

miR-224对hep3B细胞增殖和凋亡的影响

毛英, 陈保华, 李新建, 姚斌

鹰潭市解放军第一八四医院普外科, 江西 鹰潭 335000

[摘要] 背景与目的: miR-224在肝细胞癌中呈过表达, 并参与癌症的侵袭与转移过程, 该研究通过观察miR-224体内、外对Hep3B细胞增殖和凋亡的影响, 探讨miRNA-224与肝细胞癌发生、发展之间的关系。方法: 运用实时荧光定量PCR定量分析miR-224反义寡核苷酸技术(antisense oligonucleotide, ASO)对Hep3B细胞mRNA表达的影响; 通过miR-224 ASO降低Hep3B细胞中miR-224的表达, 采用MTT、克隆形成实验、流式细胞术及体内实验观察miR-224 ASO对Hep3B细胞产生的生物学效应。结果: Hep3B细胞miR-224 ASO转染组与对照组相比, miR-224水平明显下降($P<0.05$); MTT实验结果显示转染miR-224 ASO后, Hep3B细胞的存活数量明显低于对照组($P<0.05$); 克隆形成实验结果显示miR-224 ASO组克隆形成率较对照组显著降低($P<0.05$); 体内研究进一步证实miR-224 ASO可以抑制肿瘤细胞的增殖, 从而导致肿瘤生长较对照组慢($P<0.05$), 肿瘤的体积较对照组明显减小($P<0.05$); 流式细胞术检测结果显示, 转染miR-224 ASO组较对照组细胞凋亡明显增加($P<0.05$); 另外, 降低miR-224的表达后发现*Bcl-2*的mRNA和蛋白都明显下降。结论: miR-224在Hep3B细胞中表达上调, 降低miR-224的表达可有效抑制Hep3B细胞生长、促进细胞凋亡。miR-224有可能成为肝细胞癌表达调控的新靶点。

[关键词] miR-224; Hep3B; 反义单核苷酸; 细胞增殖; 细胞凋亡

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2015.07.005

中图分类号: R73-35 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2015)07-0516-06

miR-224 affects Hep3B cell proliferation and apoptosis MAO Ying, CHEN Baohua, LI Xinjian, YAO Bin (Department of General Surgery, the 184th Hospital of Chinese People's Liberation Army in Yingtan City, Yingtan Jiangxi 335000, China)

Correspondence to: LI Xinjian E-mail: 764937718@qq.com

[Abstract] **Background and purpose:** MiR-224 is overexpressed in hepatocellular carcinoma, and participate in invasion and metastasis of cancer. The aim of this study was to investigate the effects of miR-224 antisense oligonucleotide (ASO) on the proliferation and apoptosis of Hep3B cells. **Methods:** After transfection with miR-224 ASO, and detecting the miR-224 mRNA expression of Hep3B cells by real-time quantitative PCR; the miR-224 expression in Hep3B cells was measured and cell proliferation was analyzed by MTT assay and the colony formation experiment *in vitro* and *in vivo*. The cell apoptosis was analyzed by flow cytometry. **Results:** Compared with the control group, miR-224 ASO significantly reduced the miR-224 mRNA expression in the Hep3B cell ($P<0.05$), MTT assay results showed that Hep3B cells survived rate decreased greatly after transfection with miR-224 ASO. Clone formation assay revealed that the colony formation rate in miR-224 ASO group was significantly lower than that in the control group. *In vivo* study further confirmed that miR-224 ASO could inhibit the proliferation of Hep3B cells, and miR-224 ASO group grew substantially slow compared with the negative control. Flow cytometry indicated that miR-224 ASO group promoted apoptosis significantly. **Conclusion:** miR-224 was overexpressed in Hep3B cells. Reducing the expression of miR-224 can effectively inhibit the growth of Hep3B cells and promote apoptosis. miR-224 may become a new target for the regulation of gene expression in hepatocellular carcinoma.

[Key words] miR-224; Hep3B; Antisense oligonucleotides; Cell proliferation; Apoptosis

微小RNA分子(miRNA)是一种内源性的非编码小分子RNA,广泛分布于动植物细胞体内,大量研究发现miRNA在恶性肿瘤细胞的发生、发展中发挥重要作用,其中包括调控细胞的增殖、分化和凋亡^[1-2]。近年研究报道miR-224在肝细胞癌、肠癌等恶性肿瘤中呈过表达且与恶性肿瘤的侵袭和转移密切相关^[3-5]。然而miR-224表达对Hep3B细胞增殖与凋亡的影响研究尚未见报道。在本实验中我们采用TagMan MGB探针法检测miR-224在Hep3B细胞中的表达情况,同时利用反义寡核苷酸技术(antisense oligonucleotide, ASO)抑制miR-224在Hep3B细胞中的表达,分析miR-224对Hep3B细胞增殖和凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和细胞

Hep3B细胞由本实验室保存,实验动物Bal B/C裸鼠,4~5周龄,购自上海斯莱克实验动物有限公司,饲养于SPF无菌环境下。

1.1.2 主要试剂和仪器

TaqMan miRNA分析试剂盒购自美国ABI公司,DMEM高糖培养基购自美国Gibco公司、胎牛血清购自美国Hyclone公司,脂质体Lipofectamine™ 2000购自美国Invitrogen公司,反义miR-224寡核苷酸(miR-224 ASO)购自宝生物工程(大连)有限公司,Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒购自南京凯基科技发展有限公司,总蛋白提取试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,鼠抗人Bcl-2单克隆抗体购自美国santa cruz公司,实时荧光定量PCR分析仪购自美国ABI公司,流式细胞仪购自美国BD公司。

1.2 方法

1.2.1 实时荧光定量PCR检测miR-224的表达

采用TRIzol试剂提取Hep3B细胞miR-224 ASO转染组及对照组织中总RNA,采用紫外分光光度计测定浓度,-80℃保存,运用miR-224检测试剂盒检测miR-224的表达。首先取

2 μg总RNA为反应模板与3 μL反转录酶相互混合,反应体系为20 μL,反应条件为:16℃ 30 min,42℃ 30 min,85℃ 5 min。反应结束后,收集cDNA,将其稀释150倍,然后取1 μL稀释的cDNA与2 μL TaqMan引物相混合,20 μL反应体系:95℃ 10 min,随后95℃ 15 s,59℃ 60 s,40个循环。相对miRNA表达采用 ct 值精确计算,将U6 snRNA作为内参。

1.2.2 反义miR-224单核苷酸序列设计

MiRBase(<http://www.sanger.ac.uk/software/Rfam/mirna>)提供的miRNA基因序列,获取人miR-224的序列,并设计其反义寡核苷酸序列,同时运用核酸序列数据库检索程序以排除其他的同源序列。另外,我们同时设计一条随机对照序列,miR-224顺义链:5'-AGUCACUAGUGGUUCCGUUUA-3',反义链:5'-TAAACGGAACCACTAGTGACT-3';随机序列顺义链:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3',反义链:5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3',送Invitrogen公司合成,PAGE纯化,全硫代修饰。

1.2.3 细胞培养和反义寡核苷酸转染

将Hep3B细胞接种于DMEM培养基(含10%胎牛血清),置于37℃,CO₂体积分数为5%的条件下培养。严格遵照Lipofectamine™ 2000转染试剂盒操作程序进行转染,反义miR-224寡核苷酸终浓度分别为50、100、150和200 nmol/L,我们前期初步筛选出最佳终干扰浓度为100 nmol/L。转染后培养时间分别为24、48和72 h,初步筛选出最佳作用时间为48 h。将荧光对照的反义寡核苷酸转染后置于倒置荧光显微镜下进行观察,上述操作重复3次。转染效率为(88.5 ± 6.4)%。

1.2.4 转染miR-224 ASO后对miR-224表达的影响

转染miR-224 ASO与对照ASO 48 h后,提取总RNA,测定浓度,逆转录为cDNA(反应条件同1.2.1),测定cDNA浓度。运用miR-224检测试剂盒检测miR-224的表达(具体条件同1.2.1)。

1.2.5 克隆形成实验检测Hep3B细胞的增殖

Hep3B细胞经转染后,取对数生长期的细

胞, 用含3%胰蛋白酶消化细胞。接种于6孔培养板中, 大约500~600个细胞/孔, 置37℃, CO₂体积分数为5%, 饱和湿度的条件下, 培养2~3周。观察细胞生长情况, 当培养皿中出现肉眼可见的克隆细胞团时, 终止培养。移去上清液, 运用PBS漂洗2次。加甲醇固定20 min, 去除固定液, 加适量Giemsa应用染色液染30 min, 用ddH₂O清洗染色液, 经干燥后在显微镜下计数大于50个细胞的克隆数, 克隆形成率=克隆数/接种细胞数×100%。

1.2.6 MTT检测Hep3B细胞增殖情况

收集Hep3B细胞, 将各组细胞悬液在离心管内反复充分打匀, 接种于96孔培养板(6×10³/孔), 24 h后换液。实验分组同1.2.4, 每组设有6个复孔。转染后1~4 d每孔加入MTT试剂(浓度为5 mg/mL)20 μL, 置于37℃、CO₂体积分数为5%条件下继续温育4 h。用移液器吸取各孔上清液, 加入DMSO 150 μL/孔, 在室温条件下摇10 min(置水平摇床)以充分完全溶解MTT结晶。测定各孔吸光度($D_{490\text{nm}}$)值。每组重复3次。按下列公式计算细胞生长抑制率(%): 细胞生长抑制率=($D_{490\text{nm}}$ 实验组平均- $D_{490\text{nm}}$ 对照组平均)÷ $D_{490\text{nm}}$ 对照组平均×100%。

1.2.7 活体内检测miR-224 ASO对Hep3B细胞增殖的影响

将18只(4~5周龄)裸鼠(购自上海斯莱克公司)饲养于SPF无菌环境下。Hep3B细胞稳定转染对照ASO或miR-224 ASO后, 取对数期生长的细胞(约2×10⁶个)制成150 μL细胞悬液, 运用微量注射器接种于裸鼠左侧大腿背部皮下。成瘤后定期测量肿瘤的大小, 并运用公式($V=D \times d^2 \times \pi/6$)(D, d 分别代表肿瘤的最大直径和最小直径)计算肿瘤的体积^[6], 绘制肿瘤生长曲线。饲养6周后处死裸鼠, 取瘤称重。经福尔马林固定、石蜡包埋、HE染色后, 在光镜下观察肿瘤组织的病理学特征。

1.2.8 流式细胞术分析细胞早期凋亡

实验分组同1.2.4, 将细胞接种于6孔板中, 转染反义miR-224寡核苷酸。经48 h后收集细

胞并制备为单细胞悬液, 采用PBS漂洗2次, 离心、弃上清液。最后运用Annexin V-FITC早期凋亡试剂盒和流式细胞仪检测各组细胞的早期凋亡情况。

1.2.9 检测各组细胞Bcl-2 mRNA的表达水平

各组培养细胞加入TRIzol裂解液, 提取总RNA, 逆转录为cDNA, 运用SYBR Green Real Time PCR Master Mix通过实时荧光定量PCR方法检测Bcl-2 mRNA的表达。Bcl-2基因的引物序列为上游: 5'-AACTGGGGGAGGATTGTGGC-3'; 下游: 5'-GATCCAGGTGTGCAGGTGCC-3'。反应条件: 95℃变性45 s, 58℃退火45 s, 72℃延伸30 s, 40个循环。以GAPDH作为内参。在ABI7500反应平台上进行PCR反应。

1.2.10 检测各组细胞Bcl-2蛋白的表达水平

收集转染miR-224 ASO的Hep3B细胞, 运用总蛋白提取试剂盒提取总蛋白, 经10%SDS-PAGE电泳后转膜, 将膜放在含5%脱脂奶粉的TBST缓冲液中37℃封闭2 h, 加一抗稀释液1:500稀释鼠抗人Bcl-2单克隆抗体在4℃温育过夜, 1×TBST缓冲液洗膜10 min×3次, 加辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠IgG(1:1000稀释), 置于37℃温育2 h, 1×BST缓冲液洗膜10 min×3次, 运用ECL化学发光法检测目的蛋白条带。以β-actin作为内参。

1.3 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件进行统计分析, 计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间均数的比较采用Student's *t*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Hep3B细胞miR-224的表达情况

利用实时荧光定量PCR检测miR-224 ASO转染组和对照组, 结果发现: miR-224 ASO转染组miR-224的表达水平明显下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图1)。

2.2 降低miR-224的表达对Hep3B细胞存活率的影响

转染miR-224 ASO后, 通过荧光定量PCR

方法检测发现miR-224的表达较对照明显降低 ($P<0.05$, 图2A)。同时MTT检查结果发现: 转染miR-224 ASO后组细胞生长较对照组明显降低, 两者差异有统计学意义($P<0.05$, 图2B)。

2.3 降低miR-224的表达对体外Hep3B细胞增殖的影响

克隆形成实验结果提示: miR-224ASO转染后, Hep3B细胞克隆形成率较对照明显降低 ($P<0.05$, 图3)。

2.4 降低miR-224的表达对活体肿瘤增殖的影响

本实验所有的裸鼠肿瘤成瘤率为100%, 实验结果发现miR-224 ASO稳定转染组的肿瘤生长较对照组明显慢, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图4)。

2.5 降低miR-224的表达对Hep3B细胞凋亡的影响

Hep3B转染miR-224 ASO后, 流式细胞仪检测细胞凋亡的结果显示: Hep3B细胞在转染miR-224 ASO后, 凋亡增加明显, 而对照ASO转染后凋亡无明显变化($P<0.05$, 图5)。

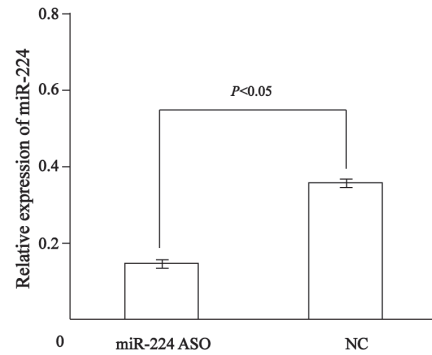


图1 实时荧光定量PCR检测miR-224的表达

Fig. 1 miR-224 mRNA expression detecting by qRT-PCR

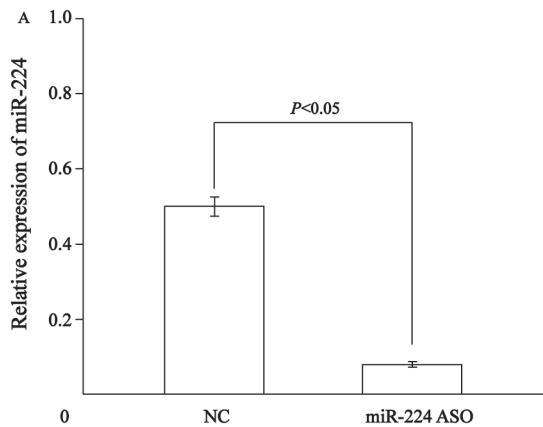


图2 转染miR-224 ASO后, Hep3B细胞miR-224的表达和生长情况变化

Fig. 2 Hep3B cells proliferation (A) and expression mRNA level (B) miR-224 of after transfection

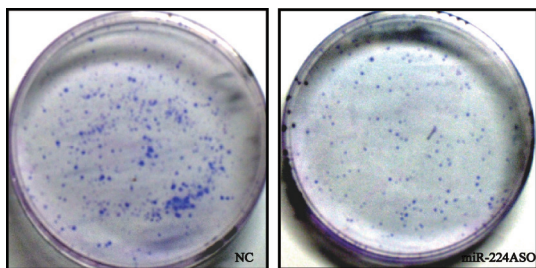
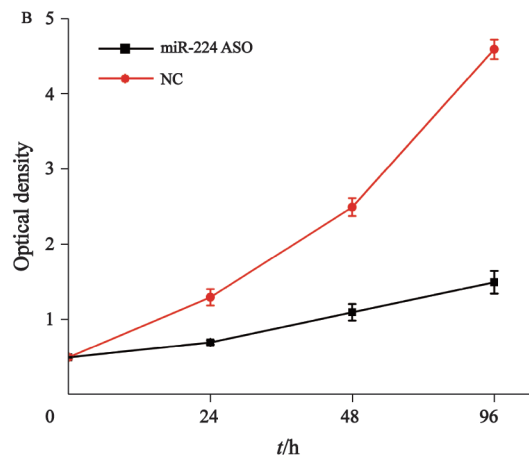


图3 转染miR-224 ASO后, Hep3B细胞克隆形成率明显降低

Fig. 3 Colony formation rate of Hep3B cells after transfection

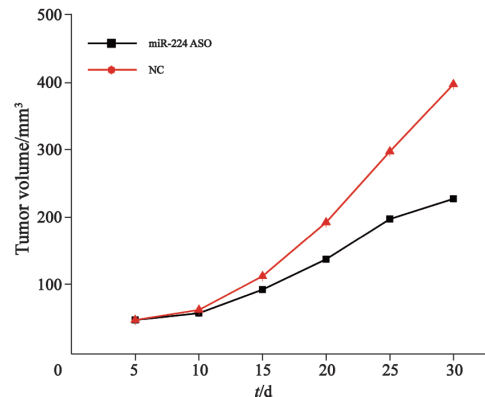


图4 活体内miR-224ASO转染的Hep3B细胞致瘤的体积变化

Fig. 4 The volume of nude mice tumors after transfection

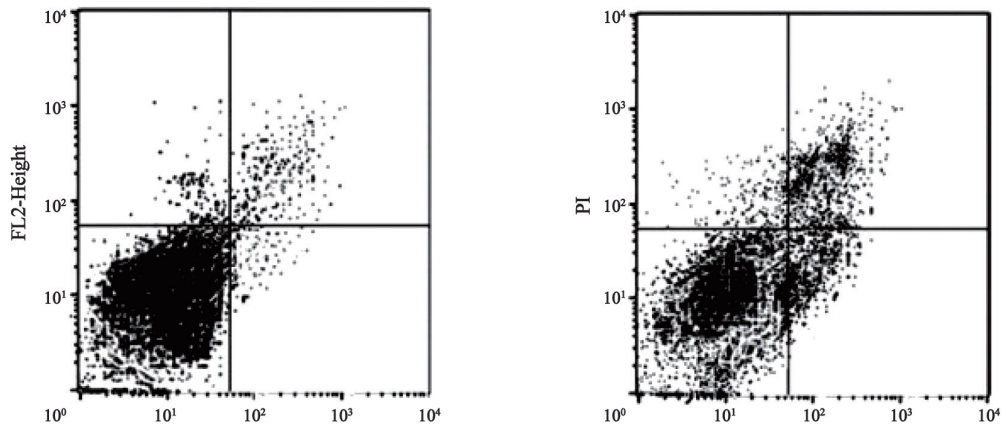


图5 流式细胞仪检测miR-224 ASO转染后的Hep3B细胞凋亡情况

Fig. 5 Hep3B cells apoptosis after transfection detecting by MTT

2.6 降低miR-224的表达对Bcl-2 mRNA和Bcl-2蛋白表达的影响

miR-224 ASO转染Hep3B细胞后, 利用荧光定量PCR和Western blot检测各组细胞中Bcl-2 mRNA和Bcl-2蛋白表达水平, 结果发现miR-224 ASO组Bcl-2 mRNA和Bcl-2蛋白表达水平明显低于对照ASO转染组, 两者差异有统计学意义($P < 0.05$, 图6)。

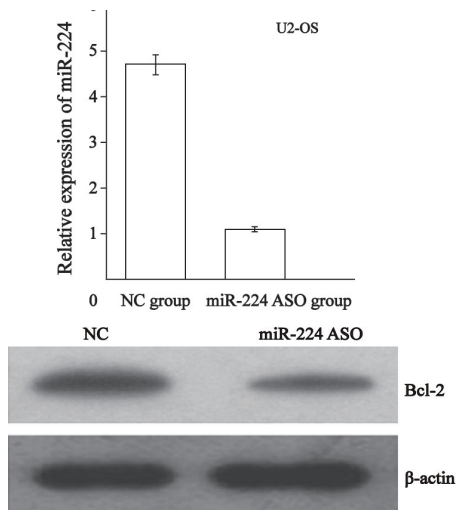


图6 Bcl-2 mRNA和蛋白在转染miR-224 ASO的Hep3B细胞中的表达情况

Fig. 6 Bcl-2 expression at protein level and mRNA level after transfection

3 讨论

miRNAs是一类新的调控因子, 在控制细胞的生长发育、分化、血管形成和凋亡等过程中

发挥着十分重要的作用^[7-8]。miRNA通过与靶mRNA的3'非编码区近乎完全互补结合在转录后水平使其降解, 或者与之不完全互补结合在翻译水平抑制蛋白合成, 从而在基因表达中发挥重要的调节作用。随着越来越多的miRNA被鉴定和深入研究, 近年来研究发现miRNAs与恶性肿瘤关系密切, 大约有调控miRNAs编码基因位的52%位于肿瘤相关染色体区域^[9-10]。有研究者认为miRNA实际上可作为癌基因或者抑癌基因而发挥作用。因此, miRNAs可能成为诊断肿瘤新的分子标志和判断肿瘤治疗及预后的分子靶点, 且miRNAs在转录后水平调节靶基因表达, 更有助于恶性肿瘤的早发现、早诊断和早治疗, 其必将具有广阔的临床应用前景^[11]。

原发性肝癌是一种常见的恶性肿瘤, 侵袭转移快, 死亡率很高。肝癌早期症状不典型, 肝移植效果好, 肝脏来源有限, 费用高。手术并不能最终解决肝癌侵袭转移性问题。因此, 发现肝癌的早期诊疗标记物和治疗靶点具有重要意义。近年随着miRNAs研究的不断深入, 发现包括miR-122、miR-21、miR-224等在内的多个MicroRNA的异常表达与肝癌的发生、发展密切相关, 多个MicroRNA参与了肝癌的增殖、分化、凋亡和死亡等一系列过程^[12]。Li等^[13]发现miR-224在肝癌细胞HepG2中表达上调且参与细胞的侵袭和转移。最近Ding等^[14]研究发现miR-224通过HOXD10

影响肝癌细胞Hep3B细胞迁移,但miR-224对肝癌Hep3B细胞增殖、凋亡的作用尚不清楚。

我们首先利用实时荧光定量PCR检测转染miR-224 ASO与对照组Hep3B miRNA表达,结果发现miR-224在转染组中受到明显抑制,两者差异有统计学意义。这表明miR-224在肝细胞癌的发生、发展中可能发挥重要作用。目前有大量研究针对目的miRNA设计相应的ASO来研究miRNA在细胞中的生物学功能^[16-17]。为了进一步分析miR-224对Hep3B细胞功能的影响,我们首先通过转染miR-224 ASO降低Hep3B细胞中miR-224的表达,同时利用MTT方法检测降低miR-224的表达后Hep3B细胞生长情况,结果发现转染miR-224 ASO的Hep3B细胞存活率明显降低。此外,我们运用克隆形成实验还观察到转染miR-224 ASO后,Hep3B细胞克隆形成率比对照ASO组明显减少。同时我们在活体内实验进一步证实稳定转染miR-224 ASO组Hep3B细胞皮下形成肿瘤的体积减小较对照ASO组显著。这都表明miR-224在骨肉瘤细胞生长中起着非常重要的作用。

本研究结果还发现转染miR-224 ASO组Bcl-2 mRNA和蛋白水平明显下降。这表明miR-224可能通过调节Bcl-2表达而影响细胞凋亡,从而达到对肿瘤细胞增殖能力的调控。

综上所述,miR-224在调控Hep3B的增殖和凋亡方面发挥重要作用,其很可能成为一个肝细胞癌新的癌前标志物,为肝细胞癌临床基因治疗提供新的靶点。

[参 考 文 献]

- [1] CROCE C M, CALIN G A. miRNAs cancer, and stem cell division [J]. *Cell*, 2005, 122 (1): 6-7.
- [2] CHEN C Z, LI L, LODISH H F, et al. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation [J]. *Science*, 2004, 303 (5654): 83-86.
- [3] MURAKAMI Y, YASUDA T, SAIGO K, et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues [J]. *Oncogene*, 2006, 25: 2537-2545.
- [4] OBERG A L, FRENCH A J, SARVER A L, et al. miRNA

expression in colon polyps provides evidence for a multihit model of colon cancer [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e20465.

- [5] LI Q, WANG G, SHAN J L, et al. MicroRNA-224 is upregulated in HepG2 cells and involved in cellular migration and invasion [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010, 25: 164-171.
- [6] ZHANG W, RAN S, SAMBADE M, et al. A monoclonal antibody that blocks VEGF binding to VEGFR2 (KDR/Flk-1) inhibits vascular expression of Flk-1 and tumor growth in an orthotopic human breast cancer model [J]. *Angiogenesis*, 2002, 5 (1-2): 35-44.
- [7] CROCE C M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer [J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10: 704-714.
- [8] STEFANI G, SLACK F J. Small non-coding RNAs in animal development [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9: 219-230.
- [9] WANG Y, LEE C G. Role of miR-224 in hepatocellular carcinoma: a toll for possible therapeutic intervention [J]. *Epigenomics*, 2011, 3(2): 235-243.
- [10] 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): 565-575.
- [11] JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, et al. Cancer statistics, 2008 [J]. *CA Cancer J Clin*, 58: 71-96.
- [12] WANG Y, LEE A T, MA J Z, et al. Profiling microRNA expression in hepatocellular carcinoma reveals microRNA-224 up-regulation and apoptosis inhibitor-5 as a microRNA-224-specific target [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 13205-13215.
- [13] LI Q, WANG G, SHAN J L, et al. MicroRNA-224 is upregulated in HepG2 cells and involved in cellular migration and invasion [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 25: 164-171.
- [14] DING C C, LI Q, WANG G, et al. miR-224 promotes cell migration by targeting HOXD10 in Hep3B cells [J]. *J Third Mil Med Univ*, 2014, 13: 1365-1366.
- [15] PRUEITT R L, YI M, HUDSON R S, et al. Expression of microRNAs and protein-coding genes associated with perineural invasion in prostate cancer [J]. *Prostate*, 2008, 68: 1152-1164.
- [16] HUANG L, TING D, LIN X, et al. miRNA-224 targets RKIP to control cell invasion and expression of metastasis genes in human breast cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 425(2): 127-133.
- [17] LEE Y S, KIM H K, CHUNG S, et al. Depletion of human microRNA miR-125b reveals that it is critical for the proliferation of differentiated cells but not for the down-regulation of putative targets during differentiation [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280 (17): 16635-16641.

(收稿日期: 2014-10-11 修回日期: 2015-04-23)