



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2020.01.006
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2020.01.006
Chinese Journal of General Surgery, 2020, 29(1):43-52.

· 基础研究 ·

microRNA-671-5p 在肝细胞癌中的表达及其负向调控 丝切蛋白 2 与上皮细胞 - 间质转化的关系

李亚昭¹, 姚博文², 石磊²

(西安交通大学第一附属医院 1. 转化医学中心 2. 肝胆外科, 陕西 西安 710061)

摘要

背景与目的: 近年研究发现, microRNA-671-5p (miR-671-5p) 参与了多种恶性肿瘤的发生发展, 同时与多种病毒介导的肝损伤相关, 但其与肝细胞癌 (HCC) 之间的关系目前仍未见报道。本研究的目的是为观察 miR-671-5p 在 HCC 中的表达情况, 分析其功能及其与 HCC 生物学行为及临床病理特征的联系, 并初步探讨作用机制。

方法: 用 qRT-PCR 检测 80 例 HCC 组织及癌旁组织样本、不同 HCC 细胞系 (Hep3B、MHCC-97H、HepG2、SMMC-7721) 及人正常肝细胞 (L02) 中 miR-671-5p 的表达, 且在同时分析 TCGA 数据库中 miR-671-5p 在 HCC 组织与癌旁组织的表达差异。分析 miR-671-5p 表达量与临床病理因素的关系; 用 miR-671-5p 抑制物敲低 MHCC-97H 细胞系中 miR-671-5p 的表后, 分别采用 CCK-8 实验及 Transwell 实验分别检测 HCC 细胞转染 miR-671-5p 抑制物后增殖、侵袭及迁移能力的变化。利用 TargetScan 及 Starbase 网站预测 miR-671-5p 的靶基因, 并通过 Western blot、双荧光素酶实验及 TCGA 数据库分析验证。用 Western blot 观察降低 miR-671-5p 表达对 HCC 细胞中 miR-671-5p 靶基因及上皮细胞 - 间质转化 (EMT) 相关蛋白 (E-cadherin、N-cadherin、vimentin) 表达的影响, 以及在此基础上同时敲低靶基因的表达后, 以上蛋白表达的变化。

结果: miR-671-5p 的表达在 HCC 组织中明显高于其癌旁组织, 在各种 HCC 细胞系中均明显高于正常肝细胞, 且随着样本肿瘤分期与 HCC 细胞的侵袭力的增加而升高 (均 $P < 0.05$); TCGA 数据库分析也显示, miR-671-5p 在 HCC 组织中的表达量明显高于癌旁组织 ($P < 0.05$)。miR-671-5p 的表达水平与 AFP 水平、肿瘤数目、静脉侵犯、Edmondson-Steiner 分级及 TNM 分期明显有关 (均 $P < 0.05$)。转染 miR-671-5p 抑制物后, MHCC-97H 细胞的增殖、侵袭及迁移能力均明显降低 (均 $P < 0.05$)。生物信息学分析及双荧光素酶实验均显示丝切蛋白 2 (CFL2) 是 miR-671-5p 潜在靶基因, TCGA 数据库分析也显示 miR-671-5p 与 CFL2 的表达呈负相关 (均 $P < 0.05$)。降低 MHCC-97H 细胞中 miR-671-5p 的表达后, CFL2 蛋白的表达水平升高, 同时 EMT 相关蛋白表达明显降低 (均 $P < 0.05$), 但同时干扰 CFL2 的表达后, 以上变化均有明显程度的逆转 (均 $P < 0.05$)。

结论: miR-671-5p 在 HCC 中表达上调, 且与 HCC 的不良临床病理特征密切相关。miR-671-5p 可促进 HCC 细胞的增殖、侵袭、迁移, 其机制可能与抑制 CFL2 的表达而促进 EMT 发生有关。

关键词

癌, 肝细胞; 微 RNA-671-5p; 丝切蛋白 2; 上皮 - 间质转化

中图分类号: R735.7

基金项目: 陕西省科学技术研究发展计划基金资助项目 (S2015YFSF0507)。

收稿日期: 2019-08-02; **修订日期:** 2019-12-20。

作者简介: 李亚昭, 西安交通大学第一附属医院硕士研究生, 主要从事肿瘤相关分子机制方面的研究。

通信作者: 石磊, Email: 1215448013@qq.com

Expression of microRNA-671-5p in hepatocellular carcinoma and the relationship between its negative regulating coflin 2 and epithelial-mesenchymal transition

LI Yazhao¹, YAO Bowen², SHI Lei²

(1. Center for Translational Medicine 2. Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital of Xian Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061, China)

Abstract

Background and Aims: Recent investigations demonstrated that microRNA-671-5p (miR-671-5p) participates in the occurrence and development of several types of cancer, and is associated with the liver injury induced by various types of virus. However, the role of miR-671-5p in hepatocellular carcinoma (HCC) has not yet been reported to date. This study was conducted to observe the miR-671-5p expression in HCC, analyze its function and its association with the biological behaviors and clinicopathologic features of HCC, and preliminarily investigate the possible mechanism.

Methods: The miR-671-5p expressions in 80 paired specimens of HCC and tumor adjacent tissue as well as different HCC cell lines (Hep3B, MHCC-97H, HepG2 and SMMC-7721) and normal human hepatic cell line (L02) were determined by qRT-PCR method, and meanwhile, the expression difference in miR-671-5p between HCC tissue and tumor adjacent tissue were analyzed in TCGA database. The relations of miR-671-5p expression level with the clinicopathologic factors were analyzed. In MHCC-97H cells after knockdown of miR-671-5p expression by transfection with miR-671-5p inhibitors, the changes in proliferative and invasion/migration abilities were examined by CCK-8 assay and Transwell assay, respectively. The target genes of miR-671-5p were predicted by using the TargetScan and Starbase online websites, and then verified by Western blot, dual luciferase assay and TCGA database analysis, respectively. The influences of miR-671-5p knockdown on the expressions of target gene of miR-671-5p and the proteins (E-cadherin, N-cadherin and vimentin) associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT) in MHCC-97H cells, as well as the changes in expressions of above proteins upon the same condition with the synchronous knockdown of the target gene were detected by Western blot.

Results: The miR-671-5p expressions in HCC tissue and all studied HCC cell lines were significantly higher than that in tumor adjacent tissue or the normal hepatic cell line, and was increased with the elevation of the tumor stage of the sample and invasion ability of the HCC cells (all $P < 0.05$); the TCGA database analysis also showed that the miR-671-5p expression level in HCC tissue was significantly higher than that in tumor adjacent tissue ($P < 0.05$). The miR-671-5p expression level was significantly related to AFP level, tumor number, venous invasion, Edmondson-Steiner grade and TNM stage (all $P < 0.05$). In MHCC-97H cells after transfected with miR-671-5p inhibitors, the proliferative, invasion and migration abilities were all significantly reduced (all $P < 0.05$). Bioinformatics analysis and dual luciferase assay suggested that coflin 2 (CFL2) was the potential target gene of miR-671-5p, and the TCGA database analysis also showed that there was a negative correlation between miR-671-5p expression and CFL2 expression ($P < 0.05$). In MHCC-97H cells with down-regulated miR-671-5p expression, the CFL2 expression was significantly increased and the expressions of EMT-associated proteins were significantly decreased (all $P < 0.05$), but all these changes were reversed to significant extents by synchronous interference of the CFL2 expression (all $P < 0.05$).

Conclusion: The miR-671-5p expression is up-regulated in HCC, which is closely associated with the unfavorable clinicopathologic features of HCC. MiR-671-5p can promote the proliferation, invasion and migration of HCC cells, and the mechanism may be probably related to its down-regulating CFL2 expression and thereby promote EMT process.

Key words

Carcinoma, Hepatocellular; MicroRNA-671-5p; Coflin 2; Epithelial-Mesenchymal Transition

CLC number: R735.7

肝细胞癌(HCC)是目前世界范围内公认的第三大恶性肿瘤,且具有极高的致死率,预后情况极不乐观^[1-3]。目前HCC的诊断治疗方法已经逐渐完善,但是对其发生发展的机制研究仍是国际研究热点。通过对侵袭转移的分子机制的研究,或有望对HCC的早期诊断及治疗产生指导作用。microRNA(miRNA)的发现开创了新一代了解肝细胞癌致癌作用的研究方向。miRNA是一种小的非编码RNA,能够通过切割靶信使RNA或抑制靶基因翻译的方式来抑制靶基因的表达^[4-6]。许多microRNA(如:miR-149、miR-107、miR-608)^[7-9]都已经成为HCC中相关发病机制的研究靶点。

近年来,HCC相关的miRNA研究仍为热点,机制研究表明:miRNA既能够在肿瘤中发挥促癌作用(包括促进瘤体增殖、侵袭播散及肺转移)又可发挥抑癌作用(包括促进凋亡、抑制细胞增殖,抑制细胞迁移)。目前已有报道显示,miR-671-5p能够介导胃癌、胶质瘤、黑色素瘤等恶性肿瘤的发生发展,同时与手足口病病毒、EB病毒(Epstein-Barr virus,EBV)感染及乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)介导的肝损伤相关^[10-15],但其与HCC之间的具体关系目前仍未见报道。因此,本研究的核心在于分析在HCC发生时miR-671-5p表达水平的变化,并探究其与HCC临床病理学特征的相关性,进而探究miR-671-5p对HCC生物学行为的影响,并初步探索其下游潜在靶点及分子作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂和器材

细胞培养基DMEM购自Gibco公司;Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis Kit购自TaKaRa公司;青、链霉素购自美国sigma公司;Matrigel基质胶购自美国BD公司;胎牛血清购自Gibco公司;miR-671-5p模拟物和模拟物对照序列、miR-671-5p抑制物和抑制物对照序列均购自上海GenePharma公司,miR-671-5p模拟物(5'-AGG AAG CCC UGG AGG GGC UGG AG-3'),miR-671-5p抑制物(5'-CUC CAG CCC CUC CAG GGC UUC CU-3');FastStart Universal SYBR Green Master购自罗氏公司;miR-671-5p及U6引物序列购于吉凯基因;所用抗体E-cadherin(14472S)、N-cadherin(13116S)、vimentin(5741S)均购

自CST公司;CFL2(ab96678)购自abcam公司; β -actin(sc-47778)购自Santa公司;CCK-8试剂盒购自日本同仁;CFL2所用小干扰RNA购自百奥迈科公司;双荧光素酶报告试剂盒购自Promega;lipo2000购自赛默飞公司;细胞培养相关耗材均购自美国Corning公司。

1.2 标本收集

相关临床肝脏组织标本,均来源于2011年1月—2013年12月期间在本院行根治性切除术的HCC患者,且所有样品均经术后病理诊断确诊为HCC。临床标本共计80例(男51例,女29例);年龄分布为35~72岁,平均年龄为49.8岁,且在手术之前均未接受任何非手术相关治疗。所涉及的每例患者都具有完整病例资料和病理诊断。术中采集癌组织与癌旁组织(距肿瘤边缘>1cm)后,将组织标本迅速液氮冷冻后,转入-80℃保存。本研究已取得所有相关患者知情同意及西安交通大学第一附属医院伦理委员会批准。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养及转染 人HCC细胞系Hep3B、HepG2、SMMC-7721、MHCC-97H以及人正常肝细胞L02均在上海复旦大学中山医院肝癌研究所进行购买。将添加过双抗(100 U/mL青霉素与100 g/mL链霉素)以及10%胎牛血清的DMEM细胞培养液用于细胞培养。将细胞培养皿置于恒温密闭培养箱(37℃、5%CO₂)内进行培养。于转染前24h胰酶消化并计数后接种于6孔板。每孔细胞数为 1.5×10^5 个,使细胞密度达到60%。按照Lipofectamine 2000说明书在6孔板接种的肿瘤细胞中,使用miR-671-5p模拟物/抑制物及其对照进行转染,且每孔转染量均为30 pmol。通过使用转染小干扰RNA采用相同方式对CFL2进行低表达,每孔小干扰RNA的转染量为10 μ L。

1.3.2 RNA提取及qRT-PCR检测 使用TRIzol Reagent提取组织和细胞中的总RNA,并按照说明书进行逆转录,然后应用FastStart Universal SYBR Green Master操作说明进行qRT-PCR检测。检测miRNA表达时以U6作为内参,检测mRNA表达量时以 β -actin作为内参,利用SPSS 19.0软件进行基于 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法的数据统计分析。

1.3.3 CCK-8细胞活力检测实验 对数期生长细胞,分别转染miR-671-5p抑制物及抑制物对照序列后,进行细胞计数并调整其浓度至 1×10^4 个/mL后,向96孔板内每孔加入100 μ L(1×10^3 个/孔),每

孔设置5个复孔, 5% CO₂, 37 °C培养贴壁后, 分别于0、24、48、72 h向每孔加入10 μL CCK-8溶液, 继续培养0.5 h。将酶联免疫检测仪设置为采集OD450 nm处的吸光值, 使用空白对照调零后, 进行实验孔的吸光值采集, 并重复3次。

1.3.4 Transwell 小室实验 将经过处理的细胞消化并重悬, 调整其细胞悬液浓度为1~2 × 10⁵ 个/mL后, 向每个小室中加入100 μL细胞悬液(其中用于侵袭实验的小室已提前进行Matrigel胶孵育包被), 向小室外的孔中加入500 μL的完全培养基。细胞培养箱中培养12 h后, 将小室在无菌的超净工作台中取出, 95%乙醇溶液固定15 min, 使用0.1%结晶紫染色10 min后, 使用PBS溶液洗去浮色并自然风干。将小室放置于载玻片上并使用倒置显微镜拍摄后计数(100倍下随机选取6个视野, 并重复3次)。

1.3.5 Western blot 按照RIPA(强)试剂盒说明书提取组织及细胞内的蛋白, 经BCA蛋白定量后。用SDS-PAGE试剂盒配制10%分离胶后进行上样(每孔总蛋白量为50 μg), 使用湿转膜仪将蛋白转印至PVDF膜上。50 g/L脱脂牛奶封闭4 h, 加PBS稀释的CFL2一抗(1:500)、E-cadherin一抗(1:400)、N-cadherin一抗、vimentin一抗及β-actin一抗(1:2 000), 抗体孵育盒置于4 °C冰箱孵育14 h; TBST洗膜4次且总时长为30 min, 加HRP标记的二抗(抗兔或抗小鼠, 稀释比为1:10 000), 室温孵育3 h; 二抗孵育结束后, 继续TBST洗膜4次且总时长为30 min后, 使用超敏ECL发光试剂盒显影并进行灰度扫描后的半定量分析。

1.3.6 双荧光素酶实验 PCR扩增丝切蛋白2

(CFL2)-3'UTR-WT(野生型)和CFL2-3'UTR-MUT(突变型)序列, 将扩增后的序列分别转入重组质粒中; 构建好的重组质粒分别与miR-671-5p模拟物共同转染Hep3B细胞, 48 h后收集细胞, 严格按照说明书操作实验。最后通过发光化学仪检测萤火虫及海肾荧光表达量数值的比值。

1.3.7 生物信息学分析 从TCGA数据库(<https://cancergenome.nih.gov>)下载HCC患者的基因表达数据, 分析miR-671-5p在HCC组织与癌旁组织的表达差异, 以及miR-671-5p表达状态与预测所得靶基因表达的相关性。利用TargetScan(www.targetscan.org)与Starbase(<https://www.starbasegame.com>)分析miR-671-5p的结合位点。

1.4 统计学处理

采用SPSS 19.0软件包分析数据, 数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用t检验, P<0.05有统计学意义。

2 结果

2.1 miRNA-671-5p在HCC及癌旁组织中的表达

80对临床样本中, HCC组织中miR-671-5p的相对表达量为2.531 0 ± 0.034 9, 癌旁组织为0.384 8 ± 0.024 8, 差异有统计学意义(P<0.001)(图1A)。进一步检测不同肿瘤的TNM分期的组织中miR-671-5p的相对表达量, 其中早期(1~2期)的病例数为62例, 中晚期(3~4期)病例数为18例, 两组的相对miRNA表达量差异有统计学意义(P<0.05)(图1B)。

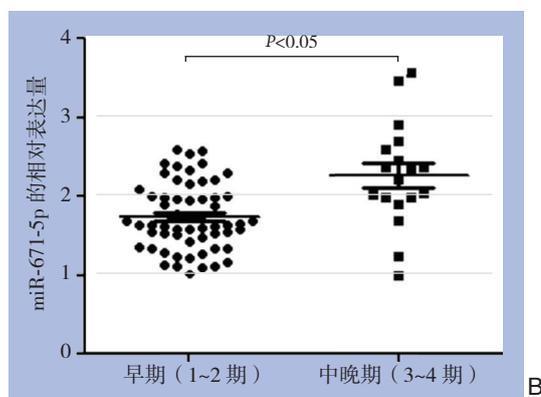
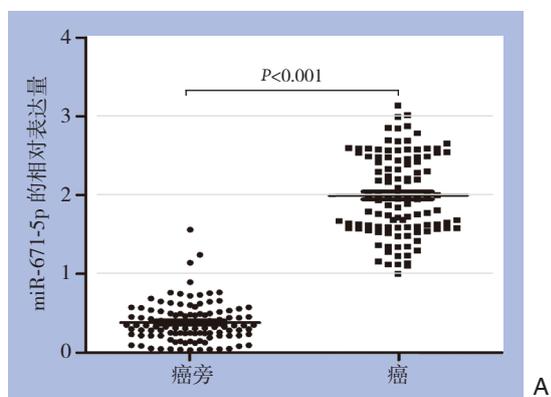


图1 qRT-PCR检测miR-671-5p表达

Figure 1 The expressions miR-671-5p detected by qRT-PCR

A: HCC与癌旁组织; B: 不同分期HCC组织

A: HCC and tumor adjacent tissue; B: HCC tissues of different stages

经生物信息软件对 TCGA 大样本数据库同步预测分析, 发现数据库中所提供的 miR-671-5p 表达量情况也为 HCC 组织的表达量明显高于正常组织 ($P < 0.001$) (图 2)。

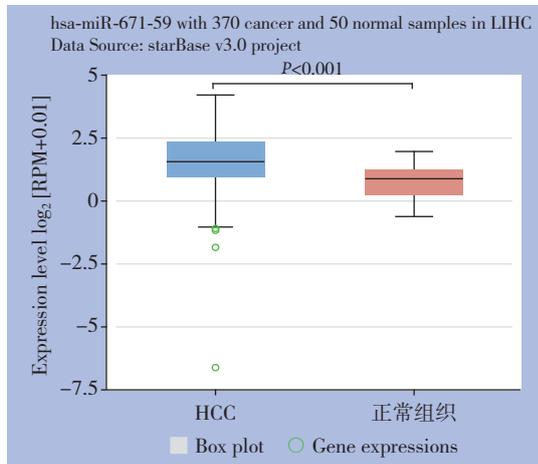


图 2 TCGA 数据库中 miR-671-5p 在 HCC 及正常组织中的表达水平

Figure 2 The expression levels of miR-671-5p in HCC tissues and tumor adjacent tissues in TCGA database

2.2 miR-671-5p 与 HCC 临床病理因素的关系

以 80 例 HCC 的 miR-671-5p 平均表达值 (1.995) 为标准, 将 miRNA-671-5p 的含量分为高表达组和低表达组, 其中高表达组 42 例, 低表达组 38 例。经分析结果显示, miR-671-5p 的表达水平与 AFP 水平、肿瘤数目、静脉侵犯、Edmondson-Steiner 分级及 TNM 分期明显有关 (均 $P < 0.05$), 而与性别、年龄、HBV 等指标无关 (均 $P > 0.05$) (表 1)。

2.3 miR-671-5p 在 HCC 细胞系中的表达情况

通过 qRT-PCR 检测 HCC 细胞系 Hep3B、MHCC-97H、HepG2、SMMC-7721 和人正常肝细胞 L02 中 miR-671-5p 的表达水平。实验结果显示, 与 L02 细胞比较, miR-671-5p 在 HCC 细胞系中的表达均明显升高, 其中高转移性的 MHCC-97H 细胞系中 miR-671-5p 升高最为明显 (均 $P < 0.05$), 因此选择在 MHCC-97H 细胞系中敲低 miR-671-5p 进行后续试验 (图 3)。

2.4 转染效率检测及 miR-671-5p 的表达对 HCC 细胞增殖的影响

为了明确 miR-671-5p 对细胞增殖的影响, 使用 miR-671-5p 抑制物敲低 MHCC-97H 内的 miR-671-5p 的表达量, 通过 qRT-PCR 实验检测其敲低效率, 结果显示, 敲低后 miR-671-5p 的表达明显降低 ($P < 0.01$) (图 4)。在不同时间点, 利用

CCK-8 法检测 OD450 nm 处经转染 miR-671-5p 抑制物或后抑制物对照序列的 MHCC-97H 细胞的增殖能力。结果显示, 经 48 h 转染的 miR-671-5p 抑制物的 MHCC-97H 细胞增殖能力与对照组相比明显下降 ($P < 0.01$) (图 5)。

表 1 miR-671-5p 与 HCC 临床病理特征之间的关系 [n (%)]
Table 1 Relations of miR-671-5p expression with clinicopathologic characteristics of HCC [n (%)]

因素	n	低表达 (n=38)	高表达 (n=42)	P
年龄 (岁)				
< 45	33	15 (39.5)	18 (42.9)	0.556
≥ 45	47	23 (60.5)	24 (57.1)	
性别				
男	51	24 (63.2)	27 (64.3)	0.752
女	29	14 (36.8)	15 (35.7)	
HBV				
阴性	32	20 (52.6)	12 (28.6)	0.052
阳性	48	18 (47.4)	30 (71.4)	
血清 AFP 水平 (μg/L)				
< 400	24	17 (44.7)	7 (16.7)	0.046
≥ 400	56	21 (55.3)	35 (83.3)	
肿瘤大小 (cm)				
< 5	56	28 (73.7)	28 (66.7)	0.096
≥ 5	24	10 (26.3)	14 (33.3)	
肿瘤数				
1	45	28 (73.7)	17 (40.5)	0.044
≥ 2	35	10 (26.3)	25 (59.5)	
肝硬化				
无	33	12 (31.6)	21 (50.0)	0.115
有	47	26 (68.4)	21 (50.0)	
静脉浸润				
无	24	20 (52.6)	4 (9.5)	0.028
有	56	18 (47.4)	38 (90.5)	
Edmondson-Steiner 分级				
I+II	45	28 (73.7)	17 (40.5)	0.006
III+IV	35	10 (26.3)	25 (59.5)	
TNM 分期				
I+II	62	34 (89.5)	28 (66.7)	0.001
III+IV	18	4 (10.5)	14 (33.3)	

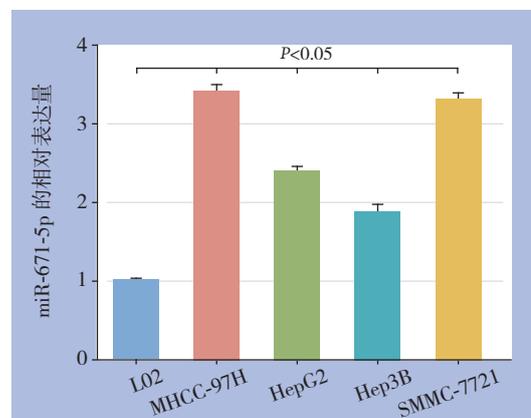


图 3 miR-671-5p 在 HCC 细胞系与正常肝细胞系中的表达
Figure 3 The expressions of miR-671-5p in HCC cell lines and normal hepatic cell line

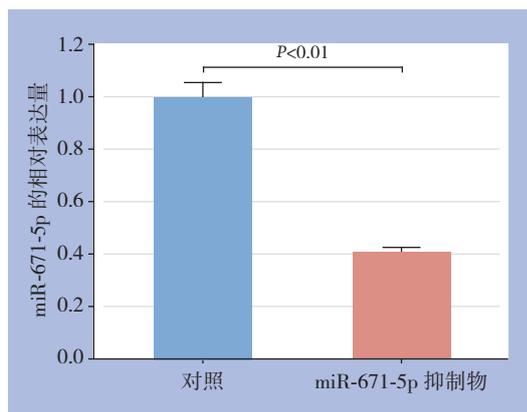


图 4 转染效率检测

Figure 4 Determination of the transfection efficiency

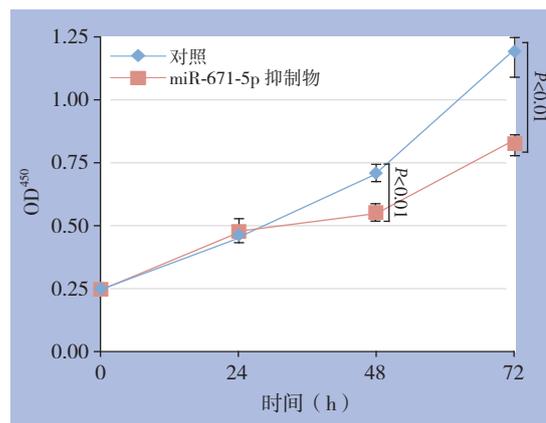


图 5 CCK-8 检测 miR-671-5p 对 HCC 细胞增殖的影响

Figure 5 The influence of miR-671-5p on cell proliferation in HCC cells by CCK-8 assay

2.5 miR-671-5p 的表达对 HCC 细胞侵袭与迁移的影响

为进一步探究 miR-671-5p 在 HCC 细胞侵袭与迁移中的具体作用与功能, 利用瞬转 miR-671-

5p 抑制物的方式将 MHCC-97H 细胞中的 miR-671-5p 低表达后进行 Transwell 实验。发现低表达 miR-671-5p 后 MHCC-97H 细胞系的侵袭与迁移能力均发生明显降低 (均 $P < 0.01$) (图 6)。

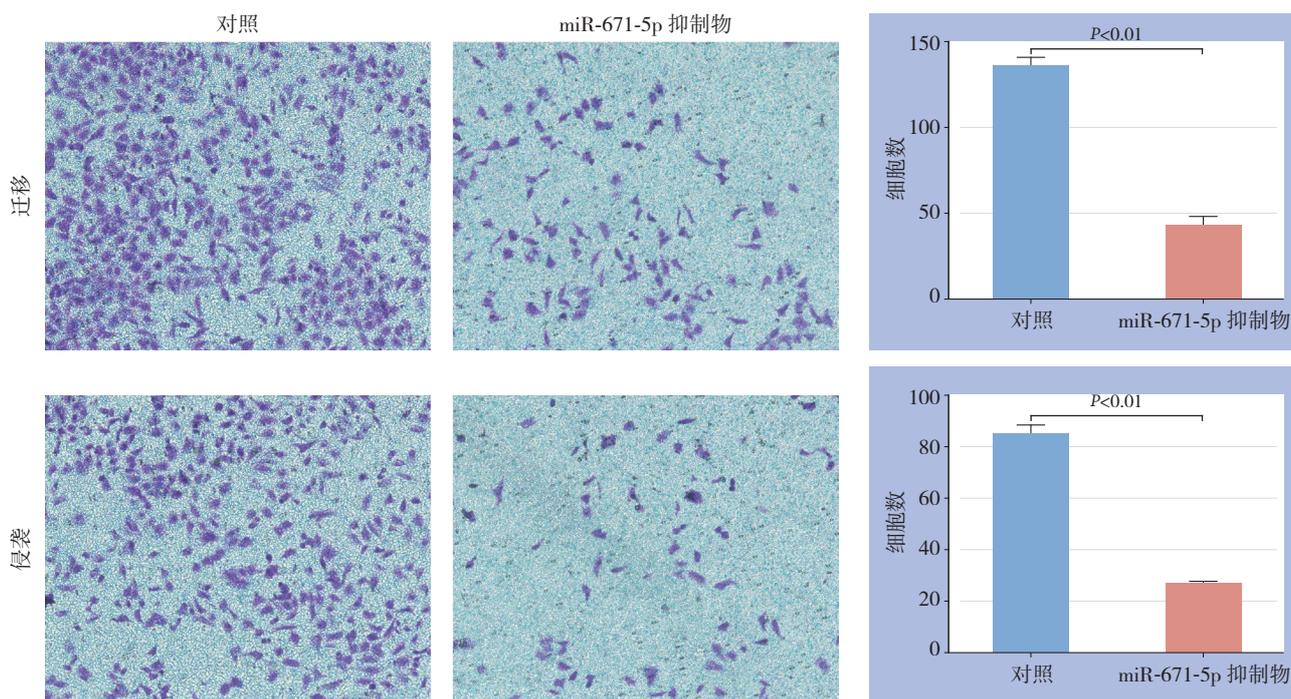


图 6 Transwell 小室检测 miR-671-5p 对 HCC 细胞迁移及侵袭能力的影响 (×100)

Figure 6 Transwell assay to assess the effect of miR-671-5p on migration and invasion in HCC cells (×100)

2.6 miR-671-5p 靶基因分析及其表达情况

经 TargetScan 及 Starbase 分析发现, CFL2 与 miR-671-5p 存在碱基互补配对, CFL2 为 miR-671-5p 的潜在靶基因 (图 7A)。目前已有报道称, CFL2 在多种肿瘤内中表达降低, 并存在抑制上皮细胞 - 间质转化 (epithelial-mesenchymal

transition, EMT) 发生的功能。从而抑制 HCC 的侵袭及迁移, 为明确 miR-671-5p 与 CFL2 的关系, 通过使用 miR-671-5p 抑制物下调 MHCC-97H 细胞系中 miR-671-5p 的表达后, 经 qRT-PCR 检测 CFL2 表达量, 结果显示 CFL2 的表达量明显升高 ($P < 0.001$) (图 7B), 并且在 MHCC-97H 细

胞系中 CFL2 的表达量与 miR-671-5p 的表达量呈明显负相关 ($P < 0.01$) (图 7C)。经 TCGA 数据库分析, 证实 CFL2 在 HCC 中表达量明显降低

($P < 0.01$), 且与 miR-671-5p 的表达量呈明显负相关 ($P < 0.01$) (图 7D-E)。

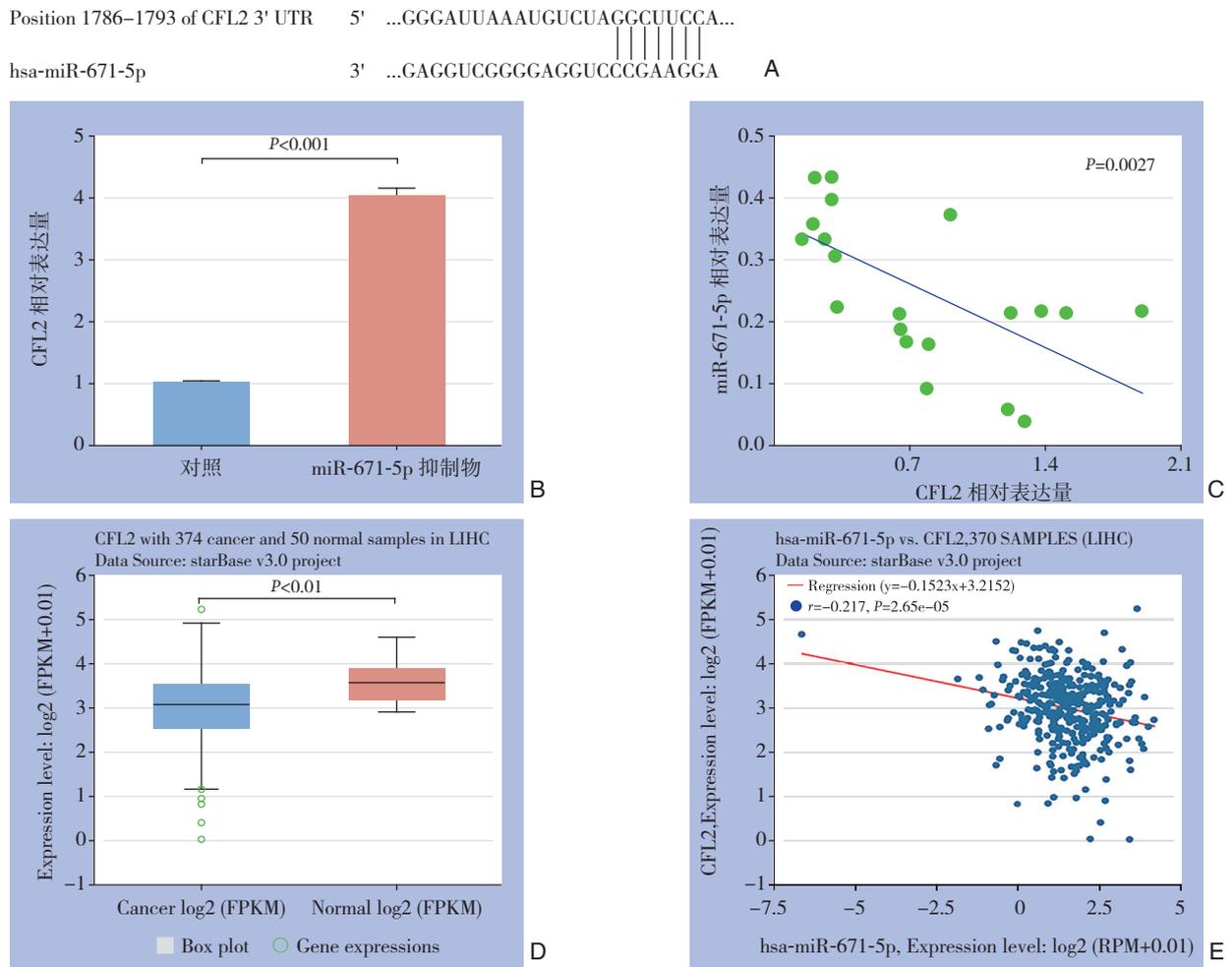


图 7 靶基因分析及验证 A: miR-671-5p 靶向结合 CFL2; B: 下调 miR-671-5p 对 CFL2 表达的影响; C: miR-671-5p 与 CFL2 表达的相关性分析; D-E: miR-671-5p 与 CFL2 关系的 TCGA 数据库分析

Figure 7 Analysis and verification of the target gene A: Targeted binding of miR-671-5p to CFL2; B: Influence of down-regulation of miR-671-5p on CFL2 expression; C: Correlation analysis of miR-671-5p on CFL2 expressions; D-E: TCGA database analysis of the relationship between miR-671-5p on CFL2

2.7 miR-671-5p 表达水平对 CFL2 的表达的影响极其与 EMT 的关系

为进一步明确 miR-671-5p 对 CFL2 的调控作用, 通过突变 miR-671-5p 与 CFL2 的结合位点后, 进行双荧光素酶实验检测。结果显示当结合位点被突变后, 高表达 miR-671-5p 无法再引起 CFL2 的 mRNA 水平的变化, 从而证实了 miR-671-5p 与 CFL2 之间的相互结合 (图 8A-B)。通过 qRT-PCR 验证 CFL2 siRNA 的敲除效率, 发现 CFL2 siRNA1 敲除效果最好 (图 8C), 因此使

用 siRNA1 对 CFL2 的表达进行敲低。经 Western blot 检测发现, 低表达 miR-671-5p 后 CFL2 蛋白表达水平明显升高, 同时抑制了 EMT 相关蛋白的表达。当在低表达 miR-671-5p 的基础上同时敲低 CFL2, 检测发现 CFL2 的表达量降低且部分抵消了 miR-671-5p 对 EMT 相关指标蛋白表达的抑制作用 (图 8D-E)。因此, 在细胞水平间接证明了 CFL2 为 miR-671-5p 的潜在靶点, 而 miR-671-5p 可通过抑制 CFL2 的表达促进 HCC 细胞 EMT 的发生。

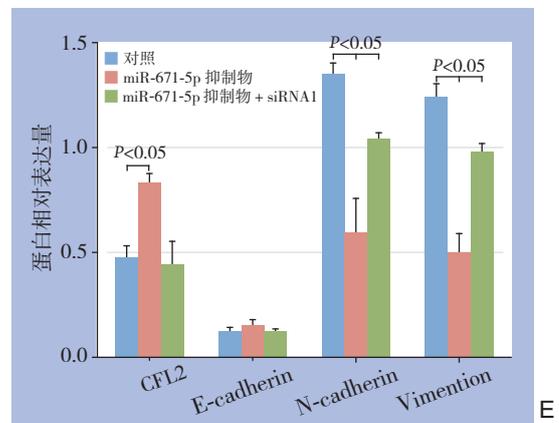
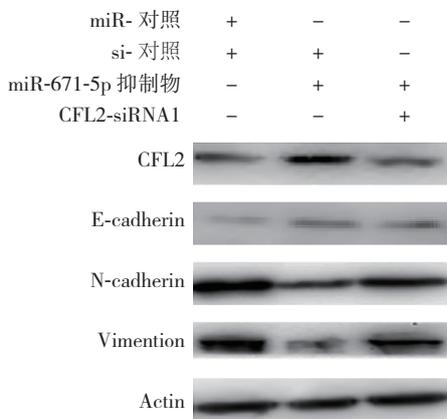
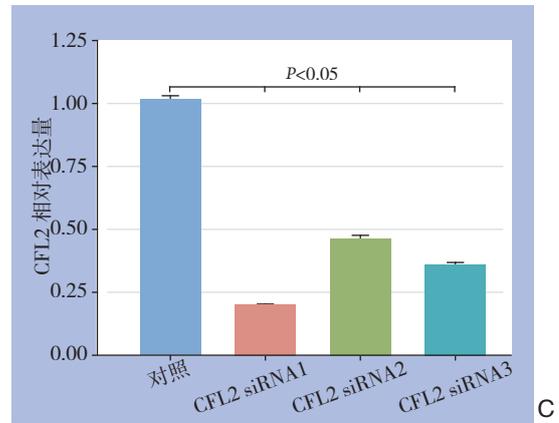
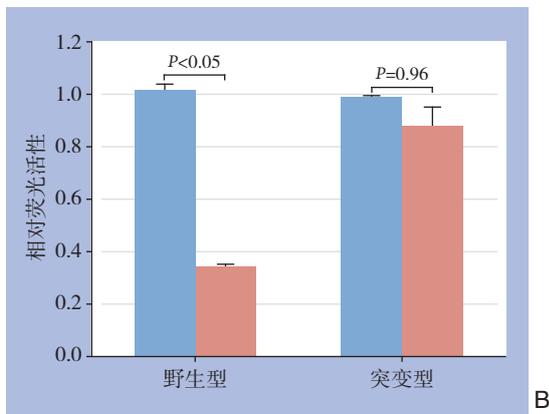
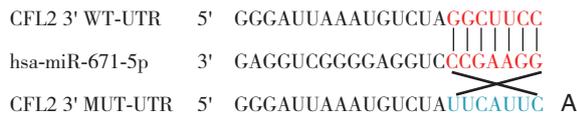


图 8 miR-671-5p 对 CFL2 的调控及其对 EMT 的影响 A: 野生型与突变型 CFL2 序列; B: 双荧光素酶实验; C: 不同 CFL2 siRNA 序列的干扰效果比较; D-E: EMT 相关蛋白表达检测

Figure 8 Regulation of miR-671-5p on CFL2 and their influence on EMT A: Sequences of wild-type and mutant-type CFL2; B: Dual luciferase assay; C: Comparison of interference effects among different CFL2 siRNA sequences; D-E: Determination of the expressions of the EMT-related proteins

3 讨 论

目前 HCC 的诊断治疗方法已经逐渐完善，HCC 分子机制研究中涉及 miRNA、lncRNA、外泌体、循环 RNA 等诸多分子，已成为近年研究的热点领域^[16-23]，例如 miR-149、miR-122、miR-107、miR-608、miR-221^[7-9, 24-26] 发现在 HCC 的致癌作用中发挥的作用调节目标基因。目前现有研究结果显示 miR-671-5p 与胶质瘤、胃癌、黑色素瘤等恶性肿瘤的发生发展具有紧密的联系，同时与手足口病、EB 病毒感染及 HBV 介导的肝损伤相关^[10-15, 19]，但其与 HCC 的发生发展之间的关系目前仍未见报道。

本实验通过 qRT-PCR 检测了来源于本院的共计 80 对 HCC 患者组织样品及与之对应的癌旁组织中 miR-671-5p 的表达；应用统计学方法分析

miR-671-5p 的表达水平与 HCC 临床病理特征的相关性；通过 qRT-PCR 法检测 HCC 细胞系中 miR-671-5p 的表达水平，并应用 Transwell 分析 miR-671-5p 对 HCC 相关细胞系的侵袭与迁移能力的影响。发现 miR-671-5p 在 HCC 组织中表达显著升高，并通过网络数据库资源筛选分析发现，高表达的 miR-671-5p 与肿瘤数目、Edmondson-Steiner 分级、静脉侵犯、AFP 水平、病理分级及 TNM 分期显著相关。综上所述，miR-671-5p 应为 HCC 中的促癌基因。

为探讨 miR-671-5p 在 HCC 中的具体作用及其分子机制，本研究检测了 HCC 细胞系（MHCC-97H、Hep3B、HepG2、SMMC-7721）及正常肝细胞 L02 中 miR-671-5p 的表达水平。结果显示，HCC 相关的各种细胞系中 miR-671-5p 表达都呈现升高的状态，与之前结果相符。

HCC发生发展过程中,最为重要和常见的生物学行为就是侵袭与转移,其中EMT的发生则是侵袭中最为重要的环节^[27-28]。关于miR-671-5p的多项研究已经表明,miR-671-5p与肿瘤的恶性增殖、侵袭和转移具有显著的相关。本研究中,使用miR-671-5p inhibitor下调了HCC细胞系中miR-671-5p的表达水平,通过Transwell实验进一步探究miR-671-5p与HCC侵袭与迁移能力之间的关系,所得到的结果为低表达miR-671-5p能够显著抑制HCC相关细胞系的侵袭和转移。目前也有报道称miR-671-5p能够通过抑制URGPC的表达,进而促进胃癌细胞凋亡,从而发挥抑癌作用^[12]。同时,miR-671-5p也可以抑制乳腺癌细胞EMT的发生^[13],但其具体分子机制均不明晰。因此,后续分子机制研究,则需要进一步验证其可能潜在的调节机制,从而确定可能的未来的治疗靶点。

CFL2是目前肿瘤相关的热点靶基因,是一种细胞骨架蛋白能够介导细胞骨架重塑。与多种恶性肿瘤相关,通过抑制CFL2从而抑制肿瘤的侵袭迁移及EMT的发生^[27,29-32]。经TargetScan及Starbase分析发现,CFL2为miR-671-5p的可能靶基因。经过Western blot发现低表达miR-671-5p后,CFL2蛋白显著高表达,EMT的指标下调。同时回复实验结果显示,EMT指标能够被显著逆转。因此能够间接证明CFL2可能为miR-671-5p的潜在靶点。

综上,miR-671-5p在HCC组织标本及HCC细胞系中高表达,与其恶性程度显著相关。miR-671-5p能够促进HCC细胞系的增殖、侵袭及迁移,并通过抑制CFL2的表达来促进EMT的发生。此项研究或许能够为HCC后续精准诊疗工作提供潜在靶点与相关理论依据。

参考文献

- [1] Ghouri YA, Mian I, Blechacz B. Cancer review: Cholangiocarcinoma[J]. *J Carcinog*, 2015, 14:1. doi:10.4103/1477-3163.151940.
- [2] 宁克,殷香保. 肝细胞癌免疫治疗的研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2019, 28(2):234-240. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2019.02.015.
Ning K, Yin XB. Research progress in immunotherapy of hepatocellular carcinomas[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2019, 28(2):234-240. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2019.02.015.
- [3] 陈世发,赵礼金. 癌发生发展机制的研究进展及其治疗现状[J]. *中国普通外科杂志*, 2018, 27(7):910-923. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.07.016.
Chen SF, Zhao LJ. Research progress on mechanisms for occurrence of liver cancer and its treatment status[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2018, 27(7):910-923. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.07.016.
- [4] Shukla GC, Singh J, Barik S. MicroRNAs: Processing, Maturation, Target Recognition and Regulatory Functions[J]. *Mol Cell Pharmacol*, 2011, 3(3):83-92.
- [5] Svoronos AA, Engelman DM, Slack FJ. OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(13):3666-3670. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0359.
- [6] 房峰,宋天强. 微小RNA在肝细胞癌中的相关研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2018, 27(7):899-909. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.07.015.
Fang F, Song TQ. Research progress associated with microRNAs in hepatocellular carcinoma[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2018, 27(7):899-909. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.07.015.
- [7] Luo G, Chao YL, Tang B, et al. miR-149 represses metastasis of hepatocellular carcinoma by targeting actin-regulatory proteins PPM1F[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(35):37808-37823. doi: 10.18632/oncotarget.5676.
- [8] Zou CD, Zhao WM, Wang XN, et al. MicroRNA-107: a novel promoter of tumor progression that targets the CPEB3/EGFR axis in human hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(1):266-278. doi: 10.18632/oncotarget.5689.
- [9] Wang KJ, Liang Q, Wei L, et al. MicroRNA-608 acts as a prognostic marker and inhibits the cell proliferation in hepatocellular carcinoma by macrophage migration inhibitory factor[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(3):3823-3830. doi: 10.1007/s13277-015-4213-5.
- [10] Barbagallo D, Condorelli A, Ragusa M, et al. Dysregulated miR-671-5p / CDR1-AS / CDR1 / VSNL1 axis is involved in glioblastoma multiforme[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(4):4746-4759. doi: 10.18632/oncotarget.6621.
- [11] Gartner JJ, Parker SC, Prickett TD, et al. Whole-genome sequencing identifies a recurrent functional synonymous mutation in melanoma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(33):13481-13486. doi: 10.1073/pnas.1304227110.
- [12] Qiu T, Wang K, Li X, et al. miR-671-5p inhibits gastric cancer cell proliferation and promotes cell apoptosis by targeting URGPC[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(6):4753-4758. doi: 10.3892/etm.2018.6813.
- [13] Tan X, Fu Y, Chen L, et al. miR-671-5p inhibits epithelial-to-mesenchymal transition by downregulating FOXM1 expression in breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(1):293-307. doi: 10.18632/oncotarget.6344.
- [14] Zhang X, Xin G, Sun D. Serum exosomal miR-328, miR-575, miR-134 and miR-671-5p as potential biomarkers for the diagnosis

- of Kawasaki disease and the prediction of therapeutic outcomes of intravenous immunoglobulin therapy[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(3):2420–2432. doi: 10.3892/etm.2018.6458.
- [15] Singh AK, Rooge SB, Varshney A, et al. Global microRNA expression profiling in the liver biopsies of hepatitis B virus-infected patients suggests specific microRNA signatures for viral persistence and hepatocellular injury[J]. *Hepatology*, 2018, 67(5):1695–1709. doi: 10.1002/hep.29690.
- [16] Arnaiz E, Sole C, Manterola L, et al. CircRNAs and cancer: Biomarkers and master regulators[J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 58:90–99. doi: 10.1016/j.semcancer.2018.12.002.
- [17] Lombardi G, Perego S, Sansoni V, et al. Circulating miRNA as fine regulators of the physiological responses to physical activity: Pre-analytical warnings for a novel class of biomarkers[J]. *Clin Biochem*, 2016, 49(18):1331–1339. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2016.09.017.
- [18] Gougelet A. Exosomal microRNAs as a potential therapeutic strategy in hepatocellular carcinoma[J]. *World J Hepatol*, 2018, 10(11):785–789. doi: 10.4254/wjh.v10.i11.785.
- [19] Luo D, Wilson JM, Harvel N, et al. A systematic evaluation of miRNA:mRNA interactions involved in the migration and invasion of breast cancer cells[J]. *J Transl Med*, 2013, 11:57. doi: 10.1186/1479-5876-11-57.
- [20] Chen X, Fan S, Song E. Noncoding RNAs: New Players in Cancers[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 927:1–47. doi: 10.1007/978-981-10-1498-7_1.
- [21] 胡走肖, 郑小林. 长链非编码RNA MIF-AS1在肝癌中表达及其与上皮-间充质转化的关系[J]. *中国普通外科杂志*, 2019, 28(7):848–856. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2019.07.011.
- Hu ZX, Zheng XL. Expression of long non-coding RNA MIF-AS1 in hepatocellular carcinoma and its association with epithelial-mesenchymal transition[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2019, 28(7):848–856. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2019.07.011.
- [22] 余斌, 丁佑铭, 廖晓峰. 长链非编码RNA肝癌高表达转录本与原发性肝癌关系的研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2017, 26(7):913–920. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.07.016.
- Yu B, Ding YM, Liao XF. Research progress of relationship between long non-coding RNA highly upregulated in liver cancer and hepatocellular carcinoma[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2017, 26(7):913–920. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.07.016.
- [23] 韩树坤, 李忠民, 韩冰, 等. 长链非编码RNAMALAT1在肝癌组织中的表达及其在肝癌细胞增殖与侵袭转移中的作用[J]. *中国普通外科杂志*, 2018, 27(1):49–54. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.01.008.
- Han SK, Li ZM, Han B, et al. Expression of long non-coding RNA MALAT1 in hepatocellular carcinoma tissue and its actions on proliferation and invasion/metastasis of hepatocellular carcinoma cells[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2018, 27(1):49–54. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.01.008.
- [24] Han W, Li N, Liu J, et al. MicroRNA-26b-5p enhances T cell responses by targeting PIM-2 in hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Signal*, 2019, 59:182–190. doi: 10.1016/j.cellsig.2018.11.011.
- [25] Valdmanis PN, Kim HK, Chu K, et al. miR-122 removal in the liver activates imprinted microRNAs and enables more effective microRNA-mediated gene repression[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):5321. doi: 10.1038/s41467-018-07786-7.
- [26] Liu Z, Wang C, Jiao X, et al. miR-221 promotes growth and invasion of hepatocellular carcinoma cells by constitutive activation of NFkappaB[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(11):4764–4777.
- [27] Gregory PA, Bracken CP, Smith E, et al. An autocrine TGF-beta/ZEB/miR-200 signaling network regulates establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition[J]. *Mol Biol Cell*, 2011, 22(10):1686–1698. doi: 10.1091/mbc.E11-02-0103.
- [28] 陈璐. 上皮间质转化与恶性肿瘤的转移和侵袭[J]. *中国普通外科杂志*, 2012, 21(7):886–892.
- Chen L. Role of epithelial-mesenchymal transition in cancer invasion and metastasis[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2012, 21(7):886–892.
- [29] Yu BB, Lin GX, Li L, et al. Cofilin-2 Acts as a Marker for Predicting Radiotherapy Response and Is a Potential Therapeutic Target in Nasopharyngeal Carcinoma[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24:2317–2329. doi: 10.12659/msm.909832.
- [30] Wang Y, Kuramitsu Y, Ueno T, et al. Differential expression of up-regulated cofilin-1 and down-regulated cofilin-2 characteristic of pancreatic cancer tissues[J]. *Oncol Rep*, 2011, 26(6):1595–1599. doi: 10.3892/or.2011.1447.
- [31] Nymark P, Guled M, Borze I, et al. Integrative analysis of microRNA, mRNA and aCGH data reveals asbestos- and histology-related changes in lung cancer[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2011, 50(8):585–597. doi: 10.1002/gcc.20880.
- [32] Bian Y, Guo J, Qiao L, et al. miR-3189-3p Mimics Enhance the Effects of S100A4 siRNA on the Inhibition of Proliferation and Migration of Gastric Cancer Cells by Targeting CFL2[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(1). pii: E236. doi: 10.3390/ijms19010236.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 李亚昭, 姚博文, 石磊. microRNA-671-5p在肝细胞癌中的表达及其负向调控丝切蛋白2与上皮细胞-间质转化的关系[J]. *中国普通外科杂志*, 2020, 29(1):43–52. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2020.01.006

Cite this article as: Li YZ, Yao BW, Shi L. Expression of microRNA-671-5p in hepatocellular carcinoma and the relationship between its negative regulating cofilin 2 and epithelial-mesenchymal transition[J]. *Chin J Gen Surg*, 2020, 29(1):43–52. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2020.01.006