

文章编号:1000-5404(2014)13-1365-05

论著

miRNA-224 通过 HOXD10 影响 Hep3B 细胞迁移

丁琛琛¹, 李琼², 王阁¹ (400042 重庆, 第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心¹; 400038 重庆, 第三军医大学基础医学部教学实验中心²)

[摘要] 目的 探讨 miR-224 影响肝癌细胞迁移的可能机制。方法 采用双荧光素酶实验、载体构建和 Western blot 实验等对预测的 miR-224 靶基因进行验证。qRT-PCR 检测正常肝细胞株 L02 和肝癌细胞株 Hep3B 中 miR-224 的表达; 划痕实验观察 miR-224 对肝癌细胞迁移的影响。结果 qRT-PCR 结果显示, 与正常肝细胞株 L02 比较, miR-224 在肝癌细胞株 Hep3B 中明显高表达(相对表达倍数 1.679 2, $P < 0.05$); 划痕实验显示, 与 miR-224 mimics 阴性对照组(迁移率: 56.43% ~ 58.33%) 以及空白组(迁移率: 60.48% ~ 66.94%) 比较, miR-224 mimics 组(迁移率: 80.12% ~ 82.02%) 的 Hep3B 细胞迁移能力明显增强($P < 0.05$), 反之亦然, 提示 miR-224 表达水平和肝癌细胞的迁移能力成正相关; 双荧光素酶实验结果显示: 与对照组比较, miR-224 mimics 组细胞的荧光信号明显下降($P < 0.05$); Western blot 实验结果显示: 与对照组比较, 上调 miR-224 的表达水平后 HOXD10 表达下降, 下调其表达水平 HOXD10 表达上升($P < 0.05$)。结论 miR-224 通过调控靶基因 HOXD10 的表达, 参与调节肝癌细胞的迁移。

[关键词] 肝细胞肝癌; miRNA-224; HOXD10; 迁移

[中图分类号] R394.3; R73-37; R735.7

[文献标志码] A

MiR-224 promotes cell migration by targeting HOXD10 in Hep3B cells

Ding Chenchen¹, Li Qiong², Wang Ge¹ (¹Cancer Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042; ²Experimental Center of Basic Medicine, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the possible underlying mechanism that miR-224 affects the migration of liver cancer cells. **Methods** A luciferase reporter assay was used to confirm that the gene HOXD10 was one direct target of miR-224. qRT-PCR, Western blotting, and scratch wound migration assay were used to clarify the molecular mechanism of miR-224 in the regulation of cell migration in human hepatocellular carcinoma line Hep3B. **Results** qRT-PCR indicated the expression of miR-224 was significantly stronger in Hep3B cells than in human hepatic L02 cells (relative expression ratio: 1.679 2, $P < 0.05$). Scratch wound migration assay showed that transfection of miR-224 resulted in significantly increased ratio of migration (80.12% to 82.02%, $P < 0.05$) in Hep3B cells than the cells transfected by miR-224 mimic negative control (56.43% to 58.33%) and by blank vector (60.48% to 66.94%). Compared with the miR-224 negative control, the luciferase activity was significantly decreased in 293 cells with miR-224 mimic (0.633 2). miR-224 affected the migration ability of HCC via directly targeting HOXD10. **Conclusion** miR-224 is involved in the regulation of hepatoma cell migration via directly targeting HOXD10.

[Key words] human hepatocellular carcinoma; miR-224; HOXD10; migration

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2011jja0634). Corresponding author: Wang Ge, E-mail: wangge70@hotmail.com

原发性肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)具有恶性程度高、侵袭转移快和预后差的特点, 位居世界常见肿瘤的第5位^[1]。其癌细胞侵袭和转移是治疗的一大难题, 也是决定其预后的关键环节^[2]。目前对于

肝癌细胞的侵袭、转移的具体机制还不十分明了。

MicroRNAs 是一类分布广泛的非编码蛋白质的小RNAs, 通过与靶 mRNA 分子的3'端非编码区互补结合, 在翻译水平特异性抑制靶基因的表达, 参与调节多种疾病发生的生物学信号通路, 并具有类似抑癌基因或癌基因的功能^[1,3]。大量研究发现, miRNA 的异常表达和 HCC 的侵袭和转移密切相关。例如: miR-122 可抑制肝癌细胞的迁移、浸润和生长^[4]; miR-34a 通过

[基金项目] 重庆市自然科学基金支持(CSTC2011jja0634)

[通信作者] 王阁, E-mail: wangge70@hotmail.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140313.1308.004.html> (2014-03-13)

抑制 c-Met 的功能,抑制肝癌细胞的侵袭和转移;miR-21 通过抑制 PTEN 的活性,促进肝癌细胞的生长、转移和侵袭^[5]。而 miR-224 在肝癌组织和肝癌细胞中明显高表达,目前研究证实其参与了肝癌细胞的增殖、凋亡等过程的调节^[2]。我们前期的研究提示,miR-224 还可能是参与调控肝癌细胞侵袭、迁移的重要分子^[6]。

在 miR-224 预测的众多靶基因中,关于调控细胞凋亡^[2]、增殖^[7]等的研究较多,但涉及侵袭和迁移的研究很少,而 HOXD10 受 miR-10b 的调控参与调节乳腺癌细胞的侵袭和迁移能力^[8]。因此我们锁定 HOXD10 作为研究重点,尝试探讨其在肝癌细胞迁移中的机制。HOXD10 是 HOX 基因家族成员之一,是细胞增殖分化的调节基因,参与细胞的分化和发育过程。HOXD10 基因的持续表达能够在体内抑制新生血管的发生,有助于上皮细胞维持持久的分化表型,同时还能够抑制 miR-224 整合素、MMP-14 和 UPAR 等基因的表达^[9]。我们高度怀疑 HOXD10 是 miR-224 参与调控肝癌细胞侵袭和转移的直接靶基因。

本研究对预测的靶基因进行验证,并探讨 miRNA-224 影响肝癌细胞迁移能力的可能机制,从而为靶向治疗 HCC 提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 miRNA 靶基因预测

通过 TargetScan、PicTar 和 miRBase 等筛选出 miRNA-224 的靶基因。

1.2 细胞株和组织样本

人肾上皮细胞 293 细胞,正常肝细胞株 L02 以及肝癌细胞株 Hep3B(上海细胞生物研究所)。细胞使用 DMEM,加 10% 胎牛血清(HyClone 公司, Logan, UT, USA)以及 1% 的抗生素(青霉素/链霉素)(Invitrogen 公司)于 37 °C,5% CO₂ 的孵箱中培养。

1.3 双荧光素酶实验

对 293 细胞株分 2 组,①NC 组(对照组):共转染 pYr-Mir-Target-HOXD10-3U 报告质粒(YRBIO, 湖南)和 miRNA NC (GenePharma, 上海);②MI 组:共转染 pYr-MirTarget-HOXD10-3U 报告质粒和 hsa-miR-224 mimics (GenePharma, 上海)。细胞转染 24 h 后,依据双荧光素酶检测试剂盒(Promega)说明处理细胞,使用双荧光素酶检测仪器(Sirius single tube luminometer, Berthold)检测。萤火虫荧光素酶作为内参。

1.4 细胞转染

正常肝细胞株 L02 以及肝癌细胞株 Hep3B,使用 6 孔板接种,密度为 50%。使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司)和 miRNA NC、hsa-miR-224 mimics (50 nmol/L)、hsa-miR-224 inhibitor (100 nmol/L) (GenePharma, 上海)转染。48 h 后收集细胞并做相应实验。所有的转染独立进行 3 次。

1.5 免疫印迹检测

Hep3B 细胞分为 4 组,①MI 组:细胞采用 Lipofectamine

2000 + hsa-miR-224 mimics 进行转染;②MI-NC 组:细胞采用 Lipofectamine 2000 + hsa-miR-224 mimics-negative control (GenePharma, 上海)进行转染;③IN 组:细胞采用 Lipofectamine 2000 + hsa-miR-224 inhibitor 进行转染;④IN-NC 组:细胞采用 Lipofectamine 2000 + hsa-miR-224 inhibitor-negative control 进行转染。转染 48 h 后的细胞使用裂解液 RIPA 提取蛋白,具体方法参照^[6]。孵育一抗(rabbit anti-HOXD10, Abcam), 1:1 000, 4 °C, 2 h。二抗(alkaline phosphatase-conjugated rabbit IgG, Sigma), 1:10 000, 室温, 1 h。GAPDH 作为内参。使用 ECL 检测试剂检测条带信号(Amersham)。

1.6 RNA 提取和 qRT-PCR 检测

使用 TRIzol (Invitrogen 公司)法提取总 RNA,分光光度法用于检测 RNA 样本的浓度和纯度,并对 RNA 完整性进行评价。

qRT-PCR 用于检测 miRNA-224 和 HOXD10 的水平。依据说明使用逆转录试剂盒(Toyobo 公司,日本)逆转录合成 cDNA,再进行 qRT-PCR 定量。最后上机(Applied Biosystems)检测。

1.7 划痕实验

Hep3B 细胞进行分组。①空白组:细胞采用 Lipofectamine 2000 进行转染;②MI 组:细胞采用 Lipofectamine 2000 + hsa-miR-224 mimics 进行转染;③MI-NC 组:细胞采用 Lipofectamine 2000 + hsa-miR-224 mimics-negative control 进行转染;④IN 组:细胞采用 Lipofectamine 2000 + hsa-miR-224 inhibitor 进行转染;⑤IN-NC 组:细胞采用 Lipofectamine 2000 + hsa-miR-224 inhibitor-negative control 进行转染;⑥SI 组:细胞采用 Lipofectamine 2000 + siRNA-HOXD10 (GenePharma, 上海)进行转染;⑦SI-NC 组:细胞采用 Lipofectamine 2000 + siRNA-HOXD10-negative control (GenePharma, 上海)进行转染。转染 48 h 后的 Hep3B 细胞,用 200 μL 的枪头垂直划痕,24 h 后观察细胞迁移情况。

$$\text{迁移率} = (d_{0h} - d_{24h}) / d_{0h} \times 100\%$$

1.8 统计学分析

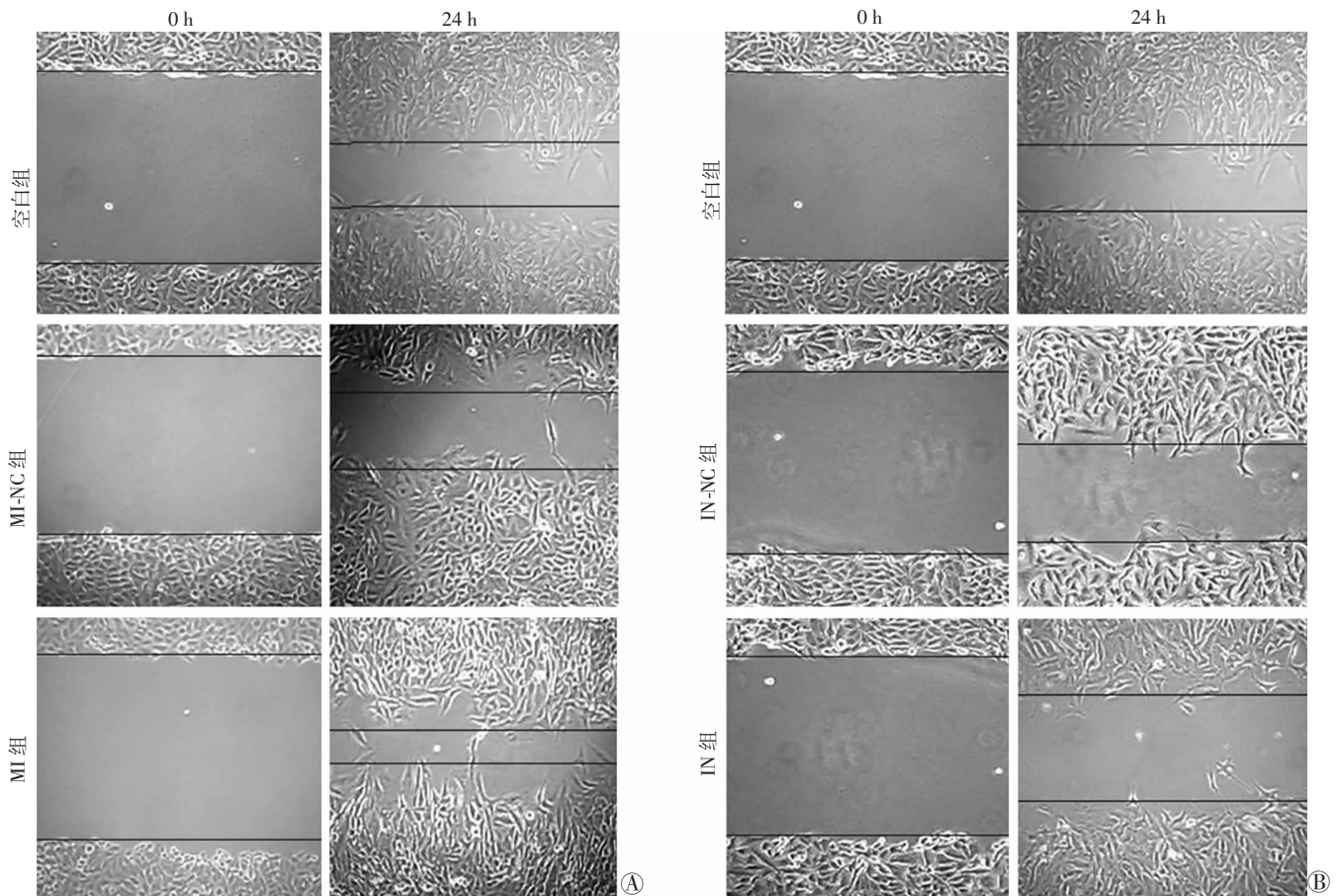
数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析。组间差异采用单因素方差分析。

2 结 果

2.1 miR-224 在肝癌细胞中高表达,并与肝癌细胞的迁移能力相关

实时荧光定量 PCR 检测结果显示:与正常肝细胞株 L02 (相对表达倍数 1)比较,肝癌细胞株 Hep3B 中 miR-224 高表达(相对表达倍数 1.679 2, $P < 0.05$)。

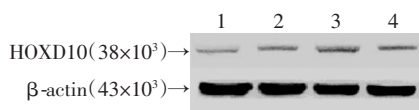
在 Hep3B 细胞中转染 miR-224 mimics,上调 miR-224 的表达,并应用划痕实验检测细胞迁移能力的变化。结果显示:相对于 MI-NC 组(迁移率:56.43% ~ 58.33%)及空白组(迁移率:60.48% ~ 66.94%),MI 组(迁移率:80.12% ~ 82.02%) Hep3B 细胞的迁移能力明显增强($P < 0.01$,图 1A)。提示 miR-224 表达的上调可以明显促进肝癌细胞株的迁移。用 Hep3B 细胞转染 miR-224 inhibitor,降低 miR-224 的表达水平,同样用划痕实验检测细胞迁移能力的变化,结果显示:和 IN-NC 组(迁移率:48.24% ~ 53.66%)以及空白组(迁移率:58.88% ~ 66.14%)相比,IN 组(迁移率:40.04% ~ 45.50%)的 Hep3B 细胞株的迁移能力明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$,图 1B)。表明 miR-224 表达水平与肝癌细胞株的迁移潜能紧密相关。



A: 转染 miR-224 Mimic (MI) 后 Hep3B 细胞的迁移能力; B: 转染 miR-224 Inhibitor (IN) 后 Hep3B 细胞的迁移能力
图1 倒置显微镜观察肝癌细胞迁移能力的变化 (×40)

2.2 HOXD10 是 miR-224 的直接靶基因

在 293 细胞中共转染 pYr-MirTarget-HOXD10-3U 报告质粒和 hsa-miR-224 mimics (50 nmol/L), 对照组共转染 pYr-MirTarget-HOXD10-3U 报告质粒、hsa-miRNA negative control (50 nmol/L)。与 NC 组 (23.98 ± 0.87) 相比, MI 组 (15.18 ± 0.46) 细胞的荧光信号明显下降 ($P < 0.05$), 表明 HOXD10 是 miR-224 直接调控的靶基因。进一步转染 miR-224 inhibitor (200 nmol/L) 和 miR-224 mimics (100 nmol/L) 到 Hep3B 细胞, 检测 HOXD10 的表达变化。结果表明: 与对照组 (MI-NC: 0.1413 ± 0.0656 ; IN-NC: 0.1391 ± 0.0416) 比较, MI 组 Hep3B 中的 HOXD10 蛋白水平 (0.0793 ± 0.0215) 降低 ($P < 0.05$), 而 IN 组的 HOXD10 蛋白水平 (0.2097 ± 0.0742) 明显增高 ($P < 0.05$, 图2), 进一步证明 miR-224 可直接调控靶基因 HOXD10 的表达。



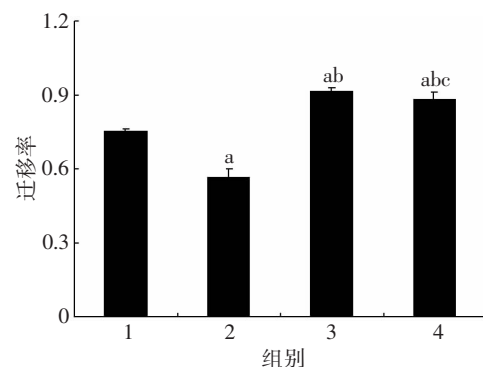
1: MI 组; 2: MI-NC 组; 3: IN 组; 4: IN-NC 组

图2 Western blot 检测 Hep3B 细胞中 HOXD10 蛋白的表达

2.3 miR-224 通过 HOXD10 调控肝癌细胞迁移

为进一步明确 miR-224 参与调节肝癌细胞迁移的作用机

制, 将 Hep3B 细胞株转染 siRNA-HOXD10 (100 nmol/L), 抑制 HOXD10 的表达; 同时转染 miR-224 mimics (100 nmol/L), 上调 miR-224 的表达, 观察肝癌细胞迁移能力的变化情况。划痕实验的结果表明: 和 SI-NC 组以及空白组相比, SI 组的细胞迁移能力明显增加, 并且此结果与 MI 组的结果一致 ($P < 0.05$, 图3, 4)。这提示在体外通过 siRNA 或者 miR-224 mimics 抑制 HOXD10 的表达均可促进肝癌细胞迁移。



1: 空白组; 2: SI-NC 组; 3: SI 组; 4: MI 组

a: $P < 0.01$, 与空白组比较; b: $P < 0.01$, 与 SI-NC 组比较; c: $P < 0.01$, 与 SI 组比较

图3 各组肝癌细胞迁移率变化

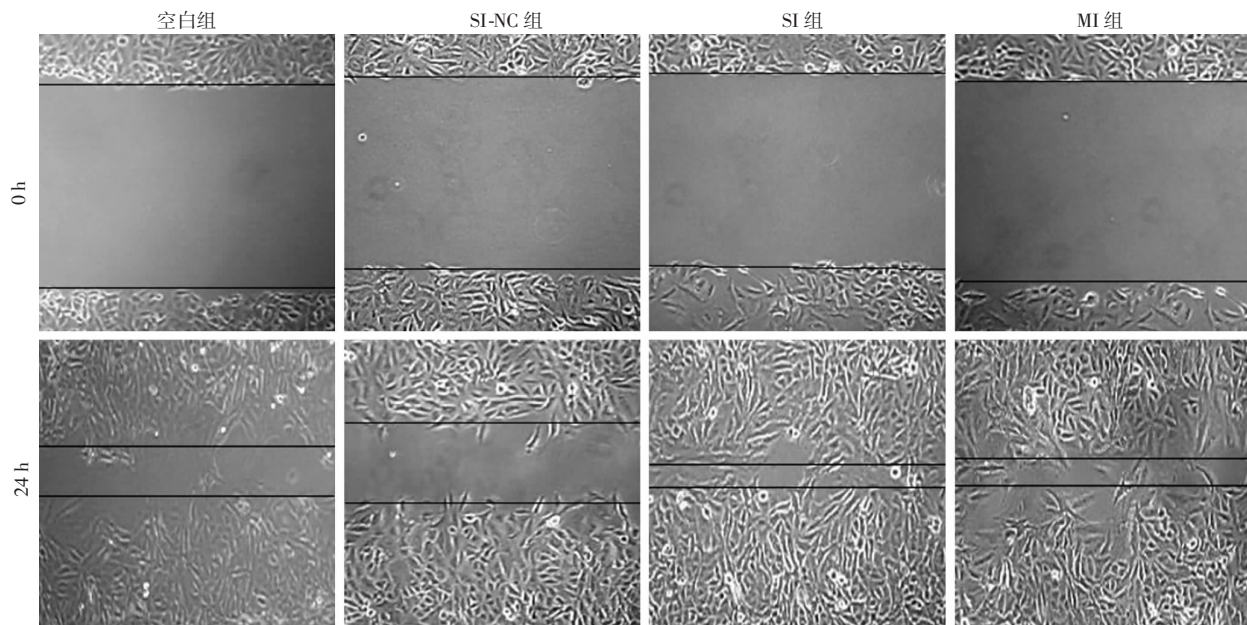


图4 划痕实验观察 miR-224 通过 HOXD10 调控肝癌细胞的迁移 ($\times 40$)

3 讨论

Wang 等^[2]提出过表达的 miRNA-224 靶向作用凋亡抑制因子-5 (API-5) 并抑制 API-5 的转录表达进而促进肝癌细胞凋亡。miRNA-224 在多种肿瘤中充当癌性 miRNA 参与肿瘤的发生、发展。其作为肝癌特异性的 miRNA^[14], 在肝癌中的研究较多。本研究进一步探讨其影响肝癌细胞迁移的可能机制, 结果提示过表达的 miR-224 通过负性调控靶基因 HOXD10 的表达影响肝癌细胞迁移能力。

HOXD10 是 HOX 基因家族成员之一, 被认为是一种抑制细胞侵袭的基因^[15]。大量的研究表明, HOX 家族在细胞发生发展中调控无数信号通路, 直接参与器官发生, 细胞分化与固定, 迁移以及细胞周期和凋亡通路的调控^[15-18]。有研究提示: HOXD10 可抑制垂体肿瘤细胞的增殖以及肿瘤形成^[19]。另外, HOXD10 受 miR-10b 直接调控, 通过下游分子 RHOC 影响乳腺癌细胞的侵袭能力^[20]。那么在肝癌细胞中 HOXD10 是否仍充当影响癌细胞迁移的角色呢? 根据前期的实验基础, 在预测的靶基因中我们选择了 HOXD10, 本研究显示 HOXD10 受到 miR-224 的直接调控, 并影响肝癌细胞迁移, 表明在肝癌中 HOXD10 参与调控癌细胞的迁移。但是 miRNA 可调控多个靶基因, 而同一个靶基因受多个 miRNA 调控。所以在肝癌中涉及影响癌细胞迁移的靶基因还有那些? 而 HOXD10 是如何影响癌细胞迁移的? 可能的调节网络是怎样的? 这需要进一步研究。

综上所述, 本研究提示在肝癌中过表达的 miRNA-224 通过靶向作用 HOXD10 参与调控肝癌细胞的迁移。这使 miRNA-224 的研究更全面并为临床治疗拓宽思路。

志谢 感谢肖何、张诗琦、戴楠、寸艳萍、张辉等对本课题的帮助

参考文献:

- [1] Wang Y, Lee C G. Role of miR-224 in hepatocellular carcinoma; a tool for possible therapeutic intervention? [J]. *Epigenomics*, 2011, 3 (2): 235 - 243.
- [2] Wang Y, Lee A T, Ma J Z, *et al.* Profiling microRNA expression in hepatocellular carcinoma reveals microRNA-224 up-regulation and apoptosis inhibitor-5 as a microRNA-224-specific target [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(19): 13205 - 13215.
- [3] Zhang B, Pan X, Cobb G P, *et al.* microRNAs as oncogenes and tumor suppressors [J]. *Dev Biol*, 2007, 302(1): 1 - 12.
- [4] Coulouarn C, Factor V M, Andersen J B, *et al.* Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties [J]. *Oncogene*, 2009, 28 (40): 3526 - 3536.
- [5] Li N, Fu H, Tie Y, *et al.* miR-34a inhibits migration and invasion by down-regulation of c-Met expression in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2009, 275(1): 44 - 53.
- [6] Li Q, Wang G, Shan J L, *et al.* MicroRNA-224 is upregulated in HepG2 cells and involved in cellular migration and invasion [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 25(1): 164 - 171.
- [7] Zhang Y, Takahashi S, Tasaka A, *et al.* Involvement of microRNA-224 in cell proliferation, migration, invasion, and anti-apoptosis in hepatocellular carcinoma [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013, 28(3): 565 - 575.
- [8] Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg R A. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer [J]. *Nature*, 2007, 449(7163): 682 - 688.
- [9] Sun L, Yan W, Wang Y, *et al.* MicroRNA-10b induces glioma cell invasion by modulating MMP-14 and uPAR expression *via* HOXD10 [J]. *Brain Res*, 2011, 1389: 9 - 18.
- [10] Huang L, Ting D, Lin X, *et al.* MicroRNA-224 targets RKIP to control cell invasion and expression of metastasis genes in human breast cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 425(2): 127 - 133.
- [11] Mencia N, Selga E, Noe V, *et al.* Underexpression of miR-224 in

methotrexate resistant human colon cancer cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2011, 82(11): 1572-1582.

[12] Wu H, Haag D, Muley T, et al. Tumor-microenvironment interactions studied by zonal transcriptional profiling of squamous cell lung carcinoma[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2013, 52(3): 250-264.

[13] Yao G, Yin M, Lian J, et al. MicroRNA-224 is involved in transforming growth factor-beta-mediated mouse granulosa cell proliferation and granulosa cell function by targeting Smad4[J]. *Mol Endocrinol*, 2010, 24(3): 540-551.

[14] Pineau P, Volinia S, McJunkin K, et al. miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(1): 264-269.

[15] Myers C, Charboneau A, Cheung I, et al. Sustained expression of homeobox D10 inhibits angiogenesis[J]. *Am J Pathol*, 2002, 161(6): 2099-2109.

[16] Botas J. Control of morphogenesis and differentiation by HOM/Hox genes[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1993, 5(6): 1015-1022.

[17] Boudreau N, Bissell M J. Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1998, 10(5): 640-646.

[18] Edelman G M, Jones F S. Outside and downstream of the homeobox[J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(28): 20683-20686.

[19] Cho M A, Yashar P, Kim S K, et al. HoxD10 gene delivery using adenovirus/adeno-associate hybrid virus inhibits the proliferation and tumorigenicity of GH4 pituitary lactotrope tumor cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 371(3): 371-374.

[20] Sasayama T, Nishihara M, Kondoh T, et al. MicroRNA-10b is overexpressed in malignant glioma and associated with tumor invasive factors, uPAR and RhoC[J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(6): 1407-1413.

(收稿:2013-11-29;修回:2014-01-26)

(编辑 汪勤俭)

文章编号:1000-5404(2014)13-1369-01

个案与短篇

胰头低度恶性肌纤维母细胞肉瘤 1 例

何容,王阁,杨镇州,余嫫,任育江,何轩,李建
放射治疗中心)

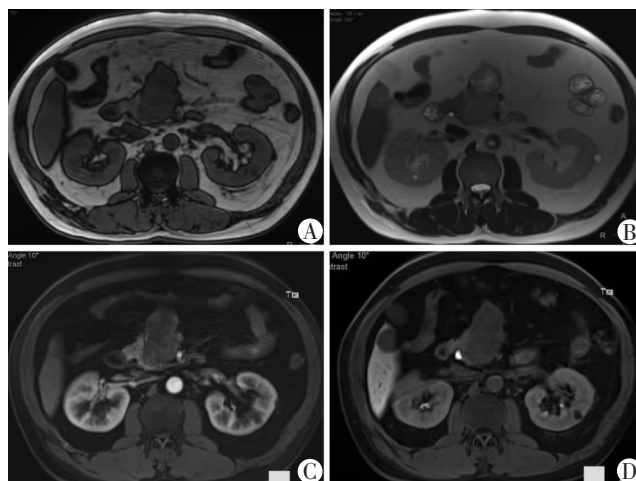
(400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤

[关键词] 胰头;肌纤维母细胞肉瘤;MRI;CT;病理

[中图分类号] R816.5 [文献标志码] B

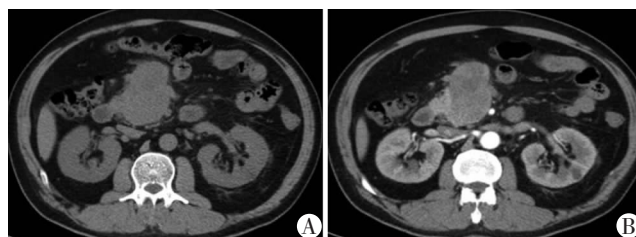
1 临床资料

患者,男性,50岁,因“反复腹痛、腹胀6个月,加重伴消瘦3个月”于2013年4月21日入我院胃结直肠肛门外科就诊。体检:腹部平坦,未见异常搏动。剑突下扪及一包块,大小约10 cm×9 cm×5 cm,边界不清,活动度欠佳,压痛,余腹无压痛,无反跳痛及肌紧张。叩诊呈鼓音,无移动性浊音,肠鸣音4/min。4月26日行上腹部MRI检查示:胰头部一类椭圆形软组织肿块,大小约7.81 cm×4.58 cm,边缘不规则,边界尚清晰,其内呈混杂长T₁混杂长T₂信号,并可见小片状短T₁信号(图1A、B),增强扫描病变不均匀强化(图1C、D)。7月15日CT定位检查示:平扫胰头部见一软组织肿块,大小约8.6 cm×6.2 cm,密度欠均匀,其中心见较低密度区,CT值8~35 HU,肿块边缘不规则,分界尚清(图2A);增强后肿块中度强化,其内低密度区未见明显强化(图2B)。该患者在CT引导下胰头包块穿刺活检,穿刺标本肉眼呈灰白灰褐色碎米样组织。病理观察示:镜下见肿瘤细胞呈梭形,核大,深染,细胞排列呈编织状、束状,有一定异型性,核分裂象为2/10HPF。免疫组化:SMA(++),Desmin(-),Calponin(+),S-100单(-),CD117(-),CD21(-),CD23(-),CD56(-),S-100多(+),Syn(+),Ki-67(50%),CK(-),Dog-1(-)。病理诊断:胰头低度恶性肌纤维母细胞肉瘤(图3)。



A:T₁WI呈低信号;B:T₂WI呈混杂高信号;C:MR增强(动脉期)不均匀强化;D:MR增强(延迟期)强化减退

图1 胰头低度恶性肌纤维母细胞肉瘤患者上腹部MRI表现



A:平扫;B:增强扫描

图2 胰头低度恶性肌纤维母细胞肉瘤患者腹部CT表现

(下转 1385 页)

[通信作者] 王阁, E-mail: wangge70@hotmail.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140618.1744.010.html> (2014-06-18)