DOI:10.16016/j.1000-5404.201608178

miR-134 通过下调叉头盒蛋白 M1 抑制肝细胞癌细胞增殖

姜 珊,熊浩君,何家琳,李 波,杨 帆,杨 腾,张 艳,何凤田 (400038 重庆,第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室)

[摘要] **目的** 探讨 miR-134 下调叉头盒蛋白 M1(forkhead box M1,FOXM1)的机制及其影响肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)细胞增殖的作用。**方法** 应用 CCK-8 法检测 miR-134 对 HCC 细胞增殖的作用;经 Western blot 和 Real-time PCR 检测人正常肝细胞 L02 和 5 种 HCC 细胞系中 FOXM1 和 miR-134 的表达;用 miR-134 模拟物(miR-134 mimic)或 miR-134 抑制剂 (miR-134 inhibitor)转染 HCC 细胞后,经 Western blot 和 Real-time PCR 检测 FOXM1 及其下游靶基因 CyclinD1 的表达;应用生物信息学分析 miR-134 在人 FOXM1 3′-UTR 的可能结合位点,通过报告基因检测实验分析 miR-134 与 FOXM1 的 3′-UTR 的特异性结合;将 miR-134 mimic 和 FOXM1 表达质粒(无 3′-UTR)共转染于 HCC 细胞后,经 CCK-8 法检测细胞的增殖情况。**结果** miR-134 可显著抑制 HCC 细胞增殖($P<0.05$);与人正常肝细胞 L02 相比,miR-134 在 HCC 细胞中的表达明显降低($P<0.05$),而 FOXM1 蛋白表达明显增强,二者存在负相关($R^2=0.705$,$P<0.05$);miR-134 可显著下调 FOXM1 蛋白及其下游靶基因 CyclinD1 的表达($P<0.05$);报告基因检测实验证实 miR-134 可特异性结合于 FOXM1 mRNA 的 3′-UTR($P<0.01$);细胞增殖实验检测结果显示,过表达缺失 3′-UTR 的 FOXM1 可显著减弱 miR-134 对 HCC 细胞增殖的抑制效应($P<0.05$)。**结论** miR-134 通过靶向结合于 FOXM1 的 3′-UTR 而下调 FOXM1 蛋白的表达,从而抑制 HCC 细胞的增殖。

[关键词] 微小 RNA-134;叉头盒蛋白 M1;肝细胞癌;细胞增殖
[中图法分类号] R394.2; R730.23; R735.7 [文献标志码] A

miR-134 suppresses proliferation in hepatocellular carcinoma cells by down-regulating FOXM1

Jiang Shan, Xiong Haojun, He Jialin, Li Bo, Yang Fan, Yang Teng, Zhang Yan, He Fengtian (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the mechanism by which miR-134 regulates the expression of forkhead box M1 (FOXM1) and determine the effect of miR-134 on the proliferation of hepatocellular carcinoma cells (HCC). **Methods** The proliferation of HCC cells was analyzed by CCK-8 assay. The levels of FOXM1 and miR-134 were separately examined by Western blotting and real-time PCR in human normal hepatic cell line L02 and 5 kinds of HCC cell lines. After transfection with miR-134 mimic or inhibitor, the expression of FOXM1 and its target gene CyclinD1 in HCC cells were measured by Western blotting and real-time PCR. The potential binding site of miR-134 on the 3′-UTR of human FOXM1 mRNA was predicted by using on-line bioinformative databases. Then the luciferase reporter assays were performed to identify the

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81672377,31470066)
[通信作者] 张 艳,E-mail:tmmubiozy@163.com
何凤田,E-mail:hefengtian06@aliyun.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20161108.1447.009.html

specific binding of miR-134 with 3′-UTR of FOXM1 mRNA. After co-transfected with miR-134 mimic or FOXM1-expressing plasmids (without 3′-UTR), the HCC cell proliferation was detected by CCK-8 assay. **Results** miR-134 dramatically suppressed the proliferation of HCC cells ($P<0.05$). Compared to normal liver cell line, L02 cells, miR-134 was lowly expressed while the FOXM1 protein was highly expressed in the HCC cells($P<0.05$), and a negative correlation was found between miR-134 level and FOXM1 protein level ($R^2=0.705$, $P<0.05$). miR-134 significantly down-regulated FOXM1 protein, and its downstream target gene, CyclinD1, in HCC cells ($P<0.05$). The luciferase reporter assay showed that miR-134 specifically bound to the 3′-UTR of FOXM1 mRNA ($P<0.01$). The cell proliferation assay revealed that the ectopic expression of FOXM1 without 3′-UTR in HCC cells significantly attenuated the miR-134-mediated growth inhibition of HCC cells ($P<0.05$). **Conclusion** miR-134 down-regulates FOXM1 protein by directly targeting the 3′-UTR of FOXM1 mRNA, and subsequently suppresses the proliferation of HCC cells.

[**Key words**] miR-134; forkhead box M1; hepatocellular carcinoma; cell proliferation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81672377, 31470066). Corresponding author: Zhang Yan, E-mail: tmmubiozy@163.com; He Fengtian, E-mail: hefengtian06@aliyun.com

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)是常见的恶性肿瘤。其发病率高,病死率高,预后差[1-3]。因此,深入阐明 HCC 的发生、发展机制以及寻找抗 HCC 治疗的新靶点具有十分重要的意义。近年来,与 HCC 密切相关的微小 RNA(microRNA)备受关注。microRNA(miRNA)是机体内源性表达的单链、非编码小分子 RNA(19-22nt),通过与靶 mRNA 相互作用而调节基因的表达[4]。越来越多的研究发现,miRNA 密切参与生物体的生长发育及多种生理病理学过程,尤其与肿瘤的发生、发展密切相关[5]。miR-134 作为抑癌基因,密切参与肝癌、肺癌、结直肠癌、子宫内膜癌、垂体瘤等多种肿瘤的发生、发展[6-9]。文献[10-11]报道,在 HCC 中 miR-134 可通过下调 KRAS 及 ITGB1,抑制 HCC 的远端转移。那么,miR-134 是否存在其他的调控机制参与 HCC 的发生、发展,仍需深入研究。

叉头盒蛋白 M1(forkhead box M1,FOXM1)是进化保守的 FOX 转录因子家族成员之一[12]。FXOM1 是一种重要的促癌基因,在多种肿瘤如肝癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌中均高表达,并且可以作为肿瘤患者预后的分子标志[13]。因此有效抑制 FOXM1 的表达及功能无疑有助于肿瘤的防治,但目前关于 FOXM1 的自身表达调控机制尚不十分明确。那么作为重要肿瘤调节因子 miR-134 是否参与调节 FOXM1,该调节通路是否是 miR-134 发挥抗 HCC 作用的新机制,目前尚不清楚。

因此,本研究在发现 miR-134 可显著抑制 HCC 细胞增殖的基础上,探讨其作用机制。HCC 细胞中 miR-134 与 FOXM1 蛋白表达的负相关性提示二者可能存在表达调控相关性;进一步研究发现 miR-134 可以特异性结合于 FOXM1 mRNA 的 3′-UTR,从而下调 FOXM1 及其下游靶基因 CyclinD1 的表达;过表达 FOXM1 可减弱 miR-134 对 HCC 细胞增殖的抑制效应。上述研究为阐明 miR-134 与 HCC 发生、发展的相关性,以及 FOXM1 自身的表达调控机制积累新的理论资料,为探索以 FOXM1 和 miR-134 为靶标的抗 HCC 治疗措施提供新的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株及细胞系 pmir-GLO 双荧光素酶报告基因质粒,购自 Promega 公司;FOXM1 过表达质粒 pEGFP-FOXM1 由本科室保存;大肠杆菌 DH5α、人肝癌细胞系 HepG2、Hep3B、Huh7、PLC、SMMC-7721 和人胎肝细胞系 L02 均由本室保存。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清(FBS)、MEM 培养基、DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;PBS 缓冲液购自北京中杉金桥公司;胰酶购自美国 HyClone 公司;Opti-MEM 培养基购自美国 Gibco 公司;Lipofectamine 2000 购自美国 Invirogen 公司;CCK-8 试剂盒购自日本 Dojindo 公司;TRIzol 购自北京康为世纪公司;Prime-Script™RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒购自大连 TaKaRa 公司;All-in-One™ miRNA qRT-PCR Detection System 试剂盒购自广州复能基因公司;SYBR 购自美国 ABI 公司;蛋白酶抑制剂购自美国 Roche 公司;RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度检测试剂盒、一抗稀释液均购自江苏碧云天公司;封闭蛋白干粉购自武汉

博士德公司;β-actin 小鼠单克隆抗体(ab8226)、FOXM1 兔多克隆抗体(ab83097)购自美国 Abcam 公司;山羊抗鼠、山羊抗兔二抗均购自北京中杉公司;PVDF 膜、ECL 化学发光试剂盒均购自美国 Bio-Rad 公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自美国 Promega 公司。

1.2 *方法*

1.2.1 细胞培养及处理 肝癌细胞 HepG2、Hep3B、Huh7、PLC、SMMC-7721 和人胎肝细胞 L02 采用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 MEM 培养基或 DMEM 培养基培养,置于 5% CO_2、37℃ 恒温恒湿培养箱中培养,细胞生长密度达 90% 左右时进行细胞传代,待细胞进入对数生长期后,转染 miR-134 mimic(5′-UGUGACUGGUUGACCAGAGGGG-3′),mimic negative control(mimic NC,5′-UUGUACUACACAAAAGUACUG-3′),miR-134 inhibitor(5′-CCCCUCUGGUCAACCAGUCACA-3′),inhibitor negative control(inhibitor NC,5′-CAG UACUUUUGUGUAGUACAA-3′)。转染操作按照 Lipofectamine 2000 说明书进行。

1.2.2 CCK-8 实验 取对数生长期的 HepG2 和 Hep3B 细胞,胰酶消化按每孔细胞密度达 50% 接种于 96 孔板中,培养 24 h 后,转染 miR-134 mimic、miR-134 inhibitor,或相对应的 NC;细胞共转染实验分别转染 pEGFP-FOXM1 + miR-134 mimic,或 pEGFP-N1 + miR-134 mimic。继续培养 24 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,37 ℃孵育 1 h 于酶标仪 450 nm 波长下测细胞的光密度值[D(450)]。

1.2.3 Real-time PCR 检测 miR-134 表达 依据 TRIzol 说明书提取细胞总 RNA,All-in-One™ miRNA qRT-PCR Detection System 试剂盒将所得 RNA 逆转录成 miRNA 第 1 条链,具体操作按说明书进行。以 U6 为内参 Real-time PCR 检测 miR-134 表达,成熟 miR-134 上游引物:5′-TGTGACTGGTTGACCAGAGGGG-3′,下游引物由试剂盒提供;U6 内参引物上游:5′-CGCTTCGGCAGCACATATACTAA-3′,下游:5′-TATGGAACGCTTCACGAATTTGC -3′。

1.2.4 Real-time PCR 检测 FOXM1 及 CyclinD1 表达 依据 TRIzol 说明书提取细胞转染 miR-134 mimic 或 mimic NC 并培养 24 h 后的总 RNA,利用 PrimeScript™RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒去除基因组 DNA 并将所得 RNA 逆转录为 cDNA,以 β-actin 为内参进行 Real-time PCR 检测。引物序列如下:β-actin 上游:5′-CGAGGCCCCCCT GAAC-3′,下游:5′-GCCAGAGGCGTACAGGGATA-3′;FOXM1 上游:5′-AGTAGTGGGCCCAACAAATTCAT -3′,下游:5′- CTTTTGGCATCATAGCTGGTTTG-3′;CyclinD1 上游:5′-CGCCCCACCCCTCCAG-3′,下游:5′-CCGCCCAGACCCTCAGACT-3′。

1.2.5 Western blot 检测 FOXM1 蛋白的表达 处理后的细胞经含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解,离心取上清,BCA 试剂盒测定蛋白浓度,加入 5 × 蛋白上样缓冲液煮沸 10 min 使蛋白变性。取等量蛋白(80 μg)经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳后,采用半干法转 PVDF 膜,转膜结束后于 5% 脱脂奶粉中室温封闭 2 h,封闭结束后将膜置于一抗稀释液(1∶1 000)4 ℃孵过夜,PBST 洗膜 3 次,每次 10 min,将膜置于二抗(1∶10 000)中室温孵育 2 h,PBST 洗膜 3 次,每次 10 min,ECL 化学发光显影。

1.2.6 质粒构建 经生物信息学预测软件 TargetScan(http://www.targetscan.org/)和 miRanda(http://www.microrna.org/microrna/getGene Form.do)预测 FOXM1 3′-UTR 上 miR-134 可能结合位点。将包含 miR-134 结合位点的 FOXM1 3′-UTR 连接至双荧光素酶报告基因载体 pmir-GLO 上,命名为 pmir-FOXM1;包含了 miR-134 结合位点突变的 FOXM1 3′-UTR 连接至 pmir-GLO 上,命名为 pmir-FOXM1-Mut;质粒构建由上海生工公司完成。

1.2.7 报告基因检测 将 HepG2 和 Hep3B 细胞接种于 96 孔板中,培养 24 h 后细胞密度达 90% 左右,共转染报告基因质粒和 miR-134 mimic/miR-134 inhibitor 或 mimic NC /inhibitor NC,24 h 后,使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒测定报告基因活性,具体操作参照说明书,报告基因活性以萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性之比表示。

1.3 *统计学分析*

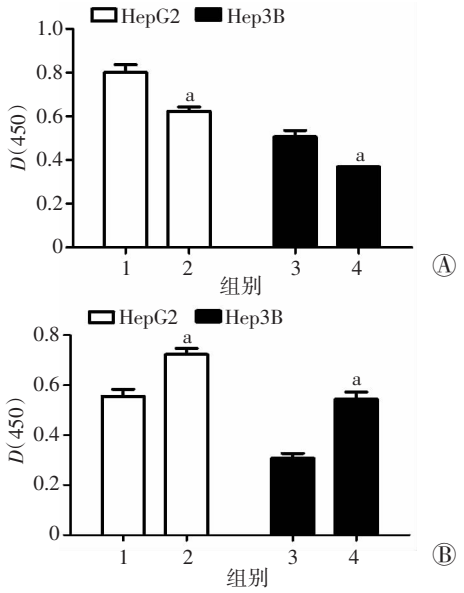
所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Graphpad Prism 5 统计软件进行分析,两组间均数比较采用 t 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *CCK-8 实验检测细胞增殖情况*

CCK-8 实验检测 HepG2 和 Hep3B 细胞转染 miR-134 mimic 或 miR-134 inhibitor 后,结果显示:相对于对照组(NC),miR-134 mimic 可抑制细胞增殖($P <$

0.05,图 1A),而转入 miR-134 inhibitor 抑制内源性 miR-134 可促进细胞增殖($P<0.05$,图 1B)。



A:HepG2 和 Hep3B 细胞转染 mimic NC 或 miR-134 mimic 后细胞增殖情况 1:mimic NC 组;2:miR-134 mimic 组;3:mimic NC 组;4:miR-134 mimic 组;B:HepG2 和 Hep3B 细胞转染 inhibitor NC 或 miR-134 inhibitor 后细胞增殖情况 1:inhibitor NC 组;2:miR-134 inhibitor 组;3:inhibitor NC 组;4:miR-134 inhibitor 组 a:$P<0.05$,与 mimic NC 组或 inhibitor NC 组比较

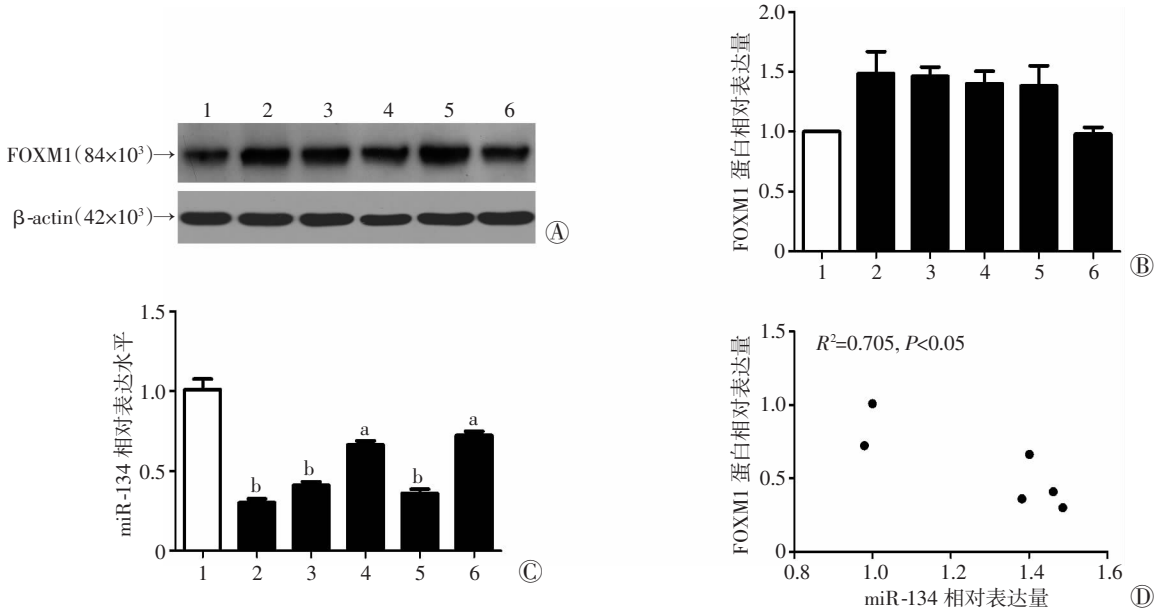
图 1 CCK-8 检测 HCC 细胞转染 miR-134 mimic 或 inhibitor 后细胞增殖情况

2.2 Western blot 和 Real-time PCR 检测 HCC 细胞系和人正常胎肝细胞 L02 中的 FOXM1 和 miR-134 的表达

Western blot 和 Real-time PCR 检测了 5 种 HCC 细胞系和人正常胎肝细胞 L02 中的 FOXM1 和 miR-134 的表达。检测结果显示,与人正常胎肝细胞 L02 相比,HepG2、Hep3B、Huh7、PLC 细胞中 FOXM1 蛋白表达显著升高(图 2A、B),而 miR-134 在 HCC 中的表达显著降低($P<0.05$,图 2C),经 Pearson's 相关性分析显示,miR-134 的表达与 FOXM1 蛋白的表达存在负相关性($R^2=0.705$,$P<0.05$,图 2D)。

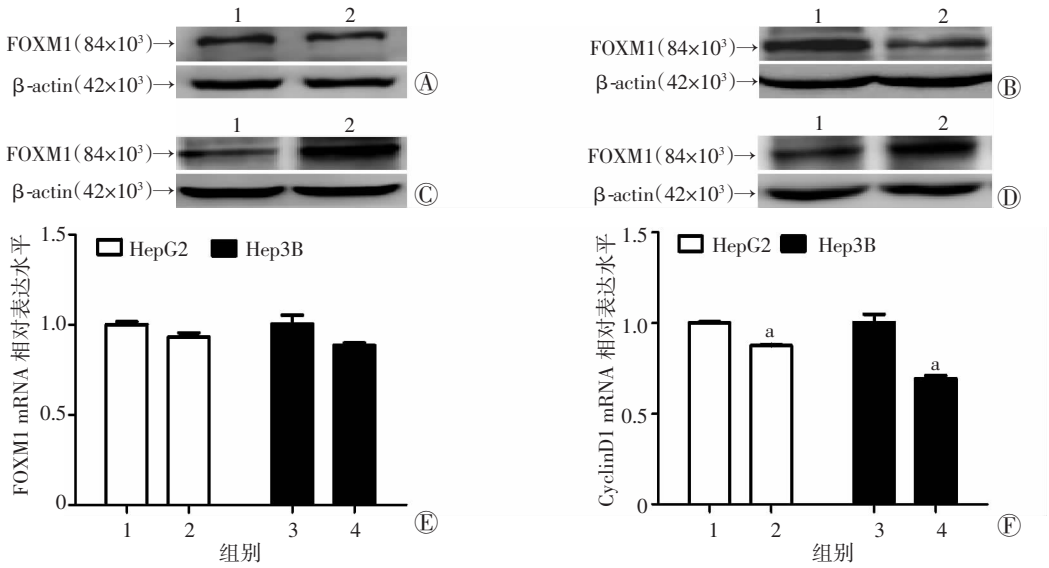
2.3 Western blot 和 Real-time PCR 检测 miR-134 对 FOXM1 蛋白和 mRNA 表达的影响

HepG2 和 Hep3B 细胞转染 miR-134 mimic、mimic NC 或 miR-134 inhibitor、inhibitor NC 后,分别检测 FOXM1 在蛋白和 mRNA 水平的表达。Western blot 结果显示:相对 NC 组,miR-134 mimic 可下调 FOXM1 蛋白表达(图 3A、B),相反地,转入 miR-134 inhibitor 组,抑制内源性 miR-134,FOXM1 蛋白的表达明显恢复(图 3C、D);Real-time PCR 结果显示,miR-134 mimic 不影响 FOXM1 mRNA 的表达(图 3E)。进一步我们检测了 FOXM1 下游靶基因 CyclinD1 的表达,结果显示,miR-134 mimic 可抑制 FOXM1 下游靶基因 CyclinD1 的表达($P<0.05$,图 3F)。以上结果提示 miR-134 可转录后抑制 FOXM1 的表达。



A:Western blot 检测结果;B:半定量分析结果; C:Real-time PCR 检测结果;D:L02 和 5 种 HCC 细胞中 FOXM1 和 miR-134 表达的相关性分析 1:L02;2:Hep3B;3:HepG2;4:Huh7;5:PLC;6:SMMC-7721 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 L02 比较

图 2 Western blot 和 Real-time PCR 检测 HCC 细胞中 FOXM1 与 miR-134 的表达



A:HepG2 细胞 Western blot 检测结果 1:mimic NC 组;2:miR-134 mimic 组;B: Hep3B 细胞 Western blot 检测结果 1:mimic NC 组;2:miR-134 mimic 组;C:HepG2 细胞 Western blot 检测结果 1:inhibitor NC 组;2:miR-134 inhibitor 组;D: Hep3B 细胞 Western blot 检测结果 1:inhibitor NC 组;2:miR-134 inhibitor 组;E:Real-time PCR 检测 FOXM1 表达 1:mimic NC 组;2:miR-134 mimic 组;3:mimic NC 组;4:miR-134 mimic 组;F:Real-time PCR 检测 CyclinD1 表达 1:mimic NC 组;2:miR-134 mimic 组;3:mimic NC 组;4:miR-134 mimic 组 a:$P<0.05$,与 mimic NC 组(对照组)比较

图 3 Western blot 和 Real-time PCR 检测 miR-134 对 FOXM1 蛋白和 mRNA 表达的影响

2.4 双荧光素酶报告基因检测 miR-134 与 FOXM1 3′-UTR 的结合

为了进一步探索 miR-134 抑制 FOXM1 的分子机制,经生物信息学预测 miR-134 的结合位点位于 FOXM1 mRNA 的第 2 672 ~2 679 之间(命名为 FOXM1-MIRE134)(图 4)。设计并合成包含结合位点以及结合位点突变的寡核苷酸片段的报告基因质粒,与 miR-134 mimic、miR-134 inhibitor 及相应的 NC 共转染 HepG2 和 Hep3B 细胞,检测荧光素酶活性,结果显示,与对照组相比,miR-134 mimic 可显著抑制 FOXM1 3′-UTR 的报告基因活性($P<0.01$,图 5A、B),而 miR-134 inhibitor 则可恢复 FOXM1 3′-UTR 报告基因活性($P<0.05$,图 5C、D),此外,miR-134 mimic 或 miR-134 inhibitor 不影响 miR-134 关键结合位点突变的 FOXM1 3′-UTR 报告基因活性(图 5),以上结果提示,miR-134 直接结合于 FOXM1 3′-UTR,FOXM1 是 miR-134 的直接靶基因。

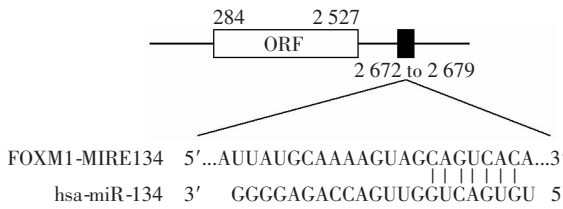
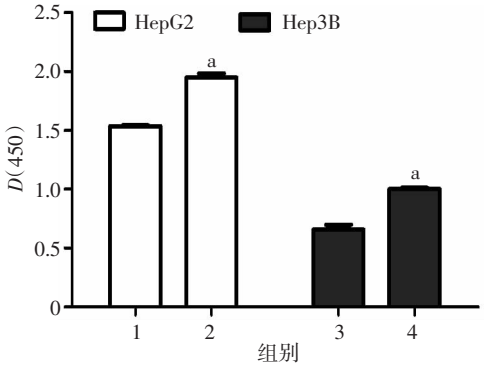


图 4 生物信息学预测 miR-134 在 FOXM1 3′-UTR 上的可能结合位点

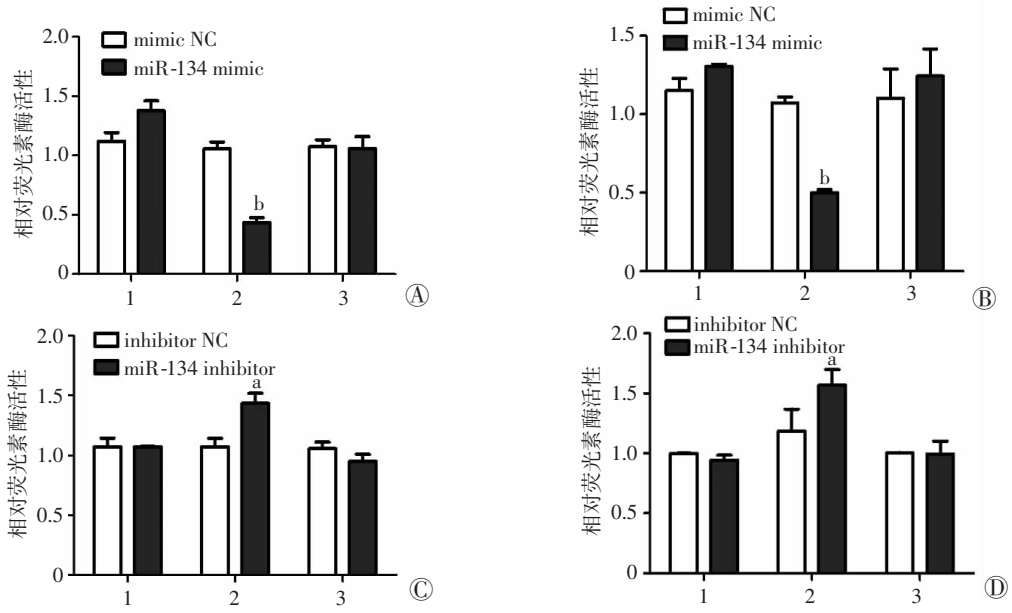
2.5 CCK-8 检测过表达 FOXM1 后 miR-134 对 HCC 细胞增殖的影响

HepG2 和 Hep3B 共转染 miR-134 mimic 和 FOXM1 过表达质粒 pEGFP-FOXM1 或空载对照质粒 pEGFP-N1,经 CCK-8 检测细胞增殖情况,结果显示:相对于空载对照组,当过表达 FOXM1 后,miR-134 mimic 对 HepG2 和 Hep3B 细胞增殖的抑制作用明显减弱($P<0.05$,图 6)。



1:pEGFP-N1 + miR-134 mimic 组;2:pEGFP-FOXM1 + miR-134 mimic 组;3:pEGFP-N1 + miR-134 mimic 组;4:pEGFP-FOXM1 + miR-134 mimic 组 a:$P<0.05$,与 pEGFP-N1 + miR-134 mimic 组比较

图 6 CCK-8 检测过表达 FOXM1 后 miR-134 对 HCC 细胞增殖的影响



A:HepG2 细胞共转染 miR-134 mimic/NC + 报告基因质粒 pmir-FOXM1/pmir-FOXM1-Mut 的萤火虫荧光素酶/海肾荧光素酶活性比; B: Hep3B 细胞共转染 miR-134 mimic/NC + 报告基因质粒 pmir-FOXM1/pmir-FOXM1-Mut 的萤火虫荧光素酶/海肾荧光素酶活性比;C:HepG2 细胞共转染 miR-134 inhibitor/NC + 报告基因质粒 pmir-FOXM1/pmir-FOXM1-Mut 的萤火虫荧光素酶/海肾荧光素酶活性比;D: Hep3B 细胞共转染 miR-134 inhibitor/NC + 报告基因质粒 pmir-FOXM1/pmir-FOXM1-Mut 的萤火虫荧光素酶/海肾荧光素酶活性比 1:pmir-GLO;2:pmir-FOXM1;3:pmir-FOXM1-Mut a:$P<0.05$,与转染 inhibitor NC + pmir-FOXM1 比较;b:$P<0.01$,与转染 mimic NC + pmir-FOXM1 比较

图 5 双荧光素酶报告基因检测 miR-134 与 FOXM1 3′-UTR 的结合

3 讨论

本研究探讨了 miR-134 对 FOXM1 的调控作用及其对肝细胞癌细胞增殖的影响。我们的研究发现,miR-134 可显著抑制 HCC 细胞增殖;HCC 细胞中 miR-134 与 FOXM1 蛋白表达存在负相关;进一步研究发现 miR-134 可抑制 FOXM1 及其下游靶基因 CyclinD1 的表达,其调节机制是由 miR-134 特异性结合于 FOXM1 mRNA 的 3′-UTR 介导;过表达 FOXM1 可减弱 miR-134 对 HCC 细胞增殖的抑制效应。

miRNA 可通过与靶基因 mRNA 的 3′-UTR 特异性识别及结合,从而抑制靶基因 mRNA 的翻译过程或促进其降解,实现对基因表达的转录后调控[4-5]。大量研究表明 miRNA 的表达失调与多种肿瘤有关,可作为促癌基因又可作为肿瘤抑制基因发挥作用[14-15]。一个 miRNA 可调控多个下游靶基因,同样地,一个基因也可由多个 miRNA 调控,共同调控肿瘤的进程。miR-134 是一个重要的肿瘤相关 miRNA,多在肿瘤中表达下调[16],miR-134 通过调控多个与肿瘤细胞增殖相关的靶基因(如 EGFR、WWOX、KRAS、Meis2、Nanog[6,17-20])发挥重要的抑癌作用。在非小细胞肺癌中,miR-134 通过下调 EGFR 抑制肿瘤细胞增殖[6];在结直肠癌中,miR-134 通过削弱 EGFR 和 PI3K 信号通路抑制肿瘤细胞增殖及肿瘤转移和侵袭[7];在子宫内膜癌中,miR-134 通过下调 POGLUT1 抑制肿瘤干细胞的增殖[8];在垂体瘤中,过表达 miR-134 可阻滞细胞周期从而抑制细胞增殖[9]。除了以上肿瘤细胞增殖靶基因外,miR-134 是否还调控其他与肿瘤细胞增殖相关的靶基因及作用机制如何? 我们的研究发现 miR-134 可抑制 HCC 细胞的增殖,并与 FOXM1 的水平呈负相关,该发现目前尚少见报道,结合生物信息学分析,提示 FOXM1 可能是 miR-134 的新靶标。但其具体的机制尚需深入探讨。

研究发现 FOXM1 是重要的促癌基因,在多种肿瘤如肝癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌中均过表达[13],且 FOXM1 的蛋白水平可用来预测接受肝移植的肝癌患者的预后情况[21]。FOXM1 通过上调基质金属蛋白酶 MMP-2、MMP-9 促进肿瘤转移[12,22]。FOXM1 作为重要的细胞增殖相关的转录因子,可通过调控细胞周期蛋白 Cdc25A、Cdc25B、CyclinB1、CyclinD1、P21 和

P27 促进细胞周期 G_1～S 期、G_2～M 期的进程,从而促进细胞增殖[23-26]。但目前关于 FOXM1 自身的表达调控机制尚不十分明确,有研究发现,促癌分子 RAS 可上调其表达[27],而抑癌分子如 p53[28]、p19ARF[29] 可下调其表达 ,核受体 LXRα 也可下调 FOXM1 表达[23]。文献[30-33]报道,一些 miRNA 也参与 FOXM1 的表达调节,如 miR-877、miR-216b、miR-370、miR-204 等均可以通过下调 FOXM1 抑制肿瘤进程。那么 miR-134 抑制 HCC 细胞增殖是否与调节 FOXM1 相关,我们研究发现,HCC 细胞中 miR-134 的表达明显降低($P<0.05$),FOXM1 蛋白表达明显增强,二者存在负相关性($R^2=0.705$,$P<0.05$),提示二者可能存在一定的调节作用。进一步的研究发现,miR-134 特异性结合于 FOXM1 mRNA 的 3′-UTR,在蛋白水平抑制 FOXM1 的表达,且过表达 FOXM1 可减弱 miR-134 对 HCC 细胞增殖的抑制效应。

综上所述,本研究证实了 miR-134 可通过下调 FOXM1 抑制 HCC 细胞增殖,miR-134/FOXM1 通路是 miR-134 发挥抗 HCC 作用的新机制。为阐明 miR-134 与 HCC 发生、发展的相关性,以及 FOXM1 自身的表达调控机制积累新的理论资料,为探索以 FOXM1 和 miR-134 为靶标的抗 HCC 治疗措施提供新的科学依据。

参考文献:

[1] EI-Serag H B, Rudolph K L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis[J]. Gastroenterology, 2007, 132(7): 2557-2576. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.04.061

[2] 卢燕军,付陆军,杨家进,等. siRNA 介导 BMP7 基因沉默对人肝癌 HepG2 细胞增殖和迁移的影响[J]. 世界华人消化杂志,2016,24(1):10-18. DOI:10.11569/wcjd.v24.i1.10

[3] 付林, 李林. 射频消融与手术切除治疗原发性肝癌的近期及远期预后回顾性分析[J]. 河北医学,2016,22(1):119-122. DOI:10.3969/j.issn.1006-6233.2016.01.041

[4] Zhou P, Huang G, Zhao Y, *et al*. MicroRNA-363-mediated downregulation of S1PR1 suppresses the proliferation of hepatocellular carcinoma cells[J]. Cell Signal, 2014, 26(6): 1347-1354. DOI: 10.1016/j.cellsig.2014.02.020

[5] Zhang Y, Gong W, Dai S, *et al*. Downregulation of human farnesoid X receptor by miR-421 promotes proliferation and migration of hepatocellular carcinoma cells[J]. Mol Cancer Res, 2012, 10(4): 516-522. DOI: 10.1158/1541-7786. MCR-11-0473

[6] Qin Q, Wei F, Zhang J, *et al*. miR-134 inhibits non-small cell lung cancer growth by targeting the epidermal growth factor receptor[J]. J Cell Mol Med, 2016, 20(10): 974-1983. DOI: 10.1111/jcmm.12889

[7] EI-Daly S M, Abba M L, Patil N, *et al*. miRs-134 and -370 function as tumor suppressors in colorectal cancer by independently suppressing EGFR and PI3K signaling[J]. Sci Rep, 2016, 6:24720. DOI: 10.1038/srep24720

[8] Gao Y, Liu T, Huang Y. MicroRNA-134 suppresses endometrial cancer stem cells by targeting POGLUT1 and Notch pathway proteins[J]. FEBS Lett, 2015, 589(2):207-214. DOI:10.1016/j.febslet.2014.12.002

[9] Cheunsuchon P, Zhou Y, Zhang X, *et al*. Silencing of the imprinted DLK1-MEG3 locus in human clinically nonfunctioning pituitary adenomas[J]. Am J Pathol, 2011, 179(4): 2120-2130. DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.07.002

[10] Yin C, Wang P, Xu W, *et al*. Hepatocyte nuclear factor-4α reverses malignancy of hepatocellular carcinoma through regulating miR-134 in the DLK1-DIO3 region[J]. Hepatology, 2013, 58(6): 1964-1976. DOI: 10.1002/hep.26573

[11] Zha R, Guo W, Zhang Z, *et al*. Genome-wide screening identified that miR-134 acts as a metastasis suppressor by targeting integrin β1 in hepatocellular carcinoma[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e87665. DOI: 10.1371/journal.pone.0087665

[12] 孔飞飞, 袁海花, 王炯轶, 等. Foxm1 对非小细胞肺癌中 MMP-2、MMP-9 和迁移侵袭的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22(8): 1775-1778. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2014.08.09

[13] Wierstra I. FOXM1 (Forkhead box M1) in tumorigenesis: overexpression in human cancer, implication in tumorigenesis, oncogenic functions, tumor-suppressive properties, and target of anticancer therapy[J]. Adv Cancer Res, 2013, 119: 191-419. DOI: 10.1016/B978-0-12-407190-2.00016-2

[14] Calin G A, Croce C M. MicroRNA signatures in human cancers[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(11): 857-866. DOI: 10.1038/nrc1997

[15] Kumar M S, Lu J, Mercer K L, *et al*. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis[J]. Nat Genet, 2007, 39(5): 673-677. DOI: 10.1038/ng2003

[16] 俞万钧, 汪一萍, 李纪鹏, 等. miR-134 调控人肺腺癌细胞顺铂耐药[J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(7): 1214-1218. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2015.07.011

[17] Chen T, Gao F, Feng S, *et al*. MicroRNA-134 regulates

lung cancer cell H69 growth and apoptosis by targeting WWOX gene and suppressing the ERK1/2 signaling pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 464 (3): 748 - 754. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.07.021

[18] Zhao Y, Pang D, Wang C, *et al*. MicroRNA-134 modulates glioma cell U251 proliferation and invasion by targeting KRAS and suppressing the ERK pathway[J]. Tumour Biol, 2016, 37 (8): 11485 - 11493. DOI: 10.1007/ s13277-016- 5027-9

[19] Wu Y, Zhao H, Zhou L, *et al*. miR-134 modulates the proliferation of human cardiomyocyte progenitor cells by targeting meis2[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16 (10): 25199 - 25213. DOI: 10.3390/ijms161025199

[20] Niu C, Yang Y, Cheng C. MiR-134 regulates the proliferation and invasion of glioblastoma cells by reducing Nanog expression[J]. Int J Oncol, 2013, 42 (5): 1533 - 1540. DOI: 10.3892/ijo.2013.1844

[21] Sun H, Teng M, Liu J, *et al*. FOXM1 expression predicts the prognosis in hepatocellular carcinoma patients after orthotopic liver transplantation combined with the Milan criteria [J]. Cancer Lett, 2011, 306 (2): 214 222. DOI: 10.1016/j.canlet.2011.03.009

[22] Koo C Y, Muir K W, Lam E W. FOXM1: From cancer initiation to progression and treatment[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1819(1): 28 - 37. DOI: 10.1016/j.bbagrm.2011.09.004

[23] Hu C, Liu D, Zhang Y, *et al*. LXRα-mediated downregulation of FOXM1 suppresses the proliferation of hepatocellular carcinoma cells[J]. Oncogene, 2014, 33 (22): 2888 - 2897. DOI: 10.1038/onc.2013.250

[24] Wang X, Quail E, Hung NJ, *et al*. Increased levels of forkhead box M1B transcription factor in transgenic mouse hepatocytes prevent age-related proliferation defects in regenerating liver[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98 (20): 11468 - 11473. DOI: 10.1073/pnas.201360898

[25] Wang X, Krupczak-Hollis K, Tan Y, *et al*. Increased hepatic Forkhead Box M1B (FoxM1B) levels in old-aged mice stimulated liver regeneration through diminished p27Kip1 protein levels and increased Cdc25B expression [J]. J Biol Chem, 2002, 277 (46): 44310 - 44316. DOI: 10.1074/jbc.M207510200

[26] Ye H, Holterman A X, Yoo K W, *et al*. Premature expression of the winged helix transcription factor HFH-11B in regenerating mouse liver accelerates hepatocyte entry into S phase[J]. Mol Cell Biol, 1999, 19 (12): 8570 - 8580.

[27] Park H J, Carr J R, Wang Z, *et al*. FoxM1, a critical regulator of oxidative stress during oncogenesis[J]. EMBO J, 2009, 28 (19): 2908 - 2918. DOI: 10.1038/emboj.2009.239

[28] Pandit B, Halasi M, Gartel A L. p53 negatively regulates expression of FoxM1[J]. Cell Cycle, 2009, 8 (20): 3425 - 3427. DOI: 10.4161/cc.8.20.9628

[29] Kalinichenko V V, Major M L, Wang X, *et al*. Foxm1b transcription factor is essential for development of hepatocellular carcinomas and is negatively regulated by the p19ARF tumor suppressor[J]. Genes Dev, 2004, 18 (7): 830 - 850. DOI: 10.1101/gad.1200704

[30] Huang X, Qin J, Lu S. Up-regulation of miR-877 induced by paclitaxel inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation though targeting FOXM1[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8 (2): 1515 - 1524.

[31] Zheng W W, Zhou J, Zhang C H, *et al*. MicroRNA-216b is downregulated in hepatocellular carcinoma and inhibits HepG2 cell growth by targeting Forkhead box protein M1 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20 (12): 2541 - 2550.

[32] Duan N, Hu X, Yang X, *et al*. MicroRNA-370 directly targets FOXM1 to inhibit cell growth and metastasis in osteosarcoma cells[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8 (9): 10250 - 10260.

[33] Sun Y, Yu X, Bai Q. miR-204 inhibits invasion and epithelial-mesenchymal transition by targeting FOXM1 in esophageal cancer[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8 (10): 12775 - 12783.

(收稿:2016-08-31;修回:2016-11-01)

(编辑 郭建秀)