DOI:10.16016/j.1000-5404.202007062

激活 miR-101-3p/EZH2 通路增敏索拉非尼抗肝癌 HepG2 细胞的效果

张越婷,肖翰希,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** 探讨激活 miR-101-3p/EZH2 通路在增敏索拉非尼抗肝癌 HepG2 细胞中的意义。**方法** 将人肝癌细胞 HepG2 分成对照组(DMSO)和索拉非尼处理组(10 μmol/L),处理 24 h 后,定量 PCR 检测 miR-101-3p 表达水平变化;生物信息学预测 miR-101-3p 结合的靶基因;在肝癌细胞中过表达 miR-101-3p 后 Western blot 和定量 PCR 检测 zeste 同源蛋白 2 增强子(enhancer of zeste homolog 2 protein,EZH2)表达水平变化;双荧光素酶报告基因实验验证 miR-101-3p 和 EZH2 的靶向关系;Western blot 检测索拉非尼处理对 EZH2 表达水平的影响;在 HepG2 细胞中过表达 miR-101-3p 或添加 EZH2 抑制剂 EPZ-6438 后联合索拉非尼处理,CCK-8 检测对 HepG2 细胞存活的影响。**结果** 索拉非尼处理后 HepG2 细胞中 miR-101-3p 表达水平显著降低($P<0.05$);miR-101-3p 可在 HepG2 细胞中下调 EZH2 的表达($P<0.05$);miR-101-3p 与 EZH2 mRNA 3'-UTR 存在直接结合($P<0.05$);索拉非尼处理后 HepG2 细胞中 EZH2 表达水平显著升高($P<0.05$);过表达 miR-101-3p 或 EZH2 抑制剂 EPZ-6438 均可增加索拉非尼对 HepG2 细胞杀伤的敏感性($P<0.05$)。**结论** 激活 miR-101-3p/EZH2 通路可增敏索拉非尼的抗肝癌细胞 HepG2 效果。

[关键词] microRNA;索拉非尼;耐药;肝癌;EZH2

[中图法分类号] R73-362; R735.7; R979.14 [文献标志码] A

Activation of miR-101-3p/EZH2 pathway enhances sorafenib sensitivity of HepG2 cells

ZHANG Yueting, XIAO Hanxi, 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 effect of activating the miR-101-3p/EZH2 pathway on sorafenib sensitivity of HepG2 cells. **Methods** HepG2 cells treated with sorafenib (10 μmol/L) for 24 h were examined for protein expression of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) using Western blotting and for mRNA expression of EZH2 and miR-101-3p using RT-qPCR. The interaction between miR-101-3p and EZH2 mRNA was analyzed through informatics analysis and verified using dual luciferase reporter assay. HepG2 cells were transfected with miR-101-3p mimic or treated with the EZH2 inhibitor EPZ-6438 followed by treatment with sorafenib for 24 h, and the change in cell proliferation was assessed using CCK-8 assay. **Results** Sorafenib obviously decreased the expression of miR-101-3p in HepG2 cells ($P<0.05$). Informatics analysis showed that miR-101-3p could bind to the 3'-UTR of EZH2 mRNA, and transfection with miR-101-3p significantly inhibited the expression of EZH2 in HepG2 cells ($P<0.05$). Sorafenib treatment significantly increased the expression of EZH2 in HepG2 cells ($P<0.05$). Both miR-101-3p over-expression and EPZ-6438 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

resulted in significantly increased sorafenib sensitivity of HepG2 cells ($P<0.05$). **Conclusion** Activation of the miR-101-3p/EZH2 pathway can enhance sorafenib sensitivity of HepG2 cells.

[**Key words**] microRNA; sorafenib; drug resistance; hepatoma; enhancer of zeste homolog 2

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

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球常见的恶性肿瘤之一,严重威胁着人类的生存和健康[1]。根据2018年全球癌症统计[2],每年约84万人患肝癌,死亡人数高达78万人,其中男性多见,约为女性患者的2~3倍。肝癌的治疗主要分为手术治疗、化疗、介入治疗等。由于大多数肝癌发病隐匿,通常出现临床症状时已达中晚期,发生转移从而失去了手术治疗的最佳时期。因此,化疗成为中晚期肝癌主要的治疗方式之一[3-4]。索拉非尼(Sorafenib)是一种多激酶抑制剂,同时也是一种新型多分子靶点化疗药,临床上多用于晚期恶性肿瘤,特别是肝癌的治疗。索拉非尼能平均延长肝癌晚期患者3个月生存期,但由于患者先天或获得性的耐药,通常用药不超过6个月即产生索拉非尼耐药[5]。因此,探讨肝癌细胞对索拉非尼的耐药机制以及增强索拉非尼对肝癌细胞的杀伤是提高肝癌患者生存期、降低肝癌患者病死率的关键。

微小RNA(microRNA,miRNA)是一种内源性单链的非编码RNA小分子,长度约为22 nt。miRNA可以与靶mRNA的3'UTR发生特异性的碱基互补配对,抑制靶基因的表达,从而在转录后水平发挥基因调控功能[6]。研究表明,miRNA在肿瘤发生、发展过程中发挥着重要的调控作用,同时miRNA也参与肿瘤细胞对化疗药物产生抵抗的过程[7-9]。miR-101-3p在多种癌症中呈现低表达水平,如肝癌[10]、胃癌[11]、鼻咽癌[12]、膀胱癌[13]、乳腺癌[14]等,并且miR-101-3p可通过调控下游靶mRNA的表达水平而促进肿瘤细胞的增殖迁移。但miR-101-3p是否参与肝癌对索拉非尼的耐药机制尚不明确。因此,本研究着重探讨miR-101-3p在HepG2细胞抵抗索拉非尼中发挥的作用及可能机制,并探讨相关增敏措施,旨在为提升索拉非尼的临床疗效提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌HepG2细胞株由本实验室保存。高糖DMEM培养基、胎牛血清和0.25%胰酶均购自Gibco公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒、RIPA裂解液、PMSF、CCK-8试剂购自江苏碧云天公司;索拉非尼购自Sigma公司;转染试剂Lipofectamine3000购自Invitrogen公司;miR-101-3p模拟物(mimics)及其对照物(mimics NC)购自上海吉荧公司;EZH2 3'UTR双荧光素酶报告基因野生型和突变型质粒构建于上海吉玛公司;miR-101-3p、U6、EZH2以及GAPDH基因引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司;总RNA提取试剂盒购自杭州博日公司;miRNA反转录试剂盒(Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit)购自美国Clontech公司;mRNA反转录试剂盒(PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser)和荧光定量PCR试剂盒[TB Green® Premix *Ex Taq*™ Ⅱ (Tli RNaseH Plus)]均购自日本TaKaRa公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒(Dual-Luciferase® Reporter Assay System)购自Promega公司;EZH2抗体购自Proteintech公司;GAPDH抗体、山羊抗兔二抗购自Bioworld technology公司;PVDF膜、ECL发光液、电泳凝胶试剂盒购自Bio-Rad公司;EZH2抑制剂(EPZ-6438)购自MedChemExpress公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将HepG2细胞置于含10%胎牛血清的DMEM培养基中,在37 ℃、5%CO_2的细胞培养箱中静置培养。每日对细胞进行换液,换液时用PBS缓冲液轻微冲洗3次,加入0.25%胰酶静置数分钟消化细胞,而后加入适量新鲜的10%胎牛血清培养基重悬细胞使其重新贴壁生长。待细胞进入对数生长期时便可进行加药或转染处理。

1.2.2 RNA提取及Real-time PCR检测基因表达水平 HepG2细胞经索拉非尼处理24 h后弃去含药培养基,用PBS缓冲液冲洗3次。加入0.25%胰酶将细胞消化下来,再次加入含血清培养基中和胰酶并收集细胞悬液,离心收集细胞后按总RNA提取试剂盒步骤提取肝癌细胞的总RNA。采用Clontech公司miRNA反转试剂盒Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit将miRNA反转录为cDNA,作为Real-time PCR检测miR-101-3p表达水平的模板;采用mRNA反转录试剂盒PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser将mRNA反转录为cDNA,作为Real-time PCR检测EZH2 mRNA

表达水平的模板。Real-time PCR 检测试剂盒为 TaKaRa 公司生产的 TB Green® Premix *Ex Taq*™ Ⅱ (Tli RNaseH Plus),检测结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析后作图。

1.2.3 双荧光素酶报告基因实验 使用 microRNA 的靶标预测网站 Starbase2.0 (http://starbase.sysu.edu.cn)预测 miR-101-3p 的靶标基因及其结合位点。为验证 miR-101-3p 是否与 EZH2 的 3'UTR 区存在直接结合,进行双荧光素酶报告基因实验。EZH2 野生型(WT)报告基因质粒中包含 miR-101-3p 的结合位点,而突变型(MUT)报告基因质粒中包含突变的 miR-101-3p 的结合位点。将 HepG2 细胞以 1×10^4/孔接种于 48 孔板中,分别设置 3 个对照组以及 1 个实验组,每组设置 3 个复孔。对照组一转染 0.2 μg 野生型报告基因质粒和 0.2 μg microRNA 模拟对照物(NC mimics);对照组二转染 0.2 μg 突变型报告基因质粒和 0.2 μg microRNA 模拟对照物(NC mimics);对照组三转染 0.2 μg 突变型报告基因质粒和 0.2 μg miR-101-3p 模拟物(miR-101-3p mimics);实验组转染 0.2 μg 野生型报告基因质粒和 0.2 μg miR-101-3p 模拟物(miR-101-3p mimics)。转染 48 h 后,使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒进行测定。通过 Fluc/Rluc 比值反应 miR-101-3p 与 EZH2 的 3'UTR 区结合情况。

1.2.4 总蛋白提取及含量测定 HepG2 细胞以 5×10^4/孔接种于 6 孔板中,分别设置对照组(NC mimics)和实验组(miR-101-3p mimics)。待细胞生长达到 50%时,分别向对照组中转染模拟对照物(NC mimics),实验组中转染 miR-101-3p 模拟物(miR-101-3p mimics)。处理 24 h,弃去培养基,用 PBS 清洗细胞 3 次。每孔加入 100 μL 含 1 mmol/L 的 RIPA 裂解液,用细胞刮反复刮取贴壁细胞并置于冰上作用 20 min。将裂解液移入 1.5 mL EP 管中,4 ℃、14 000×*g* 离心 5 min,收集上清于新的 EP 管中。使用 BCA 法对蛋白浓度进行测定并标定为统一浓度。

1.2.5 Western blot 实验 将定量变性后的蛋白质以每孔 40 μg 上样,在电泳凝胶中进行电泳分离。将分离后的目的蛋白转移到 PVDF 膜上,用含脱脂奶粉的 PBST 溶液封闭 1 h。用 PBST 清洗 3 次,每次 10 min,然后将膜分别放置于含对应抗体溶液中 4 ℃隔夜孵育。一抗的稀释浓度为 1∶1 000。将膜用 PBST 清洗 3 次后再用含山羊抗兔二抗的 PBST 溶液室温孵育 1 h。PBST 洗膜后,使用化学发光法在化学发光仪中显影曝光。

1.2.6 CCK-8 检测细胞生存率

1.2.6.1 索拉非尼单用及联合 miR-101-3p 模拟物(mimics)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、索拉非尼与 miR-101-3p 联用组,每组设置 3 个复孔。待细胞生长融合至 50%时,分别向对照组中转染模拟对照物(NC mimics),向索拉非尼与 miR-101-3p 联用组中转染 miR-101-3p 模拟物(mimics)。转染用量按照上海吉荧公司推荐使用。转染 24 h 后索拉非尼组和索拉非尼与 miR-101-3p 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)],计算每组的细胞存活率。

1.2.6.2 索拉非尼联合 EZH2 抑制剂(EPZ-6438)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/mL)、EPZ-6438 组(5 μmol/mL)、索拉非尼(10 μmol/mL)与 EPZ-6438(5 μmol/mL)联合组,每组分别设置 3 个复孔。HepG2 细胞分别接种于 96 孔板中,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)],计算每组的细胞存活率。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 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 $\alpha=0.05$。

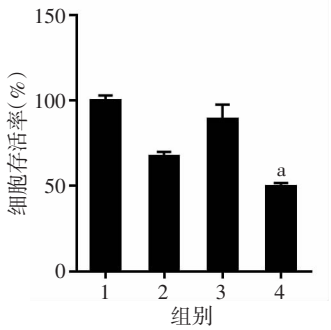
2 结果

2.1 索拉非尼下调 HepG2 细胞中 miR-101-3p 的表达

为明确索拉非尼处理对 miR-101-3p 表达的影响,采用 Real-time PCR 检测 HepG2 细胞经索拉非尼处理前后 miR-101-3p 的表达变化。10 μmol/mL 索拉非尼处理 24 h 后,HepG2 细胞中 miR-101-3p 基因表达量显著下调(0.645±0.081 *vs.* 1.000±0.031,$P<0.05$)

2.2 过表达 miR-101-3p 增加 HepG2 细胞对索拉非尼的敏感性

为明确 miR-101-3p 表达下调在 HepG2 细胞耐受索拉非尼中的意义,在 HepG2 细胞中过表达 miR-101-3p 后使用索拉非尼处理 24 h,CCK-8 实验结果表明,过表达 miR-101-3p 可显著增强 HepG2 对索拉非尼的敏感性($P<0.05$,图 1)



1:对照组;2:索拉非尼组;3:miR-101-3p 组;4:索拉非尼与 miR-101-3p 联用组　a:$P<0.05$,与索拉非尼组比较

图 1　上调 miR-101-3p 增加索拉非尼对 HepG2 细胞杀伤效果　($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

2.3　miR-101-3p 靶向抑制 EZH2 的表达

利用生物信息学网站 Starbase 2.0(http://starbase.sysu.edu.cn/)预测 miR-101-3p 结合的靶基因,根据结合评分及靶基因的生物学功能,选定 EZH2 为 miR-101-3p 的候选靶基因(图 2)。为验证 miR-101-3p 对 EZH2 的调控作用,在 HepG2 细胞中过表达 miR-101-3p 后,Western blot 检测发现 EZH2 的蛋白表达显著下调(图 3A),Real-time PCR 检测证实 EZH2 的 mRNA 水平也显著下调($P<0.05$,图 3B)。

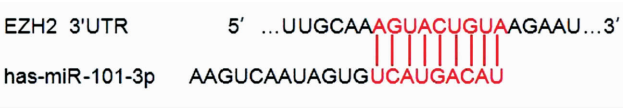
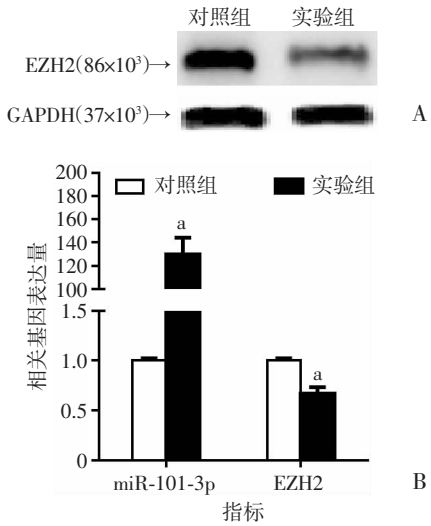


图 2　生物信息学预测发现 miR-101-3p 与 EZH2 的 3'UTR 区存在结合位点

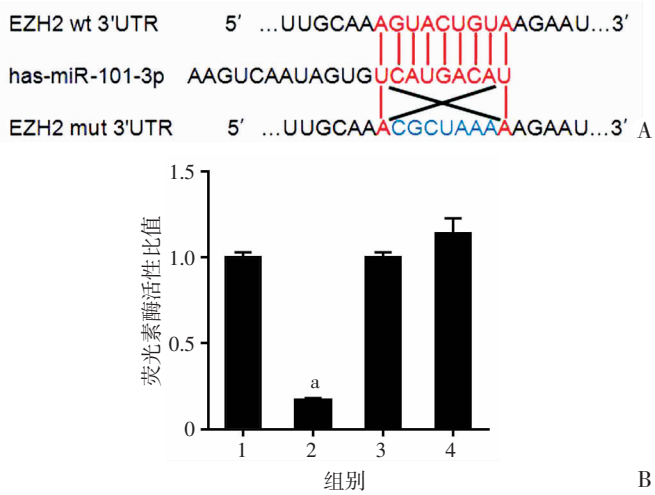


A:Western blot 检测过表达 miR-101-3p 后 EZH2 蛋白表达变化;B: Real-time PCR 检测过表达 miR-101-3p 后 EZH2 mRNA 表达变化($n=3$,$\bar{x}\pm s$)　a: $P<0.05$,与对照组比较

图 3　miR-101-3p 靶向抑制 EZH2 的表达

2.4　miR-101-3p 与 EZH2 的 3'UTR 存在直接结合

为了验证 miR-101-3p 是否与 EZH2 的 3'UTR 区存在直接结合,先构建含有 EZH2 3'UTR 区野生型(EZH2 wt-3'UTR)与突变 miR-101-3p 结合位点的突变型(EZH2 mut-3'UTR)报告基因质粒(图 4A);通过双荧光素酶报告基因检测发现,过表达 miR-101-3p 可抑制野生型报告基因活性,而对突变型报告基因无抑制作用(图 4B),说明 miR-101-3p 与 EZH2 的 3'UTR 区存在直接结合,可通过促进 EZH2 mRNA 的降解而抑制 EZH2 的表达。



A:miR-101-3p、EZH2 wt-3'UTR 和 EZH2 mut-3'UTR 的序列对比;B:双荧光素酶报告基因验证 miR-101-3p 与 EZH2 3'UTR 存在直接结合($n=3$, $\bar{x}\pm s$)　1:对照组一;2:实验组;3:对照组二;4:对照组三　a: $P<0.05$,与对照组一比较

图 4　miR-101-3p 与 EZH2 的 3'UTR 存在直接结合

2.5　索拉非尼处理上调 HepG2 细胞中 EZH2 基因表达

HepG2 细胞经索拉非尼处理 24 h 后,Western blot 检测 EZH2 的蛋白表达显著上调(图 5),Real-time PCR 检测证实 EZH2 的 mRNA 表达水平也明显上调(1.906 ± 0.105 *vs.* 1.000 ± 0.096, $P<0.05$)。

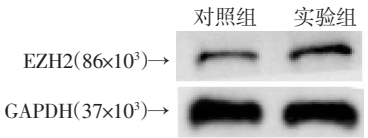
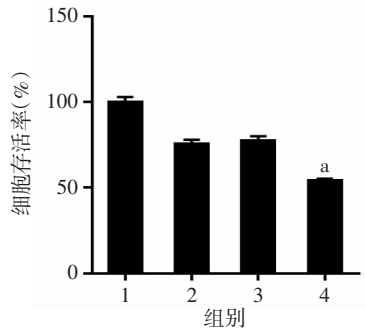


图 5　Western blot 检测索拉非尼处理后 EZH2 的蛋白表达变化

2.6　EZH2 抑制剂 EPZ-6438 可增加 HepG2 细胞对索拉非尼的敏感性

结果显示,使用 EZH2 抑制剂 EPZ-6438(5 μmol/mL)联合索拉非尼处理 HepG2 细胞后,可显著增加索拉非

尼对 HepG2 细胞的杀伤效果($P<0.05$,图 6)。



1:对照组;2:索拉非尼组;3:EPZ-6438 组;4:索拉非尼与 EZP-6438 联合组 a:$P<0.05$,与索拉非尼组比较

图 6 各组处理后 HepG2 细胞的存活率比较 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

3 讨论

近年来,全球肝癌的发病率持续增长,尤其在发展中国家肝癌依旧是高发病率及高病死率的恶性肿瘤之一[15]。索拉非尼是晚期肝癌最常用的分子靶向治疗药物,肝癌对索拉非尼的耐药严重影响着肝癌患者的生存和预后[16-18],探索肝癌细胞对索拉非尼耐药的机制以及提高索拉非尼的敏感性成为临床上急需解决的问题之一。

miRNA 在肿瘤发生、发展及治疗的各个方面起到调控作用,包括肿瘤对化疗药物的耐药过程[19-21]。目前研究表明多种 microRNA 参与了索拉非尼耐药。miR-21 在索拉非尼处理后呈上调趋势,通过 Akt/PTEN 途径抑制自噬,参与索拉非尼获得性耐药[22]。miR-122 在索拉非尼耐药的肝癌细胞中呈现低表达水平,并且可以通过抑制胰岛素样生长因子 1 受体(IGF-1R)从而参与索拉非尼的耐药过程[23]。miR-34a 在肝癌组织和细胞系中呈现低表达水平,通过对 Bcl-2 的调控作用参与索拉非尼的耐药[24]。miR-27b 通过激活 p53 依赖性的细胞凋亡和降低 CYP1B1 介导的药物解毒作用来增强索拉非尼对肝癌的杀伤作用[25]。以上研究提示,microRNA 参与肝癌中索拉非尼耐药机制,microRNA 在耐药中发挥的作用也被广泛关注有望成为新的化疗靶点。

miR-101-3p 调控着肿瘤细胞的增殖和生长能力,迁移、侵袭能力,包括自噬水平等,在多种肿瘤细胞中呈现低表达水平。miR-101-3p 在子宫内膜癌(endometrial cancer,EC)组织中的表达水平明显低于正常组织,并且 miR-101-3p 还通过抑制 EZH2 的表达促进 EC 细胞自噬[26]。在胶质母细胞瘤(glioblastoma,GBM)细胞系中 miR-101-3p 呈低表达水平,miR-101-3p 通过直接靶向 TRIM44 的 3'UTR 来减弱 TRIM44 诱导的上皮间充质转化(EMT),从而调节 GBM 细胞的增殖和迁移[27]。在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,NSCLC)中,miR-101-3p 通过靶向 MALAT-1 来阻断 PI3K/AKT 信号通路,从而抑制 NSCLC 的生长和转移[28]。本研究结果表明,索拉非尼处理可显著下调 HepG2 细胞中的 miR-101-3p 水平,且过表达 miR-101-3p 则可显著增强索拉非尼对肝癌细胞的杀伤效果,说明 miR-101-3p 的表达下调可能是肝癌细胞耐受索拉非尼的重要原因。

为探究 miR-101-3p 参与耐药的相关机制,通过生物信息学分析、双荧光素酶报告基因实验、Western blot 及 Real-time PCR 实验确定了 EZH2 为 miR-101-3p 作用的靶基因。即 miR-101-3p 下调后可导致 EZH2 表达上调而引起耐药;而 EZH2 的抑制剂(EPZ-6438)可以显著增敏索拉非尼的杀伤效果,从而进一步证实 miR-101-3p/EZH2 参与了肝癌细胞对索拉非尼的耐药。研究表明[29-32],EZH2 是一种赖氨酸特异性的甲基转移酶,能使组蛋白 H3 上的赖氨酸 27(k27)发生甲基化。EZH2 在多种肿瘤组织中的表达明显高于癌旁组织,调控肿瘤细胞的生长、增殖、迁移和细胞周期等,该基因表达升高往往预示不良预后。在肝癌细胞中,EZH2 的高表达与索拉非尼耐药相关。有研究报道[33],EZH2 可通过转录抑制 miRNA-139、miRNA-125b、miRANG-122 等一组 miRNA 的表达,降低该组 miRNA 对 IGF1R 的靶向抑制作用,使得 IGRF1R 表达升高,从而参与肝癌细胞的索拉非尼耐药。说明 miR-101-3p 表达降低导致的 EZH2 表达升高可能通过多种途径引起肝癌细胞对索拉非尼耐药。

综上所述,本研究阐明 miR-101-3p/EZH2 信号通路参与了肝癌对索拉非尼的耐药过程。索拉非尼抑制 miR-101-3p/EZH2 信号通路,通过上调 miR-101-3p 的表达,可以显著增敏索拉非尼,促进细胞死亡。本研究还发现 EPZ-6438 联合索拉非尼用药能显著增加肝癌对索拉非尼的敏感性,提高索拉非尼对肝癌的杀伤力,促进细胞死亡。miR-101-3p 是否还能通过靶向其他基因参与索拉非尼耐药? miR-101-3p 是否还能参与其他化疗药物的耐药过程? 是否存在其他 miRNA 靶向 EZH2 参与索拉非尼耐药? 将成为我们下一步探索的目标。这些结果的完善,可能为设计完善针对肝癌的索拉非尼化疗新方案提供思路。

参考文献:

[1] YANG J D, HAINAUT P, GORES G J, *et al*. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16(10): 589-604. DOI: 10.1038/s41575-019-0186-y.

[2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, *et al*. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424. DOI: 10.3322/caac.21492.

[3] LLOVET J M, VILLANUEVA A, LACHENMAYER A, *et al*. Advances in targeted therapies for hepatocellular carcinoma in the genomic era[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2015, 12(7): 408-424. DOI: 10.1038/nrclinonc.2015.103.

[4] COLAGRANDE S, INGHILESI A L, ABURAS S, *et al*. Challenges of advanced hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(34): 7645. DOI: 10.3748/wjg.v22.i34.7645.

[5] WANG P, TAN G, ZHU M, *et al*. Hand-foot skin reaction is a beneficial indicator of sorafenib therapy for patients with hepatocellular carcinoma: a systemic review and meta-analysis[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2018, 12(1): 1-8. DOI: 10.1080/17474124.2017.1373018.

[6] MICHLEWSKI G, CÁCERES J F. Post-transcriptional control of miRNA biogenesis[J]. RNA, 2019, 25(1): 1-16. DOI: 10.1261/rna.068692.118.

[7] ACUNZO M, ROMANO G, WERNICKE D, *et al*. MicroRNA and cancer-a brief overview[J]. Adv Biol Regul, 2015, 57(1): 1-9. DOI: 10.1016/j.jbior.2014.09.013.

[8] ZHANG H F, WANG Y C, HAN Y D. MicroRNA-34a inhibits liver cancer cell growth by reprogramming glucose metabolism[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(3): 4483-4489. DOI: 10.3892/mmr.2018.8399.

[9] GOMES B C, RUEFF J, RODRIGUES A S. MicroRNAs and cancer drug resistance[M]Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2016: 137-162. DOI: 10.1007/978-1-4939-3347-1_9.

[10] YAN S, SHAN X, CHEN K, *et al*. LINC00052/miR-101-3p axis inhibits cell proliferation and metastasis by targeting SOX9 in hepatocellular carcinoma[J]. Gene, 2018, 679(6): 138-149. DOI: 10.1016/j.gene.2018.08.038.

[11] CAO S, LIN L, XIA X, *et al*. lncRNA SPRY4-IT1 regulates cell proliferation and migration by sponging miR-101-3p and regulating AMPK expression in gastric cancer[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2019, 17: 455-464. DOI: 10.1016/j.omtn.2019.04.030.

[12] XUE M Y, CAO H X. Long non-coding RNA CASC15 promotes nasopharyngeal carcinoma cell proliferation and metastasis by downregulating miR-101-3p[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(20): 8897-8904. DOI: 10.26355/eurrev_201910_19285.

[13] LIU D, LI Y, LUO G, *et al*. LncRNA SPRY4-IT1 sponges miR-101-3p to promote proliferation and metastasis of bladder cancer cells through up-regulating EZH2[J]. Cancer Lett, 2017, 388: 281-291. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.12.005.

[14] ZHANG X F, GAO D F, FANG K, *et al*. Med19 is targeted by miR-101-3p/miR-422a and promotes breast cancer progression by regulating the EGFR/MEK/ERK signaling pathway[J]. Cancer Lett, 2019, 444: 105-115. DOI: 10.1016/j.canlet.2018.12.008.

[15] VENOOK A P, PAPANDREOU C, FURUSE J, *et al*. The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective[J]. Oncologist, 2010, 15(Suppl 4): 5-13. DOI: 10.1634/theoncologist.2010-s4-05.

[16] XIE L, ZENG Y, DAI Z, *et al*. Chemical and genetic inhibition of STAT3 sensitizes hepatocellular carcinoma cells to sorafenib induced cell death[J]. Int J Biol Sci, 2018, 14(5): 577-585. DOI: 10.7150/ijbs.22220.

[17] SHENG J, QIN H, ZHANG K, *et al*. Targeting autophagy in chemotherapy-resistant of hepatocellular carcinoma[J]. Am J Cancer Res, 2018, 8(3): 354-365.

[18] KLUNGBOONKRONG V, DAS D, MCLENNAN G. Molecular mechanisms and targets of therapy for hepatocellular carcinoma[J]. J Vasc Interv Radiol, 2017, 28(7): 949-955. DOI: 10.1016/j.jvir.2017.03.002.

[19] SARTORIUS K, SATORIUS B, WINKLER C, *et al*. The biological and diagnostic role of miRNA's in hepatocellular carcinoma[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2018, 23: 1701-1720. DOI: 10.2741/4668.

[20] QADIR M I, FAHEEM A. miRNA: a diagnostic and therapeutic tool for pancreatic cancer[J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2017, 27(3): 197-204. DOI: 10.1615/critreveukaryotgeneexpr.2017019494.

[21] MASOOD Y, KQUEEN C Y, RAJADURAI P. Role of miRNA in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2015, 15(2): 183-197. DOI: 10.1586/14737140.2015.978294.

[22] HE C, DONG X, ZHAI B, *et al*. MiR-21 mediates sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting autophagy via the PTEN/Akt pathway[J]. Oncotarget, 2015, 6(30): 28867-28881. DOI: 10.18632/oncotarget.4814.

[23] XU Y, HUANG J, MA L, *et al*. MicroRNA-122 confers sorafenib resistance to hepatocellular carcinoma cells by tar-

geting IGF-1R to regulate RAS/RAF/ERK signaling pathways[J]. Cancer Lett, 2016, 371(2): 171-181. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.11.034.

[24] YANG F, LI Q J, GONG Z B, *et al*. MicroRNA-34a targets Bcl-2 and sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to sorafenib treatment[J]. Technol Cancer Res Treat, 2014, 13(1): 77-86. DOI: 10.7785/tcrt.2012.500364.

[25] MU W, HU C, ZHANG H, *et al*. MiR-27b synergizes with anticancer drugs via p53 activation and CYP1B1 suppression [J]. Cell Res, 2015, 25(4): 477-495. DOI: 10.1038/cr.2015.23.

[26] WANG C, LIU B. MiR-101-3p induces autophagy in endometrial carcinoma cells by targeting EZH2[J]. Arch Gynecol Obstet, 2018, 297(6): 1539-1548. DOI: 10.1007/s00404-018-4768-7.

[27] LI L, SHAO M Y, ZOU S C, *et al*. MiR-101-3p inhibits EMT to attenuate proliferation and metastasis in glioblastoma by targeting TRIM44[J]. J Neuro-Oncol, 2019, 141(1): 19-30. DOI: 10.1007/s11060-018-2973-7.

[28] ZHANG X Q, HE X J, LIU Y B, *et al*. MiR-101-3p inhibits the growth and metastasis of non-small cell lung cancer through blocking PI3K/AKT signal pathway by targeting MALAT-1[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 93: 1065-1073. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.07.005.

[29] SU M, XIAO Y, TANG J, *et al*. Role of lncRNA and EZH2 interaction/regulatory network in lung cancer[J]. J Cancer, 2018, 9(22): 4156-4165. DOI: 10.7150/jca.27098.

[30] LI B, CHNG W J. EZH2 abnormalities in lymphoid malignancies: underlying mechanisms and therapeutic implications[J]. J Hematol Oncol, 2019, 12(1): 118. DOI: 10.1186/s13045-019-0814-6.

[31] NING X, SHI Z, LIU X, *et al*. DNMT1 and EZH2 mediated methylation silences the microRNA-200b/a/429 gene and promotes tumor progression[J]. Cancer Lett, 2015, 359(2): 198-205. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.01.005.

[32] HUANG B, HUANG M, LI Q. MiR-137 suppresses migration and invasion by targeting EZH2-STAT3 signaling in human hepatocellular carcinoma[J]. Pathol Res Pract, 2018, 214(12): 1980-1986. DOI: 10.1016/j.prp.2018.08.005.

[33] HU J, ZHANG J, SUN F, *et al*. Enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit promotes sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma though insulin-like growth factor 1 receptor[J]. Anticancer Drugs, 2019, 30(7): e0746. DOI: 10.1097/cad.0000000000000746.

(**收稿**:2020-07-08;**修回**:2020-09-18)

(编辑 汪勤俭)