

miR-122介导肝癌细胞凋亡的分子机制研究

蒋成行 郑悦亮 许秋然 甘宜超 蔡文伟

[摘要] 目的 探讨微小RNA-122(miR-122)介导肝癌细胞凋亡的分子作用机制。方法 将人工合成的miR-122类似物、对照片段NC转染到肝癌细胞HepG2(p53wt)、MHCC97H(p53 mutation)后,miR-122组(转染miR-122)、对照组(转染对照无义片段)和空白对照组均应用RT-PCR检测miR-122,Western blot检测p53、Bax蛋白,MTT法检测肝癌细胞增殖变化,流式细胞术检测肝癌细胞凋亡率。结果 在HepG2中,miR-122组的miR-122的表达、p53蛋白和Bax蛋白表达量明显高于对照组和空白对照组,三组间差异均有统计学意义($\chi^2=13.41$, F 分别=15.35、16.88, P 均 <0.05)。在MHCC97H中,miR-122组miR-122的表达和Bax蛋白表达量明显高于对照组和空白对照组,三组间差异均有统计学意义($\chi^2=12.98$, $F=18.91$, P 均 <0.05),而三组的p53蛋白测定值比较,差异无统计学意义($F=2.82$, $P>0.05$)。在HepG2和MHCC-97H细胞中,与对照组和空白对照组比较,miR-122组细胞增殖受到明显抑制,细胞凋亡率明显增加,差异均有统计学意义(χ^2 分别=8.53、7.81、11.64、12.45, P 均 <0.05)。对照组和空白对照组的细胞增殖和细胞凋亡率无明显变化,差异均无统计学意义($\chi^2=0.08$ 、0.05、0.12、0.09, P 均 >0.05)。结论 miR-122可通过p53依赖途径及非p53依赖途径促进肝癌细胞凋亡。

[关键词] 原发性肝细胞肝癌; 微小RNA-122; 细胞凋亡; p53

Research about the mechanism of miR-122 induced hepatocarcinoma cell apoptosis JIANG Chenghang, ZHENG Yueliang, XU Qiuran, et al. Department of Emergency, Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, China

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism of miR-122 induced hepatocarcinoma cell apoptosis. **Methods** The miR-122 analogue or NC as control were respectively transfected into HepG2 (p53wt) cells and MHCC97H (p53 mutation) cells to detect miR-122 by RT-PCR, the expression of p53 and Bax by western blot, the proliferation of hepatocarcinoma cells by MTT and apoptosis rate of hepatocarcinoma cells by flow cytometry. **Results** In HepG2 (p53wt) cells, the expression of miR-122, p53 and Bax proteins in miR-122 group were significantly higher than in control group and NC group ($\chi^2=13.41$, $F=15.35$, 16.88 , $P<0.05$). In MHCC97H (p53 mutation) cells, the expression of miR-122 and Bax protein in miR-122 group were significantly higher than in control group and NC group ($\chi^2=12.98$, $F=18.91$, $P<0.05$). The p53 protein among three groups was not statistical different ($F=2.82$, $P>0.05$). In HepG2 (p53wt) cells and MHCC97H (p53 mutation) cells, the cell proliferation in miR-122 group was obviously inhibited and cell apoptosis was obviously enhanced when compared to control group and NC group ($\chi^2=8.53$, 7.81 , 11.64 , 12.45 , $P<0.05$). The cell proliferation and apoptosis rate has no obvious change in control group and NC group, the difference were not significant ($\chi^2=0.08$, 0.05 , 0.12 , 0.09 , $P>0.05$). **Conclusion** MiR-122 could induce hepatocarcinoma cell apoptosis through both p53-dependent pathway and p53-independent pathway.

[Key words] primary hepatocellular carcinoma; micro RNA-122; apoptosis; p53

原发性肝细胞肝癌是最常见的消化系统恶性

肿瘤之一,其发病率居全球恶性肿瘤的第六位,占死亡原因第三位^[1]。微小RNA(microRNAs, miRNA)是一类由具有发夹结构的单链RNA前体经过酶加工后生成的非编码单链小RNA,是基因表达的主要

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2016.04.005

作者单位:310014 浙江杭州,浙江省人民医院急诊科

通讯作者:蔡文伟,Email:wwcai@139.com

调控因子之一。目前已证实 miRNA 通过调控基因表达来参与调控早期发育、细胞增殖、细胞凋亡、细胞分化等重要进程。miR-122 是肝特异性表达的 miRNA, 在肝脏生理机能、新陈代谢、细胞增殖凋亡等生命过程中起到重要作用, 与肝癌的发生发展密切相关^[2-4]。本次实验通过将人工合成 miR-122 转入肝癌细胞, 检测 p53、Bax 蛋白的表达情况及其对肝癌细胞增殖和凋亡的影响, 为 miR-122 介导肝癌细胞凋亡的分子机制提供新的线索。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 于 2015 年 1 月至 12 月, HepG2、MHCC-97H 由江西省重点分子实验室保存, 购买于上海细胞库; miR-122 及阴性对照序列由上海吉玛公司 (GeneParma) 合成, 具体序列: miR-122 sense: 5'UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG3', miR-122 anti-Sense: 5'CAAACACCAUUGUCACACU-CCA3'。阴性对照组: NC sense: 5'UUCUCCGAACGUGUCACGUTT3', NC anti-Sense: 5'CAGUACUUUUGUGUAGUACAA3'。实验分组: miR-122 组 (转染 miR-122)、对照组 (转染对照无意义片段) 和空白对照组。三组一般资料比较, 差异均无统计学意义 (P 均 >0.05)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与转染 按实验分组将细胞培养至密度为 70% 左右, 按 Lipofectamine TM 2000 (由美国 Sigma 公司生产) 说明方法进行转染。

1.2.2 real-time RT-PCR 检测 miR-122 水平

miR-122 正向引物: 5' -TTGAATTCTAACAC-CTTCGTGGCTACAGAG-3'

miR-122 反向引物: 5' -TTAGATCTCATT-TATCGAGGGAAGGATTG-3'

U6 正向引物: 5' -CTCGCTTCGGCAGCACA-3'

U6 反向引物: 5' -AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

将三组细胞分别予转染后培养 48 h, 按 miRcute miRNA 提取分离试剂盒说明书方法提取培养成熟细胞 miRNA, 再按 miRcute miRNA cDNA 第一链合成试剂盒方法合成 miRNA 的 cDNA (由 TIANGEN 公司生产), 最后以 U6 为内参予 miRcute miRNA 荧光定量检测试剂盒 (由 TaKaRa 公司生产) 检测 miR-122 水平。

1.2.3 Western blot 检测 p53 及 Bax 蛋白水平 分别提取三组细胞总蛋白, 测定蛋白浓度后, 取等量总蛋白 40 μ g, 煮沸后行 10% SDS-PAGE 电泳, 湿

转后结合一抗 (鼠抗人 Bax、 β -actin、p53 由 SantaCruz 公司生产)、二抗 (相应的辣根过氧化物酶标记的山羊抗体由北京中杉生物公司生产), 在 ChemiDoc-It 化学发光成像分析系统下曝光, 观察 p53 及 Bax 蛋白表达量。

1.2.4 MTT 法检测 miR-122 对肝癌细胞增殖变化 将细胞浓度调整至按 1×10^4 /ml 接种于 96 孔培养板上, 每组细胞设置重复 6 个副孔, 实验重复 3 次。三组分别处理细胞, 每孔加入脂质体为 1 μ l, siRNA 量为 2.5 μ l, 使其最终干扰浓度为 100 nmol/L。培养 24 h 后每天随机取一板 24 孔培养板, 连续计数 5 d, 加入 MTT 培养 4 h 加入 DMSO 终止反应。酶标仪上检测吸光度 OD 值, 绘制细胞增殖图。

1.2.5 流式细胞术检测 miR-122 对肝癌细胞凋亡的影响 转染 48 h 后按 AnnexinV-FITC 细胞凋亡检测试剂盒说明书 (由南京凯基生物公司生产) 处理细胞, 予胰酶消化细胞, 离心收集、洗涤细胞, 加入 Binding Buffer、Annexin V-FITC、Propidium Iodide 避光, 孵育, 进行流式细胞仪检测。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多样本均数比较采用方差分析, 荧光定量、细胞增殖、流式细胞凋亡数据采用 χ^2 检验。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-122 的转染及其表达 见图 1, miR-122 上调 p53 及 Bax 的表达见图 2

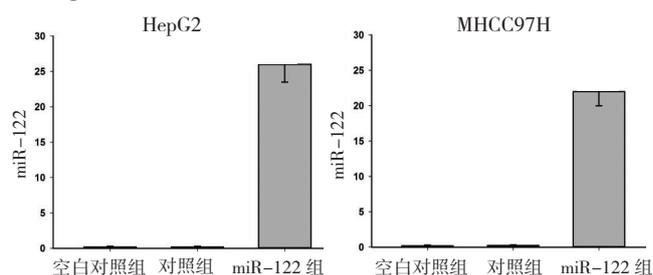


图1 转染HepG2、MHCC97H细胞后miR-122的表达

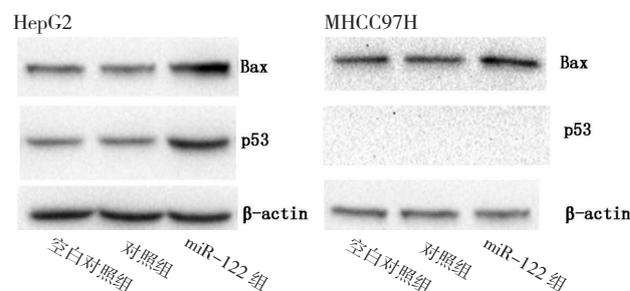


图2 HepG2细胞与MHCC97H细胞中p53、Bax蛋白的表达

由图 1、2 可见,在 HepG2 中,miR-122 组的 miR-122 的表达、p53 蛋白和 Bax 蛋白表达量明显高于对照组和空白对照组,差异均有统计学意义($\chi^2=13.41$, F 分别 =15.35、16.88, P 均 <0.05)。在 MHCC97H 中,miR-122 组 miR-122 的表达和 Bax 蛋白表达量明显高于对照组和空白对照组,差异均有统计学意义($\chi^2=12.98$, $F=18.91$, P 均 <0.05),而三组的 p53 蛋白比较,差异无统计学意义($F=2.82$, $P>0.05$)。

2.3 miR-122 抑制肝癌细胞的增殖见图 3

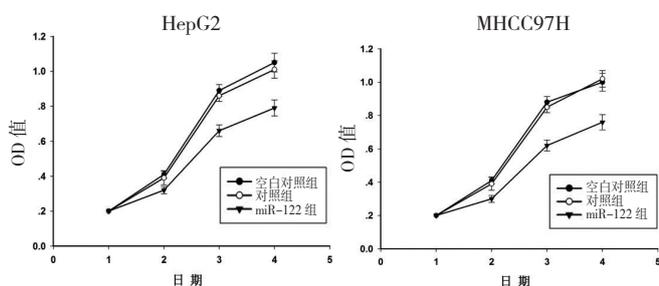


图3 HepG2细胞与MHCC97H细胞生长增殖图

由图 3 可见,在 HepG2 和 MHCC-97H 细胞中,miR-122 组相比对照组和空白对照组,细胞增殖受到明显抑制,差异有统计学意义(χ^2 分别 =8.53、7.81, P 均 <0.05)。对照组和空白对照组的细胞增殖无明显变化,差异均无统计学意义(χ^2 分别 =0.08、0.05, P 均 >0.05)。

2.4 miR-122 促进肝癌细胞凋亡见图 4

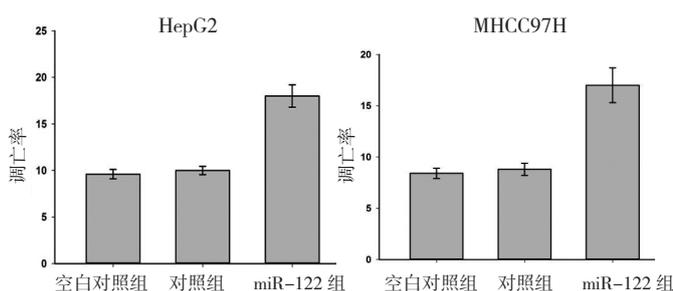


图4 HepG2细胞与MHCC97H细胞凋亡率

由图 4 可见,在 HepG2 和 MHCC-97H 细胞中,miR-122 组相比对照组和空白对照组,细胞凋亡率明显增高,差异均有统计学意义(χ^2 分别 =11.64、12.45, P 均 <0.05)。对照组和空白对照组的细胞凋亡率无明显变化,差异均无统计学意义(χ^2 分别 =0.12、0.09, P 均 >0.05)。

3 讨论

原发性肝癌是我国乃至世界范围内最常见的

恶性肿瘤之一。尽管目前肝癌发病机制研究取得了较大进展,但是鉴于其高发病率、高复发率、高转移率,肝癌的分子发病机制仍然是当今研究的重点和难点。

miRNAs 是一类基因调控因子,通过与靶 mRNA 的 3' UTRs 在翻译水平抑制蛋白合成而调控基因表达^[5]。研究发现 miRNA 参与早期发育、细胞增殖、凋亡、分化、死亡及肿瘤发生发展等转录后调控过程。由于 miRNA 的突变或表达异常被证实与肿瘤的发生发展密切相关,其在肿瘤发生中的作用正日益受到重视^[6]。林国有等^[7]发现 miR-449a 在胃癌发生发展中起抑癌基因作用。miR-122 是肝特异性表达的 miRNA,约占肝脏总 miRNA 的 70%,在肝脏生理机能、新陈代谢、丙型肝炎病毒的免疫应答等过程中起重要作用。miR-122 与肝癌的发生发展密切相关,70%的肝癌中 miR-122 的表达降低,本次实验检测发现 HepG2、MHCC-97H 细胞的 miR-122 的表达量极低,达不到可被检查数量级。miR-122 可通过调控抗凋亡蛋白 CCNG1、Bcl-w 的表达,从而促进肿瘤细胞凋亡并抑制肿瘤生长^[8]。cyclin G1 是近期发现的周期调控蛋白,作为 miR-122 的靶基因之一,在 DNA 修复、细胞周期调控、细胞增殖、细胞凋亡中起到重要作用^[9,10]。研究发现 p53 可通过与 cyclin G1 启动子结合调控 cyclin G1 的表达,而 cyclin G1 可通过 PP2A 和 Mdm-2 负反馈调节 p53 抑癌基因的表达^[11-13]。由此推测 miR-122 可能是 p53 的上游基因,其通过 cyclin G1 等相关靶基因调控 p53 的表达,从而对肝癌的发生发展起到重要作用。

p53 基因是目前研究最为深入的抑癌基因之一,可分为野生型与突变型,其突变、缺失、失活与肝癌的发生发展密切相关^[14]。野生型 p53 基因通过参与基因转录、DNA 损伤修复等生物过程,从而影响细胞增殖、分化和凋亡。突变型 p53 基因则失去抑癌基因的作用,可促进肿瘤细胞的发生发展及恶性增殖^[15,16]。Bax 是典型的 Bcl-2 促凋亡蛋白,受 p53 调控,参与众多由 p53 介导的细胞凋亡。p53 作为 Bax/Bak 的上游调控机制,诱导细胞凋亡^[17]。但是在部分情况下,Bax 的激活并不严格地依赖于 p53。细胞受到凋亡信号刺激后,Bax 通过增加线粒体膜的通透性,使 Cyt C、AIF 等凋亡蛋白由线粒体释放入胞浆,激活 caspase 级联反应或抑制细胞内抗凋亡蛋白,从而诱导细胞凋亡^[18]。

本次实验结果显示,在 HepG2 中,miR-122 组的 miR-122 的表达、p53 蛋白和 Bax 蛋白表达量明显高于对照组和空白对照组 (P 均 <0.05)。在 MHCC97H 中,miR-122 组 miR-122 的表达和 Bax 蛋白表达量明显高于对照组和空白对照组,差异均有统计学意义 (P 均 <0.05),而三组的 p53 蛋白比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在 HepG2 和 MHCC-97H 细胞中,miR-122 组相比对照组和空白对照组,细胞增殖受到明显抑制,细胞凋亡率明显增加,差异有统计学意义 (P 均 <0.05)。证实通过转染外源性 miR-122,可明显提高 HepG2 细胞 (p53wt) p53 及 Bax 蛋白的表达,并抑制肿瘤细胞增殖,促进肿瘤细胞凋亡。由于 Bax 是受 p53 调节的 Bcl-2 促凋亡蛋白,所以推测 miR-122 可通过介导 p53 调节 Bax,从而促进肝癌细胞的凋亡。然而,在 MHCC97H 细胞 (p53 mutation) 中,转入外源性 miR-122 后,尽管 p53 蛋白无表达,但 Bax 蛋白表达仍显著增加,同时肝癌细胞增殖受抑制,促进细胞凋亡,由此推测 miR-122 还可能通过其他非依赖 p53 的通路调控 Bax 的表达从而诱导细胞凋亡。本次实验结果说明,miR-122 可通过依赖 p53 途径和非依赖 p53 途径促进肝癌细胞凋亡。然而其具体的作用机制仍不清楚。如:① miR-122 是直接或者间接通过相关靶基因调控 p53 的表达仍不明确;② 非依赖 p53 途径中 miR-122 调控 Bax 的具体表达机制;③ miR-122 还能否通过调控其他凋亡基因。这些都有尚待于进一步深入研究和探讨。

参考文献

- Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. *Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- Negrini M, Ferracin M, Sabbioni S, et al. MicroRNAs in human cancer: from research to therapy[J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt11): 1833-1840.
- Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, et al. Silencing of microRNAs in vivo with antagomirs[J]. *Nature*, 2005, 438(7068): 685-689.
- Perez R, Wu N, Klipfel AA, et al. A better cell cycle target for gene therapy of colorectal cancer: cyclin G[J]. *J Gastrointest Surg*, 2003, 7(7): 884-889.
- Llave C, Xie Z, Kasschau KD, et al. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA[J]. *Science*, 2002, 297(5589): 2053-2056.
- Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(11): 857-866.
- 林国有, 钟海兵, 张雪燕, 等. 微RNA-449a在胃癌中的表达及其功能研究[J]. *全科医学临床与教育*, 2013, 11(2): 135-137.
- Ma L, Liu J, Shen J, et al. Expression of miR-122 mediated by adenoviral vector induces apoptosis and cell cycle arrest of cancer cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 9(7): 554-561.
- Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, et al. Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(13): 6092-6099.
- Kutay H, Bai S, Datta J, et al. Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas[J]. *J Cell Biochem*, 2006, 99(3): 671-678.
- Okamoto K, Beach D. Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein[J]. *Embo J*, 1994, 13(20): 4816-4822.
- Zauberman A, Lupo A, Oren M. Identification of p53 target genes through immune selection of genomic DNA: the cyclin G gene contains two distinct p53 binding sites[J]. *Oncogene*, 1995, 10(12): 2361-2366.
- Okamoto K, Li H, Jensen MR, et al. Cyclin G recruits PP2A to dephosphorylate Mdm2[J]. *Mol Cell*, 2002, 9(4): 761-771.
- Brito AF, Abrantes AM, Pinto-Costa C, et al. Hepatocellular carcinoma and chemotherapy: the role of p53[J]. *Chemotherapy*, 2012, 58(5): 381-386.
- Aylon Y, Oren M. Living with p53, dying of p53[J]. *Cell*, 2007, 130(4): 597-600.
- Lu J, Mochhala S, Kaur C, et al. Changes in apoptosis-related protein (p53, Bax, Bcl-2 and Fos) expression with DNA fragmentation in the central nervous system in rats after closed head injury [J]. *Neurosci Lett*, 2000, 290(2): 89-92.
- Alvarez S, Drané P, Meiller A, et al. A comprehensive study of p53 transcriptional activity in thymus and spleen of gamma irradiated mouse: high sensitivity of genes involved in the two main apoptotic pathways[J]. *Int J Radiat Biol*, 2006, 82(11): 761-770.
- Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, et al. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane[J]. *Cell*, 2002, 111(3): 331-342.

(收稿日期 2016-04-22)

(本文编辑 蔡华波)