

• 论 著 •

microRNA-218 在肝细胞癌中的表达及功能研究

肖 静, 杨元好, 刘文毅, 胡可轮

(深圳市宝安区松岗人民医院中心实验室, 广东深圳 518105)

摘 要:目的 探讨 microRNA-218 在肝细胞癌(HCC)中的表达水平及功能。方法 选取该院肝胆外科收治的 46 例 HCC 手术患者, 并将其分为转染组和未转染组, 比较两组 HepG2 细胞的 microRNA-218 表达、增殖、凋亡情况, 以及 B 细胞特异性莫洛尼白血病病毒插入位点 1(Bmi-1)和周期蛋白依赖性激酶 6(CDK6)的表达水平。结果 肝癌组织中 microRNA-218 表达水平明显低于癌旁组织 ($P < 0.05$); microRNA218 的表达水平与 HCC 的肿瘤大小、肿瘤 TNM 分期等临床病理特征密切相关 ($P < 0.05$); 转染组 HepG2 细胞增殖率在转染后 24、48、72 h 均明显低于未转染组 ($P < 0.05$); 转染组 HepG2 细胞凋亡率明显高于未转染组 ($P < 0.05$); HepG2 细胞转染后的 Bim-1、CDK6 表达水平均明显低于未转染组 ($P < 0.05$)。结论 microRNA-218 可通过下调潜在靶点的 Bim-1、CDK6 表达水平来抑制肝癌细胞增殖并促进其凋亡。

关键词: 肝细胞癌; microRNA-218; HepG2 细胞; B 细胞特异性莫洛尼白血病病毒插入位点 1; 周期蛋白依赖性激酶 6

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.22.027

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)22-3148-03

Expression and function of microRNA-218 in hepatocellular carcinoma

XIAO Jing, YANG Yuanhao, LIU Wenyi, Hu Kelun

(Central Laboratory, Songgang People's Hospital of Baoan District, Shenzhen, Guangdong 518105, China)

Abstract: **Objective** To study the expression level and function of micro RNA (microRNA) -218 in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** 46 cases of HCC surgery in the hepatobiliary surgery department of this hospital were selected and divided into the transfection group and non-transfection group. The expression, proliferation and apoptosis of microRNA-218 and the expression level of B cell specific Maloney leukemia virus insertion site 1(Bmi-1) and cycling-dependented kinase 6(CDK6) in HepG2 cells were compared between the two groups. **Results** The expression level of microRNA-218 in HCC tissue was significantly lower than that in paracancerous tissues ($P < 0.05$); the microRNA218 expression level was closely correlated with the clinicopathological characteristics such as tumor size and TNM stage ($P < 0.05$); the HepG2 cell proliferation rates at 24, 48, 72 h after transfection in the transfection group were significantly lower than those in the non-transfection group ($P < 0.05$); the HepG2 cell apoptosis rate in the transfection group was significantly higher than that in the non-transfection group ($P < 0.05$); the Bim-1 and CDK6 expression levels after HepG2 cell transfection in the transfection group were significantly lower than those in non-transfection group ($P < 0.05$). **Conclusion** microRNA-218 can suppress the proliferation of HCC cells and promotes HCC cells apoptosis by down-regulating the Bim-1 and CDK6 expression level in potential targets.

Key words: hepatocellular carcinoma; microRNA-218; HepG2 cell; Bim-1; CDK6

肝细胞癌(HCC)是一种具有高病死率的原发性肝癌, 属于常见的恶性肿瘤。临床上一般认为肝细胞癌的发生与乙型肝炎病毒感染密切相关, 但现阶段关于 HCC 的发生机制及其发展微观过程尚未完全明确^[1]。microRNA 属于小分子非编码单链 RNA, 参与到细胞增殖、分化、凋亡等重要活动的调控中^[2], 近年来已成为分子生物学、肿瘤医学方面的研究热点。国外有研究表明, microRNA 表达异常与 HCC 的发生存在着密切关联, 且发现 microRNA-218 在多种恶性肿瘤中的表达均呈下调或缺失状态, 有可能参与到恶性肿瘤细胞的增殖与凋亡过程中^[3-5]。但目前关于 microRNA-218 表达与肝细胞癌关系的研究报道在国内外均极为少见。本研究选取 2013 年 1 月至 2016 年 12 月 46 例 HCC 手术患者肝癌组织及癌旁组织标本进行检测和分析, 对 microRNA-218 在 HCC 中的表达水平及功能进行了解和明确, 以期对 HCC 的临床治疗提供新的着力点。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 1 月至 2016 年 12 月本院肝胆

外科收治的 46 例 HCC 手术患者作为研究对象, 其中男 33 例, 女 13 例, 年龄 33~69 岁, 平均年龄 (50.87±13.42) 岁。所有患者手术前均无放疗、化疗或介入治疗史, 术中切除的肝组织标本经病理细胞学检查证实为 HCC。采用 microRNA-218 拟态对 HepG2 细胞转染后, 将研究对象分为转染组和未转染组, 每组各 23 例。

1.2 仪器与试剂 microRNA 逆转录试剂盒、荧光实时定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 试剂盒、Trizol 试剂、脂质体购自美国 Invitrogen 公司, microRNA-218 特异性引物、microRNA-218 拟态及阴性对照物、内参 U6 购自广州锐博生物科技有限公司, B 细胞特异性莫洛尼白血病病毒插入位点 1(Bmi-1)引物和周期蛋白依赖性激酶 6(CDK6)引物均合成自上海生工生物工程股份有限公司, 胎牛血清购自浙江天杭生物科技有限公司, 达尔伯克改良伊格培养基 (DMEM) 来自于本实验室, 噻唑蓝 (MTT) 试剂、二甲基亚砜均购自美国 Roche 公司, 兔抗人 Bim-1 多克隆抗体、兔抗人 CDK6 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司, 电化学发光 (ECL) 试剂盒购自美国 Milipore 公司。

1.3 方法 收集的肝癌组织及癌旁组织标本均置于液氮中保存,采用 qRT-PCR 法检测标本中的 microRNA-218 表达水平。先采用 Trizol 试剂盒提取标本中的 RNA,提取后按照 microRNA 逆转录试剂盒说明书对 RNA 标本进行逆转录和离心,37℃下反应 60 min,5℃下反应 5 min,4℃下保存备用。按照 qRT-PCR 试剂盒的说明书对 microRNA-218 特异性引物、内参 U6、Bmi-1 引物、CDK6 引物进行反应,50℃下持续预孵育 2 min,95℃下持续预变性 2 min,95℃下持续变性 15 s,60℃下持续退火延伸 1 min,共扩增 40 个循环。采集荧光信号,对阈值循环数进行分析,计算 microRNA-218 水平,重复检测 3 次以确保其准确性,其中 Bmi-1 引物为 5'-GTG CTT TGT GGA GGG TAC TTC AT-3'(正向)和 5'-TTG GAC ATC ACA AAT AGG ACA ATA CT T-3'(反向),CDK6 引物为 5'-CCG TGG ATC TCT GGA GTG TT-3'(正向)和 5'-TCT CCT GGG AGT CCA ATC AC-3'(反向)。在含胎牛血清的 DMEM 培养基中培养人肝癌细胞株 HepG2,于 37℃的二氧化碳细胞培养箱中培养,稳定传代达到 3 代后,取 HepG2 细胞进行试验。采用 MTT 比色法、流式细胞仪分别对 HepG2 细胞增殖和凋亡情况进行检测,再采用 qRT-PCR 法、蛋白质印迹法对 microRNA 潜在靶点的 Bmi-1、CDK6 表达水平进行检测。将 Bmi-1、CDK6 一抗置于 4℃下孵育过夜,采用 TBST 溶液反复漂洗 6 次后加入适当浓度的 Bmi-1、CDK6 二抗,在 37℃下持续孵育 1 h,再采用 TBST 溶液反复漂洗 6 次,于暗室内加入 ECL 溶液中进行显色,曝光胶片。

1.4 观察指标 比较肝癌组织和癌旁组织 microRNA-218 表达水平;分析 microRNA-218 表达水平与 HCC 临床病理特征的相关性;比较转染组与未转染组 HepG2 细胞的 microRNA-218 表达、增殖、凋亡情况及 Bim-1 和 CDK6 的表达水平。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计学处理;microRNA-218、Bim-1 和 CDK6 表达水平经对数转换后以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;相关性采用 Spearman's 等级相关分析;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肝癌组织、癌旁组织 microRNA-218 表达水平比较 肝癌组织和癌旁组织中 microRNA-218 表达水平分别为 0.46 ± 0.20 和 1.55 ± 0.67 ,差异有统计学意义($t = 10.573, P < 0.05$)。

2.2 microRNA-218 表达水平与 HCC 临床病理特征的相关性 microRNA218 的表达水平与 HCC 的肿瘤大小、肿瘤 TNM 分期等临床病理特征密切相关($P < 0.05$),而与性别、年龄、乙型肝炎感染、肝硬化、血清甲胎蛋白水平、肝内转移、门静脉侵袭等临床病理特征无关($P > 0.05$)。见表 1。

2.3 转染组、未转染组 HepG2 细胞的 microRNA-218 表达水平比较 采用 microRNA-218 拟态对 HepG2 细胞转染后,转染组、未转染组 HepG2 细胞的 microRNA-218 表达水平分别为 1.08 ± 0.59 和 0.39 ± 0.24 ,差异有统计学意义($t = 5.195, P = 0.000$)。

2.4 转染组、未转染组 HepG2 细胞增殖、凋亡情况 转染组 HepG2 细胞增殖率在转染后 24、48、72 h 均明显低于未转染组,差异有统计学意义($P < 0.05$);转染组的 HepG2 细胞凋亡率明显高于未转染组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1、2。

表 1 microRNA-218 表达水平与 HCC 临床病理特征的相关性

临床病理特征	<i>r</i>	<i>P</i>
性别	0.125	0.890
年龄	0.131	0.845
乙型肝炎感染	-0.294	0.672
肝硬化	-0.265	0.697
血清甲胎蛋白水平	0.198	0.793
肿瘤大小	-0.627	0.005
肝内转移	-0.146	0.802
门静脉侵袭	-0.218	0.756
肿瘤 TNM 分期	-0.754	0.003

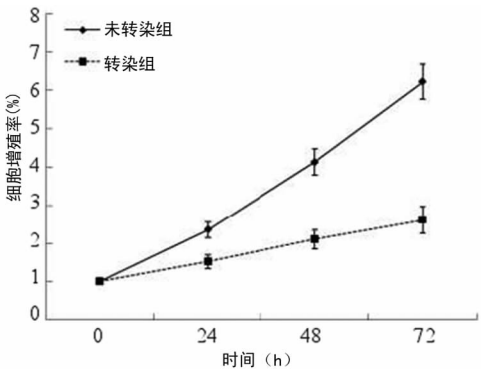


图 1 转染组、未转染组 HepG2 细胞在转染后不同时间段的增殖曲线

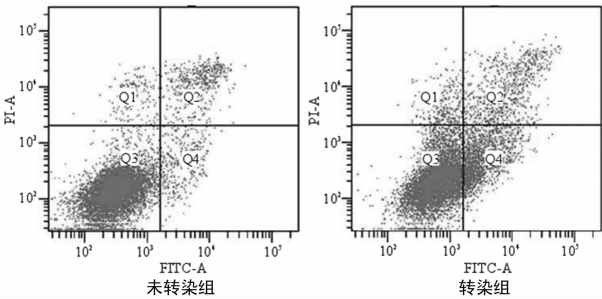


图 2 转染组、未转染组 HepG2 细胞在转染后不同时间段的凋亡情况

2.5 转染组、未转染组 HepG2 细胞的 Bim-1 和 CDK6 表达水平比较 转染组 HepG2 的 Bim-1、CDK6 表达水平均明显低于未转染组($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 转染与未转染 HepG2 细胞的 Bim-1 和 CDK6 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Bim-1	CDK6
转染组	23	0.48 ± 0.31	0.29 ± 0.17
未转染组	23	1.09 ± 0.65	1.13 ± 0.84
<i>t</i>		4.062	4.701
<i>P</i>		0.000	0.000

3 讨 论

HCC 是一种常见的恶性肿瘤,多发生于乙型病毒性肝炎

或丙型肝炎患者中,是由病毒性肝炎发展成的一种癌变,其癌细胞往往呈实性团块状排列,周围存在丰富的扩张血窦,其恶性程度较高,具有较高的致死率^[6-8]。据调查统计,全球范围内因肝癌病死的人数每年约在 60 万人^[9]。近年来,临床上对 HCC 的诊治进展较为明显,HCC 的病死率有所下降,但晚期肝癌或肝癌转移患者的预后仍然不容乐观。临床上还需进一步对 HCC 的发病机制进行深入研究,以寻找治疗的新靶点^[10-11]。

microRNA 是一种在动植物体内广泛存在的小分子非编码单链 RNA,可与靶 mRNA 分子的 3' 非编码区域碱基进行结合,从而使靶 mRNA 基因有效降解,参与到肿瘤细胞的增殖、分化、凋亡过程中,在多种肿瘤的发生、发展过程中起到了不同的作用^[12-14]。临床上诸多研究显示,HCC 患者的 microRNA 呈异常表达。本研究通过对 HCC 患者的肝癌组织、癌旁组织标本进行检测,发现肝癌组织中 microRNA-218 表达水平明显低于癌旁组织($P < 0.05$)。这表明 microRNA-218 在肝癌中呈低表达,且可能参与到肝癌的发生机制中。本研究对 microRNA-218 表达与 HCC 临床病理特征进行分析,发现 microRNA-218 的表达水平与 HCC 的肿瘤大小、肿瘤 TNM 分期等临床病理特征密切相关($P < 0.05$),提示 microRNA-218 低表达还可能参与到肝癌的肿瘤进展过程中^[15-16]。

本研究采用 microRNA-218 拟态对 HepG2 细胞进行转染,结果显示,转染组 microRNA-218 表达水平明显高于未转染组($P < 0.05$),转染组 HepG2 细胞增殖率在转染后 24、48、72 h 均明显低于未转染组($P < 0.05$),其细胞凋亡率明显高于未转染组($P < 0.05$)。这表明采用 microRNA-218 对肝癌细胞进行转染可有效促进其凋亡、抑制其增殖,可从提高肝癌患者机体内的 microRNA-218 表达水平着手对肝癌患者进行积极治疗。Bim-1、CDK6 均属于 microRNA-218 的潜在靶点蛋白,其中 Bim-1 蛋白属于核染色质调控因子多梳基因家族,而 CDK6 属于多功能蛋白且可对细胞的定向分化予以调节^[17-18]。本研究通过对 microRNA 潜在靶点检测,发现 HepG2 细胞转染后的 Bim-1、CDK6 表达水平均明显低于未转染组($P < 0.05$),提示采用 microRNA-218 下调 Bim-1、CDK6 水平可在一定程度上抑制癌细胞增殖并诱导其凋亡。

综上所述,microRNA-218 在肝癌细胞中呈低表达,可通过下调潜在靶点的 Bim-1、CDK6 表达水平抑制肝癌细胞增殖并促进其凋亡,其表达水平与肝癌的恶性程度有关。但由于 microRNA 的调控机制相对复杂,多个 microRNA 的调控靶点可能为同一个,而一个 microRNA 的下游靶点可能有多个。因此,临床上还应对 microRNA-218 在 HCC 中的调控机制作进一步研究。

参考文献

- [1] 韩中博,陈洪元,樊军卫,等.微小 RNA-155 在肝癌细胞中的表达及其对肝癌肝移植术患者预后的影响[J].中华医学杂志,2013,93(12):884-887.
- [2] 杨耿侠,郑加生.微小 RNA 在肝癌细胞治疗中的作用研

究进展[J].山东医药,2014,54(43):91-92.

- [3] Han Y, Pu R, Han X, et al. Association of a potential functional pre-miR-218 polymorphism and its interaction with hepatitis B virus mutations with hepatocellular carcinoma risk[J]. Liver Int, 2014, 34(5): 728-736.
- [4] Sui C, Xu F, Shen W, et al. Overexpression of miR-218 inhibits hepatocellular carcinoma cell growth through RET[J]. Tumour Biol, 2015, 36(3): 1511-1518.
- [5] Tu K, Li C, Zheng X, et al. Prognostic significance of miR-218 in human hepatocellular carcinoma and its role in cell growth[J]. Oncol Rep, 2014, 32(4): 1571-1577.
- [6] 曹金敏,陈国栋,贺更生,等.微小 RNA 在肝细胞癌侵袭转移中的研究进展[J].中国医药,2014,9(2):286-288.
- [7] 李微霞,李强,凌云,等.长链非编码 RNA 在肝细胞癌中的临床研究进展[J].中华肝脏病杂志,2016,24(8):628-631.
- [8] 常仁安,陈钟,陈小建. RNA 干扰技术及治疗肝细胞癌应用前景[J].现代肿瘤医学,2012,20(9):1982-1985.
- [9] 张良鹏,吴小娟,汤绍辉. RNA 干扰与肝细胞癌治疗[J].广东医学,2012,33(6):870-872.
- [10] 李超,涂康生,郑鑫,等. MicroRNA-218 在肝细胞癌中的表达及功能[J].南方医科大学学报,2013,33(8):1127-1131.
- [11] 王涛,马思聪,戚星星,等. MicroRNA-218 下调肝细胞癌中的 E2F2 基因表达抑制细胞增殖的研究[J].肝脏,2016,21(3):179-182.
- [12] 侯晋,曹雪涛. MicroRNA 与肝癌诊治:新的机遇和挑战[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2015,22(1):1-7.
- [13] 肖亮. 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.
- [14] 侯晓玫,杜琰,郭世昌,等. microRNA 在慢性乙型肝炎、肝硬化、肝细胞癌进化过程中的作用[J].第二军医大学学报,2015,36(9):997-1002.
- [15] Yang TH, Ou DL, Hsu C, et al. Comparative microRNA detection from precursor-microRNA-transfected hepatocellular carcinoma cells by capillary electrophoresis with dual-color laser-induced fluorescence[J]. Electrophoresis, 2012, 33(17): 2769-2776.
- [16] 陈颖. 肝细胞癌组织中 miR-21, miR-26a 及 miR-338 的表达及意义[J].山东医药,2015,55(10):27-29.
- [17] 林培艺,翁明哲,汤朝晖.长链非编码 RNA 在肝脏疾病中的研究进展[J].第二军医大学学报,2013,34(3):322-327.
- [18] 景伟,井宣,谭茜.长链非编码 RNA 在肝细胞癌中应用研究进展[J].中华实用诊断与治疗杂志,2016,30(10):940-942.

(收稿日期:2017-04-11 修回日期:2017-07-15)