

miRNA-3679抑制下游ZADH2-靶基因促进 肝癌细胞增殖的机制研究

何静宇^{1,2}, 周雪琴², 王文涛^{1△}

1. 四川大学华西医院 肝脏外科(成都 610041); 2. 绵阳市第三人民医院·四川省精神卫生中心 肝胆胰外科(绵阳 621000)

【摘要】 目的 寻找miRNA-3679与肝癌细胞系之间的关系,并验证其下游靶基因。**方法** 通过PCR检测miRNA-3679在肝癌细胞系中的表达,使用ENCORI、miRDB、TargetScan数据库预测miRNA-3679的下游靶基因;通过qPCR检测(空白对照组、转染组及转染阴性对照组)转染靶基因表达水平确定靶基因为含锌结合醇脱氢酶结构域-2(ZADH2);Western blot检测转染miRNA-3679抑制剂后ZADH2蛋白表达;EdU染色检测转染miRNA-3679抑制剂及同时转染miRNA-3679、ZADH2抑制剂后对细胞增殖的影响;克隆形成实验检测细胞克隆形成能力;流式细胞术检测细胞凋亡。**结果** miRNA-3679在肝癌细胞系中的表达水平平均高于正常人肝细胞株($P<0.05$),数据库中共筛选出6个在肝癌中下调的基因: *GLUD1*、*B3GAT1*、*SLC46A3*、*MAP2K3*、*ATF5*、*ZADH2*; qPCR检测转染miRNA-3679抑制剂后ZADH2表达升高($P<0.01$);转染miR-3679抑制剂后荧光素酶活性升高($P<0.01$); Western blot检测miR-3679 inhibitor组中的ZADH2蛋白表达高于NC组($P<0.01$); EdU分析检测miRNA-3679 inhibitor组阳性细胞数低于NC组及Inhibitor NC组($P<0.05$); miR-3679 inhibitor+si-ZADH2组克隆计数多于miR-3679 inhibitor组($P<0.01$); 流式细胞术检测提示miR-3679 inhibitor+si-ZADH2组细胞凋亡数目低于miR-3679 inhibitor组($P<0.01$)。**结论** miRNA-3679在肝癌细胞中显著高表达,可直接作用于ZADH2基因并影响其表达,且通过抑制ZADH2发挥促进HCC细胞的增殖及抑制其凋亡。

【关键词】 肝细胞癌 微小RNA 微小RNA-3679 含锌结合醇脱氢酶结构域-2 可塑性相关基因蛋白-3

Mechanism of miRNA-3679 Inhibiting Downstream ZADH2-Target Genes to Promote Hepatocellular Carcinoma Cell Proliferation HE Jing-yu^{1,2}, ZHOU Xue-qin², WANG Wen-tao^{1△}. 1. Department of Liver Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, the Third Hospital of Mianyang and Sichuan Mental Health Center, Mianyang 621000, China

△ Corresponding author, E-mail: wwt02@163.com

【Abstract】 Objective To examine the relationship between miRNA-3679 and hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines, and to verify the downstream target genes of miRNA-3679. **Methods** PCR was used to determine the expression of miRNA-3679 in liver cancer cell lines, and databases, including ENCORI, miRDB and TargetScan, were used to predict the downstream target genes of miRNA-3679. qPCR of the normal control group (or NC group), miR-3679 inhibitor group and transfection negative control group (or inhibitor NC group) was done to determine the transfection efficiency of the target gene, thereby identifying zinc-binding alcohol dehydrogenase domain containing 2 (ZADH2) as the target gene. Western blot was used to determine the ZADH2 protein expression after miRNA-3679 inhibitor transfection. 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) staining was done to determine the effect of transfection of miRNA-3679 inhibitor and simultaneous transfection of miRNA-3679 and ZADH2 inhibitors on cell proliferation. Clone formation assay was done to determine the ability of cell clone formation. Flow cytometry was done to examine cell apoptosis. **Results** The expression level of miRNA-3679 in HCC cell lines was higher than that in normal human liver cell lines ($P<0.05$). Through screening conducted with the databases, six genes, including *GLUD1*, *B3GAT1*, *SLC46A3*, *MAP2K3*, *ATF5*, and *ZADH2*, were found to be down-regulated in HCC. qPCR showed that *ZADH2* expression increased significantly after transfection with miRNA-3679 inhibitor ($P<0.01$) and luciferase activity increased after transfection with miR-3679 inhibitor ($P<0.01$). Western blot results showed that ZADH2 protein expression of the miR-3679 inhibitor group was higher than that of the NC group ($P<0.01$). EdU analysis showed that the number of positive cells in the miRNA-3679 inhibitor group was lower than that in the NC group and the Inhibitor NC group ($P<0.05$). The clone count of the miR-3679 inhibitor+si-ZADH2 group was significantly higher than that of the miR-3679 inhibitor group ($P<0.01$). Flow cytometry showed that the number of apoptotic cells of the miR-3679 inhibitor+si-ZADH2 group was significantly lower than that of the miR-3679 inhibitor group ($P<0.01$). **Conclusion** miRNA-3679 is significantly highly expressed in HCC cells and miRNA-3679 can directly interact with ZADH2 gene and affect its expression. Moreover, miRNA-3679 promotes the proliferation of HCC cells and inhibits their apoptosis by suppressing ZADH2.

【Key words】 HCC Micro-ribonucleic acid Micro-ribonucleic acid-3679 Zinc-binding alcohol dehydrogenase domain containing 2 Plasticity-related gene 3

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)占原发性肝脏肿瘤的85.90%, HCC的发病率在全球范围内所有癌症中排名第六, 死亡率为第三, 总体五年生存率低于10%^[1]; 有约一半以上发生在中国, 是我国第四位常见恶性肿瘤及第二位肿瘤致死病因^[2]。HCC的发生发展机制复杂, 许多信号转导通路均有参与, 但目前具体机制尚不清楚, 故缺乏能够有效抗肿瘤的药物^[3]。自2007年第一代肝细胞癌的靶向药物索拉非尼问世以来, 虽在10余年的发展中有了多靶点药物及新药的开发, 但靶向药物治疗效果远未达到我们的预期水平, 这与HCC肿瘤细胞存在明显的分子异质性、多种遗传畸变有关^[4]。随着分子生物学的进展, 更多在HCC的发生与发展中的关键靶点被发现, 对HCC的发生及发展有了较深入的研究^[5]; 但目前对HCC发生、发展的分子机制尚不明确, 因此, 对HCC的发生与发展相关分子机制研究, 寻找潜在的治疗靶点, 对HCC的预防及治疗等均有着重要意义。

微小RNA(micro-ribonucleic acid, miRNA)在肝癌的发生发展中扮演着重要角色, 它既可以促进又可以抑制肝癌的发生发展, 也可以预测肝癌的进程^[6-11]; miRNA-3679是miRNA家族成员之一, 目前已有其在肺鳞癌^[12]、冠状动脉钙化^[13]、骨质疏松^[14]、结肠癌^[15]、胰腺癌^[16]等方面有所研究, 但均未涉及到与下游靶基因关系验证及机制研究, 其与HCC的关系、是否影响其进展等, 目前国内外未见相关文献报道。本课题前期已经证实miRNA-3679可能影响HCC的发生与发展(待发表), 因此, 本实验将对miRNA-3679在肝癌细胞系中的表达、下游靶基因的寻找及验证做深入探讨。

1 材料和方法

1.1 主要材料

人正常肝细胞系、肝癌细胞系SNU-475、SNU-398、Hep3B、Smmc-7721、HepG2(上海博谷生物科技有限公司); miRNA第一链cDNA合成试剂盒、miRNA荧光定量PCR试剂盒(上海生工), miR-3679-Forward序列为(西安擎科泽西生物科技有限公司设计): 5'-TGAGGATATGGCAGGGGAGGGGA-3'; miR-3679-Reverse: Universaloligod T primer; GAPDH-Reverse: 5'-GGGGTCATTGATGGCAACAATA-3'; GAPDH-Forward: 5'-ATGGGGAAGGTGAAGGTCG-3'; B3GAT1-Forward: 5'-GTCCCATTAAGTGGGTGTCCA-3'; B3GAT1-Reverse: 5'-ATCGCTAGGATGTCCCGTCT-

3'; SLC46A3-Forward: 5'-GTCGAGTTCGACGGGAAAGT-3'; SLC46A3-Reverse: 5'-GGTAGGTAGCTGTATTCCCACG-3'; MAP2K3-Forward: 5'-AAGTTCTCAGTTGGCCCGTG-3'; MAP2K3-Reverse: 5'-CTTCCTCTTGGATTTTCCGCC-3'; ATF5-Forward: 5'-AGAGTCAGGAGGAGGAAACCA-3'; ATF5-Reverse: 5'-CACAAAGGGGTCGAGGCTAC-3'; ZADH2-Forward: 5'-TAGAATCCTGCGCTCACTGC-3'; ZADH2-Reverse: 5'-GGATTCGCGCATTTGGAGAC-3'。Lipofectamine 3000(Invitrogen公司); GAPDH monoclonal antibody, ZADH2 polyclonal antibody(一抗, Proteintech公司); Anti-rabbit IgG antibody(二抗, Biosharp公司); Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒(索莱宝), BeyoClick™EdU-488细胞增殖检测试剂盒(碧云天); pGL3-ZADH2-WT及突变后的pGL3-ZADH2-MUT质粒由西安基恩科生物科技有限公司构建。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析miRNA-3679的下游靶基因 使用ENCORI、miRDB、TargetScan三个数据库(ENCORI: <http://starbase.sysu.edu.cn/agoClipRNA.php?source=mRNA&flag=none&clade=mammal&genome=human&assembly=hg19&miRNA=HSA-MIR-3679-5P&clipNum=1&deNum=0&panNum=0&proNum=1&program=None&target=all>; miRDB: <http://mirdb.org/cgi-bin/search.cgi?searchType=miRNA&searchBox=hsa-miR-3679-5p&full=1>; TargetScan: http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert_72/targetscan.cgi?species=Human&mir_nc=miR-1185-5p)分别预测miRNA-3679的下游靶基因, 预测结果取交集后得到62个潜在靶基因; 使用TCGA数据库分析这62个潜在靶基因, 筛选得到在肝癌中下调的基因。

1.2.2 荧光定量PCR (quantitative real-time, qPCR)

通过qPCR检测miR-3679在正常人肝细胞及肝癌细胞系中的表达, 并检测1.2.1中筛选出的下游靶基因在Hep3B细胞(未转染miR-3679抑制剂组和转染miR-3679抑制剂组)中的表达水平。采用Trizol法提取RNA, Nanodrop 2000检测肝癌细胞系RNA浓度及纯度; 反转录: 根据表1配制反应体系; 定量PCR: 在qPCR管中配制如下混合液(表2); 结果处理及判读: $\Delta\Delta CT$ 法: $A = CT(\text{目的基因, 待测样本}) - CT(\text{内标基因, 待测样本})$, $B = CT(\text{目的基因, 对照样本}) - CT(\text{内标基因, 对照样本})$, $K = A - B$, 表达倍

表 1 反转录反应体系

Table 1 Reverse transcription reaction system

Reagent	Reaction system	Final concentration
dNTP mix (2.5 mmol/L each)	4 μ L	500 μ mol/L each
Primer mix	2 μ L	
RNA template	X μ L	50 pg-5 μ g
5 $\times$ RT buffer	4 μ L	1 $\times$
DTT (0.1 mol/L)	2 μ L	10 mmol/L
HiFiScript (200 U/ μ L)	1 μ L	
RNase-free water	Fill up to 20 μ L	

表 2 定量PCR反应体系

Table 2 Quantitative PCR reaction system

Reagent	Reaction system
2 $\times$ ChamQ SYBR qPCR master mix	10 μ L
Primer1 (10 μ mol/L)	0.5 μ L
Primer2 (10 μ mol/L)	0.5 μ L
cDNA*	1 μ L
RNase-free water	8 μ L

*Obtained by reverse transcription.

数 = 2^{-K} , 结果判读: 相对定量PCR是比较2个或者2个以上标本mRNA含量的变化, mRNA的含量与表达倍数呈正比。

1.2.3 细胞转染 培养Hep3B、SMMC-7721及ZADH2突变后(ZADH2-MUT)的肝癌细胞株至70%后, 待转染; 使用Opti-MEM培养基稀释Lipofectamine®3000试剂(2管), 在每管已稀释的Lipofectamine®3000试剂中加入稀释的DNA(1:1); 室温孵育5 min; 加入脂质体复合物至细胞中; 37 $^{\circ}$ C孵育细胞2~4 d, 然后分析转染细胞。

1.2.4 双荧光素酶报告基因检测 按 5×10^4 /孔将Hep3B细胞铺于24孔板中, 待培养至细胞融汇至90%时, 按转染试剂盒中的操作说明, 分别将构建的pGL3-ZADH2-WT、pGL3-ZADH2-MUT转染上述细胞, 即为ZADH2突变组(ZADH2-MUT)及ZADH2野生型组(ZADH2-WT), 同时转染内参海肾荧光素酶载体(比例为实验质粒: 内参质粒 = 100:1), 每组分别做3个复孔, 转染24 h以后, PBS液洗细胞3次后, 检测各组荧光素酶的活性(按照Dual-Luciferase@Reporter Assay System说明书进行)。

1.2.5 EdU染色 分为miR-3679组、同时抑制miR-3679及ZADH2(miR-3679 inhibitor+si-ZADH2)组及空白对照组(NC组), 将Hep 3B和SMMC-7721细胞分别接种至24孔板, 24 h后转染, 配制2 $\times$ 的EdU工作液; 将37 $^{\circ}$ C预热的2 $\times$ 的EdU工作液(20 μ mol/L), 等体积加入24孔板中孵育2 h, 多聚甲醛室温固定15 min; 去除固定液, 洗涤, 每孔加入1 mL含0.3% Triton X-100的PBS, 室温孵育10~15 min; 1 mL PBS洗涤细胞; 按照说明书配制Click

Additive Solution和Click反应液; 每孔加入0.5 mL Click反应液; 室温避光孵育30 min; PBS洗涤3次; 每孔加入含0.5 mL 0.1 μ g/mL DAPI的PBS溶液, 室温避光染色5 min; 吸除DAPI溶液, 避光条件下用PBS洗涤3次; 荧光显微镜观察拍照并阳性细胞计数。

1.2.6 细胞克隆实验 分组同1.2.5。接种: 按照300个/孔的细胞接种至6孔板里混匀, 孵育48 h; 细胞转染: 继续培养箱孵育72 h; 克隆生长: 显微镜下观察, 当培养皿中出现可见的克隆时(超过50个细胞为一个克隆), 终止培养。固定染色。拍照计数: 计数着色成功的克隆(蓝紫色的成簇细胞)。

1.2.7 流式细胞术 分组同1.2.5。细胞接种24孔板, 每组接种1孔, 细胞密度为 5×10^4 /孔, 加500 μ L培养液; 24 h后转染, 操作同前; 按照分组, 各孔在培养48 h后经预热PBS洗涤后消化收集细胞; 用1 mL 1 $\times$ 的Binding Buffer悬浮细胞, 300 $\times$ g离心10 min, 弃上清; 用1 mL 1 $\times$ 的Binding Buffer重悬细胞, 使细胞的密度达到 1×10^6 mL $^{-1}$; 每管加入100 μ L细胞(1×10^5 个); 再向管中加入5 μ L Annexin V-FITC; 室温, 避光, 轻轻地混匀, 10 min; 加入5 μ L PI, 室温, 避光, 孵育5 min; 加入PBS至500 μ L, 轻轻混匀; 在1 h内用流式细胞仪检测, 计算细胞凋亡率。

1.2.8 Western blot 取NC及miR-3679 inhibitor组Hep3B细胞, 加入100 μ L Ripa蛋白提取液, 取上清液, BCA法测定蛋白浓度; 所有蛋白样品调至相等浓度后上样, 分别上样10 μ L进行电泳, 将蛋白转移至PVDF膜上, 5%脱脂牛奶室温封闭, 加入一抗ZADH2抗体(1:1000), 4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 洗膜后加入合适的二抗, 并选择HRP标记的抗体, 按相应比例稀释, 室温轻摇1 h; 采用HRP-ECL发光法鉴定。检测目的蛋白条带与内参蛋白GAPDH条带灰度值的比值, 为目的蛋白的相对表达量。

1.2.9 统计学方法 两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 qPCR检测miR-3679在正常人肝细胞及肝癌细胞系中的表达

qPCR检测结果显示, 在肝癌细胞系中miR-3679的表达水平平均高于正常人肝细胞株, 其中Hep3B、Smmc-7721及HepG2细胞系中高表达有统计学意义($P < 0.05$), 且在Hep3B和Smmc-7721中高表达尤为显著($P < 0.01$, 图1)。

2.2 生物信息学分析miRNA-3679的下游靶基因

使用ENCORI、miRDB、TargetScan三个数据库预测, 再使用TCGA数据库分析, 最终筛选得到6个在肝癌中

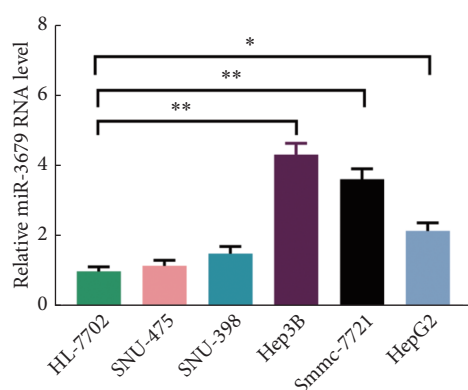


图1 qPCR检测miR-3679的表达

Fig 1 Expression of miR-3679 in human normal hepatocytes and hepatoma cell lines

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$.

下调的基因: *GLUD1*、*B3GAT1*、*SLC46A3*、*MAP2K3*、*ATF5*、*ZADH2*(图2)。

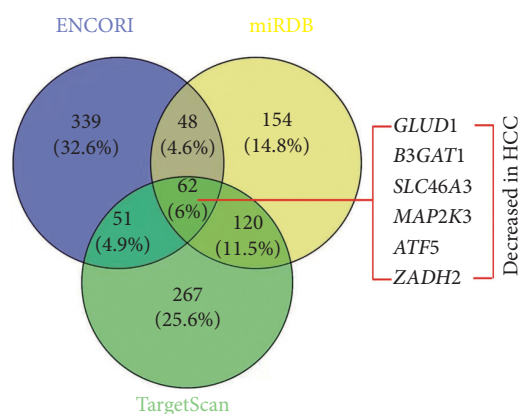


图2 生物信息学分析miRNA-3679的下游靶基因

Fig 2 Bioinformatics analysis of downstream target genes of miR-3679

GLUD1: Glutamate dehydrogenase 1; *B3GAT1*: Beta-1,3-glucuronyltransferase 1; *SLC46A3*: Solute carrier family 46 member 3; *MAP2K3*: Mitogen-activated protein kinase kinase 3; *ATF5*: Activating transcription factor 5; *ZADH2*: Zinc binding alcohol dehydrogenase domain containing 2.

2.3 qPCR检测相关基因的表达

2.3.1 转染miRNA-3679抑制剂 (P3000™试剂) 对Hep3B、Smmc-7721细胞中mi-RNA3679的表达 miRNA-3679 inhibitor组的miRNA-3679在Hep3B及Smmc-7721表达水平低于转染阴性对照(Inhibitor NC)组(图3, $P < 0.05$)。

2.3.2 qPCR检测抑制miRNA-3679后下游靶基因的表达水平 转染miRNA-3679抑制剂后Hep3B细胞*SLC46A3*、*ATF5*的表达无差异, *GLUD1*、*B3GAT1*、*MAP2K3*和*ZADH2*的表达升高($P < 0.05$),以*ZADH2*差异尤为明显($P < 0.01$, 图4),因此选择*ZADH2*为后续实验靶基因。

2.4 双荧光素酶报告基因检测下游ZADH2-靶基因与miRNA-3679的直接相互作用

将构建好的重组质粒转染Hep3B细胞, 转染miR-

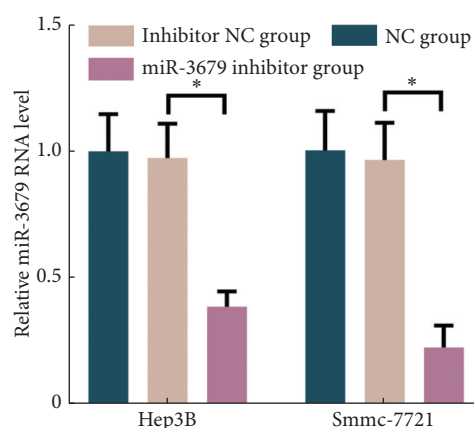


图3 各组miRNA-3679的表达

Fig 3 Expression of miRNA-3679 in Hep3B and Smmc-7721 cells

* $P < 0.05$, $n = 3$.

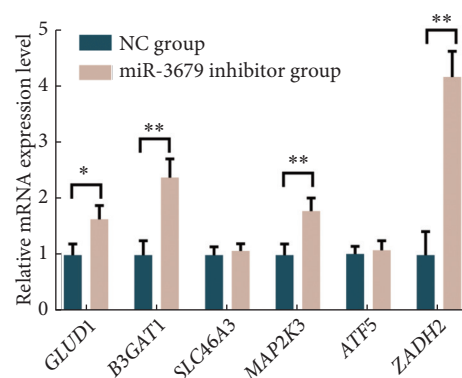


图4 qPCR检测抑制miRNA-3679后下游靶基因的表达水平

Fig 4 Expression levels of downstream target genes after inhibition of miRNA-3679

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$. *GLUD1*, *B3GAT1*, *SLC46A3*, *MAP2K3*, *ATF5*, *ZADH2*: Denote the same as those in Fig 2.

3679 inhibitor后, 荧光素酶活性显著升高($P < 0.01$); 而*ZADH2*基因与miR-3679的结合位点突变后, 转染miR-3679 inhibitor则对荧光素酶活性不再产生影响($P > 0.05$, 图5)。

2.5 Western blot检测各组蛋白表达

miR-3679 inhibitor组中Hep3B细胞*ZADH2*蛋白表达高于NC组($P < 0.01$, 图6)。

2.6 EdU实验检测细胞增殖

miRNA-3679 inhibitor组阳性细胞数低于NC组及Inhibitor NC组及miR-3679 inhibitor+si-*ZADH2*组(图7, $P < 0.01$)。

2.7 克隆形成实验检测细胞克隆形成能力

miR-3679 inhibitor组中克隆计数少于NC组($P < 0.01$), 但miR-3679 inhibitor+si-*ZADH2*组克隆计数多于miR-3679 inhibitor组(图8, $P < 0.01$)。

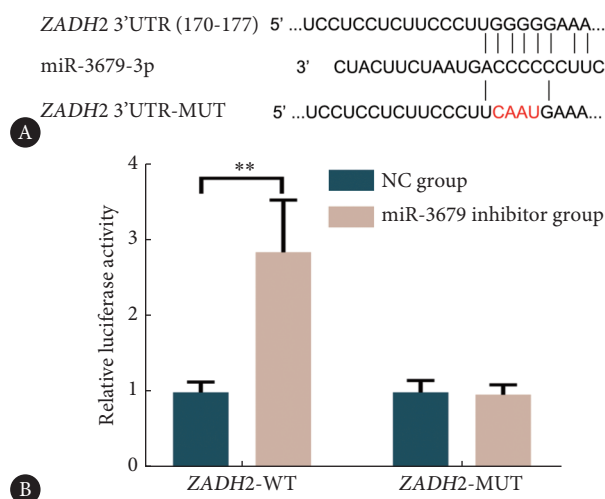


图 5 荧光素酶活性检测Hep3B细胞株ZADH2的表达

Fig 5 The expression of ZADH2 in Hep3B cell lines was determined by luciferase activity test

A: Wild-type and mutant ZADH2 and miRNA-3679 gene sequences; B: The expression of ZADH2 ($n=3$); ** $P<0.01$.

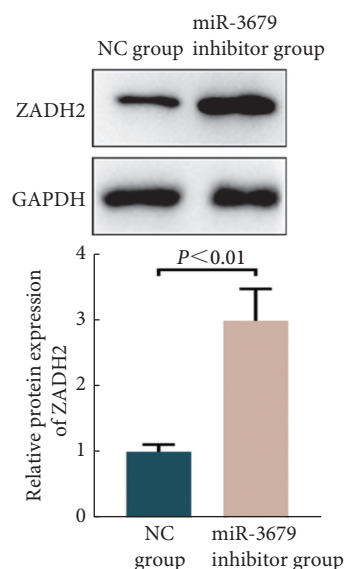


图 6 Western blot检测ZADH2蛋白表达 ($n=3$)

Fig 6 ZADH2 protein expression in each group was determined by Western blot ($n=3$)

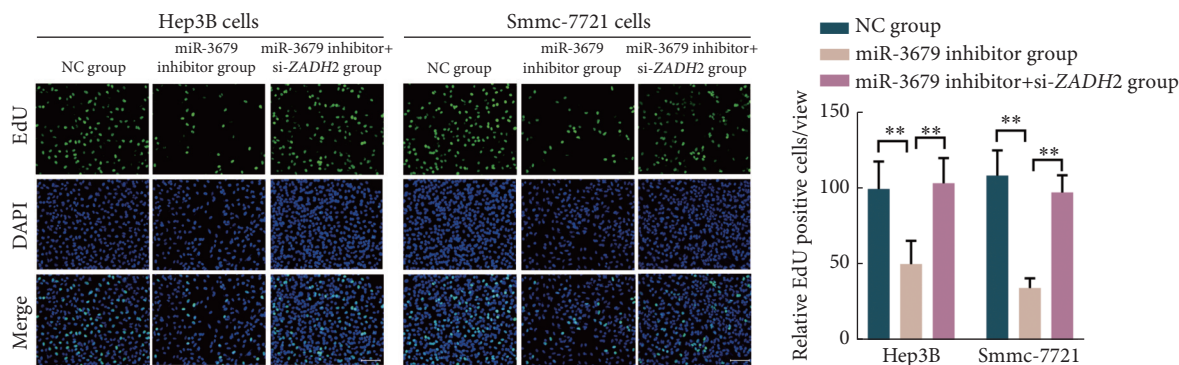


图 7 EdU分析检测各组细胞增殖情况。×200

Fig 7 EdU analysis for determining cell proliferation in each group. ×200

** $P<0.01$, $n=3$.

2.8 流式细胞术检测细胞凋亡

miR-3679 inhibitor组细胞凋亡率高于NC组及miR-3679 inhibitor+si-ZADH2组(图9, $P<0.01$)。

3 讨论

3.1 miR-3679在肝癌细胞株中的表达及下游靶基因的选定

微小RNA是由19-24个核苷酸组成的一类内源性非编码RNA, 通过与靶基因的3'非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)结合, 可抑制靶基因的表达或促进其降解, 参与细胞内的转录后调节^[17]。miRNA虽然不能直接编码蛋白质, 但目前估计有约30%的人类编码基因受miRNA的调控^[18], 通过转录后调节超过60%的人体蛋白质编码基因^[19], 因此, miRNA参与机体多种生理病理过程

及生物学功能。本课题假设miRNA-3679参与HCC的发生与发展, 采用细胞学实验证实, 在HCC细胞系(SNU-475、SNU-398、Hep3B、Smmc-7721、HepG2)中miRNA-3679的表达水平均高于人正常肝细胞(HL-7702), 但在Hep3B、Smmc-7721、HepG2细胞株中的高表达($P<0.05$), 且在Hep3B、Smmc-7721中高表达尤为显著($P<0.01$)。因此, 我们后期实验选用肝癌细胞株(Hep3B、Smmc-7721)作为主要研究对象, 以行机制等相关研究; 且说明miRNA-3679可能在HCC的发生与发展中起着重要作用, 并有可能作为潜在预后标记物之一, 为下一步实验奠定基础。

通过ENCORI、miRDB、TargetScan三个数据库分别预测miR-3679的下游靶基因, 预测结果取交集后得到62个潜在靶基因; 使用TCGA数据库分析这62个潜在靶基

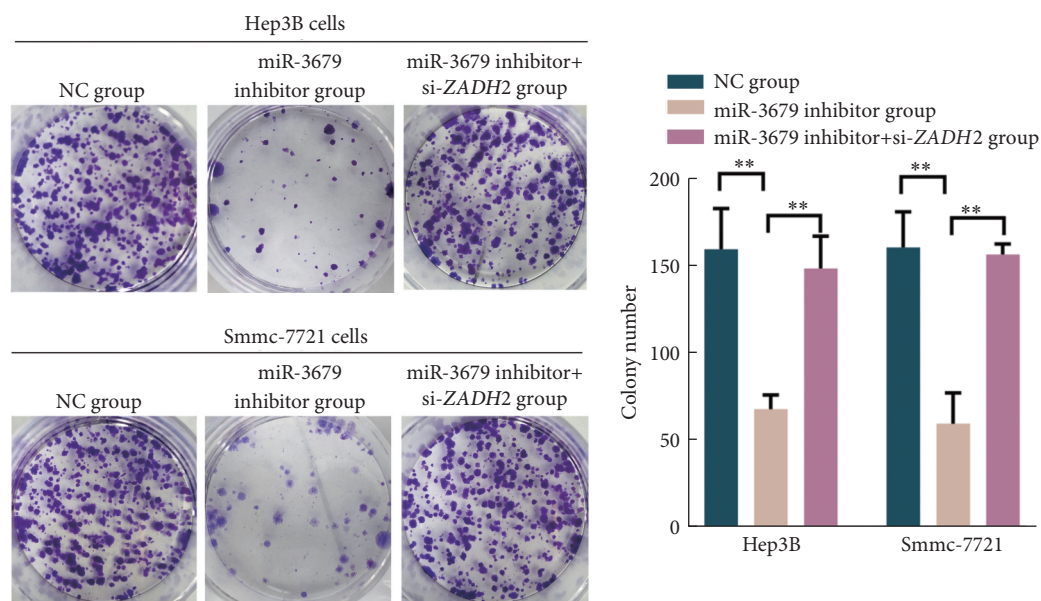


图8 克隆形成实验检测细胞克隆

Fig 8 Colony formation assay for determining cell clones in each group

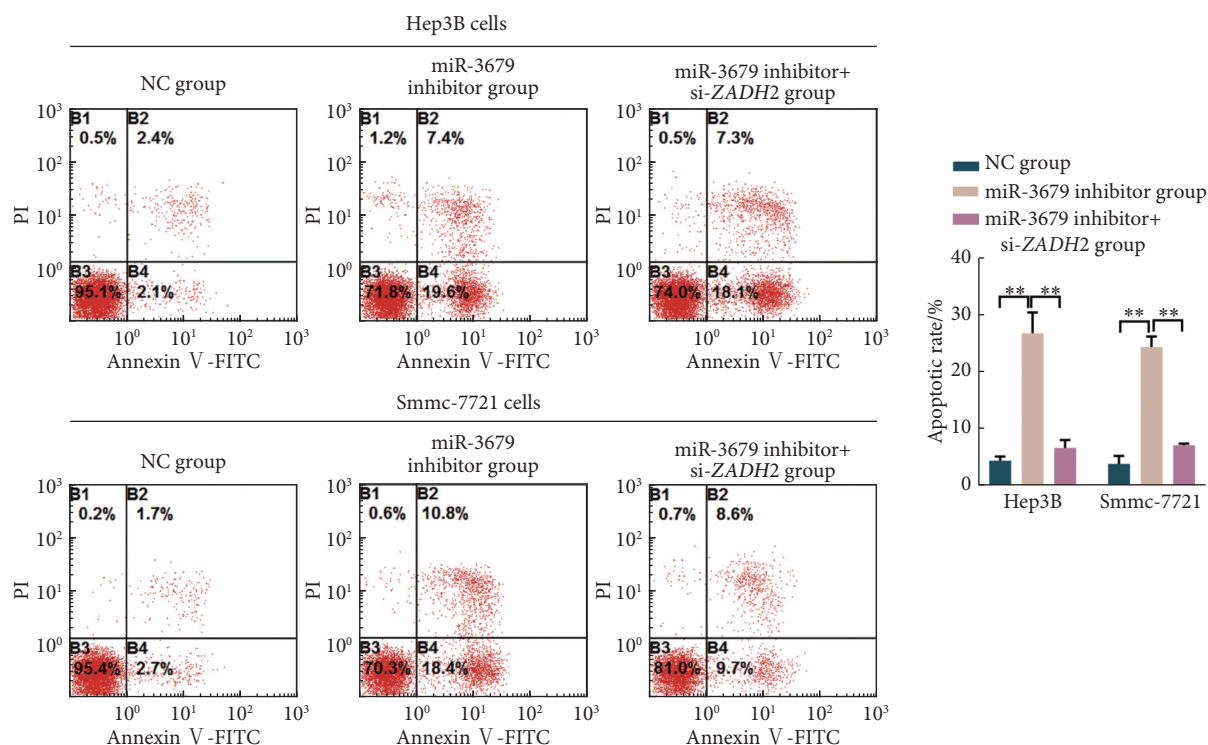
** $P < 0.01$, $n = 3$.

图9 流式细胞术 (FITC-Annexin V/PI) 检测细胞凋亡

Fig 9 Determining apoptosis by flow cytometry (FITC-Annexin V/PI)

** $P < 0.01$, $n = 3$.

因, 筛选得到6个在HCC中下调的基因: *GLUD1*、*B3GAT1*、*SLC46A3*、*MAP2K3*、*ATF5*、*ZADH2*; 为寻找这6个下调基因中与miR-3679关系最为密切的基因, qPCR检测转染miRNA-3679抑制剂(Lipofectamine 3000)后Hep3B细胞下游基因(*GLUD1*、*B3GAT1*、*SLC46A3*、*MAP2K3*、*ATF5*、

ZADH2)的表达水平, 结果显示:*ZADH2*表达显著升高($P < 0.01$)。因此, 我们选择*ZADH2*作为miRNA-3679的潜在靶基因为研究对象, 并进一步验证相互关系。

*ZADH2*基因以可塑性相关基因蛋白-3(plasticity-related gene 3, PRG-3)被我们熟知(<https://www.ncbi>.

nlm.nih.gov/gene/?term=ZADH2)。PRG-3是PRGs家族中的一员,目前已发现5种可塑性相关基因蛋白(PRG1-5),均属于脂质磷酸酯酶超家族,主要表达于中枢神经系统;在其它脏器如肝脏、心脏、肺部都有表达^[20]。CHOI等^[21]报道ZADH2基因异常与血清中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的升高有关,而VEGF在肿瘤的增殖、转移及侵袭等方面发挥重要作用^[22]。由此推断ZADH2可能在肿瘤的发生与发展中扮演重要角色。查阅相关文献,以ZADH2及PRG-3相关文献报道较少,且未见与其它脏器肿瘤报道,本研究通过生物信息学分析miRNA-3679下游靶基因,进一步用细胞培养验证抑制miRNA-3679后在Hep3B细胞中ZADH2的高表达,故将ZADH2作为潜在靶基因,并验证miRNA-3679与ZADH2的关系及对HCC细胞增殖、存活及凋亡等影响。

3.2 miRNA-3679通过抑制ZADH2发挥促进HCC细胞增殖、克隆能力

为验证miR-3679与ZADH2的相互作用,荧光素酶活性检测结果提示转染miR-3679 inhibitor后,荧光素酶活性显著升高,而ZADH2基因与miR-3679的结合位点突变后,转染miR-3679 inhibitor则对荧光素酶活性不再产生影响;由此说明miR-3679可通过预测的位点直接调控ZADH2的水平。为进一步验证miRNA-3679可调控ZADH2的表达,Western blot检测miR-3679 inhibitor组中的ZADH2蛋白表达高于NC组,实验结果提示:抑制miRNA-3679可促进ZADH2基因的表达并通过该路径发挥生物学效应。肿瘤细胞的增殖、克隆能力及细胞存活能力与肿瘤的侵袭性密切相关,细胞周期的调控与肿瘤的发生及发展关系密切,调控受损可导致机体细胞的恶性增殖、侵袭性增加及凋亡的异常等^[23];肿瘤发生与发展常伴随肿瘤细胞的凋亡受抑制;因此,对肿瘤细胞的增殖、存活、细胞周期及细胞凋亡的研究,有助于阐述肿瘤的发生及发展机制,以靶向干预,提高HCC治疗的预后。EdU分析检测结果显示miR-3679 inhibitor+si-ZADH2组阳性细胞数低于NC组及miRNA-3679 inhibitor组($P<0.01$);克隆形成实验说明抑制miRNA-3679后可抑制HCC细胞的克隆能力,但阻断ZADH2后可明显减弱其抑制作用,但仍低于NC组,说明可能还有其它通路调控HCC细胞增殖,但不是主要通路;因此,我们推断:miRNA-3679可通过抑制下游ZADH2发挥HCC细胞增殖与克隆的作用。

细胞凋亡是受多种基因精确调控的主动的、程序化的死亡过程^[24];传统的凋亡包含三大途径,即Bax和B细胞淋巴瘤2相关蛋白X(Bcl-XL)介导的信号通路,线粒体、死

亡受体诱导的及经内质网途径介导,涉及活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生和MAPK家族参与胞内信号转导通路,肿瘤发生与发展常伴随肿瘤细胞的凋亡受抑制^[25];研究表明,HCC细胞的凋亡与组织学分级、淋巴结转移、临床分期等密切相关;为了解miRNA-3679与ZADH2对肿瘤细胞凋亡的影响,流式细胞术提示miR-3679 inhibitor组及miR-3679 inhibitor+si-ZADH2组细胞凋亡数目均大于NC组($P<0.01$);miR-3679 inhibitor+si-ZADH2组低于miR-3679 inhibitor组($P<0.01$)。结果提示,抑制miR-3679可促进Hep3B和Smmc-7721细胞的凋亡,但抑制ZADH2后明显抑制miR-3679的抑制细胞凋亡作用,说明miRNA-3679通过抑制ZADH2发挥抑制HCC细胞凋亡作用。

* * *

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] FORNER A, REIG M, BRUIX J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 2018, 391(10127): 1301-1314.
- [2] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 原发性肝癌诊疗指南(2022年版). 肿瘤防治研究, 2022, 49(3): 251-276.
- [3] YANG J D, ROBERTS L R. Hepatocellular carcinoma: A global view. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2010, 7(8): 448-458.
- [4] THILLAI K, ROSS P, SARKER D. Molecularly targeted therapy for advanced hepatocellular carcinoma--A drug development crisis? *World J Gastrointest Oncol*, 2016, 8(2): 173-185.
- [5] LLOVET J M, RICCI S, MAZZAFERRO V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, 2008, 359: 378-390.
- [6] YANG C, XU Y, CHENG F, et al. miR-1301 inhibits hepatocellular carcinoma cell migration, invasion, and angiogenesis by decreasing Wnt/ β -catenin signaling through targeting BCL9. *Cell Death Dis*, 2017, 8(8): e2999[2022-06-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28817119/>. doi: 10.1038/cddis.2017.356.
- [7] XU B, XU T, LIU H, et al. MiR-490-5p suppresses cell proliferation and invasion by targeting BUB1 in hepatocellular carcinoma cells. *Pharmacology*, 2017, 100(5/6): 269-282.
- [8] FORNARI F, MILAZZO M, CHIECO P, et al. In hepatocellular carcinoma miR-519d is up-regulated by p53 and DNA hypomethylation and targets CDKN1A/p21, PTEN, AKT3 and TIMP2. *J Pathol*, 2012, 227(3): 275-285.
- [9] ZHOU Y, REN H, DAI B, et al. Hepatocellular carcinoma-derived exosomal miRNA-21 contributes to tumor progression by converting hepatocyte stellate cells to cancer-associated fibroblasts. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 324[2022-06-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30591064/>. doi: 10.1186/s13046-018-0965-2.
- [10] KOGURE T, LIN W L, YAN I K, et al. Intercellular nanovesicle -

- mediated microRNA transfer: A mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth. *Hepatology*, 2011, 54(4): 1237–1248.
- [11] LOU G, SONG X, YANG F, *et al.* Exosomes derived from miR-122-modified adipose tissue-derived MSCs increase chemosensitivity of hepatocellular carcinoma. *J Hematol Oncol*, 2015, 8: 122[2022-06-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26514126/>. doi: 10.1186/s13045-015-0220-7.
- [12] PU Q, HUANG Y, LU Y, *et al.* Tissue-specific and plasma microRNA profiles could be promising biomarkers of histological classification and TNM stage in non-small cell lung cancer. *Thorac Cancer*, 2016, 7(3): 348–354.
- [13] LIUN W, LING S, SUN W, *et al.* Circulating microRNAs correlated with the level of coronary artery calcification in symptomatic patients. *Sci Rep*, 2015, 5: 16099[2022-06-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26537670/>. doi: 10.1038/srep16099.
- [14] DE-UGARTE L, CARO-MOLINA E, RODRIGUEZ-SANZ M, *et al.* SNPs in bone-related miRNAs are associated with the osteoporotic phenotype. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 516.
- [15] LI M, WANG Q, XUE F, *et al.* lncRNA-CYTOR works as an oncogene through the CYTOR/miR-3679-5p/MACC1 axis in colorectal cancer. *DNA Cell Biol*, 2019, 38(6): 572–582.
- [16] SETTI G, PEZZI M E, VIANI M V, *et al.* Salivary microRNA for diagnosis of cancer and systemic diseases: A systematic review. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 907.
- [17] BARTEL D P. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009, 136(2): 215–233.
- [18] HALE V, HALE G A, BROWN P A, *et al.* A review of DNA Methylation and microRNA expression in recurrent pediatric acute leukemia. *Oncology*, 2017, 92(2): 61–67.
- [19] FRIEDMAN R C, FARH K K, BURGE C B, *et al.* Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, 2009, 19: 92–105.
- [20] FAN Z, BITTERMANN-RUMMEL P, YAKUBOV E, *et al.* PRG3 induces Ras-dependent oncogenic cooperation in gliomas. *Oncotarget*, 2016, 7(18): 26692–26708.
- [21] CHOIS H, RUGGIERO D, SORICE R, *et al.* Six novel loci associated with circulating VEGF levels identified by a meta-analysis of genome-wide association studies. *PLoS Genet*, 2016, 2(12): e1005874[2022-06-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26910538/>. doi: 10.1371/journal.pgen.1005874.
- [22] 范秀平, 张春燕, 李晓辉, 等. 肝癌组织中血管内皮生长因子的表达水平及影响因素分析. *实用医药临床杂志*, 2018, 15(4): 1–4.
- [23] 邹向阳, 李连宏. 细胞周期调控与肿瘤. *国际遗传学杂志*, 2006, 29(1): 70–73.
- [24] 黄燕花, 王鲁妮, 刘泽, 等. 阿司匹林通过抑制 β -catenin/EMT信号通路促进5-FU诱导食管癌细胞凋亡. *中国药理学通报*, 2020, 36(5): 655–659.
- [25] 石坤男, 覃夏, 王红阳. 坏死性凋亡研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2020, 47(7): 561–573.

(2022-05-14收稿, 2022-08-28修回)

编辑 汤洁