

miR-421 通过抑制 PDCD4 发挥促进肝癌的作用

巫佳翠,刘敏,高洪泉,张爱清,王玉孝,杜贵成

(厦门医学院基础医学部解剖教研室,福建 厦门 361008)

摘要:[目的]分析 miR-421 通过靶向调控 PDCD4 的表达水平在肝癌的发生及发展中的作用。[方法]通过构建肝癌裸鼠移植瘤模型检测 miR-421 对移植瘤生长的影响;检测 miR-421 在肝癌细胞株及肿瘤组织中的表达量及其过表达在高/低侵袭转移能力肝癌细胞模型中对侵袭能力的影响;TargetScan 预测 miR-421 的潜在靶基因,并采用双荧光素酶报告基因法验证,qRT-PCR 和 Western blot 检测 miR-421 对靶基因的调控作用;检测 PDCD4 在肝癌细胞株和肿瘤组织中的表达;CCK8、流式细胞法、Tranwell 和细胞划痕检测 miR-421 与靶基因对肝癌细胞增殖、周期、侵袭和迁移的调控。[结果]肝癌裸鼠移植瘤模型中过表达 miR-421 可促进肝癌细胞的增殖及肿瘤的生长。miR-421 在肝癌细胞及肿瘤组织中均呈高表达并且上调其表达可提高肝癌细胞的侵袭能力。PDCD4 受 miR-421 的靶向调控,并在肝癌细胞及肝癌肿瘤组织中呈低表达。miR-421 过表达可促进肝癌细胞的增殖、侵袭、迁移及 S 期阻滞,但 PDCD4 可逆转这种促进效果。[结论] miR-421 通过负性调控靶基因 PDCD4 在肝癌中扮演促癌基因的角色。

关键词:肝肿瘤;miR-421;程序性细胞死亡-4

中图分类号:R735.7 文献标识码:A 文章编号:1671-170X(2019)10-0849-09

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2019.10.B001

MiR-421 Plays a Role in Promoting Liver Cancer by Inhibiting PDCD4

WU Jia-cui, LIU Min, GAO Hong-quan, ZHANG Ai-qing, WANG Yu-xiao, DU Gui-cheng
(Department of Anatomy, Department of Basic Medicine, Xiamen Medical College, Xiamen 361008, China)

Abstract: [Objective] To analyze the role of miR-421 in the occurrence and development of liver cancer by targeting the regulation of PDCD4 expression level. [Methods] The effect of miR-421 on the growth of transplanted tumor was detected by constructing the xenograft tumor model of nude mice with liver cancer, and the expression level of miR-421 in liver cancer cell lines and tumor tissues and the effect of overexpression on the invasion ability in the liver cancer cell model with high/low invasion and metastasis ability was detected. The potential target gene of miR-421 was predicted by TargetScan, and which was verified by double luciferase reporter gene method, regulatory effect of miR-421 on the target gene was detected by qRT-PCR and Western blot, and PDCD4 expression in liver cancer cell lines and tumor tissues was detected. The regulation of miR-421 and target genes on the proliferation, cycle, invasion, and migration of HCC cells was detected by CCK8, flow cytometry, Tranwell and cell scratch. [Results] It was found that overexpression of miR-421 in the transplanted tumor model of nude mice with liver cancer promoted the proliferation and tumor growth of liver cancer cells. miR-421 was highly expressed in both liver cancer cells and tumor tissues, and this up-regulated expression could improved the invasion ability of liver cancer cells. PDCD4 was regulated by miR-421, and was low expressed in liver cancer cells and tumor tissues. miR-421 overexpression could promoted the proliferation, invasion, migration and s-phase arrest of HCC cells, but PDCD4 could reversed this effect. [Conclusion] MiR-421 plays the role of oncogene in liver cancer by negatively regulating the target gene PDCD4.

Subject words: liver cancer; miR-421; PDCD4

肝细胞肝癌(HCC)是恶性程度很高的肿瘤之一,在我国肝癌死亡率居各种肿瘤死亡率的第2位,且

仍呈上升趋势^[1-2]。尽管近年来针对肝癌的治疗方法取得了长足的进展,但肝癌的总体治疗效果仍不理想,其中肝癌的侵袭转移和复发是影响肝癌综合治疗效果提高的关键因素^[3]。

程序性细胞死亡-4 (programmed cell death 4,

通信作者:巫佳翠,教研室副主任,副教授,学士;厦门医学院基础医学部解剖教研室,福建省厦门市集美区灌口中路1999号(361008);E-mail 1585921003@qq.com

收稿日期:2019-01-29;修回日期:2019-04-15

PDCD4) 可以通过抑制蛋白转录和翻译过程抑制肿瘤细胞的生长。很多研究表明 PDCD4 是一个新的抑癌基因^[4]。来自小鼠表皮细胞 JB6 模型转化的实验报道: JB6 细胞分为对肿瘤诱导剂敏感、易向肿瘤细胞转化的细胞(P+)和不易受肿瘤诱导剂影响、不易向肿瘤细胞转化的细胞(P-)^[5]。研究表明 PDCD4 在 JB6P-细胞中高表达,而在 JB6P+细胞系低表达,并且在 JB6P+细胞系中过表达 PDCD4 可抑制细胞的恶性转化^[6];另外,来自 PDCD4 转基因鼠的实验证明 PDCD4 表达不仅能抑制表皮乳头状瘤的形成和降低皮肤癌的发生率,而且能阻滞表皮乳头状瘤向皮肤癌的恶性转化,另有研究指出 84%的 PDCD4 基因缺陷小鼠能够自发产生恶性的 B 细胞淋巴瘤^[7]。

近年来,基础研究与临床观察发现 miRNAs 可能参与包括肝癌在内的各肿瘤的发生发展、治疗转归及预后等各个环节。尽管 miRNAs 在肝癌中的作用已有所报道,但 miRNAs 在其侵袭转移中的作用及其机制仍未完全明确^[8]。本研究旨在分析 miR-421 通过靶向调控 PDCD4 促进肝癌的发生及发展,为肝癌诊断及治疗提供新的研究方向。

1 材料与方 法

1.1 样本采集

实验组织标本来自本院病理科 2015 年 5 月至 2018 年 4 月肝癌患者的肝癌组织及癌旁正常组织共 119 例,其中男性 85 例,女性 34 例,平均年龄 64.32 ± 13.32 岁,均经组织病理学检查证实,未接受化疗或放疗,所有组织标本采集时先切成小块,迅速置于冻存管中液氮保存,6h 后移至 -80°C 冰箱备用。所有样本均经患者书面知情同意获得,并经厦门医学院伦理委员会批准。

1.2 细胞培养

人肝上皮细胞 THLE-3 以及肝癌细胞株 SMMC7721、LM3、Hep3B、MHCC97H 购自中科院上海细胞库。细胞培养于含 10%的胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、 $100 \mu\text{g/ml}$ 青霉素-链霉素溶液的 DMEM 培养基中,置于含 5% CO_2 , 温度维持在 37°C 中的恒温箱中培养。

细胞转染:将生长状态良好的 SMMC7721 细胞或 MHCC97H 细胞铺于六孔板,约 5×10^5 孔,待细胞在

6 孔板中的生长融合度达 70% 时,按照转染试剂 LipofectamineTM 2000 试剂说明书,分别转染 miR-421 mimics 和 negative control miRNA mimics,共转染 miR-421 mimics 和 PDCD4。miR-421 mimics 转染序列:miR-421;5'-AUCAACAGACAUAUAAUUGGGCGC-3'; miR-421;5'-GCCCAAUAAUGUCUGUUGAUUU-3'。miR-421mimisc 购买自吉码基因有限公司。

1.3 细胞复苏

取出冻存于液氮罐中的肝癌细胞株 MHCC97H,迅速放入 37°C 预培育箱中不停摇动,使其快速融化。加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液,而对照组正常细胞 THLE-3 加入含 50mg/L BPE、5%L-谷氨酰胺及 $5 \mu\text{g/L}$ EGF 的 KSFM 培养液。将上述细胞悬液转移常规培养箱中培养,定期更换细胞培养液。

1.4 细胞传代

细胞融合 85% 左右时开始传代,用 PBS 冲洗 3 次。加入 0.25%胰蛋白酶 1ml 使消化液流遍所有细胞表面,置于 37°C 培养箱内 2min,然后用显微镜观察细胞,发现细胞突起消失后,终止消化,转移至 15ml 离心管,1000r/min 室温离心 5min,弃上清液,以培养液重悬,用移液枪吹打使成为单细胞悬液,计数板计数后,按照 1:3 的比例在原培养环境下继续培养。重复上述步骤传代。

1.5 qRT-PCR 检测

按照 Trizol 试剂盒说明书中步骤提取组织和细胞总 RNA,按照反转录试剂盒的说明书进行 RNA 逆转录合成 cDNA。按照 qRT-PCR 试剂盒说明书进行 PCR 反应。反应条件如下: 95°C 30s;40 个循环的 95°C 5s 及 60°C 30s。miR-421 水平以 U6 为内参,PDCD4 的 mRNA 水平以 GAPDH 为内参,qRT-PCR 结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示。 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = X$ (相对表达倍数), $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{E} - \Delta\text{C}$, $\Delta\text{E} = \text{Ct}_{\text{实验组}} - \text{Ct}_{\beta\text{-actin}}$, $\Delta\text{C} = \text{Ct}_{\text{对照组}} - \text{Ct}_{\beta\text{-actin}}$ 。每个样本重复 3 次。引物如下:miR-421-F:5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTC-3', miR-421-R:5'-GCACTGGATACGACAAAAAT-3', U6-F:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', U6-R:5'-AACGCTTCACGA ATTTGCGT-3', PDCD4-F:5'-GCAAAAA-GGCGACTAAGGAAAAA-3', PDCD4-R:5'-TAAGGGC-GTCACTCCCACT-3', GAPDH-F:5'-AGAAGGCTGG-GGCTCArTTG-3', GAPDH-R:5'-AGGGGCCATCCA-CAGTCTTC-3'。

1.6 荧光素酶报告基因法检测

利用 microRNA 靶基因数据库预测 miR-421 与 PDCD4 可能的作用位点。构建 PDCD4 野生型 3'-UTR 荧光素酶报告基因质粒 WT-PDCD4 和突变型质粒 Mut-PDCD4。将 WT-PDCD4、Mut-PDCD4 与 miR-421 mimics 和 negative control miRNA mimics 共转染进 MHCC97H 细胞,转染 24h 后,去除培养基,以 PBS 清洗细胞 3 次,弃净 PBS,每孔加入 100 μ l 被动裂解液(passive lysis buffer, PLB),室温下将培养板置于平板摇床上,轻微晃动 15min。待细胞裂解后,将每组 20 μ l 样本转移至发光用 96 孔板上,并置于超级酶标仪的检测板上,设置自动进样器 1 和 2 分别分装 100 μ l 的 LARII 和 Stop&Glo 试剂。测量时,使用 1~2s 延迟和 5~10s 读数。如此循环操作直至所有样本检测完毕。使用酶标仪配套软件进行结果分析。相对荧光素酶活性(relative luciferase activity)=萤火虫荧光素酶活性(firefly luciferase activity)/海肾荧光素酶活性(renilla luciferase activity)。

1.7 Western Blot

采用 RIPA 裂解液提取细胞或组织蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,按每泳道以 50 μ g 总蛋白进行 10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白,然后将蛋白转移到 PVDF 膜上。5%脱脂牛奶 37 $^{\circ}$ C 封闭 1h,加入一抗兔抗 PDCD4(1:1000),内参 GAPDH(1:2000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 漂洗 3 次后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1:5000),室温孵育 1h。ECL 液暗室发光显影,采集图像并分析。

1.8 免疫组化

将组织标本置于 4%多聚甲醛固定液中固定 48h 后进行常规脱水、透明及浸蜡处理,石蜡包埋,切片机进行连续石蜡切片,厚度 5 μ m。石蜡切片置于 65 $^{\circ}$ C 烤箱中过夜,而后梯度脱蜡、水化。水化后的组织切片上滴加 3% H₂O₂ 溶液室温孵育 15min 以阻断内源性过氧化物酶活性。使用 PBS 冲洗 3min \times 3 次,切片置于柠檬酸盐缓冲液并采用微波加热法以修复抗原。待修复结束后加入 5% 的正常羊血清封闭,室温孵育 20 min。加入一抗兔抗 PDCD4 (1:100),Ki67 抗体(1:100),4 $^{\circ}$ C 过夜。加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1:200),37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。采用 DAB 显色后,苏木精室温染色 2 min,而后进行

脱水和中性树脂封片。采用正置显微镜观察切片阳性信号,并进行计数统计。

1.9 Transwell 实验

迁移实验:取生长状态良好的各组细胞,胰蛋白酶消化并使用含 10% BSA 的培养基重悬细胞,调整细胞密度为 1 \times 10⁶/ml。将滤膜孔径为 8 μ m 的 Transwell 小室放置于 24 孔板中;在小室外加入 600 μ l 含 10% 血清的培养基;在小室内加入 100 μ l 细胞悬液;将培养板放入孵箱,常规培养 24~48h。取出小室,用 PBS 淋洗 3 次;将小室置于 95% 乙醇中固定 5 min;在 0.5% 结晶紫染色液中染色 10min 后,用 PBS 漂洗去除未结合细胞的染色液。用棉签轻拭去小室滤膜上层的细胞,在显微镜下观察滤膜下层细胞,每个样本随机选取 10 个视野拍照并计数。

侵袭实验:将 Matrigel 凝胶置于 4 $^{\circ}$ C 过夜;次日将液化的 Matrigel 与培养基以 1:6 的比例稀释。将滤膜孔径为 8 μ m 的 Transwell 小室放入 24 孔板中;在小室内加入 50 μ l Matrigel 稀释液,以包被滤膜;将培养板置于孵箱中 4h,令包被液晾干。剩余步骤同 Transwell 细胞迁移实验。

1.10 CCK8 检测细胞增殖

用含 EDTA 的胰蛋白酶消化并离心重悬,重悬后进行细胞计数,调整各组细胞数为 1.5 \times 10⁴ 个/ml。将各组细胞均匀铺于 96 孔板中,每孔 100 μ l 细胞悬液,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养。转染至 24h 后每孔中加入 10 μ l CCK8 溶液,将 96 孔板置于全波长酶标仪上,设定波长 450nm,进行吸光度检测。实验重复 3 次。

1.11 细胞划痕实验检测细胞迁移

将生长状态良好的各组细胞以 2 \times 10⁵ 个/ml 接种于 6 孔板内,每孔 2ml。待细胞长至约 80% 汇合时,用 200 μ l tip 头垂直划出一无细胞的细痕,观察 12h 时细胞划痕处细胞运动变化。

1.12 流式细胞法检测细胞周期

各组细胞以每孔 5 \times 10⁵ 个接种于 6 孔板中,转染 48h 后收集细胞并用预冷的 PBS 洗涤细胞 1 次,然后设定 1200rpm 离心 5min,用预冷的 PBS 重悬,将细胞悬液加入预冷的 70% 乙醇中,置于 4 $^{\circ}$ C 固定过夜。去除乙醇后用 PBS 洗涤 2 次并加入 100 μ l RNase A,37 $^{\circ}$ C 水浴 30min,接着添加 400 μ l PI 染色并混匀,4 $^{\circ}$ C 避光 30min,最后用流式细胞仪检测细

胞周期。实验重复3次。

1.13 构建肝癌肿瘤异种移植小鼠模型

取12只BALB/c雄性裸鼠,5~6周龄,体质量15~18g,饲料、饮水、垫料、笼具均经高压蒸汽灭菌后使用,操作人员严格执行SPF级实验动物操作规程。所有裸鼠分为对照组(n=6)和miR-421 mimics组(n=6)。取转染了miR-421 mimics,negative control miRNA mimics的MHCC97H细胞,调整细胞浓度为 2×10^7 个/ml,每只裸鼠左前上肢腋下处皮下接种0.2ml细胞悬液,接种后,所有裸鼠继续在SPF条件下饲养。根据转染物每3d各组裸鼠称重,并用游标卡尺测量每只裸鼠移植瘤的最大直径a和最小径b,计算瘤体积,计算公式为: $V=1/2 \times a \times b^2$,3周(细胞接种21d后)后处死全部裸鼠,剥离瘤体,称重,拍照,甲醛固定。

1.14 统计学处理

采用SPSS 22.0统计软件进行统计学分析,两个数据间以两单独样本t检验,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用t检验及方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

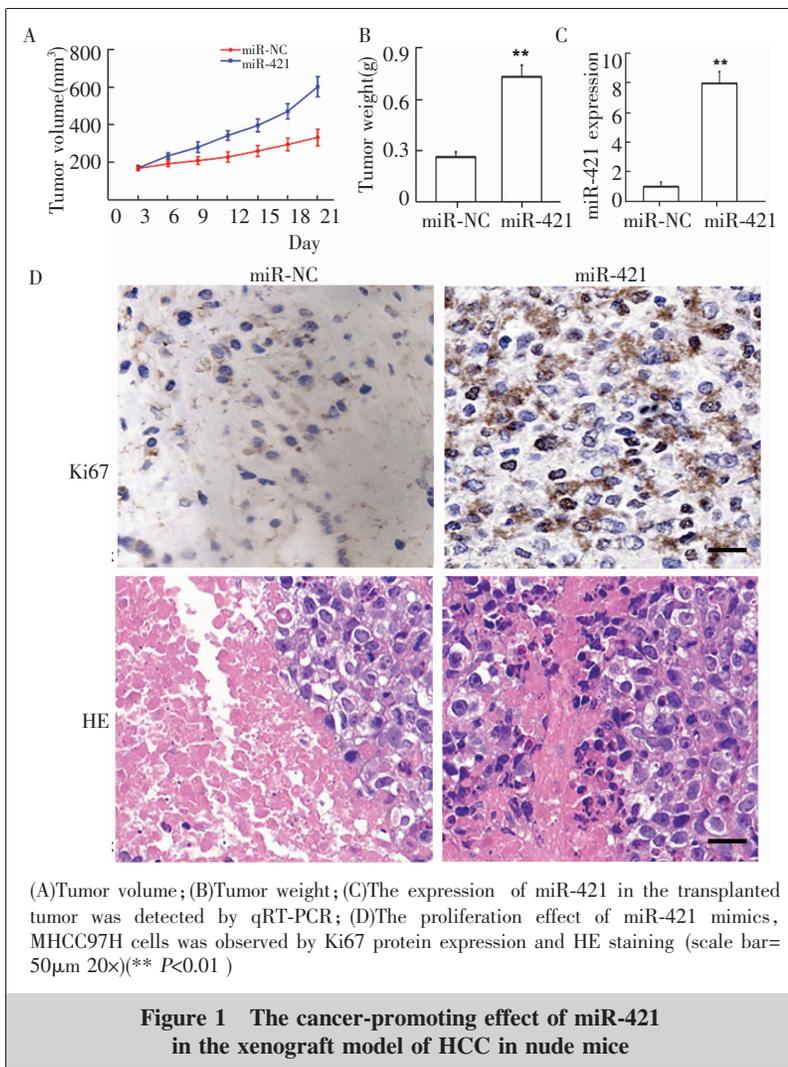
2.1 miR-421在肝癌裸鼠移植瘤模型中发挥促癌作用

MHCC97H细胞分别转染miR-421 mimics和negative control miRNA mimics(miR-NC)并接种于裸鼠左前上肢腋下处皮下以构建肝癌裸鼠移植瘤模型。细胞接种21d后,miR-421 mimics组的肿瘤体积明显高于对照组 $589.35 \pm 56.22 \text{mm}^3$ vs $305.74 \pm 34.26 \text{mm}^3$,差异有统计学意义($t=21.714, P < 0.001$)。miR-421 mimics组的肿瘤重量明显高于对照组($0.76 \pm 0.11 \text{g}$ vs $0.29 \pm 0.09 \text{g}$),差异有统计学意义($t=8.100, P < 0.001$)(Figure 1A, 1B)。qRT-PCR检测结果显示,miR-421 mimics组的miR-421表达量明显高于对照组(7.54 ± 0.17 vs 1.00 ± 0.12),差异有统计学意义($t=76.986, P < 0.001$)(Figure

1C)。Ki67与HE染色结果显示,相比对照组,miR-421 mimics组的细胞增殖能力显著升高(Figure 1D)。

2.2 miR-421在各株肝癌细胞及肝癌肿瘤组织中的表达及对细胞侵袭能力的影响

采用qRT-PCR检测4株肝癌细胞及正常人肝上皮细胞THLE-3中miR-421的表达量,结果显示,SMC7721、LM3、Hep3B和MHCC97H中miR-421的表达量分别为 1.36 ± 0.13 、 1.81 ± 0.19 、 1.55 ± 0.16 、 2.34 ± 0.23 ,均显著高于THLE-3(1.00 ± 0.12),差异均有统计学意义($t=3.524, 6.243, 4.763, 8.947; P=0.019, 0.003, 0.009, 0.001$)(Figure 2A)。并且在肝癌肿瘤组织中,miR-421的表达水平(1.95 ± 0.13)较癌旁正常组织(1.00 ± 0.12)显著升高,差异有统计学意义($t=9.301, P=0.001$)(Figure 2B)。Tranwell检测结果显示,MHCC97H细胞的侵袭能力明显强于



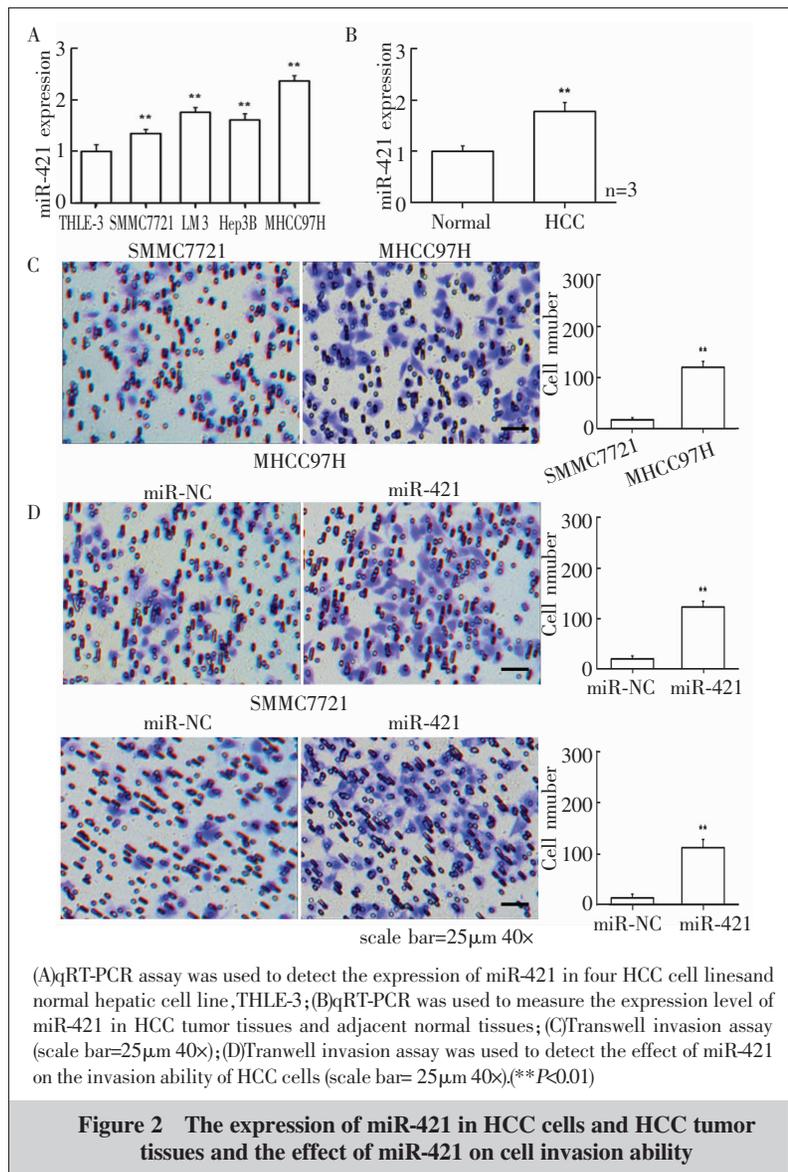
SMMC7721 (Figure 2C), 所以选取 MHCC97H 作为高侵袭转移能力的肝癌细胞模型, SMMC7721 作为低侵袭转移能力的肝癌细胞模型。在这 2 株肝癌细胞中转染 miR-421 mimics 并检测其侵袭能力, 结果显示, miR-421 过表达的 MHCC97H 细胞和 SMMC7721 细胞侵袭能力均显著升高 (Figure 2D)。
2.3 miR-421 通过结合 PDCD4 的 3'-UTR 来抑制 PDCD4 的表达

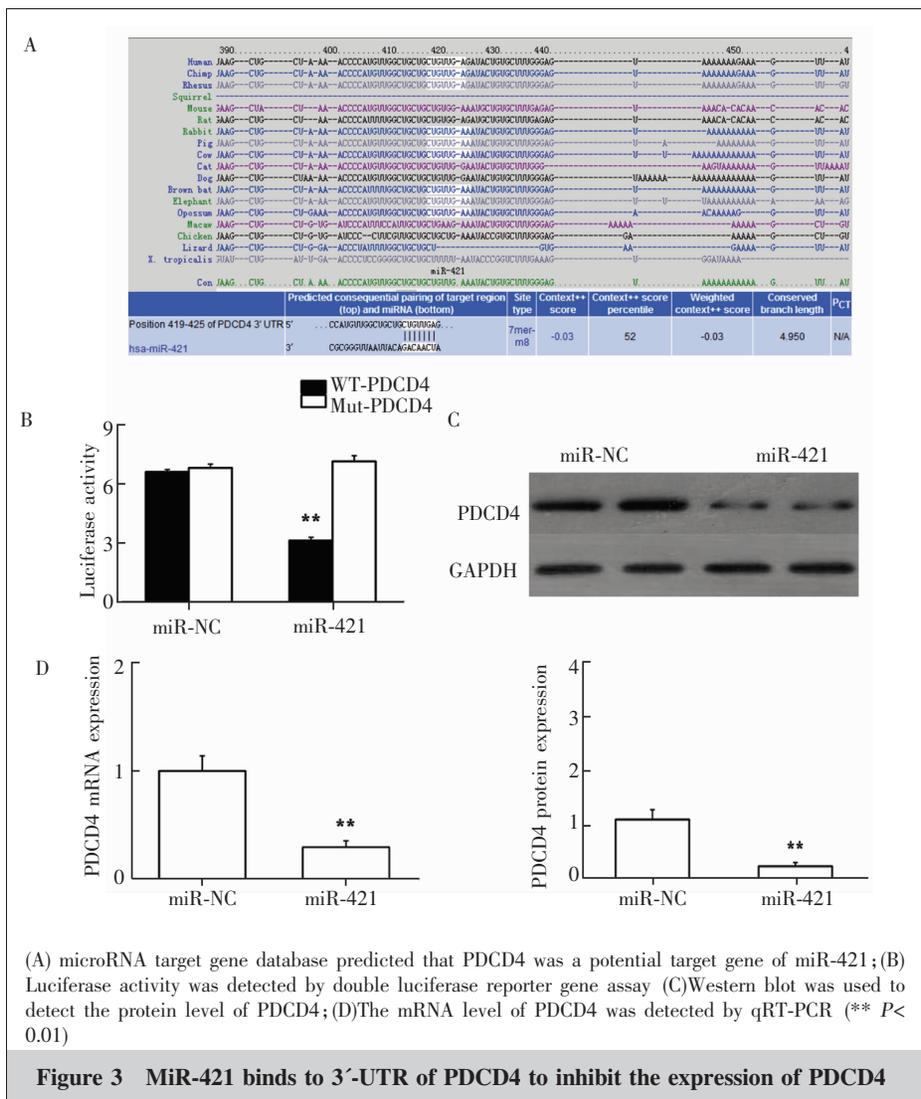
采用 TargetScan 软件预测 miR-421 的潜在靶基因, 结果显示, PDCD4 的 3'UTR 区域存在与 miR-421 形成互补结合的位点 (Figure 3A)。将 miR-421 mimics, miR-NC, 内参海肾荧光素酶 (Renilla luciferase) 以及构建的 PDCD4 野生型 3'-UTR 荧光素酶报告基因质粒 WT-PDCD4 和突变型报告基因质粒 Mut-PDCD4 共转染进 MHCC97H 细胞中, 双荧光素酶检测结果显示, NC 对照组 WT-PDCD4 质粒与 Mut-PDCD4 质粒的荧光素酶活性无明显统计学差异 (6.85 ± 0.12 vs 6.89 ± 0.15 , $t=0.361$, $P=0.737$)。miR-421 mimics 转染组的 WT-PDCD4 质粒的荧光素酶活性明显低于 Mut-PDCD4 质粒 (7.05 ± 0.99 vs 2.95 ± 0.23), 差异有统计学意义 ($t=6.987$, $P=0.002$) (Figure 3B)。采用 Western blot 检测 miR-421 mimics 转染组和 miR-NC 对照组中 PDCD4 蛋白的表达水平, 结果显示, miR-421 mimics 转染组的 PDCD4 的蛋白表达量明显低于 NC 对照组 (0.35 ± 0.05 vs 1.09 ± 0.12), 差异有统计学意义 ($t=9.859$, $P=0.001$) (Figure 3C)。qRT-PCR 检测结果也显示 miR-421 mimics 转染组 PDCD4 的 mRNA 水平明显较 NC 对照组明显降低 (0.36 ± 0.05 vs 1.00 ± 0.12), 差异有统计学意义 ($t=8.527$, $P=0.001$) (Figure 3D)。

2.4 PDCD4 在肝癌肿瘤组织及各株肝癌细胞中的表达

采用 qRT-PCR 检测 PDCD4 在肝癌细胞株 SMMC7721、MHCC97H、LM3、Hep3B 及正常人肝上皮细胞 THLE-3 中的 mRNA 表达水平, 结果显示, 各株肝癌

细胞中 PDCD4 mRNA 表达水平分别为 0.76 ± 0.06 、 0.41 ± 0.05 、 0.56 ± 0.06 、 0.23 ± 0.05 , 均显著低于 THLE-3 的 PDCD4 mRNA 表达水平 (1.00 ± 0.11), 差异均有统计学意义 ($t=3.318, 8.457, 6.082, 11.038$; $P=0.029, 0.001, 0.004, <0.001$) (Figure 4A)。另外, 在肝癌肿瘤组织中 PDCD4 mRNA 表达水平 (0.41 ± 0.04) 显著低于癌旁正常组织 (1.00 ± 0.10), 差异有统计学意义 ($t=9.488$, $P=0.001$) (Figure 4B)。免疫组化检测结果显示, PDCD4 在肿瘤组织中的阳性信号显著降低 (Figure 4C), Western blot 检测结果也显示, 肿瘤组织中 PDCD4 的蛋白表达显著低于癌旁正常组织 (0.23 ± 0.03 vs 1.00 ± 0.06), 差异有统计学意义 ($t=19.881$, $P<0.001$) (Figure 4D)。





(A) microRNA target gene database predicted that PDCD4 was a potential target gene of miR-421; (B) Luciferase activity was detected by double luciferase reporter gene assay (C)Western blot was used to detect the protein level of PDCD4; (D)The mRNA level of PDCD4 was detected by qRT-PCR (** $P < 0.01$)

2.5 miR-421 与 PDCD4 对肝癌细胞的增殖、侵袭、迁移及细胞周期的影响

在 MHCC97H 中转染 miR-NC 或 miR-421 mimics 及共转染 miR-421 mimics 和 PDCD4, CCK8 法检测结果显示, miR-421 mimics 转染组的 OD 值 (2.46 ± 0.23) 显著高于对照组 (1.81 ± 0.20), 差异有统计学意义 ($t=3.694, P=0.021$)。而 miR-421 mimics+PDCD4 转染组的 OD 值 (1.41 ± 0.10) 显著低于 miR-421 mimics 转染组, 差异有统计学意义 ($t=7.251, P=0.002$) (Figure 5A)。流式细胞法检测结果显示, miR-421 mimics 转染组 S 期细胞比例 ($25.65\% \pm 2.31\%$) 显著高于对照组 ($18.14\% \pm 1.23\%$), 差异有统计学意义 ($t=4.970, P=0.008$)。miR-421 mimics+PDCD4 转染组 S 期细胞比例 ($8.25\% \pm 1.03\%$) 显著低于 miR-421 mimics 转染组, 差异有统计学意义 ($t=10.678, P <$

0.001) (Figure 5B)。Tranwell 检测结果显示, miR-421 mimics 转染组侵袭细胞计数 (109.65 ± 10.26) 明显高于 NC 对照组 (60.50 ± 6.23), 差异有统计学意义 ($t=7.092, P=0.002$)。共转染 miR-421 mimics 和 PDCD4 后, 侵袭细胞计数为 21.30 ± 2.06 , 明显低于 miR-421 mimics 转染组, 差异有统计学意义 ($t=14.623, P < 0.001$)。miR-421 mimics 转染组迁移细胞计数为 99.56 ± 9.47 , 明显高于 NC 对照组 (52.23 ± 5.06), 差异有统计学意义 ($t=7.635, P=0.002$)。共转染 miR-421 mimics 和 PDCD4 后, 迁移细胞计数为 21.33 ± 2.66 , 明显低于 miR-421 mimics 转染组, 差异有统计学意义 ($t=9.362, P=0.001$) (Figure 5C)。细胞划痕实验结果也显示, miR-421 高表达可提高细胞迁移能力, 而同时上调 miR-421 和 PDCD4 的表达水平, 细胞的迁移能力明显降低 (Figure 5D)。

3 讨论

肝细胞肝癌(HCC)是肝的主要恶性肿瘤, 尽管 HCC 的筛查和治疗已经取得了很大的进步, 但持续的缓解并没有实现, 而且高侵袭和转移潜能成为肝癌治疗的一个重大挑战^[9]。因此, 寻找新的肝癌检测生物标志物, 对于临床肝癌的诊疗具有重要意义。

MircroRNAs(miRNA)是一类真核生物中高度保守的具有调控作用的非编码单链小 RNA, 通过调控靶基因翻译和表达, 广泛参与细胞分化、增殖及凋亡等。miRNA 表达具有特异性, 越来越多研究发现 miRNAs 可以调控超过 50% 以上的编码基因, 参

与各种肿瘤疾病的发生发展及转归^[10-11]。Braconi等^[12]将HCV基因组转染至肝癌细胞系HepG中,发现HCV感染导致了10个miRNA分子的上调和23个miRNA分子的下调,其中以miR-193b的上调幅度最为明显。Ladeiro等^[13]也报道在HBV阳性的肝癌组织中miR-96表达特异性上调。本研究中我们发现肝癌细胞株SMMC7721、LM3、Hep3B和MHCC97H中miR-421的表达量均显著高于正常人肝上皮细胞THLE-3,并且miR-421在肝癌肿瘤组织中的表达水平也明显高于癌旁正常组织,提示miR-421的异常表达和肝癌密切相关。另外,对于MHCC97H和SMMC7721这两种不同侵袭能力的肝癌细胞,上调miR-421的表达对均可提高其侵袭能力。提示miR-421可能参与了对肝癌细胞生物学行为的调控。

miRNA对于基因的调控作用依赖于碱基序列的部分互补,导致mRNA的降解及蛋白翻译的阻滞,在转录后水平发挥作用^[14]。miRNA与疾病相关性研究中遇到的一大问题,是难以找到它真正调控的靶基因^[15]。本研究中,我们通过TargetScan预测PDCD4是miR-421的潜在靶基因,并通过双荧光素酶报告基因实验证实了miR-421的确可与PDCD4的3'UTR区域互补结合。在进一步研究中,我们还发现miR-421可以抑制PDCD4的mRNA和蛋白表达水平,表明miR-421可负性调控其靶基因PDCD4的表达。也间接说明了miR-421与PDCD4的表达具有明显的相关性。

PDCD4最初是由Soejima等^[16]发现在细胞发生程序性细胞死亡时诱导产生的凋亡相关基因。人的PDCD4基因定位在染色体的10q24,其cDNA全长约3.5kb,其中编码区约1.4kb。PDCD4可以通过其MA3的结构域竞争性的结合到eIF4A上,从而通过阻止eIF4A和eIF4G的结合来抑制解螺旋酶活性,

从而抑制翻译的进行。在肺癌、结肠癌、神经胶质瘤、胰腺癌、乳腺癌等组织中均检测到PDCD4表达的下调甚至缺失,有研究结果显示PDCD4在原发性肺癌中的缺失率高达83%,而且与肿瘤的恶性程度密切相关^[17]。来自结肠癌的研究还显示PDCD4表达的下调或缺失与肿瘤的进展和患者的不良预后密切相关。所有这些资料提示PDCD4在肿瘤的发生中起着重要作用^[18]。在本研究中,我们发现各株肝癌细胞中PDCD4的mRNA表达水平均显著降低,并且肝癌肿瘤组织中PDCD4的mRNA和蛋白表达水平均显著低于癌旁正常组织,同时免疫组化检测结果也显示PDCD4在肝癌肿瘤组织中低表达。上述结果提示PDCD4的低表达与肝癌的发生密切相关。

肿瘤侵袭转移与miRNA分子的相关性是近年

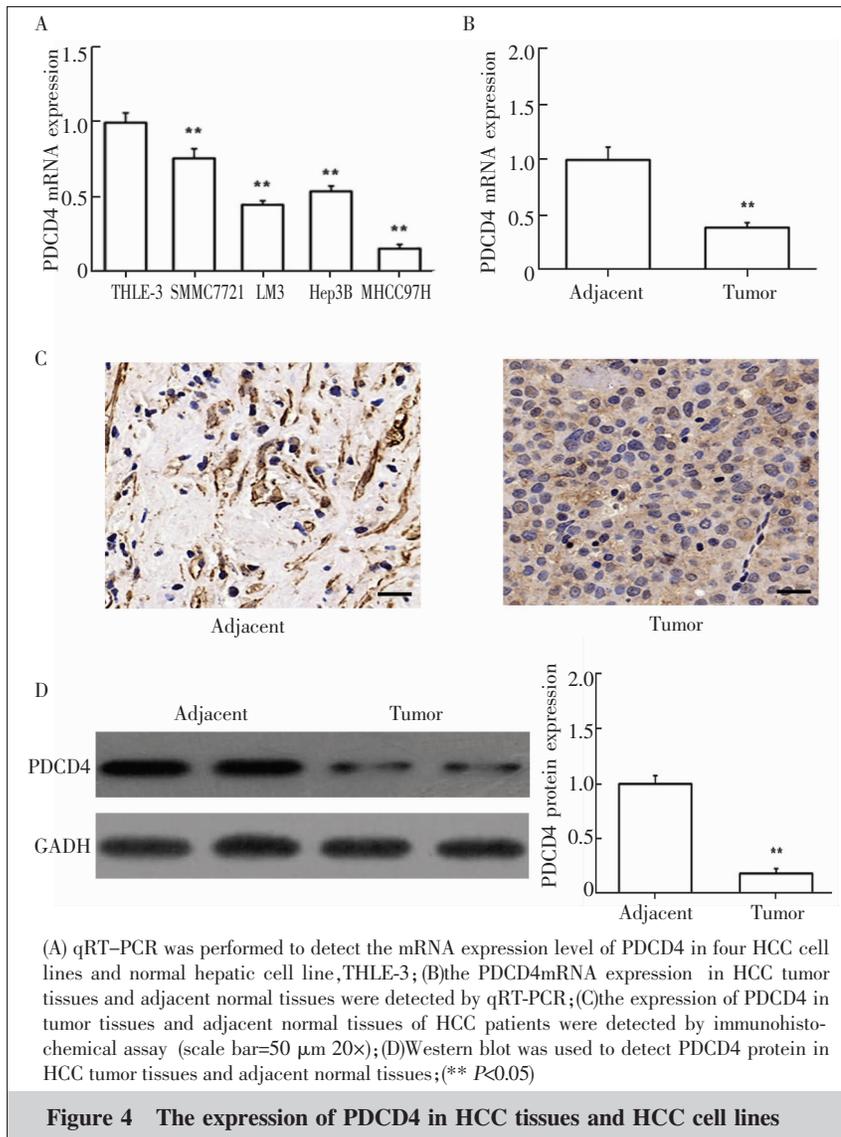
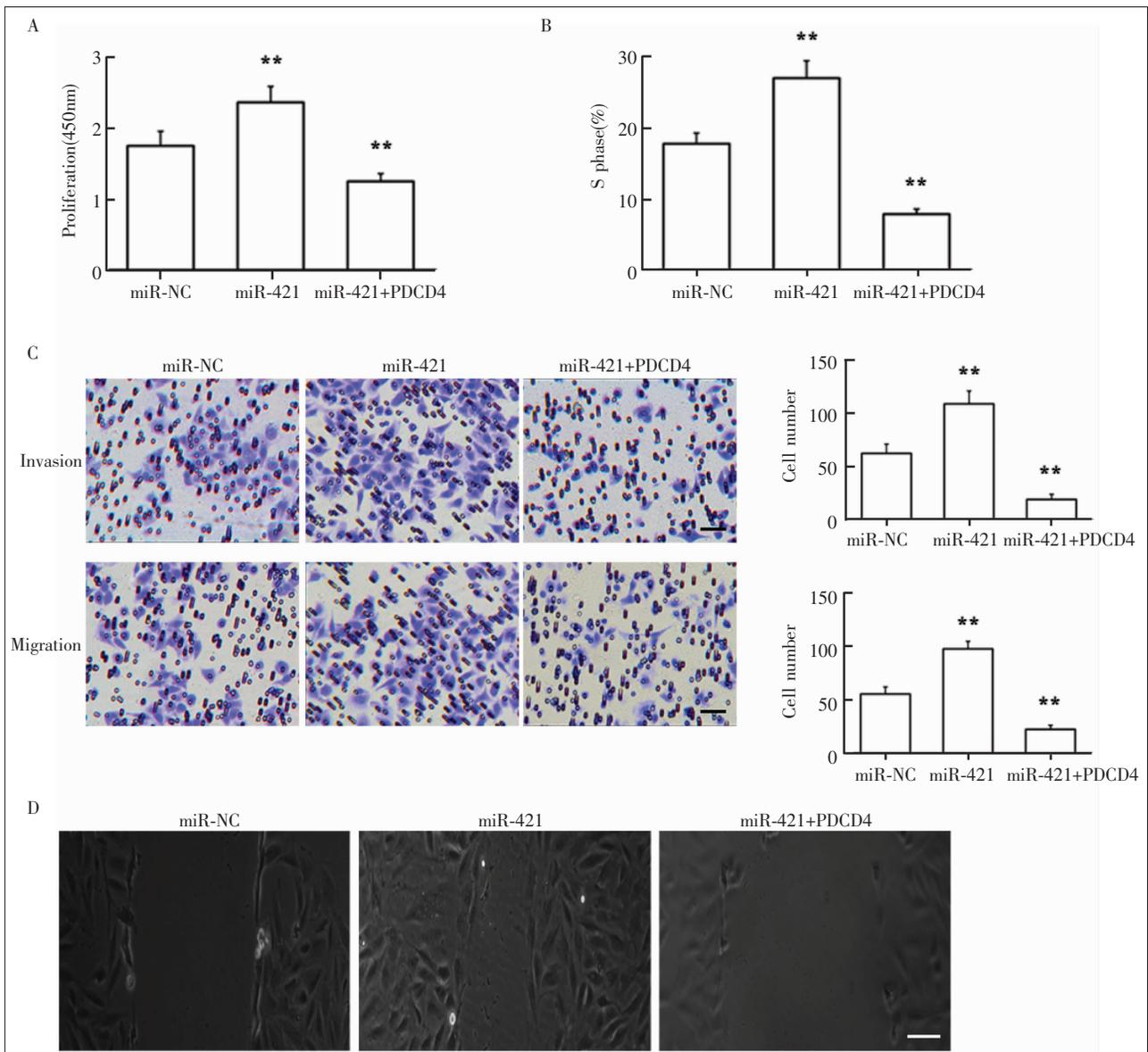


Figure 4 The expression of PDCD4 in HCC tissues and HCC cell lines



(A) The proliferation ability of MHCC97H cells was detected by CCK8 assay;(B)Flow cytometry assay was used to measure the aggregation ability in theS-phasecell fraction of MHCC97H;(C)Tranwell invasion assay was used to detect the invasionand migration ability of MHCC97Hcells(scale bar=25μm 40×);(D)the migration ability of MHCC97H cells was detected by wound healing scratch assay(scale bar= 40 μm 25×)(** P<0.05)

Figure 5 Effects of miR-421 and PDCD4 on proliferation, migration and cycle of MHCC97H with high invasion ability

研究的热点,肿瘤侵袭和迁移,作为肿瘤重要的恶性生物学行为之一,加剧了肿瘤的发展,往往影响肿瘤的最终预后,而 miRNA 分子可以通过影响细胞间的黏附、基质降解、上皮-间充质转化、血管生成等多个环节发挥作用^[19]。在本研究中我们通过一系列细胞实验发现,在 MHCC97H 细胞中单独上调 miR-421 的表达水平可促进细胞的增殖,侵袭、迁移及 S 期阻滞,但是 PDCD4 高表达能逆转 miR-421 的这些促进效果。表明 miR-421 是通过抑制 PDCD4 的表达水平

从而促进肝癌细胞的恶性生物学行为。Wang 等在乳腺癌的研究中,通过体外实验发现 miR-421 可通过靶向作用于 PDCD4 促进乳腺癌细胞的增殖、迁移、侵袭和凋亡。本研究对于 miR-421 在肝癌中的作用不仅通过体外实验进行了探讨,并进一步构建了肝癌裸鼠移植瘤模型,通过体内实验揭示 miR-421 在肝癌中扮演的角色。结果显示,过表达 miR-421 可以促进裸鼠体内肝癌细胞的增殖以及移植瘤的生长,与体外实验结果一致。进一步验证了 miR-421 在肝

癌中发挥促癌的作用。目前,尚未发现有关于 miR-421 与肝癌临床分期、预后的相关研究,仅有研究表明 miR-421 与卵巢癌、肾癌的淋巴结转移、肿瘤转移分期和预后相关^[20-21]。而 PDCD4 低表达与肿瘤分化程度降低、预后不佳有关已经得到证实^[22]。

综上所述,本研究阐明了 miR-421 和 PDCD4 在肝癌细胞株及肿瘤组织中的表达水平,揭示了 miR-421 通过靶向调控 PDCD4 的表达水平从而促进肝癌细胞的增殖、侵袭、迁移及 S 期阻滞,因此 miR-421 可能成为肝癌诊断及治疗的新靶点。

参考文献:

- [1] Qiu L,Zhang XY,Li JX. Current status and prospect of hepatocellular carcinoma therapy [J]. Academic Journal of Chinese PLA Medical School,2017,38(9):86-89. [邱乘,张欣悦,李建雄. 肝细胞癌治疗现状及展望[J].解放军医学院学报,2017,38(9):86-89.]
- [2] Yin XY,Chen D. Progress in molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma [J]. Journal of Hepatobiliary Surgery,2012,20(5):326-328. [殷晓煜,陈东. 肝细胞癌的分子靶向治疗进展 [J]. 肝胆外科杂志,2012,20(5):326-328.]
- [3] Liu Y,Ren F,Luo Y,et al. Down-regulation of MiR-193a-3p dictates deterioration of HCC;a clinical real-time qRT-PCR study[J]. Med Sci Monit,2015,21:2352-2360.
- [4] Jiang Y,Yang DQ,Wang CY,et al. Research progress on relationship between tumor-suppressing gene PDCD4 and tumor[J]. Journal of Modern Oncology,2015,(22):3363-3366. [姜艳,杨大群,王聪洋,等. 抑癌基因 PDCD4 与肿瘤关系的研究进展[J]. 现代肿瘤医学,2015,(22):3363-3366.]
- [5] Chang PL,Chambers AF. Transforming JB6 cells exhibit enhanced integrin-mediated adhesion to osteopontin [J]. J Cell Biochem,2015,78(1):8-23.
- [6] Wigington CP,Jung J,Rye EA,et al. Post-transcriptional regulation of programmed cell death 4 (PDCD4) mRNA by the RNA-binding proteins human antigen R(HuR) and T-cell intracellular antigen 1(TIA1)[J]. J Biol Chem,2015,290(6):3468-3487.
- [7] Hu LY,Xu XL,Rao HL,et al. Expression and clinical value of programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) in diffuse large B cell lymphoma;a retrospective study [J]. Chin J Cancer,2017,36(1):94.
- [8] Augello C,Colombo F,Terrasi A,et al. Expression of C19MC miRNAs in HCC associates with stem-cell features and the cancer-testis genes signature[J]. Dig Liver Dis,2018,50(6):S1590865818306674.
- [9] Lu L,Qin LX. Screening for hepatocellular carcinoma: there's a long way to go [J]. Chinese Hepatology,2017,22(5):388-389. [陆录,钦伦秀. 肝细胞癌的筛查:前路漫漫[J]. 肝脏,2017,22(5):388-389.]
- [10] Wu TM,Ma YS,Lu GX,et al. Down-regulated miR-105-1 associated with hepatocellular carcinoma patients [J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui,2017,52(4):542-545. [吴庭苗,马雨水,卢改霞,等. miR-105-1 在原发性肝细胞癌中表达的研究[J]. 安徽医科大学学报,2017,52(4):542-545.]
- [11] He F,Qin QQ,Zheng YQ,et al. Research progress of miR-338 in tumor[J]. Basic & Clinical Medicine,2018,38(6):840-844. [何芳,秦青青,郑永钦,等. miR-338 在肿瘤中的研究进展[J]. 基础医学与临床,2018,38(6):840-844.]
- [12] Braconi C,Valeri N,Gasparini P,et al. Hepatitis C virus proteins modulate microRNA expression and chemosensitivity in malignant hepatocytes [J]. Clin Cancer Res,2010,16(3):957-966.
- [13] Ladeiro Y,Couchy G,Balabaud C,et al. MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations[J]. Hepatology,2008,47(6):1955-1963.
- [14] Chen DD,Wang HL,Huang SD,et al. The clinical value of detecting four kinds of microRNA for diagnosis of hepatocellular carcinoma [J]. Anhui Medical Journal,2016,37(5):582-586. [陈丹丹,王洪流,黄顺东,等. 检测 4 种微小 RNA 对于诊断肝细胞性肝癌的价值 [J]. 安徽医学,2016,37(5):582-586.]
- [15] Zhang ZQ,Lu SM,Wang HL,et al. Expression of microRNA-222 in hepatocellular carcinoma tissue and its clinical significance [J]. Journal of Clinical Hepatology,2017,33(8):1502-1505. [张竹青,卢书明,王花丽,等. microRNA-222 在肝细胞癌组织中的表达及意义[J]. 临床肝胆病杂志,2017,33(8):1502-1505.]
- [16] Soejima H,Miyoshi O,Yoshinaga H,et al. Assignment of the programmed cell death 4 gene (PDCD4) to human chromosome band 10q24 by in situ hybridization [J]. Cytogenet Cell Genet,1999,87(1-2):113-114.
- [17] Zhen Y,Li D,Li W,et al. Reduced PDCD4 expression promotes cell growth through PI3K/Akt signaling in non-small cell lung cancer[J]. Oncol Res,2016,23(1):61-68.
- [18] Wei X,Wang W,Wang L,et al. MicroRNA-21 induces 5-fluorouracil resistance in human pancreatic cancer cells by regulating PTEN and PDCD4 [J]. Cancer Med,2016,5(4):693-702.
- [19] Huang FY,Wong KH,Seto WK,et al. Estradiol induces apoptosis via activation of miRNA-23a and p53: implication for gender difference in liver cancer development[J]. Oncotarget,2015,6(33):34941-34952.
- [20] Ren F. MicroRNA-421 Inhibites proliferation,migration and invasion through targeting KDM5A in human ovarian carcinoma[D]. Zhengzhou:Zhengzhou University,2017.[任芳.miR-421 通过靶向组蛋白赖氨酸去甲基化酶 5A 调控卵巢癌增殖、迁移和侵袭的初步研究[D]. 郑州:郑州大学,2017.]
- [21] Han CH,Cui L. Correlation between the renal cell carcinoma and relative expression of MicroRNA-421[J]. The Practical Journal of Cancer,2016,31(9):1406-1407,1411. [韩从华,崔龙. 肾癌与 MicroRNA-421 相对表达量之间的相关性 [J]. 实用癌症杂志,2016,31(9):1406-1407,1411.]
- [22] Li C,Du L,Ren Y,et al. SKP2 promotes breast cancer tumorigenesis and radiation tolerance through PDCD4 ubiquitination[J]. J Exp Clin Cancer Res,2019,38(1):76.