

网络出版时间: 2021-4-2 17:15 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20210402.1339.006.html>

miR-34a-5p 过表达靶向抑制 MET 对肝癌细胞 HepG2 恶性增殖、侵袭和肿瘤形成的影响

杨慧萍¹ 朱梦佳¹ 王 淋¹ 赵文霞² 陈 雨³

摘要 目的 探究 miR-34a-5p 过表达对肝癌细胞 HepG2 恶性增殖、侵袭和肿瘤形成的影响。方法 荧光素酶实验检测 miR-34a-5p 与 MET 靶向关系。构建 MET pcDNA 载体过表达 MET, 将 miR-34a-5p 与 pcDNA-MET 单独或联合转染 HepG2 将细胞随机分为 4 组: Control、mimic、MET 和 mimic + MET 组进行后续实验。克隆形成法检测细胞增殖、流式细胞仪检测细胞凋亡、Transwell 检测细胞侵袭、Western blot 检测 Ki67、PCNA、Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达水平; 构建肝癌裸鼠移植瘤模型, 将裸鼠随机分为 Control 组和 mimic 组 检测裸鼠 30 d 肿瘤体积变化和第 30 天肿瘤重量, 通过免疫组化方法检测 Ki67 阳性表达率、TUNEL 染色细胞凋亡。结果 结果表明, miR-34a-5p 和 MET 存在直接靶向作用关系。与 Control 组相比较, mimic 组细胞克隆形成率降低 ($P < 0.05$), Ki67、PCNA 蛋白水平降低 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$), Bax/Bcl-2、cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值升高 ($P < 0.05$), 侵袭细胞数降低 ($P < 0.05$)。MET 组细胞克隆形成率升高 ($P < 0.05$), Ki67、PCNA 蛋白水平升高 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率降低 ($P < 0.05$), Bax/Bcl-2、cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值降低 ($P < 0.05$), 侵袭细胞数升高 ($P < 0.05$); 与 MET 组相比较, mimic + MET 组细胞克隆形成率降低 ($P < 0.05$), Ki67、PCNA 蛋白水平降低 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$), Bax/Bcl-2、cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值升高 ($P < 0.05$), 侵袭细胞数降低 ($P < 0.05$); 裸鼠成瘤实验中, 与 Control 组相比较, mimic 组第 25、30 天肿瘤体积降低 ($P < 0.05$), 肿瘤组织重量降低 ($P < 0.05$), Ki67 阳性细胞数降低 ($P < 0.05$), 肿瘤组织细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$)。结论 miR-34a-5p 过表达靶向 MET 抑制抑制 HepG2 增殖、侵袭并促进细胞凋亡, 抑制肝癌裸鼠移植瘤肿瘤的生长。

关键词 肝癌; miR-34a-5p; 间质表皮转化因子; HepG2

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)05-0693-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.05.005

肝细胞癌是位于人类肝脏中的常见肿瘤。由于手术切除、转移和异质性的复杂性, 肝细胞癌被认为是世界上 3 大最致命的肿瘤之一^[1]。在肝癌的临床治疗中已经采用了许多治疗策略, 包括药物干预、化学栓塞、保守治疗和手术治疗, 但是由于缺乏对病理机制的深刻理解, 肝癌的临床治疗效果仍不理想^[2]。微小 RNA (microRNA, miRNA) 可有效地调节各种生物过程, 进一步研究 miRNA 的表达模式和作用可能为肝癌提供新的诊断和治疗靶标。

miR-34a-5p 是 miR-34a 家族成员, 可调节多种细胞的增殖和侵袭^[3-4]。已有研究^[5]表明 miR-34a-5p 在肝癌组织中表达明显低于非肝癌肝组织。间质表皮转化因子 (mesenchymal to epithelial transition factor, MET) 是 PTKs 家族成员, MET 表达水平与肝癌的术后复发、生存时间关系密切, 可作为肝癌术后预后指标^[6]。该文通过荧光素酶报告实验验证 miR-34a-5p 与 MET 靶向关系, 探讨 miR-34a-5p 过表达对 HepG2 细胞增殖、侵袭及肿瘤生长的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 10 只雄性 4~5 周龄 Balb/c 裸鼠, 体质量 18~22 g, 由成都达硕实验动物有限公司提供, 动物许可证号: SCXK(川)2020-030, 所有裸鼠均饲养于特定的无病原体条件下。

1.2 实验试剂 RPMI-1640 培养基、胎牛血清、青霉素/链霉素双抗溶液、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司; 荧光素酶检测试剂盒购自北京 solarbio 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司; 兔抗人 Ki67、增殖细胞核抗原 (proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA)、Bax (ab53154)、B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Caspase-3、cleaved caspase-3、 β -actin 均购自英国 Abcam 公司。

2020-07-02 接收

基金项目: 十三五国家科技重大专项 (编号: 2018ZX10303-502)

作者单位: ¹ 河南中医药大学, 郑州 450000

² 河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450000

³ 郑州市妇幼保健院, 郑州 450000

作者简介: 杨慧萍, 女, 硕士研究生;

赵文霞, 女, 主任医师, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: star123play@163.com

1.3 细胞培养 人肝癌细胞株 HepG2 来源于中国典型培养物保藏中心,将细胞接种于 RPMI 1640 培养基(含 10 % 胎牛血清、 1×10^5 U/L 青霉素/链霉素双抗溶液)中,于恒温培养箱(5 % CO_2 、37 °C)中培养。实验用细胞为对数生长期细胞。

1.4 RT-PCR 通过采用 TRIzol 溶液从 HepG2 细胞中抽提总 RNA,反转录获得 cDNA,按 SYBR PremixEX Taq II 试剂盒说明书进行检测。反应条件为:预变性 95 °C 2 min,变性 95 °C、5 s、60 °C、10 s、95 °C、5 s、40 个循环,60 °C、1 min。miR-34a-5p 上游引物为:5'-AGCCGCTGGCAGTGTCTTA-3',下游引物为:5'-CAGAGCAGGGTCCGAGGTA-3'; U6 上游引物为:5'-ATTGGAACGATACAGAGAAGATT-3',下游引物为:5'-GGAACGCTTCACGAATTTG-3'。以 U6 为内参,miR-34a-5p 的相对表达使用公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算。

1.5 荧光素酶报告实验 通过生物信息学网站 targetscan 分析显示 MET 是 miR-34a-5p 的潜在靶点,采用荧光素酶报告实验进行验证,构建野生型和突变型 MET 3'-UTR 荧光素酶报告基因质粒,转染至 HepG2 细胞。采用荧光素酶检测试剂盒检测细胞荧光素酶相对活性。

1.6 MET 过表达 构建 MET pcDNA 载体过表达 MET,转染至 HepG2 细胞,将细胞随机分为 3 组:Control、pcDNA 和 pcDNA-MET 组。通过 RT-PCR 和 Western blot 确定过表达是否成功。

1.7 细胞分组 miR-34a-5p mimic 与 pcDNA-MET 单独或联合转染肝癌 HepG2 细胞,Control 组、miR-34a-5p mimic 组(mimic)、pcDNA-MET 组(MET)和 miR-34a-5p mimic + pcDNA-MET 组(mimic + MET)。

1.8 克隆形成实验 取方法 1.7 转染后的各组细胞,按 500 个/孔接种于 6 孔板,于恒温培养箱(5 % CO_2 、37 °C)中培养 14 d,当出现肉眼可见的克隆时,4 % 多聚甲醛固定 30 min,0.5 % 结晶紫染色 30 min,拍照观察克隆形成数目,计算细胞克隆形成率。细胞克隆形成率 = 细胞克隆数/接种细胞数 $\times$ 100 %。

1.9 流式细胞仪检测细胞凋亡 收集方法 1.7 转染后培养 48 h 的细胞,PBS 清洗 2 遍,加入结合缓冲液制成细胞悬液,避光加入 5 μl Annexin V-FITC 和 5 μl PI 混匀,孵育 15 min,采用流式细胞仪上机分析,检测各组细胞凋亡率。

1.10 Transwell 将基质胶均匀铺至 Transwell 小室上室,并加入 100 μl 细胞悬液(10^6 /ml),下室加

入 500 μl 完全培养基,37 °C 孵育 24 h 后多聚甲醛固定 20 min,0.1 % 结晶紫染色 20 min,于荧光显微镜随机选择 5 个视野计数穿模细胞数。

1.11 Western blot 取方法 1.7 转染后各组细胞,用含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液提取总蛋白,BCA 试剂盒测定蛋白含量。采用 SDS-PAGE 凝胶电泳法分离蛋白质样品并转移至 PVDF 膜,于 4 °C 条件下加入 MET、Ki67、PCNA、Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 一抗(1:1 000)孵育过夜,TBST 清洗,4 °C 条件下加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:10 000)孵育 2 h,ECL 显影发光并曝光处理。通过 ImageJ 软件分析灰度值,以目的条带灰度值/Actin 灰度值表示蛋白表达水平。

1.12 裸鼠皮下移植瘤模型 将荷瘤裸鼠随机分成 2 组:Control 和 mimic 组,取方法 1.7 对数生长期的 Control 和 mimic 组细胞,调整接种 HepG2 细胞浓度为 1×10^7 /ml,接种于裸鼠右侧腋窝处(皮下注射,0.2 ml)。每 5 d 测量 1 次移植瘤的体积,30 d 后处死裸鼠,剥离肿瘤并称取瘤子重量。

1.13 免疫组化 取部分肿瘤组织,石蜡包埋切片,切片厚度为 4 μm ,按免疫组化检测试剂盒说明书进行免疫组化染色,DAB 显色,苏木精复染 1 min,盐酸乙醇分化 2 s,显微镜下观察 Ki67 表达情况,Ki67 阳性细胞定位于细胞核,阳性表达为细胞核染成黄色或棕黄色。

1.14 TUNEL 取方法 1.13 切片,按 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒说明书加 TUNEL 反应液,光学显微镜下随机选取 5 个视野并计数凋亡细胞。凋亡阳性细胞核为有棕黄色着染者,正常细胞呈蓝色。肿瘤组织细胞凋亡率(%) = 肿瘤组织凋亡细胞数量/肿瘤组织总细胞数 $\times$ 100 %。

1.15 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5 进行统计分析,数据表示为 $\bar{x} \pm s$,2 组间比较采用 Dunnett 检验,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-34a-5p 靶向下调 MET 为明确 miR-34a-5p 对 MET 的靶向关系,采用荧光素酶报告实验进行验证,搜索生物信息学网站获得 MET 3'-UTR 序列如图 1A 所示,MET Wt 加入 miR-34a-5p mimic 处理后荧光素酶活性降低($F = 33.40$, $P < 0.05$,图 1D),表明 miR-34a-5p 和 MET 存在靶向作用关系。RT-PCR 检测 miR-34a-5p、MET mRNA 水平(图 1B、

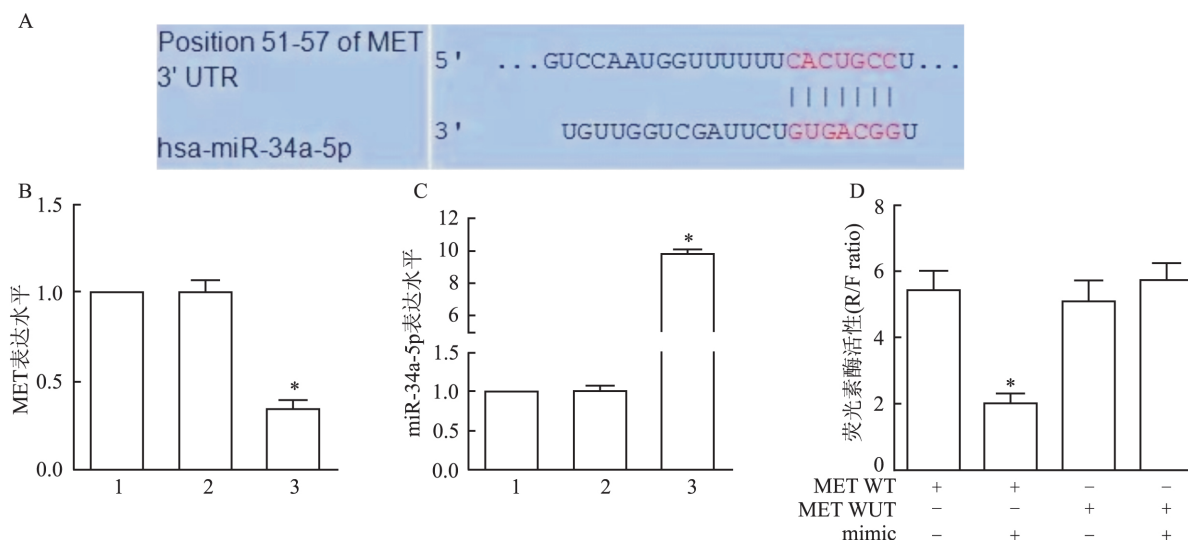


图1 miR-34a-5p与MET靶向关系

A: TargetScan 预测 miR-34a-5p 与 MET 的潜在结合位点; B: MET 相对 mRNA 表达水平直方图; C: miR-34a-5p 相对 mRNA 表达水平直方图; D: 荧光素酶报告实验验证 miR-34a-5p 与 MET 靶向关系; 1: Control 组; 2: mimic-NC 组; 3: mimic 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$

C), 与 Control 组比较, mimic 组 miR-34a-5p mRNA 水平升高 ($t = 1.226$, $P < 0.05$), MET mRNA 水平降低 ($t = 2.040$, $P < 0.05$)。

2.2 MET 过表达升高 MET mRNA 水平和蛋白表达水平 构建 MET pcDNA 载体, 通过 RT-PCR 和 Western blot 确定过表达是否成功 (图 2), 与 Control 组比较, pcDNA-MET 组 MET mRNA 水平和蛋白水平均升高 ($t = 1.615$, 1.270 , $P < 0.05$)。

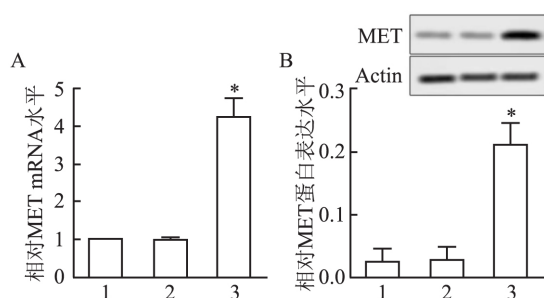


图2 MET 过表达对 MET mRNA 水平和蛋白表达水平的影响

A: MET 相对 mRNA 水平直方图; B: Western blot 检测 MET 蛋白表达水平; 1: Control 组; 2: pcDNA 组; 3: pcDNA-MET 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$

2.3 miR-34a-5p 过表达抑制 HepG2 细胞增殖, 降低 Ki67、PCNA 蛋白表达水平 通过克隆形成法检测各组细胞增殖情况 (图 3A), 与 Control 组比较, mimic 组细胞克隆形成率降低 ($t = 1.750$, $P < 0.05$), MET 组细胞克隆形成率升高 ($t = 4.000$, $P < 0.05$), mimic + MET 组细胞克隆形成率低于 MET 组 ($t = 3.125$, $P < 0.05$); 通过 Western blot 检测各组

细胞 Ki67、PCNA 蛋白表达水平 (图 3C), 与 Control 组比较, mimic 组细胞 Ki67、PCNA 蛋白水平降低 ($t = 1.316$, 1.381 , $P < 0.05$), MET 组细胞 Ki67、PCNA 蛋白水平升高 ($t = 1.880$, 2.000 , $P < 0.05$), mimic + MET 组细胞 Ki67、PCNA 蛋白水平低于 MET 组 ($t = 1.802$, 1.830 , $P < 0.05$)。

2.4 miR-34a-5p 过表达促进 HepG2 细胞凋亡, 升高 Bax/Bcl-2、cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值 通过流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况 (图 4A), 与 Control 组比较, mimic 组细胞凋亡率升高 ($t = 1.402$, $P < 0.05$), MET 组细胞凋亡率降低 ($t = 4.035$, $P < 0.05$), mimic + MET 组细胞凋亡率高于 MET 组 ($t = 1.516$, $P < 0.05$); 通过 Western blot 检测各组细胞 Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达水平 (图 4B), 与 Control 组比较, mimic 组细胞 Bax/Bcl-2、cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值升高 ($t = 1.157$, 1.270 , $P < 0.05$), MET 组细胞 Bax/Bcl-2、cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值降低 ($t = 1.200$, 2.333 , $P < 0.05$), mimic + MET 组细胞 Bax/Bcl-2、cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值高于 MET 组 ($t = 1.058$, 1.400 , $P < 0.05$)。

2.5 miR-34a-5p 过表达抑制 HepG2 细胞侵袭 通过 Transwell 检测各组 HepG2 侵袭细胞数 (图 5), 与 Control 组比较, mimic 组侵袭细胞数降低 ($t = 1.886$, $P < 0.05$), MET 组侵袭细胞数升高 ($t = 5.542$, $P < 0.05$), 与 MET 组比较, mimic + MET 组侵袭细胞数降低 ($t = 2.803$, $P < 0.05$)。

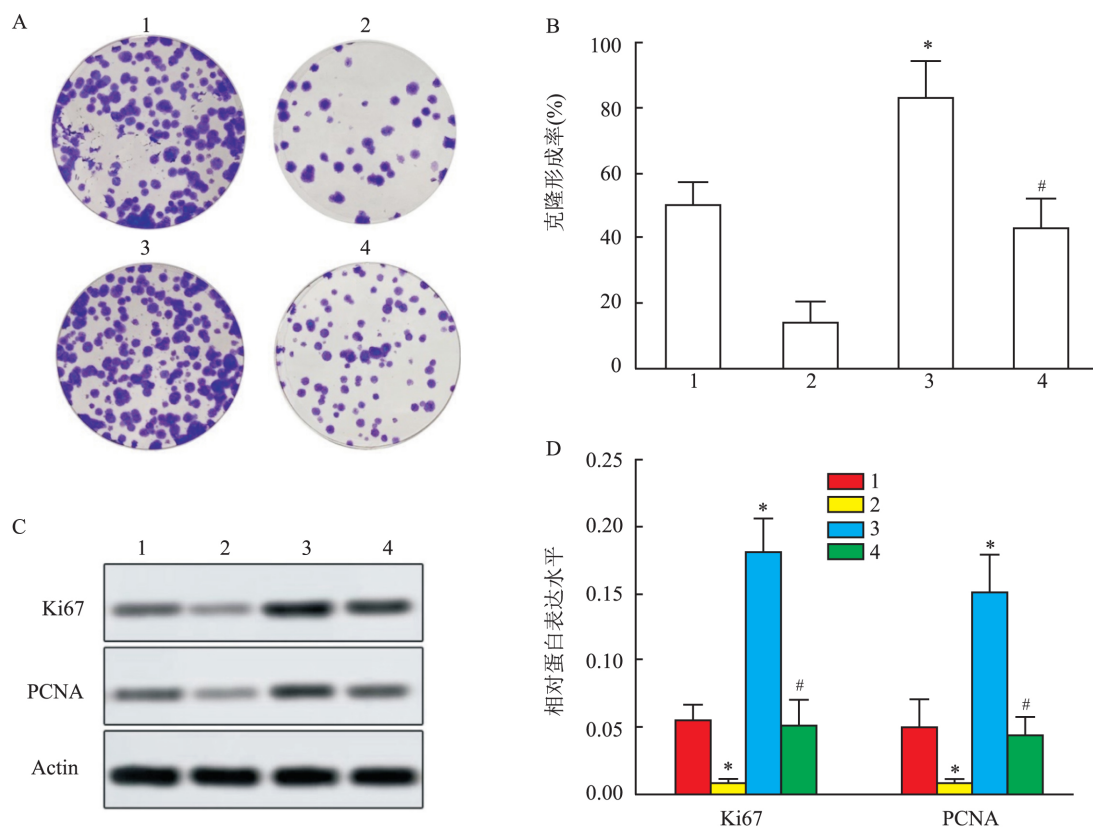


图3 miR-34a-5p 过表达对 HepG2 细胞克隆形成率和 Ki67、PCNA 蛋白表达水平的影响 × 200

A: 克隆形成实验检测细胞克隆形成率; B: 克隆形成率直方图; C: Western blot 检测 Ki67、PCNA 蛋白表达水平; D: Ki67、PCNA 蛋白表达水平直方图; 1: Control 组; 2: mimic 组; 3: MET 组; 4: mimic + MET 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$; 与 MET 组比较: # $P < 0.05$

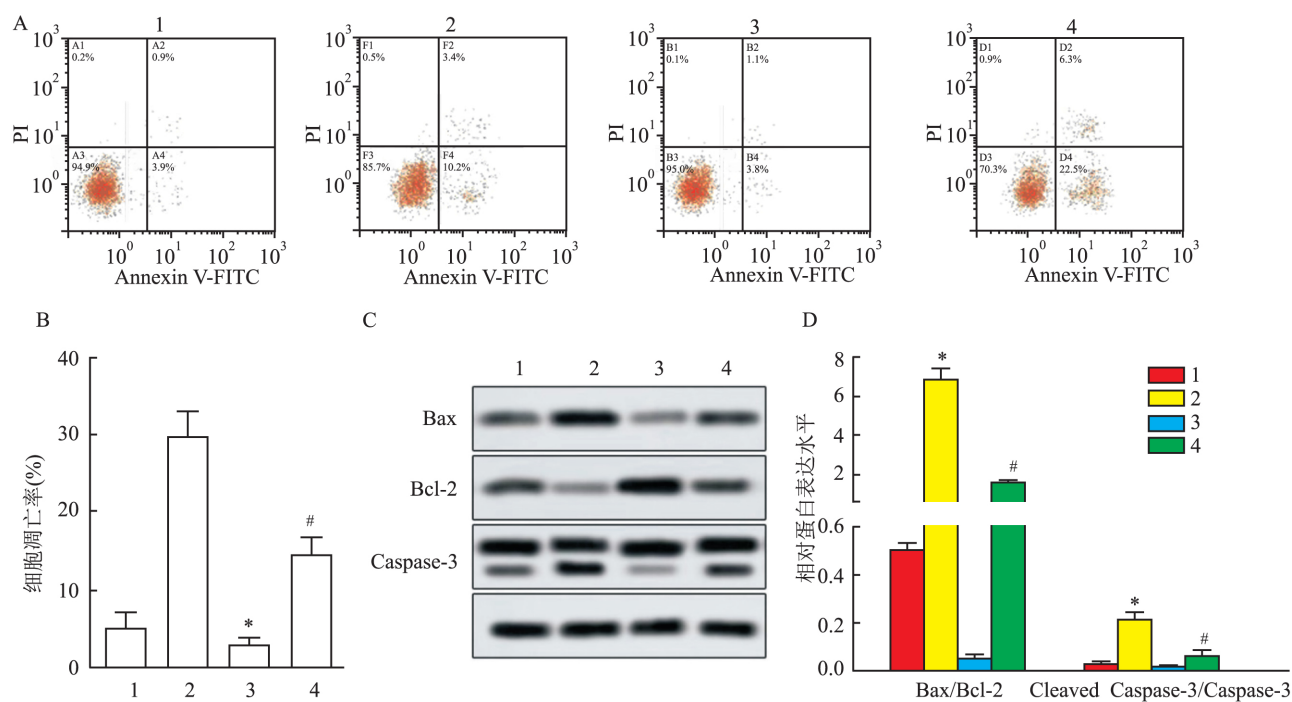


图4 miR-34a-5p 过表达对 HepG2 细胞凋亡和 Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达水平的影响

A: 流式细胞仪检测细胞凋亡; B: 细胞凋亡率直方图; C: Western blot 检测 Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达水平; D: Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达水平直方图; 1: Control 组; 2: mimic 组; 3: MET 组; 4: mimic + MET 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$; 与 MET 组比较: # $P < 0.05$

2.6 miR-34a-5p 过表达对肝癌裸鼠移植瘤的影响

与 Control 组比较 ,mimic 组第 25、30 天肿瘤体积降低 ($t = 2.103, 2.029, P < 0.05$) ,肿瘤组织重量降低 ($t = 1.820, P < 0.05$) ,mimic 组 Ki67 阳性细胞数降低 ($t = 1.271, P < 0.05$) ,肿瘤组织细胞凋亡率升高 ($t = 1.141, P < 0.05$) 。见图 6。

3 讨论

越来越多的研究显示 ,miRNA 的表达失控与肝癌的发生发展密切相关。在肿瘤中 ,miRNA 常常起

到抑癌基因或癌基因的作用。相关研究^[7]表明 ,在乳腺癌骨转移中 ,miR-34a-5p 的缺失与 MET 的表达呈负相关。本研究表明 miR-34a-5p 和 MET 存在直接靶向作用关系 ,miR-34a-5p 可能是治疗肝癌的有效潜在靶点。

调控肿瘤细胞的增殖是治疗肿瘤的重要方式。Ki67 属于增殖相关蛋白 ,其表达水平的高低可评估癌细胞的增殖能力^[8]。PCNA 是一种与细胞增殖状态有关的核蛋白 ,PCNA 指数越高 ,细胞的分裂增殖越快 ,有可能促进细胞获得无限增殖的能力并最终

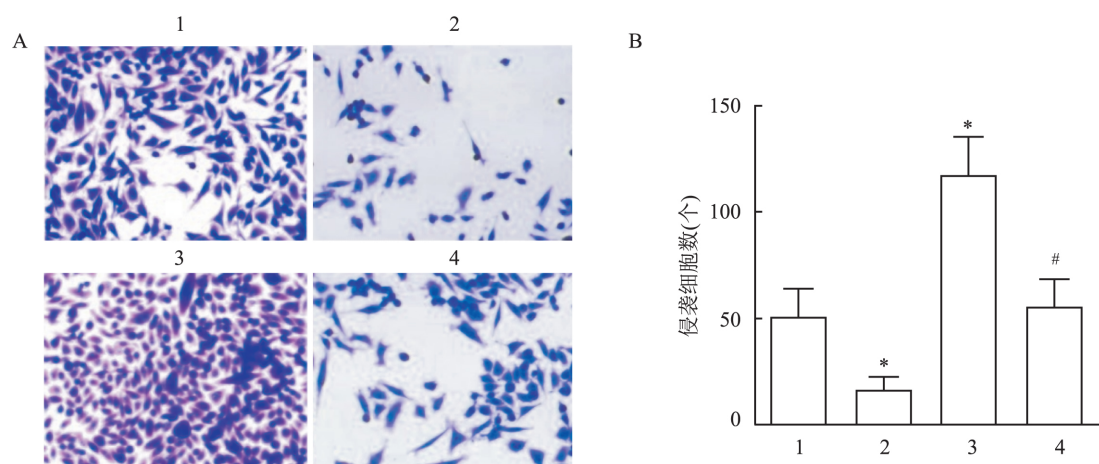


图5 miR-34a-5p 过表达对 HepG2 细胞侵袭的影响 ×200

A: Transwell 检测侵袭细胞数; B: 侵袭细胞数直方图; 1: Control 组; 2: mimic 组; 3: MET 组; 4: mimic + MET 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$; 与 MET 组比较: # $P < 0.05$

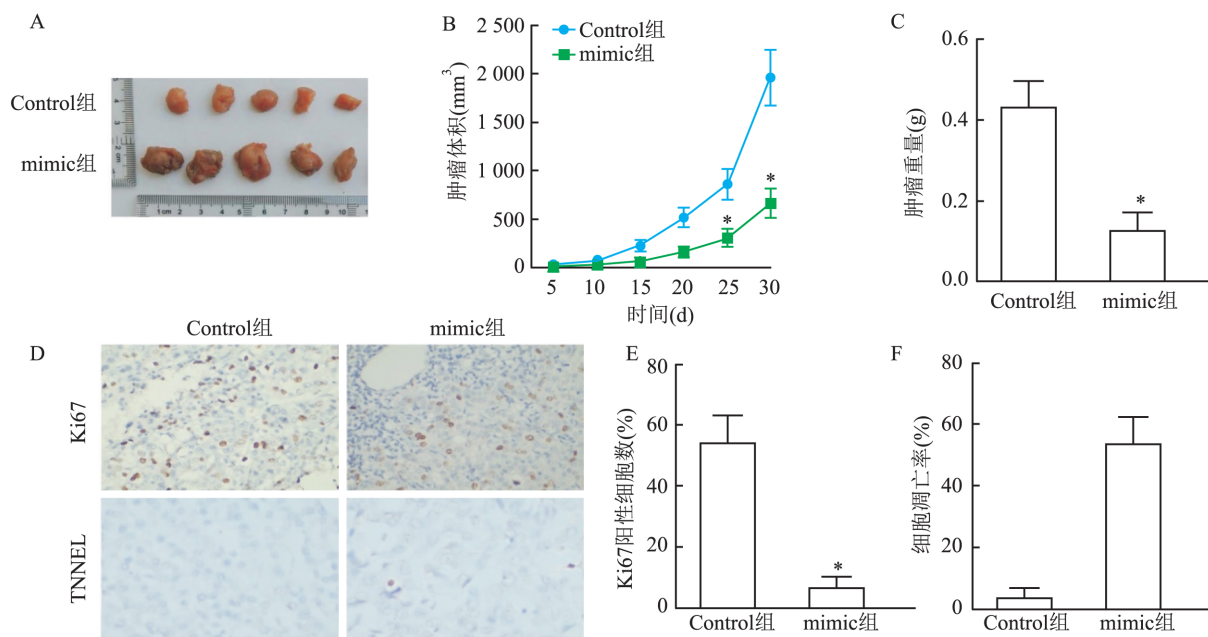


图6 miR-34a-5p 过表达对肝癌裸鼠移植瘤的影响 ×200

A: 肝癌裸鼠移植瘤肿瘤; B: 30 d 内肿瘤体积变化; C: 肿瘤重量直方图; D: 免疫组化检测 Ki67 阳性细胞数及 TUNEL 染色检测肿瘤组织细胞凋亡; E: Ki67 阳性细胞数直方图; F: 肿瘤细胞凋亡率直方图; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$

使细胞的形态结构和机能发生改变^[9]。张亚飞等^[10]发现 miR-34a-5p 靶向 GMFB 抑制 SH-SY5Y 细胞增殖。Sun et al^[11]发现上调肝癌细胞中 miR-34a-5p 表达可抑制肝癌细胞增殖。本研究显示 miR-34a-5p 过表达靶向抑制 MET 通过降低克隆形成率、Ki67 及 PCNA 蛋白表达量,提示 miR-34a-5p 过表达抑制 HepG2 细胞增殖。且降低肝癌裸鼠移植瘤模型肿瘤组织 Ki67 阳性细胞数,提示 miR-34a-5p 过表达抑制肝癌裸鼠移植瘤模型肿瘤组织细胞增殖。

肿瘤治疗最本质的策略是诱导肿瘤细胞的凋亡,细胞凋亡是发生在响应异常和细胞损伤的重要细胞机制,异常凋亡反应在许多类型的人类癌症的发生发展过程中十分常见。相关研究^[12]表明,Bax/Bcl-2 比值升高诱导细胞凋亡,Bax/Bcl-2 比值降低细胞凋亡受到抑制,在肝癌细胞中 miRNA 主要通过 Bcl-2 家族来影响细胞凋亡。Caspase 蛋白的改变是细胞凋亡发生的重要标志,而 Caspase-3 是以无活性的前体存在,在细胞接受到一系列的凋亡信号后 Caspase-3 经过剪切成为活化的执行因子 Caspase-3,其是细胞凋亡不可逆的标志。李勤等^[13]发现 miR-34a-5p 过表达可促进滋养层细胞凋亡。冯婉琴等^[14]发现 miR-34a-5p mimic 促进子宫内膜基质细胞凋亡。miR-34a-5p 过表达靶向抑制 MET 具有升高 HepG2 细胞 Bax/Bcl-2、cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值和升高肝癌裸鼠移植瘤肿瘤组织细胞凋亡率的作用。提示 miR-34a-5p 过表达靶向抑制 MET 促进 HepG2 细胞凋亡和裸鼠肿瘤组织细胞凋亡。

大量研究^[15]表明,肝癌预后不良的原因在于肝癌细胞的侵袭和转移能力,抑制肝癌细胞的侵袭活力是治疗肝癌的重要方式。李鹏等^[4]发现上调 miR-34a-5p 靶向 TPD52 抑制膀胱癌细胞侵袭。本文表明 miR-34a-5p 过表达靶向抑制 MET 具有降低 HepG2 细胞侵袭细胞数的作用。提示 miR-34a-5p 过表达靶向抑制 MET 抑制 HepG2 细胞侵袭。

综上所述,miR-34a-5p 过表达靶向 MET 抑制抑制 HepG2 细胞增殖、侵袭,诱导细胞凋亡,抑制裸鼠移植瘤肿瘤的形成。以 miR-34a-5p 为靶点的干预治疗有望成为肝癌治疗的新方法,值得临床进一步研究探讨。

参考文献

[1] 虞乐,黄春霞,胡军,等.右美托咪定对人肝癌 Huh-7 细

胞增殖和迁移的影响[J].安徽医科大学学报,2020,7(55):1019-23.

- [2] Heimbach J K, Kulik L M, Finn R S, et al. Aasld guidelines for the treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2018, 67(1): 358-80.
- [3] Jia D, Niu Y, Li D, et al. Lncrna c2dat1 promotes cell proliferation, migration, and invasion by targeting mir-34a-5p in osteosarcoma cells[J]. *Oncol Res*, 2018, 26(5): 753-64.
- [4] 李鹏,杨荣华,张明华,等. Mir-34a-5p 在膀胱癌组织中的表达及其对膀胱癌细胞侵袭迁移的影响和机制[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2019, 24(4): 403-10.
- [5] Ahmed M Y, Salah M M, Kassim S K, et al. Evaluation of the diagnostic and therapeutic roles of non-coding rna and cell proliferation related gene association in hepatocellular carcinoma [J]. *Gene*, 2019, 706: 97-105.
- [6] 曹蒋军,吴宗辉,童廷婷,等. 间质表皮转化因子 met 信号通路及其在肿瘤中的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2018, 34(3): 334-51.
- [7] Maroni P, Pugliser R, Mattia G, et al. In bone metastasis miR-34a-5p absence inversely correlates with Met expression, while Met oncogene is unaffected by miR-34a-5p in non-metastatic and metastatic breast carcinomas[J]. *Carcinogenesis*, 2017, 38(5): 492-503.
- [8] Niikura N, Iwamoto T, Masuda S, et al. Immunohistochemical ki67 labeling index has similar proliferation predictive power to various gene signatures in breast cancer[J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(8): 1508-12.
- [9] 朱戈丽,林莉,伍军,等. 百令胶囊加还原型谷胱甘肽含药血清对 NRK-49F 细胞增殖的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 3(55): 391-5.
- [10] 张亚飞,余辉,郑百俊,等. Mir-34a-5p 靶向 gmfb 抑制细胞增殖对先天性巨结肠的治疗意义[J]. *中华细胞与干细胞杂志(电子版)*, 2018, 8(4): 193-8.
- [11] Sun T Y, Xie H J, Li Z, et al. Mir-34a regulates hdac1 expression to affect the proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(1): 103-14.
- [12] Zhang Y, Takahashi S, Tasaka A, et al. Involvement of microrna-224 in cell proliferation, migration, invasion, and anti-apoptosis in hepatocellular carcinoma [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013, 28(3): 565-75.
- [13] 李勤,许娟秀. Mir-34a-5p 通过调控 cdk6 表达和 pi3k/akt 信号通路调节滋养层细胞的增殖、浸润和凋亡[J]. *南方医科大学学报*, 2020, 40(1): 79-86.
- [14] 冯婉琴,邓月秀,马颖. Mir-34a-5p 及 akt1 基因在子宫内膜异位症子宫内膜组织中的表达及其对子宫内膜基质细胞迁移和侵袭的影响[J]. *解放军医学杂志*, 2020, 45(5): 503-8.
- [15] Liu P, Long P, Huang Y, et al. Cxcl12/cxcr4 axis induces proliferation and invasion in human endometrial cancer [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(4): 1719-29.

The overexpression of miR-34a-5p inhibits the effect of MET on the malignant proliferation , invasion and tumor formation of HCC cells HepG2

Yang Huiping¹ , Zhu Mengjia¹ , Wang Lin¹ , et al

(*Henan University of Traditional Chinese Medicine Zhengzhou* 450000)

Abstract Objective To investigate the effects of MiR-34a-5p overexpression on malignant proliferation , invasion and tumor formation of hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **Methods** The relationship between MiR-34a-5p and MET was detected by luciferase assay. MET pcDNA vector was constructed to overexpress MET , miR-34a-5p and PCDNA-MET were transfected into HepG2 alone or in combination , and the cells were randomly divided into 4 groups: Control group , mimic group , MET group and mimic + MET group for subsequent experiments. Cell proliferation was detected by clone formation method. Flow cytometry was used to detect apoptosis. Transwell detected cell invasion. Protein expression levels of Ki67 , PCNA , Bax , Bcl-2 and Caspase-3 were detected by Western blot. Nude mice were randomly divided into Control group and mimic group to detect tumor volume change and tumor weight at 30d , immunohistochemistry was used to detect Ki67 positive expression rate and TUNEL staining cell apoptosis. **Results** There was a direct targeting relationship between MiR-34a-5p and MET. Compared with the Control group , the cell clone formation rate of mimic group significantly reduced($P < 0.05$) , the levels of Ki67 and PCNA protein significantly reduced($P < 0.05$) , the apoptosis rate significantly increased($P < 0.05$) , the ratio of Bax/Bcl-2 and cleaved caspase-3/caspase-3 significantly increased($P < 0.05$) , and the number of invaded cells significantly reduced($P < 0.05$) . In the MET group , the cell clonal formation rate significantly increased($P < 0.05$) , the levels of Ki67 and PCNA significantly increased($P < 0.05$) , the apoptosis rate significantly decreased ($P < 0.05$) , the Bax/Bcl-2 and cleaved caspase-3/caspase-3 ratios significantly decreased($P < 0.05$) , and the number of invaded cells significantly increased($P < 0.05$) . Compared with the MET group , mimic + MET group showed significantly lower cell clone formation rate($P < 0.05$) , significantly lower Ki67 and PCNA protein levels ($P < 0.05$) , significantly higher apoptosis rate($P < 0.05$) , significantly higher Bax/Bcl-2 and cleaved caspase-3/caspase-3 ratios($P < 0.05$) , and significantly lower cell invasion number($P < 0.05$) . In the tumor formation experiments of nude mice , compared with the Control group , the tumor volume of the group mimic significantly decreased at day 25 and 30($P < 0.05$) , the weight of tumor tissue significantly decreased($P < 0.05$) , the number of Ki67 positive cells significantly decreased($P < 0.05$) , and the apoptosis rate of tumor tissue significantly increased ($P < 0.05$) . **Conclusion** miR-34a-5p overexpression inhibits MET , inhibits HepG2 proliferation , invasion and promotes cell apoptosis , and inhibits tumor growth of xenograft tumor in nude mice with HCC.

Key words liver cancer; miR-34a-5p; mesenchymal to epithelial transition factor; HepG2