

· 基础研究 ·

miR-1301对肝细胞肝癌增殖的影响及机制研究

张 飞, 史成宇, 杨世坤, 饶建华, 成 峰*

南京医科大学第一附属医院肝胆中心, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:明确 miR-1301 在肝细胞肝癌组织以及细胞系中的表达情况,并探讨 miR-1301 对肝癌细胞增殖的影响及可能机制。方法:实时定量 PCR 检测肝癌、癌旁组织及肝癌细胞系中 miR-1301 的表达水平,并在肝癌细胞中转染 miR-1301 模拟物或抑制物,用 CCK-8 法和平板克隆法检测其对肝癌细胞增殖活性的影响;通过蛋白质印迹(Western blot)检测磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(p-AKT、AKT)蛋白的表达情况。结果:miR-1301 在肝癌组织和肝癌细胞系中的表达水平明显低于对应的癌旁组织和正常肝细胞。实时定量 PCR 证实转染了 miR-1301 模拟物或抑制物后,miR-1301 的表达量明显升高或降低($P < 0.01$)。与对照组相比,降低 miR-1301 的表达能明显促进肝癌细胞 Hep3B 的增殖活性,差异有统计学意义($P < 0.05$);而过表达 miR-1301 则显著抑制 Huh7 细胞的生长,差异有统计学意义($P < 0.05$)。此外,miR-1301 可显著抑制 PI3K/AKT 信号通路的活性。结论:miR-1301 在肝细胞肝癌中低表达,并抑制肝癌细胞增殖,其机制可能与 miR-1301 抑制 PI3K/AKT 通路的活性有关。

[关键词] miR-1301;肝细胞性肝癌;增殖;PI3K;AKT

[中图分类号] R735.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)03-355-05

doi:10.7655/NYDXBNS20200310

Effects and mechanisms of miR-1301 on proliferation of HCC cells

ZHANG Fei, SHI Chengyu, YANG Shikun, RAO Jianhua, CHENG Feng*

Hepatobiliary Center, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the expression of miR-1301 in hepatocellular carcinoma (HCC) tissues and cell lines, and explore the effect of miR-1301 on the proliferation of HCC cells and its underlying mechanism. **Methods:** The expression of miR-1301 in HCC tissues, adjacent tissues and cell lines was detected by RT-PCR. CCK-8, and colony formation assay were used to examine proliferation of HCC cells after transfection with miR-1301 mimic or inhibitor. The activity of PI3K, p-AKT and AKT was detected by Western blot. **Results:** The results showed that the expression of miR-1301 in HCC tissues and HCC cell lines was obviously down-regulated compared with that in the normal controls. RT-PCR showed that the expression of miR-1301 in HCC cells was significantly increased or decreased after miR-1301 mimic or inhibitor transfection ($P < 0.01$). Compared with the control, knockdown of miR-1301 could remarkably inhibited the proliferation of Hep3B cells ($P < 0.05$), while overexpression of miR-1301 presented the opposite effects ($P < 0.05$). Furthermore, we found that the activity of PI3K/AKT signal pathway was significantly inhibited by miR-1301. **Conclusion:** Expression of miR-1301 is low in HCC. The down-regulated miR-1301 in HCC inhibited the proliferation of HCC cells, the underlying mechanisms could be the inhibition of PI3K/AKT signal pathway by miR-1301.

[Key words] miR-1301; HCC; proliferation; PI3K; AKT

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(03):355-359]

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是消化系统常见的恶性肿瘤,也是全球第五大恶性肿瘤,其全球病死率位于所有肿瘤的第3位^[1-2]。在我

[基金项目] 国家自然科学基金(81871259)

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

国,由于慢性乙型肝炎和丙型肝炎的高发,HCC的发病率尤其高。然而由于HCC早期阶段没有明显症状,患者发现HCC时,通常已经到了晚期或不可切除的阶段。近年来随着肝切除、肝移植以及介入等手段的应用,HCC的治疗已取得相当大的进步,但HCC患者的临床预后仍然不理想^[3-4],因此进一

步探讨HCC发生与发展的分子机制对于揭示HCC的生物学行为和综合诊疗具有非常重要的意义。

微小RNA(microRNA, miRNA)是一类在进化上保守的非编码小RNA,通常情况下,其通过靶蛋白3'-UTR区来抑制蛋白质编码基因的表达^[5]。大量研究表明,miRNA作为基因表达的转录后调节因子,参与调控肿瘤细胞的增殖、分化、凋亡、细胞周期进程、迁移和肿瘤发生等多种重要的生物学过程^[6-8]。越来越多的研究表明,miR-1301可能在人类癌症中发挥关键作用^[9-11]。然而,miR-1301在HCC进展中的确切作用尚不明确,其参与的分子机制也不清楚。本研究采用PCR、Western blot、CCK-8、平板克隆的方法检测HCC组织及细胞中miR-1301的表达情况,以及对HCC细胞生长的影响及可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

HCC标本来源于2016年1—12月经南京医科大学第一附属医院肝脏外科行手术切除的40例HCC患者,入组的患者术前均未接受过放疗、化疗等,所有术后标本由病理科确诊,均为HCC。新鲜组织切取后迅速置于液氮罐内,后置于-80℃冰箱保存。本研究经医院伦理委员会批准,所有患者知情同意。

人源的HCC细胞系(HepG2、Hep3B、Huh7、SMMC-7721)以及正常人肝细胞LO2(中国科学院上海细胞库);DMEM培养基、胎牛血清、0.25%胰酶和青链霉素(Gibco公司,美国);miR-1301及U6的上下游引物,miR-1301模拟物(miR-1301 mimic)、miR-1301抑制物(miR-1301 inhibitor)以及其相应的阴性对照序列(广州锐博公司);Lipofectamine 3000、TRIzol(Invitrogen公司,美国);MicroRNA逆转录试剂盒(Takara公司,日本);ChamQ通用型SYBR GreenqPCR Master Mix(南京Vazyme公司);PI3K、pAKT、AKT、GAPDH一抗、兔抗人IgG二抗(CST公司,美国);超敏ECL发光液(Thermo公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及转染

所有细胞均用含10%胎牛血清、50 U/mL青霉素和50 μg/mL链霉素的DMEM培养基,在恒温37℃、5%CO₂的细胞培养箱中进行培养。将处于对数生长期的Huh-7和Hep3B细胞以3×10⁵个/孔的密度种于6孔板中培养过夜,然后将miR-1301模拟物(mimic)或miR-1301抑制物(inhibitor)及其对应的

阴性对照序列通过Lipofectamine 3000转染HCC细胞,具体步骤根据试剂盒说明书进行,转染6h后更换培养基,转染36h后收集细胞验证转染效率及进行后续使用。

1.2.2 细胞及组织RNA的提取和实时定量PCR

组织和细胞的总RNA采用TRIzol法提取,然后测定RNA的浓度及纯度(NanoDrop公司,美国)。为了检测miR-1301的表达情况,首先按照反转录试剂盒说明书进行逆转录,然后应用ChamQ Universal SYBR PCR Master Mix和miR-1301特异性引物进行定量检测,U6作为内参。商品化的miR-1301特异性引物Bulge-loop™ miRNA qRT-PCR Primer Sets由广州锐博公司设计,实时定量反应在ABI 7900 Fast Real-Time PCR system上进行。按照2^{-ΔΔCt}法来计算miR-1301的相对表达量,实验重复3次。

1.2.3 蛋白提取及Western blot

用含1%蛋白酶抑制剂和1%磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液(上海碧云天公司)裂解细胞,提取总蛋白。BCA定量蛋白浓度后,加入蛋白上样缓冲液于100℃水浴煮沸5~10 min。通过SDS-PAGE电泳进行蛋白分离后,将相应分子量的蛋白湿转至PVDF膜上;然后在室温下用50 g/L的脱脂奶粉溶液封闭2 h;分别加入一抗4℃孵育过夜,TBST洗膜后在室温下二抗孵育1 h;TBST洗涤后加入超敏ECL曝光液,用凝胶成像系统进行分析。

1.2.4 CCK-8实验分析细胞增殖活性

将转染细胞制成1×10⁴个/mL的细胞悬液,在96孔细胞培养皿中每孔加入100 μL细胞悬液,只加培养基的孔作为空白对照;分别在0、24、48、72、96 h加入10 μL CCK-8溶液,每组设置6个复孔;孵箱培养2 h后,用酶标仪检测波长450 nm处的吸光度值,并以空白组调零。

1.2.5 平板克隆形成实验

用胰酶消化已转染的HCC细胞,经过计数后,以1 000个/孔的密度接种至6孔细胞培养皿中,加入3 mL培养基,每隔3 d换1次液,连续培养14 d后以4%多聚甲醛固定15 min,弃甲醛以PBS冲洗3遍,加入1 mL结晶紫染色10 min,PBS冲洗干净后,拍照并计数集落数量。结果以3次独立实验的均值表示。

1.3 统计学方法

应用SPSS22.0和Graphpad5.0软件对实验数据进行统计学处理。所有定量数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用*t*检验,多组间比较采用方差分析,两两比较采用SNK(Student-Newman-

Keuls)检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-1301在HCC组织以及细胞中的表达

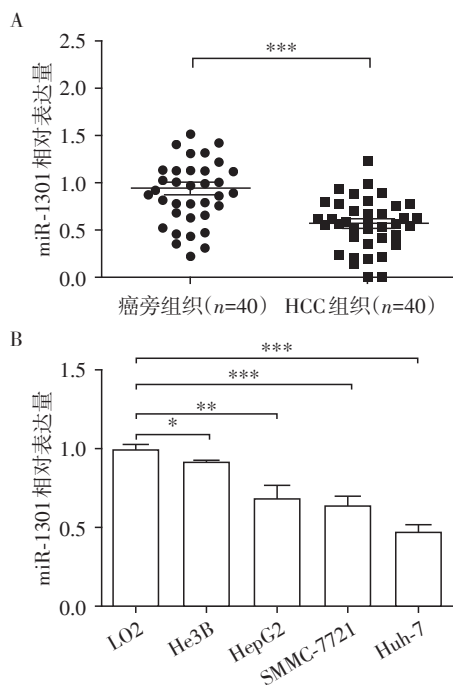
通过荧光定量PCR检测40对HCC及其癌旁组织,发现HCC组织中miR-1301的表达水平明显低于癌旁组织($P < 0.01$,图1A),进一步检测HCC细胞系和正常人肝细胞LO2中miR-1301的表达水平,结果表明,HCC细胞中miR-1301表达水平明显低于正常肝细胞(图1B)。以上数据说明,miR-1301可能在肝癌进展中起着重要的作用。

2.2 HCC细胞转染效率及miR-1301的表达水平

为进一步研究miR-1301在HCC细胞中的作用,本研究首先通过转染miR-1301抑制物或模拟物人为改变肿瘤细胞中miR-1301的相对表达量,并通过荧光定量PCR验证转染的效率。结果表明,与相应对照组比较,转染miR-1301抑制物或模拟物后,肝癌细胞Hep3B和Huh7中miR-1301的表达量明显降低或升高,差异有统计学意义($P < 0.001$,图2)。

2.3 miR-1301对肝癌细胞增殖的影响

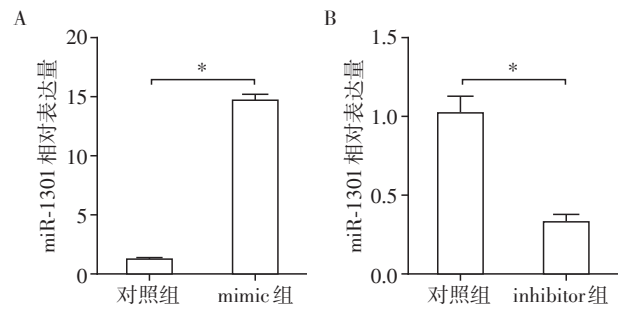
各组细胞分别于培养0、24、48、72、96 h后进行



A:实时荧光定量PCR检测HCC组织中miR-1301表达明显低于癌旁组织;B:荧光定量PCR检测HCC细胞中miR-1301表达明显低于正常人肝细胞LO2(n=3)。两组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图1 miR-1301在HCC组织以及HCC细胞系中的相对表达量

Figure 1 Relative expression of miR-1301 in HCC tissues and cell lines



A:Huh7细胞中转染miR-1301 mimic后miR-1301的表达水平;B:Hep3B细胞中转染miR-1301 inhibitor后miR-1301的表达水平。两组比较,* $P < 0.001$ (n=3)。

图2 通过转染miRNA-1301 mimic或inhibitor改变HCC细胞中miRNA-1301的表达水平

Figure 2 Changing expression of miRNA-1301 in HCC cell lines transfected by miRNA-1301 mimic or inhibitor

CCK-8检测,分析相对吸光度值。发现从测量的第3天至第5天,与相应对照组相比,miR-1301过表达的Huh-7细胞的增殖活性受到明显抑制,而miR-1301干扰后则明显增强了Hep3B细胞的增殖活性($P < 0.05$,图3)。

2.4 miR-1301对肝癌细胞平板克隆形成能力的影响

通过平板克隆法进一步分析miR-1301干扰或过表达对肝癌细胞增殖能力的影响。与对照组相比,miR-1301过表达能显著抑制Huh-7细胞的克隆形成能力,而miR-1301干扰后,Hep3B细胞的克隆形成能力则明显增强($P < 0.05$,图4)。

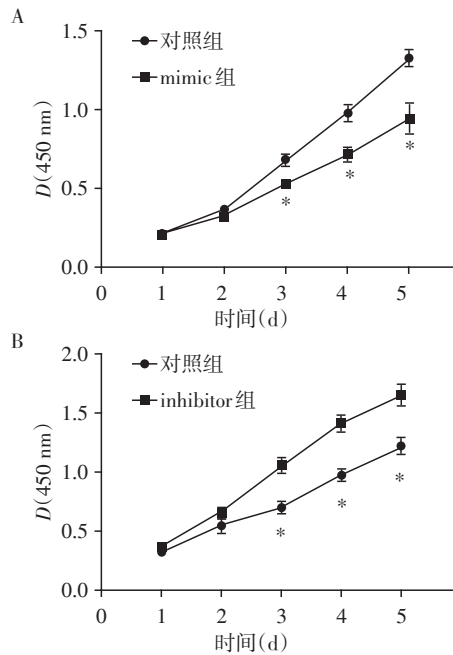
2.5 miR-1301通过抑制PI3K/AKT信号通路抑制肝癌细胞的增殖能力

AKT信号通路在细胞增殖中起关键性作用,分析AKT的相关活性蛋白p-AKT的表达情况。结果显示,Hep3B细胞中,miR-1301干扰组PI3K、p-AKT的表达水平较其对照组明显升高,而Huh-7细胞中,miR-1301过表达组PI3K、p-AKT的表达水平较其对照组明显降低,差异均有统计学意义(图5,表1)。

3 讨论

HCC是最常见的恶性肿瘤之一,由于HCC发现时常处于晚期,且对常规系统性治疗有较高的耐受性,HCC患者的生存率较低,其预后仍然不理想^[4]。因此探索HCC进展过程中新的分子标志物及其遗传学和分子生物学机制对有效治疗HCC具有重要意义。

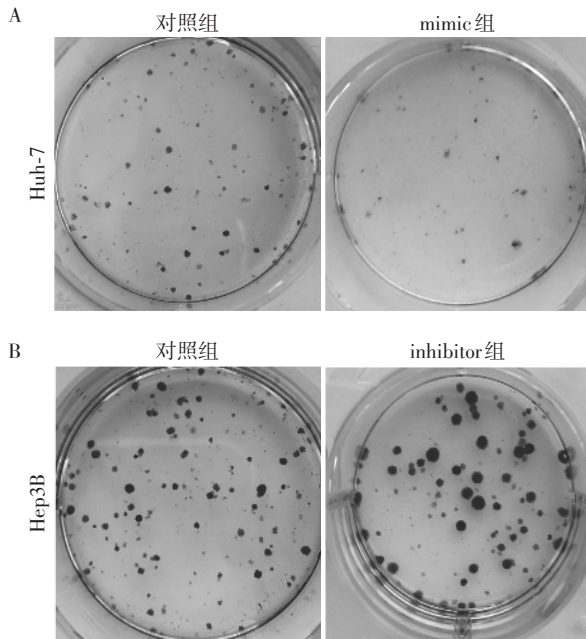
miRNA是一种由20~24个核苷酸组成的非编码RNA,通过与mRNA的3'-UTR区互补,发挥转录后



A: Huh-7 在转染 miRNA-1301 mimic 后增殖能力减弱; B: Hep3B 在转染 miRNA-1301 inhibitor 后增殖能力增强。两组比较, $P < 0.05 (n=3)$ 。

图3 miR-1301 对 HCC 细胞增殖能力的影响

Figure 3 Effects of miR-1301 on the proliferation of HCC cells



A: Huh-7 在转染 miRNA-1301 mimic 后增殖能力减弱; B: Hep3B 在转染 miRNA-1301 inhibitor 后增殖能力增强。两组比较, $P < 0.05 (n=3)$ 。

图4 miR-1301 对 HCC 细胞克隆形成能力的影响

Figure 4 Effects of miR-1301 on the colony formation of HCC cells

调控的作用^[5]。已有大量研究证实, miRNA 参与包

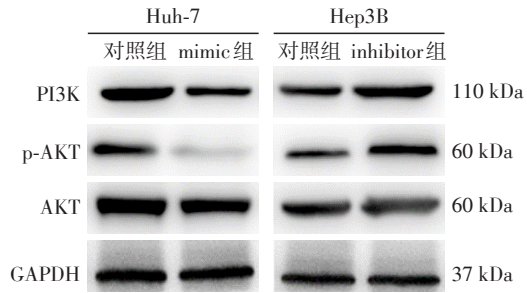


图5 Western blot 检测 miR-1301 对 Hep3B 和 Huh-7 细胞中 PI3K/AKT 通路活性的影响

Figure 5 Effects of miR-1301 on activities of PI3K/AKT in Hep3B and Huh-7 cells detected by Western blot

表1 各组 PI3K、p-AKT、AKT 相对定量表达水平

Table 1 Relative quantitative expression levels of PI3K, p-AKT and AKT in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	PI3K	p-AKT	AKT
Huh-7 细胞			
对照组	99.27 ± 10.52	6.02 ± 0.79	134.23 ± 6.32
Mimic 组	6.49 ± 1.45**	2.26 ± 0.31***	104.31 ± 1.83*
Hep3B 细胞			
对照组	6.87 ± 0.84	6.56 ± 0.33	85.94 ± 3.41
Inhibitor 组	107.12 ± 6.21**	9.73 ± 0.25**	102.30 ± 5.36*

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001 (n=3)$ 。

括细胞增殖、凋亡、分化等在内的几乎所有生物过程,作为抑癌基因或者促癌基因的 miRNA 可参与包括 HCC 在内的多种恶性肿瘤的发生与发展。越来越多的证据表明 miR-1301 可能在人类肿瘤中起关键作用^[9-11],如 miR-1301 在脑胶质瘤中明显低表达,肿瘤分期越晚,其表达量越低,并可显著抑制肿瘤细胞的增殖^[12]。为研究 miR-1301 在 HCC 中的作用,本研究中首先使用定量 PCR 检测肿瘤组织与细胞中 miR-1301 的表达情况,结果表明与对照组相比,miR-1301 在 HCC 组织和 HCC 细胞系中明显低表达,表明 miR-1301 可能参与了 HCC 发生发展的调控。为进一步研究其生物学功能,我们在肝癌细胞中转染了 miR-1301 模拟物或抑制物,从而过表达或敲低 miR-1301,并用 CCK-8 实验和细胞克隆形成实验来探索 miR-1301 对 HCC 细胞增殖的影响。结果显示过表达 miR-1301 可显著抑制肝癌细胞的增殖,而降低 miR-1301 的表达则可增强肝癌细胞的增殖能力。

磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)信号通路是一条经典的信号转导通路,在 HCC 等多种肿瘤中被高度激活,并成为多种抗癌药物的作用靶点^[13]。PI3K 被激活后产生具有磷酸化的第二信使 PIP3,PIP3 与 AKT 中的 PH 结构域直接结合,使 AKT

蛋白发生磷酸化。磷酸化后的 AKT 继续激活下游的效应分子,如 Cyclin 家族蛋白、Bcl-2 家族蛋白等,从而促进细胞增殖和抑制细胞凋亡,与肿瘤进展的关系非常密切^[14-16]。重要的是,先前已有研究证明,在 HCC 中 PI3K/AKT 通路常常处于异常激活状态,并且其激活往往预示着不良预后^[17-18]。因此本研究进一步检测 miRNA-1301 是否对该通路具有调节作用。结果显示过表达 miR-1301 后 PI3K/AKT 通路的磷酸化水平明显降低,而抑制 miR-1301 后 PI3K/AKT 通路的活性明显增强。

综上所述,本研究显示 miR-1301 在 HCC 组织中表达明显降低,并在 HCC 细胞增殖中发挥作用,miR-1301 可显著抑制 HCC 细胞的体外生长,其机制可能涉及 PI3K/AKT 信号通路,为进一步研究 miR-1301 基因对 HCC 的细胞生物学行为影响及其作用机制、寻找原发性肝癌防治新途径奠定了一定基础。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2017[J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(1): 7-30
- [2] EL-SERAG H B, RUDOLPH L. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and molecular carcinogenesis[J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(7): 2557-2576
- [3] NAKAGAWA S, WEI L, SONG W M, et al. Molecular liver cancer prevention in cirrhosis by organ transcriptome analysis and lysophosphatidic acid pathway inhibition[J]. *Cancer Cell*, 2016, 30(6): 879-890
- [4] MILLER K D, SIEGEL R L, LIN C C, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(4): 271-289
- [5] MOSS E G. MicroRNAs: hidden in the genome[J]. *Curr Biol*, 2002, 12(4): R138-R140
- [6] 韩国勇,张龙,陈志强,等. miRNA-873 促进肝癌细胞的迁移与侵袭[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(9): 1076-1080
- [7] HA M, KIM V N. Regulation of microRNA biogenesis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(8): 509-524
- [8] 童厚超,斯岩,张浩,等. miR-590-3p 对甲状腺乳头状癌的抑制作用研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(6): 873-879
- [9] WANG B, WU H, CHAI C, et al. MicroRNA-1301 suppresses tumor cell migration and invasion by targeting the p53/UBE4B pathway in multiple human cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2017, 401: 20-32
- [10] YANG C, XU Y, CHENG F, et al. miR-1301 inhibits hepatocellular carcinoma cell migration, invasion, and angiogenesis by decreasing Wnt/ β -catenin signaling through targeting BCL9[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(8): e2999
- [11] LI W W, HAN W X, MA Y M, et al. P53-dependent miRNAs mediate nitric oxide-induced apoptosis in colonic carcinogenesis[J]. *Free Radi Biol Med*, 2015, 85: 105-113
- [12] ZHI T, JIANG K, ZHANG C, et al. MicroRNA-1301 inhibits proliferation of human glioma cells by directly targeting N-Ras[J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(4): 982-998
- [13] MARTINI M, DE SANTIS M C, BRACCINI L, et al. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review[J]. *Ann Med*, 2014, 46(6): 372-383
- [14] LIU P, CHENG H, ROBERTS T M, et al. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8(8): 627-644
- [15] ZHOU Q, LUI V W, YEO W. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *Future Oncol*, 2011, 7(10): 1149-1167
- [16] SPANGLE J M, ROBERTS T M, ZHAO J J. The emerging role of PI3K/AKT-mediated epigenetic regulation in cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2017, 1868(1): 123-131
- [17] WANG X, HAN L, ZHANG J, et al. Down-regulated NRSN2 promotes cell proliferation and survival through PI3K/Akt/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *Dig Dis Sci*, 2015, 60(10): 3011-3018
- [18] 王飞,孙倍成. HOXA5 在原发性肝细胞肝癌发生发展中的作用[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(6): 867-872

[收稿日期] 2019-01-14