

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00465

## MiR-429 调节肝细胞癌炎症微环境、分化及增殖

吕桂帅<sup>1△</sup>, 李亮<sup>1,2△</sup>, 陈昕<sup>1</sup>, 杨文<sup>1,2</sup>, 方田<sup>1</sup>, 余艳婷<sup>1</sup>, 陈磊<sup>1,2</sup>, 王红阳<sup>1,2\*</sup>

1. 第二军医大学东方肝胆外科医院信号转导实验室, 上海 200438
2. 国家肝癌科学中心, 上海 201805

**[摘要]** **目的** 观察 miR-429 对人肝细胞癌(HCC)炎症浸润、分化以及增殖的影响。**方法** 利用免疫磁珠法分选人肝癌细胞系 HCCLM3 细胞, 得到 EpCAM(CD326)阳性以及阴性的细胞。对两种细胞分别进行 miR-429 的干扰(AntagomiR-429)与过表达(miR-429mimic), 通过流式细胞技术、real-time PCR 法检测其干预效果。利用 CCK-8 法检测 miR-429 过表达及干扰肝癌细胞系的增殖活性并绘制生长曲线。分别利用干扰 miR-429 的 EpCAM 阳性 HCCLM3 细胞及其对照、过表达 miR-429 的 EpCAM 阴性 HCCLM3 细胞及其对照进行 NOD-SCID 小鼠皮下荷瘤实验, 通过免疫组织化学法检测成瘤后癌组织内炎性细胞浸润情况及增殖分化相关蛋白的表达情况。**结果** 干扰 miR-429 的表达能降低 EpCAM 阳性肝癌细胞的比例, 反之, 过表达 miR-429 能促使 EpCAM 阴性肝癌细胞转化为 EpCAM 阳性细胞。过表达 miR-429 可增强 EpCAM 阴性肝癌细胞在小鼠体内的成瘤能力, 而干扰 miR-429 表达可降低 EpCAM 阳性细胞成瘤率; 与对照相比, 过表达 miR-429 的瘤体组织中出现大量的巨噬细胞, 提示 miR-429 可招募炎性细胞浸润从而促进肿瘤发展; AFP 染色提示 miR-429 与肿瘤的低分化有关; Ki67 染色结果证实 miR-429 在体内能够促进肿瘤组织生长。与对照相比, miR-429 在体外也可以促进肝癌细胞的增殖, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** miR-429 能够在体外、体内水平影响 EpCAM 阳性细胞的比例, 显著影响肝肿瘤微环境、促进肿瘤细胞的增殖活性并降低其分化潜能。

**[关键词]** 肝细胞癌; miR-429; EpCAM; 细胞增殖; 细胞分化; 巨噬细胞

**[中图分类号]** R 735.7

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2015)05-0465-07

## MiR-429 regulates inflammatory infiltration, proliferative ability and differentiation of hepatocellular carcinoma

LÜ Gui-shuai<sup>1△</sup>, LI Liang<sup>1,2△</sup>, CHEN Xin<sup>1</sup>, YANG Wen<sup>1,2</sup>, FANG Tian<sup>1</sup>, YU Yan-ting<sup>1</sup>, CHEN Lei<sup>1,2</sup>, WANG Hong-yang<sup>1,2\*</sup>

1. International Cooperation Lab on Signal Transduction, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China
2. National Center for Liver Cancer, Shanghai 201805, China

**[Abstract]** **Objective** To observe the effects of miR-429 on inflammatory infiltration, differentiation and proliferation of hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** HCCLM3 cells were sorted into positive and -negative cells using magnetic activated cell sorting (MACS) according to EpCAM marker. The EpCAM-positive and negative cells were transfected with AntagomiR-429 and miR-429mimic to construct over-expressed and down-regulated cells of miR-429, respectively. To validate the effect of transfection, control cells and constructed cells were tested by flow cytometry (FC) and real-time polymerase chain reaction (PCR). The proliferative curves of transfected cells were plotted using cell counting kit-8 (CCK8) assay. Furthermore, tumor-bearing mice model was established by subcutaneous inoculation with transfected cells and related control cells into non-obese diabetic, severe combined immunodeficient mice (NOD-SCID). Mice were sacrificed after 6 weeks, and protein expressions of Ki67, AFP and F4/80 in tumors were determined via immunohistochemistry (IHC) to examine the status of proliferation, differentiation and inflammatory infiltration, respectively. **Results** The proportion of EpCAM-positive cells was decreased by

**[收稿日期]** 2015-02-12 **[接受日期]** 2015-03-23

**[基金项目]** 国家传染病重大科技专项肝癌项目(2012ZX10002-009), 国家自然科学基金(81300306). Supported by State Key Project for Liver Cancer of China (2012ZX10002-009) and National Natural Science Foundation of China (81300306).

**[作者简介]** 吕桂帅, 硕士生. E-mail: lvguishuaievelyn@163.com; 李亮, 助理研究员. E-mail: liliangyuanquan@163.com

△共同第一作者 (Co-first authors).

\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81875361, E-mail: hywangk@vip.sina.com

down-regulating miR-429, and EpCAM-negative cells could partially transfer to EpCAM-positive cells by miR-429 over-expression. *In vivo* study showed that over-expressing miR-429 in EpCAM-negative cells could enhance the tumor forming ability; whereas EpCAM-positive cells had an inhibited tumor-formation when down-regulating miR-429. Interestingly, F4/80, a marker of macrophage, was strongly stained in tumor tissue with miR-429 over-expression. It was also found that in tumor tissue, Ki67 and AFP staining was suppressed with miR-429 down-regulation. Meanwhile, compared to the control, miR-429 significantly accelerated the proliferation of HCCLM3 *in vitro* compared with the control ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** miR-429 can regulate the proportion of EpCAM-positive cells of HCC *in vitro* and *in vivo*, and greatly increase the inflammatory infiltration and proliferative ability, accompanied by decreased differentiation.

**[Key words]** hepatocellular carcinoma; miR-429; EpCAM; cell proliferation; cell differentiation; macrophage

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(5):465-471]

MicroRNAs(miRNAs)是存在于真核生物体内的一类长约 22 nt 的非编码 RNA,其通过与靶基因 mRNA 的 3' 非翻译区(3' UTR)结合,靶向降解 mRNA 或抑制其翻译,从而调节生理、病理功能。研究发现,miRNAs 在肿瘤中既可起到促癌作用,又可发挥抑癌功能<sup>[1-2]</sup>。miR-429 是 miRNA-200s 家族中的一员,同该家族其余 4 个成员 miR-200c、miR-141、miR-200b 和 miR-200a 一样广泛表达于不同组织的上皮细胞中<sup>[3]</sup>。miR-429 在不同上皮来源的肿瘤组织中的表达与作用不尽相同,而关于 miR-429 与肝癌及其肿瘤干细胞的报道较少<sup>[4]</sup>。

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是常见的恶性肿瘤,其发病率在男性中居第 5 位,在女性中居第 9 位<sup>[5-6]</sup>。HCC 恶性程度高,目前除甲胎蛋白(AFP)以外,尚缺乏较有效的早期筛查和诊断方法。外科切除是目前常用的治疗性方法。在我国,接受手术治疗后的 HCC 患者 5 年生存率为 32.64%,而非手术治疗患者的 5 年生存率仅为 9.01%<sup>[7]</sup>。因此,寻找与肝癌相关的癌基因,明确其作用机制,进而寻找以其为靶点的化学、基因治疗药物,显得尤为重要。EpCAM 作为黏附分子家族中的一员,具有调节细胞信号转导、迁移、增殖和分化等功能<sup>[8]</sup>,其通过参与  $\beta$  连环蛋白依赖的 Wnt 级联反应,激活 c-myc、cyclinA/E 等基因的表达,从而具有致瘤作用<sup>[9]</sup>。在肝癌中,EpCAM 被认为是肿瘤干细胞的标记物之一,EpCAM 阳性的肝癌干细胞能够诱导免疫缺陷的小鼠发生肿瘤<sup>[10]</sup>。本研究靶向特定的 HCC 细胞群体,将 HCC 细胞分为 EpCAM 阳性和阴性两群,探索在 HCC 的发生发展过程中,miR-429 对 HCC 细胞增殖活性、分化潜能以及炎性浸润的影响。

## 1 材料和方法

1.1 材料 SPF 级 NOD-SCID 小鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[许可证号 SCXK(沪)2012-0002];人肝癌细胞系 HCCLM3 购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。Taqman microRNA 反转录试剂盒(人类)为美国应用生物公司(Applied Biosystems)产品;小 RNA 过表达拟态物(miR-mimics)及其对照(negative control miR-mimics)、小 RNA 拮抗剂(antago-miR)及其对照(negative control antago-miR)均购自广州锐博生物科技公司(miR-10000);INTERFERin *in vitro* siRNA 转染试剂、JetPEI 转染试剂购自 Poly plus 公司(409-50);PCR 引物使用相关软件 BioXM 2.6 自行设计,并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;总 RNA 抽提液 TRIzol Reagent 购自 Invitrogen 公司;过氧化氢( $H_2O_2$ )购自 Sigma-Aldrich 公司;DMEM 培养基、小牛或胎牛血清(FCS/FBS)购自 Gibco BRL 公司;EpCAM 流式检测、磁珠分选抗体购自美天旎公司(Miltenyi Biotech);辣根过氧化物酶标记的羊抗兔以及羊抗小鼠二抗购自华舜公司;荧光二抗购自 Invitrogen 公司。超净工作台购自苏州净化设备公司;免疫组化石蜡包埋机、制片仪、冰冻切片仪均购自 Leica 公司;荧光实时定量 PCR 仪(7900HT)购自 Applied Biosystems 公司;荧光显微镜(Olympus IX70)购自 Olympus 公司;细胞培养孵箱购自 Thermo 公司;多功能酶标仪购自 Bio Tek 公司;流式细胞仪(型号:Moflo XDP)购自 Beckman 公司。

1.2 免疫磁珠方法分选 HCCLM3 细胞系 取生长状态良好的 HCCLM3 细胞,用胰酶消化法制备单细胞悬液,136×g 离心 3 min;弃上清,PBS 清洗,

136×g 离心 3 min,弃上清;用 300 μL PBS 重悬,加入 6 μL EpCAM 抗体(1:50),混匀,4℃ 孵育 15 min,每 5 min 混匀 1 次;136×g 离心 3 min;弃上清,PBS 清洗,136×g 离心 3 min,弃上清;用 200 μL 磁珠缓冲液重悬,加入 30 μL 免疫磁珠(抗兔),混匀,4℃ 孵育 15 min,每 5 min 混匀 1 次;136×g 离心 3 min;弃上清,缓冲液清洗,136×g 离心 3 min,弃上清;准备好分离柱,并用 500 μL 缓冲液清洗 3 次,500 μL 缓冲液重悬细胞,缓慢加入到分离柱中(避免产生气泡),收集流出液体,得到 EpCAM 阴性细胞;将分离柱移出磁场,加 500 μL 分选缓冲液至分离柱,用力推出,得到 EpCAM 阳性细胞。

1.3 Real-time PCR 检测转染后细胞中 miR-429 表达 磁珠分选出 EpCAM 阳性 HCCLM3 细胞和 EpCAM 阴性 HCCLM3 细胞,种于 6 孔板中;EpCAM 阳性 HCCLM3 细胞用 40 μmol/L 的 AntagomiR-429 处理 1 d,EpCAM 阴性 HCCLM3 细胞以 100 nmol/L 的 miR-429mimic 处理 1 d;收集细胞,TRIzol 裂解法提取总 RNA,取 1 μg RNA 反转录制备 cDNA,使用 miR-429 特异性的反转录引物进行反转录,然后取 1 μL 反转录产物进行 PCR 检测,实验使用 U6 作为 PCR 内参。PCR 反应总体系:反转录产物 0.5 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL,2×Taqman Universal PCR Master Mix 12.5 μL,双蒸水补足反应体系至 20 μL。反应条件:95℃ 4 min;95℃ 15 s,58℃ 30 s,72℃ 35 s,共 40 个循环。应用 Applied Biosystems 7300 Fast Real-Time PCR System 软件分析结果,用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析基因相对表达量。

1.4 流式细胞术检测转染后 EpCAM 阳性细胞的比例 将转染 24 h 后的细胞,用胰酶消化法制备单细胞悬液,136×g 离心 3 min;弃上清,PBS 清洗,136×g 离心 3 min,弃上清;用 100 μL PBS 重悬,加入 10 μL EpCAM 直标抗体(1:10,APC 通道),并设置空白对照,混匀,4℃ 孵育 15 min,每 5 min 混匀 1 次;136×g 离心 3 min;弃上清,PBS 清洗,136×g 离心 3 min;500 μL PBS 重悬,利用 Beckman 流式细胞仪 FL/8 通道检测不同处理组细胞表面 EpCAM 比例。

1.5 CCK8 法检测 miR-429 对肝癌细胞增殖活性的影响 将磁珠分选的 EpCAM 阳性和阴性

HCCLM3 细胞种于 6 孔板中;分别用 40 μmol/L 的 Antagomir-429 和 100 nmol/L miR-429mimic 处理 1 d;取对数生长期细胞,0.5% 胰酶消化 3 min,136×g 室温离心 3 min,加入适量培养基制成单细胞悬液;计数细胞,按每孔 5 000 个细胞接种于 96 孔板中,每组设置 0、24、48、72、84 h 5 个时间点,每个时间点设 3 个重复处理孔;使细胞分布均匀,37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养;到待测时间点时,按说明书每孔加入 CCK-8 试剂 10 μL,继续培养 1 h,用分光光度计测其在 450 nm 处的光密度值。

1.6 NOD-SCID 小鼠荷瘤实验验证 miR-429 对肿瘤细胞成瘤能力的影响 磁珠分选出 EpCAM 阳性和 EpCAM 阴性 HCCLM3 细胞,种于 6 孔板中;EpCAM 阳性 HCCLM3 细胞用 40 μmol/L 的 AntagomiR-429 处理 1 d,EpCAM 阴性 HCCLM3 细胞以 miR-429mimic 处理 1 d;用 0.5% 的胰酶消化细胞,136×g 离心 3 min,PBS 重悬细胞;计数细胞并调整细胞密度,使每 100 μL PBS 中含  $2 \times 10^4$  或  $4 \times 10^4$  个细胞;将含  $2 \times 10^4$  的 EpCAM 阳性 HCCLM3 细胞或含  $4 \times 10^4$  的 EpCAM 阴性 HCCLM3 细胞的 100 μL PBS 分别种植到 NOD-SCID 小鼠躯干右侧皮下。记录肿瘤发生情况。肿瘤细胞种植 6 周成瘤后,进行活体呈像,然后断颈处死动物,收集肿瘤样本及血浆样本。肿瘤体积的计算公式如下:肿瘤体积 (cm<sup>3</sup>) = 宽<sup>2</sup> (cm<sup>2</sup>) × 长 (cm) / 2。

1.7 免疫组织化学法检测 miR-429 对肿瘤细胞分化潜能及炎症浸润的影响 取荷瘤 NOD-SCID 小鼠体内的瘤体组织,石蜡包埋,切片;将石蜡切片 60℃ 烤箱过夜后脱蜡至水,置于 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 甲醇液去除内源性过氧化物酶;微波修复抗原;1% BSA 封闭。甩去封闭液,滴加 Ki67、AFP、F4/80 一抗,置于湿盒中,并放置于 4℃ 冰箱过夜;取出后室温下复温,0.01 mol/L PBS 洗 4 次;滴加 DAKO 二抗,放于湿盒中,置于 37℃ 孵育 45 min;0.01 mol/L PBS 洗 4 次,DAB 显色,甲基绿复染,无水乙醇脱色;二甲苯脱水、透明,滴加中性树脂,盖玻片覆盖并封片;显微镜下观察 Ki67、AFP、F4/80 的阳性染色。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用非配对 *t* 检验比较两组间的差异,用方差分析比较多组间的差异。



检验水准( $\alpha$ )为0.05。

## 2 结果

**2.1 miR-429 有助于维持肝癌细胞 EpCAM 阳性表型** 将 EpCAM 阳性细胞分组并分别转染 miR-429 拮抗剂及其对照,将 EpCAM 阴性细胞分组并分别转染 miR-429 过表达拟态物及其对照。24 h 后,转染了 AntagomiR-429 的 EpCAM 阳性细胞中 miR-429 表达受到抑制(降低约 90%, $P=0.016$ ),同时转染了 miR-429 拟态物的

EpCAM 阴性细胞中 miR-429 的表达升高(升高约 100 倍, $P=0.0017$ ),证实转染效率良好(图 1A)。同时通过流式细胞技术检测不同处理组 EpCAM 阳性细胞比例,结果发现:抑制 miR-429 表达后,EpCAM 阳性细胞的比例由 84.65% 降至 49.32%;反之,经过 miR-429 过表达,EpCAM 阳性细胞的比例由 2.72% 上升至 37.46%(图 1B)。结果提示 miR-429 对于 EpCAM 阳性表型的维持很重要。

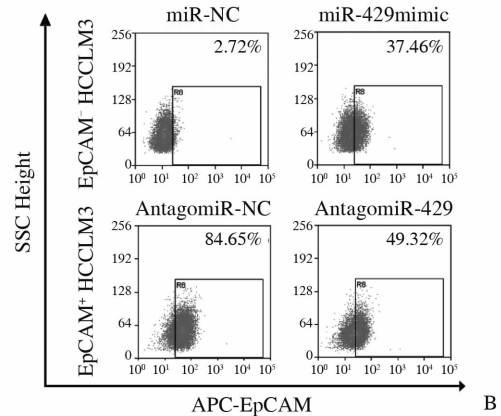
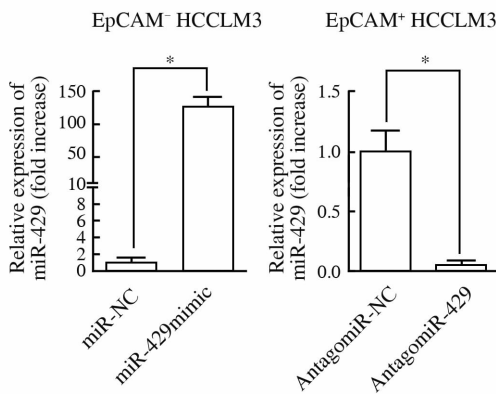


图 1 细胞瞬时转染效果鉴定及对 EpCAM 表型的影响

Fig 1 Identification of transfection efficiency and influence on EpCAM phenotype

A: Identification of transfection by RT-PCR (\*  $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ ); B: EpCAM-positive cell population with different treatments by flow cytometry

**2.2 miR-429 增强肝癌细胞体内成瘤的能力** 小鼠皮下荷瘤实验证实,EpCAM 阳性 HCCLM3 形成肿瘤所需的癌细胞数(AntagomiR-NC 处理,20 000 个细胞)远少于 EpCAM 阴性细胞(miR-NC 处理,40 000 个细胞),并且肿瘤发生的时间更早,发生肿瘤的比例更高。然而,抑制 miR-429 表达后,EpCAM 阳性细胞的肿瘤发生率降低,出现肿瘤的时间延迟,瘤体减小,肿瘤生长缓慢;而过表达 miR-429 后,EpCAM 阴性细胞的肿瘤发生率升高,出现肿瘤的时间由原来的 6 周变为 3 周,瘤体明显增大,肿瘤生长速度增快(表 1,图 2)。结果说明 miR-429 能增强肝癌细胞的体内成瘤能力。

HCCLM3 细胞成瘤组 F4/80 表达的巨噬细胞浸润减少;而过表达 miR-429 的 EpCAM 阴性 HCCLM3 细胞成瘤组与对照相比,F4/80 表达的巨噬细胞浸润增加(图 3)。结果提示在 miR-429 参与的肝癌形成过程中,其微环境中的巨噬细胞等炎性细胞浸润增多。

表 1 不同处理组小鼠体内肿瘤发生率

Tab 1 Tumor incidence of NOD-SCID mice under different conditions

Cell type	Cell number	Tumor incidence	Latency t/week
EpCAM <sup>+</sup> -AntagomiR-NC	20 000	7/7	2
EpCAM <sup>+</sup> -AntagomiR-429	20 000	6/7	3
EpCAM <sup>-</sup> -miR-NC	40 000	2/3	6
EpCAM <sup>-</sup> -miR-429mimic	40 000	2/3	3

**2.3 miR-429 影响肝癌的炎症微环境** 将瘤体组织从小鼠皮下分离,连续切片行 H-E 染色及巨噬细胞 F4/80 免疫组化染色,结果显示:相比对照,抑制 miR-429 表达后的 EpCAM 阳性

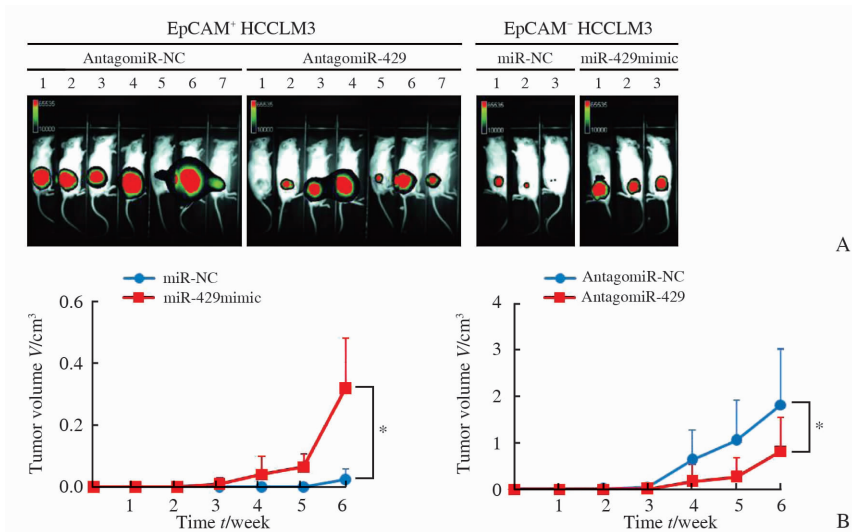


图 2 miR-429 对肝癌细胞体内成瘤能力的影响

Fig 2 Influence of miR-429 on tumorigenesis of hepatocellular carcinoma cell lines *in vivo*

A: Live-imaging of tumors in different groups; B: Volume variation of tumors in image A at different weeks (\*  $P < 0.05$ ,  $n = 3$  for miR-NC and miR-429mimic groups;  $n = 7$  for AntagomiR-NC and AntagomiR-429 groups,  $\bar{x} \pm s$ )

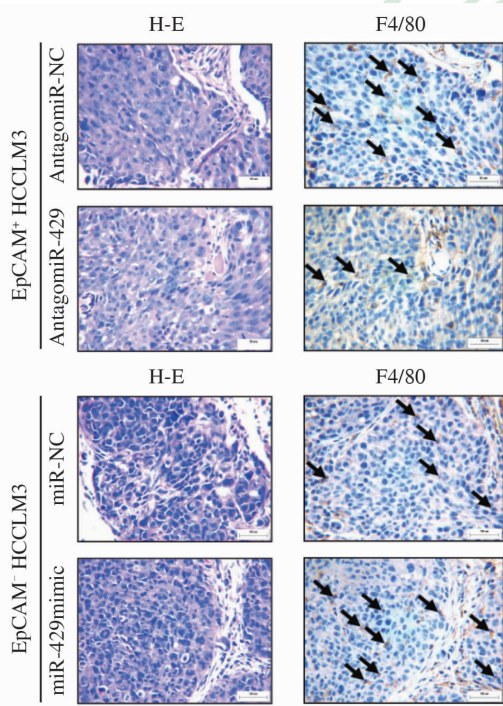


图 3 免疫组化分析不同瘤体组织中 F4/80 阳性细胞

Fig 3 Immunohistochemical analysis of F4/80-positive cells in tumors of different treatment groups

Black arrows showing macrophages stained with F4/80. Original magnification:  $\times 200$

2.4 miR-429 促进肝癌细胞的增殖与去分化 在体外水平, EpCAM 阳性 HCCLM3 的增殖速度明显高于 EpCAM 阴性 HCCLM3 细胞。抑制 miR-429 表达后, EpCAM 阳性细胞增殖明显变慢; 而过表达

miR-429 后, EpCAM 阴性细胞的增殖变快(图 4)。结果说明 miR-429 不仅有助于维持 EpCAM 阳性肝癌细胞的高增殖能力, 还能部分逆转 EpCAM 阴性 HCCLM3 细胞增殖缓慢的现象。在体内成瘤实验中, 对皮下肿瘤同一部位连续切片进行免疫组化染色, 结果显示: 抑制 miR-429 表达的 EpCAM 阳性 HCCLM3 细胞成瘤组 Ki67(反映增殖活性)、AFP(反映分化潜能) 阳性染色与对照相比均降低, 而过表达 miR-429 的 EpCAM 阴性 HCCLM3 细胞成瘤组 Ki67、AFP 阳性染色与对照相比均升高(图 5)。结果提示 miR-429 的过表达与高增殖、低分化相关。

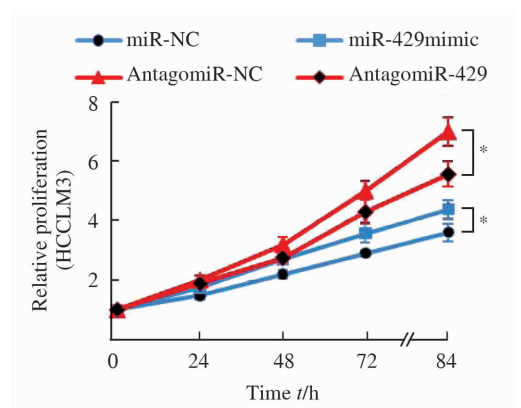


图 4 miR-429 对肝癌细胞体外增殖的影响

Fig 4 Influence of miR-429 on proliferation of HCC cell lines *in vitro*

\*  $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$



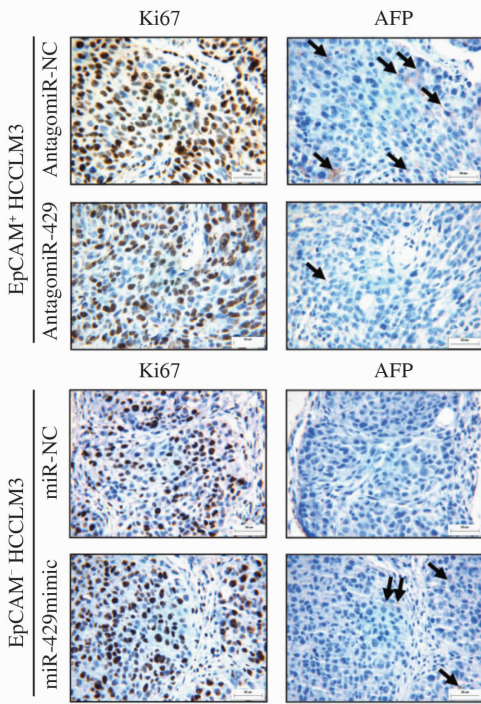


图5 免疫组化显示不同瘤体组织中 Ki67、AFP 的表达

Fig 5 Immunohistochemical analysis of Ki67 and AFP expression in tumors from different groups

Black arrows showing Ki67 or AFP positive cells. AFP: Alpha fetoprotein. Original magnification:  $\times 200$

### 3 讨论

肝癌是消化系统常见肿瘤,恶性程度较高,是病死率最高的恶性肿瘤之一。我国是肝癌的高发国家,又是病死率最高的国家,以上海市社区人群为基础的研究显示,我国每年男性和女性人群中的发病率分别达到 37.9/10 万和 14.2/10 万<sup>[7]</sup>,严峻的形势给我国的社会和医疗带来了沉重的负担。对于肝癌发病机制的研究目前主要集中在遗传改变与表观修饰,它们通过调节不同的信号转导通路而致癌<sup>[11-12]</sup>。近来,二代测序等技术的应用进一步证实了 miRNAs 调控的信号通路在肝癌发病中发挥重要作用,miRNAs 可以作为肝癌治疗的潜在靶点<sup>[13-15]</sup>。研究证实,相比肝脏癌旁组织,某些特定 miRNAs 在癌组织中特异性低表达或高表达<sup>[16]</sup>,细胞学和分子学实验证实 miRNAs 在肝脏组织中的异常表达影响了肿瘤相关信号通路的活性,从而进一步影响了癌症的发生与发展<sup>[17-18]</sup>。

多项肿瘤相关研究证实,患者体内的 1 号染色体长臂 3 区 6 带的稳定性较差,而 miR-200b/miR-

200a/miR-429 家族正位于此区域。本课题组之前的研究发现 miR-429 在 EpCAM 阳性的肝癌细胞及具有成球能力的肝癌起始细胞中高表达,可作为独立的预后影响因素促进肝脏肿瘤的发生与生长,并且 miR-429 启动子区的 4 个甲基化位点的异常会直接导致 miR-429 在肝癌细胞系及临床样本中呈高表达状态<sup>[4]</sup>。EpCAM 在肝癌中可以作为肝癌干细胞的标记物,并且和肝癌细胞的高度异质性相关。EpCAM 阳性和 EpCAM 阴性的肝癌细胞在形态学和功能学方面有着显著差异,例如,高表达 EpCAM 的肝癌细胞呈现较强的增殖能力和干细胞特性<sup>[10]</sup>。本实验通过磁珠分选人肝癌细胞系 HCCLM3 得到 EpCAM 阳性及阴性的细胞,将分选后的 EpCAM 阳性、EpCAM 阴性细胞分别转染 AntagomiR-429 及 miR-429mimic,进行 miR-429 的干扰和过表达。以此为研究工具,我们发现抑制 miR-429 表达会导致 EpCAM 阳性细胞比例、增殖能力、去分化水平及体内成瘤能力下降,而过表达 miR-429 则使 EpCAM 阴性肝癌细胞中出现 EpCAM 阳性细胞,并伴随着增殖能力、去分化水平及体内成瘤能力的升高,说明 miR-429 可能通过调节肝癌细胞中 EpCAM 阳性细胞的比例来促进肝脏肿瘤的发生、发展。

近年来,肿瘤细胞与肿瘤微环境中的炎性细胞、成纤维细胞之间的交互对话逐渐得到人们的关注。肿瘤微环境中的巨噬细胞可通过分泌趋化因子 18、骨桥蛋白等与乳腺癌、结直肠癌中的肿瘤细胞相互作用,形成正反馈环路,促进肿瘤的生长、转移<sup>[19-20]</sup>。在肝脏中,乙肝病毒介导的肝病组织中往往出现大量的 M2 型巨噬细胞浸润<sup>[21]</sup>,然而,却缺少足够的证据说明肝癌细胞与其相关巨噬细胞之间的相互作用可以直接影响肝癌的发生发展。本实验发现,在 miR-429 过表达的瘤体组织内,巨噬细胞的浸润显著增多;而抑制 miR-429 表达的瘤体内,巨噬细胞的浸润明显减少,提示 miR-429 在肝脏肿瘤细胞表达可能有助于为其招募相关的巨噬细胞,从而进一步促进肿瘤的发生、发展。我们之前的实验研究发现 miR-429 可被分泌到胞外<sup>[4]</sup>,因此,我们推测:EpCAM 阳性的肝癌细胞通过分泌 miR-429,促进巨噬细胞的迁徙能力而诱导其浸润,巨噬细胞通过分泌炎性细胞因子促进肿瘤细胞的增殖。但该推测有

待更进一步实验证实。

在前期研究中,我们对 miR-429 调控 EpCAM 阳性肝脏肿瘤起始细胞的作用靶基因及相关信号转导通路进行了深入研究。结果发现,通过抑制其靶基因 RB 结合蛋白 4(RBBP4)的表达,miR-429 能够释放出 E2F1 的转录活性,进一步促进 OCT4 的表达,从而维持 EpCAM 阳性肝脏肿瘤起始细胞的特性<sup>[4]</sup>。因此,我们认为,miR-429 很可能是通过 RBBP4/E2F1/OCT4 轴调节肝脏肿瘤的炎症微环境、分化以及增殖。

近年来,以 miRNA 或抗 miRNA 作为肿瘤治疗的靶向分子研究正逐渐得到人们的关注和重视。miR-429 在肝癌细胞和组织中高表达,且选择性地表达于 EpCAM 阳性细胞中,为寻找肝癌治疗的新靶点提供了思路。

#### [参考文献]

- [1] DeSano J T, Xu L. MicroRNA regulation of cancer stem cells and therapeutic implications[J]. *AAPS J*, 2009,11:682-692.
- [2] Esquela-Kerscher A, Slack F J. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006,6:259-269.
- [3] Wienholds E, Kloosterman W P, Miska E, Alvarez-Saavedra E, Berezikov E, de Bruijn E, et al. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development[J]. *Science*,2005,309:310-311.
- [4] Li L, Tang J, Zhang B, Yang W, Liu Gao M, Wang R, et al. Epigenetic modification of MiR-429 promotes liver tumor-initiating cell properties by targeting Rb binding protein 4[J]. *Gut*,2015,64:156-167.
- [5] Jemal A, Bray F, Center M M, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*,2011,61:69-90.
- [6] El-Serag H B. Hepatocellular carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2011, 365:1118-1127.
- [7] 韩雪,黄晨曦,张宏伟,乔鹏,谢梦,张蓉,等. 2002-2010年上海市杨浦区居民原发性肝癌发病及生存情况[J]. *中华预防医学杂志*,2012,46:119-124.
- [8] Kurtz J E, Dufour P. Adecatumumab: an anti-EpCAM monoclonal antibody, from the bench to the bedside [J]. *Expert Opin Biol Ther*,2010,10:951-958.
- [9] Maetzel D, Denzel S, Mack B, Canis M, Went P, Benk M, et al. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM[J]. *Nat Cell Biol*, 2009,11:162-171.
- [10] Kimura O, Takahashi T, Ishii N, Inoue Y, Ueno Y, Kogure T, et al. Characterization of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)<sup>+</sup> cell population in hepatocellular carcinoma cell lines [J]. *Cancer Sci*, 2010,101:2145-2155.
- [11] Gramantieri L, Fornari F, Callegari E, Sabbioni S, Lanza G, Croce C M, et al. MicroRNA involvement in hepatocellular carcinoma[J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12: 2189-2204.
- [12] Aravalli R N, Cressman E N, Steer C J. Cellular and molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma: an update[J]. *Arch Toxicol*, 2013, 87: 227-247.
- [13] Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, Ladeiro Y, Pelletier L, Maad I B, et al. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Genet*, 2012, 44: 694-698.
- [14] Cleary S P, Jeck W R, Zhao X, Chen K, Selitsky S R, Savich G L, et al. Identification of driver genes in hepatocellular carcinoma by exome sequencing [J]. *Hepatology*, 2013, 58: 1693-1702.
- [15] Kan Z, Zheng H, Liu X, Li S, Barber T D, Gong Z, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in hepatocellular carcinoma [J]. *Genome Res*, 2013, 23: 1422-1433.
- [16] Negrini M, Gramantieri L, Sabbioni S, Croce C M. microRNA involvement in hepatocellular carcinoma[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2011, 11: 500-521.
- [17] Negrini M, Ferracin M, Sabbioni S, Croce C M. MicroRNAs in human cancer: from research to therapy [J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 11): 1833-1840.
- [18] Gailhouste L, Ochiya T. Cancer-related microRNAs and their role as tumor suppressors and oncogenes in hepatocellular carcinoma [J]. *Histol Histopathol*, 2013, 28: 437-451.
- [19] Rao G, Wang H, Li B, Huang L, Xue D, Wang X, et al. Reciprocal interactions between tumor-associated macrophages and CD44-positive cancer cells via osteopontin/CD44 promote tumorigenicity in colorectal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2013,19:785-797.
- [20] Su S, Liu Q, Chen J, Chen J, Chen F, He C, et al. A positive feedback loop between mesenchymal-like cancer cells and macrophages is essential to breast cancer metastasis[J]. *Cancer Cell*, 2014,25:605-620.
- [21] Yang P, Markowitz G J, Wang X F. The hepatitis B virus-associated tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma[J]. *Natl Sci Rev*, 2014: 396-412.