

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.08.002

miR-499 在肝癌发生和发展中的作用机制研究^{*}李宝华, 戈海泽, 刘树业[△]

天津市第三中心医院检验科, 天津 300170

摘要:目的 以肝癌细胞系 Huh7 细胞为模型, 研究 miR-499 在肝癌发生和发展中的作用机制。方法 通过 TCGA 和 GEO 数据库分析 miR-499 在肝癌患者及健康人中的表达差异, 并通过实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测肝癌组织及正常癌旁组织中 miR-499 的表达差异。通过临床病例分析 miR-499 与肝癌患者临床指标的关系。采用 CCK-8 试验、集落形成试验检测 miR-499 对 Huh7 细胞活性及集落形成的影响。采用流式细胞术检测 miR-499 对 Huh7 细胞周期及相对凋亡率的影响。用 TargetScan7.1、MicroRNA.org、MiRDB 等数据库预测 miR-499 的下游靶基因。通过 RT-qPCR 及 Western blot 试验证明 miR-499 对 RAB5C mRNA 及蛋白水平的影响。结果 TCGA 和 GEO 数据库数据显示, miR-499 在肝癌患者中呈低表达。RT-qPCR 结果表明, miR-499 在肝癌组织中的表达明显低于癌旁组织。临床数据整理表格显示, 肝癌患者中 miR-499 高表达的患者普遍肿瘤体积较小、TNM 分期较低、淋巴结转移能力较弱且分化良好。miR-499 mimics 转染 Huh7 细胞后, 通过 CCK8 试验和集落形成试验发现, miR-499 抑制 Huh7 细胞增殖及集落形成能力。流式细胞术细胞周期与凋亡试验表明, miR-499 抑制 Huh7 细胞的周期进程, 并且促进 Huh7 细胞的凋亡能力。RT-qPCR 及 Western blot 试验证明, RAB5C 确为 miR-499 的靶基因。结论 miR-499 通过直接靶定并下调 RAB5C 的表达, 从而抑制肝癌的发生和发展。

关键词: miR-499; 肝癌; Huh7 细胞; RAB5C; 细胞增殖**中图分类号:** R733**文献标志码:** A**文章编号:** 1672-9455(2020)08-1012-05**Study on the mechanism of miR-499 in the genesis and development of liver cancer^{*}**LI Baohua, GE Haize, LIU Shuye[△]

Department of Clinical Laboratory, Tianjin Third Hospital, Tianjin 300170, China

Abstract: **Objective** To study the mechanism of miR-499 in the genesis and development of liver cancer by taking hepatocellular cell Huh7 as a model. **Methods** The gene expression differential display of miR-499 between hepatocellular cancer patients and healthy people were analyzed by TCGA and GEO database. Real-time PCR was used to determine the expression level of miR-499 in liver cancer tissues and the para-carcinoma tissues. Meanwhile the relationship between miR-499 and the clinical cases of liver cancer patients was displayed. CCK8 assay and colony formation assays were performed to investigate the influence of miR-499 on viability and colony formation of Huh7 cells. Flow cytometry was used to determine the influence of miR-499 on the cell cycle progression and apoptosis of Huh7 cells. The target genes of miR-499 were predicted by TargetScan7.1, MicroRNA.org and MiRDB databases. The influence of miR-499 on the expression levels of mRNA and protein of RAB5C was detected by Real-time PCR and Western blot. **Results** The expression level of miR-499 was low in hepatocellular cancers according to the TCGA and GEO database. Real-time PCR experiment revealed that the expression level of miR-499 was lower in the liver cancer tissues than that in para-carcinoma. Clinical data showed that the tumors of liver cancer patients with high expression of miR-499 had smaller volume, low TNM stage, lower lymphatic metastasis capacity and were well-differentiated. After transfection with miR-499 mimics, CCK8 assay and colony formation assay demonstrated that the viability and colony information of Huh7 cells were inhibited by miR-499. Flow cytometry experiment was further to prove that the cell cycle progression of Huh7 cells was inhibited and the apoptosis of Huh7 cells was promoted by miR-499 mimics. Real-time PCR and Western blot test revealed that RAB5C was one target gene of miR-499. **Conclusion** miR-499 inhibited the development of liver cancer by decreasing the expression of RAB5C.

Key words: miR-499; liver cancer; Huh7; RAB5C; cell proliferation^{*} 基金项目: 天津市应用基础与前沿技术研究项目(13JCYBJC22100)。作者简介: 李宝华, 男, 副主任技师, 主要从事肝癌发生和发展机制研究。 [△] 通信作者, E-mail: lshye@163.com。

肝癌作为最常见的肝脏原发性肿瘤,是世界五大恶性肿瘤之一,位居肿瘤致死原因的第 3 位。肝癌常伴随肝炎、肝硬化^[1],所以人们认为病毒性肝炎、饮酒过度、遗传及非酒精性脂肪性病变是肝癌发生的重要原因^[2-3]。原癌基因激活、抑癌基因失活及信号通路过度活化是肝癌发生的主要分子机制^[4]。近年来,随着 miRNA 研究的不断深入,人们发现 miRNA 与肝癌的发生和发展有着十分重要的联系^[5-6],miRNA 成为研究肝癌的热点之一^[7]。miRNA 是一段内源性单链小片段非编码 RNA,有 18~25 个核苷酸,一般是通过靶向 mRNA 3'UTR 来调控细胞基因的表达^[8],从而广泛参与细胞的生命活动,如细胞增殖、凋亡、迁移、代谢等^[9-10]。已有研究表明,许多 miRNA (如 miR-122、miR-199 和 miR-21)^[11-13]通过调控基因表达从而影响细胞的增殖、凋亡、迁移,参与肝癌的发生和发展过程^[14-15]。本研究以肝癌细胞系 Huh7 细胞为模型,研究 miR-499 在肝癌发生和发展中的作用机制,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 人肝癌细胞株 Huh7 来源于中国科学院上海细胞库。于本院肝外科采集配对的肝癌组织标本和正常癌旁组织标本各 20 例,以及另外的 35 例肝癌组织标本。本研究经本院伦理委员会审批通过,并与患者签订知情同意书。

1.2 主要试剂 10%胎牛血清、DMEM 培养基和胰酶购自 Gibco 公司,1%青霉素-链霉素双抗购自 Sigma 公司。反转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)定量试剂盒、CCK8 试剂盒均购自 Thermo 公司。RIPA 全蛋白裂解液、脂质体 2000、碘化丙啶购自 Sigma 公司。RAB5C 一抗购自 Abcam 公司,结晶紫试剂购自 Solarbio 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养和转染 Huh7 细胞在含 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素双抗的 DMEM 培养基中培养,培养箱条件 37℃、5%CO₂。当细胞融合度在 90%左右时 0.25%胰酶消化传代,每 3 天换液或传代 1 次。细胞转染按照脂质体 2000 转染方法,细胞传代后在细胞融合度为 60%~70%时转染 miR-NC 或 miR-499 mimics。

1.3.2 RT-qPCR 细胞转染 24~48 h 后收集细胞磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 遍或将组织匀浆后加入 Trizol 提取总 RNA,根据反转录试剂盒反转录获得 cDNA,稀释 cDNA 后按照 RT-qPCR 定量试剂盒进行 40 个 PCR。引物如下,miR-499-RT primer:5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTG CAC TGG ATA CGA CAA ACA T-3'; miR-499-qPCR-Fwd:5'-TGC GGT TAA GAC TTG CAG TG-3'; U6-RT:5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA AAA

TAT GGA AC-3'; Oligo-dT: 5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT-3'; U6-Fwd: 5'-TGC GGG TGC TCG CTT CGG CAG C-3'; miRNA-universal reverse: 5'-CCA GTG CAG GGT CCG AGG T-3'; RAB5C-qPCR-Fwd: 5'-TCC TCC GCC TGA ATG ACC-3'; RAB5C-qPCR-Rev: 5'-GGG AGG AAG TGG GAA GAG-3'。

1.3.3 CCK8 试验 按要求将 Huh7 细胞铺 96 孔板,5×10³ 个细胞/孔,每组 3 个复孔。Huh7 细胞转染 miR-NC 或 miR-499 mimics 24 h 后,分别于 0、24、48、72 h 向每孔加 10 μL CCK8 溶液,测量 450 nm 处吸光度值,根据公式计算细胞相对增殖活力。

1.3.4 集落生成试验 Huh7 细胞转染 miR-NC 或 miR-499 mimics 24 h 后,胰酶消化铺入 24 孔板,约 500 个细胞/孔。每 72 小时换一次培养基,2 周后 1×PBS 洗 2 遍,普通结晶紫染色并记录集落形成个数,每个集落细胞数大于 50,重复 3 次。

1.3.5 流式细胞术 细胞转染 miR-NC 或 miR-499 mimics 48 h 后,胰酶消化,1×PBS 洗 2 遍,加入 70%乙醇溶液固定过夜。离心收集细胞,1 mL 1×PBS 洗 2 遍,加入 500 μL 1×PBS 含 50 μg/mL 溴化乙锭,100 μg/mL RNase A 4℃避光,30 min。1×PBS 洗 1 遍终止反应,流式上机检测。

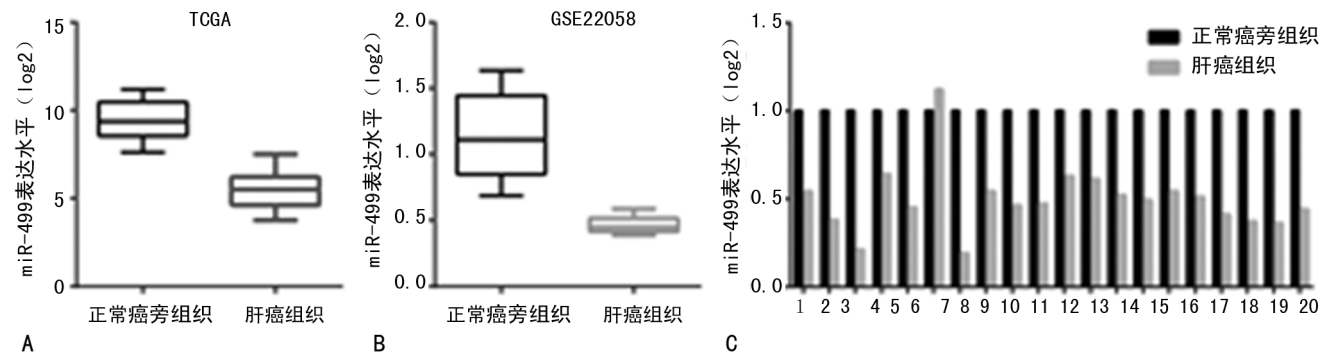
1.3.6 Western blot 试验 Huh7 细胞转染 miR-NC 或 miR-499 mimics 48 h 后,1×PBS 洗 2 遍,按说明书加入适量 RIPA 全蛋白细胞裂解液 4℃裂解 30 min,12 000 r/min 离心 15 min,收集蛋白上清液。BCA 蛋白定量后,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,每孔上样 15 μg,转膜后 5%脱脂奶粉封闭 1 h,4℃孵一抗摇床过夜。第 2 天 Tri 吐温盐酸缓冲液洗 3 次,每次 10 min,二抗室温孵育 1 h,TBST 洗 3 次,暗室曝光。

1.4 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计软件进行数据分析处理。数据均来自 3 次及以上独立试验,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝癌组织和正常癌旁组织 miR-499 表达水平比较 通过 TCGA 及 GEO 公共数据库分析发现,miR-499 表达水平在肝癌组织标本中是降低的,与正常癌旁组织比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)(图 1A、图 1B);采用 RT-qPCR 检测发现,肝癌组织 miR-499 表达水平明显低于正常癌旁组织,差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 1C)。

2.2 miR-499 与肝癌患者临床指标的关系 见表 1。通过临床标本数据分析发现,高表达 miR-499 的肝癌患者中普遍存在肿瘤体积较小、TNM 分期较低、淋巴结转移能力较弱且分化良好等临床表型。



注:A 为 TCGA 数据库分析 miR-499 的表达水平;B 为 GEO 数据库分析 miR-499 的表达水平;C 为 RT-qPCR 检测 miR-499 的表达水平。

图 1 肝癌组织和正常癌旁组织 miR-499 表达水平比较

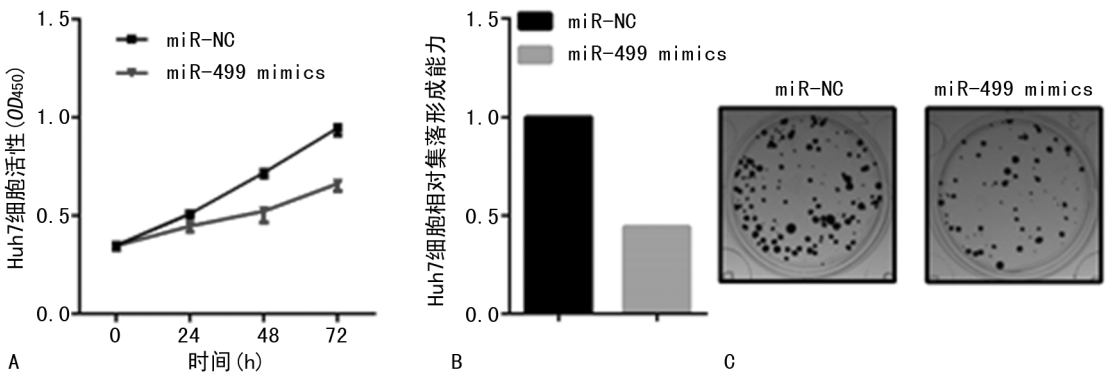
表 1 miR-499 与肝癌患者临床指标的关系 (n=35)				
指标	n	miR-499(n)		P
		低	高	
年龄(岁)				0.740
<60	17	9	8	
≥60	18	8	10	
性别				0.733
男	22	10	12	
女	13	7	6	
肿瘤大小(cm)				0.027
<5	16	4	12	
≥5	19	12	7	
TNM 分期				0.013
I~II	15	4	11	
III~IV	20	14	6	
淋巴结转移				0.030
无	21	7	14	
有	14	10	4	
分化能力				0.010
分化良好	20	7	13	
未分化	15	12	3	

2.3 miR-499 抑制肝癌 Huh7 细胞的增殖能力 为进一步阐明 miR-499 在肝癌进程中如何发挥其生物学作用,本研究通过 miR-499 mimics 转染肝癌 Huh7 细胞,检测 miR-499 对肝癌细胞活性和集落形成能力的影响。CCK8 试验结果显示,miR-499 mimics 转染

Huh7 细胞 48 h 后,细胞活性明显受到抑制,与 miR-NC 比较,差异有统计学意义($P<0.05$)(图 2A);细胞集落形成试验表明,过表达 miR-499 明显抑制 Huh7 细胞的集落形成能力,与 miR-NC 比较,差异有统计学意义($P<0.05$)(图 2B、C)。

2.4 miR-499 抑制 Huh7 细胞的周期进程,促进 Huh7 细胞凋亡 流式细胞术细胞周期试验发现,过表达 miR-499 能明显抑制 Huh7 细胞 G1 期向 S 期转换,从而阻滞细胞周期的进程,与 miR-NC 比较,差异有统计学意义($P<0.05$)(图 3A、B);流式细胞术细胞凋亡试验发现,过表达 miR-499 能明显促进 Huh7 细胞的凋亡能力,与 miR-NC 比较,差异有统计学意义($P<0.05$)(图 3C、D)。

2.5 miR-499 直接靶定 RAB5C 通过 TargetScan 7.1、MicroRNA.org、MiRDB 数据库预测 miR-499 的下游靶基因为 RAB5C(图 4A);RT-qPCR 显示,miR-499 mimics 转染 Huh7 细胞后,RAB5C mRNA 表达水平明显下降,与 miR-NC 比较,差异有统计学意义($P<0.05$)(图 4B);Western blot 试验显示,miR-499 mimics 能够明显降低 RAB5C 蛋白表达水平,与 miR-NC 比较,差异有统计学意义($P<0.05$)(图 4C、D)。miR-499 可直接靶定 RAB5C 并抑制 RAB5C 的表达水平。



注:A 为 CCK8 试验检测 miR-499 对细胞活性的影响;B 为集落形成试验检测 miR-499 对细胞相对集落形成能力的影响;C 为集落形成试验。

图 2 miR-499 抑制肝癌 Huh7 细胞的增殖能力

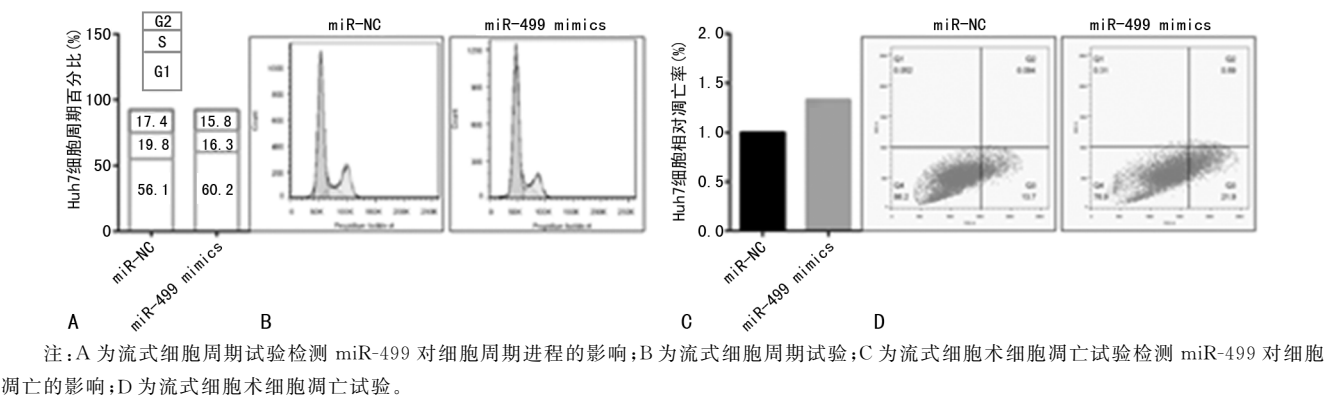


图 3 miR-499 对 Huh7 细胞周期及凋亡的影响

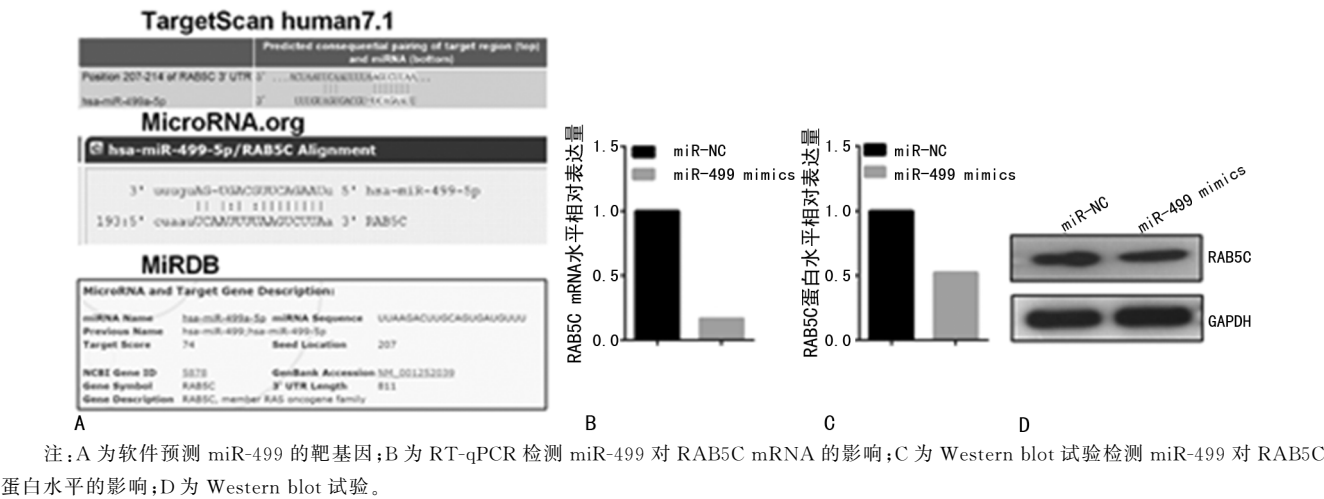


图 4 miR-499 直接靶定 RAB5C

3 讨 论

肝癌是发病率和致死率都很高的一种恶性肿瘤，当前治疗手段有限，早期诊断困难是一直困扰人们的主要问题^[16-17]。有文献报道，miRNA 作为广泛存在的分子调控者参与了细胞的生长、增殖、迁移、分化、代谢等很多生物学表型^[5]。随着研究者对 miRNA 更加深入的研究发现，很多肿瘤的发生和发展与 miRNA 的表达水平存在很密切的联系^[18]。但是，不同的 miRNA 调控不同的基因表达变化，其调节网络的复杂性仍需要不断探究^[19]。

有研究报道，miRNA 在肝癌中差异表达是广泛存在的现象，在肝癌中表达下调的 miRNA 有许多已被证实具有抑制肝癌的作用，如 miR-125b、miR-199、miR-101 等^[19-20]。本研究发现，在 TCGA 和 GEO 公共数据库及在肝癌患者的临床组织标本中 miR-499 表达水平明显减少，提示 miR-499 可能在肝癌发生和发展中起重要作用。通过临床病例分析及相关试验验证发现，miR-499 能抑制细胞周期进程，加速细胞凋亡，并且能够抑制肝癌细胞的增殖能力。同时，本研究初步探究了 miR-499 抑制肝癌恶性表型可能的分子机制，并通过试验证明 miR-499 的下游靶基因之一是 RAB5C，这也为进一步探究 miR-499 抑制肝癌细胞增殖的分子机制提供了新的思路。

本研究通过生物信息学数据库分析发现，miR-499 的表达水平在肝癌患者中呈低表达，从而猜想 miRNA 可能与肝癌的发生和发展相关。进一步研究表明，miR-499 能抑制 Huh7 细胞的增殖、集落形成及周期进程，并且可以促进 Huh7 细胞的凋亡。本研究探究 miR-499 在肝癌发生和发展中可能的下游靶基因 RAB5C，并通过 RT-qPCR 和 Western blot 试验证明 RAB5C 确为 miR-499 的下游靶基因。本研究发现，miR-499 通过下调 RAS 癌基因家族成员 RAB5C，从而抑制肝癌的发生和发展。目前尚不清楚 miR-499 是如何通过 RAB5C 来调节相关信号通路，从而抑制 Huh7 细胞的增殖、集落形成及周期进程，并且促进 Huh7 细胞凋亡，但本研究也为 miR-499 在肝癌发生和发展中的作用机制开启了新思路。

本研究结果表明，miR-499 可能通过下调 RAB5C 抑制肝癌细胞的周期进展及促进肝癌细胞凋亡来抑制肝癌细胞的增殖，从而抑制肝癌的发生和发展。本研究初步探究了 miR-499、RAB5C 与肝癌细胞的细胞周期进展、凋亡、增殖之间的关系，但具体分子机制仍然需要进一步探索。

参考文献

[1] YOU M. Obesity and binge drinking: two hits driving liv-

- er fibrosis progression[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2018, 5(3): 424-425.
- [2] HASSAN Z K, AL-OLAYAN E M. Curcumin reorganizes miRNA expression in a mouse model of liver fibrosis [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(11): 5405-5408.
 - [3] XIAO Y, LI W, WAN H, et al. Central hepatectomy versus major hepatectomy for patients with centrally located hepatocellular carcinoma: a meta-analysis [J]. *Int J Surg*, 2018, 52(2): 297-302.
 - [4] YUAN W, LIU B, WANG X, et al. CMTM3 decreases EGFR expression and EGF-mediated tumorigenicity by promoting Rab5 activity in gastric cancer [J]. *Cancer Lett*, 2017, 386(1): 77-86.
 - [5] MAATOUK D, HARFE B. MicroRNAs in development [J]. *Sci World J*, 2006, 26(6): 1828-1840.
 - [6] LANZAFAME M, BIANCO G, TERRACCIANO L M, et al. The role of long non-coding RNAs in hepatocarcinogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3): 22-29.
 - [7] KIM S S, CHO H J, NAM J S, et al. Plasma microRNA-21, 26a, and 29a-3p as predictive markers for treatment response following transarterial chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *J Korean Med Sci*, 2018, 33(1): 11-19.
 - [8] TESKE C, SCHWEITZER C, PALAMIDESSI A, et al. Modulation of RAB5A early endosome trafficking in response to KRas mediated macropinocytic fluxes in pancreatic cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 493(1): 528-533.
 - [9] TAN Y S, KIM M, KINGSBURY T J, et al. Regulation of RAB5C is important for the growth inhibitory effects of MiR-509 in human precursor-B acute lymphoblastic leukemia [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e111777.
 - [10] ORIOLO G, EGMOND E, MARINO Z, et al. Systematic review with meta-analysis: neuroimaging in hepatitis C chronic infection [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2018, 47(9): 1238-1252.
 - [11] LUNA J M, BARAJAS J M, TENG K Y, et al. Argonaute CLIP defines a deregulated miR-122-Bound transcriptome that correlates with patient survival in human liver cancer [J]. *Mol Cell*, 2017, 67(3): 400-410.
 - [12] ZHANG W, QIAN S, YANG G, et al. MicroRNA-199 suppresses cell proliferation, migration and invasion by downregulating RGS17 in hepatocellular carcinoma [J]. *Gene*, 2018, 659(15): 22-28.
 - [13] LUO G, LUO W, SUN X, et al. MicroRNA21 promotes migration and invasion of glioma cells via activation of Sox2 and betacatenin signaling [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(1): 187-193.
 - [14] SHAHHEYDARI H, FROST S, SMITH B J, et al. Identification of PLP2 and RAB5C as novel TPD52 binding partners through yeast two-hybrid screening [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(7): 4565-4572.
 - [15] RAPADO-GONZALEZ O, MAJEM B, MUINELO-ROMAY L, et al. Human salivary microRNAs in Cancer [J]. *J Cancer*, 2018, 9(4): 638-649.
 - [16] DAHER S, MASSARWA M, BENSON A A, et al. Current and future treatment of hepatocellular carcinoma: an updated comprehensive review [J]. *J Clin Transl Hepatol*, 2018, 6(1): 69-78.
 - [17] ERSTAD D J, FUCHS B C, TANABE K K. Molecular signatures in hepatocellular carcinoma: a step toward rationally designed cancer therapy [J]. *Cancer*, 2018, 124(15): 3084-3104.
 - [18] ZHANG H, LI J, LI G, et al. Effects of celastrol on enhancing apoptosis of ovarian cancer cells via the downregulation of microRNA21 and the suppression of the PI3K/AktNfκB signaling pathway in an in vitro model of ovarian carcinoma [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(6): 5363-5368.
 - [19] ZHANG J, HAN C, ZHU H, et al. MiR-101 inhibits cholangiocarcinoma angiogenesis through targeting vascular endothelial growth factor (VEGF) [J]. *Am J Pathol*, 2013, 182(5): 1629-1639.
 - [20] LI G, SO A Y, SOOKRAM R, et al. Epigenetic silencing of miR-125b is required for normal B cell development [J]. *Blood*, 2018, 131(17): 1920-1930.

(收稿日期: 2019-09-10 修回日期: 2020-01-02)

(上接第 1011 页)

- [11] 罗丽娜. 衡阳地区 2013—2015 年新生儿先天性甲状腺功能减低症发病相关情况 [D]. 衡阳: 南华大学, 2017.
- [12] CHUNG H R. Screening and management of thyroid dysfunction in preterm infants [J]. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*, 2019, 24(1): 15-21.
- [13] 陈锦国, 叶立新, 谢彩连, 等. 胎龄对先天性甲状腺功能低下症发病率的影响 [J]. *深圳中西医结合杂志*, 2018, 28(21): 8-10.
- [14] 熊丰. 新生儿先天性甲状腺功能减低症的诊断与治疗 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2012, 27(8): 642-644.
- [15] 杨海河, 裴蕾, 赵金琦, 等. 1989—2014 年北京市先天性甲状腺功能减低症发病特征及影响因素分析 [J]. *中华预防医学杂志*, 2016, 50(8): 728-732.
- [16] 吴可, 殷桦棣. 新生儿先天性甲状腺功能低下症与出生体重及胎龄关系的研究 [J]. *中国实用医药*, 2017, 12(6): 50-51.
- [17] 董晓真, 程国梅, 许雅娟, 等. 甲状腺功能减退与妊娠期糖尿病相互影响的研究 [J]. *医药论坛杂志*, 2019, 40(1): 9-11.

(收稿日期: 2019-10-20 修回日期: 2020-01-02)