

网络出版时间: 2019-3-22 16:45 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190321.1437.018.html>

miR-7 与肝细胞性肝癌 EMT 及临床病理特征之间的相关性研究

张传海¹, 张鹤松², 桂阳¹, 郭凤林³, 马金良¹, 余继海¹

摘要 目的 探讨微小 RNA-7 (miR-7) 与肝细胞性肝癌 (HCC) 临床病理特征及上皮间质化转变 (EMT) 之间的相关性。方法 收集 30 组 HCC (包括癌组织及对应癌旁组织) 临床标本及临床相关病理资料, 分别检测 miR-7 及 EMT 标志物 N-钙粘蛋白 (N-cadherin)、E-钙粘蛋白 (E-cadherin) 的表达, 分析 miR-7 与 HCC 临床病理特征之间的相关性, 以及 miR-7 与 EMT 之间的相关性。结果 miR-7、E-cadherin 在癌组织的表达水平显著低于癌旁组织 ($P < 0.01$), 而 N-cadherin 的表达则相反。相关性分析表明, miR-7 与 E-cadherin 呈正相关性, 与 N-cadherin 呈负相关性。miR-7 在 HCC 的表达与患者年龄、性别、肿瘤部位、是否伴随肝炎病毒感染无相关性, 而与 TNM 分级、分化程度和血管侵犯密切相关。结论 miR-7 的表达水平与 EMT 程度呈负相关性, 检测 miR-7 的表达对 HCC 的临床诊断、治疗及预后判断具有潜在的重要意义。

关键词 miR-7; 肝细胞性肝癌; 上皮间质化转变

中图分类号 R 392.11; R 329.25

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)03-0429-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.03.018

肝癌以发病率高、转移性强、病死率高成为严重威胁人类健康的重要疾病, 2012 年的调查显示每年全世界约有 76 万人死于肝癌, 占癌症总死亡人数的 9.1%, 在恶性肿瘤中居于第二位, 而我国肝癌的发病率和死亡率居于第四位。肝细胞性肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是肝癌最常见的临床类型, 约占肝癌的 80% [1-3]。课题组前期的体外实验 [4] 证实 miR-7 可通过结合表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 3'-UTR 非编码区 (untranslated region, UTR), 抑制 EGFR 信号通路活性, 进而抑制人高转移肝癌细胞株 (highly invasive

human hepatocellular carcinoma cell, MHCC-97H 上皮间质化转变 (epithelial mesenchymal transition, EMT), 降低 MHCC-97H 的侵袭、迁移能力 [5]。该研究拟通过比较分析 microRNA (miR)-7 在肝癌组织中的表达及其与 HCC 病理学特性、EMT 之间的关系, 进一步探讨其在 HCC 中的重要作用, 为深入探讨 HCC 特异性、敏感性早期诊断指标及转移的分子机制、临床治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 30 组 HCC 组织标本取自 2016 年 1 月 ~ 2017 年 6 月安徽省立医院肝胆外科手术切除的 HCC 组织及癌旁组织 (距离癌组织 5 cm 以上)。所有组织标本经术后病理检测证实为 HCC, 术前均未接受抗肿瘤治疗, 并且与患者或家属进行了充分沟通并签署了实验知情同意书。RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; Real-time PCR 试剂购自日本 TaKaRa 公司; Real-time PCR 引物购自美国 Invitrogen 公司; GAPDH、E-cadherin、N-cadherin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; ABI 7500 Real-time PCR 仪购自美国 ABI 公司。

1.2 方法

1.2.1 Real-time PCR 参照 RNA 提取试剂盒说明书提取组织总 RNA。以总 RNA 为模板, 参照反转录试剂盒说明书合成 cDNA 第一链。以 cDNA 为模板, 使用 ABI 7500 Real-time PCR 仪检测 U6、GAPDH、miR-7、E-cadherin 和 N-cadherin 的表达。其中, miR-7 和 U6 的上游引物序列分别为: 5'-TG-GAAGACTAGTGATT-3' 和 5'-TGCGGGTGCTCGCT-TCGGCAGC-3', 下游引物为通用引物; E-cadherin 上游引物: 5'-TCGCTTACACCATCCTCAGC-3', 下游引物: 5'-GGAAACTCTCTCGGTCCAGC-3'; N-cadherin 上游引物: 5'-AACAGCAACGACGGGTTAGT-3', 下游引物: 5'-CAGACACGGTTGCAGTTGAC-3'; GAPDH 上游引物: 5'-GCCGCATCTTCTTTTTCGCTC-3', 下游引物: 5'-TACGACCAAATCCGTTGACTCC-3'。PCR 反应程序为: 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 40 个循环。分析

2018-11-19 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金项目资助项目 (编号: 1608085MH198)

作者单位: 安徽省立医院¹ 普外科、³ 麻醉科, 合肥 230001

² 安徽医科大学研究生学院, 合肥 230032

作者简介: 张传海, 男, 副主任医师, 博士, 责任作者, E-mail: zhangch3788@126.com

miR-7 以 U6 为内参,分析 E-cadherin 和 N-cadherin 则以 GAPDH 作为内参。

1.2.2 Western blot 应用 RIPA(强)细胞裂解液进行冰上匀浆操作,提取组织总蛋白,BCA 法定量后,按 50 μg /孔的量加样、电泳、转膜。各蛋白的转膜条件分别为 GAPDH: 120 mA, 2 h; E-cadherin: 150 mA, 3 h; N-cadherin: 150 mA, 3 h; 转膜结束后,应用浓度为 5% 脱脂奶粉室温封闭 1.5 h, TBST 洗膜 3 min。分别参考抗体说明书进行抗体稀释,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。相应二抗室温孵育 1.5 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min; ECL 发光、显影,以 GAPDH 为内参,分析各指标的相对表达量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行分析,数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 F 检验和 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。应用 Spearman's 相关性分析 miR-7 与 EMT 之间的关系。每组实验均重复 3 次。

2 结果

2.1 miR-7 的表达情况 与癌旁组织比较,癌组织中 miR-7 的表达水平显著降低,差异有统计学意义 ($F = 1.753, P = 0.000$)。与非转移性癌组织比较,转移性癌组织中 miR-7 的表达亦明显降低,差异有统计学意义 ($F = 1.600, P = 0.047$),见图 1。

2.2 E-cadherin、N-cadherin 的表达情况 Real-time PCR 和 Western blot 检测结果均表明,与癌旁组织比较,癌组织中 E-cadherin mRNA 和蛋白表达均显著降低,差异有统计学意义 ($F = 3.085, P = 0.000; F = 4.072, P = 0.000$),而 N-cadherin mRNA 和蛋白表达均明显升高,差异有统计学意义 ($F = 122.6, P = 0.000; F = 5.751, P = 0.000$)。见图 2、3。

2.3 miR-7 的表达与 E-cadherin、N-cadherin 之间的关系 相关性分析表明,miR-7 在 HCC 组织中的表达与 E-cadherin 呈正相关性 ($r = 0.426$),与 N-cadherin 呈负相关性 ($r = -0.182$)。见图 4。

2.4 miR-7 与 HCC 临床病理特征之间的相关性

临床病理资料分析结果表明,miR-7 在 HCC 中的表达与患者年龄、性别、HBV 感染均无相关性 ($P > 0.05$),与 TNM 分期、分化程度、血管浸润密切相关 ($P < 0.05$)。见表 1。

3 讨论

miRs 是一类具有调控功能的非编码 RNA,可靶向作用 mRNA 而参与肿瘤细胞的增殖、凋亡、分化

的调控,在肿瘤的发生发展过程中发挥着重要的生物学功能,是近年来研究肿瘤发病分子机制的热点。其中,miR-1、miR-25、miR-206、miR-375 等具有肿瘤

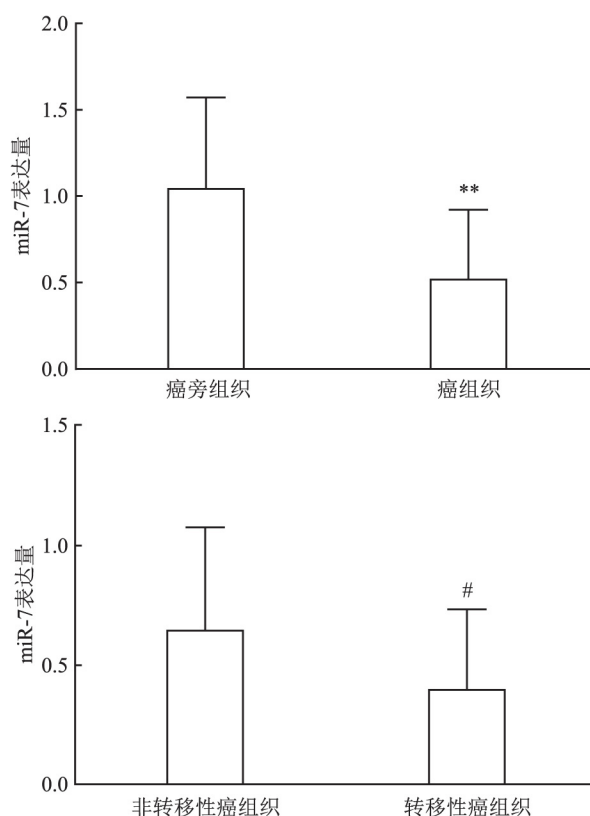


图 1 miR-7 在不同组织中的差异性表达
与癌旁组织比较: ** $P < 0.01$; 与非转移性癌组织比较: # $P < 0.05$

表 1 miR-7 与 HCC 临床病理特征之间的相关性分析

项目	n	miR-7 相对表达量	F 值	P 值
年龄(岁)				
≤40	13	1.089 ± 0.287	2.227	0.471
>40	17	1.132 ± 0.193		
性别				
男	18	1.219 ± 0.145	1.702	0.671
女	12	1.028 ± 0.214		
HBV 感染				
是	18	0.987 ± 0.109	2.156	0.902
否	12	1.118 ± 0.201		
TNM 分级				
I	6	1.032 ± 0.114		
II	8	0.687 ± 0.103	1.284	0.000
III	11	0.478 ± 0.096	3.540	0.000
IV	5	0.341 ± 0.101	2.635	0.000
分化程度				
高	8	1.128 ± 0.167		
中	13	0.598 ± 0.231	3.287	0.000
低	9	0.339 ± 0.147	2.541	0.000
血管侵犯				
无	9	1.028 ± 0.123	2.418	0.000
有	21	0.349 ± 0.108		

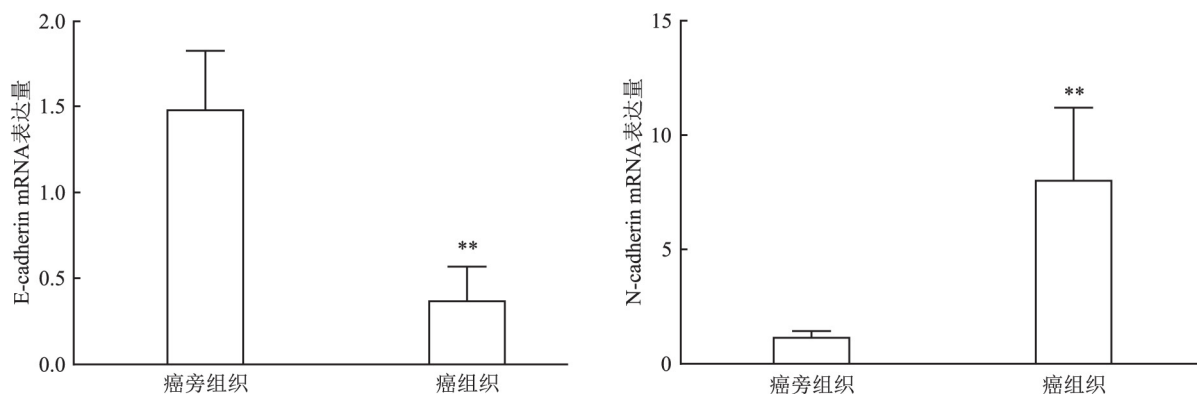


图2 E-cadherin、N-cadherin mRNA 在不同组织中的差异性表达分析
与癌旁组织比较: ** $P < 0.01$

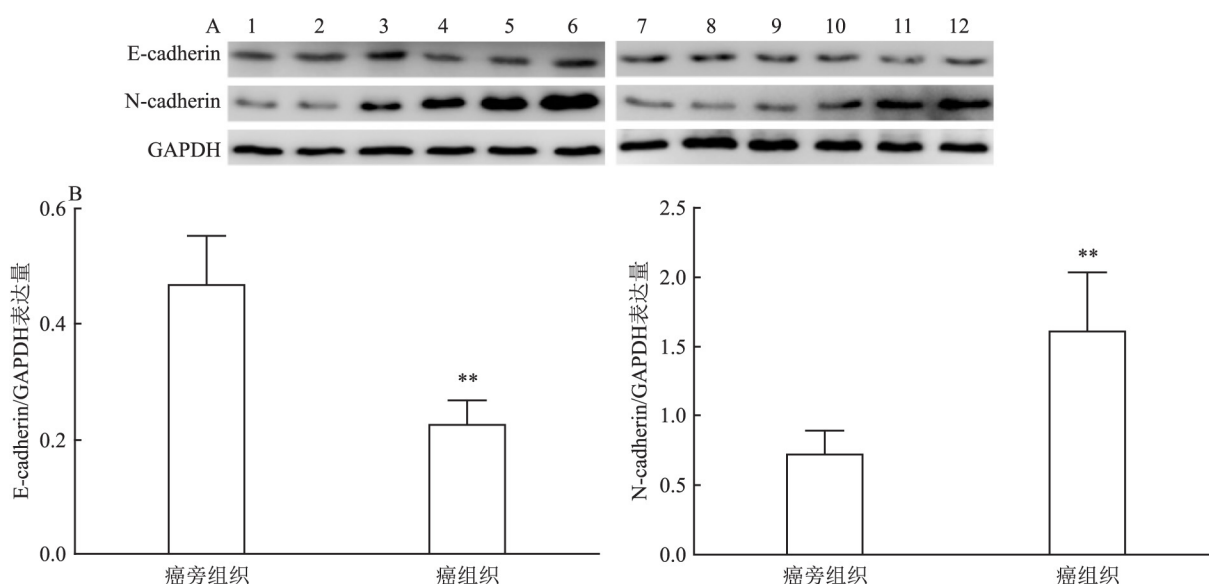


图3 E-cadherin、N-cadherin 蛋白在不同组织中的差异性表达分析
1、2、3、7、8、9: 癌旁组织; 4、5、6、10、11、12: 癌组织; 与癌旁组织比较: ** $P < 0.01$

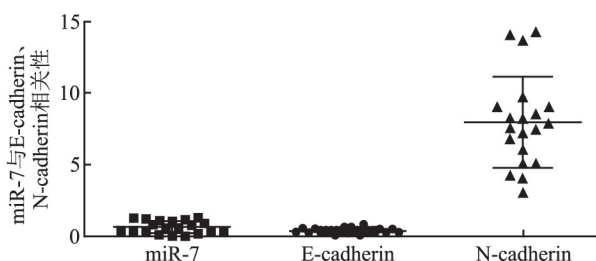


图4 miR-7 的表达与 E-cadherin、N-cadherin 分析

特异性,有可能成为检测肿瘤的血清生物学的标志物^[5-7]。研究^[8-9]表明,miR-7 具有抑癌基因特性,可抑制肺癌、结肠癌、子宫内膜癌、卵巢癌等多种肿瘤的侵袭、迁移。Webster et al^[10]研究证明,miR-7 可通过调节 EGFR 信号途径而抑制肺癌、乳腺癌和

胶质母细胞瘤等的发生发展。Wang et al^[11]研究表明,miR-7 可通过抑制癌基因电压依赖性阴离子通道 1 的表达而降低 HCC 的增殖及转移。同样,课题组前期实验研究^[9]表明,miR-7 可通过结合 EGFR 3'-UTR,抑制 EGFR 信号通路活性,进而抑制 MHCC-97H 细胞 EMT,降低 MHCC-97H 细胞侵袭、迁移能力。

EMT 是反映细胞侵袭、迁移能力的重要指标,抑制 EMT 可减弱肝癌的转移,从而提高肝癌的临床治疗效果,降低肝癌复发率。因此,本研究以 miR-7 与 HCC EMT 之间的关系为切入点,研究表明 miR-7 在 HCC 癌组织的表达水平显著低于癌旁组织($P < 0.01$),并且 miR-7 在转移性 HCC 癌组织的表达水平显著低于非转移性 HCC 癌组织($P < 0.01$),再次

证实 miR-7 的异常表达与 HCC 的发生发展具有密切相关性,其具有作为诊断 HCC 潜在指标的可能性,检测 miR-7 的表达情况对 HCC 的临床诊断、治疗及预后判断有潜在的重要意义。

然而,由于 miR-7 作用途径的多样性、作用机制的复杂性,后期将通过进行更加深入广泛的研究,进一步阐述其在 HCC 中的生物学功能,以期 HCC 的发病机制研究提供新思路。

参考文献

- [1] Wallace M C, Preen D, Jeffrey G P, et al. The evolving epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global perspective [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015, 9(6): 765–79.
- [2] Shariff M I, Cox I J, Goma A I, et al. Hepatocellular carcinoma: current trends in worldwide epidemiology, risk factors, diagnosis and therapeutics [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2009, 3(4): 353–67.
- [3] Jing W, Gao S, Zhu M, et al. Potential diagnostic value of lncRNA SPRY4-IT1 in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(2): 1085–92.
- [4] 张传海,桂阳,郭凤林,等. MicroRNA-7 对人肝癌细胞 MH-CC-97H 上皮间质转化的影响及作用机制 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 51(3): 29–34.
- [5] Mirzaei H R, Sahebkar A, Mohammadi M, et al. Circulating miRNAs in hepatocellular carcinoma: potential diagnostic and prognostic biomarkers [J]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22(34): 5257–69.
- [6] Dmitriev P, Stankevics L, Anseau E, et al. Defective regulation of microRNA target genes in myoblasts from facioscapulohumeral dystrophy patients [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(49): 34989–5002.
- [7] Guo Y H, Tang F Y, Wang Y, et al. Low concentration of formononetin promotes proliferation of estrogen receptor-positive cells through an ER α -miR-375-PTEN-ERK1/2-bcl-2 pathway [J]. *Onco-target*, 2017, 8(59): 100045–55.
- [8] Higuchi T, Todaka H, Sugiyama Y, et al. Suppression of microRNA-7(miR-7) biogenesis by nuclear factor 90-nuclear factor 45 complex(NF90-NF45) controls cell proliferation in hepatocellular carcinoma [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(40): 21074–84.
- [9] Ning B F, Ding J, Liu J, et al. Hepatocyte nuclear factor 4 α -nuclear factor- κ B feedback circuit modulates liver cancer progression [J]. *Hepatology*, 2014, 60(5): 1607–19.
- [10] Webster R J, Giles K M, Price K J, et al. Regulation of epidermal growth factor receptor signaling in human cancer cells by microRNA-7 [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(9): 5731–41.
- [11] Wang F, Qiang Y, Zhu L, et al. MicroRNA-7 downregulates the oncogene VDAC1 to influence hepatocellular carcinoma proliferation and metastasis [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(8): 10235–46.

Relationship between miR-7 and EMT and clinicopathological characteristics of hepatocellular carcinoma

Zhang Chuanhai¹, Zhang Hesong², Gui Yang¹, et al

(¹Dept General Surgery, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230001;

²Graduate School of Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the relationship between miR-7 and clinicopathological features of hepatocellular carcinoma and hepatocellular carcinoma(EMT) in epithelial mesenchymal transition(HCC) . **Methods** Real-time PCR was used to detect the expression of miR-7 in 30 HCC cancer tissues and paracancer tissues. Real-time PCR and Western blot was applied to detect the mRNA and protein expression of N-cadherin and E-cadherin. Meanwhile, the correlation between miR-7 and clinicopathological features of hepatocellular carcinoma and EMT was analyzed by SPSS 19.0. **Results** The expression levels of miR-7 and E-cadherin in cancer tissues were significantly lower than those in paracancer tissues($P < 0.01$). However, the expression of N-cadherin was significantly increased($P < 0.01$). Correlation analysis showed that miR-7 was positively correlated with E-cadherin and negatively correlated with N-cadherin. Meanwhile, the expression of miR-7 in HCC was not associated with patient age, gender, tumor location, or hepatitis virus infection, but was closely related to TNM grade, degree of differentiation and vascular invasion. **Conclusion** The expression level of miR-7 is closely related to HCC EMT. Detecting the expression of miR-7 has potential significance in clinical diagnosis, treatment and prognosis of HCC.

Key words miR-7; hepatocellular carcinoma; epithelial mesenchymal transition