



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.08.015
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.08.015
Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(8):1175-1179.

· 基础研究 ·

miR-150-5p 抑制肝癌细胞的迁移和侵袭及其机制

梁治坤, 程凡天, 胡走肖, 郑小林

(华中科技大学同济医学院附属武汉市中心医院 肝胆胰外科, 湖北 武汉 430014)

摘要

目的: 探讨 miR-150-5p 在肝细胞癌 (HCC) 细胞迁移与侵袭中的作用及其调控机制。

方法: 用荧光定量 PCR 测定 miR-150-5p 在正常肝细胞系 L02 及 HCC 细胞系 HepG2 中的表达; 将 HepG2 细胞分成两组, 分别转染 miR-150-5p (miR-150-5p 组) 与随机序列 (对照组), 转染后, 分别用细胞划痕实验、Transwell 小室基质渗透实验检测细胞的迁移和侵袭能力, 用 Western blot 检测细胞基质金属蛋白酶 2 (MMP2) 和基质金属蛋白酶 9 (MMP9) 的蛋白表达。

结果: miR-150-5p 的表达量在 HepG2 细胞系中明显降低, 为 L02 细胞系的 0.26 倍 ($P < 0.01$)。转染后, miR-150-5p 组的 miR-150-5p 水平明显升高, 为对照组的 9.53 倍 ($P < 0.001$); miR-150-5p 组的细胞划痕愈合率明显低于对照组 (54.63% vs. 87.51%, $P < 0.01$), 细胞侵袭数明显少于对照组 (138 个 vs. 452 个, $P < 0.01$); MMP2 与 MMP9 蛋白表达量均明显低于对照组 (0.78 vs. 1.75; 0.82 vs. 1.85, 均 $P < 0.05$)。

结论: miR-150-5p 在 HCC 细胞中表达降低, 升高 miR-150-5p 的表达可抑制 HCC 细胞的迁移和侵袭, 机制可能与其下调 MMP2 和 MMP9 表达有关。

关键词

癌, 肝细胞; 微 RNAs; 肿瘤浸润
中图分类号: R735.7

Inhibitory effect of miR-150-5p on migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells and its mechanism

LIANG Zhikun, CHENG Fantian, HU Zouxiao, ZHENG Xiaolin

(Department of Hepatopancreatobiliary Surgery, Affiliated Wuhan Central Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430014, China)

Abstract

Objective: To investigate the effect of miR-150-5p on migration and invasion in hepatocellular carcinoma (HCC) cells and the mechanism.

Methods: The miR-150-5p expression in normal hepatic cells and HCC HepG2 cells was determined by real-time PCR. Then, the HepG2 cells were divided into two groups to transfect with miR-150-5p (miR-150-5p group) or scramble sequences (control group), respectively. After transfection, the cell migration and invasion abilities were measured by wound healing assay and Transwell invasion assay, and the protein expressions of matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and 9 (MMP9) were examined by Western blot, respectively.

Results: The expression level of miR-150-5p in HepG2 cells was significantly reduced, and was 26% of that in normal hepatic cells ($P < 0.01$). After transfection, the miR-150-5p expression level in miR-150-5p group was

收稿日期: 2016-02-24; 修订日期: 2016-07-11。

作者简介: 梁治坤, 华中科技大学同济医学院附属武汉市中心医院主治医师, 主要从事肝癌基础与临床方面的研究。

通信作者: 郑小林, Email: xiaolingzheng999@sina.com

significantly increased, which was 9.53 times of that in control group ($P < 0.001$). In miR-150-5p group compared with control group, the healing rate of the scratch wound (54.63% vs. 87.51%, $P < 0.01$) and number of invaded cells (138 vs. 452, $P < 0.01$) were all significantly decreased. The protein expression levels of MMP2 and MMP9 (0.78 vs. 1.75; 0.82 vs. 1.85) were all significantly decreased (both $P < 0.05$).

Conclusion: The miR-150-5p expression is decreased in HCC cells, and up-regulation of miR-150-5p expression can inhibit the migration and invasion of HCC cells and the mechanism may be associated with its suppressing MMP2 and MMP9 expressions.

Key words Carcinoma, Hepatocellular; MicroRNAs; Neoplasm Invasiveness

CLC number: R735.7

HCC是世界范围内排名第五的恶性肿瘤,其发病率在东亚和发达国家不断增加^[1-2]。手术仍是治疗HCC的首选,但由于术后复发率高和远处转移,HCC预后仍较差^[3]。深入探讨HCC迁移及侵袭的分子机制对提高肝癌的诊治水平具有重要的意义。小分子核糖核酸(miRNA)是一类非编码RNA,长度在19-21 nt。其功能常见于真核细胞基因表达的负调控^[4],研究^[5-8]证实,miRNA参与调控肿瘤发生发展的多个生物学过程,包括增殖、凋亡、侵袭、转移等。miR-150-5p在多种肿瘤中见报道^[9-11],但是在HCC中的生物学功能及其作用机制目前尚未见报道,本研究旨在研究miR-150-5p对HCC细胞的迁移及侵袭的影响,并探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人HCC细胞系HepG2及正常肝组织细胞系L02购自美国ATCC细胞库,采用DMEM培养基(添加10%胎牛血清以及抗生素)进行培养。细胞培养于37℃、5% CO₂恒温细胞培养箱中。

1.2 RNA提取和荧光定量PCR

按照mirVana miRNA isolation kit (Ambion, USA)说明书,从培养细胞中提取总RNA。然后按照TaqMan miRNA reverse transcription kit (ABI, USA)说明书,从5 ng的总RNA逆转录合成cDNA。所得产物按照miRNA-specific TaqMan miRNA assay kit (ABI, USA)说明书,在ABI 7500实时定量PCR仪中,以U6小核RNA作为内参,量化miR-150-5p的表达水平。

1.3 细胞分组与转染

HepG2细胞分为对照组(转染miRNA随机序列)和miR-150-5p组(转染miR-150-5p)。人源

miR-150-5p (UCU CCC AAC CCU UGU ACC AGU G)由上海吉玛公司合成。通过Lipofectamine 2000 (Invitrogen)转染肝细胞癌细胞系。

1.4 划痕实验

将细胞用DMEM(含有10%FBS)培养在六孔板上,待细胞融合后,用sterile pipette枪头沿直线用力划直线。划痕后0~24 h,分别在不同时间点用反转的Olympus IX50显微镜通过10×物镜和Image-Pro Plus软件捕获和记录细胞迁移的图像。划痕愈合率=(划痕后即刻的划痕面积-划痕后48 h的划痕面积)/划痕后即刻的划痕面积×100%。实验重复3次,取平均值。划痕愈合率越高,表示细胞迁移能力越强。

1.5 Transwell小室基质渗透实验

细胞侵袭能力检测。2×10⁴个检测细胞种在Transwell小室的碳酸磷脂表面,上室BioCoat包被Matrigel基质胶(BD Biosciences, San Jose, CA),37℃培养细胞24 h,取出上层小室,将膜下面的侵袭细胞与1%多聚甲醛混合,用0.2% (w/v)结晶紫溶液染色15 min。用显微镜计数进入膜下的细胞量,随机取10个视野,取平均值。每组实验重复3次。

1.6 Western blot

加入裂解液提取细胞总蛋白,以每孔30 μg总蛋白上样,浓缩胶80 V电泳40 min,分离胶100 V电泳2 h。常规湿法转膜,5%脱脂奶粉封闭2 h。分别加入MMP2、MMP9、β-actin一抗,抗体浓度1:200,加入二抗山羊抗鼠1:1 000孵育2 h。ECL化学发光,凝胶成像系统显影。用Quantity One 1-D分析软件(美国Bio-Rad公司)对蛋白质印迹条带进行定量。以目的蛋白测定值与GAPDH的比值作为目标蛋白的相对表达量。

1.7 统计学处理

采用Graphpad 6.0统计作图软件,计量资料

用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组均数采用 *t* 检验, 配对的两组均数采用配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-150-5p 在 HCC 细胞系中低表达

通过荧光定量PCR方法对 miR-150-5p 的 mRNA 水平进行定量分析。结果显示, 在 HepG2 细胞系中 miR-150-5p 的表达量是 L02 细胞系的 (0.26 ± 0.02) 倍 ($P < 0.01$)。

2.2 miR-150-5p 抑制 HCC 细胞迁移与侵袭

HepG2 细胞转染 miR-150-5p 后的定量 PCR 显示, miR-150-5p 组的 miR-150-5p 水平为对照组的 (9.53 ± 0.84) 倍 (图 1A)。细胞培养 24 h 后, 划痕实验显示, miR-150-5p 组的细胞划痕愈合率明显低于对照组 [(54.63 ± 4.36) % vs. (87.51 ± 7.84) % , $P < 0.01$] (图 1B); Transwell 小室基质渗透实验显示, miR-150-5p 组 HepG2 细胞侵袭数为 (138 ± 12) 个, 对照组为 (452 ± 43) 个, 两组差异有统计学意义 ($P < 0.01$) (图 1C)。

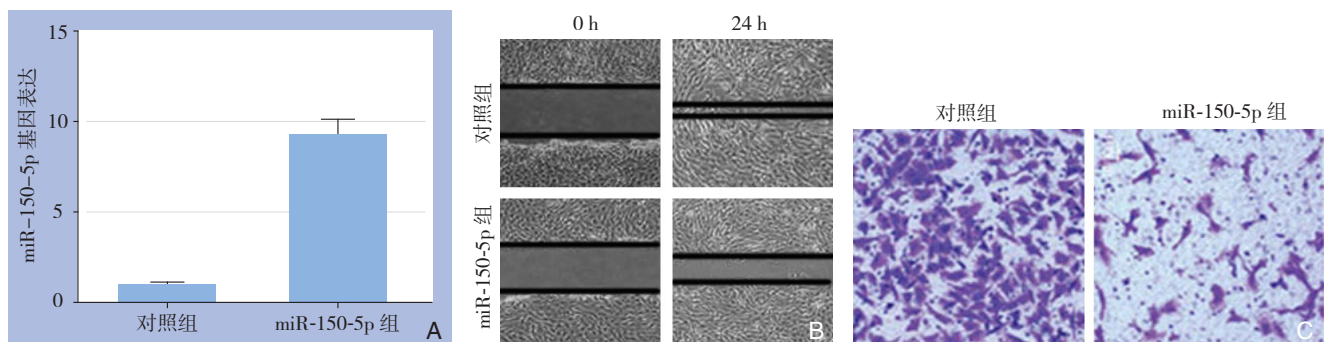


图 1 miR-150-5p 转染对 HepG2 细胞的影响 A: miR-150-5p 表达量; B: 细胞划痕愈合能力检测 ($\times 200$); C: 细胞侵袭能力检测 ($\times 200$)

Figure 1 Effects of miR-150-5p transfection on HepG2 cells A: Relative expression level of miR-150-5p; B: Determination of migration ability of the cells; C: Determination of invasion ability of the cells

2.3 miR-150-5p 抑制 MMP2 和 MMP9 表达

Western blot 实验显示, 在 miR-150-5p 组的 HepG2 细胞中, MMP2 和 MMP9 蛋白相对表达水平为 0.78 ± 0.06 、 0.82 ± 0.07 , 而对照组为 1.75 ± 0.15 、 1.85 ± 0.14 , 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 2)。

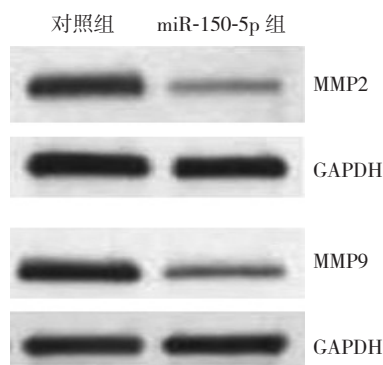


图 2 miR-150-5p 转染对 HepG2 细胞 MMP2 和 MMP9 表达的影响

Figure 2 Effect of miR-150-5p transfection on MMP2 and MMP9 expressions in HepG2 cells

3 讨论

HCC 在所有消化系统肿瘤中占 20% 以上, 在世界范围内发病率排第 6 位, 其中在男性中排第 5 位, 女性中排第 8 位, 大约占了新发肿瘤病例的 5.7%^[12]。发病原因主要包括 HBV 感染和黄曲霉素感染, 依据其组织分型, 可分为肝细胞型、胆管细胞型和混合型 3 种。治疗方法包括介入、微创、手术及放化疗等。手术切除仍是治疗 HCC 的最有效方法, 小 HCC 术切除后 1 年生存率可达 80% 以上, 5 年生存率也接近 50%^[13]。但是手术后复发及转移仍是威胁 HCC 长期生存的重要因素。据报道^[14], HCC 切除术后 5 年复发率超过 70%, 早期 HCC 也超过 40%, 门静脉癌栓发生率为 44.0%~62.2%。而一旦合并门静脉癌栓, 若不进行治疗, 中位生存时间低至 2.7~4 个月。现代肿瘤学认为肿瘤的发生发展是一系列分子或信号通路发生突变的结果, 诸如 Caveolin-1、miRNA^[6-7] 等。

近期研究^[15-16]发现miR-150在多种肿瘤的迁移和侵袭过程发挥重要调节作用。例如, miR-150通过靶向抑制ESCC或上皮卵巢癌中的ZEB1基因从而抑制癌细胞的侵袭。与此相反的是, 其他研究显示, miR-150在某些肿瘤组织中表达上调, 并发挥促进肿瘤细胞转移的作用。Cao等^[16]的研究表明, miR-150在肺癌组织显著上调, 且其过表达通过靶向SRC激酶信号抑制剂1作从而促进肺癌细胞的增殖和迁移。因此, miR-150在不同的肿瘤类型中表现出不同的调控功能。

本研究中发现miR-150-5p在HCC细胞系中下调表达, 并且转染miR-150-5p的miR-150-5p组的细胞划痕愈合率为(54.63 ± 4.36)%, 显著低于对照组的(87.51 ± 7.84)%。miR-150-5p组HepG2细胞迁移数为显著低于对照组。表明过表达miR-150-5p可显著抑制HCC细胞迁移和侵袭。这与他人在其他肿瘤研究中的结果相似, Sakr等^[9]发现miR-150-5p在胶质瘤中表达量显著下调, 并且对胶质瘤细胞系U87和U251转染miR-150-5p后, 可抑制胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭, 过表达miR-150-5p可降低MT1-MMP和MMP-2的表达。Wang等^[10]在结肠癌中发现miR-150-5p可抑制结肠癌细胞增殖和侵袭, 其是通过靶向结合MUC4基因起作用的。孙洋等^[11]发现miR-150-5p在胰腺癌组织及细胞系中表达量显著低于正常胰腺组织及细胞系, 在胰腺癌细胞系中过表达miR-150-5p可抑制细胞增殖、诱导细胞周期阻滞和促进胰腺细胞凋亡。

MMP是锌依赖的因而降低细胞外的大分子, 如胶原、纤连蛋白、层粘连蛋白和蛋白聚糖等, 因此MMP在肿瘤新生血管生成、肿瘤侵袭和转移中扮演着重要的角色^[18-20]。MMP包括两种类型, 分别是细胞膜锚定的MMP(如MMP14、MMP15、MMP16等)和分泌型MMP(如MMP2、MMP9、MMP7、MMP26等)^[18]。其中, MMP2和MMP9在癌症转移起着至关重要的作用^[18]。基于MMP2和MMP9对HCC的细胞迁移与侵袭的重要作用, 推测miR-150-5p与MMP2以及MMP9存在关联。实验发现miR-150-5p显著抑制MMP2和MMP9的mRNA和蛋白水平。因此, miR-150-5p很可能通过抑制MMP2和MMP2的表达从而抑制HCC细胞的迁移与侵袭。

本研究发现HCC细胞迁移与侵袭的调控与miR-150-5p有关, 为HCC发病机制的研究提供了新的线索, 并加深了对HCC发病机制的理解。miR-150-5p可能成为HCC治疗的新靶标。

参考文献

- [1] El-Serag HB, Mason A C. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States[J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(10):745-750.
- [2] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2):69-90.
- [3] Xia L, Huang W, Tian D, et al. Overexpression of forkhead box C1 promotes tumor metastasis and indicates poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2013, 57(2):610-624.
- [4] Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Science*, 2001, 294(5543):862-864.
- [5] Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay[J]. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(9):597-610.
- [6] 肖亮, 王志明. microRNA 在肝细胞癌发生发展和诊治中的作用[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(1):106-110.
Xiao L, Wang ZM. Oncogenic role and both diagnostic and therapeutic potential of microRNA in liver cancer[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2014, 23(1):106-110.
- [7] 解寒冰, 孙建军, 夏云展. microRNA-497 在肝细胞癌中的表达及意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2013, 22(7):895-899.
Xie HB, Sun JJ, Xia YZ. MicroRNA-497 expression in hepatocellular carcinoma and its significance[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2013, 22(7):895-899.
- [8] 张志波, 何庆良, 石铮, 等. Caveolin-1在肝细胞癌表达及与肿瘤血管生成的关系[J]. *中国普通外科杂志*, 2012, 21(1):53-57.
Zhang ZB, He QL, Shi Z, et al. Expression of caveolin-1 in hepatocellular carcinoma and its relation with tumor angiogenesis[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2012, 21(1):53-57.
- [9] Sakr M, Takino T, Sabit H, et al. miR-150-5p and miR-133a suppress glioma cell proliferation and migration through targeting membrane-type-1 matrix metalloproteinase[J]. *Gene*, 2016, 587(2):155-162.
- [10] Wang WH, Chen J, Zhao F, et al. MiR-150-5p suppresses colorectal cancer cell migration and invasion through targeting MUC4[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 15(15):6269-6273.
- [11] 孙洋, 金香兰, 张婷婷, 等. miR-150-5p抑制胰腺癌细胞生长[J]. *中华病理学杂志*, 2013, 42(7):460-464.
Sun Y, Jin XL, Zhang TT, et al. MiR-150-5p inhibits the proliferation and promoted apoptosis of pancreatic cancer cells[J]. *Chinese Journal of Pathology*, 2013, 42(7):460-464.
- [12] Zhu R X, Seto W K, Lai C L, et al. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma in the Asia-Pacific Region[J]. *Gut Liver*, 2016, 10(3):332-339.
- [13] 沈锋, 吴孟超. 原发性肝癌多学科诊治——提高肝癌外科疗效的近期研究[J]. *中国医学前沿杂志:电子版*, 2014, 6(5): 4-8.

- Shen F, Wu MC. Multidisciplinary diagnosis and treatment of primary liver cancer——study for improving short-term efficacy in surgical treatment of liver cancer[J]. Chinese Journal of the Frontiers of Medical Science: Electronic Version, 2014, 6(5):4-8.
- [14] 程树群, 孙居仙, 石洁, 等. 肝细胞癌伴门静脉癌栓的治疗现状[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2015, 22(10):1157-1160.
- Cheng SQ, Sun JX, Shi J, et al. Current status of treatment of hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombus[J]. Chinese Journal of Bases and Clinics in General Surgery, 2015, 22(10):1157-1160.
- [15] Jin M, Yang Z, Ye W, et al. MicroRNA-150 predicts a favorable prognosis in patients with epithelial ovarian cancer, and inhibits cell invasion and metastasis by suppressing transcriptional repressor ZEB1[J]. PLoS One, 2014, 9(8):e103965. doi: 10.1371/journal.pone.0103965.
- [16] Cao M, Hou D, Liang H, et al. miR-150 promotes the proliferation and migration of lung cancer cells by targeting SRC kinase signalling inhibitor 1[J]. Eur J Cancer, 2014, 50(5):1013-1024.
- [17] Xu N, Shen C, Luo Y, et al. Upregulated miR-130a increases drug resistance by regulating RUNX3 and Wnt signaling in cisplatin-treated HCC cell[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 425(2):468-472.
- [18] Egawa N, Koshikawa N, Tomari T, et al. Membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP/MMP-14) cleaves and releases a 22-kDa extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) fragment from tumor cells[J]. J Biol Chem, 2006, 281(49):37576-37585.
- [19] Taras D, Blanc J F, Rullier A, et al. Pravastatin reduces lung metastasis of rat hepatocellular carcinoma via a coordinated decrease of MMP expression and activity[J]. J Hepatol, 2007, 46(1):69-76.
- [20] Miyoshi A, Kitajima Y, Sumi K, et al. Snail and SIP1 increase cancer invasion by upregulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells[J]. Br J Cancer, 2004, 90(6):1265-1273.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 梁治坤, 程凡天, 胡走肖, 等. miR-150-5p抑制肝癌细胞的迁移和侵袭及其机制[J]. 中国普通外科杂志, 2016, 25(8):1175-1179. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.08.015

Cite this article as: Liang ZK, Cheng FT, Hu ZX, et al. Inhibitory effect of miR-150-5p on migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells and its mechanism[J]. Chin J Gen Surg, 2016, 25(8):1175-1179. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.08.015

本刊对来稿中统计学处理的有关要求

1. 统计研究设计: 应交代统计研究设计的名称和主要做法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性或横断面调查研究); 实验设计(应交代具体的设计类型, 如自身配对设计、成组设计、交叉设计、正交设计等); 临床试验设计(应交代属于第几期临床试验, 采用了何种盲法措施等)。主要做法应围绕 4 个基本原则(随机、对照、重复、均衡)概要说明, 尤其要交代如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

2. 资料的表达与描述: 用 $\bar{x} \pm s$ 表达近似服从正态分布的定量资料, 用 $M(QR)$ 表达呈偏态分布的定量资料; 用统计表时, 要合理安排纵横标目, 并将数据的含义表达清楚; 用统计图时, 所用统计图的类型应与资料性质相匹配, 并使数轴上刻度值的标法符合数学原则; 用相对数时, 分母不宜小于 20, 要注意区分百分率与百分比。

3. 统计分析方法的选择: 对于定量资料, 应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的, 选用合适的统计分析方法, 不应盲目套用 t 检验和单因素方差分析; 对于定性资料, 应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备条件以分析目的, 选用合适的统计分析方法, 不应盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析, 应结合专业知识和散布图, 选用合适的回归类型, 不应盲目套用简单直线回归分析, 对具有重复实验数据的回归分析资料, 不应简单化处理; 对于多因素、多指标资料, 要在一元分析的基础上, 尽可能运用多元统计分析方法, 以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系进行全面、合理的解释和评价。

4. 统计结果的解释和表达: 当 $P < 0.05$ (或 $P < 0.01$) 时, 应说明对比组之间的差异有统计学意义, 而不应说对比组之间具有显著性(或非常显著性)的差别; 应写明所用统计分析方法的具体名称(如: 成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等), 统计量的具体值(如 $t=3.45$, $\chi^2=4.68$, $F=6.79$ 等)应可能给出具体的 P 值(如 $P=0.0238$); 当涉及到总体参数(如总体均数、总体率等)时, 在给出显著性检验结果的同时, 再给出 95% 置信区间。

中国普通外科杂志编辑部