DOI:10.16016/j.1000-5404.202008219

下调 miR-4443/TIMP2 信号通路增强 HepG2 细胞对索拉非尼的敏感性

肖翰希,张越婷,孙梁博,李 涛,陈岑曦,闫小晶,何凤田,连继勤 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)基础医学院生物化学与分子生物学教研室

[摘要] **目的** 探讨下调 miR-4443/TIMP2 信号通路后肝癌 HepG2 细胞对索拉非尼敏感性的影响。**方法** 将 HepG2 细胞分为对照组(DMSO)与索拉非尼处理组(10 μmol/L),索拉非尼处理 HepG2 细胞 24 h 后,RT-qPCR 检测 miR-4443 的变化;脂质体法将 miR-4443 模拟物与 miR-4443 抑制剂转染 HepG2 细胞,通过 CCK-8 检测转染 miR-4443 模拟物或抑制剂后联用索拉非尼对 HepG2 细胞活性的影响;生物信息学预测 miR-4443 的下游靶基因,索拉非尼处理 24 h 后通过 RT-qPCR 和 Western blot 分别检测下游靶基因 TIMP2 mRNA 及其蛋白水平的变化;转染 miR-4443 模拟物、抑制剂后,RT-qPCR 和 Western blot 分别检测 TIMP2 mRNA 以及蛋白含量的变化;在 HepG2 细胞中通过脂质体法转染 TIMP2 siRNA,Western blot 检测 TIMP2 蛋白含量;CCK-8 检测敲低 TIMP2 后联用索拉非尼对 HepG2 细胞活性的影响。**结果** 与对照组相比,索拉非尼处理组 HepG2 细胞中 miR-4443 的含量显著降低($P<0.05$);转染 miR-4443 模拟物可显著降低索拉非尼对细胞活性的抑制($P<0.05$),而转染其抑制剂则可显著增强索拉非尼的这一作用($P<0.05$);生物信息学预测结果显示 miR-4443 结合的下游靶基因为 TIMP2;索拉非尼处理后 HepG2 细胞中 TIMP2 的 mRNA 及蛋白水平显著升高($P<0.05$);而在 HepG2 细胞中转染 miR-4443 的模拟物或抑制剂则可使 TIMP2 的 mRNA 表达量相应下降或上升,转染模拟物后 TIMP2 蛋白表达显著降低($P<0.05$),表明 miR-4443 与 TIMP2 间存在调控关系;用 TIMP2 siRNA 降低 TIMP2 表达后,可显著增强索拉非尼对 HepG2 细胞活性的抑制效果($P<0.05$)。**结论** 下调 miR-4443/TIMP2 信号通路可以增强 HepG2 细胞对索拉非尼的敏感性。

[关键词] 索拉非尼;HepG2 细胞;miR-4443;TIMP2;耐药

[中图法分类号] R394.6; R735.7; R979.1 [文献标志码] A

Down-regulation of miR-4443/TIMP2 signaling pathway enhances sorafenib sensitivity in HepG2 cells

XIAO Hanxi, ZHANG Yueting, SUN Liangbo, LI Tao, CHEN Lingxi, YAN Xiaojing, HE Fengtian, LIAN Jiqin

Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the significance of down-regulating the miR-4443/TIMP2 pathway on sorafenib sensitivity in HepG2 cells. **Methods** HepG2 cells were divided into control group (DMSO) and sorafenib treatment group (10 μmol/L). After treatment for 24 h, the mRNA level of miR-4443 was measured by RT-qPCR. CCK-8 assay was used to study the effects of transfection with miR-4443 mimics or pretreatment of its inhibitor on the cell viability of HepG2 cells treated with sorafenib for 24 h. Bioinformatics analysis was used to predict the downstream target gene of miR-4443. The expression of TIMP2 at mRNA and protein levels was assessed by RT-qPCR and Western blotting in the HepG2 cells treated with sorafenib for 24 h, transfected with miR-4443 mimics or pretreatment of its inhibitor followed by sorafenib treatment. Then TIMP2 siRNA was transfected into HepG2 cells by liposome transfection, the content of TIMP2 protein was detected by Western blotting, and the effect of TIMP2 knockdown combined with sorafenib treatment on the viability of HepG2 cells was measured with CCK-8 assay. **Results** Sorafenib treatment

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81572375);重庆市自然科学基金面上项目(CSTC2018jcyjA2018)

[通信作者] 连继勤,E-mail:lianjiqin@sina.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

decreased the expression of miR-4443 in HepG2 cells ($P<0.05$). Overexpression of miR-4443 (transfection of miR-4443 mimics) significantly decreased the inhibitory effect of sorafenib on cell viability ($P<0.05$), while pretreatment of miR-4443 inhibitor could enhance the effect of the drug ($P<0.05$). Bioinformatics analysis indicated that the downstream target gene of miR-4443 was TIMP2. The mRNA and protein levels of TIMP2 were obviously increased in HepG2 cells after sorafenib treatment ($P<0.05$), but the transfection of miR-4443 mimics or pretreatment of its inhibitor would down- or up-regulate the mRNA level of TIMP2, and the transfection of miR-4443 mimics decreased the protein level of TIMP2, indicating the regulative relationship between the 2 molecules. The transfection of TIMP2 siRNA decreased the expression of TIMP2 and then enhanced the inhibitory effect of sorafenib on HepG2 viability ($P<0.05$). **Conclusion** Down-regulation of the miR-4443/TIMP2 pathway enhances sorafenib sensitivity in HepG2 cells.

[**Key words**] sorafenib; HepG2 cells; miR-4443; TIMP2; drug resistance

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81572375) and the General Program of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2018jcyjA2018). Corresponding author: LIAN Jiqin, E-mail: lianjiqin@sina.com

肝癌在全球癌症发病率中位居第5[1],是临床上常见的严重危害人类健康的恶性肿瘤,被发现时大多已处于中晚期。每年约60万的肝癌诊断患者中死亡人数超过25万,虽然围绕肝癌开展了越来越多的基础研究,但是肝癌的高发生率以及高病死率仍然是影响全球健康的一大问题。肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)是肝癌最常见的一种类型,病死率极高并且预后差[2]。目前,多靶点抗肿瘤药物索拉非尼作为一种口服多功能抑制剂,是中晚期肝癌的一线治疗药物[3-4]。索拉非尼作为一种新的肝癌治疗方案,患者的生存率以及整体疗效虽然优于以往的药物,但是原发性和继发性耐药问题极大地降低了药物的有效性[5],使得整体疗效不能令人满意。因此,寻找增敏索拉非尼的新靶点与新措施,对提高肝癌的临床治疗效果具有重要意义。

miRNA是一类小的非编码RNA,长度一般在22个核苷酸左右[6],通常由19~23个核苷酸组成。miRNA可以与目的mRNA的3′UTR区部分或全部结合[7],通过与mRNA的靶向序列直接配对从而在转录水平上调控基因的表达[8]。越来越多的研究表明细胞核与细胞质中均有miRNA的存在,也有少部分miRNA富集在细胞核中[9]。大多数的miRNA可以调控多个mRNA,也有少数miRNA只能调控一个基因[10]。在人体中,miRNA参与超过30%编码基因的转录后调控,涉及信号转导,细胞增殖、分化、凋亡等多个生物进程[11]。miRNA在癌症的发展过程中起着重要作用,可以作为潜在的治疗靶点[12]。诸多miRNA可以促进细胞自噬和凋亡,并且与细胞耐药性的产生有关[13-15],目前针对miR-4443与肝癌的相关研究少见报道。本研究探讨下调miR-4443介导的miR-4443/TIMP2信号通路能否增强肝癌HepG2细胞对索拉非尼的敏感性。

1 材料与方法

1.1 药品及试剂

索拉非尼(sorafenib)购自Selleckchem公司;高糖DMEM培养基购自Gibco公司;胎牛血清购自HyClone公司;胰蛋白酶购自Invitrogen公司;总RNA提取试剂盒购自杭州博日公司;miR-4443模拟物(mimics)及其对照物(mimics NC)、miR-4443抑制剂(inhibitor)及其对照物(inhibitor NC)、GAPDH引物、TIMP2引物均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;miR-4443引物和U6引物购自GeneCopoeia公司;mRNA反转录试剂盒和荧光定量PCR试剂盒均购自日本TaKaRa公司;miRNA逆转录及荧光定量PCR试剂盒购自GeneCopoeia公司;青霉素/链霉素双抗、蛋白定量试剂盒、RIPA裂解液均购自碧云天公司;PMSF购自Selleck公司;Lipofectamine 3000 Transfection Kit购自Invitrogen公司;GAPDH、TIMP2抗体购自Proteintech公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG购自Bioworld公司;PVDF膜、ECL发光液、电泳凝胶试剂盒购自Bio-Rad公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞株及培养 人肝癌HepG2细胞由本教研室提供。细胞使用含有10%的胎牛血清、青霉素(100 U/mL)、链霉素(100 μg/mL)的DMEM培养基在5%CO_2、37 ℃的培养箱中培养。每日进行细胞换液,换液时先把培养瓶中的DMEM培养基全部吸出,然后缓慢加入2 mL的PBS缓冲液,轻轻晃动培养瓶清洗细胞,清洗完毕后吸出PBS缓冲液,向培养瓶中加入5 mL新的DMEM培养基。待细胞在培养瓶中长满时,PBS清洗细胞吸出后再加入1 mL 0.25%的胰酶消化细胞,消化完毕吸出胰酶,用1 mL新的DMEM培养基重悬细胞,吸取1/5体积的细胞量转移到新的培养瓶中,再向培养瓶中加入5 mL新的DMEM培养基,轻

轻摇动培养瓶使细胞在培养瓶中均匀分布,培养瓶放入培养箱中继续培养。

1.2.2 RT-qPCR 检测各组细胞中 miR-4443、TIMP2 mRNA 的表达 HepG2 细胞消化后按 2×10^5/孔接种在 6 孔板中,分别设置对照组和索拉非尼组、miR-4443 模拟物对照组和 miR-4443 模拟物组、miR-4443 抑制剂对照组和 miR-4443 抑制剂组。待细胞融合度达到 70%~80%时分别进行 RNA 转染和索拉非尼 10 μmol/L 的处理。处理完毕后吸出培养板中的培养基,加入适量的 PBS 清洗细胞,随后在培养板中按照 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA。RNA 提取完毕后利用分光光度计检测各组 RNA 的浓度以及光密度值,提取的 RNA 的光密度值应在 1.8~2.1 之间。测得 RNA 的浓度后进行逆转录和荧光定量 PCR,其具体操作步骤按照 miRNA RT-qPCR 试剂盒、逆转录和荧光定量 PCR 试剂盒说明书进行。miRNA 的扩增条件为 95 ℃ 10 min 预变性;95 ℃ 10 s,60 ℃ 20 s,72 ℃ 10 s 循环反应,共 40 个循环;4 ℃保存。mRNA 的扩增条件为 95 ℃ 30 s 预变性;95 ℃ 15 s,60 ℃ 60 s 循环反应,共 40 个循环;4 ℃保存。PCR 引物序列如下:TIMP2 上游 5′-TTGCAGGAGGAATCGT-3′,下游 5′-ACAGGCAAGCAATGG-3′。miR-4443 引物购自 GeneCopoeia 公司。分别以 U6 和 GAPDH 作为内参计算 miR-4443、TIMP2 mRNA 的相对表达量。

1.2.3 CCK-8 检测细胞存活率

1.2.3.1 索拉非尼单用及联合 miR-4443 模拟物检测 HepG2 细胞以 5×10^3/孔接种于 96 孔板中,分别设置对照组、索拉非尼组、miR-4443 模拟物组、索拉非尼与 miR-4443 模拟物联用组。待细胞融合至 50%时,分别向对照组中转染模拟物对照物,向 miR-4443 模拟物组、索拉非尼与 miR-4443 模拟物联用组中分别转染 miR-4443 模拟物。转染用量按照 Invitrogen 公司推荐使用。转染 24 h 后索拉非尼组和索拉非尼与 miR-4443 模拟物联用组均加入索拉非尼浓度为 10 μmol/mL 的培养基。24 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂于 37 ℃恒温箱中避光孵育 20 min,使用全波长酶标仪于 450 nm 波长下测定每孔的光密度值[D(450)],计算各组细胞的存活率。

1.2.3.2 索拉非尼单用及联合 miR-4443 抑制剂检测 HepG2 细胞以 5×10^3/孔接种于 96 孔板中,分别设置对照组、索拉非尼组、miR-4443 抑制剂组、索拉非尼与 miR-4443 抑制剂联用组。待细胞融合至 50%时,向对照组中转染抑制剂对照物,向 miR-4443 抑制剂组、索拉非尼与 miR-4443 抑制剂联用组中分别转染 miR-4443 抑制剂。转染用量按照 Invitrogen 公司推荐使用。转染 24 h 后索拉非尼组和索拉非尼与 miR-4443 模拟物联用组均加入索拉非尼浓度为 10 μmol/L 的培养基。24 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂于 37 ℃恒温箱中避光孵育 20 min,使用全波长酶标仪于 450 nm 波长下测定每孔的光密度值[D(450)],计算各组细胞的存活率。

1.2.3.3 索拉非尼联合 TIMP2 siRNA 检测 HepG2 细胞以 5×10^3/孔接种于 96 孔板中,分别设置对照组、索拉非尼组(10 μmol/L)、TIMP2 siRNA 组、索拉非尼(10 μmol/L)与 TIMP2 siRNA 联用组。将细胞培养板置于 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中培养过夜,后弃去原培养基,加入含索拉非尼和 EPZ-6438 的新鲜培养基。处理 24 h 后每孔加入 10 μL CCK-8 试剂于 37 ℃恒温箱中避光孵育 20 min,使用全波长酶标仪于 450 nm 波长下测定每孔的光密度值[D(450)],计算各组细胞的存活率。

1.2.4 总蛋白的提取及浓度测定 HepG2 细胞消化后按 2×10^5/孔接种于 6 孔板中,将 6 孔板放入 37 ℃的细胞培养箱中培养,待细胞生长达到 50%时进行 RNA 的转染,转染处理 24 h 后,索拉非尼处理组加入 10 μmol/L 索拉非尼进行处理,处理 24 h 后进行总蛋白的提取。用 PBS 清洗 3 次细胞,取适量体积的含 1 mmol/L 的 RIPA 裂解液加入 6 孔板中,用细胞刮充分刮取培养板中的细胞并置于冰上作用 5 min。将培养板中的 RIPA 裂解液移入 1.5 mL EP 管中,在 4 ℃高速离心机 14 000×g 的条件下离心 5 min,收集上清于新的 EP 管中。酶标仪测定蛋白浓度,测定蛋白时吸收光的波长为 562 nm。

1.2.5 Western blot 检测细胞中 TIMP2 蛋白的表达 提取的蛋白经过变性处理后每组取 20 μg 进行 SDS-PAGE 电泳,上下层胶所用电压和时间分别为上层胶 80 V 30 min,下层胶 120 V 60 min。电泳结束后在恒压 20 V 的条件下转膜 15 min,然后在含有 5%脱脂奶粉的封闭液中封闭 1.5 h。以 1∶1 000 的比例稀释兔抗人 TIMP2 抗体,以 1∶10 000 稀释兔抗人 GAPDH 抗体,4 ℃孵育一抗过夜。一抗孵育完成后用 PBST 漂洗 3 次,每次漂洗时间为 10 min。漂洗后室温孵育辣根过氧化物酶标记山羊抗兔的二抗(1∶10 000)1 h。二抗孵育后用 PBST 洗膜 3 次,显影分析各组蛋白含量的变化。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$。

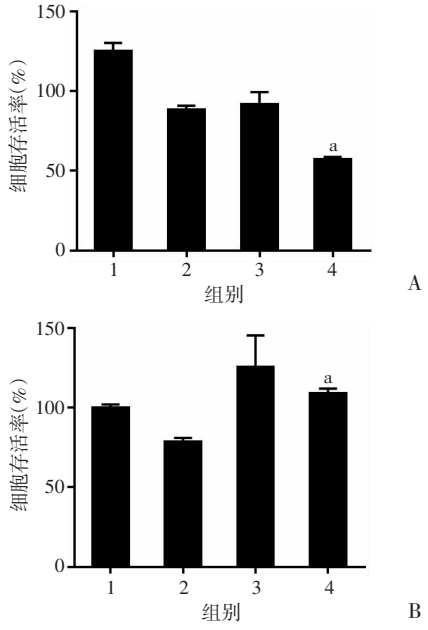
2 结果

2.1 索拉非尼抑制 HepG2 细胞中 miR-4443 的表达

用 10 μmol/L 索拉非尼处理 HepG2 细胞 24 h 后,RT-qPCR 检测结果显示,索拉非尼处理组的 miR-4443 表达量较对照组降低了 40.67%($P<0.05$)。

2.2　miR-4443 表达水平影响 HepG2 细胞对索拉非尼的敏感性

HepG2 细胞转染 miR-4443 抑制剂后使用索拉非尼处理 24 h,CCK-8 检测结果显示,下调 miR-4443 后可以提升 HepG2 细胞对索拉非尼的敏感性($P<0.05$,图 1A);HepG2 细胞转染 miR-4443 模拟物后联合索拉非尼处理 24 h,CCK-8 检测结果显示,过表达 miR-4443 后可以降低 HepG2 细胞对索拉非尼的敏感性($P<0.05$,图 1B)。



A:CCK-8 检测 miR-4443 抑制剂与索拉非尼联用后细胞活性的变化　1:对照组;2:索拉非尼组;3:miR-4443 抑制剂组;4:索拉非尼与 miR-4443 抑制剂联用组;a:$P<0.05$,与索拉非尼组比较;B:CCK-8 检测 miR-4443 模拟物与索拉非尼联用后细胞活性的变化　1:对照组;2:索拉非尼组;3:miR-4443 模拟物组;4:索拉非尼与 miR-4443 模拟物联用组;a:$P<0.05$,与索拉非尼组比较

图 1　miR-4443 表达水平影响 HepG2 细胞对索拉非尼的敏感性

2.3　TIMP2 可能是 miR-4443 作用的靶基因

生物信息学数据库 Targetscan(www.targetscan.org)预测 miR-4443 的下游靶基因,最终确定 miR-4443 在 HepG2 细胞中结合的下游靶基因为 TIMP2,在 TIMP2 3′UTR 区共有 3 段可以与 miR-4443 互补结合的区域(图 2)。

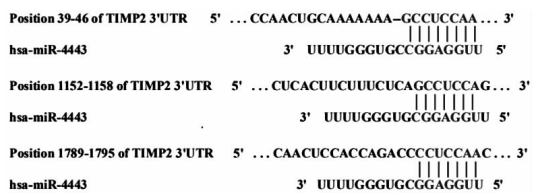
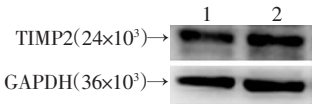


图 2　Targetscan 预测 miR-4443 的下游靶基因及其结合位点

2.4　索拉非尼处理增强 HepG2 细胞中 TIMP2 表达

索拉非尼处理 HepG2 细胞 24 h 后,RT-qPCR 检测 TIMP2 mRNA 的变化,结果显示 TIMP2 mRNA 含量较对照组升高了 85.99%($P<0.05$)。Western blot 检测结果显示,索拉非尼处理 HepG2 细胞 24 h 后 TIMP2 蛋白含量明显增加(图 3),灰度结果显示索拉非尼处理组 TIMP2 蛋白的灰度值较对照组上升了 75%。表明索拉非尼处理可增强 HepG2 细胞中 TIMP2 mRNA 及蛋白水平。



1:对照组;2:索拉非尼组;a:$P<0.05$,与对照组比较　Western blot 检测索拉非尼处理后 TIMP2 蛋白表达及半定量分析

图 3　索拉非尼处理增强 HepG2 细胞中 TIMP2 表达

2.5　下调 miR-4443 表达增强 HepG2 细胞中 TIMP2 mRNA 表达

HepG2 细胞转染 miR-4443 抑制剂后,RT-qPCR 检测结果显示,转染抑制剂组 miR-4443 的含量较对照组下降了 88.33%($P<0.05$),TIMP2 mRNA 的含量较对照组上升了 106%($P<0.05$)。

2.6　上调 miR-4443 表达抑制 HepG2 细胞中 TIMP2 蛋白表达

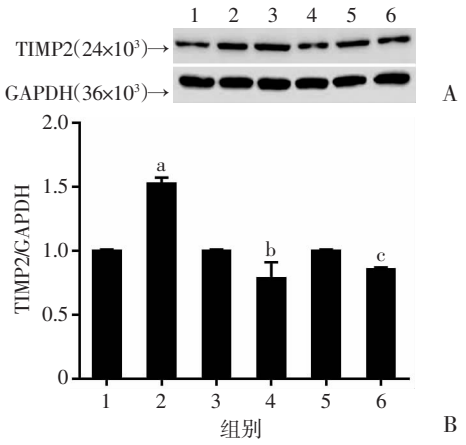
HepG2 细胞转染 miR-4443 模拟物后,RT-qPCR 检测结果显示,转染模拟物组 miR-4443 的含量较对照组上升了 135.23 倍($P<0.05$),TIMP2 mRNA 的含量较对照组下降了 58%($P<0.05$)。

Western blot 检测结果显示,单独转染 miR-4443 模拟物后 TIMP2 的蛋白含量明显减少;转染 miR-4443 模拟物后联合索拉非尼处理 HepG2 细胞 TIMP2 蛋白含量仍然降低(图 4)。结果证实 HepG2 细胞经过索拉非尼处理后 TIMP2 的改变是由于 miR-4443 的变化所引起的。

2.7　抑制 TIMP2 可增强 HepG2 细胞对索拉非尼的敏感性

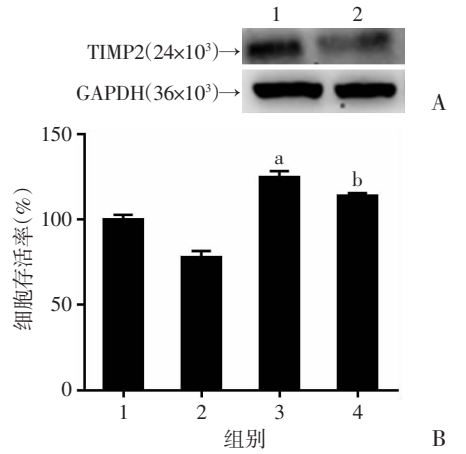
Western blot 检测结果显示,HepG2 细胞中转染 TIMP2 siRNA 后 TIMP2 蛋白含量低于对照组(图 5A),灰度结果显示转染 TIMP2 siRNA 组 TIMP2 蛋白的灰度值较对照组下降了 27.07%($P<0.05$);CCK-8 检测结果显示,单独转染 TIMP2 siRNA 组的细胞活性高于其对照组,索拉非尼与 TIMP2 siRNA 联用组的细胞活性也高于其对照组($P<0.05$,图 5B)。结果表明,

在 HepG2 细胞中,下调 miR-4443/TIMP2 信号通路可以增强细胞对索拉非尼的敏感性,促进索拉非尼对 HepG2 细胞的杀伤作用,提升索拉非尼的药效。



A、B:Western blot 检测 TIMP2 蛋白含量的变化及半定量分析 1:对照组;2:索拉非尼组;3:miR-4443 模拟物对照组;4:miR-4443 模拟物组;5:索拉非尼与 miR-4443 模拟物对照联用组;6:索拉非尼与 miR-4443 模拟物联用组;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 miR-4443 模拟物对照组比较;c:$P<0.05$,与索拉非尼与 miR-4443 模拟物对照联用组比较

图 4 上调 miR-4443 表达抑制 HepG2 细胞中 TIMP2 蛋白表达



A:Western blot 检测转染 TIMP2 siRNA 后 TIMP2 蛋白表达 1:对照组;2:TIMP2 siRNA 组;a:$P<0.05$,与对照组比较;B:CCK-8 检测索拉非尼联合 TIMP2 siRNA 处理 HepG2 细胞后细胞活性的变化 1:对照组;2:索拉非尼组;3:TIMP2 siRNA 组;4:索拉非尼与 TIMP2 siRNA 联用组;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与索拉非尼组比较

图 5 下调 TIMP2 的表达可增强 HepG2 细胞对索拉非尼的敏感性

3 讨论

肝癌在临床上是一种严重危害人类健康的恶性肿瘤,随着每年高发生率、高病死率、预后差、耐药性等问题的日趋暴露,使得越来越多的基础研究围绕肝癌展开,因此提高肝癌治疗药物的药效也显得越来越重要。在现有的报道中发现 miRNA 在多种化疗药物治疗癌症的过程中发挥重要作用:miR-374b 通过抑制 hnRNPA1/PKM2 信号通路,可以使耐药的 HCC 细胞重新对索拉非尼变得敏感[16];miR-494 通过抑制 PTEN,激活 PI3K/Akt 信号通路增强 HCC 细胞对索拉非尼的耐药作用[17];miRNA 通过对凋亡、自噬、肿瘤干细胞、NF-κB 等生物过程中相关的分子或信号通路进行调控,进而促进或抑制肿瘤细胞对化疗药物顺铂的敏感性[18];过表达 miR-4443 使 JAK2/STAT3 信号通路活化,从而促进肺癌细胞对表柔比星的耐药[19]。通过查阅文献可以发现 miR-4443 在多种癌症中发挥作用:将人正常肝细胞 THLE 培养在高表达 miR-4443 与低表达 miR-4443 的外泌体中,发现 TIMP2 的表达量分别呈现出下降和上升的趋势,miR-4443 的高表达可以促进乳腺癌的肝转移[20];在卵巢癌组织中 miR-4443 可以促进卵巢癌的发生和转移[21];瘦素和胰岛素可促进 miR-4443 的表达,抑制其下游靶蛋白 NCOA1 和 TRAF4 的表达,降低人结肠癌细胞的侵袭力[22]。miR-4443 于 2015 年被发现[23],与耐药的产生相关[24],过表达 miR-4443 可以促进癌细胞的增殖和迁移[25]。在现有的报道中,miR-4443 主要是通过与 TIMP2 相互作用促进肿瘤的侵袭、转移和耐药,但是在索拉非尼治疗肝癌过程中 miR-4443 是否与耐药有关以及在耐药机制中发挥何种作用尚不清楚。因此,本研究探讨 miR-4443 如何影响肝癌细胞 HepG2 细胞对索拉非尼敏感性。

基质金属蛋白酶(matrir metalloproteinases,MMPs)是一类降解细胞外基质与基底膜组分的组蛋白酶。金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitor of metalloproteinase,TIMPs)是一种能够特异性抑制 MMPs 活性的生物因子[26]。MMP2 是 MMPs 家族的重要成员,可以降解细胞外基质的蛋白,促进肿瘤细胞的侵袭和转移[27]。TIMP2 是 MMP2 的天然抑制剂[28],TIMP2 与 MMP2 以共价形式相结合,抑制 MMP2 的活性。因此,TIMP2 是一种肿瘤转移抑制因子[29]。TIMPs 与 MMPs 的状态失衡是恶性肿瘤侵袭和转移的重要原因[30]。TIMP2 与 MMP2 是近年来倍受关注的

一对与肿瘤侵袭性有关的标记物[31]。本研究显示,在HepG2细胞中,miR-4443属于一种致癌miRNA,索拉非尼处理可显著下调HepG2细胞中miR-4443的水平,降低miR-4443的表达量可以增强HCC细胞对索拉非尼的敏感性。过表达miR-4443能够降低索拉非尼对肝癌细胞的杀伤效果,说明miR-4443的表达下调可能是增加索拉非尼对肝癌杀伤力的重要原因。

为探究miR-4443参与耐药的相关机制,通过生物信息学分析、Western blot及Real-time PCR实验确定了TIMP2为miR-4443的靶基因。即miR-4443表达下调后导致TIMP2表达上调促进HepG2细胞对索拉非尼的敏感性;而敲低TIMP2显著降低索拉非尼的杀伤效果,从而进一步证实miR-4443/TIMP2信号通路参与了肝癌细胞对索拉非尼的耐药。miR-4443通过抑制TIMP2的表达影响肿瘤细胞的增殖、迁移,进而引起耐药的发生。以上结果显示,在肝癌细胞HepG2细胞中索拉非尼能够降低miR-4443的表达,减缓了miR-4443对TIMP2的抑制,促进其下游靶蛋白TIMP2的表达,降低了肿瘤细胞侵袭与转移的能力,使得HepG2细胞对索拉非尼更加敏感。在增敏索拉非尼的策略中,我们可以通过下调miR-4443/TIMP2信号通路增加其对索拉非尼的敏感性,更好地发挥其药效。

综上,本研究在肝癌HepG2细胞中证实了通过抑制miR-4443/TIMP2信号通路能够增强HepG2细胞对索拉非尼的敏感性,提升索拉非尼的药效,但是在这条信号通路发挥作用的过程中是否涉及其他分子?它们又是如何协助该条信号通路发挥作用的?索拉非尼处理HepG2细胞后miR-4443含量的降低是由什么引起的?miR-4443含量的降低具体是通过哪种机制引起TIMP2发生改变的?等一系列问题仍需要进一步研究。因此,miR-4443有望成为一种潜在的靶点。靶向这一分子可以提高肝细胞肝癌对其化疗药物索拉非尼的敏感性,增强药效,在肝细胞肝癌的生物治疗中具有重要意义。

参考文献:

[1] ZHAO J A, SANG M X, GENG C Z, *et al*. A novel curcumin analogue is a potent chemotherapy candidate for human hepatocellular carcinoma[J]. Oncol Lett, 2016, 12(5): 4252-4262. DOI:10.3892/ol.2016.5126.

[2] HO D W H, LO R C L, CHAN L K, *et al*. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma[J]. Liver Cancer, 2016,5(4): 290-302. DOI: 10.1159/000449340.

[3] GARTEN A, GROHMANN T, KLUCKOVA K, *et al*. Sorafenib-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma is reversed by SIRT1[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(16): 4048. DOI:10.3390/ijms20164048.

[4] XUE F, LIU Y, ZHANG H, *et al*. Let-7a enhances the sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to cetuximab by regulating STAT3 expression[J]. Onco Targets Ther, 2016, 9: 7253-7261. DOI:10.2147/ott.s116127.

[5] LABEUR T A, HOFSINK Q, TAKKENBERG R B, *et al*. The value of sorafenib trough levels in patients with advanced hepatocellular carcinoma—a substudy of the SORAMIC trial[J]. Acta Oncol, 2020, 59(9): 1028-1035. DOI: 10.1080/0284186x.2020.1759826.

[6] KULCHESKI F R, CHRISTOFF A P, MARGIS R. Circular RNAs are miRNA sponges and can be used as a new class of biomarker[J]. J Biotechnol, 2016, 238: 42-51. DOI:10.1016/j.jbiotec.2016.09.011.

[7] BRAOUDAKI M, LAMBROU G I, GIANNIKOU K, *et al*. Microrna expression signatures predict patient progression and disease outcome in pediatric embryonal central nervous system neoplasms[J]. J Hematol Oncol, 2014, 7: 96. DOI: 10.1186/s13045-014-0096-y.

[8] LEE R C, FEINBAUM R L, AMBROS V. The C. elegans heterochronic gene Lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to Lin-14[J]. Cell, 1993, 75(5): 843-854. DOI:10.1016/0092-8674(93)90529-y.

[9] RASKO J E J, WONG J J L. Nuclear microRNAs in normal hemopoiesis and cancer[J]. J Hematol Oncol, 2017, 10(1): 8. DOI:10.1186/s13045-016-0375-x.

[10] EBRAHIMI S O, REIISI S. Downregulation of miR-4443 and miR-5195-3p in ovarian cancer tissue contributes to metastasis and tumorigenesis[J]. Arch Gynecol Obstet, 2019, 299(5): 1453-1458. DOI: 10.1007/s00404-019-05107-x.

[11] LU M, WANG T, HE M, *et al*. Tumor suppressor role of miR-3622b-5p in $ERBB_2$-positive cancer[J]. Oncotarget, 2017, 8(14): 23008-23019. DOI:10.18632/oncotarget.14968.

[12] LI M, ZHANG X M, DING X, *et al*. Long noncoding RNA LINC00460 promotes cell progression by sponging miR-4443 in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Cell Transplant, 2020, 29: 096368972092740. DOI:10.1177/0963689720927405.

[13] LEI W, YAN C, YA J, *et al*. MiR-199a-3p affects the multi-chemoresistance of osteosarcoma through targeting AK4[J]. BMC Cancer, 2018, 18(1): 631. DOI: 10.1186/s12885-018-4460-0.

[14] HUANG L M, HU C Q, CAO H, *et al*. MicroRNA-29c increases the chemosensitivity of pancreatic cancer cells by

inhibiting USP22 mediated autophagy[J]. Cell Physiol Biochemi, 2018, 47(2): 747-758. DOI: 10.1159/000490027.

[15] WANG M, CAI W R, MENG R, *et al*. miR-485-5p suppresses breast cancer progression and chemosensitivity by targeting survivin[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 501(1): 48-54. DOI:10.1016/j.bbrc.2018.04.129.

[16] ZHANG M, ZHANG H, HONG H, *et al*. MiR-374b re-sensitizes hepatocellular carcinoma cells to sorafenib therapy by antagonizing PKM2-mediated glycolysis pathway[J]. Am J Cancer Res, 2019, 9(4): 765-778.

[17] LIU K, LIU S Y, ZHANG W, *et al*. MiR-494 promotes cell proliferation, migration and invasion, and increased sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma by targeting PTEN[J]. Oncol Rep, 2015, 34(2): 1003-1010. DOI: 10.3892/or.2015.4030.

[18] WANG S, LI M Y, LIU Y, *et al*. The role of microRNA in cisplatin resistance or sensitivity[J]. Expert Opin Ther Targets, 2020, 7: 1-13. DOI: 10.1080/14728222.2020.1785431.

[19] ZHANG W, QIAO B, FAN J. Overexpression of miR-4443 promotes the resistance of non-small cell lung cancer cells to epirubicin by targeting INPP4A and regulating the activation of JAK2/STAT3 pathway[J]. Pharmazie, 2018, 73(7): 386-392. DOI:10.1691/ph.2018.8313.

[20] WANG J Y, ZHANG Q, WANG D D, *et al*. Microenvironment-induced TIMP2 loss by cancer-secreted exosomal miR-4443 promotes liver metastasis of breast cancer[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(7/8): 5722-5735. DOI:10.1002/jcp.29507.

[21] EBRAHIMI S O, REIISI S. Downregulation of miR-4443 and miR-5195-3p in ovarian cancer tissue contributes to metastasis and tumorigenesis[J]. Arch Gynecol Obstet, 2019, 299(5): 1453-1458. DOI: 10.1007/s00404-019-05107-x.

[22] MEERSON A, YEHUDA H. Leptin and insulin up-regulate miR-4443 to suppress NCOA1 and TRAF4, and decrease the invasiveness of human colon cancer cells[J]. BMC Cancer, 2016, 16(1): 882. DOI: 10.1186/s12885-016-2938-1.

[23] XUN M, MA C F, DU Q L, *et al*. Differential expression of miRNAs in enterovirus 71-infected cells[J]. Virol J, 2015, 12: 56. DOI:10.1186/s12985-015-0288-2.

[24] CHEN X, ZHONG S L, LU P, *et al*. miR-4443 participates in the malignancy of breast cancer[J]. PLoS ONE, 2016, 11(8): e0160780. DOI:10.1371/journal.pone.0160780.

[25] MEERSON A, YEHUDA H. Leptin and insulin up-regulate miR-4443 to suppress NCOA1 and TRAF4, and decrease the invasiveness of human colon cancer cells[J]. BMC Cancer, 2016, 16(1): 882. DOI: 10.1186/s12885-016-2938-1.

[26] LUDDI A, MARROCCO C, GOVERNINI L, *et al*. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in endometrium: high levels in endometriotic lesions[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(8): 2840. DOI: 10.3390/ijms21082840.

[27] MIMORI K, UEO H, SHIRASAKA C, *et al*. Clinical significance of MT1-MMP mRNA expression in breast cancer[J]. Oncol Rep, 2001, 8(2): 401-403. DOI:10.3892/or.8.2.401.

[28] CHEN G, GE D, ZHU B, *et al*. Upregulation of matrix metalloproteinase 9 (MMP9)/tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) and MMP2/TIMP2 ratios may be involved in lipopolysaccharide-induced acute lung injury[J]. J Int Med Res, 2020, 48(4): 300060520919592. DOI:10.1177/0300060520919592.

[29] PEENEY D, FAN Y, NGUYEN T, *et al*. Matrisome-associated gene expression patterns correlating with TIMP2 in cancer[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 20142. DOI: 10.1038/s41598-019-56632-3.

[30] AZNAVOORIAN S, MURPHY A N, STETLER-STEVENSON W G, *et al*. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis[J]. Cancer, 1993, 71(4): 1368-1383. DOI: 10.1002/1097-0142(19930215)71:41368::aid-cncr2820710432>3.0.co;2-l.

[31] NAGASE H. Cell surface activation of progelatinase A (proMMP-2) and cell migration[J]. Cell Res, 1998, 8(3): 179-186. DOI:10.1038/cr.1998.18.

(收稿:2020-08-26;修回:2020-10-29)

(编辑 汪勤俭)