DOI:10.33266/1024-6177-2026-71-6-25-31

А.В. Смирнова, Ф.А. Малахов, В. Сюе, Ю. Ван, Ю.М. Розенберг, Д.В. Кузьмин, М.В. Пустовалова, С.В. Леонов

ВЛИЯНИЕ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК СЕМЕЙСТВА miR-16 НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ ОСТЕОСАРКОМЫ К РЕНТГЕНОВСКОМУ ОБЛУЧЕНИЮ И ЦИСПЛАТИНУ

Институт биофизики будущего, Долгопрудный, Московская область

Контактное лицо: Маргарита Витальевна Пустовалова, e-mail: pu.margo@mail.ru

РЕФЕРАТ

Цель: Оценка влияния повышенной экспрессии микроРНК miR-16, а также ее пассажирских цепей miR-16-1-3p и miR-16-2-3p на ключевые характеристики клеточной линии HOS остеосаркомы (ОС) человека: пролиферацию, миграционную (прометастатическую) активность, способность к репопуляции (туморогенность) и химио- и радиочувствительность.
Материал и методы: На основе линии клеток HOS были получены стабильные сублинии с повышенной экспрессией лидерной (miR-16-5p) и двух пассажирских (miR-16-1-3p и miR-16-2-3p) цепей miR-16 с использованием лентивирусных векторов. В качестве контроля был выбран пустой (не содержащий вставки) вектор. Сублинии оценивали с помощью клоногенного анализа, миграционного теста в камерах Бойдена для оценки радиочувствительности, SRB-теста для определения чувствительности к цисплатину, динамического анализа пролиферации RTCA по измерениям клеточного импеданса на установке xCELLigence, а также анализа уровня метаболических изменений методом Alamar Blue.
Результаты: Повышенная экспрессия лидерных и пассажирских цепей miR-16 приводила к значительному снижению колониеобразующей способности как до, так и после облучения клеток, причём наиболее выраженный эффект наблюдался у пассажирских цепей. Повышение экспрессии тех же микроРНК значительно снижало способность клеток к миграции в ограниченном пространстве пор мембраны и повышала чувствительность к цисплатину, что проявлялось в снижении значений IC50. Выявлено значительное замедление пролиферации и более чем двухкратное увеличение времени удвоения клеток с повышенной экспрессией miR-16-1-3p. Повышенная экспрессия лидерных и пассажирских цепей miR-16 приводила к значительному снижению метаболизма клеток как до, так и после рентгеновского облучения.
Заключение: Повышение экспрессии лидерной и пассажирских цепей miR-16 повышало чувствительность клеток ОС человека к воздействию рентгеновского облучения и цисплатину, подавляя их способность к миграции и репопуляции. Полученные в работе данные позволяют предположить, что микроРНК семейства miR-16 могут быть использованы в качестве перспективных агентов в составе комбинированной таргетной терапии ОС.

Ключевые слова: *остеосаркома, метастазирование, микроРНК, рентгеновское облучение, цисплатин, пролиферация, miR-16, miR-16-1-3p, miR-16-2-3p*

Для цитирования: Смирнова А.В., Малахов Ф.А., Сюе В., Ван Ю., Розенберг Ю.М., Кузьмин Д.В., Пустовалова М.В., Леонов С.В. Влияние некодирующих РНК семейства miR-16 на чувствительность клеточной линии остеосаркомы к рентгеновскому облучению и цисплатину // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2026. Т. 71. № 6. С. 25–31. DOI:10.33266/1024-6177-2026-71-6-25-31

DOI:10.33266/1024-6177-2026-71-6-25-31

A.V. Smirnova, F.A. Malakhov, W. Xue, Y. Wang, J.M. Rozenberg, D.V. Kuzmin, M.V. Pustovalova, S.V. Leonov

The Effect of Non-Coding RNAs of the miR-16 Family on the Sensitivity of an Osteosarcoma Cell Line to X-Ray Irradiation and Cisplatin Treatment

Institute of Future Biophysics, Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

Contact person: M.V. Pustovalova, e-mail: pu.margo@mail.ru

ABSTRACT

Purpose: The aim of this study was to examine how increased expression of microRNAs miR-16 and its passenger strands miR-16-1-3p and miR-16-2-3p influences key biological characteristics of the human osteosarcoma HOS cell line.
Material and methods:Stable HOS sublines overexpressing the guide strand (miR-16-5p) and the two passenger strands (miR-16-1-3p and miR-16-2-3p) were generated using lentiviral vectors, with an empty vector serving as the control. The sublines were analyzed using clonogenic assays to assess colony-forming ability before and after irradiation, Boyden chamber migration assays to evaluate changes in motility and radiosensitivity, SRB assays to determine cisplatin sensitivity, real-time proliferation analysis with the xCELLigence RTCA system, and metabolic activity assessment using the Alamar Blue assay.
Results: Elevated expression of both guide and passenger strands of miR-16 significantly reduced colony formation under baseline conditions and following X-ray irradiation, with the strongest effect observed for the passenger strands. All three microRNAs reduced cell migration through membrane pores and increased sensitivity to cisplatin, as reflected by decreased IC_{50} values. Notably, overexpression of miR-16-1-3p led to marked proliferation slowdown and more than a two-fold increase in doubling time. Enhanced miR-16 expression also reduced metabolic activity both before and after irradiation.

Conclusion: Increased expression of miR-16 family microRNAs enhanced the sensitivity of osteosarcoma cells to radiation and cisplatin, while impairing their migratory and repopulation capacities. These findings indicate that miR-16 microRNAs may represent promising candidates for inclusion in combined targeted therapeutic approaches for osteosarcoma.

Keywords: *osteosarcoma, metastasis, microRNA, X-ray irradiation, cisplatin, proliferation,miR-16, miR-16-1-3p, miR-16-2-3p*

For citation: Smirnova AV, Malakhov FA, Xue W, Wang Y, Rozenberg JM, Kuzmin DV, Pustovalova MV, Leonov SV. The Effect of Non-Coding RNAs of the miR-16 Family on the Sensitivity of an Osteosarcoma Cell Line to X-Ray Irradiation and Cisplatin Treatment. Medical Radiology and Radiation Safety. 2026;71(6):25–31. DOI:10.33266/1024-6177-2026-71-6-25-31

Введение

Остеосаркома – одно из наиболее агрессивных злокачественных новообразований костной ткани, преимущественно возникающее у детей и подростков. Несмотря на успехи в хирургическом лечении и химиотерапии, выживаемость пациентов с метастатической формой заболевания остаётся крайне низкой [1–3]. В подавляющем большинстве случаев метастазы формируются в лёгких, что является ведущей причиной смертности при остеосаркоме. В связи с этим особую актуальность приобретает изучение молекулярных механизмов опухолевой прогрессии и метастазирования, в том числе на уровне некодирующих РНК.

МикроРНК (miRNA) представляют собой короткие некодирующие молекулы РНК длиной около ~18–25 нуклеотидов, регулирующие экспрессию генов на пост-транскрипционном уровне. Последовательности микроРНК распределены по всему геному, локализуясь в экзонных и интронных областях, а также в межгенных участках [4]. Их биогенез начинается с транскрипции с помощью РНК-полимеразы II, в некоторых случаях – РНК-полимеразы III, в результате чего образуется первичный транскрипт – при-миРНК [5]. Этот транскрипт характеризуется шпилечной структурой длиной 33 п.н. После транскрипции ядерный белок Drosha – РНКаза III класса катализирует первичную обработку пре-миРНК. В результате расщепления формируется промежуточная молекула – пре-миРНК, содержащая ~22 нуклеотида в стволе и ~48 нуклеотидов в терминальной петле, которая затем транспортируется в цитоплазму для дальнейшего созревания [6]. После выхода в цитоплазму пре-миРНК подвергается дальнейшей обработке с участием Dicer, другого фермента семейства РНКаз III, который расщепляет пре-миРНК до зрелой двухцепочечной миРНК длиной ~22 нуклеотида (miRNA:miRNA*, где miRNA* обозначает так называемую «пассажирскую» цепь) [7] .

После образования двухцепочечной молекулы микроРНК её цепи подвергаются разделению в АТФ-независимом процессе, механизмы которого до конца не изучены. Одна из цепей, называемая лидерная (направляющая или guide или lead strand), взаимодействует с РНК-индуцированным комплексом сайленсинга (RISC), содержащим белки семейства AGO, тем самым образуя комплекс – miRSC (miRNA-induced silencing complex) [8]. У млекопитающих выбор лидерной цепи обусловлен термодинамической стабильностью концов дуплекса: цепь, имеющая наименее стабильное спаривание на 5’–конце, с большей вероятностью будет включена в RISC. Оставшаяся цепь, обозначаемая как пассажирская (обозначаемая как miRNA* или “passenger” strand), традиционно считалась подверженной деградации [9]. Однако данные, полученные методами глубокого секвенирования микроРНК, а также экспериментальные результаты свидетельствуют о том, что значительное количество пассажирских цепей (miRNA*) не подвергается деградации, а экспрессируется на уровне, сопоставимом с уровнем соответствующей направляющей цепи. Эти наблюдения позволяют предположить, что пассажирская цепь также может загружаться в RISC, что указывает на возможность функционального участия обеих цепей.

Семейство miR-16 относится к числу наиболее изученных онко-супрессорных микроРНК. Впервые его роль в онкогенезе была показана при хроническом лимфоцитарном лейкозе, где делеция 13q14, включающая локус *MIR-16-1*, приводит к снижению уровня miR-16 и нарушению регуляции клеточного цикла и апоптоза. [10] В дальнейшем было продемонстрировано участие miR-16 в патогенезе различных солидных опухолей, включая рак молочной железы, простаты, лёгких и толстой кишки [11].

В геноме человека miR-16 кодируется двумя локусами, *MIR-16-1* (13q14.3) и *MIR-16-2* (3q25.33), которые формируют общую ведущую цепь miR-16-5p и две различные пассажирские цепи – miR-16-1-3p (13q14.3) и miR-16-2-3p (3q25.33). Эти пассажирские цепи имеют отличающиеся наборы мишеней и могут обладать самостоятельной функциональной активностью в регуляции опухолевого роста и метастазирования [12, 13].

Недавние данные свидетельствуют о снижении экспрессии miR-16-5p и miR-16-2-3p в клетках остеосаркомы, что указывает на потенциальную значимость этого семейства микроРНК в генезе ОС и формировании метастатического фенотипа [1]. Однако молекулярные механизмы участия как ведущей, так и пассажирских цепей miR-16 в чувствительности остеосаркомы к ДНК-повреждающему действию цисплатина и рентгеновского облучения остаются недостаточно изученными.

Данное исследование было направлено на изучение того, как повышенная экспрессия miR-16-5p, miR-16-1-3p и miR-16-2-3p влияет на восприимчивость к цисплатине и радиочувствительность опухолевых клеток, меняя их клоногенную выживаемость, миграционную способность, а также пролиферацию и метаболическую активность. Наши результаты показали, что повышенные уровни экспрессии как пассажирских miR-16-1-3p и miR-16-2-3p, так и лидерной miR-16 оказывают мощный опухолево-супрессирующий эффект, повышая чувствительность клеток ОС к действию цисплатина и рентгеновсокго облучения.

Материал и методы

Клеточные линии и условия их культивирования

Клетки HOS и HEK293T, полученные из American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) культивировались в среде DMEM, обогащенной 10% инактивированной при нагревании эмбриональной бычьей сывороткой (FBS), L-глутамином, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина в стандартных условиях (37°C, 5% CO_2).

Получение клеточных сублиний с повышенной экспрессией микроРНК. Клонирование плазмид

Лентивирусный вектор pLKO.3G был любезно предоставлен Кристофом Бенуа и Дианой Матис (Addgene

plasmid #14748; http://n2t.net/addgene:14748; RRID: Addgene_14748). Упаковочные плазмиды pLP1, pVSVG и pLP2 приобретены в компании Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, США).

Лентивирусные конструкции pLKO.3G-miR-16, pLKO.3G-miR-16-1*, pLKO.3G-miR-16-2* и контрольная конструкция – пустой вектор pLKO.3G, содержащие репортёрный ген EGFP для идентификации и последующей селекции популяций клеток, экспрессирующих соответствующие микроРНК, с помощью проточного сортера клеток, были получены следующим образом:

Дуплексы (1) miR-16, (2) miR-16-1*, (3) miR-16-2* были синтезированы путём отжига комплементарных олигонуклеотидов: (1) hsa-miR-16-F и miR-16-R; (2) hsa-miR-16-1*-F и miR-16-1*-R; (3) hsa-miR-16-2*-F и miR-16-2*-R. Полученные дуплексы клонировали в сайты рестрикции Acc36I и EcoRI вектора pLKO.3G, что позволило сконструировать векторы pLKO.3G-miR-16, pLKO.3G-miR-16-1* и pLKO.3G-miR-16-2*.

Корректность полученных конструкций подтверждали ПЦР с праймерами PLKO-Dir и PLKO-Rev, а также секвенированием по Сэнгеру с использованием праймеров LKO.1-5′ и PLKO-Rev.

Получение лентивирусов и клеточная трансдукция

Лентивирусы получали путем ко-трансфекции лентивирусного вектора и упаковывающих лентивирус плазмид 3-го поколения (pLP1, pLP2 и pVSVG) в клетках HEK293T с помощью Lipofectamine-3000 согласно инструкции производителя. Культуральную среду с лентивирусами собирали каждые 24 ч в течение 3 сут, фильтровали через фильтр PES 0,45 мкм и хранили при –80°C. Клетки линий HOS трансдуцировали лентивирусами в лунках 6-луночных планшетов. В дальнейшем EGFP-положительные клетки линий HOS сортировали с помощью BIO-RAD S3e (BIO-RAD, США). В дальнейших экспериментах использовались только отсортированные EGFP-положительные клетки.

Клоногенный анализ

Для анализа клоногенной выживаемости (способности к репопуляции) родительские клетки и клетки каждой сублинии, экспрессирующие соответствующие микроРНК, высевали в 6-луночные планшеты по 3×10^5 клеток на лунку. Высаженные за 24 ч до облучения клетки облучали на рентгеновской биологической установке РУСТ-М1 при параметрах: 200 кВ, 0,85 Гр/мин, ток 2 × 5 мА, фильтрация алюминием 1,5 мм (ОАО «Росэлектроника», Москва, Россия). Необлученные клетки анализировались через те же промежутки времени, что и после облучения.

После воздействия ионизирующего излучения клетки высевали на 6-луночные планшеты с различной плотностью посева, соответствующей используемым дозам 100 и 2000 клеток для 0 и 6 Гр соответственно. Культивирование осуществляли в течение 12 сут до формирования отчетливых колоний. Затем клетки фиксировали метанолом (15 мин) и окрашивали красителем Гимза (15 мин).

Колонии, содержащие не менее 50 клеток, подсчитывали. Параметры клоногенной активности рассчитывали на основе трёх независимых экспериментов. Эффективность образования колоний (PE) определяли по формуле:

$$PE = \frac{\text{число сформированных колоний}}{\text{число посеянных клеток}} \times 100\% . \quad (1)$$

Анализ миграции с использованием камер Бойдена

Для анализа миграционной активности клетки предварительно инкубировали в безсывороточной среде в течении 12 ч в CO_2 инкубаторе (5% CO_2) при 37°C, после чего высевали по 1×10^4 клеток в 100 мкл бессывороточной среды в верхние камеры 24-луночных трансвелл-вставок с полупроницаемой мембраной (с порами размером 8 мкм, EDM Millipore). В нижние лунки добавляли среду, содержащую 10% FBS и создающую хемоаттрактантный градиент. Инкубацию проводили 24 ч при 37°C и 5% CO_2. Немигрировавшие клетки с апикальной стороны мембраны вставки удаляли ватным аппликатором, а промигрировавшие клетки на базальной стороне мембраны фиксировали в 70% метанолом в течение 10–15 мин и высушивали. Мембраны вставок окрашивали 0,2% раствором кристаллического фиолетового (3–5 минут), промывали PBS и повторно высушивали. Количество мигрировавших клеток определяли с помощью микроскопа Leica DM2000 при увеличении ×20 путём подсчёта окрашенных клеток в трёх репрезентативных полях зрения для каждой вставки.

Определение массы клеток окрашиванием сульфородамином B (SRB тест)

Клетки высевали в 96-луночные планшеты по 1×10^4 клеток в 100 мкл среды на лунку и инкубировали 24 ч при 37 °C. Затем в лунки добавляли цисплатин (Цисплатин-ЛЕНС®, ООО «Верофарм», Россия или цис-ДДП), разведённый в полной среде до конечных концентраций 0,25–80 мкМ; каждая концентрация анализировалась как минимум в трех повторностях.

Клеточную массу в результате цитотоксического действия цис-ДДП оценивали через 48 ч методом окрашивания сульфородамином B (SRB). Клетки фиксировали 5% трихлоруксусной кислотой (1 ч, 4°C), промывали водой и после высушивания окрашивали раствором SRB (20 мин, комнатная температура). Несвязанный с клеточной массой краситель удаляли промывкой 1% уксусной кислотой, после чего количество связанного с массой красителя определяли путем экстракции Tris-буфером, pH 10,5 и измерением оптической плотности при 510 нм на спектрофотометре CLARIOstar (BMG LABTECH, Германия). Количество выживших клеток определяли по количеству связанного SRB, который пропорционален общей клеточной массе в каждой лунке. Значения IC_{50} рассчитывали регрессионным анализом кривых «доза–ответ» с использованием программного пакета GraphPad Prism 8.

Оценка пролиферации клеток с помощью анализатора импеданса клеточного монослоя xCELLigence RTCA

Для оценки влияния повышенной экспрессии микроРНК на пролиферацию родительской линии и сублиний клеток HOS использовался анализатор xCELLigence RTCA, который позволяет регистрировать импеданс клеточного монослоя в режиме реального времени.

Перед началом эксперимента E-Plate 16 подготовили путем добавления 50 мкл среды в каждую лунку и регистрации базового импеданса. После этого в каждую лунку планшета высевали по 1000 клеток в объеме 100 мкл и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин для равномерного оседания клеток на дно лунки. Планшет помещали в анализатор xCELLigence RTCA для мониторинга клеточной динамики в реальном времени. Измерения импеданса (индекс клеток) проводили каждые 15 мин в течение первых 4 ч и затем каждые 30 мин на протяжении 150 ч. Все эксперименты про-

водили в трех биологических повторах для повышения достоверности результатов. Полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения xCELLigence RTCA Software. Влияние повышенной экспрессии микроРНК на пролиферацию интерпретировали по изменению индекса клеток относительно контрольной группы на различных временных интервалах.

Оценка метаболической активности клеток ОС с использованием теста Alamar Blue

Для исследования влияния микроРНК на метаболизм клеток остеосаркомы без и в результате ионизирующего облучения, клетки высевали в 96-луночные планшеты из расчёта 1 × 10^4 клеток на 100 мкл ростовой среды. Через 24 часа инкубации клетки либо оставляли в инкубаторе (0 Гр), либо подвергали рентгеновскому облучению в дозе 10 Гр на биологической установке РУСТ-М1 (200 кВ, 0,85 Гр/мин, 2 × 5 мА, фильтр 1,5 мм Al; ОАО «Росэлектроника», Москва, Россия). Через 48 ч после облучения в каждую лунку с облученными и необлученными клетками добавляли 10 мкл реагента Alamar Blue. Интенсивность флуоресценции измеряли спустя 3 часа при 530 нм с использованием спектрофотометра CLARIOstar (BMG LABTECH, Германия). Полученные значения нормировали относительно контроля – родительских клеток, не подвергавшихся облучению.

Результаты и обсуждение

Клоногенный анализ

Для оценки влияния повышенной экспрессии miR-16-5p, miR-16-1-3p и miR-16-2-3p на колониеобразующую способность клеток до и после облучения были получены стабильные клеточные сублинии с использованием трансдукции клеток лентивирусными векторами, кодирующими соответствующие последовательности микроРНК. В качестве отрицательного контроля использовали клетки, трансдуцированные пустым вектором pLKO.3G.

Как представлено на рис. 1 А, в отсутствие облучения повышенная экспрессия пассажирских цепей miR-16-1-3p и miR-16-2-3p в клетках приводит к статистически значимому снижению эффективности образования колоний примерно в три раза по сравнению с контролем. Те же клеточные сублинии под влиянием облучения в дозе 6 Гр продемонстрировали более чем 70- и 130-кратное снижение способности к репопуляции соответственно (рис. 1 Б). Эти результаты могут указывать на то, что экспрессия именно пассажирских цепей miR-16-1-3p и miR-16-2-3p имеет наиболее существенное значение для репопуляции клеток после ДНК-повреждающего действия рентгеновского излучения на клетки ОС. При тех же условиях повышенная экспрессия лидерной цепи miR-16-5p либо не демонстрирует (без облучения), либо только в 68 раз снижает (6 Гр) этот параметр, что может указывать на ее менее существенную роль в процессе репопуляции клеток ОС в ответ на повреждения ДНК. Таким образом, повышенная экспрессия особенно пассажирских цепей miR-16-1-3p и miR-16-2-3p и в меньшей степени лидерной цепи miR-16-5p значительно сенсибилизирует клетки ОС к воздействию ионизирующего излучения.

В целом наши данные свидетельствуют о том, что такая высокая функциональная активность miR-16-1-3p и miR-16-2-3p указывает на особую биологическую значимость пассажирских цепей, роль которых долгое время оставалась недооцененной. Таким образом, модуляция экспрессии микроРНК семейства miR-16 представляется перспективной стратегией для повышения эффективности лучевой терапии, особенно при использовании комбинированных подходов к лечению ОС.

Анализ миграции с использованием камер Бойдена

Метастатические клетки характеризуются повышенной подвижностью и деформируемостью, что позволяет им преодолевать плотные тканевые барьеры через узкие пространства между тяжами внеклеточного матрикса (ВКМ) вокруг опухоли. Для оценки способности опухолевых клеток к миграции в условиях физического ограничения применяется анализ с использованием камеры Бойдена. В этой системе клетки проходят через пористую мембрану (с размером пор около 8 мкм) под

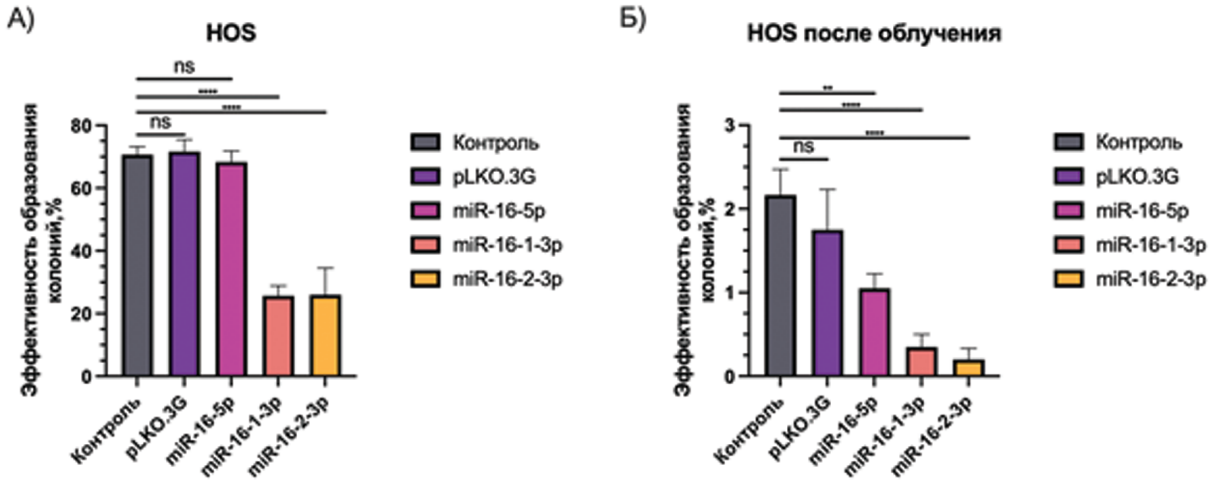


Рис. 1. Влияние повышенной экспрессии miR-16-5p, miR-16-1-3p и miR-16-2-3p на эффективность образования колоний клетками HOS до (А) и после (Б) облучения в дозе 6 Гр. В качестве контролей использованы клетки, трансдуцированные исходным (без вставки какой-либо miR последовательности) вектором pLKO.3G, и родительские не трансдуцированные клетки HOS. Значения по оси ординат представляют собой средние значения ± стандартное отклонение по результатам трех независимых экспериментов. * $p < 0,05$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,00001$

Fig. 1. Effect of increased expression of miR-16-5p, miR-16-1-3p, and miR-16-2-3p on the colony-forming efficiency of HOS cells before (A) and after (Б) irradiation at a dose of 6 Gy. As controls, HOS cells transduced with the original pLKO.3G vector (lacking any miRNA insert) and parental non-transduced HOS cells were used. The values on the Y-axis represent the mean ± standard deviation from three independent experiments. * $p < 0.05$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.00001$

влиянием трофического градиента концентрации эмбриональной сыворотки. Количество клеток, проникнувших сквозь поры мембран, отражает их миграционный потенциал и коррелирует с инвазивностью и метастатической активностью.

Повышенная экспрессия как miR-16-5p, так и пассажирских цепей – miR-16-1-3p и miR-16-2-3p – приводит к значительному снижению числа мигрировавших клеток в соответствующих сублиниях HOS клеток, как показано на рис. 2. Проведение данного эксперимента с использованием камер Бойдена особенно важно в контексте канцерогенеза, поскольку миграция клеток злокачественных новообразований через плотные ткани и базальные мембраны ВКМ – критический этап метастазирования. Поэтому способность клеток преодолевать такие барьеры напрямую связана с их инвазивным потенциалом. Таким образом, выявленное значительное снижение миграции при экспрессии лидерной и пассажирских цепей miR-16 может указывать на их функциональную роль в метастазировании опухолевых клеток, что еще раз подчеркивает их значимость как потенциальных мишеней для противоопухолевой терапии, направленной на предотвращение распространения опухоли.

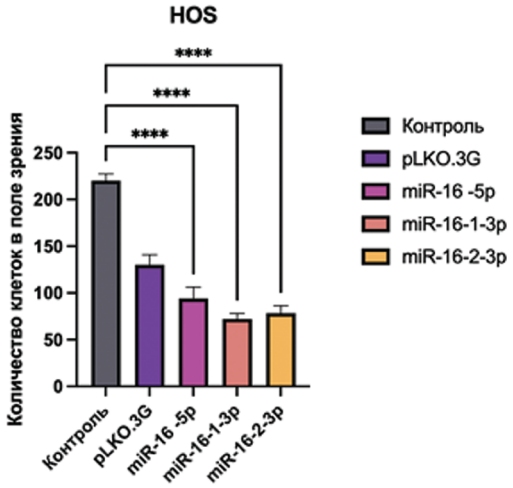


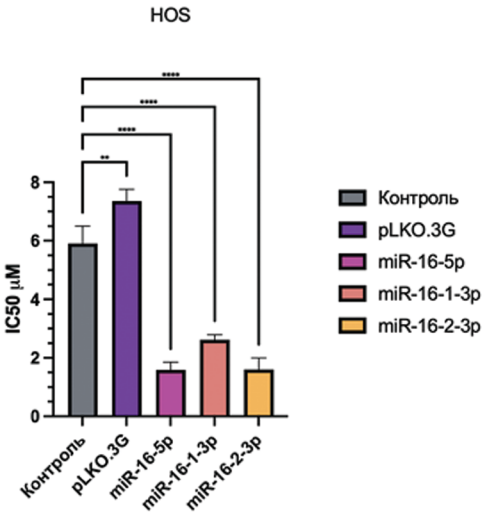
Рис. 2. Способность клеток HOS к миграции в ограниченном пространстве вдоль градиента хемоаттрактанта, определенная с помощью камер Бойдена с порами 8 мкм. Количество мигрировавших клеток по оси ординат представляют собой средние значения ± стандартное отклонение по результатам трех независимых экспериментов. ****$p < 0{,}0001$

Fig. 2. Migration ability of HOS cells in a confined space along a chemoattractant gradient, assessed using Boyden chambers (8-μm pore size). The number of migrated cells shown on the Y-axis represents the mean ± standard deviation from three independent experiments. **** $p < 0.0001$

Влияние повышенной экспрессии miR-16-5p, miR-16-1-3p и miR-16-2-3p на чувствительность клеточной линии HOS к цисплатину

Цисплатин является одним из наиболее эффективных и широко применяемых химиотерапевтических препаратов для лечения остеосаркомы. Поэтому мы проанализировали возможное влияние повышенной экспрессии микроРНК на чувствительность клеток к цисплатину.

Мы показали, что повышенная экспрессия miR-16-5p, miR-16-1-3p или miR-16-2-3p в клетках HOS снижала концентрацию цисплатина, необходимую для 50% гибели клеток, в 3,6, 2,5 и 3,1 раза соответственно (рис. 3). Значительное снижение значений IC50 может свидетельствовать о существенном повышении чувствительности клеточных сублиний к действию цисплатина по сравнению с их родительскими клетками. Таким образом, эти результаты позволяют сделать предположение о том, что экспрессия лидерной и пассажирских цепей miR-16 может влиять на чувствительность клеток ОС к химиотерапии через модуляцию апоптозных или пролиферативных механизмов. Более того, полученные данные открывают перспективу использования микроРНК семейства miR-16 в качестве терапевтических агентов при адъювантной или комбинированной химиотерапии.



	Контроль	pLKO.3G	miR-16-5p	miR-16-1-3p	miR-16-2-3p
IC50 (мкМ)	5.916	7.257	1.665	2.455	1.994

Рис. 3. Анализ чувствительности к цисплатину у трансдуцированных либо контрольным (pLKO.3G), либо микроРНК кодирующим лентивирусом, а также не трансдуцированных (контроль) клеток. Дозозависимое от концентрации цисплатина количество клеток HOS оценивали с помощью теста с сульфородамином В. Значения IC50 (мкМ) для всех типов клеток вычислялись с помощью алгоритмов, входящих в программный пакет GraphPad Prism™ и указаны в таблице под графиками. * $p < 0{,}05$, *** $p \le 0{,}001$, **** $p \le 0{,}00001$

Fig. 3. Analysis of cisplatin sensitivity in HOS cells transduced either with the control lentiviral vector (pLKO.3G) or with miRNA-encoding constructs, as well as in non-transduced control cells. The dose-dependent changes in viable HOS cell number upon exposure to increasing concentrations of cisplatin were assessed using the sulforhodamine B (SRB) assay. IC_{50} values (μM) for all cell types were calculated using algorithms implemented in the GraphPad Prism™ software package and are shown in the table below the graphs. * $p < 0.05$, *** $p \le 0.001$, **** $p \le 0.00001$

Оценка влияния повышенной экспрессии микроРНК на пролиферацию с помощью анализатора xCELLigence RTCA импеданса клеточного монослоя

Клеточная пролиферация является важным показателем функционального состояния клеток и критически связана с онкогенными процессами. В нашем исследовании влияние повышенной экспрессии выбранных микроРНК на пролиферацию клеток HOS оценивали с использованием системы xCELLigence RTCA, позволяющей в режиме реального времени регистрировать изменения импеданса клеточного монослоя и построить кинетические кривые роста. Непрерывное измерение импеданса позволяет в режиме реального времени отслеживать клеточные события, включая пролиферацию и гибель клеток. На основе динамики клеточного индекса рассчитывали скорость пролиферации и время удвоения для каждой экспериментальной группы.

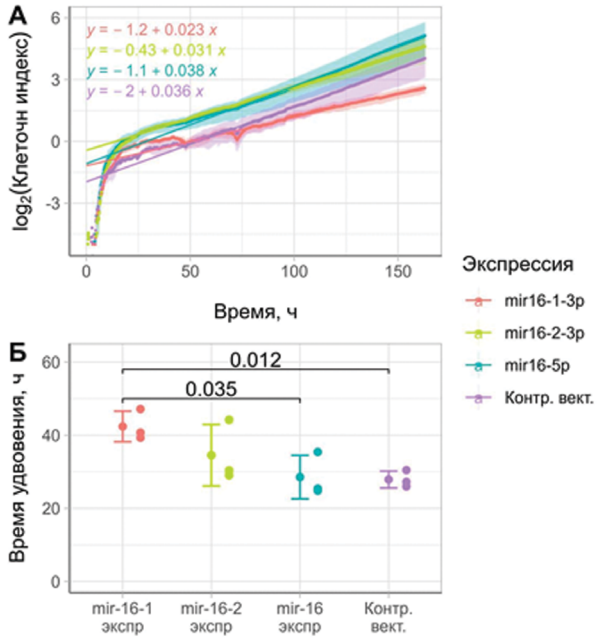


Рис. 4. Влияние повышенной экспрессии микроРНК на кинетику роста (А) и время удвоения (Б) сублиний клеток HOS, экспрессирующих различные микроРНК (miR-16-5p, miR-16-1-3p, miR-16-2-3p), по сравнению с контрольными (pLKO.3G трансдуцированными) клетками. Анализ проводился с помощью метода анализа клеточных процессов в реальном времени (RTCA или Real-Time Cell Analysis) с помощью анализатора xCELLigence RTCA на основе измерения клеточного импеданса

Fig. 4. Effect of increased microRNA expression on the growth kinetics (A) and doubling time (Б) of HOS cell sublines expressing different microRNAs (miR-16-5p, miR-16-1-3p, miR-16-2-3p) compared with control cells transduced with the pLKO.3G vector. The analysis was performed using real-time cell analysis (RTCA) with the xCELLigence RTCA system based on impedance-based measurements of cell proliferation

На основании данных, представленных на рис. 4, можно сделать вывод о различном влиянии главной и пассажирских цепей miR-16 на пролиферацию клеток остеосаркомы HOS. На графике А отражена кинетика роста клеток, полученная с помощью системы xCELLigence RTCA, где видно, что сверхэкспрессия miR-16-1-3p приводит к заметному снижению импеданса по сравнению с контрольной группой (vector). Это указывает на значительное ингибирование пролиферации клеток под действием miR-16-1-3p.

График Б подтверждает данный вывод, демонстрируя почти двукратное увеличение времени удвоения клеточной популяции, достигающего приблизительно 45 ч, что статистически значимо выше по сравнению с контрольной группой время (23 ч, p = 0,012) и с группой время miR-16-5p (p = 0,035). В то же время, повышенная экспрессия miR-16-5p и miR-16-2-3p не оказывала выраженного влияния на время удвоения клеток, которое было сопоставимо с контролем, несмотря на умеренные различия в начальной фазе роста (график А).Таким образом, полученные результаты подчеркивают ключевую роль именно пассажирской цепи miR-16-1-3p (или miR-16-1*) в существенном замедлении роста клеток HOS. Выявление различий в анти-пролиферативной активности внутри семейства miR-16 может быть связано с различным влиянием на метаболизм опухолевых клеток и может быть полезным при выборе наиболее эффективной формы микроРНК для использования в качестве терапевтического агента.

Оценка влияния микроРНК на метаболизм клеток ОС с использованием теста Alamar Blue

Радиотерапия является одним из важнейших методов лечения остеосаркомы, поэтому оценка влияния микроРНК на метаболизм опухолевых клеток после облучения представляет значительный интерес. Реагент Alamar Blue содержит резазурин – индикаторный краситель окислительно-восстановительного процесса. Краситель восстанавливается до резоруфина ферментами в митохондриях живых клеток, обладающих высокой метаболической активностью. Образующийся резоруфин обладает выраженной флуоресценцией, и её интенсивность регистрируется с помощью планшетного ридера. Поскольку уровень флуоресцентного сигнала напрямую коррелирует с числом метаболически активных клеток, данная методика позволяет количественно оценивать их метаболическую активность. С использованием теста Alamar Blue было исследовано как повышенная экспрессия miR-16-5p, miR-16-1-3p и miR-16-2-3p влияет на метаболическую активность клеток в ответ на облучение.

Полученные данные показывают, что даже в отсутствие радиационного воздействия интенсивность флуоресценции снижается приблизительно на 50% в клетках, экспрессирующих повышенные концентрации исследуемых микроРНК, что указывает на влияние экспрессии лидерной и пассажирских цепей miR-16 на митохондриальную активность клеток ОС. (рис. 5) После облучения наблюдается дальнейшее статистически значимое уменьшение сигнала Alamar

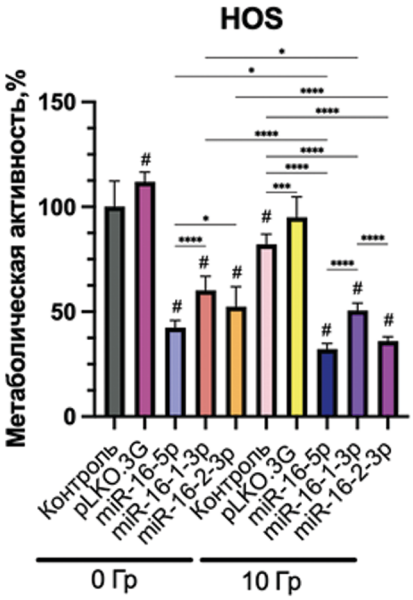


Рис. 5. Влияние повышенной экспрессии miR-16-5p, miR-16-1-3p и miR-16-2-3p на метаболическую активность сублиний клеток HOS до (0 Гр) и после облучения в дозе 10 Гр измеренную с помощью Alamar Blue метода через 72 ч после облучения. В качестве контролей использованы клетки, трансдуцированные исходным (без вставки какой-либо miR последовательности) вектором pLKO.3G, и родительские (контроль) не трансдуцированные клетки. Знак # обозначает статистически значимые различия по сравнению с группой «Контроль, 0 Гр». * p < 0,05, *** p ≤ 0,001, **** p ≤ 0,00001

Fig. 5. Effect of increased expression of miR-16-5p, miR-16-1-3p, and miR-16-2-3p on the metabolic activity of HOS cell sublines before (0 Gy) and after irradiation at a dose of 10 Gy, measured using the Alamar Blue assay 72 hours post-irradiation. As controls, HOS cells transduced with the original pLKO.3G vector (lacking any miRNA insert) and parental non-transduced cells (Control) were used. The symbol # indicates statistically significant differences compared with the “Control, 0 Gy” group. * p < 0.05, *** p ≤ 0.001, **** p ≤ 0.00001

Blue в этих же клеточных линиях, что может свидетельствовать об аддитивном эффекте радиации и исследуемых микроРНК на снижение метаболической активности клеток ОС по сравнению с контролем. Следует отметить, что наиболее выраженный эффект наблюдался при повышенной экспрессии лидерной цепи miR-16.

В целом полученные данные позволяют предположить, что микроРНК семейства miR-16 влияют на регуляцию сигнальных путей, участвующих в метаболическом клеточном ответе на ионизирующее излучение, что может иметь важное значение при разработке таргетных комбинированных терапевтических подходов с использованием этих микроРНК.

Заключение

В настоящем исследовании показано, что повышенная экспрессия как лидерной miR-16-5p, так и пассажирских miR-16-1-3p и miR-16-2-3p цепей существенно подавляет ключевые злокачественные свойства клеток остеосаркомы. Полученные данные демонстрируют, что все изоформы miR-16 обладают выраженными онко-супрессорными свойствами, проявляющимися в снижении пролиферации, подавлении миграционной активности и повышении чувствительности клеток ОС к цисплатину и ионизирующему излучению.

Особенно значимым является выявленный эффект пассажирских цепей, которые долгое время считались нестабильными и быстро деградирующими. В нашей работе miR-16-1-3p и miR-16-2-3p продемонстрировали сопоставимую или даже более выраженную активность по сравнению с лидерной цепью, что подтверждает их функциональную значимость и роль в регуляции злокачественного фенотипа клеток остеосаркомы.

Наблюдаемое усиление радиочувствительности и химиочувствительности при повышенной экспрессии различных цепей miR-16 указывает на то, что эта группа микроРНК может играть критическую роль в регуляции ответов на повреждение ДНК, апоптоз и метаболические процессы. Эти результаты открывают возможность использования микроРНК семейства miR-16 в качестве перспективных биомаркеров для прогнозирования эффективности терапии, а также как потенциальных терапевтических агентов или адъювантов при комбинированном лечении остеосаркомы.

Таким образом, наше исследование подчёркивает значимость многоуровневой функциональной организации как ведущих, так и пассажирских цепей малых некодирующих РНК (в частности, микроРНК или miRNA) и демонстрирует их высокую терапевтическую ценность, что формирует основу для дальнейшей разработки микроРНК-ориентированных стратегий лечения остеосаркомы.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

1. Jones K.B., Salah Z., Del Mare S., Galasso M., Gaudio E., Nuovo G.J., et al. MiRNA Signatures Associate with Pathogenesis and Progression of Osteosarcoma. Cancer Res 2012;72:1865–77. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2663.
2. Zhao X., Wu Q., Gong X., Liu J., Ma Y. Osteosarcoma: a Review of Current and Future Therapeutic Approaches. Biomed Eng Online 2021;20:24. Doi: 10.1186/s12938-021-00860-0.
3. Hattinger C.M., Patrizio M.P., Fantoni L., Casotti C., Riganti C., Serra M. Drug Resistance in Osteosarcoma: Emerging Biomarkers, Therapeutic Targets and Treatment Strategies. Cancers 2021;13:2878. Doi: 10.3390/cancers13122878.
4. Altuvia Y. Clustering and Conservation Patterns of Human MicroRNAs. Nucleic Acids Res 2005;33:2697–706. Doi: 10.1093/nar/gki567.
5. Lee Y., Kim M., Han J., Yeom K-H., Lee S., Baek S.H., et al. MicroRNA Genes are Transcribed by RNA Polymerase II. EMBO J. 2004;23:4051–60. Doi: 10.1038/sj.emboj.7600385.
6. Zeng Y., Cullen B.R. Sequence Requirements for Micro RNA Processing and Function in Human Cells. RNA 2003;9:112–23. Doi: 10.1261/rna.2780503.
7. Gregory R.I., Chendrimada T.P., Cooch N., Shiekhattar R. Human RISC Couples MicroRNA Biogenesis and Posttranscriptional Gene Silencing. Cell 2005;123:631–40. Doi: 10.1016/j.cell.2005.10.022.
8. Kawamata T., Tomari Y. Making RISC. Trends Biochem Sci 2010;35:368–76. Doi: 10.1016/j.tibs.2010.03.009.
9. Schwarz D.S., Hutvágner G., Du T., Xu Z., Aronin N., Zamore P.D. Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. Cell 2003;115:199–208. Doi: 10.1016/S0092-8674(03)00759-1.
10. Calin G.A., Dumitru C.D., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., et al. Frequent Deletions and Down-Regulation of MicroRNA Genes MiR15 and MiR16 at 13q14 in Chronic Lymphocytic Leukemia. Proc Natl Acad Sci 2002;99:15524–9. Doi: 10.1073/pnas.242606799.
11. Yang L., Yang S., Ren C., Liu S., Zhang X., Sui A. Deciphering the Roles of MiR-16-5p in Malignant Solid Tumors. Biomed Pharmacother 2022;148:112703. Doi: 10.1016/j.biopha.2022.112703.
12. Ye T., Liang Y., Zhang D., Zhang X. MicroRNA-16-1-3p Represses Breast Tumor Growth and Metastasis by Inhibiting PGK1-Mediated Warburg Effect. Front Cell Dev Biol 2020;8:615154. Doi: 10.3389/fcell.2020.615154.
13. Han T, Wu N, Wang Y, Shen W, Zou J. MiR-16-2-3p Inhibits Cell Proliferation and Migration and Induces Apoptosis by Targeting PDPK1 in Maxillary Primordium Mesenchymal Cells. Int J Mol Med 2019. Doi: 10.3892/ijmm.2019.4070.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (№ 23-14-00220) и Министерства науки и высшего образования РФ, проект FSMG-2026-0018 (соглашение от 16.01.2026 № 075-03-2026-305).

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Поступила: 20.06.2026. Принята к публикации: 25.07.2026.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Financing. The study was financially supported by a grant from the Russian Science Foundation (No. 23-14-00220) and the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, project FSMG-2026-0018 (agreement dated January 16, 2026 No. 075-03-2026-305).

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Article received: 20.06.2026. Accepted for publication: 25.07.2026.