

· 基础研究 ·

## miR-552-3p 通过抑制 DACH1 促进肝细胞性肝癌细胞增殖、迁移和侵袭

张 明,王吉荣

南京医科大学附属江宁医院普外科,江苏 南京 211100

**[摘要]** 目的:探讨 miR-552-3p 在肝细胞性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中的表达及其促进细胞增殖和迁移、侵袭的机制。方法:qRT-PCR 检测 HCC 细胞系及人正常肝细胞系中 miR-552-3p 的表达情况;下载 TCGA 数据库中 HCC 样本的微阵列数据,分析 miR-552-3p 在 HCC 癌组织及癌旁组织中是否存在表达差异;miR-552-3p mimics 以及 miR-552-3p inhibitor 转染 HCC 细胞,荧光素酶报告基因验证 miR-552-3p 与 DACH1 是否存在靶向关系,CCK-8 及 Transwell 实验检测 miR-552-3p 及其与 DACH1 相互作用对于 HCC 细胞增殖、迁移、侵袭的影响。结果:TCGA 数据库中 HCC 样本的分析结果表明,miR-552-3p 在 HCC 中高表达,同时 qRT-PCR 显示 miR-552-3p 在 HCC 细胞系中的表达水平显著高于人肝细胞系 L02;miR-552-3p 的高表达促进 HCC 细胞的增殖、迁移和侵袭,而抑制 miR-552-3p 表达后则相反;荧光素酶报告实验证实 miR-552-3p 靶向作用于 DACH1 的 3'-UTR,上调 miR-552-3p 可抑制 DACH1 的表达,而下调 miR-552-3p 则增加 DACH1 表达;DACH1 的过表达可抑制 HCC 细胞增殖、迁移和侵袭,但同时过表达 miR-552-3p 后 DACH1 对于 HCC 细胞相关功能的抑制即可解除;miR-552-3p 正向调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的激活。结论:miR-552-3p 靶向作用于 DACH1 促进 HCC 细胞增殖、迁移和侵袭,并参与调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号。可能为 HCC 的诊疗策略提供潜在靶点。

**[关键词]** miR-552-3p;DACH1;肝细胞性肝癌**[中图分类号]** R735.7**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2020)04-538-08**doi:** 10.7655/NYDXBNS20200414

## MiR-552-3p promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation, migration and invasion by inhibiting DACH1

ZHANG Ming, WANG Jirong

*Department of General Surgery, the Affiliated Jiangning Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 211100, China*

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression of miR-552-3p in hepatocellular carcinoma (HCC) and its mechanism of promoting cell proliferation, migration and invasion. **Methods:** qRT-PCR was used to detect the expression of miR-552-3p in HCC cell lines and normal human liver cell lines. The microarray data of HCC samples were downloaded from TCGA database, and the expressions of miR-552-3p in HCC tumor tissues and its adjacent tissues were analyzed to show whether they are different or not; miR-552-3p mimics and miR-552-3p inhibitor transfected HCC cells, and luciferase assays verified whether miR-552-3p targets DACH1, while CCK8 and Transwell assays detected the effect of miR-552-3p and its interaction with DACH1 on HCC cell proliferation, migration, and invasion. **Results:** The analysis of HCC samples from the TCGA database indicated that miR-552-3p was highly expressed in HCC, and qRT-PCR showed that the expression level of miR-552-3p in HCC cell line was significantly higher than that in human liver cell line L02; the high expression of miR-552-3p promoted the proliferation, migration and invasion of HCC cells, while the inhibition of miR-552-3p reversed these functions; the luciferase reporter assays verified that miR-552-3p targets the 3'-UTR of DACH1. Up-regulation of miR-552-3p expression inhibited DACH1 whereas down-regulation of miR-552-3p increased DACH1 expression; DACH1 overexpression inhibited HCC cell proliferation, migration and invasion, but with miR-552-3p overexpression the DACH1 inhibitions of HCC cell-related functions were relieved; miR-552-3p positively regulated the activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. **Conclusion:** miR-552-3p targeting DACH1 promotes HCC cell proliferation, migration and invasion, and regulates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, which may provide potential targets for HCC diagnosis and treatment strategies.

**[Key words]** miR-552-3p; DACH1; hepatocellular carcinoma

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(04): 538-544, 583]

肝细胞性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是近年来发病率最高的恶性肿瘤之一。由于人口老龄化、代谢综合征等新的危险因素逐渐产生,全世界范围内每年报告的新发病例已超过7.5万例,除公认的乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒感染外,非酒精性肝病和酒精滥用的增加亦成为致病因素<sup>[1-3]</sup>。大部分HCC患者在进展期被确诊,无法行根治性切除手术,且行手术治疗后复发率依然很高,介入治疗、放疗、靶向治疗等姑息性治疗难以产生效果,所以HCC患者的预后极差,为全世界第三大致死性恶性肿瘤,5年生存率仅为10%~15%<sup>[4]</sup>。

微小RNA(microRNA, miRNA)是一类包含19~25个核苷酸的内源性单链非编码RNA,它们通过与靶基因的mRNA 3'-非翻译区(3'-UTR)相互作用,作为基因表达的负调节因子在转录后水平调节靶基因蛋白表达<sup>[5-6]</sup>。大量研究表明,通过调节RNA修饰及蛋白质翻译,miRNA在包括肝癌在内的许多疾病中被认为是致癌基因或肿瘤抑制因子<sup>[7]</sup>,并且越来越多的miRNA被确认为肿瘤生物标志物,有帮助肿瘤诊断、恶性程度区分及预测预后等功能<sup>[8]</sup>。据报道miR-552是一类肿瘤抑制因子,是多种肿瘤类型,包括骨肉瘤<sup>[9]</sup>、结肠癌<sup>[10]</sup>、肺癌<sup>[11]</sup>、乳腺癌<sup>[12]</sup>、肝癌<sup>[13]</sup>等预后的生物标志物。有研究发现在HCC细胞中miR-552可抑制内皮-间质转化并间接调控肝癌进展<sup>[14]</sup>。miR-552-3p为高度同源的miR-552家族成熟体之一,然而,miR-552-3p是否在HCC细胞与组织中异常表达并且其对HCC进展影响的相关机制尚未见报道。本研究旨在探寻miR-552-3p在HCC中的表达情况、其在HCC进展中的作用及相关机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人类肝癌细胞株 HepG2、Hep3B、MHCC97H、MHCC97L、Huh7、SMMC-7721及正常人类肝细胞株 L02 购自中科院上海细胞库或南京凯基生物有限公司;胎牛血清、青链霉素双抗、DMEM 培养基(Gibco 公司,美国);Lipofectamine 2000 试剂(Invitrogen 公司,美国);DACH1 过表达质粒和空载(Vector)质粒购自上海吉玛公司,miR-552-3p 模拟体(miR-552-3p mimics)和 miR-552 抑制剂(miR-552-3p inhibitor)及其匹配的对照载体(mimics control 和 inhibitor control)由上海吉玛公司合成;CCK-8 试剂盒(Dojindo 公司,日本);PVDF 膜(Millipore 公司,美国);增强型

BCA 蛋白检测试剂盒、RIPA 裂解缓冲液、ECL 显色液(杭州碧云天);Western blot 实验所用特异性一抗  $\beta$ -Catenin(6B3) Rabbit mAb、Cyclin D1(92G2) Rabbit mAb、c-Myc(D84C12) Rabbit mAb、GSK-3 $\beta$ (D5C5Z) XP<sup>®</sup> Rabbit mAb、GAPDH(D16H11) XP<sup>®</sup> Rabbit mAb 及二抗 Anti-rabbit IgG、HRP-linked Antibody(CST 公司,美国),DACH1# 10914-1-AP(武汉三鹰公司);Transwell 细胞迁移小室和生物膜基质凝胶包被的侵袭小室(Costar 公司,美国);TRIzol 试剂(Invitrogen 公司,美国),PrimeScript<sup>™</sup> RT 逆转录试剂盒(大连 TaKaRa 公司),TaqMan miRNA 试剂盒(Applied Biosystems 公司,美国),SYBR Green Premix PCR Master Mix(Roche 公司,德国);DACH1 的 miR-552-3p 预测结合位点定向缺失突变型(DACH1-MUT)和野生型(DACH1-WT)3'-UTR 的荧光素酶报告载体由上海吉玛公司合成提供;双荧光素酶报告基因检测试剂盒(南京凯基生物公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 组织分析

本研究采用癌症与肿瘤基因组图谱(Cancer Genome Atlas, TCGA)公共数据库(<http://www.cancergenome.nih.gov/dataportal>)上获取肝细胞性肝癌(liver hepatocellular carcinoma, LIHC)miRNA 芯片分析原始数据,使用 UCSC Xena 网站(<http://xena.ucsc.edu/>)在线分析 TCGA LIHC 筛选出来源于肝实质细胞的肝细胞性肝癌 438 例样本的 miRNA 芯片数据。

#### 1.2.2 细胞培养

本研究所用人类肝癌细胞株 HepG2、Hep3B、MHCC97H、MHCC97L、Huh7、SMMC-7721 及正常人类肝细胞株 L02 使用含 10% 胎牛血清及 1% 双抗的 DMEM 培养基,于含 5% 浓度 CO<sub>2</sub> 的 37 °C 恒温培养箱中培养,取其对数生长期细胞进行相关实验。

#### 1.2.3 细胞转染

采用 Lipofectamine 2000 按说明书转染 HCC 细胞。将 Hep3B 细胞提前 1 d 接种于 24 孔板,更换无双抗培养基,待长至 30%~50% 融合后配制转染液,将 Lipofectamine 2000 用 50  $\mu$ L Opti-MEI 培养基稀释,室温孵育 5 min,与稀释的各组质粒混合,轻轻混匀,室温孵育 20 min 后每孔细胞加入 100  $\mu$ L 转染液摇匀,6 h 后更换培养基,培养 24~48 h 后收集细胞进行后续实验。

#### 1.2.4 Western blot

用 RIPA 裂解缓冲液在冰上裂解 HCC 细胞,离心后取上清。采用增强型 BCA 蛋白检测试剂盒测

定蛋白浓度后加入5×SDS上样缓冲液煮沸。将蛋白样品用10% SDS-PAGE凝胶电泳分离,然后转至PVDF膜上,5%脱脂奶粉封闭2 h, TBST洗涤3次,每次15 min,加入特异性一抗,4℃孵育过夜。TBST洗涤3次后加入二抗,室温孵育2 h,洗涤后使用ECL显色液显色,使用Bio-Rad凝胶成像分析系统进行曝光。

### 1.2.5 CCK-8

将HCC细胞按每孔 $5 \times 10^3$ 个/100  $\mu$ L细胞悬液接种于96孔板中,使用CCK-8试剂盒检测细胞增殖,每组5个或以上复孔,在0、24、48和72 h分别按照试剂说明书加入试剂,37℃温箱孵育2 h后酶标仪检测各组细胞450 nm处的吸光度。

### 1.2.6 Transwell

HCC细胞以无血清、无双抗DMEM培养基稀释,细胞悬液按 $5 \times 10^4$ 个/孔接种Transwell细胞迁移小室及生物膜基质凝胶包被的侵袭小室中,下层加入600  $\mu$ L含有10%胎牛血清和抗生素的完全培养基。37℃细胞培养箱中孵育24 h,膜下层细胞采用4%多聚甲醛固定、1%结晶紫染色,棉签擦去上层细胞,用尼康光学显微镜拍摄染色细胞图像,每个小室随机抽取5个区域的视野拍摄并进行细胞计数。

### 1.2.7 RT-qPCR

用TRIzol试剂按照说明书分离提取细胞的总RNA,用PrimeScript™ RT试剂盒逆转录成cDNA。miR-552-3p表达水平通过TaqMan miRNA分析。采用SYBR Green Premix PCR Master Mix在StepOne-Plus real-time PCR系统(Applied Biosystems公司,美国)中对DACH1 mRNA进行qRT-PCR。95℃ 5 min预变性,95℃ 10 s,60℃ 30 s 40个循环,95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 15 s。通过primer bank设计引物序列,miR-552-3p正义链:5'-CCGCACAGGTGACTGGTTAGA-3',反义链:5'-GTGCAGGTTCCGAGGT-3'; RT:5'-AACAGGTGACTGGTTGTCTAA-3'; U6正义链:5'-CTCGCTTCGGCAGCACTAT-3',反义链:5'-AACGATTCACGAATTTCACT-5'; RT:5'-GTCTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGA-TACGACTTACAACA-3'; DACH1正义链:5'-CCCTC-TACAATGACTGCACCA-3',反义链:5'-GCGGCATGATGTGAGAGTTCT-3'; GAPDH正义链:5'-AAATGGTGAAGGTCCGTGTGAAC-3',反义链:5'-CAACAATCTCCACTTTGCCACTG-3'。

### 1.2.8 荧光素酶报告基因

DACH1的miR-552-3p预测结合位点定向缺失

突变型(DACH1-MUT)和野生型(DACH1-WT)3'-UTR的荧光素酶报告载体分别单独转染或与miR-552-3p mimics共转染至HCC细胞中,细胞裂解后,按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书,采用酶标仪检测荧光素酶活性。

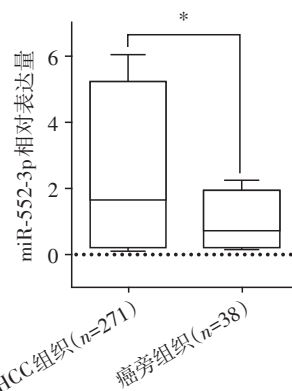
### 1.3 统计学方法

使用SPSS23.0软件进行数据分析,每个定量数据的实验单独重复3次,数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用t检验, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-552-3p在HCC组织中表达上调

对TCGA数据库438例HCC样本的miRNA HiSeq测序数据进行分析,hsa-miR-552-3p成熟体编号(Accession)为MIMAT0003215,其中MIMAT0003215有结果的癌组织与癌旁组织数据为309例,网站工具生成箱式图显示,miR-552-3p在HCC肿瘤组织(271例)与癌旁正常肝实质组织(38例)相比表达上调( $P < 0.001$ ,图1),从而说明miR-552-3p在HCC组织中表达上调。



TCGA数据库测序结果分析miR-552-3p在HCC组织和癌旁组织中的表达情况,两组比较,\* $P < 0.001$ 。

图1 miR-552-3p在HCC组织中表达上调

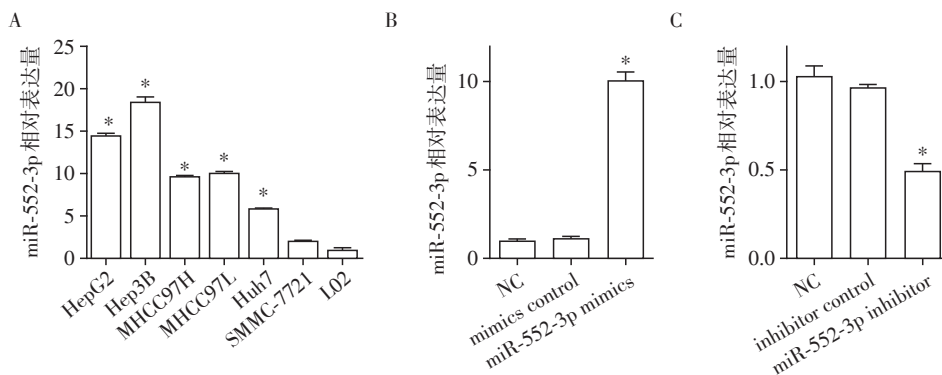
Figure 1 miR-552-3p is up-regulated in hepatocellular carcinoma

### 2.2 miR-552-3p在HCC细胞中表达上调

为检测miR-552-3p在HCC细胞中的表达情况,通过qPCR检测HCC细胞系HepG2、Hep3B、MHCC97H、MHCC97L、SMC-7721、Huh7及人正常肝细胞系L02中miR-552-3p的表达水平(图2A),可见miR-552-3p在HCC细胞中高表达,其中Hep3B的表达水平相对较高。为进一步探索miR-552-3p在HCC细胞中的作用机制,分别通过转染mimics con-

miR-552-3p mimics、inhibitor control、miR-552-3p inhibitor在Hep3B细胞中过表达或敲低miR-552-3p水平,使用qPCR试验确认转染效果,由图2B、2C可见miR-552-3p mimics组miR-552-3p表达显著增加,而miR-552-3p inhibitor组miR-552-3p表达被干扰,且与相应对照组间的差异具有统计学意义。

2.3 miR-552-3p促进HCC细胞增殖、迁移、侵袭功能  
为判断miR-552-3p对HCC细胞增殖功能的影响,CCK-8试验测定miR-552-3p被干扰及过表达后Hep3B细胞的增殖能力(图3A),经miR-552-3p inhibitor干扰后,Hep3B细胞在之后24 h至观察截止(72 h)的增殖能力低于对照组,而当miR-552-3p过



A: qPCR检测miR-552-3p在HCC细胞系中的表达水平,与L02细胞比较,\* $P < 0.001$  ( $n=3$ ); B: miR-552-3p mimics转染Hep3B细胞并使用qPCR检测转染效率,与NC及mimics control组比较,\* $P < 0.001$  ( $n=3$ ); C: miR-552-3p inhibitor转染Hep3B细胞并检测转染效率,与NC及inhibitor control组比较,\* $P < 0.001$  ( $n=3$ )。

图2 miR-552-3p在HCC细胞中表达上调

Figure 2 miR-552-3p is up-regulated in HCC cell lines

表达后Hep3B细胞增殖能力高于对照组( $P < 0.01$ )。Transwell试验观察miR-552-3p敲低及过表达后HCC细胞的迁移、侵袭功能,图3B可见miR-552-3p的表达被抑制后Hep3B细胞迁移、侵袭细胞数显著降低,而miR-552-3p过表达后Hep3B细胞迁移、侵袭细胞数量显著升高。因此,敲低miR-552-3p,Hep3B细胞迁移、侵袭能力被显著抑制,过表达miR-552-3p后Hep3B细胞迁移、侵袭能力提升。

2.4 miR-552-3p靶向作用于DACH1调控HCC细胞功能

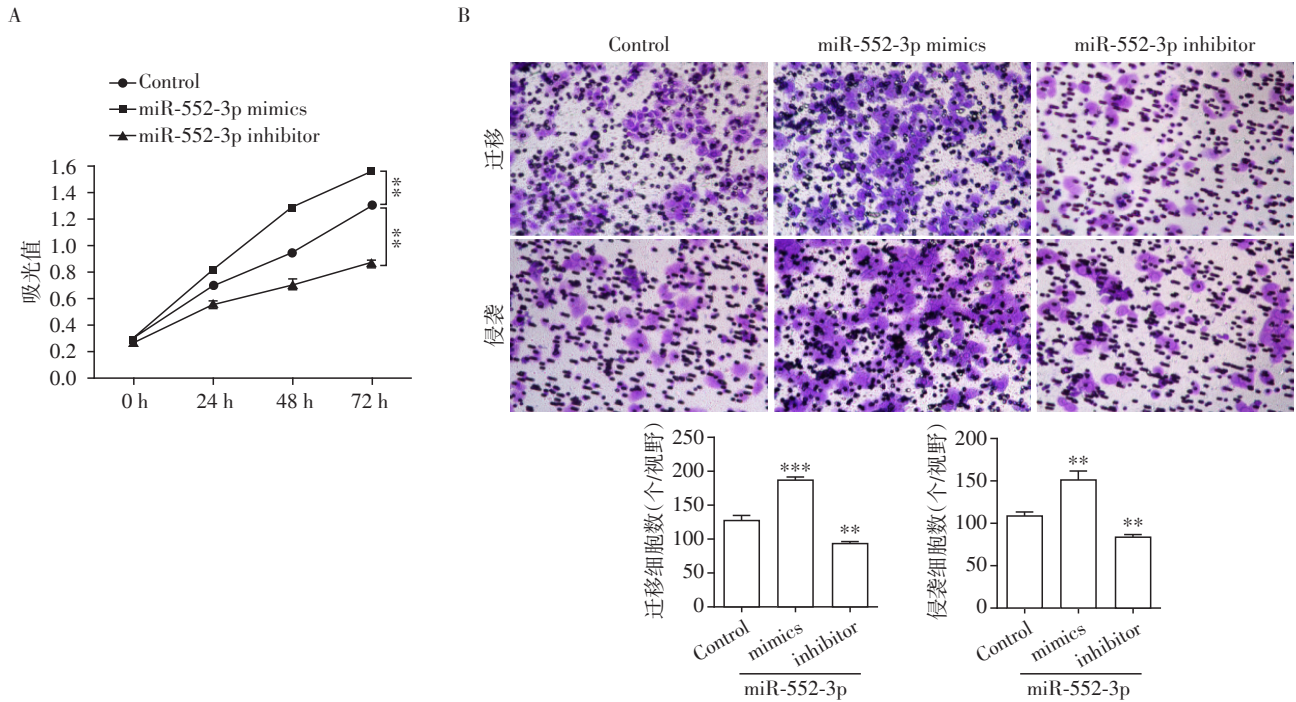
使用miRNA靶向预测工具miRanda数据库及TargetScan寻找miR-552-3p作用靶基因,本研究在4 778个靶基因中筛选出DACH1并预测其结合位点,图4A显示预测结果。为明确在HCC中DACH1是否为miR-552-3p的直接作用靶点并对HCC细胞的功能存在调控作用,本研究根据所预测的DACH1结合位点构建了DACH1野生型(DACH1-WT)及DACH1突变型(DACH1-MUT)荧光素酶报告载体转染至Hep3B细胞,并同时转染miR-552-3p mimics后检测荧光素酶活性,可见DACH1-WT组转染miR-552-3p mimics后相对荧光素酶活性降低,DACH1-MUT组并无明显变化(图4B)。使用qPCR检测miR

-552-3p敲低或过表达后DACH1 mRNA水平变化(图4C),并且Western blot检测miR-552-3p敲低或过表达后DACH1蛋白水平表达变化(图4D),结果可见miR-552-3p敲低后DACH1表达减少且miR-552-3p过表达后DACH1水平升高,可再次确认miR-552-3p可靶向作用于DACH1。

在Hep3B细胞中过表达DACH1,qPCR、Western blot检测确认转染效果(图4E、4F)。过表达DACH1、过表达DACH1同时转染miR-552-3p mimics,CCK-8检测各组细胞增殖、Transwell试验检测各组细胞迁移及侵袭能力变化,图4G可见Hep3B细胞在DACH1过表达后24~72 h的增殖能力低于对照组,同时过表达miR-552-3p后Hep3B细胞的增殖能力高于DACH1过表达组。图4H可见DACH1过表达后Hep3B细胞迁移、侵袭能力被抑制,而同时过表达miR-552-3p后Hep3B细胞迁移、侵袭能力的抑制被解除,由此可见miR-552-3p可通过靶向抑制DACH1促进HCC细胞增殖、迁移、侵袭功能。

2.5 miR-552-3p调控Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路

有研究发现,miR-552-3p可通过调控Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路促进肠癌进展<sup>[15]</sup>。为研究miR-552-3p促进HCC细胞增殖、迁移等功能的相关机制,采用Western blot分别检测Hep3B细胞中对照组



A: CCK-8 试验检测 miR-552-3p 干扰或过表达对 HCC 细胞增殖的影响, 两组比较, \*\* $P < 0.01$  ( $n=3$ ); B: Transwell 试验检测 miR-552-3p 干扰或过表达对 HCC 细胞迁移、侵袭的影响( $\times 100$ ), 与 Control 组比较, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  ( $n=3$ )。

图3 miR-552-3p 促进 HCC 细胞增殖、迁移、侵袭功能

Figure 3 miR-552-3p promotes HCC cell proliferation, migration and invasion

(NC)、miR-552-3p mimics 组、miR-552-3p inhibitor 组 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关蛋白表达水平, 图 5 可见 miR-552-3p 过表达后  $\beta$ -catenin、Cyclin D1、C-myc、GSK-3 $\beta$  蛋白表达水平升高, 而 miR-552-3p 被抑制后上述蛋白表达水平降低。进一步在 Hep3B 细胞 Control 组、DACH1 过表达组、过表达 DACH1+miR-552-3p mimics 组中检测以上 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路蛋白, 可见过表达 DACH1 后,  $\beta$ -catenin、Cyclin D1、C-myc、GSK-3 $\beta$  蛋白表达水平降低, 而同时过表达 miR-552-3p 后以上蛋白水平回升。综上, 说明 miR-552-3p 参与调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的激活及其具有影响 HCC 细胞功能的潜在作用。

### 3 讨论

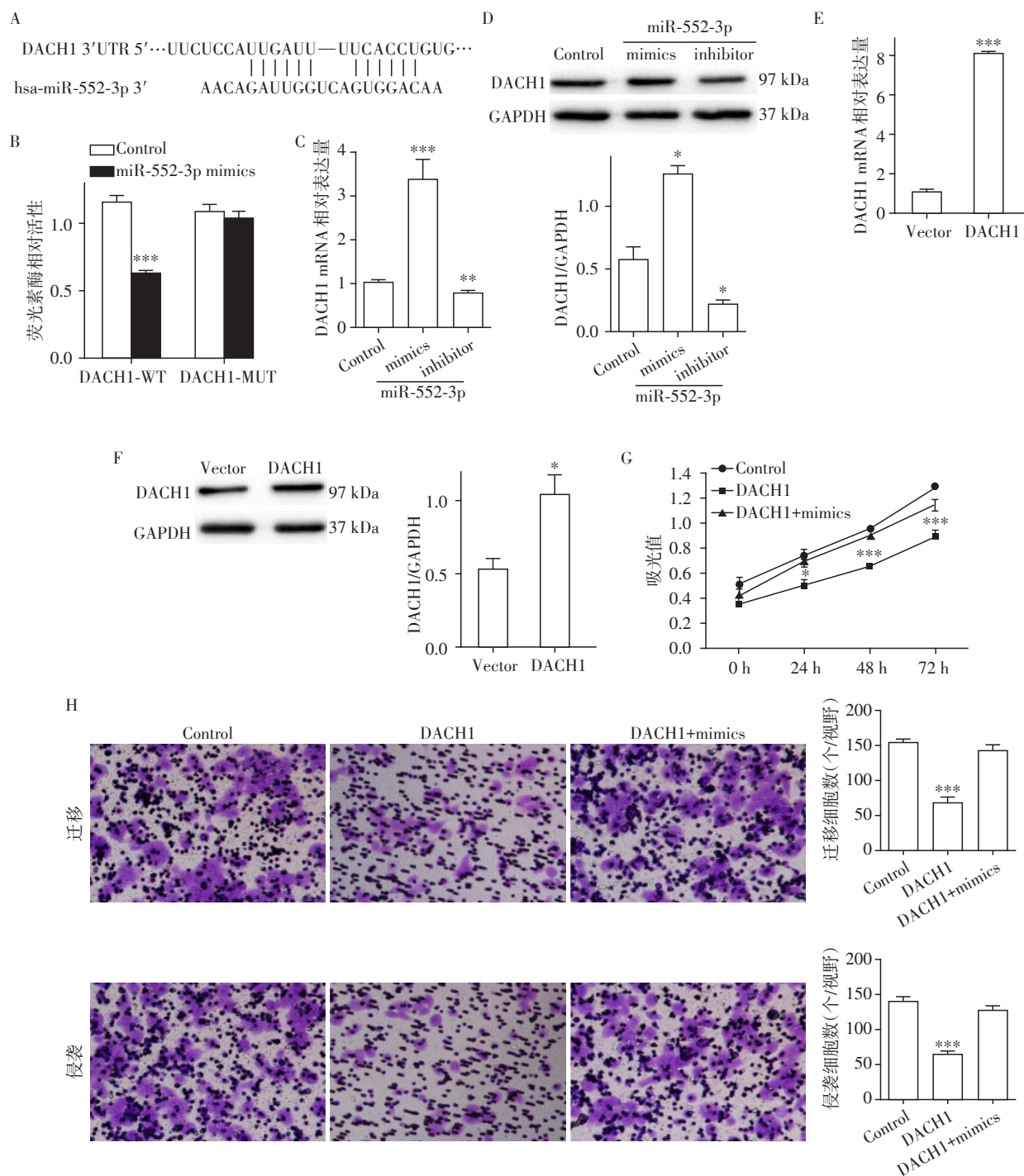
近年来, miRNA 丰富了我们对于 HCC 中基因表达数据的认识, 并逐渐成为 HCC 的生物标志物和治疗靶点研究中不可或缺的研究热点, 期以改进现有的方法并研究出更有效的个体化治疗方案<sup>[16]</sup>。miRNA 已被证明参与多种细胞过程, 如细胞增殖、细胞分化、细胞凋亡、干细胞生存等<sup>[7]</sup>。miRNA 通常在肿瘤中表达失调, 可作为肿瘤抑制因子或致癌基因, 主要取决于其作用的靶基因<sup>[17-18]</sup>。据报道, miR-552 在多种类型肿瘤细胞中高表达, 并可作为特异

性分子标志物, 尤其在肠癌中研究较多, 大量生物信息学研究亦表明, hsa-miR-552 可作为结直肠癌 (CRC) 诊断和治疗的生物标志物<sup>[10]</sup>。同时, miR-552-3p 下调多种参与细胞凋亡和细胞周期进程调控因子的过表达, 可作为潜在的肿瘤治疗靶点<sup>[13]</sup>。

有研究报道 miR-552 促进内皮细胞的内皮-间质转化, 随后通过间接促进 HCC 进展发挥促肿瘤发展作用<sup>[14]</sup>, 且其高表达可能与 HCC 患者的预后较差相关。因此, 我们试图研究 miR-552-3p 在 HCC 中的临床意义和功能机制。通过对 TCGA 数据库的研究, 我们发现 miR-552-3p 在 HCC 肿瘤中高表达。但在未来的研究中, 仍需进一步在肿瘤标本及体内实验的验证, 并统计其与临床特征的相关性。

本研究在肝细胞性肝癌细胞系中验证了 miR-552-3p 的高表达, 相较于人正常肝细胞系, 多种 HCC 细胞系 miR-552-3p 的表达显著增高, 并确认了 miR-552-3p 促进 HCC 细胞增殖、迁移、侵袭过程。除此之外, miR-552 亦可促进结直肠癌细胞的增殖、迁移、侵袭、化疗耐药性等功能, 并且其机制已被广泛研究<sup>[19]</sup>。

近期研究发现, 在乳腺癌中 miR-552-3p 直接靶向于 HER2 基因 3'-UTR, 是 HER2 途径的有效负性调控因子, 可能在乳腺癌进展期间发挥作用, 可能

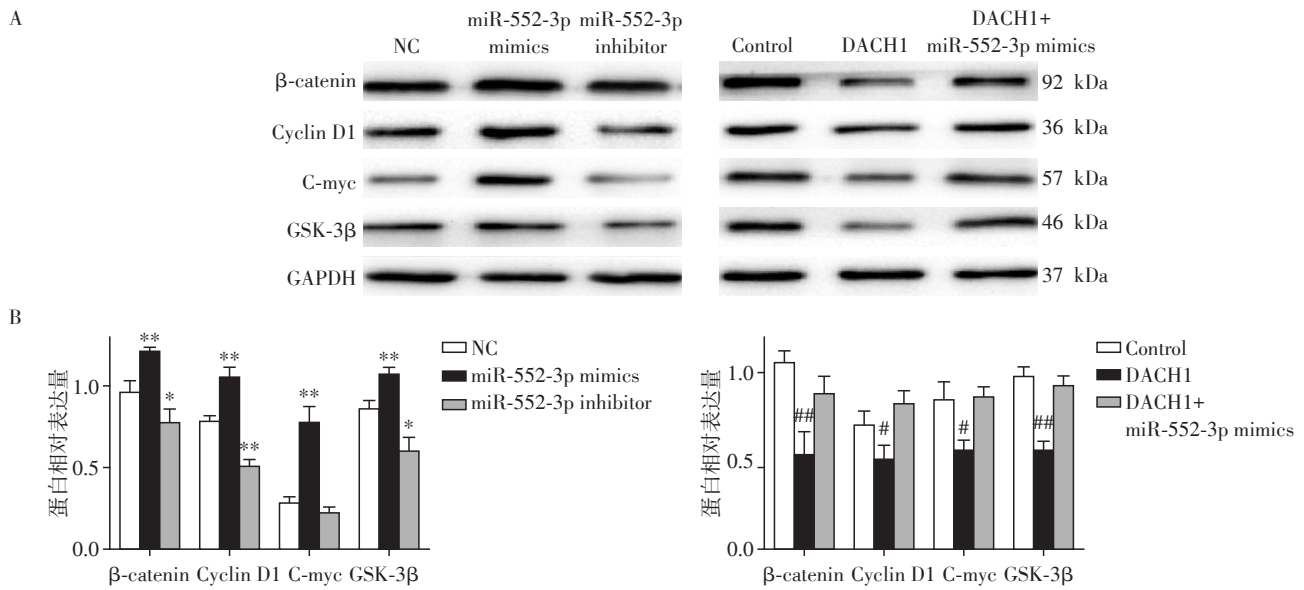


A: 预测的 miR-552-3p 靶向 DACH1 的结合位点; B: 突变型和野生型 DACH1 转染对照或 miR-552-3p 过表达 Hep3B 细胞后各组荧光素酶的相对活性,与 Control 组比较,\*\*\* $P < 0.001$  ( $n=3$ ); C: qPCR 检测干扰或过表达 miR-552-3p 对于 DACH1 mRNA 水平的影响,与 Control 组比较,\*\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$  ( $n=3$ ); D: Western blot 检测干扰或过表达 miR-552-3p 对于 DACH1 蛋白水平的影响,与 Control 组比较,\* $P < 0.05$  ( $n=3$ ); E: qPCR 确认 Hep3B 细胞中 DACH1 过表达转染效果,与 Vector 组比较,\*\*\* $P < 0.001$  ( $n=3$ ); F: Western blot 确认 DACH1 过表达转染效果,与 Vector 组比较,\* $P < 0.05$  ( $n=3$ ); G: DACH1 过表达后 Hep3B 细胞增殖能力被抑制,而同时过表达 miR-552-3p 后对增殖的抑制被解除,与 Control 组比较,\*\*\* $P < 0.001$  ( $n=3$ ); H: DACH1 过表达后 Hep3B 细胞迁移、侵袭能力被抑制,而同时过表达 miR-552-3p 后迁移、侵袭的抑制被解除( $\times 100$ ),与 Control 组比较,\*\*\* $P < 0.001$  ( $n=3$ )。

图4 miR-552-3p 靶向作用于DACH1调控HCC细胞功能  
Figure 4 miR-552-3p targets DACH1 regulating HCC cell function

为预防和治疗抑制 HER2 阳性乳腺癌开辟了潜在的新策略<sup>[12]</sup>。而本研究发现 miR-552-3p 可能结合于

DACH1 的 3'-UTR, 并验证了在 HCC 细胞中, miR-552-3p 靶向于 DACH1 基因抑制 HCC 细胞迁徙、侵



A: Western blot 检测 miR-552-3p 上调或下调、DACH1 过表达及 DACH1 过表达同时过表达 miR-552-3p 后 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号相关蛋白表达; B: 上述分组 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号相关蛋白表达水平相对于 GAPDH 灰度比值定量分析,与 NC 组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与 Control 组比较,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ ( $n=3$ )。

图5 miR-552-3p 调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路  
Figure 5 miR-552-3p regulates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway

衰、增殖等功能。DACH1 作为正常生理过程中血管重塑及上皮细胞迁移等作用的重要调控因子<sup>[20]</sup>,在乳腺癌、肺癌、胰腺癌、膀胱癌、脑癌及肝癌等多种肿瘤中作为肿瘤抑制因子<sup>[21-22]</sup>,且有许多证据显示其可作为多种肿瘤预后的标志物<sup>[23]</sup>。

DACH1 的低表达与 HCC 的进展和预后不良有关,Kaplan-Meier 分析表明 DACH1 可能是 HCC 总体存活的独立预后因素,并且在 HCC 进展中作为 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号的负性调控因子<sup>[24]</sup>。与先前研究相似的是,我们发现 miR-552-3p 靶向作用于 DACH1 并在 HCC 中抑制其表达、促进 HCC 进展相关功能,且与 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号蛋白调控相关。在进一步的研究中,可能需要深度挖掘其作用机制,探索 miR-552-3p/DACH1 在 HCC 细胞周期、凋亡、分化等细胞功能调节中的作用。

综上所述,本研究提供了 miR-552-3p 在 HCC 中表达增高及其促 HCC 进展的新的机制研究方向,DACH1 和 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路亦参与其中,为 HCC 的诊治策略提供潜在新靶点。

[参考文献]

[1] ARMENGOL C, SARRIAS M R, SALA M. Hepatocellular carcinoma: Present and future [J]. Med Clin (Barc), 2018, 150(10):390-397  
[2] FORNER A, LLOVET J M, BRUIX J. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet, 2012, 379(9822):1245-1255

[3] TURATO C, BALASSO A, CARLONI V, et al. New molecular targets for functionalized nanosized drug delivery systems in personalized therapy for hepatocellular carcinoma[J]. J Control Release, 2017, 268:184-197  
[4] NAULT J C, SUTTER O, NAHON P, et al. Percutaneous treatment of hepatocellular carcinoma: State of the art and innovations[J]. J Hepatol, 2018, 68(4):783-797  
[5] AMBROS V. The functions of animal microRNAs[J]. Nature, 2004, 431(76):350-355  
[6] KREK A, GRUN D, POY M N, et al. Combinatorial microRNA target predictions[J]. Nat Genet, 2005, 37(5):495-500  
[7] CALIN G A, CROCE C M. MicroRNA signatures in human cancers[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(11):857-866  
[8] 苗志龙,施育华,刘小兵,等. miR522 在肝细胞肝癌中的表达及临床意义[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2018, 38(12):1735-1737  
[9] CHAO Y, HU K, WANG X, et al. MicroRNA-552 promotes migration and invasion of osteosarcoma through targeting TIMP2[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 511(1):63-68  
[10] WU S, WU F, JIANG Z. Identification of hub genes, key miRNAs and potential molecular mechanisms of colorectal cancer[J]. Oncol Rep, 2017, 38(4):2043-2050  
[11] KIM J, LIM N J, JANG S G, et al. miR-592 and miR-552 can distinguish between primary lung adenocarcinoma

(下转第 583 页)

- hepatitis B after 3 decades of escalating vaccination policy, China[J]. *Emerg Infect Dis*, 2017, 23(5): 765-772
- [4] 王毓, 翟祥军, 许卫国, 等. 江苏省一般人群乙型肝炎表面抗原阳性率与乙肝疫苗免疫的关系[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2011, 31(4): 532-536
- [5] 凌剑, 张志兰, 侯晓艳, 等. 乙肝疫苗无(弱)应答再免疫策略初探[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2014, 34(11): 1621-1623
- [6] 曾滢, 陈鲁粤, 杨忠华, 等. 16岁及以上人群接种60 μg重组乙肝疫苗安全性及免疫原性研究[J]. *预防医学*, 2017, 29(9): 869-873
- [7] 崔富强, 庄辉. 我国乙型肝炎防控工作进展、挑战及对策[J]. *中国病毒病杂志*, 2016, 6(2): 81-87
- [8] 张旭, 张秋明, 刘耀珍, 等. 淮安市淮安区新生儿乙肝疫苗计划免疫策略实施效果的监测评价[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2014, 34(12): 1779-1782
- [9] CUI F Q, LUO H M, WANG F Z, et al. Evaluation of policies and practices to prevent mother to child transmission of hepatitis B virus in China: Results from China GAVI project final evaluation [J]. *Vaccine*, 2013, 31(9): J36-J42
- [10] 吴蔚, 康文玉, 孔毅, 等. 2005—2015年云南省乙型肝炎病毒性肝炎流行特征分析[J]. *疾病监测*, 2016, 31(12): 1028-1032
- [11] 黄玉莲, 李君梅, 陈园生, 等. 新疆克拉玛依市健康人群乙肝抗体水平及感染状况[J]. *职业与健康*, 2016, 32(14): 1933-1935, 1939
- [12] 宋红潮, 熊传庆, 郭艳秋, 等. 成人乙型肝炎疫苗无应答者大剂量再免疫效果评价[J]. *现代预防医学*, 2015, 42(20): 3783-3785
- [13] 王富珍, 郑徽, 张国民, 等. 8个省(自治区)乙型肝炎病毒表面抗原阳性产妇筛查及新生儿免疫预防措施的调查[J]. *中国疫苗和免疫*, 2014, 20(6): 523-528
- [14] 黄婉灵, 林杭, 张泽标, 等. 口腔正畸科患者交叉感染影响因素分析及预防对策[J]. *中华医院感染学杂志*, 2018, 28(21): 3301-3304
- [15] 李昕怡, 梅朝蓉, 邝玉, 等. 中国口腔医学各专业实习生对乙型肝炎病毒感染知、信、行情况调查[J]. *国际口腔医学杂志*, 2017, 44(2): 135-140
- [收稿日期] 2019-06-23

(上接第544页)

- and colorectal cancer metastases in the lung[J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(5): 2297-2302
- [12] LEIVONEN S K, SAHLBERG K K, MÄKELÄ R, et al. High-throughput screens identify microRNAs essential for HER2 positive breast cancer cell growth[J]. *Mol Oncol*, 2014, 8(1): 93-104
- [13] CHOI Y C, YOON S, BYUN Y, et al. MicroRNA library screening identifies growth-suppressive microRNAs that regulate genes involved in cell cycle progression and apoptosis[J]. *Exp Cell Res*, 2015, 339(2): 320-332
- [14] QU W, WEN X, SU K, et al. MiR-552 promotes the proliferation, migration and EMT of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting AJAPI expression[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(2): 1541-1552
- [15] CAO J, YAN X R, LIU T, et al. MicroRNA-552 promotes tumor cell proliferation and migration by directly targeting DACH1 via the Wnt/beta-catenin signaling pathway in colorectal cancer [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(3, B): 3795-3802
- [16] MINGUEZ B, LACHENMAYER A. Diagnostic and prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma[J]. *Dis Markers*, 2011, 31(3): 181-190
- [17] 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
- [18] CHEN C Z. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors[J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(17): 1768-1771
- [19] CHEN W C, LIN M S, YE Y L, et al. microRNA expression pattern and its alteration following celecoxib intervention in human colorectal cancer[J]. *Exp Ther Med*, 2012, 3(6): 1039-1048
- [20] CHANG A H, RAFTREY B C, D'AMATO G, et al. DACH1 stimulates shear stress-guided endothelial cell migration and coronary artery growth through the CXCL12-CXCR4 signaling axis [J]. *Genes Dev*, 2017, 31(13): 1308-1324
- [21] CHENG Q, NING D, CHEN J, et al. SIX1 and DACH1 influence the proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma through regulating p53 [J]. *Cancer Biol Ther*, 2018, 19(5): 381-390
- [22] LU G F, GENG F, XIAO Z, et al. MicroRNA-6807-3p promotes the tumorigenesis of glioma by targeting downstream DACH1 [J]. *Brain Res*, 2019, 1708: 47-57
- [23] ZHENG Z, NAYAK L, WANG W, et al. An ATF6-tPA pathway in hepatocytes contributes to systemic fibrinolysis and is repressed by DACH1 [J]. *Blood*, 2019, 133(7): 743-753
- [24] LIU Y, ZHOU R, YUAN X, et al. DACH1 is a novel predictive and prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma as a negative regulator of Wnt/β-catenin signaling [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(11): 8621-8634
- [收稿日期] 2019-05-26