**分类号：R575 学校代码：10392**

**学科专业代码：100201** **学** 号：**1101003003**

**福 建 医 科 大 学**

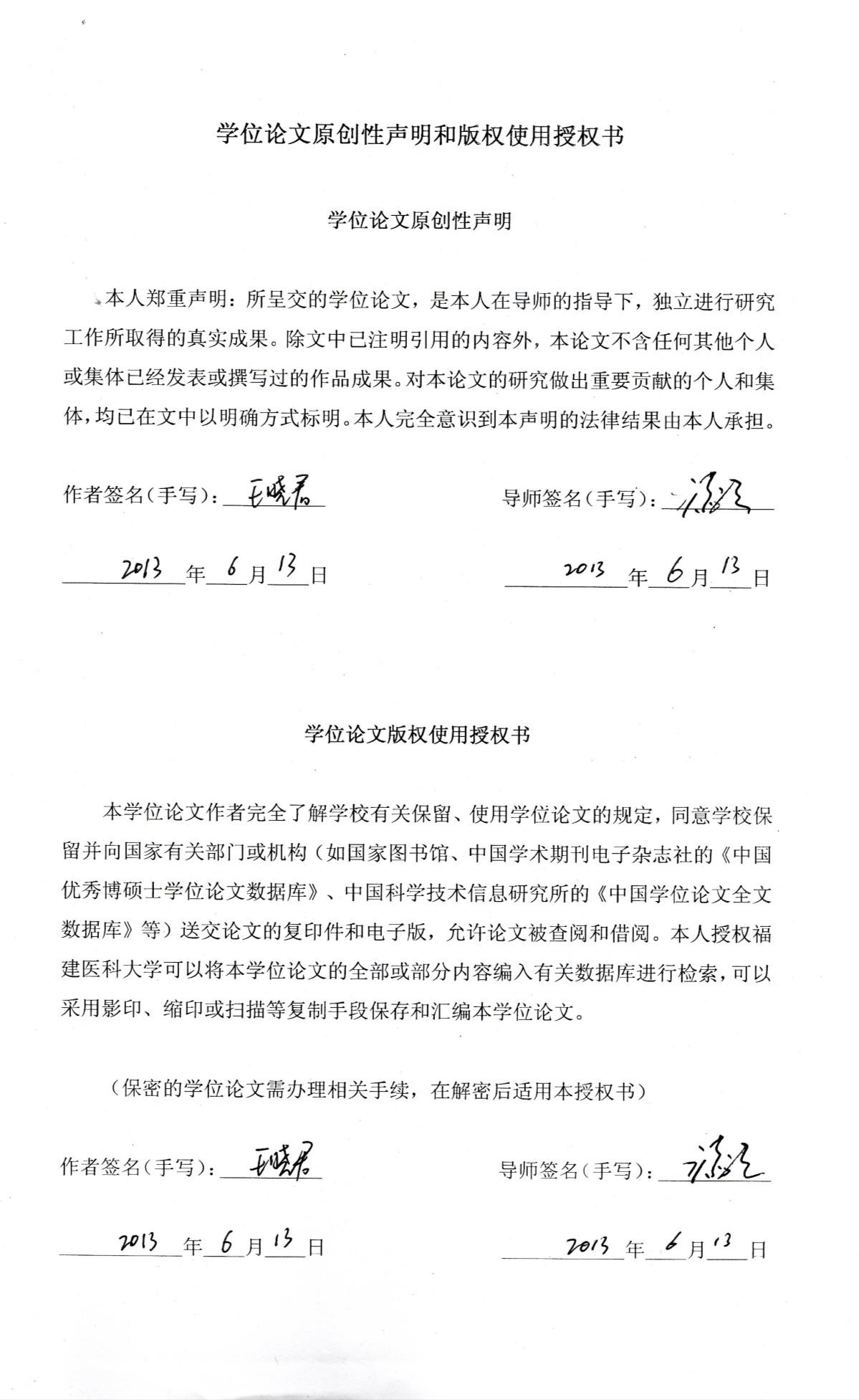
**博 士 研 究 生 毕 业 论 文**

**miRNA-214 通过靶向 β-catenin 通路抑制肝癌生长**

**miRNA-214 inhibits hepatocellular carcinoma growth by targeting β-catenin pathway**

|  |  |
| --- | --- |
| **学 位 类 型 ：** | **医学博士** |
| **所 在 学 院 ：** | **第一临床医学院** |
| **研** 究 **生：** | **王晓君** |
| **学科 、 专 业 ：** | **内科学** |
| **导** **师：** | **江家骥** **教授** |
| **研究起止日期：** | **2011 年 4 月至 2012 年 12 月** |
| **答 辩 日 期 ：** | **2013 年 6 月 13 日** |

**二○一三年六月**



**目 录**

# 英 文 缩 略 词 表

cDNA Complementary DNA 互补 DNA CDS Coding Sequence 编码序列 CMV Cytomegalovirus 巨细胞病毒

DEPC Diethyl pyrocarbonate焦碳酸二乙酯

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM 培养基 EDTA Ethylene diamineteraacetic acid 2-二乙胺四乙酸 FBS Fetal Bovine Serum 胎牛血清

GFP Green fluorescence protein 绿色荧光蛋白 HCC Hepatocellular carcinoma 肝细胞癌 miRNA MicroRNA 微小 RNA

PAGE PolyAcrylamide Gel Electrophoresis聚丙烯凝胶电泳

PBS Phosphate Buffered Saline磷酸盐缓冲液

PCR Ploymerase chain reaction多聚酶链反应

RISC RNA-induced siliencing complex RNA诱导的沉默复合物

RT-PCR Reverse transcriptase PCR 反转录 PCR shRNA short hairpin RNA 短发夹 RNA UTR Untranslated Regions 非翻译区

**miRNA-214通过靶向β-catenin通路抑制肝癌生长**

# 中文摘 要

肝细胞癌（Hepatocellular carcinoma, HCC）是人类最常见的恶性肿瘤之一。尽管在肝癌的治疗中取得了很大进步，肝癌仍是癌症相关死亡的第三大原因，患者的5年生存率不到5％。调查肝癌发生发展的分子机制，对于开发新的诊断、治疗和预后方法具有重要意义。MicroRNA（miRNA）是一类丰富的非编码的短RNA，在转录后水平通过诱导mRNA的降解或抑制其翻译从而抑制靶基因的表达。最近，越来越多的报告表明，异常表达的miRNA与各种人类癌症，包括肝癌有关，miRNA可以作为肿瘤抑制基因或癌基因参与人类癌症的发生发展。这对肝癌的诊断和治疗应用提供了新的途径。最近的miRNA表达谱研究已经证明了miR-124在肝癌表达下调，然而，其在肝癌发生过程中的潜在的功能及相关机制仍未明确。本实验从肝癌组织标本和细胞系中检测miR-124的表达，然后构建miR-124过表达慢病毒载体在体内外研究其对肝癌生长的抑制作用，并进一步探讨其机制。

**研究方法**

本课题首先应用实时定量RT-PCR方法检测18对配对的肝癌组织和癌旁组织以及肝癌细胞株和正常肝细胞系LO2中成熟miR-214的表达情况。然后构建miR-214的慢病毒载体，包装慢病毒，并感染HepG2细胞，筛选慢病毒稳定株。检测稳定过表达miR-214对肝癌细胞的生长、增殖、克隆形成能力以及细胞周期的影响；并进行裸鼠成瘤实验，观察miR-214对HepG2细胞成瘤能力的影响。应用生物信息学软件预测miR-214可能作用的靶基因，并采用荧光素酶报告实验、实时定量RT-PCR、Western blot进行靶基因验证。通过β-catenin RNA干扰和恢复表达实验，检测对细胞增殖的影响。检测miR-214对β-catenin通路下游蛋白CyclinD1、c-Myc、TCF-1和LEF-1的表达水平的影响。

**研究结果**

1. miR-214在肝癌组织和肝癌细胞系Hep3B，SK-HEP1，SMMC-7721，Huh7，

HepG2细胞中的表达显著下调。

2.建立了表达miR-214的HepG2细胞稳定株。

3.细胞生长曲线表明miR-214 HepG2细胞生长缓慢；MTT实验表明miR-214

过表达可抑制HepG2细胞的增殖；miR-214稳定株的HepG2细胞集落生长能力降低；细胞周期检测发现miR-214组HepG2细胞在G1/G0比例为69.28%，高于对照组的54.62%; miR-214组HepG2细胞S期细胞的比例为19.56%，明显较对照组比例33.48%低，结果提示miR-214可通过引起细胞G1期阻滞抑制肝癌细胞增殖。

4.用miR-214稳定株HepG2细胞和对照慢病毒细胞，建立裸鼠肝癌移植瘤模型，结果发现，miR-214组肿瘤生长明显慢于对照组；皮下接种BALB/c裸鼠

25d后，miR-214组肿瘤体积为对照组的32%，重量为对照组的37.5%。

5. TargetScan等软件预测CTNNB1可能是miR-214作用的靶基因。荧光素酶报告实验结果表明，转染miR-214表达质粒能够抑制共转染的CTNNB1-3'-UTR载体荧光素酶基因活性，而共转染miR-214表达质粒和CTNNB1-3'-UTR靶位点突变载体，荧光素酶活性未见明显改变。Western blot检测发现miR-214可抑制β-catenin蛋白的表达；实时定量RT-PCR结果显示转染miR-214表达质粒后，β-catenin mRNA的表达量和对照组相比无显著差异。

6.转染shβ-catenin干扰质粒可降低β-catenin表达，抑制HepG2细胞增殖。对稳定表达miR-214的肝癌细胞，转染不含3'-UTR的β-catenin过表达质粒，可恢复β-catenin蛋白表达，逆转miR-214对HepG2细胞增殖的抑制作用。

7. Western blot结果显示miR-214稳定表达株中CyclinD1、c-Myc和TCF-1的表达水平下降，miR-214稳定表达株裸鼠移植肿瘤组织中CyclinD1、c-Myc和LEF-1的表达水平比对照组下降。

**研究结论**

1. miR-214在肝癌组织和肝癌细胞系中的表达显著下调。

2. miR-214可以在体外和在体内抑制肝癌细胞的生长。

3. CTNNB1是miR-214的靶基因。miR-214可以通过抑制β-catenin通路影响肝癌生长。

[关键词] miR-214；肝癌； CTNNB1； β-catenin；慢病毒

**MiRNA-214 inhibits hepatocellular carcinoma growth by targetingβ-catenin pathway**

**Abstract**

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common malignant tumor worldwide. Despite of great progress in the treatment of HCC, it remains the third leading cause of cancer-related death, and the 5-year survival of HCC patients is less than 5%. Therefore, it's very necessary to clarify the molecular mechanisms of HCC for development of new diagnostic, treatment and prognosis strategy. MicroRNAs

(MiRNAs) is a class of rich non-coding short RNA inhibiting the expression of

Target genes in post-transcriptional level by inducing mRNA degradation or inhibit its translation. Recently, a growing number of reports indicate that abnormal expression of miRNAs associated with a variety of human cancers, including HCC, and miRNA as a tumor suppressor or oncogene involved in the development of human cancers. This provides a new approach to the diagnosis and treatment of HCC. MicroRNA profile in recent studies have demonstrated that miR-124 is downregulated in HCC, however, its potential function in the process of HCC and related mechanisms are not yet clear.

**Methods**

We detected the expression lever of mature miR-214 in 18 paired HCC tissue and adjacent tissues, and HCC cell lines including Hep3B, SK-HEP1, SMMC-7721, Huh7, HepG2 cells and normal liver cells LO2 by quantitative real-time RT-PCR analysis.

Lentiviral expression plasmid of miR-214(Lv-miR-214) or lentiviral control

(Lv-control) and packaging systems co-transfected 293T cells to produce lentivirus, then infected HepG2 cells, and screened cell strains stably expressing miR-214. Cell growth curve and MTT assay were employed for HepG2 cell proliferation assay; Colony formation assay for single tumor cell colony growth capacity assay; Flow cytometry for cell cycle analysis assay. Nude mice experiments was employed to observe the impact of the tumorigenic ability of miR-214 on HepG2 cells .

Bioinformatics softwares were applicated to predict the possible target genes of

MiR-214, and luciferase reporter experiments, quantitative real-time RT-PCR, Western blot for target gene validation. β-catenin RNA interference and restore expression experiments was employed for testing the effects ofβ-catenin on cell proliferation. Impact of miR-214 on the expression levels ofβ-catenin pathway downstream protein of CyclinD1, c-Myc, TCF-1, and LEF-1 was detected by Western blot.

**Results**

1. MiR-214 is significantly downregulated in HCC tissues and HCC cell lines.

2. HepG2 cell strains stably expressing miR-214 were established.

3. Cell growth curves showed that HepG2 cell strains stably expressing miR-214 growed slowly; MTT experiments showed that miR-214 overexpression inhibits HCC cell proliferation; Colony formation experiments showed that overexpression of miR-214 reduced tumor cell colony growth ability; The flow cytometry discovered the proportion of cells in G1/G0 phase were 54.62% in the control group, while the ratio in G1/G0 increased to 69.28% in the experimental group; the proportion of cells in S phase was 19.56%, lower than the control group, the proportion was 33.48%. This suggest that miR-214 caused cell cycle G1 arrest.

4. HepG2 cell strains stably expressing miR-214 were applicatied to establish nude mice HCC animal model, compared to the control group, the experimental group tumors grow slowly; The volume and wight of the tumors in the experimental group were 32% and 37.5% of the control group 25d after inoculated subcutaneously with BALB/c nude mice.

5. TargetScan predicted CTNNB1 may be a target genes of miR-214. Luciferase reporter experimental results show that luciferase gene activity can be suppressed by co-transfection of miR-214 expression plasmid and CTNNB1-3'-UTR, but not by co-transfection of miR-214 expression plasmid and CTNNB1- 3'-UTR-mt. Western blot analysis showed that miR-214 can inhibit the expression ofβ-catenin protein; qRT-PCR results showed that miR-214 didn't influrencedβ-catenin mRNA expression. 6. The shβ-catenin reduceedβ-catenin expression, inhibited HCC cell proliferation. Transfection ofβ-catenin overexpression plasmid not containing the 3'-UTR of CTNNB1 restoredβ-catenin protein expression, reversed the inhibition of miR-214 on

Cell proliferation.

7. Western blot showed that CyclinD1, c-Myc, LEF-1, and TCF-1 expression levels decreased in HepG2 cell strains stably expressing miR-214 and nude mice transplanted tumor tissue .

**Conclusions**

1. MiR-214 is significantly downregulated in HCC tissues and HCC cell lines. 2. miR-214 inhibition of the growth of HCC cells in vitro and in vivo.

3. CTNNB1 is a target gene of miR-214. miR-214 can affect HCC cells growth by theβ-catenin pathway.

[Keywords] miR-214; HCC; CTNNB1; β-catenin; Lentiviral

前 言

肝细胞癌（Hepatocellular carcinoma, HCC）是人类最常见的恶性肿瘤之一，其发病率居恶性肿瘤的第六位，并且是癌症相关死亡的第三大原因[1]。我国是肝癌高发区，原发性肝癌患者数约占全球的55%[2]，肝癌对我国人民的生命健康造成了严重威胁。近年来在肝癌的诊断和治疗上取得了长足进步，肝癌诊疗水平得到提高，改善了肝癌的疗效，但是由于肝癌早期诊断困难，手术后容易复发转移，患者的预后仍然很差，5年生存率不到5％。因此很有必要加强肝癌分子机制的研究，寻找肝癌诊断治疗的更有效的靶点，提高肝癌患者的早期诊断率和疗效。

MicroRNA（miRNA）是一类由约22个核苷酸组成的非编码的小分子单链

RNA，在进化上保守，广泛存在于动物、植物、真菌及病毒等多种生物中[3]。

miRNA转录合成后，经过初级miRNA、前体miRNA两个阶段，两次剪切后形成成熟miRNA. miRNA的作用是通过调控靶基因的表达实现的，它的调控方式是与靶基因mRNA3’端非翻译区（3'UTR）的互补结合，根据其互补程度的不同，导致靶基因mRNA降解或翻译抑制。目前，在人类中已发现上千条miRNA分子，调控人类约1/3的基因表达。miRNA对基因转录后水平的调控广泛存在于真核生物的发育和代谢过程[4]。细胞的增殖、凋亡、分化、代谢以及个体发育等过程均受到miRNA调控。miRNA在多种人类疾病的发展中扮演着至关重要的角色。根据靶基因的不同，miRNA在癌症的发生发展起着癌基因或抑癌基因的作用[5-7]，大量的证据表明，miRNA的异常表达与多种人类癌症的发生发展密切相关，它有望成为一种新型的癌症诊断和治疗的分子靶标。

多项对HCC中miRNA表达谱的研究发现了多个异常表达的miRNA[8]。表达量显著上升的有miR-21、miR-221、miR-222、miR-224、miR-301等，表达水平明显下降的有miR-122a、miR-125a、miR-139、miR-150、miR-145、miR-199a、miR-200b、miR-214、miR-223等。多项研究显示miR-21在HCC中表达水平升高[9]。miR-21表达上调促进肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭，这种作用可能是通过下调其靶基因PTEN等实现的。miR-155通过抑制C/EBPB, miR-221通过抑制

Bmf，促进肝癌细胞生长，抑制肝癌细胞凋亡。在HCC表达下调的miRNA分子中，miR-122是研究较多的分子之一。miR-122是肝脏组织特异性miRNA[10]。它也是肝脏中含量最丰富的miRNA. miR-122在肝脏中表达丰富，而在肝细胞

癌中表达明显降低，表明miRNA可能对维持肝脏功能、抑制肝细胞恶化起着重要作用。实验表明miR-122通过下调CyclinG1、p53、AFP以及解整合素样金属蛋白酶10（ADAM10）、胰岛素样生长因子1受体（IGF1R）、血清反应因子（SRF）的表达，在肝脏中起到抑癌基因的作用，可导致肝癌细胞的克隆存活、不依赖支持物的生长、转移、侵袭、上皮-间质转化和裸鼠成瘤等能力降低[11,12]。miR-122功能缺失可导致肝癌发生，并且与肝癌的预后不良有关。miR-199a也是在HCC组织中表达普遍下调的miRNA[13]。研究发现miR-199a可诱导肝癌细胞Gl期细胞周期停滞，并通过抑制mTOR和C-Met降低肝癌细胞增殖能力。miR-26，miR-125b，let-7, miR-637分别通过抑制NF-kB通路，LIN28B，Bcl2和STAT3信号对肝癌发挥抑癌作用。

以往的研究已经证明，通过miRNA微阵列分析，与相邻正常组织比较，miR-214在肝癌组织中表达下调[14, 15]。已有研究发现miR-214在宫颈癌中表达下调，它具有抑制HeLa细胞的生长的作用[16]。miR-214可靶向EZH2，抑制乳腺癌细胞的增殖和侵袭[17]。有研究发现miR-214的表达下调可诱导肝癌源性生长因子（HDGF）的分泌促进肿瘤血管生成，促进肿瘤的侵袭和转移。提示miR-214具有潜在的肿瘤抑制功能。然而在胰腺癌和卵巢癌中发现miR-214的表达水平升高，并且其过度表达促进肿瘤细胞的存活和化疗耐药性[18, 19]。表明miR-214可能在不同肿瘤中作用不同。目前关于miR-214在肝癌发生中的生物学功能尚不明确，其作用的分子机制仍不明确，十分有必要进行深入系统的研究。

通过生物学信息预测β-catenin蛋白编码基因CTNNB1可能是miR-214作用的靶基因。β-catenin是Wnt/β-catenin信号通路的重要分子[20, 21]。它参与调控多种人体正常的生理过程，并且与多种人类恶性肿瘤的发生和发展密切相关。目前研究表明至少一半以上的肝癌与Wnt/β-catenin信号通路异常激活有关。本研究我们通过实时定量RT-PCR方法检测肝癌组织及细胞系中成熟miR-214的表达情况，然后了通过慢病毒介导的过表达技术上调HepG2细胞miR-214的表达，通过细胞和动物实验观察miR-214对肝癌细胞生物学行为的影响作用，并进一步深入探讨其机制，以期为肝癌的诊断和靶向治疗提供新的思路。

目 录

[英 文 缩 略 词 表](#_Toc686578860) 3

[中文摘 要](#_Toc686578861) 3

**[Abstract](#_Toc686578862)** 3

[前 言](#_Toc686578863) 4

[第一部分](#_Toc686578864) **[miR-214](#_Toc686578864)**[在肝癌组织和肝癌细胞系中的表达](#_Toc686578864) 4

[材料与方法](#_Toc686578865) 4

[结果](#_Toc686578866) 6

[讨论](#_Toc686578867) 7

**[第二部分 miR-214](#_Toc686578868)**[慢病毒载体构建包装与稳定细胞株的建立](#_Toc686578868) 7

[结果](#_Toc686578869) 10

[第三 部分](#_Toc686578870)**[miR-214](#_Toc686578870)**[对肝癌生长的影响](#_Toc686578870) 11

[讨论](#_Toc686578871) 13

**[第四部分 miR-214](#_Toc686578872)**[抑制肝癌细胞生长的机制](#_Toc686578872) 14

[结论](#_Toc686578873) 27

[参考文献](#_Toc686578874) 27

[参考文献](#_Toc686578875) 30

# 第一部分 **miR-214**在肝癌组织和肝癌细胞系中的表达

成熟miRNA具有生物活性，miRNA的作用与其成熟体的表达量相关。miR-214在多种人类肿瘤组织和细胞系中异常表达，在宫颈癌、乳腺癌中低表达，而在胰腺癌、卵巢癌中高表达，已有miRNA芯片检测发现miR-214在肝癌中表达降低，为了进一步明确miR-214在肝癌中的表达情况，本部分用qPT-PCR方法检测肝癌组织及细胞系中的成熟miR-214的表达。

# 材料与方法

## **1.** 材料

### **1.1.** 组织标本收集

收集福建医科大学附属第一医院2011～2012年经手术切除且经病理证实的肝癌标本及其配对癌旁组织18例，其中男性患者12例，女性6例，最小年龄42

岁，最大年龄73岁。术后病理均为肝细胞肝癌，癌细胞分化程度分别为中分化

7例，中-低分化7例，低分化4例。标本经手术切除后立即取材，放入液氮中冷冻保存。

### **1.2.** 细胞株

肝癌细胞株Hep3B、SK-Hep1、SMMC-7721、Huh7、HepG2和正常肝细胞株LO2购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所。常规培养于含10%胎牛血清的RPMI-1640或DMEM培养基，置于37℃、5%CO2饱和湿度培养箱中进行培养传代，每3d 换液，待细胞铺满培养瓶底至细胞融合成单层，密度长至

70%~80%融合时，用0.25%胰酶消化，1: 3的比例进行传代培养。

### **1.3** 主要实验试剂

RPMI-1640细胞培养基 美国Gibco公司

DMEM细胞培养基 美国Gibco公司

胎牛血清美国Gibco公司

TRIzol Reagent美国Invitrogen公司

DEPC美国Sigma公司

RNase Inhibitor美国Promega公司

Taqman microRNA RT Kit美国Applied Biosystems公司

Taqman miRNA Assays（hsa-mir-214）美国Applied Biosystems公司

Taqman Universal PCR Master Mix美国Applied Biosysrems公司

### **1.4.** 主要实验仪器

单人单面净化工作台（SW-CJ-1FD型）苏州净化设备有限公司电热恒温水浴箱（DK-8D型）上海精宏实验设备公司

[CO2培养箱](http://www.bridgebio.cn/Laboratory/eq_detail.asp?id=33)（U3111型）美国Thermo公司

低温高速离心机（3K30型）德国Sigma公司

精密天平（BS110S型）德国Sartorius公司

PCR仪杭州朗基科学仪器有限公司

荧光定量PCR仪（7900HT型）美国ABI公司

电动匀浆器（FA25型）美国FLUKO公司

超低温冰箱青岛海尔特种电器有限公司

液氮罐成都金凤液氮容器有限公司

紫外分光光度计美国Jenway公司

纯水仪美国Millipore公司

水平/垂直电泳槽上海天能科技有限公司

凝胶成像系统上海天能科技有限公司

## **2.** 方法

### **2.1.** 总**RNA**提取

(1)样品准备：每100 mg 组织，加入lml TRIzol，用电动匀浆器匀浆，室温放置

5min；指数生长期的贴壁细胞，PBS洗涤三遍，每5×106个细胞加入lml TRIzol，反复吹打5-10min至不粘稠，室温放置10min；

(2)加入0.2ml氯仿，振荡混均30秒，室温放置5min；

(3)于12000×*g*、4℃条件下离心15分钟，离心后混合液分成三层，分别为底层红色的酚-氯仿相，中间相和无色的上层水相。RNA只存在于上层水相中，水相的体积约为加入TRIzol体积的60%。

(4)将水相移入一个干净的离心管中，按照每lml TRIzol加入0.5ml的比例加入异丙醇，混匀，15-30℃静置10分钟。

(5)于12000×*g*、4℃条件下离心10分钟，RNA沉淀形成胶状物沉在管底管壁。

(6) RNA洗涤：倒掉上清液，按照1ml TRIzol加入lml的比例加入75%乙醇（无

RNA酶水配制），振荡混匀。

(7)于7500×*g*、4℃条件下离心5分钟，弃上清液，用移液器吸干试管内残留酒精，室温下自然干燥RNA沉淀5-10分钟。

(8)用DEPC处理过的水重新溶解RNA，反复吹打混匀65℃水浴助溶5min，冰上冷却5min，-80℃保存；

(9) RNA纯度及浓度的测定：应用紫外分光光度计测定样品在260nm与280nm的吸光度（OD值）。计算RNA浓度，并分析其纯度。OD260/280在1.8-2.0视为抽提的RNA纯度很高。

（10）甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定RNA完整性和污染情况。

### **2.2.** 逆转录反应

按下表的比例配制反应体系（冰上进行），混匀，短暂离心。

|  |  |
| --- | --- |
| 样品及试剂 | 每管加入量 |
| 10×RT Buffer | 1.5 μl |
| 10 mM dNTPs | 1.5 μl |
| RNase Inhibitor（20U/ul） | 0.2μl |
| 5×RT Primer | 3 μl |
| RNA 样品 | 5 μl |
| MultiscribeTM RT enzyme （50U/μl） | 1 μl |
| DEPC H2O | 5.5 μl |
| 总体积 | 15μl |

反应程序如下：16℃30min，42℃30min，85℃5min，4℃5min。

### **2.3.** 实时荧光定量**PCR**（**qRT-PCR**）检测肝癌组织中**miR-214**表达

（1）qRT-PCR 反应体系如下表：

|  |  |
| --- | --- |
| 样品及试剂 | 用量 |
| 2×TaqMan PCR Master Mix | 10μl |
| 10×TaqMan Probe/ Primer Mix | 2μl |
| cDNA 模板 | 1μl |

|  |  |
| --- | --- |
| DEPC H2O | 7μl |
| 总体积 | 20μl |

PCR扩增条件：95℃10min；95℃20秒，60℃1min，循环40次；4℃保温。

（2）采用2-∆∆Ct法进行数据分析。

每个样本设3个复孔，采用U6 snRNA作为内参。以达到阈值的最低循环数（Ct值）计算样本中miR-214的RNA拷贝数相对量。每个样本的Ct值与样本中模板的起始拷贝数的对数呈线性关系，起始拷贝数越多，Ct值越小。采用相对定量，以癌旁正常组织为校准样本，肿瘤标本为试验样本，分别计算∆Ct值。∆Ct1（肝癌组织）= Ct miR2141－Ct U61, ∆Ct2（癌旁组织）= Ct miR2142－Ct U62, ∆∆Ct =∆Ct1-∆Ct2, 2-∆∆Ct 代表肝癌组织与配对癌旁组织中目标基因的

RNA拷贝数比值。

## **3.** 统计学分析

实验结果以均数±标准差（mean±SD）表示，用SPSS13.0软件包对数据进行统计分析。用配对样本t检验分析肿瘤组织和癌旁组织中miR-214表达水平的差异。以P＜0.05为差异有统计学意义；P＜0.01有显著统计学意义。

# 结果

**1. RNA提取及鉴定**

甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定RNA纯度及完整性，可见三条清晰的带型，分别为5S、18S、28S（图1.1）。

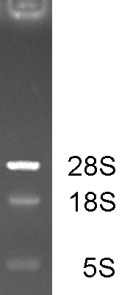


图1.1 组织总RNA电泳

**2.肝癌标本miR-214表达情况**

实时定量RT-PCR 结果表明，与配对的癌旁组织相比，肝癌组织中miR-214

的表达降低，肝癌组织∆Ct1=6.24±0.05，癌旁组织∆Ct2=4.37±0.38，平均下调10

倍，有显著统计学差异（P<0.01, 图1.2）。



图1.2 miR-214在肝癌组织和配对的癌旁组织中的表达

**3. miR-214在肝癌细胞株的表达**

实时定量RT-PCR结果表明，与正常肝细胞株LO2相比，miR-214在各种肝癌细胞株的表达下调，下调最明显的是HepG2、SK-Hep1和Huh7细胞，改变有显著统计学差异（P<0.05, P<0.01, 图1.3）。



图1.3 miR-214在肝癌细胞株和正常肝细胞株中的表达

\* P<0.05, \*\*P<0.01

# 讨论

microRNA简称miRNA，是一类由大约19~24个核苷酸（nt）组成的非编码的小分子单链RNA，由发夹结构前体RNA（pre-miRNA）经Dicer酶加工形成。

miRNA的表达具有分化的位相性和时序性。miRNA水平在不同组织和发育阶段有显著差异。肝脏是人体的重要器官，具有重要的生物学功能，肝脏疾病较为常见且危害很大。近年来研究显示，miRNA对肝脏功能具有广泛的调节作用，与肝炎、肝纤维化和肝癌等肝病均有一定关系。

miR-214是在小鼠、大鼠及鸡等种属中高度保守的miRNA, miR-214基因在染色体上的位置为1q24.3，序列为：ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU。已有研究显示miR-214在宫颈癌、乳腺癌中表达下调，恢复miR-214表达可抑制HeLa细胞的生长[16]，抑制乳腺癌细胞的增殖和侵袭[14]，而在胰腺癌和卵巢癌，miR-214高表达，促进癌细胞的存活并增强癌细胞的化疗耐药性[18, 19]。在肝癌中的miRNA微阵列研究显示，与相邻正常组织比较，miR-214 在肝癌组织中表达水平下降

[14,15]. 提示miR-214对肝癌具有潜在的肿瘤抑制功能。然而，到现在为止，miR-214在肝癌发生中的作用及其发挥其功能的潜在的分子机制仍不明确。

我们首先进行肝癌标本和肝癌细胞miR-214含量的检测，明确miR-214的表达水平是否在肝癌组织及细胞系中普遍下调。目前常用的检测miRNA表达的技术主要有Northern印迹、微阵列芯片、原位杂交和实时定量PCR等。Northern印迹法是利用核酸杂交原理进行RNA 相对定量的经典方法，但其需要大量的

RNA样本，而且灵敏度低，操作繁琐。miRNA芯片技术是一种探针杂交技术，优点是方便快捷、通量高，缺点是准确性不高，难以区分前体miRNA 和成熟

miRNA以及高度相似的miRNA，主要用于miRNA的表达谱分析和已知miRNA

的初步检测筛选。原位杂交技术包括细胞原位杂交和组织内原位杂交，显示

miRNA的表达直观，灵敏度和特异性高，但仅适用于固相组织的miRNA表达检测。目前常用的是实时定量RT-PCR技术，依据反转录方法分为引物延伸法，poly

（A）加尾法，Stem-loop（茎-环状）反转录引物法。Stem-loop反转录引物法的灵敏度和特异性均很高。仅需要低至ng级的样品，对低丰度miRNA的表达水平也可检测。对miRNA前体和成熟miRNA能很好地分辨，因而可排除miRNA前体表达量的干扰，检测结果显示的是具有生物活性的成熟miRNA的含量。该

法对于同一家族中高度同源的miRNA也可精确区分，甚至能区分仅有一个碱基差别miRNA。依据信号检测模式分为荧光染料渗入法和TaqMan探针法，TaqMan探针法需要设计探针，但是它具有更好的特异性。



图1.5 Stem-loop反转录引物法检测microRNA原理

本文以U6 snRNA为内参，采用Stem-loop反转录引物法结合TaqMan探针法的实时荧光定量RT-PCR，检测肝癌组织及肝癌细胞系中成熟miR-214的表达水平。结果与肝癌中miRNA芯片检测结果的文献报道一致，成熟miR-214在癌旁组织中表达水平较高，而在肝癌组织中表达水平明显下降。与正常肝细胞系相比，肝癌细胞系中成熟miR-214均明显下调。提示miR-214在肝癌中可能起到抑癌基因的作用。

# **第二部分 miR-214**慢病毒载体构建包装与稳定细胞株的建立

miR-214在肝癌中低表达，提示miR-214可能对肝癌细胞有抑制作用，为了进一步研究miR-214在肝癌中的功能，我们构建了miR-214慢病毒表达载体，并进行慢病毒的包装，感染HepG2细胞，通过进一步筛选传代，建立了HepG2细胞miR-214慢病毒稳定株。

**材料和方法**

## **1** 材料

### **1.1.** 细胞株和菌株

肝癌细胞株HepG2，慢病毒包装细胞株293T细胞，购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所；大肠杆菌菌株DH5α为本实验室制备。

### **1.2.** 主要试剂

RPMI-1640细胞培养基美国Gibco公司

DMEM细胞培养基美国Gibco公司

胎牛血清 美国 Gibco 公司

hsa-miR-214 基因克隆质粒 北京 OriGene Technologies 公司 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP 美国 System Biosciences 公司 Lv-control 对照载体及慢病毒包装质粒 上海 Invabio 公司

Opti-MEM美国Hyclone公司

Lipofectamine2000美国Invitrogen公司

TRIzol Reagent美国Invitrogen公司

RNase Inhibitor美国Promega公司

Taqman microRNA RT Kit 美国 AppliedBiosystems 公司 Taqman miRNA Assays(hsa-mir-214) 美国 Applied Biosystems 公司 Taqman Universal PCR Master Mix 美国 AppliedBiosysrems 公司核酸内切酶 *Bam*HⅠ、*Eco*RⅠ 美国 NEB 公司

T4DNA连接酶美国Thermo公司

DNA凝胶回收试剂盒美国Axygen公司

PCR试剂盒上海生工生物工程公司

### **1.3.** 主要仪器

单人单面净化工作台（SW-CJ-1FD型）苏州净化设备有限公司

[CO2培养箱](http://www.bridgebio.cn/Laboratory/eq_detail.asp?id=33)（U3111型）美国Thermo公司

倒置相差显微镜（TS100 型） 日本 Nikon 公司倒置荧光显微镜（DMI3000 型） 德国 Leica 公司 低温高速离心机（3K30 型） 德国 Sigma 公司

超高速离心机 美国 Beckman Coulter 公司流式细胞仪（Cell Lab Quanta SC 型） 美国 Beckman Coulter 公司

PCR 仪（MG96G 型） 杭州朗基科学仪器有限公司荧光定量 PCR 仪（7900HT 型） 美国 ABI 公司

超低温冰箱青岛海尔特种电器有限公司

纯水仪美国Millipore公司

水平/垂直电泳槽上海天能科技有限公司

凝胶成像系统上海天能科技有限公司

## **2.** 方法

### **2.1** **miR-214**慢病毒载体的构建

#### 2.1.1 载体图谱



图2.1 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP慢病毒载体

该慢病毒载体中含有EF1启动子调控的copGFP基因，目的基因插入CMV

启动子下游多克隆位点。

#### **2.1.2** 目的基因**pre-miR-214**引物设计和获取

根据基因信息，设计pre-miR-214基因合成引物，上游引物选用EcoRⅠ，下游引物选用BamHⅠ，以hsa-miR-214基因克隆质粒为模板，利用以下两条引物进行PCR，扩增出pre-miR-214片断，引物序列如下：

上游5'-ATAGAATTCTTTCTCCCTTTCCCCTTACTCTCC-3'

下游5'-CCAGGATCCTTTCATAGGCACCACTCACTTTAC-3'

PCR反应体系如下：

|  |  |
| --- | --- |
| 10×Buffer | 5μl |
| Primer forward（10μM） | 1μl |
| Primer reverse（10μM） | 1μl |
| 基因克隆质粒（100ng/ul） | 1μl |
| dNTPs（10mM） | 0.5μl |
| Pfu 酶 | 1μl |
| Dd H2O | 40.5μl |
| 总体积 | 50μl |

PCR反应条件如下：

95℃ 2 分钟；

95℃ 20 秒

60℃ 20 秒 30 循环

72℃ 15 秒

72℃ 3 分钟

4℃＋∞

琼脂糖凝胶电泳及胶回收纯化（Axygen试剂盒）：

a）在紫外灯下切下含有目的DNA的琼脂糖凝胶，用纸巾吸尽凝胶表面液体并切碎。计算凝胶重量（提前记录1.5 ml 离心管重量），该重量作为一个凝胶体积（如100 mg=100μl体积）；

b）加入3个凝胶体积的Buffer DE-A，混合均匀后于75℃加热，间断混合（每2-3 min），直至凝胶块完全熔化（约6-8 min）；

c)加0.5个Buffer DE-A体积的Buffer DE-B，混合均匀；

d）吸取上述混合液，转移到DNA制备管（置于2 ml离心管中），12,000×*g*离心1 min。弃滤液；

e)将制备管置回离心管，加0.5 ml Buffer W1，12，000×*g*离心30 s，弃滤液；

f)将制备管置回离心管，加0.7 ml Buffer W2，12，000×*g*离心30 s，弃滤液；以同样的方法再用0.7 ml Buffer W2洗涤一次12，000×*g*离心1 min；

g)将制备管置于2 ml离心管中，12，000×*g*离心1 min；

h)将制备管置于洁净的1.5 ml离心管中，在DNA制备膜正中央加25μl Eluent，室温静置1 min，12，000×*g*离心1 min洗脱DNA。

#### **2.1.3** 载体及目的片段的酶切

对空载体pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP和pre-miR-214基因PCR的回收产物分别用*Bam*HⅠ和*Eco*RⅠ进行双酶切。

酶切体系如下：

载体/ PCR回收产物（500ng/μl）10μl

10×*Eco*RI Buffer 2μl

10×BSA 2μl

*Bam*HⅠ（10U/μl）1μl

*Eco*RⅠ（10U/μl）1μl

ddH2O 4μl

总体积20μl

反应条件为：37℃，2小时；

酶切目的片断的纯化，根据Axygen试剂盒说明书进行如下操作：

a.在酶切反应液中加入3倍体积的Buffer PCR-A，即120μl；混匀后，转移到DNA

制备管置于2 ml离心管中，12,000×*g*离心1 min，弃滤液；

b.将制备管置回2 ml离心管，加0.7 ml Buffer W2，12，000×*g*离心1 min，弃滤液；

c.将制备管置回2 ml离心管，加0.4 ml Buffer W2，12，000×*g*离心1 min；

d.将制备管置于洁净的1.5 ml离心管中，在DNA制备膜正中央加25μl Eluent，室温静置1 min，12，000×*g*离心1 min洗脱DNA。

#### **2.1.4** 载体与目的基因片段的连接反应

连接体系如下：

载体片段2.0μl

目的基因片段6.0μl

10×T4 buffer 1.0μl

T4 DNA连接酶1.0μl

总体积10μl

反应条件：22℃，1h。

#### **2.1.5** 连接产物转化感受态细菌及培养

将2μl连接反应质粒DNA加入100μl已冰浴溶化的感受态细菌（DH 5α）中，冰浴30min后，经42℃、90s热休克，再冰浴1-2 min，加入600μl不含抗生素的LB液，水平摇床37℃、200rpm、45min后，均匀涂布于含100 mg/ml Amp的LB平板上，倒置于37℃孵箱中培养过夜。4℃保存备用。

#### **2.1.6** 菌液**PCR**鉴定及酶切、测序鉴定

（1）用高压灭菌的枪头挑取单个菌落到3ml有抗性的LB中，水平摇床37℃

200rpm过夜。

（2）标记好每个克隆，然后用高压灭菌的枪头吸200μl的菌液到EP管中，100度煮5分钟，4℃、12000rpm离心10min，吸1μl做模板备用。

（3）按照菌中预期包含的质粒加好PCR体系，做20μl体系，模板为上面煮过的菌的上清1μl。

（4）按照上面克隆时的条件PCR。

（5）电泳，看结果，阳性的菌落对应的菌液进一步酶切、测序鉴定。测序正确则扩增，提取质粒备用。构建成功的慢病毒载体命名为Lv-miR-214。

### **2.2.** 慢病毒包装

（1）取对数生长期的293T细胞，胰蛋白酶消化，重新接种于10cm2细胞培养皿，在37℃、5% CO2培养箱内培养；

（2）当细胞融合度达90%～95%时转染。先吸去培养基，然后用无菌的PBS

洗一次，然后加入5ml无血清培养基。

（3）制备慢病毒包装系统中四种质粒DNA溶液：Lv-miR-214（transfer vector）或对照载体Lv-control，慢病毒包装质粒pRsv-REV、pMDlg-pRRE和pMD2G；

分别加入opti-MEM至500μl，室温放置5 min；另外取一无菌EP管，加入450μl opti-MEM，然后加入50μl Lipofectamine2000，室温放置5 min。然后将脂质体缓慢的加入质粒DNA中，混匀，室温放置20min。

（4）将DNA和脂质体混合液转移至细胞培养瓶中，轻轻混匀，培养4-6h

后弃去培养液，加入PBS 15 mL，轻摇后弃去，重复该步骤3次；

（5）每瓶细胞中加入15 mL含10%FBS的细胞培养液，继续培养；

（6）当细胞培养基变黄时，收集转染的293T细胞上清液；重新加入新鲜含

10%胎牛血清的细胞培养液，继续收集病毒。

（7）将收集的上清液于4℃，4000rpm离心10 min，收集上清液；

（8）将上清液以0.45μm滤器过滤；

（9）于50mL超速离心管中，4℃，25000rpm离心120分钟；

（10）500ul PBS重悬病毒沉淀。

### **2.3.** 慢病毒滴度测定

（1）测定前一天，将293T细胞铺板，每个96孔中加4×10 4个细胞，体积

为100μl。

（2）根据病毒的预期滴度，准备7-10个无菌的Ep管。在每个管中加入90

μl的新鲜培养基。

（3）取待测定的病毒原液10μl加入到第一个管中，混匀后，取10μl加入到第二个管中。继续相同的操作直到最后一管。

（4）选取所需的细胞孔，吸去90μl培养基。加入稀释好的病毒溶液。放入培养箱培养。

（5）24小时后，加入新鲜培养基100μl。小心操作，不要吹起细胞。

（6）72小时后，观察细胞生长状况，并收取细胞进行后续病毒滴度测定。

### **2.4.** 慢病毒感染目的细胞

（1）将包装好的慢病毒感染目的细胞，7天后用流式细胞仪进行分选；

（2）将分选细胞进行培养，并再次加入病毒，7天后再次进行流式筛选；

（3）筛选后的细胞继续培养，1个月后效率若能维持在90%以上，说明稳定株已经建立。

### **2.5.** 慢病毒稳定株**miR-214**表达水平检测

提取经Lv-miR-214和Lv-control感染的HepG2细胞的RNA，检测其miR-214表达水平，方法同第一部分。

## **3.** 统计学分析

用SPSS13.0统计软件分析相关实验数据。用x±s表示，两组样本间的比较采用t检验。

# 结果

## **1.** **miR-214**慢病毒载体的构建

### **1.1** 载体和**PCR**产物酶切



图2.1 载体和PCR产物酶切

（1为pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP载体酶切，2 为miR-214的PCR产物酶切）。

### **1.2** 重组质粒**PCR**鉴定



图2.2 重组质粒PCR鉴定

（1、2、3、4、5、6、7、8均为阳性克隆，9为阳性对照，10为阴性对照）

### **1.3** 重组质粒酶切鉴定



图2.3 重组质粒酶切鉴定（1和2号为正确的克隆）

### **1.4** 重组质粒测序

****



图 2.4 重组质粒测序图

## **2.** 病毒载体混合质粒转染**293T**细胞

将慢病毒载体Lv-miR-214（transfer vector）或对照载体Lv-control分别与慢病毒包装质粒pRsv-REV、pMDlg-pRRE和pMD2G共同转染293T病毒包装细胞。



图2.5 病毒载体混合质粒转染293T细胞48小时（200×）

**3.包装好的慢病毒感染293T细胞**

****

图2.6 慢病毒感染293T细胞48小时（200×）

**4.表达miR-214慢病毒稳定细胞株的建立**



慢病毒感染HepG2细胞，经过流式细胞仪筛选后，得到miR-214稳定表达的HepG2细胞株（图2.7）。

A.普通光视野（400×）B.荧光视野（400×）图2.7 miR-214慢病毒稳定细胞株

**5.慢病毒稳定细胞株miR-214表达**

qRT-PCR检测稳定株miR-214的表达，与对照组相比，Lv-miR-214组HepG

细胞miR-214的表达明显升高（P<0.01, 图2.8）。



图 2.8 qRT-PCR检测稳定株中miR-214的表达（\*\*P<0.01）。**讨**论

miR-214在肝癌中低表达，为了研究miR-214在肝癌中的功能，需要恢复其表达。恢复miRNA表达的方法有：转入化学合成的miRNA mimic；转入化学合成的miRNA agomir；转入miRNA表达载体。化学合成的miRNA拟似物寡核苷酸片段，只能实现瞬时转染，作用持续时间短。构建miRNA表达载体转入细胞，可使miRNA稳定过表达。构建miRNA表达载体可使用病毒载体和非病毒载体。前者目前应用最广泛。常用的病毒载体包括腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒、单纯疱疹病毒、痘苗病毒等。

腺病毒为线性双链的DNA病毒。腺病毒DNA可进入宿主细胞核，但它并不能整合到宿主基因组中。腺病毒载体比较安全，制备与纯化简便，可感染分裂和非分裂细胞。但因不能整合到宿主染色体上，不能持续表达所需产物，表达时间短；还可能刺激免疫反应。腺相关病毒为线性单链的DNA病毒。腺相关病毒能特异整合与宿主染色体，与腺病毒相比，外源基因表达稳定，可达3 个月～

1. 5年。但是它的缺点是产量低，需要辅助病毒，并且携带外源基因的能力有限。逆转录病毒是一种RNA病毒，基因组大小为8～11kb。逆转录病毒进入细

胞的方式通过病毒衣壳糖蛋白与宿主细胞膜上的受体结合，进入细胞后，病毒基因组编码的[反转录酶](http://www.ebioe.com/yp/product-list-475.html)，使病毒基因组RNA反转录出双链DNA。双链DNA可随机整合到宿主细胞的基因组中，并随宿主细胞的复制而复制。从而使携带的外源基因得到持久性表达。优点是宿主细胞广泛，能够感染不同生物种类的多种类型

细胞；能高效的感染分裂细胞；缺点是包装外源DNA能力有限；要求靶细胞表面存在相应受体；不能感染非分裂的细胞；可能产生具有复制能力的病毒；引起

“插入诱变”。

慢病毒属于逆转录病毒的1个亚类，包括各种灵长类病毒和非灵长类病毒。开发较早研究较多的是以HIV-1为基础构建的载体。与其他逆转录病毒相比，慢病毒能够有效感染非分裂细胞和最终分化的细胞，如神经元细胞、巨噬细胞、心肌细胞、肝细胞、肿瘤细胞、内皮细胞、干细胞等[22]，这是因为其基因组中存在核定位信号序列。慢病毒可携带大片段的外源性基因，并且可以长期表达，不产生细胞免疫应答，是一种较为理想的体外基因转运工具。

慢病毒载体系统由载体成分和包装成分两部分组成。载体成分包含的HIV顺式作用序列为病毒包装、逆转录和整合所需，还包含用来插入目的基因的多克隆位点，以及筛选标志。包装成分与载体成分互补，能够编码产生病毒颗粒所需

Gag、Pol和Env蛋白等。包装成分通常被分开构建在两个或三个质粒上，和载体质粒组成三质粒系统或四质粒系统。

本实验中我们采用pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP载体，构建miR-214表达质粒，其中pre-miR-214基因与copGFP基因分别位于CMV和EF1启动子下游。将该载体质粒和包装质粒pRsv-REV，pMDlg-pRRE, pMD2G共转染293T包装细胞，收获细胞上清液，离心浓缩后得到携带目的基因的慢病毒颗粒，慢病毒为自杀性病毒，只有一次性感染能力而无复制能力。将此慢病毒颗粒感染HepG细胞，并经流式细胞仪筛选传代培养，阴性对照和表达miR-214的HepG2细胞绿色荧光率达到90%以上，表明建立了miR-214稳定表达的HepG2稳定株。定量RT-PCR检测发现稳定株miR-214表达明显升高。利用此稳定株可进一步实验探索miR-214在肝癌中的功能。

# 第三 部分**miR-214**对肝癌生长的影响

miR-214在肝癌标本和肝癌细胞表达下调，提示miR-214对肝癌起到了抑癌基因的作用。我们在这一部分通过体内外实验研究miR-214是否可以抑制癌细胞生长。

**材料和方法**

## **1.** 材料

### **1.1.** 细胞株

Lv-miR-214-HepG2、Lv-control -HepG2稳定细胞株：由本文第二部分建立；肝癌细胞株HepG2：购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所。

### **1.2.** 主要试剂

DMEM细胞培养基美国Gibco公司

胎牛血清、胰酶美国Gibco公司

二甲基亚砜（DMSO） 美国 Amresco 公司 RNase A 和碘化丙啶（PI） 美国 Amesco 公司软琼脂 美国 Sigma 公司

### **1.3.** 主要仪器

单人单面净化工作台苏州净化设备有限公司

[CO2 培养箱](http://www.bridgebio.cn/Laboratory/eq_detail.asp?id=33) 美国 Thermo 公司

倒置相差显微镜日本Nikon公司

通用微孔板分光光度计美国Bio-Tek仪器公司

流式细胞仪美国Beckman Coulter公司

### **1.4.**动物

4周龄雄性健康BALB/c裸鼠购自上海斯莱克实验动物中心，饲养于医学实验动物中心。饮水及饲料均经过121℃，30 min的高压灭菌，标准饲养条件。裸鼠购回后适应性饲养1 星期再进行实验。

## **2.** 方法

### **2.1.** 细胞生长曲线

（1）收集对数生长期的慢病毒稳定细胞株Lv-miR-214-HepG2、Lv-control-HepG2和HepG2对照细胞（mock），调整细胞悬液浓度为4×10 4/ml，接种于96孔细胞培

养板，设3个复孔；置于5% CO2、37℃恒温培养箱中孵育；

（2）每隔24h消化计数，台盼蓝染色计数活细胞比率；每次每组计数3个复孔，计算均值；

（3）共记数5d，以培养时间为横轴，细胞数为纵轴，绘制细胞生长曲线。

### **2.2.** **MTT**实验

（1）收集对数生长期的慢病毒稳定细胞株Lv-miR-214-HepG2、Lv-control-HepG2和HepG2对照细胞（mock），调整细胞悬液浓度为4×10 4/ml，接种于96孔细胞培养板，设3个复孔；置于5% CO2、37℃恒温培养箱中孵育；

（2）培养24 h后弃去原培养液，每组的三个平行孔加入新鲜培养液，每孔100μl，此时算做0h时间点；

（3）以后每24h检测一次，即检测时间点为24h、48h、72h等；

（4）每孔加入5 g/L的MTT溶液20μl，继续培养4 h后弃去孔内液体，加入

150μl DMSO，振荡10 min后，570 nm波长下测定吸光度。

（5）计算细胞增殖抑制率，公式为：

细胞增殖抑制率%=（对照组细胞OD－实验组细胞OD）/对照细胞OD×100 。

### **2.3.** 软琼脂集落形成实验

（1）收集Lv-miR-214和Lv-control稳定株细胞，胰酶消化，梯度稀释，取2×10 2

个细胞；

（2）分别接种于直径为60 mm，含底层6g/L琼脂和上层4 g/L琼脂的软琼脂中；

（3）37℃，5%CO2培养2周；

（4）倒置相差显微镜下观察集落形成情况，计数直径> 50μm的克隆算一个集落，按集落数与接种细胞数的比例计算集落形成率。

### **2.4.** 流式细胞检测

（1）收集对数生长期的慢病毒稳定细胞株Lv-miR-214-HepG2、Lv-control-HepG2细胞，用适量胰酶充分消化成单细胞悬液，PBS充分悬浮细胞，4℃，1000rpm离心5min，洗涤2 次；

（2）加入1ml -20℃预冷的70%的乙醇，吹打混匀，4℃固定24h；

（3）4℃，1000rpm离心5min，去除乙醇，加入PBS，4℃，1000 rpm离心5min，洗涤细胞2次；加入200μl 1 mg/ml RNase A，37℃孵育30min，冰浴10 min，

中止RNA酶的催化反应；

（4）用PBS清洗细胞2次，洗去RNA酶，加入0.5ml碘化丙啶染色液，混匀后4℃避光染色30min。流式细胞仪测定细胞周期。

### **2.5.** **BALB/c**裸鼠皮下移植瘤模型

#### **2.5.1** 细胞接种

选用4周龄的BALB/c裸鼠，体重约为18～20g，随机原则分2组，每组3只。分别为Lv-miR-214的HepG2细胞组和Lv-control的HepG2细胞组；分别收集2组细胞，0.25%胰蛋白酶消化细胞，PBS洗涤3遍；

将细胞重悬于无血清DMEM培养液中，调整细胞浓度为5×10 6/ml；选取裸鼠右背侧为种植部位，按每个种植点106细胞/0.2ml皮下接种肿瘤；

#### **2.5.2** 移植瘤生长检测

观察裸鼠肿瘤生长情况并于接种后每隔5d测瘤体大小1次，记录肿瘤的长径（L）和横径（W），计算肿瘤体积。肿瘤体积计算公式为V=LW2/2.25d后处死裸鼠，取出肿瘤，记录肿瘤重量，比较各组间差异。部分成瘤组织用液氮冷冻保存以备用。部分瘤组织用10%中性福尔马林固定，固定24 h后，常规石蜡包埋，切片，进行HE染色。

## **3.** 统计学分析

用SPSS13.0统计软件进行分析。实验数据用x±s表示，两组样本间的比较采用t检验，P<0.05，为差异显著；P<0.01，为差异非常显著。

**结果**

**1. miR-214抑制HepG2细胞的增殖**



图3.1 HepG2细胞生长曲线（与对照组相比，\*P<0.05，\*\*P<0.01）

和阴性对照及空白对照的HepG2细胞相比较，Lv-miR-214-HepG2细胞生长

减慢（图3.1）。

**2. miR-214对HepG2肝癌细胞活力的影响**

感染48h 后，miR-214对稳定株HepG2细胞的抑制率28%（P <0.05），感染72h 后抑制率约41% （P<0.05, 图3.2）。提示miR-214显著抑制HepG2 细胞活力。



图3.2 MTT法观察miR-214对HepG2肝癌细胞活力的影响

（与对照组相比，\*P<0.05）

**3. miR-214抑制HepG2细胞克隆形成**

对照组Lv-control-HepG2在软琼脂中培养形成的集落较大，克隆形成数多，实验组Lv-miR-214-HepG2细胞形成的集落小，克隆形成率低；对照组和实验组克隆形成数分别为：121±9.02，42±6.11。克隆形成率分别为50.17%±4.82%，24.53%±2.43%（P<0.05）。





A: Lv-control B: Lv-miR-214



图3.3 miR-214抑制HepG2细胞克隆

（与对照组相比，\*P<0.05）

## **4.** **miR-214**对**HepG2**细胞细胞周期的影响

转染48h后，对照组的HepG2细胞在G1/G0期细胞的比例为54.62%，而实验组则增至69.28%（P<0.01）；对照组在S 期细胞的比例33.48%，实验组在S 期细胞的比例仅为19.56%（P<0.01）（图3.4）。

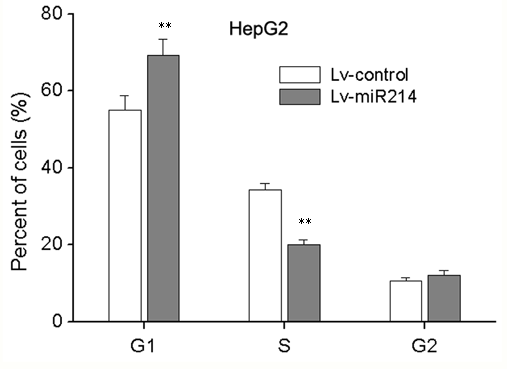
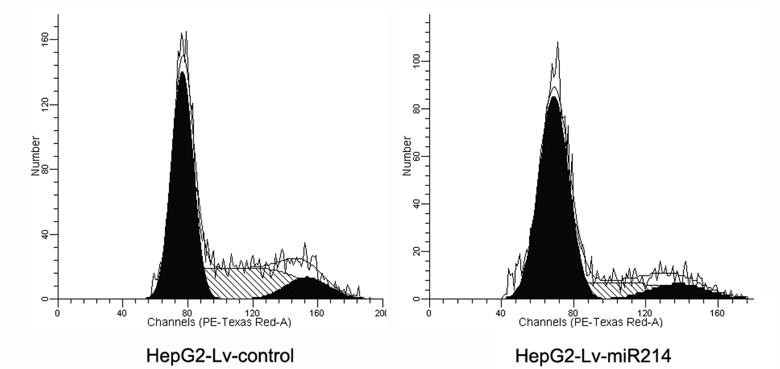


图3.4 miR-214对HepG2细胞周期的影响

## **5.** **miR-214**对**HepG**细胞在裸鼠体内成瘤能力的影响

（1）皮下接种裸鼠后，实验组的肿瘤的体积及生长速度小于对照组。皮下接种裸鼠25d 后，miR-214组体积大小为对照组的32%（图3.5, 图3.6A, B）。实验组裸鼠肿瘤重量为对照组的37.5%（P<0.05, 图3.6 C）。

Lv-control Lv-miR-214







图3.5 Lv-miR-214感染HepG2细胞的裸鼠体内成瘤实验

图3.6 Lv-miR-214-HepG2和阴性对照细胞裸鼠体内成瘤实验

（A肿瘤图片；B肿瘤体积比；C肿瘤重量对比；与对照组相比\*P<0.05，\*\*P<0.01）

（2）病理学检测

大体观察发现对照组肿瘤体积较大，表面较光滑，实验组肿瘤体积较小，形态不规则，表面不光滑（图3.6A）。HE 染色可见：Lv-miR-214-HepG2 实验组肿瘤出现较多坏死灶（图3.7）。

Lv-control Lv-miR-214

图3.7 Lv-miR-214-HepG2和阴性对照细胞成瘤病理切片

# 讨论

miRNA通过与特定靶mRNA结合，负性调控靶mRNA的表达。以miRNA为靶点的治疗是目前肿瘤研究中的热点。肿瘤发生发展过程中伴随miRNA表达谱的变化，某些miRNA的表达量上调而另外某些miRNA表达量下降，提示我们可以通过基因治疗技术沉默异常高表达的miRNA 表达，或者恢复低表达

miRNA的表达，从而达到治疗肿瘤的目的。结肠癌组织中miR-34a低表达，恢复miR-34a表达可抑制HCT116和RKO细胞在小鼠体内的生长[23]。研究发现miR-26可抑制肝癌细胞增生，诱导其凋亡。动物实验发现，经过3周治疗，接受miR-26治疗的试验组小鼠肿瘤变小，或者完全消失，而对照组小鼠肿瘤快速生长[24, 25]。利用表达miR-26的腺病毒载体感染肝癌细胞，可抑制肝癌细胞增殖并诱导其凋亡，将其注入小鼠肝癌模型体内，结果其肝癌生长受到明显抑制，且未见毒副作用。利用腺病毒介导的miR-99a 过表达也可有效抑制肝癌细胞增殖

[26]. 以2’-O-甲基化寡聚核苷酸antagomirs 作用于有促癌作用的miR-21 和

miR-17-92，也可显著抑制肝癌细胞增殖[27]。

我们采用慢病毒介导的过表达技术研究miR-214对肝癌细胞生长的影响。细胞生长曲线表明miR-214过表达能够抑制HepG2细胞生长。MTT结果表明，miR-214过表达明显抑制肝癌细胞增殖活力。克隆形成实验结果显示表达miR-214稳定株细胞集落生长能力降低，提示miR-214能够抑制单个肿瘤细胞的集落生长能力。细胞增殖状态也可以用细胞周期分析来判断。细胞周期一般分为

G0/G1期、S期和G2/M期。S期为DNA合成期，S期细胞的比例可反应细胞增殖状态，S期细胞所占的百分比高说明细胞增殖能力高。实验结果表明，miR-214组S期细胞所占的百分比下降，G0/G1期细胞比例升高，提示miR-214干扰了肝癌细胞的有丝分裂过程，使HepG2细胞阻滞于G0/G1期。体外实验结果表明miR-214可抑制肝癌细胞生长，为了进一步在体内验证miR-214对肝癌细胞生长的抑制作用，我们利用miR-214慢病毒稳定株HepG2细胞进行裸鼠成瘤实验。实验结果提示miR-214组裸鼠肿瘤的生长速度及体积、重量均小于对照组，证明miR-214能够在体内抑制肝癌细胞成瘤能力。

这些结果与既往研究发现的肝癌的抑癌miRNA 相似。肝脏组织特异性

miRNA[10], miR-122在肝细胞癌组织中表达普遍下调，实验表明miR-122在肝

脏中起到抑癌基因的作用，可导致肝癌细胞的克隆存活、不依赖支持物的生长、转移、侵袭、上皮-间质转化和裸鼠成瘤等能力降低[11,12]。miR-199a也是在HCC组织中表达下调的miRNA[13]。研究发现miR-199a可诱导肝癌细胞Gl期细胞周期停滞，并通过抑制mTOR和C-Met降低肝癌细胞增殖能力。

以往的研究发现miR-214具有抑制宫颈癌HeLa细胞的生长的作用[16]。miR-214可靶向EZH2，抑制乳腺癌细胞的增殖和侵袭[17]。有研究发现miR-214的表达下调可诱导肝癌源性生长因子（HDGF）的分泌促进肿瘤血管生成，促进肿瘤的侵袭和转移。提示miR-214具有抑癌miRNA作用。然而在胰腺癌和卵巢癌中发现miR-214的表达水平升高，并且其过度表达促进肿瘤细胞的存活和化疗耐药性[18, 19]。表明miR-214可能在不同肿瘤中作用不同。

# **第四部分 miR-214**抑制肝癌细胞生长的机制

miR-214在肝癌标本和肝癌细胞普遍下调，并能抑制肝癌细胞生长和肿瘤形成，表明miR-214在肝癌中发挥抑癌基因的功能。我们在这一部分进一步探讨其抑制癌细胞生长的机制。

**材料和方法**

## **1**.材料

### **1.1.** 细胞株和菌株

HepG2细胞株购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所。大肠杆菌菌株DH5α为本实验室制备。

### **1.2.** 主要试剂

DMEM细胞培养基美国Gibco公司

胎牛血清 美国 Gibco 公司

pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP载体美国System Biosciences公司

CTNNB1基因克隆质粒北京OriGene Technologies公司

pCDNA3.0-Luc本实验室基于pCDNA3.0构建

pLenR-GPH载体上海Invabio公司

PCR试剂盒[北京全式金生物技术有限公司](http://so.360.cn/url?u=a7b9d23408ece277350d65c7ae3a6c0fe207f94df8be3503a14ed7c80d&amp;m=86b7954c5491ef930a4cdae1c7235d96)

核酸内切酶 美国 NEB 公司

T4 DNA 连接酶 美国 Thermo 公司

质粒纯化试剂盒美国Qiagen公司

Lipofectamine 2000 美国 Invitrogen 公司双荧光素酶报告系统检测试剂盒 美国 Promega 公司 PrimeScript RT reagent Kit 大连 TaKaRa 公司

SYBR Premix Ex Taq II大连TaKaRa公司

BCA 蛋白浓度测定试剂盒 江苏碧云天生物公司 β-catenin，CyclinD1，c-Myc，TCF-1， 英国 Abcam 公司 LEF-1, β-actin 抗体及二抗

#### **1.1.3.** 主要仪器

单人单面净化工作台（SW-CJ-1FD型）苏州净化设备有限公司

[CO2培养箱](http://www.bridgebio.cn/Laboratory/eq_detail.asp?id=33)（U3111型）美国Thermo公司

倒置相差显微镜（TS100型）日本Nikon公司发光检测仪（GloMax 20/20型）美国Promega公司低温高速离心机（3K30型）德国Sigma公司

PCR仪（MG96G型）杭州朗基科学仪器有限公司荧光定量PCR仪（7900HT型）美国ABI公司

纯水仪美国Millipore公司

水平/垂直电泳槽上海天能科技有限公司多功能成像分析系统（GeneGnome HR）美国Syngene公司

## **2.** 方法

### **2.1.** **miR-214**与靶基因**3’-UTR**互补结合位点的预测

利用生物信息学软件miRanda、TargetScan、PITA预测miR-214靶基因，采用mFold Software分析靶基因3’-UTR与miR-214互补结合位点的自由能。

### **2.2.** **miR-214**表达质粒的构建

### **2.3. pCDNA3-Luc-CTNNB1-3**’**-UTR**重组质粒的构建

#### **2.3.1** 载体信息

pCDNA3-Luc 报告基因载体是在pCDNA3.0 基础上构建而成。方法：以

pGEM-Luc为模板扩增荧光素酶基因序列，插入到pCDNA3.0载体HindⅢ和

KpnⅠ位点之间。



图4.1 pCDNA3.0载体

#### **2.3.2 CTNNB1-3**’**-UTR**引物设计和获取

（1）PCR引物设计

根据GenBank中的人β-catenin蛋白的编码基因CTNNB1 mRNA序列（NM\_

001904.3）设计用于扩增其3’-UTR的引物（5'-3'）：

CTNNB1-3'-UTR-F: 5' GGGGTACCCCTAAGAAGTTTTAAAAAGCCA 3'

CTNNB1-3'-UTR-wt-R: 5' GGGGCCCCCATCGTATCACAGCAGGTTACAACA 3'

CTNNB1-3'-UTR-mt-R: 5' GGGGCCCCCATCGTATCAGTCGTCGTTACAACA 3'

（2）PCR扩增CTNNB1 3’非翻译区（3'-UTR）反应体系：

|  |  |
| --- | --- |
| 10×Buffer | 5μl |
| Primer forward（10μM） | 1μl |
| Primer reverse（10μM） | 1μl |
| CTNNB1 基因克隆质粒（100ng/ul） | 1μl |
| dNTPs（10mM） | 0.5μl |
| Pfu 酶 | 1μl |
| Dd H2O | 40.5μl |
| 总体积 | 50μl |

反应条件：95℃5min；95 30s，60℃30s,72℃30s，35cycles；72℃10min；

4℃保温。

琼脂糖凝胶电泳及胶回收纯化（Axygen试剂盒）。

#### 2.3.3 载体及目的片段的酶切酶切体系如下：

|  |  |
| --- | --- |
| 载体/ PCR 回收产物（500ng/μl） | 10μl |
| 10× Buffer | 2μl |
| 10×BSA | 2μl |
| Kpn Ⅰ（10U/μl） | 1μl |
| Apa Ⅰ （10U/μl） | 1μl |
| ddH2O | 4μl |
| 总体积 | 20μl |

反应条件：37℃，2小时；

琼脂糖凝胶电泳及胶回收纯化（Axygen试剂盒）。

#### 2.3.4 载体及目的基因片段的连接反应连接体系如下：

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 试剂 | 对照（－） |  | 连接组 |  |
|  | 1 2 | 1 | 2 | 3 |
| 载体 DNA | 1 µl － | 1 µl | 1 µl | 1 µl |
| CTNNB1-3'-UTR DNA 片段 | — 1 µl | 3 µl | 3 µl | 3 µl |
| 10×T4 连接酶缓冲液 | 1 µl 1 µl | 1 µl | 1 µl | 1 µl |
| T4 DNA 连接酶 | 1 µl 1 µl | 1 µl | 1 µl | 1 µl |
| Dd H2O | 7 µl 7 µl | 4 µl | 4 µl | 4 µl |
| 总体积 | 10 µl 10 µl | 10 µl | 10 µl | 10 µl |

反应条件：16℃，12小时.

#### 2.3.5 连接产物转化感受态细菌及培养同第二部分2.1.5。

#### **2.3.6** 菌液**PCR**鉴定及酶切、测序鉴定

同第二部分2.1.6。构建成功的重组质粒为pCDNA3-Luc-CTNNB1-3'-UTR

（CTNNB1-3'-UTR-wt）。

#### **2.3.7** **miR-214**靶位点突变型载体构建

利用靶位点突变引物，通过高保真DNA聚合酶PCR反应，以野生型pCDNA3-Luc-CTNNB1-3'-UTR重组质粒为模板，扩增带有突变位点的线性片段，利用限制性内切酶对模板质粒进行消化后，将线性片段在大肠杆菌中同源重组，得到环状的携带突变位点的质粒，经过通测质粒序列确认。重组质粒为pCDNA3-Luc-CTNNB1-3'-UTR -mt （CTNNB1-3'-UTR -mt）。

### **2.4.** 荧光素酶报告基因实验

#### **2.4.1.** 质粒共转染

将消化好的HepG2细胞（4×10 4）接种于96孔板，待细胞密度达到~80%时，利用Lipofectamine2000试剂进行转染。

转染按照每孔200pmol Lv-miR-214 或Lv-control（终浓度为50nM），

CTNNB1-3'-UTR-wt报告基因质粒或突变体质粒DNA 400ng; pRL-TK对照质粒

（含海肾荧光素酶表达盒）2μg加15μl Lipofectamine2000混于500μl无血清培养基中。

实验分组如下：

①共转染Lv-miR-214, CTNNB1-3'-UTR-wt，pRL-TK组；

②共转染Lv-control，CTNNB1-3'-UTR-wt，pRL-TK组；

③共转染Lv-miR-214, CTNNB1-3'-UTR--mt，pRL-TK组；

④共转染Lv-control，CTNNB1-3'-UTR-mt，pRL-TK组。

#### **2.4.2.** 荧光素酶报告基因活性检测

转染48h后，按照双重特异性报告基因试剂盒说明检测荧光素酶活性：

a.吸干培养板中的培养基，每孔细胞先用1×PBS 洗2次，然后加入20μl

报告基因细胞裂解液1×PLB，在室温轻缓晃动培养板15分钟，把裂解液转移到检测试管中；

b.用萤光发光仪进行检测：事先在检测管中加入100ul LARII；给萤光发光仪设置程序；转移20ul PLB裂解液到检测管中，混合；检测萤火虫萤光素酶的活性；向检测管中加入100ulStop& Glo®Reagent；检测海肾萤光素酶活性。计算两者比值。

### **2.5.** 定量**PCR**检测**miR-214**对肝癌细胞**β-catenin mRNA**表达水平的影响

（1）引物设计

应用Primer 5.0，设计检测基因引物，内参基因为β-actin，引物序列为：β-catenin

F: 5’-AAAATGGCAGTGCGTTTAG-3' R: 5’-TTTGAAGGCAGTCTGTCGTA-3'

β-actin

F: 5’-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3' R: 5’-GCTGTCACCTTCACCGTTCC-3'

（2）肝癌细胞总RNA提取方法同第一部分2.1。

（3）cDNA合成

将1μl Oligo dT(2.5μM)、1μl dNTPs（10mM）和2µg Total RNA加入到PCR

小管中，补充DEPC-H2O至10μl；混匀后离心，65℃温浴5min；之后立即置于

0℃冰水混合物中冰浴，使Oligo dT和模板退火。

按下表的比例配制反应体系（冰上进行），混匀，短暂离心。

|  |  |
| --- | --- |
| 上述变性、退火后反应液 | 10μl |
| 5×RT Buffer | 4 μl |
| RNasin | 0.5 μl |
| PrimeScript RTase | 0.5 μl |
| DEPC H2O | 5 μl |
| 总体积 | 20μl |

反应条件：30℃10min；42℃30min，95℃5min，4℃保温。将得到cDNA置于-20℃保存备用。

（4）qRT-PCR反应体系反应体系如下表：

|  |  |
| --- | --- |
| SYBR Premix Ex Taq II（2×） | 10μl |
| Primer forward（10μM） | 0.8μl |
| Primer reverse（10μM） | 0.8μl |
| ROX Reference Dye（50×） | 0.4μl |
| cDNA 模板 | 2μl |
| Dd H2O | 6μl |

总体积20μl

每个样本做3个复孔，采用β-actin作为内参。荧光定量PCR扩增条件的设置：95℃10sec；95℃5sec，60℃30s，循环40次；4℃保温。

### **2.6** **Western-blot**检测**miR-214**对肝癌细胞**β-catenin**蛋白表达水平的影响

#### 2.6.1**.** 蛋白提取细胞总蛋白提取的所有操作均在冰上及4℃下进行。

（1）取生长状态良好的细胞，除去培养液，用无菌的PBS洗三次，去除残留的

培养液与漂浮的死细胞；

（2）在培养皿中加入l ml PBS，用细胞刮刀将贴壁细胞刮下，转移至l.5 ml

Eppendorf管中，1000rpm离心5 min使沉淀细胞，弃上清。

（3）根据沉淀细胞数量，加入适量的RIPA细胞蛋白裂解液，反复吹打后置冰上

20 min，每隔5分钟在漩涡混合仪震荡30 s，4℃、12000 rpm离心20 min；

（4）取上清分装到0.5ml离心管中，每管40μl，留一管-20℃保存测蛋白浓度，其余放入-80℃保存。

#### 2.6.2**.** 蛋白定量采用BCA蛋白质定量试剂盒完成。

（1）BCA试剂盒组成

蛋白标准品（5mg/ml BSA）：1ml，-20℃保存；Solution A（BCA碱性溶液）：250ml，室温保存；Solution B（硫酸铜溶液）：5ml，室温保存。

（2）配制工作液：先将Solution A摇晃混匀，根据样品数量，按50 倍体积Solution A，1倍体积Solution B配制适量BCA工作液（24h内稳定），充分混匀。取完全溶解的蛋白标准品（5mg/ml BSA）10μl用PBS稀释至100μl，使终浓度为0.5mg/ml；

（3）按下表依次加入稀释后的BSA标准品（0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20）、

PBS、BCA工作液，每个测定做3个平行反应。37℃水浴30min，冷却至室温。

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| BSA(μl) | 0 | 1 | 2 | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 |
| PBS(μl) | 20 | 19 | 18 | 16 | 12 | 8 | 4 | 0 |
| BCA(μl) | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 |

（4）将样品与标准品在562nm波长下测定吸光度

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| BSA(µg/μl) | 0.000 | 0.025 | 0.05 | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| OD562均值 | 0.000 | 0.032 | 0.068 | 0.153 | 0.301 | 0.415 | 0.527 | 0.699 |

（5）绘制标准曲线，通过标准曲线计算样品的浓度。调整样品浓度为5µg/μl。

#### **2.6.3.** **SDS-**聚丙烯酸胺凝胶电泳（**SDS-PAGE**）

（1）配制分离胶

根据所需蛋白质的分子量确定所要配制胶的浓度。本实验采用的胶为12%的分离胶。按照如下的量进行配制分离胶：

去离子水：3.3 ml

30%丙烯酰胺：4.0 ml

Tris-HCl(pH8.8)：2.5 ml 10% SDS: 0.1 ml

10% AP: 0.1 ml TEMED: 0.01 ml

配置时要将液体混匀。将配好的分离胶倒入胶板中（倒入量为胶板高度的

3/4）加入去离子水封住。通常分离胶需要10~15 min即可，凝固后可以看到用一条直线。

（2）配制5%浓缩胶：去离子水：4.1 ml

30%丙烯酰胺：1.0 ml

Tris-HCl(pH6.8)：0.75 ml 10% SDS: 0.06 ml

10% AP: 0.06 ml TEMED: 0.006 ml

配好后将分离胶上的去离子水倒出，倒入浓缩胶，插入去离子水冲洗干净的梳子。20 min即可凝固。

（3）电泳液和转膜液的配制

电泳液：Gly 15.0 g, Tris 3.02 g, SDS 1 g, 1000 ml 去离子水，室温保存转膜液：Gly14.4 g, Tris 3.03 g，甲醇200 ml，加入去离子水至1 L，4℃保存。

（4）电泳

①将电泳槽准备好，胶板的矮面朝里，加入电泳液，先在里面和外面个加入一半的电泳液，排净气泡后加满。

②上样，上样量为8μl。

③按照“红对红，黑对黑”的原则安装电极。开始电泳。先恒压60 V使蛋白质跑

到同一条起跑线上，待跑至分离胶上时，改为90V，使溴酚蓝全部跑出时停止。

#### **2.6.4.** **Western blot**分析

（1）转膜

①剪好滤纸和PVDF膜，滤纸要比膜小1~2 cm，在转膜液中浸泡。

②准备白色的矮一些的盒子，里面装好转膜液，将膜取下。

③制作“三明治”，夹板黑色的一面朝向桌子，第一层为海绵，第二层为滤纸，第三层为胶，第四层放入PVDF膜，第五层为滤纸，先将前面三层中的气泡赶走，然后再加入第六层海绵，夹紧。

④放入“三明治”时要按照“黑对黑”的原则放入。在倒满转膜液之前将一个冰盒放在转膜槽内。将转膜槽放在装满冰的盆里，开始转膜。转膜的条件为恒流220 mA、

2 h。

（2）封闭：电转完毕后，将PVDF膜作好标记置于5%的脱脂奶粉（将10 g脱脂奶粉加入到200 ml PBS中，在漏斗中过滤）中封闭，室温摇床上封闭2 h，弃封闭液。

（3）一抗的孵育：将膜从封闭液中取出，用PBS冲洗3次，每次10 min。按照分子量将膜剪开。加Anti-β-catenin一抗（用1%的脱脂奶粉稀释1: 1000），4℃过夜。

（4）二抗的孵育：将膜从夹链袋中取出，一抗回收放在PBST中冲洗3次，10 min一次；加羊抗鼠-HRP 二抗（用1%的脱脂奶粉稀释1: 3000），室温孵育1h；弃二抗，PBST洗膜三次，10 min/次；最后再用PBS冲洗一次。

（5）加ECL-plus发光显色液，将A、B液等体积混合后将其覆盖在膜表面使其均匀，室温作用l min 后，暗室中曝片。

（6）对比蛋白Marker，读取目的条带。

### **2.7** **RNA**干扰**β-catenin**对肝癌细胞的抑制作用

#### **2.7.1** **shRNA-β-catenin**干扰载体的构建

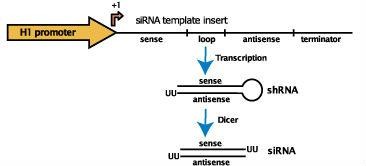
**（1）干扰靶点**

干扰靶点序列：TTGTTATCAGAGGACTAAATA，序列位置2031-2051.

**（2）DNA合成片段**



|  |  |
| --- | --- |
| ShRNA β-catenin (sense) | TTGTTATCAGAGGACTAAATA |
| ShRNA β-catenin (antisense) | TATTTAGTCCTCTGATAACAA |
| Negative control (sense) | TTCTCCGAACGTGTCACGT |
| Negative control (antisense) | ACGTGACACG TTCGGAGAA |



**（3）干扰载体**

图4.2 pLenR-GPH载体

该慢病毒载体中含有CMV启动子调控的copGFP基因，靶点片段插入BamH

I、EcoRI位点之间，由H1启动子调控表达。

**（4）载体酶切**酶切反应体系：

|  |  |
| --- | --- |
| Plasmid DNA （500ng/μl） | 10μl |
| 10×Buffer | 3μl |
| BamH I | 0.5 μl |
| EcoRI | 0.5 μl |
| ddH2O | 16.μl |
| 总体积 | 30 μl |

反应条件：37℃，4小时；

琼脂糖凝胶电泳及胶回收纯化（Axygen试剂盒）。

**（5）引物退火**

目的片断shRNA利用3’和5’的单链退火获得：

|  |  |
| --- | --- |
| 10× Buffer | 2μl |
| shDNA-F | 1μl |
| shDNA-R | 1μl |
| ddH2O | 16μl |
| 总体积 | 20μl |

程序：95℃10分钟，75℃10分钟，55℃10分钟，35℃10分钟，15℃10分钟。

**（6）载体与目的基因片段的连接反应** 连接反应体系如下： DNA 片段 7μl

载体 DNA 1μl

10×T4 Buffer 1μl

T4 DNA 连接酶 1μl

总体积 10μl

反应条件：16℃，过夜。

**（7）连接产物转化感受态细菌及培养**同第二部分2.1.5。

**（8）酶切鉴定**

提取质粒（Axygen质粒抽提试剂盒）后进行酶切鉴定。干扰RNA插入位点

是BamHI+EcoRI ，由于酶切出的片段片段较小，电泳不易分辨，另设计

KpnI+EcoRI位点酶切鉴定。KpnI在4290处，EcoR在4620处，阳性克隆酶切片段长度为4620－4290=330+65= 395bp。

使用KpnI+EcoRI酶切鉴定，酶切鉴定体系如下：

|  |  |
| --- | --- |
| EcoR I （10U/μl） | 1μl |
| Kpn I （10U/μl） | 1μl |
| 10×Buffer | 2 μl |
| Plasmid DNA （500ng/μl） | 8 μl |
| ddH2O | 8μl |
| 总体积 | 20 μl |

反应条件如下：37℃，4小时。

**（10）测序鉴定。**

酶切正确的阳性克隆送测序鉴定。

2.7.2**慢病毒颗粒的生产**同第二部分。

2.7.3 **MTT法检测shβ-catenin对肝癌细胞的抑制作用**同第三部分2.2。

2.7.4 **Western-blot检测shβ-catenin对肝癌细胞β-catenin蛋白表达水平的影响**同本部分2.6.

### **2.8** **β-catenin**过表达对**miR-214**抑制肝癌细胞生长的恢复作用

**2.8.1.β-catenin过表达载体构建**

**（1）PCR扩增CTNNB1基因CDS 区**

PCR引物：

CTNNB1-F:5-CGCTCTAGAATGGCTACTCAAGCTGATTTGATGG-3 CTNNB1-R:5-CCAGGATCCTTACAGGTCAGTATCAAACCAGGCC-3

PCR反应体系：

|  |  |
| --- | --- |
| 10×Buff er | 5μl |
| Primer forward（10μM） | 1μl |
| Primer reverse（10μM） | 1μl |
| CTNNB1 基因克隆质粒（100ng/ul） | 1μl |
| dNTPs（10mM） | 5μl |
| Pfu 聚合酶 | 1μl |
| Dd H2O | 36μl |
| 总体积 | 50μl |

反应条件：

94℃5min; 94℃30sec, 58℃30sec, 68℃2min30sec, 30 cycles; 68ºC,5min 。

**（2）酶切**

pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP载体和PCR产物使用Xba I、BamH I进行酶切。酶切反应体系：

|  |  |
| --- | --- |
| 10 ×Buffer | 4μl |
| Xba I | 1μl |
| BamH I | 1μl |
| DNA（500ng/μl） | 25μl |
| ddH2O | 9μl |
| 总体积 | 40μl |

反应条件如下：37℃，4小时；

**（3）载体与目的基因片段的连接反应**同第二部分2.1.4。

**（4）连接产物转化感受态细菌及培养**同第二部分2.1.5。

**（5）酶切、测序鉴定**

同第二部分2.1.6。

2.8.2**慢病毒颗粒的生产**同第二部分。

2.8.3 **MTT法检测β-catenin过表达对miR-214抑制肝癌细胞生长的恢复作用**同第三部分2.2。

**2.8.4 Western-blot检测β-catenin过表达对miR-214抑制肝癌细胞β-catenin蛋白表达水平的恢复作用**

同本部分2.6。

### 2.9. **Western blot**检测**miR-214**对肝癌细胞**β-catenin**通路蛋白表达水平的影响同本部分2.6。

### 2.10. **Western blot**检测**miR-214**对肝癌移植瘤中**β-catenin**通路蛋白表达的影响同本部分2.6。

## **3.** 统计学分析

用SPSS13.0统计软件分析相关实验数据。用x±s表示，两组样本间的比较采用t 检验。

### 结果

## **1.** **miR-214**靶基因预测与分析

利用TargetScan软件预测的miR-214靶基因有678个，miRanda软件预测的靶基因为10, 057个，PITA软件预测结果为2932个，β-catenin蛋白的编码基因

CTNNB1为三个软件预测的共同靶基因之一。CTNNB1有三个mRNA转录本，均与miR-214互补结合，转录本1([NM\_001904](http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert_61/view_gene.cgi?taxid=9606&amp;rs=NM_001904&amp;members&amp;showcnc=0&amp;shownc=0&amp;showncf)) 3' UTR长度为1106nt，与miR-214互补结合区为1028-1034位点。该位点是在人、黑猩猩、恒河猕猴、非洲丛猴等物种高度保守的位点（图4.1）。CTNNB1-3'-UTR 与miR-214 结合位点5’端7个核苷酸序列的自由能为-13.5kcal/mol，低于随机自由能阈值均值

（△G=-13.02kcal/mol）。



图 4.1 TargetScan预测CTNNB1-3’-UTR区与miR-214结合位点



图 4.2 CTNNB1-3’-UTR与miR-214结合位点的自由能

## **2. CTNNB1-3**’**-UTR**报告基因载体构建

（1）PCR产物和载体酶切



图 4.3 CTNNB -3’-UTR PCR产物和载体酶切

（1为CTNNB1-3'-UTR PCR产物酶切，2为pCDNA3-Luc载体酶切）。

（2）重组质粒的PCR鉴定



图4.4 重组质粒PCR鉴定

（1、2、3、4、5、6、7均为阳性克隆，8为阳性对照）

（3）重组质粒的酶切鉴定



图4.5 重组质粒的酶切电泳分析（1和2号为正确的克隆；插入片段为1045bp）

（4）重组质粒的测序结果

重组质粒pCDNA3-Luc-CTNNB1-3'-UTR测序并与Genebank序列比对分析，结果显示与CTNNB1（[NM\_001904](http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert_61/view_gene.cgi?taxid=9606&amp;rs=NM_001904&amp;members&amp;showcnc=0&amp;shownc=0&amp;showncf)）序列完全一致（图4.6）。靶位点突变质粒pCDNA3-Luc-3'-UTR-mt测序并与Genebank序列比对分析，结果符合预期（图4.7）。



图4.6 重组质粒pCDNA3-Luc-CTNNB1-3’-UTR（UTR-wt）测序图



图4.7 重组质粒pCDNA3-Luc-CTNNB1-3’-UTR-mt（UTR-mt）测序图

## **3.** 荧光素酶报告基因实验结果分析

与Lv-control 和CTNNB1-3'-UTR-wt 报告基因载体共转染组相比较，

Lv-miR-214和CTNNB1-3'-UTR-wt报告基因载体共转染组荧光素酶活性降低



图4.8 荧光素酶报告基因实验结果

（与对照组相比，\*\*P<0.01）

（P<0.01）；Lv-miR-214和CTNNB1-3'-UTR-mt共转染时，荧光素酶活性无明显改变（图4.8）。证明CTNNB1是miR-214的直接作用靶基因。

## **4.** **miR-214**对肝癌细胞**β-catenin**蛋白表达水平的影响

Western blot检测发现，和阴性对照Lv-control相比，Lv-miR-214稳定细胞株中β-catenin表达量下降（图4.9）。



图 4.9 Western blot检测稳定株中β-catenin的蛋白表达

## **5.** **miR-214**对**β-catenin mRNA**表达水平的影响

实时定量RT-PCR检测β-catenin mRNA表达量。采用2-∆∆Ct法对数据进行分析。miR-214过表达的肝癌细胞中β-catenin mRNA表达量与对照组相比无显著差异（P＞0.05）（图4.10）。



图4.10 miR-214对β-catenin mRNA表达水平的影响

## **6.** **shRNA-β-catenin**载体的构建

### **6.1.** 载体酶切

pLenR-GPH载体经BamH I、EcoRI双酶切，得到长度为7861bp的片段（图

4.11)。



图 4.11 pLenR-GPH载体酶切

### **6.2.** 重组质粒的鉴定

（1）通过酶切的方法确定阳性克隆

采用EcoR I、Kpn I双酶切，酶切产物于1％的琼脂糖电泳。阳性克隆酶切片段长度应为7531bp和395bp。2号条带符合预期，为阳性克隆（图4.12）。



图4.12 重组质粒的酶切电泳分析（3为阴性对照）

（2）通过测序的方法确定阳性克隆

阳性克隆测序，序列比对符合预期（图4.13）。



图4.13 重组质粒测序结果

## **7.** 干扰**β-catenin**对肝癌细胞生长的影响

****

图4.14 shβ-catenin对肝癌细胞生长的影响

（与对照组相比，\*\*P<0.01）

利用shRNAβ-catenin降低HepG2细胞中β-catenin的表达可以显著抑制

HepG2生长，与过表达miR-214对肝癌细胞生长的作用一致（图4.14）。miR-214

和shRNAβ-catenin均能明显降低β-catenin表达（图4.15）。



图4.15 shβ-catenin对肝癌细胞β-catenin蛋白表达的影响

## **8.** **β-catenin**过表达载体构建

**（1）载体和PCR产物酶切**



图4.16 载体和CTNNB1 PCR产物酶切

（1为pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP载体酶切，2为CTNNB1 PCR产物酶切）

**（2）重组质粒鉴定**

重组质粒经Xba I 、BamH I酶切鉴定，条带符合预期（图4.17）。测序并与

Genebank序列比对分析，结果显示与CTNNB1（[NM\_001904](http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert_61/view_gene.cgi?taxid=9606&amp;rs=NM_001904&amp;members&amp;showcnc=0&amp;shownc=0&amp;showncf)）序列完全一致（图4.18）。



图4.17 重组质粒酶切鉴定（1、2号为正确的克隆）





图4.18 重组质粒测序（上图：正向CMV引物测序；下图：反向DCE引物测序）

## **9.** **β-catenin**过表达对**miR-214**抑制肝癌细胞生长的恢复作用



图 4.19 β-catenin过表达对miR-214抑制肝癌细胞生长的恢复作用

β-catenin 过表达可恢复miR-214 对肝癌细胞的抑制作用（图4.19），恢复Lv-miR-214组细胞β-catenin蛋白的表达（图4.20）。



图4.20 β-catenin过表达恢复miR-214对肝癌细胞β-catenin表达的抑制作用

## **10.** **miR-214**对肝癌细胞**β-catenin**通路蛋白表达的影响

和阴性对照Lv-control相比，Lv-miR-214稳定细胞株中β-catenin通路蛋白

Cyclin D1、c-Myc、TCF-1的表达水平明显下降（图4.21）。



图4.21 Western blot检测肝癌细胞β-catenin通路蛋白

## **11.** **miR-214**对裸鼠移植瘤中**β-catenin**通路蛋白表达量的影响



图4.22 裸鼠移植瘤中的β-catenin通路蛋白的表达

Western blot检测裸鼠移植瘤中β-catenin通路蛋白表达，结果表明，和阴性对照Lv-control组相比，Lv-miR-214组裸鼠移植瘤中β-catenin、Cyclin D1、c-Myc、LEF-1蛋白表达量下降（图4.22）。

### 讨论

miRNA不表达蛋白，其生物学功能主要通过它所负性调控的靶基因实现，因此研究miRNA的功能及其发挥功能的生物学机制，必须通过对它的靶基因的研究而实现。目前miRNA靶基因的寻找主要靠生物信息学软件预测，但是生物信息学软件预测的miRNA靶基因通常有成百上千甚至上万个，不一定都是真正的靶基因，因为miRNA发挥作用受到多重因素的影响，某个特定的miRNA可能在不同的细胞中发挥不同甚至完全相反的作用，因此确定一个预测的靶基因是不是真正的靶基因必须通过在具体细胞和生物体内进行生物学实验的方法加以验证。

生物信息学软件预测的原理是基于miRNA的作用方式，即通过5’端种子序列（Seed Sequence）与靶基因mRNA 3'-UTR的miRNA调控元件（MRE）互补识别和结合。除此之外，还可以同时加入miRNA与靶mRNA形成二聚体的热力学稳定性等限制条件来进行靶基因筛选。目前常用的预测miRNA靶基因的生物信息学软件有miRBase、TargetScan、miRanda、PicTar、PITA、RNAhybrid等。荧光素酶报告基因实验可以直接对靶基因进行验证，是靶基因鉴定的“金标

准“。首先将靶基因3’-UTR包含miRNA结合部位在内的一段序列克隆到报告基因质粒中荧光素酶报告基因下游，构建重组荧光素酶报告基因质粒。然后将此质粒与人工合成的miRNA拟似物或miRNA表达质粒共同转染细胞，进行荧光素酶活性的测定。由于miRNA与靶基因3’-UTR的结合抑制了荧光素酶的表达，从而使荧光素酶活性降低，而靶点序列点突变后其抑制效果则消失。通过检测荧光素酶的活性变化即可初步确认该基因是否为特定miRNA的靶基因。此外芯片技术和蛋白质组学技术也可以用于miRNA靶基因的筛选鉴定。

我们在该部分实验中通过TargetScan、miRanda预测CTNNB1为miR-214的潜在靶基因，然后构建CTNNB1-3'-UTR荧光素酶报告基因质粒，进行荧光素酶报告基因实验发现共转染Lv-miR-214和CTNNB1-3'-UTR报告基因载体时，

荧光素酶报告基因活性降低，而转染Lv-control和预测靶位点突变载体CTNNB1-3'-UTR-mt荧光素酶报告基因活性不变。证明miR-214可以靶向作用于CTNNB1-3'-UTR，CTNNB1是miR-214靶基因。

CTNNB1是β-catenin蛋白的编码基因。经过免疫印迹方法检测β-catenin蛋白表达的变化，发现当肝癌细胞恢复miR-214表达时抑制了β-catenin的蛋白表达。通过qRT-PCR检测发现miR-214对β-catenin mRNA表达水平没有变化，表明miR-214在翻译水平而不是转录水平对β-catenin表达进行调控。

Wnt/β-catenin通路是肝癌中普遍存在的信号传导通路[28]。Wnt信号转导缺乏时，β-catenin与Axin-APC-GSK-3β等形成降解复合物，结合后的β-catenin被GSK-3β磷酸化，进而被泛素化并被胞浆内的蛋白酶体降解。该信号通路活化时，胞浆内的β-catenin 稳定性提高，并转位至胞核与T 细胞因子/淋巴增强因子

（TCF/LEF）[转录因子](http://zh.wikipedia.org/wiki/%E8%BD%AC%E5%BD%95%E5%9B%A0%E5%AD%90)家族结合形成复合体，激活下游靶基因c-myc、cyclin D1、TCF-1、VEGF、MMP-7、CD44、COX-2等的转录。在肝癌中研究发现，β-catenin的GSK-3β结合区域的定向突变或缺失均可造成Wnt/β-catenin通路异常激活；

AXIN1、AXIN2等该通路的负性调节因子的功能缺失性突变也可激活该通路[29]。GSK-3β的失活也可提高β-catenin的稳定性[30]。此外有研究显示HBx蛋白可通过上调URG11的表达也可使β-catenin表达量上调，促进肝癌发生[31]。

为了进一步研究miR-214对β-catenin通路的影响，我们检测了miR-214对β-catenin通路下游基因的表达的影响，发现miR-214过表达明显抑制了c-myc，cyclinD1，TCF-1，和LEF-1的表达。c-myc是与肝癌发生密切相关的原癌基因之一。c-myc基因的过表达可启动转基因小鼠模型中肝癌的发生并能促进癌细胞的生长[32, 33]。相反，如果c-myc基因失活则可抑制侵袭性肝癌的生长，并使肝癌细胞分化为肝细胞和胆管细胞而形成胆管结构，并且可使肿瘤标志物AFP迅速转阴，而细胞因子-8（CK-8）和癌胚抗原CEA水平升高。细胞周期相关蛋白cyclin

D1过表达可通过下调细胞生长抑制因子pRb的表达，促进细胞异常增生以及恶性转化发生[34,35,36]。在侵袭性人肝癌标本中可检测到cyclin Dl的异常高表达。TCF

/ LEF家族，包括TCF1, LEF1, TCF3和TCF4，是β-catenin基因信号通路的主要蛋白。β-catenin与TCF/LEF相互作用，激活下游靶基因，参与细胞增殖、分化、存活和凋亡过程。Wnt可诱导β-catenin的稳定和核积累及与TCF / LEF形成

复合体，并招募其他共同活化分子诱导下游基因激活[37,38,39,40,41]。

已经发现多个miRNA可影响Wnt/β-catenin信号通路[42,43,44,45,46]。Hashimi报道，WNT1 3'-UTR是miR-21和miR-34a的功能性靶点，抑制miR-21和miR-34a可以阻碍人单核细胞来源的树突状细胞（MDDC）分化。下调miRNA-200a水平可使细胞质和细胞核β-catenin的水平上调，诱导上皮间质转化。上调miR-122表达可通过影响Wnt /β-catenin-TCF信号转导通路，抑制肝癌细胞生长并促进其凋亡。我们推测miR-214可能与miR-122具有协同作用，共同调控肝癌Wnt/β-catenin通路。

在本研究中，我们证明，miR-214在肝癌中作为肿瘤抑制基因。我们观察到在肝癌组织和细胞株中miR-214下调是一种常见的事件。异位过表达miR-214能抑制细胞增殖，诱导肝癌细胞阻滞在G0/G1期，抑制肝癌细胞裸鼠成瘤能力。这些结果与宫颈癌、乳腺癌、食管鳞癌、胶质瘤等类似[16,17,47,48]，这些肿瘤中miR-214的表达下调，过表达miR-214可抑制细胞生长。在食管鳞癌中miR-214的表达下调，与病理分级、肿瘤分期和淋巴结转移相关；miR-214的表达与EZH2蛋白表达负相关；过表达miR-214可显著抑制食管鳞癌细胞的迁移和侵袭，EZH2可逆转这种作用。表明miR-214通过靶向EZH2抑制食管鳞癌细胞转移[47]。然而，miR-214在其他人类癌症的表达通常是上调的，包括胰腺癌、卵巢癌，胃癌，恶性黑色素瘤[18,19,49,50]。miR-214在卵巢癌中普遍明显上调，进一步研究发现miR-214通过靶向PTEN的3'端非翻译区（UTR），下调PTEN蛋白表达，并诱导Akt信号通路的激活，从而导致肿瘤细胞的存活与顺铂耐药性。使用Akt抑制剂抑制Akt，或过表达缺乏3'-UTR的PTEN基因cDNA，可逆转miR-214诱导的细胞生存。表明miR-214通过靶向PTEN/Akt信号通路诱导卵巢癌细胞生存与顺铂耐药性[19]。一个可能的解释是miRNA的表达是肿瘤特异性的。如miR-9分子在乳腺癌中表达上调，但是在卵巢癌中表达下调。miR-155在弥漫性大B细胞淋巴瘤明显上调，而在人乳腺癌中下调。miRNA的功能高度依赖于它的靶基因，不同的细胞环境中驱动肿瘤形成的分子不同，使得同一个miRNA可在不同的细胞中起到癌基因或抑癌基因的作用。特异的细胞环境可能是miR-214在不同肿瘤中作用相反的原因。

本文研究结果表明miR-214作为一个肿瘤抑制基因，通过抑制β-catenin，对

于抑制肝癌形成起着重要的作用。miR-214可作为肝癌的一个有用的预后或治疗目标。同时miRNA还可能参与其它靶基因的表达调控，通过miRanda、PITA软件我们还预测到SCD1可能也是miR-214的靶基因，SCD1也是β-catenin通路的调控基因，进一步探讨miR-214和其他靶基因和相关信号通路之间的相互作用，将有助于深入认识miR-214在肝癌发病中的机制。

结**论**

1. miR-214在肝癌组织和肝癌细胞系中的表达显著下调。

2. miR-214 可以在体外和在体内抑制肝癌细胞的生长。3. CTNNB1是miR-214的靶基因之一。miR-214可以通过抑制β-catenin通路抑制肝癌生长。

参考文献

[1] Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(14): 2137–2150.

[2] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74-108.

[3] Kumar MS, Lu J, Mercer KL, et al. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis[J]. Nat Genet, 2007, 39(5): 673-677.

[4] Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA[J]. RNA2005, 11(12): 1753-1761.

[5] Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor[J]. CancerMetastasisRev, 2009, 28(3-4): 369-378.

[6] Ueda R, Kohanbash G, Sasaki K, et al. Dicer-regulated microRNAs 222 and 339 promote resistance of cancer cells to cytotoxic T-lymphocytes by down-regulation of ICAM-1[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(26): 10746-10751.

[7] Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. Nature, 2007, 449(7163): 682-688.

[8] Varnholt H. The role of microRNAs in primary liver cancer[J]. Annals of Hepatology, 2008, 7(2): 104-113.

[[9] Meng F,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Meng%20F%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17681183) [Henson R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Henson%20R%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17681183), [Wehbe-Janek H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Wehbe-Janek%20H%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17681183), et a1. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer[J]. Gastroenterology, 2007, 133(2): 647-658.

[10] Ma L, Liu J, Shen J, et a1． Expression of miR-122 mediated by adenoviral vectorinduces apoptosis and cell cycle arrest of cancer cells[J]． Cancer Biol Ther, 2010, 9(7): 554-561.

[11] Tsai W C, Hsu PW, Lai TC, et a1. MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellu1ar carcinoma[J]. Hepatology, 2009, 49(5): 1571-1582.

[12] Bai S, Nasser MW, Wang B, et a1. MicroRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to

Sorafenib[J]. J Biol Chem,2009,284(46): 32015-32027．

[13] Fornari F, Milazzo M, Chieco P, et a1. MiR-199a-3p regulates mTOR and c-Met to influence the doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells[J]. Cancer Res, 2010, 70(12): 5184-5193．

[14] Wong CC, Wong CM, Tung EK, et al. The microRNA miR-139 suppresses metastasis and progression of hepatocellular carcinoma by down-regulating Rho-kinase 2[J]. Gastroenterology, 2011, 140 (1): 322-331.

[15] Wang Y, Lee AT, Ma JZ, et al. Profiling microRNA expression in hepatocellular carcinoma reveals microRNA-224 up-regulation and apoptosis inhibitor-5 as a microRNA-224-specific target[J]. J Biol Chem, 2008, 283 (19): 13205-13215.

[16] Yang Z, Chen S, Luan X, et al. MicroRNA-214 is aberrantly expressed in cervical cancers and inhibits the growth of HeLa cells[J]. IUBMB Life, 2009, 61: 1075-1082.

[17] Derfoul A, Juan AH, Difilippantonio MJ, et al. Decreased microRNA-214 levels in breast cancer cells coincides with increased cell proliferation, invasion and accumulation of the Polycomb Ezh2 methyltransferase[J]. Carcinogenesis, 2011, 32: 1607-1614.

[18] Zhang XJ, Ye H, Zeng CW, et al. Dysregulation of miR-15a and miR-214 in human pancreatic cancer[J]. Journal of hematology& oncology, 2010, 3: 46.

[19] Yang H, Kong W, He L, et al. MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN[J]. Cancer Res, 2008, 68(2): 425–433.

[20] Thompson MD, Monga SP. WNT/beta-catenin signaling in liver health and disease [J]. Hepatology, 2007, 45: 1298-305.

[21] Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease[J]. Cell. 2006, 127: 469-480.

[22] Cai SR, Wang Z, Chen CQ, et al. Role of silencing phosphatase of regenerationg liver-3 expression by microRNA interference in the growth of gastric cancer[J]. Chin Med J (Engl), 2008, 121(24): 2534-2538.

[23] Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, et al. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci, 2007, 104(39): 15472-15477.

[24] Rossi JJ. New hope for a microRNA therapy for liver cancer[J]. Cell, 2009, 137(6): 990-992.

[25] Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, et al. Therapeutic miRNA delivery

Suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model [J]. Cell, 2009, 137(6): 1005-1017.

[26] 张敬磊, 金华君, 刘辉, 等. 腺病毒介导microRNA-99a 过表达抑制肝癌细胞生长[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2012, 19(3): 267-271.

[[27] Connolly E,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Connolly%20E%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18688024) [Melegari M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Melegari%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18688024), [Landgraf P,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Landgraf%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18688024) et al. Elevated expression of the miR-17-92 polycistron and miR-21 in hepadnavirus-associated hepatocellular carcinoma contributes to the malignant phenotype[J]. [Am J Pathol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18688024#%23) 2008, 173(3): 856-864.

[28] Xu XR, Huang J, Xu ZG, et al. Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98 (26): 15089-15094.

[29] Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, et al. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1[J]. Nat Genet, 2000, 24(3): 245-250.

[30] Ding Q, Xia W, Liu JC, et al. Erk associates with and primes GSK-3beta for its inactivation resulting in upregulation of beta-catenin[J]. Mol Cell, 2005, 19(2): 159-170.

[[31] Lian Z,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lian%20Z%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16496348) [Liu J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Liu%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16496348), [Li L,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Li%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16496348) et al. Enhanced cell survival of Hep3B cells by the hepatitis B x antigen effector, URG11, is associated with upregulation of beta-catenin[J]. Hepatology, 2006, 43(3): 415-424.

[32] Murakami H, Sanderson ND, Nagy P, et al. Transgenic mouse model for synergistic effects of nuclear oncogenes and growth factors in tumorigenesis: interaction of c-myc and transforming growth factor alpha in hepatic oncogenesis[J]. Cancer Res, 1993, 53(8): 1719-1723.

[33] Shachaf CM, Kopelman AM, Arvanitis C, et al. MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer[J]. Nature, 2004, 431(7012): 1112-1117

[34] Dowdy SF, Hinds PW, Louie K, et al. Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins[J]. Cell, 1993, 73(3): 499-511.

[35] Jiang W, Zhang YJ, Kahn SM, et al. Altered expression of the cyclin D1 and

Retinoblastoma genes in human esophageal cancer[J]. PNAS, 1993, 90(19): 9026-9030.

[36] Nishida N, Fukuda Y, Komeda T, et al. Amplification and overexpression of thecyclin D1 gene in aggressive human hepatocellular carcinoma[J]. Caner Res. 1994, 54(12): 3107-3110.

[37] Wong CM, Ng IO. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma[J]. Liver Int 2008, 28(2): 160–174.

[38] Polakis P. Wnt signaling and cancer[J]. Genes Dev, 2000, 14(15): 1837–1851. [39] MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases[J]. Dev Cell, 2009, 17(1): 9–26.

[40] Chen JP, Lin C, Xu CP, et al. Molecular therapy with recombinant antisense c-myc adenovirus for human gastric carcinoma cells in vitro and in vivo[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2001, 16(1): 22–28.

[41] Wong NA, Morris RG, McCondochie A, et al. Cyclin D1 overexpression in colorectal carcinoma in vivo is dependent on beta-catenin protein dysregulation, but not k-ras mutation[J]. J Pathol 2002; 197(1): 128–135.

[42] Huang K, Zhang JX, Han L, et al. MicroRNA roles in beta-catenin pathway[J]. Mol Cancer, 2010, 9: 252.

[43] Hashimi ST, Fulcher JA, Chang MH, et al. MicroRNA proﬁling identiﬁes miR-34a and miR-21 and their target genes JAG1 and WNT1 in the coordinate regulation of dendritic cell differentiation[J]. Blood, 2009, 114(2): 404–414.

[44] Burk U, Schubert J, Wellner U, et al. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells[J]. EMBO Rep, 2008, 9(6): 582–589.

[[45] Su J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Su%20J%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22211245), [Zhang A,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhang%20A%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22211245) [Shi Z,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Shi%20Z%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22211245) et al. MicroRNA-200a suppresses the Wnt/β-catenin signaling pathway by interacting withβ-catenin[J]. Int J Oncol. 2012, 40(4): 1162-1170.

[[46] Xu J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Xu%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22276989), [Zhu X](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhu%20X%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22276989), [Wu L,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Wu%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22276989) et al. MicroRNA-122 suppresses cell proliferation and induces cell apoptosis in hepatocellular carcinoma by directly targeting Wnt/β-catenin pathway[J]. [Liver Int,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=MicroRNA-122%2Bsuppresses%2Bcell%2Bproliferation%2Band%2Binduces%2Bcell%2Bapoptosis%2Bin) 2012, 32(5): 752-760.

[[47] Huang SD](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Huang%20SD%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22867052), [Yuan Y](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Yuan%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22867052), [Zhuang CW](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhuang%20CW%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22867052), et al. MicroRNA-98 and microRNA-214 post-transcriptionally regulate enhancer of zeste homolog 2 and inhibit migration and invasion in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. [Mol Cancer,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=MicroRNA-98%2Band%2BmicroRNA-214%2Bpost-transcriptionally%2Bregulate%2Benhancer%2Bof%2Bzeste%2Bhomolog%2B2%2Band%2Binhibit%2Bmigration%2Band%2Binvasion%2Bin%2Bhuman%2Besophageal%2Bsquamous%2Bcell%2Bcarcinoma) 2012, 11: 51.

[[48] Zhao Z,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhao%20Z%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23187003) [Tan X,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Tan%20X%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23187003) [Zhao A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhao%20A%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23187003), et al. microRNA-214-mediated UBC9 expression in glioma[J]. BMB Rep, 2012, 45(11): 641-646.

[49] Ueda T, Volinia S, Okumura H, et al. Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis[J]. Lancet Oncol, 2010, 11(2): 136–146.

[50] Penna E, Orso F, Cimino D, et al. MicroRNA-214 contributes to melanoma tumour progression through suppression of TFAP2C[J]. EMBO J, 2011, 30(10): 1990–2007.

**文献综述**

**microRNA在肝脏疾病中的研究进展**

**【摘要】**microRNA是一类调控基因转录后表达的非编码小RNA。近年来研究表明，miRNA的表达与多种肝脏疾病密切相关，在肝脏疾病的诊断、治疗和预后中具有广阔前景。本文就近年来miRNA与肝脏疾病的相关研究进行综述。

**【关键词】**microRNA；肝脏疾病

**Progression of MicroRNA in Liver Diseases**

**[Abstract]** MicroRNAs are a series of small non-coding RNAs that regulate gene expressions in the post-transcriptional level. Recent research demonstrates that the expressions of microRNA were correlated closely with many kinds of liver diseases.

They will have a wide prospects in early diagnosis, treatment and prognostic

Evaluation of liver diseases. The purpose of this review is to summarize recent advances on relationship between microRNA and liver diseases.

**[Keywords]** microRNA; Liver diseases

microRNA简称miRNA，是一类19~24个核苷酸组成的非编码的小分子单链RNA，由发夹结构前体pre-miRNA经Dicer酶加工形成。miRNA的表达具有分化的位相性和时序性，在不同组织和发育阶段，其表达水平有显著差异。

miRNA的转录独立于其他基因，具有调控体内代谢的作用。肝脏是人体的重要器官，具有重要的生物学功能，肝脏疾病的发生较为常见且危害很大。近年来研究报道显示，肝脏含有丰富的miRNA，对肝脏功能具有广泛的调节作用，与肝炎、肝纤维化和肝癌等肝病均有一定关系。本文对miRNA与肝脏疾病的关系及其在肝脏疾病中的应用进行综述。

**1 miRNA与病毒性肝炎**

**1.1 miRNA与乙型病毒性肝炎**

我国是乙型肝炎的高发地区，HBV的感染率很高，miRNA对HBV基因具有一定的调控作用，是HBV感染和乙肝进展的重要介质。第一个被证实与HBV复制有关的miRNA是miR-122，可通过碱基配对与HBV的前基因组RNA序列结合，抑制HBV的表达和复制。研究显示miR-122的表达与HBV的感染与复

制负相关[1]，可作为判断HBV感染的潜在的标志物，miR-122的表达变化比ALT

升高发生的更早，组织特异性和可靠性更强[2]。贾音等[3]报道在慢性乙型肝炎

（CHB）患者血浆中，miR-122、miR-199a和miR-125b的表达量变化具有统计学意义，以miR-122的变化最显著。Gui等[4]报道CHB患者血清中miR-885-5p的水平显著增高。Xu等[5]采用实时定量PCR对48例CHB患者血清中的miR-21、miR-122及miR-223进行检测，结果发现其均明显高于健康人，认为miR-21、miR-122及miR-223可作为慢性CHB肝损伤的标志物。Ji等[6]采用基因芯片技术对HBV携带者、CHB患者、HBV相关慢性急性肝衰竭（ACLF）患者和健康人（HC）的miRNA表达水平进行分析，并分析其与临床症状的相关性。结果显示HBV感染者中miRNA的表达水平均明显高于HC，其中miR-122表达升高最为显著，miR-122和miR-194与CHB和ACLF患者的患病时间负相关。张静等

[7]对microRNA在重型乙型肝炎（SHB）患者外周血单个核细胞（PBMC）中的表达及意义进行研究，采用RNA-DNA嵌合探针液态芯片（xMap）技术检测CHB患者、SHB患者和健康人（NC）的PBMC 中miR-191、miR-223、miR-222、miR-145、miR-21、miR-31、miR-126、miR-20a和miR-372的表达水平，结果

CHB组、SHB组和NC组PBMC中miR-191、miR-222、miR-145、miR-31、和miR -372表达无统计学差异，而miR-21、miR-126和miR-223的表达均有统计学差异，且均在SHB 组表达最低。3 组间miR-20a 表达有统计学差异，

SHB组miR-20a表达最高，SHB组miR-21、miR-126和miR-223表达下调和

miR-20a的表达上调可能参与SHB的发生、发展。

miRNA在HBV感染和乙肝进展中的异常表达，使其具有了作为乙肝治疗靶点的可能，关于其对HBV调控的机制已有报道。Wu等[8]的研究显示，miRNA可直接作用于HBV基因，其中miR-7、miR-196b、miR-511和miR-433可直接作用于HBV的聚合酶或S基因，miR-205直接作用于X基因，miR-345作用于前C基因，进而对HBV的表达和复制起调节作用。Zhang等[9]报道miR-199a-3p作用于S基因，miR-210作用于前S基因，从而使HBV复制被抑制，使HBsAg表达减少但对细胞增殖无影响。miRNA可间接调节细胞增殖信号通路，从而对

HBV的表达产生影响，研究发现miR-1可通过对多个宿主基因的表达抑制而促进HBV的复制和转录，抗原表达增强，产物分泌增加[10]。肝细胞膜表面特异性

表达的转膜分子去唾液酸糖蛋白1（ASGPR1）可能是HBV进入肝细胞的主要受体之一，表达靶向ASGPR1的外源性miRNA，可抑制HBV的复制和表达，降低HBsAg、HBeAg的分泌和HBV-DNA含量[11]。CHB患者I型干扰素（IFN）分泌不足，并且干扰素下游的抗病毒信号通路异常，导致患者对IFN-α应答不良。李宁等[12]对microRNA在调控CHB患者I型干扰素分泌紊乱中的可能作用和临床意义进行研究，发现miR-548家族成员，尤其是miR-548c5p与CHB患者I型干扰素分泌紊乱密切相关。

**1.2 miRNA与丙型病毒性肝炎**

首个被证明与HCV关系密切的miRNA是miR-122，它可以通过促进核糖体与病毒RNA结合，在翻译初期对HCV的复制起促进的作用。沉默miR-122可抑制HCV复制，而过表达miR-122则能促进HCV的复制[13, 14]，二者这种正向相关的关系，使miRNA可为HCV复制的诊断及靶向治疗提供思路。

miR-122在慢性丙肝（CHC）患者血清中的表达水平高于健康人群，且与谷丙转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST）及组织学活动指数（HAI）等炎症指标具有相关性，而与HCV RNA无关，提示血清miR-122可作为反映CHC患者炎症活动的指标[15]。miRNA的表达与抗HCV感染疗效的关系，国内外已有研究报道。Sarasin等[16]研究发现，CHC患者如果miR-122水平低，则对干扰素的治疗无应答，如果在给予干扰素治疗前，使miR-122水平提高，可显著提高对干扰素的应答率。Pedersen等[17]发现miR-196序列与HCV RNA基因组几乎完全互补，β干扰素可通过对其表达的诱导抗HCV. Scagnolari等[18]等对CHC患者和健康人miRNA的比较发现，miR-1、miR-30、miR-128、miR-196及miR -296表达水平在CHC患者和正常人中存在差异，对干扰素治疗的反应也有明显差别，提示

miRNA可为CHC患者中干扰素治疗的有效性预测提供参考。目前在HCV感染中已发现108种miRNA和1247种mRNA水平明显异常，不同的miRNA在对

HCV复制过程中均发挥一定的调节作用，提示对miRNA和mRNA表达谱的联合检测对HCV感染诊断与作用机制的研究具有重要意义[19]。

**2 miRNA与酒精性肝炎、药物性肝炎**

miRNA除与病毒性肝炎相关外，有报道显示其也与酒精性肝炎和药物性肝炎相关。Zhang等[20]通过建立酒精致肝损伤的小鼠模型，研究发现血浆miR-122

水平在肝损伤发生时显著增高，其表达水平改变甚至早于肉眼可观察到的组织病理学变化，与ALT相比更加灵敏。Wang等[21]报道对乙酰氨基酚肝损伤大鼠血浆中的miRNA表达谱发生明显改变，miR-122急剧升高400倍以上，而miR-710和miR-711表达水平则明显下降，提示循环miRNAs可能具有作为检测酒精性肝炎和药物性肝炎的新型标志物的可能性。

**3 miRNA与肝纤维化、肝硬化**

肝纤维化和肝硬化的过程中，均伴随着miRNA表达水平的变化。Murakami等[22]发现miR-199和miR-200家族与肝纤维化的发展过程密切相关，其表达水平异常增高可导致肝星状细胞（HSC）中的纤维化相关基因过表达。Roderburg [23]发现随着肝纤维化进展，miR-29的表达下调，并与HSC活化以及细胞外基质基因的上调具有相关性。Li等[24]建立肝纤维化大鼠模型对肝纤维化中的miRNA进行研究，结果显示肝纤维化组织中有23个miRNA存在差异性表达，其中以miR-34 家族上调显著，且其上调水平与肝纤维化程度正相关；差异性表达的

miRNA的靶基因主要参与调控脂/脂肪酸代谢的相关通路；长链酰基辅酶A合成酶家族成员1（ACSL1）受miR-34家族5个miRNA的共同调控，其含有与miR-34家族特异性结合位点，是miR-34a/34c的靶基因，表达水平与肝纤维化进程负相关，提示miR-34a/34c及其靶基因ACSL1可能是肝纤维化进程中的重要调控因子。Chen等[25]研究显示，在HSC活化过程中，有17个miRNA表达上调，14个表达下调，在肝纤维化进展中，有10个miRNA表达逐渐上调，5个则逐渐下调。经生物信息学分析，这些miRNA可直接或间接调控多个肝纤维化有关基因功能和细胞信号转导通路，其中miR-335的表达水平在HSC活化过程中明显下降，而miR-335的过表达可明显对HSC的活化和迁移有抑制作用，这种作用可能是通过下调细胞粘合素C（TNC）的表达而实现的。

**4 miRNA与肝癌**

肝癌是最常见的恶性肿瘤之一，严重危害人类健康。miRNA具有癌基因或抑癌基因的作用，其与肝癌的发生、发展和转移密切相关，为肝癌的诊断、靶向治疗和预后提供了重要信息。

**4.1 miRNA与肝癌的发生发展**

**4.1.1 miRNA与肝癌细胞的增殖与凋亡**

近年来国内外的研究提示，miRNA可调控影响细胞周期的关键因子的表达，调控死亡受体及线粒体以介导的通路，进而调控癌细胞增殖与凋亡。

miRNA-124作用于CDK6，沉默CpG阻滞细胞周期，抑制肝癌细胞增殖[26]。

miRNA-106b和miRNA-93作用于Ci/Kip家族成员发挥抑制癌细胞增殖的作用

[27]. miRNA-199a-3p通过mTOR、c-Met和PAK4靶点上调细胞周期抑制因子，阻滞细胞周期在G1/S期，并使癌细胞对阿霉素敏感性增加[[28,29]；miRNA-199a还通过抑制HIF-1α和CD44的表达抑制肝癌细胞增殖[30,31]。Buurman等[32]报道miR-449可能具有抑癌基因作用，其过表达可抑制肝癌细胞增殖并促进肝癌细胞凋亡。Xu等[33]的研究表明，miR-122在肝细胞肝癌中低表达，其过表达可抑制肝癌细胞增殖并促进肝癌细胞凋亡，这种作用是通过影响Wnt/β-catenin通路实现的。Chung等[34]报道miRNA-15b可靶向Bcl-w抑制肝癌细胞增殖，促进TRAIL诱导的细胞凋亡。Guo等[35]报道miRNA-15/16可对Bcl-2靶点调节，激活caspase-3、-8和-9，通过调节死亡受体和线粒体介导的凋亡通路诱导细胞凋亡。张俊等[36]研究发现miR-150表达上调可通过降低靶基因c-Myb的表达，抑制细胞增殖，诱导细胞凋亡，进而为成为肝癌靶向治疗的靶基因提供了一定的可能性。

Li等[37]报道miR-99a可抑制肝癌的发生、发展，这种作用通过靶向调控IGF-R 和

mTOR实现，其与肝癌预后相关。利用腺病毒介导miR-99a的过表达，发现miR-99a能有效抑制肝癌细胞增殖[38]。Nohata等[39]发现miR-375可通过靶向调控AEG-1抑制肝癌细胞生长。朱秀明[40]研究发现miR-let-7c在肝癌组织和细胞中低表达，并与肝癌分化程度相关，过表达miR-let-7c具有抑制肝癌细胞增殖，促进细胞凋亡和阻滞细胞周期的作用，这种作用是通过靶向抑制CDC25A靶基因实现的。

**4.1.2 miRNA与肝癌细胞的侵袭与转移**

研究发现多种miRNA是肿瘤细胞转移相关基因的调节因子，发挥抗转移或促转移作用，加快或减慢癌细胞侵袭速度。Yao等[41]发现miR-30d通过对抑癌基因Galphai2表达的抑制，可以促进肿瘤细胞浸润和转移进程。Ding等[42]报道miR-151-3p与原发性肝癌肝内转移具有高度相关性，其通过调节抑癌基因RhoGDIA，激活Rac1、Cdc42及RhoGTP促进肝癌细胞的侵袭和转移。Henry等[31]报道指出miR-199a-3p对CD44+肝癌细胞SNU449侵袭性具有抑制作用，

这种作用是通过负调控CD44，抑制其与配体结合进而抑制其介导的癌细胞侵袭转移。Fornari等[29]报道miR-199a-3p调控c-Met表达，降低肝癌细胞HepG2侵袭性，外源性转染miR-199a-3p与沉默c-Met相比，对肿瘤细胞侵袭性的影响更大，可能存在其他靶点对癌细胞侵袭性调控共同发挥作用。Tsai等[43]研究了肝内转移的肝癌细胞系，发现其中miR-122的表达水平明显低于正常水平，通过生物信息学方法及基因芯片技术分析，发现其作用靶点可能为与细胞转移关系密切的

ADAM17基因，miR-122下调使该基因过表达，促进了肝癌细胞的肝内转移。

**4.2 miRNA与肝癌诊断、治疗和预后**

**4.2.1 miRNA与肝癌的诊断**

miRNA在肝癌组织与正常肝组织中表达水平存在显著差异，miRNA表达谱可能对肝癌的诊断具有重要意义。肖海静等[44]对肝细胞肝癌和癌旁组织表达水平存在显著差异miRNA的进行研究筛选，结果得到213个差异表达的miRNA，其中116个为上调表达，包括miR-181、miR-21、let-7e等，97个表达下调，如miR-199、miR-451、miR-122等。Sukata等[45]发现miR-98、let-7a、let-7f在肝癌发生早期就显著升高，可能作为肝癌早期诊断的标志物。高军平等[46]报道肝细胞癌患者血浆中miR-224表达水平显著高于健康人群，并与癌组织表达量正相关，提示miR-224可能可以作为一种新的肝癌诊断的血清学指标。Li等[47]报道肝癌患者血液中miRNA-375表达水平显著异常，可作为肝癌诊断标志物，其诊断的特异度和敏感度分别高达96%和100%。

**4.2.2 miRNA与肝癌的靶向治疗**

目前miRNA用于肝癌基因靶向治疗的研究处于刚起步阶段，主要研究方向是对异常低表达的抑癌miRNA的表达上调以及沉默高表达的促癌miRNA，从而发挥抑制肿瘤发生发展的作用。Kota[48]等构建miR-26-腺病毒载体，以小鼠肝癌模型进行研究，将其注入模型小鼠体内，结果其肝癌生长明显受到抑制，并未见毒副作用。以2’-O-甲基化寡聚核苷酸antagomirs作用于有促癌作用的miR-21和miR-17-92，可显著抑制癌细胞增殖[49]。利用腺病毒介导miR-99a的过表达能有效抑制肝癌细胞增殖[38]，认为腺病毒Ad5-miR-99a可能成为治疗肝癌的新型药物。Zhou等[50]报道索拉非尼可使miR-1274a表达上调，进而使与索拉非尼治疗相关的蛋白酶ADAM9的表达下调，增加NK对肝癌细胞的杀伤。miRNA用于

肝癌的基因治疗的初步研究已显示出巨大的应用价值，但其作用靶点较多，作用性质各异，其作用程度和范围以及效果如何，以及安全性均需进一步的研究。

**4.2.3 miRNA与肝癌的预后**

miRNA对肝癌的预后也具有一定的意义。Li等[51]发现肝癌患者血清中miR-221的高表达与肿瘤大小、分期明显正相关，miR-221高表达患者与miR-221低表达患者相比，生存率显著降低。Wang等[52]研究发现miR-199b低表达患者，其生存率显著低于miR-199b高表达患者；恢复肝癌细胞中miR-199b表达，可抑制HepG2细胞增殖，并增加其对放疗与化疗的敏感性。Ji等[53]报道miR-26低表达患者的生存期显著高于高表达患者，且术后干扰素治疗效果更佳。倪航航等

[54]研究了miR-122的表达与肝癌手术前后肝损伤的相关性，结果发现术后miR-122表达水平与是否阻断第一肝门及切除肿瘤大小正相关，认为miR-122可能作为反映肝切除术肝功能损伤的新的潜在生物学指标。邓治亮等[55]用miRNA芯片技术分析比较了不同复发倾向肝癌患者的miRNA表达谱，筛选出7个差异表达的miRNA与肝癌术后早期复发密切相关。

**5小结与展望**

miRNA是一类拥有复杂调控网络的基因表达调控因子，其可能直接参与调控相关基因的表达进而对细胞内信号传导进行调控，而其自身表达也受到某些细胞信号传导通路的调控；一个miRNA分子可能与多个基因的表达密切相关，一个基因也可能受多个miRNA分子的调控。对miRNA的发现与研究，为我们展现了一个全新的更为复杂的基因表达调控模式，开拓了巨大的探索空间。

miRNA的表达与基因调控作用与肝脏疾病的发生发展密切相关。筛选病变过程中差异表达的miRNA，探讨其与疾病发生、发展及预后的相关性，寻找作用靶点，以期进一步阐明疾病发生发展机制并对疾病进行靶向治疗，是目前大多数学者的研究思路。目前已发现和证实多个与肝脏疾病相关的miRNA，研究阐明其与疾病的作用机制，对于进一步筛选出稳定性和特异性较高的miRNA，应用于临床肝脏疾病的诊断、治疗及预后判断具有重要的意义。

参考文献

[1] Chen Y, Shen A, Rider PJ, et al. A liver- specific microRNA binds to a highly conserved RNA sequence of hepatitis B virus and negatively regulates viral gene expression and replication [J]. FASEB J, 2011, 25(12): 4511-4521.

[2] Zhang Y, Jia Y, Zheng R, et al. Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol- and chemical-related hepatic diseases [J]. Clin Chem, 2010, 56(12): 1830-1838.

[3] 贾音, 张毅, 费明钰, 等. 慢性乙肝患者外周血microRNAs的表达变化[J]. 第二军医大学学报, 2010, 31(12): 1381-1383.

[[4] Gui J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Gui%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20815808), [Tian Y,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Tian%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20815808) [Wen X](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Wen%20X%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20815808), et al. Serum microRNA characterization identifies miR-885-5p as a potential marker for detecting liver pathologies [J]. [Clin Sci (Lond).,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=microrna%20gui%20junhao) 2011, 120(5): 183-193.

[5] Xu J, Wu C, Chen X, et al. Circulating microRNAs, miR -21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis [J]. Mol Carcinog, 2011, 50(2): 136-142.

[6] Ji F, Yang B, Peng X, et al. Circulating microRNAs in hepatitis B virus-infected patients[J]. J Viral Hepat, 2011, 18(7): e242-251.

[7] 张静, 顾国浩, 史进方, 等. 重型乙型肝炎患者外周血单个核细胞microRNA 表达及其意义[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(3): 219-221.

[8] Wu FL, Jin WB, Li JH, et al. Targets for human encoded microRNAs in HBV genes [J]. Virus Genes, 2011, 42(2): 157-161.

[9] Zhang GL, Li YX, Zheng SQ, et al. Suppression of hepatitis B virus replication by microRNA-199a-3p and microRNA-210[J]. Antiviral Res, 2010, 88(2): 169-175.

[10] Zhang X, Zhang E, Ma Z, et al. Modulation of hepatitis B virus replication and hepatocyte differentiation by MircoRNA-1 [J]. Hepatology, 2011, 53(5): 1476-1485.

[11] 郜玉峰, 余莉, 李家斌, 等. 靶向ASGPR1的外源性microRNA对HBV表达和复制的抑制作用[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(7): 699-704.

[12] 李宁, 陈明泉, 程琦, 等. 调控慢性乙型肝炎患者I 型干扰素信号通路的microRNA的筛选及鉴定[J]. 中国病毒病杂志, 2012, 2(2): 107-112.

[13] Randall G, Panis M, Cooper JD, et al. Celluar cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104( 31): 12884-12889.

[14] Narbus CM, Israelow B, Sourisseau M, et al. HepG2 cells expressing microRNA miR-122 support the entire hepatitis C virus life cycle [J]. J Virol, 2011, 85(22): 12087-12092.

[[15] Bihrer V,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Bihrer%20V%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21606975) [Friedrich-Rust M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Friedrich-Rust%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21606975), [Kronenberger B,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kronenberger%20B%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21606975) et al. Serum miR-122 as a biomarker of necroinflammation in patients with chronic hepatitis C virus infection [J]. Am J Gastroenterol, 2011, 106 ( 9): 1663 -1669.

[16] Sarason FM, Krol J, Markiewicz I, et al. Decreased levels of microRNA-122 in individuals with hepatitis C responding poorly to interferon therapy [J]. Nat Med, 2009, 15(1): 31-33.

[17] Pedersen IM, Cheng G, Wieland S, et al. Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism [J]. Nature, 2007, 449(7164): 919-922.

[18] Scagnolari C, Zingariello P, Vecchiet J, et al. Differential expression of interferon-induced microRNAs in patients with chronic hepatitis C virus infection treated with pegylated interferon alpha [J]. Virol J, 2010, (7): 311.

[19] 胡学玲. microRNA在乙型、丙型肝炎中的作用[J]. 临床肝胆病杂志, 2012, 28(11): 877-880.

[20] Zhang Y, Jia Y, Zheng R, et al. Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases [J]. Clin Chem, 2010, 56(12): 1830-8.

[21] Wang K, Zhang S, Marzolf B, et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(11): 4402-4407.

[22] Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, et al. The progression of liver fibrosis is related with overexpression of the miR-199 and 200 families [J]. PLoS One, 2011, 6(1): e16081

[23] Roderburg C, Urban GW, Bettermann K, et al. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis [J]. Hepatology, 2011, 53(1): 209-218.

[[24] Li WQ,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Li%20WQ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21366874) [Chen C,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Chen%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21366874) [Xu MD,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Xu%20MD%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21366874) et al. The rno-miR-34 family is upregulated and targets ACSL1 in dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats [J]. [FEBS J.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21366874) 2011, 278 (9): 1522-1532.

[[25] Chen C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Chen%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21586285), [Wu CQ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Wu%20CQ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21586285), [Zhang ZQ,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhang%20ZQ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21586285) et al. Loss of expression of miR-335 is implicated in hepatic stellate cell migration and activation. [Exp Cell Res.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21586285) 2011, 317 (12): 1714- 1725.

[26] Furuta M, Ozawkie KI, Kanaka S, et al. miRNA-124 and miRNA-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive Microfloras in hepatocellular carcinoma [J]. Carcinogenesis, 2010, 31(5): 766-776.

[[27] Ivanovska I,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Ivanovska%20I%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18212054) [Ball AS](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Ball%20AS%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18212054), [Diaz RL,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Diaz%20RL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18212054) et al. MicroRNAs in the miR-106b family regulate p21/CDKN1A and promote cell cycle progression[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(7): 2167- 2174.

[28] Fornent F, Lazzo M, Chico P, et al. miRNA-199a-3p regulates mTor and c-Met to influence the doxorubicin sensitivity of human adenocarcinomata cells[J]. Cancer Res, 2010, 70(12): 5184-5193.

[29] Hou J, Lin L, Zhou W, et al. Identification of miRNomes in human liver and hepatocellular carcinoma reveals miR-199a/b-3p as therapeutic target for hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Cell, 2011, 19(2): 232-243.

[30] Jia XQ, Cheng HQ, Qian X, et al. Lentivirus-mediated overexpression of microRNA-199a inhibits cell proliferation of human hepatocellular carcinoma. [J]. Cell Biochem Biophys, 2012, 62(1): 237-244.

[31] Henry JC, Park JK, Jiang J, et al. MiR-199a-3p targets CD44 and reduces proliferation of CD44 positive hepatocellular carcinoma cell lines [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 403: 120-125.

[32] Buurman R, Gurlevik E, Schaffer V, et al. Histone deacetylases activate hepatocyte growth factor signaling by repressing microRNA-449 in hepatocellular carcinoma cells [J]. Gastroenterology, 2012, [ Epub ahead of

print].

[33] Xu J, Zhu X, Wu L, et al. MicroRNA-122 suppresses cell proliferation and induces cell apoptosis in hepatocellular carcinoma by directly targeting Wnt/β-catenin pathway [J]. Liver Int, 2012, 32(5): 752-760.

[34] Chung GE, Mung SJ, Lee SH, et al. High expression of microRNA-15b predicts a low risk of tumor recurrence following curative resection of hepatocellular carcinoma [J]. Colon Report, 2010, 23(1): 113-119.

[35] Guo CJ, Pan Q, Li DG, et al. miR-15b and miR-16 are implicated in activation of the rat hepatic stellate cell: An essential role for apoptosis [J]. J Hepatol, 2009, 50(4): 766-778.

[36] 张俊, 罗娜, 王勃, 等. 上调microRNA-150表达对肝癌SMMC7721细胞增殖和凋亡的影响[J]. 解放军医学杂志, 2012, 37(10): 943-936.

[37] Li D, Liu X, Lin L, et al. MicroRNA-99a inhibits hepatocellular carcinoma growth and correlates with prognosis of patients with hepatocellular carcinoma [J]. J Biol Chem, 2011, 286(42): 36677-36685.

[38] 张敬磊, 金华君, 刘辉, 等. 腺病毒介导microRNA-99a 过表达抑制肝癌细胞生长[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2012, 19(3): 267-271.

[39] Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N, et al. Tumor suppressive microRNA-375 regulates oncogene AEG-1 / MTDH in head and neck squamous cell carcinoma ( HNSCC) [J]. J Human Genetics, 2011, 56(8): 595-601.

[40] 朱秀明. MicroRNAlet-7c在肝细胞癌中的表达、功能及靶点的研究[D]. 浙江大学, 2012.

[41] Yao J, Liang L, Huang S, et al. MicroRNA-30d promotes tumor invasion and metastasis by targeting Galphai2 in hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2010, 51(3): 846-856.

[42] Ding J, Huang S, Wu S, et al. Gain of miR-151 on chromosome8q24.3 facilitates tumour cell migration and spreading through downregulating RhoGDIA [J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(4): 390-399.

[43] Tsai WC, Lai TC, Chau GY, et al. MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA

That regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology,

2009, 49(5): 1571-1582.

[44] 肖海静, 王观宇, 董庆华. 人肝细胞肝癌和癌旁正常组织microRNA表达差异的分析[J]. 肿瘤防治研究, 2012, 39(8): 947-949.

[45] Sukata T, Sumida K, Kushida M, et al. Circulating miRNAs, possible indicators of progress of rat hepatocarcinogenesis from early stages [J]. Toxicol Lett, 2011, 200(1-2): 46 -52.

[46] 高军平, 向邦德, 倪航航, 等. microRNA-224 在肝细胞癌组织和血浆中表达的相关性[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 32(21): 4012-4021.

[47] Li LM, Hu ZB, Zhou ZX, et al. Serum miRNA profiles serve asnovel biomarkers for HBV infection and diagnosis of HBV-positive hepatocarcinoma[J]. Cancer Res, 2010, 70(23): 9798－9807.

[48] Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, et al. Therapeutic miRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model [J]. Cell, 2009, 137(6): 1005-1017.

[[49] Connolly E,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Connolly%20E%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18688024) [Melegari M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Melegari%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18688024), [Landgraf P](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Landgraf%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18688024), et al. Elevated expression of the miR-17-92 polycistron and miR-21 in hepadnavirus-associated hepatocellular carcinoma contributes to the malignant phenotype[J]. [Am J Pathol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18688024#%23) 2008, 173(3): 856-864.

[50] Zhou C, Liu J, Li Y, et al. microRNA-1274a, a modulator of sorafenib induced a disintegrin and metalloproteinase 9 (ADAM9) down-regulation in hepatocellular carcinoma [J]. FEBS Lett, 2011, 585: 1828-1834.

[51] Li J, Wang Y, Yu W, et al. Expression of yserum miRNA-221 in human hepatocellular carcinoma and its prognostic significance [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 406(1): 70-73.

[52] Wang C, Song B, Song W, et al. Unpressed miRNA-199b-5p targets Hypoxia-lnducible Factor-1a in hepatocellular carcinoma and predicts prognosis of hepatocellular carcinoma patients [J]. J Gastroenteroi Hepatol, 2011, 26(11): 1630 -1637.

[53] Ji JF, Shi J, Budhu A, et al. miRNA expression, survival, and response to interferon in liver cancer [J]. N Engl J Med, 2009, 361(15): 1437-1447.

[54] 倪航航, 向邦德, 高军平, 等. 血浆中microRNA-122与肝癌手术肝损伤的相关性研究[J]. 实用医学杂志, 2012, 28(6): 932-935.

[55] 邓治亮, 孙建, 区应亮, 等. 原发性肝癌术后早期复发密切相关microRNA的筛选及应用[J]. 中ft大学学报(医学科学版), 2012, 33(4): 494-498.

致**谢**

本研究是在尊敬的导师江家骥教授的精心指导下完成，导师对于医学科研事业严谨治学的态度和勇于探索的精神，令本人获益良多，在此致以由衷的感激和崇高的敬意！

感谢尊敬的导师江家骥教授三年来在工作和生活上给予的无微不至的关怀

和帮助。

感谢在研究进程中给予热心帮助的老师、师兄、师弟们和其他所有研究生同学。

感谢三年中家人对我的无私帮助和支持。在此致以最衷心的感谢！