

microRNA-200a 抑制肝细胞癌的进展及 调控索拉非尼治疗效果的研究

魏 昇, 周大臣, 方 超, 杨茗皓, 赵慧咏, 庞小溪, 崔 笑

摘要 目的 研究 microRNA-200a(miR200a) 影响肝细胞癌的进展及调控索拉非尼治疗效果。方法 构建人肝癌细胞 miR200a 稳转细胞株: miR200a 过表达、对照组(Control)、miR200a 敲低。采用 qRT-PCR 法检测各转染细胞株 miRNA 表达量, MTT 的方法检测细胞活力, Western blot 分析各目标蛋白表达量; Transwell 法检测肝癌细胞迁移、侵袭能力。转染细胞株添加索拉非尼, 复测 MTT 及 Western blot, 验证 miR200a 调控索拉非尼对细胞的作用和相应蛋白表达量变化, SPF 级 BALB/c- ν 雄鼠 18 只 随机分为 3 组, 每组 6 只。每组皮下种植 miR200a 过表达、Control、miR200a 敲低细胞, 待成瘤后每组裸鼠每天注射索拉非尼 连续 14 d 处死裸鼠, 取出瘤体, 计算肿瘤体积, 免疫组化验证瘤体目标蛋白表达及定位。结果 上调 miR200a 不仅可以抑制人肝癌细胞的细胞活力及迁移侵袭能力, 还可以降低 SIRT1 的表达。并且上调 miR200a 明显减小裸鼠的肿瘤体积。结论 上调 miR200a 可以负性调控人肝癌细胞的增殖和迁移能力, 并增加索拉非尼的药物疗效, 这种作用可能是通过调控 SIRT1 表达来完成。

关键词 miR200a; 肝细胞癌; 索拉非尼; SIRT1

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)12-1860-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.12.003

原发性肝癌在全球恶性肿瘤中发病率位居第 6 位, 病死率第 4 位^[1]。进展期肝癌的一线临床常用治疗药物为索拉非尼。肝癌患者使用索拉非尼后常出现耐药现象。如何改善此现象成为该研究的切入点。微小核糖核酸(microRNA)是一类分子量 20~25 个碱基的小分子非编码 RNA。microRNA 常与目的基因 mRNA 3' 端通过碱基互补配对原则不完全互补结合, 进而调控目的基因。miR200a 是

miR200 家族的一员, 因其在肿瘤进展和转移的重要性而备受关注。研究^[2]表明 miR200 家族成员在癌症中的主要作用被认定为肿瘤抑制因子。前期实验中已验证 miR200a 可抑制人肝细胞癌上皮间质转化(结果未发表)。

SIRT1 是哺乳动物 sirtuin 家族(SIRT1-SIRT7)的成员之一, 是一种 NAD⁺ 依赖性组蛋白去乙酰化酶, 其在机体各种生命活动过程中起着非常重要的作用。SIRT1 的过表达显著上调血管内皮生长因子受体, 促进肿瘤新生血管的形成, 增强了迁移和侵袭能力^[3], 这与索拉非尼抗肿瘤机制相关。并有研究^[4]报道 SIRT1 的过表达是导致索拉非尼耐药现象发生的重要原因。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人肝癌 Huh-7 细胞株来自中国科学院长春细胞库。

1.1.2 实验动物 18 只雄性 BALB/c- ν 裸鼠, 4~6 周龄, 体质量 18~22 g, 购自江苏集萃药康生物科技有限公司, 动物生产许可证号: SCKK(苏)2018-0008。

1.1.3 试剂与仪器 DMEM 高糖细胞培养基购自美国 Hyclone 公司, 胎牛血清购自美国 Gibco 公司, BCA 试剂盒、4% 多聚甲醛、MTT、青链霉素、结晶紫均购自北京碧云天生物技术有限公司, β -actin 和 SIRT1 购自美国 Cell Signaling Technology 公司, 山羊抗兔/鼠 IgG 二抗购自北京中杉金桥有限公司, 二甲双胍和索拉非尼购自上海 MCE 公司。细胞培养箱购自美国 Thermo Fisher 公司, 荧光倒置显微镜购自日本 OLYMPUS 公司, 酶标仪购自上海科华生物工程股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将人肝癌细胞构建 miR200a 稳转细胞株: miR200a 过表达组、Control 组、miR200a 敲低组, 10% 胎牛血清 + 1% 双抗的高糖培养基中培养, 细胞培养箱培养条件为: 37 °C、5% CO₂。每 2~

2021-09-04 接收

基金项目: 安徽高校自然科学基金项目(编号: KJ2017A825); 安徽省自然科学基金(编号: 1808085MH270、2008085QH406)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院普外科, 合肥 230601

作者简介: 魏 昇, 男, 硕士研究生;

崔 笑, 男, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: cx_2077@bjmu.edu.cn

3 d 更换培养液,细胞数为 70% ~ 90% 时 0.25% 胰酶消化,传代(不超过 10 代)。

1.2.2 分组与处理 将处于对数生长期转染细胞常规接种于 96 孔板(2.5×10^3 个/孔,100 μ l/孔)或 6 孔板(3×10^5 个/孔,2 ml/孔),每组细胞加入终浓度为 10 μ mol/L 索拉非尼处理 24、48、72 h。

1.2.3 细胞活力的测定 将转染细胞接种于 96 孔板内,每孔 2 500 个,处理结束后每组取 5 孔,加入 5 mg/ml MTT 溶液 10 μ l,37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h 后加入 150 μ l 异丙醇室温振荡 10 min,酶标仪于波长 570 nm 和 630 nm 处测定吸光度(OD)值,用 570 nm 处 OD 值光度 - 630 nm 处 OD 值反映细胞活力。

1.2.4 Western blot 法检测 SIRT1 的表达 转染细胞 PBS 洗 2 遍,加入蛋白裂解液(RIPA:蛋白酶抑制剂:磷酸酶抑制剂比例为 1:100:100),待细胞裂解完全后吸取悬液在 4 $^{\circ}$ C 离心机离心并吸取蛋白上清液,储存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱,用 BCA 法测蛋白浓度并进行蛋白质定量,加上样缓冲液煮沸 10 min 变性,以蛋白质 30 μ g 进行 SDS-PAGE 电泳。转膜后,用含 5% BSA 的 TBST 室温慢摇封闭 1.5 h,分别加入 β -actin 和 SIRT1 抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,加入相应的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠/兔抗体孵育 1 h,洗膜后用显影仪检测蛋白显影。

1.2.5 Transwell 实验检测细胞迁移侵袭能力 无血清 DMEM 培养基饥饿处理目标细胞 6 h,迁移、侵袭重悬细胞悬液细胞数分别为 2×10^4 和 1×10^5 个。下室中加入含 30% 胎牛血清的 DMEM 培养基 600 μ l,上室中加入 150 μ l 经过不同处理的细胞悬液,放入孵箱中孵育 48 h,每组设 2 个复孔。取出小室,纯水洗涤,4% 多聚甲醛固定 25 min 以上,加入 0.1% 结晶紫水溶液染色 20 min,纯水洗净。用棉签擦净上室里存留的液体和细胞,在倒置显微镜下拍照且计数,随机选择不同的视野进行统计学分析。

1.2.6 动物分组及处理 SPF 级 BALB/c-nu 雄鼠 18 只,饲养于恒温恒湿、12 h/12 h 昼夜交替的环境中,自由摄取水和食物。采用随机数表法将裸鼠分为 3 组($n = 6$),每组皮下种植 miR200a 过表达组、Control 组、miR200a 敲低组细胞(1×10^6 个/只)皮下种植于裸鼠右侧腋窝下。待瘤体达 50 mm³ 时,开始注射索拉非尼,每次注射前记录裸鼠的体质量和瘤体的大小。注射药物 14 d 后处死裸鼠,取出瘤体记录相应的体积。

1.2.7 RNA 提取 取出转染细胞 PBS 清洗 2 次,加

入 TRIzol 1 ml(全程冰上操作)10 min,吹匀,将各孔裂解液吸到 1.5 ml EP 管中,加入三氯甲烷 200 μ l/管,上下颠倒振摇混匀。冰上静置,低温离心。离心后小心吸取最上层无色液体移入一新的无酶 EP 管中。加入异丙醇混匀,冰上静置,离心,去上清液,加入无酶水稀释 75% 乙醇,混匀,离心。弃上清液,干燥沉淀。加入适量无酶水,测取总 RNA 浓度及纯度,并用琼脂糖凝胶电泳验证质量,-80 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.8 qRT-PCR 法检测 将提取总 RNA 按 10 μ l 反应体系进行逆转录:PrimeScriptTM RT Master MIX 2 μ l,总 RNA 量 1 000 ng,加无酶水至 10 μ l,根据逆转录试剂盒说明书逆转录成 cDNA。最后以 cDNA 为模板使用对应引物进行目的基因的扩增,反应体系为 10 μ l,cDNA 1.6 μ l,特异性引物 3.2 μ l,SYBR 5.2 μ l。以 GAPDH 作为内参。miRNA 逆转录及目的基因扩增按相关试剂盒操作。

1.2.9 免疫组化法检测 将裸鼠肿瘤冰冻切片用纯水冲洗 2 次,每次 5 min,10% 过氧化氢去离子水:甲醇(1:9)孵育 10 min,以灭活内源性过氧化物酶活性,TBST 冲洗 3 次,每次 5 min,破膜液(浓度 0.25% Triton X-100 的 TBS)10 min,TBST 冲洗,滴加 10% 山羊血清封闭液,室温孵育 2 h,油性笔画圈,滴加一抗,4 $^{\circ}$ C 过夜。回收一抗,TBST 冲洗,滴加反应增强液,清洗滴加相应辣根过氧化物酶标记的二抗,纯水冲洗,DAB 显色后自来水冲洗终止反应,苏木精染核 20 s,纯水冲洗。梯度脱水、固定、中性树脂封片后镜下观察。

1.3 统计学处理 使用 GraphPad Prism 7.0 软件对实验数据进行统计分析。每组实验均单独重复 3 次。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染细胞系 qRT-PCR 验证 miR200a 表达量及 miR200a 对肝癌细胞的活力的影响 miR200a 过表达组 miR200a 表达量最高、Control 组居中、miR200a 敲低组最低($F = 33.05$, $P = 0.0006$)。miR200a 抑制肝癌细胞的活力,MTT 法检测 miR200a 转染处理后细胞活性的变化。miR200a 过表达细胞活力低于 Control 组,miR200a 敲低组细胞活力高于 Control 组($F = 249.6$, $P < 0.001$),差异均有统计学意义(图 1)。

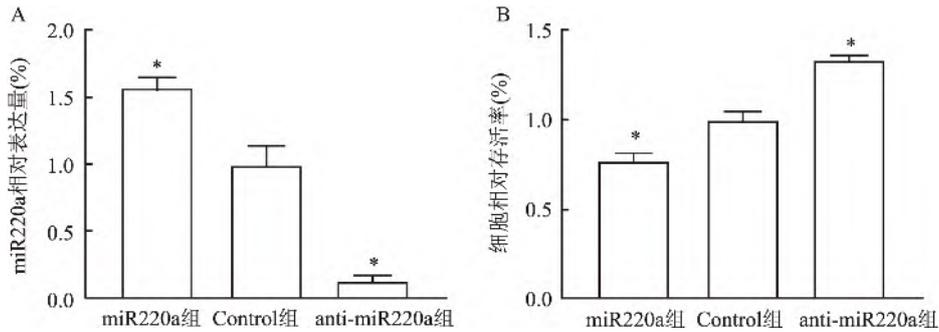


图1 miR200a对肝癌细胞的活力的影响

A: qRT-PCR 检测转染细胞系 miR200a 表达量; B: MTT 检测 miR200a 对肝癌细胞活力的影响; 与对照组比较: * P < 0.05

2.2 miR200a 对肝癌的迁移侵袭能力的影响 Transwell 小室实验结果显示转染细胞系经小室培养 48 h 后迁移和侵袭结果: miR200a 过表达组穿膜的细胞数明显少于 Control 组和 miR200a 敲低组 ($F = 37.58, P = 0.0075$; $F = 70.43, P = 0.0030$)。转染细胞系添加索拉非尼处理后 miR200a 过表达组、Control 组和 miR200a 下调组穿膜细胞明显少于相应未加药处理组 (图 2)。

2.3 miR200a 对索拉非尼抑制肝癌细胞的药效作用的影响 用不同浓度 (0、2、4、8、12、16 $\mu\text{mol/L}$) 索拉非尼处理 Control 组细胞 24、48、72 h, 且当索拉非尼浓度为 12 $\mu\text{mol/L}$ 时, Control 组细胞 IC_{50} 。因此, 该研究选择 12 $\mu\text{mol/L}$ 为该实验的最适浓度。用 12 $\mu\text{mol/L}$ 处理转染细胞系 48 h, miR200a 过表达细胞活力低于 Control 组, miR200a 敲低组细胞活力高于 Control 组 ($F = 157.8, P < 0.05$) (图 3)。

2.4 miR200a 对肝癌细胞 SIRT1 转录和翻译过程的影响 qRT-PCR、Western blot 结果显示: 与 Control 组比较, miR200a 过表达组 SIRT1 的表达量明显降低, miR200a 敲低组表达量明显上升 ($F = 78.63, P = 0.0026$)。加入 12 $\mu\text{mol/L}$ 索拉非尼后处理 48 h, miR200a 组 SIRT1 的表达减低 ($F = 16.39, P = 0.0019$)。miR200a 可以下调 SIRT1 表达, miR200a 抑制人肝癌细胞株增殖与迁移, 并且可能参与调控 SIRT1 影响索拉非尼药效, 并在相关网址预测其作用靶点 (图 4)。

2.5 miR200a 对裸鼠肿瘤进展的影响 在裸鼠皮下成瘤实验中, miR200a 过表达组体积明显低于 Control 组和 miR200a 敲低组且相应瘤体免疫组化图结果显示 miR200a 过表达组 Ki67 表达明显少于 Control 组和 miR200a 敲低组 (图 5)。

3 讨论

肝细胞肝癌是由多种基因、多种因素调控的恶

性疾病, 常见的基因作用途径包括: RAS 蛋白 - 有丝分裂原活化蛋白激酶 (RAS-MAPKK) 通路、Janus 激酶/信号转导和转录激活因子 (JAK-STAT) 通路、Wnt/ β -连环蛋白 (Wnt/ β -catenin) 通路和磷酸酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B/雷帕霉素靶蛋白 (PI3k/Akt/mTOR) 通路^[5-8]。以索拉非尼为代表的多激酶抑制剂是治疗肝癌的一线用药, 延长患者的生存时间, 通过以上信号通路抑制肝癌的进展。索拉非尼耐药导致肝癌进展也是肝癌治疗中的棘手问题, 研究^[9-10]表明这一机制主要依赖 SIRT1 调控, SIRT1 通过去乙酰化抑制 β -catenin 表达激活 Wnt/ β -catenin 通路和 NAD/SIRT1/AMPK axis 通路参与索拉非尼耐药机制。通过检索 miRbase 数据库预测 SIRT1 的 mRNA 3'端是 miR200a-3p 结合位点。miR200a 在包括乳腺癌、结直肠癌、肾癌、肝癌等多种肿瘤中调控不同靶基因发挥着抑癌作用^[11-14], 该实验结果显示上调 miR200a 可以抑制肝癌细胞的增殖和侵袭行为, 下调可以促进肝癌的进展。实验显示 miR200a 不仅抑制 SIRT1 蛋白表达, 而且负性调控其 mRNA 水平。在体内和体外实验中, 上调肝癌细胞中 miR200a 水平可以强化索拉非尼的抑癌作用, 下调则诱导索拉非尼的耐药效果。这一研究展现了 miR200a 作为未来抗肝癌治疗临床应用的潜质。二甲双胍是 2 型糖尿病患者的一线用药, 近年来有研究^[15]表明二甲双胍可以抑制肝癌细胞的生长, 该实验使用二甲双胍可以上调肝癌细胞中 miR200a 的表达, 并可提升索拉非尼的抑癌药物疗效。实验结果未发表。

综上所述, miR200a 下调 SIRT1 抑制人肝癌细胞增殖和迁移的能力, 在肝癌细胞中上调 miR200a 可以增加索拉非尼药物敏感性。在临床上, 大部分肝癌患者的 miR200a 水平一般多为低表达, 这与大部分肝癌患者索拉非尼耐药相符。未来该课题组将

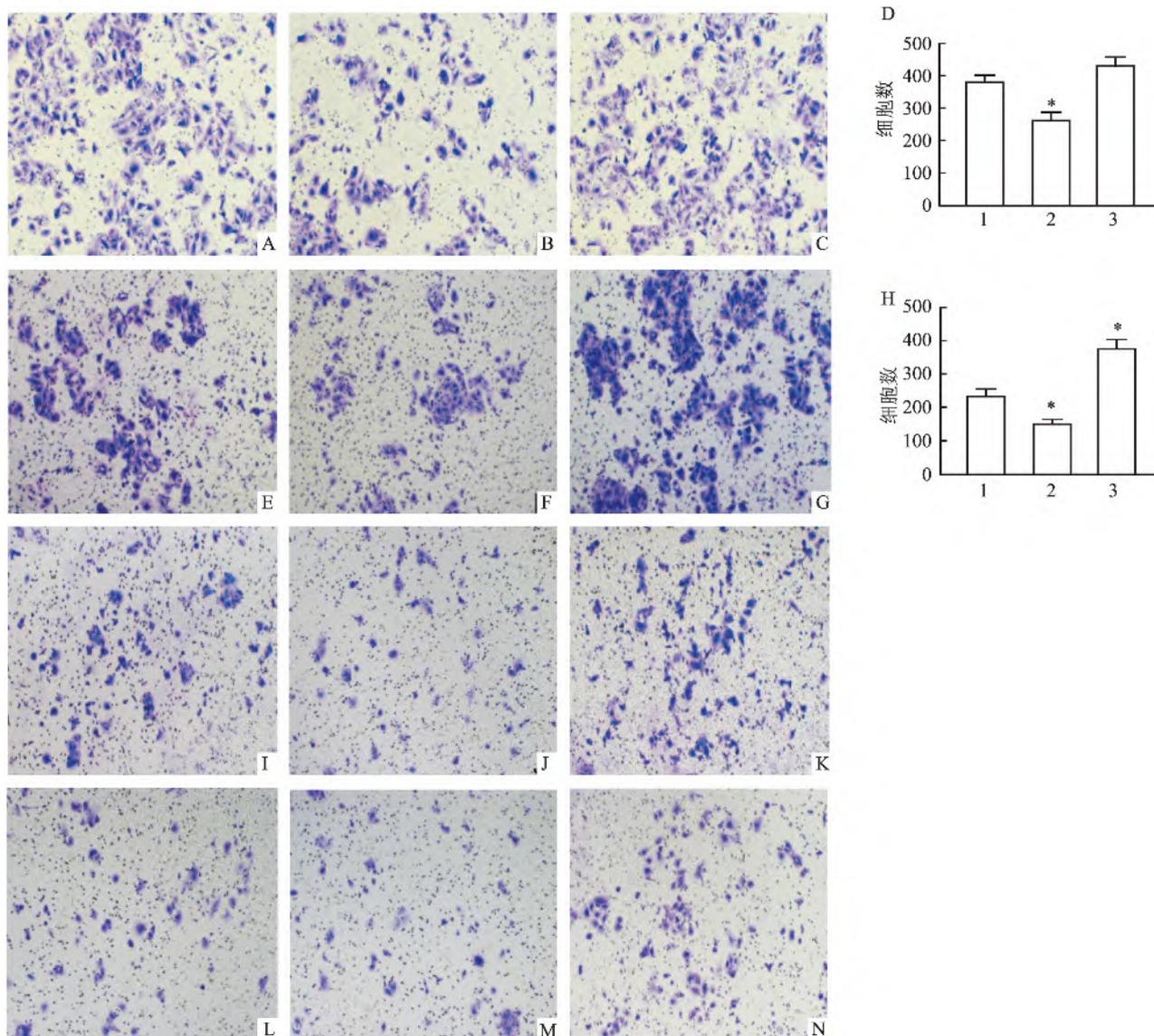


图2 miR200a对肝癌细胞的迁移、侵袭能力的影响

1: Control 组; 2: miR200a 过表达组; 3: miR200a 敲低组; A ~ C: 1、2、3 组对肝癌细胞迁移能力的影响; D: 相应细胞数; E ~ G: 1、2、3 组调控 miR200a 肝癌细胞侵袭能力的影响; H: 相应细胞数; I ~ K: 1、2、3 组添加索拉非尼对肝癌细胞迁移能力的影响; L ~ N: 1、2、3 组添加索拉非尼对肝癌细胞侵袭能力的影响; 与对照组比较: * $P < 0.05$

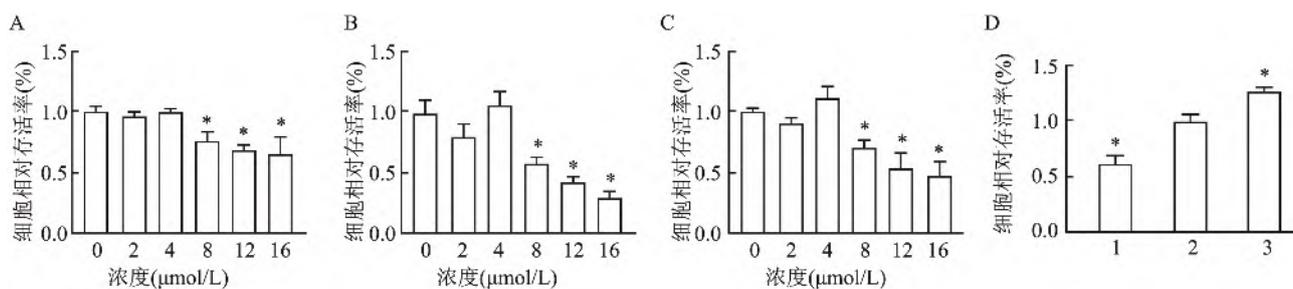


图3 筛选索拉非尼浓度对肝癌细胞活力的影响

A ~ C: 24、48、72 h 不同浓度索拉非尼对 Control 组肝癌细胞活力的影响; D: 12 μmol/L 索拉非尼对转染细胞系细胞活力的影响; 1: 上调 miR200a 组; 2: 对照组; 3: 下调组; 与对照组比较: * $P < 0.05$

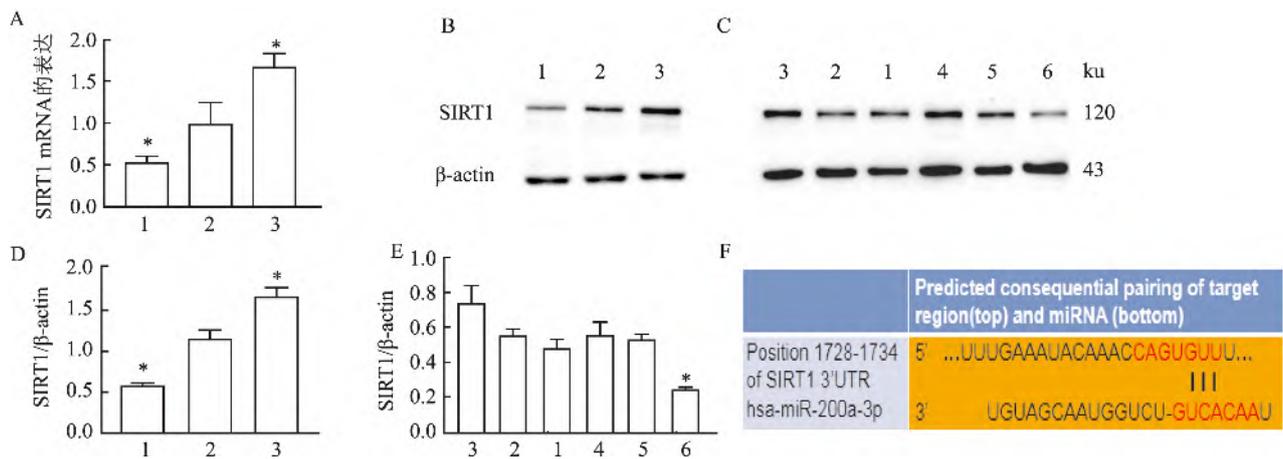


图4 miR200a 对 SIRT1 转录及翻译的影响

A: qRT-PCR 检测 miR-200a 转染 Huh-7 细胞系 SIRT1 mRNA 表达量; B: Western blot 转染细胞系 SIRT1 蛋白表达量; C: Western blot 检测转染细胞加入索拉非尼后 SIRT1 蛋白表达; D: SIRT1 与 β -actin 的比值; E: SIRT1 与 β -actin 的比值; F: 预测 miR200a 对 SIRT1 作用靶点; 1: miR200a 过表达组; 2: Control 组; 3: anti-miR200a 组; 4~6: 分别为 1~3 添加 12 μ mol/L 索拉非尼处理组; 与对照组比较: * $P < 0.05$

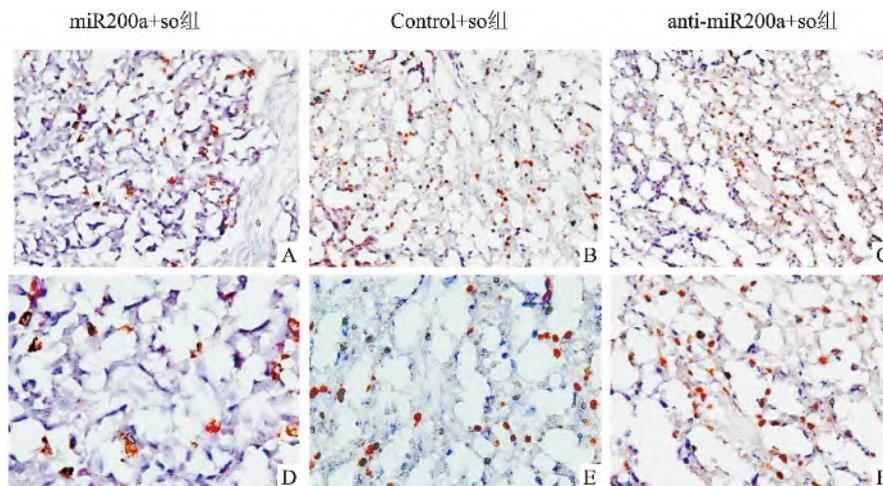


图5 miR200a 对 Ki67 的表达的影响

A~C: 不同转染细胞系添加索拉非尼处理裸鼠皮下成瘤 Ki67 免疫组化图 $\times 100$; D~F: 不同转染细胞系添加索拉非尼处理裸鼠皮下成瘤 Ki67 免疫组化图 $\times 400$

进一步完善 miR200a 如何增加索拉非尼药敏性的相关实验机制,为未来研制新的肝癌靶向药物治疗方案和提高患者远期生存率提供理论基础。

参考文献

[1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin 2018, 68(6): 394-424.

[2] Huang G L, Sun J, Lu Y, et al. MiR-200 family and cancer: from a meta-analysis view [J]. Mol Aspects Med 2019, 70: 57-71.

[3] Dong G, Wang B, An Y, et al. SIRT1 suppresses the migration and invasion of gastric cancer by regulating ARHGAP5 expression [J]. Cell Death Dis 2018, 9(10): 977.

[4] Chen H C, Jeng Y M, Yuan R H, et al. SIRT1 promotes tumorigenesis and resistance to chemotherapy in hepatocellular carcinoma and its expression predicts poor prognosis [J]. Ann Surg Oncol, 2012, 19(6): 2011-9.

[5] Hugel N, Sandbothe M, Schroder A K, et al. Wnt status-dependent oncogenic role of BCL9 and BCL9L in hepatocellular carcinoma [J]. Hepatol Int 2020, 14(3): 373-84.

[6] Jiao M, Ning S, Chen J, et al. Long noncoding RNA ZEB1AS1 predicts a poor prognosis and promotes cancer progression through the miR200a/ZEB1 signaling pathway in intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. Int J Oncol 2020, 56(6): 1455-67.

[7] Molinaro A, Becattini B, Solinas G. Insulin signaling and glucose

- metabolism in different hepatoma cell lines deviate from hepatocyte physiology toward a convergent aberrant phenotype [J]. *Sci Rep* , 2020 ,10(1) : 12031.
- [8] Wang X , Liao X , Yu T , et al. Analysis of clinical significance and prospective molecular mechanism of main elements of the JAK/STAT pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Oncol* , 2019 ,55(4) : 805 – 22.
- [9] Farcas M , Gavrea A A , Gulei D , et al. SIRT1 in the development and treatment of hepatocellular carcinoma [J]. *Front Nutr* , 2019 , 6: 148.
- [10] Yu Y , Zhao D , Li K , et al. E2F1 mediated DDX11 transcriptional activation promotes hepatocellular carcinoma progression through PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Cell Death Dis* , 2020 ,11(4) : 273.
- [11] Fu H , Song W , Chen X , et al. MiRNA-200a induce cell apoptosis in renal cell carcinoma by directly targeting SIRT1 [J]. *Mol Cell Biochem* 2018 ,437(1 – 2) : 143 – 52.
- [12] Garten A , Grohmann T , Kluckova K , et al. Sorafenib-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma is reversed by SIRT1 [J]. *Int J Mol Sci* 2019 , 20(16) : 4048.
- [13] Zeng X , Qu X , Zhao C , et al. FEN1 mediates miR-200a methylation and promotes breast cancer cell growth *via* MET and EGFR signaling [J]. *FASEB J* 2019 , 33(10) : 10717 – 30.
- [14] Zheng J , Sadot E , Vigidal J A , et al. Characterization of hepatocellular adenoma and carcinoma using microRNA profiling and targeted gene sequencing [J]. *PLoS One* 2018 , 13(7) : e0200776.
- [15] Hu J W , Chen B , Zhang J , et al. Novel combination of celecoxib and metformin improves the antitumor effect by inhibiting the growth of hepatocellular carcinoma [J]. *J Cancer* 2020 , 11(21) : 6437 – 44.

Study on the effect of microRNA-200a on the progression of hepatocellular carcinoma and the therapeutic effect of sorafenib

Wei Sheng Zhou Dacheng Fang Chao , et al

(Dept of General Surgery , The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230601)

Abstract Objective To study the effect of microRNA-200a(miR200a) on the progression of hepatocellular carcinoma and the therapeutic effect of sorafenib. **Methods** The stable transformation cell lines of human hepatocellular carcinoma miR200a were constructed: miR200a overexpression , Control and miR200a knockdown. The expression of miR200a in each transfected cell line was detected by qRT-PCR , the expression of protein was detected by Western blot method , the cell's vitality was detected by MTT method , and the ability of cell migration and invasion was detected by transwell method. After adding sorafenib to the transfected cell line , the effect of miR200a on the regulation of sorafenib on cells and the changes of cell vitality and corresponding protein expression were detected by MTT and Western blot. Eighteen SPF male BALB/c-nu mice were randomly divided into 3 groups , with 6 mice in each group. miR200a overexpression , Control and miR200a knockdown cells were subcutaneously implanted in each group. After tumor formation , each group of nude mice were injected with sorafenib every day for 14 days. The nude mice were killed and the tumor volume was calculated. The expression and localization of tumor target protein were verified by immunohistochemistry. **Results** miR200a could inhibit the cell viability and migration ability of hepatocellular carcinoma cells , and reduce the expression of SIRT1 at the same time. MiR200a significantly reduced the tumor volume of nude mice. **Conclusion** miR200a can inhibit the proliferation and migration of human hepatocellular carcinoma cell line and increase the efficacy of sorafenib , which may be achieved by regulating the expression of SIRT1.

Key words miR200a; hepatocellular carcinoma; sorafenib; SIRT1