·论著·

miR-16对人肝癌细胞BEL-7402增殖与凋亡的影响

缪 欣[1]，丁 岚[2]，刘 浩[1]，李晓敏[1]，徐 聪[1]，贾筱琴[1]，李国利[1]

1. 扬州大学医学院病理学教研室，江苏 扬州 225009；
2. 扬州市江都人民医院病理科，江苏 扬州 225000

［摘要］ **背景与目的：***miR*-16和*miR*-15*a*基因复合体位于人13q14区域的*DLEU*2基因内含子内，是目前公认的抑癌基因之一。该基因区域的缺失与多种实体肿瘤有关，*miR*-16同时促进肿瘤细胞的凋亡。该研究旨在探讨*miR*-16对BEL-7402肝癌细胞增殖与凋亡的影响。**方法：**人肝癌细胞BEL-7402分为*miR*-16感染组(加入LV-hsa-miR-16-1慢病毒)和阴性对照组(加入阴性对照病毒)，采用倒置荧光显微镜观察细胞绿色荧光的强度；采用细胞计数试剂盒(cell counting kit-8，CCK-8)检测*miR*-16对BEL-7402肝癌细胞增殖的影响；采用流式细胞术分析*miR*-16对人肝癌细胞BEL-7402的细胞周期与凋亡的影响。**结果：**CCK-8检测结果显示，感染组细胞增殖能力明显降低($P<0.05$)；流式细胞术检测结果显示，阴性对照组BEL-7402细胞周期中G_1期细胞百分率数值明显下降，但S及G_2/M期细胞的百分率均明显上升($P<0.05$)。*miR*-16促进BEL-7402肝癌细胞凋亡。**结论：***miR*-16抑制BEL-7402肝癌细胞的增殖并促进其凋亡，*miR*-16有望成为临床肝癌靶向治疗的新靶点。

［关键词］*miR*-16；BEL-7402肝癌细胞；增殖；凋亡

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2018.01.005

中图分类号：R735.7 **文献标志码：**A **文章编号：**1007-3639(2018)01-0038-05

Effects of *miR*-16 on proliferation and apoptosis of BEL-7402 hepatocellular carcinoma cells

MIAO Xin[1], DING Lan[2], LIU Hao[1], LI Xiaomin[1], XU Cong[1],JIA Xiaoqin[1], LI Guoli[1] (1. Department of Pathology, Medical College, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China; 2. Department of Pathology, Jiangdu People's Hospital, Yangzhou 225000, Jiangsu Province, China)

Correspondence to: LI Guoli E-mail: glli@yzu.edu.cn

［**Abstract**］ **Background and purpose:** The *miR*-16 and *miR*-15*a* gene complexes are located within the intron of the *DLEU*2 gene in the human 13q14 region and are currently recognized as tumor suppressor genes. The deletion of this gene region is associated with a variety of solid tumors. *miR*-16 can promote tumor cell apoptosis. The purpose of this study was to investigate the effect of *miR*-16 on the proliferation and apoptosis of BEL-7402 hepatocarcinoma cells. **Methods:** BEL-7402 hepatocarcinoma cells were divided into *miR*-16 infection group (the plasmid is expressed by the addition of the LV-hsa-miR-16-1 lentivirus) and negative control group which was infected with *miR*-16 lentivirus (the negative control virus CON220 was added). The intensity of green fluorescence was observed using an inverted fluorescence microscope. Cell counting kit-8 (CCK-8) was used to detect the proliferation of BEL-7402 hepatocarcinoma cells. In addition, flow cytometry was performed to detect the influence of miR-16 on cell cycle and apoptosis of BEL-7402 hepatocarcinoma cells. **Results:** What we found is that, compared to the negative control group, the infected cells showed an obvious decrease in the capacity of cell proliferation. The percentage of G_1 phase cells in the BEL-7402 cell cycle was reduced apparently, whereas the S and G_2/M phase cells significantly increased ($P<0.05$). *miR*-16 virus had a very significant effect on the apoptosis of BEL-7402 hepatocarcinoma cells. **Conclusion:** *miR*-16 suppresses the proliferation capacity of BEL-7402 hepatocarcinoma cells. miR-16 is expected to be a new target for targeted liver cancer therapy.

［**Key words**］ miR-16; BEL-7402 hepatocarcinoma cells; Proliferation; Apoptosis

---

基金项目：国家自然科学基金面上项目(81273214)；江苏省普通高校专业学位研究生实践创新计划项目(SJZZ16-0267)。
通信作者：李国利 E-mail：glli@yzu.edu.cn

微小RNA(microRNA，miRNA)长度一般为18~25个核苷酸，广泛存在于真核生物中，属于高度保守与非编码的小分子单链RNA的一种。miRNA具有癌基因和抑癌基因的作用，直接或间接参与肝癌的发生、发展。成熟的*miR*-16来源于两个不同的前体*miR*-16-1和*miR*-16-2。*miR*-16-1位于人类基因组脆弱点11q24，同时也是秀丽线虫lin-4的同源基因，在人类卵巢癌、子宫癌、乳腺癌和肺癌患者体内均可发现此位点基因的缺失突变。课题组前期研究应用miRNA芯片技术筛选出肝癌组织差异表达miRNA，发现*miR*-16在肝癌组织中表达下调。推测出现*miR*-16表达的下调可能与肿瘤细胞的快速增殖有关。本实验初步探讨*miR*-16对BEL-7402肝癌细胞的增殖及凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

人BEL-7402肝癌细胞及293T细胞购自上海酶研生物科技有限公司；RPMI-1640及DMEM购自美国Gibco公司，胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司，凋亡试剂盒购自美国eBioscience公司；倒置荧光显微镜购自日本Olympus公司；流式细胞仪购自美国BD公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

配制含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和0.1 mg/mL链霉素的RPMI-1640完全培养基，接种人BEL-7402肝癌细胞株，置于37 ℃、CO_2体积分数为5%的饱和湿度培养箱中培养，细胞贴壁生长，0.25%胰酶消化传代。

1.2.2 过表达*miR*-16慢病毒稳定细胞株的建立

将慢病毒载体质粒(LV-hsa-miR-16-1)和包装质粒混合物(Lenti-Easy Packaging Mix)混合，在混合后的物质中加入脂质体(Lipofectamine™2000)，形成脂质体复合物(DNA-Lipofectamine™2000复合物)，加入293T细胞(要求293T细胞的细胞密度在80%左右，并处于对数生长期、已进行共转染)，将集中的细胞混匀，置于37 ℃、CO_2体积分数为5%的培养箱中进行细胞培养。转染8 h后，将培养液更换为DMEM细胞培养基(含胎牛血清10%)，培养48~72 h后，收集慢病毒颗粒的细胞上清液，将搜集到的上清液进行浓缩与纯化处理，可得到滴度与纯度均较高的慢病毒浓缩液，转染293T细胞后进行病毒滴度测定。

1.2.3 慢病毒感染人BEL-7402肝癌细胞

感染前24 h，取对数生长期的BEL-7402肝癌细胞，胰酶消化制成细胞悬液，计数调整细胞的浓度，置于37 ℃、CO_2体积分数为5%的培养箱中培养，待细胞融合度达到30%左右时停止。根据BEL-7402肝癌细胞的MOI值，加入适量的浓缩病毒液，感染16 h后，更换培养基；感染96 h后，采用倒置荧光显微镜观察绿色荧光的强度，检测慢病毒颗粒的感染效率。

1.2.4 采用细胞计数试剂盒(cell counting kit-8，CCK-8)检测细胞增殖

选择对数生长期的细胞，胰酶消化后培养基重悬制成细胞悬液。使用血球计数板计数细胞，以每孔2 000个细胞的标准，于96孔板中进行细胞接种。实验分为miR-16感染组和阴性对照组，每组5个复孔，每孔100 μL，置于37 ℃、CO_2体积分数为5%的培养箱中培养。分别培养0、1、2、3、4和5 d后，每孔加入10 μL CCK-8，2~4 h后，振荡器振荡5~10 min，酶标仪450 nm进行吸光度(D)值检测，以各时间点的D值为依据，绘制出详细的细胞生长曲线图。

1.2.5 流式细胞术检测细胞周期

确保细胞还未进入生长平台期时，选择生长覆盖率在80%左右的细胞进行试验，收集转染48 h的人BEL-7402肝癌细胞，PBS洗涤，细胞浓度调整为1×10^6/mL，使用70%的乙醇进行固定，加入36 μL的PI(2 mg/mL)、14.5 μL的RNase(10 mg/mL)及1 450 μL的PBS重悬，室温避光温育10 min，流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡

收集人BEL-7402肝癌细胞，将细胞浓度调整为1×10^6/mL，加入10 μL的annexin V-PE进行细胞染色，室温避光10~15 min，流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.3 统计学处理

应用SPSS 17.0软件对本次研究中的数据进行处理和统计，实验数据为计量资料，用$\bar{x}\pm s$表示，采用t检验对组间差别进行检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

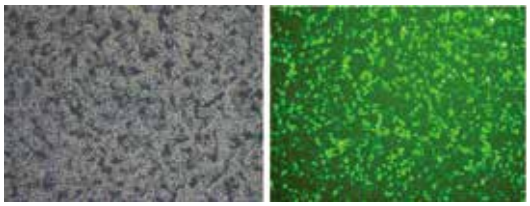
2 结 果

2.1 过表达*miR*-16慢病毒稳定细胞株

目的质粒转染293T细胞荧光显微镜观察结果见图1。过表达*miR*-16慢病毒BEL-7402肝癌细胞稳定株荧光显微镜下观察结果见图2。

2.2 感染*miR*-16慢病毒对BEL-7402肝癌细胞增殖能力的影响

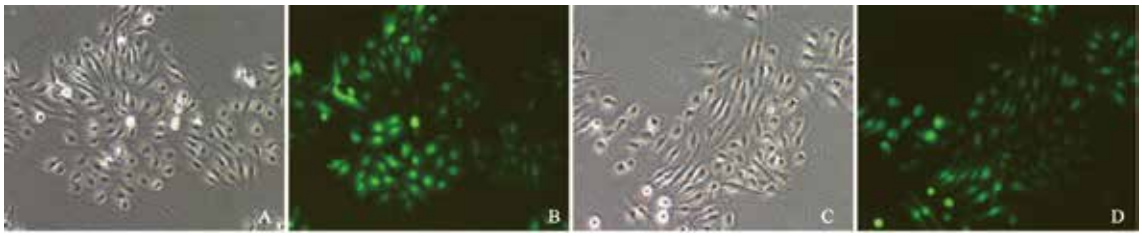
miR-16慢病毒对BEL-7402肝癌细胞感染后，采用CCK-8检测细胞的生长情况，根据细胞的生长状况，绘制细胞增殖曲线图(图3)。结果显示，感染组在2 d前差异无统计学意义($P>0.05$)，而在2~5 d差异有统计学意义($P<0.05$)。表明感染*miR*-16慢病毒后，BEL-7402肝癌细胞的增殖能力明显降低。



(×200)

图 1 目的质粒转染293T细胞

Fig. 1 The target plasmid was transfected into 293T cells



(×100)

图 2 过表达*miR*-16慢病毒稳定细胞株

Fig. 2 Over-expression of *miR*-16 lentivirus stable cell lines

A, B: LV-hsa-miR-16-1 group; C, D: LV-hsa-miR-CON220 group

2.3 感染*miR*-16慢病毒对BEL-7402肝癌细胞周期的影响

BEL-7402肝癌细胞感染*miR*-16慢病毒，流式细胞术检测细胞周期(图4)。与阴性对照组相比，BEL-7402细胞周期的G_1期细胞百分率下降，S及G_2/M细胞的百分率数值上升，差异有统计学意义($P<0.05$)，证明*miR*-16可使BEL-7402肝癌细胞部分停滞于S及G_2/M期，延缓了细胞分裂的速度，抑制了细胞增殖。

2.4 感染*miR*-16慢病毒对Bel-7402肝癌细胞凋亡的影响

人BEL-7402肝癌细胞感染*miR*-16慢病毒后，采用流式细胞仪对两组细胞凋亡率进行检测，差异有统计学意义($P<0.05$，图5、6)，证明*miR*-16对7402肝癌细胞的凋亡有较为明显的作用和影响。

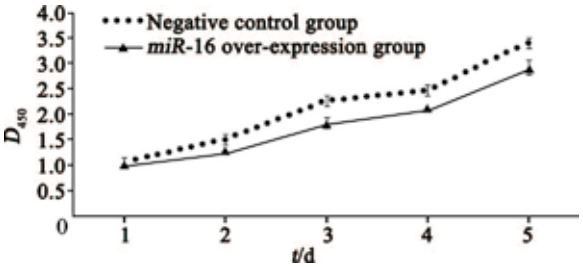


图 3 过表达*miR*-16慢病毒对BEL-7402肝癌细胞增殖能力的影响

Fig. 3 Effects of over-expression of *miR*-16 lentivirus on the proliferation of BEL-7402 hepatocarcinoma cells

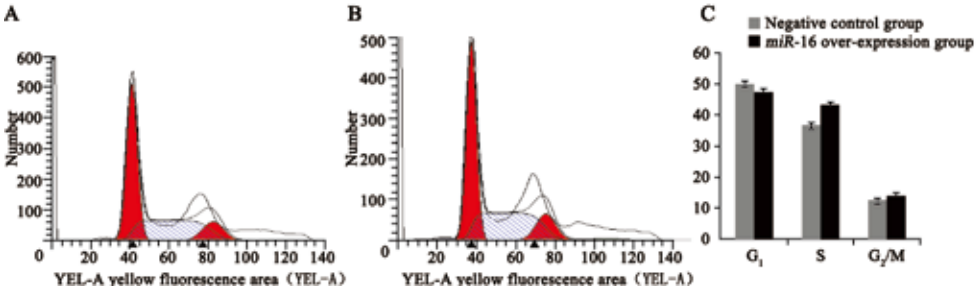


图 4　过表达miR–16对Bel–7402肝癌细胞周期影响

Fig. 4　Overexpression of miR-16 on cell cycle of BEL-7402 hepatocarcinoma cells

A: Negative control group cell cycle distribution; B: Cell cycle distribution of miR-16 infection group; C: Cell cycle histogram

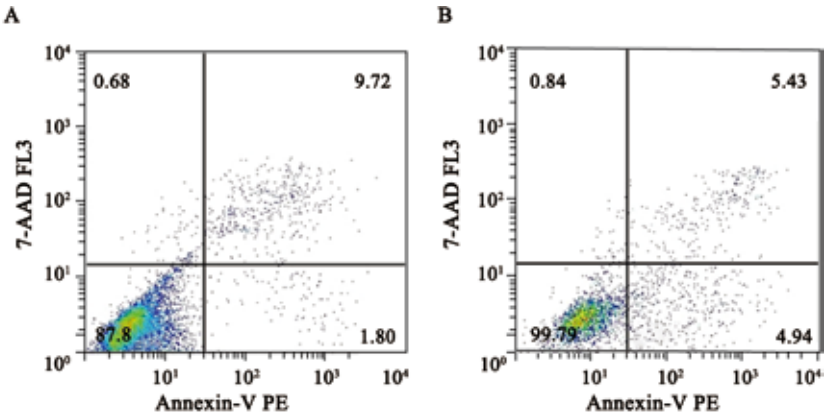


图 5　流式细胞术检测两组细胞凋亡情况

Fig.5　Detect the apoptosis of the two groups by flow cytometry

A: *miR*-16 infectious group; B: Negative control group

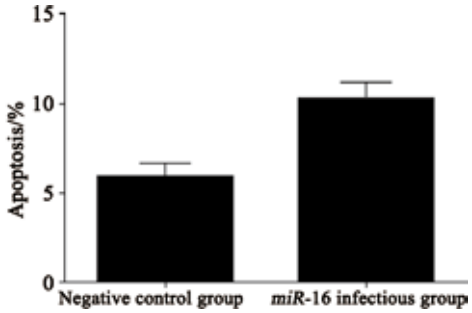


图 6　过表达*miR*–16对BEL–7402肝癌细胞凋亡的影响

Fig. 6　Effects of over-expression of miR-16 on apoptosis of BEL-7402 hepatocarcinoma cells

3　讨　　论

肝癌对于人类的生存健康有着极大的威胁，属于病死率较高的恶性肿瘤。据统计，近年来我国死于肝癌的患者逐渐增多，年平均值已达到30万左右，占全球肝癌死亡人数的50%左右，肝癌的高死亡率为我国医学界造成了极大的难题和负担[1-4]。肝癌治疗研究虽然已深入至基因水平，但目前仍没有找出对治疗有效且具有特异性的分子靶点。

miRNA目前多数存在于真核生物中，属于高度保守及非编码的小分子单链RNA的一种。*miR*-16/*miR*-15*a*主要靶向抑制*Bcl*-2、*WT*-1、*WNT*3*A*、*MCA*1、*MCL*1及*CCDN*1等致癌基因的活性，进而促进肿瘤细胞的凋亡[5]。*miR*-16最早被发现在白血病中表达下调[7]，*miR*-16在肝癌、胃癌、垂体腺瘤、肺癌、前列腺癌和多发性骨髓瘤中表达均下调[8]。近年来研究发现，*miR*-16/*miR*-15*a*亦可靶向抑制血管内皮生长因子的分泌而发挥抗肿瘤活性[6]。

本研究表明，相对于阴性对照组，BEL-7402细胞周期中G_1期细胞百分率下降，S及G_2/

M期细胞的百分率上升，表明*miR*-16可使BEL-7402肝癌细胞部分停滞于S及G_2/M期，从而延缓细胞分裂的速度。因此，进一步证实了*miR*-16抑制癌细胞的机制之一是通过影响细胞周期从而抑制细胞的增殖。

有研究报道，*miR*-16负调控*Bcl*-2，*miR*-16的缺失或下调，导致*Bcl*-2表达的升高，促进白血病、淋巴瘤和前列腺癌的发生。进一步研究发现，*miR*-16通过激活外源性APAF-1-胱天蛋白酶-9-PARP凋亡途径，参与凋亡过程[11]。本研究初步证实，*miR*-16能抑制肝癌Bel-7402细胞增殖及促进细胞凋亡，而*miR*-16介导肝癌细胞增殖和调节细胞凋亡的分子机制，仍需后续实验进一步探讨。

综上，本研究发现，*miR*-16过表达能抑制肝癌BEL-7402细胞增殖及促进细胞凋亡，提示*miR*-16有望成为肝癌基因治疗重要的新靶点。相信随着研究的深入，*miR*-16在癌症治疗方面的应用价值将逐渐展现出来。

［参 考 文 献］

［1］ PARK J A, LEE K Y, OH Y J, et al. Activation of caspase-3 protease via a Bcl-2 insensitive pathway during the process of ginsenoside Rh2-inducedapoptosis［J］. Cancer Lett, 1997, 121(1): 73.

［2］ NAKATA H, KIKUCHI Y, TODE T, et al. Shinomiya inhibitory effects of ginsenoside Rh2 on tumor growth in nude mice bearing human ovarian cancer cells［J］. J Cancer Res, 1998, 89(7): 733.

［3］ ZENG X L, TU Z G. *In vitro* induction of differentiation by ginsenoside Rh2 in SMMC-7721 hepatocarcinoma cell line［J］. Pharmacol Toxicol, 2003, 93(6): 275.

［4］ OH M, CHOI Y H, CHOI S, et al. Anti-proliferating effects of ginsenoside Rh2 on MCF-7 human breast cancer cells［J］. Int J Oncol, 1999, 14(5): 869-875.

［5］ PEKARSKY Y, CROCE C M. Role of miR-15/16 in CLL［J］. Cell Death Differ. 2015, 22(1): 6-11.

［6］ TUNG Y T, HUANG P W, CHOU Y C, et al. Lung tumorigenesis induced by human vascular endothelial growth factor (hVEGF)-A165 overexpression in transgenic mice and amelioration of tumor formation by miR-16［J］. Oncotarget, 2015, 6(12): 10222-10238.

［7］ DAL BO M, ROSSI F M, ROSSI D, et al. 13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia［J］. Genes Chromosomes Cancer, 2011, 50(8): 633-643.

［8］ CIMMINO A, CALIN G A, FABBRI M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2［J］. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(39): 13944-13949.

［9］ STELLER H. Mechanisms and genes of celluar suicide［J］. Science, 1995, 267(5203): 1445.

［10］ RONINSON I B. Tumor senescence as a determinant of drug response *in vivo*［J］. Drug Resist Updat, 2002, 5(5): 204-208.

［11］ ZHANG X, WAN G, MLOTSHWA S, et al. Oncogenic Wip1 phosphatase is inhibited by miR-16 in the DNA damage signaling pathway［J］. Cancer Res, 2010, 70(18): 7176-7186.

（收稿日期：2017-08-09 修回日期：2017-10-21）