

· 肿瘤学研究 ·

miR-558靶向TNFAIP1调控肝癌的生长

仲 晨,朱 勤*

南京医科大学第一附属医院肝胆中心,中国医学科学院肝移植重点实验室,江苏 南京 210029

[摘要] 目的:探讨肝癌中微小RNA(microRNA, miR)-558的作用以及可能的相关分子机制。方法:采用RT-PCR检测miR-558在35对肝癌组织和癌旁组织中的表达。CCK-8、平板克隆和流式细胞仪检测miR-558和人肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白1(tumor necrosis factor- α induced protein 1, TNFAIP1)对肝癌细胞生长及周期的影响。荧光素酶报告实验研究miR-558与TNFAIP1的靶向关系。Western blot检测蛋白水平的表达变化。结果:miR-558在肝癌组织中的表达量明显高于癌旁组织($P < 0.01$)。敲低miR-558可显著抑制肝癌细胞增殖,过表达miR-558可明显促进肝癌细胞生长($P < 0.01$)。miR-558在肝癌细胞中直接靶向TNFAIP1抑制其表达发挥作用。上调TNFAIP1可显著消除miR-558对肝癌细胞的促进作用。结论:miR-558在肝癌组织中明显高表达,miR-558通过靶向调节TNFAIP1可明显促进肝癌细胞增殖。miR-558在肝癌患者中具有一定的靶向治疗价值。

[关键词] 肝癌;miR-558;增殖**[中图分类号]** R735.7**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2019)08-1172-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20190814

miR-558 regulates the growth of liver cancer by targeting TNFAIP1

Zhong Chen, Zhu Qin*

Hepatobiliary Center, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Key Laboratory of Liver Transplantation, Chinese Academy of Medical Sciences, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the role and possible molecular mechanism of microRNA (miR)-558 in liver cancer. **Methods:** RT-PCR was used to detect the expression of miR-558 in 35 liver cancer tissues and 35 paracancerous tissues. The effects of miR-558 and TNFAIP1 on the growth and cycle of hepatoma cell were detected by cell counting kit-8 (CCK-8), plate clone and flow cytometry. Luciferase assays were performed to analyze the relationship between miR-558 and TNFAIP1. The expression of protein level was detected by Western blot. **Results:** The expression of miR-558 in the liver cancer tissues was significantly higher than that in the paracancerous tissue ($P < 0.01$). Knock down of miR-558 significantly inhibited the proliferation of hepatoma cells, while overexpression of miR-558 could significantly promote the growth of hepatoma cells ($P < 0.01$). MiR-558 functioned in hepatoma cells through targeting TNFAIP1 directly. TNFAIP1 overexpression could significantly reverse the effect of miR-558 on hepatoma cell. **Conclusion:** MiR-558 was highly expressed in liver cancer tissue, and miR-558 can promote the proliferation of hepatoma cells by targeting TNFAIP1. MiR-558 had a certain value of target therapy in liver cancer patients.

[Key words] liver cancer; miR-558; proliferation

[Acta Univ Med Nanjing, 2019, 39(08): 1172-1176]

肝癌是最常见的恶性肿瘤之一,是全球癌症相关死亡的第三大主要原因^[1]。尽管肝癌的诊断和治

疗方面取得了很大进展,但由于肝癌发现一般较晚且进展迅速,其长期年生存率仍然很低^[2]。因此,进一步探讨肝癌发生以及进展的分子机制具有重要意义。

小分子核糖核酸(microRNA, miRNA)是内源基因编码的一群非编码小分子RNA,主要是通过靶向

[基金项目] 江苏高校优势学科建设工程资助项目(JX10231802)

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

基因 mRNA 3'非翻译区(UTR)结合诱导降解或抑制翻译发挥转录后的调控作用^[3-4]。近来有研究表明 miRNA 调控肿瘤细胞的多种生物学行为,如增殖、转移、凋亡和耐药等^[5-6]。如 miR-155 通过靶向调节 CDX1 促进胶质瘤生长^[7]。

新近研究发现 miR-558 在多种肿瘤中表达上调,在肿瘤发生发展过程中起到促进作用^[8-9],但其在肝癌中的研究尚未见报道。本研究采用 RT-PCR、CCK-8、平板克隆和流式细胞仪方法检测肝癌中 miR-558 表达量以及调节 miR-558 对肝癌细胞增殖的影响,探讨其在肝癌发生发展中的作用。

1 对象和方法

1.1 对象

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胆中心行手术切除治疗的肝癌患者 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℃保存以备后用。本研究获得我院伦理委员会批准并征得患者及家属的知情同意。

1.2 方法

1.2.1 定量实时 PCR

应用 microRNA 特异性 TaqMan 探针和 TaqMan Universal PCR Master Mix 进行 miR-558 的实时定量 PCR 检测。反应在 ABI StepOne Plus Detection system 上进行,扩增条件为:95℃预变性 10 min,95℃变性 15 s,60℃延伸 1 min,扩增 40 个循环。miR-558 前引物序列为 5'-TTCGACTTTACTGGCATTG-CAC-3',后引物序列 5'-TGCATCCTGGTTAACGGT-CAA-3',选择 U6 作为内参,2^{-ΔΔCT}(CT 表示循环阈值,ΔCT=CT_{miR-558}-CT_{U6})表示 miR-558 的相对表达量。

1.2.2 细胞培养

肝癌细胞株以及正常肝脏细胞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、链霉素培养基培养,培养环境为 37℃、5% CO₂ 湿化培养箱。

1.2.3 细胞转染

转染前 24 h 将细胞以 40%~50%密度铺于 6 孔板中,运用 miR-558 mimics 或 inhibitor(Gene Pharma 公司)、Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司)转染试剂上调 miR-558。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。

1.2.4 CCK-8 实验

采用 CCK-8 方法检测细胞增殖能力。细胞转染后 24 h,将细胞分别以 3 000 个/孔接种于 96 孔板,分别于 24 h、48 h、72 h 和 96 h 进行酶标仪检测,在酶标仪上以波长 450 nm 测各孔的吸光度值,以上实验重复 3 次。

1.2.5 平板克隆实验

取对数生长期的各组细胞,将细胞以每孔 200 个的密度分别接种于 6 孔板中,置细胞培养箱中培养 2~3 周。在培养皿中出现肉眼可见的克隆时终止培养。弃去上清液,PBS 浸洗,加 4%多聚甲醛固定细胞 5 mL 固定 15 min。去固定液,加适量结晶紫应用染色液染 10~30 min,用流水缓慢洗去染色液,空气干燥,进行克隆计数。

1.2.6 细胞周期实验

将细胞接种于 6 孔板中培养 48 h,用 70%乙醇在 4℃固定 6 h 以上,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)冲洗 2 次。50 μg/mL 碘化丙啶、PBS-Triton X-100 染色,室温避光 30 min。FACSCalibur 流式细胞仪(BD Biosciences 公司,美国)上分析细胞。

1.2.7 蛋白质印迹

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℃煮 10 min。SDS-PAGE 进行电泳分离后,采用湿转膜法转至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉溶液室温封闭 2 h,加入一抗 4℃孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 15 min,后加入二抗孵育 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。

1.2.8 荧光素酶报告实验

制备含有肿瘤坏死因子-α诱导蛋白 1(tumor necrosis factor-α induced protein 1, TNFAIP1) Luc/Rluc 的重组质粒;分别选用 SMCC-7721 和 Hep3B 细胞将带有 Luc/Rluc 标记的报告基因和目的基因进行共转染,转染时间为 48 h;选用赛默飞双荧光素酶检测试剂盒在酶标仪上进行荧光强度检测。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 12.0 软件进行统计学处理。定量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 Student's *t* 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-558 在肝癌组织及细胞中呈高表达

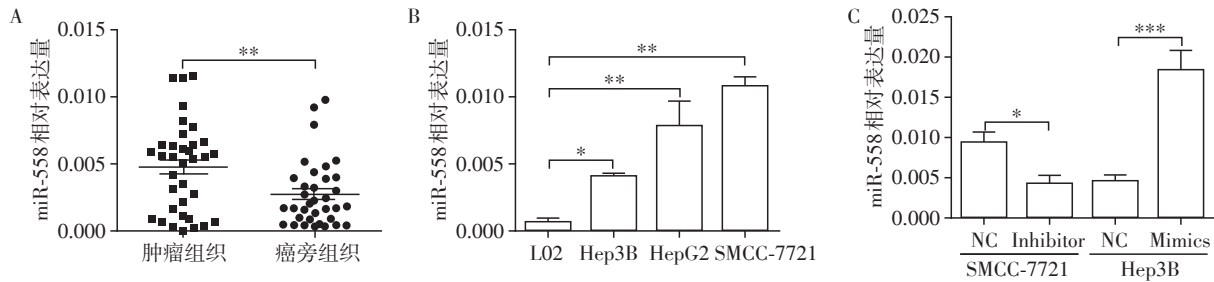
首先检测 miR-558 在 35 对肝癌组织及癌旁组织中的表达情况,结果显示 miR-558 在癌组织中的

表达明显升高($P < 0.01$, 图1A)。进一步检测 miR-558 在细胞中的表达情况, 结果如图1B所示, miR-558 在肝癌细胞中的表达也明显高于正常细胞。为研究 miR-558 在肝癌中的作用, 选用表达量相对较高的 SMCC-7721 细胞以及相对较低的 Hep3B 细胞分别进行敲低和过表达转染。如图1C所示, SMCC-

7721 细胞和 Hep3B 细胞中 miR-558 的表达量明显抑制或升高。

2.2 miR-558 调节肝癌细胞的生长

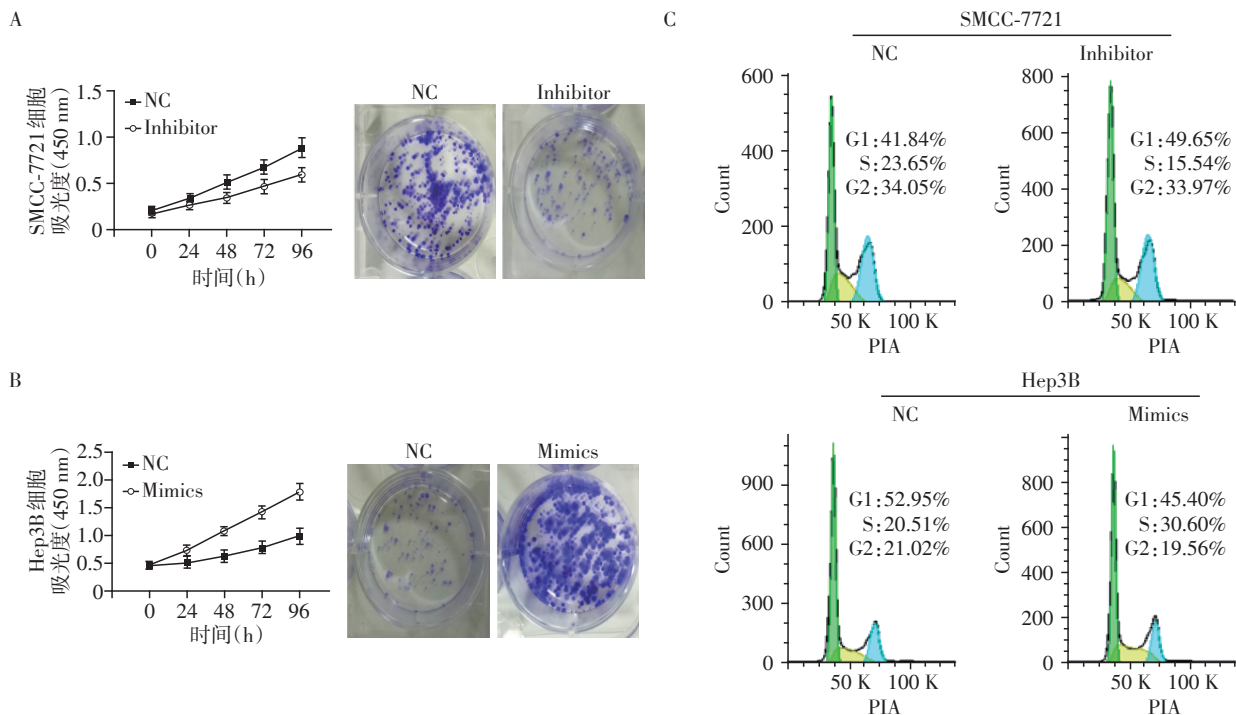
CCK-8、平板克隆以及流式细胞仪结果显示敲低 miR-558 明显抑制 SMCC-7721 细胞的生长与周期, 而过表达可显著促进 Hep3B 的生长与周期(图2)。



A: 与癌旁组织相比, miR-558 在肝癌组织中的表达增高; B: 与正常细胞(L02)相比, miR-558 在肝癌细胞(Hep3B、HepG2、SMCC-7721)中的表达增高; C: Inhibitor 或 Mimics 明显抑制或上调肝癌细胞 SMCC-7721 或 HepG2 中 miR-558 的表达量。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图1 miR-558 在肝癌组织以及细胞中的表达水平

Figure 1 The expression of miR-558 in HCC tissues and cells



A: miR-558 敲低显著抑制肝癌细胞 SMCC-7721 的生长; B: miR-558 过表达明显促进肝癌细胞 Hep3B 的生长; C: miR-558 敲低或过表达明显抑制或加速肝癌细胞的周期。

图2 miR-558 调节肝癌细胞的生长

Figure 2 miR-558 regulates the growth of HCC cells

2.3 TNFAIP1 是 miR-558 在肝癌细胞中的直接结合靶点

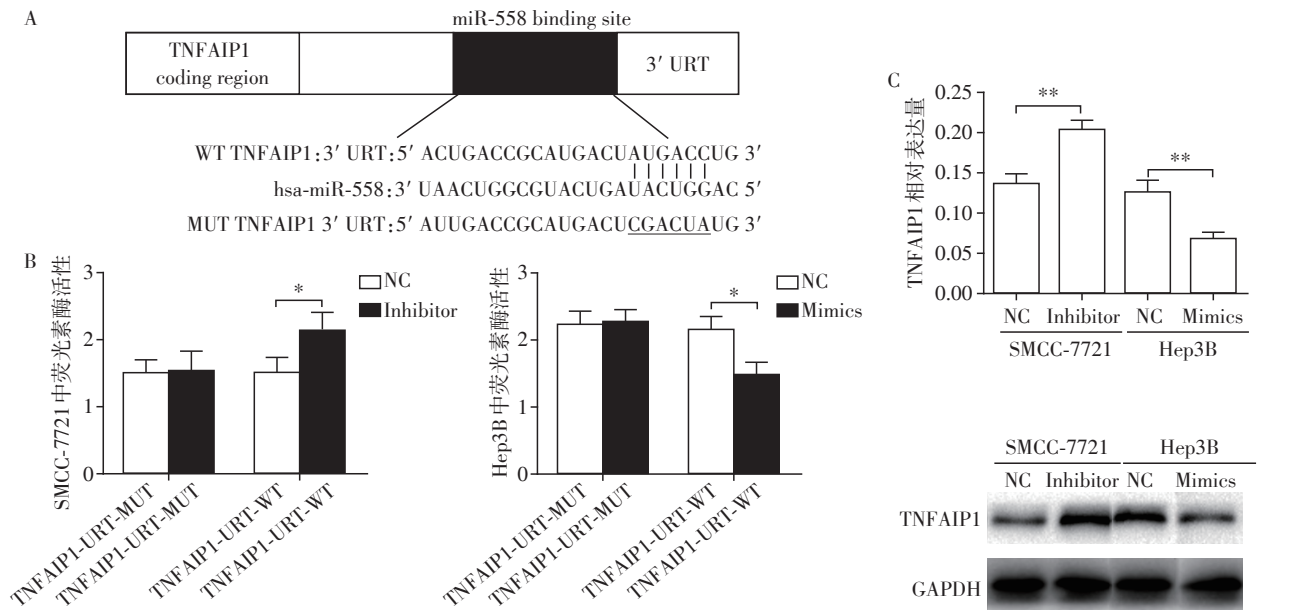
Targetscan 分析预测结果显示 TNFAIP1 可能是 miR-558 的结合位点(图3A)。荧光素酶试验结果表明在肝癌细胞 SMCC-7721 中野生型组转染 miR-

558 inhibitor 的细胞较转染 miR-558 NC 的细胞荧光素酶活性明显增强, 而在肝癌细胞 Hep3B 中转染 miR-558 mimics 的细胞较转染 miR-558 NC 的细胞荧光素酶活性明显受到抑制(图3B)。转染 miR-558 inhibitor 或 miR-558 mimics 后肝癌细胞的 TN-

FAIP1表达显著升高或降低(图3C)。

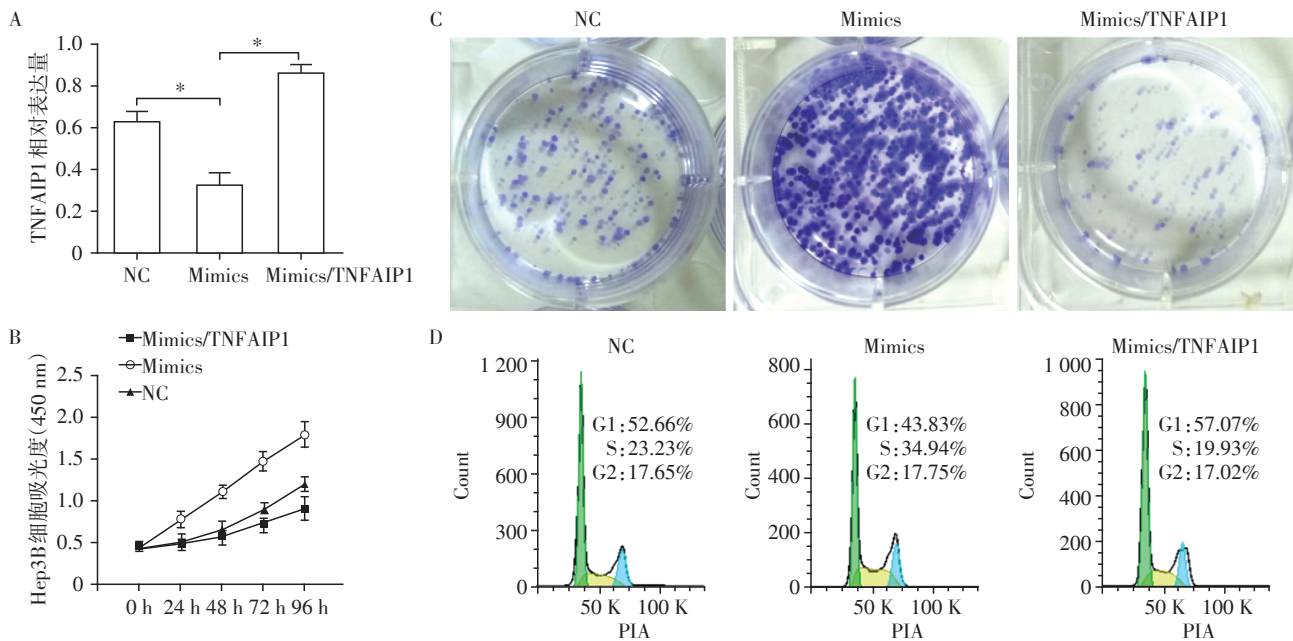
2.4 TNFAIP1上调可显著抑制miR-558过表达对肝癌细胞生长的促进作用

为研究TNFAIP1在肝癌细胞中是否发挥作用，对转染miR-558 mimics的Hep3B细胞进行TNFAIP1过表达(图4A)。CCK-8、平板克隆以及流式细胞仪结果显示当过表达TNFAIP1后，miR-558对肝癌的促进作用明显减弱(图4B、C和D)。



A:miR-558与TNFAIP1直接结合;B:miR-558 Inhibitor或Mimics显著改变野生型组的荧光素酶活性;C:miR-558 Inhibitor或Mimics显著上调或抑制TNFAIP1的表达。两组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图3 miR-558在肝癌中的作用靶点
Figure 3 The target of miR-558 in HCC



A:上调肝癌细胞Hep3B细胞中TNFAIP1的表达;B、C:TNFAIP1上调可明显抑制miR-558过表达的促进肝癌细胞增殖(B)和克隆形成(C)的作用;D:TNFAIP1上调可明显抑制miR-558过表达加速肝癌细胞周期的作用。两组比较,* $P < 0.01$ 。

图4 TNFAIP1参与miR-558对肝癌细胞生长和周期的调节作用
Figure 4 TNFAIP1 participates in the regulation of growth and cycle of HCC cells by miR-558

3 讨论

miRNA在转录后通过调节靶基因的mRNA降解或抑制翻译发挥功能。许多研究表明miRNA在肿瘤发生发展中起到重要作用。本实验主要研究miR-558在肝癌细胞生长过程中发挥的作用。以往有研究表明miR-558通过激活乙酰肝素酶的转录促进神经母细胞瘤的发生以及侵袭^[9]。Smad4介导的乙酰肝素酶的抑制可起到抑制胃癌的作用,而miR-558可明显减弱该过程进而促进胃癌进展^[8]。

本研究发现miR-558在肝癌组织与细胞中的表达明显高于癌旁组织和正常肝脏细胞。为进一步研究其是否发挥促进肝癌的作用,miR-558 Inhibitor或Mimics抑制或过表达肝癌细胞中miR-558的水平,结果显示敲低miR-558显著抑制了肝癌细胞的生长,阻滞了肝癌细胞周期,而过表达miR-558则起到相反作用。

通过Targetscan发现TNFAIP1可能是miR-558在肝癌细胞中的作用靶点。TNFAIP1是炎症早期TNF- α 诱导表达的一个蛋白^[10]。研究表明TNFAIP1在多种肿瘤中发挥抑癌作用。如miR-372通过靶向调节TNFAIP1抑制其表达调控NF- κ B信号通路,在胃癌中发挥促癌作用^[11]。在肺癌中miR-424通过调控TNFAIP1发挥促进肺癌进展与转移的作用^[12]。荧光素酶实验结果表明miR-558可显著改变TNFAIP1荧光素酶的活性,上调或敲低肝癌细胞中miR-558的表达量可抑制或增强TNFAIP1的表达。为研究TNFAIP1在miR-558促进肝癌过程中是否发挥作用,在Hep3B中过表达miR-558的基础上进一步上调TNFAIP1,结果显示TNFAIP1的上调可显著反转miR-558促进肝癌细胞生长的作用。

综上所述,miR-558在肝癌细胞中高表达,其主要是通过靶向结合TNFAIP1抑制其表达发挥促进肝癌细胞生长的作用。

[参考文献]

[1] Bruix J, Gores GJ, Mazzaferro V. Hepatocellular carcino-

ma; clinical frontiers and perspectives [J]. Gut, 2014, 63 (5):844-855

[2] Hatakeyama S. TRIM proteins and cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(11):792-804

[3] Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in Cancer [J]. Annu Rev Med, 2009, 60:167-179

[4] Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA [J]. Trends Genet, 2006, 22(3):165-173

[5] 尹媛, 许伟, 吴双双, 等. miRNA-200a调控FOXC1增敏肺癌EGFR-TKI治疗的研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2017, 37(9):1067-1075

[6] 朱明霞, 周鑫, 黄泽波, 等. miR-145通过IGF1R与IRS1逆转胃癌SGC7901/DDP细胞对顺铂的耐药性[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2016, 36(2):144-150

[7] Yang L, Li C, Liang F, et al. MiRNA-155 promotes proliferation by targeting caudal-type homeobox 1 (CDX1) in glioma cells [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 95:1759-1764

[8] Zheng L, Jiao W, Song H. miRNA-558 promotes gastric cancer progression through attenuating Smad4-mediated repression of heparanase expression [J]. Cell Death Dis, 2016, 7(9):e2382

[9] Qu H, Zheng L, Pu J, et al. miRNA-558 promotes tumorigenesis and aggressiveness of neuroblastoma cells through activating the transcription of heparanase [J]. Hum Mol Genet, 2015, 24(9):2539-2551

[10] Wolf FW, Marks RM, Sarma V, et al. Characterization of a novel tumor necrosis factor- α induced endothelial primary response gene [J]. J Biol Chem, 1992, 267(2):1317-1326

[11] Zhou C, Li X, Zhang X, et al. microRNA-372 maintains oncogene characteristics by targeting TNFAIP1 and affects NF κ B signaling in human gastric carcinoma cells [J]. Int J Oncol, 2013, 42(2):635-642

[12] Zhang M, Gao C, Yang Y, et al. MiR-424 promotes non-small cell lung cancer progression and metastasis through regulating gene TNFAIP1 [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(1):211-221

[收稿日期] 2018-02-13