

miRNA-873 促进肝癌细胞的迁移与侵袭

韩国勇,张 龙,陈志强,王小微,朱 勤,黄新立,王学浩*

(南京医科大学第一附属医院肝脏移植中心,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:检测 miRNA-873 在肝细胞肝癌组织以及细胞系中的表达情况,并进一步探讨 miRNA-873 对肝癌细胞迁移和侵袭的影响。方法:实时定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测肝细胞肝癌组织、癌旁组织以及细胞系中 miRNA-873 的表达水平。分别用划痕实验和 Transwell 细胞侵袭实验检测细胞迁移和侵袭能力。蛋白质印迹(Western blot)检测 Janus 激酶 2(Janus kinase 2, JAK2)和信号转导子与转录活化子 3(signal transduction and transcriptional activation 3, STAT3)活性的变化。结果:肝癌组织和肝癌细胞系中 miRNA-873 表达水平明显高于对应的癌旁组织和正常肝脏细胞。RT-PCR 证实转染 miRNA-873 inhibitor 或 mimics 后 miRNA-873 的表达量明显降低或升高($P<0.01$)。与对照组(NC)相比,敲低 miRNA-873 明显抑制肝癌细胞 HepG2 迁移和侵袭,差异有统计学意义($P<0.05$)。过表达 miRNA-873 则明显促进肝癌细胞 Huh7 迁移和侵袭,差异有统计学意义($P<0.05$)。miRNA-873 可明显活化 JAK2/STAT3 信号通路。结论:miRNA-873 在肝癌中高表达,且可能通过活化 JAK2/STAT3 信号通路促进肝癌的迁移与侵袭。

[关键词] miRNA-873;肝细胞肝癌;肿瘤侵袭;JAK2;STAT3

[中图分类号] R735.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)09-1076-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20170902

MiRNA-873 promotes migration and invasion of hepatocellular carcinoma

Han Guoyong, Zhang Long, Chen Zhiqiang, Wang Xiaowei, Zhu Qin, Huang Xinli, Wang Xuehao*

(Department of Liver Transplantation Center, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of miRNA-873 in hepatocellular carcinoma(HCC) tissues and cell lines, further study the effect of miRNA-873 on migration and invasion in hepatocellular carcinoma cell lines. **Methods:** The expression of miRNA-873 in HCC tissues and cell lines was detected by RT-PCR. Wound-healing experiment and Transwell invasion were used to examine migration and invasion of cells, respectively. Western blot was used to detect the activity of Janus kinase 2 (JAK2) and signal transduction and transcriptional activation 3(STAT3). **Results:** The results showed that miRNA-873 was upregulated in HCC tissues and HCC cell lines, compared with that in the normal control. RT-PCR showed that the expression of miRNA-873 decreased or increased after miRNA-873 inhibitor or mimic transfection, respectively ($P<0.01$). Compared with the normal control, knockdown of miR-873 significantly inhibited the migration and invasion of HepG2($P<0.05$). However, overexpression of miRNA-873 had the opposite effect($P<0.05$). We also found that miRNA-873 significantly activated JAK2/STAT3 signal pathway. **Conclusion:** MiRNA-873 was overexpressed in HCC and might promote HCC migration and invasion through JAK2/STAT3 signal pathway.

[Key words] miRNA-873; hepatocellular carcinoma; tumor invasion; JAK2; STAT3

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(09):1076-1080]

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界上最常见的恶性肿瘤之一,其病死率位于所有肿瘤的第 3 位^[1-2]。因 HCC 发现一般较晚且进展较快,尽管近年来肝切除、肝移植以及介入等治疗已取得相当大的进步, HCC 的预后仍然较差,因此进一

步探讨 HCC 发生与发展的分子机制具有重要意义。

微小 RNA(microRNA, miRNA)是长度约为 20~24 个核苷酸的小 RNA,其通过在 3'-UTR 靶向 mRNA 的互补序列抑制靶基因的表达发挥作用^[3-4]。大量研究已表明,miRNA 参与肿瘤的增殖、分化、凋亡、转移以及血管形成等多种生物学功能的调控^[5-6]。近来有报道表明,miRNA-873 在肺癌、乳腺癌以及卵巢癌

[基金项目]江苏省六大人才高峰项目基金(NO2014-WSW-005)

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

中表达异常^[7-9]。miRNA-873 可通过靶向细胞周期依赖性蛋白激酶 3(cyclin dependent kinase 3,CDK3)来抑制雌激素受体 α (estrogen receptor α ,ER α)的活性及细胞生长进而介导乳腺癌的三苯氧胺耐药性,然而,miRNA-873 在 HCC 中的表达及作用仍不明确。本研究采用 PCR、Western blot、细胞划痕以及 Transwell 方法检测 HCC 组织及细胞中 miRNA-873 表达量,以及其对 HCC 细胞迁移与侵袭的影响,进而探讨 miRNA-873 在 HCC 发生发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

组织标本采自 2014 年 1 月—2016 年 1 月经南京医科大学第一附属医院肝脏外科行手术切除治疗的 HCC 患者 30 例,癌旁组织 30 例,术后均由南京医科大学第一附属医院病理科确诊。入组患者术前均未接受过放疗、化疗或激素治疗。组织标本离体后切取并迅速置于液氮罐内,后置-80 °C 保存备用。

人 HCC 细胞系 Hep3B、HepG2、SMC-7721、Huh7 以及正常人肝细胞 HL7702 购于上海中国科学院细胞库,所有细胞均用 DMEM 培养基加 10%胎牛血清及 1%青、链霉素培养基在 37 °C、5%CO₂ 下培养。

Janus 激酶 2(Janus kinase 2,JAK2)及其磷酸化抗体,信号转导子与转录活化子 3(signal transduction and transcriptional activation 3,STAT3)及其磷酸化抗体,GAPDH 抗体均购自美国 CST 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染

取对数生长期的 HCC 细胞种植于 6 孔板中培养 24 h,miRNA-873 过表达(mimics)或 miRNA-873 敲低(inhibitor,上海吉玛公司)及其各自阴性对照通过 Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司,美国)进行转染,具体的转染步骤参照试剂盒说明书。转染 6 h 后更换新鲜培养基,继续孵育 24~48 h 后收集细胞检测转染效率并进行功能试验。

1.2.2 RNA 提取和定量实时 PCR

根据说明书采用 TRIzol 法提取总 RNA(大连 TaKaRa 公司)。Nanodrop 2000 检测 RNA 纯度和浓度(NanoDrop 公司,美国)。应用 microRNA 特异性 TaqMan 探针和 TaqMan Universal PCR Master Mix(ABI 公司,美国)进行 miRNA-873 的实时定量 PCR 检测(TaqMan 探针法是高度特异性的定量 PCR 技术,其核心是利用 Taq 酶 3'→5'外切核酸酶活性,切

断探针,产生荧光信号)。反应在 ABI StepOne Plus Detection system(ABI 公司,美国)上进行,扩增条件为:95 °C 预变性 10 min,95 °C 变性 15 s,60 °C 延伸 1 min,扩增 40 个循环。U6 作为内参。反应体系如下:反应预混液为 5 μ L,miRNA-873 或 U6 为 0.5 μ L,模板 cDNA 为 1 μ L,ddH₂O 为 3.5 μ L,总体积为 10 μ L。目的基因和内参的引物如下:miRNA-873 正义链 5'-GCAGGAAGTTGTGTCTCCT-3',反义链 5'-TGAGCTAGGGTTAGTTCGAAGAT-3';U6 正义链 5'-CGCTTACAGCAGACATAC-3',反义链 5'-TTCACGAATTTGCCGTGCAT-3'。2^{- $\Delta\Delta$ Ct}方法计算 miRNA-873 相对表达量。

1.2.3 Western blot

用 RIPA 裂解细胞,提取总蛋白,BCA 测定蛋白含量,加入蛋白上样缓冲液后 100 °C 煮 10 min。SDS-PAGE 进行电泳分离后,采用湿转膜法转至 PVDF 膜上;5%脱脂奶粉室温封闭 2 h;加入一抗 4 °C 孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 15 min;加入二抗孵育 2 h,PBST 洗 3 次,每次 15 min;加入发光反应液,凝胶电泳成像系统进行读片分析。实验重复 3 次。GAPDH、STAT3、p-STAT3、JAK2、p-JAK2 抗体稀释比例均为 1:1 000。

1.2.4 划痕迁移实验

将转染好的细胞均匀铺于 6 孔板继续培养,每孔细胞数约为 5 \times 10⁵ 个。待细胞 90%贴壁后,撤血清饥饿 24 h,用 200 μ L 枪头在 6 孔板中均匀划痕,PBS 洗涤除去漂浮细胞,加入无血清培养基,显微镜下观察并拍照,24 h 后再次观察并拍照记录。

1.2.5 细胞侵袭实验

采用 DMEM 将 Matrigel 稀释(1:6),加入至 Transwell 小室,100 μ L/孔(低温条件下),37 °C 放置 1 h,Matrigel 充分聚合后,Transwell 下室加入 750 μ L 含 10%FBS 的 DMEM 培养基,平衡 1 h。用含 1%胎牛血清 DMEM 培养基制备成 1 \times 10⁵ 个/mL 的细胞悬液,取 200 μ L 细胞悬液,接种至 Transwell 上室铺匀,在下室内加入含 10%FBS 的 DMEM 培养基 600 μ L,常规培养 24 h,取出 Transwell 小室,用棉签拭去聚碳酸酯膜表面的 Matrigel,PBS 轻轻冲洗,晾干,甲醛固定,0.1%结晶紫染色,双蒸水冲洗多余结晶紫染液,晾干,光学显微镜下观察并拍照,实验重复 3 次。

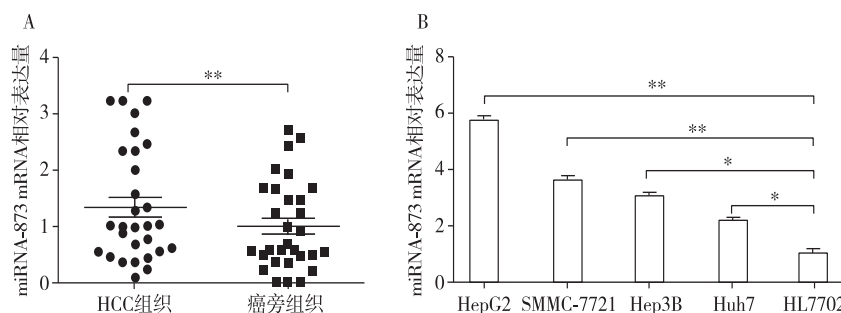
1.3 统计学方法

采用 SPSS 12.0 软件进行统计学处理。结果中计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 Student's *t* 检验;计数资料比较采用卡方检验,多组间比较采用方差分析, $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

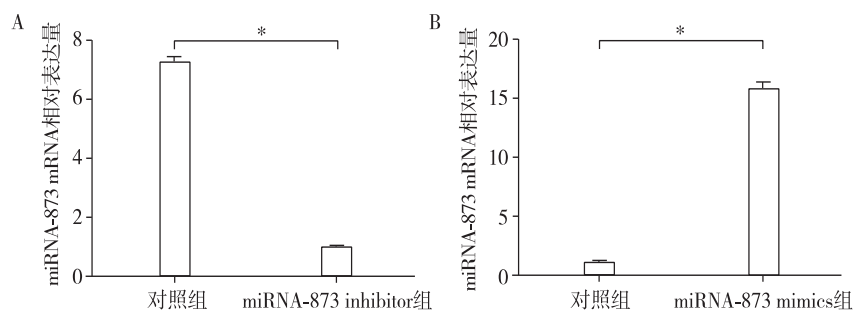
2.1 miRNA-873 在 HCC 组织以及细胞中高表达

通过荧光定量 PCR 检测 30 对 HCC 及癌旁组织, 结果发现 HCC 组织中 miRNA-873 的表达水平明显高于癌旁组织 ($P < 0.01$, 图 1A), 进一步检测 HCC 细胞和正常人肝细胞 HL7702 中 miRNA-873 的表达水平, 结果表明, HCC 细胞中 miRNA-873 表达高于正常肝细胞(图 1B)。



A: 荧光定量 PCR 检测 HCC 组织中 miRNA-873 表达明显高于癌旁组织; B: 荧光定量 PCR 检测 HCC 细胞中 miRNA-873 表达明显高于正常人肝细胞 HL7702。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 1 miRNA-873 在 HCC 组织以及 HCC 细胞中的相对表达量
Figure 1 Relative expression of miRNA-873 in HCC tissues and cell lines



A: HepG2 细胞中转染 miRNA-873 inhibitor 后 miRNA-873 的表达水平; B: Huh7 细胞中转染 miRNA-873 mimics 后 miRNA-873 的表达水平。两组比较, * $P < 0.001$ 。

图 2 通过转染 miRNA-873 inhibitor 或 mimics 改变 HCC 细胞中 miRNA-873 的表达水平

Figure 2 Changing expression of miRNA-873 in HCC cell lines by miRNA-873 inhibitor or mimics transfection

2.3 miRNA-873 参与 HCC 细胞迁移的调控

通过细胞划痕实验检测干扰或过表达 miRNA-873 后 HCC 细胞的转移能力。与空白对照相比, 干扰 miRNA-873 后 HepG2 细胞迁移能力受到抑制 (图 3A), 过表达 miRNA-873 后 Huh7 细胞迁移能力增强(图 3B)。

2.4 miRNA-873 参与 HCC 细胞侵袭的调控

通过小室侵袭实验检测干扰或过表达 miRNA-873 后 HCC 细胞的侵袭能力。与空白对照相比, 干扰 miRNA-873 后, HepG2 细胞侵袭能力受到抑制 (图 4A), 过表达 miRNA-873 后 Huh7 细胞侵袭能力增强(图 4B)。

2.2 miRNA-873 inhibitor 或 mimics 可明显改变 HCC 细胞中 miRNA-873 的表达水平

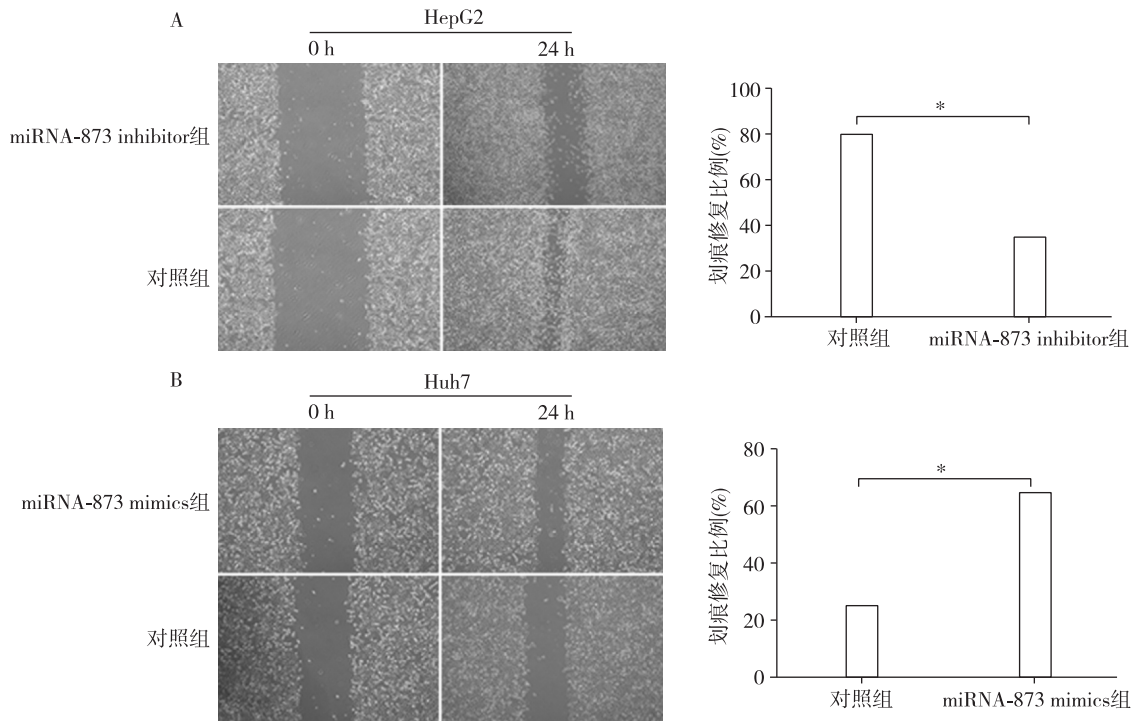
为研究 miRNA-873 在 HCC 细胞中的作用, 本研究通过 miRNA-873 inhibitor 或 mimics 进而改变细胞中 miRNA-873 的表达量, 通过荧光定量 PCR 验证转染效果。结果显示, 转染 miRNA-873 inhibitor 或 mimics 后, 肝癌细胞 HepG2 和 Huh7 中 miRNA-873 的表达量显著降低或升高 (图 2, $P < 0.001$)。

2.5 miRNA-873 通过活化 JAK2/STAT3 通路发挥促进肿瘤转移和侵袭作用

为进一步研究 miRNA-873 促进 HCC 转移与侵袭可能相关的分子机制, 通过 Western blot 检测 miRNA-873 表达量改变之后 JAK2 和 STAT3 活性的变化。结果显示, 过表达 miRNA-873 后 JAK2 和 STAT3 的磷酸化明显增强, 干扰 miRNA-873 后 JAK2 和 STAT3 的磷酸化明显减弱(图 5)。

3 讨论

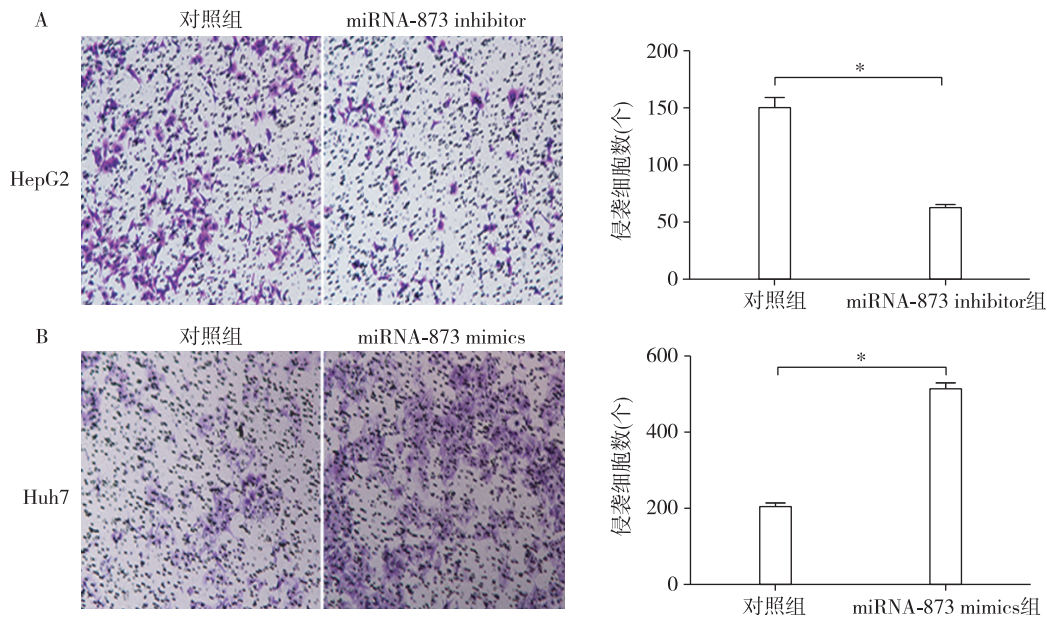
HCC 是最常见的恶性肿瘤之一, 由于 HCC 目前预后仍然较差, 因此探索 HCC 发生发展的分子机



A:HepG2 在转染 miRNA-873 inhibitor 后迁移能力减弱;B:Huh7 在转染 miRNA-873 mimics 后迁移能力增强(n=3)。两组比较,*P<0.001。

图 3 miRNA-873 对 HCC 细胞迁移能力的影响(×100)

Figure 3 Effect of miRNA-873 on migration of HCC cells(×100)



A:HepG2 在转染 miRNA-873 inhibitor 后侵袭能力减弱;B:Huh7 在转染 miRNA-873 mimics 后侵袭能力增强(n=3)。两组比较,*P<0.01。

图 4 miRNA-873 对 HCC 细胞侵袭能力的影响(×100)

Figure 4 Effect of miRNA-873 on invasion of HCC cells(×100)

制十分必要。已有大量报道证实,microRNA 参与包括 HCC 在内的许多肿瘤的发生与发展。一些 microRNA 在肿瘤中起到促癌基因作用,也有许多则发挥抑癌作用。例如 miRNA-155 在 HCC 中的表达明显增高,可促进 HCC 细胞的侵袭与转移,且其表达水平与患者预后呈明显负相关^[10]。而 miRNA-133a 则

抑制 HCC 的发生发展,miRNA-133a 可明显抑制肿瘤细胞的增殖与转移^[11]。因此进一步研究 microRNA 在 HCC 发生与发展中的作用有重要意义。

miRNA-873 是近来新发现的 1 个 microRNA,已有研究表明该 microRNA 参与肿瘤的进展,如乳腺癌、卵巢癌等。但其在 HCC 中的表达情况及是否在

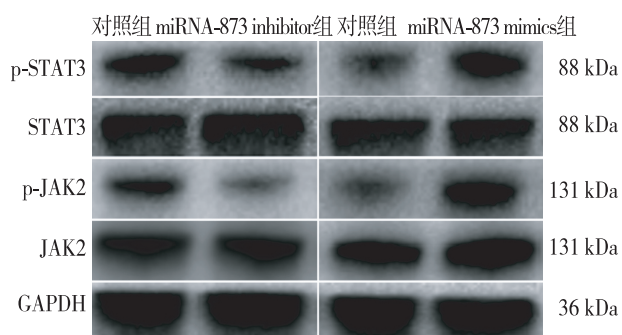


图5 JAK2和STAT3活性的改变

Figure 5 Changes of JAK2 and STAT3 activity

HCC中起到一定作用仍未知。为研究miRNA-873在HCC中的作用,本研究通过荧光定量PCR检测其在HCC组织及细胞中的表达量,发现在HCC组织及细胞中miRNA-873的水平明显高于对应癌旁组织和正常肝脏细胞,表明miRNA-873可能在HCC中起促癌作用。为进一步研究其功能,本研究通过miRNA-873 inhibitor和miRNA-873 mimics敲低或过表达HCC细胞系中miRNA-873的表达水平,并通过划痕和小室实验检测miRNA-873表达水平变化之后是否影响HCC细胞的迁移和转移能力。结果显示抑制miRNA-873表达可明显抑制HepG2细胞的迁移和侵袭能力,而过表达miRNA-873可促进Huh7细胞的迁移与转移。

JAK2/STAT3信号通路在正常细胞中的活性受到严格调控^[12],大量研究表明该信号通路在肿瘤中异常活化,促进肿瘤的发生及进展^[13-14]。例如Colomiere等^[15]研究发现其在细胞因子和生长因子调节的上皮间质转化过程中发挥至关重要的作用。趋化因子CXCL12可磷酸化JAK2/STAT3促进肿瘤的生长与转移^[16]。在HCC中,自噬可通过JAK2/STAT3信号通路调节肿瘤细胞凋亡等^[17]。因此本研究进一步检测miRNA-873是否对该通路具有调节作用。结果显示过表达miRNA-873后JAK2和STAT3的磷酸化水平明显增高,而抑制miRNA-873后JAK2和STAT3的活性明显减低。

综上所述,miRNA-873在HCC中的表达量明显增高,在HCC的迁移和侵袭过程中发挥显著促进作用,其机制可能是通过活化JAK2/STAT3信号通路发挥作用。

[参考文献]

- [1] Testino G, Leone S, Patussi V, et al. Hepatocellular carcinoma: diagnosis and proposal of treatment [J]. *Minerva Med*, 2016, 107(6):413-426
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in

- China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2):115-132
- [3] Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA [J]. *Trends Genet*, 2006, 22(3):165-173
- [4] Olena AF, Patton JG. Genomic organization of microRNAs[J]. *J Cell Physiol*, 2010, 222(3):540-545
- [5] 熊兵红, 马利, 程勇, 等. miR-21在大肠癌中的表达及其靶基因探讨[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2014, 34(3):281-286
- [6] 范磊, 袁同洲, 陈琦, 等. microRNA-145抑制骨肉瘤生长以及血管形成的动物实验研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(2):160
- [7] Gao Y, Xue Q, Wang D, et al. miR-73 induces lung adenocarcinoma cell proliferation and migration by targeting SRCIN1[J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(11):2519-2526
- [8] Cui J, Yang Y, Li H, et al. MiR-873 regulates ERα transcriptional activity and tamoxifen resistance via targeting CDK3 in breast cancer cells[J]. *Oncogene*, 2015, 34(30):3895-3907
- [9] Wu DD, Li XS, Meng XN, et al. MicroRNA-873 mediates multidrug resistance in ovarian cancer cells by targeting ABCB1[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(8):10499-10506
- [10] Yan XL, Jia YL, Chen L, et al. Hepatocellular carcinoma-associated mesenchymal stem cells promote hepatocarcinoma progression: role of the S100A4-miR155-SOCS1-MMP9 axis[J]. *Hepatology*, 2013, 57(6):2274-2286
- [11] Zhang W, Liu K, Liu S, et al. MicroRNA-133a functions as a tumor suppressor by targeting IGF-1R in hepatocellular carcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(12):9779-9788
- [12] Mui A. The role of STATs in proliferation, differentiation, and apoptosis[J]. *Cell Mol Life Sci*, 1999, 55(12):1547-1558
- [13] Behera R, Kumar V, Lohite K, et al. Activation of JAK2/STAT3 signaling by osteopontin promotes tumor growth in human breast cancer cells[J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(2):192-200
- [14] Liu X, Wang J, Wang H, et al. REG3A accelerates pancreatic cancer cell growth under IL-6-associated inflammatory condition: Involvement of a REG3A-JAK2/STAT3 positive feedback loop[J]. *Cancer Lett*, 2015, 362(1):45-60
- [15] Colomiere M, Findlay J, Ackland L, et al. Epidermal growth factor-induced ovarian carcinoma cell migration is associated with JAK2/STAT3 signals and changes in the abundance and localization of alpha6beta1 integrin [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41(5):1034-1045
- [16] Pfeiffer M, Hartmann TN, Leick M, et al. Alternative implication of CXCR4 in JAK2/STAT3 activation in small cell lung cancer[J]. *Br J Cancer*, 2009, 100(12):1949-1956
- [17] Wu J, Guo J, Cao Q, et al. Autophagy impacts on oxaliplatin-induced hepatocarcinoma apoptosis via the IL-17/IL-17R-JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(2):770-776

[收稿日期] 2017-03-30