

miR - 21 通过下调 PTEN 表达促进肝癌 细胞增殖、侵袭及迁移

陆 雄¹, 郝福军¹, 葱 根¹, 石 磊², 宋 涛²

(1. 宝鸡市人民医院普外科, 陕西 宝鸡 721000;

2. 西安交通大学第一附属医院肝胆外科, 陕西 西安 716000)

摘要:目的 探讨 miR - 21 在肝癌组织中的表达、临床意义及可能的分子机制。方法 实时定量 PCR 检测 miR - 21 在肝癌及癌旁组织中的表达, MTT 法检测 MHCC - 97H 细胞的增殖, Transwell 实验检测 MHCC - 97H 细胞的侵袭及迁移, Western blot 法检测 miR - 21 下游潜在靶点 PTEN 的表达。结果 miR - 21 在肝癌组织中表达水平显著高于相应癌旁组织; 肝癌组织中 miR - 21 高表达与肿瘤大小、TNM 分期、门静脉侵犯及 Edmondson 分级显著相关; 高表达 miR - 21 患者 3 年生存率明显低于低表达组; miR - 21 可显著促进 MHCC - 97H 细胞的增殖、侵袭及迁移, 并下调 PTEN 的蛋白水平。结论 miR - 21 在肝癌组织中表达显著上调并与肝癌恶性临床病理特征有关, miR - 21 促进肝癌细胞增殖、侵袭及迁移的作用可能与下调 PTEN 表达有关。

关键词: miR - 21; 肝细胞癌; 增殖; 侵袭; 迁移; PTEN

中图分类号: R735.7, R392 - 33 文献标识码: A 文章编号: 1672 - 2639(2016)02 - 0001 - 05

miR - 21 promotes the proliferation, invasion and migration of hepatocellular carcinoma cell via down - regulation of PTEN expression

LU Xiong¹, HAO Fu-jun¹, XI Gen¹, SHI Lei², SONG Tao²

(1. Department of General Surgery, People's Hospital of Baoji; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, First Affiliated Hospital, Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 716000, China)

Abstract: Objective To investigate the level and clinical significance of miR - 21 expression in human hepatocellular carcinoma (HCC) and the underlying mechanisms. **Methods** Real time quantitative PCR was applied to detect the expression of miR - 21 in HCC and the corresponding tumor - adjacent tissues. The proliferation of MHCC - 97H cells were detected by MTT assay. Transwell assay was performed to measure the invasion and migration of MHCC - 97H cells. The expression of phosphatase and tensin homolog (PTEN) was determined by Western blotting. **Results** The expression level of miR - 21 in HCC tissues was significantly higher than that in the adjacent normal tissues, and it was significantly associated with tumor size, TNM stage, portal vein infiltration and Edmondson degree. Patients in the higher miR - 21 group had a worse 3 - year survival than those in lower miR - 21 group. Down regulation of miR - 21 in MHCC - 97H cells significantly suppressed cell proliferation, invasion and migration, and increased the protein expression of PTEN. **Conclusion** The expression of miR - 21 in HCC tissue is significantly higher than that in tumor - adjacent normal tissues and was correlated with the malignant clinical pathological features. miR - 21 promotes HCC cell proliferation, migration and invasion by inhibiting the expression of PTEN.

Key words: miR - 21; Hepatocellular carcinoma; Proliferation; Invasion; Migration; Phosphatase and tensin homolog (PTEN)

我国乙型肝炎病毒感染率高,肝癌是我国常见恶性肿瘤之一^[1],肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的类型,目前手术治疗仍是肝癌最有效的方法,由于起病隐匿,大部分患者在确诊时已失去手术时机^[2]。因此,研究肝癌的发生、发展的分子机制及其调控肿瘤侵袭、转移的信号通路十分必要。小RNA(microRNA, miRNA)是由18~25个核苷酸组成的小分子非编码RNA,其通过作用于靶基因的3'端非编码区互补结合,从而抑制靶mRNA的翻译或降解靶mRNA,达到下调靶基因的表达水平^[3]。miR-21在胃癌、结肠癌等恶性肿瘤中表达明显上调,并参与调控肿瘤的增殖、凋亡、侵袭及迁移及不良预后密切相关^[4-6]。但miR-21在肝癌中的表达水平及其在肝癌发生、发展中的作用未见报道。PTEN是人类发现的第一个具有酪氨酸磷酸酶作用的抑癌基因,可以通过拮抗磷酸肌醇激酶PI3K的作用而调控蛋白激酶Akt的磷酸化,对Akt的活化起负调控作用^[7,8]。异常表达的PTEN与肿瘤的发生、发展关系密切^[9,10]。生物信息学预测PTEN可能为miR-21下游潜在靶点。本实验通过检测miR-21在肝癌及相应癌旁组织中的表达水平,并分析其与患者临床病理资料及预后的关系,并通过反义寡核苷酸技术抑制miR-21(anti-miR-21)转染人肝癌细胞系并分析其功能及与PTEN的关系,初步探讨miR-21在肝癌发生、发展中的作用,为肝癌的治疗提供新的治疗思路。

1 材料和方法

1.1 材料

收集并筛选2011-01-01~2012-12-31期间在西安交通大学第一附属医院肝胆外科手术治疗后经病理证实的肝细胞癌患者共计78例,其中男63例,女15例。年龄28~72岁,中位年龄50.5岁。所有入组患者均签署知情同意书。患者术前均未接受放疗、化疗等其他辅助治疗。患者术后随访时间为36个月。癌旁组织为距肿瘤边缘>2cm的肝组织,所有组织为术后获得的新鲜标本组织,组织获得后立即转移至液氮。miRNA逆转录试剂盒(Ncode™ VILOTM mRNA cDNA Synthesis Kit)、TRIzol试剂、Real time PCR试剂盒(EXPRESS SYBR® Green-ERTM mRNA qRT-PCR Kit)及脂质体(Lipofectamine™2000)均购自Invitrogen公司;甲基噻唑基四唑(methylthiazolyl tetrazolium, MTT)及DMSO购自

Roche公司;miR-21特异性引物、miRNA内参基因RNU6B引物、anti-miR-21及阴性对照(anti-miR-NC)均购自广州锐博生物科技有限公司。BCA蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术研究所,ECL化学发光试剂盒购自Milipore公司。兔抗人PTEN多克隆抗体及小鼠抗人β-actin单克隆抗体(mAb)均购自SantaCruz公司。正常永生生化人肝细胞LO2与HepG2、SMMC-7721、Hep-3B、Bel-7402、MHCC-97H肝癌细胞株、购于中国科学院上海细胞库。DMEM为Gibco公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 LO2正常永生生化人肝细胞与HepG2、SMMC-7721、Hep-3B、Bel-7402、MHCC-97H肝癌细胞购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学及细胞生物学研究所并培养于含100mL/L胎牛血清的DMEM培养液中,37℃、50mL/LCO2培养箱中常规培养。

1.2.2 细胞转染 细胞常规培养接种于6孔板中,待细胞汇合率达70%左右按照Lipofectamine™2000说明书以100nmol/Lanti-miR-21及阴性对照组(anti-miR-NC)加入6孔板中。用无双抗100mL/L血清的DMEM培养细胞48h后进行后续试验。

1.2.3 实时定量PCR检测MHCC-97H及转染后细胞miR-21、PTENmRNA的水平 MHCC-97H细胞转染后,按TRIzol说明书提取总RNA,反应条件37℃60min,95℃5min。后取2μLcDNA配制实时定量PCR体系,PCR反应:95℃预变性30s、95℃变性5s、60℃退火延伸30s,扩增35个循环。扩增结束后制作融解曲线。2^{-ΔΔCt}法计算miR-21、PTENmRNA的相对表达量。以RNU6B和β-actin分别作为内参。每个样本独立重复实验3次。

1.2.4 MTT试验检测细胞活力 分别收集转染后24、48、72h后的MHCC-97H细胞。以每孔200μL的细胞数为1×10⁵个/mL的单细胞悬液接种于96孔板中,每组设6复孔及1个空白对照孔。实验结束前4h避光加入5mg/mL的MTT溶液常规培养,弃上清,加入150μLDMSO溶液,在酶标仪上测定490nm的吸光度值。每个样本独立实验重复3次。

1.2.5 Transwell侵袭及迁移实验 取转染48h后的MHCC-97H细胞,重悬细胞调整细胞数为1×10⁶个/mL。50mg/LMatrigel胶1:8稀释液包被Transwell小室(孔径8μm)底部(侵袭实验铺胶、迁移实验未铺胶)。取各组细胞悬液200μL加入Tran-

swell 小室,24 孔板下室加入 500 μ L 100 mL/L 胎牛血清的完全培养基。每组重复 3 个样本。继续将 24 孔细胞培养板培养 24 h,取出 Transwell 小室,用 PBS 液淋洗,棉签擦去基质胶及微孔膜上层细胞,40 g/L 多聚甲醛固定,0.1% 结晶紫染色,在倒置显微镜下计算移至微孔膜下层的细胞数,每个样本随机选取 8 个 200 倍视野求细胞计数平均数。

1.2.6 Westernblot 法检测转染后 MHCC-97H 细胞 PTEN 蛋白水平 利用 RIPA(强)试剂盒提取转染后 MHCC-97H 细胞内总蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒(BCAkit)检测蛋白样品浓度。各组样品均加样 40 μ g,SDS-PAGE 分离后,转移至 PVDF 膜上。50 g/L 脱脂奶粉封闭 1.5h,加 50g/LBSA 稀释的兔抗 PTEN 多克隆抗体(1:500)及小鼠抗 β -actin-mAb(1:1000),4 $^{\circ}$ C 过夜;TBST(TBS,1 mL/LTween-20)洗膜 3 次,6 min/次;分别加 HRP 标记的抗兔或抗小鼠二抗(1:5000),室温孵育 2 h,ECL 化学发光剂暗室显影。

1.2.7 统计学分析 使用 SPSS13.0 统计软件分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间进行 *t* 检验。采用 χ^2 检验分析 miR-21 表达与临床病理资料间的相关性。当 $P < 0.05$ 时,认为差异具有统计学意义。所有检测实验均重复 3 次。

2 结果

2.1 miR-21 在肝癌组织中表达明显升高

实时定量 PCR 检测 miR-21 在肝癌组织及对应癌旁组织中的表达。结果显示,在肝癌组织中 miR-21 的相对表达量的表达水平明显高于对应癌旁组织($*P < 0.05$,图 1)。

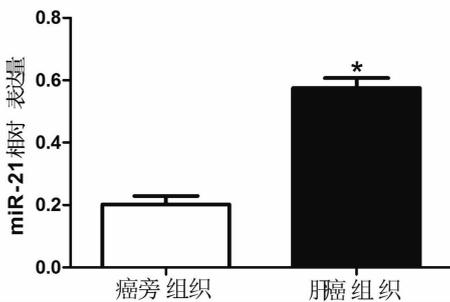


图 1 miR-21 在肝癌及对应癌旁组织中的表达水平

2.2 miR-21 的表达与肝癌患者临床病理资料的关系

以 miR-21 在组织中的中位表达水平为分界点,将 78 例肝癌组织分为 miR-21 高表达组($n =$

42)与 miR-21 低表达组($n = 36$)。结果发现,miR-21 高表达与肿瘤大小(>5 cm)、TNM 分期(Ⅲ期和Ⅳ期)、门静脉侵犯及 Edmondson 分级相关($*P < 0.05$,表 1)。

表 1 miR-21 的表达与肝癌临床病理特征关系($n = 78$)

项目	类别	miR-21 高表达($n = 42$)	miR-21 低表达($n = 36$)	<i>P</i>
性别	男	33	30	0.595
	女	9	6	
年龄	≤ 50 岁	29	24	0.822
	≥ 50 岁	13	12	
肿瘤直径	< 5 cm	28	34	0.002*
	≥ 5 cm	14	2	
肿瘤个数	1 个	37	33	0.604
	≥ 2 个	5	3	
TNM 分期	I + II	32	34	0.026*
	Ⅲ + Ⅳ	10	2	
门静脉侵犯	无	35	35	0.032*
	有	7	1	
AFP	< 400 ng/mL	27	24	0.826
	≥ 400 ng/mL	15	12	
HBV 感染	无	4	2	0.512
	有	38	34	
Edmondson 分级	I + II	27	33	0.004*
	Ⅲ + Ⅳ	15	3	

2.3 miR-21 的表达与患者生存率的关系

以 miR-21 在组织中的中位表达水平为分界点,将患者分为 miR-21 高表达组与 miR-21 低表达组,随访患者 3 年生存率。结果显示,高表达 miR-21 的患者的 3 年生存率明显低于低表达组患者,差异具有统计学意义($*P < 0.05$,图 2)。

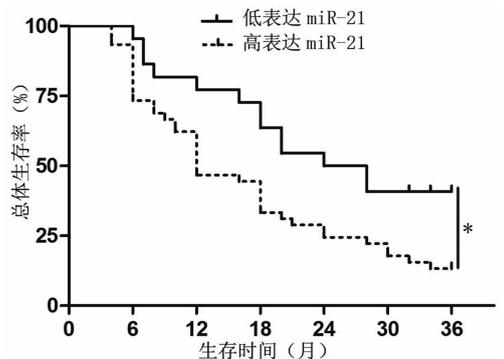


图 2 miR-21 高表达组与低表达组的生存曲线

2.4 miR-21 在不同肝癌细胞系中的表达均升高

为进行后续试验,我们检测 miR-21 在肝癌细胞系中的表达,结果发现,miR-21 在肝癌细胞系中的表达均高于 LO2 正常肝细胞系,且在 MHCC-97H 中表达最高(*P < 0.05,图 3)。

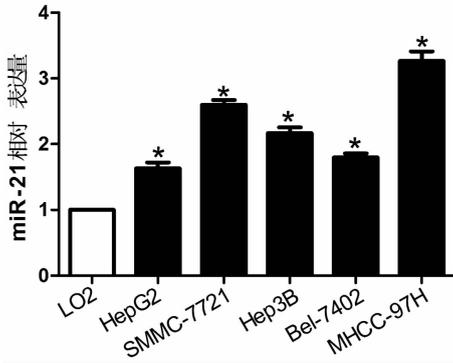


图 3 miR-21 在不同肝癌细胞系中的表达

2.5 anti-miR-21 转染人肝癌 MHCC-97H 细胞使其下调 miR-21

为进一步研究 miR-21 对肝癌细胞生物学行为影响,利用脂质体转染法,将 anti-miR-21 瞬时转染入人肝癌 MHCC-97H 细胞中。采用实时定量 PCR 检测 miR-21 转染效率,结果显示实验组 miR-21 的表达水平显著低于阴性对照组(*P < 0.05,图 4)。

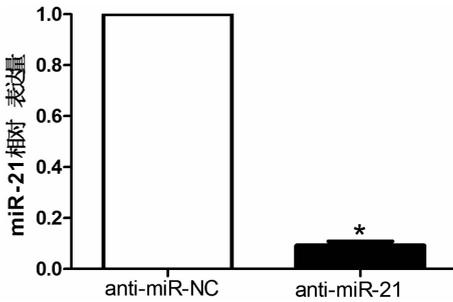


图 4 anti-miR-21 转染 MHCC-97H 细胞后 miR-21 的表达

2.6 下调 miR-21 抑制 MHCC-97H 肝癌细胞增殖

为研究 miR-21 对肝癌细胞 MHCC-97H 增殖能力的影响,采用 MTT 法检测转染 anti-miR-21 24、48、72 h 后 MHCC-97H 细胞的增殖变化情况。结果显示,与阴性对照组相比,实验组细胞在转染 anti-miR-21 48h 后增殖能力明显下降(*P < 0.05,图 5)。

2.7 下调 miR-21 抑制 MHCC-97H 肝癌细胞侵袭

用铺胶的 Transwell 侵袭实验显示,下调 miR-21 可明显抑制 MHCC-97H 细胞的侵袭能力(*P <

0.05,图 6)。

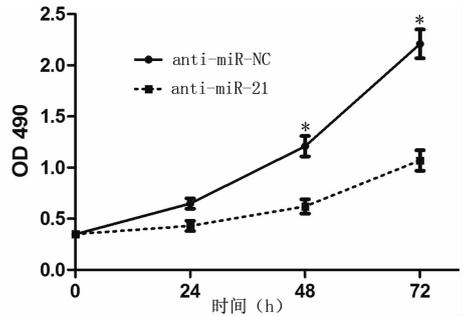


图 5 miR-21 抑制 MHCC-97H 细胞增殖

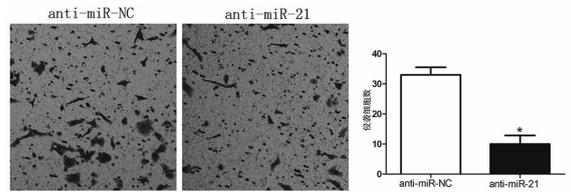


图 6 miR-21 抑制 MHCC-97H 细胞侵袭

2.8 下调 miR-21 抑制 MHCC-97H 肝癌细胞的迁移

为进一步研究 miR-21 对肝癌细胞迁移能力的影响,未铺胶的 Transwell 实验显示,miR-21 明显抑制肝癌细胞的迁移能力(*P < 0.05,图 7)。

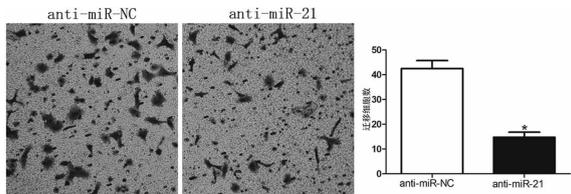


图 7 miR-21 抑制 MHCC-97H 细胞迁移

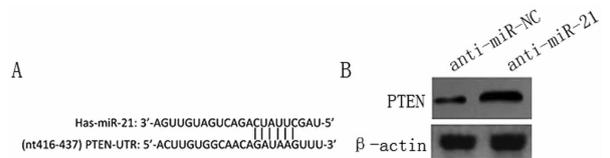


图 8 下调 miR-21 升高 PTEN 的表达

2.9 miR-21 下调 MHCC-97H 细胞中 PTEN 的表达

PTEN 在肝癌组织及细胞系中存在明显下调,并可通过抑制 PI3K/Akt 的活化而抑制肝癌细胞的侵袭及迁移能力^[11,12]。为探讨 miR-21 对肝癌细胞侵袭及迁移能力的影响,经生物信息学及靶基因

预测 TargetScan 发现^[13,14], PTEN 为 miR-21 的可能靶基因(图 8A)。我们采用 Westernblot 法检测下调 miR-21 后 MHCC-97H 细胞中 PTEN 蛋白的表达变化,结果发现,下调 miR-21 后 PTEN 蛋白表达水平明显升高(* $P < 0.05$,图 8B)。

3 讨论

肝细胞肝癌是我国最常见、预后最差的恶性肿瘤之一,是癌症原因致死第三大肿瘤,其复发及转移是影响其预后最主要的因素,严重影响患者预后^[15]。因此,研究 HCC 发生、发展机制及寻找新的有效的 HCC 特异性分子标志物及治疗靶点为我国 HCC 的诊断及治疗提供新的途径。

大量研究表明 miRNAs 在肝癌的发生、发展起重要作用,但关于 miRNAs 调控肝癌的具体分子机制仍不明确。有研究表明在乳腺癌中 miR-21 通过靶向抑制 PTEN 促进乳腺癌细胞的侵袭和转移及诱导上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[16];在头颈鳞状细胞癌中 miR-21 可通过调控 CDK5 的表达促进细胞的迁移及侵袭^[17];在非小细胞肺癌中,miR-21 可作为患者的预后指标。系列研究报道 PTEN 在肝癌中明显低表达,与患者的索拉菲尼敏感性和患者预后明显相关,且可通过抑制 PI3K 而抑制 Akt 的磷酸化,从而抑制肝癌细胞 EMT。而本研究通过对 78 例 HCC 组织标本检测发现,在 HCC 组织中 miR-21 的表达水平显著高于对应癌旁组织,且 miR-21 的高表达与肿瘤大小($\geq 5\text{cm}$)、高 TNM 分期、门静脉侵犯及高 Edmondson 分级等 HCC 恶性临床病理特征密切相关。通过随访,发现高表达 miR-21 患者的 3 年生存率明显低于低表达,提示 miR-21 的高表达预示患者预后不良,这提示 miR-21 在 HCC 的发生、发展过程中具有重要作用。而进一步研究表明,miR-21 在肝癌细胞系中的表达也明显高于正常永生化肝细胞,通过在 MHCC-97H 细胞中下调 miR-21 发现,下调 miR-21 可以显著抑制肝癌细胞的增殖、侵袭及迁移能力。通过生物信息学及文献报道,我们进一步探讨 miR-21 调控肝癌细胞增殖、侵袭及迁移的分子机制,发现下调 miR-21 可以显著升高 PTEN 的表达,提示在 HCC 中 miR-21 可能通过调控 PTEN 的表达而发挥促癌作用,提示 PTEN 可能为 miR-21 的靶点。而 PTEN 是具有磷酸酶活性的抑癌基因,在正常细胞中通过拮抗 PI3K 的作用,使其底物

去磷酸化,减少细胞内 PIP2 及 PIP3 含量,对 PI3K/Akt 信号通路起到负向调控作用。近来研究表明 PTEN 在肝癌对索拉菲尼及肝癌细胞的侵袭、迁移及 EMT 过程中起重要作用。因此,说明 miR-21 在肝癌中发挥作用可能是通过抑制 PTEN 的表达实现的。

综上所述,miR-21 在 HCC 组织中表达显著上调,并与 HCC 的恶性临床病理特征密切相关,且高表达 miR-21 预示患者预后不良。在体外,miR-21 可能通过下调 PTEN 的表达发挥其促进肝癌细胞增殖、侵袭及迁移的作用。因此,miR-21 可能成为新的 HCC 分子标志物及生物治疗靶点。

参考文献:

- [1] El-serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(7): 2557-2576.
- [2] De Lope CR, Tremosini S, Forner A, et al. Management of HCC [J]. *Journal of hepatology*, 2012, 56 Suppl 1: 75-87.
- [3] Fornari F, Ferracin M, Trefe D, et al. Circulating microRNAs, miR-939, miR-595, miR-519d and miR-494, Identify Cirrhotic Patients with HCC [J]. *PLoS one*, 2015, 10(10): e0141448.
- [4] Yin C, Zhou X, Dang Y, et al. Potential Role of Circulating MiR-21 in the Diagnosis and Prognosis of Digestive System Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis [J]. *Medicine*, 2015, 94(50): e2123.
- [5] Zhao W, Zhao JJ, Zhang L, et al. Serum miR-21 level: a potential diagnostic and prognostic biomarker for non-small cell lung cancer [J]. *International journal of clinical and experimental medicine*, 2015, 8(9): 14759-14763.
- [6] Sasic L, Vallbohmer D, Stoecklein NH, et al. Serum microRNA profiles as prognostic or predictive markers in the multimodality treatment of patients with gastric cancer [J]. *Oncology letters*, 2015, 10(2): 869-874.
- [7] Lebok P, Kopperschmidt V, Kluth M, et al. Partial PTEN deletion is linked to poor prognosis in breast cancer [J]. *BMC cancer*, 2015, 15(1): 963.
- [8] Kang X, Song C, Du X, et al. PTEN stabilizes TOP2A and regulates the DNA decatenation [J]. *Scientific reports*, 2015, 5: 17873.
- [9] Zhang W, Peng F, Zhou T, et al. Targeted delivery of chemically modified anti-miR-221 to hepatocellular carcinoma with negatively charged liposomes [J]. *International journal of nanomedicine*, 2015, 10: 4825-4836. (下转第 8 页)