



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.03.020
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2017.03.020
Chinese Journal of General Surgery, 2017, 26(3):395-400.

· 简要论著 ·

miR-21 在肝癌中的表达及其与 PTEN 的关系

王文耀, 张鸿飞, 唐森, 王立超, 刘龙龙

(河北医科大学第二医院 普通外科, 河北 石家庄 050000)

摘要

目的: 探讨 miR-21 在肝癌中的表达及其与 PTEN 的关系。

方法: 用 RT-PCR 检测 119 例肝癌组织与癌旁组织中 miR-21 与 PTEN 的表达情况; 双报告基因实验检测肝癌细胞中 miR-21 对 PTEN 转录水平的影响; 分析 miR-21 表达与肝癌患者临床病理因素的关系; 在肝癌细胞中分别过表达及抑制 miR-21 的表达之后, 检测细胞增殖与 PTEN 及其下游通路蛋白的表达。

结果: 肝癌组织中 miR-21 表达明显高于癌旁组织, 而 PTEN 则相反 (均 $P < 0.05$); miR-21 与 PTEN 的表达具有一定相关性 ($r^2 = 0.6767$, $P < 0.05$); miR-21 可并抑制 PTEN 转录活性; miR-21 的表达与肝癌患者 AFP 水平及 TNM 分期有关 (均 $P < 0.05$); 肝癌细胞过表达 miR-21 后, 肝癌细胞增殖明显增强, PTEN 表达明显调, 并影响其下游蛋白的表达, 而抑制 miR-21 则相反 (均 $P < 0.05$)。

结论: miR-21 在肝癌中表达升高, 且 miR-21 可以通过下调 PTEN 表达进一步促进肝癌细胞的增殖。

关键词

癌, 肝细胞; 微 RNAs; 细胞增殖

中图分类号: R735.7

肝癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一, 约 80%~90% 是原发性肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)^[1], 有研究数据显示, 肝癌

的发病率和病死率均在恶性肿瘤的排名中靠前, 全球每年约有 60 多万的新增肝癌患者, 其中约有 58 万人死于肝癌^[2]。肝癌是一种起源于肝细胞的恶性肿瘤, 肝癌的最主要病因目前被认为是病毒感染 (例如乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒)、非病毒因素 (酒精以及黄曲霉素) 以及遗传性肝病和肝硬化^[3]。在我国, 目前肝癌的主要致病因素为乙型肝炎病毒^[4]。目前虽然肝癌的发病机

收稿日期: 2016-03-22; 修订日期: 2017-01-06。

作者简介: 王文耀, 河北医科大学第二医院副主任医师, 主要从事肝胆胰脾外科方面的研究。

通信作者: 王文耀, Email: Wangwy117@163.com

2200.2016.10.005.

Zheng CM, Wang ZJ, Ji Z, et al. The application value of the percutaneous catheter drainage guided by ultrasound in severe acute pancreatitis complicated with peripancreatic effusion[J]. Journal of Bengbu Medical College, 2016, 41(10):1275-1277. doi:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2016.10.005.

[2] 杨耀成, 黄耿文, 李宜雄, 等. 经皮穿刺置管引流治疗急性胰腺炎合并坏死感染的预后分析[J]. 肝胆胰脾外科杂志, 2015, 27(2):94-96. doi:10.11952/j.issn.1007-1954.2015.02.002.

Yang YC, Huang GW, Li YX, et al. Prognostic analysis on percutaneous catheter drainage in the treatment of acute pancreatitis combined with infected necrosis[J]. Journal of Hepatopancreatobiliary Surgery, 2015, 27(2):94-96. doi:10.11952/

j.issn.1007-1954.2015.02.002.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 阿不都热依木·阿不都拉, 伊斯马依力·艾麦提, 买买提吐尔逊·吐尔迪, 等. 超声引导下经皮穿刺置管引流术治疗重症胰腺炎合并胰周脓肿[J]. 中国普通外科杂志, 2017, 26(3):390-395. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.03.019

Cite this article as: ABUDUREYIMU·ABDL, YISIMAYILI·AMT, MAIMAITITUERXUN·TED, et al. Ultrasound-guided percutaneous catheter drainage in treatment of severe acute pancreatitis complicated with peripancreatic abscess[J]. Chin J Gen Surg, 2017, 26(3):390-395. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.03.019

制尚不完全阐明,但抑癌基因的异常失活以及癌基因的过度激活被认为是造成肝癌发生的主要因素^[5]。

微小RNA (miRNA) 是一类非编码的小分子RNA,一般可以在转录水平以及转录后水平上对基因表达进行调控^[6]。近年来,很多研究^[7-8]表明miRNA在各种生物学功能和疾病的调节方面起到重要的作用,某些miRNA的表达异常可以导致肿瘤的发生发展。目前有很多研究报道指出,肝癌的发生发展以及预后复发均与一系列特定的miRNA表达异常密切相关。因此通过对miRNA的研究可以为更好的发现肝癌的发病机制、并且为肝癌的分子诊断治疗提供理论依据、与此同时也可以作为判断肝癌预后的新的标准。miR-21作为典型的致癌性miRNA被广泛研究。有研究^[9]表明,miR-21在很多肿瘤中存在过度表达的情况,例如乳腺癌、宫颈癌、肺癌、结肠癌以及肝癌中均有miR-21过表达的报道。miR-21的过表达可以促进肝癌细胞的侵袭转移能力,此外,也有研究^[10]指出PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) 可以作为miR-21的一个靶基因,miR-21通过调节PTEN的表达来调节肝癌细胞的侵袭转移。但是目前关于miR-21调节肝癌细胞增殖情况的报道较少。

本研究通过分析119对肝癌标本来检验miR-21和PTEN在肝癌中的表达情况与它们之间的联系,并且探讨了miR-21在肝癌的发展中的作用。进一步通过HepG2细胞进行了一系列细胞实验探讨miR-21如何通过调节PTEN蛋白的表达调节肝癌细胞的增殖,以期待由此能找到肝癌新的诊疗手段。

1 材料与方法

1.1 材料

119例术前未接受过放化疗的经诊断确诊为肝癌的肝癌患者,取其肿瘤组织及癌旁组织,组织取下后置于液氮中备用。人肝癌HepG2细胞株(实验室冻存),DMEM培养基(hyclone,美国),胎牛血清(hyclone,美国),TRIzol(上海生工),氯仿(上海生工),异丙醇(上海生工),抗体:PTEN, cyclin D1, AKTpSer-473和GAPDH

(美国Santa), SYBR Green (美国Promega)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 在25 mL培养瓶中培养,并加入适量含10%胎牛血清的无抗生素的DMEM培养液于5%CO₂, 37℃的孵箱条件下培养,取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 MTT实验 分别将miR-21模拟物及对照及miR-21抑制物及对照(上海吉凯生物)转染处于对数生长期的HepG2细胞中,培养12 h后,分别于0、12、24、36、48 h使用MTT方法测量细胞增殖情况,在490 nm处记录吸光值。细胞增殖的抑制率计算公式为:抑制率=1-(剂量组平均OD值/对照组平均OD值)×100%。miR-21模拟物:AGC TAA AAA TAG CTT ATC AGA CTG ATG TTG AG; miR-21反义序列:GAT CCT CAA CAT CAG TCT GAT AAG CTA TTT TT。

1.2.3 双报告基因实验 分别将miR-21模拟物及TK-PTEN与PTEN WT及PTEN DEL(PCR得到去除PTEN与miR-21结合的突变质粒)共同转染到处于对数生长期的HepG2细胞中,将报告基因的细胞裂解液充分混匀,吸尽去除细胞培养液后可以直接加入报告基因细胞裂解液;充分裂解后,4℃下10 000~15 000 g离心3~5 min,取上清用于测定。

1.2.4 Western blot 吸取20~50 μg蛋白样品,加入相应比例的SDS凝胶上样缓冲液(6×Loading Buffer),煮沸变性5 min,冷却后进行SDS-PAGE电泳,电泳浓缩胶电压90 V,分离胶110 V,待溴酚蓝电泳至凝胶的底部时停止电泳、转膜、封闭后,一抗4℃过夜。二抗室温1 h。

1.2.5 RT-PCR 取适量(50~100 mg)组织样品粉碎组织,加1 mL TRIzol试剂在室温下静置1~5 min。加0.2 mL氯仿,振摇15 s,室温静置2~3 min。离心15 min(12 000 g, 2~8℃)。吸取上层水相,0.4~0.5 mL到新的Ep管中,加入0.5 mL异丙醇,上下颠倒混匀,室温放置5~10 min。离心10 min(12 000 g, 2~8℃)弃上清。加入75%乙醇,振摇数次。离心5 min(7 500 g, 2~8℃)。真空干燥后,用DEPC处理水30~40 μL溶解沉淀,55~60℃孵育10~15 min。随后反转录成cDNA,进行RT-PCR反应。所用引物为PTEN正向:5'-AGC TGG AAA GGG ACG AAC TG-3',

反向: 5'-ACA CAC AGG TAA CGG CTG AG-3';
 miR-21 正向: 5'-ACA CTC CAG CTG GGC CAG
 TGT TGG-3', cyclin D1 正 向: 5'-CCG AGG
 AGC TGC TGC AAA TGG AG-3', 反向: 5'-GAA
 ATC GTG CGG GGT CAT TGC G-3'; U6 正向:
 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3', 反向: 5'-AAC
 GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'; GAPDH 正向:
 5'-CATCCCTTCTCCCCACACAG-3', 反向: 5'-AGT
 CCC AGG GCT TTG ATT TG-3'。

1.3 统计学处理

使用SPSS 13.0软件进行统计学分析。使用配
 对样本检验分析癌与癌旁组织的miR-21相对表达量
 的差异程度,使用Mann-Whitney 检验分析miR-21
 相对表达量与肝癌患者临床病理因素的相关性,
 使用Spearman's rank检验分析miR-21相对表达量
 与PTEN相对表达量的关联性。其中 $P < 0.05$ 为差异
 具有统计学意义。

2 结 果

2.1 肝癌组织中 miR-21 与 PTEN 的表达情况

RT-PCR结果显示,肝癌患者的肿瘤组织中
 miR-21普遍高于癌旁组织,PTEN则相反(均
 $P < 0.05$) (图1);相关性分析显示,miR-21
 与PTEN的表达具有一定相关性($r^2 = 0.6767$,
 $P < 0.05$);报告基因实验结果显示,在HepG2
 细胞中miR-21可以打靶PTEN并且抑制其表达
 ($P < 0.05$) (图2)。

2.2 miR-21 与肝癌患者临床病理因素的关系

统计学分析显示,miR-21的表达与肝癌患者
 AFP水平及TNM分期有关(均 $P < 0.05$),而与患者年
 龄、性别、肿瘤大小无关(均 $P > 0.05$) (表1)。

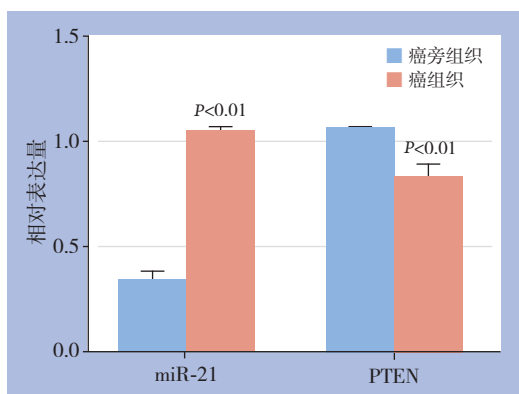


图1 肝癌组织与癌旁组织中 miR-21 与 PTEN 的表达

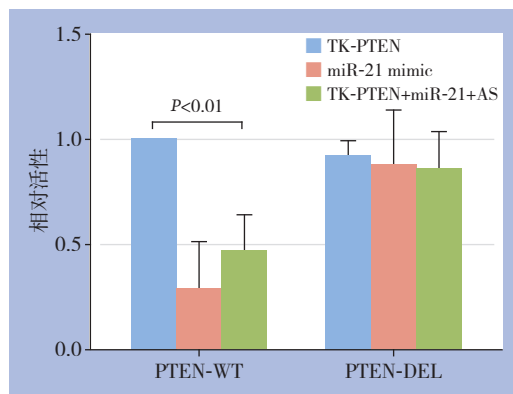


图2 miR-21 对 PTEN 转录的抑制

表1 miR-21 与肝癌患者临床病理因素的关系分析

变量	n	低表达	高表达	P
性别[n (%)]				
男	39	20 (51.3)	19 (48.7)	0.53
女	80	39 (48.8)	41 (51.2)	
年龄[岁, n (%)]				
< 50	54	26 (48.1)	28 (51.9)	0.67
≥ 50	65	33 (50.8)	32 (49.2)	
AFP[n (%)]				
< 25	43	31 (72.)	12 (27.9)	0.01
≥ 25	76	28 (36.)	48 (63.2)	
肿瘤大小[cm, n (%)]				
< 5	51	29 (56.)	22 (43.)	0.06
≥ 5	68	30 (44.1)	38 (55.9)	
TNM分期[n (%)]				
I/II	61	42 (68.9)	19 (31.)	<0.01
III/IV	58	17 (29.)	41 (70.7)	

2.3 miR-21 对响肝癌细胞增殖的影响

miR-21过表达后,肝癌细胞HepG2的增殖
 明显增强,miR-21受到抑制后,肝癌细胞HepG2
 的增殖明显抑制,差异均有统计学意义(均
 $P < 0.05$) (图3)。

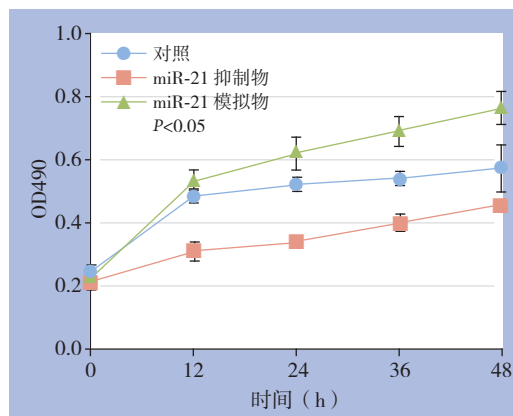


图3 不同 miR-21 表达状态 HepG2 细胞的增殖情况

2.4 miR-21 对 PTEN 及其下游增殖相关通路蛋白的影响

miR-21 过表达或抑制后, 可以抑制或上调

PTEN 的表达, 并影响其下游的 Akt 通路的磷酸化水平与 cyclin D1 的表达, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 4)。

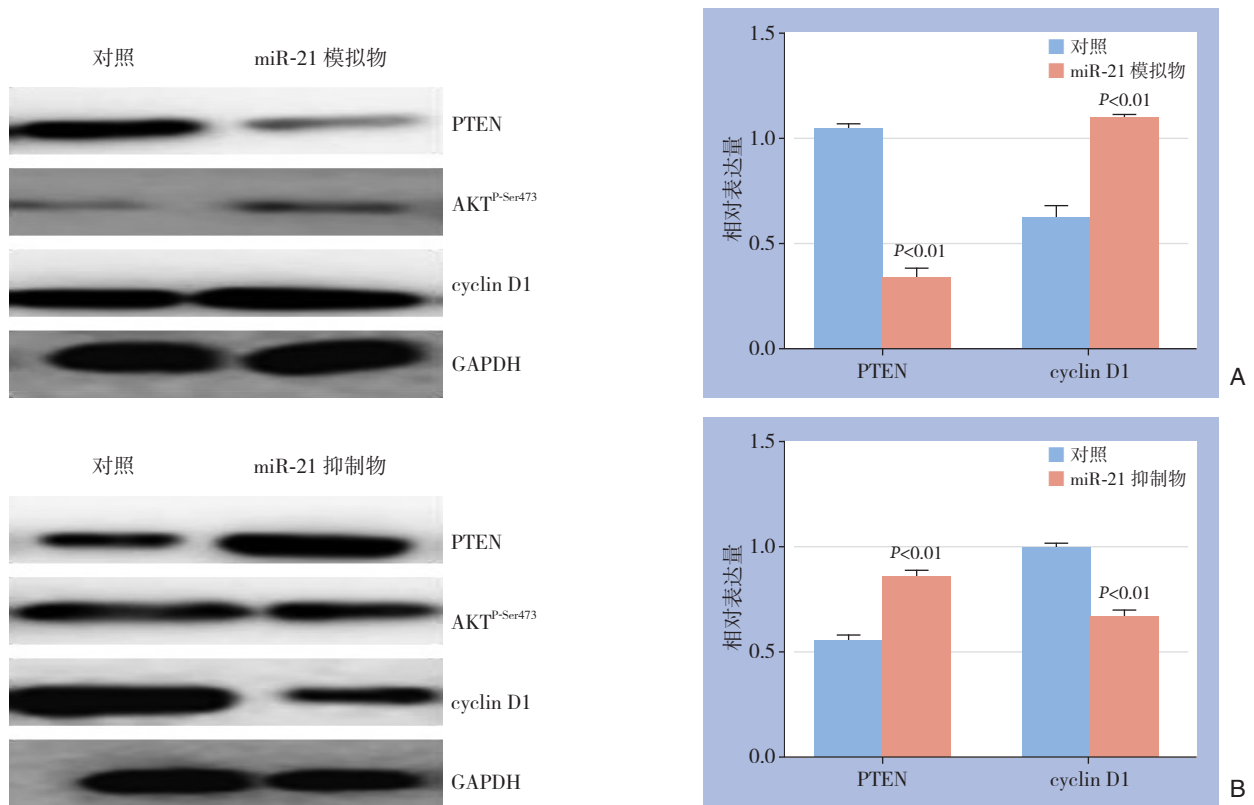


图 4 miR-21 对 PTEN 及其下游增殖相关通路蛋白表达的影响 A: miR-21 过表达; B: miR-21 抑制

3 讨论

肝癌作为一种常见的恶性肿瘤, 全球每年的肝癌患者新增数量约占恶性肿瘤的 4%, 目前每年肝癌的新增病例超过 62 万例, 肝癌的发病居恶性肿瘤的第 6 位, 肝癌的病死率居肿瘤相关死亡的第 3 位^[11]。目前我国的肝癌发病率在世界居高不下, 我国的发病人数约占全球的 50% 以上, 是国内仅次于肺癌的肿瘤相关死亡疾病^[12]。肝癌的发生发展涉及多种细胞通路的异常调控, 肝癌细胞与正常细胞相比会出现增殖、分化、凋亡与侵袭转移等多种功能蛋白的异常表达^[13]。

miRNA 能够调控转录后蛋白水平, 并且通过调节各种信号分子 (生长因子、转录因子等) 来实现对细胞增殖、分化、新陈代谢、侵袭转移等的调控^[14]。目前的研究指出, miRNA 与人类的多种重大疾病如病毒感染、肿瘤、心血管疾病等的发生发展密切相关。大量证据表明正常组织中

的 miRNA 表达图谱与肿瘤组织中有明显差异, 很多肿瘤中有很多 miRNA 被报道存在异常表达, 这些 miRNA 在肿瘤中可能发挥着类似抑癌基因或原癌基因的作用^[15]。miRNA 即可以作为抑癌基因下调原癌基因的活性, 也可以作为原癌基因下调抑癌基因的表达^[16-17], 这些均说明 miRNA 可以作为一种潜在的肿瘤标志物用于肿瘤的诊断或者预后评估。miRNA 在肝癌的发生发展中起到重要作用, 很多 miRNA 被证明可以直接参与肝癌细胞的增殖、凋亡、分化与侵袭转移^[18]。因此, 对于 miRNA 的研究不但可以用于诊断肝癌、以及肝癌的个体化治疗还可以作为判断肝癌预后的重要工具。

miR-21 在多种肿瘤中被认为起到促进肿瘤发生发展的作用, 它可以通过调节多种靶基因的表达来参与肿瘤的调控^[19]。研究表明, 在胶质瘤中 miR-21 可以通过调节 TIMP3 与 RECK 以及基质金属蛋白酶来调节胶质瘤的发生发展; 在乳腺癌中 miR-21 也可以通过调节凋亡相关蛋白来促进乳

腺癌细胞的生长;在肠癌细胞系中的研究证实,miR-21可以通过调节PDCD4以及相关蛋白来促进细胞的侵袭能力;肝癌细胞中,miR-21也被证明是高表达的^[19],并且其可以通过调节PTEN的表达来促进肝癌细胞的侵袭转移^[20-21],但是关于其如何调节肝癌细胞的增殖报道较少。研究^[22]表明多种肿瘤中PTEN基因的缺失或者突变可能是肿瘤发生发展的重要机制,有报道指出PTEN可以通过调节下游的PI3K/AKT通路来影响细胞的增殖与侵袭转移。并且也有研究^[23]表明约27%的肝癌中存在PTEN的杂合性缺失。

本研究通过分析119例肝癌患者的组织以及癌旁组织发现,大多数肿瘤组织中miR-21的表达普遍高于癌旁组织,进一步分析发现miR-21的表达与肝癌的发生发展密切相关。在对患者组织样本进行分析时发现肿瘤组织中PTEN的表达明显低于癌旁组织并且与miR-21具有一定相关性。由此推断PTEN可能与miR-21具有一定相关性,通过报告基因实验,印证了miR-21可以特异性的打靶并且抑制PTEN的表达。由于PTEN可以调节肿瘤的一系列生物学功能,尤其是对肿瘤细胞的增殖有很明确的调节作用,因此对miR-21是否可以通过调节PTEN的表达来影响HepG2细胞的增殖情况进行了分析,MTT试验发现miR-21可以通过抑制PTEN的表达来促进HepG2细胞的增殖。接下来我们通过Western blot与RT-PCR实验分析了miR-21对PTEN下游经典的AKT通路的作用,发现miR-21通过抑制PTEN来抑制其下游Akt通路的磷酸化水平,也提高了cyclin D1的表达,进而促进了肝癌细胞的增殖水平。

参考文献

- [1] 涂青松,何翦太,陈伟.抑制过氧化物酶1表达对肝癌细胞放射敏感性的影响[J].中国普通外科杂志,2016,25(2):245-251. doi: 10.3978/j.issn.1005-6947.2016.02.015.
- [2] 石世代,冯潜,裴轩增,等.干扰素诱导跨膜蛋白3在肝癌中的表达及功能研究[J].中国普通外科杂志,2016,25(2):238-244. doi: 10.3978/j.issn.1005-6947.2016.02.014.
- [3] Shi SD, Feng Q, Pei XZ, et al. Interferon-induced transmembrane protein3 expression and its function in hepatocellular carcinoma[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(2):238-244. doi: 10.3978/j.issn.1005-6947.2016.02.014.
- [4] Lin CC, Cheng YT, Chen M WT, et al. The Effectiveness of Multiple Electrode Radiofrequency Ablation in Patients with Hepatocellular Carcinoma with Lesions More than 3 cm in Size and Barcelona Clinic Liver Cancer Stage A to B2[J]. Liver Cancer, 2016, 5(1):8-20. doi: 10.1159/000367755.
- [5] He ZX, Xiang P, Gong JP, et al. Radiofrequency ablation versus resection for Barcelona clinic liver cancer very early/early stage hepatocellular carcinoma: a systematic review[J]. Ther Clin Risk Manag, 2016, 12:295-303. doi: 10.2147/TCRM.S96760.
- [6] Kus T, Aktas G, Sevinc A, et al. Tyrosine kinase inhibitors improve parenchymal findings of liver cirrhosis in a patient exhibiting concomitant hepatocellular carcinoma and renal cell cancer[J]. Mol Clin Oncol, 2016, 4(2):290-292.
- [7] Shyu AB, Wilkinson MF, van Hoof A, et al. Messenger RNA regulation: to translate or th degrade[J]. EMBO J, 2008, 27(3):471-478.
- [8] Dimopoulos K, Gimsing P, Grønbaek K. Aberrant microRNA expression in multiple myeloma[J]. Eur J Haematol, 2013, 91(2):95-105. doi: 10.1111/ejh.12124.
- [9] Bommer GT, Gerin I, Feng Y, et al. p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes[J]. Curr Biol, 2007, 17(15):1298-1307.
- [10] Najafi Z, Sharifi M, Javadi G. Degradation of miR-21 induces apoptosis and inhibits cell proliferation in human hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Gene Ther, 2015, 22(11):530-535. doi: 10.1038/cgt.2015.51.
- [11] Li ZB, Li ZZ, Li L, et al. MiR-21 and miR-183 can simultaneously target SOCS6 and modulate growth and invasion of hepatocellular carcinoma (HCC) cells[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19(17):3208-3217.
- [12] Sun JJ, Chen GY, Xie ZT. MicroRNA-361-5p Inhibits Cancer Cell Growth by Targeting CXCR6 in Hepatocellular Carcinoma[J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 38(2):777-785. doi: 10.1159/000443033.
- [13] Wong CM, Wei L, Law CT, et al. Up-regulation of histone methyltransferase SETDB1 by multiple mechanisms in hepatocellular carcinoma promotes cancer metastasis[J]. Hepatology, 2016, 63(2):474-487. doi: 10.1002/hep.28304.
- [14] Bagchi A, Mills AA. The quest for the lp36 tumor suppressor[J]. Cancer Res, 2008, 68(8):2551-2556. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2095.
- [15] Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis[J]. Cell

- Death Digger, 2010, 17(2):193–199. doi: 10.1038/cdd.2009.56.
- [15] Li X, Zhang Y, Zhang Y, et al. Survival prediction of gastric cancer by a seven-microRNA signature[J]. Gut, 2010, 59(5):579–585. doi: 10.1136/gut.2008.175497.
- [16] Tsujiura M, Ichikawa D, Komatsu S, et al. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers[J]. Br J Cancer, 2010, 102(7):1174–1179. doi: 10.1038/sj.bjc.6605608.
- [17] Huang Z, Huang D, Ni S, et al. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer[J]. Int J Cancer, 2010, 127(1):118–126. doi: 10.1002/ijc.25007.
- [18] He C, Dong X, Zhai B, et al. MiR-21 mediates sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting autophagy via the PTEN/Akt pathway[J]. Oncotarget, 2015, 6(30):28867–28881. doi: 10.18632/oncotarget.4814.
- [19] Wang WY, Zhang HF, Wang L, et al. miR-21 expression predicts prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2014, 38(6):715–719. doi: 10.1016/j.clinre.2014.07.001.
- [20] Zhu Q, Wang Z, Hu Y, et al. miR-21 promotes migration and invasion by the miR-21-PDCD4-AP-1 feedback loop in human hepatocellular carcinoma[J]. Oncol Rep, 2012, 27(5):1660–1668. doi: 10.3892/or.2012.1682.
- [21] Wagenaar TR, Zabludoff S, Ahn SM, et al. Anti-miR-21 Suppresses Hepatocellular Carcinoma Growth via Broad Transcriptional Network Deregluation[J]. Mol Cancer Res, 2015, 13(6):1009–1021. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0703.
- [22] Wan XW, Jiang M, Cao HF, et al. The alteration of PTEN tumor suppressor expression and its association with the histopathological features of human primary hepatocellular carcinoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2003, 129(2):100–106.
- [23] Rahman MA, Kyriazanos ID, Ono T, et al. Impact of PTEN expression on the outcome of hepatitis C virus-positive cirrhotic hepatocellular carcinoma patients: possible relationship with COX II and inducible nitric oxide synthase[J]. Int J Cancer, 2002, 100(2):152–157.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 王文耀, 张鸿飞, 唐森, 等. miR-21在肝癌中的表达及其与PTEN的关系[J]. 中国普通外科杂志, 2017, 26(3):395–400. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.03.020

Cite this article as: Wang WY, Zhang HF, Tang M, et al. Expression of miR-21 in hepatic cancer and its relationship with PTEN[J]. Chin J Gen Surg, 2017, 26(3):395–400. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.03.020