

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.08.019

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190130.0856.002.html(2019-01-30)

miR-193a 在肝癌中的表达水平及临床意义*

李宝华, 戈海泽, 刘树业[△]

(天津市第三中心医院检验科 300170)

[摘要] **目的** 探讨微 RNA-193a(microRNA-193a, miR-193a)在肝癌中的表达水平,并在分子水平研究其相关作用机制。**方法** 数据库分析和 RT-PCR 试验检测人肝癌组织及其癌旁组织中 miR-193a 的表达水平; CCK-8 法检测 miR-193a 对 Huh7 细胞活性的影响;细胞集落形成和 Transwell 试验分别检测 miR-193a 对 Huh7 细胞集落形成、迁移和侵袭能力的影响;荧光素酶报告试验检测 miR-193a 与其候选靶基因 KRAS 的靶向关系;RT-PCR 和 Western blot 检测 miR-193a 对 KRAS mRNA 和蛋白水平的影响。**结果** 与癌旁组织比较,肿瘤组织中 miR-193a 的表达水平明显降低,这与 GEO 和 TCGA 数据库中的数据结果一致;转染 miR-193a mimics 的肝癌细胞 Huh7 的细胞活性、集落形成能力、迁移能力及侵袭能力都低于转染 miR-NC 组;miR-193a 能够直接靶向 KRAS 并下调其表达。**结论** miR-193a 通过下调 KRAS 表达抑制了肝癌细胞增殖、迁移和侵袭能力。

[关键词] 肝肿瘤;miR-193a;Huh7 细胞;KRAS

[中图法分类号] R735.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)08-1334-05

The role and clinical significance of miR-193a in hepatocellular carcinoma*

LI Baohua, GE Haize, LIU Shuye[△]

(Department of Clinical Laboratory, Tianjin Third Central Hospital, Tianjin 300170, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression level of miR-193a in hepatocarcinoma and study its related mechanism at the molecular level. **Methods** Database analysis and RT-PCR were used to detect the expression of miR-193a in human hepatocarcinoma tissues and adjacent tissues. CCK-8 method was used to detect the effect of miR-193a on Huh7 cell activity. Cell colony formation and Transwell assay were used to detect the effect of miR-193a on colony formation, migration and invasion ability; luciferase reporter assay to detect the targeting relationship between miR-193a and its candidate target gene KRAS; RT-PCR and Western blot to detect the effect of miR-193a on KRAS mRNA and protein levels. **Results** Compared with paracancerous tissues, the expression level of miR-193a in tumor tissues was significantly decreased, which was consistent with the results in the GEO and TCGA databases. The cell viability, colony forming ability, migration ability and invasive ability of Huh7 transfected with miR-193a mimics was lower than that of the miR-NC group (transfected with miR-NC). miR-193a was able to directly target KRAS and down-regulate its expression. **Conclusion** miR-193a mimics suppressed cell proliferation, cell migration and invasion by targeting KRAS expression.

[Key words] liver neoplasms; miR-193a; Huh7 cells; KRAS

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种全球常见的恶性肿瘤,也是致死率排名第3的肿瘤,不良预后和高发病率使它成为世界关注的恶性肿瘤之一^[1-2]。目前,临床上对于早期肝癌的治疗方式主要有手术切除和原位肝移植这两种,但这些疗法存在很大的局限性,只对部分患者适用,而且也未能达到预期的疗效^[3-4]。因此,临床上需要治疗肝癌的新策略。

肝癌的发病机制是一个极其复杂的过程;研究表明一些致病因子可促使慢性肝炎进一步恶化,并伴随

有基因表达水平和表观遗传修饰的改变,这很可能是导致抑癌基因沉默和原癌基因激活的主要原因;在肝癌发生发展的过程中某些微 RNAs(microRNA, miRNAs)的表达水平也变得异常^[5-6]。目前,很多研究想通过基因疗法来得到可靠的癌症检测指标和治疗靶点;但是,这些分子标志物由于很多原因在临床上并没有被广泛应用^[7];因此,这些不足更促使医学者们想进一步地了解肝癌的发病机制。

miRNA 是一类广泛存在于动植物中的单链非编

* 基金项目:天津市教育科学“十三五”规划课题(VE3114);天津市医院协会医院管理研究项目 2016 年度立项课题(2016zch04);雅培病毒性肝炎诊疗课题资助项目(2013-ADD)。 作者简介:李宝华(1960-),主管检验师,本科,主要从事临床检验诊断学研究。 △ 通信作者, E-mail: lshye@163.com。

码的小 RNA,由内源基因编码,长度在 18~22 个核苷酸,其主要作用于基因的转录后调控。研究表明,在肿瘤相关的疾病中,miRNA 对细胞的增殖、分化、凋亡、迁移和侵袭等起重要的调控作用^[8],miRNA 的表达差异造成了肿瘤的发展变化。因此,miRNA 在癌症研究方面具有非常重要的意义^[9-10]。已有研究发现,miR-214^[11]和 miRNA-491-5p^[12]等表达的失调与肝癌的发生发展有着密切的联系。miRNA 可靶向作用特定的抑癌或致癌基因,通过改变它们的表达量来调控肝癌的进程^[10]。本试验主要探讨 miR-193a 在肝癌组织和癌旁组织中的表达水平,以及其对肝癌细胞 Huh7 的增殖、迁移、侵袭能力及 KRAS 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 本研究中的肝癌组织和其配对的癌旁组织均取自本院检验科。所有标本的获取都经过患者的知情同意,并且得到本院医学伦理道德委员会的批准。术后立即将标本置于液氮罐内备用。人肝癌细胞 Huh7 购自上海奥陆生物科技有限公司。DMEM 培养基和胎牛血清均购于美国 HyClone 公司;胰酶购于日本 Taraka 公司;转染试剂 Lipofectamine 2000、TRIzol 试剂和反转录试剂盒均购于美国 Invitrogen 公司;CCK-8 购于上海碧云天生物有限公司;实时荧光定量 PCR 试剂盒购于瑞士 Roche 公司;蛋白裂解液 RIPA 购于北京普利莱基因技术有限公司;KRAS 和 GAPDH 抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染 Huh7 细胞用含有 10% 胎牛血清,100 U/mL 青、链霉素的 DMEM 培养基,置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。取对数生长期细胞,分别按照 6 孔板 5×10⁴/孔或者 96 孔板 5×10³/孔的量铺板,18~24 h 后按照 Lipofectamine 2000 试剂盒说明书转染,分为 miR-NC 和 miR-193 mimics 组,按既定的时间做相关的试验。

1.2.2 CCK-8 检测细胞增殖 细胞转染 0、24、48、72 h 后每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,避光培养 2 h 后测定 450 nm 处吸光度(OD)值,细胞活性按照 CCK-8 试剂盒说明书计算并作图。

1.2.3 集落形成试验 Huh7 细胞转染 24 h 后收集并计数,按照 500/孔的数量接种在 12 孔板内,每 3 天更换培养基 1 次,大约 2 周后处理细胞。先用 1×PBS 清洗 1 遍,再用结晶紫染料染色并计数。

1.2.4 细胞迁移试验 Huh7 细胞转染 24 h 后,将 miR-NC 和 miR-193 mimics 组细胞用无血清的 DMEM 重悬,各取 200 μL 加到 Transwell 小室中,每孔 5×10⁴ 个 Huh7 细胞,下室加 600 μL 含有 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基,每组设 3 个复孔,48 h 后用 4% 的多聚甲醛室温固定并用 0.1% 结晶紫染色,拭去未迁移的细胞后拍照并计数。

1.2.5 细胞侵袭试验 用无血清 DMEM 以 1:8 的

比例稀释 Matrigel,用预冷的枪头吸 100 μL 加到 Transwell 小室中,在细胞培养箱放置 1 h 使之聚合。后续试验步骤同细胞迁移试验。

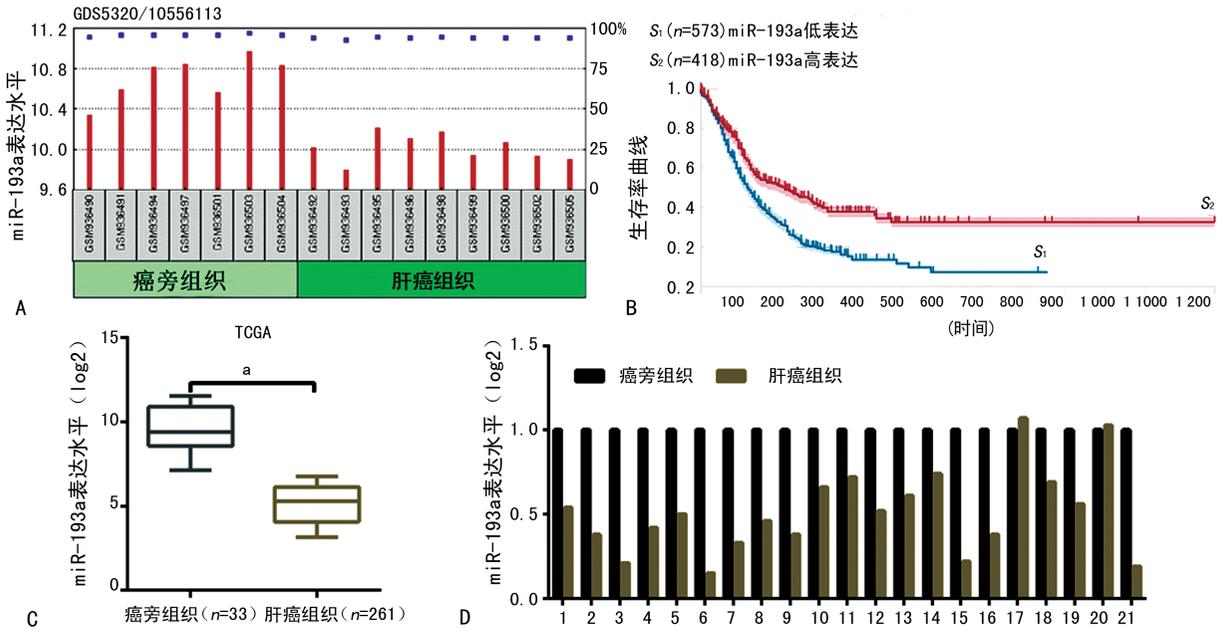
1.2.6 实时荧光定量 PCR 检测 miR-193a mRNA 和 KRAS mRNA 的表达水平 患者组织加液氮研磨后用 TRIzol 法提取总 RNA。转染后的细胞经过 48 h 后用 TRIzol 法提取总 RNA。用分光光度计检测总 RNA 的纯度。合格后反转录成 cDNA,以 U6 为内参进行荧光定量 PCR 分析,试验步骤按照试剂盒说明书进行。试验中所需的引物序列如下:miR-193a 正向引物 5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTG CAC TGG ATA CGA CTC ATC TC-3';反向引物:5'-TGC GGT GGG UCA AAG CGG GC-3';U6 正向引物:5'-TGC GGG TGC TCG CTT CGG CAG C-3';U6 反向引物:5'-TGC GGG TGC TCG CTT CGG CAG C-3';U6-RT:5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA AAA TAT GGA AC-3';Oligo-dT:5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT-3';KRAS 正向引物 5'-GGG TGT TGA TGA TGC CTT CT-3';KRAS 反向引物 5'-TAC TGG CAC TTA GAG GAA-3'。

1.2.7 Western blot 检测 KRAS 蛋白的表达水平 细胞收集后用 1×PBS 洗 1 遍,加入 RIPA 裂解液重悬后冰上裂解 30 min,中间再混匀 1 次,4 °C、12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,用 BCA 蛋白浓度定量试剂盒完成浓度检测。变性后的蛋白用 10% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜,5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h,加一抗(1:1 000)4 °C 敷过夜,1×TBST 洗 3 遍,每遍 10 min;室温敷二抗(1:1 000)1 h,1×TBST 洗 3 遍,每遍 10 min。最后滴加发光液并在暗室曝光。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件分析数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

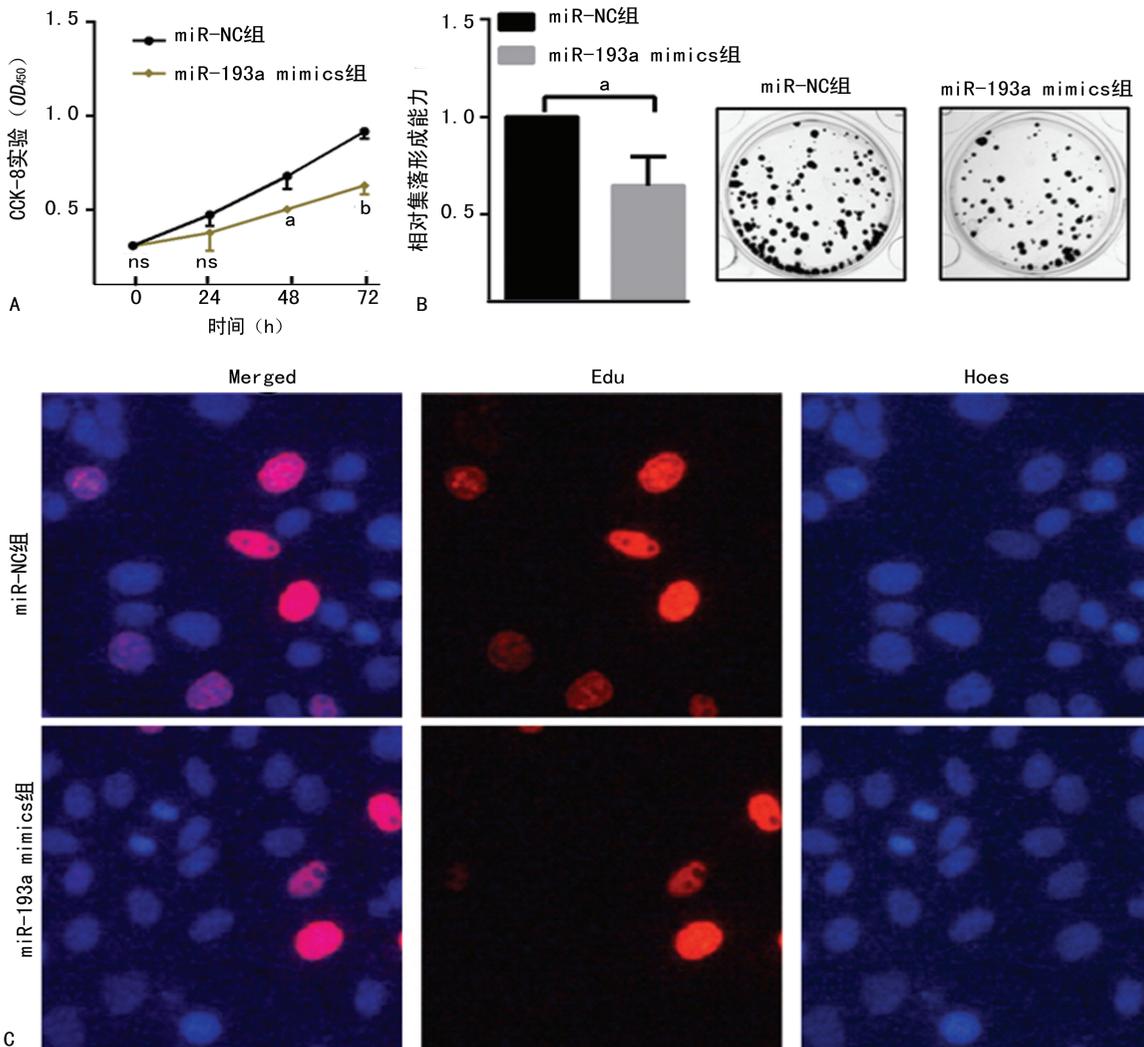
2 结果

2.1 miR-193a 在肿瘤组织中表达水平 在 GEO 数据库中分析 miR-193a 的表达水平,结果发现与相应的癌旁组织比较,miR-193a 在肝癌组织中低表达(图 1A)。在 TCGA 数据库分析异常表达的 miR-193a 患者的生存率,结果发现,在 miR-193a 低表达组(*n*=573)和高表达组(*n*=418)中,miR-193a 高表达组的个体存活率有所延长(图 1B)。TCGA 数据库分析结果表明,与相应的癌旁组织比较,miR-193a 在肝癌组织中是低表达的(图 1C)。本研究对 21 对肝癌患者的肝癌组织和癌旁组织进行研究发现,有 19 例患者的肝癌组织中 miR-193a 的表达量均低于癌旁组织(图 1D)。这些结果表明,miR-193a 在肝癌组织中的表达水平较癌旁组织低。



A: GEO 数据库分析结果; B: miR-193a 的表达对患者个体生存时间的影响; C: TCGA 数据库分析结果; D: RT-qPCR 分析肝癌组织和癌旁组织中 miR-193a 的表达水平; ^a: $P < 0.05$, 与癌旁组织比较

图 1 miR-193a 在肿瘤组织中的表达



A: CCK-8 试验; B: 集落形成试验; C: Edu 细胞增殖试验; ^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$, 与 miR-NC 组比较

图 2 miR-193a 对不同组 Huh7 细胞增殖的影响

2.2 miR-193a 对 Huh7 细胞增殖能力的影响

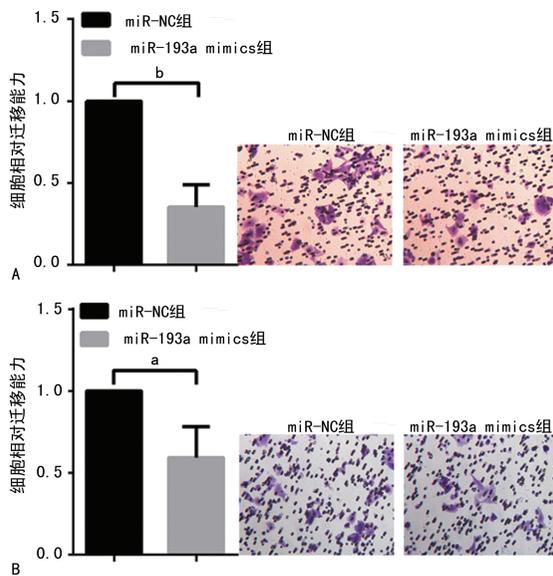
Huh7 细胞转染 miR-NC 和 miR-193a mimics 后, CCK-8 试验表明, miR-193a mimics 组的细胞活性明显低于 miR-NC 组(图 2A)。集落形成试验探讨 miR-193a 对 Huh7 细胞集落形成能力的影响, 试验结果表明, miR-193a mimics 组 Huh7 细胞的集落形成能力较 miR-NC 组受到了明显的抑制(图 2B)。EdU 细胞增殖试验发现, 与 miR-NC 组比较, miR-193a mimics 组 Huh7 细胞增殖能力明显受抑制(图 2C)。上述结果表明 miR-193a 会降低 Huh7 细胞的活性和集落形成能力。

2.3 miR-193a 对 Huh7 细胞迁移和侵袭能力的影响

Transwell 试验发现, miR-193a mimics 组中 Huh7 细胞的迁移和侵袭能力都低于 miR-NC 组, 见图 3。表明高表达 miR-193a 抑制了 Huh7 细胞的迁移和侵袭能力。

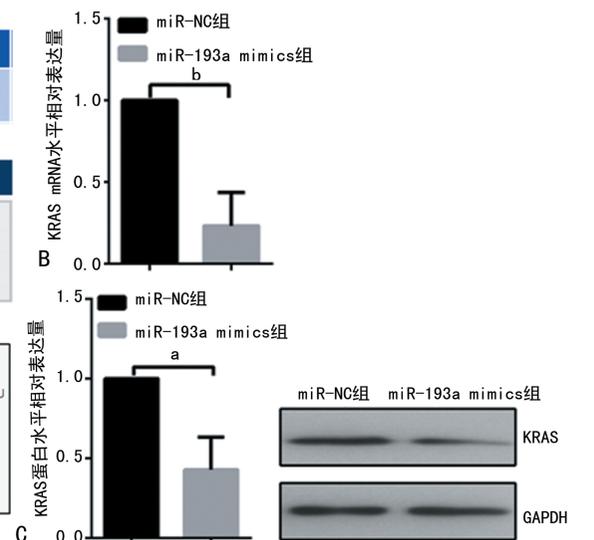
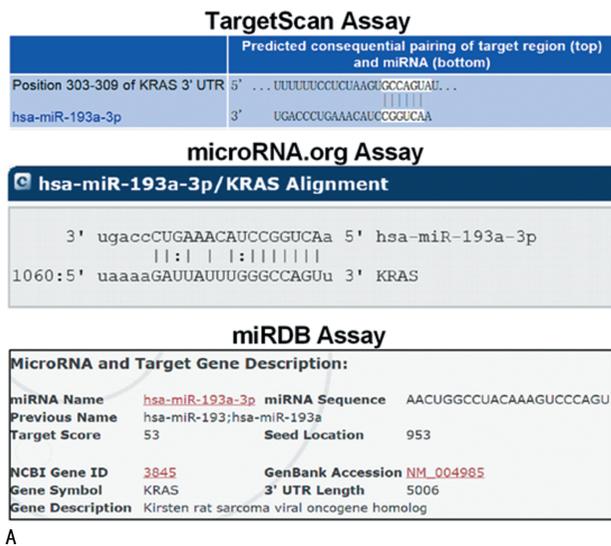
2.4 miR-193a 直接靶定并下调 KRAS 为了进一步研究 miR-193a 作用于 Huh7 细胞可能相关的分子机制, 笔者采用 TargetScan human7.1、miRNA.org 和 miRDB 等生物信息学软件进行分析显示, KRAS 可能是 miR-193a 的一个候选靶基因(图 4A)。采用 RT-PCR 和 Western blot 验证, 结果显示, miR-193a

mimics 组 KRAS 在 mRNA 和蛋白水平都低于 miR-NC 组(图 4B、C)。这表明 miR-193a 抑制了 KRAS 的表达, 进而影响肿瘤细胞的增殖等特性。



A: Transwell 试验检测 miR-193a 对 Huh7 细胞迁移能力的影响; B: Transwell 试验检测 miR-193a 对 Huh7 细胞侵袭能力的影响; ^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$, 与 miR-NC 组比较

图 3 miR-193a 对不同组 Huh7 细胞迁移和侵袭的影响



A: 生物信息学软件预测 miR-193a 可能的靶点; B: miR-193a 对 KRAS mRNA 水平的影响; C: miR-193a 对 KRAS 蛋白水平的影响; ^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$, 与 miR-NC 组比较

图 4 miR-193a 对 KRAS 表达的影响

3 讨论

随着对 miRNA 在不同肿瘤或相关疾病中的研究不断深入, 研究者发现 miRNA 的差异表达与疾病的发生发展有着密切的联系, miRNA 可能具有抑癌或促癌的作用。例如, miR-144 和 miR-122-3p 分别通过靶向 RUNX1 和 FOXO, 使卵巢癌细胞 OC 和肺癌细胞 A549 的增殖等特性受到严重抑制^[13-14], 而 miR-1468 和 miR-451 在不同的肿瘤中却起到促癌作

用^[15-16]。说明 miRNA 在将来可能会作为癌症进程中临床检测指标和治疗靶点^[17]。

很多研究表明, miR-193a 可能是 1 种抑癌的 miRNA, 与癌细胞的增殖、分化和迁移密切相关^[18-19]。已有研究表明, miR-193a 在肿瘤中的表达水平明显低于癌旁组织, 且肿瘤细胞的增殖及集落形成能力也被 miR-193a 所抑制^[20]。miR-193a 队具有抑癌作用以外, 也有报道称, 在人类胃癌组织和胃癌细胞系中

miR-193a 的表达水平有所升高,证明它可能在不同的组织中也有促癌作用^[21]。因此,研究 miR-193a 的表达水平及作用是必要的。

本研究探索了 miR-193a 对肝癌的作用及相关的机制。试验表明与癌旁组织比较,miR-193a 在肝癌组织中的表达显著降低;通过转染 miR-NC 和 miR-193a mimics,发现 Huh7 细胞的增殖、迁移和侵袭能力明显被 miR-193a 表达的升高所抑制。这表明 miR-193a 起到了抑制肝癌发展的作用。

为了更进一步的探讨 miR-193a 在肝癌发展过程中的作用,笔者用生物信息学方法预测了 miR-193a 的下游靶点为 KRAS,RT-PCR 和 Western blot 两种试验结果都表明过表达 miR-193a 后降低了 KRAS mRNA 和蛋白水平的表达。

综上所述,本研究证明 miR-193a 在肝癌中的表达水平有明显的降低,进而发挥抑制肝癌细胞增殖、迁移和侵袭的作用,而这一作用可能是由 miR-193a 直接靶向 KRAS 引起的。

参考文献

- [1] FORNER A J L, BRUIX J. Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2012, 379(9822): 1245-1255.
- [2] MCGLYNN K A, PETRICK J L, LONDON W T. Global epidemiology of hepatocellular carcinoma: an emphasis on demographic and regional variability[J]. *Clin Liver Dis*, 2015, 19(2): 223-238.
- [3] SCHLACHTERMAN A, CRAFT J, HILGENFELDT E, et al. Current and future treatments for hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(28): 8478-8491.
- [4] 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.
- [5] LIN M S, DUAN B S, HU J F, et al. Decreased expression of miR-193a-3p is associated with poor prognosis in colorectal cancer[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(1): 1061-1067.
- [6] TAKAHASHI H, TAKAHASHI M, OHNUMA S, et al. miRNA-193a-3p is specifically down-regulated and acts as a tumor suppressor in BRAF-mutated colorectal cancer [J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1): 723.
- [7] ZHANG W, HE H, ZANG M, et al. Genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2015, 149(5): 1226-1239.
- [8] SUN Y, XU R F, HUANG J, et al. Insulin-like growth factor-1-mediated regulation of miR-193a expression promotes the migration and proliferation of c-kit-positive mouse cardiac stem cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 41.
- [9] LI T, SUN X Z, XU K W. The suppressing role of miR-622 in renal cell carcinoma progression by down-regulation of CCL18/MAPK signal pathway [J]. *Cell Biosci*, 2018, 8: 17.
- [10] CHU Y, JIANG M Z, DU F, et al. miR-204-5p suppresses hepatocellular cancer proliferation by regulating homeoprotein SIX1 expression[J]. *FEBS Open Bio*, 2018, 8(2): 189-200.
- [11] LIU Y, LIN J, ZHAI S J, et al. MicroRNA-214 suppresses ovarian cancer by targeting beta-Catenin [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(4): 1654-1662.
- [12] ZHANG J J, REN J C, HAO S J, et al. MiRNA-491-5p inhibits cell proliferation, invasion and migration via targeting JMJD2B and serves as a potential biomarker in gastric cancer[J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(2): 525-534.
- [13] HAN S, ZHU J, ZHANG Y, et al. miR-144 Potentially suppresses proliferation and migration of ovarian cancer cells by targeting RUNX1[J]. *Med Sci Monit Basic Res*, 2018, 24: 40-46.
- [14] WANG W, YANG J S, YU F L, et al. MicroRNA-122-3p inhibits tumor cell proliferation and induces apoptosis by targeting Forkhead box O in A549 cells[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(2): 2695-2699.
- [15] LIU Z I, WANG Y F, DOU C W, et al. MicroRNA-1468 promotes tumor progression by activating PPAR-gamma-mediated AKT signaling in human hepatocellular carcinoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 49.
- [16] CHEN M B, WEI M X, HAN J Y, et al. MicroRNA-451 regulates AMPK/mTORC1 signaling and fascin1 expression in HT-29 colorectal cancer[J]. *Cell Signal*, 2014, 26(1): 102-109.
- [17] INAMURA K, ISHIKAWA Y. MicroRNA in lung cancer: novel biomarkers and potential tools for treatment[J]. *J Clin Med*, 2016, 5(3): 36.
- [18] KHOO C P, ROUBELAKIS M G, SCHRADER J B, et al. miR-193a-3p interaction with HMGB1 downregulates human endothelial cell proliferation and migration[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 44137.
- [19] FAN Q, HU X T, ZHANG H Y, et al. MiR-193a-3p is an important tumour suppressor in lung cancer and directly targets KRAS[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(4): 1311-1324.
- [20] LIU Y F, XU X, XU X L, et al. MicroRNA-193a-3p inhibits cell proliferation in prostate cancer by targeting cyclin D1[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(5): 5121-5128.
- [21] JIAN B, LI Z F, XIAO D C, et al. Downregulation of miRNA-193-3p inhibits tumor proliferation migration and chemoresistance in human gastric cancer by regulating PTEN gene [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(7): 8941-8949.