

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.10.1279

• 论 著 •

MicroRNA-340 在肝细胞肝癌中抑制细胞增殖并促进凋亡

王孜尧, 宋丹, 黄平*

重庆医科大学附属第一医院肝胆外科, 重庆 400016

[摘要] **目的** 探讨微 RNA-340 (miR-340) 在肝细胞肝癌中的表达特点及其对细胞生物学行为的影响。

方法 收集重庆医科大学附属第一医院肝胆外科 2015 年 3 月至 2016 年 9 月收治的 40 例肝细胞肝癌患者手术后切除的癌组织和癌旁组织标本。通过 qPCR 检测组织标本中 miR-340 的表达, 并分析 miR-340 表达与临床病理学指标的关系。分别培养肝癌细胞株 Hep3B、Bel-7402、HepG2 和 SMMC-7721 以及正常肝细胞株 HL-7702, 48 h 后使用 qPCR 检测 5 种细胞中 miR-340 的表达水平。通过转染增加或抑制 SMMC-7721 细胞中 miR-340 的表达, 然后分别于细胞培养 24、48、72 h 后采用 CCK-8 法检测 SMMC-7721 细胞增殖, 流式细胞术检测细胞凋亡。通过生物信息学软件预测 miR-340 的靶基因, 并使用 qPCR 和蛋白质印迹法进一步验证 miR-340 对靶基因的作用。**结果** 癌组织中 miR-340 的表达低于癌旁组织 ($P < 0.01$), 并且 miR-340 的表达与乙肝表面抗原、HBV DNA 载量、肿瘤大小以及临床 TNM 分期有关 ($P < 0.01$)。正常肝细胞 HL-7702 内 miR-340 的表达高于 4 种肝癌细胞 Hep3B、Bel-7402、HepG2 和 SMMC-7721 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。增加 miR-340 表达可抑制 SMMC-7721 细胞的增殖 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而抑制 miR-340 的表达则促进 SMMC-7721 细胞的增殖 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 增加 miR-340 的表达可促进 SMMC-7721 细胞的凋亡 ($P < 0.01$), 而抑制 miR-340 则减少凋亡 ($P < 0.01$)。生物信息学分析显示 S 期激酶相关蛋白 2 (SKP2) 基因是 miR-340 下游的一个靶基因。qPCR 和蛋白质印迹分析结果显示增加 SMMC-7721 细胞中 miR-340 的表达可抑制 SKP2 的 mRNA 和蛋白表达, 抑制 miR-340 表达则增加 SKP2 的 mRNA 和蛋白表达。**结论** miR-340 的异常表达可能与乙肝病毒的感染有关, 其异常表达有助于评价病情以及预后。在肝癌细胞系 SMMC-7721 细胞中, miR-340 能够抑制细胞增殖并促进凋亡, 这一作用结果可能是通过 miR-340 对 SKP2 的抑制而实现的。

[关键词] 肝肿瘤; 肝细胞癌; 微 RNA-340; 细胞增殖; 细胞凋亡; S 期激酶相关蛋白 2

[中图分类号] R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)10-1279-07

MicroRNA-340 suppresses cell proliferation and induces cell apoptosis in hepatocellular carcinoma

WANG Zi-yao, SONG Dan, HUANG Ping*

Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of microRNA-340 (miR-340) in hepatocellular carcinoma (HCC) and its effect on cell biological behavior. **Methods** We collected 40 frozen HCC tissues and adjacent non-tumor tissues from patients undergoing hepatectomy of HCC at The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University from Mar. 2015 to Sep. 2016. The expression of miR-340 in all tissues was detected by qPCR and the relationship between miR-340 expression and clinicopathological parameters was analyzed. Simultaneously, the expression of miR-340 in normal hepatocyte (HL-7702) and four hepatoma cells lines (Hep3B, Bel-7402, HepG2, SMMC-7721) was detected by qPCR after incubation for 48 h. The eukaryotic expression vector with miR-340 or control reagent was transfected into SMMC-7721 cells using EndoFection™-Max to increase or inhibit the expression of miR-340, and then the cells were cultured for 24 h, 48 h and 72 h. The proliferation of SMMC-7721 cells was detected by CCK-8 assay, and the apoptosis was detected by flow cytometry. The target gene of miR-340 was predicted by bioinformatics software, and the effect of miR-340 on target gene was further verified by qPCR and Western blotting. **Results** The expression of miR-340 in HCC

[收稿日期] 2017-03-17 **[接受日期]** 2017-05-31

[基金项目] 重庆市科委科技计划项目 (cstc2015shmszx120039). Supported by Science and Technology Project of Chongqing Science and Technology Commission (cstc2015shmszx120039).

[作者简介] 王孜尧, 硕士生. E-mail: 371815678@qq.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 023-89011191, E-mail: huangpchina@sina.com

tissues was significantly lower than that in the adjacent non-tumor tissues ($P < 0.01$), and was correlated with hepatitis B surface antigen, HBV DNA, tumor size and TNM stage (all $P < 0.01$). Besides, the expression of miR-340 in HL-7702 cells was significantly higher than that in Hep3B, Bel-7402, HepG2 and SMMC-7721 cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$). CCK-8 assay results showed that overexpression of miR-340 inhibited proliferation of SMMC-7721 cells, while inhibition of miR-340 promoted cell proliferation ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Overexpression of miR-340 significantly promoted SMMC-7721 cells apoptosis, while suppression of miR-340 significantly inhibited cells apoptosis (all $P < 0.01$). S-phase kinase-associated protein 2 (SKP2) was a target gene of miR-340 as indicated by bioinformatics software. Further, qPCR and Western blotting results showed that overexpression of miR-340 inhibited the mRNA and protein expression of SKP2, while inhibition of miR-340 increased the mRNA and protein expression of SKP2. **Conclusion** The abnormal expression of miR-340 may be associated with the HBV infection, and miR-340 may be an indicator to evaluate the progression and prognosis of HCC. MiR-340 can inhibit proliferation and promote apoptosis of SMMC-7721 cells, which may be effected by inhibiting the SKP2 expression.

[Key words] liver neoplasms; hepatocellular carcinoma; microRNA-340; cell proliferation; apoptosis; S-phase kinase associated protein 2

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(10): 1279-1285]

肝癌是一种常见的恶性肿瘤,在2012年全球有782 500例新发病例、745 500例死亡病例,中国新发和死亡病例约占世界的50%^[1]。其中,70%~90%的患者其组织学类型是肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)^[2]。HCC的发生是一个多步骤的复杂过程,因此研究HCC的发生、诊断、治疗及预后对提高公众的健康水平极为重要。

研究表明,微RNA(microRNA, miRNA)-340(miR-340)在结直肠癌^[3]、卵巢癌^[4]、乳腺癌^[5]等多种肿瘤中充当抑癌因子,其通过抑制细胞的增殖、侵袭、转移以及诱导细胞凋亡参与肿瘤的发生和发展。此外有研究指出miR-340通过结直肠癌细胞的瓦尔堡效应(Warburg effect)影响细胞的增殖^[6]。且在口腔上皮细胞癌中miR-340可上调葡萄糖转运蛋白1(glucose transporter 1, GLUT1)的表达,从而导致乳酸分泌增加和葡萄糖摄取增加^[7]。可见miR-340在多种肿瘤中具有重要的作用,但其在HCC中是否也具有抑癌作用并且能否作为评价病情或预后的指标,目前尚无相关研究。本研究拟分析miR-340在HCC患者癌组织和癌旁组织中的表达特点及其在正常肝细胞系以及肝癌细胞系中的表达特点,揭示miR-340对肝癌细胞增殖和凋亡的影响,并对miR-340的作用靶点进行预测和验证。

1 材料和方法

1.1 主要材料 正常肝细胞株HL-7702和肝癌细胞株HepG2、Hep3B、SMMC-7721、Bel-7402均由重庆医科大学病毒性肝炎研究所保存。MEM培养液和RPMI 1640培养液购自美国Gibco公司。胎牛

血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国PAN-Biotech公司。MiR-340模拟质粒(miR-340 mimic; 质粒结构包括克隆载体pLVX-ZsGreen-Puro和miR-340 DNA引物序列,序列如下:正义5'-GAT CCG GTT ATA AAG CAA TGA GAC TGA TTT TTT CTC GAG G-3',反义5'-AAT TCC TCG AGA AAA AAT CAG TCT CAT TGC TTT ATA ACC G-3'),miR-340模拟对照质粒(miR-340 mimic control; 质粒结构包括克隆载体pLVX-ZsGreen)、miR-340抑制质粒(miR-340 inhibitor; 质粒结构包括克隆载体pLVX-tdTomato-Puro和miR-340 inhibitor DNA引物序列,序列如下:正义5'-GAT CCG GAA TCA GTC TCG ACC TTT ATA ATT TTT TCT CGA GG-3',反义5'-AAT TCC TCG AGA AAA AAT TAT AAA GGT CGA GAC TGA TTC CG-3'),miR-340抑制对照质粒(miR-340 inhibitor control; 质粒结构包括克隆载体pLVX-tdTomato)、转染试剂EndoFectionTM-Max、反转录试剂盒以及qPCR试剂盒均购自广州复能基因有限公司。高纯度miRNA和mRNA提取试剂盒购自上海玉博生物科技有限公司。CCK-8试剂盒购自日本Dojindo公司。Annexin V-PE/7-AAD凋亡检测试剂盒和Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒购自杭州联科生物技术股份有限公司。蛋白质印迹实验相关试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。抗S期激酶相关蛋白2(S-phase kinase-associated protein 2, SKP2)抗体(RLT-4311)、抗GAPDH抗体(RLM-3215)和二抗(RS0002)均购自苏州睿瀛生物技术有限公司。

1.2 HCC 癌组织和癌旁组织标本的收集 收集重庆医科大学附属第一医院肝胆外科 2015 年 3 月至 2016 年 9 月收治的 40 例经术后病理确诊为 HCC 患者的癌组织和癌旁组织标本,其中癌旁组织要远离癌组织边缘 3 cm 以上。标本于术中取下后立即放入 RNA 保存液中,之后立即置于液氮中保存。所有纳入患者均同意参与本实验,并签署知情同意书。本实验方案和获得重庆医科大学附属第一医院伦理学委员会的批准并且严格遵守《赫尔辛基宣言》。

1.3 肝细胞以及肝癌细胞的培养 肝癌细胞株 HepG2 和 Hep3B 培养在含 10% FBS 的 MEM 培养液中,肝癌细胞株 SMMC-7721、Bel-7402 以及正常肝细胞株 HL-7702 培养在含有 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液中。以上细胞均培养于 37 ℃、5% CO₂ 的环境中。

1.4 miRNA 和 mRNA 的提取、反转录、qPCR 所有引物均由广州复能基因有限公司合成。各型肝癌细胞和正常肝细胞均培养 48 h 后进行 miRNA 和 mRNA 的提取。使用高纯度 miRNA 和 mRNA 提取试剂盒通过离心柱法提取组织和细胞中的 miRNA 和 mRNA,然后分别用 miRNA 反转录试剂盒以及第一链合成试剂盒进行反转录反应。

miRNA 反转录反应体系为 20 μL,其中总 RNA 2 μg、2.5 U/μL 多聚腺苷酸聚合酶 1 μL、反转录酶 1 μL、5×反应缓冲液 5 μL,用双蒸水(不含 RNA 酶和 DNA 酶)补足 20 μL;反转录反应条件为 37 ℃ 60 min、85 ℃ 5 min、4 ℃ 放置。cDNA 稀释 3 倍进行 qPCR。以 U6 作为内参。引物序列如下:miR-340 正义 5'-GCG GTT ATA AAG CAA TGA GA-3'、反义 5'-GTG CGT GTC GTG GAG TCG-3',U6 正义 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3'、反义 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'。qPCR 反应体系为 20 μL,含 2×一体化 qPCR 试剂 10 μL、一体化 miRNA qPCR 引物 2 μL、通用适配 PCR 引物 2 μL、cDNA 2 μL、双蒸水 4 μL。反应条件:95 ℃ 10 min;95 ℃ 10 s,60 ℃ 20 s,72 ℃ 15 s,共 40 个循环。mRNA 反转录分为 2 步。第 1 步:总体积 13 μL,包括 RNA 2 μg、250 μmol/L 随机引物 1 μL,用双蒸水补足 13 μL;反应条件 65 ℃ 10 min。第 2 步:总体积 25 μL,含 RNA 引物 13 μL、5×反应缓冲液 5 μL、25 mmol/L 脱氧核糖核苷三磷酸 1 μL、

25 U/μL RNA 酶抑制剂 1 μL、200 U/μL 反转录酶 1 μL、双蒸水 4 μL;反应条件为 37 ℃ 60 min、85 ℃ 5 min、4 ℃ 放置。cDNA 稀释 5 倍进行 qPCR。以 GAPDH 为内参。引物序列如下:SKP2 正义 5'-AGT CTC TAT GGC AGA CCT TAG ACC-3'、反义 5'-TTT CTG GAG ATT CTT TCT GTA GCC-3',GAPDH 正义 5'-CAG TCA GCC GCA TCT TCT TTT-3'、反义 5'-GTG ACC AGG CGC CCA ATA C-3'。qPCR 反应体系为 20 μL,含 2×一体化 qPCR 试剂 10 μL、一体化 qPCR 引物 2 μL、cDNA 2 μL、双蒸水 6 μL。反应条件:95 ℃ 10 min;95 ℃ 10 s,60 ℃ 20 s,72 ℃ 15 s,共 40 个循环。每个检验指标设 3 个复孔,使用 2^{-ΔΔCt}法定量 miRNA 和 mRNA 的相对表达水平。

1.5 细胞转染 培养 SMMC-7721 细胞生长至约 60% 融合时,按照 EndoFectionTM-Max 试剂盒说明书将 miR-340 模拟质粒及其对照质粒、miR-340 抑制质粒及其对照质粒分别转入细胞内。培养 6 h 后更换新鲜培养液,在 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养 24~72 h,收集各组细胞进行下一步实验。

1.6 CCK-8 实验检测细胞增殖 将 SMMC-7721 细胞以 1×10⁵/孔的密度接种于 96 孔板,转染成功后分别在培养 24、48、72 h 时每孔加入含 10% CCK-8 反应液的培养液 100 μL,等待对照孔光密度(D)值达到 1 时,在 450 nm 处检测实验孔的 D 值。细胞存活率(%)=[(实验孔 D 值-空白孔 D 值)/(对照孔 D 值-空白孔 D 值)]×100%。每一时间点设 5 个平行孔。

1.7 流式细胞术检测细胞凋亡 按照细胞凋亡检测试剂盒要求收集 miR-340 模拟质粒组、miR-340 模拟对照质粒组、miR-340 抑制质粒组、miR-340 抑制对照质粒组 SMMC-7721 细胞。PBS 洗涤 2 次,用 500 μL PBS 重悬细胞后转入 1.5 mL EP 管。用预冷的 PBS 离心洗涤细胞 2 次,弃上清。用双蒸水稀释 5×结合缓冲液为 1×工作液,取适量预冷的 1×工作液重悬细胞沉淀使细胞密度为 1×10⁶~1×10⁷/mL,每个样品管中加入 100 μL 细胞悬液。miR-340 模拟质粒组、miR-340 模拟对照质粒组样品管加入 5 μL Annexin V-PE 和 10 μL 7-AAD。MiR-340 抑制质粒组、miR-340 抑制对照质粒组样品管加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI。轻柔漩涡混匀后,室温避光孵育 5~15 min。无需洗涤,miR-340 模拟质粒组和 miR-340 模拟对照质粒组样

品管中再加入 380 μ L 预冷的 1 \times 工作液。最后用美国 BD 公司 Influx Flow Cytometer & Cell Sorter 系统检测细胞凋亡情况。

1.8 生物信息学检测 运用 miRNA 靶基因在线预测软件 PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>)、miRBase (<http://www.mirbase.org>)、TargetScanHuman (<http://www.targetscan.org>)进行预测,将得到的 3 个软件中至少 2 个有交集且与细胞增殖和凋亡有关的蛋白质的编码基因作为 miR-340 可能的靶基因。

1.9 蛋白质印迹法检测 miR-340 下游可能靶蛋白 SKP2 的表达 按照蛋白质印迹检测试剂盒要求提取细胞总蛋白,用 BCA 试剂盒进行蛋白质定量。使用 10% SDS-PAGE 分离蛋白并转移至 PVDF 膜上,用 8%脱脂奶粉溶液封闭 1 h。加入按 1:500 稀释的一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次,每次 10 min;加入 1:8 000 稀释的二抗,常温孵育 180 min。TBST 洗涤 3 次,进行化学发光反应并采集图像。

1.10 统计学处理 所有实验均重复 3 次。应用 SPSS 19.0 软件分析数据。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,5 种细胞间 miR-340 表达差异的比较采用单因素方差分析,两组间的比较采用 *t* 检验。MiR-340 表达(以 miR-340 相对表达的平均值为界,高于平均值为高表达,低于平均值为低表达)与临床病理指标的关系采用 χ^2 检验进行分析。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 癌及癌旁组织中 miR-340 的表达及其与临床病理指标的关系 癌组织中 miR-340 的表达水平(0.03 \pm 0.02)低于癌旁组织(0.07 \pm 0.02, $P<0.01$)。以 miR-340 相对表达量的平均值(0.39 \pm 0.18)为界,21 例患者的 miR-340 低表达,19 例为高表达。由表 1 可见,乙肝表面抗原阳性、HBV DNA 载量 $\geq 1.0 \times 10^3$ U/mL、肿瘤大小 ≥ 5 cm 和高 TNM 分期的 HCC 患者多呈现 miR-340 低表达($P<0.01$)。表明 miR-340 可能参与 HCC 的形成,其表达可能受乙肝病毒影响,且 miR-340 表达水平可能与 HCC 病情的严重程度相关。

2.2 不同肝癌细胞和正常肝细胞中 miR-340 的表达 qPCR 结果(图 1)显示 4 种肝癌细胞株中 miR-340 的表达均低于正常肝细胞 HL-7702($P<0.05$, $P<0.01$),其中 miR-340 在 SMMC-7721 细胞中的表达最低,因此选取该细胞开展后续细胞增殖和凋亡实验。

表 1 HCC 患者 miR-340 的表达与临床病理指标的关系

Tab 1 Relationship between miR-340 expression and clinicopathological factors in HCC patients

Factor	MiR-340 expression		χ^2 value	P value
	Low N=21	High N=19		
Age			0.902	0.342
<40 years	3	1		
≥ 40 years	18	18		
Gender			1.711	0.191
Male	18	13		
Female	3	6		
HBsAg			8.827	0.003
+	19	9		
-	2	10		
HBV DNA			8.120	0.004
$<1.0 \times 10^3$ U/mL	6	14		
$\geq 1.0 \times 10^3$ U/mL	15	5		
AFP			2.489	0.115
<400 μ g/L	13	16		
≥ 400 μ g/L	8	3		
ALT			0.973	0.324
<40 U/L	11	7		
≥ 40 U/L	10	12		
AST			0.186	0.666
<40 U/L	8	6		
≥ 40 U/L	13	13		
Tumor size			7.977	0.005
<5 cm	1	8		
≥ 5 cm	20	11		
Cirrhosis			2.525	0.112
Yes	17	11		
No	4	8		
TNM stage			9.495	0.009
I	0	4		
II	2	6		
III	19	9		

miR-340: MicroRNA-340; HCC: Hepatocellular carcinoma; HBsAg: Hepatitis B surface antigen; HBV DNA: Hepatitis B virus DNA; AFP: α -Fetoprotein; ALT: Alanine aminotransferase; AST: Aspartate aminotransferase

2.3 MiR-340 对 SMMC-7721 细胞增殖和凋亡的影响 qPCR 检测转染后 SMMC-7721 细胞内的 miR-340 的表达水平,结果(图 2A)显示转染 miR-340 模拟质粒后 SMMC-7721 细胞中 miR-340 的表达高于转染了 miR-340 模拟对照质粒的细胞,转染了 miR-340 抑制质粒后 miR-340 的表达低于转染了 miR-340 抑制对照质粒的细胞($P<0.05$)。CCK-8 细胞增殖实验结果(图 2B、2C)显示,转染了 miR-340 模拟质粒后 SMMC-7721 细胞的存活率较转染 miR-340 模拟对照质粒的细胞降低,而转染 miR-340 抑制质粒的细胞存活率较转染 miR-340 抑制对照质粒的细胞升高($P<0.05$, $P<0.01$)。流式细胞术结果(图 3)显示,与转染 miR-340 模拟对照质粒的细胞相比,转染 miR-340

模拟质粒后 SMMC-7721 细胞的凋亡率增加 ($P < 0.01$), 而转染 miR-340 抑制质粒的 SMMC-7721 细胞的凋亡率与转染 miR-340 抑制对照质粒的细胞相比下降 ($P < 0.01$)。上述结果表明, miR-340 能够抑制 SMMC-7721 细胞的增殖并促进凋亡。

2.4 MiR-340 对 SKP2 mRNA 和蛋白表达的影响 运用生物信息学技术发现, 3 个软件中至少 2 个有交集, 与细胞增殖、凋亡有关的蛋白质 SKP2 的编码基因可能是 miR-340 的靶基因。SKP2 的 3' UTR 具有 1 个 miR-340 的结合位点, 即“种子序列”完全互补(图 4), 提示 SKP2 基因 3' UTR 与 miR-340 具有较强的结合性。进一步验证 miR-340 是否会对 SKP2 表达具有抑制作用, 结果(图 5)显示转染 miR-340 模拟质粒后 SMMC-7721 细胞中 SKP2 mRNA 和蛋白质的表达均较转染 miR-340 模拟对照质粒的细胞降低 ($P < 0.05$), 而转染了 miR-340 抑制质粒后 SMMC-7721 细胞中 SKP2 mRNA 和蛋白的表达均较

转染 miR-340 抑制对照质粒的细胞升高 ($P < 0.05$)。表明 miR-340 能够抑制 SKP2 的表达, 而这一抑制作用也许是通过 miR-340 与 SKP2 的靶向结合而实现的。

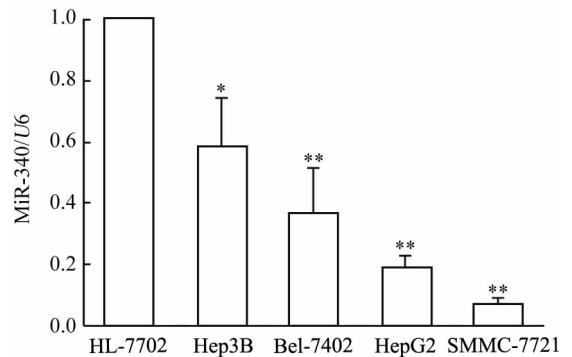


图 1 qPCR 检测肝癌细胞和正常肝细胞中 microRNA-340 (miR-340) 的表达

Fig 1 Expression of microRNA-340 (miR-340) in hepatoma cell lines and normal hepatocyte by qPCR

Hep3B, Bel-7402, HepG2 and SMMC-7721 are hepatoma cell lines, and HL-7702 is normal hepatocyte. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs HL-7702 cells. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

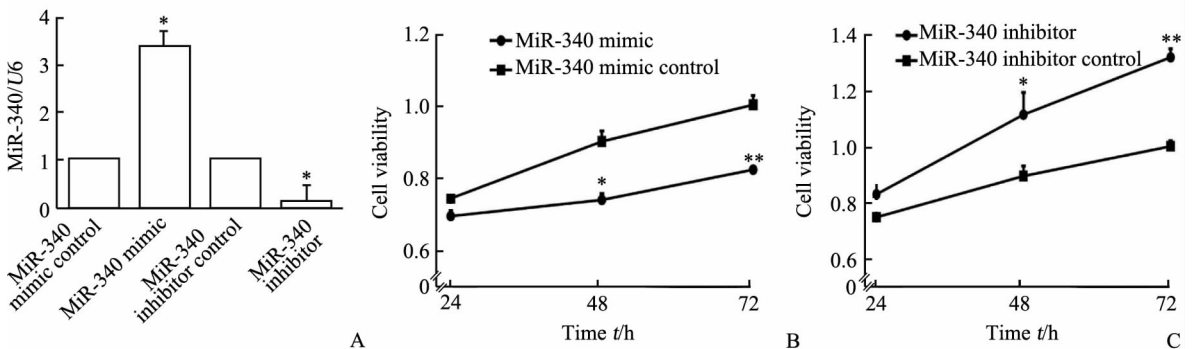


图 2 增加和抑制 microRNA-340 (miR-340) 表达对 SMMC-7721 细胞增殖的影响

Fig 2 Effects of overexpression or suppression of microRNA-340 (miR-340) on proliferation of SMMC-7721 cells

A: Transfection efficiency of miR-340 in SMMC-7721 cells transfected with miR-340 eukaryotic expression vector by qPCR; B: Overexpression of miR-340 significantly inhibits the viability of SMMC-7721 cells at different time points; C: Suppression of miR-340 significantly increases the viability of SMMC-7721 cells at different time points. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the corresponding control group. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

MiRNA 通过翻译后修饰在人类肿瘤的发生、发展过程中发挥重要的作用, 其既可是致癌基因也可是抑癌基因, 同时也可作为肿瘤的治疗靶点和肿瘤患者预后的评价指标。例如, miRNA 在诱发人类癌症发生过程中起关键抑制作用的第 1 个证据来自于对慢性淋巴细胞白血病中染色体 13q14 上 2 个编码区域缺失的研究, 而这 2 个区域正是编码 miR-15a 和 miR-16-1 的位置^[8]; 至于 miRNA 所起的致癌基因的作用, 较早得出确定结论的便是 miR-155 的过表达会导致 B 细胞淋巴瘤、乳腺癌、肺癌和甲状腺

癌^[9-10]; 而 miR-125 则能在乳腺癌中发挥重要的抑制癌细胞侵袭和转移的作用^[11]; 在非小细胞肺癌中, let-7 的减少与较差的预后和较短的患者术后生存期密切相关^[12]。本研究发现 miR-340 在 4 种肝癌细胞中的表达较正常肝细胞均降低。同时, 在 40 对 HCC 标本中, 癌旁组织中 miR-340 的表达均高于癌组织。统计学分析表明, 乙肝表面抗原阳性的患者或者是 HBV DNA 载量大于正常值的患者往往表现出更低的 miR-340 水平; 此外, 如果患者具有更高的 TNM 分期或者是更大的肿瘤 (≥ 5 cm), 那么这些患者也表现出更低的 miR-340 水平。这些结果表明 miR-340 可能与乙型病毒性肝炎的感染有关。

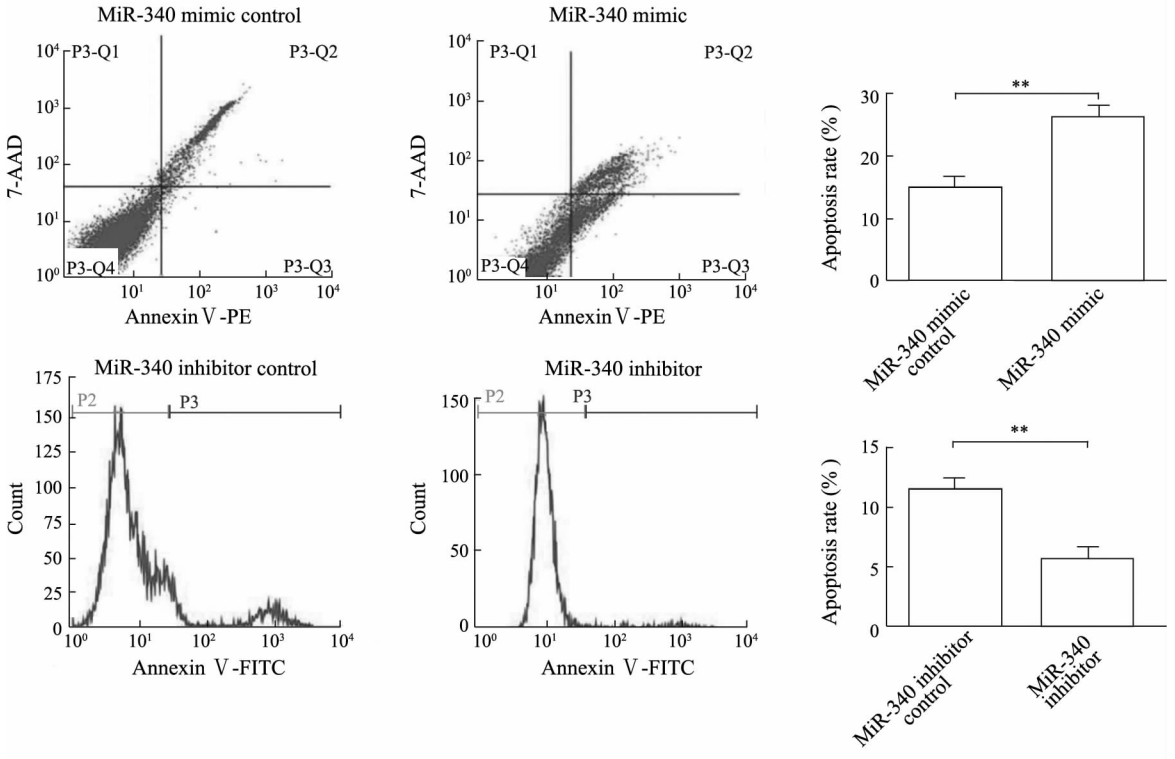


图3 MicroRNA-340(miR-340)表达增加和抑制对SMMC-7721细胞凋亡的影响

Fig 3 Effects of overexpression or suppression of microRNA-340 (miR-340) on apoptosis of SMMC-7721 cells by flow cytometry

** $P < 0.01$, $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

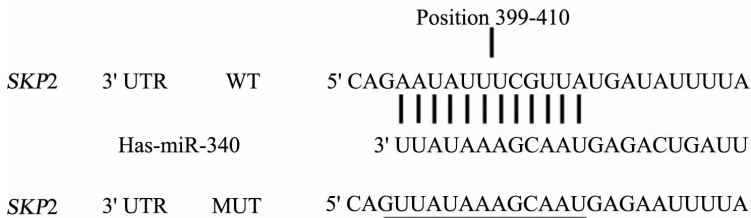


图4 MicroRNA-340(miR-340)与S期激酶相关蛋白2(SK P2)基因的靶向结合位点

Fig 4 Targeted combination of microRNA-340 (miR-340) and S-phase kinase associated protein 2 (SKP2) gene

UTR: Untranslated regions; WT: Wild type; MUT: Mutant type

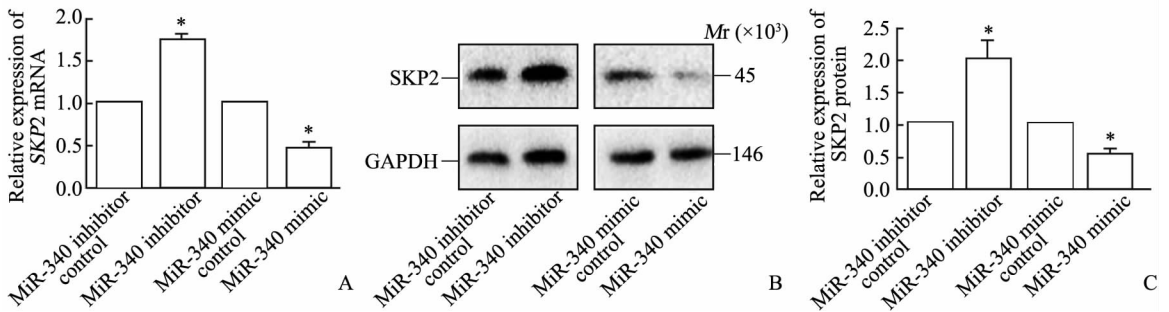


图5 MicroRNA-340 (miR-340)对SKP2表达的影响

Fig 5 Effect of microRNA-340 (miR-340) on SKP2 expression

A: Expression of SKP2 mRNA in SMMC-7721 cells after transfection detected by qPCR; B, C: Expression of SKP2 protein in SMMC-7721 cells after transfection detected by Western blotting. SKP2: S-phase kinase-associated protein 2. * $P < 0.05$ vs the corresponding control group.

$n = 3$, $\bar{x} \pm s$

研究表明乙型肝炎病毒 X 蛋白 (HBx) 能够激活 NF- κ B, 后者能够结合到相应 miRNA 的启动子区域或增强子区域进而对 miRNA 产生反式激活作用^[13], 因此可能是类似上述机制导致了 miR-340 的异常表达, 从而导致 HCC 的发生和发展, 但这需要进一步研究。在生物学功能方面, miR-340 明显抑制了 SMMC-7721 细胞的增殖, 并且诱导了其凋亡。这表明在 HCC 中 miR-340 是作为一种抑癌基因发挥作用的。生物信息学软件预测结果显示 SKP2 是 miR-340 的靶蛋白。研究表明, SKP2 在晚期肝癌患者癌组织中的表达升高, 并且 SKP2 的过表达与患者更差的预后有关^[14]。qPCR 和蛋白质印迹分析结果表明 miR-340 的增加会抑制 SKP2 mRNA 和蛋白质的表达, 同时抑制 miR-340 会增加 SKP2 mRNA 和蛋白质的表达。提示 miR-340 可能通过靶向结合 SKP2 或复合体的形式发挥作用。

本研究表明 miR-340 在 HCC 中可以抑制细胞增殖并促进凋亡, 而这一作用的机制可能与 miR-340 抑制了 SKP2 的表达有关, 但是 miR-340 抑制 SKP2 的机制是特异性的靶向作用还是以复合体的形式发挥作用还需要进一步研究。本研究发现 miR-340 的表达量与 HBV 感染密切相关并且在 HCC 患者的癌组织以及癌旁组织中的表达有明显的差异, 因此我们推测可能是由于 HBV 的感染导致抑癌基因 miR-340 的异常表达进而引发肝细胞向恶性转化, 而 HCC 患者异常表达的 miR-340 的量也许能够作为一个预测 HCC 患者病情和预后的指标, 但这一结论还需要进一步的实验和大样本的统计分析。

[参考文献]

[1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, FERLAY J, LORTET-TIEULENT J, JEMAL A. Global cancer statistics, 2012[J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65: 87-108.

[2] McGLYNN K A, PETRICK J L, LONDON W T. Global epidemiology of hepatocellular carcinoma: an emphasis on demographic and regional variability[J]. *Clin Liver Dis*, 2015, 19: 223-238.

[3] TAKEYAMA H, YAMAMOTO H, YAMASHITA S, WU X, TAKAHASHI H, NISHIMURA J, et al. Decreased miR-340 expression in bone marrow is associated with liver metastasis of colorectal cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2014, 13: 976-985.

[4] LI P, SUN Y, LIU Q. MicroRNA-340 induces apoptosis and inhibits metastasis of ovarian cancer cells by inactivation of NF- κ B1[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38: 1915-1927.

[5] MOHAMMADI-YEGANEH S, PARYAN M, AREFIAN E, VASEI M, GHANBARIAN H, MAHDIAN R, et al. MicroRNA-340 inhibits the migration, invasion, and metastasis of breast cancer cells by targeting Wnt pathway[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37: 8993-9000.

[6] SUN Y, ZHAO X, ZHOU Y, HU Y. miR-124, miR-137 and miR-340 regulate colorectal cancer growth via inhibition of the Warburg effect[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28: 1346-1352.

[7] XU P, LI Y, ZHANG H, LI M, ZHU H. MicroRNA-340 mediates metabolic shift in oral squamous cell carcinoma by targeting glucose transporter-1[J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2016, 74: 844-850.

[8] CALING A, DUMITRU C D, SHIMIZU M, BICHI R, ZUPO S, NOCH E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 15524-15529.

[9] COSTINEANS, ZANESI N, PEKARSKY Y, TILI E, VOLINIA S, HEEREMA N, et al. Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E μ -miR155 transgenic mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 7024-7029.

[10] NEGRINI M, FERRACIN M, SABBIONI S, CROCE C M. MicroRNAs in human cancer: from research to therapy[J]. *J Cell Sci*, 2007, 120: 1833-1840.

[11] SCOTT G K, GOGA A, BHAUMIK D, BERGER C E, SULLIVAN C S, BENZ C C. Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 1479-1486.

[12] TAKAMIZAWA J, KONISHI H, YANAGISAWA K, TOMIDA S, OSADA H, ENDOH H, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival[J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 3753-3756.

[13] ZHANG X, LIU S, HU T, LIU S, HE Y, SUN S. Up-regulated microRNA-143 transcribed by nuclear factor kappa B enhances hepatocarcinoma metastasis by repressing fibronectin expression [J]. *Hepatology*, 2009, 50: 490-499.

[14] LEE S W, LI C F, JIN G, CAI Z, HAN F, CHAN C H, et al. Skp2-dependent ubiquitination and activation of LKB1 is essential for cancer cell survival under energy stress[J]. *Mol Cell*, 2015, 57: 1022-1033.