

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20211034

· 论 著 ·

乙型肝炎病毒 X 蛋白下调 miRNA-544-3p 并激活 Arf6/Akt-mTOR 信号轴促进肝脏细胞迁移和侵袭

况 钦, 吴 勇, 杜 彬, 毋 楠, 周梦瑶, 杨鑫玥, 卢 杨, 冯 涛*

重庆医科大学药学院、重庆市生化与分子药理学重点实验室, 重庆 400016

[摘要] **目的** 探讨 miRNA-544-3p 对乙型肝炎病毒 X 蛋白 (HBx) 诱导的肝细胞癌的影响及分子机制。**方法** 培养含增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 和 HBx 的慢病毒稳转小鼠永生体肝前体细胞株 14-19 (HBx-EGFP-14-19 细胞), 并通过向昆明小鼠肝门静脉注射上述细胞构建可长期稳定表达 HBx 的模型, 采用 qPCR 检测 miRNA-544-3p 在 HBx-EGFP-14-19 细胞及小鼠模型肝组织中的表达。在 HBx-EGFP-14-19 细胞中瞬时转染 miRNA-544-3p 模拟物 (mimic) 或抑制剂 (inhibitor), 应用划痕愈合实验、Transwell 细胞迁移和侵袭实验检测 miRNA-544-3p 对 HBx-EGFP-14-19 细胞迁移和侵袭的影响, 采用 qPCR 和蛋白质印迹法探究 miRNA-544-3p 对二磷酸腺苷核糖基化因子 6 (Arf6)、Akt、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 表达的调控作用。**结果** 成功构建了可长期稳定表达 HBx 的小鼠模型, 该小鼠在造模后 360 d 处死时可见肝组织有恶性肿瘤生成。与对照组相比, HBx-EGFP-14-19 细胞和 HBx 模型小鼠各时间点 (造模后 30、90、180、360 d) 肝组织中 miRNA-544-3p 表达水平均降低 (P 均 < 0.05)。与对照组比较, 转染 miRNA-544-3p mimic 的 HBx-EGFP-14-19 细胞迁移和侵袭能力均降低, 转染 miRNA-544-3p inhibitor 的 HBx-EGFP-14-19 细胞迁移和侵袭能力均增强 (P 均 < 0.05)。qPCR 和蛋白质印迹法检测结果显示 miRNA-544-3p 低表达与 Arf6 表达水平上调、Akt-mTOR 信号轴的激活有关。**结论** HBx 可能通过下调 miRNA-544-3p 激活 Arf6/Akt-mTOR 信号轴促进小鼠肝癌细胞的侵袭和迁移能力。

[关键词] 乙型肝炎病毒 X 蛋白; 肝细胞癌; miRNA-544-3p; 二磷酸腺苷核糖基化因子 6; 蛋白激酶 B; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

[中图分类号] R 735.7

[文献标志码] A

[文章编号] 2097-1338(2022)06-0604-10

Hepatitis B virus X protein downregulates microRNA-544-3p and activates the Arf6/Akt-mTOR signaling axis to promote liver cell migration and invasion

KUANG Qin, WU Yong, DU Bin, WU Nan, ZHOU Meng-yao, YANG Xin-yue, LU Yang, FENG Tao*

School of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of microRNA (miRNA)-544-3p on hepatitis B virus X protein (HBx) induced hepatocellular carcinoma and its molecular mechanism. **Methods** By injecting HBx-enhanced green fluorescent protein (EGFP)-14-19 cells into the hepatic portal vein of Kunming mice, an animal model with long-term stable expression of HBx was constructed. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used to detect the expression of miRNA-544-3p in HBx-EGFP-14-19 cells and liver tissues of mouse models. miRNA-544-3p mimics and inhibitors were transiently transfected into HBx-EGFP-14-19 cells. The effects of miRNA-544-3p on the migration and invasion of HBx-EGFP-14-19 cells were detected by scratch wound healing assay and Transwell cell migration and invasion assay. qPCR and Western blotting were used to explore the regulatory effect of miRNA-544-3p on the expression of adenosine diphosphate ribosylation factor 6 (Arf6), protein kinase B (Akt) and mammalian target of rapamycin (mTOR). **Results** A mouse model that can stably express HBx for a long time was successfully constructed, and malignant tumors could be found in the liver tissues when the mice were sacrificed 360 d after modeling. Compared with the control group, the expression levels of miRNA-544-3p in HBx-EGFP-14-19 cells and HBx model mice at different time points (30, 90, 180, and 360 d after modeling) were decreased (all $P < 0.05$). Compared with the control group, the migration and invasion abilities of HBx-EGFP-14-19 cells transfected with miRNA-544-3p mimics were decreased, and the migration and invasion abilities of HBx-EGFP-14-19 cells transfected with miRNA-544-3p inhibitors were increased (all

[收稿日期] 2021-10-15 [接受日期] 2022-02-24

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (81071770). Supported by General Program of National Natural Science Foundation of China (81071770).

[作者简介] 况 钦, 硕士生. E-mail: 1074638676@qq.com

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 023-65714455, E-mail: 100733@cqmu.edu.cn

$P < 0.05$). The results of qPCR and Western blotting showed that the low expression of miRNA-544-3p was correlated with the up-regulation of Arf6 expression and the activation of Akt-mTOR signal axis. **Conclusion** HBx may promote the invasion and migration of mouse hepatocarcinoma cells by downregulating miRNA-544-3p and activating Arf6/Akt-mTOR signal axis.

[**Key words**] hepatitis B virus X protein; hepatocellular carcinoma; microRNA-544-3p; adenosine diphosphate ribosylation factor 6; protein kinase B; mammalian target of rapamycin

[Acad J Naval Med Univ, 2022, 43(6): 604-613]

HBV 感染是全球性的公共卫生问题。在我国, 约 85% 的肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 患者有 HBV 感染史^[1]。与未感染人群相比, 慢性 HBV 携带者患 HCC 的终身风险要高 15~25 倍^[2-3]。HBV-HCC 具有起病隐匿、病程进展迅速、缺乏治愈方法等特点, 是预后极差的恶性肿瘤之一。乙型肝炎病毒 X 蛋白 (hepatitis B virus X protein, HBx) 是 HBV 发挥作用的核心功能蛋白, 在 HBV-HCC 的发生、发展中起着重要作用^[4]。

miRNA 是一类长约 19~24 nt 的内源非编码单链 RNA, 广泛存在于动物、植物及各种微生物中。它可以通过完全或不完美匹配的方式识别并结合靶基因的 3'-非翻译区 (untranslated region, UTR), 发挥对靶基因的转录后调控效应, 进而参与早期胚胎发育及细胞的生长、分化、凋亡等生命活动^[5-6]。miRNA 的突变、缺失或表达异常与疾病的发生密切相关, 参与了肿瘤的发生、发展、转移、血管生成和耐药^[7-8]。研究发现, HBx 能够通过调节 miRNA 影响肝癌细胞的增殖、凋亡、迁移、侵袭、自噬、炎症等多种生物学过程, 从而促进 HBV-HCC 的发展^[9-12]。

本课题组前期利用小鼠永生肝前体细胞构建了能够长期稳定表达 HBx 且免疫系统正常的小鼠模型, 且在 360 d 的模型小鼠肝脏中发现了癌变组织^[13-14]。本研究以 miRNA 为着眼点, 利用肿瘤基因组数据库资料分析肝癌组织中差异表达的 miRNA, 并选择性检测了 miRNA-544-3p 在稳定表达 HBx 的永生肝前体细胞中和小鼠模型体内的表达情况, 进一步通过干扰 miRNA-544-3p 以探究细胞侵袭、迁移能力的变化和靶向调控机制, 为 HBV-HCC 的治疗提供新的靶点。

1 材料和方法

1.1 细胞株和小鼠 小鼠永生肝前体细胞株 14-19 由美国芝加哥大学分子肿瘤研究中心惠赠, 该细胞株细胞呈集落样生长, 体积较小, 呈多边

形, 核质比例高, 增殖旺盛, 诱导后可分化为成熟的肝细胞, 且连续传代 50 代细胞特性无明显改变^[13]。含增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 的慢病毒稳转细胞株 EGFP-14-19 及含 HBx 和 EGFP 的慢病毒稳转细胞株 HBx-EGFP-14-19 由本课题组前期构建并保存^[13-14]。

6~8 周龄雄性昆明小鼠购于重庆医科大学实验动物中心 [动物生产许可证号: SCXK (渝) 2018-0003], 体重 25 g 左右, 代养于 SPF 级实验动物饲养室。

1.2 主要试剂 DMEM (美国 Gibco 公司); FBS [赛尔博克斯生物制品 (香港) 贸易有限公司]; 超纯总 RNA 提取试剂盒、RNA 反转录试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司); SYBR Green qPCR Mix 试剂盒 (美国 Bimake 公司); 兔抗小鼠 HBx 抗体 (英国 Abcam 公司); 兔抗小鼠二磷酸腺苷核糖基化因子 6 (adenosine diphosphate ribosylation factor 6, Arf6) 抗体 (上海泊湾生物科技有限公司); 兔抗小鼠 Akt 抗体、磷酸化 Akt (phosphorylated Akt, p-Akt) 抗体、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 抗体、磷酸化 mTOR (phosphorylated mTOR, p-mTOR) 抗体及 GAPDH 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司); SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、HRP 标记的二抗 (上海碧云天生物技术有限公司); ECL 显影液 (成都正能生物技术有限责任公司); EndoFectinTM-Max 转染试剂盒 (美国 GeneCopoeia 公司); miRNA-544-3p 模拟物 (mimic)、抑制剂 (inhibitor)、激动剂 (agomir)、拮抗剂 (antagomir) 及各自的阴性对照 (negative control, NC) 均购自上海吉荧生物技术有限公司。

1.3 细胞培养与转染 将冻存于液氮的细胞取出后于 37 °C 水浴中快速解冻、离心后弃上清, 加入 1 mL 含 10% FBS 的 DMEM, 吹打混匀后均匀滴在无菌培养皿中, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h,

待细胞贴壁完全后换液。当细胞融合度达80%时传代,取对数生长期的细胞用于后续实验。

将处于对数生长期的HBx-EGFP-14-19细胞接种于6孔板中,常规培养。待细胞融合度达80%时,更换为无血清培养基同步化12 h,随后分为空白对照组、miRNA-544-3p NC-mimic组、miRNA-544-3p mimic组、miRNA-544-3p NC-inhibitor组、miRNA-544-3p inhibitor组,其中空白对照组不进行转染,其他4组分别进行相应的转染。所有转染均按照EndoFectin™-Max转染试剂盒说明书进行操作,转染24 h后的细胞即可用于后续实验。

1.4 动物模型构建 雄性昆明小鼠45只,随机分为生理盐水组($n=5$)、EGFP-14-19组($n=5$)和HBx-EGFP-14-19组($n=35$)。小鼠术前禁食12 h,腹腔注射2%戊巴比妥钠麻醉后置于超净台中,取仰卧位,腹部经乙醇消毒后在剑突下行2 cm纵向切口,打开腹腔。用湿润棉签掀起肝叶,暴露肝门静脉。按分组情况分别从肝门静脉注入生理盐水(200 μ L)、EGFP-14-19或HBx-EGFP-14-19细胞悬液(200 μ L,含 5×10^5 个细胞,提前消化在PBS中),止血完毕后,关腹缝合。术后小鼠自由饮水进食。

HBx-EGFP-14-19模型组取20只随机分为4个亚组($n=5$),分别于造模后30、90、180、360 d腹腔注射2%戊巴比妥钠麻醉,将小鼠置于高浓度一氧化碳环境中处死。取小鼠肝脏储存于 -80 °C冰箱中,用于后续实验。

另取HBx-EGFP-14-19组剩余15只小鼠(于造模后30 d处死)随机分为5个亚组($n=3$),于处死前1周经尾静脉分别注射生理盐水、miRNA-544-3p NC-agomir、miRNA-544-3p agomir、miRNA-544-3p NC-antagomir、miRNA-544-3p antagomir。给药1周后腹腔注射2%戊巴比妥钠麻醉小鼠,置于高浓度一氧化碳环境中处死。取小鼠肝脏储存于 -80 °C冰箱中,用于后续实验。

1.5 生物信息学分析 利用TargetScan生物信息学网站(https://www.targetscan.org/vert_72/)预测miRNA-544-3p的靶基因。

1.6 qPCR检测miRNA-544-3p和目的基因的表达 采用TRIzol法提取细胞和小鼠肝组织中总RNA,按反转录试剂盒说明书的步骤将RNA反转录为cDNA,使用NanoDrop 2000超微量核酸蛋白测定仪(美国ThermoFisher公司)进行RNA浓

度和纯度检测。引物设计与合成均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。引物序列:HBx正向引物5'-TGCGGACGACCCTTCTCGGG-3',反向引物5'-GGGCAACATTCGGTGGGCGT-3'; miRNA-544-3p正向引物5'-AGGGGATTCTGCA-TTTTTAGC-3',反向引物5'-GTTGTGGTTGGTT-GTTTGT-3'; Arf6正向引物5'-GTCTGATCTT-CGTGGTAGACTG-3',反向引物5'-CTCATCTCC-CGGTCATTGATAA-3'; U6正向引物5'-AGAGA-AGATTAGCATGGCCCCTG-3',反向引物5'-ATC-CAGTGCAGGGTCCGAGG-3'; GAPDH正向引物5'-CTCGTCCCGTAGACAAAATGGT-3',反向引物5'-GAGGTCAATGAAGGGGTCGTT-3'。按照SYBR Green qPCR Mix试剂盒说明书进行操作,每个样本设置3个复孔。

1.7 蛋白质印迹法检测目的蛋白的表达 分离细胞和小鼠肝组织中总蛋白并煮沸变性,采用BCA蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度。每组取30 μ g蛋白进行10% SDS-PAGE分离,然后将蛋白转移到PVDF膜上,在脱脂奶粉溶液中封闭2 h后,放入一抗中于4 °C孵育过夜,再在HRP标记的二抗中室温孵育2 h,加入ECL显影液并在显影仪中观察目的蛋白的表达。采用ImageJ软件进行数据分析,以GAPDH为内参计算目的蛋白的相对表达量。

1.8 免疫组织化学法检测小鼠肝组织中HBx的表达 将新鲜肝组织浸泡于4%多聚甲醛中固定,石蜡包埋,切片后按照S-P法进行免疫组织化学染色,光镜下观察并拍照。

1.9 H-E染色观察小鼠肝组织病理学改变 取造模后360 d处死的小鼠肝组织,固定、切片,常规进行H-E染色,用中性树脂封片,光镜下观察并拍照。

1.10 划痕愈合实验检测细胞的迁移能力 将处于对数生长期的细胞在无血清培养基中培养12 h,用1 000 μ L枪头在培养孔中划痕,每孔划3条。用PBS洗涤3次以除去漂浮的细胞。分别于培养0 h和24 h拍照,用ImageJ软件进行数据分析,计算细胞划痕愈合率。细胞划痕愈合率(%) = $(A_{0h} - A_{24h}) / A_{0h} \times 100\%$,其中 A_{0h} 为0 h时的划痕面积, A_{24h} 为培养24 h时的划痕面积。

1.11 Transwell实验检测细胞的迁移和侵袭能力 细胞迁移实验:将处于对数生长期的细胞在无血清培养基中培养12 h,分别取 2×10^4 个细胞均匀接种于各Transwell小室上室中(含200 μ L无

血清培养基),下室加入 750 μL 含 20% FBS 的培养基。培养 24 h 后吸去培养基,将小室放入 PBS 中洗涤 2 次,用 4% 多聚甲醛室温固定 20 min;用 0.1% 结晶紫室温染色 30 min, PBS 洗涤 2 次后用棉签轻轻擦去上室内的细胞。在显微镜下观察,随机选取 5 个视野拍照并计数。

细胞侵袭实验: 将基质胶与不含血清的培养基以 1 : 10 的比例稀释,各 Transwell 小室中均加入 70 μL 稀释胶,凝固后接种细胞,后续步骤同细胞迁移实验。

1.12 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用最小显著性差异法。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 小鼠永生化肝前体细胞中 HBx 的表达 qPCR 检测结果显示,HBx-EGFP-14-19 细胞中 HBx mRNA 相对表达量为 $11\,922.37 \pm 2\,496.61$,高于 14-19 细胞 (相对表达量为 0.52 ± 1.17) 和 EGFP-14-19 细胞 (相对表达量为 0.20 ± 0.95),差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。蛋白质印迹法检测结果显示,只有 HBx-EGFP-14-19 细胞中有 HBx 表达 (图 1),证明 HBx 在 14-19 细胞中表达成功。

2.2 动物模型的鉴定

2.2.1 小鼠肝组织中 HBx 的表达 qPCR 检测结果显示,HBx-EGFP-14-19 组小鼠造模后 30、90、180、360 d 肝组织中 HBx mRNA 相对表达量分别为 94.56 ± 43.09 、 211.66 ± 37.75 、 176.61 ± 61.44 、 170.13 ± 97.75 ,均高于生理盐水组 (相对表达量为 0.85 ± 0.19) 和 EGFP-14-19 组 (相对表达量为

0.93 ± 0.25),差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。蛋白质印迹法检测结果显示,HBx-EGFP-14-19 组小鼠造模后 30、90、180、360 d 肝组织中均有 HBx 蛋白表达 (图 2)。免疫组织化学染色结果显示,HBx-EGFP-14-19 组小鼠造模后 30、90、180、360 d 肝组织中均可见 HBx 阳性染色 (图 3)。上述结果表明本实验建立的小鼠模型能持续、稳定表达 HBx。

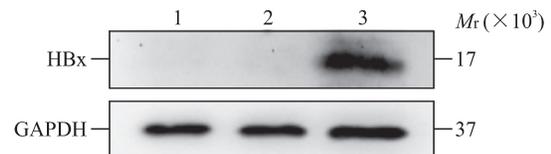


图 1 蛋白质印迹法检测永生化肝前体细胞 14-19 中 HBx 的表达

Fig 1 Expression of HBx in immortalized liver precursor cells 14-19 detected by Western blotting

1: 14-19 cell; 2: EGFP-14-19 cell; 3: HBx-EGFP-14-19 cell. HBx: Hepatitis B virus X protein; EGFP: Enhanced green fluorescent protein; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

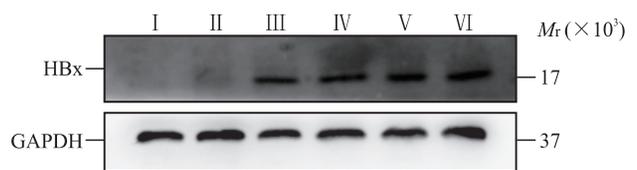


图 2 蛋白质印迹法检测小鼠肝组织中 HBx 的表达
Fig 2 Expression of HBx in mouse liver tissues detected by Western blotting

I : Normal saline group; II : EGFP-14-19 group; III - VI: HBx-EGFP-14-19 groups 30, 90, 180, and 360 d after modeling, respectively. HBx: Hepatitis B virus X protein; EGFP: Enhanced green fluorescent protein; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

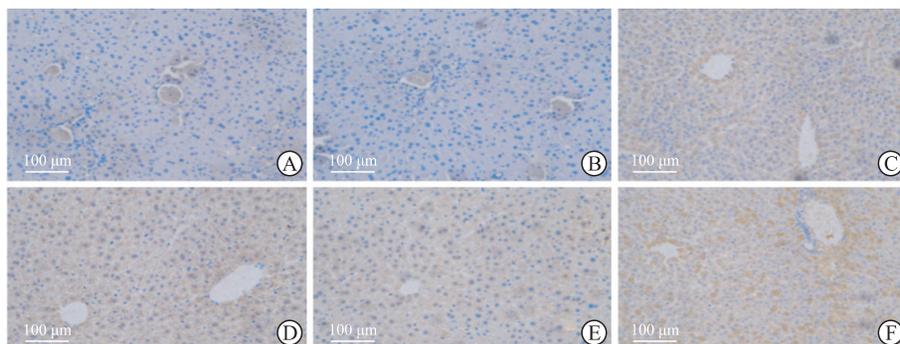


图 3 免疫组织化学染色法检测小鼠肝组织中 HBx 的表达

Fig 3 Expression of HBx in mouse liver tissues detected by immunohistochemical staining

A: Normal saline group; B: EGFP-14-19 group; C-F: HBx-EGFP-14-19 groups 30, 90, 180, and 360 d after modeling, respectively. HBx: Hepatitis B virus X protein; EGFP: Enhanced green fluorescent protein.

2.2.2 小鼠肝组织肿瘤鉴定 HBx-EGFP-14-19 组小鼠造模后 360 d 处死时,肝组织可见肿瘤生成(图 4A)。H-E 染色结果(图 4B)显示肝细胞排列异常,呈多行排列;有的细胞增大,且核仁偏大,核质分布异常,核仁明显;有的细胞呈多核,肝组织结构消失。结果表明小鼠肝组织整体呈现坏死状态,病灶处呈纤维化,证明小鼠肝脏发生恶性肿瘤病变。

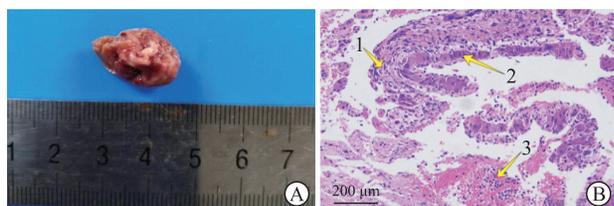


图 4 小鼠肝组织肿瘤形成和 H-E 染色结果

Fig 4 Formation of mouse liver tumor and H-E staining results

A: The liver of mice in 360 d HBx-EGFP-14-19 group had tumor formation; B: The results of H-E staining identified the suspected cancerous lesions in the liver of mice in 360 d HBx-EGFP-14-19 group were tumors. Arrow 1: Hepatocytes were arranged abnormally in multiple rows; Arrow 2: The cells were enlarged, and the nucleoli were obvious and too large, and the distribution of nucleoplasm was abnormal; Arrow 3: The cells were multinucleated and the structure of liver tissues disappeared. H-E: Hematoxylin-eosin; HBx: Hepatitis B virus X protein; EGFP: Enhanced green fluorescent protein.

2.3 HBx 对小鼠永生肝前体细胞和小鼠肝组织中 miRNA-544-3p 表达的影响 14-19 细胞、EGFP-14-19 细胞和 HBx-EGFP-14-19 细胞 miRNA-544-3p 相对表达量分别为 1.66 ± 0.36 、 1.29 ± 0.23 、 0.63 ± 0.11 , HBx-EGFP-14-19 细胞 miRNA-544-3p 表达水平较 14-19 细胞、EGFP-14-19 细胞降低 (P 均 < 0.05)。生理盐水组、EGFP-14-19 组小鼠肝组织中 miRNA-544-3p 相对表达量分别为 1.31 ± 0.31 、 1.27 ± 0.36 , HBx-EGFP-14-19 组小鼠造模后 30、90、180、360 d 肝组织中 miRNA-544-3p 相对表达量分别为 0.70 ± 0.12 、 0.62 ± 0.13 、 0.72 ± 0.24 、 0.85 ± 0.24 , HBx-EGFP-14-19 组小鼠造模后不同时间点肝组织中 miRNA-544-3p 表达均下调 (P 均 < 0.05)。结果表明 HBx 可在体内外将 miRNA-544-3p 的表达维持在较低水平。

2.4 HBx 对小鼠永生肝前体细胞和小鼠肝组织中 Arf6 水平及 Akt-mTOR 通路的影响 TargetScan 预测结果显示, Arf6 为 miRNA-544-3p 的靶基

因。蛋白质印迹法检测结果显示, 14-19 细胞、EGFP-14-19 细胞、HBx-EGFP-14-19 细胞中 Arf6 蛋白相对表达量分别为 1.06 ± 0.05 、 0.91 ± 0.04 、 1.88 ± 0.14 , HBx-EGFP-14-19 细胞中 Arf6 蛋白表达上调 (P 均 < 0.05 , 图 5A); 生理盐水组、EGFP-14-19 组小鼠肝组织中 Arf6 蛋白相对表达量分别为 0.70 ± 0.21 、 0.70 ± 0.51 , HBx-EGFP-14-19 组小鼠造模后 30、90、180、360 d 肝组织中 Arf6 蛋白相对表达量分别为 1.09 ± 0.37 、 1.27 ± 0.69 、 1.11 ± 0.11 、 1.10 ± 0.25 , HBx-EGFP-14-19 组小鼠造模后各时间点肝组织中 Arf6 表达均上调 (P 均 < 0.05 , 图 5B)。qPCR 检测结果显示, HBx-EGFP-14-19 细胞中 Arf6 mRNA 相对表达量 (1.02 ± 0.05) 高于 14-19 细胞 (0.29 ± 0.26) 和 EGFP-14-19 细胞 (0.30 ± 0.30), HBx-EGFP-14-19 组小鼠造模后 30、90、180、360 d 肝组织中 Arf6 mRNA 相对表达量 (分别为 1.40 ± 0.40 、 1.55 ± 0.14 、 1.36 ± 0.29 、 1.62 ± 0.20) 均高于生理盐水组 (0.67 ± 0.21) 和 EGFP-14-19 组 (0.73 ± 0.11 , P 均 < 0.05)。

蛋白质印迹法结果显示, HBx-EGFP-14-19 细胞中 p-Akt 蛋白相对表达量 (0.86 ± 0.19) 高于 14-19 细胞 (0.57 ± 0.31) 和 EGFP-14-19 细胞 (0.43 ± 0.37) (P 均 < 0.05), Akt 蛋白相对表达量 (0.93 ± 0.27) 与 14-19 细胞 (0.90 ± 0.28) 和 EGFP-14-19 细胞 (0.86 ± 0.26) 相比差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05); HBx-EGFP-14-19 细胞中 p-mTOR 蛋白相对表达量 (1.84 ± 0.38) 高于 14-19 细胞 (1.00 ± 0.36) 和 EGFP-14-19 细胞 (1.10 ± 0.71 , P 均 < 0.05), mTOR 蛋白相对表达量 (1.17 ± 0.26) 与 14-19 细胞 (1.19 ± 0.16) 和 EGFP-14-19 细胞 (1.10 ± 0.11) 相比差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05 , 图 5C)。HBx-EGFP-14-19 组小鼠造模后 30、90、180、360 d 肝组织中 p-Akt 蛋白相对表达量 (分别为 0.60 ± 0.37 、 0.73 ± 0.50 、 0.68 ± 0.44 、 0.82 ± 0.49) 均高于生理盐水组 (0.24 ± 0.47) 和 EGFP-14-19 组 (0.39 ± 0.26 , P 均 < 0.05), Akt 蛋白相对表达量 (分别为 0.79 ± 0.43 、 0.90 ± 0.30 、 0.69 ± 0.27 、 0.87 ± 0.38) 与生理盐水组 (0.79 ± 0.58) 和 EGFP-14-19 组 (0.81 ± 0.39) 相比差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05); HBx-EGFP-14-19 组小鼠造模后 30、90、180、360 d 肝组织中 p-mTOR 蛋白相对表达量 (分别为 1.93 ± 0.55 、

2.43±0.75、2.11±0.69、1.90±0.62)均高于生理盐水组(1.25±0.41)和EGFP-14-19组(1.09±0.57, P 均<0.05), mTOR蛋白相对表达量(分别为1.81±

0.47、1.80±0.56、1.87±0.53、1.91±0.40)与生理盐水组(1.74±0.36)和EGFP-14-19组(1.68±0.54)相比差异均无统计学意义(P 均>0.05, 图5D)。

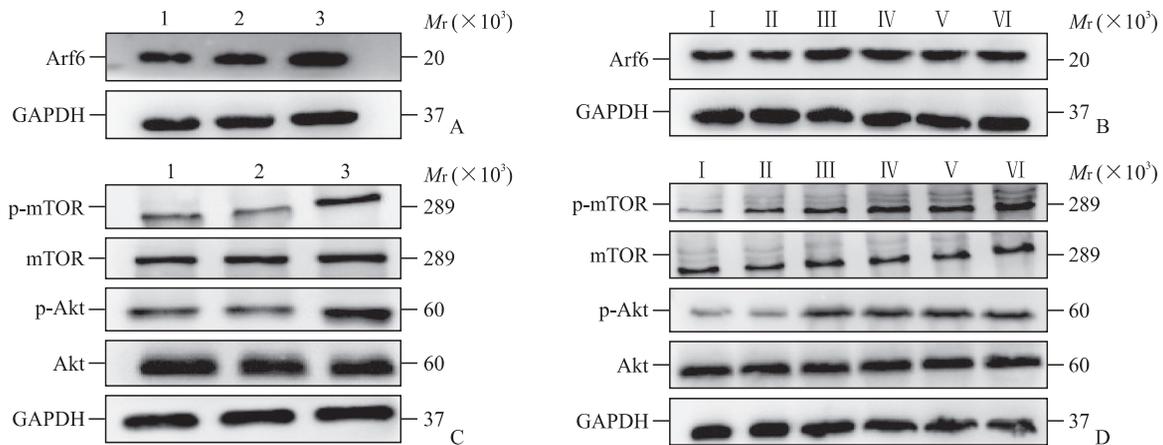


图5 蛋白质印迹法检测各组小鼠永生肝前体细胞14-19和小鼠肝组织中Arf6、Akt、mTOR的表达

Fig 5 Expression of Arf6, Akt, and mTOR in immortalized liver precursor cells 14-19 and liver tissues of mice in each group detected by Western blotting

A: The expression of Arf6 protein in 14-19 cells; B: The expression of Arf6 protein in the liver tissues of mice; C: The expression of Akt and mTOR proteins in 14-19 cells; D: The expression of Akt and mTOR proteins in the liver tissues of mice. 1: 14-19 cell; 2: EGFP-14-19 cell; 3: HBx-EGFP-14-19 cell. I: Normal saline group; II: EGFP-14-19 group; III-VI: HBx-EGFP-14-19 groups 30, 90, 180, and 360 d after modeling, respectively. Arf6: Adenosine diphosphate ribosylation factor 6; Akt: Protein kinase B; mTOR: Mammalian target of rapamycin; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; p-mTOR: Phosphorylated mammalian target of rapamycin; p-Akt: Phosphorylated protein kinase B; HBx: Hepatitis B virus X protein; EGFP: Enhanced green fluorescent protein.

2.5 miRNA-544-3p 转染效率 空白对照组、miRNA-544-3p NC-mimic 组和 miRNA-544-3p NC-inhibitor 组 HBx-EGFP-14-19 细胞中 miRNA-544-3p 相对表达量分别为 0.16±0.03、0.16±0.05 和 0.11±0.06; 与对照组相比, miRNA-544-3p mimic 组 HBx-EGFP-14-19 细胞中 miRNA-544-3p 相对表达量升高(4.13±2.07), miRNA-544-3p inhibitor 组 HBx-EGFP-14-19 细胞中 miRNA-544-3p 相对表达量降低(0.02±0.01, P 均<0.05)。这表明转染 miRNA-544-3p mimic 可上调 miRNA-544-3p 的表达水平, 转染 miRNA-544-3p inhibitor 可下调 miRNA-544-3p 的表达水平。

2.6 miRNA-544-3p 对 HBx-EGFP-14-19 细胞迁移和侵袭能力的影响 划痕愈合实验结果(图6A)显示, 空白对照组、miRNA-544-3p NC-mimic 组和 miRNA-544-3p NC-inhibitor 组 HBx-EGFP-14-19 细胞划痕愈合率分别为(59.13±8.83)%、(62.71±10.74)%、(56.59±11.25)%; 与对照组相比, miRNA-544-3p mimic 组细胞划痕愈合

率降低[(38.25±4.71)%], 而 miRNA-544-3p inhibitor 组细胞划痕愈合率增高[(80.45±20.29)%, P 均<0.05]。Transwell 细胞迁移实验结果(图6B)显示, 空白对照组、miRNA-544-3p NC-mimic 组和 miRNA-544-3p NC-inhibitor 组穿透小室滤膜的 HBx-EGFP-14-19 细胞数量分别为 504.33±64.49、482.33±75.87 和 486.67±77.53; 与对照组相比, miRNA-544-3p mimic 组穿透小室滤膜的细胞数量减少(97.33±7.02), 而 miRNA-544-3p inhibitor 组穿透小室滤膜的细胞数量增加(823.67±23.35, P 均<0.05)。Transwell 细胞侵袭实验结果(图6B)显示, 空白对照组、miRNA-544-3p NC-mimic 组和 miRNA-544-3p NC-inhibitor 组穿透基质胶与小室滤膜的 HBx-EGFP-14-19 细胞数量分别为 221.67±14.22、226.00±11.53 和 223.33±11.37; 相较于对照组, miRNA-544-3p mimic 组穿透基质胶与小室滤膜的细胞数量减少(40.33±4.04), 而 miRNA-544-3p inhibitor 组穿透基质胶与小室滤膜的细胞数量增加(384.00±29.87, P 均<0.05)。

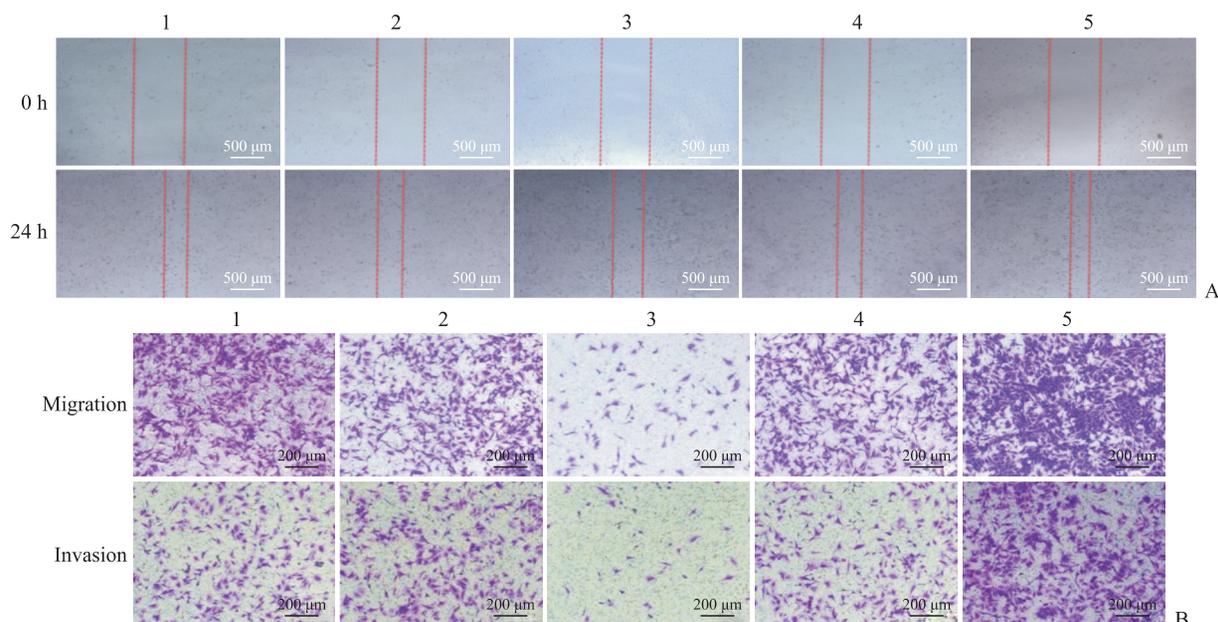


图6 各组HBx-EGFP-14-19细胞的迁移和侵袭能力检测

Fig 6 Detection of migration and invasion abilities of HBx-EGFP-14-19 cells in each group

A: Scratch wound healing assay; B: Transwell cell migration and invasion assay. 1: Blank control group; 2: miRNA-544-3p NC-mimic group; 3: miRNA-544-3p mimic group; 4: miRNA-544-3p NC-inhibitor group; 5: miRNA-544-3p inhibitor group. HBx: Hepatitis B virus X protein; EGFP: Enhanced green fluorescent protein; miRNA: MicroRNA; NC: Negative control.

2.7 miRNA-544-3p对HBx-EGFP-14-19细胞中Arf6水平及Akt-mTOR通路的影响 qPCR检测结果显示,空白对照组、miRNA-544-3p NC-mimic组、miRNA-544-3p mimic组、miRNA-544-3p NC-inhibitor组、miRNA-544-3p inhibitor组 *Arf6* mRNA相对表达量分别为 1.01 ± 0.24 、 0.99 ± 0.12 、 0.53 ± 0.06 、 0.91 ± 0.16 、 1.54 ± 0.03 ,相较于对照组,miRNA-544-3p mimic组 *Arf6* mRNA相对表达量降低,而miRNA-544-3p inhibitor组 *Arf6* mRNA相对表达量增加 (P 均 <0.05)。空白对照组、miRNA-544-3p NC-agomir组、miRNA-544-3p agomir组、miRNA-544-3p NC-antagomir和miRNA-544-3p antagomir组 *Arf6* mRNA相对表达量分别为 1.57 ± 0.16 、 1.46 ± 0.21 、 0.69 ± 0.06 、 1.67 ± 0.06 、 2.67 ± 0.13 ,相较于对照组,miRNA-544-3p agomir组 *Arf6* mRNA相对表达量降低,而miRNA-544-3p antagomir组 *Arf6* mRNA相对表达量增加 (P 均 <0.05)。

蛋白质印迹法检测结果显示,空白对照组、miRNA-544-3p NC-mimic组、miRNA-544-3p mimic组、miRNA-544-3p NC-inhibitor组和miRNA-544-3p inhibitor组 Arf6蛋白相对表达量分别为 0.98 ± 0.06 、 1.15 ± 0.10 、 0.64 ± 0.10 、 1.37 ± 0.12 、 2.09 ± 0.17

(图7A),相较于对照组,miRNA-544-3p mimic组 Arf6蛋白相对表达量降低,而miRNA-544-3p inhibitor组 Arf6蛋白相对表达量增加 (P 均 <0.05);空白对照组、miRNA-544-3p NC-agomir组、miRNA-544-3p agomir组、miRNA-544-3p NC-antagomir组和miRNA-544-3p antagomir组 Arf6蛋白相对表达量分别为 2.54 ± 0.24 、 1.89 ± 0.23 、 1.18 ± 0.24 、 1.68 ± 0.18 、 4.14 ± 0.63 (图7B),相较于对照组,miRNA-544-3p agomir组 Arf6蛋白相对表达量降低,而miRNA-544-3p antagomir组 Arf6蛋白相对表达量增加 (P 均 <0.05)。

蛋白质印迹法检测结果显示,空白对照组、miRNA-544-3p NC-mimic组、miRNA-544-3p mimic组、miRNA-544-3p NC-inhibitor组和miRNA-544-3p inhibitor组 p-Akt蛋白相对表达量分别为 0.61 ± 0.11 、 0.70 ± 0.22 、 0.29 ± 0.07 、 0.71 ± 0.51 、 1.11 ± 0.19 ,Akt蛋白相对表达量分别为 0.74 ± 0.18 、 0.77 ± 0.15 、 0.97 ± 0.12 、 1.07 ± 0.14 、 0.81 ± 0.19 ,p-mTOR蛋白相对表达量分别为 0.48 ± 0.12 、 0.60 ± 0.12 、 0.22 ± 0.09 、 0.43 ± 0.15 、 1.16 ± 0.16 ,mTOR蛋白相对表达量分别为 0.64 ± 0.03 、 0.68 ± 0.12 、 0.75 ± 0.14 、 0.63 ± 0.14 、 0.99 ± 0.11

(图7C)。相较于对照组, miRNA-544-3p mimic组 p-Akt和p-mTOR的表达均降低, 而miRNA-544-3p inhibitor组 p-Akt和p-mTOR表达均增加(P 均 < 0.05); 各组间Akt蛋白和mTOR蛋白的表达差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。空白对照组、miRNA-544-3p NC-agomir组、miRNA-544-3p agomir组、miRNA-544-3p NC-antagomir组和miRNA-544-3p antagomir组 p-Akt蛋白相对表达量分别为 0.75 ± 0.15 、 0.71 ± 0.15 、 0.42 ± 0.13 、 0.81 ± 0.15 、 1.56 ± 0.21 , Akt蛋白相对表达量分别为 0.83 ± 0.15 、 0.89 ± 0.11 、 0.96 ± 0.15 、 $1.07 \pm$

0.17 、 1.15 ± 0.25 , p-mTOR蛋白相对表达量分别为 0.74 ± 0.13 、 0.86 ± 0.15 、 0.50 ± 0.16 、 0.89 ± 0.12 、 1.27 ± 0.23 , mTOR蛋白相对表达量分别为 0.93 ± 0.15 、 1.16 ± 0.14 、 1.02 ± 0.08 、 1.09 ± 0.17 、 1.26 ± 0.11 (图7D)。相较于对照组, miRNA-544-3p agomir组 p-Akt、p-mTOR的表达均减少, 而miRNA-544-3p antagomir组 p-Akt、p-mTOR的表达均增加(P 均 < 0.05); 各组间Akt蛋白和mTOR蛋白的表达差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。上述结果表明miRNA-544-3p对Arf6/Akt-mTOR信号轴有调控作用。

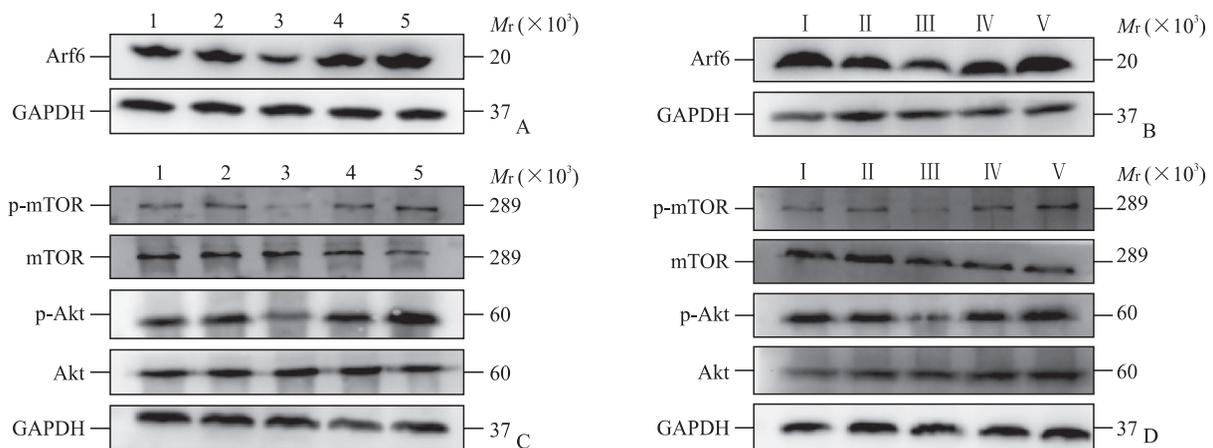


图7 蛋白质印迹法检测各组 HBx-EGFP-14-19 细胞中 Arf6、Akt、mTOR 的表达

Fig 7 Expression of Arf6, Akt, and mTOR in HBx-EGFP-14-19 cells of each group detected by Western blotting

A, B: Expression of Arf6 protein; C, D: Expression of Akt and mTOR proteins. 1: Blank control group; 2: miRNA-544-3p NC-mimic group; 3: miRNA-544-3p mimic group; 4: miRNA-544-3p NC-inhibitor group; 5: miRNA-544-3p inhibitor group. I: Blank control group; II: miRNA-544-3p NC-agomir group; III: miRNA-544-3p agomir group; IV: miRNA-544-3p NC-antagomir group; V: miRNA-544-3p antagomir group. HBx: Hepatitis B virus X protein; EGFP: Enhanced green fluorescent protein; Arf6: Adenosine diphosphate ribosylation factor 6; Akt: Protein kinase B; mTOR: Mammalian target of rapamycin; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; p-mTOR: Phosphorylated mammalian target of rapamycin; p-Akt: Phosphorylated protein kinase B; miRNA: MicroRNA; NC: Negative control.

3 讨论

作为许多基因的转录后调节因子, miRNA 调控了癌症的发生、发展、转移等多个过程, 如癌细胞分化、增殖、凋亡、迁移、侵袭、血管生成等。现已发现 miRNA-544 在多种癌症中表达异常, 如骨髓瘤^[15]、结直肠癌^[16]、宫颈癌^[17]、乳腺癌^[18-19]等, 这提示 miRNA-544 与癌症存在着一定程度的关联。Chen 等^[15]研究指出, miRNA-544 在促进骨髓瘤细胞增殖中发挥了十分重要的作用, 它通过直接调控靶基因轴抑制因子 2 (axis inhibition protein 2, AXIN2) 的表达参与骨髓瘤的发生。Yao 等^[16]研

究发现, miRNA-544 在结直肠癌细胞系和癌组织中过表达使靶基因叉头框蛋白 O1 (forkhead box O1, FOXO1) 的表达增加, 进而促进结直肠癌细胞的增殖和侵袭。Mao 等^[17]研究表明, 靶基因酪氨酸 3/色氨酸 5 单加氧酶激活蛋白 ζ (tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein ζ , YWHAZ) 表达的降低所引发的效应是 miRNA-544 发挥细胞周期调控和抑制宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭作用的核心因素。以上研究结果表明, miRNA-544 在不同类型的癌症中特异性靶向不同基因, 从而参与多种不同类型癌症的生理、病理进程, 发挥了癌基因样或抑癌基因

样作用。本研究结果显示, miRNA-544-3p 在 HBx 存在时呈下调趋势, 将 miRNA-544-3p mimic 或 miRNA-544-3p inhibitor 转染到 HBx-EGFP-14-19 细胞, 实验结果提示 miRNA-544-3p 能够抑制细胞迁移和侵袭。本研究通过 TargetScan 生物信息学网站预测 miRNA-544-3p 的靶基因, 并通过实验验证了 *Arf6* 可能为 miRNA-544-3p 的功能靶基因。

Arf6 是 Ras 超家族中的 1 个小 GTP 酶结合蛋白, 广泛存在于人体肝脏、胃、乳腺、前列腺等组织器官中, 参与调控囊泡的形成和运输、细胞分裂与黏附、肌动蛋白细胞骨架的重组等, 并与肿瘤细胞的生长、迁移和侵袭密切相关^[20]。研究发现, *Arf6* 在多种恶性肿瘤中异常高表达, 如胰腺癌^[21]和乳腺癌^[22]。目前关于 *Arf6* 与 HCC 相关的研究报道较少。Wang 等^[23] 研究发现, *Arf6* 在 HCC 细胞系和人 HCC 组织中高表达, 但其作用机制尚不清楚。有学者指出, *Arf6* 通过作用于一系列细胞迁移和侵袭相关的下游通路, 导致细胞迁移和侵袭能力改变并最终引发肿瘤^[24]。Hashimoto 等^[21] 指出 *Arf6* 是 Akt-mTOR 通路的上游调控因子, 还有研究表明 HBx 通过激活 Akt-mTOR 信号通路促进了肝癌的发生、发展^[25-26]。本研究结果表明, *Arf6* 在 HBx 存在时呈上调趋势; 上调或下调 miRNA-544-3p 后 *Arf6* 及 Akt-mTOR 通路发生变化, 提示 miRNA-544-3p 可能靶向调控 *Arf6* 并影响 Akt-mTOR 通路。

综上所述, 本研究结果表明 miRNA-544-3p 可能通过调控 *Arf6*/Akt-mTOR 信号轴在 HCC 发生和转移中发挥抑制作用。但是, miRNA 与靶基因的关系是一个复杂的网络调控系统, 同一种 miRNA 可调控多个靶基因和多个信号通路, 同一个靶基因也可受多种 miRNA 共同调节, miRNA-544-3p 对其他基因的调控作用值得进一步深入研究。值得一提的是, 本研究首次在动物体内以动态监测的方式考察了从 HBx 感染到 HCC 发生过程中 miRNA-544-3p 表达水平的变化, 并进一步探讨了 miRNA-544-3p 在感染 HBx 过程中的功能和意义, 为 HBV-HCC 的预测、治疗及预后研究提供了具有应用价值的新方向, 也为 HBV-HCC 的生物治疗提供了新的作用靶点。

[参考文献]

[1] WANG M J, WANG Y T, FENG X S, WANG R J,

WANG Y M, ZENG H M, et al. Contribution of hepatitis B virus and hepatitis C virus to liver cancer in China north areas: experience of the Chinese National Cancer Center[J]. *Int J Infect Dis*, 2017, 65: 15-21.

[2] TARAO K Z, OHKAWA S, MIYAGI Y, MORINAGA S, OHSHIGE K, YAMAMOTO N, et al. Inflammation in background cirrhosis evokes malignant progression in HCC development from HCV-associated liver cirrhosis[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2013, 48: 729-735.

[3] LEVRERO M, ZUCMAN-ROSSI J. Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2016, 64(1 Suppl): S84-S101.

[4] GUERRIERI F, BELLONI L, D'ANDREA D, PEDICONI N, LE PERA L, TESTONI B, et al. Genome-wide identification of direct HBx genomic targets[J/OL]. *BMC Genomics*, 2017, 18: 184. DOI: 10.1186/s12864-017-3561-5.

[5] SALIMINEJAD K, KHORRAM KHORSHID H R, SOLEYMANI FARD S, GHAFARI S H. An overview of microRNAs: biology, functions, therapeutics, and analysis methods[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234: 5451-5465.

[6] KROL J, LOEDIGE I, FILIPOWICZ W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay[J]. *Nat Rev Genet*, 2010, 11: 597-610.

[7] LEE Y S, DUTTA A. microRNAs in cancer[J]. *Annu Rev Pathol*, 2009, 4: 199-227.

[8] ACUNZO M, ROMANO G, WERNICKE D, CROCE C M. MicroRNA and cancer: a brief overview[J]. *Adv Biol Regul*, 2015, 57: 1-9.

[9] WANG Z Y, WU Z J, HUANG P. The function of miRNAs in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis B virus X protein (review)[J]. *Oncol Rep*, 2017, 38: 652-664.

[10] WEI Z Y, SHEN X H, NI B, LUO G X, TIAN Y, SUN Y. Contribution of hepatitis B virus X protein-induced aberrant microRNA expression to hepatocellular carcinoma pathogenesis[J]. *Turk J Biol*, 2019, 43: 113-123.

[11] SAGNELLI E, POTENZA N, ONORATO L, SAGNELLI C, COPPOLA N, RUSSO A. Micro-RNAs in hepatitis B virus-related chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma[J]. *World J Hepatol*, 2018, 10: 558-570.

[12] SARTORIUS K, SWADLING L, AN P, MAKAROVA J, WINKLER C, CHUTURGOON A, et al. The multiple roles of hepatitis B virus X protein (HBx) dysregulated microRNA in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma (HBV-HCC) and immune pathways[J/OL]. *Viruses*, 2020, 12: 746. DOI: 10.3390/v12070746.

[13] 黄佳祎. 永生化肝前体细胞株的构建及维甲酸在肝前体细胞分化中的作用研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2009.

[14] 钟沁, 张超, 何雪梅, 胡代曦, 张锡峰, 黄佳祎, 等. 表达

- HBx 的肝前体细胞的小鼠肝内移植模型的构建[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36: 2451-2454.
- [15] CHEN M, LIU Y Y, ZHENG M Q, WANG X L, GAO X H, CHEN L, et al. MicroRNA-544 promoted human osteosarcoma cell proliferation by downregulating AXIN2 expression[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15: 7076-7082.
- [16] YAO G D, ZHANG Y F, CHEN P, REN X B. MicroRNA-544 promotes colorectal cancer progression by targeting forkhead box O1[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15: 991-997.
- [17] MAO L Y, ZHANG Y, DENG X L, MO W J, YU Y, LU H. Transcription factor KLF4 regulates microRNA-544 that targets *YWHAZ* in cervical cancer[J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5: 1939-1953.
- [18] LU P W, GU Y T, LI L, WANG F, QIU X G. miR-544a promotes breast cancer cell migration and invasion reducing cadherin 1 expression[J]. *Oncol Res*, 2016, 23: 165-170.
- [19] ZHU Z Z, WANG S Y, ZHU J H, YANG Q F, DONG H M, HUANG J K. MicroRNA-544 down-regulates both Bcl6 and Stat3 to inhibit tumor growth of human triple negative breast cancer[J]. *Biol Chem*, 2016, 397: 1087-1095.
- [20] HONGU T, YAMAUCHI Y, FUNAKOSHI Y, KATAGIRI N, OHBAYASHI N, KANAHO Y. Pathological functions of the small GTPase Arf6 in cancer progression: tumor angiogenesis and metastasis[J]. *Small GTPases*, 2016, 7: 47-53.
- [21] HASHIMOTO S, FURUKAWA S, HASHIMOTO A, TSUTAHO A, FUKAO A, SAKAMURA Y, et al. ARF6 and AMAP1 are major targets of *KRAS* and *TP53* mutations to promote invasion, PD-L1 dynamics, and immune evasion of pancreatic cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 17450-17459.
- [22] SABE H, HASHIMOTO S, MORISHIGE M, OGAWA E, HASHIMOTO A, NAM J M, et al. The EGFR-GEP100-Arf6-AMAP1 signaling pathway specific to breast cancer invasion and metastasis[J]. *Traffic*, 2009, 10: 982-993.
- [23] WANG S, WANG T J, GU P C. MicroRNA-145-5p inhibits migration, invasion, and metastasis in hepatocellular carcinoma by inhibiting ARF6[J]. *Cancer Manag Res*, 2021, 13: 3473-3484.
- [24] LI R, PENG C, ZHANG X Z, WU Y W, PAN S D, XIAO Y C. Roles of Arf6 in cancer cell invasion, metastasis and proliferation[J]. *Life Sci*, 2017, 182: 80-84.
- [25] WANG X, HUO B N, LIU J, HUANG X, ZHANG S Y, FENG T. Hepatitis B virus X reduces hepatocyte apoptosis and promotes cell cycle progression through the Akt/mTOR pathway *in vivo*[J]. *Gene*, 2019, 691: 87-95.
- [26] XIANG K L, WANG B. Role of the PI3K-AKT-mTOR pathway in hepatitis B virus infection and replication[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17: 4713-4719.

[本文编辑] 尹 茶