



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.07.009
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.07.009
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(7):963-969.

• 基础研究 •

上调 miR-101 对肝细胞癌生物学行为的影响

周密¹, 汤成泳², 张国庆¹, 谭婧宇¹, 吴忠均¹

(重庆医科大学附属第一医院 1. 肝胆外科 2. 药剂科, 重庆 400016)

摘要

目的: 探讨 miR-101 在肝细胞癌 (HCC) 细胞生物学行为的影响。

方法: 分别将 miR-101 模拟物或 miRNA 阴性对照序列转染 HepG2 和 SMMC-7721 两种 HCC 细胞, 以无处理自然生长的两种细胞为各自空白对照, 观察 miR-101 对两种细胞增殖、集落形成能力、凋亡及周期的影响, 以及对侵袭和迁移能力的影响。

结果: 与各自的空白对照细胞比较, 转染 miR-101 模拟物后的 HepG2 和 SMMC-7721 细胞的增值能力明显降低、细胞集落的形成明显减少、G₀/G₁ 期的细胞比例升高、细胞凋亡率明显增加、迁移与侵袭细胞数明显减少 (均 $P < 0.05$); 转染 miRNA 阴性对照序列对两种细胞的以上指标无明显影响 (均 $P > 0.05$)。

结论: miR-101 可能在 HCC 细胞中起到了抑癌基因的作用, 上调其表达能抑制 HCC 的恶性生物学行为。

关键词

癌, 肝细胞; 微 RNAs; 肿瘤浸润

中图分类号: R735.7

Impact of upregulating miR-101 on biological behavior of hepatocellular carcinoma

ZHOU Mi¹, TANG Chengyong², ZHANG Guoqing¹, TAN Jingyu¹, WU Zhongjun¹

(1. Department of Hepatobiliary Surgery 2. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract

Objective: To investigate the influence of miR-101 on the biological behavior of hepatocellular carcinoma (HCC) cells.

Methods: The HCC HepG2 and SMMC-7721 cells were transfected with miR-101 mimics or miRNA negative control sequences, using the two types of cells cultured without any treatment as corresponding blank control, and then the effect of miR-101 on proliferation, colony formation ability, apoptosis and cell cycle, as well as the migration and invasion ability of the two types of cells were observed.

Results: Compared with corresponding blank control, in either HepG2 or SMMC-7721 cells after transfection with miR-101 mimics, the proliferative ability was decreased, colony formation was reduced, G₀/G₁ phase cell ratio was increased, apoptosis rate was increased, and the ability of migration and invasion was reduced markedly (all $P < 0.05$); transfection of miRNA negative control sequences exerted no obvious effect on above parameters for the two types of cells (all $P > 0.05$).

Conclusion: miR-101 possibly plays a role as cancer suppressor gene in HCC cells, and upregulating its expression may suppress the malignant activity of HCC.

收稿日期: 2015-05-22; 修订日期: 2015-06-08。

作者简介: 周密, 重庆医科大学附属第一医院硕士研究生, 主要从事肝癌及其机制方面的研究。

通信作者: 吴忠均, Email: wzjtcy@126.com

Key words Carcinoma, Hepatocellular; MicroRNAs; Neoplasm Invasiveness

CLC number: R735.7

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是一种高病死率的原发性肝癌, 也是最常见原发性肝癌, 在世界范围内每年可导致超过70万人的死亡^[1]。统计分析发现, 70%~80%的HCC患者5年生存率仅为3%~5%^[2-3]。全球HCC每年新发病例约100~150万例, 其中45%发生在中国, 严重威胁着人类生命健康。HCC的发生是一个多基因参与、多步骤、多阶段的病理学过程^[4], 肝炎病毒感染、黄曲霉素、环境污染、家族遗传及化学致癌物质都是HCC的危险因素^[5-6]。这些危险因素通过沉默抑癌基因的表达和激活致癌基因的表达来影响HCC的发生发展。

microRNA (miRNA) 是一种长度约为21~25个核苷酸的内源性非编码的小分子RNA, 具有调控基因表达的功能。主要通过碱基互补配对的方式识别目标mRNA, 并且通过互补作用于目标mRNA, 以此来影响mRNA的稳定性并调节目标mRNA的翻译能力^[7-8]。近年来的一些研究报告表明miRNA的差异性表达与各种恶性肿瘤的增殖、侵袭、转移密切相关, 同时跟这些肿瘤的预后也有密切的关系。研究证实miRNA在胃癌、乳腺癌、HCC中都呈低表达状态的^[9-11]。最近, 大量研究报告表明, 一种新发现的短小的调控RNA的分子, 即miR-101与HCC的发生与发展过程密切相关, 并且有证据表明该分子可以通过模拟内源性的miRNA为HCC的治疗提供一个新的途径^[12]。在人类正常肝组织所含有的miRNA中, miR-101的表达是最引人注目的分子之一^[13], 且在人类HCC细胞中呈低表达状态^[14]。这预示着miR-101可以作为一个研究的新位点。

因此, 本研究着重阐明miR-101在HCC的发生和发展过程中的分子机制, 探寻HCC发生发展过程中的相关抑癌和致癌基因, 并以此为靶点展开生物学的功能实验研究, 以期将相关生物学的研究发现转化为药物开发和临床应用, 为预防和治疗HCC提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

HepG2和SMMC-7721细胞系均来自重

庆医科大学生科院实验室; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自Hyclon公司; 改良型RPMI1640培养基购自Gibco公司; miR-101模拟物 (microRNA-101 minics) 和miRNA阴性对照 (negative control microRNA) 购自上海吉玛基因公司; CCK-8细胞增殖检测试剂盒购自博培公司; Matrigel胶购自BD公司; Transwell小室购自Corning公司; Lipofectamine[®]2000 (Lp2000) 购自Invitrogen公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与转染 细胞培养和转染 HepG2 和 SMMC-7721 细胞系用含 10% PBS 的改良型 RPMI 1640 培养基于 37°C、5% CO₂ 条件下的细胞孵箱内培养。将细胞分为 miR-101 模拟物转染组和阴性对照组, 用脂质体 Lp2000 介导转染, 分别将终浓度为 100 nM 的 miR-101 模拟物和 miRNA 阴性对照转染到细胞内, 以无处理的 HepG2 和 SMMC-7721 细胞作为空白对照组。

1.2.2 细胞增殖实验 采用 CCK-8 法对细胞的生长率进行分析, 将上述 5×10^3 个经过转染的 HepG2 和 SMMC-7721 细胞接种于 96 孔板中, 每组设置 3 个复孔, 根据使用说明书加入 CCK-8 试剂, 孵箱内孵育细胞贴壁, 在 0、24、48、72 h 检测细胞生长情况并分别在酶标仪上 490 nm 波长下测定各孔 OD 值。

1.2.3 细胞的集落形成实验 对细胞的生长率进行分析, 将上述 1×10^3 个经过转染 48 h 后的 HepG2 和 SMMC-7721 细胞接种于 6 孔板中, 完全培养基培养 2 周。用甲醇固定细胞, 亚甲蓝染色分析细胞集落的形成。

1.2.4 细胞的周期和凋亡检测 采用流式细胞术检测细胞的周期和凋亡, 将转染 24 h 后的 HepG2 和 SMMC-7721 细胞分别用冰冷的 70% 乙醇固定, 碘化丙啶 (PI) 染色, 流式细胞仪检测细胞周期分布, 使用 Cell Quest 软件分析数据。根据说明书用 Annexin V-FITC/PI 染色细胞, 立即流式细胞仪分析。

1.2.5 细胞迁移和侵袭检测 Transwell 检测细胞迁移和侵袭实验根据说明书操作使用孔径为 8 μ m 规格的 Transwell 小室检测转染 24 h 后 HepG2 和 SMMC-7721 细胞的侵袭和迁移能力, 培养细胞 48 h 后对迁移到膜底面细胞进行结晶紫染色, 显微镜下

计数。侵袭实验小室需要加有 Matrigel 胶外, 亚甲蓝染色细胞, 其它步骤与迁移相同。

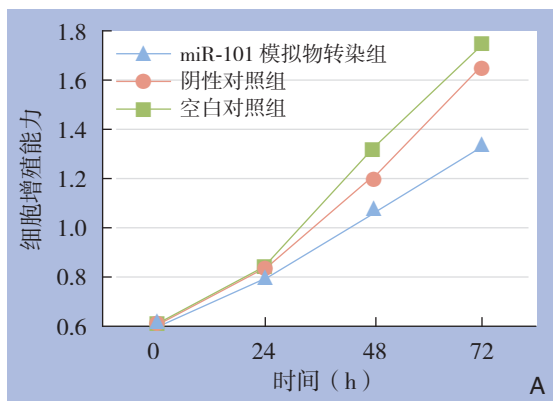
1.3 统计学处理

使用SPSS 19.0软件进行统计学分析, 实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析及LSD-*t*检验进行多组间均数的比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-101 抑制 HCC 细胞的增殖

在细胞增殖实验中, 采用CCK-8试剂盒对两



种HCC细胞的增殖能力进行评估, 实验结果分析发现转染miR-101模拟物后的HepG2和SMMC-7721细胞在24、48、72 h时OD值均低于各自的空白对照组和阴性对照组细胞, 并随时间推移差异逐渐增大, 均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 而两组阴性对照细胞在0、24、48、72 h时的细胞增殖能力没有明显改变 (均 $P > 0.05$) (图1)。

2.2 miR-101 抑制 HCC 细胞的集落形成

在细胞集落形成实验中, 转染了miR-101模拟物的HepG2和SMMC-7721细胞与各自的空白对照组和阴性对照组比较, 细胞集落的形成均明显减少 (图2)。

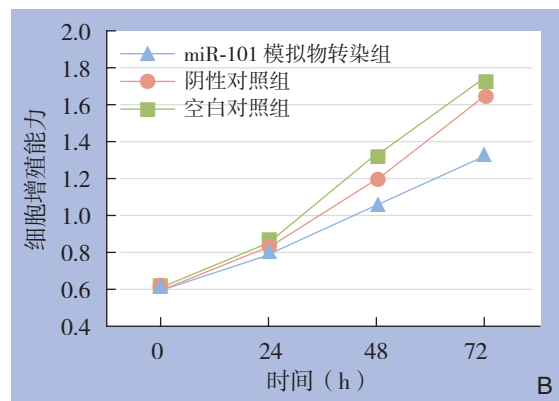


图1 细胞生长曲线 A: HepG2 细胞; B: SMMC-7721 细胞

Figure 1 Cell growth curves A: HepG2 cells; B: SMMC-772 cells

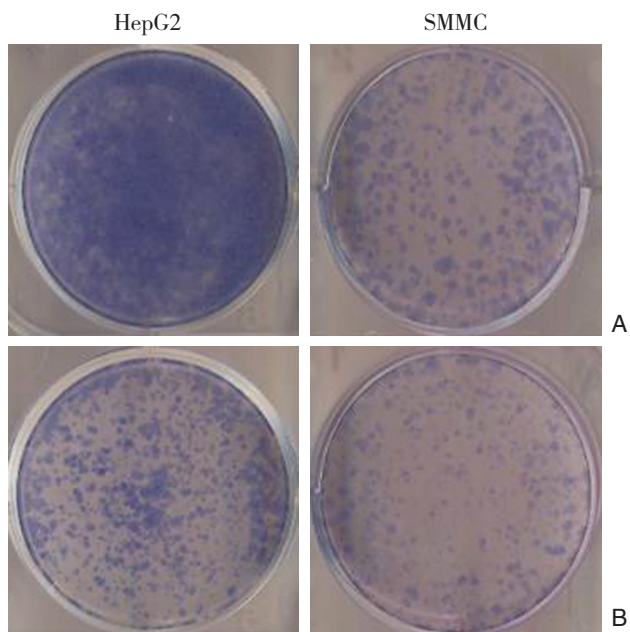


图2 细胞集落形成实验 A: 阴性对照组; B: miR-101 模拟物转染组

Figure 2 Colony formation assay A: Negative control group; B: miR-101 mimics transfection group

2.3 miR-101 诱导了 HCC 细胞的周期阻滞, 促进 HCC 细胞的凋亡

流式细胞仪分析结果显示, 转染 miR-101 模拟物的两种 HCC 细胞 G_0/G_1 期 (DNA 合成前期) 的细胞比例均高于各自的阴性对照组及空白对照组, S 期 (DNA 合成期) 的细胞比例低于各自阴性对照组及空白对照组 (均 $P < 0.05$); 转染 miR-101 模拟物后的两种 HCC 细胞凋亡率高于各自的阴性对照组及空白对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 1) (图 3)。

2.4 miR-101 抑制 HCC 细胞的迁移和侵袭

细胞迁移与侵袭实验结果显示, 转染了 miR-101 模拟物的 HepG2 和 SMMC-7721 的细胞明显少于各自的阴性对照组及空白对照组细胞, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 2) (图 4-5)。

表 1 两种 HCC 细胞的细胞周期时相分布及凋亡率 (% , $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Cell cycle distribution and apoptosis of the two types of HCC cells (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	HepG2 细胞			SMMC-7721 细胞		
	G ₀ /G ₁ 期	S 期	凋亡率	G ₀ /G ₁ 期	S 期	凋亡率
miR-101 模拟物转染组	73.65 ± 3.49 ^{1),2)}	15.36 ± 2.53 ^{1),2)}	38.37 ± 3.56 ^{1),2)}	75.62 ± 4.33 ^{1),2)}	14.20 ± 3.04 ^{1),2)}	42.73 ± 3.56 ^{1),2)}
阴性对照组	65.82 ± 2.50	24.14 ± 3.04	30.18 ± 2.58	64.21 ± 5.04	23.14 ± 3.11	34.83 ± 2.58
空白对照组	62.12 ± 3.59	25.17 ± 3.07	27.16 ± 3.07	65.30 ± 4.12	26.42 ± 2.85	29.31 ± 3.17

注: 1) 与空白对照组比较, P<0.05; 2) 与阴性对照组比较, P<0.05

Note: 1) P<0.05 vs. blank control group; 2) P<0.05 vs. negative control group

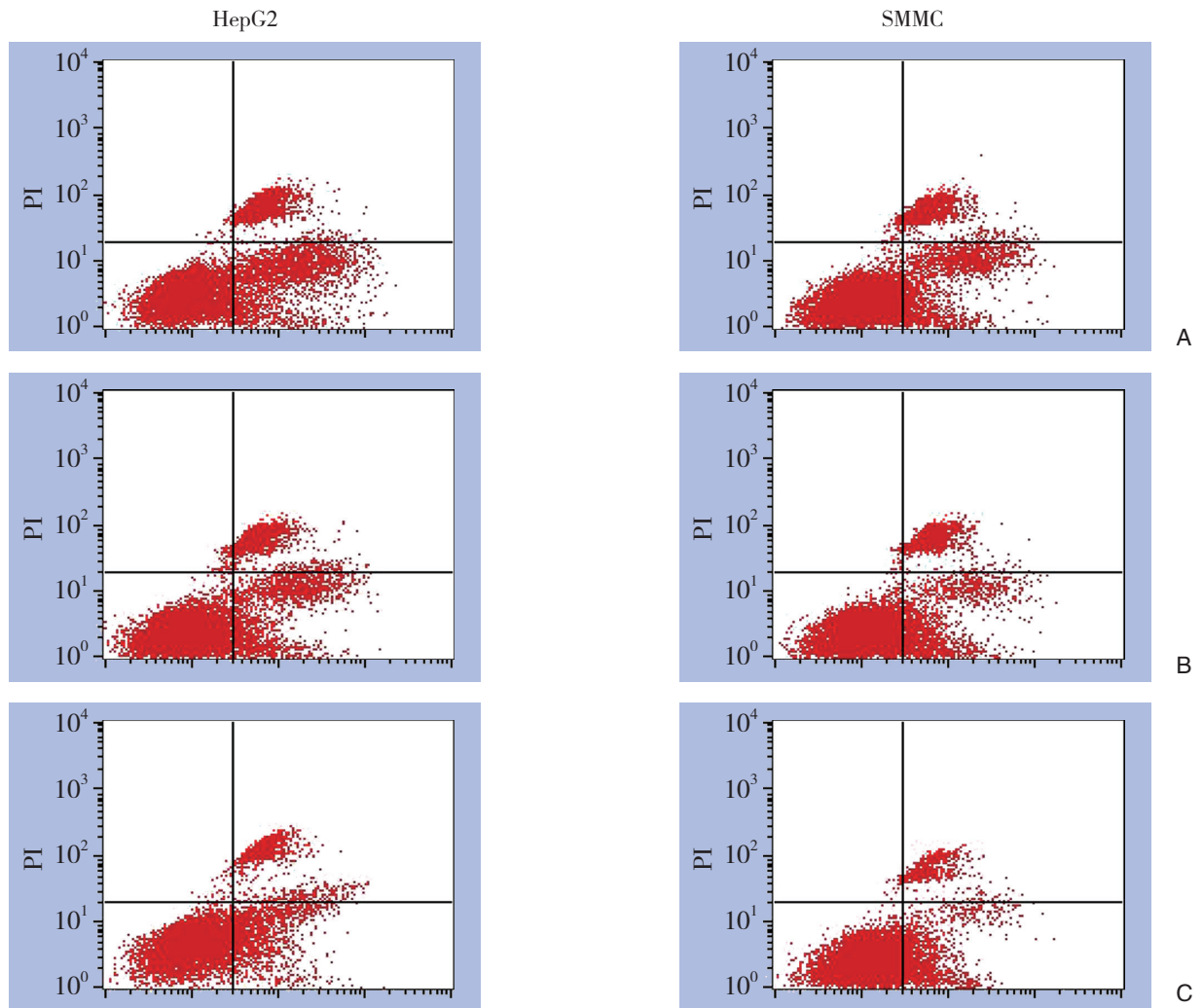


图 3 流式细胞术检测细胞凋亡 A: miR-101 模拟物转染组; B: 阴性对照组; C: 空白对照组

Figure 3 Cell apoptosis detected by flow cytometry A: miR-101 mimics transfection group; B: Negative control group; C: Blank control group

表 2 各组细胞迁移与侵袭实验平均细胞数 ($\bar{x} \pm s$, 个)

Table 2 Average cell number of migration and invasion in each group of cells ($\bar{x} \pm s$, n)

组别	HepG2 细胞		SMMC-7721 细胞	
	迁移细胞数	侵袭细胞数	迁移细胞数	侵袭细胞数
miR-101 模拟物转染组	28 ± 3 ^{1),2)}	30 ± 5 ^{1),2)}	24 ± 2 ^{1),2)}	35 ± 3 ^{1),2)}
阴性对照组	90 ± 10	41 ± 4	55 ± 4	52 ± 5
空白对照组	94 ± 12	45 ± 6	58 ± 7	55 ± 6

注: 1) 与空白对照组比较, P<0.05; 2) 与阴性对照组比较, P<0.05

Note: 1) P<0.05 vs. blank control group; 2) P<0.05 vs. negative control group

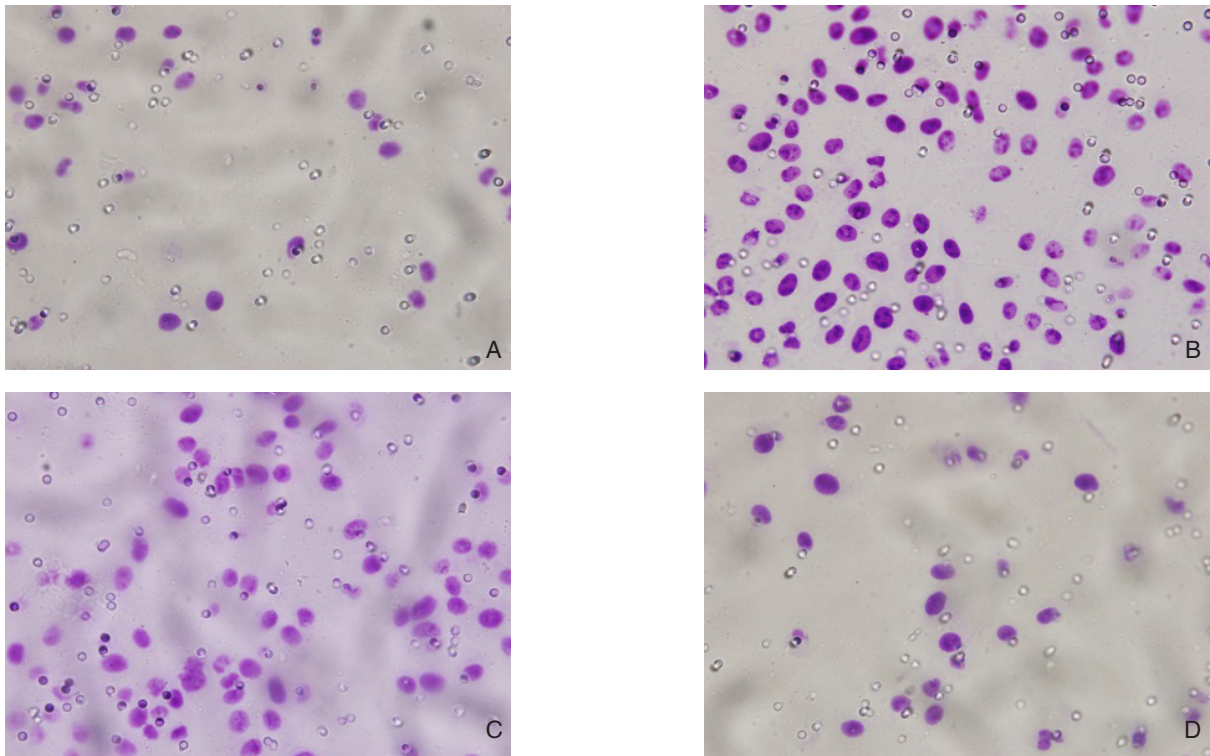


图 4 细胞迁移实验 (结晶紫染色 $\times 400$) A: miR-101 模拟物转染组 (HepG2 细胞); B: 阴性对照组 (HepG2 细胞); C: 阴性对照组 (SMMC-7721 细胞); D: miR-101 模拟物转染组 (SMMC-7721 细胞)

Figure 4 Cell migration assay (crystal violet staining $\times 400$) A: miR-101 mimics transfection group (HepG2 cells); B: Negative control group (HepG2 cells); C: miR-101 mimics transfection group (SMMC-7721 cells); D: Negative control group (SMMC-7721 cells)

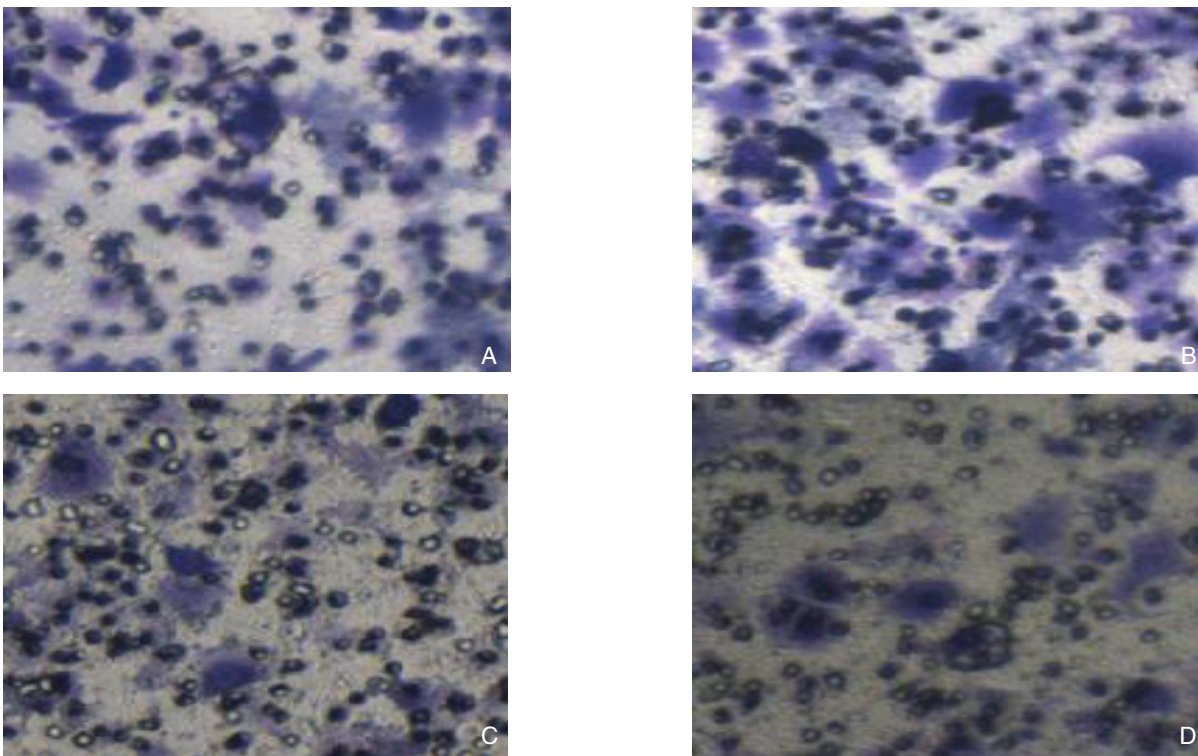


图 5 细胞侵袭实验 (亚甲蓝染色 $\times 400$) A: miR-101 模拟物转染组 (HepG2 细胞); B: 阴性对照组 (HepG2 细胞); C: 阴性对照组 (SMMC-7721 细胞); D: miR-101 模拟物转染组 (SMMC-7721 细胞)

Figure 5 Cell invasion assay (methylene blue staining $\times 400$) A: miR-101 mimics transfection group (HepG2 cells); B: Negative control group (HepG2 cells); C: miR-101 mimics transfection group (SMMC-7721 cells); D: Negative control group (SMMC-7721 cells)

3 讨论

HCC的发生发展是一个极其复杂的病理改变过程,不仅涉及到生理结构的异常改变,还涉及到基因表达的异常改变。生理结构方面,机体不能调节肿瘤细胞的生长与凋亡,其生长与凋亡不再受到限制,从而影响到正常机体的组织与器官功能。基因表达方面,致癌基因的异常激活与抑癌基因的异常失活改变了细胞的信号通路,从而引发了HCC的发生发展。到目前为止HCC的发病机制尚未完全研究清楚,因此在基因水平上探讨HCC发生过程中的相关机制意义重大。

最新的研究^[15-16]发现,miRNA是一个重要的转录后基因表达调节分子,可以调节肿瘤细胞一系列的生理和病理过程。最新研究发现miRNA的低表达与高表达与人类的一些肿瘤发生密切相关,如乳腺癌、肺癌、结肠癌、肝癌、胃癌、卵巢癌、前列腺癌、多形性细胞瘤、急性淋巴细胞白血病等,miRNA在上述肿瘤的形成过程中发挥了一个致癌或者抑癌基因的作用^[17-18]。也有研究^[19-20]表明miRNA的低表达与HCC的形成和发展也有密切关系。

在人类的大部分恶性肿瘤中,miR-101是否仅仅充当了一个抑癌基因的作用目前还存在争议^[21]。但在食管癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌发生过程中,miR-101起到一个抑癌基因的作用^[22],它可以识别并直接调节靶基因的表达从而影响肿瘤的形成和发展。此前相关研究报告中指出了miR-101在HCC细胞和HCC组织中呈低表达状态。本研究结果表明,通过介导miR-101的过表达抑制了HCC细胞的增殖。在肝癌细胞中,过表达的miR-101也减少了细胞的集落形成,抑制了细胞的迁移和侵袭,并诱导HCC细胞在细胞周期的阻滞和凋亡。此外还有学者^[23]提出,miR-101的低表达与HCC患者术后高复发和预后差密切相关。这些发现都表明在HCC的发生过程中miR-101的作用是至关重要的。

大多数HCC患者在发现和确诊时已经处于中晚期,肿瘤已经发生了肝内或者肝外转移,失去了肝切除或肝移植的机会,所以临床上寻找出一个全新治疗HCC的途径仍是一个巨大的挑战。为此,把miR-101作为干预治疗的一个新的靶点

是一个全新的方向。过往的研究^[24]发现6个HCC细胞系里面miRNA-101的表达都是降低的,在正常肝组织、癌旁组织、HCC组织中miRNA-101的表达是依次降低的。因此,本研究采用HepG2和SMMC-7721两种HCC细胞验证miR-101与HCC之间的相互关系。通过表观遗传学程序重新引入的miRNA-101可能将肿瘤细胞恢复到一个正常的生理状态,这种方法可能对肿瘤有较好的治疗效果。miRNA-101是长度为22个核苷酸的内源性的非编码RNA^[25],其稳定性水平、表观遗传修饰、转录和加工是可以被控制的,所以研究开发与miR-101相关的基因药物理论上是可行的^[26]。

本研究发现miR-101具有抑制HCC细胞的作用,但上游基因对miR-101表达调控的作用以及miR-101作用于下游靶基因从而影响HCC发生发展的分子机制仍需要我们的进一步研究。从表观遗传学的观点来说,DNA甲基化、基因沉默、RNA编辑是否调节miR-101的表达也需要进一步去探索。但是,本研究发现,miR-101在体外实验中可以抑制HCC细胞的生长,这可能成为治疗HCC新途径的理论依据。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2):69-90.
- [2] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12):2893-2917.
- [3] Shariff MI, Cox IJ, Goma AI, et al. Hepatocellular carcinoma: current trends in worldwide epidemiology, risk factors, diagnosis and therapeutics[J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2009, 3(4):353-367.
- [4] Venook AP, Papandreou C, Furuse J, et al. The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective[J]. *Oncologist*, 2010, 15(Suppl 4):5-13.
- [5] Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences[J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(11):1118-1129.
- [6] Liu Y, Wu F. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment[J]. *Environ Health Perspect*, 2010, 118(6):818-824.
- [7] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2):281-297.
- [8] Rigoutsos I. New tricks for animal microRNAs: targeting of amino acid coding regions at conserved and nonconserved sites[J]. *Cancer*

- Res, 2009, 69(8):3245-3248.
- [9] He XP, Shao Y, Li XL, et al. Downregulation of miR-101 in gastric cancer correlates with cyclooxygenase-2 overexpression and tumor growth[J]. FEBS J, 2012, 279(22):4201-4212.
- [10] Wang R, Wang HB, Hao CJ, et al. MiR-101 is involved in human breast carcinogenesis by targeting Stathmin1[J]. PLoS One, 2012, 7(10):e46173. doi: 10.1371/journal.pone.0046173.
- [11] Sheng Y, Li J, Zou C, et al. Downregulation of miR-101-3p by hepatitis B virus promotes proliferation and migration of hepatocellular carcinoma cells by targeting Rab5a[J]. Arch Virol, 2014, 159(9):2397-2410.
- [12] Di Leva G and Croce CM. Roles of small RNAs in tumor formation[J]. Trends Mol Med, 2010, 16(6):257-267.
- [13] Hou J, Lin L, Zhou W, et al. Identification of miRNomes in human liver and hepatocellular carcinoma reveals miR-199a/b-3p as therapeutic target for hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Cell, 2011, 19(2):232-243.
- [14] Su H, Yang JR, Xu T, et al. MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity[J]. Cancer Res, 2009, 69(3):1135-1142.
- [15] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. Nature, 2005, 435(7043):834-838.
- [16] Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(7):2257-2261.
- [17] Jiang J, Gusev Y, Aderca I, et al. Association of microRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(2):419-427.
- [18] Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis[J]. Cancer Cell, 2006, 9(3):189-198.
- [19] Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer[J]. Cancer Res, 2005, 65(16):7065-7070.
- [20] Lui WO, Pourmand N, Patterson BK, et al. Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer[J]. Cancer Res, 2007, 67(13):6031-6043.
- [21] Iorio MV, Visone R, Di Leva G, et al. MicroRNA signatures in human ovarian cancer[J]. Cancer Res, 2007, 67(18):8699-8707.
- [22] Wei X, Xiang T, Ren G, et al. miR-101 is down-regulated by the hepatitis B virus x protein and induces aberrant DNA methylation by targeting DNA methyltransferase 3A[J]. Cell Signal, 2013, 25(2):439-446.
- [23] Budhu A, Jia HL, Forgues M, et al. Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2008, 47(3):897-907.
- [24] Su H, Yang JR, Xu T, et al. MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity[J]. Cancer Res, 2009, 69(3):1135-1142.
- [25] Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, et al. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs[J]. Genes Dev, 2002, 16(6):720-728.
- [26] Tili E, Michaille JJ, Gandhi V, et al. miRNAs and their potential for use against cancer and other diseases[J]. Future Oncol, 2007, 3(5):521-537.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 周密, 汤成泳, 张国庆, 等. 上调miR-101对肝细胞癌生物学行为的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(7):963-969. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.07.009

Cite this article as: ZHOU M, TANG CY, ZHANG GQ, et al. Impact of upregulating miR-101 on biological behavior of hepatocellular carcinoma[J]. Chin J Gen Surg, 2015, 24(7):963-969. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.07.009

本刊 2015 年下半年各期重点内容安排

本刊 2015 年下半年各期重点内容安排如下, 欢迎赐稿。

第 7 期 肝脏肿瘤基础与临床研究

第 8 期 胆道疾病及胆道外科

第 9 期 胰腺肿瘤及胰腺外科

第 10 期 消化道肿瘤及胃肠外科疾病

第 11 期 乳腺、甲状腺疾病外科治疗及内分泌外科

第 12 期 血管外科及其他

中国普通外科杂志编辑部