

miR-485-5p 介导 SOX5 基因表达对肝细胞肝癌 细胞活力及迁移侵袭的影响

韩成美 柳梅, 任维鑫 朱英斌 陈茂丽

摘要 目的 研究微小 RNA(miR)-485-5p 靶向性别决定区 Y 框蛋白 5(SOX5) 对肝细胞肝癌(HCC) 细胞活力和迁移侵袭能力的影响及作用机制。方法 采用 Targetscan 7.1 预测软件及双荧光素酶报告基因试验检测 miR-485-5p 对 SOX5 基因的靶向调控作用。qRT-PCR 检测 HCC 组织中 miR-485-5p 和 SOX5 mRNA 的表达水平, 并分析两者的相关性。常规培养 HCC 细胞 Huh7, 将其分为 NC、miR-485-5p mimic 和 miR-485-5p mimic + oe-SOX5 组, 采用 lip2000 进行各组质粒的转染。CCK-8 实验检测各组细胞的活力, Transwell 实验检测各组细胞的迁移侵袭能力。Western blot 检测各组细胞中 pAkt 和 pGSK3 β 蛋白的表达。结果 Targetscan 7.1 预测软件、双荧光素酶报告基因试验表明 miR-485-5p 靶向调控 SOX5。与 HCC 癌旁组织相比, miR-485-5p 在 HCC 组织中低表达, SOX5 mRNA 在 HCC 组织中高表达, 两者的表达呈负相关性。与 NC 组相比, miR-485-5p mimic 组和 miR-485-5p mimic + oe-SOX5 组 HCC 细胞活力和迁移侵袭能力降低。而与 miR-485-5p mimic 组相比, miR-485-5p mimic + oe-SOX5 组 HCC 细胞活力和迁移侵袭能力增加, 过表达 SOX5 减弱了 miR-485-5p mimic 对 HCC 细胞活力和迁移侵袭能力的抑制作用。与 NC 组相比, miR-485-5p mimic 和 miR-485-5p mimic + oe-SOX5 组细胞中 pAkt 和 pGSK3 β 蛋白表达降低。而与 miR-485-5p mimic 组相比, miR-485-5p mimic + oe-SOX5 组 pAkt 和 pGSK3 β 蛋白表达增加, 过表达 SOX5 减弱了 miR-485-5p mimic 对 Akt/GSK3 β 信号通路活性的抑制作用。结论 miR-485-5p 靶向调控 SOX5 表达抑制 HCC 细胞活力及迁移侵袭能力。

关键词 HCC; miR-485-5p; 增殖; 侵袭; 迁移; Akt/GSK3 β

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)05-0710-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.05.008

微小 RNA(microRNA, miRNA) 被报道通过调控其靶基因的表达在肿瘤的发生发展中发挥关键作

用^[1]。miR-485-5p 在肿瘤中被发现表达异常, 在胶质瘤和非小细胞肺癌等恶性肿瘤中表达减少, 可抑制肿瘤的恶性进展^[2-3]。miR-485-5p 抑制肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC) 的增殖和迁移侵袭能力^[4]。性别决定区 Y 框蛋白 5(sex determinant Y box protein 5, SOX5) 在 HCC 中促进细胞的迁移和侵袭能力^[5], SOX5 在 HCC 中是否发挥其它的生物学作用, 以及 SOX5 是否作为 miR-485-5p 的靶基因参与 HCC 的发生发展引起课题组的关注, 该文对此及其可能的作用机制进行了研究, 旨在获得 miR-485-5p 作为 HCC 治疗潜在靶点的重要实验室依据。

1 材料与方法

1.1 临床样本收集 收集 2018 年 6 月—2019 年 10 月入住山东第一医科大学附属济南人民医院行手术治疗的 HCC 患者的癌组织和癌旁组织, 癌旁组织为距离肿瘤组织边缘 3 cm 以上的非癌肝组织, 癌组织和癌旁组织均经病理专家确认。要求收集临床样本为首次行手术切除的病灶, 并在术前未经化疗等任何形式的治疗。将切除的 PTC 及癌旁组织立即冻存于 -80 °C 液氮中。所有患者签署知情同意书, 本研究由本院伦理委员会审核批准通过。

1.2 主要试剂材料 TRIzol 试剂和 qRT-PCR Kit 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; Bestar 1st Strand cDNA 合成试剂盒购自上海 DBI[®] Bioscience 公司; miR-485-5p、SOX5、内参 U6 和 β -actin 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成; HCC 细胞 Huh7 购自上海中国科学院; 高糖培养基、胎牛血清(fetal Bovine Serum, FBS) 和胰酶购自美国 Hyclone 公司; pGL6-TA-SOX5-野生型质粒(SOX5-wt)、pGL6-TA-SOX5-突变型质粒(SOX5-mut)、miR-485-5p mimic 和过表达 SOX5 质粒购自上海吉凯基因有限公司; 双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自北京索莱宝试剂有限公司; CCK8 试剂购自日本同仁化学; Transwell 小室购自美国 coring 公司; 蛋白裂解液和 BCA 检测试剂盒购自美国 Thermo 公司; PVDF 膜购自迈博瑞生物膜技术有限公司; pAkt (66444-1-Ig,

2020-12-02 接收

基金项目: 山东省科技发展计划项目(编号: 2016ZRC10136)

作者单位: 山东第一医科大学附属济南人民医院感染科, 济南 271199

作者简介: 韩成美, 女, 主治医师, 硕士研究生, 责任作者, E-mail:

hhjj4788@163.com

1 : 2 000) 抗体购自美国 proteintech 公司和 pGSK3 β (ab75814, 1 : 1 000) 抗体购自英国 Abcam 公司。

1.3 细胞培养和转染 Huh7 快速复苏后立即重悬至高糖培养基中, FBS 浓度为 10%。细胞培养在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的全湿度培养箱中。细胞生长状态较好时, 胰酶消化收集细胞, 以每孔 1×10^5 个细胞传至 6 孔板中, 分为 NC、miR-485-5p mimic 和 miR-485-5p mimic + oe-SOX5 组。细胞接种 12 h 后采用 lip2000 进行各组转染, 无关序列对照转染 NC 组细胞, miR-485-5p 模拟物 (mimic) 转染 miR-485-5p mimic 组细胞, miR-485-5p mimic 和过表达 SOX5 质粒同时转染 miR-485-5p mimic + oe-SOX5 组细胞, 放至培养箱中培养 48 h 后进行后续实验。

1.4 qRT-PCR HCC 组织研磨成粉末后, 加入 TRIzol 试剂, 冰上完全裂解, 提取组织中的总 RNA。Huh7 细胞长满后, PBS 洗 1 遍, 加入 TRIzol 试剂, 提取细胞中总 RNA。测得 RNA 的浓度和纯度后。按照 85 $^{\circ}$ C、5 s、37 $^{\circ}$ C、15 min 反应条件采用逆转录试剂盒体系将 RNA 逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板, 按照 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 s、40 个 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s、65 $^{\circ}$ C 退火延伸 34 s 反应条件, 采用 qRT-PCR 试剂盒体系测得各样品的循环阈值 (threshold cycle, Ct), 按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式以 U6 为内参计算 HCC 组织和细胞中 miR-485-5p 的相对表达量, 以 β -actin 为内参计算 SOX5 mRNA 的相对表达量。miR-485-5p 引物序列 F: 5'-AGAGGCTGGCCGTGATG-3', R: 5'-GTG-CAGGGTCCGAGGT-3'。SOX5 引物序列 F: 5'-CAGCCAGAGTTAGCACAATAGG-3', R: 5'-CTGTT-GTTCCCCTCGGAGTT-3'。U6 引物序列 F: 5'-GCT-TCGGCAGCACATATACTAAAAT-3', R: 5'-CGCT-TCACGAATTTGCGTGTGAT-3'。 β -actin 引物序列 F: 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3', R: 5'-GCCAATACGACCAAATCC-3'。

1.5 双荧光素酶报告实验 TargetScan7.1 在线软件 (<http://www.targetscan.org/>) 预测 miR-485-5p 可能的靶基因。以 1.4 中的 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增包含 miR-485-5p 结合位点的 SOX5 3'UTR 片段, SOX5 引物进行 SOX5 基因片段扩增, 采用 XbaI 和 XhoI 双酶切位点将扩增的 SOX5 片段插入到 pGL6-TA 质粒中荧光素酶基因的下游, 获得 pGL6-TA-SOX5-野生型质粒 (SOX5-wt)。以同样的方法将突变片段插入到 pGL6-TA 质粒中, 获得 pGL6-TA-SOX5-野生型质粒 (SOX5-wt)。Huh7 细胞长满时, 胰酶消化收集细胞, 以每孔 2 000 个传至 96 孔板中,

分为 NC + SOX5-wt 组 (无关序列对照与 SOX5-wt 质粒同时转染)、miR-485-5p + SOX5-wt 组 (miR-485-5p mimic 与 SOX5-wt 质粒同时转染)、NC + SOX5-mut 组 (无关序列对照与 SOX5-mut 质粒同时转染)、miR-485-5p + SOX5-mut 组 (miR-485-5p mimic 与 SOX5-mut 质粒同时转染), 放至培养箱中培养 48 h。按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书检测各组细胞的荧光素酶活性。

1.6 CCK-8 实验 Huh7 细胞长满后, PBS 洗 1 遍, 胰酶消化收集细胞, 以每孔 1 500 个细胞传至 96 孔板中, 分为 NC、miR-485-5p mimic 和 miR-485-5p mimic + oe-SOX5 组, 按上述转染的方法进行各组细胞的转染。分别在细胞转染 0、24、48 和 72 h 时, 每孔加入 10 μ l CCK-8 试剂, 放置培养箱中继续培养 2 h。酶标仪检测 490 nm 处各样品的吸光度值。

1.7 Transwell 实验 胰酶消化收集转染 48 h 的各组细胞, 无血清高糖培养基洗 2 次, 以 1×10^5 个细胞重悬至 100 μ l 无血清高糖培养基中。细胞悬液加入到 Transwell 小室中, 并将 Transwell 小室放入加有 500 μ l 含有 10% FBS 的完全培养基中。放置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的全湿度培养箱中培养。12 h 左右终止培养, PBS 将未穿过的细胞洗去后, 甲醇固定细胞, 苏木精进行染色, 显微镜下拍照, 计数细胞穿膜的个数。

1.8 Western blot 检测蛋白表达 胰酶消化收集转染 48 h 的各组细胞, PBS 洗 1 遍后, 加入蛋白裂解液, 超声裂解 30 min, 14 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 30 min。采用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。加入上样缓冲液后煮沸蛋白变性。定量蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 蛋白经湿性转膜方法转移至 PVDF 膜上, 5% BSA 常温孵育 PVDF 膜 1 h, pAkt、pGSK3 β 和内参 GAPDH 一抗稀释液 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 二抗稀释液室温孵育 1 h, ECL 试剂盒曝光蛋白条带。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 独立样本 *t* 检验比较 2 组间差异。Pearson 线性相关分析检测 miR-485-5p 与 SOX5 的表达相关性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-485-5p 对 SOX5 的靶向调控作用 TargetScan 7.1 软件在线预测显示 SOX5 的 3'UTR 与 miR-485-5p 具有结合位点, 见图 1A。双荧光素酶报告基因试验结果显示: 与 NC + SOX5-wt 组相比,

miR-485-5p + SOX5-wt 组的荧光素酶活性降低($t = 4.031$, $P = 0.021$); 而 NC + SOX5-mut 和 miR-485-5p + SOX5-mut 组间的荧光素酶活性差异无统计学意义($t = 1.052$, $P = 0.067$) ,见图 1B。

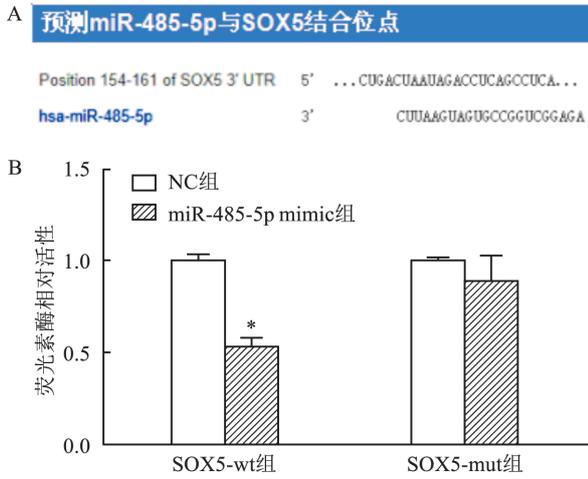


图1 miR-485-5p对SOX5的靶向调控作用

A: SOX5 3'UTR 与 miR-485-5p 的结合位点; B: 双荧光素酶报告基因试验; 与 NC + SOX5-wt 组比较: * $P < 0.05$

2.2 miR-485-5p 和 SOX5 在 HCC 组织中的表达水平 qRT-PCR 检测结果显示与癌旁组织相比, HCC 组织中 miR-485-5p 的表达降低($t = 2.747$, $P = 0.008$)。与癌旁组织相比, HCC 组织中 SOX5 mRNA 的表达增加($t = 5.697$, $P < 0.001$) ,见图 2。

2.3 miR-485-5p 和 SOX5 在 HCC 组织中表达的相关性 采用 Pearson 线性相关分析检测 HCC 组织中 miR-485-5p 与 SOX5 的表达相关性, 按照 miR-485-5p 在 HCC 组织中的平均相对表达量 0.73 为界, 将 40 例 HCC 患者分为 miR-485-5p 高表达(18 例) 和 miR-485-5p 低表达(22 例) 。SOX5 在 HCC 组织中的平均相对表达量 1.43 为界, 将 40 例 HCC 患者分为 SOX5 高表达(19 例) 和 SOX5 低表达(21 例) 结果显示 miR-485-5p 与 SOX5 在 HCC 组织中的表达呈负相关($r = -0.701$, $P = 0.004$)。

2.4 各组细胞转染效率的检测 Huh7 转染 miR-485-5p mimic 与 NC 组相比, miR-485-5p mimic 组中 miR-485-5p 的表达增加($t = 6.331$, $P = 0.010$) ,表明 miR-485-5p mimic 成功转染 HCC 细胞, 见图 3A。与 NC 组相比, miR-485-5p mimic 组细胞中 SOX5 mRNA 的表达降低($t = 4.050$, $P = 0.018$) ,表明 miR-485-5p 负调控 SOX5 的表达, 见图 3B。Huh7 转染 SOX5 过表达质粒, 与 NC 组相比, oe-SOX5 组细胞中 SOX5 蛋白的表达增加($t = 8.041$, $P <$

0.001) ,见图 3C。表明 SOX5 过表达质粒成功转染 HCC 细胞。

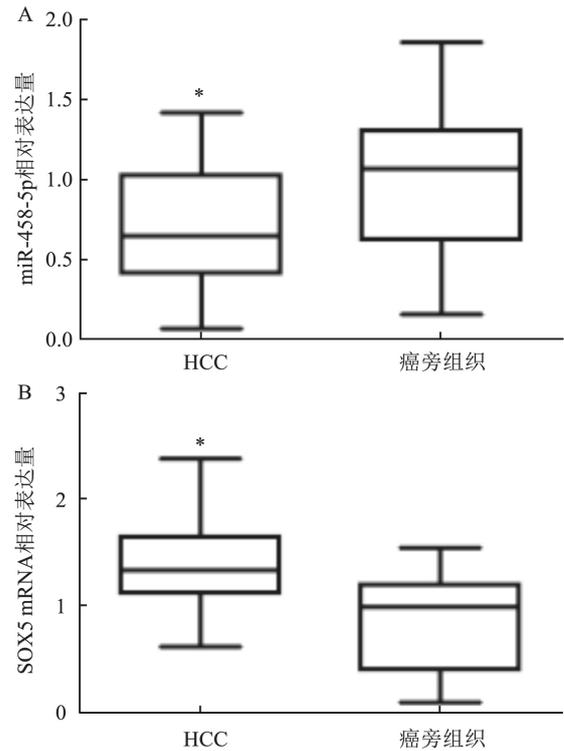


图2 qRT-PCR 检测 miR-485-5p 和 SOX5 在 HCC 组织中的表达水平

A: miR-485-5p 在 HCC 组织中的表达水平; B: SOX5 在 HCC 组织中的表达水平; 与癌旁组织比较: * $P < 0.05$

2.5 miR-485-5p 调控 SOX5 对 HCC 细胞活力的影响 CCK-8 实验结果显示, 与 NC 组相比, miR-485-5p mimic 组和 miR-485-5p mimic + oe-SOX5 组 Huh7 细胞活力降低。而与 miR-485-5p mimic 组相比, miR-485-5p mimic + oe-SOX5 组 Huh7 细胞活力增加, SOX5 减弱 miR-485-5p mimic 对 HCC 细胞活力的抑制作用。见图 4。

2.6 miR-485-5p 调控 SOX5 对 HCC 细胞转移侵袭能力的影响 Transwell 实验结果显示, NC 组 Huh7 细胞穿膜数为(128.33 ± 10.57) 个, miR-485-5p mimic 组 Huh7 细胞穿膜数为(32.67 ± 3.84) 个, miR-485-5p mimic + oe-SOX5 组 Huh7 细胞穿膜数为(64.33 ± 9.78) 个。与 NC 组相比, miR-485-5p mimic 组和 miR-485-5p mimic + oe-SOX5 组 Huh7 细胞转移侵袭能力降低($t = 13.871$, $P < 0.001$; $t = 5.952$, $P = 0.009$)。与 miR-485-5p mimic 组相比, miR-485-5p mimic + oe-SOX5 组 Huh7 细胞转移侵袭能力增加($t = 4.863$, $P = 0.012$) ,SOX5 减弱 miR-

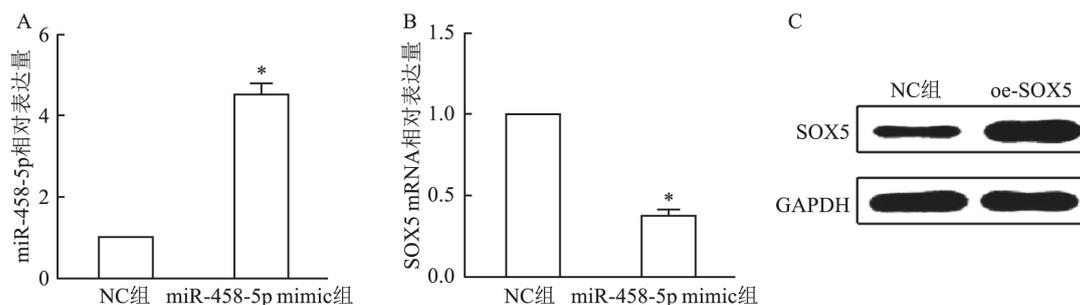


图3 各组细胞转染效率的检测

A: qRT-PCR 检测 miR-485-5p mimic 转染 HCC 细胞的效果; B: miR-485-5p mimic 对 HCC 细胞中 SOX5 表达影响; C: Western blot 检测 SOX5 过表达质粒转染 HCC 细胞的效果; 与 NC 组比较: * $P < 0.05$

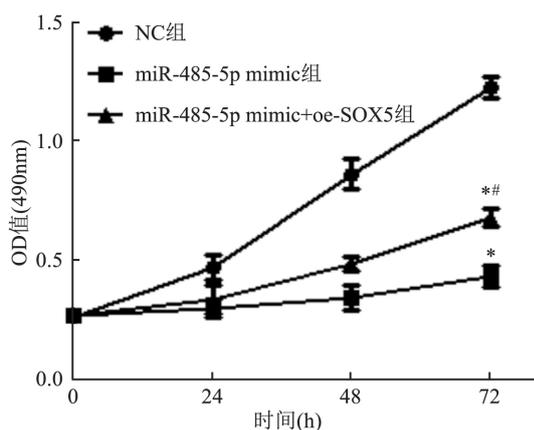


图4 miR-485-5p 调控 SOX5 对 Huh7 细胞活力的影响

与 NC 组比较: * $P < 0.05$; 与 miR-485-5p mimic 组比较: # $P < 0.05$

miR-485-5p mimic 对 HCC 细胞迁移侵袭能力的抑制作用。见图 5。

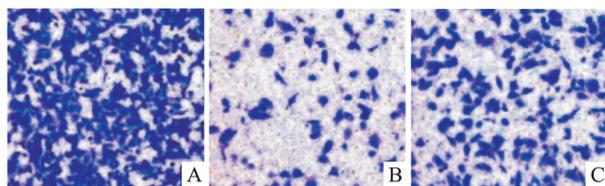


图5 miR-485-5p 调控 SOX5 对 Huh7 细胞迁移侵袭能力的影响 ×200

A: NC 组; B: miR-485-5p mimic 组; C: miR-485-5p mimic + oe-SOX5 组

2.7 miR-485-5p 调控 SOX5 对 Akt/GSK3β 的影响 Western blot 实验结果显示,与 NC 组相比,miR-485-5p mimic 组和 miR-485-5p mimic + oe-SOX5 组 Huh7 细胞中 pAkt^{ser473} 和 pGSK3β^{ser9} 蛋白表达降低。与 miR-485-5p mimic 组相比,miR-485-5p mimic + oe-SOX5 组 Huh7 细胞中 pAkt^{ser473} 和 pGSK3β^{ser9} 蛋白

表达增加,SOX5 减弱 miR-485-5p mimic 对 Akt/GSK3β 信号通路的抑制作用。见图 6、表 1。

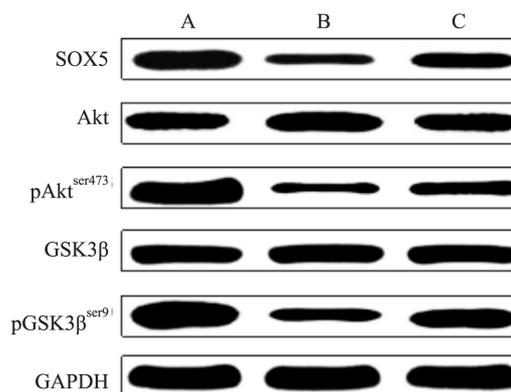


图6 miR-485-5p 负靶向调控 SOX5 对 Akt/GSK3β 的影响

A: NC 组; B: miR-485-5p mimic 组; C: miR-485-5p mimic + oe-SOX5 组

表1 各组细胞中 Akt/GSK3β 信号通路蛋白的相对表达量 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

蛋白相对表达	NC 组	miR-485-5p mimic 组	miR-485-5p mimic + oe-SOX5 组
SOX5	1.07 ± 0.11	0.26 ± 0.08	0.60 ± 0.04
Akt	0.93 ± 0.12	1.08 ± 0.06	0.95 ± 0.09
pAkt ^{ser473}	1.12 ± 0.10	0.19 ± 0.03*	0.34 ± 0.07* #
GSK3β	0.81 ± 0.08	0.89 ± 0.10	0.84 ± 0.11
pGSK3β ^{ser9}	1.28 ± 0.05	0.27 ± 0.03*	0.52 ± 0.07* #

与 NC 组比较: * $P < 0.05$; 与 miR-485-5p mimic 组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

miRNA 是长度约为 18 ~ 25 个核苷酸的一类小非编码单链 RNA 分子,包括恶性肿瘤在内的各种人类疾病中表达异常,并且被认为是抗肿瘤治疗的候选靶点^[6]。miR-485-5p 位于 14q32 号染色体的人

类基因组区域。miR-485-5p 在多种肿瘤中发挥抑癌基因的作用,miR-485-5p 在结直肠癌中低表达抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭能力,并促进细胞的凋亡^[7-8]。miR-485-5p 的表达显著抑制了食管癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力^[9]。越来越多的证据集中在 miR-485-5p 在肿瘤发生发展过程中的功能上,Gao et al^[4]报道 miR-485-5p 在 HCC 中表达下调,并通过负调控 WBP2 抑制 HCC 细胞增殖、迁移侵袭能力和促进细胞凋亡。miRNA 通过与它们靶基因的 3' 非翻译区结合来抑制其靶基因 mRNA 的表达是 miRNA 发挥调控作用的重要机制,每个 miRNA 的靶基因可能存在成千上百个^[1]。TargetScan7.1 软件是可以在线预测 miRNA 与其靶基因结合位点的网站,本文在此网站上发现 miR-485-5p 与 SOX5 mRNA 的 3 非翻译区具有结合位点,并且采用双荧光素酶报道基因证实 SOX5 为 miR-485-5p 的靶基因。

SOX5 是 SOX 家族转录因子的成员,具有高迁移率族 DNA 结合基序的保守序列,在调节胚胎发育和决定细胞命运方面具有重要作用^[10]。SOX5 的最新研究主要集中在肿瘤上,在胰腺癌和非小细胞肺癌等肿瘤中,促进肿瘤细胞的迁移、侵袭和维持肿瘤干细胞干性等方面具有重要的作用^[11-12]。Wang et al^[5]报道 SOX5 在 HCC 组织和细胞系中表达上调,并通过调控上皮间质转化过程促进肿瘤细胞的迁移和侵袭能力。双荧光素酶报道实验提示 miR-485-5p 可能通过调控 SOX5 在 HCC 中发挥作用。本文采用 qRT-PCR 检测显示与癌旁组织相比,HCC 组织中 miR-485-5p 的表达显著下调,而 SOX5 的表达显著上调,与已有的研究^[4-5]一致。但是 person 相关分析显示,miR-485-5p 与 SOX5 在 HCC 组织中的表达呈负相关,并且采用 mimic 转染 HCC 细胞过表达 miR-485-5p 后显示 HCC 细胞中 SOX5 mRNA 的表达降低,表明 miR-485-5p 靶向负调控 SOX5。采用 MTS 和 Transwell 实验检测 miR-485-5p 调控 SOX5 在 HCC 中的生物学功能,结果表明与 NC 组相比,miR-485-5p mimic 组和 miR-485-5p mimic + oe-SOX5 组 HCC 细胞的增殖和侵袭迁移能力降低,而与 miR-485-5p mimic 组相比,miR-485-5p mimic + oe-SOX5 组 HCC 细胞的增殖和侵袭迁移能力增加,表明 miR-485-5p 通过负调控 SOX5 抑制 HCC 的细胞的恶性表型。为了进一步研究 miR-485-5p 调控

SOX5 发挥作用的机制,本文采用 Western blot 实验检测 miR-485-5p 调控 SOX5 对 Akt/GSK3 β 信号通路的影响,Akt/GSK3 β 信号通路是与肿瘤增殖和侵袭迁移能力相关的肿瘤重要调控途径,包括 HCC^[13]。Akt/GSK3 β 信号通路中关键蛋白 Akt 和 GSK3 β 发生磷酸化激活(pAkt^{ser473}和 pGSK3 β ^{ser9})促使其下游信号分子发生促肿瘤发生发展的表达改变^[14]。本文结果显示 SOX5 减弱 miR-485-5p 对 Akt/GSK3 β 信号通路活化的抑制作用。表明 miR-485-5p 负调控 SOX5 抑制 Akt/GSK3 β 信号通路活化参与 HCC 的发生发展。

综上所述,miR-485-5p 和 SOX5 的表达在 HCC 中呈负相关。miR-485-5p 负调控 SOX5 抑制 HCC 细胞增殖和侵袭迁移能力,作用机制可能是通过抑制 Akt/GSK3 β 信号通路的活化。miR-485-5p 和 SOX5 可能是抗 HCC 治疗的分子靶标。

参考文献

- [1] 李根林,刘杰,谢晶,等. miR-422-5p 靶向 ADAM10 调控 Notch 信号通路对人卵巢癌细胞 SKOV-3 的上皮-间质转化的抑制作用[J]. 安徽医科大学报 2021, 56(1): 54-9.
- [2] Wang R, Zuo X H, Wang K, et al. MicroRNA-485-5p attenuates cell proliferation in glioma by directly targeting paired box 3 [J]. *Am J Cancer Res* 2018, 8(12): 2507-17.
- [3] Gao F, Wu H, Wang R, et al. MicroRNA-485-5p suppresses the proliferation, migration and invasion of small cell lung cancer cells by targeting flotillin-2 [J]. *Bioengineered* 2019, 10(1): 1-12.
- [4] Gao J, Dai C, Yu X, et al. microRNA-485-5p inhibits the progression of hepatocellular carcinoma through blocking the WBP2/Wnt signaling pathway [J]. *Cell Signal* 2020, 66: 109466.
- [5] Wang D, Han S, Wang X, et al. SOX5 promotes epithelial-mesenchymal transition and cell invasion via regulation of twist1 in hepatocellular carcinoma [J]. *Med Oncol* 2015, 32(2): 461.
- [6] 郭有新,陈宝刚,刘建伟,等. miR-433b 对喉癌细胞增殖、凋亡、侵袭的影响及机制研究 [J]. 安徽医科大学学报 2019, 54(1): 90-6.
- [7] Loktionov A. Biomarkers for detecting colorectal cancer non-invasively: DNA, RNA or proteins [J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2020, 12(2): 124-48.
- [8] 胡秀秀,潘玉琴,王书奎. MicroRNA-485-5p 抑制人结直肠癌细胞增殖和侵袭作用的研究 [J]. 东南大学学报(医学版) 2018, 37(5): 814-9.
- [9] Yang C L, Zheng X L, Ye K, et al. miR-485-5p inhibits the invasion and migration of esophageal cancer stem cells through the hedgehog signaling pathway by targeting smo [J]. *Mol Ther Nucleic Acids* 2020, 19: 841-52.
- [10] You J X, Zhao Q, Fan X D, et al. SOX5 promotes cell invasion and

- metastasis *via* activation of twist-mediated epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer[J]. *Onco Targets Ther* 2019 ,12: 2465 -76.
- [11] 余伟, 冯达, 刘礼军, 等. Sox5 促进胰腺癌细胞迁移侵袭和上皮间质化[J]. *微循环学杂志* 2018 28(4): 20 -5 31.
- [12] Zou H B ,Wang S ,Wang S T ,et al. SOX5 interacts with YAP1 to drive malignant potential of non-small cell lung cancer cells [J]. *Am J Cancer Res* 2018 8(5): 866 -78.
- [13] 梅娟娟, 冯书梅, 吴飞荣. SOX5 在 HCC 中的表达及与 HCC 预后的关系研究[J]. *中国实用医药* 2019 14(10): 63 -5.
- [14] 于丹, 王莹, 高原, 等. Akt/GSK-3 β /Snail 通路在 TGF- β ₁ 诱导 A549/DDP 细胞上皮间质转化中的作用[J]. *中国病理生理杂志* 2018 34(6): 1124 -8.

Effects of miR-485-5p targeting SOX5 gene on the viability and migration invasion of hepatocellular carcinoma cells

Han Chengmei , Liu Mei , Ren Weixin , et al

(*Dept of Infection , Jinan People's Hospital Affiliated to Shandong First Medical University , Jinan 271199*)

Abstract Objective To study the effect and mechanism of microRNA-485-5p (miR-485-5p) targeting sex determinant Y box protein 5 (SOX5) on cell viability and migration invasion of hepatocellular carcinoma (HCC) cells.

Methods TargetsScan 7.1 prediction software and dual luciferase reporter gene test were used to detect the targeted regulation of miR-485-5p on SOX5 gene. qRT-PCR was used to detect the expression levels of miR-485-5p and SOX5 mRNA in HCC tissues , and the correlation between them was analyzed. HCC cells Huh7 was routinely cultured and divided into NC group , miR-485-5p mimic group and miR-485-5p mimic + oe-SOX5 group. Lip2000 was used to transfect the plasmids of each group. CCK8 test was used to detect the viability of each group cells , and Transwell test was used to detect the migration invasion ability of the cells in each group. Western blot was used to detect the expression of pAkt and pGSK3 β protein in each group.

Results TargetsScan 7.1 prediction software and dual luciferase reporter gene experiments showed that miR-485-5p targeted SOX5. Compared with HCC adjacent tissues , miR-485-5p was lowly expressed in HCC tissues , and SOX5 mRNA was highly expressed in HCC tissues. The expression of them was negatively correlated. Compared with the NC group , the viability and migration invasion ability of HCC cells in miR-485-5p mimic group and miR-485-5p mimic + oe-SOX5 group reduced. Compared with the miR-485-5p mimic group , the viability and migration invasion ability of HCC cells in miR-485-5p mimic + oe-SOX5 group increased , and overexpression SOX5 attenuated the effect of miR-485-5p mimic on inhibition of cell viability and migration invasion. Compared with the NC group , the expressions of pAkt and pGSK3 β protein in miR-485-5p mimic group and miR-485-5p mimic + oe-SOX5 group reduced. Compared with miR-485-5p mimic group , the expression of pAkt and pGSK3 β protein in miR-485-5p mimic + oe-SOX5 group increased , and overexpression SOX5 attenuated the inhibitory effect of miR-485-5p mimic on Akt/GSK3 β signaling pathway activity.

Conclusion miR-485-5p targets the regulation of SOX5 expression and inhibits the viability and migration invasion of HCC cells.

Key words HCC; miR-485-5p; proliferation; invasion; migration; Akt/GSK3 β