**年级：2013 级学号：201310056**

**广西医科大学**

博士学位论文

**MicroRNA-22-3p 通过下调靶基因 Sp1 抑制肝癌细胞的增殖、转移和侵袭**

**朱少亮**

**导师姓名：黎乐群 教授 专业名称：肿瘤学 申请学位类型：学术型学位**

**答辩委员会主席：杨连粤**

**答辩委员会委员：谢裕安、韦艾凌、卢奕、罗小玲**

1

**二零一六年三月**

原 创 性 声 明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果， 也不包含获得广西医科大学或其他教育机构的学位或证书使用过的材料。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。

学位论文作者签名： 签字日期： 年 月 日

---------------------------------------------------------------------------

**学位论文版权使用授权书**

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规

定，即：在校期间论文的知识产权属广西医科大学。学校有权保存论文的电子和纸质文档，可以借阅或上网公布本论文的部分或全部内容，可以采用影印、复印或其它手段保存、汇编本论文， 学校可以向国家有关机关或机构送交论文的电子和纸质文档，允许论文被查阅和借阅。同意广西医科大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。保密论文在解密后遵守此规定。

学位论文作者签名：

导师签字：

签字日期： 年 月 日 签字日期：年 月 日

2

基本情况

个人简历

姓名：朱少亮 性别：男

民族：汉族 出生年月：1986.12.31

籍贯：广东台ft 政治面貌：群众

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 学习工作经历  起止时间 | 所在院校或单位 | 学历 | 学位 |
| 2006/9 – 2011/7： | 大连大学 | 本科 | 学士 |
| 20011/9 – 20013/7： | 广西医科大学 | 硕士研究生 | 硕士 |
| 20013/9 – 至今 | 广西医科大学 | 博士研究生 | 博士 |

研究生期间科研经历

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 项目起止时间 项目名称 | 项目来源 | 本人承担任务 |

2016.01-2018.12 HBV/AFB1 双暴露介

导 AKR1B10 上调表达在肝细胞癌门静脉侵袭转移中的作用研究

2013.01-2016.12 生物黏附型结肠靶

向 5-FU/葵酸钠微球用于门脉缓释化疗

国家自然科学基金 细胞体外实验

国家自然科学基金 裸鼠体内抑瘤实验

[缩略语英文对照表5](#_bookmark0)

3

目 录

[摘要](#_Toc686602923) 5

**[Abstract](#_Toc686602924)** 8

[前言](#_Toc686602925) 12

[参考文献](#_Toc686602926) 13

[1 肝细胞癌中](#_Toc686602927)**[miR-22-3p](#_Toc686602927)**[的表达特性的鉴定](#_Toc686602927) 16

**[1.1](#_Toc686602928)** [材料](#_Toc686602928) 16

**[1.1.1](#_Toc686602929)** [临床肿瘤标本收集](#_Toc686602929) 16

**[1.1.2](#_Toc686602930)** [细胞株](#_Toc686602930) 16

**[1.1.3](#_Toc686602931)** [主要试剂](#_Toc686602931) 16

**[1.1.4](#_Toc686602932)** [主要仪器与设备](#_Toc686602932) 16

**[1.2](#_Toc686602933)** [方法](#_Toc686602933) 17

**[1.2.1](#_Toc686602934)** [细胞培养](#_Toc686602934) 17

**[1.2.2](#_Toc686602935)** [组织总](#_Toc686602935)**[RNA](#_Toc686602935)**[的提取](#_Toc686602935) 17

**[1.2.3](#_Toc686602936)** [细胞总](#_Toc686602936)**[RNA](#_Toc686602936)**[的提取](#_Toc686602936) 17

**[1.2.4](#_Toc686602937)** [逆转录反应合成](#_Toc686602937)**[cDNA](#_Toc686602937)** 18

**[1.2.5](#_Toc686602938)** [荧光定量](#_Toc686602938)**[PCR](#_Toc686602938)**[反应](#_Toc686602938) 19

**[1.2.6](#_Toc686602939)** [统计学分析](#_Toc686602939) 20

**[1.3](#_Toc686602940)** [实验结果](#_Toc686602940) 20

**[1.3.1](#_Toc686602941)** [组织中总的提取](#_Toc686602941) 20

**[1.3.2](#_Toc686602942)** [肝癌组织、癌旁组织及正常组织中](#_Toc686602942)**[miR-22-3p](#_Toc686602942)**[的表达情况](#_Toc686602942) 20

**[1.3.3](#_Toc686602943)****[qRT-PCR](#_Toc686602943)**[检测](#_Toc686602943)**[miR-22-3p](#_Toc686602943)**[在五种细胞系中的表达情况](#_Toc686602943) 21

**[1.4](#_Toc686602944)** [讨论](#_Toc686602944) 21

**[1.5](#_Toc686602945)** [参考文献](#_Toc686602945) 21

**[2](#_Toc686602946)****[miR-22-3p](#_Toc686602946)**[对肝癌体内外生物学特性的影响](#_Toc686602946) 23

**[2.1](#_Toc686602947)****[miR-22-3p](#_Toc686602947)**[对肝癌体内外生物学特性的影响](#_Toc686602947) 23

**[2.1.1](#_Toc686602948)** [材料](#_Toc686602948) 23

[剂盒购买于日本同仁。](#_Toc686602949) 23

[洗1次，然后用棉签轻轻擦除上室中的matrigel基质胶和残留细胞，然后再用](#_Toc686602950) 27

**[2.1.3](#_Toc686602951)** [实验结果](#_Toc686602951) 27

**[2.2](#_Toc686602952)****[miR-22-3p](#_Toc686602952)**[对肝癌体内生物学特性的影响](#_Toc686602952) 29

**[2.2.1](#_Toc686602953)** [材料](#_Toc686602953) 29

**[2.2.2](#_Toc686602954)** [方法](#_Toc686602954) 30

**[2.2.3](#_Toc686602955)** [结果](#_Toc686602955) 33

**[2.3](#_Toc686602956)** [讨论](#_Toc686602956) 34

**[2.4](#_Toc686602957)** [参考文献](#_Toc686602957) 34

**[3](#_Toc686602958)****[miR-22-3p](#_Toc686602958)**[靶基因的预测及鉴定](#_Toc686602958) 34

[3.1 靶基因的预测及初步鉴定](#_Toc686602959) 34

**[3.1.1](#_Toc686602960)** [材料与方法](#_Toc686602960) 34

**[3.1.2](#_Toc686602961)** [结果](#_Toc686602961) 39

**[3.2 Sp1](#_Toc686602962)**[对肝癌体外生物学特性的影响](#_Toc686602962) 40

**[3.2.1](#_Toc686602963)** [材料](#_Toc686602963) 40

[主要仪器 公司](#_Toc686602964) 41

**[3.2.2](#_Toc686602965)** [方法](#_Toc686602965) 41

**[3.2.3](#_Toc686602966)** [结果](#_Toc686602966) 45

**[3.3](#_Toc686602967)** [双萤光素酶报告系统检测](#_Toc686602967)**[Sp1](#_Toc686602967)**[与](#_Toc686602967)**[miR-22-3p](#_Toc686602967)**[的关系](#_Toc686602967) 46

[3.3.1 材料与方法](#_Toc686602968) 48

**[3.3.2](#_Toc686602969)** [实验结果](#_Toc686602969) 51

**[3.4](#_Toc686602970)** [讨论](#_Toc686602970) 58

**[3.5](#_Toc686602971)** [参考文献](#_Toc686602971) 59

[综述](#_Toc686602972) 61

[参考文献](#_Toc686602973) 65

[附录](#_Toc686602974) 69

[附录1. 所有引物序列](#_Toc686602975) 69

[攻读学位期间发表的学术论文目录](#_Toc686602976) 70

缩略语英文对照表

**缩写英文全称中文全称**

5

HCC Hepatocellular Carcinoma肝细胞癌

MTT 3-(4,5) -dimethylthiahiazo (-z-y1) -3,5-di-

phenytetrazoliumromide

3-(4，5-二甲基噻唑-2) -2, 5-二苯基四氮唑溴盐

RPMI Roswell Park Memorial Institute洛斯维

siRNA Small interfering RNA小片段干扰核糖核酸

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

QRT-PCR quantificational real-time

Polymerase chain reaction MTT 3-(4,5) -dimethylthiahiazo

(-z-y1) -3,5-di-

phenytetrazoliumromide

Dulbecco改良Eagle培养基

实时定量反转录聚合酶连锁反应

3-(4，5-二甲基噻唑-2) -2, 5-二苯基四氮唑溴盐

DMSO Dimethylsufoxide 二甲基亚砜

PRMI Roswell Park Memorial Institute 洛斯维

siRNA Small interfering RNA 小片段干扰核糖核酸

NC Non-specific control 非特异对照组

VEGF vascular endothelial growth factor 血管内皮生长因子

EMT Epithelial to messenchymal transition

上皮细胞向间质细胞的转变

**MicroRNA-22-3p通过下调靶基因Sp1抑制肝癌细胞的增殖、转移和侵袭**

6

摘要

**背景和目的：**

肝细胞癌（下文中简称肝癌或HCC）是全世界最常见且恶性程度比较高的肿瘤之一，其发病率在恶性肿瘤中排在第五位，其死亡率位排第三位。肝癌的综合治疗手段有手术切除、肝动脉化疗栓塞术、肝移植、射频消融 治疗等。手术治疗是肝癌治疗的首选方法。肝移植虽然可以获得较满意的 效果，但是，由于供体肝的缺乏，肝移植术的开展受到了很大限制。肝动 脉化疗栓塞术及射频消融治疗等方法具有相对比较好的疗效，然而由于肝 癌起病隐匿，所以大部分患者诊断的时候已属晚期，只有30％～40％的患者可以接受根治性的治疗，而对于大部分进展期的肝癌患者不得不接受姑 息性的治疗。由于各种治疗手段的局限性、疾病本身的复发与转移、合并 基础肝病的严重程度及治疗过程中的肝功衰竭等各个方面，仍然限制了各 种治疗手段疗效的提高，与人们的预期存在较大差异，故迫切需要结合肝 癌的发病机制研究，进一步研发新的治疗方法，目的为改善肝癌患者的预 后和提高肝癌患者的生存质量。

MicroRNA（miRNA），是一组天然的非编码的小分子RNA，长度约为二十一到二十五个核苷酸，miRNA可特异性抑制或降解靶mRNA的翻译从而调节靶基因的表达。最近的研究表明，miRNA在调节多种人体内发生的生理或者病理过程中发挥关键作用，这些过程包括新陈代谢，细胞分化和肿瘤的

7

发生发展。miRNA在人类肿瘤中可以根据靶基因的不同而作为调节肿瘤的发生发展的致癌基因或抑癌基因。

miRNA-22-3p，前体为pre-mi-22，是在Dicer酶切后形成的产物。到目前为止，有关mir-22-3p在肝细胞癌中的功能研究及mir-22-3p的靶基因仍未有报导。因此，mir-22-3p在肝癌的发生发展过程中的功能作用及其机制值得我们深入去研究。在本研究中，我们拟通过实时定量qRT-PCR检测miR-22-3p在肝癌的组织和细胞系中的表达特点；利用化学合成的方法增强内源性miRNA的功能，通过MTT、细胞周期、细胞迁移和侵袭、裸鼠皮下成瘤等实验方法来研究miR-22-3p对于肝癌的增殖及转移能力的影响；根据生物信息学预测结果，通过实时定量技术、蛋白质电泳、突光素酶报告实验确定miR-22-3p的靶基因。目的为明确miR-22-3p在肝癌增殖及转移的过程中的功能作用，期望从分子水平探讨肝细胞癌的发生及转移的机理，从而为肝癌的临床诊断及治疗提供分子标记物和目标。

**方法：**

**1.肝癌中miR-22-3p的表达特性的鉴定**

我们用qRT-PCR检测了20例HCC及其对应癌旁组织，以及10例正常肝组织中miR-22-3p的表达情况。检测miR-22-3p在HL-7702、HepG2、7721、Huh-7、Hep3B这5种细胞株中的表达。

**2. miR-22-3p 对于肝癌体内和体外生物学特性的影响**

（1）利用化学合成的方法，将mimics-miR-22-3p转染至HepG2细胞中，然后我们采用MTT细胞增殖实验、细胞周期实验、划痕实验以及

Transwell侵袭实验检测miR-22-3p对于体外肝癌细胞的增殖、迁移及侵袭

8

能力的影响。

（2）利用化学合成的方法，将antagomirago-miR-22-3p转染至HepG2细胞中，将antagomirago-miR-22-3p转染组细胞注射进裸鼠皮下，然后进一步观察miR-22-3p对于HepG2在裸鼠皮下的成瘤能力的影响。

**3. miR-22-3p靶基因的预测和鉴定**

（1）应用生物信息学预测软件microRNA、TargetScan、Pictar预测miR-22-3p调控的靶基因.

（2）利用化学合成的方法，将mimics-miR-22-3p及inhibitor-miR-22-3p转染至HepG2细胞中，利用Western Blot检测mimics-miR-22-3p及inhibitor-miR-22-3p组及其对应NC组细胞中候选靶基因Sp1的表达情况，初步鉴定其是否为miR-22-3p的靶基因。

（3）利用化学合成方法沉默Sp1（siRNA-Sp1），将siRNA-Sp1转染进

HepG2细胞中，利用荧光定量RT-PCR检测siRNA-Sp1、siRNA-NC以及NC组的HepG2细胞中miR-22-3p的表达情况，以说明Sp1是否影响miR-22-3p的表达。

（4）利用qRT-PCR检测miR-22-3p的候选靶基因Sp1在肝癌细胞株

HepG2以及正常肝细胞株HL-7702中的表达情况；利用RNA干扰技术沉默Sp1（siRNA-Sp1），将siRNA-Sp1转染进HepG2细胞中，然后采用MTT细胞增殖实验、划痕实验以及Transwell侵袭实验检测Sp1对体外HepG2细胞的增殖、迁移以及侵袭能力的影响。

（5）利用双萤光素酶报告基因系统来检测miR-22-3p与Sp1之间的相互作用来鉴定Sp1是否为miR-22-3p的靶基因。

9

**结果：**

**1.肝癌中miR-22-3p的表达特性的鉴定**

（1）肝癌组织、癌旁组织及正常组织中miR-22-3p的表达情况

我们用qRT-PCR检测了20例HCC及其对应癌旁组织，以及10例正常肝组织中miR-22-3p的表达情况，结果显示：在HCC组织中，miR-22-3p的表达水平显著低于其相对应的癌旁组织（*P*<0.01）。虽然在癌旁组织中mir-22-3p的表达水平低于在正常肝组织中的表达，但是该差异没有统计学意义（*P*> 0.05）。

（2）qRT-PCR检测miR-22-3p在五种细胞系中的表达情况

qRT-PCR结果发现：以正常细胞系HL-7702为对照，在四种肝癌细胞系中miR-22-3p的表达均低于在正常细胞系HL-7702中的表达（*P*<0.01），并且在HepG2肝癌细胞中表达最低。结果提示：miR-22-3p在肝癌中的低表达是中的一种很普遍的现象，miR-22-3p的低表达可能与肝癌的的发生发展相关。

2. **miR-22-3p对于肝癌体内和体外生物学特性的影响**a. miR-22-3p对于肝癌体外生物学特性的影响

（1）将mimics-miR-22-3p及NC转染到HepG2细胞中，并通过qRT-PCR检测其转染效率。结果显示为：转染mimics-miR-22-3p后，HepG2细胞中miR-22-3p 的表达水平明显上调，结果提示干扰效果显著（*P*<0.001）。

（2）采用MTT法检测转染mimics-miR-22-3p及其NC后的HepG2细胞，检测HepG2细胞的体外增殖能力，然后绘制细胞抑制曲线。结果显示mimics-miR-22-3p组细胞的增殖能力明显较mimics-NC组受到抑 制

10

（*P*<0.05）。结果提示：过表达miR-22-3p能抑制肝癌细胞的体外增殖能力。

（3）将转染mimics-miR-22-3p及对应NC组细胞进行流式细胞术检测肝癌细胞周期。结果显示：与NC组及空白对照组相比，mimics-miR-22-3p组细胞G2期的细胞含量百分比明显增加（*P*<0.05）,说明miR-22-3p可能使肝癌细胞在G2期受到了阻滞。同时，我们没有检测到过表达miR-22-3p后肝癌细胞的调亡有明显改变，因此我们推测miR-22-3p主耍通过诱导细胞周期阻滞在G2期，从而抑制细胞的生长。

（4）Mimics-miR-22-3p转染HepG2细胞后划痕，在0h和24h拍照，结果显示：，mimics-miR-22-3p转染组细胞的迁移能力（24h划痕宽度/0h划痕宽度：mimics-miR-22-3p组：0.711±0.032，Mimics-NC组：0.327±

0.029，空白对照组：0.294±0.041）与mimics-NC组和空白对照组相比有明显差异（*P*<0.05），过表达miR-22-3p后HepG2的细胞迁移能力有明显的减弱。可见，上调miR-22-3p后对细胞迁移能力有明显抑制作用。

（5）Transwell侵袭实验结果显示：Mimics-miR-22-3p转染组细胞的穿膜细胞数明显少于mimics-NC组和空白对照组，Mimics-miR-22-3p感染HepG2胞后，Mimics-NC组透膜细胞数为（129.2±5.5）/视野，空白对照组透膜细胞数为（119.6±4.4）/视野，Mimics-miR-22-3p 组透膜细胞数为

（69.7±6.7）/视野，Mimics-miR-22-3p转染组细胞侵袭能力明显低于imics-NC组和空白对照组细胞（*P*＜0.05）。结果提示：过表达miR-22-3p可明显抑制HepG2细胞体外侵袭能力。

b. miR-22-3p对于肝癌体内生物学特性的影响

11

采用裸鼠皮下成瘤实验进一步检测miR-22-3p对HepG2细胞在体内增殖能力的影响。裸鼠成瘤的统计结果显示antagomiragomir-miR-22-3转染细胞注射组的裸鼠成瘤能力较antagomirago-NC组和空白对照组显著增高。

**3. miR-22-3p靶基因的预测及鉴定**

（1）应用生物信息学预测软件microRNA、TargetScan、Pictar预测miR-22-3p调控的靶基因。初步候选Bcl2, CCND1, Sp1成为预测结果中的靶基因，其中Sp1可能性最大。

（2）Western Blot检测Mimics-miR-22-3p、Inhibitor-miR-22-3p及其对应NC转染细胞后Bcl2, CCND1, Sp1蛋白的表达。结果显示：与Mimics-NC相比，Mimics-miR-22-3p转染组HepG2细胞中Sp1蛋白的表达明显减少

（*P*<0.05）. 与Inhibitor-NC相比，Inhibitor-miR-22-3p转染组HepG2细胞中Sp1蛋白的表达明显升高（*P*<0.05）. 说明了Sp1极有可能是miR-22-3p的靶基因。

（3）已明确miR-22-3p和Sp1相互之间为逆向作用的关系后，为了明确是miR-22-3p作用于Sp1还是Sp1作用于miR-22-3p，我们把Sp1沉默后用qRT-PCR检测miR-22-3p的表达，结果显示：miR-22-3p在siRNA-Sp1组，siRNA-NC组以及空白对照组的细胞之间的表达量没有统计学差异

（*P*> 0.05）。说明Sp1并不影响miR-22-3p的表达。

（4）qRT-PCR结果发现：Sp1在HepG2细胞株中的表达水平高于正常细胞株HL-7702（*P*<0.01）。结果提示：Sp1高表达在肝癌中是一种普遍的现象，Sp1的高表达可能与肝癌的发生发展相关。

（5）将siRNA-Sp1及siRNA-Sp1-NC转染到HepG2细胞中，并通过

12

qRT-PCR检测siRNA-Sp1、siRNA-NC及空白对照组的转染效率。结果显示：转染siRNA-Sp1后HepG2细胞中Sp1表达水平明显下调，提示沉默现象明显（*P*<0.001）。

（6）MTT细胞增殖实验检测siRNA-Sp1组、siRNA-NC组中HepG2细胞的在体外增殖能力，然后绘制细胞抑制曲线。siRNA-Sp1组细胞相对于siRNA-NC组中HepG2细胞的增殖能力明显受到下调（*P*<0.05）。结果提示：抑制Sp1的表达能抑制肝癌细胞的体外增殖能力。

（7）siRNA-Sp1转染HepG2细胞后进行划痕，在0h和24h时间点拍照，结果显示：，siRNA-Sp1组细胞迁移能力（24h划痕宽度/0h划痕宽度：siRNA-Sp1组0.688±0.037，siRNA-NC组0.394±0.026，空白对照组0.311

±0.032）明显比siRNA-NC组和空白对照组低（*P*<0.05），沉默Sp1后细胞迁移能力明显减弱。结果提示：下调Sp1后对体外HepG2细胞的迁移能力有显著的抑制作用。

（8）Transwell侵袭实验结果显示：siRNA-Sp1转染组细胞的穿膜细胞数明显少于siRNA-NC和空白对照组, siRNA-Sp1感染HepG2胞后，siRNA-NC 组透膜细胞数为（97.2±6.3）/视野，空白对照组透膜细胞数为

（102±4.6）/视野，siRNA-Sp1组透膜细胞数为（47.2±5.5）/视野，siRNA-Sp1组细胞的侵袭能力显著低于siRNA-NC组及空白对照组细胞（*P*

＜0.05）。结果提示：抑制Sp1的表达能明显抑制HepG2细胞的体外侵袭能力。

（9）双萤光素酶系统结果显示：3' UTR-NC+miRNA组和3' UTR+miRNA相比，有显著性差异(*P*<0.05)，说明miR-22-3p与靶基因Sp1的3' UTR 的

13

结合，抑制其表达。**结论：**

1. miR-22-3p在肝癌细胞中低表达是一种普遍现象，过表达miR-22-3p可明显抑制肝癌细胞的增殖、侵袭以及转移能力。

2. miR-22-3p可能通过调节其靶基因Sp1的表达，从而抑制肝癌细胞增殖、侵袭及转移。

关键词：miR-22-3p； Sp1； 肝癌； 增殖； 迁移； 侵袭

**MiR-22-3p inhibit proliferation, migration and invasion via down regulating Sp1**

**In hepatocellular carcinoma**

14

**Abstract**

**Background and objective:** As the most frequent primary cancer of the liver, hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth leading cause of cancer morbidity and the third leading cause of cancer-related deaths worldwide. Hepatic resection (HR), liver transplantation, transarterial chemoembolization (TACE) and radiofrequency ablation (RFA) are widely used for the treatment of HCC. It is recommended by most published series that HR is the first-line therapy for HCC patients. Although liver transplantation could provide acceptable efficacy, it is not wildly accepted for treatment owing to issues of organ allocation. RFA could also could provide acceptable efficacy. However, most of the patients are at advantaged stage when first diagnosed because of the hidden onset. About 30%~40% of them receive curative treatments and the rest which have advantaged stage HCC have no choice but receive palliative treatments. The treatments of HCC are difficult to be improved due to the limitations of the treatments, recurrence and metastasis of the HCC itself, combination of severe basic hepatic disease and liver failure during the treating process. Thus, it is urgent that new treatments should be developed by investigating the pathogenesis of HCC to improve the prognosis and quality of

15

Live of HCC patients.

MicroRNAs (miRNAs) are a group of naturally-occurring, small non-coding RNAs, 21-25 nucleotides long, that regulate target gene expression by specifically inhibiting the translation of mRNA or inducing mRNA degradation. Accumulating evidence has demonstrated that miRNAs play a critical role in regulating a variety of physiological and pathological processes in the human body, such as cell differentiation, morphogenesis and tumorigenesis. In human cancer, miRNAs can function either as oncogenes or tumor suppressor genes in regulating tumor development and progression, depending on the target gene.

Mir-22-3p, of which the precursor is pre-miR-22, is the product after pre-miR-22 is cleaved by Dicer enzyme. Up to now, few research concerning the function of miR-22-3p and its target gene in HCC have been reported. Hence the role and molecular mechanism of miR-22-3p in the development of HCC is worth in-dept investigating. In the current study, we examined miR-22-3p expression in human HCC tissue and cells in vitro by qRT-PCR, and tested its effects on cell growth and metastasis by MTT assay, cell-cycle distribution, cell migration and invasion tests in vitro and subcutaneous tumor formation test in nude mice in vivo using chemical synthesis technology. In addition, we determined the target of miR-22-3p according to the prediction of biological information, qRT-PCR, Western Blot and luciferase reporter experiment. The solution of of questions would indicate the function of miR-22-3p in HCC

16

Growth and metastasis. The results may provide reference for new targets and mocular markers of HCC in clinical diagnosis and treatments.

**Methods：**

**1. MiR-22-3p expression in tissues and cells was detected using qRT-PCR.**

MiR-22-3p expression was detected in 10 cases of normal liver tissues, 20 cases of HCC tissue and their matched adjacent tissues. In addition, miR-22-3p

Expression was detected in HCC cells in vitro, the lines include HL-7702 、

HepG2、7721、Huh-7、Hep3B.

**2. Role of miR-22-3p on the biological characteristics of HCC cells in vitro and in vivo was examined.**

(1) Using chemical synthesis technology, the mimics-miR-22-3p was transfected into HCC cell line HepG2. And we examined the effects of miR-22-3p on cell growth and metastasis by MTT assay, cell-cycle distribution, cell migration and invasion tests in vitro.

(2) Using chemical synthesis technology, the antagomirago-miR-22-3p was transfected into HCC cell line HepG2. And we tested the effects of miR-22-3p on cell growth by subcutaneous tumor formation test in nude mice in vivo.

**3. Prediction of target gene of miR-22-3p**

(1) We predicted the target gene of miR-22-3p by software: microRNA 、

17

TargetScan、Pictar.

(2) Using chemical synthesis technology, the mimics-miR-22-3p, inhibitor-miR-22-3p and their matched NC was transfected into HCC cell line HepG2. And we examined the Sp1 expression in cells of the mimics-miR-22-3p group and inhibitor-miR-22-3p group and their matched NC groups by Western Blot.

(3) Using RNA interference technology, the siRNA-Sp1 was transfected into HCC cell line HepG2. And we examined the miR-22-3p expression in cells of the siRNA-Sp1, its matched NC group and the blank group by qRT-PCR.

(4) We examined the Sp1 expression in cell line HepG2 and HL-7702 by qRT-PCR. Using RNA interference technology, the siRNA-Sp1 was transfected into HCC cell line HepG2. And we examined the effects of Sp1 on cell growth and metastasis by MTT assay, cell-cycle distribution, cell migration and invasion tests in vitro.

(5) We further determined whether Sp1 is the target gene of miR-22-3p by luciferase reporter experiment.

18

**Results:**

**1. MiR-22-3p expression in tissues and cells was detected using qRT-PCR.**

(1) MiR-22-3p expression in tissues was detected using qRT-PCR

MiR-22-3p expression in 20 cases of HCC tissues was significantly lower than that in their matched adjacent tissues and the 10 cases of normal liver tissues (*P*<0.01). miR-22-3p expression in the 20 cases of adjacent tissues and the 10 cases of normal liver tissues have no significant difference (*P*> 0.05).

(2) MiR-22-3p expression in 5 cell lines was detected using qRT-PCR

MiR-22-3p expression in HepG2、7721、Huh-7、Hep3B was significant lower than that in HL-7702 (*P*<0.01). And the lowest miR-22-3p expression was in HepG2.

**2. Role of miR-22-3p on the biological characteristics of HCC cells in vitro and in vivo was examined.**

A. mimics-miR-22-3p on the biological characteristics of HCC cells in

vitro

(1) The miR-22-3p expression in mimics-miR-22-3p group was significantly higher than that in mimics-NC group (*P*<0.001) by qRT-PCR, indicating that the effect of chemical synthesis technology was significant.

(2) The cell proliferation capacity in mimics-miR-22-3p group was significantly better than that in mimics-NC group (*P*<0.05) by MTT assay, indicating that miR-22-3p plays a tumor-suppressor role in HCC.

19

(3) The HepG2 cells in G2 phase in mimics-miR-22-3p group were significantly more than that in mimics-NC group and blank group (*P*<0.05) in flow cytometry analysis, indicating that overexpression miR-22-3p group can induce cell cycle arrest in G2 phase. And we did not found more cell apoptosis in mimics-miR-22-3p group than that in the two groups.

(4) The migration capacity of the HepG2 cells in mimics-miR-22-3p group was significantly weaker than the two groups (24h scratch width/the 0h scratch width: mimics-miR-22-3p group: 0.711±0.032，Mimics-NC group: 0.327±

0.029, Blank group: 0.294±0.041, *P*<0.05), indicating that overexpression of

MiR-22-3p could inhibit the migration capacity of the HepG2 cells.

(5) Invasion ability of HepG2 cells in mimics-miR-22-3p group was significantly weaker than the two groups(the cells through the membrane: mimics-miR-22-3p group: 69.7±6.7/vision, Mimics-NC group: 129.2±5.5/vision, Blank group: 119.6±4.4/vision, *P*<0.05), indicating that

Overexpression of miR-22-3p could inhibit the invasion ability of the HepG2 cells.

B. mimics-miR-22-3p on the biological characteristics of HCC cells in vivo Antagomiragomir-miR-22-3p, antagomiragomir-NC was transfected into HepG2 cells. The cells in antagomiragomir-miR-22-3p group and in antagomiragomir-NC group were injected to the nude mice, respectively. The tumor growth rate in antagomiragomir-miR-22-3p group was slower than that of

Antagomiragomir-NC group.

20

**3. Prediction of target gene of miR-22-3p**

(1) Bcl2, CCND1, Sp1 were predicted as the candidates target genes of miR-22-3p by the boinformatics software(microRNA、TargetScan and Pictar).

(2) Bcl2, CCND1, Sp1 expression in mimics-miR-22-3p, inhibitor-miR-22-3p and their matched NC groups were examined by Western Blot. Sp1 expression in mimics-miR-22-3p group was significantly lower than that in the mimics-NC group. Sp1 expression in inhibitor-miR-22-3p group was significantly higher than that in the inhibitor-NC group. The results indicate that Sp1 probably is a target gene of miR-22-3p.

(3) We examined miR-22-3p expression in the HepG2 cells of siRNA-Sp1 group, siRNA-NC group and Blank group by qRT-PCR. There is no difference among the three groups (*P*> 0.05), indicating that Sp1 does not have impact on miR-22-3p expression in the HepG2 cells.

(4) Sp1 expression in HL-7702 cell line was significantly higher than that in HepG2 cell line (*P* <0.05), indicating that Sp1 is commonly downregulated in HCC.

(5) SiRNA-Sp1 and siRNA-NC were transfected into HepG2 cell line. And we examined the Sp1 expression among the cells of siRNA-Sp1 group, siRNA-NC and blank group, respectively. Sp1 expression in siRNA-Sp1 group was significantly lower than that in the other two groups (*P* <0.05), indicating that the effect of siRNA was significant.

(6) The cell proliferation capacity in siRNA-NC group was significantly

21

Better than that in siRNA-Sp1 group (*P*<0.05) by MTT assay, indicating that Sp1 plays a oncogene role in HCC.

(7) The migration capacity of the HepG2 cells in siRNA-Sp1 group was significantly weaker than the siRNA-NC group and Blank group (24h scratch

Width/the 0h scratch width: siRNA-Sp1 group: 0.688±0.037，siRNA-NC

Group: 0.394±0.026，Blank group: 0.311±0.032, P<0.05), indicating that Sp1 downregulated could inhibit the migration capacity of the HepG2 cells.

(8) Invasion ability of HepG2 cells in siRNA-Sp1 group was significantly weaker than the other two groups(the cells through the membrane: siRNA-Sp1

Group: 47.2±5.5/vision, siRNA-NC group: 97.2±6.3/vision, Blank group：

102±4.6/vision, *P*<0.05), indicating that Sp1 downregulated could inhibit the invasion ability of the HepG2 cells.

(9) We further determined whether Sp1 is the target gene of miR-22-3p by luciferase reporter experiment. There was significant difference between 3'

UTR-NC+miRNA group and 3' UTR+miRNA group (*P*<0.05), indicating that miR-22-3p is combined with the 3' UTR of Sp1 and Sp1 is the target gene of miR-22-3p.

**Conclusions**

1. MiR-22-3p is commonly downregulated in HCC and miR-22-3p overexpression can inhibit the capacity of proliferation, migration and invasion of the HCC cells.

22

2. MiR-22-3p could act as a tumor-suppressor by downregulating Sp1 expression in HCC.

**Key words:** MiR-22-3p; Sp1; Hepatocellular carcinoma; Proliferation; Migration; Invasion

23

前言

肝细胞癌（下文中简称肝癌或HCC）是全世界最常见且恶性程度比较高的肿瘤之一，其发病率在恶性肿瘤中排在第五位，其死亡率位排第三位[1]。肝癌的综合治疗手段有手术切除、肝动脉化疗栓塞术、肝移植、射频 消融治疗等[2]。手术治疗是肝癌治疗的首选方法。肝移植虽然可以获得较 满意的效果，但是，由于供体肝的缺乏，肝移植术的开展受到了很大限制。肝动脉化疗栓塞术及射频消融治疗等方法具有相对比较好的疗效，然而由 于肝癌起病隐匿，所以大部分患者诊断的时候已属晚期[3, 4]，只有 30％～

40％的患者可以接受根治性的治疗，而对于大部分进展期的肝癌患者不得不接受姑息性的治疗。由于各种治疗手段的局限性、疾病本身的复发与转移、合并基础肝病的严重程度及治疗过程中的肝功衰竭等各个方面，仍然限制了各种治疗手段疗效的提高，与人们的预期存在较大差异，故迫切需要结合肝癌的发病机制研究，进一步研发新的治疗方法，目的为改善肝癌患者的预后和提高肝癌患者的生存质量。

肝癌的发生进展是一个复杂的过程，该过程起始于肝组织经历由外界因素（乙肝病毒、丙肝病毒、黄曲霉毒素BI和酒精）引起的肝炎或肝硬化[5.6]。在这个复杂的过程中肝细胞经历增殖和异常分化，甚至获得了肝内转移和远处播散的恶性表型。该过程牵涉到细胞周期调节过程中重要的基因，在该过程中，细胞分裂增殖、分化、凋亡、侵袭和转移相关的基因下调。过去的研究主要关注对肝癌发生和进展过程中起关键作用的基因和蛋白。但是，近年来，许多研究开始关注与肝癌发生发展相关的微小RNA 分

24

子(miRNA)。

最早发现的miRNA是miRNA-Lin4，是在研究秀丽隐杆线虫发育存在缺陷时意外发现的[7]。miRNA是一类非编码的小分子单链RNA，长度约为二十一到二十五个核苷酸，miRNA在进化上相对保守并且广泛存在于动植物、真菌及病毒等生物中[8]。之后专家学者开始了对miRNA的更进一步探索，至今已经有1000种左右的miRNA陆续被发现。miRNA的生成主要分两步骤完成。开始的时候，编码的基因在细胞核中在RNA聚合酶II的作用下转录成为初级转录物产物：pri-miRNA，紧接着，初级转录物在Drosha酶的共同作用下被剪切成为长度约60到70nt并具有垄环结构的前体：pre-miRNA。然后pre-miRNAs由Exportin 5转运出细胞核，进入细胞浆[9, 10]。在细胞浆中，pre-miRNAs由Dicer加工，生成两条成熟的miRNAs[11]。根据丰度多少，称作miRNA/miRNA\*。而当前未通过实验确定丰度高低的，以诸如miR-5p（5‘臂）和miR-3p（3‘臂）这种命名形式来区分。miRNA与效应复合物结合，可以作用于特定靶点miRNA，抑制其表达[12, 13]最近越来越多的文献表明：miR-5p端及miR-3p端可以对相同或不同的靶基因起作用从而起到相同或者不同的功能。miRNA对于基因转录后水平的这些调控作用，是普遍存在于真核生物的新陈代谢过程中的。miRNA可调控细胞的增殖、分化、凋亡、代谢以及个体发育等各种不同的过程。而且在许多种人类疾病的发 展过程中，miRNA扮演着非常重要的角色。miRNA可根据靶基因的不同，在癌症的发生发展过程中起着致癌基因或者抑癌基因的作用[14, 15]，过去 的研究结果表明，多种人类癌症的发生和发展与miRNA的异常表达密切相关，miRNA 对肿瘤的治疗、耐药、预后等各方面起着重要作用，而且很有可

25

能miRNA会成为一种新的肿瘤诊断及治疗的分子靶标[16]。

一方面，miRNA特异性与抑癌基因转录mRNA结合，抑癌基因的功能受到抑制，导致肿瘤发生，故miRNA起到致癌基因的作用；另一方面，miRNA与癌基因转录mRNA特异性地结合，从而抑制癌基因的表达，使到肿瘤的发生得到有效的控制，因此miRNA也可以起到抑癌基因的作用。最近越来越多的研究提示：miRNA在正常组织与肿瘤组织中的表达存在着差异，这包括了许多常见的肿瘤，例如鼻咽癌、直肠癌，结肠癌、肺癌、乳腺癌等。 黄秀芳等人的研究包括了8例乳腺癌及其癌旁组织标本，他们对比了癌组织与癌旁组织关于miRNA表达差异，结果发现有16种miRNA的表达异常与乳癌的发生发展非常相关[17]。曾婷等人的研究在56例诊断为原发性非小细胞肺癌组织和癌旁组织中检测了miRNA-34a和c-myc mRNA的的表达量，结果发现miRNA-34a在癌组织中的表达显著低于在癌旁组织中的表达，并且，随着miRNA-34a表达量的逐渐增加，c-myc mRNA的表达逐渐下降；miRNA-34a在癌组织中的表达显著低于在癌旁组织中的表达，癌组织c-myc的表达显著高于在癌旁组织中的表达，而且两者的关系正好相反，提示miRNA-34a的靶基因可能是c-myc[18]。对于miRNA与肝癌的关系又如何呢？最近同样也有大量研究表明miRNA在肝癌的进展中起着重要的作用，并参与了肝癌细胞的分化、凋亡、侵袭等过程。在黄晓卉等人的研究中， 他们使用液相芯片技术结合real-time RT-PCR分析了36例肝癌患者，结果发现：肝癌恶性程度、肿瘤分化程度、是否有肝内和肝外转移及是否有 门静脉癌栓等因素与miRNA-338-3p表达下调程度密切相关，提示miRNA-338-3p可作为肝癌诊断的生物学标记[19]。Li等人的研究分析了120

26

例HCC患者血清miRNA表达谱，在研究中他们用表达异常的miRNA-375来诊断肝癌，结果发现诊断的特异度达96%，敏感度达100%[20]。在Gui等人的研究中，他们利用miRNA芯片检测肝癌患者血循环中miRNA的表达情况时发现表达明显上调miRNA-885可以作为肝癌发生的标志物[21]。随着研究的的开展及深入，更多的研究集中在筛选miRNA的靶基因。在李志芳等人的研究中，他们选取AFBI恶性转化后的L02细胞中的表达显著升高的miRNA-638进行了靶基因的预测，用TargetScan预测并筛选到了四个与肿瘤发生发展相关的靶基因候选基因，分别是BRCAl、BAP- 1、TNFRSFIB和TP53. 11[22]。在常莹等人的实验中，他们用TargetScan预测PEG-10的miRNA分子，发现miRNA-122的种子序列中有8个碱基与PEG-10的3’

UTR匹配，从而认为miRNA-122是可能调控PEG-10的miRNA分子之一[23]。

Liu等人的研究发现：在原发性肝癌中，起抑癌作用的miRNA-375的靶点为YAP[24]。

最近的一项研究的结果表明：miRNA-22在乙肝相关肝癌中的表达水平明显低于其在癌旁与正常组织中的表达[25]。miRNA-22，最初是在海拉细胞中发现，但后来发现其广泛表达于不同的组织[26]。编码miR-22的基因被发现于染色体17的短臂上，在许多脊椎动物中是高度保守的，包括黑猩猩，老鼠，老鼠，狗和马。这种高度保守提示：miR-22在生命过程中起着非常重要的作用。最近，越来越多的研究发现miR-22被在许多癌症组织中下调，包括胆管癌、多发性骨髓瘤及肝细胞癌[27]。miRNA-22-3p，前体为pre-mi-22，是在Dicer酶切后形成的产物。到目前为止，肝癌中有关mir-22-3p功能的研究及mir-22-3p靶基因仍未有报导。因此，mir-22-3p

27

在肝癌的发生发展过程中的功能作用及其机制值得我们深入去研究。。 因此在本研究中，我们拟通过实时定量qRT-PCR检测miR-22-3p在肝

癌的组织和细胞系中的表达特点；利用化学合成的方法增强内源性miRNA的功能，通过MTT、细胞周期、细胞迁移和侵袭、裸鼠皮下成瘤等实验方法来研究miR-22-3p对于肝癌的增殖及转移能力的影响；根据生物信息学预测结果，通过实时定量技术、蛋白质电泳、突光素酶报告实验确定miR-22-3p的靶基因。目的为明确miR-22-3p在肝癌增殖及转移的过程中的功能作用，期望从分子水平探讨肝细胞癌的发生及转移的机理，从而为肝癌的临床诊 断及治疗提供分子标记物和目标。

28

参考文献

[1]. Bosetti, Cristina, Federica Turati et al. Hepatocellular carcinoma epidemiology. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. 2014, 28: 753-770.

[2]. LencioniR. Loco-regionaltreatmentofhepatocellularcarcinoma. Hepatology. 2010; 52: 762-773.

[3]. Siegel R, Miller K, Jemal A. Cancer statistics, 2015. CA: a cancer journal for clinicians. 2015; 65: 5–29.

[4]. Torre LA, Bray F, Siegel R et al. Global cancer statistics, 2012. CA: a cancer journal for clinicians. 2015; 65: 87-108.

[5]. Kirk GD, Lesi OA, Mendy M et al. The Gambia Liver Cancer Study: Infection with hepatitis B and C and the risk of hepatocellular carcinoma in West Africa. Hepatology. 2004; 39: 211–219.

[6]. Velazquez RF, Rodriguez M, Navascues CA et al. Prospective analysis of risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis. Hepatology. 2003; 37: 520–527.

[7]. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans. Science. 2001; 294: 862-4.

[8]. AmbrosV. ThefunctionsofanimalmicroRNAs. Nature.

2004;431(7006):350-5.

[9]. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. Rna.

29

2004;10:1957-66.

[10]. Winter J, Jung S, Keller S et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. Nature cell biology. 2009; 11: 228-34 11. Han J, Lee Y, Yeom KH et al. Molecular basis for the recognition of primarymicroRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. cell. 2006; 125: 887-901.

[12]. Bemstein E. Role for a bidenmte ribonuclease in the initiation step of RNA intcffercnce. Nature, 2001, 409: 363-366.

[13]. Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA et al. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. Science. 2001; 293: 1146-50.

[14]. Cho WC. MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy. The international journal of biochemistry & cell biology. 2010; 42: 1273-81.

[15]. Garzon R, Croce CM. MicroRNAs and cancer: introduction. Semin Oncol.

2011;38:721–3.

[16]. Gaur A, Jewell DA, Liang Y, et al. Characterization of miRNA expression Levels and their biological correlates in human cancer cell lines. Cancer Res, 2007, 67: 2456-2468.

[17]. 黄秀芳, 邵建永. 乳腺癌差异表达的microRNA的筛选研究. 中ft大学报, 2009, 30: 69-77.

[18].曾婷, 马丽, 郝丽, 等. miRNA-34a 与非小细胞肺癌的关系及其可能调节机制. 中国医药导报, 2012, 9: 5-7.

[19]. 黄晓卉, 陈连周, 苏乔, 等． miR-338-3p在肝癌组织中的表达及意义． 中

30

华普通外科学文献，2011, 5[2012-03-10]．

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

[21]. Gui J, Tian Y, Wen X, et al． Serum miRNA characterization identifiesmiRNA- 885- 5p as a potential marker for detecting liver pathologies． Clin Sci(Lond), 2011, 120: 183-193．

[22]. 李志芳, 李道传, 王庆, 等． 黄曲霉毒素B1诱导的恶性转化肝细胞miRNA表达谱的变化． 癌变・畸变・突变， 2011, 23: 26-30．

[23].常莹, 何星星, 黎培员, 等． miRNA-122调控肝癌遗传印记基因PEG-10的实验研究． 中华肝脏病杂志， 2010， 18 : 288－291．

[24]. Liu AM, Poon RT, Luk JM． miRNA- 375 targets Hippo-signaling effector YAP in liver cancer and inhibits tumor properties． Biochem Biophys Res Commun, 2010, 394: 623-627．

[25]. Shi C, Xu X. MicroRNA-22 is down-regulated in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. Biomedicine& Pharmacotherapy. 2013; 67: 375-80.

[26]. Xiong J, Yu D, Wei N et al. An estrogen receptor alpha suppressor, microRNA-22, is downregulated in estrogen receptor alpha-positive human breast cancer cell lines and clinical samples. FEBS journal. 2010; 277: 1684-94.

[27]. Zhang J, Yang Y, Yang T et al. microRNA-22, downregulated in hepatocellular carcinoma and correlated with prognosis, suppresses cell

31

Proliferation and tumourigenicity. British journal of cancer. 2010;103:1215-20.

32

# 1 肝细胞癌中**miR-22-3p**的表达特性的鉴定

关于miR-22-3p在肝癌及细胞系中的表达特性的报导甚少，同样的基因在不同发病背景的肿瘤中的表达可能不一致，广西地区为乙肝相关肝癌高发地。在这个研究背景的基础上，我们在这一部分研究中采用qRT-PCR方法来检测miR-22-3p在乙肝相关肝癌组织、肝癌细胞系中的表达，目的为进一步探讨miR-22-3p的生物学功能奠定基础。

## **1.1** 材料

### **1.1.1** 临床肿瘤标本收集

首先收集2013至2014年间一共20例在广西医科大学附属肿瘤医院肝胆外科经手术切除且经病理证实的乙肝相关肝细胞癌组织标本及其配对癌 旁组织、以及10例正常肝组织作为正常对照组，所有组织标本的收集均获得临床医学伦理委员会的批准。经手术切除后，组织标本均立即取材，然 后用PBS buffer冲洗，再放置在液氮中冻存，最后转放到冰箱内冷冻保存。

### **1.1.2** 细胞株

正常肝细胞株HL-7702, HepG2，7721，Huh-7, Hep3B均购自上海生命科学院细胞库，保存于实验室。

### **1.1.3** 主要试剂

RPMI 1640培养基，胎牛血清，胰蛋白酶，TRNzol裂解液购买自

Invitrogen公司，miRcute miRNA qPCR Detection Kit(SYBR Green)购买于天根生化科技有限公司，miRcute miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit购买于天根生化科技有限公司，DEPC 处理水（100ml）购买自碧云天研究所，

33

50-500 bp DNA Marker购买自Takara公司，逆转录试剂盒购买自Takara公司，组织RNA保护液购买于天根生化科技有限公司，引物见附录1。

### **1.1.4** 主要仪器与设备

**主要仪器**公司

SS-325高压灭菌消毒锅TOMY（日本）

数字pH计Mettler-Toledo公司（瑞士）

5810R高速冷冻离心机eppenndorf公司（德国）

常温低速离心机湘仪公司

高速磁力搅拌机Mettler-Toledo公司（瑞士）

可换膜过滤器、47毫米直径默克密理博公司（美国）

针头式滤器Coming公司（美国）

电子分析天平Mettler-Toledo公司（瑞士）

-80℃超低温冰箱日本SANYO

恒温水浴箱上海安亭仪器厂

高压灭菌指示带中西泰安技术服务中心

millipore超纯水机默克密理博公司（美国）

封口膜Polisciences Inc公司（美国）

玻璃巴氏滴管康宁公司（美国）

显微器械艾瑞医疗器械公司

解剖显微镜贝朗医疗器械公司

制冰机SCOTSMAN, 美国

日立7100型全自动生化分析仪日立、日本

7500荧光PCR仪ABI、美国

96孔PCR板（带条形码）ABI公司（美国）。

PCR板热封膜ABI公司（美国）

高速组织电动研磨器天根（北京）

电泳仪电源和电泳槽伯乐公司（美国）

凝胶成像分析系统伯乐公司（美国）

微波炉广东格兰仕家电集团

高压灭菌消毒锅博讯

34

## **1.2** 方法

### **1.2.1** 细胞培养

正常肝细胞系HL-7702、人肝癌细胞系HepG2、7721、Huh-7、Hep3B在含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中培养，放置在370C和含5%CO饱和湿度的培养箱中培养传代，隔三天换一次液，等到细胞长满的时候，用0.25%胰酶消化，以1: 3的比例进行传代培养。

2

### **1.2.2** 组织总**RNA**的提取

（1）往组织中加入TRNzol，在每30-50mg组织中越添加1ml TRNzol，并使用匀浆仪处理。样品体积一般不要超过TRNzol体积的10%。

（2）在15-300C的温度下放5分钟，使完全分离核酸蛋白复合物。

（3）40C 12,000 rpm(~13,400×g)离心10 min，取上清。

（4）每使用1 ml TRNzol，均需要加入0.2 ml氯仿，然后将管盖盖好，振荡15 sec，在室温下放置3分钟。

（5）40C 12,000 rpm(~13,400×g)离心10-15 min，样品会分成三层：黄色的是有机相，而中层和上层均是无色的水相，而RNA主要在水相中，把约600μl的水相转移到新的离心管。

（6）得到的水相溶液后，往里加入等体积的异丙醇并混匀，然后在室温条件下放置20-30分钟。

（7）40C 12,000 rpm(~13,400×g)离心10 min，去上清。在离心之前，通常看不见RNA沉淀，而在离心后，RNA沉淀会在管侧和管底形成胶状沉淀。

（8）加入1 ml 75%乙醇(RNase-Free ddH2O配置)洗涤沉淀。每使用1 ml TRNzol，至少需要用1 ml 75%乙醇洗涤RNA沉淀进。

35

（9）40C 5,000 rpm(~2,300×g)离心3 min。把液体倒出，注意：不要把沉淀倒出，短暂离心剩余的少量液体并用枪头吸出，不能吸到沉淀。

（10）在室温条件下晾干，并加入30-100μl RNase-Free ddH2O，反复吹打和混匀，目的为把RNA充分溶解。

### **1.2.3** 细胞总**RNA**的提取

（1）观察到细胞生长良好时，把培养基吸除掉并用PBS液洗涤细胞，然后把PBS液吸除掉，往细胞里添加含0.1-0.25%胰蛋白酶的PBS液，待细胞脱离容器壁，添加含有血清的培养基失活胰蛋白酶，把细胞溶液转移到RNase-Free的离心管中，300×g离心5分钟然后收集细胞沉淀，吸除所有的上清液。

（2）在15-300C的温度下放5分钟，使完全分离核酸蛋白复合物。

（3）40C 12,000 rpm(~13,400×g)离心10 min，取上清。

（4）每使用1 ml TRNzol，均需要加入0.2 ml氯仿，然后将管盖盖好，振荡15 sec，在室温下放置3分钟。

（5）40C 12,000 rpm(~13,400×g)离心10-15 min，样品会分成三层：黄色的是有机相，而中层和上层均是无色的水相，而RNA主要在水相中，把约600μl的水相转移到新的离心管。

（6）得到的水相溶液后，往里加入等体积的异丙醇并混匀，然后在室温条件下放置20-30分钟。

（7）40C 12,000 rpm(~13,400×g)离心10 min，去上清。在离心之前，通常看不见RNA沉淀，而在离心后，RNA沉淀会在管侧和管底形成胶状沉淀。

（8）加入1 ml 75%乙醇(RNase-Free ddH2O配置)洗涤沉淀。每使

36

用1 ml TRNzol，至少需要用1 ml 75%乙醇洗涤RNA沉淀进。

（9）40C 5,000 rpm(~2,300×g)离心3 min。把液体倒出，注意：不要把沉淀倒出，短暂离心剩余的少量液体并用枪头吸出，不能吸到沉淀。

（10）在室温条件下晾干，并加入30-100μl RNase-Free ddH2O，反复吹打和混匀，目的为把RNA充分溶解。

### **1.2.4** 逆转录反应合成**cDNA**

（1）miRNA 3'端行加Poly (A)处理：往在冰上预冷RNase Free的反

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 应 管 加 入 以 下 试 剂 至 总 体 积  Polymerase) 。 | 20 μ l | （ 最 后 加 入 | E.coli Poly(A) |
| 试剂组分 |  | 体积 | 终浓度 |
| Total RNA\* |  | - | 可达 2 µg |
| E.coli Poly(A) Polymerase(5 U/µl) 10× Poly(A) Polymerase Buffer 5×rATP Solution  RNase-Free ddH2O |  | 0.4 µl 2 µl 4 µl  补水至 20 µl | 2 U  1×  1×  - |

（2）用移液器将上述配制的反应液轻轻混匀，短暂离心，并在37℃温度下反应60分钟。得到反应液可以进行下游实验，也可以在-20℃的温度下短暂保存。如需长期保存建议存放于-800C。

（3）将加Poly（A）修饰的miRNA进行逆转录反应：按照下表成分配制

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 反应液。 |  | |
| 试剂组分 |  | 体积 |
| Poly(A) 反应液 |  | 2 µl |
| 10×RT Primer |  | 2 µl |
| 10×RT Buffer |  | 2 µl |
| Super Pure dNTPs (2.5 mM each) |  | 1 µl |
| RNasin (40 U/µl) |  | 1 µl |
| Quant RTase |  | 0.5 µl |
| RNase-Free ddH2O  Total volume |  | 11.5 µl  20 µl |
|  | 37 |  |

### **1.2.5** 荧光定量**PCR**反应

荧光定量PCR反应按天根生化科技公司qPCR试剂盒miRcute miRNA qPCR Detection Kit(SYBR Green)说明书进行，以U6为内参。

（1）室温融化2×miRcute miRNA Premix和Reverse Primer。

（2）上下颠倒2×miRcute miRNA Premix，轻轻地均匀混合，注意要避免起泡，然后轻微离心后便可以使用。

（3）把试剂放置冰上，并按照下表配置反应体系：

组成成分50μl体系20μl体系终浓度

2×miRcute miRNA Premix（含SYBR，含

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| ROX） |  | | |
| Foward Primer （自备） | - | - | 200 nM |
| Reverse Primer (10μl) | 1μl | 0.4μl | 200 nM |
| miRNA 第一链 cDNA | - | - | - |
| ddH2O | 至 50μl | 至 20μl | - |

25μl 10μl 1×

（4）反应条件为：940C起始模板变性2min, 940C 25秒PCR循环中模板变性，600C 34s退火延伸，经历35-45个循环后检测溶解曲线，反应在

7500荧光PCR仪（ABI, USA）中进行。

（5）数据分析：CT值定义：每个反应的荧光信号达到设定的阀值时经历的循环数，每个样本设3个复孔，得到的Q值取平均值，每个样本的miRNA相对表达量通过2-△CT-计算，其中△CT=CT -CT

miRNA U6

### **1.2.6** 统计学分析

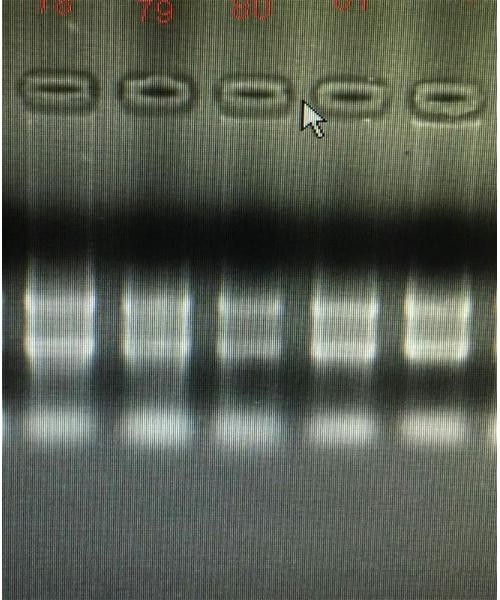
采用SPSS19.0统计软件进行数据分析。釆用非参数检验比较组织的荧光定量结果，采用单因素方差分析比较细胞qRT-PCR结果（2-△CT值）。

38

## **1.3** 实验结果

### **1.3.1** 组织中总的提取

提取组织中的总RNA，测定浓度和纯度，用1%琼脂糖凝胶电泳检测质量3条清晰的rRNA带：28s、18s和5s和说明RNA无降解，质量较好（图1）。

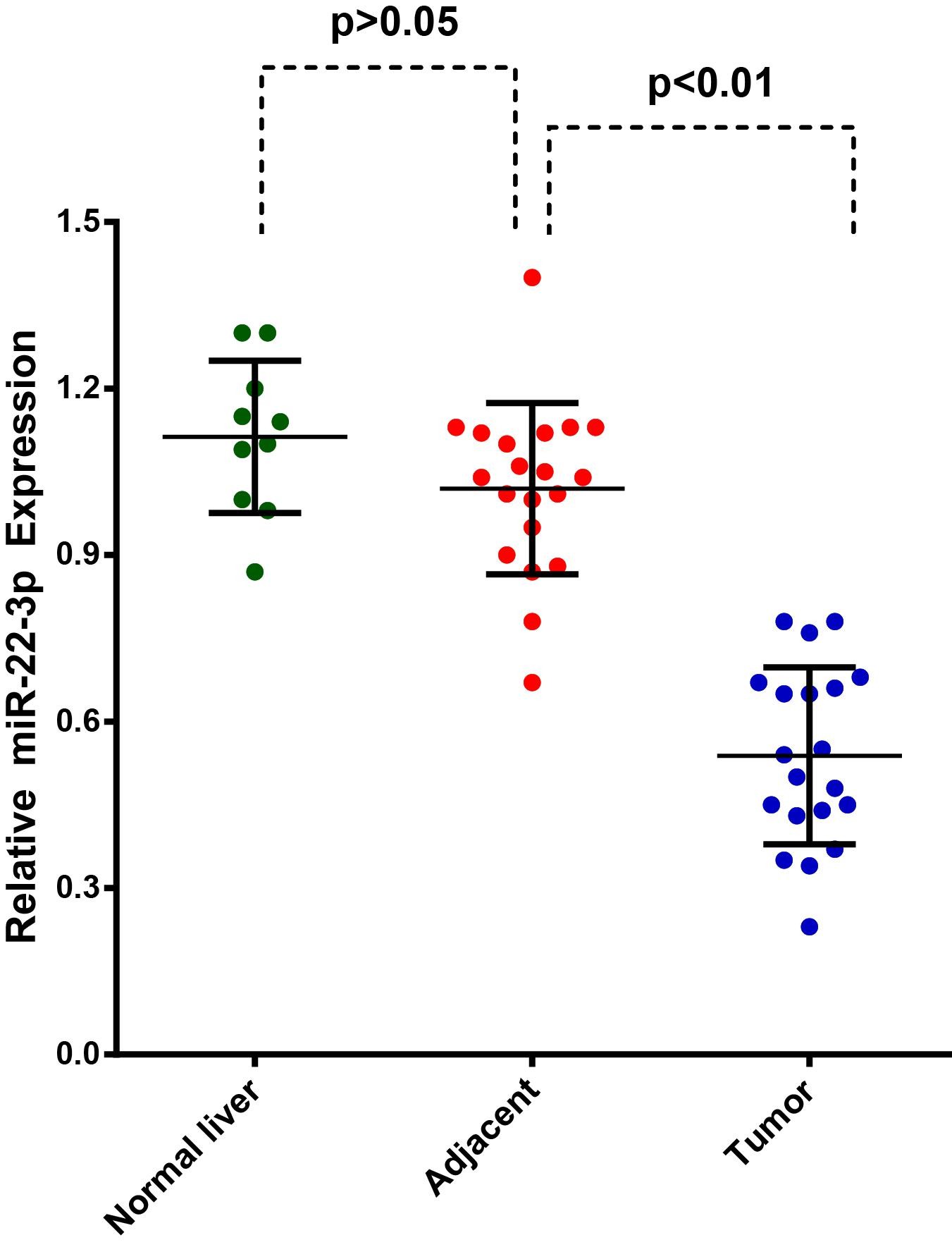


**图 1** **组织中提取总RNA凝胶电泳图**

### **1.3.2** 肝癌组织、癌旁组织及正常组织中**miR-22-3p**的表达情况

为我们用qRT-PCR检测了20例HCC及其对应癌旁组织，以及10例正常肝组织中miR-22-3p的表达情况，结果显示：（1）在HCC组织中，miR-22-3p的表达水平显著低于其相对应的癌旁组织（*P*<0.01）。虽然在癌旁组织中mir-22-3p的表达水平低于在正常肝组织中的表达，但是该差异没有统计学意义（*P*> 0.05, 图2）。

39



**图 2 mir-22-3p在肝癌、癌旁及正常组织中的表达（qRT-PCR）**

### **1.3.3** **qRT-PCR**检测**miR-22-3p**在五种细胞系中的表达情况

qRT-PCR结果发现：以正常细胞系HL-7702为对照，在四种肝癌细胞系中miR-22-3p的表达均低于在正常细胞系HL-7702中的表达（*P*<0.01, 图3）， 并且在HepG2肝癌细胞中表达最低。结果提示：miR-22-3p在肝癌中的低表达是中的一种很普遍的现象，miR-22-3p的低表达可能与肝癌的的发生发展相关。

40



**图 3 mir-22-3p在肝细胞癌细胞中的表达（qRT-PCR）**

## **1.4** 讨论

肝细胞癌（下文中简称肝癌或HCC）是全世界最常见且恶性程度比较高的肿瘤之一，其发病率在恶性肿瘤中排在第五位，其死亡率位排第三位

[1]. 肝癌的综合治疗手段有手术切除、肝动脉化疗栓塞术、肝移植、射频 消融治疗等[2]。手术治疗是肝癌治疗的首选方法。肝移植虽然可以获得较 满意的效果，但是，由于供体肝的缺乏，肝移植术的开展受到了很大限制。肝动脉化疗栓塞术及射频消融治疗等方法具有相对比较好的疗效，然而由 于肝癌起病隐匿，所以大部分患者诊断的时候已属晚期[3, 4]，只有 30％～

40％的患者可以接受根治性的治疗，而对于大部分进展期的肝癌患者不得

41

不接受姑息性的治疗。由于各种治疗手段的局限性、疾病本身的复发与转移、合并基础肝病的严重程度及治疗过程中的肝功衰竭等各个方面，仍然限制了各种治疗手段疗效的提高，与人们的预期存在较大差异，故迫切需要结合肝癌的发病机制研究，进一步研发新的治疗方法，目的为改善肝癌患者的预后和提高肝癌患者的生存质量。

Micro RNA（miRNA），是一组天然的非编码的小分子RNA，长度约为二十一到二十五个核苷酸，miRNA可特异性抑制或降解靶mRNA的翻译从而调节靶基因的表达。随着对miRNA的深入研究，其不仅参与了动植物的组织器官发育、细胞增殖、分化和凋亡、脂肪代谢、激素的分泌，而且广泛参与了肿瘤的发病机制。过去的研究[5]表明：和正常组织相比，miRNA在多种肿瘤组织中表达异常，并且这些miRNA影响着肿瘤的增殖和凋亡，说明这些miRNA可能扮演着致癌基因或者抑癌基因的角色。

大量研究已证实了miR-22在肺癌[6]、结肠癌[7]、胃癌[8]等人类肿瘤中表达下调。关于mir-22-3p在肝癌中的研究鲜有报导。因此，在本部分研究中，我们首先通过我们用qRT-PCR检测了20例HCC及其对应癌旁组织，以及10例正常肝组织中miR-22-3p的表达情况，结果显示：在HCC组织中，miR-22-3p的表达水平显著低于其相对应的癌旁组织（*P*<0.01）。虽然在癌旁组织中mir-22-3p的表达水平低于在正常肝组织中的表达，但是该差异没有统计学意义（*P*> 0.05）。其次，我们进一步用qRT-PCR检测miR-22-3p在五种细胞系中的表达情况，结果显示：以正常细胞系HL-7702为对照，在四种肝癌细胞系中miR-22-3p的表达均低于在正常细胞系HL-7702中的表达（*P*<0.01），并且在HepG2肝癌细胞中表达最低。结果提

42

示：miR-22-3p在肝癌中的低表达是中的一种很普遍的现象，miR-22-3p的低表达可能与肝癌的的发生发展相关。

综上所述，miR-22-3p在肝癌细胞中的表达下调是一种普遍现象，miR-22-3p将有可能作为一个预测因子用来判断肝癌患者的预后。关于在肝癌中的生物学功能及其相关机制，因此，在下一步的功能研究中将通过mimics-miRNA在人肝癌细胞株中上调miR-22-3p的表达，并通过MTT细胞增殖实验、细胞周期实验、划痕实验以及transwell侵袭实验来观察miR-22-3p对细胞增殖、凋亡及侵袭等生物学行为的影响，目的为进一步探讨miR-22-3p在肝癌发生发展过程中的机制。

## **1.5** 参考文献

1. Bosetti, Cristina, Federica Turati et al. Hepatocellular carcinoma epidemiology.

Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. 2014,28:753-770.

2. Lencioni R. Loco-regional treatment of hepatocellular carcinoma.

Hepatology.2010;52:762-773.

3. Siegel R, Miller K, Jemal A. Cancer statistics, 2015. CA: a cancer journal for clinicians.2015;65(1):5–29.

4. Torre LA, Bray F, Siegel R et al. Global cancer statistics, 2012. CA: a cancer journal for clinicians.2015;65(2):87-108.

5. Casalini P, Iorio M V．MicroRNAs and future therapeutic applications in

Cancer．J BUON, 2009, 14 (Suppl 1):S17－22．

6. Ling B, Wang G X, Long G, et al．Tumor suppressor miR-22 suppresses lung

43

Cancer cell progression through postthanscription regulation of ErbB3．J Cancer Res Clin Oncol, 2012, 138(8):1355－61．

7. Zhang G, Xia S, Tian H, et al．Clinical significance of miR-22 expression in patients with colorectal cancer．Med Oncol, 2012, 29( 5): 3108－12．8. Guo M M, Hu L H, Wang Y Q, et al. miR-22 is down-regulated in gastric cancer,

And its overexpression inhibits cell migration and invasion via targeting transcription factor Sp1. Medical oncology,2013,30(2):1-7.

44

# **2** **miR-22-3p**对肝癌体内外生物学特性的影响

在前一部分实验中，我们qRT-PCR技术在乙肝相关肝癌组织标本及五种细胞株中检测了miR-22-3p的表达情况，结果显示：miR-22-3p在肝癌组织的表达水平明显低于相应的肝癌旁组织以及正常的肝组织。而在四种肝癌细胞系中miR-22-3p的表达均低于在正常细胞系HL-7702中的表达。在这一部分实验中，我们将采用mimics-miR-22-3p转染至HepG2细胞系中，使miR-22-3p在HepG2细胞系中高表达，然后通过一些细胞功能实验观察高表达miR-22-3p对HepG2体外生物学行为的影响。为接下来进一步探讨其功和机制寻寻找理论依据。

## **2.1** **miR-22-3p**对肝癌体内外生物学特性的影响

### **2.1.1** 材料

#### **2.1.1.1** 细胞株

人肝癌细胞系HepG2购自于上海生命科学院细胞库，保存于实验室。

#### **2.1.1.2** 主要试剂

RPMI 1640培养基，胎牛血清，胰蛋白酶，TRNzol裂解液购买自

Invitrogen公司，miRcute miRNA qPCR Detection Kit(SYBR Green)购买于天根生化科技有限公司，miRcute miRNA First-Strand cDNA Synthesis

Kit购买于天根生化科技有限公司，DEPC处理水（100ml）购买自碧云天研究所，50-500 bp DNA Marker购买自Takara公司，逆转录试剂盒购买自

Takara公司，组织RNA保护液购买于天根生化科技有限公司，引物见附录1，mimics-miR-22-3p及其对应NC来源于锐博生物公司，MTT细胞计数试

45

### 剂盒购买于日本同仁。

**2.1.1.3主要仪器和设备**

**主要仪器**公司

SS-325 高压灭菌消毒锅 TOMY（日本）

数字pH计Mettler-Toledo公司（瑞士）

5810R高速冷冻离心机eppenndorf公司（德国）

常温低速离心机湘仪公司

高速磁力搅拌机Mettler-Toledo公司（瑞士）

可换膜过滤器、47 毫米直径 默克密理博公司（美国）

针头式滤器Coming公司（美国）

电子分析天平Mettler-Toledo公司（瑞士）

-80℃超低温冰箱日本SANYO

恒温水浴箱上海安亭仪器厂

高压灭菌指示带中西泰安技术服务中心

millipore超纯水机默克密理博公司（美国）

封口膜Polisciences Inc公司（美国）

玻璃巴氏滴管康宁公司（美国）

显微器械艾瑞医疗器械公司

解剖显微镜贝朗医疗器械公司

制冰机SCOTSMAN, 美国

日立7100型全自动生化分析仪日立、日本

7500 荧光 PCR 仪 ABI、美国

96孔PCR板（带条形码）ABI公司（美国）。

PCR板热封膜ABI公司（美国）

高速组织电动研磨器天根（北京）

电泳仪电源和电泳槽伯乐公司（美国）

凝胶成像分析系统伯乐公司（美国）

微波炉广东格兰仕家电集团

高压灭菌消毒锅博讯

**2.1.2方法**

**2.1.2.1细胞培养**

人肝癌细胞系HepG2在含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中培养，放置在370C和含5%CO饱和湿度的培养箱中培养传代，隔三天换一次液，等到

2

46

细胞长满的时候，用0.25%胰酶消化，以1: 3的比例进行传代培养。

**2.1.2.2细胞转染**

miR-22-3p基因过表达采用化学合成的mimics。等到细胞生长状好时，铺24孔板：接种1×105至5×105个细胞到含有一定量完全培养基的24孔板培养孔中，使转染时的细胞密度能够达到30~50%. mimics-miRNA转染时浓度为50nM。

转染步骤：

a.稀释mimic: 用30μl 1X riboFECTTM CP Buffer稀释1.25μl 20μM miRNA mimic，轻轻混匀。

b.混合液制备：加入3μl riboFECTTM CP Reagent，轻轻吹打混匀，室温孵育0～15min。

c.把 riboFECTTM CP 混合液添加到细胞培养基中并轻轻混匀。d.把培养板放置在37℃温度条件下的的CO2培养箱中，培养24到96

个小时。

24孔，浓度为100或50nm剂量配置如下表：

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 终浓度 | 每孔体积 | 培养基 | Buffer | siRNA | Reagent |
| 24-well | 100nm | 500μl | 464.50μl | 30μl | 2.5μl | 3μl |
|  | 50nm | 500μl | 465.75μl | 30μl | 1.25μl | 3μl |

**2.1.2.3细胞总RNA的提取**

（1）观察到细胞生长良好时，把培养基吸除掉并用PBS液洗涤细胞，然后把PBS液吸除掉，往细胞里添加含0.1-0.25%胰蛋白酶的PBS液，待细胞脱离容器壁，添加含有血清的培养基失活胰蛋白酶，把细胞溶液转移到RNase-Free的离心管中，300×g离心5分钟然后收集细胞沉淀，吸除所有

47

的上清液。

（2）在15-300C的温度下放5分钟，使完全分离核酸蛋白复合物。

（3）40C 12,000 rpm(~13,400×g)离心10 min，取上清。

（4）每使用1 ml TRNzol，均需要加入0.2 ml氯仿，然后将管盖盖好，振荡15 sec，在室温下放置3分钟。

（5）40C 12,000 rpm(~13,400×g)离心10-15 min，样品会分成三层：黄色的是有机相，而中层和上层均是无色的水相，而RNA主要在水相中，把约600μl的水相转移到新的离心管。

（6）得到的水相溶液后，往里加入等体积的异丙醇并混匀，然后在室温条件下放置20-30分钟。

（7）40C 12,000 rpm(~13,400×g)离心10 min，去上清。在离心之前，通常看不见RNA沉淀，而在离心后，RNA沉淀会在管侧和管底形成胶状沉淀。

（8）加入1 ml 75%乙醇(RNase-Free ddH2O配置)洗涤沉淀。每使用1 ml TRNzol，至少需要用1 ml 75%乙醇洗涤RNA沉淀进。

（9）40C 5,000 rpm(~2,300×g)离心3 min。把液体倒出，注意：不要把沉淀倒出，短暂离心剩余的少量液体并用枪头吸出，不能吸到沉淀。

（10）在室温条件下晾干，并加入30-100μl RNase-Free ddH2O，反复吹打和混匀，目的为把RNA充分溶解。

**2.1.2.4逆转录反应合成cDNA**

（1）miRNA 3'端行加Poly (A)处理：往在冰上预冷RNase Free的反应管加入以下试剂至总体积20μl (最后加入E. coli Poly(A)

Polymerase) 。

48

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 试剂组分 | 体积 | 终浓度 |
| Total RNA\* | - | 可达 2 µg |
| E.coli Poly(A) Polymerase(5 U/µl) | 0.4 µl | 2 U |
| 10× Poly(A) Polymerase Buffer | 2 µl | 1× |
| 5×rATP Solution | 4 µl | 1× |
| RNase-Free ddH2O | 补水至 20 µl | - |

（2）用移液器将上述配制的反应液轻轻混匀，短暂离心，并在37℃温度下反应60分钟。得到反应液可以进行下游实验，也可以在-20℃的温度下短暂保存。如需长期保存建议存放于-800C。

（3）将加Poly（A）修饰的miRNA进行逆转录反应：按照下表成分配制反应液。

试剂组分 体积

Poly(A) 反应液 2 µl

10×RT Primer 2 µl

10×RT Buffer 2 µl

Super Pure dNTPs (2.5 mM each) 1µl

RNasin (40 U/µl) 1 µl

Quant RTase 0.5µl

RNase-Free ddH2O 11.5µl

Total volume 20µl

**2.1.2.5荧光定量PCR反应**

荧光定量PCR反应按天根生化科技公司qPCR试剂盒miRcute miRNA qPCR Detection Kit(SYBR Green)说明书进行，以U6为内参。

（1）室温融化2×miRcute miRNA Premix和Reverse Primer。

（2）上下颠倒2×miRcute miRNA Premix，轻轻地均匀混合，注意要避免起泡，然后轻微离心后便可以使用。

（3）把试剂放置冰上，并按照下表配置反应体系：

49

组成成分50μl体系20μl体系终浓度

2×miRcute miRNA Premix （含SYBR，含

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| ROX） |  | | |
| Foward Primer （自备） | - | - | 200 nM |
| Reverse Primer (10μl) | 1μl | 0.4μl | 200 nM |
| miRNA 第一链 cDNA | - | - | - |
| ddH2O | 至 50μl | 至 20μl | - |

25μl 10μl 1×

（4）反应条件为：940C起始模板变性2min, 940C 25秒PCR循环中模板变性，600C 34s退火延伸，经历35-45个循环后检测溶解曲线，反应在

7500荧光PCR仪（ABI, USA）中进行。

（5）数据分析：CT值定义：每个反应的荧光信号达到设定的阀值时经历的循环数，每个样本设3个复孔，得到的Q值取平均值，每个样本的miRNA相对表达量通过2-△CT-计算，其中△CT=CT -CT

miRNA U6。

**2.1.2.6 MTT法检测细胞生长**

荧光显微镜下确认mimics-miR-22-3p、mimics-NC转染成功后，在37℃温度条件下，用5%CO2培养箱中培养细胞2天。然后取一块96孔板并在每个孔添加20ulMTT溶液，继续孵育4小时后停止止培养，吸取每个孔内的培养上清液并在每个孔内添加150ulDMSO，脱色摇床震荡10分钟以使结晶物充分溶解掉。，在酶联免疫监测仪上，设定选择490nm波长，测定每个孔的光吸收值并记录结果。每一个组的3个孔均取平均值，连续监测0小时，12小时，24小时及48小时的生长情况，并以时间为横坐标，抑制率为纵坐标来绘制细胞生长曲线。

**2.1.2.7细胞周期检测**

以每个孔5X105个HepG2细胞接种于6孔板中，然后培养过夜，在更换培养基后转染mimics-miR-22-3p及mimics-NC，每组设3个复孔。转染

50

mimics-miR-22-3p及mimics-NC 48小时后后收集细胞并用预冷的PBS洗涤细胞1次，然后设定1200RPM离心5min，用预冷的PBS重悬，逐滴将细胞悬液加入预冷的70%乙醇中，置于4OC固定过夜。去除乙醇后用PBS洗涤2次并加入100μl RNase A, 37OC水浴30分钟，接着添加400μl PI染色并混匀，4OC避光30min，最后用Beckman coulter Epics XL流式细胞仪检测细胞周期。实验重复3次。

**2.1.2.8划痕实验检测miR-22-3p对HepG2细胞迁移能力的影响**

1.用直尺用记号笔在6孔板背后均匀画线，每相隔0.5cm画一条线，横穿过孔；

2.将计数细胞消化后用完全培养基将细胞重悬，在六孔板中的每一个孔添加大约约5×105个细胞；

3.第二天，依靠直尺，垂直于背后所画横线用枪头划痕；

4.用PBS液清洗细胞目的为去除划下的漂浮细胞并添加含0.2% BSA的培养基；

5.放入37℃5%CO2培养箱，培养24h后取样，拍照。

**2.1.2.9 Transwell侵袭实验检测miR-22-3p对HepG2细胞侵袭能力的影响**

1.铺板：在上室中加入40ul人工基底膜（该人工基底膜由matrigel和无血清培养液混合），在 37℃温度条件下孵育过夜目的使其呈凝胶；

2.接种细胞：消化计数细胞，添加含0.2% BSA的DMEM培养基将细胞重悬，把细胞浓度调整为1×106/ml；取100µl细胞悬液添加到Transwell上室并在下室中添加600µl条件培养基培养24小时；

3.固定、染色：取出transwell小室并吸取上室中的培养液，用PBS液清

51

### 洗1次，然后用棉签轻轻擦除上室中的matrigel基质胶和残留细胞，然后再用

PBS液清洗两次再用4%多聚甲醛固定30min；将甲醛吸取掉后再用PBS液清洗两次，用0.1%结晶紫染色20分钟后再用ddH2O清洗三次以上，等待其自然风干；

4.镜下观察并计数：在显微镜镜下随机选3个视野拍照，然后行计数细胞。

#### 2.1.2.9 统计学分析

采用SPSS19.0统计软件进行数据分析。采用单因素方差分析qRT-PCR结果（2-△CT值）。采用单因素方差分析比较MTT实验、细胞周期实验、划痕实验以及transwell侵袭实验的结果。

### **2.1.3** 实验结果

#### **2.1.3.1** 转染效率的验证

将miR-22-3p mimics及NC及NC转染到HepG2细胞中，并通过qRT-PCR检测其转染效率。结果如图4所示。转染mimics-miR-22-3p后miR-22-3p表达水平明显上调（*P*<0.001）。



**图 4** mimics-miR-22-3p**的转染效率**

52

#### **2.1.3.2** **MTT**法检测细胞生长

采用MTT法检测转染mimics-miR-22-3p及其NC后的HepG2细胞，检测HepG2细胞的体外增殖能力，然后绘制细胞抑制曲线。结果显示mimics-miR-22-3p组细胞的增殖能力明显受到抑制（*P*<0.05, 图5）。结果提示：过表达miR-22-3p能抑制肝癌细胞的体外增殖能力。



**图 5** **过表达miR-22-3p能抑制肝癌细胞的体外增殖能力**

#### **2.1.3.3** **mimics-miR-22-3p**对**HepG2**细胞周期的影响

将转染mimics-miR-22-3p及对应NC组细胞进行流式细胞术检测肝癌细胞周期。结果显示：与NC组（图6A）及空白对照组（图6B）相比，mimics-miR-22-3p组（图6C）细胞G2期的细胞含量百分比明显增加

（mimics-miR-22-3p组vs. NC组/空白对照组, *P*<0.05）,说明miR-22-3p可能使肝癌细胞在G2期受到了阻滞。同时，我们没有检测到过表达miR-22-3p后肝癌细胞的调亡有明显改变（mimics-miR-22-3p组vs. NC组/空白对照组, *P*> 0.05），因此我们推测miR-22-3p主耍通过诱导细胞周期阻滞在G2期，从而抑制细胞的生长。

53



**图 6** **流式细胞仪检测Mimics-miR-22-3p组HepG2细胞株细胞周期情况**

#### **2.1.3.4** 细胞划痕迁移实验

Mimics-miR-22-3p转染HepG2细胞后划痕，在0h和24h拍照，结果显示：，mimics-miR-22-3p转染组细胞的迁移能力（24h划痕宽度/0h划痕宽度：mimics-miR-22-3p组：0.711±0.032，Mimics-NC组：0.327±0.029，空白对照组：0.294±0.041）与mimics-NC组和空白对照组相比有明显差

54

异（*P*<0.05），过表达miR-22-3p后HepG2的细胞迁移能力有明显的减弱

（图7）。可见，上调miR-22-3p后对细胞迁移能力有明显抑制作用。



**图 7** **细胞划痕检测转染后细胞的迁移能力的变化。**

#### **2.1.3.5** **Transwell**侵袭实验

Transwell侵袭实验结果显示：Mimics-miR-22-3p转染组细胞的穿膜细胞数明显少于mimics-NC组和空白对照组, Mimics-miR-22-3p感染HepG2胞后，Mimics-NC组透膜细胞数为（129.2±5.5）/视野，空白对照组透膜细胞数为（119.6±4.4）/视野，Mimics-miR-22-3p 组透膜细胞数为（69.7

±6.7）/视野，Mimics-miR-22-3p转染组细胞侵袭能力明显低于mimics-NC组和空白对照组细胞（*P<*0.05, 图8）。结果提示：过表达miR-22-3p可明显抑制HepG2细胞体外侵袭能力。



**图 8** **Transwell侵袭检测转染后细胞的侵袭能力的变化。**

55

## **2.2** **miR-22-3p**对肝癌体内生物学特性的影响

在上一节的实验中我们我们在细胞水平的研究结果显示miR-22-3p能显著抑制人肝癌细胞的增殖。那么，在在体内复杂的环境中，miR-22-3p对肿瘤形成有怎样的影响呢？为此，在本部分研究中我们采用miRNA

antagomir转染HepG2细胞，使用经典的肿瘤异体异位动物模型-鼠皮下移植瘤模型来观察稳转及的细胞在体内形成肿瘤的情况。

### **2.2.1** 材料

#### **2.2.1.1** 细胞株

人肝癌细胞系HepG2购自于上海生命科学院细胞库并保存于实验室，实验动物：体重18-22 g的SPF级昆明种小鼠，购买于广西医科大学实验动物中心，实验动物的生产许可证：SCXK(桂) 2009-0002。

#### **2.2.1.2** 主要试剂

RPMI 1640培养基，胎牛血清，胰蛋白酶，TRNzol裂解液购买自

Invitrogen公司，miRcute miRNA qPCR Detection Kit(SYBR Green)购买于天根生化科技有限公司，miRcute miRNA First-Strand cDNA Synthesis

Kit购买于天根生化科技有限公司，DEPC处理水（100ml）购买自碧云天研究所，50-500 bp DNA Marker购买自Takara公司，逆转录试剂盒购买自

Takara公司，组织RNA保护液购买自天根生化科技有限公司合成，引物见附录1，miRNA antagomir购买于锐博生物公司。

56

#### **2.2.1.3** 主要仪器

**主要仪器**公司

SS-325高压灭菌消毒锅TOMY（日本）

数字pH计Mettler-Toledo公司（瑞士）

5810R高速冷冻离心机eppenndorf公司（德国）

常温低速离心机湘仪公司

高速磁力搅拌机Mettler-Toledo公司（瑞士）

可换膜过滤器、47毫米直径默克密理博公司（美国）

针头式滤器Coming公司（美国）

电子分析天平Mettler-Toledo公司（瑞士）

-80℃超低温冰箱日本SANYO

恒温水浴箱上海安亭仪器厂

高压灭菌指示带中西泰安技术服务中心

millipore超纯水机默克密理博公司（美国）

封口膜Polisciences Inc公司（美国）

玻璃巴氏滴管康宁公司（美国）

显微器械艾瑞医疗器械公司

解剖显微镜贝朗医疗器械公司

制冰机SCOTSMAN, 美国

日立7100型全自动生化分析仪日立、日本

7500荧光PCR仪ABI、美国

96孔PCR板（带条形码）ABI公司（美国）。

PCR板热封膜ABI公司（美国）

高速组织电动研磨器天根（北京）

电泳仪电源和电泳槽伯乐公司（美国）

凝胶成像分析系统伯乐公司（美国）

微波炉广东格兰仕家电集团

高压灭菌消毒锅博讯

血糖试剂盒Accu-check Performa（德国罗氏公司）

肌酐试剂盒-氧化酶法上海执诚科技有限公司

尿素试剂盒-脲酶连续检测法上海执诚科技有限公司

### **2.2.2** 方法

#### **2.2.2.1** 细胞培养

人肝癌细胞系HepG2在含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中培养，放置在370C和含5%CO饱和湿度的培养箱中培养传代，隔三天换一次液，等到

2

57

细胞长满的时候，用0.25%胰酶消化，以1: 3的比例进行传代培养。

#### **2.2.2.2** **antagomirago-miRNA**细胞转染

miR-22-3p基因过表达采用化学合成的antagomirago。等到细胞生长状好时，铺24孔板：接种1×105至5×105个细胞到含有一定量完全培养基的24孔板培养孔中，使转染时的细胞密度能够达到30~50%. Antagomirago-miRNA转染时浓度为50nM。

转染步骤：

a.稀释antagomirago: 用30μl 1X riboFECTTM CP Buffer稀释1.25μl 20μM miRNA antagomirago，轻轻混匀。

b.混合液制备：加入3μl riboFECTTM CP Reagent，轻轻吹打混匀，室温孵育0～15min。

c. 把riboFECTTM CP混合液添加到细胞培养基中并轻轻混匀。

d. 把培养板放置在37℃温度条件下的的CO2培养箱中，培养24到96个小时。

24孔，浓度为100或50nm剂量配置如下表：

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 终浓度 | 每孔体积 | 培养基 | Buffer | siRNA | Reagent |
| 24-well | 100nm | 500μl | 464.50μl | 30μl | 2.5μl | 3μl |
|  | 50nm | 500μl | 465.75μl | 30μl | 1.25μl | 3μl |

#### **2.2.2.3** 细胞总**RNA**的提取

（1）观察到细胞生长良好时，把培养基吸除掉并用PBS液洗涤细胞，然后把PBS液吸除掉，往细胞里添加含0.1-0.25%胰蛋白酶的PBS液，待细胞脱离容器壁，添加含有血清的培养基失活胰蛋白酶，把细胞溶液转移到RNase-Free的离心管中，300×g离心5分钟然后收集细胞沉淀，吸除所有

58

的上清液。

（2）在15-300C的温度下放5分钟，使完全分离核酸蛋白复合物。

（3）40C 12,000 rpm(~13,400×g)离心10 min，取上清。

（4）每使用1 ml TRNzol，均需要加入0.2 ml氯仿，然后将管盖盖好，振荡15 sec，在室温下放置3分钟。

（5）40C 12,000 rpm(~13,400×g)离心10-15 min，样品会分成三层：黄色的是有机相，而中层和上层均是无色的水相，而RNA主要在水相中，把约600μl的水相转移到新的离心管。

（6）得到的水相溶液后，往里加入等体积的异丙醇并混匀，然后在室温条件下放置20-30分钟。

（7）40C 12,000 rpm(~13,400×g)离心10 min，去上清。在离心之前，通常看不见RNA沉淀，而在离心后，RNA沉淀会在管侧和管底形成胶状沉淀。

（8）加入1 ml 75%乙醇(RNase-Free ddH2O配置)洗涤沉淀。每使用1 ml TRNzol，至少需要用1 ml 75%乙醇洗涤RNA沉淀进。

（9）40C 5,000 rpm(~2,300×g)离心3 min。把液体倒出，注意：不要把沉淀倒出，短暂离心剩余的少量液体并用枪头吸出，不能吸到沉淀。

（10）在室温条件下晾干，并加入30-100μl RNase-Free ddH2O，反复吹打和混匀，目的为把RNA充分溶解。

#### **2.2.2.4** 逆转录反应合成**cDNA**

（1）miRNA 3'端行加Poly (A)处理：往在冰上预冷RNase Free的反应管加入以下试剂至总体积20μl (最后加入E. coli Poly(A)

Polymerase) 。

59

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 试剂组分 | 体积 | 终浓度 |
| Total RNA\* | - | 可达 2 µg |
| E.coli Poly(A) Polymerase(5 U/µl) | 0.4 µl | 2 U |
| 10× Poly(A) Polymerase Buffer | 2 µl | 1× |
| 5×rATP Solution | 4 µl | 1× |
| RNase-Free ddH2O | 补水至 20 µl | - |

（2）用移液器将上述配制的反应液轻轻混匀，短暂离心，并在37℃温度下反应60分钟。得到反应液可以进行下游实验，也可以在-20℃的温度下短暂保存。如需长期保存建议存放于-800C。

（3）将加Poly（A）修饰的miRNA进行逆转录反应：按照下表成分配制反应液。

试剂组分 体积

Poly(A) 反应液 2 µl

10×RT Primer 2 µl

10×RT Buffer 2 µl

Super Pure dNTPs (2.5 mM each) 1µl

RNasin (40 U/µl) 1 µl

Quant RTase 0.5µl

RNase-Free ddH2O 11.5µl

Total volume 20 µl

#### **2.2.2.5** 荧光定量**PCR**反应检测转染效率

荧光定量PCR反应按天根生化科技公司qPCR试剂盒miRcute miRNA qPCR Detection Kit(SYBR Green)说明书进行，以U6为内参。

（1）室温融化2×miRcute miRNA Premix和Reverse Primer。

（2）上下颠倒2×miRcute miRNA Premix，轻轻地均匀混合，注意要避免起泡，然后轻微离心后便可以使用。

（3）把试剂放置冰上，并按照下表配置反应体系：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **组成成分** **50μl 体系** | **20μl 体系** | **终浓度** |
| 2×miRcute miRNA Premix （含 SYBR，含  ROX） 25μl | 10μl | 1× |
| Foward Primer （自备） - | - | 200 nM |

60

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **组成成分** | **50μl 体系** | **20μl 体系** | **终浓度** |
| Reverse Primer (10μl) | 1μl | 0.4μl | 200 nM |
| miRNA 第一链 cDNA | - | - | - |
| ddH2O | 至 50μl | 至 20μl | - |

（4）反应条件为：940C起始模板变性2min, 940C 25秒PCR循环中模板变性，600C 34s退火延伸，经历35-45个循环后检测溶解曲线，反应在

7500荧光PCR仪（ABI, USA）中进行。

（5）数据分析：CT值定义：每个反应的荧光信号达到设定的阀值时经历的循环数，每个样本设3个复孔，得到的Q值取平均值，每个样本的miRNA相对表达量通过2-△CT-计算，其中△CT=CT -CT

miRNA U6。

#### **2.2.2.6** 裸鼠成瘤实验

用胰酶消化HepG2细胞，制成单细胞悬液，在无血清的培养基清洗3遍后行细胞计数。antagomirago-miR-22-3p和antagomirago-NC分别转染

HepG2细胞，浓度为10nmol,孵育两天后。取4-6周龄雄性BALB/C裸鼠24只，分为antagomirago-miR-22-3p组和antagomirago-NC组，每组8只，分别将antagomiragomir-miR-22-3p以及antagomirago-NC组细胞分别注射到裸鼠右上侧皮下，在接种第5天后开始观察到肉眼皮下肿瘤的形成并开始绘制皮下肿瘤生长曲线。

#### **2.2.2.7** 统计学分析

所有统计学分析均使用SPSS 19.0来完成。连续性变量用单因素方差分析做比较检验。若组间方差齐性检验有差异，将根据情况在 Mann-Whitney

U和Kruskal-Wallis H这两种非参数检验方法中选择。

### **2.2.3** 结果

#### **2.2.3.1** **qRT-PCR**反应检测转染效率

61

如图9所示，antagomiragomir-miR-22-3p转染细胞组中miR-22-3p表达明显高于antagomiragomir-NC转染组(*P* <0.001)。



**图 9** antagomiragomir-miR-22-3p**转染细胞组及antagomiragomir-NC转染组miR-22-3p的表达**

#### **2.2.3.2** 裸鼠皮下成瘤

裸鼠成瘤的统计结果如图10所示，antagomiragomir-miR-22-3p转染细胞注射组的裸鼠成瘤能力较antagomirago-NC组显著减弱（*P*<0.05）。



**图 10** **裸鼠成瘤的结果**

62

## **2.3** 讨论

最近越来越多的研究提示：miRNA在正常组织与肿瘤组织中的表达存在着差异，这包括了许多常见的肿瘤，例如鼻咽癌、直肠癌，结肠癌、肺癌、乳腺癌等。黄秀芳等人的研究包括了8例乳腺癌及其癌旁组织标本，他们对比了癌组织与癌旁组织关于miRNA表达差异，结果发现有16种miRNA的表达异常与乳癌的发生发展非常相关[1]。曾婷等人的研究在56例诊断为原发性非小细胞肺癌组织和癌旁组织中检测了miRNA-34a和c-myc mRNA的的表达量，结果发现miRNA-34a在癌组织中的表达显著低于在癌旁组织中的表达，并且，随着miRNA-34a表达量的逐渐增加，c-myc mRNA的表达逐渐下降；miRNA-34a在癌组织中的表达显著低于在癌旁组织中的表达，癌组织c-myc的表达显著高于在癌旁组织中的表达，而且两者的关系正好相反，提示miRNA-34a的靶基因可能是c-myc[2]。对于miRNA与肝癌的关系又如何呢？最近同样也有大量研究表明miRNA在肝癌的进展中起着重要的作用，并参与了肝癌细胞的分化、凋亡、侵袭等过程。在黄晓卉等人的研 究中，他们使用液相芯片技术结合real-time RT-PCR分析了36例肝癌患者，结果发现：肝癌恶性程度、肿瘤分化程度、是否有肝内和肝外转移及是否有门静脉癌栓等因素与miRNA-338-3p表达下调程度密切相关，提示miRNA-338-3p可作为肝癌诊断的生物学标记[3]。Li等人的研究分析了120例HCC患者血清miRNA表达谱，在研究中他们用表达异常的miRNA-375来诊断肝癌，结果发现诊断的特异度达96%，敏感度达100%[4]。在Gui等人的研究中，他们利用miRNA芯片检测肝癌患者血循环中miRNA的表达情况时发现表达明显上调miRNA-885可以作为肝癌发生的标志物[5]。随着

63

研究的深入，更多研究把重点放在了筛选miRNA的靶基因上。近期的一项实验研究的结果表明：miRNA-22在乙肝相关肝癌中的表达明显低于其在癌旁与正常组织中的表达[6]。这又从组织实验的角度证实了miRNA-22和肝癌的恶性行为程度呈逆向变化。然而，miR-22-3p在肝癌中的具体作用机制仍是未知的。因为miRNA的是可以同时对人体的多个基因位点进行调节，而动物的miRNA和mRNA之间的互补程度又较低，这样就会对动物的靶基因预测增加假阳性出现的可能性，从而导致研究其作用方式较困难。因此， 只有找到它在肝癌细胞中所调控的基因位点才能进一步推测它在肿瘤的发 生、发展中所起到的作用过程。

越来越多的证据提示：miR-22的表达异常在不同的肿瘤进展过程中起着重要作用。然而miR-22-3p在肝癌中的确切作用仍不明确。我们的实验结果表明了，miR-22-3p对于肝癌细胞有显著的抑制作用。我们先对HepG2细胞进行mimics-miR-22-3p的转染，通过qRT-PCR验证了转染效果。在对mimics-miR-22-3p以及对应NC组细胞进行的MTT实验中mimics-miR-22-3p组细胞的增殖能力明显较mimics-NC组受到抑制。在划痕实验中，我们发现mimics-miR-22-3p转染组细胞的迁移能力与mimics-NC组和空白对照组相比有明显差异，过表达miR-22-3p后HepG2的细胞迁移能力有明显的减弱。我们通过将转染mimics-miR-22-3p及对应NC组细胞进行流式细胞术检测肝癌细胞周期。结果显示，NC组及未处理组相比，mimics-miR-22-3p组细胞G2期的细胞含量百分比明显增加，说明miR-22-3p可能使肝癌细胞在G2期受到了阻滞。同时，我们没有检测到过表达miR-22-3p后肝癌细胞的调亡有明显改变，因此我们推测miR-22-3p主耍通过诱导细胞周期阻滞在G2期，从而抑制肿瘤细胞的生长；而且我们没有检测到过表达miR-22-3p

64

后肝癌细胞的调亡有明显改变。同样在裸鼠皮下成瘤的统计结果显示antagomiragomir-miR-22-3转染细胞注射组的裸鼠成瘤能力较antagomirago-NC组和空白对照组显著增高。以上的研究表明：miR-22-3p对于肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭有均明显的抑制作用。

综上所述，我们发现过表达miR-22-3p能够降低肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力，提示着miR-22-3p可能在未来对肝癌发生发展过程中的控制发挥着重要的作用。

## **2.4** 参考文献

1. 黄秀芳，邵建永.乳腺癌差异表达的microRNA的筛选研究.中ft大学报，2009, 30:69-77.

2. 曾婷，马丽，郝丽，等. miRNA-34a与非小细胞肺癌的关系及其可能调节机制[J].中国医药导报，2012，9:5-7.

3. 黄晓卉，陈连周，苏乔，等．miR-338-3p在肝癌组织中的表达及意义．中华普通外科学文献，2011, 5[2012-03-10]．

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

5. Gui J, Tian Y, Wen X, et al．Serum miRNA characterization identifies miRNA- 885- 5p as a potential marker for detecting liver pathologies．Clin Sci(Lond), 2011, 120: 183-193．

6. Shi C, Xu X. MicroRNA-22 is down-regulated in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. Biomedicine& Pharmacotherapy. 2013;67:375-80.

65

# **3** **miR-22-3p**靶基因的预测及鉴定

在前一部分实验中，我们从细胞水平上观察到miR-22-3p可抑制肝癌细胞的生长及转移。但其具体的发挥调控的具体机制仍不明确。而miRNA的功能是通过调控其靶基因而实现的。因此我们推测miR-22-3p在其功能行使的过程中可能靶向调控了一些肿瘤发生及转移相关基因，因此我们釆用生物信息学的方法预测和寻找miR-22-3p调控的肿瘤相关基因，并利用Western Blot检测miR-22-3p对其靶基因蛋白表达的影响，筛选出其可能的靶基因，并通过沉默其可能靶基因反向验证作用方向为明确它们之间的相互关系。为探讨及的调控机制奠定理论基础。

## 3.1 靶基因的预测及初步鉴定

### **3.1.1** 材料与方法

#### **3.1.1.1** 程序和数据库

##### （**1**）获得**miR-22-3p**的基本信息数据库

miR-Base数据[库：http: //www. mirbase. org/index. shtml](http://www.mirbase.org/index.shtml)

##### （**2**）靶基因预测数据库

**TargetScan:** [http: //www. targetscan. org/](http://www.targetscan.org/) **Pictar:** [http: //pictar. mdc-berlin. de/](http://pictar.mdc-berlin.de/)

**MicroRNA:** [http: //www. microrna. org/microrna/home. do](http://www.microrna.org/microrna/home.do)

#### **3.1.1.2** 细胞株

人肝癌细胞系HepG2购买自上海生命科学院细胞库并保存于实验室**。**

#### **3.1.1.3** 主要试剂

66

siRNA储存液，riboFECTTM CP Reagent, riboFECTTM CP Buffer，细胞培养基，mimics-mir-22-3p, mimics-NC， Inhibitor-mir-22-3p, Inhibitor-NC均购自锐博生物公司。miRcute miRNA qPCR Detection Kit(SYBR Green)购买于天根生化科技有限公司，miRcute miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit购买于天根生化科技有限公司，引物见附录1.

#### **3.1.1.4** 主要仪器

**主要仪器**公司

SS-325高压灭菌消毒锅TOMY（日本）

数字pH计Mettler-Toledo公司（瑞士）

5810R高速冷冻离心机eppenndorf公司（德国）

常温低速离心机湘仪公司

高速磁力搅拌机Mettler-Toledo公司（瑞士）

可换膜过滤器、47毫米直径默克密理博公司（美国）

针头式滤器Coming公司（美国）

电子分析天平Mettler-Toledo公司（瑞士）

-80℃超低温冰箱日本SANYO

恒温水浴箱上海安亭仪器厂

高压灭菌指示带中西泰安技术服务中心

millipore超纯水机默克密理博公司（美国）

封口膜Polisciences Inc公司（美国）

玻璃巴氏滴管康宁公司（美国）

显微器械艾瑞医疗器械公司

解剖显微镜贝朗医疗器械公司

制冰机SCOTSMAN, 美国

日立7100型全自动生化分析仪日立、日本

7500荧光PCR仪ABI、美国

96孔PCR板（带条形码）ABI公司（美国）。

PCR板热封膜ABI公司（美国）

高速组织电动研磨器天根（北京）

电泳仪电源和电泳槽伯乐公司（美国）

凝胶成像分析系统伯乐公司（美国）

微波炉广东格兰仕家电集团

高压灭菌消毒锅博讯

67

#### **3.1.1.5** 细胞培养

人肝癌细胞系HepG2在含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中培养，放置在370C和含5%CO饱和湿度的培养箱中培养传代，隔三天换一次液，等到细胞长满的时候，用0.25%胰酶消化，以1: 3的比例进行传代培养。

2

#### **3.1.1.6** **mimics-miRNA**及**Inhibitor-miRNA**细胞转染

miR-22-3p基因过表达采用化学合成的mimics. miR-22-3p基因抑制采用化学修饰的inhibitor。等到细胞生长状好时，铺24孔板：接种1×105

至5×105个细胞到含有一定量完全培养基的24孔板培养孔中，使转染时的细胞密度能够达到30~50%. miRNA mimic转染时浓度为50nM, miRNA

inhibitor转染时浓度为100nM。转染步骤：

a.稀释mimic/inhibitor: 用30μl 1X riboFECTTM CP Buffer稀释1.25μl (inhibitor为2.5μl) 20μM miRNA mimic，轻轻混匀。

b.混合液制备：加入3μl riboFECTTM CP Reagent，轻轻吹打混匀，室温孵育0～15min。

c. 把riboFECTTM CP混合液添加到细胞培养基中并轻轻混匀。

d. 把培养板放置在37℃温度条件下的的CO2培养箱中，培养24到96个小时。

24孔，浓度为100或50nm剂量配置如下表：

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 终浓度 | 每孔体积 | 培养基 | Buffer | siRNA | Reagent |
| 24-well | 100nm | 500μl | 464.50μl | 30μl | 2.5μl | 3μl |
|  | 50nm | 500μl | 465.75μl | 30μl | 1.25μl | 3μl |

68

#### **3.1.1.7** **siRNA-Sp1**细胞转染

Sp1基因过表达采用化学合成的siRNA。等到细胞生长状好时，铺24孔板：接种1×105至5×105个细胞到含有一定量完全培养基的24孔板培养孔中，使转染时的细胞密度能够达到30~50%。

转染步骤：

a.稀释siRNA: 用30μl 1X riboFECTTM CP Buffer稀释1.25μl 20μM

siRNA储存液，轻轻混匀。

b.混合液制备：加入3μl riboFECTTM CP Reagent，轻轻吹打混匀，室温孵育0～15min。

c. 把riboFECTTM CP混合液添加到细胞培养基中并轻轻混匀。

d. 把培养板放置在37℃温度条件下的的CO2培养箱中，培养24到96个小时。

24孔，浓度为100或50nm剂量配置如下表：

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | siRNA 终浓度 | 每孔体积 | 培养基 | Buffer | siRNA | Reagent |
| 24-well | 100nm | 500μl | 464.50μl | 30μl | 2.5μl | 3μl |
|  | 50nm | 500μl | 465.75μl | 30μl | 1.25μl | 3μl |

#### **3.1.1.8** 细胞总**RNA**的提取

（1）观察到细胞生长良好时，把培养基吸除掉并用PBS液洗涤细胞，然后把PBS液吸除掉，往细胞里添加含0.1-0.25%胰蛋白酶的PBS液，待细胞脱离容器壁，添加含有血清的培养基失活胰蛋白酶，把细胞溶液转移到RNase-Free的离心管中，300×g离心5分钟然后收集细胞沉淀，吸除所有的上清液。

69

（2）在15-300C的温度下放5分钟，使完全分离核酸蛋白复合物。

（3）40C 12,000 rpm(~13,400×g)离心10 min，取上清。

（4）每使用1 ml TRNzol，均需要加入0.2 ml氯仿，然后将管盖盖好，振荡15 sec，在室温下放置3分钟。

（5）40C 12,000 rpm(~13,400×g)离心10-15 min，样品会分成三层：黄色的是有机相，而中层和上层均是无色的水相，而RNA主要在水相中，把约600μl的水相转移到新的离心管。

（6）得到的水相溶液后，往里加入等体积的异丙醇并混匀，然后在室温条件下放置20-30分钟。

（7）40C 12,000 rpm(~13,400×g)离心10 min，去上清。在离心之前，通常看不见RNA沉淀，而在离心后，RNA沉淀会在管侧和管底形成胶状沉淀。

（8）加入1 ml 75%乙醇(RNase-Free ddH2O配置)洗涤沉淀。每使用1 ml TRNzol，至少需要用1 ml 75%乙醇洗涤RNA沉淀进。

（9）40C 5,000 rpm(~2,300×g)离心3 min。把液体倒出，注意：不要把沉淀倒出，短暂离心剩余的少量液体并用枪头吸出，不能吸到沉淀。

（10）在室温条件下晾干，并加入30-100μl RNase-Free ddH2O，反复吹打和混匀，目的为把RNA充分溶解。

#### **3.1.1.9** 逆转录反应合成**cDNA**

##### （1）miRNA 3'端行加Poly (A)处理：往在冰上预冷RNase Free的反应管加入以下试剂至总体积20μl (最后加入E. coli Poly(A)

Polymerase) 。

70

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 试剂组分 | 体积 | 终浓度 |
| Total RNA\* | - | 可达 2 µg |
| E.coli Poly(A) Polymerase(5 U/µl) | 0.4 µl | 2 U |
| 10× Poly(A) Polymerase Buffer | 2 µl | 1× |
| 5×rATP Solution | 4 µl | 1× |
| RNase-Free ddH2O | 补水至 20 µl | - |

##### （2）用移液器将上述配制的反应液轻轻混匀，短暂离心，并在37℃温度下反应60分钟。得到反应液可以进行下游实验，也可以在-20℃的温度下短暂保存。如需长期保存建议存放于-800C。

##### （3）将加Poly(A)修饰的miRNA进行逆转录反应：按照下表成分配制反应液。

试剂组分 体积

Poly(A) 反应液 2 µl

10×RT Primer 2 µl

10×RT Buffer 2 µl

Super Pure dNTPs (2.5 mM each) 1µl

RNasin (40 U/µl) 1 µl

Quant RTase 0.5µl

RNase-Free ddH2O 11.5µl

Total volume 20µl

#### **3.1.1.10** 荧光定量**PCR**反应检测**siRNA-Sp1**细胞转染后**miR-22-3p**的表达情况

荧光定量PCR反应按天根生化科技公司qPCR试剂盒miRcute miRNA qPCR Detection Kit(SYBR Green)说明书进行，以U6为内参。

（1）室温融化2×miRcute miRNA Premix和Reverse Primer。

（2）上下颠倒2×miRcute miRNA Premix，轻轻地均匀混合，注意要避免起泡，然后轻微离心后便可以使用。

（3）把试剂放置冰上，并按照下表配置反应体系：

71

组成成分50μl体系20μl体系终浓度

2×miRcute miRNA Premix （含SYBR，含

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| ROX） |  | | |
| Foward Primer （自备） | - | - | 200 nM |
| Reverse Primer (10μl) | 1μl | 0.4μl | 200 nM |
| miRNA 第一链 cDNA | - | - | - |
| ddH2O | 至 50μl | 至 20μl | - |

25μl 10μl 1×

（4）反应条件为：940C起始模板变性2min, 940C 25秒PCR循环中模板变性，600C 34s退火延伸，经历35-45个循环后检测溶解曲线，反应在

7500荧光PCR仪（ABI, USA）中进行。

（5）数据分析：CT值定义：每个反应的荧光信号达到设定的阀值时经历的循环数，每个样本设3个复孔，得到的Q值取平均值，每个样本的miRNA相对表达量通过2-△CT-计算，其中△CT=CT -CT

miRNA U6。

#### **3.1.1.11** **Western Blot**材料及方法

材料：上样缓冲液和脱脂奶粉来源于广州威佳科技公司；辣根化物酶标记ft羊抗鼠（兔）IgG（H+L）二抗购买于北京中杉金桥生物技术有限公司；BCA蛋白含量检测以及全蛋白提取试剂盒来源于南京凯基生物科技公司；超敏化学发光试剂盒、配胶试剂盒以及抗体稀释液均来源于碧云天生物科技研究所；蛋白预染Marker购自美国Fermentas公司。

方法：分别从mimics-mir-22-3p组和mimics-NC转染组、Inhibitor-mir-22-3p和Inhibitor-miRNA中分别加入细胞裂解液，并按照步骤提取蛋白，用DC蛋白测定试剂盒(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)测定蛋白浓度。将50pg样品和上样缓冲液混合，煮沸分钟后行12％SDS—PAGE变性凝胶电泳，转PVDF膜(Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA,

USA）.，应用封闭液室温下封闭l h，分别与Bcl2、CCND1、Sp1一抗杂交，

72

4℃过夜。然后与HRP标记的二抗作用，ECL化学发光试剂检测。扫描胶片，用凝胶图像处理系统分析结果。

#### **3.1.1.12** 统计学分析

使用SPSS19.0软件进行统计分析。计量资料数据以均数±标准差（x

±s）表示，两组比较采用t检验，三组以上比较采用单因素方差分析。 *P*

﹤0.05即认为有统计学差异。

### **3.1.2** 结果

#### **3.1.2.1** **miR-22-3p**作用靶基因检测

应用生物信息学预测软件microRNA、TargetScan、Pictar预测miR-22-3p调控的靶基因。初步候选Bcl2, CCND1, Sp1成为预测结果中的靶基因，其中Sp1可能性最大。



**图 11** **TargetScan预测S1可能为miR-22-3p调控的靶基因**

#### **3.1.2.2 Mimics-miR-22-3p**、**Inhibitor-miR-22-3p**及其对应**NC**转染细胞后**Western Blot**检测**Bcl2**，**CCND1**，**Sp1**蛋白的表达。

Mimics-miR-22-3p、Mimics-miR-22-3p-NC、Inhibitor-miR-22-3p 、

73

Inhibitor-miR-22-3p-NC转染细胞后Western Blot检测Bcl2, CCND1, Sp1蛋白的表达。结果显示：与Mimics-NC相比，Mimics-miR-22-3p转染组HepG2细胞中Sp1蛋白的表达明显减少（*P*<0.05）。与Inhibitor-NC相比，Inhibitor-miR-22-3p转染组HepG2细胞中Sp1蛋白的表达明显升高

（*P*<0.05）。说明了Sp1极有可能是miR-22-3p的靶基因（图12）。



**图 12** **qRT-PCR检测沉默Sp1后miR-22-3p的表达**

已明确miR-22-3p和Sp1相互之间为逆向作用的关系后，为了明确是miR-22-3p作用于Sp1还是Sp1作用于miR-22-3p，我们把Sp1沉默后用qRT-PCR检测miR-22-3p的表达，结果显示：miR-22-3p在siRNA-Sp1组，siRNA-NC组以及空白对照组的细胞之间的表达量没有统计学差异（*P*> 0.05, 图13）。说明Sp1并不影响miR-22-3p的表达。

74



**图 13** siRNA-Sp**1，siRNA-NC及空白对照细胞组之间miR-22-3p的表达**

## **3.2 Sp1**对肝癌体外生物学特性的影响

上一节中我们通过釆用生物信息学的方法预测和寻找到Sp1可能为miR-22-3p调控的肿瘤相关基因，并利用Western Blot检测miR-22-3p 对

Sp1蛋白表达的影响，发现Mimics-miR-22-3p转染组HepG2细胞中Sp1蛋白的的表达水平明显下调。与Inhibitor-NC相比，Inhibitor-miR-22-3p转染组HepG2细胞中Sp1蛋白的表达明显升高，即miR-22-3p与Sp1两者

75

之间的表达呈逆向关系。说明了Sp1非常有可能为miR-22-3p的靶基因。但是Sp1与肝癌之间的关系又如何？以往的大多数研究的只发现了Sp1在肿瘤中的高表达，而Sp1在肝癌细胞中的功能研究报导甚少。因此，在本部分研究中我们将验证Sp1与肝癌细胞的关系.通过qRT-PCR观察Sp1在HepG2及正常肝细胞株HL-7702的表达水平，采用化学合成的siRNA-Sp1转染HepG2细胞，并进行MTT细胞增殖实验及划痕实验验证Sp1与肝癌之间的相互关系。

### **3.2.1** 材料

#### **3.2.1.1** 细胞株

正常肝细胞株HL-7702、HepG2细胞株来源于上海生命科学院细胞库并保存于实验室。

#### **3.2.1.2** 主要试剂

siRNA-Sp1, siRNA-NC，siRNA储存液，riboFECTTM CP Reagent, riboFECTTM CP Buffer，细胞培养基均购自锐博生物公司，SuperReal

PreMix(Probe)(FP206)、FastQuant RT Kit(with gDNase)（KR106），均购自天根生化科技公司，DEPC处理水（100ml）购买自碧云天研究所，50-500 bp DNA Marker购买自Takara公司，逆转录试剂盒购买自Takara公司，组织RNA保护液购买自天根生化科技有限公司，引物见附录1，MTT细胞计数试剂盒购买于日本同仁。

#### **3.2.1.3** 主要仪器与设备

76

### 主要仪器 公司

SS-325 高压灭菌消毒锅 TOMY（日本）

数字pH计Mettler-Toledo公司（瑞士）

5810R高速冷冻离心机eppenndorf公司（德国）

常温低速离心机湘仪公司

高速磁力搅拌机Mettler-Toledo公司（瑞士）

可换膜过滤器、47毫米直径默克密理博公司（美国）

针头式滤器Coming公司（美国）

电子分析天平Mettler-Toledo公司（瑞士）

-80℃超低温冰箱日本SANYO

恒温水浴箱上海安亭仪器厂

高压灭菌指示带中西泰安技术服务中心

millipore超纯水机默克密理博公司（美国）

封口膜Polisciences Inc公司（美国）

玻璃巴氏滴管康宁公司（美国）

显微器械艾瑞医疗器械公司

解剖显微镜贝朗医疗器械公司

制冰机SCOTSMAN, 美国

日立7100型全自动生化分析仪日立、日本

7500 荧光 PCR 仪 ABI、美国

96孔PCR板（带条形码）ABI公司（美国）。

PCR板热封膜ABI公司（美国）

高速组织电动研磨器天根（北京）

电泳仪电源和电泳槽伯乐公司（美国）

凝胶成像分析系统 伯乐公司（美国）

微波炉广东格兰仕家电集团

高压灭菌消毒锅博讯

### **3.2.2** 方法

#### **3.2.2.1** 细胞培养

人肝癌细胞系HepG2及正常肝细胞系HL-7702在含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中培养，放置在370C和含5%CO饱和湿度的培养箱中培养传代，隔三天换一次液，等到细胞长满的时候，用0.25%胰酶消化，以1：

2

3的比例进行传代培养。

#### **3.2.2.2** **siRNA-Sp1**细胞转染

77

Sp1基因过表达采用化学合成的siRNA。等到细胞生长状好时，铺24孔板：接种1×105至5×105个细胞到含有一定量完全培养基的24孔板培养孔中，使转染时的细胞密度能够达到30~50%. miRNA mimic转染时浓度为50nM，miRNA inhibitor转染时浓度为100nM。

转染步骤：

a.稀释mimic/inhibitor: 用30μl 1X riboFECTTM CP Buffer稀释1.25μl (inhibitor为2.5μl) 20μM miRNA mimic，轻轻混匀。

b.混合液制备：加入3μl riboFECTTM CP Reagent，轻轻吹打混匀，室温孵育0～15min。

c. 把riboFECTTM CP混合液添加到细胞培养基中并轻轻混匀。

d. 把培养板放置在37℃温度条件下的的CO2培养箱中，培养24到96个小时。

24孔，浓度为100或50nm剂量配置如下表：

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 终浓度 | 每孔体积 | 培养基 | Buffer | | siRNA | Reagent | |
| 24-well | 100nm | 500μl | 464.50μl | | 30μl | 2.5μl | | 3μl |
|  | 50nm | 500μl | 465.75μl | | 30μl | 1.25μl | | 3μl |

#### **3.2.2.3** 细胞总**RNA**的提取

（1）观察到细胞生长良好时，把培养基吸除掉并用PBS液洗涤细胞，然后把PBS液吸除掉，往细胞里添加含0.1-0.25%胰蛋白酶的PBS液，待细胞脱离容器壁，添加含有血清的培养基失活胰蛋白酶，把细胞溶液转移到RNase-Free的离心管中，300×g离心5分钟然后收集细胞沉淀，吸除所有的上清液。

（2）在15-300C的温度下放5分钟，使完全分离核酸蛋白复合物。

（3）40C 12,000 rpm(~13,400×g)离心10 min，取上清。

78

（4）每使用1 ml TRNzol，均需要加入0.2 ml氯仿，然后将管盖盖好，振荡15 sec，在室温下放置3分钟。

（5）40C 12,000 rpm(~13,400×g)离心10-15 min，样品会分成三层：黄色的是有机相，而中层和上层均是无色的水相，而RNA主要在水相中，把约600μl的水相转移到新的离心管。

（6）得到的水相溶液后，往里加入等体积的异丙醇并混匀，然后在室温条件下放置20-30分钟。

（7）40C 12,000 rpm(~13,400×g)离心10 min，去上清。在离心之前，通常看不见RNA沉淀，而在离心后，RNA沉淀会在管侧和管底形成胶状沉淀。

（8）加入1 ml 75%乙醇(RNase-Free ddH2O配置)洗涤沉淀。每使用1 ml TRNzol，至少需要用1 ml 75%乙醇洗涤RNA沉淀进。

（9）40C 5,000 rpm(~2,300×g)离心3 min。把液体倒出，注意：不要把沉淀倒出，短暂离心剩余的少量液体并用枪头吸出，不能吸到沉淀。

（10）在室温条件下晾干，并加入30-100μl RNase-Free ddH2O，反复吹打和混匀，目的为把RNA充分溶解。

#### **3.2.2.4** 逆转录反应合成**cDNA**

1. 将模板RNA在冰上解冻；5×gDNA Buffer、FQ-RT Primer Mix、10×Fast RT Buffer、RNase-Free ddH2O在室温（5-25℃）解冻，解冻后迅速置于冰上。在使用前，将每种溶液涡旋振荡混匀后简短离心，目的为收集残留在管壁的液体。

以下操作步骤请在冰上进行。在进行各项反应时应先配制成Mix然后

79

再分装到每个反应管中，目的是为了保证反应液配制的准确性。

2. 按照下列体系配制混合液，彻底混匀。简短离心，并置于42℃，孵育3 min。然后置于冰上放置。

**gDNA去除反应体系**

|  |  |
| --- | --- |
| 组成成分 | 使用量 |
| 5×gDNA Buffer | 2 μl |
| Total RNA | - |
| RNase-Free ddH2O | 补足到 10 μl |

**3.** 按照下表的反应体系配制混合液。**反转录反应体系**

|  |  |
| --- | --- |
| 组成成分 | 使用量 |
| 10×Fast RT Buffer | 2 μl |
| RT Enzyme Mix | 1 μl |
| FQ-RT Primer Mix | 2 μl |
| RNase-Free ddH2O | 补足到 10 μl |

4.将反转录反应中的Mix添加加到gDNA去除步骤的反应液中并充分混

匀。

5.42℃，孵育15 min。

6.在95℃温度条件下孵育3分钟后再放于冰上，得到的cDNA可以在后续实验中使用或在低温条件下保存。

#### **3.2.2.5** **qPCR**检测转染前**HepG2**细胞及**HL-7702**细胞中**Sp1**的表达水平。

<1>建立Real-Time PCR反应体系：

1. 融解2×SuperReal PreMix (Probe)(如果保存在-20℃)，50×ROX Reference Dye，模板，引物和RNase-Free ddH2O，并将所有试剂在室温下平衡并彻底混匀。

80

2. 放置在冰上，行Real-Time PCR反应液的配制。反应体系：

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组成成分 | 50 μl 体系 | 25 μl | 20 μl 体系 | 终浓度 |
| 2×SuperReal PreMix (Probe) | 25 μl | 12.5 μl | 10 μl | 1× |
| 正向引物（ 10 μM） | 1.5 μl | 0.75 μl | 0.6 μl | 300 nM\*1 |
| 反向引物（ 10 μM） | 1.5 μl | 0.75 μl | 0.6 μl | 300 nM\*1 |
| 荧光探针（ 10 μM） | 1.0 μl | 0.5 μl | 0.4 μl | 200nM\*2 |
| DNA 模板 | － | － | － | ≤200 ng |
| 50×ROX Reference Dye\*3 | － | － | － | － |
| RNase-Free ddH2O | 至 50 μl | 至 25 μl | 至 20 μl | － |

<2>进行Real-time PCR反应

用两步法PCR反应程序进行反应。变性时间可在1-3 sec范围内进行调整，退火/延伸时间可在20-32 sec范围内进行调整。

两步法反应程序：

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 阶段 | 循环 | 温度 | 时间 | 内容 | 荧光信号采集 |
| 预变性 | 1× | 95℃ | 15 min | 预变性 | 否 |
| PCR 反应 | 40× | 95℃ | 3 sec\*4 | 变性 | 否 |
|  |  | 60℃ | 20-32 sec\*5 | 退火/延伸 | 是 |

3盖上反应管，轻柔混匀。为确保所有组分均在管底可短暂离心。

4在荧光定量PCR仪中放置反应体系并开始反应。

#### **3.2.2.6** **MTT**法检测**siRNA-Sp1**转染组细胞增殖情况

荧光显微镜下确认siRNA-Sp1、siRNA-NC转染成功后，在37℃温度条件下，用5%CO2培养箱中培养细胞2天。然后取一块96孔板并在每个孔添加20ulMTT溶液，继续孵育4小时后停止止培养，吸取每个孔内的培养上清液并在每个孔内添加150ulDMSO，脱色摇床震荡10分钟以使结晶物充分溶解掉。，在酶联免疫监测仪上，设定选择490nm波长，测定每个孔的光吸收值并记录结果。每一个组的3个孔均取平均值，连续监测0小时，12

81

小时，24小时及48小时的生长情况，并以时间为横坐标，抑制率为纵坐标来绘制细胞生长曲线。

#### **3.2.2.7** 划痕实验检测**Sp1**对**HepG2**细胞迁移能力的影响

1.用直尺用记号笔在6孔板背后均匀画线，每相隔0.5cm画一条线，横穿过孔；

2.将计数细胞消化后用完全培养基将细胞重悬，在六孔板中的每一个孔添加大约约5×105个细胞；

3.第二天，依靠直尺，垂直于背后所画横线用枪头划痕；

4.用PBS液清洗细胞目的为去除划下的漂浮细胞并添加含0.2% BSA的培养基；

6.放入37℃5%CO2培养箱，培养24h后取样，拍照。

#### **3.2.2.8** **Transwell**侵袭实验检测**Sp1**对**HepG2**细胞迁移能力的影响

1.铺板：在上室中加入40ul人工基底膜（该人工基底膜由matrigel和无血清培养液混合），在 37℃温度条件下孵育过夜目的使其呈凝胶；

2.接种细胞：消化计数细胞，添加含0.2% BSA的DMEM培养基将细胞重悬，把细胞浓度调整为1×106/ml；取100µl细胞悬液添加到Transwell上室并在下室中添加600µl条件培养基培养24小时；

3.固定、染色：取出transwell小室并吸取上室中的培养液，用PBS液清洗1次，然后用棉签轻轻擦除上室中的matrigel基质胶和残留细胞，然后再用PBS液清洗两次再用4%多聚甲醛固定30min；将甲醛吸取掉后再用PBS液清洗两次，用0.1%结晶紫染色20分钟后再用ddH2O清洗三次以上，等待其自然风干；

82

5.镜下观察并计数：在显微镜镜下随机选3个视野拍照，然后行计数细胞。

### **3.2.3** 结果

#### **3.2.3.1** **qRT-PCR**检测细胞株中**Sp1**的表达

qRT-PCR结果发现：Sp1在HepG2细胞株中的表达水平高于正常细胞株HL-7702（*P*<0.01, 图14）。结果提示：Sp1高表达在肝癌中是一种普遍的现象，Sp1的高表达可能与肝癌的发生发展相关。



**图 14** qRT-PCR**检测Sp1细胞株中的表达**

#### **3.2.3.2** **qRT-PCR**检测**siRNA-Sp1**转染效率

将siRNA-Sp1及siRNA-Sp1-NC转染到HepG2细胞中，并通过qRT-PCR检测siRNA-Sp1、siRNA-NC及空白对照组的转染效率。结果如图16所示。转染siRNA-Sp1后HepG2细胞中Sp1表达水平明显下调，提示干扰现象明显（*P*<0.001）。

83



**图 15** **qRT-PCR检测siRNA-Sp1、siRNA-Sp1-NC及空白对照的转染效率**

#### **3.2.3.3** **MTT**法检测

MTT细胞增殖实验检测siRNA-Sp1组、siRNA-NC组中HepG2细胞的在体外增殖能力，然后绘制细胞抑制曲线。siRNA-Sp1组细胞相对于siRNA-NC组中HepG2细胞的增殖能力明显受到下调（*P*<0.05, 图16）。结果提示：抑制Sp1的表达能抑制肝癌细胞的体外增殖能力。



**图 16** **沉默Sp1基因能抑制肝癌细胞的体外增殖能力**

84

#### **3.2.3.4** 划痕实验检测**siRNA-Sp1**、**siRNA-NC**组及空白对照组细胞的迁移能力

siRNA-Sp1转染HepG2细胞后进行划痕，在0h和24h时间点拍照，结果显示：，siRNA-Sp1组细胞迁移能力（24h划痕宽度/0h划痕宽度：siRNA-Sp1 组0.688±0.037，siRNA-NC组0.394±0.026，空白对照组0.311±0.032）

明显比siRNA-NC组和空白对照组低（*P*<0.05），沉默Sp1后细胞迁移能力明显减弱。结果提示：下调Sp1后对体外HepG2细胞的迁移能力有显著的抑制作用（图17）。



**图 17** **细胞划痕实验检测转染后细胞的迁移能力的变化。**

#### **3.2.3.5** **Transwell**侵袭实验检测**siRNA-Sp1**、**siRNA-NC**组及空白对照组细胞的侵袭能力

Transwell侵袭实验结果显示（图18）：siRNA-Sp1转染组细胞的穿膜细胞数明显少于siRNA-NC和空白对照组, siRNA-Sp1感染HepG2胞后，siRNA-NC 组透膜细胞数为（97.2±6.3）/视野，空白对照组透膜细胞数为

85

（102±4.6）/视野，siRNA-Sp1组透膜细胞数为（47.2±5.5）/视野，siRNA-Sp1组细胞的侵袭能力显著低于siRNA-NC组及空白对照组细胞（*P*

＜0.05）。结果提示：抑制Sp1的表达能明显抑制HepG2细胞的体外侵袭能力。



**图 18** **Transwell侵袭实验检测转染后细胞的侵袭能力的变化。**

## **3.3** 双萤光素酶报告系统检测**Sp1**与**miR-22-3p**的关系

为进一步明确Sp1是否为miR-22-3p的靶基因，在本部分实验我们将采用双荧光素酶报告基因系统检测Sp1与miR-22-3p的关系，以确定Sp1是否为miR-22-3p的靶基因。

##### 一、实验目的

microRNA调节靶基因的表达，主要是通过microRNA与靶基因mRNA 的

3'端非翻译区（3' UTR）结合并导致靶mRNA降解或抑制蛋白合成而实现的。在该3' UTR报告基因系统中，我们将目的基因的3' UTR区域构建到报告基因luciferase后面，然后比较过表达microRNA后，报告基因表达水平的改变（监测荧光素酶的活性变化）能定量反映microRNA对目的基因的抑制作用。

##### 二、实验概述

萤光素酶是理想的报告基因，因为哺乳动物细胞中不含内源性萤光素

86

酶，一旦转录完成立刻就生成功能性的萤光素酶。单报告基因实验往往会受到各种实验条件的影响，而双报告基因则通过共转染的“对照”作为内参为试验提供一基准线，从而可以在最大程度上减小细胞活性和转染效率等外在因素对实验的影响，使得数据结果更为可信。Dual-Luciferase双萤光素酶报告基因检测系统在细胞中同时表达萤火虫萤光素酶和海肾萤光素酶，两者没有种源同源性并对应不同的反应底物，故而没有交叉干扰。我们使用该系统检测启动子有效性和miRNA靶基因验证。miRNA靶基因验证原理如下：由于miRNA主要通过作用于靶基因的3’UTR起作用，可以将目的基因3’UTR区域构建至载体中报告基因luciferase的后面，通过比较过表达或者干扰miRNA后，报告基因表达的改变（监测萤光素酶的活性变化）可以定量反映miRNA对目的基因的抑制作用；结合定点突变等斱法进一步确定miRNA不靶基因3’UTR的作用位点。

##### 三、实验信息

|  |  |
| --- | --- |
| **目的细胞：** | 293T |
| **转染体系：** | 24 孔板，500 μl/well |
| **检测时间：** | 质粒转染后 48 小时 |
| **质粒共转染量：** | 3' UTR Luciferase 质粒 0.1 μg，miRNA 质粒 0.4 μg，Renilla 质粒 0.02ug |

##### 四、检测体系中各质粒名称说明

|  |  |
| --- | --- |
| **miRNA-NC：** | microRNA 空载质粒，作为目的 microRNA 质粒阴性对照 |
| **miRNA：** | microRNA 载体质粒，表达目的 microRNA（hsa-mir-22(17077-2)） |
| **3' UTR-NC：** | 3' UTR 空载质粒，作为靶基因 3' UTR 质粒阴性对照 |
| **3' UTR：** | 靶基因 3' UTR 质粒（SP1(17072-1)） |
| **3' UTR-MU：** | 靶基因 3' UTR 突变体质粒（SP1(17070-1)） |
| **阳参 3' UTR** | TRAF6 基因 3' UTR 质粒 |
| **阳参 miRNA** | hsa-mir-146b 载体质粒 |

87

**五、实验分组**

|  |  |
| --- | --- |
| **分组序号** | **合同对应分组名称** |
| **实验组 1** | 3' UTR-NC+miRNA-NC |
| **实验组 2** | 3' UTR-NC+miRNA |
| **实验组 3** | 3' UTR+miRNA-NC |
| **实验组 4** | 3' UTR+miRNA |
| **实验组 5** | 3' UTR-MU+miRNA-NC |
| **实验组 6** | 3' UTR-MU+miRNA |
| **阳参 miRNA NC 组** | 阳参 3' UTR+miRNA-NC |
| **阳参 miRNA 组** | 阳参 3' UTR+阳参 miRNA |

### 3.3.1 材料与方法

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **3.3.1.1 主要试剂** | |  |
| **试剂名称** | **试剂来源** | **cat.No** |
| 胎牛血清 | Ausbian | VS500T |
| DMEM | Corning | 10-013-CVR |
| 胰酶 | 生工生物工程（上海）股份有限公司 | T0458-50G |
| X-tremegene HP | ROCHE | 06366236001 |
| Opti-MEM | GIBCO | 31985-070 |
| Dual-Luciferace |  |  |
| Reporter Assay | promega | E2910 |
| System |  |  |
| **3.3.1.2 主要仪器** | | |
| **仪器名称** | **仪器来源** | **Cat.No** |
| 荧光显微镜 | 奥林帕斯 | IX71 |
| 酶标仪 | Tecan infinite | M2009PR |
| CO2 培养箱 | 日本三洋 SANYO | MCO-175 |
| 倒置显微镜 | 上海蔡康光学仪器有限公司 | XDS-100 |
| 离心机 | 赛默飞世尔科技（中国）有限公司 | Fresco 21 |
| 生物安全柜 | 上海振样创空气净化设备公司 | Bio 1200-II-A2 |

88

#### 3.3.1.3 实验流程

细胞感染

转移小室、下室准备

细胞加样

细胞转移

转移细胞染色

OD 读数

#### **3.3.1.3** 实验步骤实验步骤

**1. 准备目的细胞**

（1）从液氮罐中取出细胞冻存管并迅速放入37℃水浴中且不时摇动使其尽快解冻。

（2）完全解冻后在1300 rpm下离心3分钟，用75%酒精擦拭冻存管消毒后再移至生物安全柜。

（3）吸去冻存液上清，然后添加1 mL新鲜的完全培养基重悬细胞，再把细胞悬液接种至含有3 mL完全培养基的6-cm dish中，轻轻晃匀后置于37℃、5% CO2培养箱。

89

##### （4）更换一次培养液后再继续培养。

##### （5）生长90%汇合的细胞进行传代培养。用胰酶消化后制成细胞悬液，再分装至两个新的6-cm dish中，补足完全培养基到4 mL左右继续培养。

2. 目的细胞质粒转染

（1）把数生长期的细胞制成细胞悬液并计数，然后接种于24-well培养板中（细胞数约为105，其具体根据细胞形态大小而定），在37℃温度条件下、5% CO2的培养箱培养到细胞融合度达到60%左右。

（2）使用ROCHE: X-tremegene HP转染试剂转染：（说明书链接[http: //lifescience. roche. com/webapp/wcs/stores/servlet/Produ](http://lifescience.roche.com/webapp/wcs/stores/servlet/Produ)

ctDisplaypartNumber=3.5.3.18.1.10)

a)每孔每转染1µg质粒、需2µL X-tremegene HP，按照此比例将X-tremegene HP转染试剂和所需质粒共同溶解于100µL opti-MEM中，混匀，室温静置20 min；

b）将孔板中培液吸去300µL；

c）质粒与X-tremegene HP混合液加入细胞，37℃、5% CO2培养箱中培养5-6小时后，补充含10%血清的完全培养基200µL以确保整个培养孔内含有500µL培养基；

（3）转染24-48小时后开始观察质粒上萤光标记基因的表达情况来判断转染的效率；

（4）备注说明：在转染目的质粒时，会安排0.5µg GFP质粒单独转染，用于证明转染体系无异常；

（5）细胞转染48小时后进行luciferase检测。

90

3. Luciferase检测(Dual-Luciferase®Reporter Assay System说明书：

[Http: //cn. promega. com/resources/protocols/technical-manuals/](http://cn.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/) 0/dual-glo-luciferaseassay-system-protocol)

（1）初次使用Dual-Luciferase®Reporter Assay System时，需要将Luciferase Assay Buffer II提前放于室温下溶解、平衡；将Luciferase Assay Buffer II完全加入到Luciferase Assay Substrate瓶中，完全溶解底物，形成Luciferase Assay Reagent，分装保存于-80℃，一年内有效。

（2）裂解细胞前，将Passive Lysis Buffer 5×使用D-Hanks稀释配制为1×；吸取掉24孔板中的培养基并加入300µL的Passive Lysis Buffer 1×，放到4℃冰箱反应20分钟，待细胞充分裂解，用振板机震荡3-5分钟（不要太剧烈），混合均匀，可立即进行检测，如果来丌及检测可放入-80度冰箱一周内拿出检测。

（3）上机检测前，提前将Stop & Glo®Buffer放于室温下溶解、平衡，将Stop & Glo®Substrate 50×加入到Stop & Glo®Buffer中，使其充分溶解，稀释成1×Reagent. Stop & Glo®Substrate 1×Reagent需要现配现用，配好后常温48 h内有效。

（4）常温下溶解步骤（2）中的细胞裂解液并吸取40µL于Lockwell

maxisorp检测板中，加入20µL Luciferase Assay Reagent，震荡混匀后立即使用酶标仪检测firefly luminescence（萤火虫荧光酶荧光值），注意该步骤时间丌宜超过5 min。

91

（5）检测firefly luminescence后，每孔中加入20µL Stop & Glo®Reagent，震荡混匀后静置3分钟，然后使用酶标仪检测 Renilla

luminescence（海肾荧光酶荧光值）。

##### （6）数据收集和分析（备注：报告中数据统计分析斱法是参考报告附件中的“数据分析参考文献”进行的）。

#### **3.3.1.4** 统计学分析

使用SPSS19.0软件进行统计分析，以均数±标准差（x±s）表示计量资料数据，采用t检验比较两组间数据，三组以上比较采用单因素方差分析。*P*﹤0.05为有统计学差异。

### **3.3.2** 实验结果

##### （**1**）荧光素酶检测原始数据

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **检测指标** | **实验分组** | **复孔 1 数据** | **复孔 2 数据** | **复孔 3 数据** |
| **Firefly luminescence** | 实验组 1 | 24930 | 27698 | 25706 |
| 实验组 2 | 12879 | 14977 | 13051 |
| 实验组 3 | 306263 | 292998 | 303660 |
| 实验组 4 | 88991 | 87281 | 89163 |
| 实验组 5 | 433801 | 415950 | 418236 |
| 实验组 6 | 195953 | 193597 | 212778 |
| 阳参 miRNA NC 组 | 99775 | 101727 | 102775 |
| 阳参 miRNA 组 | 39596 | 40342 | 40946 |
| **Renilla luminescence** | 实验组 1 | 24337 | 27053 | 27179 |
| 实验组 2 | 13458 | 13450 | 12910 |
| 实验组 3 | 28944 | 27888 | 29176 |
| 实验组 4 | 16484 | 16141 | 17066 |
| 实验组 5 | 30025 | 28475 | 28763 |
| 实验组 6 | 15564 | 15199 | 16877 |
| 阳参 miRNA NC 组 | 66084 | 65741 | 67052 |
| 阳参 miRNA 组 | 52633 | 53127 | 52982 |

92

##### （2）**Firefly /Renilla luminescence**：同一样品孔内**Firefly Luciferase**值与**Renilla Luciferase**值的比值，代表**luciferase**相对表达量

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Firefly /Renilla luminescence** | **实验分组** | **复孔 1 数据** | **复孔 2 数据** | **复孔 3 数据** |
| 实验组 1 | 1.02 | 1.02 | 0.95 |
| 实验组 2 | 0.96 | 1.11 | 1.01 |
| 实验组 3 | 10.58 | 10.51 | 10.41 |
| 实验组 4 | 5.40 | 5.41 | 5.22 |
| 实验组 5 | 14.45 | 14.61 | 14.54 |
| 实验组 6 | 12.59 | 12.74 | 12.61 |
| 阳参 miRNA NC 组 | 1.51 | 1.55 | 1.53 |
| 阳参 miRNA 组 | 0.75 | 0.76 | 0.77 |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Firefly /Renilla luminescence** | **实验分组** | **AVERAGE** | **STDEV.** |
| 实验组 1 | 1.00 | 0.05 |
| 实验组 2 | 1.03 | 0.08 |
| 实验组 3 | 10.50 | 0.09 |
| 实验组 4 | 5.34 | 0.10 |
| 实验组 5 | 14.53 | 0.08 |
| 实验组 6 | 12.65 | 0.08 |
| 阳参 miRNA NC 组 | 1.53 | 0.02 |
| 阳参 miRNA 组 | 0.76 | 0.01 |

##### （3）**Firefly /Renilla luminescence fold change**：同一**Luciferase**质粒转染的两个组中，将**miRNA-NC**组**luciferase**相对表达量均一化为1，目的**miRNA**组相比**miRNA-NC**组后，其**luciferase**相对表达量

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Firefly /Renilla luminescence fold change** | **实验分组** | **复孔 1 数据** | **复孔 2 数据** | **复孔 3 数据** |
| 实验组 1 | 1.03 | 1.03 | 0.95 |
| 实验组 2 | 0.96 | 1.12 | 1.01 |
| 实验组 3 | 1.01 | 1.00 | 0.99 |
| 实验组 4 | 0.51 | 0.52 | 0.50 |
| 实验组 5 | 0.99 | 1.01 | 1.00 |
| 实验组 6 | 0.87 | 0.88 | 0.87 |
| 阳参 miRNA NC 组 | 0.99 | 1.01 | 1.00 |
| 阳参 miRNA 组 | 0.49 | 0.50 | 0.51 |

93

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Firefly /Renilla luminescence fold change** | **实验分组** | **AVERAGE** | **STDEV.** |
| 实验组 1 | 1.00 | 0.05 |
| 实验组 2 | 1.03 | 0.08 |
| 实验组 3 | 1.00 | 0.01 |
| 实验组 4 | 0.51 | 0.01 |
| 实验组 5 | 1.00 | 0.01 |
| 实验组 6 | 0.87 | 0.01 |
| 阳参 miRNA NC 组 | 1.00 | 0.01 |
| 阳参 miRNA 组 | 0.50 | 0.01 |

##### （**4**）**Normalized Firefly /Renilla luminescence fold**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Normalized** **fold change** | **实验分组** | **复孔 1 数据** | **复孔 2 数据** | **复孔 3 数据** |
| 实验组 2 | 0.93 | 1.08 | 0.98 |
| 实验组 4 | 0.50 | 0.50 | 0.48 |
| 实验组 6 | 0.84 | 0.85 | 0.84 |
| 阳参 miRNA NC  组 | 0.99 | 1.01 | 1.00 |
| 阳参 miRNA 组 | 0.49 | 0.50 | 0.51 |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Normalized** **fold change** | **实验分组** | **AVERAGE** | **STDEV.** |
| 实验组 2 | 1.00 | 0.08 |
| 实验组 4 | 0.49 | 0.01 |
| 实验组 6 | 0.85 | 0.01 |
| 阳参 miRNA NC 组 | 1.00 | 0.01 |
| 阳参 miRNA 组 | 0.50 | 0.01 |

##### （**5**）T-Test：

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | | | | **P VALUE** |
| 实验组 2 VS 4 | | | | | 0.007 |
| 实验组 4 VS 6 | | | | | 0.000 |
| 阳参 miRNA NC | 组 | VS | 阳参 miRNA | 组 | 0.000 |

##### （**7**）**Luciferase**的表达量结果统计

相比阳参miRNA NC组，阳参miRNA组相对luciferase的表达量有显著性下降(*P*<0.05)，说明整个转染检测体系没有问题。实验组2-6的luciferase

94

表达量如图19所示（阳参miRNA组与阳参miRNA NC组并没列出），3' UTR-NC+miRNA组和3' UTR+miRNA相比，有显著性差异(*P*<0.05)，说明miR-22-3p与靶基因Sp1的3' UTR的结合，抑制其表达。



**图19** **luciferase表达量统计图**

## **3.4** 讨论

miRNA对机体生理活动的调控过程构成及其庞大的网络，构成了一个及其复杂的调节系统，通过这个系统来完成对细胞及各种生物体活动的调控，为疾病相关miRNA作用机制及点的研究增加了难度，但同时它们在各种疾病中错综复杂的作用机制也为疾病的治疗提供新的研究方向。目前发现跟 肿瘤有关的某些特定miRNA，并确定miRNA作用的疾病特异性miRNA靶点及它们部分或全部参与的信号通路已成为新的研究话题。已经有一部分被验

95

证过的关于miRNA的靶基因，TNFAIP3已被验证为miR-29c的靶基因[1]；

Shi等的研究中，P70S6k1作为mTOR下游的一个重耍因子参与肿瘤的血管生成，过表达miR-128后，可以靶向P70S6k1从而抑制神经胶质瘤的生长和血管生成[2]。HBXIP是一个能抑制HBV病毒复制的基因，已有实验证明miR-501通过靶向调控HBXIP来抑制乙肝病毒的复制[3]；Fan等人在他们的实验中观察到miR-122可以通过调控NDRG3来影响HepG2.2.15细胞的增殖和凋亡[4]；MiR-101可靶向调控DNMT3A基因来完成DNA的甲基化[5]。Uchino K等人发现：miR-582-5p和miR-582-3p在膀胱癌中临床样本中发现呈低表达，并且发现它们都可以抑制相同的靶向基因的表达如PGGT1B、LRRK2、DIXDC1[6]；最近Maria I等人发现miR-28可以抑制肿瘤的增殖但是却可以导致肿瘤的转移，因为miR-28-3p和miR-29-5p是调控不同的mRNA[7]；miR-28-5p可靶向调控CCND1和HOXB3，而miR-28-3p调控NM23-H1

[8]；而Hu等人的研究发现：miR-128在非小细胞肺癌的发生、血管及淋巴管生成中发挥着重要的作用，它能靶向血管内皮生长因子C（VEGF-C）来发挥抑癌作用[9]；miR-21通过靶向调控IL-12和Bcl-2基因减弱宿主抗分歧杆菌T细胞的反应[10]；miR-29通过靶向调控IFN-γ来抑制宿主的免疫反应[11]；miR-128在前列腺癌中的研究表明miR-128可通过下调多梳基因家族的BMI-1来抑制肿瘤干细胞的自我更新和恶性转化[12]。另外，Zhu等人的研究发现，乳腺癌中miR-128的低表达与耐药相关，miR-128可通过抑制Bmi-1和ABCC-5的表达来提高阿霉素对耐药细胞的杀伤作用

[13]。

在上一部分实验中我们已经验证了miR-22-3p和肝癌的关系，确定

96

miR-22-3p能抑制肝癌细胞的增殖和转移。但是其确切作用机制我们仍不清楚。我们从可能的作用的靶细胞位点分析其作用机制，通过应用预测软件进行分析，并通过对肝癌细胞的侵袭和转移的相关性进行筛选。初步候选

Bcl2, CCND1, Sp1成为预测结果中的靶基因，其中Sp1可能性最大。紧接着我们通过Western Blot检测Mimics-miR-22-3p、Mimics-miR-22-3p-NC、Inhibitor-miR-22-3p、Inhibitor-miR-22-3p-NC转染细胞后Bcl2，CCND1，

Sp1蛋白的表达。结果显示：与Mimics-NC相比，Mimics-miR-22-3p转染组HepG2细胞中Sp1蛋白的表达明显减少。与Inhibitor-NC相比，Inhibitor-miR-22-3p转染组HepG2细胞中Sp1蛋白的表达明显升高。说明了Sp1极有可能是miR-22-3p的靶基因。已明确miR-22-3p和Sp1相互之间为逆向作用的关系后，为了明确是miR-22-3p作用于Sp1还是Sp1作用于miR-22-3p，我们把Sp1沉默后用qRT-PCR检测miR-22-3p的表达，结果显示siRNA-Sp1, siRNA-NC及空白对照细胞组之间miR-22-3p的表达量并没有统计学差异，结果同样说明Sp1有可能是miR-22-3p的靶基因，而Sp1对于调控miR-22-3p的表达并无影响。

Sp1是第一个被分离克隆出来的转录因子，属于Sp/Kruppel转录因子家族，Sp1蛋白包含多个家族中最保守的DNA结合域，包括Cys2、His2和锌指。锌指结构域是Sp1 DNA结合活性必不可少的，通过结合不同辅因子调控一系列基因的表达， 参与到细胞增殖、分化以及调亡等生命过程

[14-18]。大量研究报道Sp1参与细胞生长调控及肿瘤的形成[19, 20]。

Sp1在结直肠癌[21]、胃癌[22]、甲状腺癌[23]、胰腺癌[24]、胶质瘤[25]、鳞状细胞癌[26]等多种肿瘤组织中均高表达，可能成为肿

97

瘤诊断的独立指标。实验还提示了Sp1的高表达与肿瘤分期、淋巴结转移密切相关，提示了肿瘤的不良预后[27,28]。Cai等人运用蛋白质组学研究，构建了头颈麟癌转移差异蛋白表达谱，从蛋白质水平揭示了Sp1是头颈麟癌转移的关键转录因子[29]。Shin J等人的实验中，他们利用免疫组织化学方法检测到Sp1在口腔癌组织中高表达，这提示Sp1是一个肿瘤相关转录因子，且可能起肿瘤促进作用[30]。肿瘤转移：即肿瘤细胞从原发部位扩散到达其他的部位，并继续生长。肿瘤转移会使肿瘤对机体的 损害增加，会很大程度地影响患者的预后和生存质量。如上所述，Sp1在多种肿瘤中均表达上调且Sp1在肿瘤侵袭转移中扮演着重要角色。在Wang L等人的实验中，他们采用免疫组化检测了Sp1在86例胃癌组织、57例正常胃粘膜组织以及53例胃癌淋巴结转移组织中的表达水平。结果发现Sp1在淋巴结转移组织中表达水平最高，其次是胃癌组织，最低为正常胃粘膜组织。研究还发现：Sp1高表达组患者的中位生存时间显著低于Sp1低表达组，

Sp1表达水和与患者淋巴结转移是否及预后密切相关[27]。在Wang XB等人的实验中，他们用免疫组化方法检测了Sp1在60例乳腺癌与12例癌旁组织中表达水平，结果发现：Sp1在乳腺癌中呈高表达，而且Sp1高表达与肿瘤侵袭、分期及是否有淋巴结转移密切相关，还发现了Sp1低表达组的生存率显著高于高表达组[31]。还有研究表明：Sp1与EMT密切相关[32, 33]，进而促进肿瘤侵袭转移。甚至还有研究提示Sp1可通过调节VEGF、TGB-β等肿瘤转移相关基因的表达表达水平来参与到调节肿瘤的增殖、血管生成 和侵袭转移[34]。

最近也有不少关于Sp1与肝癌的相关的报导，J. Liétard等人的研究

98

提示Sp1在肝细胞癌中参与激活LamC1[35]。安建光等人的研究结果提示：Sp1蛋白在肝癌及癌旁组织的表达阳性率明显高于正常肝脏组织[36]。潘奇等人的研究提示：Sp1在肝癌组织中表达明显高于其相对应的正常肝脏组织，而且，在有微血管侵犯的患者中，Sp1表达升高非常明显。研究结果还提示：肝癌患者术后生存率与Sp1的表达水平与呈负相关关系，而与肝癌患者术后复发率却呈正相关关系[37]。同样是潘奇等人另一项研究结 果提示：转录因子Sp1与VEGF启动子特异性结合是VEGF转录调控最重要的机制，结合后进一步调控肝癌血管生成和转移复发，因此，深入分析Spl在肝癌中的表达将有利于研究肝癌血管生成和转移及复发的机制[38]。 冯洁等人的研究结果提示：Sp1蛋白在肝癌组织表达水平显著高于癌旁肝硬化组织，而Sp1在正常肝组织中全部为阴性表达[39]。在本部分研究中，我们同样验证了Sp1与肝癌的关系。我们首先通过用qRT-PCR检测Sp1在正常细胞系HL-7702及HepG2细胞株中的表达水平，结果提示：Sp1在HepG2细胞株中的表达水平高于正常细胞株 HL-7702（*P*<0.01）。结果提示：Sp1高表达在肝癌中是一种普遍的现象，Sp1的高表达可能与肝癌的发生发展相关。随后将siRNA-Sp1及siRNA-Sp1-NC转染到HepG2细胞中，并采用MTT法检测siRNA-Sp1、siRNA-NC组中细胞的体外增殖能力，结果提示：抑制

Sp1 的表达能抑制肝癌细胞的体外增殖能力。我们还进行了划痕实验以及

transwell侵袭实验检测siRNA-Sp1、siRNA-NC组细胞的迁移能力及侵袭能力，结果提示：下调Sp1后对体外HepG2细胞的迁移及侵袭能力有显著的抑制作用。

明确了Sp1和肿瘤的关系后，基于前面的研究表明Sp1极有可能为

99

miR-22-3p的靶基因，miR-22-3p在肝癌细胞中可通过调节Sp1的表达来影响肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。但是单凭前面的实验还不足以证明Sp1就是miR-22-3p的靶基因。我们进一步采用了双萤光素酶报告基因系统鉴定Sp1是否为miR-22-3p的靶基因，结果显示：3' UTR-NC+miRNA组和3'

UTR+miRNA相比，有显著性差异，说明miR-22-3p与靶基因Sp1的3' UTR的结合，抑制其表达，说明了Sp1确实是miR-22-3p的一个靶基因。

## **3.5** 参考文献

1. Wang CM, Wang Y, Fan CG, et al. miR-29c targets TNFAIP3, inhibits cell proliferation and induces apoptosis in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. Biochem Biophys Res Commun 2011;411:586-92.

2. Shi Z, Wang J, Yan Z, et al. MiR-128 inhibits tumor growth and angiogenesis by targeting p70S6K1. PLoS One, 2012, 7: e32709.

3. Jin J, Tang S, Xia L, et al. MicroRNA-501 promotes HBV replication by targeting HBXIP. Biochem Biophys Res Commun 2013;430:1228-33.

4. Fan CG, Wang CM, Tian C, et al. miR-122 inhibits viral replication and cell proliferation in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma and targets NDRG3. Oncol Rep 2011;26:1281-6.

5. Wei X, Xiang T, Ren G, et al. miR-101 is down-regulated by the hepatitis B virus x protein and induces aberrant DNA methylation by targeting DNA methyltransferase 3A. Cell Signal 2013;25:439-46.

6. Uchino K, Takeshita F, Takahashi RU et al. Therapeutic Effects of

100

MicroRNA-582-5p and -3p on the Inhibition of Bladder Cancer Progression. Mol Ther 2013 21:610–619.

7. Lo´pez JA, Alvarez-Salas LM. Differential effects of miR-34c-3p and miR-34c-5p on SiHa cells proliferation apoptosis, migration and invasion. Biochem Biophys Res Commun 2011 409:513–519.

8. Almeida MI, Nicoloso MS, Zeng L et al. Strandspecific miR-28-5p and miR-28-3p have distinct effects in colorectal cancer cells. Gastroenterology 2012 142:886–896.

9. 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. Cancer cell 2011, 19: 232-243.

9. Hu J, Cheng Y, Li Y, et al. microRNA-128 plays a critical role in human non-small cell lung cancer tumourigenesis, angiogenesis and lymphangiogenesis by directly targeting vascular endothelial growth factor-C. European Journal of Cancer 2014, 50: 2336-2350.

10. Wu Z, Lu H, Sheng J et al. Inductive microRNA-21 impairs antimycobacterial responses by targeting IL-12 and Bcl-2. FEBS Lett 2012 586: 2459–2467.

11. Ma F, Xu S, Liu X, Zhang Q, Xu X, et al. The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon-gamma. Nat Immunol 2011, 12: 861–869.

12. Jin M, Zhang T, Liu C, et al. miRNA-128 suppresses prostate cancer by

101

Inhibiting BMI-1 to inhibit tumor-initiating cells. Cancer research 2014, 74: 4183-4195.

13. Zhu Y, Yu F, Jiao Y, et al. Reduced miR-128 in breast tumor–initiating cells induces chemotherapeutic resistance via Bmi-1 and ABCC5. Clinical Cancer Research 2011, 17: 7105-7115.

14. Dynan W S, Tjian R. The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. Cell 1983, 35 79-87.

15. Dynan W S, Tjian R. Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II. Cell 1983, 32: 669-680.

16. Dynan W S, Tjian R. Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins. 1985.

17. Briggs M R, Kadonaga J T, Bell S P, et al. Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. Science, 1986 234: 47-52.

18. Kadonaga J T, Carner K R, Masiarz F R, et al. Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. Cell, 1987, 51: 1079-1090.

19. Bouwman P, Philipsen S. Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. Molecular and cellular endocrinology, 2002, 195: 27-38.

20. Safe S, Abdelrahim M. Sp transcription factor family and its role in cancer.

European Journal of Cancer, 2005, 41: 2438-2448.

102

21. Hosoi Y, Watanabe T, Nakagawa K, et al. Up-regulation of DNA-dependent protein kinase activity and Sp1 in colorectal cancer. International journal of oncology, 2004, 25: 461-468.

22. Kitadai Y, Yasui W, Yokozaki H, et al. The level of a transcription factor Sp1 is correlated with the expression of EGF receptor in human gastric carcinomas. Biochemical and biophysical research communications, 1992, 189: 1342-1348.

23. Chiefari E, Brunetti A, Arturi F, et al. Increased expression of AP2 and Sp1 transcription factors in human thyroid tumors: a role in NIS expression regulation. BMCcancer, 2002, 2: 1.

24. Shi Q, Le X, Abbruzzese J L, et al. Constitutive Sp1 activity is essential for differential constitutive expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic adenocarcinoma. Cancer research, 2001, 61: 4143-4154.

25. Guan H, Cai J, Zhang N, et al. Sp1 is upregulated in human glioma, promotes MMP‐2‐mediated cell invasion and predicts poor clinical outcome. International Journal of Cancer, 2012, 130: 593-601.

26. Kumar A P, Butler A P. Enhanced Sp1 DNA-binding activity in murine keratinocyte cell lines and epidermal tumors. Cancer letters, 1999, 137: 159-165.

27. Wang L, Wei D, Huang S, et al. Transcription factor Sp1 expression is a significant predictor of survival in human gastric cancer. Clinical Cancer Research, 2003, 9: 6371-6380.

103

28. Yao J C, Wang L, Wei D, et al. Association between expression of transcription factor Sp1 and increased vascular endothelial growth factor expression, advanced stage, and poor survival in patients with resected gastric cancer. Clinical Cancer Research, 2004, 10: 4109-4117.

29. Cai G M, Huang D H, Dai Y Z et al. Analysis of transcriptional factors and regulation networks in laryngeal squamous cell carcinoma patients with lymph node metastasis. Journal of proteome research, 2011, 11: 1100-1107.

30. Shin J, Kim J J, Choi E S, et al. In vitro apoptotic effects of methanol extracts of Dianthus chinensis and Acalypha australis L. targeting specificity protein 1 in human oral cancer cells. Head & neck, 2013, 35: 992-998.

31. Skog M, Bono P, Lundin M, et al. Expression and prognostic value of transcription factor PROX1 in colorectal cancer. British journal of cancer, 2011, 105: 1346-1351.

32. Kolesnikoff N, Attema J L, Roslan S, et al. Specificity Protein 1 (Sp1) Maintains Basal Epithelial Expression of the miR-200 Family IMPLICATIONS FOR EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289: 11194-11205.

33. Nam E H, Lee Y, Park Y K, et al. ZEB2 upregulates integrinα5 expression through cooperation with Sp1 to induce invasion during epithelial-mesenchymal transition of human cancer cells. Carcinogenesis 2012: bgs005.

34. 王丽杰，史晓宇，周建华. 转录因子Sp1及其与肿瘤的关系. 实用肿瘤

104

学杂志, 2008, 22: 478-480.

35. Lietard J, Musso O, Theret N, et al. Sp1-mediated transactivation of LamC1 promoter and coordinated expression of laminin-gamma1 and Sp1 in human hepatocellular carcinomas. The American journal of pathology, 1997, 151: 1663.

36. 安建光，宋丽. C-fos蛋白, Sp1蛋白在肝硬化，肝癌组织中的表达及意

义. ft东医药, 2009: 112-113.

37. 潘奇，朱凯，陈万勇，等. 转录因子Sp1 表达与肝癌临床病理特征及预后的关系. 中国肿瘤临床, 2014, 41: 1284-1287.

38. 潘奇， 王鲁， 孙惠川， 等. 转录因子Spl 在肝癌细胞VEGF 表达调控中的作用. 中国临床医学, 2007, 14: 487-490.

39. 冯洁，汤正好，臧国庆，等. KLF6, Sp1 蛋白在肝癌， 肝硬化组织中的表达及意义. 胃肠病学和肝病学杂志, 2008, 17: 148-151.

105

## 综述

MicroRNA在肿瘤的中研究进展

**1. microRNA的发现、结构和特点**

Lee等人[1]在1993年的时候，首次在秀丽新小杆线虫体内发现一种小分子RNA: lin-4，该小分子RNA不编码蛋白质，可是却能调控其胚胎后期发育的基因表达。Reinhart[2]等人在2000年的时候在研究线虫的发育调控时发现了第二种miRNA: Let-7，紧接着后来，在果蝇、线虫、细菌、斑马鱼、植物和人体中相继发现大量miRNA的编码基因，接着的进一步研究证实：miRNA主要是通过调控其靶基因的mRNA，以在转录后水平调控靶基因的蛋白表达，最近也有报道提示：miRNA也能在转录水平调控基因表达

[3]. 成熟的MicroRNA（miRNA）是一组天然的非编码的小分子RNA，长度约为二十一到二十五个核苷酸。它是部分互补的一个或多个的信使核糖核 酸（mRNA）的分子，定位于RNA前体的3’端或者5’端，主要功能是在以各种方式下调基因的表达，其中包括翻译抑制、mRNA 的裂解和脱腺苷酸。

miRNA在物种进化中很保守，miRNA的表达有很严格的组织特异性和表达时序性，在组织发育和机体细胞生长过程中miRNA起多种作用，其作用有调控细胞的增殖、分化、凋亡，还有神经元发育，染色体修饰和脂肪代谢等多个过程[4]。

**2. MicroRNA 的生物合成过程及参与该过程的酶和蛋白**

106

成熟的miRNA分子比基因编码的miRNA短很多。已证实许多miRNA位于其作用的mRNA前体宿主基因的内含子中，而且，miRNA和其作用的mRNA共享调控元件、初级转录物，并且它们拥有相似的表达谱。其余的miRNA基因从自己的启动子转录，少量的初级转录物已被完全确定了。microRNA由RNA聚合酶II转录的的大RNA前体被称为Pri-mi RNA，包括一个5'帽和poly-A尾。仅有几个病毒的基因经转录生成的Pri-miRNA具有RNA聚合酶Ⅲ的转录特征。miRNA的生物合成过程图20所示：首先，编码的基因在细胞核内通过RNA聚合酶II的作用转录而形成初级转录物：pri-miRNA，紧接着在RNsae III家族酶核-糖核酸酶Drosha的共同作用下初级转录物被剪切成为长度约60-70nt并具有垄环结构的前体：pre-miRNA。随后，pre-miRNAs由Exportin 5和Ran-GTP形成的复合物转运出细胞核进入胞浆[5, 6]。Ran(ras相关核蛋白)是一个RAS超级家族的小GTP结合蛋白，

Ran在RNA和蛋白质经过细胞核孔的运输过程中的作用是不可或缺的。Ran

GTP酶结合Exportin 5，然后和Pre-miRNA形成了一个核异三聚体。pre-miRNAs进入在细胞浆后经Dicer加工生成两条成熟的miRNAs[7] 。

Dicer含有的200kDa的巨大蛋白质，其含有ATP酶/RNA解旋酶，有一个

DUF283域（未知功能域）和一个PAZ域（包含Piwi, Argonaut和Zwille）能结合特异性的双基3’突出的miRNA和siRNA,还有2个催化作用的RNase

Ⅲ域(RⅢa和RⅢb)和一个C端双链RNA结合域（dsRBD）。Dicer分子内二聚体的两个核糖核酸酶III域有一个单一的加工中心。每个核糖核酸酶域独立切割RNA链的复式2-NT 3'的突出。除了从Pre-miRNA剪切出miRNA外，Dicer酶也加工dsRNA至siRNA。

107



**图20** **MicroRNA生物合成过程示意图**

**3. MicroRNA的作用机制**

大部分成熟miRNA以RISC复合体形式结合靶mRNA而调控其基因表达。在哺乳动物中，miRNA和其靶mRNA完全匹配的现象是非常罕见的，但是

miRNA中只要有6bp的碱基和靶mRNA的5′端互补结合后，就可发挥其调控作用[8-9]，miRNA和靶mRNA的作用方式有两种：一是两者完全互补配对，形成dsRNA,即通过AGO-2介导的核苷酸内切酶降解mRNA，这个作用过程类似于RNAi。第二种情况：当miRNA与靶mRNA不完全配对时，miRNA和靶mRNA的3′端非编码区部分结合，通过腺苷脱氨酶和核酸外切酶抑制mRNA翻译成蛋白质[10]。miRNA的调控机制依赖于和靶mRNA的互补程度，miRNAs一般被转录成初级产物，然后成为多个独立的成熟miRNAs，一个miRNA能和多个不同的靶mRNA作用，而同时，一个mRNA又可能受多个miRNA的调控

[11]. 举个例子，miRNA-26a在HCC中高表达，体外实验证明：miRNA-26a

108

可通过和其靶蛋白cyclin D2和cyclin E2作用，使它们低表达来抑制肿瘤细胞的增殖和引起肿瘤细胞特异性凋亡。miRNA-26a在肝癌的发生发展过程中起抑癌基因的作用。然而，在胶质瘤中的体外研究证实：在体外，miR-26a能够促进胶质瘤细胞的增殖，在小鼠胶质瘤模型中，miR-26a通过下调靶基因PTEN、Rb1和MAP3K2/MEKK1蛋白的表达和增加AKT的活性来促进肿瘤细胞增殖和降低细胞凋亡，因此相反，miR-26a在胶质瘤中发挥的是致癌癌基因的作用。人体内约60%的mRNA可受到miRNA调控[12]，最近的研究研究表明：miRNA复合体也能作用于非编码RNA，使其对其自身反馈调节[13]，miRNA在协调基因编程功能中的作用是必不可少的[14]，在蛋白质的生物合成过程中的微调作用非常广泛。

4. **MicroRNA 的调控特点**MicroRNA的调控方式迅速、高效，且调节存在可逆性，是基因组极为

重要的一环。由于在动物中，miRNA与靶mRNA之间的不完全配对使得任何一个miRNA都有可能作用于不同的mRNA,而一个mRNA也有可能受多个不同

miRNA的调节，这使人们通过miRNA来调控动物基因的表达的意义更为显著。同时，miRNA 也具有自我调节功能，能够调控自身的合成和功能。还有它所形成的翻译抑制在某些条件下可逆。miRNA 在很多重要的细胞内信号通路中表现出杰出的调控能力，例如细胞生长、分化和凋亡。尽管如此，在 很多试验里对苍蝇和蠕虫进行特定的miRNA进行基因敲除并没有显示出显著的生长和发育的缺陷。但是当环境条件产生变化后，那些由于敲除了某 种特定miRNA所产生的缺陷终于显现出来。这提示了MicroRNA能够在维持

109

细胞稳态上具有一定的作用，并且在环境产生变化时进行微调整。因此当miRNA调控产生变化时，能够产生诸如癌症、心肌疾病和其他一些疾病的病理变化就并不让人感到吃惊了。这些miRNA对于靶基因所产生的调控变化既有可能是miRNA变化的结果，也有可能是目的基因逃离了miRNA的调控。并且越来越多的实验结果表明microRNA不但能参与到病理变化的调控中去，也具有调控细胞生理学几乎所有方面的功能和潜力。

**5. microRNA与肿瘤的发生和发展**

（1）microRNA与致癌机制

microRNAs通过与靶mRNAs的碱基互补配对来直接抑制基因的表达，因此microRNAs可通过一些可能的机制来影响肿瘤的发生。对于过表达、增强或者缺失沉默一些编码miRNA的基因，而这些miRNA又可靶向调控一个或多个抑癌基因，这样势必会影响一些抗肿瘤通路的活性。而相对应的，缺失或者沉默一些抑制一个或多个致癌基因的表达的miRNA，将会导致致癌基因蛋白的表达，从而增加肿瘤发生的可能。一些可引起成熟miRNA序列改变的微小突变也可以减少或者消除它们和靶基因的结合甚至大大地改变它们的特异性，从而影响一些关键的调控蛋白的平衡增长。与miRNA配对的靶向mRNA的序列也有可能存在突变的点，从而使它们不受该miRNA的调控或者受其他miRNA调控（如图21所示）。尽管目前只有一些可能与肿瘤相关的机制被证明，但是在过去六年内关于microRNA与肿瘤发展的报导一个接着一个。这些研究从基因组的鉴别，在癌症中影响microRNA的基因表

110

达的改变到转基因小鼠肿瘤模型的研究。综上所诉，这些研究提供了一个让人可信的事实-从miRNA到mRNA之间的改变可以影响肿瘤的发展。

由于编码蛋白的基因与肿瘤相关，因此关于miRNAs与肿瘤发生最令人信服的证据来自于在肿瘤细胞中的基因改变。最开始的研究来自于Carlo Croce et al.,他们的研究验证可一对相邻的miRNAs经常在慢性淋巴细胞白血病（CLL）的病人中缺失[15]。到目前为止同样有许多研究表明miRNA在肿瘤中缺失或过表达。此外，在正常组织和肿瘤组织中比较miRNAs表达的研究揭示了miRNAs的激发性生长方式（如一些miRNAs的反复过表达或者低表达），有些甚至与microRNA基因的甲基化联系起来[16]。在肿瘤细胞株或者老鼠肿瘤模型中的功能性研究为这些microRNAs亚群在肿瘤发生中直接作用提供了进一步的证据。与microRNAs领域作为一个整体相似，对于这些肿瘤相关microRNAs的靶点的发现仍然非常不足，但同样的，对于一些候选的靶点的发现在最近有了新的进展。



**图21** **microRNAs序列改变和肿瘤的关系**

（2）microRNA作为致癌基因

microRNAs 在肿瘤中增强或过表达可以作为致癌基因的存在，而且一些

111

公认的致癌microRNAs已被提出[17]。如miR-155被证明在一些造血系统恶性肿瘤以及乳腺癌，肺癌及胰腺癌[18]。在microRNAs被发现之前，作为一个常见的在由禽类白血病病毒引起的淋巴瘤中的原病毒DNA插入点，编码miR-155转录的基因已被证实存在。在BIC基因已被证明和Myc一起联合诱发造血系统肿瘤之后，明显的阅读框架缺失仍然是BIC基因（开始的命名）中一个令人费解的点。尽管能观察到BIC RNA能形成广泛的二级结构（包括一个由145个碱基形成的茎环结构，据我们所知是miR-155的前体）提示了该RNA可以作为致癌因素[19]，但是具体机制一直不明直到miR-155的作用被验证出来。对于在转基因小鼠模型中验证获得或缺失miR-155的等位基因为其生理和致癌特性提供了有价值的证据。miR-155在小鼠骨髓中的异位表达已被报导可以诱导多克隆的前B细胞的增殖，紧接着产生成熟B细胞型白血病[20]或者髓样增生[21]，这两者取决于推动转基因表达的系统。尽管miR-155对于正常的T细胞或者B细胞的发育是可有可无的，但miR-155缺失的小鼠会有B细胞或者T细胞的缺少[22, 23, 24]。特别是这些小鼠表现出对胚胎中心B细胞反应的降低和产生免疫反应后IgM反应的缺失，并伴随着T细胞依赖性抗原或者非依赖性抗原（IgM是正常的）。这些结果表明了miR-155在产生同型转换高亲和性的抗体过程中起着重要的作用。在这些miR-155靶点中可能调节其功能的是激活诱导型胞嘧啶核苷脱氨酶，它通过促进体细胞突变和促进在B细胞中的分类开关的重新组合使得免疫球蛋白多元化。两个小组的研究已经证实了AID基因的在3′未翻译区域(3′UTR)中单个miR-155结合位点的突变会部分导致miR-155自身的缺失[25, 26]。在两组研究中，结果都是在胚胎中心B细胞和在抗原刺

112

激下受损的亲和度成熟的过程中，AID的表达增加，但是这种表型重叠仅仅是部分的。尽管分类开关的重新组合在缺少miR-155的老鼠中减少[23, 24]，但是在携带AID变异的小鼠中增加[25, 26]。因此，尽管这些实验证明了

miRNA介导的单个靶点基因调节的缺失可导致很大的生理效应，它们也可以作为一些可能是由于许多靶向基因的的同时失去控制导致的缺失miRNA而引起的结局的标记。

另一个很重要的致癌microRNAs家族的成员是miR-17~92亚群[27]。该亚群包含了6个从一种单一的初级的转录中产生的miRNAs，基于该亚群能映射到染色体的一个经常在人类B细胞淋巴瘤的子集[28]中增强或者在大量的其他癌症中过表达的区域，所以它最初被认为与癌症相关。在一个重要的研究miR-17~92致癌可能性的体内研究，He等人[29]证实了一个缩短的亚群（缺乏远端miRNA，miR-92）可协同c-Myc和大大地在B细胞淋巴瘤老鼠模型中促进肿瘤的发生。尽管miR-17~92失去调控在本质上并不足以引起肿瘤的发生，但是在淋巴细胞祖细胞中过表达该亚群的转基因小鼠中，可以引起淋巴增值性失调疾病并影响B或者T细胞，最终导致自身免疫[30]。相反，携带miR17~92位点的删失的纯合子呈现出在pro-B/pre-B时期B细胞的过早死亡，从而导致淋巴细胞减少症[31]。尽管受miR17-92调控的全部基因谱仍然还不清楚，但是，前凋亡基因Bim，极有可能在

miR17~92裸鼠和在miR17~92转基因老鼠中调节B细胞表型的[30, 31]。Bim是B细胞生存的关键调节器，同样也是在B细胞淋巴瘤的Eµ-Myc模型中一个可能的抑癌基因[32]。它的3′UTR端包含多个由miR-17~92编码的

miRNAs的结合位点。与Bim作为miR-17~92的一个直接的靶点一致，它的

113

在miR-17~92裸pre-B细胞中的表达增加，而在过表达miR-17~92的小鼠的B细胞表达减少。因此有可能miR-17~92抑制了Bim来介导过表达miR-17~92引起的促肿瘤活性和对于B细胞发展的生理性功能调节。

缺乏miR-17~92小鼠的研究分析为我们对于这个亚群同样提供了线索

[31]，缺少miR-17~92的小鼠明显比野生型的小鼠小很多，存在着严重的肺发育不全，不完全封闭的室间隔，以及在出生后的几分钟就死亡。肺发育不全非常有意思，随着miR-17~92过表达和偶尔靶点的增强已经在人类肺癌中报导过[33]。肺发育不全的机制目前还不是特别清楚，但是减少的细胞的增殖可能起了一定的作用。与这个假设一致，在肺特异性的启动子的引导下的miR-17~92的表达，将在体内导致肺上皮细胞的增殖和分化[34]。

（3）microRNA作为抑癌基因

一些microRNAs已经被发现是抑癌因子根据它们在人类肿瘤中删失或者低表达的特点。除了这些特点，一些研究这些microRNAs的在宿主动物模型身上功能性实验的同样验证了他们过表达可以抑制肿瘤细胞的增殖或者诱发肿瘤细胞凋亡。在研究中被发现的具有抑癌作用microRNAs 和

microRNAs家族有非常非常多[17]，在以下我们只描述其中的一些。miR-15a~16-1家族最近被发现是人们长期探索的抑癌因子，在染色体13q14上。在大多数的慢性淋巴细胞白血病、一些类型的套细胞淋巴瘤和前列腺癌中该染色体区域通常被发现是缺失的[35]。有许多强有力的证据可以证明miR-15a~miR-16-1是真正的抑癌因子。miR-15a~16-1被发现在慢性淋巴细胞白血病中呈最低程度的删失[35]，随即观察到在极少的慢性淋巴细

114

胞白血病患者中pre-miR-16-1的序列下游的胚系突变（单个碱基的改变）

[36].该突变和miR-16-1的减少有关，有可能是由于RNA前体生成的效率降低，仍然需要大量的进一步的研究来证实这是否是一个诱发肿瘤的突变。有趣的是，在新西兰黑鼠种群中观察到该种群特别容易发生一种B细胞淋巴增值性疾病，与人类慢性淋巴细胞白血病相似，pre-miR-16-1的一个碱基的改变和B细胞淋巴增值性疾病的发生发展相关[37]。miR-15a~16-1的抑癌作用可不仅仅在B细胞中体现，超过50^%的前列腺癌也发现存在13q14区域的删失。相应的，最近的一项研究表明miR-15a and miR-16的活性可导致小鼠模型中前列腺的增生以及在体外细胞培养实验中前列腺细胞的生 存，增殖及侵犯[38]。同样在这个研究中，通过加入miR-15a和miR-16-1可抑制前列腺异种移植瘤的例子可证实该亚群有可能存在着治疗该疾病的 能力。尽管这两个microRNA的靶点是什么仍然不清楚，但是受miR-15a和miR-16-1调控的致癌基因有BCL2, cyclin D1和WNT3A。

研究得最多的基因当属let-7家族的成员[38]。该人类基因组包括let-7家族中12个成员，分布在8个不同的位点[(http: //microrna. sanger. ac. uk/sequences/mirna\_summary. plfam](http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/mirna_summary.pl?fam)

=MIPF0000002）。第一个let-7家族的成员是在秀丽影杆线虫中发现的，它们可在秀丽影杆线虫从幼虫到成虫的过程中诱导细胞循环终止和一种特殊 细胞类型的最终分化。和许多抑癌基因可以抑制肿瘤的发展一样，let-7经常在肺癌中被发现以及和肺癌预后较差有关[39]。除此以外，在各种不同 的肿瘤中存在着各种染色体位点let-7基因的缺失。let-7可直接被c-Myc基因抑制[40]而且他们的前体RNA的进一步加工受lin-28的抑制[41, 42]。

115

在功能上let-7可抑制致癌基因Ras家族的成员[43]和致癌基因HMGA2家族的成员[44, 45]甚至c-Myc本身[46]。致癌基因的突变可影响microRNA的结合位点最好的例子就是HMGA2基因的易位可移除与功能性的let-7配对的序列，从而导致致癌蛋白的过表达[41, 42]。最后，在乳腺癌和肺癌的小鼠模型中let-7 microRNAs的过表达可抑制肿瘤的发展[47, 48]。到目前为止仍然没有任何一个关于let-7家族成员的小鼠基因敲除研究，看来要确定在小鼠模型中let-7 的缺失是否会致癌还需要一段时间。

最近也有关于microRNAs受抑癌基因调控的研究。这些研究都专注于

microRNAs被一个通常在人类肿瘤中被抑制的基因-P53[49]。通过这些研究鉴定出miR-34家族是p53的一个重要的介导因素。miR-34家族由三个高度相关的microRNAs组成，这三个microRNAs由两个不同的位点表达：miR-34a表达于染色体1p36而miR-34b/miR-34c表达于染色体11q23。这两个位点的转录都直接由p53和在各自的启动子中的保守位点结合来调控。类似于p53, miR-34自身的表达可诱导细胞循环的停止或者凋亡。miR-34b/miR-34c已被报导过在乳腺癌和肺癌细胞系是低表达的。此外，miR-34a位于1p36,该区域在人类神经母细胞瘤和很多其他肿瘤中是半合子删失。有趣的是，该区域包含另外一个抑癌因子-CDH5, CDH5通过p19Arf来诱导p53表达。因此，1p36的删失可同时影响上游和下游的p53通路。

**6. microRNA靶基因的预测**

miRNA的5’端有一个区域，被称为“种子区域”，该区域以核苷酸2-7为中心。按照沃森克里克原则，和mRNA目的位点进行配对的种子区域是对

116

miRNA作用位点预测的最重要的因素。很多高效的miRNA靶点的预测工具按照这个原则已发展形成并且可以严格地按照要求配对。它不仅可以明显降低假阳性率而且有利于在沃森克里克原则配对下去迎合miRNA的核苷酸1。经过分析后发现：该特征在脊椎动物中相对较保守。而且已有许多研究证据可证明那些部分和位点1相配对[50, 51]。很多的miRNA的靶点有一个

7nt的配对。因此，有可能在核苷酸2-8处构建了沃森克里克配对，也有可能在核苷酸2-7处联合位点1处完成配对。种子位点非常重要的原因，与

miRNA和沉默复合物的结合的方式非常相关。有效的配对方式是：RISC 和

mRNA的核苷酸2-8结合后，可以重新组织mRNA的A螺旋结构。但其他的配置方式仅能形成较低的亲和效率[52, 53]。

虽然在各种群中，保守的结合位点更像是要维持一定的功能，但这些位点仍然是miRNA可能的潜在靶点。在预测程序中利用这些保守的位点序列可明显降低假阳性率。不同的预测方案，有时用有略微不同的保守位点 来定义。在多个基因组同源位置中所保留下来的序列通常认为是保守位点，这些序列必须精准的出现在3’-UTR序列的相同位置。然而也有小部分保守位点可在序列中的非校正位置中找到[54]。

另一个识别靶基因的方法是需要考虑热力学的稳定性。比较常用的一个参数是miRNA的双链自由能。在两条互补的RNA进行杂交时，该能量发挥作用。已经配对的双链RNA中的自由能越低，那么，若要破坏这个双链结构，则需要越多的能量。由此可知，一个双链RNA若要在热力学中达到一个更为稳定的状态就意味着miRNA和mRNA的结合能力较强，这需要自由能较低才能实现。若miRNA和mRNA结合后具有较高的亲和力，那么形成的

117

这条双链则具有较低的自由能。

另一个要考虑的因素，是结合的位点的可达性。mRNA的二级结构起到了非常重要的作用。在mRNA的立体构象中，其结合位点必须可以到达，即要求这个位点必须是打开状态且没有和mRNA自身的其他位点相连接[54, 55]。

现公认的是目的位点序列和UTR阅读框共同决定一个mRNA是否可成为某miRNA的靶标[56, 57]。这要求该位点必须位于3’UTR离终止密码碱基最少有15nt的距离外。在长UTR中目的位点不应该在中间，这是由于在这个位置中，不容易到达沉默复合物。必须强调的是局部AU含量高的地方由于拥有一个更为脆弱的二级结构，因此它可以增长目的位点的可结合性，以上的假说均在同源3’-UTR的7-mers的保守性分析中证实[58]。

共表达的miRNA的相邻的结合位点可以提高位点的效率。因为两个位点能够出现紧密合作。这说明在两个结合位点在大于8nt和小于40nt的距离内可引起一个比预期的普通的多点相乘更大的反应[59]。

一些生物信息学的预测软件在上述的预测原理的基础上被开发出来。它们被用作预测miRNA的作用位点。不同的软件各有侧重并可以实现大部分预测结果的资源共享。这些软解预测可提供快捷、高效和直观的预测结果。预测靶基因可通过靶基因的已知功能推测miRNA的功能概况。

植物的miRNA几乎和靶mRNA完全匹配，这使得植物的靶基因预测具有很大的优势和较高的准确率。到目前为止，已知的植物miRNA的靶基因大多数是在分化和发育过程中可够起到重要作用的转录因子。但是要预测动物的靶基因比植物要难得多，由于动物的miRNA与其mRNA之间的互补配

118

对程度较低，使得出现假阳性的可能性大大增加。在哺乳动物中，预测出的靶基因仅有很少的一些是转录因子，而预测出的靶基因分子种类相当广泛，这说明了哺乳动物的miRNA可在更的生理过程中起作用。现有的预测系统并不能够轻易的准确报告出某种表型的目的基因，而是应基于先验知识可能涉及的生物通路，在程序列出的数以百计的靶基因中选择数个目的基因，并加以进一步的学习和验证。更为重要的是，尽管现有的预测工具能帮助我们寻找miRNA的目的基因，它们却始终缺乏敏感性和特异性[60]

。因此通过实验来验证目的基因非常重要。

**7. microRNA与肿瘤的诊断**

要攻克肿瘤，很大程度上依赖于可否明确肿瘤发生发展的机制来寻找早期发现的手段和肿瘤标志物。检测miRNAs简单无创且易于操作，已在高危人群的筛选和临床诊断以及随访等多方面普遍使用，新的肿瘤生物标志物在实验室技术的日趋成熟下不断增加，近年来研究的热点，是从基因水平出发，用先进的实验室手段对肿瘤基因组直接测序并将其和相应正常组织基因的对比来从疾病源头筛选出异常的分子，其具有更早期，更精确等优势，近年来，循环miRNA的研究重点也围绕着miRNA是否可以成为肿瘤标志物来展开，有研究[61]表明：在miRNA形成过程中，pre-miRNA被运送到胞浆中，少部分pre-miRNA被多囊体包裹或与RNA-binding蛋白等的结合形成核酸-蛋白复合体并外排颗粒的形式转运出细胞，从而进入循环系统且在血浆中稳定存在。因此，要作为肿瘤标志物，循环miRNA理论上更具有优势，循环miRNA的特异性及敏感性都优于既往的肿瘤标志物，同时，

119

循环miRNA和肿瘤早期发生的相关，因此其表达水平和肿瘤负荷有关。举个例子，循环miRNA-21，是食管鳞状细胞癌的肿瘤标志物[62]，miR-223, miR-21和miR-218，为早期胃癌的敏感标志物，其中miR-223在Hp感染人群中的表达明显高于其在健康人群中的表达[63]。Taylor等人的研究[64]表明：通过在不同分期卵巢癌和良性卵巢病变患者血清的比较分析中，发现有8种miRNA出现异常增高（miR-21、miR-141、miR-200a、miR-200c、miR-200b、miR-203、miR-205、miR-214），并且发现miRNA的异常高表达和肿瘤的恶性程度存正相关，提示miRNA的表达水平有助于区分异常的组织分化信号，这种简单且无创的操作，在无症状高危人群中作为标志物筛选是完全可行的。最近的研究表明：不仅仅是血浆中的 miRNA，粪便中的

miRNA在筛查一些无症状肿瘤的价值也已被证实，举个例子，如miR-21和miR-106a可作为早期结直肠癌的肿瘤标志物[65]，而miR-181b和miR-210可以作为胰腺癌的肿瘤早期筛选分子[66]。

**8. microRNA与肿瘤的预后**

目前，肿瘤预后差的主要指标是复发和转移，有研究提示：miRNA在参与肿瘤细胞的增殖，凋亡以及远处转移等过程中都发挥着重要的作用，与此同时在肿瘤术后，循环miRNA表达水平也会出现明显的变化，这提示miRNA具有一定评估肿瘤预后的价值。在Yu等人的研究[67]中，他们将甲状腺乳头状癌患者的血浆和良性病变以及健康者的血浆对比分析后发现：Let-7e, miR-151-5p和miR-222的表达水平明显上调，并且发现血浆let-7e, miR-151-5p和miR-222和许多临床病理特征如明显相关，以及术后患者血

120

浆miR-151-5p和miR-222的表达明显下调，提示检测血浆miRNA的表达水平能有效评价甲状腺乳头状癌的侵袭能力及检测肿瘤生长状态。在Võsa等人的研究中[68]，他们用基因芯片分析了33例早期非小细胞肺癌和27例癌旁正常组织的miRNA表达谱，结果发现肺癌组织与正常肺癌组织相比有

39种miRNA表达上调以及33种miRNA表达下调，结果表明这些miRNA在细胞的生长过程中起到关键作用。在Zhu等人的研究中[69]发现miR-183家族(miR-96, miR-182和miR-183)在肺癌组织和血清中均显示表达上调，miR-183家族表达上调和患者预后差显著相关。Barrett's食管是食管癌的癌前病变，是食管癌的高危人群，而目前临床上存在过度治疗的倾向，但 是，早期监测癌变才是正确治疗的关键。在Nguyen等人的研究中[70]，他们利用RT-PCR技术检测了58例Barrett's食管患者以及35例食管腺癌患者的炎症基因和miRNA的表达水平，结果表明IFN-γ，IL-1α, IL-8, IL-21, IL-23等炎症因子是患者预后差的指标，并将其命名为炎症风险指数，进一步的研究发现这些炎症因子的表达上调和miRNA-375密切相关，联合

IRS/miR能用来监测Barrett's食管癌变的可能性，这同时也是Barrett's食管的重要的预后指标之一。我国中ft大学肿瘤防治中心的研究人员的研究中[71]，他们对鼻咽癌的miRNA表达谱进行分析并发现41个miRNAs在鼻咽癌和非癌性组织间的表达有统计学差异，其中有5个miRNAs标记均与患者无瘤生存期显著相关，结果提示这5个miRNAs可结合TNM分期提供更全面的预后评价来指导临床，从而制定更有效的治疗方案。前列腺癌复发后的治疗是临床中比较棘手的问题，因此早期监测复发高危因子以给予及时的干预治疗是治疗的关键。在Schaefer等人的研究中[72]，他们用微阵

121

列和qRT-PCR分析了76例前列腺癌切除标本，结果发现：和正常癌旁组织相比，10种miRs(hsa-miR-16, hsa-miR-31, hsa-miR-125b, hsa-miR-145, hsa-miR-149, hsa-miR-181b, hsa-miR-184, hsa-miR-205, hsa-miR-221, hsa

-miR-222）表达下调，同时5种miRs(hsa-miR-96, hsa-miR-182, hsa-miR-182, hsa-miR-183, hsa-375)出现表达上调。进一步分析发现： hsa-miR-96和术后复发风险性密切相关，该结果为前列腺癌的早期诊断和术后评估提供了新的潜在的评估因子。在Yoon等人的研究中[73]，他们分析了115对肝癌术后标本和癌旁组织以及21例正常肝组织，结果发现四种miRNAs（miR-221、miR-222、miR-21和miR-155）的异常调节和肝癌的发生明显有关，其中，miR-221表达水平的变化可作为术后复发和远处转移的评估指标。

**9.对未来的展望**

尽管最近的研究取得了显著的突破，但是关于microRNA和肿瘤关系的领域的研究还处于初级阶段，而且许多重要的问题还有待解决。除了在小鼠身上异位表达时可诱导B细胞白血病的形成的miR-155在前面讨论过以外，到目前为止没有任何的致癌基因被报导它们自身就可以导致肿瘤的发生。同样地，许多microRNAs根据它们在肿瘤中反复的删失或者沉默或根据它们在细胞系中的沉默生长效应可定义它们为肿瘤抑制因子，然而目前为止极少有这样的因子在小鼠模型中验证过。没有证据证明不代表客观不存在，这很客观地反映了该领域正在初期阶段和反映了对其复杂性以及对多个功能性相关基因的靶向研究的需求。类似的，对于miRNA的识别和验

122

证的研究目前正在一步步推进，但我们在总体上对于受microRNA尤其是肿瘤相关的microRNA调控的细胞循环知道的仍然很少。我们并不能指望一个或几个mRNA就可以解释一些特殊的microRNA甚至microRNA家族的特性。更有可能的是，它们的效应可能是调控属于多个通路的多个靶向因子的网络式的作用。随着研究的揭开从而对癌症基因组的重新排序，miRNAs的作用将有可能揭示miRNAs和在蛋白编码基因中它们的靶向序列的变异频率

（虽然后者需要更多的3′UTR的特定分析）。与此同时，更精致的体内模型将有助于鉴定出microRNA和microRNA家族致癌和抑癌的特性。同时，用改进的实验和计算方法来鉴定microRNA的靶基因将会提供给我们对其机制以及它们调控的通路以更全面的认识。到目前为止仍然很难评估这些发现所能带来的影响。随着正在开发的调控microRNA活性的药理手段[74]，这对于判断microRNAs肿瘤对于肿瘤的维持和转移的重要性将有可能提供新的治疗途径。这个特殊的发现对于我们对基因调控的理解已产生巨大的影响。尽管仍然没有一个肿瘤标志物，microRNA的功能与调控的变化将作为癌症发病机理中重要的一环而很快被发现。在不久的将来，它们也将影响着如何治疗这些疾病。

123

参考文献

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

[2]. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21 nucletide let-7 RNA regulates developmental timing in caenorhabditis elegans1. Nature, 2000, 403: 901-906.

[3]. Li C, Yue J, Huang X et al. MiR-21 and miR-101 regulate PLAP-1 expression in periodontal ligament cells. Mol Med Report. 2012, 5: 1340-1346.

[4]. Griffiths-Jones S, Saini H. K, Dongen SV et al. mi RBase: tools for micro RNA genomics. Nucleic Acids Res 2008, 36: 154-158.

[5]. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. Rna 2004; 10: 1957-66.

[6]. Winter J, Jung S, Keller S et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. Nature cell biology 2009; 11: 228-34

[7]. Han J, Lee Y, Yeom KH et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. cell 2006; 125: 887-901.

[8]. rennecke J, Stark A, Russell RB, et al. Principles of micro RNA-target recognition. PLoS Biol 2005, 3: 404-418.

[9]. Lai EC, Tam B, Rubin GM. Pervasive regulation of Drosophila Notch target genes by GY-box-, Brd-box-, and K-box-class micro RNAs. Genes Dev 2005,

124

19: 1067-1080.

[10]. Krol J, Loedige I, Filipowicz W, et al. The wide spread regulation of micro RNA biogenesis, function and decay. Nat Rev Genet2010, 11: 597-610.

[11]. Bartel DP. Micro RNAs: Target recognition and regulatory functions. Cell, 2009, 136: 215-233.

[12]. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of micro RNAs. Genome Res 2009, 19: 92-105.

[13]. Dimitrios G, Zisoulis, Zoya S, et al. Autoregulation of micro RNA biogenesis by let-7 and argonaute. Nature, 2012, 486: 541-544.

[14]. Brown JW, Marshall DF, Echeverria M, et al. Intronic noncoding RNAs and splicing. Trends Plant Sci 2008, 13: 335-342.

[15]. Calin G A, Croce C M. MicroRNAs and chromosomal abnormalities in cancer cells. Oncogene, 2006, 25: 6202-6210.

[16]. Saito Y, Jones P M. Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells. Cell cycle 2006, 5: 2220-2222.

[17]. Medina P P, Slack F J. microRNAs and cancer: an overview. Cell cycle, 2008, 7: 2485-2492.

[18]. Kluiver J, Kroesen B J, Poppema S, et al. The role of microRNAs in normal hematopoiesis and hematopoietic malignancies. Leukemia, 2006, 20: 1931-1936.

[19]. Tam W, Ben-Yehuda D, Hayward W S. bic, a novel gene activated by proviral insertions in avian leukosis virus-induced lymphomas, is likely to

125

Function through its noncoding RNA. Molecular and cellular biology, 1997, 17: 1490-1502.

[20]. Costinean S, Zanesi N, Pekarsky Y, et al. Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in Eμ-miR155 transgenic mice. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 103: 7024-7029.

[21]. O'Connell R M, Rao D S, Chaudhuri A A, et al. Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. The Journal of experimental medicine, 2008, 205: 585-594.

[22]. Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. Science, 2007, 316: 608-611.

[23]. Thai T H, Calado D P, Casola S, et al. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. Science, 2007, 316: 604-608.

[24]. Vigorito E, Perks K L, Abreu-Goodger C, et al. microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. Immunity, 2007, 27: 847-859.

[25]. Dorsett Y, McBride K M, Jankovic M, et al. MicroRNA-155 suppresses activation-induced cytidine deaminase-mediated Myc-Igh translocation. Immunity, 2008, 28: 630-638.

[26]. Teng G, Hakimpour P, Landgraf P, et al. MicroRNA-155 is a negative regulator of activation-induced cytidine deaminase. Immunity, 2008, 28: 621-629.

[27]. Mendell J T. miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and

126

Disease. Cell, 2008, 133: 217-222.

[28]. Ota A, Tagawa H, Karnan S, et al. Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. Cancer research, 2004, 64: 3087-3095.

[29]. He L, Thomson J M, Hemann M T, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. nature, 2005, 435: 828-833.

[30]. Xiao C, Srinivasan L, Calado D P, et al. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes Nature immunology, 2008, 9: 405-414.

[31]. Ventura A, Young A G, Winslow M M, et al. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17∼92 family of miRNA clusters. Cell, 2008, 132: 875-886.

[32]. Egle A, Harris A W, Bouillet P, et al. Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101: 6164-6169.

[33]. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. Cancer research, 2005, 65: 9628-9632.

[34]. Lu Y, Thomson J M, Wong H Y F, et al. Transgenic over-expression of the microRNA miR-17-92 cluster promotes proliferation and inhibits differentiation of lung epithelial progenitor cells. Developmental biology 2007, 310: 442-453.127

[35]. Calin G A, Dumitru C D, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proceedings of the National Academy of Sciences 2002, 99: 15524-15529.

[36]. Calin G A, Ferracin M, Cimmino A, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. New England Journal of Medicine, 2005, 353: 1793-1801.

[37]. Raveche E S, Salerno E, Scaglione B J, et al. Abnormal microRNA-16 locus with synteny to human 13q14 linked to CLL in NZB mice. Blood 2007, 109: 5079-5086.

[38]. Bonci D, Coppola V, Musumeci M, et al. The miR-15a–miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. Nature medicine, 2008, 14: 1271-1277.

[38]. Roush S, Slack F J. The let-7 family of microRNAs. Trends in cell biology, 2008, 18: 505-516.

[39]. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. Cancer cell, 2006, 9: 189-198.

[40]. Chang T C, Yu D, Lee Y S, et al. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. Nature genetics 2008, 40: 43-50.

[41]. Newman M A, Thomson J M, Hammond S M. Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing. Rna, 2008 14:

128

1539-1549.

[42]. Viswanathan S R, Daley G Q, Gregory R I. Selective blockade of microRNA processing by Lin28. Science, 2008, 320: 97-100.

[43]. Johnson S M, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. Cell, 2005, 120: 635-647.

[44]. Lee Y S, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. Genes & development, 2007, 21: 1025-1030.

[45]. Mayr C, Hemann M T, Bartel D P. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. Science, 2007, 315: 1576-1579.

[46]. Sampson V B, Rong N H, Han J, et al. MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. Cancer research 2007, 67: 9762-9770.

[47]. Kumar M S, Erkeland S J, Pester R E, et al. Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. Proceedings of the National Academy of Sciences 2008, 105: 3903-3908.

[48]. Yu F, Yao H, Zhu P, et al. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. Cell, 2007, 131: 1109-1123.

[49]. He L, He X, Lowe S W, et al. microRNAs join the p53 network—another piece in the tumour-suppression puzzle. Nature Reviews Cancer, 2007, 7: 19-822.

[50]. Baek D, Villen J, Shin C et al. The impact of micro RNAs on protein output .

Nature 2008, 455:64-71.

129

[51]. Nielsen CB, Shomron N, Sandberg R et al. Determinants of targeting by endogenous and exogenous micro RNAs and si RNAs. RNA 2007, 13: 1894- 1910.

[52]. Bartel DP. Micro RNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 2004, 116: 281-297.

[53]. Mallory AC, Reinhart BJ, Jones-Rhoades MW et al. Micro RNA control of PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the micro RNA 5' region. EMBO J 2004, 23: 3356-3364.

[54]. Hammell M, Long D, Zhang L et al. mir WIP: micro RNA target prediction based on micro RNA-containing ribonucleoprotein-enriched transcripts. Nat Methods 2008, 5: 813-819.

[55]. Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E. The role of site accessibility in micro RNA target recognition. Nat Genet, 2007, 39: 1278-1284.

[56]. Hofacker IL. How micro RNAs choose their targets. Nat Genet 2007, 39: 1191-1192.

[57]. Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. Micro RNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. Mol Cell 2007, 27: 91-105.

[58]. Gaidatzis D, van Nimwegen E, Hausser J, Zavolan M. Inference of miRNA targets using evolutionary conservation and pathway analysis. BMC Bioinformatics 2007, 8: 69-69.130

[59]. Saetrom P, Heale BS, Snove O Jr, Aagaard L, Alluin J, Rossi JJ. Distance constraints between micro RNA target sites dictate efficacy and cooperativity. Nucleic Acids Res 2007, 35: 2333-2342.

[60]. Sethupathy P, Megraw M, Hatzigeorgiou AG. A guide through present computational approaches for the identification of mammalian micro RNA targets. Nat Methods 2006, 3: 881-886.

[61]. Qu H, Xu W, Huang Y, et al. Circulating miRNAs: promising biomarkers of human cancers. Asian Pac J Cancer Prev, 2011, 12: 1117-1125.

[62]. Kurashige J, Kamohara H, Watanabe M, et al. Serum micro RNA-21 is a novel biomarker in patients with esophageal squamous cell carcinoma. J Surg Oncol, 2012, 106: 188-92.

[63]. Li BS, Zhao YL, Guo G, et al. Plasma micro RNAs, mi R-223, mi R-21 and mi R-218, as novel potential biomarkers for gastric cancer detection. PLo S One, 2012, 7: e41629.

[64]. Taylor DD, Gercel-Taylor C. Micro RNA signatures of tumor-derived exosomes as Diagnostic biomarkers of ovarian cancer. Gynecol Oncol, 2008, 110: 13-21.

[65]. Link A, Balaguer F, Shen Y, et al. Fecal Micro RNAs as novel biomarkers for colon cancer screening. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev2010, 19: 1766-1774

[66]. Ren Y, Gao J, Liu JQ, et al. Differential signature of fecal micro RNAs in patients with pancreatic cancer. Mol Med Rep 2012, 6(1): 201-209.131

[67]. Yu S, Liu Y, Wang J, et al. Circulating micro RNA profiles as potential biomarkers for diagnosis of papillary thyroid carcinoma. Clin Endocrinol Metab 2012, 97: 2084-92.

[68]. Võsa U, Vooder T, Kolde R, et al. Identification of mi R-374a as a prognostic marker for survival in patients with early-stage non-small-cell lung cancer. Genes Chromosomes Cancer, 2011, 50: 812-822.

[69]. Zhu W, Liu X, He J, et al. Overexpression of members of the micro RNA-183 familyisariskfactorforlungcancer: acasecontrolstudy. BMC Cancer, 2011, 15: 393-398.

[70]. Nguyen GH, Schetter AJ, Chou DB. Inflammatory and micro RNA gene expression as prognostic classifier of Barrett's-associated esophageal adenocarcinoma. Clin Cancer Res, 2010, 16: 5824-5834.

[71]. Liu X, Chen NY, Ciu RX, et al. Prognostic value of a micro RNA signature in nasopharyngeal carimoma: a micro RNA expression analysis. Lancel Occol, 2012, 13: 633-641.

[72]. Schaefer A, Jung M, Mollenkopf HJ, et al. Diagnostic and prognostic implications of micro RNA profiling in prostate carcinoma. Cancer, 2010, 126: 1166-1176.

[73]. Yoon SO, Chun SM, Han EH. Deregulated expression of micro RNA-221 with the potential for prognostic biomarkers in surgically resected hepatocellular carcinoma. Hum Pathol. 2011, 42: 1391-1400.

[74]. Elmén J, Lindow M, Schütz S, et al. LNA-mediated microRNA silencing in

132

Non-human primates. Nature, 2008, 4

52: 896-899.

133

附录

附录1. 所有引物序列

**Name Primer Sequence**

**MiRNA Deplexes**

Mimics-miR-22-3p 5'-AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU-3' mimics-NC 5'-UCACAACCUCCUAGAAAGAGUAGA-3'

Inhibitor-miR-22-3p 5'-AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU-3' inhibitor-NC 5'-UCACAACCUCCUAGAAAGAGUAGA-3'

Antagomir-miR-22-3p 5'-AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU-3' antagomir-NC 5'-UCACAACCUCCUAGAAAGAGUAGA-3' siRNA-Sp1 5'-CCCAATGGACAGGTCAGTT-3'

siRNA-NC 5'-GCAAGGACCUAGCAACACUUA-3'

**Primers for RT-PCR**

MiR-22-3p Forward primer 5'-ACACTCCAGCTGGGAAGCTGCCAGTT-3

MiR-22-3p Reverse primer 5'-TGGTGTCGTGGAGTCG-3' U6 Forward primer 5'-TGGTGTCGTGGAGTCG-3' U6 Reverse primer 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'

Sp1 Forward primer 5'-AATTTGCCTGCCCTGAGTGC-3' Sp1 Reverse primer 5'-TTGGACCCATGCTACCTTGC-3'

134

致谢

生命，那是自然赋予人类去雕琢的美玉。博士论文付梓之际，三年多的博士研究生生涯行将结束。在这些激情燃烧的岁月里，我风雨兼程，纵然清贫，但梦想和执着始终相伴左右。我无悔于三年攻读博士的决心，无悔于在母校十年的寒窗苦读。回首求学路上的点点滴滴，我的每一步成长离不开老师、朋友和亲友们的鞭策与帮助，衷心感谢你们！

感谢我的导师黎乐群教授。是您引领我步入学科领域的大门；是您一次次审思与斧正我的论文并督促我反复修改，培养我勤奋、自强和严谨的 治学态度；是您不厌其烦地悉心指导与谆谆教诲，让我深刻思考怎样做人、做一个什么样的人。我所取得的每一点成绩都凝聚着您的心血，您虚怀若 谷、厚德载物的人格魅力不断激励我奋勇向前。

感谢感谢肝胆外科赵荫农教授、袁卫平教授、刘剑勇教授、向邦德教授、吴飞翔教授、邬国斌教授、黄ft副教授、张志明副教授及全体老师对我学习上的指导及生活上的关心和帮助。

感谢师兄马良副教授、彭宁福副教授、陈洁博士、叶甲舟博士、白涛博士、齐鲁楠博士、钟鉴宏博士、陈祖舜博士、龚文峰老师、游雪梅老师、师弟柯阳、谢志波、王炎炎、陆世东、王小波等在这几年里对我学习上的 指导及生活上的关心和帮助。

135

## 攻读学位期间发表的学术论文目录

**1. Zhu Shao-Liang**§**,** Zhong Jian-Hong§, Ke Yang§, Xiao Hui-Min, Ma Liang, Chen Jie, You Xue-Mei, Li Le-Qun\*. Comparative efficacy of postoperative transarterial chemoembolization with or without antiviral therapy for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. Tumor Biol. 2015 Aug; 36(8):6277-84. **(IF=3.611)**

**2. Zhu Shao-Liang,** Ke Yang, Peng Yu-Chong, Ma Liang, Li Hang, Li Le-Qun\*, Zhong Jian-Hong\*. Comparison of long-term survival of patients with solitary large hepatocellular carcinoma of BCLC stage A after liver resection or transarterial chemoembolization: a propensity score analysis. PloS One. 2014 Dec 26;9(12): e115834. **(IF=3.234)**

**3. Zhu Shao-Liang**§**,** Zhong Jian-Hong§, Ke Yang§, Ma Liang, You Xue-Mei, Li Le-Qun\*. Efficacy of hepatic resection vs transarterial chemoembolization for solitary huge hepatocellular carcinoma. World J Gastroentero. 2015 Aug 28; 21(32):9630-7. **(IF=2.369)**

**4. Zhu Shao-Liang**§, Chen Jie§, Li Hang, Li Le-Qun\*, Zhong Jian-Hong\*. Efficacy of hepatic resection for huge (≥ 10cm) hepatocellular carcinoma: Good prognosis associated with the uninodular subtype. Int J Clin Exp Med. 2015 Nov 15;8(11):20581-8. **(IF=1.277)**

**5. Zhu Shao-Liang§**, Gong Wen-Feng**§**, Han Chuang-Ye**§**, Li Hang, Li Le-Qun\*, Zhong Jian-Hong\*. Association of two common microRNA gene polymorphisms with risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. Int J Clin Exp Med 2016;9(2):535-543. **(IF=1.277)**

6. **Zhu Shao-Liang**§, Zhong Jian-Hong§, Gong Wen-Feng§, Li Hang, Li Le-Qun\*. Association of the miR-196a2 C> T and miR-499 A> G

136

Polymorphisms with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma risk: An updated meta-analysis. Onco targets the. 2016 Apr;2016(9):2111-2119. (**IF=2.311**)

**7.** Xie Zhi Bo§, **Zhu Shao-Liang**§, Peng Yu-Chong§, Chen Jie, Wang Xiao-Bo, Ma Liang, Bai Tao, Xiang Bang-De, Li Le-Qun\*, Zhong Jian-Hong. Postoperative hepatitis B virus reactivation and surgery-induced immunosuppression in patients with hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. J Surg Oncol. 2015 Nov; 112(6):634-42. **(IF=3.024)**

8. 林泽毅§， **朱少亮**§， 黄ft§， 赵荫农\*， 邬国斌. 单发小肝癌规则切除与非

规则切除疗效及其预后因素分析. 中华肿瘤防治杂志. 2015, 22(14):1288-1133.

**9.** Xie Zhi-Bo§, Wang Xiao-Bo§, Peng Yu-Chong§, **Zhu Shao-Liang**, Ma Liang, Xiang Bang-De, Gong Wen-Feng, Chen Jie, You Xue-Mei, Jiang Jing-Hang, Li Le-Qun\*, Zhong Jian-Hong. [Systematic review comparing the safety and efficacy of conventional and drug-eluting bead transarterial chemoembolization for inoperable hepatocellular carcinoma.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25388603)[.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23990929) Hepatol Res. 2015 Jan; 45(2):190-200. **(IF=2.735)**

**10.** Bai Tao, Chen Jie, Xie Zhi-Bo, Ma Liang, Liu Jun-Jie, **Zhu Shao-Liang**, Wu Fei-Xiang, Li Le-Qun\*. [Combined portal vein resection for hilar cholangiocarcinoma.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26885035) Int J Clin Exp Med. 2015 Nov 15;8(11):21044-52. **(IF=1.277)**

**注**：§为并列第一作者，\*为通讯作者。

137