

MiR-105 抑制肝癌细胞增殖能力的实验研究

李勇传¹, 石永杰², 嘉红云², 黄思聪²

(1. 广州市红十字会医院检验科, 广东 广州 510220;

2. 广州医科大学附属第二医院检验科, 广东 广州 510260)

【摘要】 目的 探讨 miR-105 对人肝癌细胞增殖的影响及可能机制。方法 改变 QGY-7703 及 HepG2 两种细胞的 miR-105 表达, 细胞克隆形成实验和软琼脂增殖试验检测细胞增殖能力的改变; 流式细胞仪检测细胞周期改变。结果 细胞克隆形成和软琼脂增殖实验显示, 过表达 miR-105 可抑制 QGY-7703 及 HepG2 细胞增殖, 反之抑制 miR-105 表达则促进细胞增殖; 细胞流式检测显示 miR-105 过表达能促进两种癌细胞 G₀/G₁ 期阻滞。结论 miR-105 抑制肝癌细胞增殖, 其机制与引起细胞周期阻滞有关。

【关键词】 MiR-105; 肝细胞癌; 细胞增殖; 细胞凋亡

【中图分类号】 R735.7 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2017)07-1038-03

MiR-105 suppress the proliferation of hepatocellular carcinoma cells. Li Yong-chuan¹, Shi Yong-jie², Jia Hong-yun², Huang Si-cong². 1. Department of Clinical Laboratory, Guangzhou Red Cross Hospital, Guangzhou 510220, Guangdong, CHINA; 2. Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, Guangdong, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the effects of miR-105 expression on the proliferation of human hepatocellular carcinoma (HCC) cells. **Methods** Over-expression of miR-105 was transfected by miR-105 mimics, and inhibition of miR-105 expression was transfected by miR-105 inhibitors. The effects of miR-105 expression on the proliferation of QGY-7703 and HepG2 cells were detected by colony formation assay and soft agar proliferation experiment. Flow cytometry was used to examine the influence of miR-105 expression on the cell cycle distribution of HCC cells. **Results** Colony formation assay and soft agar proliferation experiment showed that, the proliferation of QGY-7703 and HepG2 cells were suppressed by miR-105 over-expression ($P < 0.05$), while miR-105 inhibitor accelerated the proliferation of HCC cells. The G₀/G₁ phase cells dramatically increased in the miR-105 over-expressing QGY-7703 and HepG2 cells, while decreased in miR-105-inhibited cells. **Conclusion** MiR-105 inhibits the proliferation of HCC cells. The mechanisms may be related to the cell cycle arrested.

【Key words】 miR-105; Hepatocellular carcinoma; Cell proliferation; Cell apoptosis

基金项目: 广东省广州市科技和信息化局项目(编号: 2014J4100063)

通讯作者: 黄思聪。E-mail: 58218826@qq.com

作用。本实验证实米诺环素体外具有一定抗弓形虫感染作用, 为弓形虫病的治疗提供一个新思路。若生物体在感染弓形虫的同时感染对米诺环素敏感的细菌, 使用MNC治疗或许能起到更好的效果。

参考文献

[1] 杨慧, 武一娜, 苑文英, 等. 弓形虫感染与慢性疾病的关系[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(10): 2468-2469.

[2] 苑文英, 赵清, 张平, 等. 白细胞介素家族在弓形虫感染中的作用[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2010, 22(1): 96-99.

[3] Yong VW, Wells J, Giuliani F, et al. The promise of minocycline in neurology [J]. Lancet Neurol, 2004, 3(12): 744-751.

[4] 陈莉, 朱乃军, 袁媛. 米诺环素对人脐静脉内皮细胞-单核细胞黏附的抑制作用及其机制研究[J]. 中国药房, 2015, 26(31): 4381-4384.

[5] 赵莹, 吕芳丽. 匹多莫德体外抑制弓形虫增殖作用的研究[J]. 热带医学杂志, 2013, 13(5): 531-534.

[6] Tardieux I, Menard R. Migration of apicomplexa across biological barriers: the Toxoplasma and Plasmodium rides [J]. Traffic, 2008, 9

(5): 627-635.

[7] Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, et al. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii* [J]. Science, 1988, 240(4851): 516-518.

[8] Mordue DG, Monroy F, La RM, et al. Acute toxoplasmosis lead to lethal overproduction of Th1 cytokines [J]. J Immunol, 2001, 167(8): 4574-4584.

[9] Gavrilescu LC, Denkers EY. IFN-gamma overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence toxoplasma gondii infection [J]. J Immunol, 2001, 167(2): 902-909.

[10] 王大为, 郭晓改, 司海洋, 等. 弓形虫感染治疗方法的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016, 3: 54-57.

[11] Wang J, Wei Q, Wang CY, et al. Minocycline up-regulates Bcl-2 and protects against cell death in mitochondria [J]. J Biol Chem, 2004, 279(19): 19948-19954.

[12] 姚满林, 曾耀英, 黄秀艳, 等. 米诺环素对小鼠T淋巴细胞体外活化和增殖的影响[J]. 现代免疫学, 2008, 28(2): 136-141.

(收稿日期: 2016-10-11)

我国肝癌发病率高居恶性肿瘤病谱第四位,病死率为肿瘤死因谱第二位,且每年持续上升^[1]。肝细胞癌(hepatocellular carcinoma cells, HCC)是目前肝癌的主要类型,尽管现在对肝癌的诊断和治疗较过去都有了很大的提高,但 HCC 的 5 年存活率仍然只有 5%,且远期疗效很不理想^[2]。现阶段 HCC 发生发展的机制还存在很多未知领域。研究表明, microRNA 在 HCC 的病理进程中起重要作用,并可能成为 HCC 诊断和治疗的新方向^[3]。近年发现 miR-105 对部分肿瘤来说可能是一个有效的抑癌基因^[4-5],但其对 HCC 的作用目前尚未清晰。因此本研究希望通过体外实验研究 miR-105 表达对 QGY-7703 及 HepG2 两种人类肝癌细胞增殖、细胞周期和凋亡的影响,探讨 miR-105 在 HCC 发生发展中的作用和可能机制,为 HCC 的治疗提供潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞来源及培养 肝癌细胞株 QGY-7703 和 HepG2 细胞由广州医科大学附属第二医院分子实验室留存,常规方法复苏后置于 37℃、5%CO₂ 的细胞培养箱中培养。取对数生长期细胞用于实验。

1.2 主要试剂 胎牛血清(FBS)和 DMEM 培养液购自美国 Gibco 公司, TRIzol 溶液、Lipofectamine 2000、Opti-MEI 溶液购自美国 Invitrogen 公司。miR-105 模拟物、miR-105 抑制物、阴性对照购自广州市锐博生物科技有限公司。

1.3 细胞转染 分别用阴性对照(NC)、miR-105 模拟物(miR-105)和 miR-105 抑制物(miR-105-in)转染 QGY-7703 及 HepG2 细胞。用 Opti-MEI 稀释待转染核酸至浓度为 0.02 μg/μL,加入 Lipofectamine™ 2000/Opti-MEI 混匀液,置室温 20 min 后加入待转染的贴壁细胞中,4~6 h 后更换培养液为含 10%FBS 的 DMEM,继续培养 24 h。

1.4 克隆形成实验 QGY-7703 和 HepG2 细胞

种于 6 孔板(每孔 0.5×10^3 个细胞)连续培养 10 d,观察克隆(>50 个细胞的集落为 1 个克隆)的生长情况。用 10%甲醛固定 10 min,1.0%结晶紫染色 5 min,倒置显微镜下计数克隆数量。结果以 miR-105/NC、miR-105-in/NC 克隆数量比值表示。

1.5 软琼脂增殖实验 取 2×10^3 的 QGY-7703 和 HepG2 细胞悬浮在 2 mL 含有 0.33%琼脂的完全培养基中。0.66%完全培养基琼脂混合物作为琼脂底层,琼脂细胞混合物作为琼脂上层。培养 10 d 后,用目镜测微尺计数克隆直径>0.1 mm 的细胞集落。

1.6 流式细胞仪检测细胞周期 收集消化后的 QGY-7703 及 HepG2 细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后加入 80%冰冷乙醇的 PBS 溶液固定。细胞沉淀后重悬,加入 2 μg/mL 牛胰 RNA 酶,37℃培养 30 min,随后在 10 μg/mL 碘化丙啶中室温孵育 30 min。流式细胞仪检测细胞 DNA 的含量,重复 3 次。

1.7 统计学方法 用 Exce2003 进行数据整理,SPSS17.0 进行统计学分析,计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组计量资料比较采用双侧 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-105 表达对肝癌细胞增殖的影响 克隆形成实验显示,与 NC 组比较,miR-105 组的 QGY-7703 和 HepG2 细胞克隆数量比值为(0.28±0.08)、(0.22±0.06) (图 1A);miR-105-in 组克隆数量比值分别为(2.80±0.30)、(3.20±0.50) (图 1B)。软琼脂增殖实验显示,NC 组的菌落数量约(50±5)个,miR-105 组的 QGY-7703 和 HepG2 细胞菌落数量为(17±2)个、(15±1)个(图 1C);miR-105-in 组克隆数量比值分别为(135±15)、(155±25) (图 1D)。表明 miR-105 的过表达可导致 QGY-7703 和 HepG2 细胞克隆及菌落数量明显下降($P < 0.05$);抑制 miR-105 表达两种细胞的克隆及菌落数量则明显增多($P < 0.05$)。

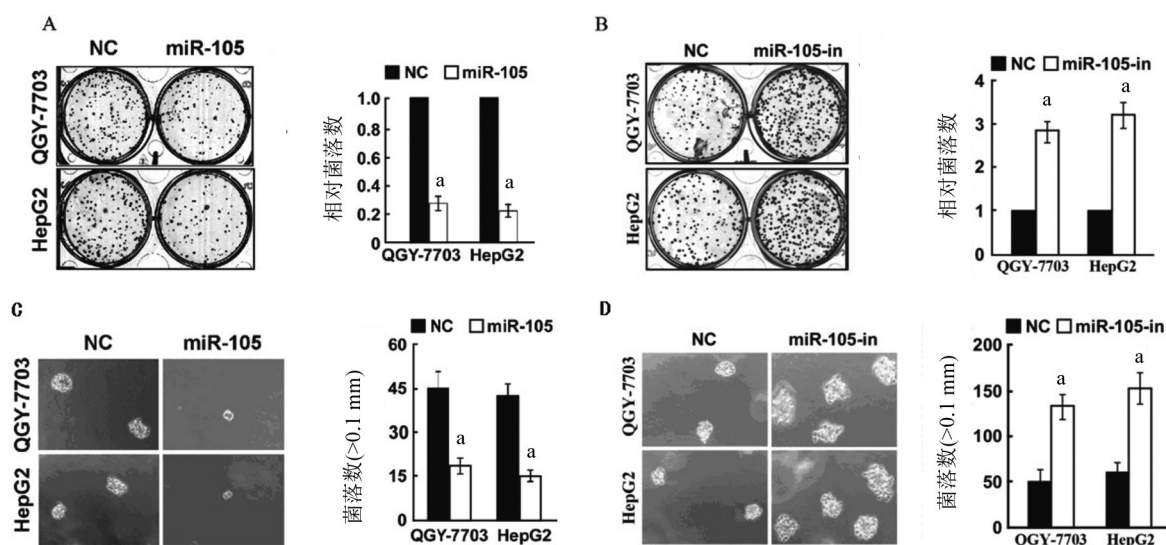


图 1 miR-105 在克隆形成和软琼脂增殖实验中对 HCC 细胞增殖的影响(与 NC 比较, $P < 0.05$)

注:A、B 分别为过表达及抑制 miR-105 对 HCC 细胞克隆形成数量的影响。C、D 分别为过表达及抑制 miR-105 对 HCC 细胞软琼脂增殖数量的影响。

2.2 miR-105 表达对肝癌细胞周期的影响 与 NC 比较,miR-105 过表达的两种细胞 G₁/G₀ 期细胞所占比例均显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),而抑制 miR-105 表达后,两种细胞 G₁/G₀ 期细胞所占比例则显著下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 miR-105 表达对 HCC 细胞 G₁/G₀ 期比例的影响

细胞株	NC (%)	miR-105 (%)	miR-105-in (%)
QGY-7703	54±3.8	71±4.8 ^a	32±2.8 ^a
HepG2	58±4.3	72±5.2 ^a	43±3.5 ^a

注:与 NC 相比,^a $P < 0.05$ 。

3 讨论

miRNA 的失调经常发生在各种人类肿瘤中,miRNA 表达的异常可通过影响多个基因的表达最终导致人类癌症形成^[6]。研究发现,在多种肿瘤类型中,miR-105 表达都有改变,如前列腺癌患者的癌变组织和血中均发现 miR-105 表达下调,且在体外和体内的实验中证实其下调有助于前列腺肿瘤细胞的增殖^[4]。结肠癌组织中也发现 miR-105 表达显著下调^[7]。提示 miR-105 可能对部分肿瘤具有较大的抑制作用。

本次细胞实验结果显示,miR-105 的过表达可导致肿瘤细胞的克隆及集落数量下降;反之抑制 miR-105 表达肿瘤细胞的克隆及集落数量明显增多。提示 miR-105 过表达可以抑制肝癌细胞的增殖,而抑制其表达,则使肝癌细胞增殖加速。说明对于 HCC,miR-105 有可能通过抑制肝癌细胞增殖而发挥其抑癌作用。

从一定意义上讲,肿瘤是多基因变化导致细胞周期紊乱,细胞失控性生长所导致的一类细胞周期性疾病^[8]。一个完整的细胞周期有 G₀、G₁、S、G₂、M 五个时期,细胞 DNA 的含量随各时相呈现周期性变化。流式细胞仪根据细胞增殖时各阶段的 DNA 含量不同,将细胞的复制期分为 G₀/G₁、S、G₂/M 期。具有 2C DNA 含量的细胞为 G₀/G₁ 期细胞,具有 4C DNA 含量的细胞为

G₂/M 期细胞,DNA 含量介于 G₁ 和 G₂ 期之间为 S 期细胞^[9]。本次流式细胞检测发现,过表达 miR-105 能使 QGY-7703 和 HepG2 两种肝癌细胞处于 G₀/G₁ 期的比例增多,表明 miR-105 有使肝癌细胞产生 G₀/G₁ 期阻滞的能力,而抑制 miR-105 表达,癌细胞 G₀/G₁ 期的比例减少,表示进入 S 期的细胞比例会相应增加。结果提示 miR-105 表达影响肝癌细胞增殖的机制可能与其影响细胞周期改变有关。

综上所述,miR-105 也许在抑制 HCC 的发生和发展中起着重要的积极作用,有望能成为针对 HCC 治疗的有效作用靶点,为原发性肝癌的治疗提供新的治疗方向。

参考文献

- [1] 甘雨,于新发,周成宇,等. 甲胎蛋白在原发性肝癌的诊断和预后判断中的临床价值[J]. 海南医学, 2016, 27(6): 891-894.
- [2] Motawi TK, Shaker OG, El-Maraghy SA, et al. Serum microRNAs as potential biomarkers for early diagnosis of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma in Egyptian patients [J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0137706.
- [3] Wen Y, Han J, Chen J, et al. Plasma miRNAs as early biomarkers for detecting hepatocellular carcinoma [J]. Int J Cancer, 2015, 137(7): 1679-1690.
- [4] Honeywell DR, Cabrita MA, Zhao H, et al. miR-105 inhibits prostate tumor growth by suppressing CDK6 levels [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e70515.
- [5] Guan Y, Chen L, Bao Y, et al. Identification of low miR-105 expression as a novel poor prognostic predictor for human glioma [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(7): 10855-10864.
- [6] Ohtsuka M, Ling H, Doki Y, et al. MicroRNA processing and human cancer [J]. J Clin Med, 2015, 4(8): 1651-1667.
- [7] Wang ZM, Du WJ, Piazza GA, et al. MicroRNAs are involved in the self-renewal and differentiation of cancer stem cells [J]. Acta Pharmacol Sin, 2013, 34(11): 1374-1380.
- [8] 林东昕. 肿瘤的遗传易感因素[J]. 海南医学, 1999, 10(6): 83-85.
- [9] 崔巍. 流式细胞术 PI 染色进行细胞周期分析的原理是什么? [J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(3): 151.

(收稿日期:2016-10-11)