

miRNA-34a 靶向 Bcl-2 对肝癌细胞 HepG2 的生长和迁移能力的影响*

张游侠 严其康 陈玉然 郝佳奇 朱金玲

(佳木斯大学基础医学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

【摘要】 目的 通过过表达 miRNA-34a 检测 Bcl-2 的表达及对肝癌细胞的生长和迁移能力的影响, 为肝癌的治疗提供新靶点。方法 通过生物信息学方法预测 miRNA-34a 的潜在作用靶点; 采用双荧光素酶报告实验检测 miRNA-34a 与 Bcl-2 的靶向调控关系; 体外培养肝癌细胞, 将肝癌细胞分为对照组(转染 miRNA-34a 阴性对照物 mimic NC)及 miRNA-34a 转染组(转染 miRNA-34a 模拟物)。分别转染 miRNA-34a 模拟物和阴性对照, 转染 36 h 后, CCK8 检测细胞增殖, Trans-well 检测细胞迁移能力, q-PCR 和 Western blot 方法检测 miRNA-34a 对肝癌细胞中 Bcl-2 表达量的影响。结果 miRNA-34a 对肝癌 HepG2 细胞的活力和迁移能力具有抑制作用($P < 0.01$); miRNA-34a 可以直接靶向下调 Bcl-2 ($P < 0.01$) 的表达。结论 miRNA-34a 可靶向并负向调控 Bcl-2, 降低肝癌细胞 HepG2 的活力和迁移能力。

【关键词】 miRNA-34a; Bcl-2; 肝癌; 增殖; 迁移

【中图分类号】 R735.7 **【文献标志码】** A **DOI:** 10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 11. 010

The effect of miRNA-34a targeting Bcl-2 on the growth and migration of hepatocarcinoma cell HepG2

ZHANG Youxia, YAN Qikang, CHEN Yuran, HAO Jiaqi, ZHU Jinling

(School of Basic Medicine, Jiamusi University, Jiamusi 154007, Heilongjiang, China)

【Abstract】 **Objective** The overexpression of miRNA-34a was used to detect the expression of Bcl-2 and its effect on the growth and migration of liver cancer cells, and provided a new target for the treatment of liver cancer. **Methods** The potential targets of miRNA-34a were predicted by bioinformatics. The targeted regulation relationship between miRNA-34a and Bcl-2 was detected by double luciferase reporter experiment Hepatocellular carcinoma cells were cultured in vitro and transfected with miRNA-34a mimetic and negative control respectively. After 36 hours of transfection, CCK8 was used to detect cell proliferation, Trans-well was used to detect cell migration ability, and q-PCR and Western blot were used to detect the effect of miRNA-34a on Bcl-2 expression in hepatocellular carcinoma cells. **Results** miRNA-34a could directly down-regulate the expression of Bcl-2 ($P < 0.01$). MiRNA-34a could inhibit the viability and migration of hepatocellular carcinoma HepG2 cells ($P < 0.01$). **Conclusion** MiRNA-34a can target and negatively regulate Bcl-2 to reduce the activity and migration ability of HepG2 cells.

【Key words】 miRNA-34a; Bcl-2; Liver cancer; Proliferation; Migration

原发性肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)简称肝癌,指发生于肝脏的恶性肿瘤,是临床上最常见的恶性肿瘤之一。根据最新统计,HCC全球发

病率已超过 62.6 万/年,居于恶性肿瘤的第 5 位,正严重威胁人类健康和生命。中国是肝癌的高发国家,2020 年新增与死于 HCC 的患者均处于世界前列^[1]。尽管目前外科手术、消融治疗等技术日益发展,但由于肿瘤复发和肝内转移导致 HCC 患者的 5 年生存率仍然很低。因此,探索肝癌生物学的发生发展机制,寻找新的治疗靶点以改善目前 HCC 的治疗方式有着重要意义。MicroRNA(miRNA)是近年发现的一种十分重要的非编码小 RNA,miRNA 在基因调控中起

基金项目:黑龙江省卫生健康委科研课题(2019-299)

通信作者:朱金玲,教授,E-mail:370786436@qq.com

引用本文:张游侠,严其康,陈玉然,等. miRNA-34a 靶向 Bcl-2 对肝癌细胞 HepG2 的生长和迁移能力的影响[J]. 西部医学,2022,34(11): 1613-1616, 1623. DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 11. 010

差齐性,采用单因素方差检验;当方差不齐时,采用 Welch 方法进行比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 过表达 miRNA-34a 抑制 HepG2 细胞的增殖能力 CCK8 实验结果显示,miR-34a 转染组的细胞增殖能力和细胞活力明显低于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.2 过表达 miRNA-34a 抑制 HepG2 细胞的迁移能力 转染后的 HepG2 细胞进行 Transwell 小室迁移实验,结果显示,miRNA-34a 转染组的细胞迁移能力

表 2 过表达 miRNA-34a 抑制肝癌细胞增殖($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 2 Overexpression of miRNA-34a inhibits the proliferation of liver cancer cells

时间(d)	对照组	miRNA-34a 转染组
1	0.23±0.01	0.23±0.02
2	0.29±0.01	0.29±0.01
3	0.54±0.02	0.42±0.02 ^①
4	0.99±0.05	0.56±0.02 ^①
5	1.63±0.07	0.84±0.03 ^①
6	2.17±0.07	1.13±0.06 ^①
7	2.49±0.08	1.42±0.07 ^①

注:与对照组比较,① $P < 0.01$

明显低于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。见图 1。

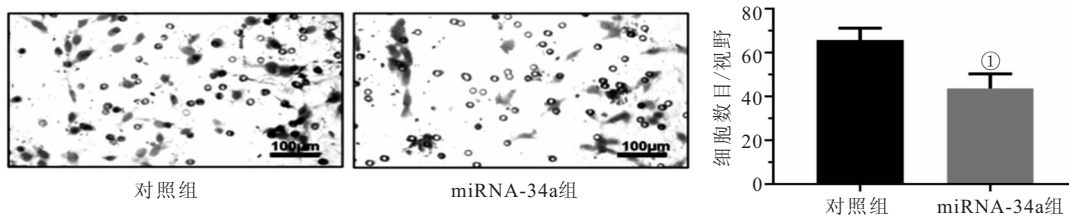


图 1 过表达 miRNA-34a 抑制 HepG2 细胞的迁移能力($n=3$)

Figure 1 Overexpression of miRNA-34a inhibits the migration ability of HepG2 cells

注:与对照组比较,① $P < 0.01$

2.3 Bcl-2 是 miRNA-34a 的下游靶标 生物信息学方法预测 Bcl-2 是 miRNA-34a 的潜在下游靶标(图 2A)。在 HepG2 细胞中进行双荧光素酶实验证实 Bcl-2 是 miRNA34a 的靶点(图 2B),双荧光素酶报告

基因的检测结果表明,过表达 miRNA-34a 可显著下调 Bcl-2 野生型荧光素酶报告基因的活性($P < 0.01$),并且对其它组无作用。

Position 203-209 of BCL2 3' UTR 5'	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA(bottom)
... UGAAUCAGCUAUUU-ACUGCAA...	
hsa-miR-35a-5p 3'	UGUUGGUCGUAUUCUGAGCGGU

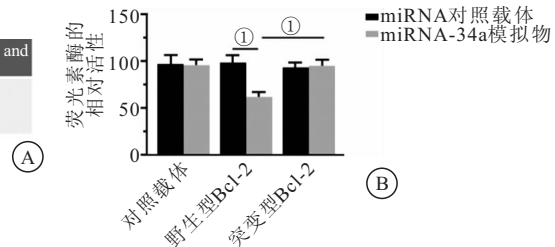


图 2 Bcl-2 是 miRNA-34a 的下游靶标($n=3$)

Figure 2 Bcl-2 is the downstream target of miRNA-34a

注:A. Target Scan 生物信息学方法预测结果及结合位点;B. 荧光素酶报告基因检测 Bcl-2 是 miRNA-34a 的下游靶标。其他 2 组与 micrON has-miRNA-34a-5p mimics 和 Bcl-2 miRNA 靶标克隆共转染组比较,① $P < 0.01$

2.4 在肝癌细胞中过表达 miRNA-34a 下调 Bcl-2 的表达 qRT-PCR 和 Western blot 实验结果均显示

miRNA-34a 组的 Bcl-2 表达量明显低于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。

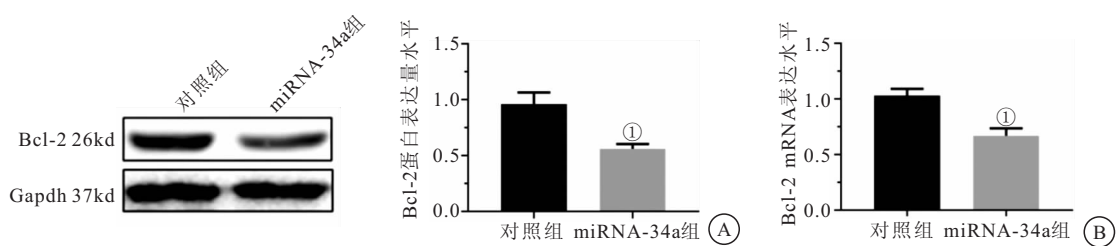


图 3 miRNA-34a 在肝癌细胞中下调 Bcl-2 的表达量($n=3$)

Figure 3 miRNA-34a down-regulates the expression of Bcl-2 in liver cancer cells

注:A. Western blot 检测 Bcl-2 的蛋白表达;B. qRT-PCR 检测 Bcl-2 的 mRNA 表达。与对照组比较,① $P < 0.01$

3 讨论

肝癌对人类的健康和生活产生了巨大的危害,肝癌的发病率在不断增加。因此研究肝癌的发生发展机制、寻找一种可以用于治疗肝癌的新靶点是我们急需解决的问题。近十几年来,miRNA 这种表观遗传学调控分子受到了越来越多的关注,有多种 miRNA 参与肝癌的发生和发展,与肝癌临床恶性表型及抗药性密切相关^[9-11]。miRNA-34a 在多种癌症中均表达异常^[12-14]。此外有研究报道,在肝癌患者中 miRNA-34a 低表达^[5-6],这表明 miRNA-34a 可能参与肝癌的发展过程。为此本研究将 miRNA-34a mimics NC 和 miRNA-34a mimics 分别转染进入 HepG2 细胞来研究 miRNA-34a 对肝癌细胞的增殖和迁移能力的影响,通过 CCK8 和 Transwell 实验发现过表达 miRNA-34a 能够明显的抑制 HepG2 细胞的活力和迁移能力,研究结果与郭瑛等^[15]的研究结果类似。表明过表达某些 miRNA 可抑制肝癌细胞的增殖能力,因此推测 miRNA-34a 可能有助于治疗肝癌。在其他类型的人类癌症中也有类似的发现。为了更加深入的了解 miRNA-34a 抑制 HepG2 细胞的活力和迁移能力的原因,本研究推测这与其下游靶标有关,因此应用生物信息学方法 Target Scan 数据库预测 miRNA-34a 的下游靶标,筛选出肿瘤界中备受关注的癌基因 Bcl-2。近年来 Bcl-2 在肿瘤的发生发展过程中被广泛关注^[16],Bcl-2 能够参与细胞凋亡的起始阶段,和 Bax 等促凋亡蛋白结合,阻止线粒体膜透化(MOMP),防止细胞色素 C 等凋亡因子从线粒体中释放,最终达到抗细胞凋亡的作用^[17-18]。研究发现 Bcl-2 高表达的细胞增殖能力和迁移能力高,这种现象在其他肿瘤中也得到了证实^[19]。另外还有研究报道 Bcl-2 不仅可以影响肝癌细胞的生长,侵袭等,而且对肝癌的耐药性也有影响^[20]。这些都表明 Bcl-2 作为癌基因在肝癌中发挥重要作用。为了进一步验证 miRNA-34a 是怎样发生生物作用,本研究用双荧光素酶报告实验确定了 Bcl-2 是 miRNA-34a 的靶基因,并且通过 qRT-PCR 和 Western blot 的实验结果确定了 miRNA-34a 能够直接下调 Bcl-2 的表达。

总之,以上结果表明 miRNA-34a 对肝癌细胞的增殖和迁移能力具有抑制作用并且这种作用可能是通过 miRNA-34a 直接靶向并下调 Bcl-2 而造成的。本研究不仅为肝癌的发生和发展的潜在机制提供了新的见解,而且还为肝癌的治疗提供了新的思路。但是 miRNA-34a 的靶标不仅只有 Bcl-2,还有许多其他的靶标。因此 miRNA-34a 对肝癌的影响可能还有其它的机制。为此,在后续的研究中会进一步探讨。

4 结论

miRNA-34a 可靶向并负向调控 Bcl-2 的表达,降低肝癌细胞 HepG2 的活力和迁移能力,可为肝癌的治疗提供新靶点,并为探讨肝癌的发病机制提供理论基础。

【参考文献】

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al.* Global cancer statistics 2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] LYNAM-LENNON N, MAHER S G, REYNOLDS J V. The roles of microRNA in cancer and apoptosis[J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2009, 84(1): 55-71.
- [3] 姚平,阮萍,林国彪. microRNA 在肝细胞肝癌中的诊断及治疗研究进展[J]. *中国继续医学教育*, 2021, 13(32): 195-198.
- [4] 赵砚之,罗洪亮. miRNA-34a 与恶性肿瘤的相关研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(18): 4152-4156.
- [5] 李颖,卢忠心,刘水逸,等. 微小 RNA-34a 在肝癌组织的表达及其临床意义[J]. *中华实验外科杂志*, 2016, 33(12): 2759-2761.
- [6] 于泳,李霄,周亮,等. MicroRNA-34a、Notch1 在肝细胞肝癌组织中的表达及临床意义[J]. *世界华人消化杂志*, 2014, 22(14): 1943-1952.
- [7] WANG X, DONG K, GAO P, *et al.* microRNA-34a sensitizes lung cancer cell lines to DDP treatment independent of p53 status[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2013, 28(1): 45-50.
- [8] CAO W, FAN R, WANG L, *et al.* Expression and regulatory function of miRNA-34a in targeting survivin in gastric cancer cells[J]. *Tumor Biol*, 2013, 34(2): 963-971.
- [9] 徐力致,余德才,王亚平,等. microRNA 在肝细胞肝癌诊断和治疗中的研究进展[J]. *中华实验外科杂志*, 2010, 27(2): 271-272.
- [10] 王珣,曾会,陈志娟,等. 肝癌组织 miR-146b-5p 和 miR-134 的表达下调及临床意义[J]. *西部医学*, 2021, 33(5): 752-755.
- [11] SI W, SHEN J, ZHENG H, *et al.* The role and mechanisms of action of microRNAs in cancer drug resistance[J]. *Clinical Epigenetics*, 2019, 11(1): 25.
- [12] 赵艳丽,刘钊,张家新,等. microRNA-34a 与乳腺癌的临床病理相关性研究[J]. *蚌埠医学院学报*, 2021, 46(10): 1412-1414.
- [13] 文丝雨,谭文华,刘巍. microRNA-34a 在恶性肿瘤中的研究进展[J]. *中国临床研究*, 2020, 33(10): 1432-1434, 1438.
- [14] DING Z S, HE Y H, DENG Y S, *et al.* MicroRNA-34a inhibits bladder cancer cell migration and invasion, and upregulates PTEN expression[J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(5): 5549-5554.
- [15] 郭瑛,李君,李宗芳,等. 人肝癌细胞系中 miR-20a-5p 的表达及对肝癌细胞 Bel-7402 增殖及凋亡的影响[J]. *西部医学*, 2019, 31(1): 7-12.
- [16] ZHANG L, LU Z, ZHAO X. Targeting Bcl-2 for cancer therapy[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1876(1): 188569.
- [17] O'NEILL K L, HUANG K, ZHANG J, *et al.* Inactivation of prosurvival Bcl-2 proteins activates Bax/Bak through the outer mitochondrial membrane [J]. *Genes Dev*, 2016, 30(8): 973-988.

负反馈调节 p21 表达有关。但该结论应用于临床的策略及可行性仍需要进一步探讨,应作为后期研究的重点。

【参考文献】

- [1] 李道娟,师金,靳晶,等. 宫颈癌的流行病学趋势[J]. 中华肿瘤杂志, 2021, 43(9): 912-916.
- [2] 尤华,万之灵,王辉. 宫颈癌和 HPV 疫苗[J]. 中华流行病学杂志, 2020, 41(10): 1751-1752.
- [3] WU X, ZHONG Y, CHEN Q, *et al.* Enhancer of mRNA Decapping protein 4 (EDC4) interacts with replication protein a (RPA) and contributes to Cisplatin resistance in cervical Cancer by alleviating DNA damage[J]. *Hereditas*, 2020, 157(1): 41.
- [4] SONG Z, LI J, ZHANG L, *et al.* UCHL3 promotes pancreatic cancer progression and chemo-resistance through FOXM1 stabilization[J]. *Am J Cancer Res*, 2019, 9(9): 1970-1981.
- [5] ARCECI A, BONACCI T, WANG X, *et al.* FOXM1 Deubiquitination by USP21 Regulates Cell Cycle Progression and Paclitaxel Sensitivity in Basal-like Breast Cancer[J]. *Cell Rep*, 2019, 26(11): 3076-3086.
- [6] HONG H, ZHU H, ZHAO S, *et al.* The novel circCLK3/miR-320a/FoxM1 axis promotes cervical cancer progression[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(12): 950.
- [7] HASEGAWA T, KIKUTA J, SUDO T, *et al.* Identification of a novel arthritis-associated osteoclast precursor macrophage regulated by FoxM1[J]. *Nat Immunol*, 2019, 20(12): 1631-1643.
- [8] 李丹丹. FoxM1 通过 MRN/ATM 通路介导的 DNA 损伤修复调控人鼻咽癌细胞的顺铂敏感性[D]. 重庆:重庆医科大学, 2019.
- [9] 武志丹,杨志谋,岳天孚. 四甲基偶氮唑蓝法测定植酸对 HeLa 细胞的作用[J]. 国际妇产科学杂志, 2012, 39(5): 533-534, 封 3.
- [10] 刘钰妮,王世恩,汪湘,等. Annexin V-FITC/DAPI 细胞凋亡检测法[J]. 生物技术, 2020, 30(4): 352-361.
- [11] 杨燕丽,李富娟,牛宁. NOS1 在宫颈癌干细胞中的表达及对化疗敏感性的影响[J]. 西部医学, 2020, 32(9): 1286-1291.
- [12] NEGI D, SINGH A, JOSHI N, *et al.* Cisplatin and Probiotic Biomass Loaded Pessaries for the Management of Cervical Cancer[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2020, 20(5): 589-598.
- [13] 吴少敏,关灵,郑锐年,等. ERCC1 核苷酸多态性 C118T 与中晚期宫颈癌患者顺铂耐药的相关性[J]. 广东医学, 2019, 40(1): 105-108.
- [14] ZHOU H E, PAN S S, HAN H. TRIM24 aggravates the progression of ovarian cancer through negatively regulating FOXM1 level[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(24): 10647-10656.
- [15] SHUKLA S, MILEWSKI D, PRADHAN A, *et al.* The FOXM1 Inhibitor RCM-1 Decreases Carcinogenesis and Nuclear β -Catenin[J]. *Mol Cancer Ther*, 2019, 18(7): 1217-1229.
- [16] HU G, YAN Z, ZHANG C, *et al.* FOXM1 promotes hepatocellular carcinoma progression by regulating KIF4A expression[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 188.
- [17] CHENG Z, YU C, CUI S, *et al.* circTP63 functions as a ceRNA to promote lung squamous cell carcinoma progression by up-regulating FOXM1[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3200.
- [18] LIU C, SHI J, LI Q, *et al.* STAT1-mediated inhibition of FOXM1 enhances gemcitabine sensitivity in pancreatic cancer[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2019, 133(5): 645-663.
- [19] UEDA Y, MORIWAKI K, TAKEUCHI T, *et al.* O-GlcNAcylation-mediated degradation of FBXL2 stabilizes FOXM1 to induce cancer progression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 521(3): 632-638.
- [20] ZHOU D M, LIU J, LIU F, *et al.* A novel FoxM1-PSMB4 axis contributes to proliferation and progression of cervical cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 521(3): 746-752.
- [21] TAN Y, WANG Q, XIE Y, *et al.* Identification of FOXM1 as a specific marker for triple-negative breast cancer[J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(1): 87-97.
- [22] XIN L, ZHOU Q, YUAN Y W, *et al.* METase/lncRNA HULC/FoxM1 reduced cisplatin resistance in gastric cancer by suppressing autophagy[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2019, 145(10): 2507-2517.

(收稿日期:2021-11-19;修回日期:2022-09-21;编辑:刘灵敏)

(上接第 1616 页)

- [18] KALKAVAN H, GREEN D R. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business[J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(1): 46-55.
- [19] LIU Z, SONG T, DOU C, ZHENG X, *et al.* Detection of Bcl-2 in human hepatocellular carcinoma and down-regulation with siRNA[J]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2015, 31(2): 221-225, 230.
- [20] JIANG N, CHEN W, ZHANG J W, *et al.* Aberrantly regulated dysadherin and B-cell lymphoma 2/B-cell lymphoma 2-associated X enhances tumorigenesis and DNA targeting drug resistance of liver cancer stem cells[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(5): 7239-7246.

(收稿日期:2022-01-13;修回日期:2022-08-23;编辑:刘灵敏)