分类号：R735.7 单位代码：10114

密 级： 学 号：Dr2009034

**MicroRNA-125b 在肝癌中的功能和机制研究**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 研 |  | 究 |  | 生： | 贾红燕 |
| 指 | 导 |  | 教 | 师： | 赵浩亮 教授 |
| 申请学位门类级 别 ： 科学学位 | | | | | |
| 专 | 业 | 名 | | 称： | 外科学 |
| 研 | 究 | 方 | | 向： | 肝胆外科 |

所 在 学 院： 第一临床医学院

二 O 一三年五月十日

学位论文独创性声明

本人声明，所呈交的学位论文系在导师指导下本文独立完成的研究成果。文中任何引用他人的成果，均已做出明确标注或得到许可。论文内容未包含法律意义上已属于他人的任何形式的研究成果，也不包含本人已用于其他学位申请的论文或成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

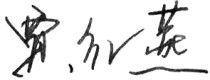
本文如违反上述声明，愿意承担以下责任和后果：

1、交回学校授予的学位证书；

2、学校可在相关媒体上对作者本人的行为进行通报；

3、本文按照学校规定的方式，对因不当取得学位给学校造成的名誉损害， 进行公开道歉。

4、本人负责因论文成果不实产生的法律纠纷。

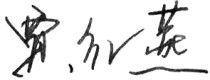
论文作者签名：  日期： 2013 年 5 月 31 日

学位论文版权使用授权书

本人完全了解ft西医科大学有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留或向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅； 本人授权ft西医科大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。

本人离校后发表或使用学位论文或与该论文直接相关的学术论文或成果时署名单位仍然为ft西医科大学。

(保密论文在解密后应遵守此规定)

论文作者签名：  日期： 2013 年 5 月 31 日

指导教师签名：  日期： 2013 年 5 月 31 日

（本声明的版权归ft西医科大学所有，未经许可，任何单位及任何个人不得擅自使用）

目 录

[缩略语](#_Toc686819041) 4

[前](#_Toc686819042)[言](#_Toc686819042) 6

[参考文献](#_Toc686819043) 7

[中文摘要](#_Toc686819044) 8

**[Abstract](#_Toc686819045)** 8

**[1.](#_Toc686819046)** [材料和方法](#_Toc686819046) 9

**[1.1 .](#_Toc686819047)** [材料](#_Toc686819047) 9

**[1.2 .](#_Toc686819048)** [实验方法](#_Toc686819048) 20

**[2.](#_Toc686819049)** [结果](#_Toc686819049) 31

**[2.1.](#_Toc686819050)****[HE](#_Toc686819050)**[染色比较肝癌组织与正常组织的形态差异](#_Toc686819050) 31

**[2.2.](#_Toc686819051)****[miR-125b](#_Toc686819051)**[在](#_Toc686819051)**[HCC](#_Toc686819051)**[和](#_Toc686819051)**[HCC](#_Toc686819051)**[细胞系中表达下调](#_Toc686819051) 32

**[2.3.](#_Toc686819052)****[qRT-PCR](#_Toc686819052)**[检测](#_Toc686819052)**[miR-125b](#_Toc686819052)**[过表达情况](#_Toc686819052) 32

**[2.4.](#_Toc686819053)****[miR-125b](#_Toc686819053)**[抑制](#_Toc686819053)**[HepG2](#_Toc686819053)**[细胞的增殖](#_Toc686819053) 32

**[2.5.](#_Toc686819054)** [过表达](#_Toc686819054)**[miR-125b](#_Toc686819054)**[抑制](#_Toc686819054)**[HepG2](#_Toc686819054)**[细胞周期](#_Toc686819054) 33

**[2.6.](#_Toc686819055)****[miR-125b](#_Toc686819055)**[靶基因的预测及报告基因实验验证](#_Toc686819055) 33

**[2.7.](#_Toc686819056)****[Western blot](#_Toc686819056)**[验证](#_Toc686819056)**[miR-125b](#_Toc686819056)**[的靶基因](#_Toc686819056) 33

**[2.8.](#_Toc686819057)****[Mcl-1](#_Toc686819057)**[和](#_Toc686819057)**[IL6R](#_Toc686819057)**[的表达下调能抑制](#_Toc686819057)**[HCC](#_Toc686819057)**[的细胞增殖](#_Toc686819057) 33

**[2.9.](#_Toc686819058)****[Mcl-1](#_Toc686819058)**[和](#_Toc686819058)**[IL6R](#_Toc686819058)**[的表达下调能抑制](#_Toc686819058)**[HCC](#_Toc686819058)**[的细胞周期](#_Toc686819058) 34

**[2.10.](#_Toc686819059)****[miR-125b](#_Toc686819059)**[通过靶向抑制](#_Toc686819059)**[Mcl-1](#_Toc686819059)**[和](#_Toc686819059)**[Il6R](#_Toc686819059)**[干扰](#_Toc686819059)**[HCC](#_Toc686819059)**[细胞增殖](#_Toc686819059) 34

**[3.](#_Toc686819060)** [讨论](#_Toc686819060) 34

[小](#_Toc686819061)[结](#_Toc686819061) 35

[4、 设计了“拯救”实验并用于研究miR-125b通过靶向抑制Mcl-1和IL6R 在](#_Toc686819062) 35

[参考文献](#_Toc686819063) 36

[参考文献](#_Toc686819064) 37

# 缩略语

英文缩写 英文全称 中文全称

PLC Primary liver cancer 原发性肝癌

HCC Hepatic cell carcinoma 肝细胞肝癌

HBV Hepatitis B virus, 乙型肝炎病毒

HCV Hepatitis C virus 丙型肝炎病毒

RNA Ribonucleic acid 核糖核酸

CLTR China Liver Transplant Registry 中国肝脏移植注册系统 UNOS United Network for Organ 美国器官资源共享网络 PCR Polymerase chain reaction 聚合酶链反应

LV Liver transplantation 肝移植

UTR Untranslated region 非翻译区

3'UTR 3'Untranslated region 3'非翻译区

5'UTR 5'Untranslated region 5'非翻译区

nt Nucleotide 核苷酸

bp Base pair 碱基对

mRNA messenger RNA 信使RNA

PAGE Polyacrylamide gel electrophoresis 聚丙烯酰胺凝胶电泳

PBS Phosphate buffer saline 磷酸盐缓液

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| pre-miRNA | Precusor miRNA | miRNA 前体 |
| pri-miRNA | Primary miRNA | 初始 miRNA |
| rpm | Revolutions per minute | 每分钟转速 |
| RT-PCR | Reverse-transcription polymerase | 反转录聚合酶链式反应 |
|  | Chain reaction |  |
| siRNA | Small interfering RNA | 小干扰 RNA |
| snRNA | Small nuclear RNA | 小核 RNA |
| TBS | Tris buffer saline | Tris 缓冲液 |
| miRNA | MicroRNA | 微小 RNA |
| IL-6 | Interleukin-6 | 白细胞介素-6 |
| IL-6R | Interleukin-6 receptor | 白细胞介素-6 受体 |
| Mcl-1 | Myeloid Cell Leukemia-l | 髓样细胞白血病-l 基因 |
| Bcl-2 | B cell Leukemia-2 | B 细胞白血病-2 基因 |
| AFP | alpha-fetoprotein | 甲胎蛋白 |

前 **言**

MicroRNA(miRNA)是一类长度为20-24个核苷酸(nt nucleotide, nt)的内源性非编码RNA分子，广泛存在于多种生物基因组内，具有序列特异性调节基因表达的功能。其通过与靶基因3’非翻译区( 3'untranslated region, 3'UTR)完全或部分的结合，从而抑制mRNAs的翻译[1,2]，是在转录后水平调控基因表达的重要分子之一。Lee等早在1993年便在隐杆线虫基因组中发现了一个22 nt的小分子非编码RNA lin-4的存在[3]，但这仅仅被认为是个别现象，并未引起研究者足够的重视和关注。随着在植物、果蝇、斑马鱼、哺乳动物和人等多种物种中相继发现了这类小RNA存在，并把其命名为microRNA，对microRNA的学术研究才逐渐增多，至今已发现上千种microRNA, miRNA的重要性引起人们的关注，并连续两次入选《Science》杂志评选的十大科技研究进展。miRNA在生物体生长发育、胚胎形成、细胞增殖、分化、凋亡、脂肪代谢等生命活动中发挥重要的调控作用[4-7]。另外，miRNA的发现具有重要的理论意义，经典的生物中心法则认定编码蛋白质的基因似乎是遗传信息唯一来源，也是所有生命的完整蓝图，而近几年研究发现，基因组内存在大量隐藏信息，这些信息在生物体生长发育过程中发挥着不可替代的作用，正如天文学家所描述的太空暗物质，虽不可见却发挥支配作用。miRNA便是一种隐藏信息，它的发现对中心法则形成了挑战。由此可见，miRNA的研究不但有助于丰富生命科学的相关理论，也有助于疾病治疗新策略的发现。由于miRNA调节方式的特点，即一个miRNA分子可以靶向调控多个mRNA，同时一个mRNA分子也可被多个

miRNA分子共同调节，使得它在网络调控及多个信息层的交叉作用中具有独特的优势。



图1 MicroRNA与靶基因作用过程



图2 miRNA分子靶向调控多个基因或一个基因也可被多个miRNA分子

共同调控

miRNA一般分布于基因间序列或内含子区域，少数分布于外显子区域。研究发现，miRNAs的表达是具有组织特异性的，它随着信使RNA（messenger

RNA，mRNA）一起转录，其加工过程需要几个重要蛋白的参与。首先，在

RNA聚合酶II的催化下，miRNAs在核内起始转录，产生初始转录产物（primary

miRNA，pri-miRNA），pri-miRNA在细胞核内经过一种RNA内切酶III的加工，进一步加工成miRNA前体(precusor miRNA, pre-miRNA)，此前体利用Exportin-5蛋白水解GTP产生的能量被转运至细胞质中，再经过另一个RNA内切酶III成员Dicer的进一步加工，最终得到22个核苷酸左右的成熟双链RNA分子，而其中只有一条链能与RNA诱导沉默复合物（RISC）结合发挥作用，此复合物结合于靶基因的3’UTR区，抑制基因的表达。目前，已经在生物体内发现了1000多种miRNA，这些miRNA序列在各物种中都体现出了高度的保守性，可见其广泛参与到了各个物种的生命调节过程中。据估计人的基因组编码miRNA的基因超过1000个，可以调节30%甚至更多的人类基因，这些靶基因参与人类各项生命活动，说明miRNA对人类生命活动的调控是强有力的，例如，胚胎形成、组织发育、细胞的生长分化及凋亡等。miRNA的表达异常也会引起人类的许多重大疾病的发生，如恶性肿瘤。因此深入研究miRNA在人类疾病发生发展过程中的调控作用及机理，具有重要的理论和实际意义。[Lu](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&amp;cmd=Retrieve&amp;dopt=AbstractPlus&amp;list_uids=16325577&amp;query_hl=2&amp;itool=pubmed_docsum)

[[3]等利用含有200多个miRNA探针的磁珠芯片方法检测了多种肿瘤组织与正常组织之间miRNA表达水平的变化，所得信息可准确对肿瘤进行分型，开创性地提出miRNA可用于肿瘤诊断和分类。](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&amp;cmd=Retrieve&amp;dopt=AbstractPlus&amp;list_uids=16325577&amp;query_hl=2&amp;itool=pubmed_docsum)因此，研究肿瘤相关miRNA的表达及功能已经成为肿瘤研究的热点，在理论和实际方面意义重大。

恶性肿瘤是一类多因素参与、多阶段、多基因改变的疾病，其发生机制复杂，目前尚未发现有效的彻底根治办法，其患者预后差，病死率高，一直是人类健康的“恐怖杀手”。为了攻克这一复杂疾病，全世界的科学家们都在积极的研究当中，希望有朝一日能彻底治愈恶性肿瘤患者。近年来，科学家们的研究发现，miRNA在肿瘤发生发展过程中也起着重要作用，在很多肿瘤中发现其表达明显失调，这些都为肿瘤的诊断及治疗提供了可能的新思路。研究发现，

miRNA常位于染色体内的脆弱位点，即染色体易发生缺失、重复及移位的片段，如慢性淋巴细胞白血病（CLL）患者染色体13q14区域易发生缺失，而miR-15a/miR-16 簇正位于此区域，相关研究发现在50-60% CLL 患者中

miR-15a/miR-16簇表达下调或缺失[8]。Mu等发现miR-17-92基因簇在多种恶性淋巴瘤及肺癌中高表达，与c-myc等癌基因共同作用，促进肿瘤的发生[9]。Mary C等研究发现染色体脆弱位点移位可以降低Let-7对高迁移率A2基因

（High Mobility Group A2）的抑制作用，促进肿瘤发生[10]。现已有研究者利用含有多个miRNAs探针的芯片检测了多种肿瘤组织中miRNAs的表达变化，并通过其表达变化和肿瘤分型间的相关性比较，提出miRNAs可用于肿瘤的诊断和分型，Galasso等利用miRNA基因芯片方法筛选六种实体瘤中表达共上调的

miRNA，以期预测肿瘤发生进程，发现新的肿瘤分子标记物[11,12]。因此，miRNA表达失控与多种肿瘤发生密切相关，在肿瘤发生过程中可起到癌基因或抑癌基因的作用。例如，表达上调的miRNA可抑制某些抑癌因子的表达，而发挥癌基因的作用，这些miRNA被称为onco-miRNAs。而另一些miRNAs在肿瘤组织中表达下调，释放抑癌因子的表达，从而发挥抑癌基因的作用。如果这些

miRNAs本身的表达出现异常，就会产生与它们功能相反的生物学效应。例如，外源性使miR-124a表达下调可导致细胞的异常增殖[13]；miR-31能抑制卵巢癌细胞的增殖[14]；PLZF-microRNA-221/-222能通过下调p27Kip1/CDKN1B和c-KIT受体抑制黑色素瘤的发展过程[15]。

原发性肝癌（Primary liver cancer, PLC）是一类在世界范围内高发的恶性肿瘤，其发生率居恶性肿瘤第五位，全球每年新发肝癌患者约50万例[16]，病死率排名第三位[17]，原发性肝癌按组织分型可以分为肝细胞癌（Hepatic cell

carcinoma，HCC）、胆管细胞癌和混合型三类，其中肝细胞癌是其主要组织学类型，约占全部肝癌数量的70-85%。总体来看，慢性病毒性肝炎、黄曲霉毒素、长期酗酒、脂肪肝、某些代谢性或遗传性疾病等是HCC的常见致病因素，其中慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是导致HCC的最常见原因，其次为慢性丙型肝炎病毒((hepatitis C virus, HCV))感染。HBV或HCV感染所致病毒性肝炎常常导致一些慢性肝病，随着病程进展进一步可发展为肝硬化，最终诱发肝癌。在我国，HBV 感染者更多，成为最主要的风险因素。因此，

HCC的发病率更高，我国肝癌的病死率居恶性肿瘤死亡率的第二位[18]，几乎占全世界肝癌死亡人数的45%. HBV感染诱发HCC的病理生理学机制非常复杂，通常认为分别涉及宿主和病毒两方面。对于宿主本身，HBV感染能够诱发机体出现免疫应答反应，引起肝细胞损伤，进一步导致部分肝细胞出现坏死、凋亡，同时肝细胞出现继发性再生过程，肝细胞最终形成炎症－坏死－再生的恶性循环，导致肝细胞纤维化增加，原有正常肝小叶被不规则分割成假小叶，形成肝硬化，硬化的肝脏又为肝癌的发生提供了良好的微环境，最终诱发肝癌形成。对于病毒而言，HBV本身也可以通过自身保护机制逃逸宿主对于病毒的免疫清除，实现HBV慢性持续性感染。

HCC的病死率很高，多数患者在确诊后1年内死亡[19]。肝癌的临床治疗方法比较局限，缺乏特异性和针对性的治疗手段，肝脏切除术或肝移植（Liver

transplantation）术通常被认为是治疗首选。近年来，虽然AFP等特异早期诊断指标在临床上的使用，使得肝癌患者的临床手术切除率及预后状况有所改善，但是患者仍易复发和转移[20]。另外，基于肿瘤的位置及大小，或者可能存在肿瘤侵犯肝脏周围器官以及肝功能不佳等原因，部分肝癌患者并不适合肝脏切除术[21]。全球约40%的肝癌患者在我国，中国肝脏移植注册系统（China Liver Transplant Registry, CLTR）数据显示，目前我国的肝移植手术中44%为肝癌肝移植，美国器官资源共享网络(United Network for Organ, UNOS)的数据显示，在2006年美国等待肝移植的病人数为17221例，而全年的肝移植手术例数仅有

6650例，仅仅能使部分患者受益，对于大量存在的患者而言，简直是杯水车薪。供需严重不平衡的矛盾，也使得肝脏移植手术在肝癌外科治疗中的作用十分有限，很多患者不能及时接受肝脏移植手术而因肿瘤进展失去移植机会或发生死亡。肝脏移植术后的急性排斥反应造成严重的移植物功能丧失及感染等并发症成为术后死亡的主要原因，免疫抑制药物的毒性也是不容忽视的安全问题；另外，肝脏移植也会面对许多伦理道德方面的限制，特别是活体肝脏移植器官的摘取及其安全性，也要严格受到社会道德观念的制约，使得其临床应用受到限

制。

随着对肝癌发生发展的分子机制研究的深入，已有多个肿瘤相关基因被揭示出来，如：p53，Ras，p16，c-fms，DLC-1等，与此同时，以上述基因作为分子标记物和靶标的新的治疗方法受到越来越多的关注[22-26]。对肝癌发生机制的深入研究，将逐渐阐明参与其中的作用分子的调控机制，为以此为基础的新的临床诊断和治疗方法的建立提供依据。

肝细胞性肝癌的发生机制比较复杂，包括表观遗传、染色体突变、蛋白编码基因突变以及非编码RNA基因的突变等等。尽管在HCC中发现了许多致癌基因和肿瘤抑制因子，但非编码RNA分子在HCC肿瘤生物学中的功能则是近几年来才被开始关注[27]。miRNA作为新型的调控分子，在肝细胞癌发生过程中的功能以及与肝细胞癌诊断、治疗的关系是目前备受关注的课题之一。与肝细胞癌发生发展相关的miRNA研究证实有很多，如miR-29通过调控长链非编码RNA基因MEG3参与了肝细胞癌的发生过程[28]。miR-122a在正常肝脏中特异表达，参与肝脏胆固醇和脂肪酸的代谢过程，在维持肝脏细胞生长、应激反应等功能上起着重要作用，但miR-122a在HCC中则低表达，它通过抑制cyclin

G1及Bcl-w发挥抑癌基因的作用[29]。另外，miR-101也在HCC中低表达，其通过抑制癌基因FOS的表达发挥抑癌基因的作用[30]。miR-122及其靶基因构成的调控网络与肝癌细胞对化疗药物的敏感性密切相关，研究显示增强肝癌细胞miR-122的表达水平可以提高其化疗敏感性，为新型靶标联合化疗的治疗方案的研究奠定了基础[31]。而在HCC中表达上调的miRNA包括，miR-23a、miR-27a、miR-223、miR-21、miR-221及miR-17-92等[32-34]，它们均通过抑制一些抑癌基因的表达发挥类似癌基因的作用。其中miR-21是肿瘤研究中研究频率最高的明星分子之一，作为一类癌miRNA，它在多种恶性肿瘤中表达上调，抑制了大量抑癌基因的表达，其中不乏包括PTEN等重要的肿瘤抑癌基因，与肿瘤的发生、发展密切相关[35-37]. miR-21的功能与整个HCC的发生发展关系密切，并且调控着一个由大量靶基因构成的复杂网络，其通过不同靶基因所

发挥的重要功能则是研究者重点关注的热点问题。研究者通过设计―拯救‖实验对其进行深入分析探讨[35]，结果显示，miR-21在细胞增殖及凋亡过程的调控是通过抑制PTEN和PDCD4的表达完成的，与RECK无关；对肝癌细胞侵袭的调控则是通过抑制PTEN、PDCD4和RECK的表达完成的。miR-21通过调控PTEN、PDCD4和RECK影响到多个重要的信号通路和功能分子，诸如磷酸化Akt、磷酸化ERK、磷酸化GSK3-β均呈现表达下调的趋势，而Akt、ERK、GSK3-β表达没有明显变化；与细胞周期调控相关的基因CDK4、Cyclin D表达也明显下调，而p21表达上调，说明miR-21通过影响了Akt、ERK等重要的信号通路以及细胞周期相关的重要基因，参与了细胞增殖的调控。由此可见，miR-21及其靶基因以及相关调控功能基因构成一个复杂的调控网络，在HCC发生发展过程中起了重要作用，对miR-21的表达进行抑制可能为HCC寻找一类有效的治疗新策略。所以，对miRNAs调节HCC发生发展的分子机制研究可能为肝癌的早期诊断和治疗提供一种新的途径。

本研究中，我们发现miR-125b在HCC病人中以及HepG2、Huh7和SMMC-7721细胞系中均出现显著下调，而在HepG2细胞中过表达miR-125b能明显抑制细胞增殖和细胞周期循环。进一步的，我们证明了在HCC中，miR-125b能够直接靶向调节Mcl-1和IL6R，从而引起部分表型的改变。以上这些结果都强烈提示了miR-125b 有可能作为一个重要的肿瘤抑制因子，在

HCC中对细胞增殖和细胞周期发挥着重要的调节功能。

综上所述，miRNAs作为肿瘤发生微环境中的重要成员之一，其功能逐渐受到人们的重视[38]。而miR-125b作为肿瘤发生发展中一个复杂调控网络的核心分子，在HCC形成过程中发挥着关键的抑癌基因作用，对其进行的深入性功能研究有可能为HCC的临床治疗提供新的靶点。

参考文献

[1]. Bartel DP, (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 116: 281-297.

[2]. Kim VN, (2005) Small RNAs: classification, biogenesis, and function. Mol Cells. 19: 1-15.

[3]. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell 1993: 75(5): 843-854.

[4]. Nicolas FE, Lopez-Martinez AF, (2010) MicroRNAs in human diseases. Recent Pat DNA Gene Seq. 4: 142-154.

[5]. Small EM, Olson EN, (2011) Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. Nature. 469: 336-342.

[6]. Redova M, Svoboda M, Slaby O, (2011) MicroRNAs and their target gene networks in renal cell carcinoma. Biochem Biophys Res Commun. 405: 153-156.

[7]. Junker A, Hohlfeld R, Meinl E, (2011) The emerging role of microRNAs in multiple sclerosis. Nat Rev Neurol. 756-759.

[8]. Calin GA, Croce CM. [Genomics of chronic lymphocytic leukemia microRNAs](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16616063) [as new players with clinical significance.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16616063) Semin Oncol. 2006; 33(2): 167-173.

[9]. Mu P, Han YC, Betel D, et al. [Genetic dissection of the miR-17-92 cluster of](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20008931) [microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20008931) Genes Dev. 2009; 23(24): 2806-2811.

[10]. Mayr C, Hemann MT, Bartel DP. Disrupting the pairing between let-7 and

Hmga2 enhances oncogenic transformation. Science. 2007; 315(5818): 1576-

1579.

[11]. Huang Y, Yang S, Zhang J, et al. [MicroRNAs as promising biomarkers for](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20210518) [diagnosing human cancer.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20210518) Cancer Invest. 2010; 28(6): 670-671.

[12]. Galasso M, Elena Sana M, Volinia S. [Non-coding RNAs: a key to future](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20236487) [personalized molecular therapy](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20236487)GenomeMed. 2010; 2(2): 12.

[13]. Agirre X, Vilas-Zornoza A, Jiménez -Velasco A, et al. (2009) Epigenetic silencing of the tumor suppressor microRNA Hsa-miR-124a regulates CDK6 expression and confers a poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. Cancer Res. 69: 4443-4453.

[14]. Creighton CJ, Fountain MD, Yu Z, et al. (2010) Molecular profiling uncovers a p53-associated role for microRNA-31 in inhibiting the proliferation of serous ovarian carcinomas and other cancers. Cancer Res. 70: 1906-1915.

[15]. Felicetti F, Errico MC, Bottero L, et al. (2008) The promyelocytic leukemia zinc finger-microRNA-221/-222 pathway controls melanoma progression through multiple oncogenic mechanisms. Cancer Res. 68: 2745-2754.

[16]. Nouso K, Kobayashi Y, Nakamura S, et al. Evolution of prognostic factors in hepatocellular carcinoma in Japan. Aliment Pharmacol Ther. 2010 Feb 1; 31(3): 407-414.

[17]. El-Serag HB, Marrero JA, Rudolph L, et al, (2008) Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. Gastroenterology. 134: 1752-1763.

[18]. Hao XS, Wang PP, Chen KX, et al. [Twenty-year trends of primary liver cancer](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12883379) [incidence rates in an urban Chinese population.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12883379) Eur J Cancer Prev. 2003 Aug; 12(4): 273-279.

[19]. Yuen MF, Hou JL, Chutaputti A; Asia Pacific Working Party on Prevention of Hepatocellular Carcinoma. [Hepatocellular carcinoma in the Asia pacific region.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19220670) J Gastroenterol Hepatol. 2009 Mar; 24(3): 346-353.

[20]. Wolfort RM, Papillion PW, Turnage RH, et a[l. Role of FDG-PET in the](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20480845) [evaluation and staging of hepatocellular carcinoma with comparison of tumor](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20480845) [size, AFP level, and histologic grade.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20480845) Int Surg. 2010; 95(1): 67-75.

[21]. Tomlinson JS, [Jarnagin WR](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Jarnagin%20WR%22%5bAuthor%5d), [DeMatteo RP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22DeMatteo%20RP%22%5bAuthor%5d), et al. Actual 10-year survival after resection of colorectal liver metastases defines cure. J Clin Oncol. 2007 Oct 10; 25(29): 4575-4580.

[22]. Kerr SH, Kerr DJ. Novel treatments for hepatocellular cancer. Cancer Lett. 2009; 286(1): 114-120.

[23]. Cabibbo G, CraxìA. Epidemiology, risk factors and surveillance of hepatocellular carcinoma. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2010; 14(4): 352-355.

[24]. Hoshida Y, Toffanin S, Lachenmayer A, et al. [Molecular classification and](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20175032) [novel targets in hepatocellular carcinoma: recent advancements.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20175032) Semin Liver Dis. 2010; 30(1): 35-51.

[25]. Wysocki PJ. [Targeted therapy of hepatocellular cancer.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20074016) Expert Opin Investig Drugs. 2010; 19(2): 265-274.

[26]. Villanueva A, Minguez B, Forner A, et al. [Hepatocellular carcinoma: novel](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20059340) [molecular approaches for diagnosis, prognosis, and therapy.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20059340) Annu Rev Med. 2010; 61: 317-328.

[27]. Braconi C, Henry JC, Kogure T, et al, (2011) The role of microRNAs in human liver cancers. Semin Oncol. 38: 752-763.

[28]. Braconi C, Kogure T, Valeri N, et al. microRNA-29 can regulate expression of the long non-coding RNA gene MEG3 in hepatocellular cancer. Oncogene 2011; 30(47): 4750-4756.

[29]. Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, Veronese A, Sabbioni S, Liu CG, et al, (2007) Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. Cancer Res. 67: 6092-6099.

[30]. Li S, Fu H, Wang Y, et al, (2009) MicroRNA-101 regulates expression of the v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (FOS) oncogene in human hepatocellular carcinoma. Hepatology. 49: 1194-2102.

[31]. Yang F, Zhang L, Wang F, et al. Modulation of the unfolded protein response is the core of microRNA-122-involved sensitivity to chemotherapy in hepatocellular carcinoma. Neoplasia 2011; 13(7): 590-600.

[32]. Xu J, Wu C, Che X, et al, (2011) Circulating microRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis. Mol Carcinog. 50: 136-142.

[33]. Connolly E, Melegari M, Landgraf P, et al, (2008) Elevated expression of the miR-17-92 polycistron and miR-21 in hepadnavirus-associated hepatocellular carcinoma contributes to the malignant phenotype. Am J Pathol. 173: 856-864.

[34]. Park JK, Kogure T, Nuovo GJ, et al, (2011) miR-221 silencing blocks hepatocellular carcinoma and promotes survival. Cancer Res. 71: 7608-7616.

[35]. Liu C, Yu J, Yu S, et al. MicroRNA-21 acts as an oncomir through multiple targets in human hepatocellular carcinoma. J Hepatol 2010; 53(1): 98-107.

[36]. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer.

Gastroenterology 2007;133(2): 647-658.

[37]. Connolly EC, Van Doorslaer K, Rogler LE, et al. Overexpression of miR-21 promotes an in vitro metastatic phenotype by targeting the tumor suppressor RHOB. Mol Cancer Res 2010; 8(5): 691-700.

[38]. Fabregat I, (2009) Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. World J Gastroenterol. 15: 513-520.

**microRNA-125b在肝癌中的功能和机制研究**

# 中文摘要

MicroRNA（s miRNAs）是一类长度约为20-24个核苷酸的小的非编码RNA

分子，广泛存在于自然界多种生物基因组内，具有序列特异性调节基因表达的重要功能，主要是在转录后水平发挥其调控基因表达的作用，通过抑制生物体内蛋白质的翻译或者引起mRNA的降解，是转录后水平进行基因表达调控的重要分子之一。研究发现，miRNA在生物体生长发育、细胞增殖、分化、凋亡及人类重大疾病的发生发展过程中发挥着重要的调控作用。miRNA表达失控与肿瘤的发生密切相关，在肿瘤的发生发展过程中可起到肿瘤基因或肿瘤抑制基因的作用。因此，研究肿瘤发生过程中相关miRNA的表达及功能已经成为当今肿瘤发生机制研究的热点之一，具有重要的理论和实际意义。

肝细胞性肝癌（HCC）是严重危害人类健康的恶性肿瘤之一，死亡率高，且其发生机制复杂，目前尚不十分明确。miRNA作为一种非编码RNA基因，在HCC中常见失控表达。我们用Northern Blot方法，初步分析了多个潜在抑癌miRNAs在HCC组织及相关肝癌细胞系中的表达，结果我们发现，定位于人11号染色体的miR-125b，在HCC组织及肝癌细胞系中表达明显下调。

Northern Blot表达分析显示，与癌旁组织相比，miR-125b在6对HCC组织和HepG2、SMMC7721及Huh7等肝癌细胞系中表达明显下调。随后扩大样本使用实时荧光定量PCR检测32对肝癌组织及相应的癌旁组织中miR-125b的表达情况，结果显示其在肿瘤组织中的表达明显低于癌旁组织。因此，我们推测miR-125b可能作为抑癌miRNA，在HCC发生发展过程中发挥作用。为研究miR-125b的功能，我们使用miR-125b mimic转染HepG2细胞使其过表达，结果显示，miR-125b过表达后，肝癌细胞增殖减缓和细胞周期阻滞。我们利用生物信息学及分子生物学方法，对其靶基因进行了初步鉴定，结果发现

Mcl-1和IL6R是其调控的两个重要的靶基因，它们在HCC中都是高表达的。我们推测miR-125b可能通过靶向抑制Mcl-1和IL6R的表达而发挥抑癌基因的功能，阻碍肝癌细胞增殖和细胞周期循环。

为了验证这个设想，我们设计“拯救”实验（Rescued Assay）对此加以分析。将Mcl-1和IL6R表达载体导入外源过表达miR-125b的HepG2细胞中，我们发现，Mcl-1和IL6R表达恢复的同时，S期细胞也随之增加，这说明miR-125b就是通过靶向抑制Mcl-1和IL6R的表达，从而参与HCC细胞增殖和细胞周期调控。

综上所述，miR-125b与其靶基因构成一个复杂的基因调控网络，在HCC发生发展过程中发挥了重要作用，对miR-125b的表达进行调控可能为HCC的治疗提供一种有效的新策略。

**关键词：**肝细胞性肝癌； miR-125b； Mcl-1； IL6R

**MICRORNA-125B FUNCTIONS AS A TUMOR SUPPRESSOR IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELLS**

**Abstract**

MicroRNAs (miRNAs) are small, about 20-24 nucleotide and non-coding RNAs found in various tissue and have a broad impact on gene expression through post-transcriptional suppression or translational repression. miRNAs have been found to play important roles in multiple biological processes, such as development, cellular proliferation, differentiation and divers diseases. Recent studies showed that dsyregulation of miRNAs was currently linked to tumorigenesis and indicated that miRNAs could work as tumor suppressors and oncogenes. Therefore, it is of great importance to focus on the expression and function of miRNAs, associated with tumor formation and progression.

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common malignancy of liver with high rates in all over the worldwide, which is a complex disease involving chromosomal instability and expression abnormalities of both coding and non-coding genes. MiRNAs is a kind of noncoding genes and abnormal expression of miRNA is often associated with hepatocarcinogenesis. Northern Blot analysis was performed to analyze the expression of a few potential miRNAs in HCC tissues and HCC cell lines. We found that miR-125b, located at chromosome 11, remarkably down-regulated in HCC.

To inspect the expression of miR-125b in HCC, a Northern blot analysis of 6 pairs of HCC patient tissues was conducted. The expression of miR-125b was

Remarkably lower in HCCs compared with matched normal tissues. Furthermore, another Northern blot was performed to analyze miR-125b expression in 3 different HCC cell lines (HepG2, SMMC7721 and Huh7) showed that expression of miR-125b was also down-regulated in all cell lines. Therefore, we infer from these results that decrease of miR-125b expression is a frequent event in human HCC and might be work as a common and typical anti-onco-miRNA in tumor formation and progression. To analyze the function of miR-125b in hepatocarcinogenesis, we built a cell module of over-express miR-125b by transfecting miR-125b mimic. The results showed that over-expression of miR-125b significantly suppressed proliferation and cell cycle of HepG2 and SMMC7721, which indicated that the miR-125b might tend to restrain HCC cell growth. Potential targets of miR-125b were predicted and confirmed by bioinformatics tools and dual reporter gene assay. Then, we certify that Mcl-1 and IL6R, high express in hepatocarcinogenesis, was two of the targets of miR-125b in HCC. We reasoned that miR-125b play as an anti-onco-miRNA in HCC proliferation and cell cycle by targeting Mcl-1 and IL6R directly.

To demonstrate the conjecture, rescued assay was adopted to illuminate it. After transfecting expression vector of Mcl-1 and IL6R in HepG2 cell treated with miR-125b mimic previously, we found that the expression of Mcl-1 and IL6R show great increase. Meanwhile, S phase cell was observed grow in number. The results indicate that miR-125b indeed play as a anti-onco-miRNA in cell proliferation and cell cycle of HCC through suppressing the expression of Mcl-1 and IL6R.

Taken together, these results suggest that miR-125b and its targets constitute a great complex regulatory network, which play very important roles in Occurrence and development of HCC. We can propose that suppression of mir-125b may be a novel approach for the treatment of HCC.

**Key words:** Hepatocellular carcinoma; MiR-125b; Mcl-1; IL6R

## **1.** 材料和方法

### **1.1****.** 材料

#### **1.1.1****.** 组织和细胞系

选取2010年1月-2011年8月ft西医科大学第一医院和ft西肿瘤医院等医

院收治的32例肝癌患者，这些患者都经过病理学的确诊。手术切除后立即取患者肝癌组织和标本边缘非癌组织，并放入液氮中保存。所有患者均签署知情同意书并获得ft西医科大学伦理委员会的批准。本组32例患者中，男性患者

有24人，女性患者有8人。详见Tab.1。

**Tab.** **1** **Description of 32 HCC cases**

| Sample ID | Gender | Age | AFP (ng/ml) |
| --- | --- | --- | --- |
| 1 | Male | 51 | 4412.65 |
| 2 | Male | 55 | 84.51 |
| 3 | Male | 39 | 387.54 |
| 4 | Male | 42 | 694.11 |
| 5 | Female | 47 | 1105.21 |
| 6 | Male | 58 | 16.47 |
| 7 | Male | 62 | 426.58 |
| 8 | Male | 59 | 55.43 |
| 9 | Female | 52 | 6.97 |
| 10 | Male | 55 | 871.34 |
| 11 | Male | 46 | 4349.55 |
| 12 | Female | 57 | 644.12 |
| 13 | Male | 54 | 16.54 |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 14 | Male | 64 | 6.98 |
| 15 | Male | 63 | 7.39 |
| 16 | Male | 60 | 846.97 |
| 17 | Female | 59 | 8.46 |
| 18 | Female | 47 | 8.43 |
| 19 | Male | 58 | 1156.49 |
| 20 | Male | 64 | 8789.64 |
| 21 | Male | 68 | 10023.37 |
| 22 | Male | 64 | 184.56 |
| 23 | Male | 64 | 546.25 |
| 24 | Female | 59 | 1698.44 |
| 25 | Male | 62 | 12.10 |
| 26 | Male | 67 | 8.49 |
| 27 | Male | 56 | 75.64 |
| 28 | Male | 57 | 4641.23 |
| 29 | Female | 52 | 144.29 |
| 30 | Female | 46 | 165.47 |
| 31 | Male | 66 | 138.62 |
| 32 | Male | 67 | 83.05 |

|  |  |
| --- | --- |
| **细胞系** |  |
| HepG2 | 北京协和医学院基础所细胞中心 |
| Huh7 | 北京协和医学院基础所细胞中心 |
| MMC7721 | 北京协和医学院基础所细胞中心 |

#### **1.1.2****.** 菌株

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **菌株** | **基因型** | **用途** |
| E.coli DH5α | F-Ф80d lacZΔM15 recA1 endA GyrA96 thi-1 hsdR17(rk-mk+) supE44 RelA1  deoRΔ(lacZYA-argF)U169 | 用于质粒的扩增和转化 |

#### **1.1.3****.** 工具酶及分子量**Marker**

|  |  |
| --- | --- |
| 限制性内切酶 | Promega |
| Taq DNA 聚合酶 | Promega |
| 逆转录酶 | Invitrogen |
| RNase A | Invitrogen |
| 蛋白分子量标准 | Invitrogen |
| DNA 分子量标准 | Takara |

#### **1.1.4****.** 主要生化试剂

|  |  |
| --- | --- |
| 丙烯酰胺 | Sigma |
| N'N'-亚甲基双丙烯酰胺 | Sigma |
| 尿素 | Sigma |
| 过硫酸铵 | Sigma |
| SDS | Sigma |
| Tris | Roche |
| anti-GAPDH | Abcam |

|  |  |
| --- | --- |
| anti-Mcl-1 | Abcam |
| anti-Il6R | Senta Cruz |
| 辣根过氧化物酶标记的二抗 | 中杉金桥 |
| BCA 蛋白浓度测定试剂盒 | VIGOROUS |
| PVDF 膜 | Millipore |
| Hybond-N 尼龙膜 | Amersham |
| ECL | Millipore |
| X 光片 | 柯达 |
| 琼脂糖 | Gibco |
| RPMI1640 培养基 | HyClone |
| 血清 | Gibco |
| DMSO | Sigma |
| dNTP | Takara |

#### **1.1.5****.** 试剂盒

|  |  |
| --- | --- |
| 逆转录试剂盒 | Promega |
| Trizol 试剂盒 | Gibcol |
| DharmFECT1 | Dharmacon |
| MiR-125b mimic | Dharmacon |
| AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒 | BD 公司 |
| 质粒小量提取试剂盒 | Biomed |
| DNA 快速纯化回收试剂盒 | Biomed |
| 胞增殖检测试剂盒 | DOJINDO LABORATORIES |
| 蛋白质定量检测试剂盒 | Pierce |

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| SYBR® Premix Ex TaqTM 试剂盒 | Takara |

#### **1.1.6****.** 质粒

pMD18-T(图1-1)：用于T-A克隆试验，从Takaraa生物工程（大连）有限公司购买

pMIR-REPORTTM Luciferase(图1-2)：用于萤火虫荧光素酶报告基因的构建，从Promega普洛麦格（北京）生物技术有限公司购买。

pGL-3-control质粒（图1-3）：用于双荧光报告系统中对照，购自Promega

普洛麦格（北京）生物技术有限公司

pRL-TK 质粒（图1-4）：用于双荧光报告系统分析作为内参质粒，购自

Promega普洛麦格（北京）生物技术有限公司

pEGFP-c1质粒（图1-5）: 用于miRNA的瞬时表达

以下为这些质粒的图谱，具体的操作按照质粒的说明书进行。

|  |
| --- |
|  |
| **图1-1** **pMD18-T质粒的结构及上面的多克隆位点**  **Fig.** **1-1** **Map of pMD18-T vector** |



**图1-2** **pMIR-REPORTTM萤火虫荧光素酶报告基因载体结构及多克隆位点**

**Fig.** **1-2** **Map of pMIR-REPORTTM Luciferase**



**图1-3** **pGL-3-control质粒结构及多克隆位点**

**Fig.** **1-3** **The pGL-3-control vector circle Map and the sequence reference points**



**图1-4** **pRL-TK质粒结构及多克隆位点**

**Fig.** **1-4** **The pRL-TK vector circle Map and the sequence reference points**



**图1-5** **pEGFP-C1质粒结构及多克隆位点序列**

**Fig.** **1-5** **The pEGFP-C1 circle map and multiple cloning sequence**

#### **1.1.7****.** 引物

**Tab.** **2** **Primers used for DNA cloning and qRT-PCR**

| Primers for DNA cloning | Sequence (5'-3') |
| --- | --- |
| MiR-125b reporter up | CTAGATCACAAGTTAGGGTCTCAGGGAA |
| MiR-125b reporter down | CGCGTTCCCTGAGACCCTAACTTGTGAT |
| Mcl-1\_WT up | TCTAGACCCAATTCATTAGGTATGACTG |
| Mcl-1\_WT down | ACGCGTGTTAGGGAAACACACTACATTTG |
| Mcl-1\_MUT up | CTGTCCCAAAAACATGCAGTCCTCTAG |
| Mcl-1\_MUT down | TTTTGGGACAGAGAAGCGTAAGAC |
| IL6R\_WT up | TCTAGAGCTAGAGTGAACTTGGGCCAC |
| IL6R\_WT down | ACGCGTCACAGCGAATATTGGATATTCCACC |
| IL6R\_MUT up | GTCCCCCTGGTCGTTTTCAACAGA AT |
| IL6R\_MUT down | CAGGGGGACAGATACTGTATTATTC |

|  |  |
| --- | --- |
| **Primers for qRT-PCR** | **Sequence (5'-3')** |
| MiR-125b RT | GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATA  CGACTCACAAG |
| MiR-125b up | GCGCTCCCTGAGACCCTAA |
| MiR-125b down | CAGTGCAGGGTCCGAGGT |
| U6 snRNA RT | AAAATATGGAACGCTTCACGAATTTG |
| U6 snRNA up | CTCGCTTCGGCAGCACATATACT |
| U6 snRNA down | ACGCTTCACGAATTTGCGTGTC |

#### **1.1.8.** **Northern**杂交探针

**Tab.** **3** **probes used for Northern blot**

| Probes for Northern blot | |
| --- | --- |
| miR-125b | TCACAAGTTAGGGTCTCAGGGA |
| U6 snRNA | CACGAATTTGCGTGTCATCCTTGC |

#### **1.1.9****.** 生物信息学分析软件和网络资源平台

##### （1) 所使用的生物信息学软件及网络资源来源：

miRNA基因组定位：NCBI Genbank ([http: //www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/)](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/))

miRNA序列来源：miRBase([http: //www. mirbase. org/](http://www.mirbase.org/))

miRNA前体及成熟miRNA序列比对：

NCBI Genba[nk (http: //www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/)](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/))

差异EST比对资源：NCBI Genbank ([http: //www. ncbi. nlm. nih. gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/))

miRNA基因promoter分析：

Prediction 2.0 [(http: //ww](http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/))w[. cbs. dtu. dk/services/Promoter/)](http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/)) Promoter Scan [(http: //thr. cit. nih.](http://thr.cit.nih.gov/molbio/proscan)) g[ov/molbio/proscan)](http://thr.cit.nih.gov/molbio/proscan))

siRNA序列来源：Ambion ([http: //www. ambion. com/](http://www.ambion.com/))

miRNA靶基因分析：

DIANA-MicroT([http: //diana. pcbi. upenn. edu/cgi-bin/micro\_t. cgi/](http://diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/micro_t.cgi/)) miRanda [(http: //ww](http://www.miRNA.org/miranda_new.html))w[. miRNA. org/miranda\_new. html)](http://www.miRNA.org/miranda_new.html))

MiGen Targets

[(Http: //ww](http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/miRGen/v3/Targets.cgi))w[. diana. pcbi. upenn. edu/cgi-bin/miRGen/v3/Targets. cgi)](http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/miRGen/v3/Targets.cgi)) Targetscan ([http: //genes. mit. edu/targetscan/](http://genes.mit.edu/targetscan/))

PicTar ([http: //pictar. bio. nyu. edu/](http://pictar.bio.nyu.edu/))

##### （2) 分子生物学软件

作图软件：GraphPad Prism 5软件；Photoshop软件聚类分析：Cluster软件

引物合成分析软件：primer-premier 5软件

DNAMAN

#### **1.1.10****.** 主要仪器

超净工作台：购自苏州安泰空气技术有限公司（中国）SW-CJ-2FD

CO2培养箱：购自Thermo公司（美国）6500

MilliQ Plus超纯水系统：购自Millipore公司（德国）低温台式离心机：购自Thermo公司（美国）

PCR仪及实时荧光定量PCR仪：购自Bio-Rad公司（美国）电泳仪：购自Thermo公司（美国）

-80ºC 冰柜：购自海尔公司

浓度监测仪：购自Thermo公司（美国）微量加样器：购自Thermo公司（美国）

荧光显微镜及照相系统：购自Nikon公司（日本）

同位素检测仪：购自上海博通化学科技有限公司（中国）

### **1.2****.** 实验方法

#### **1.2.1****.** 细胞学实验

##### （1) 细胞培养

本实验所用的细胞（HepG2、Huh7和SMMC7721）培养基为MEM-NEAA培养基、RPMI-1640培养基或DMEM培养基，双抗为青霉素和链霉素（按照说明配置），血清浓度为10%的胎牛血清(FBS)，培养箱条件按照37°C、5%CO2及饱和湿度的条件进行设置。

##### （2) 细胞复苏

首先准备好超净台、培养基及胰酶等物品，然后将液氮中的细胞取出，冻存管外套保护套放置于37°C 的水浴锅中快速融化，然后以

800转/分的速度离心5分钟后弃去上清，加入3ml培养基悬浮细胞，再以800转/分的速度离心5分钟，弃去上清，加入1ml新鲜的完全培养基悬浮细胞，然后将细胞转移至培养瓶或培养皿中继续培养。

##### （3) 细胞传代和扩大培养

当培养的细胞密度较大时则需要进行传代（以细胞未长满瓶壁为适宜），如果为贴壁细胞，需先倒去旧的培养基后，再使用新鲜的培养基轻轻洗涤细胞，倒去培养基，然后再加入适量胰酶（25cm2的培养瓶加入1ml的胰酶，根据具体情况再调整），室温或者37°C消化数分钟后在显微镜下观察细胞，如果培养瓶中的细胞间隙增大，变成单细胞时则轻轻拍打瓶壁使得细胞脱离瓶壁，按一传三或者一传四的比例传入新培养瓶或皿中继续培养。

##### （4) 细胞冻存

复苏后的细胞传代1次后，状态恢复后即可以进行冻存，尽量少传

代。冻存细胞的前一天更换新鲜培养基，800~1000转/分离心5分钟收集细胞，用适量冻存液（含10%的二甲基亚砜DMSO，20%胎牛血清的RPMI 1640 完全培养基）重悬细胞，保证稀释细胞密度在2×106~2×

107cells/ml之间。将细胞转入冻存管中，冻存程序如下：冻存管依次置于4°C 30分钟，-20°C 30分钟，-80°C超低温冰箱中冻存过夜，最后置于液氮罐中长期保存。

##### （5) 细胞转染（依照转染试剂盒操作手册具体实施）

1）转染前一天，以适当密度（30%-50%）传代细胞，使细胞在第二天转染时处于对数生长期。先用无血清的培养基将细胞洗涤一次，加入适量0.25%的胰蛋白酶消化细胞，并以1~2×10 6细胞/孔的密度将细胞重悬于无双抗的完全培养基中，将细胞吹打均匀，移入6孔板、

12孔板、24孔板中培养（移入过程要均匀，保证每孔细胞数大致相同），2ml/孔（24孔板），1.5ml/孔（12孔板），1ml/孔（24孔板）。然后置于培养箱中后最好不要挪动位置，继续培养过夜。

2）第二天转染时将培养基更换为无血清无双抗的培养基，避免双抗对转染的影响。

3）将浓度为20nM的miRNA mimics以及对应的阴性对照10μl（具体根据转染效率检测结果再调整）加入200μl无血清培养基中混匀，另外取200μl 无血清培养基中加入转染试剂Dharmafect Ⅰ10μl，室温静置5分钟。

4）将miRNA mimic和脂质体转染试剂轻轻混匀后，室温静置20分钟。

5）将混合物混匀后直接加入6孔板的中，并轻轻前后左右前后移动使其混匀，置于培养箱中后最好不要挪动位置，继续培养6~8小时后，可

将现有培养基更换为有血清和抗生素的培养基，继续培养24~48小时后进行后续步骤。

**Tab.4 Starting points for optimizing the transfection of adherent cells in different formats using Reagent.**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Plate Format | | Volumes per well | | Plating Volume(μL/well) |
| Plating Format  (wells/plate) | Surface Area  (Cm 2 /well) | DharmaFECT  （μL） | Serum-free  Medium (μL) | Transfection  Medium |
| 96 | 0.3 | 0.05 - 0.5 | 9.95 - 9.5 | 100 |
| 24 | 2 | 0.5 - 2.0 | 49.5 - 48.0 | 500 |
| 12 | 4 | 1.0 - 3.0 | 99.0 - 97.0 | 1000 |
| 6 | 10 | 2.0 - 6.0 | 198.0 - 194.0 | 2000 |

##### （6) 细胞增殖检测

1）转染前以合适密度将细胞接种至6孔或者12孔板。

2）按上述转染方法进行。

3）转染后24小时，将细胞消化下来重新铺入96孔板（一般1000~3000

细胞/孔）。

4）培养至合适的时间，加入10μl /孔CCK-8试剂后，将培养板放于培养箱内继续孵育1~4小时。

5）在450nm和630nm测定吸光度，绘制生长曲线。

##### （7) 细胞周期分析

###### 1） 收集细胞，室温，1000转/分的速度5分钟。

###### 2） 用4°C 预冷的PBS洗2遍，室温1000转/分的速度离心5分钟。

3）细胞重悬于100µl预冷的PBS后，加入400µl 4°C预冷的乙醇（开始要一滴一滴缓慢加入并边加边混匀，避免细胞局部与乙醇接触而裂解）。

4）4°C 放置过夜以固定细胞，也可固定数月，固定过程中保持不动。

5）从4°C取出细胞，于4°C 1000转/分的速度离心5分钟收集细胞，再用500µl预冷的含1%的FBS的PBS洗一遍，弃上清，加入1ml1%的FBS洗涤一次（将沉淀轻轻弹起），1000转/分，4°C，5分钟离心收集细胞，以100µl预冷的含1%的FBS的PBS重悬。

6)加入10µlRNase（终浓度20µg/ml），混匀37°C 水浴，30分钟。

7) 加入10µl(10×) PI染液（500µg/ml, 1%TritonX-100+0.9%Nacl），混匀后于4°C 孵育30分钟。

8）补加400µl含1%的FBS的PBS，流式细胞仪检测。

#### **1.2.2.** **Real-time PCR**

##### （1）Trizol法提取组织和细胞总RNA

1）取适量肝癌组织及癌旁组织或肝癌细胞，将磨碎的组织或细胞与

TRIZOL剧烈混匀，静置10分钟。1mlTRIZOL可处理约1×10 7细菌或5~10×10 6动植物、酵母细胞。细胞加TRIZOL之前不可漂洗，以防止mRNA降解。单层培养的细胞应按照培养皿的面积来决定

TRIZOL的量，一般是1ml/10cm2.

2）混合物静置，使细胞充分融解。每1mlTRIZOL加入200µl氯仿，剧烈振荡，室温放置2~3分钟，2~8°C，12000转/分，离心15分钟。

3）转移上清移至新的EP管中（吸取过程要仔细，不要吸到下面的蛋白层，避免对RNA质量影响），加入0.5ml异丙醇，上下颠倒充分混匀后于室温放置10分钟。

4）于4°C，12000 转/分，离心10分钟，弃上清。

5）加入预冷的75%乙醇1ml（DEPC水配制），洗涤沉淀（轻轻弹起沉淀）。

6）于4°C，7500 转/分，离心5分钟，弃上清。

7）晾干沉淀，加入适量体积DEPC水溶解（在白色沉淀未变透明前加入DEPC水溶解比较容易，也可在37°C 水浴锅中进行促溶解）。

8）取适量体积RNA测浓度并通过琼脂糖凝胶电泳检测质量（三条带条带清晰，注意清洗电泳槽及换用新鲜TBE缓冲液）。

9）测定浓度后将RNA于-80°C 保存备用。

##### （2）RNA质量的检测

测定RNA样品的OD260，OD280，OD230，计算RNA的浓度，分别以OD260/ OD280, OD260/ OD230判断RNA样品中有无蛋白质、有机溶剂污染。

##### （3）逆转录合成cDNA

1)在0.5ml Rnase-free的EP管中混合以下成分：

|  |  |
| --- | --- |
| 总 RNA 量 | 1.0-5µg |
| 通用引物 oligo (dT)(500µg/µl) | 1.0µl |
| DNTP (10mM) | 1.0µl |
| 灭菌 DEPC 水 | 补足 |
|  | 总体积 12µl |

2）将上述液体混匀后稍离心收集液体，置于65°C 孵育5分钟。

3）然后立即置于冰上冰浴，稍离心集中液体。

4）加入以下成分的混合液：

|  |  |
| --- | --- |
| 5×First 缓冲液 | 4.0µl |
| 还原剂 (0.1M) | 2.0µl |
| Rnase 抑制剂 (40U/µl) | 1.0µl |
| 逆转录酶 (200U/µl) | 1.0µl |

5）混匀后稍离心收集液体37°C 反应1小时。

6）最后70°C，15分钟终止反应，反应产物可冻存于-20°C 备用。

7) PCR扩增β-actin或者GAPDH, miRNA扩增U6，检测cDNA质量。

##### （4) Real-time PCR

1）以β-actin或者GAPDH为内参，miRNA使用U6作为内参，每个样品有3个重复孔，反应体系如下：

|  |  |
| --- | --- |
| 2×mix | 10μl |
| 探针 | 1μl |
| 上游引物（10μM） | 0.4μl |
| 下游引物（10μM） | 0.4μl |
| cDNA | 1μl |
| 双蒸水 | 7.2μl |
| 总体积 | 20μl |

充分混匀避免气泡形成，小心准确移液，避免荧光干扰及污染，戴手套操作，PCR 管应不与其它物品接触，加完液体后将96 孔

板置于离心机中2000转/分离心2分钟，整个过程在冰上进行。

2）操作bio-rad CFX96操作软件：选择样品（反应）类型和取名，输入样品名称，重复样品的名字必须完全相同，设置“引物及探针”，编辑热学过程：Stage 1: 94°C，10秒，Stage2: 94°C，5秒，60°C ，

34秒，共40个循环，保存设置。

3）将96孔板放入PCR仪器中，点击“开始”按钮，运行反应，机器自动收集荧光值并保存。

4）自动设定阈值或者手动调整，分析mRNA或者miRNA的相对表达水平。

#### **1.2.3.** **Northern blot**

##### （1) 细胞或者组织总RNA的制备

应用Trizol试剂盒分别提取肝癌及癌旁组织以及实验中所用肝癌细胞系总RNA，方法同上述提取RNA方法，最后溶解的时候尽量使用少的DEPC水保证RNA浓度。

##### （2) 末端标记法标记探针

所有试剂按照下表中次序加入，37°C 水浴，60分钟。

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 体积 |
| RNA 模板（20 μmol/L） | 10μl |
| 10×标记缓冲液 | 5 μl |
| [γ-32P] ATP(10μCi/μL) | 5 μl |
| T4 多核苷酸激酶 | 1 μl |
| DEPC 水 | 补足 |
| 总体积 | 50 μl |

##### （3) miRNA的PAGE胶电泳、转膜、杂交及放射自显影

###### 1) 首先制备PAGE 胶

先将电泳槽及电泳板等在DEPC水中浸泡过夜，并按照下表所列试剂配置15%的分离胶(20ml)，注意保持胶板密闭性好，配置好的胶液封后液面不能下降太多，否则配置的胶密度不均匀（配置高质量的胶）。

|  |  |
| --- | --- |
| DEPC 水 | 2 ml |
| 5×TBE 缓冲液 | 4 ml |
| 尿酸 | 9.6 g |
| 45%丙烯酰胺 | 6.66 ml |
| 10%过硫酸铵 | 150 μl |
| TEMED 催化剂 | 6.5 μl |

###### 2） 加样及电泳

按照下表依次加入试剂，于55°C，水浴30 分钟，冰浴5 分钟。

|  |  |
| --- | --- |
| 总 RNA | 40μg |
| 去离子甲酰胺 | 10μg |
| 10× loading 缓冲液 | 2μg |
| 加 EDPC 水至总体积 | 20μl |

第二天在电泳槽内加入1×TBE电泳缓冲液进行预电泳30分钟，然后仔细吸取20μl总RNA样品混合液进行上样，将枪头深入胶孔底部，保证上样时无样品从孔中流出，然后设定稳流20mA进行电泳，当指示剂快跑至距离玻璃板底部时结束电泳，取下凝

胶，进行下一步操作。

###### 3） 电转移

新鲜配制0.5×TBE电转缓冲液。将凝胶块、尼龙膜和棉垫分别放入装有电转缓冲液的容器里预先侵泡10分钟，并按照一定顺序海绵、滤纸、凝胶、尼龙膜、滤纸、海绵进行电转，保证胶在负极，尼龙膜在正极，倒入印迹液，在转移槽外使用冰水进行降温。设定稳流200mA进行电转2小时后结束。期间注意观察，电泳结束后将尼龙膜在2×SSC（17.53 g/L NaCl; 8.82g/L柠檬酸钠·2H2O, pH 7.0）里漂洗5分钟，晾干后紫外胶联，-20°C进行保存。

###### 4） 杂交及放射自显影

杂交：将尼龙膜放入杂交管中并加入预杂交液，37°C 摇箱预杂交

1~2小时，然后加入放射性同位素标记的探针，继续于37°C

摇箱中杂交16~24小时。

洗膜：杂交结束后，先用新鲜配置的缓冲溶液（0.5×SSC ，

0.1%SDS）于室温洗膜2次，然后再用缓冲溶液（1×SSC，

0.1% SDS）于37°C 洗膜1~2次（每次10分钟），使用发射检测仪检测无RNA区域没有放射性信号为止。

放射自显影：在室温环境下，将杂交膜用0.1×SSC溶液稍微漂洗，使用滤纸吸干水滴后用保鲜膜封好。-80°C进行放射自显影。

整个过程注意防护，严格遵照安全流程进行。

###### 5） 探针剥离及再杂交

0.1% SDS/0.1×SSC溶液煮沸后加入杂交膜，处理5分钟。2

×SSC洗膜2次，每次5分钟，阴干于-20°C保存，或直接杂交新探针。杂交方法同以上所述。

#### **1.2.4****.** 重组质粒的构建

##### （1) 构建miR-125b过表达质粒

1）首先从基因库中查找pre-miR-125b的序列，使用引物设计软件设计带酶切位点的目的序列，以基因组为模板进行特异PCR扩增目的条带，琼脂糖凝胶电泳至合适位置，紫外灯下切下目的条带进行胶回收，测定回收的PCR产物浓度及质量。

2）将PCR产物连接至pGEM-T easy或者pGEM-T质粒上，转化并涂板，培养12~18小时后挑取单克隆进行测序并分析。

3）连接体系（pEGFP-C1质粒和酶切后纯化目的基因）如下：

|  |  |
| --- | --- |
| 10×T4 DNA 连接缓冲液 | 1.0μl |
| T4 DNA 酶 | 1.0μl |
| pEGFP-C1 | 0.5μl |
| miR-125b 胶回收产物 | 4.5μl |
| ddH2O | 补足至 10 μl |

4）在4°C连接过夜或者根据说明书选择温度及时间，然后转化感受态大肠杆菌h109，并涂布LB平板（氨苄抗性）上。

5）37°C 培养箱中过夜16~24小时，等待长出菌落后，超净台中使用

200μl枪头或者灭菌的牙签挑单克隆菌落于0.5ml含有氨苄的LB

培养基中，于37°C、200转/分钟振荡培养8~12小时。

6）菌液PCR检测，并测序并分析。

##### （2) 表达质粒pAd track CMV-miR-21同样用上述方法构建。

#### **1.2.5****.** 质粒**DNA**的提取

##### （1）大肠杆菌的转化

1）取5μl连接产物或1μl质粒加入30μl~50μl感受态细胞中，轻轻吹打混匀后，置冰浴放置30分钟。

2）于42°C水浴锅中热休克45秒~90秒，迅速置于冰上冷却，2分钟后再移动。

3）加入500μl无抗LB培养基，于37°C振荡培养45分钟~60分钟，使宿主菌复苏并表达抗性蛋白。

4）2000转/分钟，离心1分钟，弃去上清。取100μl涂布于LB琼脂培养基（氨苄抗性），于37°C 培养箱中倒置培养12~16小时。

5）待菌落长出后，超净台中使用200μl枪头或者灭菌的牙签挑单菌落接种于500μl含氨苄的LB培养基中，37°C振荡培养4~6小时，菌液送至测序公司进行序列鉴定。

##### （2) 质粒DNA的小量提取和定量（质粒提取试剂盒操作说明进行）

1）转化按照上面步骤进行，取上一步鉴定后的菌液100μl加入到5 ml的新的LB培养基（氨苄）中，于37°C以200转/分钟的速度震荡培养8~12小时（菌液浑浊）。

2）将浑浊菌液移入1.5ml离心管中，以12000转/分钟的速度离心 1

分钟，弃去上清液。加入100μl冰预冷的溶液I，充分震荡。

3）再加入150l溶液II，盖住盖子后立即温和来回颠倒离心管数次，使得细菌充分裂解，然后于室温静置1分钟，待溶液变清亮后再进行下面操作。

4）加入150μl溶液III，盖住盖子后立即轻柔来回颠倒离心管数次，然后于室温静置5分钟以上，4°C以12000转/分钟的速度离心5分钟。

5）加入420l DNA结合溶液到上述步骤中离心的上清液中混合均匀，再加入到吸附柱中，4°C 12000转/分钟的速度离心1分钟，弃去废液。

6）加600μl清洗缓冲液到吸附柱中，12000转/分钟离心1分钟，弃去废液。重复1次。

7）取出吸附柱后，放到新的1.5mlEP管中，加入30~50μl DP洗脱溶液，室温溶解5分钟，12000转/分钟的速度离心1分钟，测定浓度及质量后于-20°C 长期保存。

##### （3) 质粒DNA的大量制备及纯化

###### 1） 转化按照上面步骤进行，挑转化后的单克隆菌落，接种于1ml LB

培养基（氨苄）中，37°C 振荡培养8~12小时。

###### 2） 将1ml活化菌液接种于氨苄抗生素的100~300ml LB培养基（氨苄）中，37°C 振荡培养12~16小时。

3）50ml离心管收集菌液，8000转/分钟的速度离心10分钟，弃上清。

4)用预冷的STE缓冲液（配置方法为终浓度为10mmol/L Tris-HCl pH8.0, 0.1mol/L NaCl, 1mmol/L EDTA pH8.0的液体）重悬菌体，

吹打均匀后转移到新的50ml离心管中，然后加入5ml SolutionⅠ

（25mmol/L Tris-HCl, 10mmol/L EDTA），振荡充分混匀。

5)将上一步的浑浊液体加入9ml Solution Ⅱ（0.2mol/L NaOH, 1%

SDS），轻轻上下颠倒数次使液体混合均匀，然后冰上放置5分钟以上。

6)加入9ml SolutionⅢ，于4°C 5000转/分钟的速度离心10分钟，弃上清。

7）加入6mol/L KA（pH4.8）至菌液中，上下颠倒混匀，然后冰上放置10分钟。

8）于4°C 12000转/分钟的速度离心10分钟，上清为所需要的成分，将上清转入到新的50ml离心管中。

9 将移入新管的液体加入等体积的异丙醇并混和均匀，室温静置10

分钟。

10）于室温下以12000转/分钟的速度离心15分钟，弃上清，倒置后凉干。

11）加入预冷的75%乙醇1ml进入沉淀中，室温静置2分钟，吹打沉淀使其悬浮后，转入新的EP管中。

12）将转移到新管的溶液以12000转/分钟的速度离心5分钟，下层沉淀未所需成分，弃去上清。

13)将沉淀放于室温中晾干，加入400μl TE和90l 10mg/ml的Rnase

A，于37°C 消化1小时。

14）先用tris饱和酚抽提一次，再用酚/氯仿（1:1配置）抽提1次，最后使用氯仿抽提两次，10000转/分钟的速度离心15分钟。

15）加入50μl的3 mol/L的醋酸钠(pH4.6)和1ml预冷的无水乙醇并混匀，放置于室温30分钟以上。

16）12000转/分钟的速度离心10分钟，用75%乙醇洗涤沉淀一次，

12000转/分钟的速度离心5分钟，弃上清。

17）沉淀凉干后加入500μlTE缓冲液溶解。测定浓度及质量后冻存于

-20°C 冰箱中。

#### **1.2.6****.** 细胞流式检测

##### （1) 转染后24~48小时间细胞未长满前收集细胞并计数，最低检测细胞数为5×10 5/孔。

##### （2) 使用PBS缓冲液洗涤细胞2次，2000转/分钟的速度离心5分钟。

##### （3) 加入一抗杂交30分钟，100μl PBS中加入2μl一抗，避光孵育10分钟。

##### （4) PBS缓冲液洗涤细胞2次，2000转/分钟的速度离心5分钟。

##### （5) 加入二抗杂交30分钟，稀释比例约100μl PBS中加入2μl二抗，避光孵育10分钟。

##### （6) PBS缓冲液洗涤细胞2次，2000转/分钟的速度离心5分钟。

##### （7) 使用500μl PBS缓冲液重悬后，按照流式细胞仪的操作程序进行流式检测并分析。

#### **1.2.7.** **Western blot**印迹

##### （1) 蛋白的提取及定量

待细胞生长至合适时间，收集培养皿或者培养板中的细胞，以

800转/分的速度离心5分钟。弃去上清，使用PBS洗涤细胞2遍，弃上清，冰上加入适量细胞裂解液（使用前加入蛋白酶抑制剂并预冷，按照50mMTris-HCl pH7.4; 150mM NaCl；1%NP-40; 0.1%SDS，比例进行配置），置于冰上反应30分钟，于4°C 10000转/分的速度离心10分钟，吸取上清，勿吸到沉淀。用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白样品的浓度，加入5\*蛋白loading缓冲液及ddH2O调定浓度后，100°C煮10分钟，-80°C冻存。裂解液及其它试剂及整个过程在冰上操作防止蛋白质的降解。

##### （2) 蛋白质电泳

根据目的条带的大小配制好合适浓度的分离胶和浓缩胶，以恒定电压80V（或者在浓缩胶中时使用120V，当电泳跑至分离胶时设定80V）进行蛋白质电泳分离。当溴酚蓝指示剂电泳至接近底部时结束电泳，取下凝胶，注意动作轻柔勿将凝胶撕破，弃去浓缩胶，留下分离胶，若蛋白体积较大（大于200KD则可留下部分浓缩胶）然后进行转膜步骤。

按下表配制分离胶和浓缩胶（单位ml）：

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | ddH2O | 30%  丙烯酰胺 | 1.5M  Tris-HCl pH8.8 | 1.0M  Tris-HCl  pH6.8 | 10% SDS | 10% AP  过硫酸铵 | TEMED |
| 分离胶  12％(10ml) | 3.2 | 4.0 | 2.5 | ——— | 0.1 | 0.045 | 0.0045 |
| 分离胶  10％(10ml) | 4 | 3.3 | 2.5 | ——— | 0.1 | 0.1 | 0.004 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 浓缩胶  4％(6ml) | 4.1 | 1.0 | ——— | 0.75 | 0.06 | 0.06 | 0.006 |

##### （3) 蛋白质的电转移

1）转膜所需的海绵、滤纸和PVDF膜（预先需先用甲醇浸泡激活）等用新配制的电转缓冲液在使用之前浸泡，同时使用刮板挤出海绵及滤纸中的空气，PVDF膜在转膜之前要用甲醇浸泡1~2分钟以激活其功能。

2）电转时电转架黑色面向下放入电转液中，首先放一层浸湿的海绵，其上放置适量的滤纸，滤纸之间不可有气泡，将凝胶轻轻抓起，从一侧紧贴滤纸置于滤纸上，缓冲液冲洗多次，继续放置三层滤纸，小试管滚动赶出滤纸内气泡，在放置一层海绵。夹紧塑料夹。

3）将电转夹以正确的方向放入电转槽中最终使蛋白质由负极向正极运动，应使电转体系在低温条件下进行（电转槽应置于冰水混合物中）。接上电源，电流300mA，转膜40~90分钟（根据实验目的分子量大小）。

4）电转结束后，取出并拆卸电转夹，取出PVDF膜，做好标记（蛋白面）。

##### （4) PVDF膜封闭及目得抗体孵育

###### 1） 按蛋白质的分子量大小不同，电转不同的时间，结束电转后，取出PVDF膜，不可将其撕裂，用事先配制好的TBST洗涤5分钟以洗去电转缓冲液。

###### 2） 封闭PVDF膜：TBST洗好后，将其封闭于事先用TBST溶好的牛奶中

15~20°C, 2~4小时。

###### 3） 第一次抗体孵育：将膜放于一抗溶液（用封闭液按比例稀释）中，4°C

孵育过夜（或室温孵育2小时）。

###### 4） TBST洗膜：4次，每次10分钟。

5）杂二抗：将膜置于牛奶配置的与一抗同源的过氧化物酶溶液中，TBST按所需浓度配制，4°C 摇床颠倒2小时左右。

6）TBST洗膜：将孵育好二抗的PVDF膜置于TBST中洗3次，每次10

分钟。

7）显影：将膜置于塑料膜上，晾干，在有蛋白的一面均匀滴加ECL反应液，根据荧光强弱决定压片时间。

8）依次放入显影液及定影液中，目得条带显影。

##### （5) 二次目得抗体的杂交

每一张PVDF膜可以反复杂交多种抗体（即再标记与反复标记），但是，若两个目的蛋白分子量相差小于5kD，膜在首个蛋白显影后需经过抗体洗脱液的处理后，再标记另一个；若两个目的蛋白的分子量相差在5kD以上，最好使两个蛋白杂交的二抗来自不同种属。

1）洗掉前一抗体再次杂交

用抗体洗脱液（配制成分：β-巯基乙醇800μl，SDS 2g, Tris 0.756g，

HCl调pH至6.7）对显影后的PVDF膜进行洗脱：将洗脱抗体的PVDF膜置于TBST中洗3次，每次10分钟，之后用配制好的5%的牛奶封闭2小时以上。其余操作同前。

2）直接杂交另一个抗体

用TBST对前次显影后的膜进行冲洗：每次10分钟，3次，室温封闭1~2小时。杂交另一蛋白的一抗，后同前免疫印迹。

#### **1.2.8****.**双荧光素酶报告基因实验

(1)使用前将5×PLB稀释到1×PLB使用。用完后冻存于-20℃冰箱中，24孔板每孔加入100μl 1×PLB 。

(2)将冻干的荧光素酶底物溶于10ml的buffer II缓冲液中，制成可直接使用的LAR II，并使用锡箔纸包裹周围避光-80℃保存。

(3)按照说明将50×stop& Glo底物用Stop& Glo 缓冲液稀释至1×Stop&Glo

检测液使用。

(4)细胞转染后24~48小时之间选择合适时机，吸去培养基，并用PBS漂洗1遍，吸干净PBS，操作过程要轻柔。

(5) 24孔板每孔加入100μl的1×PLB，在室温下摇床轻摇10分钟，然后置于冰上继续轻摇20分钟，最终形成细胞裂解液。

##### （6) 使用96 孔板测定firefly 荧光值/renilla 荧光值，使用机器前先使用

ddH2O和75%的酒精冲预洗机器，将LAR II和Stop&Glo检测液预先填充，选择所要测定的孔进行测量。

##### （7) 计算并统计。

## **2.** 结果

### **2.1.** **HE**染色比较肝癌组织与正常组织的形态差异

分别对六对肝癌组织和癌旁组织（NO.1-NO.6）做HE染色处理，组织切片结果显示(Fig. 1)，肝癌组织细胞核质比明显增加，着色加深，细胞形态异常，门静脉区脉管严重紊乱。（×100）



**Fig. 1 Hepatocellular carcinoma tissue were treated by hematoxylin and eosin (H&E) staining.**

### **2.2.** **miR-125b**在**HCC**和**HCC**细胞系中表达下调

为了鉴定miR-125b的表达情况，用Northern blot检测6对异常分化的HCC

病人组织。结果表明，miR-125b 在肿瘤组织中的表达要明显低于癌旁组织

（Fig.2a）。另外，在肝癌细胞系（HepG2、Huh7和SMMC7721）中检测miR-125b的表达情况，结果显示3个细胞系中miR-125b的表达水平均也低于正常肝组织（Fig.2b）。进一步用qRT-PCR( quantitative real-time PCR)检测32对肝癌组

织标本中miR-125b的表达水平，结果仍旧显示其在肿瘤组织中的表达明显低于癌旁组织（Fig. 2c）。以上结果提示，miR-125b在HCC中可能作为抑癌因子发挥作用。



**Fig.** **2** **MiR-125b is down-regulated in primary HCC tissues and HCC cell lines.**

(A) Northern blot analysis shows a marked decrease in 6 pairs of HCC tissues (HCC) as compared to the

Matching control (NC).

(B) Northern blot analysis shows a remarkable decrease of miR-125b expression in HCC cell lines (HepG2, Huh7, and SMMC7721) relative to normal liver tissue (NC).

(C) Validation of differential expression of miR-125b in amplified HCC tissues and controls. Expression levels of miR-125b in an independent validation set of 32 HCC patients and matched controls. Expression levels of miR-125b were quantified by real-time RT-PCR assay and normalized using the NC-1 sample. P value calculated using nonparametric test.

### **2.3.** **qRT-PCR**检测**miR-125b**过表达情况

为了深入了解miR-125b 在HCC 中的生物学功能，我们应用miR-125b

mimic转染HepG2细胞，qRT-PCR检测其转染后表达水平。结果显示，mimic转染组miR-125b的表达水平显著高于空白对照组，说明转染成功（Fig. 3）。



**Fig. 3 Over-expression of miR-125b by transfection of miRNA mimic.**

Real-time PCR was performed to analysis the expression of miR-125b after transfecting the miR-125b mimic

And scramble respectively.

### **2.4.** **miR-125b**抑制**HepG2**细胞的增殖

进一步用CCK-8实验检测miR-125b过表达之后对HepG2细胞增殖的影响。结果表明，外源性增加miR-125b的表达能显著抑制HepG2细胞的增殖（Fig. 4）。



**Fig. 4 CCK-8 assay for proliferation of HepG2 cells after transfection with miR-125b mimic or scramble at different cultured times.**

### **2.5.** 过表达**miR-125b**抑制**HepG2**细胞周期

过表达miR-125b之后，流式检测细胞周期。结果显示，过表达miR-125b

的HepG2细胞，处于G1期的细胞百分比为54.3%, S期细胞的百分比为32.4%，

而转染对照寡核苷酸Scramble的HepG2细胞中，处于G1期的细胞百分比为

45.7%, S期的细胞百分比为38.9%，说明过表达miR-125b后显著抑制了HepG2细胞G1/S期的细胞周期转换，导致整个细胞周期运行的减缓（Fig.5）。以上结果表明miR-125b能够在体外水平有效抑制HepG2细胞的增殖和细胞周期。



**Fig. 5 Cell cycle analysis of HepG2 cells treated with miR-125b mimic or scramble and cultured for 24 h after cell transfection.**

### **2.6.** **miR-125b**靶基因的预测及报告基因实验验证

为了探究miR-125b在HCC中可能的调控途径，我们应用生物信息学数据库TargetScan和PicTar预测出了miR-125b潜在的靶基因。其中，Mcl-1和IL6R是两个在多种肿瘤中被深入研究的癌基因[1-6]，包括肝细胞性肝癌。将Mcl-1和IL6R的3’UTR分别克隆到萤火虫荧光素酶报告基因载体（pMIR-reporter）的下游(Fig. 6a)，然后将报告基因载体和miR-125b mimic共转入293T细胞中，

检测发现两者萤光素酶表达水平与对照相比显著下降，而将潜在作用位点突变之后，萤光素酶表达水平与对照相比无明显差异，说明miR-125b与Mcl-1 和

IL6R的3’UTR的确存在相互作用(Fig. 6b)。



**Fig. 6 Reporter gene assay is performed to analyze the target gene of miR-125b.**

(A) Sequences of the miR-125b binding sites within the human Mcl-1 and Il6R 3′UTRs and schematic reporter constructs. Mcl-1\_WT and IL6R\_WT represent the reporter constructs containing the entire 3′UTR sequences of Mcl-1 and Il6R. Mcl-1\_MUT and Il6R\_MUT represent the reporter constructs containing mutated nucleotides.

(B) Relative luciferase activities analysis of Mcl-1\_WT, Il6R\_WT, Mcl-1\_MUT, and IL6R\_MUT in 293T cells.

Error bars are derived from three experiments in triplicate. \* indicates P <0.01.

### **2.7.** **Western blot**验证**miR-125b**的靶基因

通过Western blot发现在转染了miR-125b mimic的HepG2细胞中，Mcl-1和IL6R在蛋白水平的表达也出现明显下降(Fig.7)。以上结果为HCC细胞中miR-125b对Mcl-1和IL6R表达的负向调节提供了实验依据，也提示了miR-125b在HCC细胞中所发挥的抑癌作用很可能就是通过靶向抑制Mcl-1 和

IL6R的表达水平而实现的。



**Fig. 7 Mcl-1 and Il6R are conformed to be the target of miR-125b.**

Immunoblotting for Mcl-1 and Il6R in extracts from HepG2 cells transfected with miR-125b mimic or scramble.

### **2.8.** **Mcl-1**和**IL6R**的表达下调能抑制**HCC**的细胞增殖

Mcl-1和IL6R作为致癌因子被证明表达于多种肿瘤组织中。因此，我们推测通过阻断Mcl-1和IL6R在HCC中的表达，可能会有效抑制肿瘤细胞的生长。我们用siRNA分别干扰Mcl-1和IL6R的表达后，观察到其细胞增殖出现了显著的抑制，这表明这两个基因的下调确实可以在一定程度上抑制HCC细胞的增长(Fig. 8)。



**Fig. 8 Interference of Mcl-1 and Il6R expression inhibits the cell proliferation in HepG2 cells.**

CCK-8 assay for proliferation of HepG2 cells after transfection with specific siRNAs targeting Mcl-1 (si\_Mcl-1) and IL6R (si\_IL6R) or scramble at different cultured times.

### **2.9.** **Mcl-1**和**IL6R**的表达下调能抑制**HCC**的细胞周期

siRNA分别干扰Mcl-1和IL6R的表达后，流式检测处理后对HepG2细胞周期的影响。结果显示，与对照组相比，Mcl-1和IL6R的表达受到抑制后，S期细胞均明显减少，说明两者可直接影响到HCC细胞周期的循环(Fig. 9)。



**Fig.2-9 Cell cycle analysis of HepG2 cells treated with specific siRNAs targeting Mcl-1 (si\_Mcl-1) and IL6R (si\_IL6R) or scramble and cultured for 24 h after cell transfection.**

### **2.10.** **miR-125b**通过靶向抑制**Mcl-1**和**Il6R**干扰**HCC**细胞增殖

尽管已经证明Mcl-1和IL6R是miR-125b直接的靶基因，并且在HepG2细胞中过表达miR-125b也能改变细胞增殖和细胞周期，但是这两者之间的直接联系仍不十分清楚。为了鉴定miR-125b是否是通过直接靶向调节Mcl-1 和

IL6R 而发挥抑癌基因的作用，我们选择用一组“拯救”实验来证明两者的直

接联系。首先，我们制备了两个重组体分别包含Mcl-1和IL6R，并都包含一段完整的ORF区(pcDNA-Mcl-1 and pcDNA-IL6R). 在转染miR-125b mimic 后

24小时再分别转入pcDNA-Mcl-1和pcDNA-IL6R重组体，我们发现Mcl-1和IL6R基因的表达都有所恢复(Fig.10a)。与此一致的是，细胞周期检测发现其S期细胞数量也显著恢复。因此，通过以上实验我们证实了，miR-125b能够靶向调节Mcl-1和IL6R从而特异性的抑制HCC的细胞增殖，发挥抑癌基因的作用(Fig. 10b)。



**Fig. 10 Interference of Mcl-1 and Il6R induced by miR-125b directly suppress the cell proliferation and cell cycle in HepG2 cells.**

(A) HepG2 cells were treated under the―rescue‖condition. Immunoblotting of Mcl-1 and IL6R in extracts from HepG2 cells that were transfected with miR-125b mimic or the scramble for 24 h and then subsequently treated for another 48 h with either pcDNA-Mcl-1, pcDNA-IL6R, or pcDNA-empty.

(B) Cell cycle analysis of HepG2 cells treated under the―rescue‖condition as described above.

## **3.** 讨论

非编码RNA发现之前，存在于基因间或内含子区域内的非编码基因通常被认为是基因组内的“垃圾”信息，并不发挥任何生物学功能。但随着众多miRNA等非编码RNA的发现，人们重新认识到了这一类“垃圾”分子的重要作用[7-10]。非编码RNA存在于多种生物基因组内，通过与编码基因序列完全或部分互补结合，在转录后水平发挥基因表达调控的作用。miRNA由RNA聚合酶II催化起始转录，经过细胞核内及核外一系列酶加工，最终产生22个核苷酸左右的双链分子。其中一条链迅速降解，另一条单链分子通过完全或部分互补结合于靶基因序列内的调控位点，抑制蛋白质编码基因的翻译，影响mRNA的稳定性。miRNA是非编码RNA中研究最为深入、作用机制相对明确的一大类调控分子，其功能广泛，几乎涉及生命活动的各个方面，如组织器官发育、细胞增殖和凋亡、细菌和病毒感染、细胞代谢和癌症发生与转移等[11, 12]。miRNA是非编码RNA，本身并不编码蛋白质，它是通过与特异的靶mRNA结合使之降解或者抑制其翻译，从而降低相关靶基因蛋白质的表达。目前，人类基因组已经鉴定出了1000多个

miRNA，它们调控着35%左右的蛋白编码基因，而且miRNA组成的调控网络也是极其复杂的。研究发现，一个miRNA可以同时调控多个蛋白质编码基因，而多个miRNA也可同时调控一个蛋白质编码基因，这就形成了一个交错复杂的调控网络，影响着人体内多个重要信号通路中功能分子的表达[13]。然而，一旦这个网络中某个miRNA的表达发生异常，就会导致与之相关的众多疾病的发生，如心血管疾病、恶性肿瘤等[14-17]。

恶性肿瘤是一种发生机制异常复杂的疾病，往往涉及到肿瘤微环境中的多种调控因子的表达失控[18]。肿瘤的发生常常是因为体内癌基因和抑癌基因的表达异常，使细胞生长异质化而失去控制，具备了恶性特征。主要表现为失控的细胞增殖、抗凋亡及侵袭等。miRNA是肿瘤发生微环境中非常重要的一种小分子，其表达失控会引起包括其调控的靶基因以及相关的重要信号通路组成的调

控网络发生异常，促进了肿瘤的发生及进展，目前已经成为肿瘤研究中的热点，需要更多的实验研究去探索。

原发性肝癌是一类在世界范围内高发的恶性肿瘤，其发生率居恶性肿瘤第五位，全球每年新发肝癌患者约50万例[19]，致死率排名第三位[20]，其中肝细胞癌（HCC）是其主要组织学类型，约占全部肝癌数量的70~85%，我国肝癌的病死率居恶性肿瘤死亡率的第二位[21]，几乎占全世界肝癌死亡人数的45%。

HCC的病死率很高，多数患者在确诊后1年内死亡。近年来，随着手术技术的改进，HCC的存活率有所提高，但是，患者复发及转移的情况仍然很常见，预后较差。因此，更加需要科研工作者们对HCC的发生机制做全面深入的研究，以尽快解决或是改善HCC对患者所带来的伤痛。HCC的发生机制比较复杂，包括表观遗传、染色体突变、蛋白编码基因突变以及非编码RNA基因的突变等等。尽管在HCC中发现了许多致癌基因和肿瘤抑制因子，但非编码RNA分子在HCC肿瘤生物学中的功能则是近几年来才被开始关注[22]。miRNA作为新型的调控分子，在HCC发生过程中的功能以及与HCC诊断、治疗的关系是目前备受关注的课题之一，HCC发生过程中常见染色体不稳定性改变以及一些重要蛋白质编码基因、非编码基因的表达出现异常。所以，探究哪些miRNA在HCC中表达异常从而发挥抑癌或致癌的作用，成为首要条件。

miRNAs可能作为一种癌基因或抑癌基因参与到各种肿瘤的发生发展过程中。通常认为，miRNA表达上调则是抑制抑癌基因的表达而发挥癌基因的功能，

miRNA表达下调则是通过抑制癌基因的表达而发挥抑癌基因的功能[23]。另外，

miRNA通过调控其靶基因与其他相关基因相互作用构成一个庞大而复杂的调控网络，参与调控肿瘤的发生发展过程。肿瘤相关miRNAs的鉴别、以及它们的靶基因，是理解miRNAs在肿瘤发生发展过程中所扮演角色的关键依据，它们可能发展成为新的肿瘤治疗靶点。

在恶性肿瘤中，miRNA的表达具有一定的组织特异性，相同的miRNA在

不同的肿瘤组织中存在特异的miRNA表达谱，在不同肿瘤组织中miRNA的表达水平也可能不相同，甚至呈现相反表达的情况，说明miRNA在生物体内的的作用机制极其复杂。研究表明，miR-125b在肿瘤中的表达水平存在很大争议

[24-27]. miR-125b可能是一种癌基因，也可能是一种抑癌基因，其角色的选择决

定于所处的细胞环境。在前列腺癌细胞中，miR-125b的高表达能靶向抑制Bak1从而激活雄性激素非依赖性增长[28]；而在乳腺癌中，高表达miR-125b则能阻断ERBB2 (HER2)和ERBB3 (HER3)，从而抑制肿瘤的生长[29]。尽管如此，miR-125b在人肝细胞性肝癌中的作用和功能仍不明确。

本研究中，我们检测了miR-125b在HCC组织和细胞系中的表达水平，探讨了其生物学作用和在肿瘤发生发展过程中的调节机制。我们检测了32 对

HCC组织以及3个肝癌细胞系中miR-125b的表达水平，结果显示，与癌旁组织相比，miR-125b在HCC组织中的表达明显下调，这提示miR-125b有可能作为一个肿瘤抑制因子在HCC中发挥重要作用。接下来我们通过外源性过表达miR-125b发现其明显抑制了HepG2细胞的增殖和细胞周期，从而证明了我们的设想。

众所周知，miRNAs的功能是通过特异性结合靶mRNA的3' UTRs干扰和抑制其翻译。在最开始鉴定miR-125b靶基因的过程中，我们通过生物信息学数据库预测了3' UTRs序列中包含与miR-125b配对结合的潜在靶基因，综合考量了各项评分指标，筛选出了最有可能的两个靶基因，Mcl-1和IL6R。我们通过后续的实验证明了，两者确实被miR-125b直接靶向抑制。髓样细胞白血病

-l基因(Myeloid Cell Leukemia—l, Mcl-1)是B细胞白血病-2基因(B cell

Leukemia-2, Bcl-2）家族中的一员，是HCC中最重要的调节凋亡因子之一。Mcl-1基因在上皮细胞、淋巴组织的生发中心细胞、神经内分泌细胞等均有广泛表达，同时Mcl-1基因在恶性肿瘤组织及肿瘤细胞系中也有表达，而且Mcl-1基因定位的人l号染色体长臂在在恶性肿瘤中有重新排列现象，因此Mcl-1基因在恶性肿瘤中的调控作用的研究对于了解恶性肿瘤发生的分子生物学机制及探索

新的抗肿瘤治疗途径有着重要的社会意义，也是未来新的生物靶向治疗的重要靶点。Mcl-1在细胞的生长、分化调控过程中是重要的抗凋亡因子，调节其表达的信号传导通路中的任何一个环节出现调节紊乱都会引起Mcl-1的异常过度表达，导致包括恶性肿瘤在内的疾病发生。研究表明Mcl-1过表达可引起在人类造血系统的肿瘤以及多种实体瘤[1,2,5,30]。细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)是一种多功能细胞因子，参与细胞炎症反应、细胞增殖和凋亡的调控和免疫应答，在人类许多疾病中发挥着重要的作用。IL-6与许多肿瘤性疾病的生长有关，在这些肿瘤病人中呈现不同程度的变化，如食管癌、宫颈癌、肺癌、肝门胆管癌等的发生发展均有密切关系。IL6R作为一个细胞表面受体，通常被看做是信号传递过程中的中介分子。最近研究表明，人肿瘤细胞中过表达的IL6R与活跃增殖、抑制凋亡、增加癌细胞转移可能以及血管生成都有着非常密切的关系

[3,4,6,31]。

为了明确miR-125b是直接通过靶向抑制Mcl-1和IL6R蛋白而影响HCC细胞增殖，我们在miR-125b mimic存在的条件下外源性表达Mcl-1和IL6R，发现其拯救了由过表达miR-125b而导致的HepG2细胞增殖所受到的抑制作用；同时，当干扰Mcl-1和IL6R的表达又抑制了HepG2细胞增殖，这一结果与两者在其它癌症中的功能是一致的。

通过本研究，我们证实了miR-125b通过其两个重要靶基因Mcl-1和IL6R的干扰，作为一种抑癌因子参与到HCC的发生发展中，抑制其细胞增殖及细胞周期进程。但是，miRNA 的作用环境是一个异常复杂的调控网络，一个

miRNA可调控许多靶基因，一个蛋白编码基因又可为多个miRNA所调控。所以，miR-125b在HCC中的靶基因一定还有很多，通过这些靶基因，miR-125b可能参与了更加广泛的细胞信号传导途径。另外，已有研究发现，miR-21作为一个癌基因，能够通过靶向抑制PTEN、PDCD4及RECK等三个非常重要的转录因子，促进癌细胞的增殖及侵袭能力。MiR-21可通过抑制PTEN，影响

Akt和ERK等信号通路，通过抑制PDCD4，影响AP-1、P21、CDK4以及

MMP4K1等重要功能基因，参与肿瘤细胞增殖、凋亡及侵袭过程的调控中[32, 33]。从miR-21的研究中，我们发现其在HCC中的功能与miR-125b完全相反，那么这两个miRNA之间是否存在着紧密联系？它们的靶基因之间是否会有交集？如果有联系，它们在HCC中的调控作用是否存在着某种平衡关系？这些问题都值得我们接下来深入的探讨研究。另外，现在很多研究发现，miRNA与其靶基因之间经常形成一个反馈环路。如miR-23a能促进PU.1的表达，而miR-23a上游promoter区又存在PU.1的结合位点，PU.1可结合该位点，激活miR-23a的表达[34]。由此我们思考，miR-125b和HCC抑癌因子之间是否也存在着这样的反馈作用呢？这也很值得探索，以进一步完善这一调控网络的机制研究。

综上所述，本研究揭示了miR-125b在人肝细胞性肝癌中的新的功能，即miR-125b能够通过靶向阻断Mcl-1和IL6R的表达，抑制HCC组织和肝癌细胞系的增殖和细胞周期进程。这些结果都证明了miR-125b在HCC中是作为一种肿瘤抑制因子发挥重要的抑癌作用。那么，miR-125b能否有效抑制HCC的发生发展，则需要进一步的机制研究以及动物实验才能证明。

## 小 **结**

1、通过Northern Blot方法分析了miR-125b在6对HCC组织中的表达，发现肝癌组织miR-125b水平明显低于其癌旁组织。随后扩大样本，检测了32对肝癌组织标本中miR-125b的表达水平，结果仍旧显示其在肿瘤组织中的表达明显低于癌旁组织。

2、使用生物信息学软件预测miR-125b的靶基因，发现Mcl-1和IL6R是miR-125b在HCC发生过程中可能的靶基因。通过双报告基因实验对靶基因进行了分析并在mRNA及蛋白水平对靶基因加以验证，发现并确证Mcl-1和IL6R是miR-125b在HCC发生过程中的直接功能靶基因。

3、通过过表达miR-125b能明显抑制HepG2的增殖及细胞周期，并通过外源抑制miR-125b的靶基因Mcl-1和IL6R在HepG2中的表达，也观察到对细胞增殖及细胞周期的抑制作用。

## 4、 设计了“拯救”实验并用于研究miR-125b通过靶向抑制Mcl-1和IL6R 在

HepG2中的表达，从而证实了miR-125b能够靶向调节Mcl-1和IL6R从而特异性的抑制肝癌的细胞增殖，发挥抑癌作用。

##### 本研究的创新点

1、通过Northern Blot方法分析了miR-125b在6对人HCC组织和细胞中的表达情况。并通过qRT-PCR检测了32对肝癌组织标本中miR-125b的表达水平，结果显示其在肿瘤组织中的表达明显低于癌旁组织。此结果未见报道。

2、设计“拯救”实验系统阐明了miR-125b通过直接调控靶基因Mcl-1和IL6R

在HCC中的表达发挥抑癌基因的作用。

参考文献

[1]. Yang-Yen HF, (2006) Mcl-1: a highly regulated cell death and survival controller. J Biomed Sci. 13: 201-204.

[2]. Akgul C, (2009) Mcl-1 is a potential therapeutic target in multiple types of cancer. Cell Mol Life Sci. 66: 1326-1336.

[3]. Weidle UH, Klostermann S, Eggle D, et al, (2010) Interleukin 6/interleukin 6 receptor interaction and its role as a therapeutic target for treatment of cachexia and cancer. Cancer Genomics Proteomics. 7: 287-302.

[4]. Wang H, Lathia JD, Wu Q, et al. (2009) Targeting interleukin 6 signaling suppresses glioma stem cell survival and tumor growth. Stem Cells. 27: 2393-2404.

[5]. Akgul C, (2009) Mcl-1 is a potential therapeutic target in multiple types of cancer. Cell Mol Life Sci. 66: 1326-1336.

[6]. Kanazawa T, Nishino H, Hasegawa M, et al, (2007) Interleukin-6 directly influences proliferation and invasion potential of head and neck cancer cells. Eur Arch Otorhinolaryngol. 264: 815-821.

[7]. Yu J. Human microRNA clusters: genomic organization and expression profile in leukemia cell lines. [J] Biochem Biophys Res Commun. 2006; 349(1): 59-68.

[8]. Volinia S. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. [J] Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103(7): 2257-2261.

[9]. Wang T. A micro-RNA signature associated with race, tumor size, and target gene activity in human uterine leiomyomas. [J] Genes Chromosomes Cancer. 2007; 46(4): 336-347.

[10]. Jongen-Lavrencic M. MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia. [J] Bloo. 2008; 111(10): 5078-5085.

[11]. Beezhold KJ, Castranova V, Chen F. Microprocessor of microRNAs: regulation and potential for therapeutic intervention. Mol Cancer. 2010; 9: 134.

[12]. Herranz H, Cohen SM. MicroRNAs and gene regulatory networks: managing the impact of noise in biological systems. Genes Dev. 2010; 24: 1339-1344.

[13]. Alvarez-Garcia I, Miska EA, (2005) MicroRNA functions in animal development and human disease. Development. 132: 4653-4662.

[14]. Chen, CZ, (2005) MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. N Engl J Med. 353: 1768-1771.

[15]. Croce CM, Calin GA, (2005) miRNAs, cancer, and stem cell division. Cell. 122: 6-7.

[16]. He L, Thomson JM, Hemann MT, et al, (2005) A microRNA polycistron as a potential human oncogene. Nature. 435: 828-833.

[17]. Karp X, Ambros V, (2005) Developmental biology. Encountering microRNAs in cell fate signaling. Science. 310: 1288-1289.

[18]. Mendell JT, (2005) MicroRNAs: critical regulators of development, cellular physiology and malignancy. Cell Cycle. 4: 1179-1184.

[19]. Nouso K, Kobayashi Y, Nakamura S, et al. Evolution of prognostic factors in hepatocellular carcinoma in Japan. Aliment Pharmacol Ther. 2010 Feb 1; 31(3): 407-414.

[20]. El-Serag HB, Marrero JA, Rudolph L, et al, (2008) Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. Gastroenterology. 134: 1752-1763.

[21]. Hao XS, Wang PP, Chen KX, et al. [Twenty-year trends of primary liver cancer](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12883379) [incidence rates in an urban Chinese population.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12883379) Eur J Cancer Prev. 2003 Aug; 12(4): 273-279.

[22]. Braconi C, Henry JC, Kogure T, et al, (2011) The role of microRNAs in human liver cancers. Semin Oncol. 38: 752-763.

[23]. Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, et al. MicroRNA expression and function in cancer. Trends Mol Med 2006; 12: 580-587.

[24]. Zhang Y, Yan LX, Wu QN, et al, (2011) miR-125b is methylated and functions as a tumor suppressor by regulating the ETS1 proto-oncogene in human invasive breast cancer. Cancer Res. 71: 3552-3562.

[25]. Xu N, Brodin P, Wei T, et al, (2011) MiR-125b, a microRNA downregulated in psoriasis, modulates keratinocyte proliferation by targeting FGFR2. J Invest Dermatol. 131: 1521-1529.

[26]. Shi XB, Xue L, Ma AH, et al, (2011) miR-125b promotes growth of prostate cancer xenograft tumor through targeting pro-apoptotic genes. Prostate. 71: 538-549.

[27]. Glud M, Rossing M, Hother C, et al, (2010) Downregulation of miR-125b in metastatic cutaneous malignant melanoma. Melanoma Res. 20: 479-484.

[28]. Shi XB, Xue L, Yang J, et al, (2007) An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 104: 19983-19988.

[29]. Scott GK, Goga A, Bhaumik D, et al, (2007) Coordinateuppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. J Biol Chem. 282: 1479-1486.

[30]. Zhao A, Zeng Q, Xie X, et al, (2012) MicroRNA-125b induces cancer cell apoptosis through suppression of Bcl-2 expression. Genet Genomics. 39: 29-35.

[31]. Oka M, Iizuka N, Yamamoto K, et al, (1996) The influence of interleukin-6 on the growth of human esophageal cancer cell lines. J Interferon Cytokine Res. 16: 1001-1006.

[32]. Fujita S, Ito T, Mizutani T, et al, (2008) miR-21 Gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism. [J] J Mol Biol. 378: 492-504.

[33]. Talotta F, Cimmino A, Matarazzo MR, et al, (2009) An autoregulatory loop mediated by miR-21 and PDCD4 controls the AP-1 activity in RAS transformation. Oncogene. 28: 73-84.

[34]. Kong KY, Owens KS, Rogers JH, et al, (2010) MIR-23A microRNA cluster inhibits B-cell development. Exp Hematol. 38: 629-640.

##### 文献综述

**MicroRNA与炎症通路在炎症恶性转化过程中的研究进展**

**摘要：**非编码调节分子microRNA(miRNA)和多种炎症通路都参与了炎症的恶性转化。炎症反应本是生物体自身对抗感染和损伤的防御机制，但过度和失控的炎症反应必然会导致细胞因子和炎性反应的泛滥，反而对机体造成更严重损伤。而miRNA分子则通过对不同靶基因的调节作用，造成机体基因表达失衡，并介导和决定了各个因子之间相互调节、相互诱导和相互激活，形成级联反应和反馈调节并构成复杂调控网络，这些调节因子的相互作用共同决定了炎症恶性转化过程中的严重性和最终结果。

炎症反应是宿主系统对抗病原体感染及各种组织损伤的一种自我保护机制，由体内多种细胞与炎症因子所共同介导，参与了机体许多生理和病理调节过程。生物体内的炎症反应往往表现出高度的“两面性”，即炎症因素消除后伴随炎症反应终结的“可控性炎症”，以及持续炎症因素刺激下产生的“非可控性炎症”状态[1, 2]。近年来的研究证明，由细菌或病毒感染所导致的慢性、非可控性炎症反应与某些肿瘤有着密切的联系，它们不仅可以促进肿瘤发生，甚至会“协助”癌细胞转移至其他组织[3-5]。

过去的三十年里，细菌或病毒感染是癌症发生的重要危险因素这一观点已逐渐为研究者所接受[6]。世界卫生组织估计由感染性炎症所致癌症死亡比例在发展中国家占22％，发达国家占6％。其中，女性癌症死亡率排第三位的宫颈癌是由于人乳头瘤病毒感染所导致；幽门螺杆菌（Helicobactor. plyori, H. plyori）感染所致慢性胃炎可诱发胃癌（男性中癌症死亡率排第二位）；乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)或丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染所致病毒性肝炎常常导致一些慢性肝病，随着病程进展进一步可发展为肝硬化，最终诱发

肝癌，特别在东亚，后二者所引起的癌症死亡率分别占总癌症死亡率的18.9%

（胃癌，第一位）和14.3%（肝癌，第三位）[7-9]。尽管近几年的研究已经很大程度地增强了我们对感染性因素所致炎症恶性转化机制的理解：一系列炎症促进肿瘤的信号传导途径和关键[分子](http://www.wiki8.com/fenzi_109921/)的发现(TNF-α/IKK/NF-κb、IL-6/JAK/STATs、PPAR和AID等)[10-14]；应用一些抗炎剂和靶向[药物](http://www.wiki8.com/yaowu_3979/)切断免疫细胞与肿瘤之间的联系可以控制肿瘤的发生和发展[15]。但这一领域仍有多个方面需要研究者做出实质性的突破，如感染性因素所致炎症向非可控性炎症转化及非可控性炎症恶性转化的分子机制；非可控性炎症的诱导因素和发病机理；非可控性炎症恶性转化的“关键节点”等。因此，对癌症与炎症的关联性研究，不仅能帮助我们更多了解免疫应答效应在肿瘤发生发展中的作用和机制，同时也为临床上肿瘤的有效预防和治疗提供重要的理论依据。

在炎症恶性转化过程中，促炎性因子与抗炎性因子比例或活性失衡，促炎性炎症通路IL-6、IL-8、IL-17和TNF-α的异常激活，及抗炎性通路IL-10、TGF-β和IFN-α的抑制等[16-20]，导致炎症反应持续进行并不断放大，进一步加重了组织的损伤以致癌症的发生。比如：活化的IL-6通路会最终激活许多癌基因的表达，包括MYC、MMP2、BIRC5、VEGF、COX2等等；IL-8作为肿瘤炎症微环境中一种重要的效应因子，与肿瘤的生长及转移密切相关；激活的TNF-α受体会导致其下游TNFR受体相关因子2(TRAF2)、RIP激酶(receptor interacting protein)、IκB激酶(IKK)的顺序激活，最后造成NF-κB的活化入核，与其DNA特异序列结合并行使功能[21-24]。与此相反，抗炎性因子IL-10主要通过抑制蛋白激酶IKK的活性降低NF-κB的DNA结合力，限制了NF-κB的过度活化，抑制TNF-α、IL-6等促炎性细胞因子的释放，从而阻止病情持续恶化，尤其在癌变早期发挥重要作用。

MiRNA是非编码RNA中研究最为深入、作用机制相对明确的一大类调控分子，其功能广泛，几乎涉及生命活动的各个方面，如组织器官发育、细胞增殖和凋亡、细菌和病毒感染、细胞代谢和癌症发生与转移等[25, 26]。由于miRNA

调节方式的特点，即一个miRNA分子可以对多个mRNA分子进行靶向调控，同时一个mRNA分子也可以被多个miRNA分子共同调节，使得它在网络调控及多个信息层的交叉作用中具有独特的优势。近年来炎症领域的一些研究显示miRNA在其中扮演着重要角色，miRNA分子不但可以作为炎性因子的应答产物参与信号传导通路进而影响细胞的一系列表型（miR-146a、miR-155、miR-9、miR-223、miR-122a等），还可以作为炎症介质参与炎性反应（miR-146a、miR-15、miR-16等）[27,28]。Moschos等证明细菌脂多糖引起的细胞炎性反应可以激活miR-146a的表达[29]。促炎性因子IL-1或TNF-α的刺激均可使miR-146a的表达上调，这种激活作用是通过miR-146a启动子区的NF-κB结合位点实现的[30]。另有报道指出miR-146a通过抑制IL-1信号通路下游的IRAK-1和TRAF-6构成了对IL-1信号通路的负反馈调节[31]。同样地，miR-146a也在IL-6和IL-8激活的信号转导中发挥调节作用[32]。同时，一些肿瘤领域的研究发现多种慢性炎症所致肿瘤中miRNA的失调现象。肝细胞性肝癌（HCC）的发生及发展是一个涉及多基因、多通路、多步骤改变的复杂过程，miRNA的异常表达与肝癌的发生发展密切相关。而且，miRNA的变化可能在肝细胞癌癌前病变：如慢性肝炎时就已发生，如在胆汁性肝硬化炎症反应所致的肝癌患者中发现miR-122a和miR-26a的表达下降[33, 34]。

另外，在HCV病毒感染中，miR-122会促进病毒复制，HCV-RNA能在表达miR-122的HuH7肝癌细胞株中复制，这说明miR-122在HCV相关性肝癌的发生发展过程中有着重要的作用[35]。在多种慢性炎症导致的组织恶性病变中都发现有miR-21的激活，其中促炎性因子IL-6介导的STAT3信号通路在此过程中发挥重要作用，激活的miR-21进而抑制PDCD4、TPM1、PTEN和BTG2等抑癌基因的表达，促进细胞增殖并抑制凋亡的发生[34,36]。miR-21的功能涉及整个HCC发生发展的过程，并且调控着一个由大量靶基因构成的复杂网络，MiR-21通过调控PTEN、PDCD4和RECK影响到多个重要的信号通路和功能分子，诸如磷酸化Akt、磷酸化ERK、磷酸化GSK3-β均呈现表达下调的趋势，

与细胞周期调控相关的基因CDK4、Cyclin D表达也明显下调，而p21表达上调。说明miR-21通过影响了Akt、ERK等重要的信号通路以及细胞周期相关的重要基因，参与了细胞增殖的调控[37]。由此可见，miR-21与其靶基因以及一些相关的重要功能基因构成一个复杂的调控网络，在HCC发生发展过程中发挥了重要作用（图1）[37]。



最近，有研究发现miR-21可以直接靶向抗炎性因子IL12-p35，在溃疡性结肠炎和结肠癌组织中都存在miR-21对IL12-p35的抑制作用。因此，促炎性因子IL-6和抗炎性因子IL12-p35在结肠癌的发生发展过程中的作用通过miR-21形成了相互的联系和交叉，故而miR-21的表达水平在一定程度上决定着这两种炎性反应的偏向性[38]。体外实验也证实，抑制miR-21的表达可以有效抑制肿瘤细胞的生长，并伴随削弱的炎性反应[39]。MiR-155已被发现在调控造血细胞的分化发育、炎症、抗体合成等多种免疫反应中发挥重要作用[40]。同时，miR-155在淋巴癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌等多种癌组织中高表达，并以

类似癌基因的方式起作用，研究证明miR-155能够通过扩大炎症效应促进肿瘤发生，是炎症和癌症之间的一个桥梁[41-44]。这些结果提示miR-21和miR-155或许是炎症恶性转化过程中的“节点miRNA‖分子。此外，分泌性miRNA的发现为其作为炎症介质在免疫细胞和肿瘤细胞间进行信息传递提供了先天的条件。显然，已有很多证据表明miRNA在免疫、炎症和肿瘤这些关系紧密的生物学领域具有重要的功能作用。

炎性反应是生物体自身对抗感染和损伤的防御机制，但过度和失控的炎症反应必然会导致细胞因子和炎性反应的泛滥，反而对机体造成更严重损伤。在非可控性炎症的恶性转化过程中，大量的调节因子参与了疾病的发生发展，它们可能协同作用也可能行使相反的功能，或者促进了炎症的恶性转化或者在其中发挥抑制作用，使得炎症反应表现出促癌和抑癌两种结果。以miRNA为代表的调节因子在肿瘤发病中的作用机制已经逐渐阐明，其具有的多向性、多效性及协同性等生物学特性，决定了各个因子之间相互调节、相互诱导和相互激活，形成级联反应和反馈调节并构成复杂调控网络。这些调节因子的相互作用决定了疾病的严重性和最终结果。通过进一步考察非可控性炎症恶性转化的动态过程中miRNA表达的变化情况，获得miRNA参与炎症恶性转化的线索，并对这些可能介导炎症与肿瘤相互作用的miRNA分子分别从其功能作用和自身表达调控两个方面进行研究，可以更好地揭示miRNA参与炎症恶性转化的分子机制以及miRNA在此复杂调控网络中的作用，对了解炎症所致肿瘤的发生发展和拓展相关的诊断治疗措施具有重要意义。

参考文献

[1]. Thomas R. The balancing act of autoimmunity: central and peripheral tolerance versus infection control. Int Rev Immunol. 2010; 29: 211-33.

[2]. Erdman SE, Poutahidis T. Cancer inflammation and regulatory T cells. Int J Cancer. 2010; 127: 768-79.

[3]. Solinas G, Marchesi F, Garlanda C, et al. Inflammation-mediated promotion of invasion and metastasis. Cancer Metastasis Rev. 2010; 29: 243-8.

[4]. Hussain SP. and Harris CC. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. Int J Cancer. 2007; 121: 2373-80.

[5]. Mantovani A, Romero P, Palucka AK, et al. Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. Lancet, 2008; 371: 771-83.

[6]. Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, et al. Inflammation and cancer: how hot is the linkBiochemPharmacol. 2006; 72: 1605-21.

[7]. Stanley MA, Pett MR, Coleman N. HPV: from infection to cancer. Biochem Soc Trans. 2007; 35: 1456-60.

[8]. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, et al. Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. N Engl J Med, 1991; 325: 1127-31.

[9]. Tsukuma H, Hiyama T, Tanaka S, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease. N Engl J Med, 1993; 328: 1797-801.

[10]. Cuzick J, Otto F, Baron JA, et al.. Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: an international consensus statement. Lancet Oncol,

2009; 10:501-7.

[11]. Mantovani A. Molecular pathways linking inflammation and cancer. Curr Mol Med. 2010; 10: 369-73.

[12]. Mantovani A, Garlanda C, Allavena P. Molecular pathways and targets in cancer-related inflammation. Ann Med. 2010; 42: 161-70.

[13]. Yang L. TGFbeta, a potent regulator of tumor microenvironment and host immune response, implication for therapy. Curr Mol Med. 2010; 10: 374-80.

[14]. Wu Y, Zhou BP. TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. Br J Cancer. 2010; 102: 639-44.

[15]. Dinarello CA. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. Cell. 2010; 140: 935-50.

[16]. Murphy G, Thornton J, McManus R, et al. Association of gastric disease with polymorphisms in the inflammatory-related genes IL-1B, IL-1RN, IL-10, TNF and TLR4. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2009; 21: 630-5.

[17]. Kariya S, Okano M, Fukushima K, et al. Expression of inflammatory mediators in the otitis media induced by Helicobacter pylori antigen in mice. Clin Exp Immunol. 2008; 154: 134-40.

[18]. Razani B, Cheng G. NF- {kappa} B: Much Learned, Much to Learn. Sci Signal. 2010; 3: pe29.

[19]. Liu J, Song B, Bai X, et al. Association of genetic polymorphisms in the interleukin-10 promoter with risk of prostate cancer in Chinese. BMC Cancer. 2010; 10: 456.

[20]. Yao Z, Fenoglio S, Gao DC, et al. TGF-beta IL-6 axis mediates selective and

Adaptive mechanisms of resistance to molecular targeted therapy in lung cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107:15535-40.

[21]. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. Cancer Cell, 2009; 15: 103-13.

[22]. Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. Nat Rev Cancer, 2009; 9: 361-71.

[23]. Oguma K, Oshima H, Oshima M. Inflammation, tumor necrosis factor and Wnt promotion in gastric cancer development. Future Oncol. 2010; 6: 515-26.

[24]. Suganuma M, Yamaguchi K, Ono Y, et al. TNF-alpha-inducing protein, a carcinogenic factor secreted from H. pylori, enters gastric cancer cells. Int J Cancer. 2008; 123: 117-22.

[25]. Beezhold KJ, Castranova V, Chen F. Microprocessor of microRNAs: regulation and potential for therapeutic intervention. Mol Cancer. 2010; 9: 134.

[26]. Herranz H, Cohen SM. MicroRNAs and gene regulatory networks: managing the impact of noise in biological systems. Genes Dev. 2010; 24: 1339-44.

[27]. Davidson-Moncada J, Papavasiliou FN, Tam W. MicroRNAs of the immune system: roles in inflammation and cancer. Ann N Y Acad Sci. 2010; 1183: 183-94.

[28]. Schetter AJ, Heegaard NH, Harris CC. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. Carcinogenesis. 2010; 31: 37-49.

[29]. Moschos SA, Williams AE, Perry MM, et al. Expression profiling in vivo

Demonstrates rapid changes in lung microRNA levels following lipopolysaccharide-induced inflammation but not in the anti-inflammatory action of glucocorticoids. BMC Genomics, 2007; 8: 240.

[30]. Williams AE, Perry MM, Moschos SA, et al. Role of miRNA-146a in the regulation of the innate immune response and cancer. Biochem Soc Trans. 2008; 36: 1211-5.

[31]. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, et al. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006 103: 12481-6.

[32]. Sheedy FJ, O'Neill LA. Adding fuel to fire: microRNAs as a new class of mediators of inflammation. Ann Rheum Dis. 2008; 67: 50-5.

[33]. Padgett KA, Lan RY, Leung PC, et al. Primary biliary cirrhosis is associated with altered hepatic microRNA expression. J Autoimmun, 2009; 32: 246-53.

[34]. Wu F, Zikusoka M, Trindade A, et al. MicroRNAs are differentially expressed in ulcerative colitis and alter expression of macrophage inflammatory peptide-2 alpha. Gastroenterology, 2008; 135: 1624-35.

[35]. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. Science. 2005; 309: 1577-1581

[36]. Iliopoulos D, Jaeger SA, Hirsch HA, et al. STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1 via PTEN and CYLD are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer. Mol Cell. 2010; 39: 493-506.

[37]. Liu C, Yu J, Yu S, et al. MicroRNA-21 acts as an oncomir through multiple targets in human hepatocellular carcinoma. J Hepatol 2010; 53(1): 98-107.

[38]. Lu TX, Munitz A and Rothenberg ME. MicroRNA-21 is up-regulated in allergic airway inflammation and regulates IL-12p35 expression. J Immunol, 2009; 182: 4994-5002.

[39]. Iliopoulos D, Jaeger SA, Hirsch HA, et al. STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1 via PTEN and CYLD are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer. Mol Cell. 2010; 39: 493-506.

[40]. Jiang S, Zhang HW, Lu MH, et al. MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene. Cancer Res. 2010; 70: 3119-27.

[41]. Tili E, Michaille JJ, Cimino A, et al. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. J Immunol. 2007; 179: 5082-9.

[42]. Pedersen IM, Otero D, Kao E, et al. Onco-miR-155 targets SHIP1 to promote TNFalpha-dependent growth of B cell lymphomas. EMBO Mol Med. 2009; 1: 288-95.

[43]. He M, Xu Z, Ding T, et al. MicroRNA-155 regulates inflammatory cytokine production in tumor-associated macrophages via targeting C/EBPbeta. Cell Mol Immunol. 2009; 6: 343-52.

[44]. Ding SZ, Goldberg JB, Hatakeyama M. Helicobacter pylori infection, oncogenic pathways and epigenetic mechanisms in gastric carcinogenesis. Future Oncol. 2010; 6: 851-62.

致 谢

光阴似箭，日月飘飞。一转眼，四年的博士研究生学习就要结束。在呈上毕业论文之际，首先要表达我对导师赵浩亮教授的衷心感谢和崇高敬意！论文固然是我四年工作与学习的总结，但更是导师悉心指导和辛勤汗水的结晶，四年来，导师的谆谆教诲不仅是我在学业上取得了进步，更使我懂得了许多做人的道理。导师知识渊博、治学严谨、忘我敬业，所有这些都深深铭记在我的心里，我将受益终生！

特别感谢ft西医科大学第一医院普外科刘建生主任、赵瑛主任、张志坚主任、鲍民生主任、郭建昇主任、闫军主任、杨高潮主任、武华主任、王世明主任、马艳波主任等在收集病例、完成课题、临床实践中所给予的热情关怀和无私帮助！

感谢中国医学科学院基础研究所余佳、王芳、马艳妮等在实验方面给予的诸多指导和帮助！

感谢ft西医科大学第一医院病理科梁建芳主任、白淘、张民等以及ft西省肿瘤医院病理科王晋芬副所长等在收集标本方面给予的无私帮助！

感谢实验室同学给予无私帮助和大力支持！

借此论文完成之际，向我的父母和亲人致以诚挚的感谢，感谢你们在工作、学习、生活等方面给我的指导和教诲，是你们给了我前进的动力而没有后顾之忧！

人生的路还很漫长，但我将用我毕生的精力和爱去做好我的本职工作，不辜负所有关心和爱我的人的期望。

另外，衷心地祝福在我的成长道路中给我帮助的所有善良的人！

##### 个人简介

姓名：贾红燕 性别：女 职称：副主任医师出生日期：1974年2月 籍贯：ft西省运城市

学习经历

2009/09–至今，ft西医科大学，第一临床医学院外科学专业，博士。

2005/09–2008/07，ft西医科大学，研究生学院外科学专业，获硕士学位。

1993/09–1998/07，ft西医科大学，临床医学专业，获学士学位。博士期间发表文章

**Hongyan Jia**, Yuxuan Wang, Wenting Yan, Huiyu Li, Yanzhang Tian, Shiming Wang, Haoliang Zhao\*. MicroRNA-125b functions as a tumor suppressor in human hepatocellular carcinomas. Int J Mol Sci. 13(7): 8762-8774. ( IF=2.589)

第一作者

主持项目

ft西省科技攻关项目―microRNA-125b在肝癌中的功能和机制研究‖（编号：

20110313012-3)