

miR-224-5p 对人肝癌细胞 HepG2 增殖、凋亡、侵袭及迁移的作用机制

顾铃毓¹, 王利新^{1,2}, 崔洁², 董辉³

(¹ 宁夏医科大学总医院心脑血管病医院医学检验科, 银川 750000;

宁夏医科大学总医院² 医学实验中心、³ 医学科学研究院, 银川 750000)

摘要 目的 探讨 miR-224-5p 对人肝癌细胞 HepG2 细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移的作用机制。方法 从 TCGA 数据集获取肝癌细胞癌患者中 miR-224-5p 和早期生长反应因子 2 (*EGR2*) 的 RNA 表达水平; 体外培养人正常肝细胞 LO2 和肝癌细胞 HepG2 细胞, 并在 HepG2 细胞中转染慢病毒载体 (敲低 miR-224-5p)、小干扰 RNA 片段或过表达载体 (干扰及过表达 *EGR2*)。实时荧光定量 PCR 实验 (qPCR) 检测肝癌 cDNA 芯片及细胞中 miR-224-5p 及 *EGR2* 的 RNA 表达水平; Western blot 检测细胞中 *EGR2* 蛋白表达水平; 双荧光素酶报告基因实验检测 miR-224-5p 与 *EGR2* 结合情况; EdU 实验检测 HepG2 细胞阳性率, 流式细胞术检测细胞凋亡率, Transwell 实验检测细胞侵袭数, 划痕实验检测细胞迁移率。结果 与癌旁组织相比, HCC 组织中 miR-224-5p 表达升高, *EGR2* mRNA 水平表达下降; 与 LO2 组细胞相比, HepG2 细胞中 miR-224-5p 表达升高, *EGR2* mRNA 及蛋白表达下降; 与 Lv-sh-NC 组相比, Lv-sh-miR-224-5p 组 HepG2 细胞 24 h EdU 阳性细胞率、细胞侵袭数及 48 h 细胞迁移率降低, 细胞凋亡率增加; 与 Oe-NC 组相比, Oe-*EGR2* 组 HepG2 细胞 24 h EdU 阳性细胞率、细胞侵袭数及 48 h 细胞迁移率降低, 细胞凋亡率增加; 与 Lv-sh-NC 组相比, Lv-sh-miR-224-5p 组 *EGR2* 蛋白水平表达升高; 与 Lv-sh-miR-224-5p + si-NC 组相比, Lv-sh-miR-224-5p + si-*EGR2* 组 HepG2 细胞 24 h EdU 阳性细胞率、细胞侵袭数及 48 h 细胞迁移率升高, 细胞凋亡率下降。结论 miR-224-5p 通过与 *EGR2* 结合从而促进 HepG2 细胞增殖、侵袭和迁移, 抑制细胞凋亡。

关键词 miR-224-5p; HepG2; 增殖; 凋亡; 侵袭及迁移; 早期生长反应因子 2

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)06-1022-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.06.007

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是一种常见的肝脏原发性恶性肿瘤^[1]。尽管目前, 在 HCC 的治疗方面已取得一定进展, 但其 5 年生存率仍然很低。环境因素可诱导 DNA 甲基化、乙酰化、染色质修饰以及非编码 RNA 等发生改变, 进而引起肝脏表观基因组变化^[2]。作为一组小的非编码 RNA, microRNA (miRNA) 可通过靶向 mRNA 进而调控不同类型癌症的发生发展^[3]。研究^[4]表明 miR-224 在 HCC 组织及细胞系中表达上调。此外, 作为转录调控家族中的一员, 早期生长反应因子 2 (early growth responsive gene 2, *EGR2*) 能够介导细胞生长和分化中多个基因的表达, 且可以与多种 miRNA 结合并在不同肿瘤发挥作用^[5]。然而, miR-224-5p/*EGR2* 在 HCC 中的调控机制尚不清楚。该研究拟

探讨 miR-224-5p 是否能够通过调控 *EGR2* 进而参与 HepG2 细胞的增殖、凋亡、侵袭及迁移, 为 HCC 的发病机制提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料 HepG2 细胞购自上海细胞生物研究所; DMEM 培养基购自北京索莱宝科技有限公司; 肝癌 cDNA 芯片购自上海芯超生物科技有限公司; 流式细胞仪购自美国 Agilent 公司; 倒置相差显微镜购自日本 OLYMPUS 公司; 细胞凋亡检测试剂盒购自沈阳万类生物科技有限公司; 丝裂霉素 C 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 兔抗 *EGR2* 抗体购自美国 Affinity 公司; 兔抗 β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体购自美国 ProteinTech 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肝癌细胞 HepG2 低温保存于 -180°C 液氮中。快速取出细胞置于 37°C 水浴, 将细胞悬液置于含 10% 血清的 DMEM 培养基中, 混匀, $1\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 离心 5 min, 弃去上清液。加入培养基后重悬细胞。将细胞悬液加入培养瓶中进行培

2025-04-14 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 82002955); 宁夏自然科学基金 (编号: 2022AAC03567)

作者简介: 顾铃毓, 女, 检验技师;

董辉, 男, 助理研究员, 通信作者, E-mail: 173401951@qq.com

养。当细胞融合度达到 80% 时,消化后传代,24 h 后换液,72 h 后传代。

1.2.2 慢病毒转染及分组 将生长状态良好的 HepG2 细胞分别设置未转染组 (Control 组)、敲低对照组 (Lv-sh-NC 组)、miR-224-5p 敲低组 (Lv-sh-miR-224-5p 组) 进行培养,24 h 后根据最佳感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 值进行转染;继续转染 24 h 后,吸出含有病毒的培养基并置换新培养基;约 72 h 后,显微镜下观察转染效率,加入嘌呤霉素调整其浓度为 5 $\mu\text{g/ml}$,继续培养约 24 h,筛选存活的细胞,继续培养,进行后续实验。

1.2.3 小 RNA 片段转染及分组 针对人 *EGR2* 构建 SiRNA 及其阴性对照,过表达载体 (pCD5-ciR) 及其空载体对照,调整细胞状态后,采用 Lipofectamine 3000 试剂将 *EGR2* 干扰片段及其阴性对照,过表达载体 (pcDNA3.1-*EGR2*) 及其空载体对照分别转染对数生长期的 HepG2 细胞内,且评估转染效率。分为未转染组 (Control 组)、阴性对照组 (Si-NC 组)、SiRNA 转染组 (Si-*EGR2* 组)、过表达对照组 (Oe-NC 组) 及 *EGR2* 过表达载体组 (Oe-*EGR2* 组)。

1.2.4 生物信息学预测 采用 R 语言从癌症基因组图谱 (TCGA) 数据集 (<https://portal.gdc.com>) 获得 HCC 肿瘤的 RNA seq 数据和相应的临床信息,共纳入 374 例 HCC 病例和 50 例正常对照样本进行分析。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 实验 (quantitative real-time PCR, qPCR) 使用 TRIzol 试剂从细胞中提取总 RNA,通过 DNase I 处理纯化,并使用 PrimeScript RT reagent 反向转录成 cDNA。使用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 进行 qPCR,以 β -actin 和 *U6* 作为内参,进行荧光定量分析。qPCR 反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 、20 s,共 40 个循环。最后采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达量。

通过 qPCR 对已制备好的人肝癌 cDNA 芯片 (cDNA-HLivH30PG01) 进行 miR-224-5p 及 *U6* RNA 表达水平检测;对人肝癌 cDNA 芯片 (cDNA-HLivH60PG02) 进行 *EGR2* 及 β -actin RNA 表达水平检测。将组织 cDNA 芯片进行 3 000 r/min 离心 1 min,制备混合液后加入孔中,封板并置于冰上 15 min 后,3 000 r/min 离心 1 min,进行 qPCR 实验。qPCR 反应条件为:50 $^{\circ}\text{C}$ 、2 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min,共 40 个循环。见表 1 (miR-224-5p 和 *U6* 的引物序列由广州锐博生物技术有限公司提供,序列未公开)。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

Genes	Primer sequences
<i>EGR2</i>	F: GCTGACACGGCACATCC R: ACAGTAGTCACAGGCGAAGG
β -actin	F: GGCACCCAGCACAATGAA R: TAGAAGCATTGCGGTGG

1.2.6 Western blot 实验 提取各组细胞中的蛋白后,分离等量的蛋白质并转移到膜上,封闭 2 h 后,加入兔抗 *EGR2* 抗体 (1 : 500) 和兔抗 β -actin 抗体 (1 : 5 000) 并置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。洗膜后,与 HRP 偶联的山羊抗兔 IgG (1 : 5 000) 一起孵育 2 h,洗膜并配制化学发光液对实验结果进行曝光。对检测结果的吸光度值进行分析。计算其相对表达量。

1.2.7 EdU 实验 按实验要求对各组细胞进行转染,待转染 24 h 后,加入 10 $\mu\text{mol/L}$ EdU 染液培养箱中孵育 2 h。标记和洗涤后,甲醛固定 15 min,加入含 3% BSA 的 PBS 洗涤 2 次后,继续用 0.1 ml 含 0.5% Triton X-100 的 PBS 孵育 20 min。洗涤且加入反应液后,避光孵育 30 min。最后,用 10 $\mu\text{mol/L}$ DAPI 染色 5 min。PBS 洗涤细胞 2 次,置于荧光显微镜下采集照片。

1.2.8 细胞凋亡实验 将各组细胞调整到 5×10^5 个/ml 的密度,并培养于 6 孔板中。离心收集细胞后,洗涤并加入 500 μl 结合缓冲液重悬细胞。加入 5 μl Annexin V-FITC 混匀后,继续加入 10 μl PI,室温避光孵育 15 min。上机检测并分析凋亡率。

1.2.9 细胞划痕实验 按细胞密度 2×10^5 个/ml 接种至 6 孔板并转染,37 $^{\circ}\text{C}$ 下于 6 孔板中培养至细胞密度达 95%。在实验前将培养基换为无血清培养基并加入 1 $\mu\text{g/ml}$ 的丝裂霉素 C 处理 1 h。200 μl 枪头端划伤单层细胞。用 PBS 清洗后,将细胞置于无血清的 DMEM 中培养 48 h。0、48 h 时观察划痕生长情况。

1.2.10 细胞侵袭实验 取出 Transwell 小室放入 24 孔板中,用预先稀释好的 Matrigel 胶包被到小室膜上,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 预涂 2 h。将转染后的细胞用 DMEM 培养基 (无血清) 进行悬浮,吸取 200 μl 接种于含 Matrigel 的 Transwell 小室上室中 (5×10^4 个细胞/室)。将添加 10% 胎牛血清的 800 μl DMEM 作为化学引诱剂涂入 Transwell 板的下腔。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h 后,用棉签去除无创细胞,固定细胞 15 min,0.5% 结晶紫室温染色 30 min。随机在镜下选择 5 个视野观察,并计数。

1.2.11 双荧光素酶报告基因实验 构建野生型 (h-*EGR2*-3UTR-wt) 和突变型 (h-*EGR2*-3UTR-mut) 双荧光素酶报告基因质粒。培养 293T 细胞于 96 孔板,根据 Lipofectamine2000 转染试剂说明书进行转染。将 h-*EGR2*-3UTR-wt 或 h-*EGR2*-3UTR-mut 双荧光素酶报告基因质粒分别与 miR-224-5p mimic 或 NC mimic 共转至 293T 细胞中。转染后的细胞在 48 h 裂解,测定荧光素酶活性。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 6.0 进行统计分析。所有实验均至少重复 3 次,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,生物信息学分析 TCGA 数据库采用秩和检验,其余两组间比较采用 *t* 检验,多组间两两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 敲低 miR-224-5p 后对 HepG2 细胞生物学行为的影响 TCGA 数据库结果显示,HCC 癌组织

(6.63 ± 1.94) 中 miR-224-5p 表达高于癌旁组织 (4.03 ± 1.23),差异有统计学意义 ($U = 17.195, P < 0.001$)。qPCR 检测结果显示,与癌旁组织 (1.44 ± 0.80) 相比,HCC 组织 (6.51 ± 3.85) 中 miR-224-5p 表达升高 ($t = 3.651, P < 0.01$);与正常人肝 LO2 细胞 (1.00 ± 0.05) 相比,HepG2 细胞 (10.49 ± 0.61) 中 miR-224-5p 表达升高 ($t = 26.839, P < 0.001$)。

慢病毒转染 sh-miR-224-5p 后,EdU 实验结果显示,与 Lv-sh-NC 组相比,Lv-sh-miR-224-5p 组 HepG2 细胞 24 h EdU 阳性细胞率降低 ($P < 0.01$);流式细胞术检测结果显示,与 Lv-sh-NC 组相比,Lv-sh-miR-224-5p 组 HepG2 细胞凋亡率增加 ($P < 0.01$);Transwell 实验检测结果显示,与 Lv-sh-NC 组相比,Lv-sh-miR-224-5p 组 HepG2 细胞侵袭数下降 ($P < 0.01$);划痕实验检测结果显示与 Lv-sh-NC 组相比,Lv-sh-miR-224-5p 组 HepG2 细胞 48 h 细胞迁移率下降 ($P < 0.01$)。见图 1 A ~ D 和表 2。

2.2 miR-224-5p 靶向调控 EGR2 双荧光素酶报

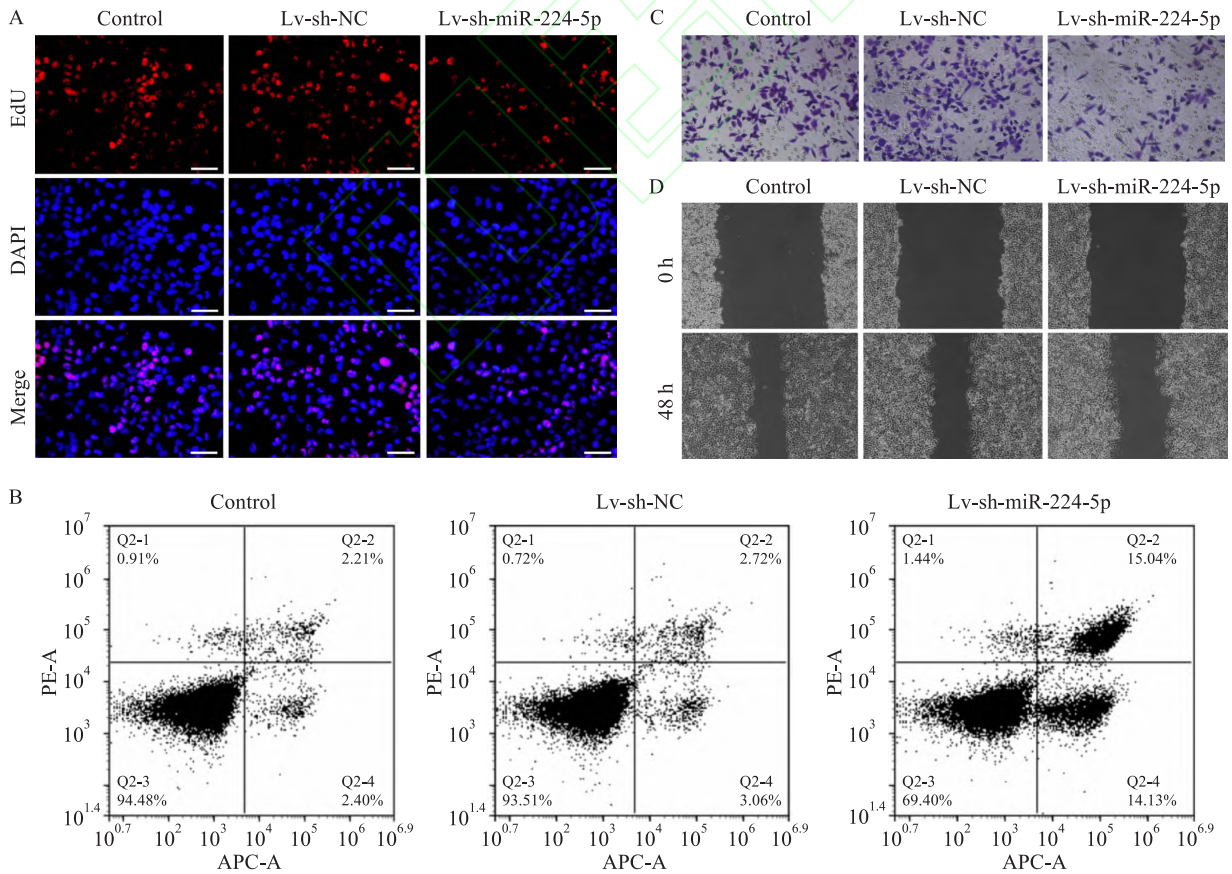


图 1 敲低 miR-224-5p 后对 HepG2 细胞增殖、凋亡、侵袭及迁移的影响

Fig. 1 Effects of interference of miR-224-5p on proliferation, apoptosis, invasion, and migration of HepG2 cells

A: The proliferation of HepG2 cells after miR-224-5p knockdown was detected by EdU $\times 400$; Red; EdU; Blue; DAPI; B: The apoptotic rate of HepG2 cells after miR-224-5p knockdown was detected by Flow cytometry; C: The invasion ability of HepG2 cells after miR-224-5p knockdown was detected by Transwell invasion assay $\times 200$; D: The migration capacity of HepG2 cells after miR-224-5p knockdown was detected by cell scratch assay $\times 100$.

表2 各组间细胞 EdU 阳性细胞率 ($n=3$)、凋亡率 ($n=3$)、侵袭数 ($n=5$) 及迁移率 ($n=3$) 比较 ($\bar{x} \pm s$)
Tab.2 Comparison of EdU ositive cell rate ($n=3$), apoptosis rate ($n=3$), invasion number ($n=5$), and mobility ($n=3$) among all groups ($\bar{x} \pm s$)

Groups	EdU positive cell rate (%)	Apoptosis rate (%)	Number of invading cells	Migratory cell rate (%)
Control	41.26 ± 1.67	5.18 ± 0.53	220.40 ± 22.81	72.69 ± 0.43
Lv-sh-NC	41.69 ± 0.97	5.01 ± 0.83	230.20 ± 30.33	71.53 ± 1.91
Lv-sh-miR-224-5p	26.84 ± 2.24 **	34.79 ± 5.09 **	107.00 ± 9.57 **	52.22 ± 0.35 **
<i>F</i> value	73.431	98.469	45.925	300.627
<i>P</i> value	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

** $P < 0.01$ vs Lv-sh-NC group

告基因实验结果表明, hsa-miR-224-5p + h-EGR2-3UTR-wt 组荧光素酶活性低于 NC mimics + h-EGR2-3UTR-wt 组 ($n=3, t=18.157, P < 0.01$); hsa-miR-224-5p + h-EGR2-3UTR-mut 组荧光素酶活性与 NC mimics + h-EGR2-3UTR-mut 组差异无统计学意义 ($n=3, t=0.110, P > 0.05$)。见图 2。

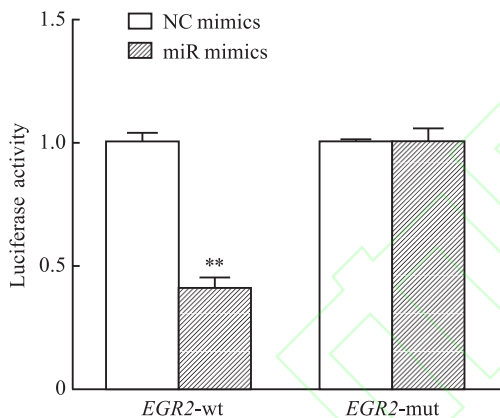


图2 双荧光素酶基因报告实验验证 miR-224-5p 和 EGR2 靶向关系
Fig.2 Dual luciferase gene reporting experiments verified the targeting relationship between miR-224-5p and EGR2

** $P < 0.01$ vs NC mimics group.

2.3 过表达 EGR2 后对 HepG2 细胞生物学行为的影响 TCGA 数据库结果显示, HCC 癌组织 (1.35 ± 1.00) 中 EGR2 表达低于癌旁组织 (2.68 ± 1.07), 差

异有统计学意义 ($U = 4.539, P < 0.001$); qPCR 和 Western blot 实验结果 (图 3) 显示, 与癌旁组织 (1.94 ± 0.92) 相比, HCC 组织 (0.92 ± 0.57) 中 EGR2 表达下降 ($t = 3.822, P < 0.01$); 与人正常肝 LO2 细胞相比, HepG2 细胞中 EGR2 mRNA [(1.00 ± 0.11) vs (0.35 ± 0.03) , $t = 10.356, P < 0.01$] 及蛋白水平 [(1.15 ± 0.10) vs (0.52 ± 0.12) , $t = 6.762, P < 0.01$] 表达下降。

过表达 EGR2 后, EdU 实验结果显示, 与 Oe-NC 组相比, Oe-EGR2 组 HepG2 细胞 24 h EdU 阳性细胞率降低 ($P < 0.01$); 流式细胞术检测结果显示, 与 Oe-NC 组相比, Oe-EGR2 组 HepG2 细胞凋亡率增加 ($P < 0.01$); Transwell 实验检测结果显示, 与 Oe-NC 组相比, Oe-EGR2 组 HepG2 细胞侵袭数下降 ($P < 0.01$); 划痕实验检测结果显示与 Oe-NC 组相比, Oe-EGR2 组 HepG2 细胞 48 h 细胞迁移率下降 ($P < 0.01$)。见表 3 和图 4 A ~ D。

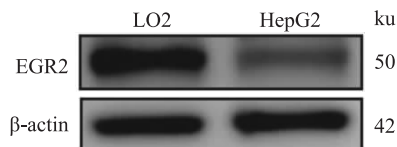


图3 Western blot 检测两组 EGR2 蛋白表达水平
Fig.3 Western blot analysis of EGR2 protein expression in both groups

表3 各组间 EdU 阳性细胞率 ($n=3$)、细胞凋亡率 ($n=3$)、侵袭数 ($n=5$) 及迁移率 ($n=3$) 比较 ($\bar{x} \pm s$)
Tab.3 Comparison of EdU positive cell rate ($n=3$), apoptosis rate ($n=3$), invasion number ($n=5$), and mobility ($n=3$) among all groups ($\bar{x} \pm s$)

Groups	EdU positive cell rate (%)	Apoptosis rate (%)	Number of invading cells	Migratory cell rate (%)
Control	51.27 ± 4.65	5.07 ± 0.58	223.40 ± 25.61	71.25 ± 0.45
Oe-NC	50.02 ± 1.83	5.21 ± 0.41	220.00 ± 34.87	71.01 ± 1.94
Oe-EGR2	30.87 ± 3.99 **	34.27 ± 4.04 **	89.60 ± 12.28 **	55.31 ± 2.41 **
<i>F</i> value	28.795	151.403	43.160	76.713
<i>P</i> value	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

** $P < 0.01$ vs Oe-NC group.

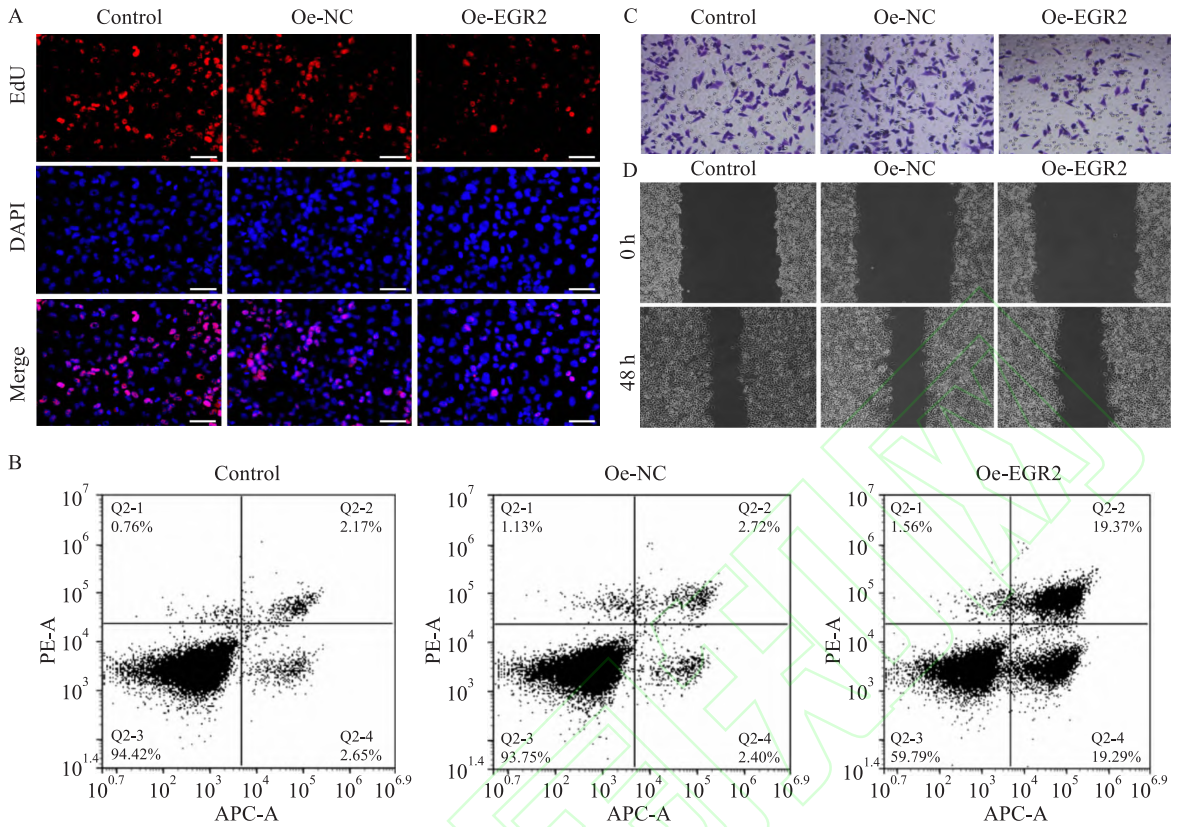


图4 过表达 EGR2 后对 HepG2 细胞增殖、凋亡、侵袭及迁移的影响

Fig.4 Effects of overexpression of EGR2 on proliferation, apoptosis, invasion, and migration of HepG2 cells

A: The proliferation of HepG2 cells after EGR2 overexpression was detected by EdU × 400; Red: EdU; Blue: DAPI; B: The apoptotic rate of HepG2 cells after EGR2 overexpression was detected by flow cytometry; C: The invasion ability of HepG2 cells after overexpression of EGR2 was detected by Transwell invasion assay × 200; D: The migration ability of HepG2 cells after overexpression of EGR2 was detected by cell scratch assay × 100.

2.4 miR-224-5p 通过 EGR2 对 HepG2 细胞生物学行为的影响 Western blot 实验结果表明,与 Lv-sh-NC 组相比, Lv-sh-miR-224-5p 组 EGR2 蛋白水平表达升高 ($P < 0.01$); 与 Lv-sh-miR-224-5p + si-NC 组相比, Lv-sh-miR-224-5p + si-EGR2 组 EGR2 蛋白表达水平下降 ($P < 0.01$)。见表 4 和图 5。

EdU 实验结果显示,与 Lv-sh-miR-224-5p + si-NC 组相比, Lv-sh-miR-224-5p + Si-EGR2 组 HepG2 细胞 24 h EdU 阳性细胞率升高 ($P < 0.05$); 流式细胞术检测结果显示,与 Lv-sh-miR-224-5p + si-NC 组相比, Lv-sh-miR-224-5p + si-EGR2 组 HepG2 细胞凋亡率下降 ($P < 0.01$); Transwell 实验检测结果显示,与 Lv-sh-miR-224-5p + si-NC 组相比, Lv-sh-miR-224-5p + si-EGR2 组 HepG2 细胞侵袭数升高 ($P < 0.01$); 划痕实验检测结果显示与 Lv-sh-miR-224-5p + si-NC 组相比, Lv-sh-miR-224-5p + si-EGR2 组 HepG2 细胞 48 h 迁移率升高 ($P < 0.01$)。见图 6A ~ D 和表 4。

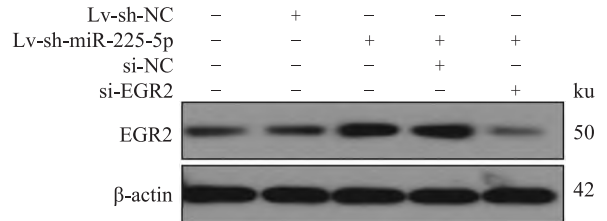


图5 Western blot 检测各组 EGR2 蛋白表达水平

Fig.5 Western blot results showed EGR2 protein expression in each group

3 讨论

近年来,转录后基因调控在肿瘤发生和发展中的作用已经得到进一步认识。虽然转录激活和抑制能够影响细胞中的 mRNA 水平,但转录后机制最终决定翻译成蛋白质的可能性^[6]。这其中包括 RNA 结合蛋白对 RNA 稳定性的控制以及 miRNAs 的调控等^[7]。miRNAs 已被证明通过降解 mRNA 或抑制基因的翻译从而调节肿瘤的发生^[8]。其中,多种癌

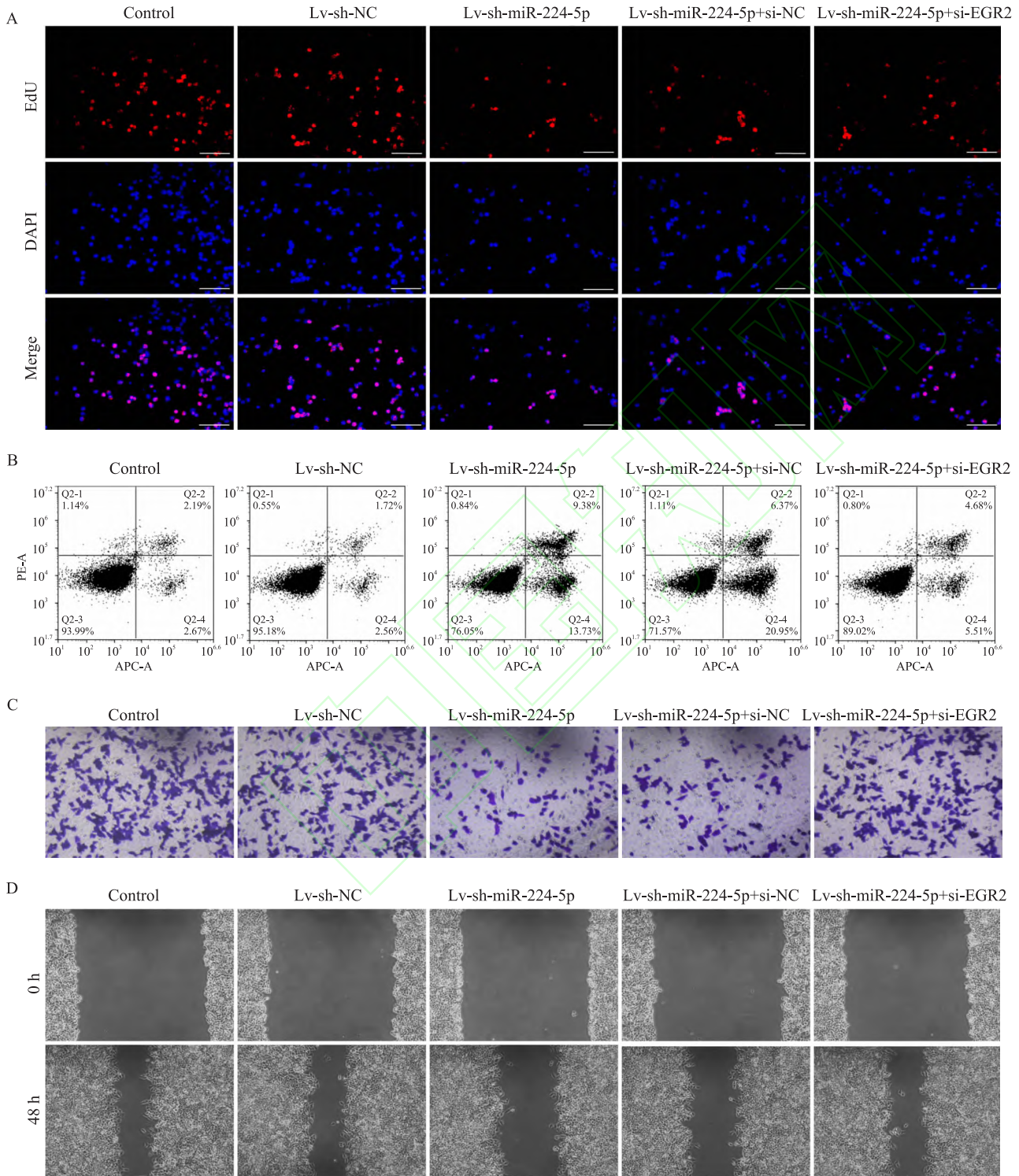


图 6 miR-224-5p 通过 EGR2 对 HepG2 细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移的影响

Fig. 6 Effects of miR-224-5p on proliferation, apoptosis, invasion, and migration of HepG2 cells through EGR2

A: The effect of miR-224-5p on the proliferation of HepG2 cells through EGR2 was detected by EdU × 200; Red: EdU; Blue: DAPI; B: The effect of miR-224-5p on apoptosis of HepG2 cells through EGR2 was detected by flow cytometry; C: The invasion ability of miR-224-5p on HepG2 cells through EGR2 was detected by Transwell invasion assay × 200; D: The migration ability of miR-224-5p on HepG2 cells through EGR2 was detected by cell scratch assay × 100.

表4 各组间 EGR2 蛋白水平 ($n=3$)、EdU 细胞阳性率 ($n=3$)、细胞凋亡率 ($n=3$)、侵袭数 ($n=5$) 及迁移率 ($n=3$) 比较 ($\bar{x} \pm s$)Tab.4 Comparison of EGR2 protein expression levels ($n=3$), EdU positive cell rate ($n=3$), apoptosis rate ($n=3$), invasion number ($n=5$), and mobility ($n=3$) in intergroup cells ($\bar{x} \pm s$)

Groups	EGR2 protein levels	EdU positive cell rate (%)	Apoptosis rate (%)	Number of invading cells	Migratory cell rate (%)
Control	0.34 ± 0.08	44.57 ± 3.13	4.70 ± 0.52	222.70 ± 15.53	72.00 ± 1.72
Lv-sh-NC	0.33 ± 0.07	42.35 ± 6.72	4.62 ± 0.37	227.07 ± 29.28	70.98 ± 0.75
Lv-sh-miR-224-5p	0.58 ± 0.11 **	28.77 ± 1.83 **	23.11 ± 0.97 **	110.33 ± 8.86 **	54.83 ± 0.74 **
Lv-sh-miR-224-5p + si-NC	0.54 ± 0.09	26.80 ± 1.53	25.90 ± 1.24	107.30 ± 8.73	56.06 ± 1.35
Lv-sh-miR-224-5p + si-EGR2	0.23 ± 0.05 ^{##}	35.38 ± 4.20 [#]	8.96 ± 1.07 ^{##}	202.36 ± 21.22 ^{##}	68.30 ± 1.10 ^{##}
F value	10.251	11.969	394.380	41.437	97.631
P value	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

** $P < 0.01$ vs Lv-sh-NC group; [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ vs Lv-sh-miR-224-5p + si-NC group.

症中发现 miR-224 异常表达。miR-224 在胃癌、HCC 等癌症中表达上调。然而,在乳腺癌、前列腺癌等癌症中检测到 miR-224 的下调^[9-10]。因此,miR-224 可成为基于 miRNA 诊疗癌症的一个潜在靶点。本研究结果显示,miR-224-5p 在 HCC 组织及 HepG2 细胞中表达上调,提示 miR-224-5p 的表达与 HCC 进展有关。敲低 miR-224-5p 后,EdU 实验、流式细胞术、Transwell 侵袭实验和划痕实验显示 HepG2 细胞增殖、侵袭、迁移能力下降,细胞凋亡升高,表明 miR-224-5p 能够促进 HepG2 细胞增殖、侵袭、迁移,抑制细胞凋亡。

本研究中双荧光素酶报告实验证实 miR-224-5p 与 EGR2 能够结合。EGR2 广泛存在于肿瘤及免疫疾病发生发展的多个环节中。其主要参与调控细胞凋亡、分化、细胞周期等细胞生物学功能^[11]。NFAT2 通过上调 EGR2、FasL,进而诱导细胞凋亡,抑制 HepG2 细胞的侵袭和迁移^[12];miR-17-5p 能够通过抑制甲状腺癌细胞中的 EGR2 来减少细胞生长和转移^[13];同时,Zang et al^[10] 研究表明 miR-224-5p 与 EGR2 结合促进甲状腺癌中的细胞迁移、侵袭和 EMT。本研究结果显示,EGR2 在 HCC 组织及 HepG2 细胞中表达下调。此外,过表达 EGR2 后,研究结果表明,HepG2 细胞增殖、侵袭、迁移能力下降,细胞凋亡升高,提示 EGR2 能够参与 HCC 的发生发展。另外,本研究后续细胞功能实验显示,干扰 EGR2 可部分逆转敲低 miR-224-5p 对 HepG2 细胞增殖、侵袭迁移的抑制及对细胞凋亡的促进作用,进而表明 miR-224-5p 促进 HepG2 细胞增殖、侵袭、迁移能力及抑制细胞凋亡作用与 EGR2 有关。

综上所述,miR-224-5p 能够通过 EGR2 结合进而促进 HepG2 细胞增殖,侵袭和细胞迁移能力,抑制细胞凋亡。HCC 进展过程中的表达网络主要

由调节多个癌基因和肿瘤抑制因子的 miRNA 控制。因此,miRNA 本身的表达谱能够作为有价值的生物标志物,无论是在诊断、评估转移、预测治疗反应或复发和总生存率^[14]等方面。

参考文献

- [1] 严洪遥, 劳远翔, 孙倍成. UROCI 在肝细胞癌中的表达及对肿瘤发生的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(8): 1339-46. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.08.008.
- [1] Yan H Y, Lao Y X, Sun B C. Expression of UROCI in hepatocellular carcinoma and its effect on tumor development [J]. Acta Univ Med Anhui, 2024, 59(8): 1339-46. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.08.008.
- [2] Nagaraju G P, Dariya B, Kasa P, et al. Epigenetics in hepatocellular carcinoma [J]. Semin Cancer Biol, 2022, 86: 622-32. doi:10.1016/j.semcancer.2021.07.017.
- [3] Uzuner E, Ulu G T, Gürler S B, et al. The role of MiRNA in cancer: pathogenesis, diagnosis, and treatment [J]. Methods Mol Biol, 2022, 2257: 375-422. doi:10.1007/978-1-0716-1170-8_18.
- [4] Wang Y, Toh H C, Chow P, et al. microRNA-224 is up-regulated in hepatocellular carcinoma through epigenetic mechanisms [J]. FASEB J, 2012, 26(7): 3032-41. doi:10.1096/fj.11-201855.
- [5] Liu X, Shi H, Liu B, et al. miR-330-3p controls cell proliferation by targeting early growth response 2 in non-small-cell lung cancer [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2015, 47(6): 431-40. doi:10.1093/abbs/gmv032.
- [6] Vilimova M, Pfeffer S. Post-transcriptional regulation of polycistronic microRNAs. Wiley Interdiscip Rev RNA. 2023 Mar; 14(2): e1749. doi: 10.1002/wrna.1749.
- [7] Iacona J R, Lutz C S. miR-146a-5p: expression, regulation, and functions in cancer [J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2019, 10(4): e1533. doi:10.1002/wrna.1533.
- [8] Hussen B M, Hidayat H J, Salihi A, et al. microRNA: a signature for cancer progression [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 138: 111528. doi:10.1016/j.biopha.2021.111528.
- [9] Takahashi S, Takagane K, Itoh G, et al. CCDC85A is regulated

by miR-224-3p and augments cancer cell resistance to endoplasmic reticulum stress[J]. *Front Oncol*, 2023, 13:1196546. doi: 10.3389/fonc.2023.1196546.

- [10] Zang C S, Huang H T, Qiu J, et al. miR-224-5p targets EGR2 to promote the development of papillary thyroid carcinoma[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(9): 4890 – 900. doi:10.26355/eurrev_202005_21178.
- [11] Du G, Wang X, Wu Y, et al. Downregulation of miR-140-5p affects the pathogenesis of HSCR by targeting EGR2[J]. *Pediatr Surg Int*, 2020, 36(8): 883 – 90. doi:10.1007/s00383-020-04686-0.
- [12] Wang J, Zhang Y, Liu L, et al. NFAT2 overexpression suppresses

the malignancy of hepatocellular carcinoma through inducing Egr2 expression[J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 966. doi:10.1186/s12885-020-07474-0.

- [13] Geng X, Sun Y, Fu J, et al. microRNA-17-5p inhibits thyroid cancer progression by suppressing early growth response 2 (EGR2)[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 2713 – 22. doi:10.1080/21655979.2021.1935137.
- [14] Roy B, Ghose S, Biswas S. Therapeutic strategies for miRNA delivery to reduce hepatocellular carcinoma[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2022, 124: 134 – 44. doi:10.1016/j.semcdb.2021.04.006.

The mechanism of miR-224-5p on proliferation, apoptosis, invasion, and migration of human hepatoma cells HepG2

Gu Lingyu¹, Wang Lixin^{1,2}, Cui Jie², Dong Hui³

(¹Dept of Clinical Laboratory, Cardio-Cerebrovascular Hospital, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750000; ²Laboratory Medical Center, ³Institute of Medical Sciences, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750000)

Abstract Objective To investigate the mechanism of miR-224-5p on proliferation, apoptosis, invasion and migration of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **Methods** The RNA expression levels of miR-224-5p and early growth responsive gene 2 (*EGR2*) in patients with hepatocellular carcinoma were obtained from the TCGA dataset. Normal human hepatocytes LO2 and hepatoma cells HepG2 were cultured *in vitro*, and the HepG2 cells were transfected with lentiviral vectors (knockdown of miR-224-5p), small interfering RNA fragments or overexpression vectors (interference and overexpression of *EGR2*). The expression levels of miR-224-5p and *EGR2* in hepatocellular carcinoma cDNA chips and cells were detected by quantitative real-time PCR (qPCR). The expression level of *EGR2* protein was detected by Western blot. Dual luciferase reporter gene assay was used to detect the binding of miR-224-5p to *EGR2*. HepG2 cells positive rate were detected by EdU assay, apoptosis rate was detected by flow cytometry, cell invasion number was detected by Transwell assay, and cell mobility was detected by scratch assay. **Results** Compared with paracancerous tissues, the expression of miR-224-5p was increased and the expression of *EGR2* mRNA decreased in HCC tissues. Compared with LO2 group, the expression of miR-224-5p in HepG2 cells increased, and the expression of *EGR2* mRNA and protein decreased. Compared with the Lv-sh-NC group, the 24 h EdU positive cell rate, cell invasion number, and 48 h cell mobility of HepG2 cells in the Lv-sh-miR-224-5p group decreased, while the apoptosis rate increased. Compared with Oe-NC group, 24 h EdU positive cell rate, cell invasion number, and 48 h cell mobility of HepG2 cells in Oe-*EGR2* group decreased, while apoptosis rate increased. Compared with Lv-sh-NC group, the expression of *EGR2* protein in Lv-sh-miR-224-5p group increased. Compared with Lv-sh-miR-224-5p + si-NC group, 24 h EdU positive cell rate, cell invasion rate, and 48 h cell mobility of HepG2 cells in Lv-sh-miR-224-5p + si-*EGR2* group increased, while apoptosis number decreased. **Conclusion** miR-224-5p can promote proliferation, invasion, and migration of HepG2 cells and inhibit apoptosis *via* binding with *EGR2*.

Key words miR-224-5p; HepG2; proliferation; apoptosis; invasion and migration; early growth responsive gene 2

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82002955); Natural Science Foundation of Ningxia Hui Autonomous Region (No. 2022AAC03567)

Corresponding author Dong Hui, E-mail: 173401951@qq.com