

miR-125b 和血管内皮生长因子 A 在肝细胞癌中的表达及两者的相关性

刘国庆,滕建曦,孔亮亮,倪庆锋,孔连宝*

(南京医科大学第一附属医院肝脏外科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨 miR-125b 与血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A) 在肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 中的表达情况及与两者的相关性。方法:利用 real-time PCR 检测肝癌、癌旁组织、肝癌细胞 Huh-7、HepG2 以及正常肝细胞 L02 中 miR-125b 表达,应用 real-time PCR 和 Western blot 分别检测肝癌、癌旁组织中 VEGF-A mRNA 和蛋白表达。转染 miR-125b 模拟物(mimic)上调肝癌细胞 HepG2 中 miR-125b 表达后,real-time PCR 和 Western blot 检测 HepG2 细胞中 VEGF-A mRNA 和蛋白表达。结果:miR-125b 在人肝癌组织中的表达较癌旁组织明显降低($P < 0.05$);在肝癌细胞 Huh-7、HepG2 中的表达较 L02 明显降低($P < 0.05$)。VEGF-A mRNA 和蛋白在人肝癌组织中的表达较癌旁组织明显升高($P < 0.05$)。miR-125b mimic 上调 HepG2 中 miR-125b 表达后,转染组 VEGF-A mRNA 和蛋白表达较空白组和阴性对照组均明显下降($P < 0.05$)。结论:miR-125b 在肝癌中表达明显下调,而 VEGF-A 表达上调;低表达的 miR-125b 丧失对 VEGF-A 表达的抑制作用可能是肝癌发生的重要机制。

[关键词] miR-125b;血管内皮生长因子 A;肝细胞性肝癌

[中图分类号] Q786;R735.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)07-877-05

doi:10.7655/NYDXBNS20130704

Expression and correlation of miR-125b and vascular endothelial growth factor-A in hepatocellular carcinoma

Liu Guoqing, Teng Jianxi, Kong Liangliang, Ni Qingfeng, Kong Lianbao*

(Department of Hepatic Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] Objective: To investigate the expression of miR-125b and vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) in hepatocellular carcinoma (HCC) and to analyze their correlation. **Methods:** Real-time PCR was performed to detect miR-125b expression in HCC, tumor-adjacent tissue and Huh-7, HepG2, L02. Real-time PCR and Western blot were employed to detect the expression of VEGF-A mRNA and protein in HCC, tumor-adjacent tissue. miR-125b mimics was transfected into HepG2 cells and the expression of VEGF-A mRNA and protein were tested with real-time PCR and Western blot, respectively. **Results:** The expression of miR-125b was down-regulated in HCC compared to tumor-adjacent tissue ($P < 0.05$). The expression of miR-125b mRNA in HepG2 cells was also less than to L02 cells ($P < 0.05$). VEGF-A mRNA and protein were up-regulated HCC and tumor-adjacent tissue compared to normal liver tissue ($P < 0.05$), which was down-regulated in HepG2 cells after transfection of an miR-125b mimic ($P < 0.05$). **Conclusion:** miR-125b is down-regulated, but VEGF-A is up-regulated in HCC, suggesting that the depressed expression of miR-125b promotes the carcinogenesis of hepatocellular carcinoma by upregulating VEGF-A expression.

[Key words] miR-125b; VEGF-A; hepatocellular carcinoma

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(7):877-881]

肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是消化系统最常见的恶性肿瘤之一, 其为高复发、易转

移、富血供的恶性肿瘤, 它的发生、发展、浸润与转移均依赖新生血管形成。微小 RNA (microRNAs, miRNA) 是近年来新发现的一类分布广泛的非编码小分子 RNA, 长度为 19~23 个核苷酸, 主要在转录后水平对其靶基因表达进行负性调控^[1]。大量研究发现多种恶性肿瘤中均有 miR-125b 的异常表达, 血管内

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81270483)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: konglb@njmu.edu.cn

皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A) 在肿瘤的发生发展中扮演着重要的角色。但在肝癌中 miR-125b 和 VEGF-A 之间是否具有表达相关性尚未见报道。本实验在不同的肝脏组织及细胞系中检测 miR-125b 及 VEGF-A 的表达差异, 并通过在 HepG2 细胞中上调 miR-125b 表达检测 VEGF-A 表达水平, 初步探讨肝细胞癌中 VEGF-A 的表达异常与 miR-125b 表达的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本

25 例肝癌及癌旁组织均取自本院手术标本, 并经病理证实, 组织于 -80°C 保存。正常肝脏细胞株 L02、肝癌细胞株 HepG2、Huh-7 均为本实验室冻存。

1.1.2 主要试剂

胎牛血清、DMEM 培养液和胰蛋白酶(美国 Gibco 公司); miR-125b TaqMan[®]MicroRNA assay 和 U6 TaqMan[®]MicroRNA assay 及 TaqMan[®]MicroRNA Reverse Transcription Kit 和 TaqMan Universal PCR Master Mix(美国 ABI 公司); SYBR Green 荧光染料试剂盒(日本 TaKaRa 公司); VEGF-A 及 GAPDH 的上下游引物、TRIzol 和转染试剂脂质体 2000 (美国 Invitrogen 公司); VEGF-A 一抗(兔抗人)(美国 Cell Signaling 公司); miR-125b 模拟物(miR-125b mimic, 上海吉玛制药技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 HepG2、Huh-7 和 L02 细胞培养

均用含有 10% 的胎牛血清 C11995 培养基, 在 37°C 、5% CO_2 细胞培养箱中培养。每 2~3 d 用 0.25% 胰酶消化传代 1 次。

1.2.2 细胞转染

取稳定生长的对数期 HepG2 细胞, 消化计数后, 以每孔 3.0×10^5 个细胞密度种植于 6 孔细胞培养板中, 分为空白组、阴性对照组、转染组, 空白组加入无血清无抗生素的 Opti-MEM 培养基 2 ml, 实验组加入终浓度为 50 nmol/L 的 miR-125b mimic 和 5 μl Lipofectamine 2000, 阴性对照组加入终浓度为 50 nmol/L 的阴性对照试剂(mimics negative control)和 5 μl Lipofectamine 2000, 最后各组均用 Opti-MEM 培养基调至每孔 2 ml, 转染步骤严格按照说明书进行。12 h 检测转染效率, 24 h 后提取细胞总 RNA 进行实时 PCR 反应, 48 h 后提取蛋白质进行 Western blot 检测, 实验重复 3 次。

1.2.3 实时定量 PCR 检测 miR-125b 的表达

应用 TRIzol 一步法提取组织总 RNA, 紫外分光光度法测定 RNA 纯度及浓度。miRNA 特异性逆转录: 利用 TaqMan[®]MicroRNA 反转录试剂盒进行反转录, 每组标本分别进行 miR-125b 和内参照 miR-U6 特异性的逆转录, 具体操作按说明书进行, 收集 cDNA。TaqMan 探针法 miRNA 实时定量 PCR 检测: miR-125b 和内参照 miR-U6 的 PCR 反应体系为 20 μl , 依次加入 Master Mix 10 μl , 特异性 TaqMan 探针 1 μl , 特异性逆转录的 cDNA 模板 1 μl , 去核酸水 8 μl 。反应条件: 95°C 10 min, 95°C 15 s, 60°C 1 min, 共 40 个循环。反应在 ABI PRISM[®] 7300 型荧光定量仪进行, 每个反应设 3 个复孔。

1.2.4 实时定量 PCR 检测 VEGF-A mRNA 的表达

应用 TRIzol 一步法提取组织总 RNA, 紫外分光光度法测定 RNA 纯度及浓度并进行逆转录。VEGF-A 上游引物: 5'-CGCAGCTACTGCCATCCAAT-3'; 下游引物: 5'-GTGAGGTTTGATCCGCATAATCT-3'。GAPDH 上游引物: 5'-TGCACCACCAACTGCTTAG-3'; 下游引物: 5'-GGATGCAGGGATGATGTTTC-3'。荧光定量 PCR 步骤严格按照试剂盒说明书进行, 反应条件: 94°C 5 min, 94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s, 共 39 个循环。反应在 ABI PRISM[®] 7300 型荧光定量仪进行, 每个反应设 3 个复孔。

1.2.5 Western blot 检测各肝脏组织 VEGF-A 蛋白表达

在收集的组织中加入 500 μl 组织裂解液抽提蛋白, 测定蛋白质的浓度。6% SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 采用湿转法转膜, 5% BSA 室温封闭 1 h。加入 1:400 稀释的 VEGF-A 一抗 4°C 孵育过夜, TBS-T 摇床漂洗 3 次, 每次 10 min 后加 HRP 标记二抗室温 1 h, 37°C 于摇床孵育 1 h, TBS 缓冲液漂洗 3 次, 每次 10 min, 常规曝光、扫描成像。

1.3 统计学方法

采用 SPSS18.0 统计学软件进行分析, 结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 独立样本两两比较采用 *t* 检验, 多组数据间的比较采用单因素方差分析后行 SNK-*q* 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

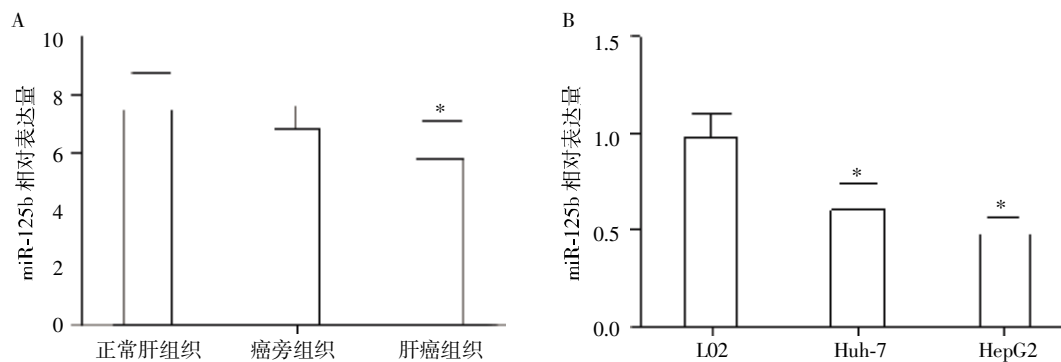
2.1 miR-125b 在肝癌、癌旁组织及肝细胞系中的表达

miR-125b 在肝癌和癌旁组织中的相对表达量分别为 5.757 ± 0.270 和 6.794 ± 0.168 , 肝癌组织与

癌旁组织间表达差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 1A); miR-125b 在 Huh-7、HepG2 和 L02 细胞中的相对表达量分别为 0.565 ± 0.051 、 0.474 ± 0.053 、 0.972 ± 0.078 , 与 L02 细胞相比, Huh-7、HepG2 细胞中的 miR-125b 表达下调 ($P < 0.001$, 图 1B)。

2.2 VEGF-A mRNA 和蛋白在不同肝组织的表达

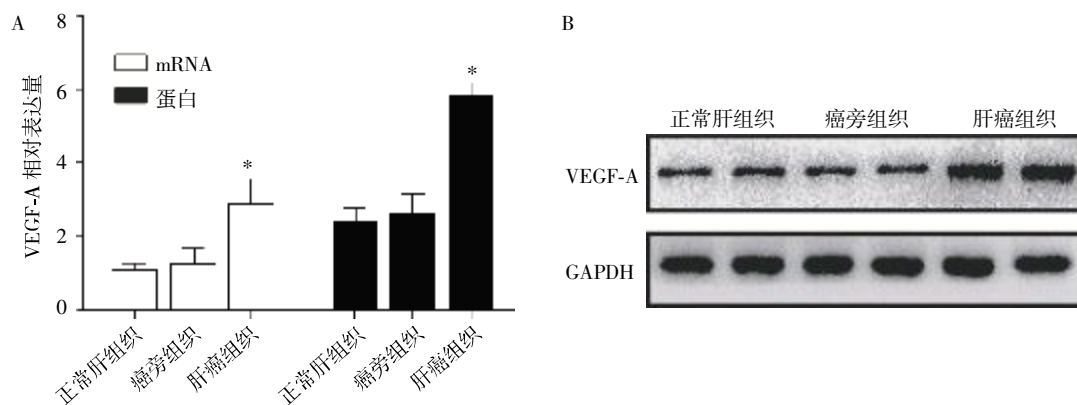
VEGF-A mRNA 在肝癌和癌旁组织中的相对表达量分别为 2.857 ± 0.338 和 1.147 ± 0.079 , 肝癌组织明显高于癌旁组织 ($P < 0.001$, 图 2A)。VEGF-A 蛋白在肝癌组织和癌旁组织中的相对表达量分别为 5.905 ± 0.609 和 2.564 ± 0.118 , 肝癌组织亦明显高于癌旁组织 ($P < 0.001$, 图 2)。



A: 与癌旁组织比较, $*P < 0.001$ ($n=25$); B: 与 L02 细胞比较, $*P < 0.001$ 。

图 1 miR-125b 在肝癌、癌旁组织(A)及肝细胞系(B)中的表达情况

Figure 1 The expression of miR-125b in HCC, tumor-adjacent tissues and (A) and Huh-7, HepG2, L02 cell lines (B)



与癌旁组织比较, $*P < 0.001$ ($n=25$)。

图 2 VEGF-A mRNA 和蛋白在肝癌、癌旁组织的表达情况

Figure 2 The expression of VEGF-A mRNA and protein in HCC, tumor-adjacent tissues

2.3 miR-125b mimic 转染后 VEGF-A mRNA 和蛋白表达

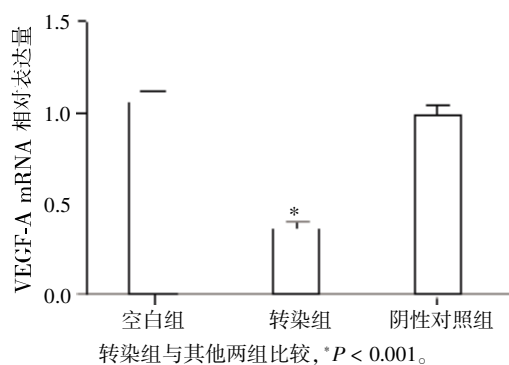
转染 miR-125b mimic 24 h 后提取总 RNA 进行实时定量 PCR 检测, VEGF-A mRNA 在空白组、转染组和阴性对照组的相对表达量分别为 1.055 ± 0.068 、 0.350 ± 0.044 和 0.978 ± 0.061 , 转染组较其他两组明显降低 ($P < 0.001$), 而空白组和阴性对照组之间无明显差异 ($P > 0.05$, 图 3)。48 h 后提取总蛋白行 Western blot 检测, VEGF-A 蛋白在空白组、转染组和阴性对照组的相对表达量分别为 3.022 ± 0.104 、 2.238 ± 0.052 和 2.928 ± 0.107 , 转染组较其他两组明显降低 ($P < 0.001$, 图 4), 而空白组和阴性

对照组之间无明显差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

HCC 是全世界最常见的恶性肿瘤之一, 它的发生发展是一个涉及多基因、多通路、多结构和多步骤改变的复杂过程。肝移植是目前认为最有效的治疗手段, 但由于捐赠肝脏的缺乏限制了它的广泛应用, 所以肝癌的治疗迫切需要新的方法, 其中基因治疗就是一种富有前景的治疗方法。

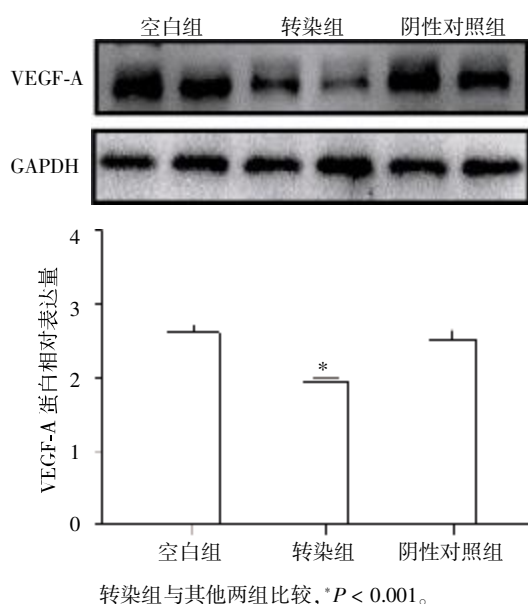
越来越多的研究成果发现 miRNA 与人类疾病的发生发展过程紧密相关, 特别是在肿瘤发生机制中具有举足轻重的作用。大量研究表明, 多种人类肿



转染组与其他两组比较, * $P < 0.001$ 。

图3 miR-125b mimic 转染后 VEGF-A mRNA 表达情况

Figure 3 The expression changes of VEGF-A mRNA with miR-125b mimic



转染组与其他两组比较, * $P < 0.001$ 。

图4 miR-125b mimic 转染后 VEGF-A 蛋白表达

Figure 4 The expression change of VEGF-A protein with miR-125b mimic

瘤都伴有 miRNA 的表达异常,如胰腺癌中 miR-221 表达上调^[2]、肺癌中的 miR-126 表达下调^[3]、结肠直肠癌中的 miR-143 和 miR-145 表达下调^[4] 等等,提示 miRNA 在肿瘤的发生发展中可能发挥类似癌基因或抑癌基因的作用^[5]。自 Murakami 等^[6]首次报道有关 HCC 中 miRNA 异常表达谱以来,近年来多项研究均证实了 miRNA 的异常表达与 HCC 的发生发展相关,在这些研究成果中,let-7a、miR-21、miR-221、miR-222、miR-602、miR-224 和 miR-30 等 miRNA 被发现一致的高表达;而 miR-122a、miR-125a、miR-125b-1、miR-139、miR-145、miR-150、miR-199a、miR-200b、miR-214 和 miR-223 等 miRNA 却被证实在 HCC 组织中呈现一致的低表达,这些异常表达的 miRNA 可能在肝细胞癌变中起重要作用^[7-13]。这些研

究表明 miRNA 与肿瘤之间存在着密切的关系。本研究结果显示 miR-125b 在肝癌组织较正常组织和癌旁组织显著低表达,在肝癌细胞系 Huh-7、HepG2 细胞中的表达较正常肝细胞 L02 细胞显著下调。

近年来研究认为,实体肿瘤的发展与血管生成密切相关,肿瘤不仅通过血管获得丰富的营养,而且还要通过血管输出大量的癌细胞,导致肿瘤不断地生长和转移。研究发现不少细胞因子与肿瘤血管形成密切相关,发现的肿瘤血管生成因子及血管生成抑制因子有四十余种,血管生成因子包括 VEGF-A、酸性及碱性成纤维细胞生长因子 (aFGF、bFGF)、胎盘生长因子(PIGF)、表皮生长因子(EGF)、血管生成素(angionenin)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素-8(IL-8)、基质金属蛋白酶(MMP)等等,其中最主要的是 VEGF-A。VEGF-A 主要由血管内皮细胞产生,是迄今鉴定出来的最重要的血管生成因子,在多种肿瘤中高表达^[14-16],作为肿瘤血管形成和转移最重要的生长因子,其具有促进血管内皮细胞增殖,增加血管通透性,促进血管支持物的生成,抑制肿瘤细胞的凋亡等功能^[17-18],在恶性肿瘤的发生、发展及预后具有极其重要的地位。由于 VEGF-A 的功能强大,因而在抗肿瘤生成基因治疗中 VEGF-A 是比较理想的靶点^[19-21]。本实验中无论在 mRNA 还是蛋白水平,肝癌组织 VEGF-A 明显高于肝癌旁组织。

本研究结果提示,异常表达的 miR-125b 和 VEGF-A 可能在肝癌发生、进展中发挥重要作用。本研究通过运用 miRanda、TargetScan 等软件预测及文献报道^[22],推测 miR-125b 可能作用于 VEGF-A 的 mRNA,为了更进一步明确在肝癌中 miR-125b 是否通过调控 VEGF-A 发挥作用,通过上调 HepG2 细胞中 miR-125b 表达后,发现 VEGF-A 蛋白表达明显降低,明确了在肝癌中 miR-125b 可以抑制 VEGF-A 的表达,进而发挥抑制肿瘤血管形成,导致肝癌细胞衰退。这些研究提示低表达的 miR-125b 丧失对 VEGF-A 表达的抑制作用可能是肝癌发生的重要机制。miR-125b 可能是一种潜在的重要肝癌靶向治疗位点,可作为肝脏疾病诊治的工具。其在肝癌靶向治疗中的作用及其表达调控机制还有待深入研究。

[参考文献]

- [1] Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? [J]. Nat Rev Genet, 2008, 9 (2): 102-114

- [2] Zhang Y, Li M, Wang H, et al. Profiling of 95 microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis [J]. *World J Surg*, 2009, 33(4): 698-709
- [3] Liu B, Peng XC, Zheng XL, et al. MiR-126 restoration down-regulate VEGF and inhibit the growth of lung cancer cell lines in vitro and in vivo [J]. *Lung Cancer*, 2009, 66(2): 169-175
- [4] Li JM, Zhao RH, Li ST, et al. Down-regulation of fecal miR-143 and miR-145 as potential markers for colorectal cancer[J]. *Saudi Med J*, 2012, 33(1): 24-29
- [5] Ventura A, Jacks T. MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way[J]. *Cell*, 2009, 136(4): 586-591
- [6] Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues [J]. *Oncogene*, 2006, 25(17): 2537-2545
- [7] Law PT, Wong N. Emerging roles of microRNA in the intracellular signaling networks of hepatocellular carcinoma [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26(3): 437-449
- [8] Guan Y, Yao H, Zheng Z, et al. MiR-125b targets BCL3 and suppresses ovarian cancer proliferation [J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(10): 2274-2283
- [9] Liang L, Wong CM, Ying Q, et al. MicroRNA-125b suppressed human liver cancer cell proliferation and metastasis by directly targeting oncogene LIN28B2 [J]. *Hepatology*, 2010, 52(5): 1731-1740
- [10] Heneghan HM, Miller N, Kerin MJ. MiRNAs as biomarkers and therapeutic targets in cancer[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2010, 10(5): 543-550
- [11] Pineau P, Volinia S, McJunkin K, et al. miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(1): 264-269
- [12] Yang L, Ma Z, Wang D, et al. MicroRNA-602 regulating tumor suppressive gene RASSF1A is overexpressed in hepatitis B virus-infected liver and hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Biol Therapy*, 2010, 9(10): 803-808
- [13] Wong QW, Ching AK, Chan AW, et al. MiR-222 overexpression confers cell migratory advantages in hepatocellular carcinoma through enhancing AKT signaling [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(3): 867-875
- [14] Kwon KA, Kim SH, Oh SY, et al. Clinical significance of preoperative serum vascular endothelial growth factor, interleukin-6, and C-reactive protein level in colorectal cancer[J]. *BMC Cancer*, 2010, 10: 203
- [15] Maae E, Olsen DA, Steffensen KD, et al. Prognostic impact of placenta growth factor and vascular endothelial growth factor A in patients with breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 133(1): 257-265
- [16] 陈明祥, 李 扬, 吕俊明, 等. 胃癌肝转移患者治疗过程中血管内皮细胞生长因子水平的变化[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2011, 31(11): 1653-1655
- [17] Yla-Herttuala S. Gene therapy with vascular endothelial growth factors [J]. *Biochem Soc Trans*, 2009, 37 (Pt 6): 1198-1200
- [18] Malaguarnera G, Giordano M, Paladina I, et al. Serum markers of hepatocellular carcinoma [J]. *Dig Dis Sci*, 2010, 55(10): 2744-2755
- [19] Zhao X, Li J, Zhuo J, et al. Reexpression of ARHI inhibits tumor growth and angiogenesis and impairs the mTOR/VEGF pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 403(3-4): 417-421
- [20] Roudnicky F, Poyet C, Wild P, et al. Endocan is upregulated on tumor vessels in invasive bladder cancer where it mediates VEGF-A-induced angiogenesis[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(3): 1097-1106
- [21] 王耀辉, 马 娟, 束 为, 等. PGE2 通过 cAMP-PKA 信号转导通路促进肝癌细胞 VEGF 表达[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2010, 30(3): 299-303
- [22] Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer [J]. *Gastroenterology*, 2007, 133(2): 647-658

[收稿日期] 2013-02-27