DOI:10.16016/j.1000-5404.202012245

miR-3934-5p 靶向抑制 β 内酰胺酶表达促进肝癌细胞增殖

鲜 瑶[1],刘润坤[2],莫缓椰[2],肖雪莲[2],王 亮[2],张 雷[3] 710061 西安,西安交通大学第一附属医院:营养科[1],肝胆外科[2],老年外科[3]

[摘要] **目的** 观察 miR-3934-5p 在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中的表达,探讨其临床意义及分子机制。**方法** 收集 53 例 2013 年 9 月至 2014 年 8 月在本院确诊的肝细胞癌患者的癌旁组织及肿瘤组织。实时定量 PCR(RT-qPCR)检测组织和细胞 miR-3934-5p 的表达;应用人类癌症基因库(the Cancer Genome Atlas, TCGA)分析正常肝组织与肝癌组织中 miR-3934-5p 的表达;用 χ^2 检验和 Kaplan-Meier 生存曲线分析 miR-3934-5p 与临床病理特征及生存预后之间的相关性;采用 RT-qPCR 和 Western blot 检测转染效率;CCK-8 实验、平板克隆实验及 EdU 实验评价 HCCLM3 细胞的活性及增殖能力;分析 HCC 组织中 β-内酰胺酶(beta-lactamases, LACTB) mRNA 与 miR-3934-5p 表达的相关性;TargetScan 数据库预测 miR-3934-5p 下游靶基因,通过荧光素酶报告基因实验加以验证。**结果** miR-3934-5p 在肝癌组织及细胞中高表达($P<0.05$),且其高表达与肿瘤大小、肿瘤数量、血管侵犯及 TNM 分期显著相关($P<0.05$);与 miR-3934-5p 低表达组相比,miR-3934-5p 高表达组的肝癌患者 5 年生存率更低;CCK-8 实验、平板克隆实验及 EdU 实验结果证实:敲减 miR-3934-5p 可显著抑制 HCCLM3 细胞的增殖能力($P<0.05$);LACTB 被证实是 miR-3934-5p 的直接作用靶点,且其介导了 miR-3934-5p 的生物学功能。**结论** miR-3934-5p 通过靶向抑制抑癌基因 LACTB 的表达促进肝癌细胞的增殖能力。

[关键词] 肝细胞癌;miR-3934-5p;β-内酰胺酶;细胞增殖
[中图法分类号] R394.3; R730.23; R735.7 [文献标志码] A

MiR-3934-5p promotes proliferation of hepatocellular carcinoma cells by targeting LACTB

XIAN Yao[1], LIU Runkun[2], MO Huanye[2], XIAO Xuelian[2], WANG Liang[2], ZHANG Lei[3] [1]Department of Nutrition, [2]Department of Hepatobiliary Surgery, [3]Department of Geriatric Surgery, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi Province, 710061, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the expression, clinical significance and molecular mechanism of miR-3934-5p in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** HCC tissues and adjacent normal tissues were collected from 53 HCC patients diagnosed in our hospital from September 2013 to August 2014. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was performed to detect the level of miR-3934-5p in the above tissues and human liver cell line L02 and HCC cell lines. The Cancer Genome Atlas (TCGA) database was used to analyze the expression of miR-3934-5p in normal liver tissues and HCC tissues; *Chi*-square test with Kaplan-Meier survival curve were applied to analyze the correlation of miR-3934-5p and clinicopathological characteristics and survival prognosis; RT-qPCR and Western blotting were adopted to detect transfection efficiency; CCK-8 assay, colony formation assay and EdU assay were employed respectively to evaluate the activity and proliferation of HCCLM3 cells; Spearman correlation analysis was applied to study the correlation between LACTB mRNA and miR-3934-5p expression in HCC tissues; TargetScan database was used to predict

[基金项目] 陕西省重点研发计划(2020SF-061);西安交通大学第一附属医院院基金(2019ZYTS-07)
[通信作者] 张 雷,E-mail: zhanglei0519@xjtu.edu.cn

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/)

the downstream target genes of miR-3934-5p, and the prediction results was verified by luciferase reporter assay. **Results** MiR-3934-5p was highly expressed in the liver cancer tissues and cells ($P<0.05$), and its high expression was significantly correlated with tumor size ($P=0.040$), tumor multiplicity ($P=0.013$), vascular invasion ($P=0.006$), and TNM stage ($P=0.017$); Compared to the low miR-3934-5p expression group, the HCC patients with high expression had poorer survival prognosis. CCK-8 assay, colony formation assay and EdU assay confirmed that knocking down miR-3934-5p notably inhibited the proliferation of HCCLM3 cells ($P<0.05$). LACTB had been proved to be the direct target of miR-3934-5p, and mediated the biological effect of miR-3934-5p on HCC cells. **Conclusion** MiR-3934-5p promotes the proliferation of HCC cells by targeting tumor suppressor gene LACTB.

[**Key words**] hepatocellular carcinoma; miR-3934-5p; beta-lactamases; cell proliferation

Supported by the Key Research and Development Program of Shaanxi Province (2020SF-061) and the Foundation of the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University (2019ZYTS-07). Corresponding author: ZHANG Lei, E-mail: zhanglei0519@xjtu.edu.cn

原发性肝癌(primary liver cancer,PLC)是全球常见的恶性肿瘤之一,严重威胁着人们的身体健康[1]。肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)是原发性肝癌最常见的病理类型,通常起病隐匿、早期缺乏典型临床症状且缺乏有效的早期诊断靶标,故早期确诊难度较大;再加上 HCC 进展较为迅速且恶性程度高,导致 HCC 患者预后往往较差。因此,基于 HCC 的诊治现状,对其发病机制进行深入探索,进而寻求有效的早期诊断指标和预后监测指标就显得尤为重要且迫切。microRNA(miRNAs)是一类长度为 21~25 nt 的非编码单链 RNA,其在进化上具有高度保守性,能够通过与靶基因 mRNA 特异性的碱基互补配对导致靶基因 mRNA 降解或抑制其翻译,从而实现在转录后水平对基因的表达进行调控。miRNAs 广泛参与了肝细胞癌的发生和发展,其可通过调控肿瘤细胞的增殖[2]、侵袭及转移[3]等多种恶性生物学过程,进而发挥其促癌或者抑癌的生物学作用。研究表明 miR-3934-5p 在非小细胞肺癌[4]和神经母细胞瘤[5]均发挥促癌功能,而 miR-3934-5p 在 HCC 中的表达及功能目前均不清楚。

β-内酰胺酶(beta-lactamases,LACTB)是一种位于线粒体膜间隙的哺乳动物活性位点丝氨酸蛋白,其从细菌青霉素结合蛋白进化而来的,在哺乳动物的肝脏、心脏和骨骼肌的组织中普遍存在。研究发现 LACTB 可通过减少线粒体磷脂酰乙醇胺合成过程中线粒体磷脂酰丝氨酸脱羧酶的水平,调控线粒体脂质代谢,而进一步影响细胞的分化,继而影响肿瘤进展[6]。研究显示 LACTB 在乳腺癌[7]、结直肠癌[8]及肝癌组织[9]中表达均明显下调,表明其在肿瘤细胞的增殖、侵袭和远处转移等恶性生物学行为中起到重要的调节作用。而 LACTB 与 miR-3934-5p 的关系也不清楚。因此,本研究旨在探讨 miR-3934-5p 在肝癌组织及细胞中的表达情况、临床意义及生物学功能,并进一步研究其分子机制,从而为 HCC 的临床诊治提供潜在的分子靶标。

1 材料与方法

1.1 组织与细胞

收集 53 例 2013 年 9 月至 2014 年 8 月在本院肝胆外科手术治疗后经病理证实为肝细胞癌患者的癌旁肝脏组织及肿瘤组织。患者术前均未行非手术相关治疗,均有详细的随访信息。本课题经本院伦理委员会审核(2020 伦审科字第 107 号),且获得患者知情同意。HEK293T、正常永生化人肝细胞 L02 及肝癌细胞株(Hep3B、Huh7、MHCC97-L、SK-Hep-1、MHCC97-H、HCCLM3)均购自中科院上海细胞库。

1.2 试剂

培养细胞所使用的 DMEM 培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司;双抗(氨苄青霉素和链霉素)由美国 HyClone 公司提供;提取 RNA 所使用的 TRIzol 试剂及转染所需的 Lipofectamine™ 2000 由美国 Invitrogen 公司提供;miR-3934-5p(miRA1001165-1-100)和 U6(miRAN0002-1-100)的引物序列、miR-3934-5p inhibitors(anti-miR-3934-5p, miR20018349-1-5)及阴性对照序列(anti-miR-NC, miR2N0000001-1-5)、靶向 LACTB 的小干扰 siRNA(siG000114294A-1-5)由广州锐博生物技术有限公司提供(miR-3934-5p inhibitors 被用来敲减 HCC 细胞中 miR-3934-5p 的表达;小干扰 siLACTB 被用来敲减 HCC 细胞中 LACTB 的表达);ECL 发光液购自美国 Milipore 公司;LACTB 抗体(货号 ab131171)购自 Abcam 公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;RIPA 裂解液购自西安赫特生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 含 10%胎牛血清、100 IU/mL 青霉素及 100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养基被用来培

养 L02、Hep3B、Huh7、MHCC97-L、SK-Hep-1、MHCC97-H、HCCLM3 细胞,培养条件为 5%CO_2、37 ℃的恒温培养箱。

1.3.2 转染 HCCLM3 细胞常规培养接种于 6 孔板中,待细胞汇合度达 50%左右时,将 miR-3934-5p inhibitors 和/或 LACTB siRNA 及相应的阴性对照序列按照 Lipofectamine ™ 2000 说明书步骤加入 6 孔板中,用无双抗含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基培养 6 h 后,更换成完全培养基继续培养,48 h 后收取细胞,进行转染效率检测和功能学实验。

1.3.3 实时定量 PCR(RT-qPCR) TRIzol 法提取 HCC 组织及细胞中 RNA,逆转录及定量操作按照说明书步骤进行,分别以 U6 和 β-actin 为内参,通过 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法分别计算 miR-3934-5p 及 LACTB 相对表达量,每个样本独立重复实验 3 次。miR-3934-5p 正向引物:5′-GCCAGCTCCTACATCTCAGC-3′;LACTB 引物:正向 5′-ACAGAGCAGGAGAATGAA-3′,反向 5′-TGACTA-CCAGGTTTGAAGA3′。

1.3.4 CCK-8 检测 调整经转染的 HCCLM3 细胞为 5×10^4/mL,并接种 100 μL 细胞悬液至 96 孔培养板,每组设 5 个复孔,在细胞培养箱中进行常规培养。分别在 0、24、48、72 h 各取出 1 个培养板进行检测。在避光情况下,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,继续在细胞培养箱中孵育 0.5 h,通过酶标仪测定 450 nm 波长处的光密度值 $D(450)$,整理数据结果并绘制细胞生长曲线。

1.3.5 克隆形成实验 调整经转染的 HCCLM3 细胞密度,使得每个小皿中的细胞数为 1 000 个,然后将小皿置于细胞培养箱中培养,定期观察细胞生长状态。当小皿中的单个细胞形成肉眼可见的细胞团块时将其取出,依次进行 PBS 清洗、甲醇固定、结晶紫染色、拍照。对细胞克隆进行计数和统计学分析。

1.3.6 EdU 细胞增殖检测 调整经转染的 HCCLM3 细胞为 5×10^4/mL,并接种 100 μL 细胞悬液至 96 孔培养板,置于培养箱中培养;按照试剂盒说明书配制 EdU 培养基,并用其孵育细胞,对细胞进行 EdU 标记。按照说明书依次进行细胞固定、Apollo 染色、DNA 染色、拍照。计算 EdU 阳性细胞比并对结果进行统计学分析。

1.3.7 Western blot 检测 利用 RIPA 裂解液抽提经转染的 HCCLM3 细胞的总蛋白并用 BCA 法进行蛋白定量。将待检测蛋白样品按 40 μg/孔上样后行 SDS-PAGE 电泳,然后通过湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上,将膜用 5%脱脂牛奶封闭 2 h 后进行一抗(LACTB,1∶1 000;β-actin,1∶1 000)4 ℃孵育过夜;第 2 天,用 TBST 溶液洗膜 3 次,每次 10 min;二抗室温孵育 1 h;TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;最后,在暗室进行 ECL 化学发光显影。

1.3.8 荧光素酶报告基因实验 利用 TargetScan 数据库(http://www.targetscan.org/)预测 miR-3934-5p 的靶基因,获得预测价值较高的靶基因 LACTB。分别构建含野生型和突变型 LACTB 3′UTR 的荧光素酶表达载体(WT-3′UTR 和 MUT-3′UTR)。实验分 2 组:WT-3′UTR 组和 MUT-3′UTR 组。取对数生长期细胞接种于 24 孔板,待 293T 细胞汇合度达 50%左右时,分别共转染含 WT-3′UTR 和 MUT-3′UTR 荧光素酶表达质粒及 miR-3691-5p inhibitors 和阴性对照序列。使用荧光素酶报告基因实验检测仪进行实验结果测定。将荧光素酶活性和海肾荧光活性的比值进行整理后进行统计学分析。

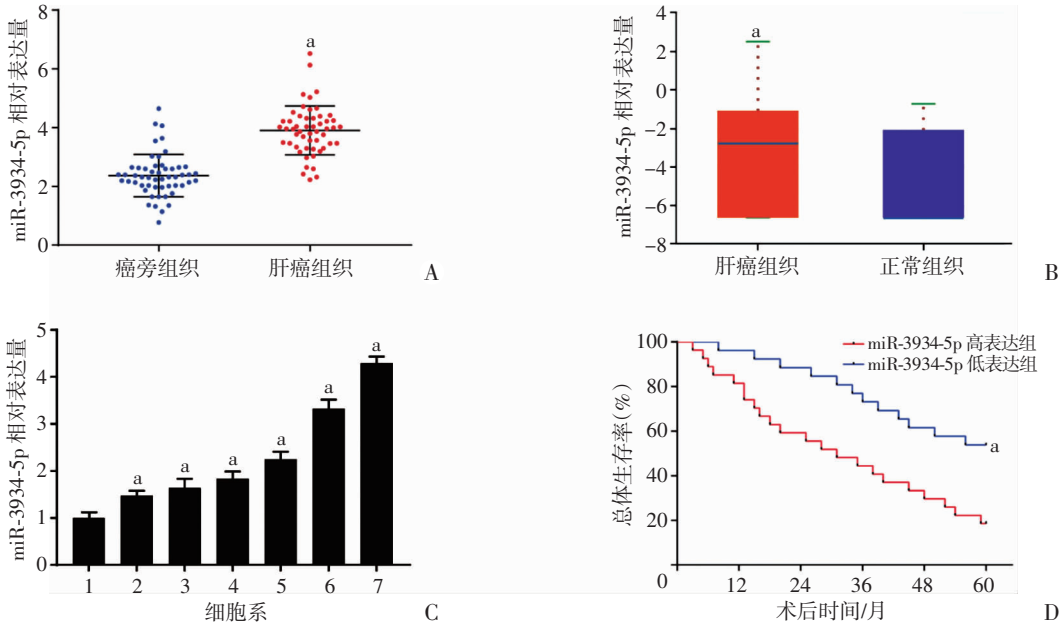
1.4 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验;miR-3934-5p 的表达与 HCC 患者各临床病理特征之间的相关性采用 χ^2 检验;Kaplan-Meier 生存曲线分析 miR-3934-5p 表达与 HCC 患者生存预后的关系;通过 Spearman 相关性检验分析 HCC 中 miR-3934-5p 与 LACTB 表达的相关性。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。实验均重复 3 次。

2 结果

2.1 miR-3934-5p 在 HCC 中的表达及其临床意义

采用 RT-qPCR 检测 53 对肝癌及癌旁组织中 miR-3934-5p 的表达,结果显示:miR-3934-5p 在肝癌组织中的表达显著高于癌旁组织($P<0.001$,图 1A)。在 TCGA 在线数据库 ENCORI 中检索 miR-3934-5p 在 50 例正常肝组织及 370 例肝癌组织中的表达,结果也发现 miR-3934-5p 在 HCC 组织中高表达($P=0.038$,图 1B)。另外,RT-qPCR 检测 miR-3934-5p 在正常肝细胞 L02 及肝癌细胞株(Hep3B、Huh7、MHCC97-L、SK-Hep-1、MHCC97-H、HCCLM3)中的表达,结果显示:相较于正常肝细胞 L02,miR-3934-5p 在各肝癌细胞系中的表达均显著上调($P<0.05$,图 1C)。以 miR-3934-5p 在 53 例 HCC 组织的中位表达值,将这 53 例 HCC 患者分为 miR-3934-5p 高表达组($n=27$)和 miR-3934-5p 低表达组($n=26$),分析 miR-3934-5p 的表达与 HCC 患者的临床病理特征及生存预后之间的关系。结果如表 1 所示:miR-3934-5p 的高表达与肿瘤大小($P=0.040$)、肿瘤数量($P=0.013$)、血管侵犯($P=0.006$)及 TNM 分期($P=0.017$)相关。另外,生存分析结果显示:与 miR-3934-5p 低表达组比较,miR-3934-5p 高表达组患者的总体生存时间更短,预后更差($P=0.004$,图 1D)。



A:miR-3934-5p 在 53 对 HCC 及癌旁组织中的表达水平　a:$P<0.001$,与癌旁组织比较;B:TCGA 数据库检索显示 miR-3934-5p 在 HCC 组织中高表达　a:$P=0.038$,与正常组织比较;C:miR-3934-5p 在各肝癌细胞系中的表达　1:L02;2:Hep3B;3:Huh7;4:MHCC97-L;5:SK-Hep-1;6:MHCC97-H;7:HCCLM3;a:$P<0.05$,与 L02 比较;D:miR-3934-5p 高、低表达组患者的总体生存时间比较　a:$P=0.004$,与 miR-3934-5p 高表达组比较

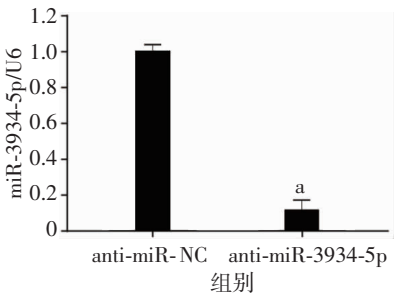
图 1　miR-3934-5p 在 HCC 中的表达及其与总体生存率的关系

表 1　miR-3934-5p 的表达与 HCC 患者临床病理特征之间的相关性(例)

临床病理特征	n	miR-3934-5p 表达水平		P 值
		高表达组($n=27$)	低表达组($n=26$)	
年龄/岁				0.922
≥60	35	18	17	
<60	18	9	9	
性别				0.317
男	38	21	17	
女	15	6	9	
HBV 感染				0.668
阴性	9	4	5	
阳性	44	23	21	
肝硬化				0.606
无	5	2	3	
有	48	25	23	
血清 AFP/ng·mL^{-1}				0.465
≤400	12	5	7	
>400	41	22	19	
肿瘤长径				0.040
≤5 cm	25	9	16	
>5 cm	28	18	10	
肿瘤数量				0.013
1	34	13	21	
≥2	19	14	5	
血管侵犯				0.006
无	33	12	21	
有	20	15	5	
TNM 分期				0.017
Ⅰ+Ⅱ	43	18	25	
Ⅲ+Ⅳ	10	9	1	

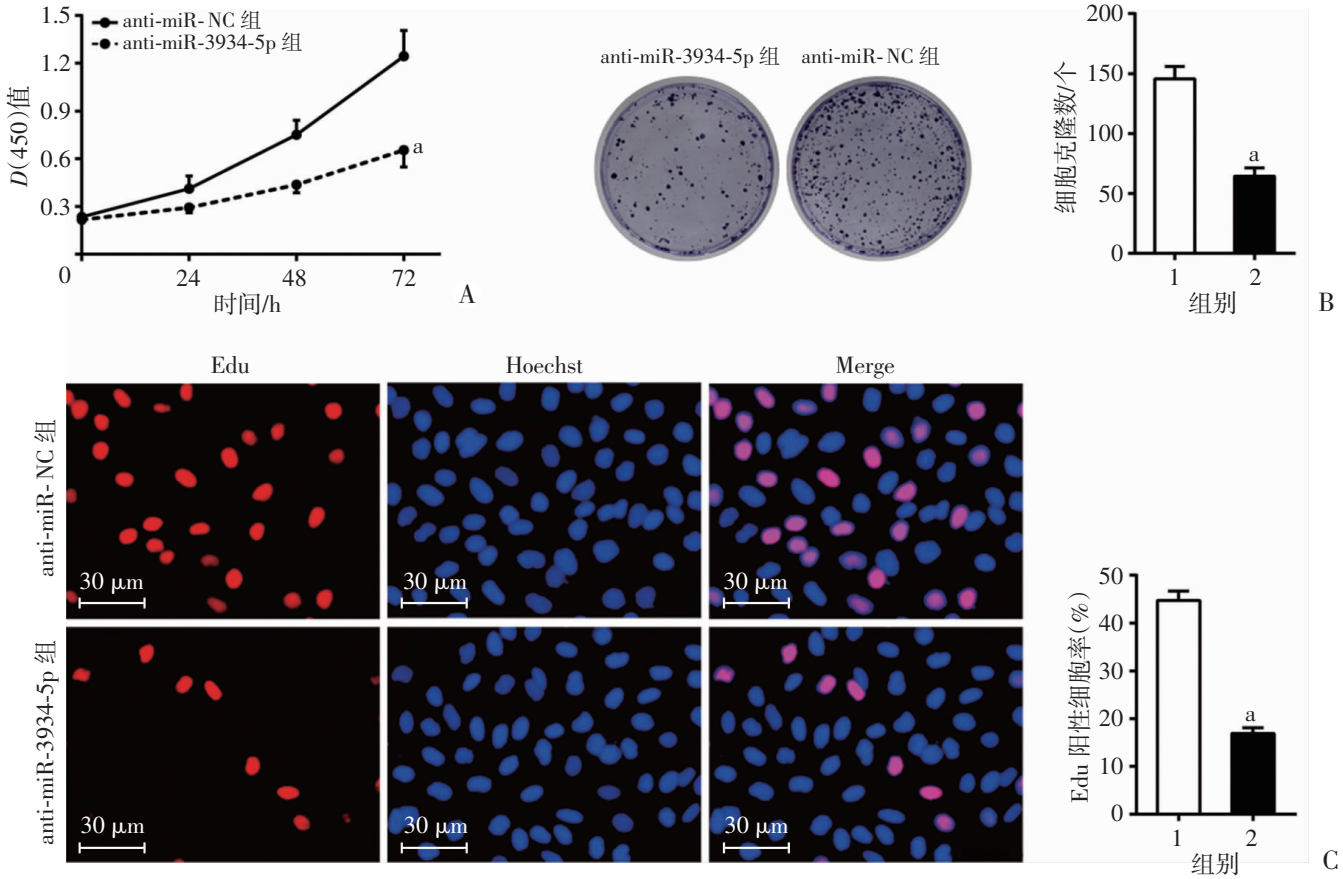
2.2　敲减 miR-3934-5p 抑制肝癌细胞的增殖能力

在各肝癌细胞系中,HCCLM3 细胞系中的 miR-3934-5p 表达最高(图 1C)。因此,HCCLM3 细胞系被用作进行 miR-3934-5p 敲减的细胞模型进行后续的功能学研究。在 HCCLM3 细胞系中,利用 Lipofectamina 2000 瞬时转染 miR-3934-5p inhibitor,对细胞中的 miR-3934-5p 进行敲减,转染效率差异具有统计学意义($P<0.001$,图 2)。CCK-8 实验、平板克隆实验及 EdU 实验分别被用来评价 HCCLM3 细胞的活性及增殖能力,结果表明:与对照组比较,敲减 miR-3934-5p 后 HCCLM3 细胞的活性明显下降($P<0.05$,图 3A),其增殖能力被显著抑制($P<0.05$,图 3B、C)。



a:$P<0.001$,与 anti-miR-NC 组比较

图 2　敲减 HCCLM3 细胞中 miR-3934-5p 表达的转染效率检测



1:anti-miR-NC 组;2:anti-miR-3934-5p 组;a: $P<0.001$,与 anti-miR-NC 组比较

A:敲减 miR-3934-5p 显著抑制 HCCLM3 细胞的活性;B:敲减 miR-3934-5p 显著抑制 HCCLM3 细胞的克隆形成能力;C:敲减 miR-3934-5p 显著抑制 HCCLM3 细胞的增殖能力

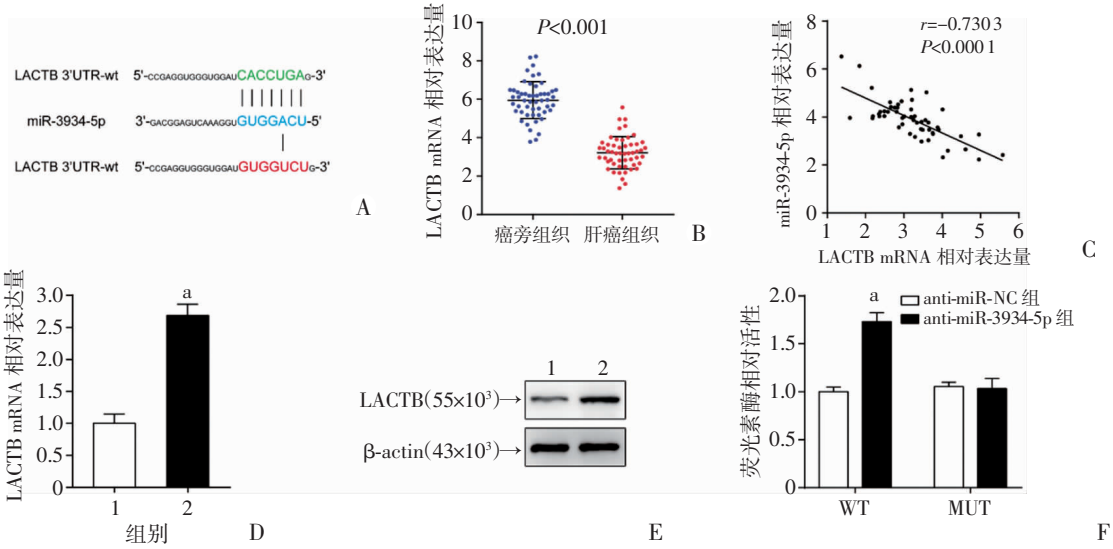
图 3 敲减 miR-3934-5p 对 HCCLM3 细胞增殖能力的影响

2.3 LACTB 是 miR-3934-5p 的直接作用靶点

采用 TaregetScan 数据库预测 miR-3934-5p 的作用靶点,结果显示:LACTB mRNA 的 3′非翻译区存在与 miR-3934-5p 直接结合的作用位点(图 4A)。RT-qPCR 结果显示:相较于癌旁正常组织,LACTB 在肝癌组织中低表达($P<0.001$,图 4B)。Spearman 相关性分析发现:在 HCC 组织中,LACTB mRNA 与 miR-3934-5p 的表达呈负相关($r=-0.730\ 3$,$P<0.000\ 1$,图 4C)。在转染 miR-3934-5p inhibitor 的 HCCLM3 细胞中检测 LACTB 的表达,结果显示:在敲减 miR-3934-5p 后,LACTB 在 mRNA 和蛋白水平均显著被上调($P<0.05$,图 4D、E),证实 miR-3934-5p 可负向调控 LACTB 的表达。双荧光素酶报告基因实验结果显示,敲减 miR-3934-5p 可显著增强含野生型 LACTB mRNA 3′UTR 的质粒载体的荧光素酶活性,而对含突变型 LACTB mRNA 3′UTR 的质粒载体荧光素酶活性的影响差异无统计学意义($P<0.05$,图 4F)。表明 LACTB 是 miR-3934-5p 的直接作用靶点。

2.4 LACTB 介导 miR-3934-5p 对肝癌细胞增殖能力的促进作用

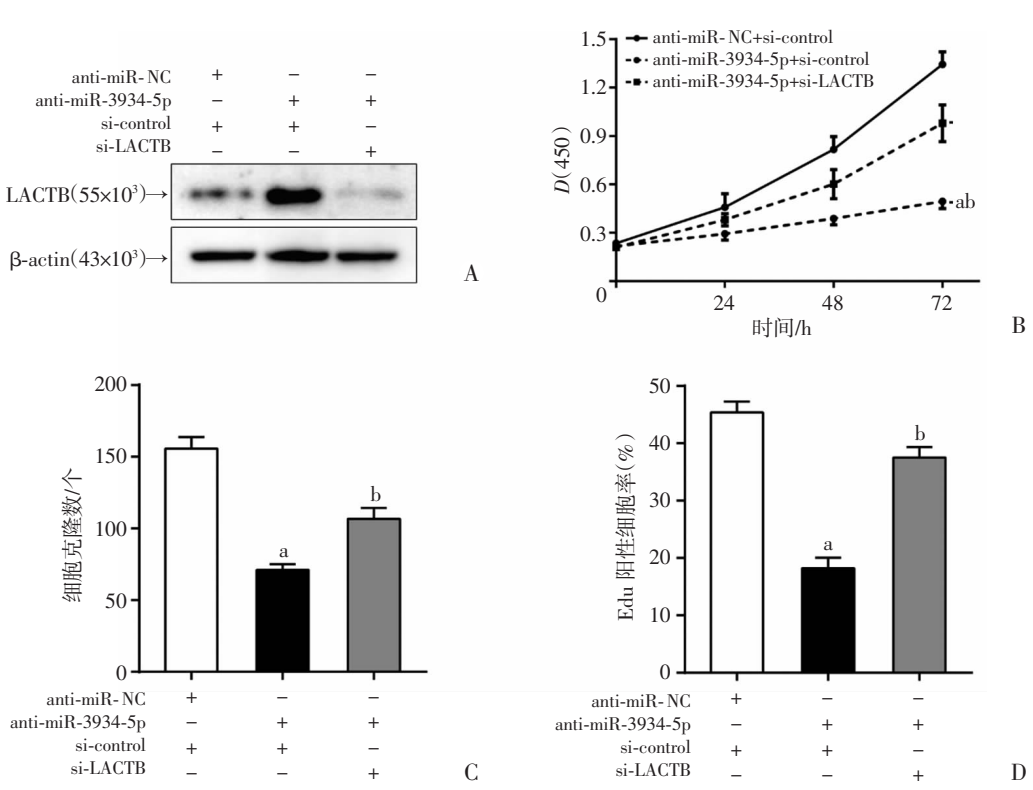
在 HCCLM3 中,对 miR-3934-5p 和 LACTB 进行敲减,转染效率通过 Western blot 实验进行验证(图 5A)。CCK-8 实验结果证实:敲减 miR-3934-5p 可显著抑制 HCCLM3 细胞的活性,而敲减 LACTB 可逆转这一效应($P<0.05$,图 5B);平板克隆实验和 EdU 实验也证实:敲减 LACTB 可逆转敲减 miR-3934-5p 对 HCCLM3 细胞增殖能力的抑制作用($P<0.05$,图 5C、D)。



1:anti-miR-NC 组;2:anti-miR-3934-5p 组;a: $P<0.05$,与 anti-miR-NC 组比较

A:TaregetScan 数据库预测分析;B:正常肝组织和肝癌组织中 LACTB mRNA 的表达;C:HCC 组织中 LACTB mRNA 与 miR-3934-5p 表达的相关分析;D:敲减 miR-3934-5p 后 HCCLM3 细胞中 LACTB mRNA 表达;E:敲减 miR-3934-5p 后 HCCLM3 细胞中 LACTB 蛋白表达;F:双荧光素酶报告基因实验检测敲减 miR-3934-5p 后 LACTB mRNA 3′UTR 的质粒载体的荧光素酶活性

图 4　LACTB 是 miR-3934-5p 的直接靶点



a: $P<0.05$,与 anti-miR-NC + si-control 组比较;b: $P<0.05$,与 anti-miR-3934-5p + si-control 组比较

A:转染效率检测;B:敲减 miR-3934-5p 对 HCCLM3 细胞活性抑制效应的影响;C:敲减 miR-3934-5p 对 HCCLM3 细胞克隆形成能力抑制效应的影响;D:敲减 miR-3934-5p 对 HCCLM3 细胞增殖能力抑制效应的影响

图 5　LACTB 介导了 miR-3934-5p 对 HCCLM3 细胞增殖能力的促进作用

3 讨论

研究表明 miRNAs 可在转录后水平对原癌基因或抑癌基因的表达进行调控,进而影响肿瘤细胞的多种生物学行为,如增殖、凋亡、血管生成、侵袭及转移等,从而在肿瘤进展过程中发挥抑癌或者促癌作用[10-12]。ZHAO 等[13]研究发现:miR-424-5p 在 HCC 中表达下调,功能学实验证实过表达 miR-424-5p 可通过影响细胞周期从而抑制 HCC 细胞的增殖能力,进一步研究发现癌基因 E2F7 介导了 miR-424-5p 对 HCC 细胞增殖能力的抑制作用。另有研究发现 miR-3174 在 HCC 组织和细胞中表达上调,并且其高表达与肿瘤大小相关;功能学研究发现过表达 miR-3174 可促进细胞增殖且抑制细胞凋亡,进一步机制探索发现 miR-3174 可靶向抑制 FOXO1,进而调控 Bim、P21、cyclin D1 及 c-myc 等基因的表达,从而发挥其生物学功能[14]。本课题组之前的研究也发现:在 HCC 中高基质硬度环境下 miR-3682-3p 的表达上调,后者可通过促进细胞凋亡从而抑制 HCC 细胞的增殖[15]。还发现 miR-769-5p[16]和 miR-130-3p[17]在 HCC 中高表达,而且其可以促进 HCC 细胞增殖和迁移能力,在 HCC 进展中发挥促癌作用。YU 等[18]研究表明:处于缺氧微环境中的 HCC 细胞可分泌大量包含 miR-1273f 的外泌体,在外泌体的介导下,miR-1273f 可与处在常氧环境下的肿瘤细胞发生交互作用,促进其增殖能力。另外,有研究发现 miR-3934-5p 在非小细胞肺癌和神经母细胞瘤中均发挥促癌功能,可影响肿瘤细胞的增殖从而促进肿瘤进展[4-5]。本研究结果显示:miR-3934-5p 在肝癌组织及细胞中表达上调,且其高表达与较恶的临床病理特征和较差的生存预后相关,提示 miR-3934-5p 在 HCC 进展中可能发挥促癌功能;CCK-8 实验、平板克隆实验及 EdU 实验证实敲减 miR-3934-5p 显著抑制 HCC 细胞的活性及增殖能力。而缺氧微环境或者高基质硬度微环境是否可以作为上游驱动因素影响 miR-3934-5p 在 HCC 中的表达,我们将在后续的研究中进行探索。

LACTB 是一种存在于哺乳动物肝脏、心脏和骨骼肌等组织细胞线粒体膜间隙的可溶性聚合体蛋白[19]。研究表明 LACTB 作为一种与脂质代谢有关的蛋白[7],可以参与人体的多种生理生化反应,并在其中发挥重要作用[6,20]。KECKESOVA 等[7]早在 2017 年就发现 LACTB 在乳腺癌组织和细胞系中表达下调,进一步研究证实 LACTB 通过影响线粒体脂质代谢和肿瘤细胞的状态进而发挥抑癌作用。从此,LACTB 在其他肿瘤发生、发展过程中的作用逐渐被探索。在结直肠癌中研究发现:LACTB 通过与 MDM2 竞争型结合 p53,减少 p53 的降解从而稳定其表达,最终 LACTB 通过抑癌蛋白 p53 发挥其抑癌功能[21-23]。另外,XUE 等[9]发现 LACTB 在肝癌组织中异常低表达,并且其低表达与肝癌患者的预后相关,进一步实验发现 LACTB 参与肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭等生物学过程,证实 LACTB 在 HCC 中的抑癌作用。本研究通过 TargetScan 数据库预测到 LACTB 是 miR-3934-5p 的潜在下游靶点。经过统计学分析,发现在 HCC 组织中 LACTB mRNA 和 miR-3934-5p 的表达呈负相关;在 HCCLM3 细胞中敲减 miR-3934-5p 可上调 LACTB 的表达,即 miR-3934-5p 可负向调控 LACTB 的表达;接着通过双荧光素酶报告基因实验证实 miR-3934-5p 与 LACTB mRNA 3′UTR 之间存在直接结合;最后,通过回复实验证实 LACTB 介导了 miR-3934-5p 的生物学功能。

综上所述,本研究发现 miR-3934-5p 在 HCC 组织及细胞中异常高表达,且其高表达与不良临床病理特征和较差的生存预后显著相关。在 HCC 细胞中,敲减 miR-3934-5p 可通过靶向上调抑癌基因 LACTB 的表达从而抑制 HCC 细胞的增殖能力。表明 miR-3934-5p 可作为潜在的 HCC 分子标志物和治疗靶点。

参考文献:

[1] 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.

[2] LI Y, WANG X Y, LI Z G, *et al*. MicroRNA-4651 represses hepatocellular carcinoma cell growth and facilitates apoptosis *via* targeting FOXP4 [J]. Biosci Rep, 2020, 40(6): BSR20194011. DOI:10.1042/BSR20194011.

[3] MAJID A, WANG J X, NAWAZ M, *et al*. miR-124-3p suppresses the invasiveness and metastasis of hepatocarcinoma cells *via* targeting CRKL[J]. Front Mol Biosci, 2020, 7: 223. DOI:10.3389/fmolb.2020.00223.

[4] REN A J, WEN Z Z, ZHENG L J. Downregulation of miR-3934-5p enhances A549 cell sensitivity to cisplatin by targeting TP53INP$_1$[J]. Exp Ther Med, 2019, 18(3): 1653-1660. DOI:10.3892/etm.2019.7718.

[5] YE W, LIANG F, YING C, *et al*. Downregulation of microRNA-3934-5p induces apoptosis and inhibits the proliferation of neuroblastoma cells by targeting TP53INP$_1$ [J]. Exp Ther Med, 2019, 18(5): 3729-3736. DOI:10.

3892/etm.2019.8007.

[6] CUCCHI D,MAURO C. LACTB-mediated tumour suppression by increased mitochondrial lipid metabolism[J]. Cell Death Differ, 2017, 24(7): 1137-1139. DOI: 10.1038/cdd.2017.60.

[7] KECKESOVA Z, DONAHER J L, DE COCK J, *et al*. LACTB is a tumour suppressor that modulates lipid metabolism and cell state[J]. Nature, 2017, 543(7647): 681-686. DOI:10.1038/nature21408.

[8] ZENG K, CHEN X, HU X, *et al*. LACTB, a novel epigenetic silenced tumor suppressor, inhibits colorectal cancer progression by attenuating MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation[J]. Oncogene, 2018, 37(41): 5534-5551. DOI:10.1038/s41388-018-0352-7.

[9] XUE C, HE Y, ZHU W, *et al*. Low expression of LACTB promotes tumor progression and predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. Am J Transl Res, 2018, 10(12): 4152-4162.

[10] LI Y, ZHOU Y, MA L, *et al*. MiR-3677-3p promotes hepatocellular carcinoma progression *via* inhibiting GSK3β[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2020, 52(12): 1404-1412. DOI:10.1093/abbs/gmaa125.

[11] SI T, NING X J, ZHAO H W, *et al*. MicroRNA-9-5p regulates the mitochondrial function of hepatocellular carcinoma cells through suppressing PDK4[J]. Cancer Gene Ther, 2020: 1-13. DOI:10.1038/s41417-020-00253-w.

[12] DUAN X H, LI W, HU P, *et al*. MicroRNA-183-5p contributes to malignant progression through targeting PDCD4 in human hepatocellular carcinoma[J]. Biosci Rep, 2020, 40(10): BSR20201761. DOI: 10.1042/BSR20201761.

[13] ZHAO Y C, ZHU C Q, CHANG Q, *et al*. MiR-424-5p regulates cell cycle and inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells by targeting $E2F_7$[J]. PLoS One, 2020, 15(11): e0242179. DOI:10.1371/journal.pone.0242179.

[14] WANG Q, YANG X, ZHOU X, *et al*. MiR-3174 promotes proliferation and inhibits apoptosis by targeting FOXO1 in hepatocellular carcinoma[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 526(4): 889-897. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.03.152.

[15] YAO B W, NIU Y S, LI Y Z, *et al*. High-matrix-stiffness induces promotion of hepatocellular carcinoma proliferation and suppression of apoptosis *via* miR-3682-3p-PHLDA1-FAS pathway[J]. J Cancer, 2020, 11(21): 6188-6203. DOI: 10.7150/jca.45998.

[16] XIAN Y, WANG L, YAO B, *et al*. MicroRNA-769-5p contributes to the proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells by attenuating RYBP[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 118: 109343. DOI:10.1016/j.biopha.2019.109343.

[17] 张雷, 王宇锋, 王亮, 等. miR-130b-3p 通过靶向作用于 INTS6 促进肝细胞癌生长和转移[J]. 山西医科大学学报, 2019, 50(5): 543-550. DOI: 10.13753/j.issn.1007-6611.2019.05.003.
ZHANG L, WANG Y F, WANG L, *et al*. The miR-130b-3p promotes metastasis and proliferation of hepatocellular carcinoma by targeting INTS6[J]. J Shanxi Med Univ, 2019, 50(5): 543-550, DOI: 10.13753/j.issn.1007-6611.2019.05.003.

[18] YU Y, MIN Z, ZHOU Z, *et al*. Hypoxia-induced exosomes promote hepatocellular carcinoma proliferation and metastasis *via* miR-1273f transfer[J]. Exp Cell Res, 2019, 385(1): 111649. DOI: 10.1016/j.yexcr.2019.111649.

[19] POLIANSKYTE Z, PEITSARO N, DAPKUNAS A, *et al*. LACTB is a filament-forming protein localized in mitochondria[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(45): 18960-18965. DOI:10.1073/pnas.0906734106.

[20] LI H T, DONG D Y, LIU Q, *et al*. Overexpression of LACTB, a mitochondrial protein that inhibits proliferation and invasion in glioma cells[J]. Oncol Res, 2019, 27(4): 423-429. DOI:10.3727/096504017X15030178624579.

[21] LANG V, PALLARA C, ZABALA A, *et al*. Tetramerization-defects of p53 result in aberrant ubiquitylation and transcriptional activity[J]. Mol Oncol, 2014, 8(5): 1026-1042. DOI:10.1016/j.molonc.2014.04.002.

[22] RUSSO A, ESPOSITO D, CATILLO M, *et al*. Human rpL3 induces G_1/S arrest or apoptosis by modulating p21 (Waf1/cip1) levels in a p53-independent manner[J]. Cell Cycle, 2013, 12(1): 76-87. DOI:10.4161/cc.22963.

[23] WALERYCH D, LISEK K, SOMMAGGIO R, *et al*. Proteasome machinery is instrumental in a common gain-of-function program of the p53 missense mutants in cancer[J]. Nat Cell Biol, 2016, 18(8): 897-909. DOI:10.1038/ncb3380.

(**收稿**:2020-12-31;**修回**:2021-02-08)

(编辑 汪勤俭)