

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.03.002

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.03.002>

MiR-325-3p 通过靶向 PBOV1 抑制人肝癌细胞增殖、 迁移和侵袭

马沛, 李连海, 刘甫

(南阳市第一人民医院普外一科, 河南 南阳 473010)

[摘要] 目的: 研究miR-325-3p抑制肝癌细胞增殖和转移的作用以及其作用靶点。方法: 通过qRT-PCR方法研究肝癌组织以及肝癌细胞中miR-325-3p的表达情况。肝癌细胞HepG2转染miR-325-3p mimic后, 通过CCK-8和Transwell法研究miR-325-3p对肝癌细胞HepG2增殖和转移的影响。通过双荧光素实验研究miR-325-3p的作用靶点。通过CCK-8和Transwell实验验证miR-325-3p与PBOV1相互作用调控HepG2细胞增殖与迁移。结果: 肝癌组织和肝癌细胞中miR-325-3p表达量明显低于癌旁正常组织或正常肝细胞。miR-325-3p-mimic可显著抑制HepG2细胞增殖、侵袭和迁移。PBOV1是miR-325-3p的靶基因。与转染miR-325-3p-mimic+Lenti-Con比较, 转染miR-325-3p-mimic+Lenti-PBOV1的HepG2细胞增殖、迁移与侵袭增强。结论: MiR-325-3p通过靶向结合PBOV1来抑制肝癌细胞增殖和转移。

[关键词] miR-325-3p; 肝癌; PBOV1

MiR-325-3p inhibits proliferation, migration and invasion of human hepatocellular carcinoma cells by targeting PBOV1

MA Pei, LI Lianhai, LIU Fu

(Department of General Surgery, Nanyang First People's Hospital, Nanyang Henan 473010, China)

Abstract **Objective:** To study the inhibitory effect of miR-325-3p on proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma cells and its target gene. **Methods:** The expressions of miR-325-3p in hepatocellular carcinoma tissues and hepatocellular carcinoma cells were studied by RT-qPCR. After transfection with miR-325-3p mimic into hepatocellular carcinoma cells HepG2, the effects of miR-325-3p on the proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma were studied by CCK-8 and Transwell assays. The target gene of miR-325-3p was studied by double fluorescein assay. The interaction between miR-325-3p and PBOV1 was proved to regulate the proliferation and migration of HepG2 cells by CCK-8 and Transwell assays. **Results:** The expressions of miR-325-3p in hepatocellular carcinoma tissues and hepatocellular carcinoma cells were significantly lower than that

收稿日期 (Date of reception): 2019-06-12

通信作者 (Corresponding author): 马沛, Email: mapei2356@sohu.com

in adjacent normal tissues or normal hepatocytes. MiR-325-3p-mimic could significantly inhibit cell proliferation, invasion and migration of HepG2 cells. PBOV1 was a target gene of miR-325-3p. Compared with transfection with miR-325-3p-mimic+Lenti-Con, the proliferation, invasion and migration of HepG2 cells were increased in transfection with miR-325-3p-mimic+Lenti-PBOV1. **Conclusion:** MiR-325-3p inhibits proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma cells by targeting PBOV1.

Keywords miR-325-3p; hepatocellular carcinoma; PBOV1

肝癌是发生于肝脏的恶性肿瘤,分为原发性和继发性两大类^[1]。原发性肝癌起源于肝脏上皮或间叶组织,其具体分子机制仍未完全阐明。慢性炎症、病毒感染、肥胖、酗酒和糖尿病是肝癌的危险因素^[2-3]。临床对于原发性肝癌的治疗策略包括手术切除或原位肝移植,然而大多数患者的总体预后仍然很差,两年内术后复发或转移发生率达50%,5年内高达75%~100%^[4]。近年来,越来越多的证据^[5-6]表明miRNAs在肝癌的发生与进展中起重要作用。

本实验主要通过RT-qPCR方法研究肝癌组织以及肝癌细胞中miR-325-3p的表达情况,并通过CCK-8, Transwell, 双荧光素实验和蛋白质印迹法研究miR-325-3p对肝癌细胞增殖和转移的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

胎牛血清(FBS)和DMEM培养基购于浙江天杭生物科技股份有限公司; Lipofectamine 2000试剂购自美国Invitrogen公司; miR-325-3p-mimic、miR-NC、U6引物、miR-325-3p引物、Lenti-PBOV1、Lenti-Con、双荧光素酶基因报告分析试剂盒和野生型与突变型(Mut)PBOV1载体购自上海吉玛制药技术有限公司; RNA反转录试剂盒、Taq PCR Master Mix试剂盒和iQ™SYBR Green Supermix试剂盒购自美国Bio-Rad公司; CCK-8活细胞计数试剂盒和BCA试剂盒购自广州赖德生物技术有限公司; Transwell小室(8 μm孔径)购自美国Corning公司。PBOV1抗体购自美国Abcam公司。

1.2 组织收集

收集30例行肝癌切除术的原发性II期肝癌患者癌组织和距离癌浸润边缘2.5 cm的癌旁组织(经病理科确认为正常肝组织),样本获得后快速储存于-80 ℃。所有患者术前均知情同意,本研究通过南

阳市第一人民医院医学伦理委员会批准。

1.3 细胞培养

人正常肝细胞L-02、肝癌细胞系HepG2和SMMC-7721购自美国ATCC细胞库,并在37 ℃, 5% CO₂条件下接种在含有10% FBS的DMEM培养基中培养。在对数生长期时,收集细胞,用于后续实验。

1.4 MiR-325-3p-mimic 转染

根据说明书步骤,通过Lipofectamine 2000将miR-325-3p-mimic以及miR-NC分别转染至HepG2细胞。待细胞转染48 h后,收集细胞,用于后续实验。

1.5 Lenti-PBOV1 感染

采用携带PBOV1的慢病毒感染已稳定转染miR-325-3p-mimic的HepG2细胞。根据说明书步骤,分别对已稳定转染miR-325-3p-mimic的HepG2细胞进行感染Lenti-PBOV1和Lenti-Con。待细胞感染48 h后,收集细胞,用于后续实验。

1.6 qRT-PCR

从肝癌组织、癌旁组织及肝癌细胞中以TRIzol试剂提取总RNA,通过RNA反转录试剂盒反转录成cDNA,在Taq PCR Master Mix中添加引物,以cDNA作为qPCR的模板,在iQ™SYBR Green Supermix体系中进行RT-qPCR,采用2^{-ΔΔCt}法计算相对表达水平。

1.7 CCK-8 实验

分别收集3000个HepG2细胞和已转染miR-325-3p-mimic, miR-NC, miR-325-3p-mimic + Lenti-PBOV1和miR-325-3p-mimic+Lenti-Con的HepG2细胞,重悬浮后接种在96孔板,分别培养1~4 d。达到实验节点时,每孔加入10 μL CCK-8

溶液, 在培养箱内孵育2 h, 随后用酶标仪测定在450 nm处的吸光度值。

1.8 细胞迁移和侵袭实验

细胞侵袭实验: 分别收集HepG2细胞和已转染miR-325-3p-mimic, miR-NC, miR-325-3p-mimic + Lenti-PBOV1和miR-325-3p-mimic+Lenti-Con的HepG2细胞, 用无血清培养基重悬浮后, 取100 μ L含5 000个细胞的悬液接种在Matrigel包被的Transwell上室上膜面。将600 μ L含有10% FBS的培养基置于下室。于37 $^{\circ}$ C培养24 h后, 擦除Transwell上室上膜面细胞, 4%多聚甲醛固定上室下膜面细胞, 随后用0.1%结晶紫染色观察, 随机选择5个视野计数。除上述细胞直接接种于Transwell上室上膜面外, 细胞迁移实验步骤与方法同细胞侵袭实验。

1.9 蛋白质印迹

取对数生长期HepG2和正常肝细胞L-02细胞, 用RIPA裂解液裂解取全蛋白。肝癌组织和癌旁组织匀浆后, 再以RIPA裂解液裂解取全蛋白。利用BCA试剂盒将蛋白样品统一定量后, 再进行SDS-PAGE电泳。电泳后, 将电泳分离的蛋白电转移至PVDF膜。5%脱脂牛奶室温下封闭PVDF膜1 h。在4 $^{\circ}$ C条件下, 用1:1 000的稀释的一抗PBOV1孵育PVDF膜过夜。第2天TBST洗涤后在室温下孵育HRP标记的二抗1 h, 以TBST洗涤后, ECL显影, Quantity One 软件分析条带的灰度值。

1.10 双荧光素酶基因报告分析

取对数生长期细胞接种于12孔板中, 通过Lipofectamin 2000辅助转染miR-325-3p-mimic, 空白对照(NC)和/或野生型与突变型(Mut)PBOV1载体荧光素酶报告基因质粒。48 h后更换培养基并清洗细胞, 加入PLB裂解液置摇床30 min。将上清液转移至96孔酶标板中, 加入100 μ L荧光素酶检测试剂II, 检测荧光素酶反应强度。

1.11 统计学处理

采用SPSS 20.0软件进行数据分析。计量资料用均数 \pm 标准误(mean \pm SEM)表示, 组间比较采用*t*检验; 不同组别和不同时间CCK-8测量的OD值的比较采用两因素方差分析; 其余多组之间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MiR-325-3p 在肝癌组织以及肝癌细胞中的表达情况

与癌旁正常肝组织相比, 肝癌组织中miR-325-3p表达明显降低($t=3.135$, $P=0.004$, 图1A)。MiR-325-3p在人正常肝细胞L-02与肝癌细胞系HepG2和SMMC-7721中表达方差齐($F=78.452$, $P < 0.001$); 与L-02细胞相比, 肝癌细胞系HepG2和SMMC-7721中miR-325-3p表达也明显降低(均 $P < 0.001$, 图1B)。

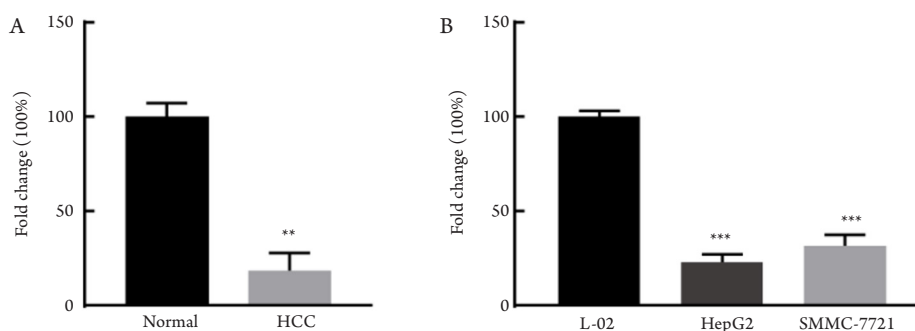


图1 MiR-325-3p在肝癌组织以及肝癌细胞中的表达情况

Figure 1 Expression of miR-325-2p in hepatocellular carcinoma tissues and hepatocellular carcinoma cells

(A) MiR-325-3p在肝癌组织和正常肝组织中的表达情况。 $n=30$, 与正常肝组织比较, $**P < 0.01$; (B) miR-325-3p在L-02, HepG2和SMMC-7721细胞中的表达情况。 $n=3$, 与L-02细胞比较, $***P < 0.001$ 。

(A) The expression of miR-325-2p in hepatocellular carcinoma and normal liver tissues. $n=30$, $**P < 0.01$ vs Normal tissues. (B) The expression of miR-325-2p in L-02, HepG2 and SMMC-7721 cells. $n=3$, $***P < 0.001$ vs L-02 cells.

2.2 MiR-325-3p 对肝癌细胞增殖以及侵袭和迁移能力的影响

与转染 miR-NC 的 HepG2 细胞相比, 转染 miR-325-3p-mimic 的 HepG2 细胞分别在第 2, 3, 4 天时 450 nm 处 OD 值明显降低 ($P=0.32$,

$P=0.007$, $P=0.004$; 图 2A)。Transwell 实验结果显示: 与转染 miR-NC 的 HepG2 细胞相比, 转染 miR-325-3p-mimic 的 HepG2 细胞侵袭 ($t=15.734$, $P<0.001$, 图 2B) 和迁移 ($t=8.654$, $P=0.023$, 图 2C) 细胞数明显减少。

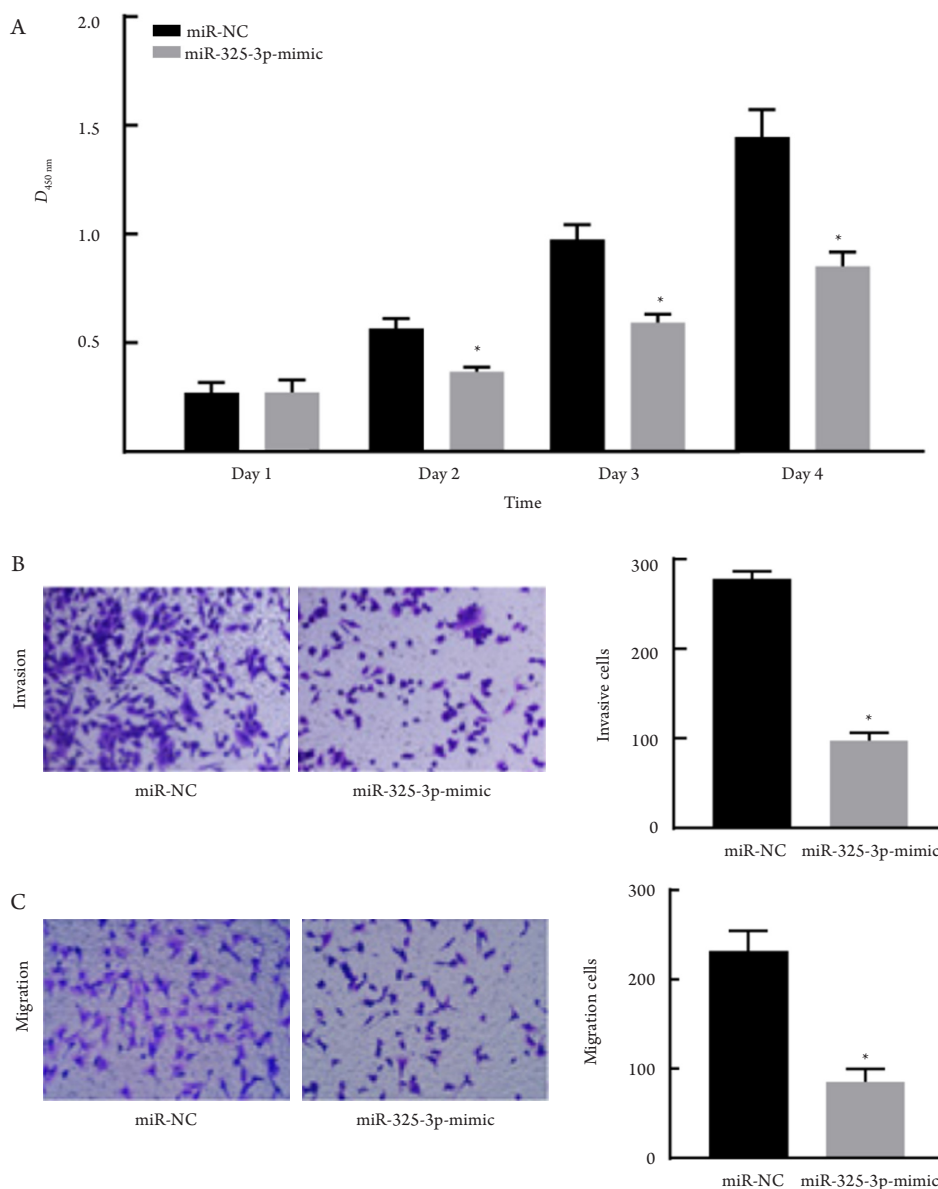


图2 MiR-325-3p对HepG2细胞增殖以及侵袭和迁移能力的影响

Figure 2 Effects of miR-325-3p on proliferation, invasion and migration of HepG2 cells

(A) CCK-8 实验中的 OD 值; (B) 细胞侵袭的 Transwell 实验结果与统计 ($\times 200$); (C) 细胞迁移的 Transwell 实验结果与统计 ($\times 200$)。 $n=3$, 与 miR-NC 组比较, $*P<0.05$ 。

(A) OD value in CCK-8 experiment; (B) Transwell experiment results and statistics of cell invasion ($\times 200$); (C) Transwell experiment results and statistics of cell migration ($\times 200$). $n=3$, $*P<0.05$ vs miR-NC.

2.3 MiR-325-3p 与 PBOV1 的靶向关系

与肝正常组织比较, 肝癌组织中PBOV1蛋白表达均异常增高($t=23.302$, $P<0.001$); 与L-02细胞比较, HepG2细胞中PBOV1蛋白表达也异常增高($t=19.875$, $P<0.001$, 图3A)。TargetScan在线软件筛选了miR-325-3p的潜在靶点, 发现PBOV1为其潜在靶点之一(图3B)。双荧光素酶报告实验检测了转染miR-325-3p-mimic野生型(WT)以及突变型(Mut)PBOV1的HepG2细胞中相对荧光素酶活性, 结果显示: 在WT组中, 转染miR-153-3p-mimic的PBOV1相对荧光素酶活性显著降低($t=13.726$, $P<0.001$); 而在Mut组中, 荧光素酶活性差异无统计学意义($t=0.215$, $P=0.849$,

图3B)。通过蛋白质印迹法检测转染miR-153-3p-mimic的HepG2细胞的PBOV1蛋白表达明显降低($t=22.124$, $P<0.001$, 图3C)。

2.4 MiR-325-3p 通过靶向 PBOV1 影响 HepG2 细胞增殖和转移

CCK-8结果显示: 与miR-325-3p-mimic+Lenti-Con组相比, miR-325-3p-mimic+Lenti-PBOV1组的HepG2细胞增殖能力在转染后第2, 3, 4天显著升高($P=0.042$, $P=0.008$, $P=0.004$, 图4A)。Thranswell实验结果显示: 与miR-325-3p-mimic+Lenti-Con组比较, miR-325-3p-mimic+Lenti-PBOV1组的HepG2细胞侵袭与迁移明显增加(图4B)。

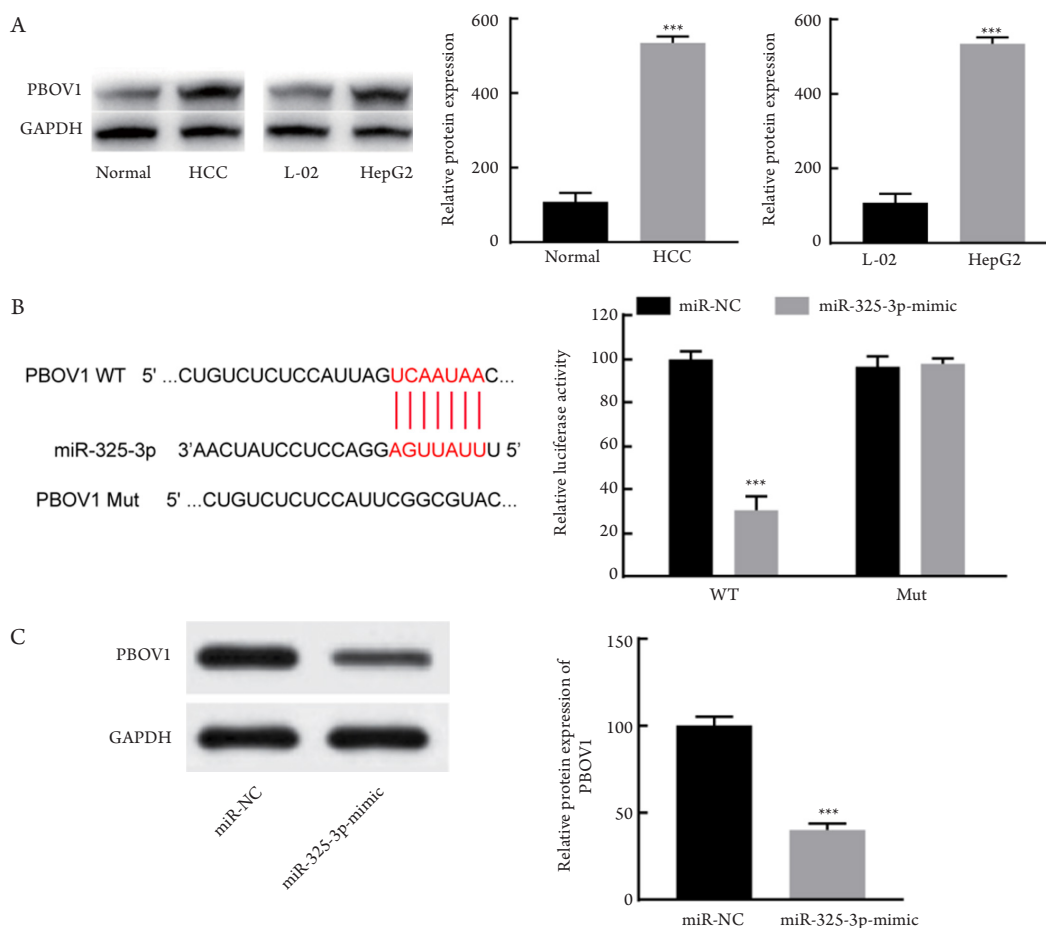


图3 MiR-325-3p与PBOV1的靶向关系

Figure 3 Targeting relationship between microRNA-325-3p and PBOV1

(A) PBOV1蛋白在肝癌组织和HepG2细胞中的表达情况; (B) TargetScan筛选结果和双荧光素酶检测结果; (C) 转染miR-153-3p-mimic后, 蛋白质印迹法检测PBOV1蛋白表达。n=3, 与肝正常组织或L-02细胞或WT + miR-NC比较, *** $P<0.001$ 。

(A) PBOV1 protein expression in hepatocellular carcinoma tissues and HepG2 cells; (B) TargetScan screening results and dual-luciferase test results; (C) After transfection with miR-153-3p-mimic, the protein expression of PBOV1 was detected by Western blot. n=3, *** $P<0.001$ vs Normal tissues or L-02 cells or WT + miR-NC.

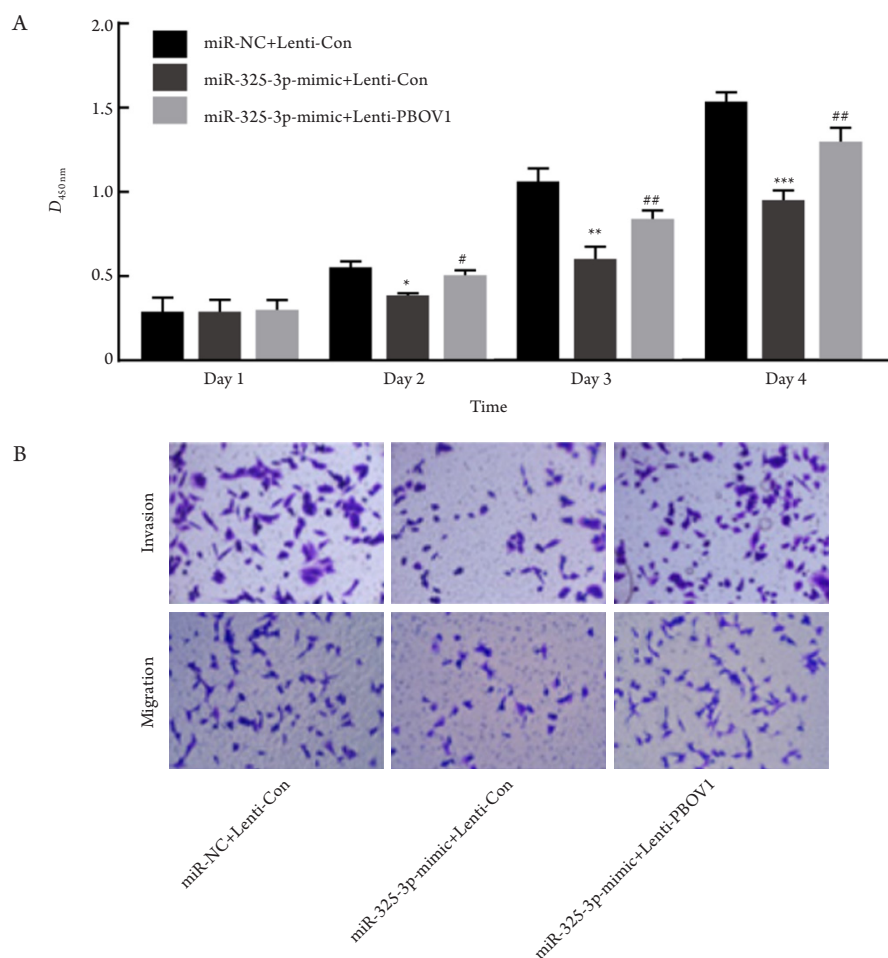


图4 MiR-325-3p通过靶向PBOV1影响HepG2细胞增殖和转移

Figure 4 MiR-325-3p affects proliferation and metastasis of HepG2 cells by targeting PBOV1

(A)CCK-8结果; (B)细胞侵袭和迁移的Transwell实验($\times 200$)。n=3, 与miR-NC+Lenti-Con比较, * $P<0.05$; 与miR-325-3p-mimic+Lenti-Con比较, # $P<0.05$ 。

(A) Results of CCK-8; (B) Transwell experiment of cell invasion and cell migration ($\times 200$). n=3, * $P<0.05$ vs miR-NC+Lenti-Con; # $P<0.05$ vs miR-325-3p-mimic+Lenti-Con.

3 讨论

肝细胞癌是全球最常见的恶性肿瘤之一^[3]。全球每年约新增50万例肝癌患者,这其中50%发生在中国^[7-8]。肝癌的治疗方案包括手术切除和肝移植,然而患者的长期生存率仍然很低^[9],因此寻找治疗肝癌新的且有效的靶点至关重要。MiRNA已被证明在一系列生物过程中起调节作用,包括肿瘤细胞的增殖和侵袭^[10]。miR-325被报道可通过抑制细胞骨架活性调节蛋白(activity regulated cytoskeleton associated protein, ARC)调控细胞自噬^[11],然而其在肝癌中的作用报道尚少。本研究发现肝癌组织和肝癌细胞中miR-325-3p低表达。猜测miR-325-3p可能与肝癌进展相关。为验证这一

猜测,本研究在肝癌HepG2细胞中过表达miR-325-3p,观察其在HepG2细胞增殖和转移中的作用,结果发现:过表达miR-325-3p显著抑制细胞增殖、侵袭和迁移能力。提示miR-325-3p可以抑制肝癌细胞增殖和转移。

MiRNA是通过调控靶基因发挥生物学效应^[12]。本研究通过靶基因在线预测软件发现miR-325-3p与PBOV1存在潜在的靶向关系,并且通过双荧光素酶基因报告实验证实了PBOV1是miR-325-3p靶基因之一。PBOV1由于在前列腺、乳腺癌和膀胱癌组织中,在蛋白和mRNA水平异常高表达而得名^[13]。现在的研究^[14]证明:PBOV1在哺乳动物进化中的保守性较低,在多种类型的人类肿瘤中表达异常,而在正常组织样本中却很少表达。并且已有研究^[15]发

现: PBOV1与肝癌进展呈现正相关。本研究也发现了PBOV1在肝癌组织和肝癌细胞中高表达, 并且过表达miR-325-3p能抑制PBOV1的表达。最后, 为验证miR-325-3p是通过作用于PBOV1抑制肝癌的发展, 本研究在转染miR-325-3p-mimic的HepG2细胞同时过表达PBOV1, 结果发现过表达PBOV1能部分逆转miR-325-3p-mimic对细胞增殖与转移的抑制效应。

综上, 本研究证明miR-325-3p在肝癌组织及肝癌细胞中低表达, miR-325-3p通过抑制靶基因PBOV1表达, 发挥抑制肝癌细胞增殖和转移的作用。同时, 本研究也为肝癌的治疗提高了新的研究靶点。

参考文献

- 隋晶. 原发性肝癌的药物治疗进展[J]. 滨州医学院学报, 2018, 41(1): 56-58.
SUI Jing. Advances in drug therapy for primary liver cancer[J]. Journal of Binzhou Medical University, 2018, 41(1): 56-58.
- Maluccio M, Covey A. Recent progress in understanding, diagnosing, and treating hepatocellular carcinoma[J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(6): 394-399.
- 陈世发, 赵礼金. 肝癌发生发展机制的研究进展及其治疗现状[J]. 中国普通外科杂志, 2018, 27(7): 910-923.
CHEN Shifa, ZHAO Lijin. Research progress on mechanisms for occurrence of liver cancer and its treatment status[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2018, 27(7): 910-923.
- Portolani N, Coniglio A, Ghidoni S, et al. Early and late recurrence after liver resection for hepatocellular carcinoma: prognostic and therapeutic implications[J]. Ann Surg, 2006, 243(2): 229-235.
- Song Y, Wang F, Huang Q, et al. MicroRNAs contribute to hepatocellular carcinoma[J]. Mini Rev Med Chem, 2015, 15(6): 459-466.
- Xu J, Li J, Zheng TH, et al. MicroRNAs in the occurrence and development of primary hepatocellular carcinoma[J]. Adv Clin Exp Med, 2016, 25(5): 971-975.
- Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. Ca Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- Chen W. Cancer statistics: updated cancer burden in China[J]. Chin J Cancer Res, 2015, 27(1): 1.
- 滕海云. 原发性肝癌介入治疗的临床研究进展[J]. 医疗装备, 2018, 31(8): 200-201.
TENG Haiyun. Progress in clinical research of interventional therapy for primary liver cancer[J]. Chinese Journal of Medical Device, 2018, 31(8): 200-201.
- 王思念, 吕进, 张巧云, 等. miRNA与肿瘤侵袭转移[J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(3): 485-487.
WANG Sinian, LÜ Jin, ZHANG Qiaoyun, et al. miRNA and invasion and metastasis of cancer[J]. Journal of Modern Oncology, 2016, 24(3): 485-487.
- Bo L, Su-Ling D, Fang L, et al. Autophagic program is regulated by miR-325[J]. Cell Death Differ, 2014, 21(6): 967-977.
- Oh M, Rhee S, Moon JH, et al. Literature-based condition-specific miRNA-mRNA target prediction[J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0174999.
- Nikolay S, Larisa K, Irina M, et al. PBOV1 Is a Human De Novo Gene with tumor-specific expression that is associated with a positive clinical outcome of cancer[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56162.
- Wang L, Niu CH, Wu S, et al. PBOV1 correlates with progression of ovarian cancer and inhibits proliferation of ovarian cancer cells[J]. Oncol Rep, 2016, 35(1): 488-496.
- Xue C, Zhong Z, Ye S, et al. Association between the overexpression of PBOV1 and the prognosis of patients with hepatocellular carcinoma[J]. Oncol Lett, 2018, 16(3): 3401-3407.

本文引用: 马沛, 李连海, 刘甫. MiR-325-3p通过靶向PBOV1抑制人肝癌细胞增殖、迁移和侵袭[J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(3): 540-546. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.03.002

Cite this article as: MA Pei, LI Lianhai, LIU Fu. MiR-325-3p inhibits proliferation, migration and invasion of human hepatocellular carcinoma cells by targeting PBOV1[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2020, 40(3): 540-546. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.03.002