

MiR-641 在肝细胞癌中的表达及其对 HepG2 细胞功能的影响

李文科, 何佳

重庆医科大学附属永川医院肝胆胰腺外科, 重庆 402160

【摘要】 目的 探讨 miR-641 在肝细胞癌(HCC)组织中的表达情况及其对肝癌细胞株 HepG2 增殖和侵袭能力的影响。方法 收集 2018 年 1~8 月重庆医科大学附属永川医院肝胆胰腺外科 48 例经病理确诊的 HCC 患者手术切除癌及癌旁组织, 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测癌组织和癌旁组织中 miR-641 表达, 并分析 miR-641 在不同临床病理资料之间的差异, 脂质体法转染 miR-641 mimics、inhibitors、无关序列(negative control, NC)到 HepG2 细胞, qRT-PCR 检测各组 miR-641 表达水平, MTT 法检测转染后 24 h、48 h、72 h、96 h 增殖能力, Transwell 侵袭实验检测细胞侵袭能力。结果 miR-641 在 HCC 癌组织中表达水平为(2.44±0.13), 明显低于癌旁组织的(6.31±0.48), 差异有统计学意义($P<0.05$)。同时, miR-641 在癌组织中的表达水平随患者 Edmondson 分级的升高而降低, 其中 I、II 级组表达水平为(3.15±0.72), III、IV 级组表达水平为(2.02±0.74)。与 NC 组 miR-641 表达水平(1.0±0.07)比较, 转染 miR-641 mimics 组 miR-641 表达水平(9.54±0.62)显著升高, 转染 inhibitors 转染组 miR-641 表达水平(0.34±0.05)显著降低, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。同时, 与 96 h 时 NC 组细胞的增殖水平(0.59±0.02)比较, miR-641 mimics 组的增殖水平(0.50±0.01)显著降低, miR-641 inhibitors 组的增殖水平(0.82±0.03)显著升高, 差异均具有统计学意义($P<0.05$)。而侵袭实验数据显示, 与 NC 组细胞相对侵袭数量相比, miR-641 mimics 组的细胞相对侵袭数量显著降低, miR-641 inhibitors 组的细胞相对侵袭数量显著增加, 差异均具有统计学意义($P<0.05$)。结论 miR-641 在 HCC 组织低表达, 并与肝细胞癌 Edmondson 分级相关, 其可能通过促进癌细胞的增殖和侵袭能力参与 HCC 的发生与发展。

【关键词】 肝细胞癌; miR-641; 增殖; 侵袭; 转移

【中图分类号】 R735.7 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2019)01-0009-04

Expression of MiR-641 in hepatocellular carcinoma and its effect on HepG2 cell function. LI Wen-ke, HE Jia. Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Yongchuan Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 402160, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the expression of miR-641 in hepatocellular carcinoma (HCC) and its effect on the proliferation and invasion of HepG2 cells. **Methods** The cancer and adjacent tissues of 48 patients pathologically confirmed as HCC who underwent surgical resection from January 2018 to August 2018 in Yongchuan Hospital Affiliated to Chongqing Medical University were collected. Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression of miR-641 in cancer tissues and adjacent tissues, and the results were analyzed with clinical pathological parameters. The miR-641 mimics, inhibitors, and negative control (NC) were transfected into HepG2 cells by liposome method. Then the expression level of miR-641 was detected by qRT-PCR, the proliferative capacity was detected by MTT assay at 24 h, 48 h, 72 h, 96 h after transfection, and the invasion ability was tested by transwell invasion assay. **Results** The expression level of miR-641 in HCC tissues was (2.44±0.13), significantly lower than (6.31±0.48) in adjacent tissues ($P<0.05$). Meanwhile, the expression level of miR-641 in cancer tissues decreased with the increase of patients' Edmondson classification ($P<0.05$), which were (3.15±0.72) in grade I and II group and (2.02±0.74) in grade III and IV group. Compared with the expression level of miR-641 in the NC group (1.0±0.07), the level of miR-641 in miR-641 mimics group (9.54±0.62) was significantly increased, and that in miR-641 inhibitors group (0.34±0.05) was significantly decreased, all with statistically significant differences ($P<0.05$). At the same time, compared with the proliferation level of NC group cells at 96 h (0.59±0.02), the proliferation level of miR-641 mimics group (0.50±0.01) was significantly decreased, and that of miR-641 inhibitors group (0.82±0.03) was significantly increased, all with statistically significant differences ($P<0.05$). Invasion data showed that compared with the relative invasion cell number in the NC group, the number in the miR-641 mimics group was significantly lower, and that in the miR-641 inhibitors group was significantly increased, all with statistically significant difference ($P<0.05$). **Conclusion** miR-641 is lowly expressed in HCC tissues and is associated with hepatocellular carcinoma Edmondson grading, which may participate in the development and progression of HCC by promoting the proliferation and invasion of cancer cells.

【Key words】 Hepatocellular carcinoma; miR-641; Proliferation; Invasion; Metastasis

由于乙型肝炎病毒的流行,肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)已成为我国一种常见的恶性肿瘤^[1-2]。近年来,手术和介入治疗取得了很大进展,但 HCC 患者的预后仍然较差^[3]。众所周知,HCC 患者预后不良的主要原因是复发和转移^[4]。因此,探索 HCC 发生进展的机制对于提高早期诊断和改善治疗至关重要。微小 RNA (miRNA)是由约 22 个核苷酸组成的一类小的非编码 RNA,其可以与靶 mRNA 的 3'UTR 组合以提供转录后调节^[5]。越来越多的证据表明,失调的 miRNA 参与了 HCC 的各种生物过程,包括细胞增殖、细胞周期、细胞凋亡、侵袭和迁移^[6]。最近 Zhang 等^[7]通过生物学信息技术预测 miR-641 是调节肝癌中大量基因的 3 个最直接 miRNA 之一,但尚未有直接实验证据。然而,miR-641 在其他肿瘤类型的作用已有证实,如 Kong 等^[8]发现 miR-641 通过靶向 MDM2 基因在肺癌中发挥抑癌因子作用;Chen 等^[9]发现 miR-641 的表达增加有助于非小细胞肺癌细胞中的厄洛替尼抗性。为深入揭示 miR-641 在 HCC 中的具体作用,本研究分析了 HCC 癌组织中的 miR-641 表达情况,并分析了 miR-641 对肝细胞癌细胞株 HepG2 增殖和侵袭能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 选取 2018 年 1~8 月在重庆医科大学附属永川医院进行手术的肝细胞癌患者 48 例。其中,男性 28 例,女性 20 例;年龄 46~69 岁,平均(58.79±6.71)岁。留取其癌组织及癌旁组织,手术切除标本立即放入液氮中,随后置入-80℃冰箱冷冻保存备用。所有患者均由病理检测确诊,术前未接受放化疗,均签署知情同意书。人肝细胞癌 HepG2 细胞株(购自上海中国科学院细胞库),胎牛血清、1 640 培养基(购自美国 HyClone 公司),CCK-8 细胞增殖检测试剂盒(购自上海碧云天生物技术公司),Trizol 试剂(购自美国 Invitrogen 公司),cDNA 合成和实时荧光定量 PCR 采用 Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis Kit (购自美国 Clontech 公司),Lipofectamine TM 2000 转染试剂盒(购自美国 Invitrogen 公司),miRNA-641 引物、miRNA-641 negative control、miRNA-641 mimics 和 miRNA-641 inhibitor 由上海吉玛基因公司设计合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将购自于上海细胞库的 HepG2 细胞取出液氮罐,37℃水浴复苏,离心沉淀获取细胞,使用含 10%FBS RPMI 1640 培养基(1×10⁵ U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素)悬浮细胞,置于 5%CO₂、37℃饱和湿度培养箱中常规培养。

1.2.2 细胞转染 取对数生长期 HepG2 (1×10⁵) 铺于 6 孔板中,待生长至 60%~70%融合时,更换无血清培养基,随后进行 miR-641 mimics (50 nmol/L)、miR-641 inhibitors (50 nmol/L)及其对应无关对照序列(negative control, NC)的转染。具体操作步骤按照 lipofectamine 2000 转染试剂说明书进行,转染 12 h 后

更换新鲜培养基,24 h 后收集细胞并按照 TRIzol 法步骤提取总 RNA。

1.2.3 RT-qPCR 检测肝细胞癌组织和 HepG2 细胞中 miR-641 表达 每个样本组织称取 100 mg,分别加入 1 mL TRIzol 充分裂解;细胞样本采用胰酶消化离心收集后,每组样本加入 1 mL TRIzol,反复吹打裂解。按照 TRIzol 法步骤提取组织和各组的细胞总 RNA,并应用加尾法逆转录试剂(Mir-XTM miRNA first-strand synthesis and SYBR® RT-qPCR)制备 cDNA 模板用于检测 miR-641 表达。miR-641 上游引物序列 5'-AAAGACATAGGATAGAGTCACCTC-3', miR-641 下游引物及 U6 上下游引物均来自试剂盒。应用 SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa)进行 qPCR 检测。扩展步骤为:95℃预变性 60 s;95℃变性 5 s,60℃复性 20 s,共进行 40 个循环。应用 2^{-ΔΔCT}±SE 法计算 miR-641 的相对表达量,每组设置复孔 6 个。

1.2.4 MTT 检测细胞增殖 96 孔板每孔接种约 3 000 个细胞,采用 Lipofectamine 2 000 脂质体转染试剂按说明书进行转染。实验分组:转染 has-miR-641 mimics 组、转染 has-miR-641 inhibitors 组、转染 negative control 组(NC);各组设 3 个复孔,于转染后 24 h、48 h、72 h、96 h 后加入 20 μL MTT,37℃孵育 4 h 后弃上清,加入 150 μL MTT 后于 492 nm 波长下检测细胞的吸光度值。

1.2.5 细胞侵袭能力检测 细胞侵袭实验操作方法沿用郎磊等^[10]报道的方法,其中本实验使用的细胞数量为每组 4×10⁵ 个。微孔膜下层穿透的细胞数量采用倒置显微镜(德国莱卡公司)观察,计数方法每组选取 5 个视野,计数细胞数量,每组设 3 个重复孔。

1.3 统计学方法 数据分析采用 SPSS 17.0 统计学软件和 Graph Pad Prism 5.0 作图软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x}±s$)表示,用独立样本的 *t* 检验分析比较 miR-641 在肝细胞癌和癌旁组织中的表达差异;miR-641 表达水平与肝细胞癌临床病理参数间的关系用非参数检验-两独立样本的秩和检验进行分析。以 *P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-641 在 HCC 组织中的表达 采用 qRT-PCR 检测 48 例 HCC 癌灶和癌旁组织中 miR-641 表达水平,结果显示 HCC 癌灶组织中 miR-641 表达显著低于癌旁组织,差异有统计学意义(*P*<0.05),见图 1。

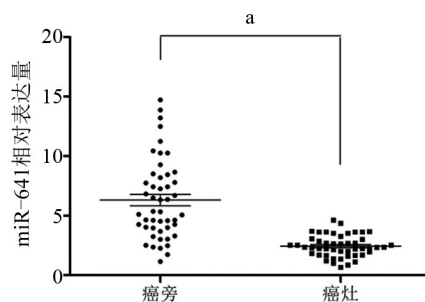


图 1 miR-641 在 HCC 癌灶和癌旁组织中的表达

注:**P*<0.05。

2.2 HCC 组织中 miR-641 表达与临床病理资料的关系 分析 HCC 组织中 miR-641 与临床病理资料关系,发现 miR-641 表达水平与 Edmondson 分级、肿瘤大小、门静脉侵犯发生、肿瘤分化程度相关($P < 0.05$),但与性别、年龄、肿瘤数量无关,差异无统计学意义($P > 0.05$)。miR-641 在 III~IV 级 HCC 患者、肿瘤 > 5 cm 者、肿瘤转移者、门静脉侵犯者、中低分化者的表达分别低于 I~II 级者、< 5 cm 者、肿瘤未转移、门静脉侵犯阴性者、肿瘤高分化者,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 HCC 患者不同临床特征与癌组织 miR-641 相对表达量的关系($\bar{x} \pm s$)

项目	例数	miR-641 相对表达量	t 值	P 值
性别			0.284	0.668
男	28	2.474±0.911		
女	20	2.397±0.931		
年龄(岁)			0.627	0.533
≤60	27	2.437±0.945		
>60	21	2.353±0.814		
肿瘤数量			0.277	0.783
单发	26	2.405±0.923		
多发	22	2.386±0.916		
Edmondson 分级			5.197	<0.05
I、II 级	18	3.149±0.716		
III、IV 级	30	2.018±0.738		
肿瘤大小(cm)			2.911	<0.05
≤5	18	2.717±0.152		
>5	30	1.983±0.204		
肿瘤转移			2.265	<0.05
是	20	2.204±0.171		
否	28	2.775±0.184		
门静脉侵犯			3.306	<0.05
是	24	2.047±0.176		
否	24	2.837±0.161		
肿瘤分化			2.982	<0.05
中低分化	21	2.853±0.168		
高分化	27	2.122±0.171		

2.3 miR-641 转染效率检测 使用无关序列(negative control, NC)、miR-641 mimics 和 inhibitors 直接转染 HepG2 细胞 24 h 后收集细胞并提取总 RNA,并检测各组 miR-641 表达情况。与 NC 组比较,转染 miR-641 mimics 和 inhibitors 分别显著促进和抑制细胞中 miR-641 的表达,差异均有统计学意义($P < 0.05$),证明转染有效,见图 2。

2.4 miR-641 对 HepG2 细胞增殖的影响 MTT 法分析细胞增殖能力变化,以 HepG2 细胞在 0、24 h、48 h、72 h、96 h 的光密度值绘制细胞生长曲线,结果显示转染 48 h 后各组细胞的增殖能力出现显著差异。miR-641 mimics 组相比 NC 组显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);miR-641 inhibitors 组相比 NC 组显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。

2.5 Tanswell 侵袭能力检测 实验结果显示,miR-614 mimics 组发生侵袭的细胞相对个数显著低于 NC 组,miR-641 inhibitors 组发生侵袭的细胞相对

个数显著高于 NC 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),表明 miR-614 可抑制 HepG2 的侵袭能力,见图 4、图 5。

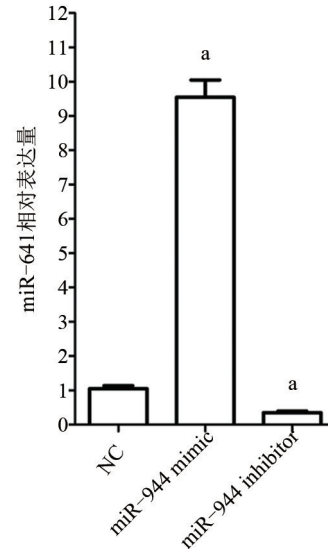


图 2 各转染组 miR-641 相对表达水平 注:与 NC 组比较, $P < 0.05$ 。

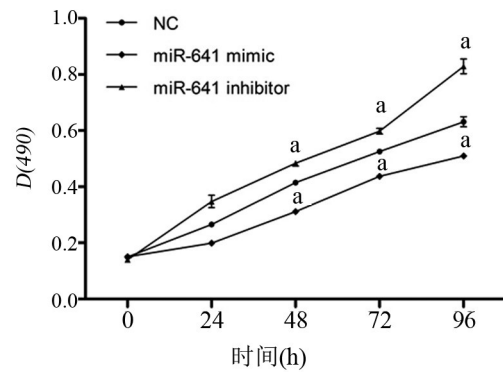


图 3 MTT 法检测各组细胞增殖率 注:与 NC 组比较, $P < 0.05$ 。

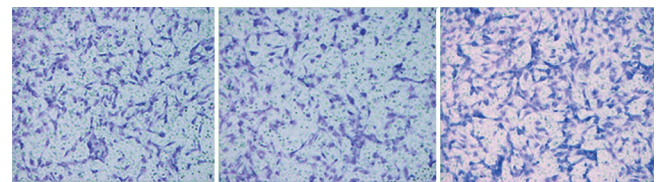


图 4 普通显微镜下图($\times 200$)

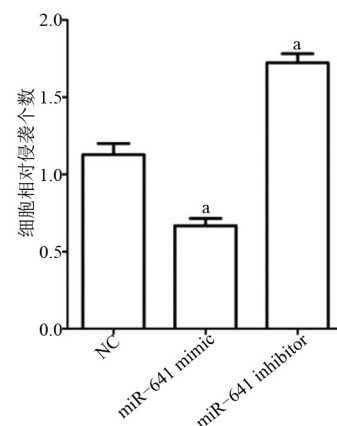


图 5 miR-641 对细胞侵袭的影响 注:与 NC 组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

HCC 是一种高度异质性的恶性肿瘤,其预后非常紊乱,是全球癌症相关死亡的第二大原因^[1]。尽管在过去几十年中 HCC 的治疗已经取得相当多的进步,但患者的 5 年存活率仍然未得到明显改善,部分原因是缺乏有效的早期诊断方法,导致患者临床确诊时多数为中晚期。HCC 的发生是由多种因素(如机体微环境、基因和饮食结构等)共同作用的结果,但调控其发生发展的分子机制尚未明确。miRNA 是一类小的内源性非编码 RNA,一般通过与靶基因的 3'-UTR 不完全互补结合,在转录后水平调控靶基因的转录和翻译,参与发育、分化、细胞增殖凋亡和代谢等各种生命活动及生物学进程的调控^[5]。miRNAs 与人类多种疾病有关,其在疾病的发生、诊断和治疗中起着重要的作用。大量研究证明,miRNA 在肿瘤的发生、发展过程中扮演重要的角色,通过调控靶基因起到癌基因或抑癌基因的作用^[11]。因此更广泛的探索 microRNAs 参与 HCC 机制,对提高治疗效果、生活质量和延长患者的生存意义重大。

miRNAs 已被揭示为 HCC 进展中的重要调节因子^[11-12]。大量研究表明,miRNAs 的失调促进了 HCC 细胞的生长和转移^[13]。因此,阐明 miRNA 调控 HCC 增殖和转移机制非常重要。本研究发现 miR-641 在 HCC 组织中表达下调。miR-641 水平下调与恶性临床病理特征相关,包括 Edmondson 分级、肿瘤大小、门静脉侵犯发生、肿瘤分化程度相关。这些数据表明 miR-641 参与了 HCC 的进展,可能发挥抑癌基因功能,有望成为 HCC 治疗的潜在新靶点。

最近,Kong 等^[8]发现 miR-641 在肺癌组织中表达减少,miR-641 过表达通过靶向 MDM2 显著抑制肺癌细胞的增殖以及诱导细胞的凋亡。Yao 等^[14]表明 miR-641 过表达可抑制宫颈癌细胞的增殖。Hinske 等^[15]发现 miR-641 在胶质母细胞瘤中表达下降,并通过把靶基因调控激酶 AKT2 的激活,参与胶质母细胞瘤的发展。此外,Chen 等^[9]还发现 miR-641 与非小细胞肺癌(NSCLC)患者表皮生长受体(EGFR)靶向酪氨酸激酶抑制剂(TKIs)的获得性抗性相关;与对酪氨酸激酶抑制剂(TKIs)敏感的样品相比,miR-641 在对 TKIs 具有抗性的非小细胞肺癌(NSCLC)细胞和人 NSCLC 组织中表达上调。而另一项来自 Yan 等^[16]的研究发现 miR-641 还参与抗菌药物利福平诱导的肝 HepaRG 细胞中 CYP3A4 高表达。然而关于 miR-641 在 HCC 中的确切生物学功能尚未有研究报道,本研究是第一项评估 miR-641 在 HCC 中作用的研究。此外,本研究中还建立 miR-641 过表达或抑制细胞模型,通过转染 mimic 或 inhibitor 在 HepG2 细胞中上调或下调 miRNA-641 水平。后续利用该细胞模型进行功能试验证实,miR-641 对 HepG2 细胞增殖和侵袭有

抑制作用。

综上所述,miRNA-641 在 HCC 的发生、发展过程中发挥类似抑癌基因的作用,该作用可能是通过靶向特定基因从而抑制 HCC 细胞增殖和侵袭而实现。miRNA-641 低表达与 HCC 肿瘤大小、Edmondson 分级、门静脉侵犯发生、肿瘤分化程度相关,有潜力成为 HCC 早期诊断的一个重要分子标志物。

参考文献

- [1] 曾红梅,陈万青. 中国癌症流行病学与防治研究现状[J]. 化学进展, 2013, 25(9): 1415-1420.
- [2] MILLER KD, SIEGEL RL, LIN CC, et al. Cancer treatment and survivorship statistics [J]. CA, 2016, 66(4): 271-289.
- [3] GRETEN TF, WANG XW, KORANGY F. Current concepts of immune based treatments for patients with HCC: from basic science to novel treatment approaches [J]. Gut, 2015, 64(5): 842-848.
- [4] HANAHAHAN D, WEINBERG RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.
- [5] HA M, KIM VN. Regulation of microRNA biogenesis [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(8): 509-524.
- [6] WEI R, HUANG GL, ZHANG MY, et al. Clinical significance and prognostic value of microRNA expression signatures in hepatocellular carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(17): 4780-4791.
- [7] ZHANG CJ, DU HJ. Screening key miRNAs for human hepatocellular carcinoma based on miRNA-mRNA functional synergistic network [J]. Neoplasma, 2017, 64(6): 816-823.
- [8] KONG Q, SHU N, LI J, et al. Mir-641 functions as a tumor suppressor by targeting MDM2 in human lung cancer [J]. Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics, 2018, 26(5): 735-741.
- [9] CHEN J, CUI J, GUO X, et al. Increased expression of miR-641 contributes to erlotinib resistance in non-small-cell lung cancer cells by targeting NF 1 [J]. Cancer Medicine, 2018, 7(4): 1394-1403.
- [10] 郎磊,周明莉,杨佳佳,等. 高表达 ITGB1 促进人乳腺上皮 MCF10A 细胞 EMT 及迁移[J]. 基础医学与临床, 2016, 36(11): 1511-1516.
- [11] HE S, ZHANG J, LIN J, et al. Expression and function of microRNA-27b in hepatocellular carcinoma [J]. Mol Med Rep, 2016, 13(3): 2801-2808.
- [12] TAMORI A, MURAKAMI Y, KUBO S, et al. MicroRNA expression in hepatocellular carcinoma after the eradication of chronic hepatitis virus C infection using interferon therapy [J]. Hepatol Res, 2016, 46(3): E26-35.
- [13] CHILDS-DISNEY JL, DISNEY MD. Small molecule targeting of a microRNA associated with hepatocellular carcinoma [J]. Acs Chem Biol, 2016, 11(2): 375-380.
- [14] YAO T, RAO Q, LIU L, et al. Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in cervical cancer [J]. Virol J, 2013, 10(1): 175.
- [15] HINSKE LC, HEYN J, HÜBNER M, et al. Intronic miRNA-641 controls its host Gene's pathway PI3K/AKT and this relationship is dysfunctional in glioblastoma multiforme [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 489(4): 477-483.
- [16] YAN L, LIU J, ZHAO Y, et al. Suppression of miR-628-3p and miR-641 is involved in rifampin-mediated CYP3A4 induction in HepaRG cells [J]. Pharmacogenomics, 2017, 18(1): 57-64.

(收稿日期:2018-10-18)