DOI:10.16016/j.1000-5404.202102040

HBx 通过抑制 microRNA-145a-5p 促进小鼠肝癌发生

杜 彬,周梦瑶,毋 楠,张思遥,黄 欣,况 钦,吴 勇,冯 涛 400016 重庆,重庆医科大学:分子医学与肿瘤研究中心,药学院生物化学与分子生物研究中心

[摘要] **目的** 通过研究 miRNA-145a-5p 在肝前体细胞和小鼠感染乙肝病毒 X(hepatitis B virus X,HBx)不同时间的变化情况,初步探讨 HBx 导致肝癌发生的机制。**方法** 通过慢病毒将 HBx 基因转染到 14-19 肝前体细胞中,构建 HBx-EGFP-14-19 细胞系,并通过肝门静脉将 HBx-EGFP-14-19 细胞悬液注入 KM 小鼠体内,建立具有完整免疫系统的 HBx 小鼠模型,并分别于 30、90、180、360 d 收集肝脏组织。通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测 HBx 在 HBx-EGFP-14-19 细胞和 HBx 小鼠中的表达。将 miR-145a-5p mimics 和 inhibitor 转染到 HBx-EGFP-14-19 细胞和饲养 180 d HBx 小鼠中,qRT-PCR 检测 miR-145a-5p、c-Myc、Kras、细胞凋亡和细胞周期因子的 RNA 表达,Western blot 检测 c-Myc、Kras、细胞凋亡和细胞周期因子的蛋白质表达,CCK-8 检测细胞增殖。**结果** 成功构建能够稳定表达 HBx 的细胞模型和动物模型。HBx 过表达后,miR-145a-5p 在 HBx-EGFP-14-19 细胞和 HBx 小鼠中的表达下调,而 c-Myc 和 Kras 的表达升高。使用 miR-145a-5p 模拟物(mimic/agomir)可以抑制细胞增殖并下调 c-Myc、Kras、Bcl-2、CDK4、Cyclin E、CyclinD1 的表达,并上调 Bad 和 Bax 的表达,而 miR-145a-5p 抑制剂(inhibitor/antagomir)与 miR-145a-5p 模拟物组的结果相反。**结论** HBx 过表达导致小鼠肝癌发生,其机制可能与 HBx 调节 miR-145a-5p 及其靶基因 c-Myc 和 Kras 的表达和抑制细胞凋亡有关。

[关键词] HBx;肝癌;miR-145a-5p;c-Myc;Kras
[中图法分类号] R394.3; R730.23; R735.7 [文献标志码] A

HBx promotes liver tumor in mice by inhibiting microRNA-145a-5p

DU Bin, ZHOU Mengyao, WU Nan, ZHANG Siyao, HUANG Xin, KUANG Qin, WU Yong, FENG Tao Molecular Medicine and Cancer Research Center, Biochemistry and Molecular Biology Research Center, College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the changes of miRNA-145a-5p in liver progenitor cells and mice infected with hepatitis B virus X protein (HBx) at different time points to preliminarily explore the mechanism of HBx causing liver tumor. **Methods** HBx gene was transfected into 14-19 liver precursor cells by lentivirus vector to construct HBx-EGFP-14-19 cell line, and then the suspension of obtained cells was injected into KM mice through hepatic portal vein to establish an HBx model with a complete immune system. The liver tissues were collected on days 30, 90, 180, and 360. The expression of HBx in HBx-EGFP-14-19 cells and HBx mice was detected by qRT-PCR and Western blotting. After miR-145a-5p mimic and inhibitor was transfected into the HBx-EGFP-14-19 cells and HBx mice having been fed for 180 d, respectively, the RNA expression of miR-145a-5p, c-Myc, Kras, apoptosis-related and cell cycle-related factors was detected by qRT-PCR, and the protein expression of them were detected by Western blotting. The cell proliferation was detected by CCK8 assay. **Results** The cell model capable of stably expressing HBx and HBx mouse model were established successfully. Overexpression of HBx induced the down-regulation of miR-145a-5p in HBx-EGFP-14-19 cells and HBx mice, while enhanced the expression of c-Myc and Kras. MiR-145a-5p mimic/

[通信作者] 冯 涛,E-mail: 100733@cqmu.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/)

agomir inhibited cell proliferation and down-regulated the expression of c-Myc, Kras, Bcl-2, CDK4, CyclinE, CyclinD1, and up-regulated the expression of Bad and Bax, while miR-145a-5p inhibitor/antagomir led to the opposite results from the mimic. **Conclusion** Overexpression of HBx leads to the occurrence of liver tumor in mice, and its mechanism may be related to its regulation of miR-145a-5p and its target genes c-Myc and Kras and inhibition for cell apoptosis.

[**Key words**] hepatitis B virus X; hepatocellular carcinoma; miR-145a-5p; c-Myc; Kras

Corresponding author: FENG Tao, E-mail: 100733@cqmu.edu.cn

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma,HCC)的病死率在全球癌症死亡率中排名第二,并且是全球癌症相关死亡的第三大主要原因[1],大约50%的HCC是由乙型肝炎病毒(hepatitis B Virus,HBV)感染引起的[2]。而在HBV中,病毒调节蛋白HBx的长期稳定表达可以紊乱细胞转录和增殖,并使肝细胞对致癌因子敏感。在肝癌的早期,HBx是HBV的关键蛋白,起着重要作用,它被募集到细胞染色质中并调节特定遗传基因座的染色质动力学[3]。MiRNA是小的保守非编码RNA,可与靶基因mRNA分子的3′-UTR互补,从而促进靶基因mRNA的降解或抑制mRNA翻译。它在调节基因表达中起重要作用,并参与多种生物学过程。现有研究显示,HBx可通过上调或下调miRNA表达来诱导肝癌的发展[4-6]。MiRNA-145是目前已发现的抑癌基因,其通过调节靶基因c-Myc和Kras的表达来调节肿瘤细胞的增殖[7-9]。而c-Myc和Kras作为原癌基因,在癌症发展过程中均为高表达[10]。miRNA-145在肝癌中作为抑癌基因处于低表达水平[11-12],而在胃癌中,miRNA-145可以通过抑制靶基因c-Myc的表达来抑制胃癌细胞的增殖和侵袭[13]。

由于HBx是否能导致HCC这一理论和具体机制均尚未阐明,本研究采用转染HBx的肝前体细胞(HBx-EGFP-14-19)和转染HBx不同时间段的小鼠,观察HBx对miRNA-145a-5p及其靶基因c-Myc和Kras的调节作用;通过给予HBx-EGFP-14-19细胞和HBx小鼠(饲养至180 d)miRNA-145a-5p模拟物和抑制剂,观察miRNA-145a-5p对肝细胞的凋亡、增殖和周期的调节作用,探讨HBx诱导HCC的机制,为HBx导致HCC理论提供新的依据,也为HCC的诊断和治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及动物 永生化小鼠肝前体细胞株14-19由美国芝加哥大学分子肿瘤研究中心馈赠,经慢病毒转染后的EGFP-14-19(空载对照)和HBx-EGFP-14-19细胞株由本课题组前期构建并保存。无特殊病原体(specific pathogen free,SPF)级昆明小鼠由重庆医科大学动物中心提供并饲养。

1.1.2 主要试剂 FBS胎牛血清购自CELL BOX公司,细胞培养基DMEM(高糖)购自HyClone公司,TRIzol总RNA提取试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司,柱式microRNA抽提试剂盒和miRNA第一链cDNA合成(茎环法)试剂盒均购自上海生工生物工程(上海)股份有限公司,反转录试剂盒购自Vazyme公司,2×SYBR Green qPCR Master Mix购自Bimake公司,HBx抗体购自Abcam公司,GAPDH抗体购自Cell Signaling Technology公司,c-Myc、Kras抗体购自Abcepta公司,Bad、Bax、Bcl-2抗体均购自Abclonal公司,CDK4、CyclinE抗体购自万类生物科技有限公司,CyclinE抗体购自Abways公司,EndoFectin™-Max转染试剂购自GeneCopoeia公司,miRNA-145a-5p mimic、inhibitor、agomir、antagomir均购自莱博斯生物公司,CCK-8试剂盒购自MCE公司,SDS-PAGE凝胶配置试剂盒购自碧云天生物技术公司,ECL显影液购自Advansta公司,DAB显色液及免疫组化SP试剂盒购自北京中山金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 肝前体细胞株14-19、EGFP-14-19、HBx-EGFP-14-19在含有10%胎牛血清的DMEM高葡萄糖培养基中于37 ℃,5% CO_2 条件下培养,并传代3次后进行后续测试。细胞转染时分为6组:①normal组(HBx-EGFP-14-19细胞),②EndoFectin组(HBx-EGFP-14-19细胞+转染试剂),③mimics-miR-145组(HBx-EGFP-14-19细胞+转染试剂+mimics-miR-145),④mimics-NC-miR145组(HBx-EGFP-14-19细胞+转染试剂+mimics- NC-miR-145),⑤inhibitor- miR-145组(HBx-EGFP-14-19细胞+转染试剂+inhibitor-miR-145),⑥inhibitor- NC-miR-145组(HBx-EGFP-14-19细胞+转染试剂+ inhibitor - NC-miR-145)。

1.2.2 动物模型的构建及分组 根据课题组前期报道[14],构建动物模型时,将小鼠分为3组:生理盐水组($n=10$)、EGFP-14-19细胞组($n=10$)和HBx-EGFP-14-19细胞组($n=40$)。分别将200 μL生理盐水、EGFP -

14-19细胞和HBx-EGFP-14-19细胞(5×10^5细胞悬浮于200 μL PBS)悬浮液通过肝门静脉注射入小鼠体内。选择6~8周龄的小鼠,手术前24 h禁食,乙醚麻醉小鼠,待小鼠昏迷后固定其四肢,用酒精对腹部进行消毒,剑突下行约2 cm纵向切口使肝门静脉暴露,用血管夹夹住门静脉远端,从近端缓慢注射。注射完成后,用PBS湿润的棉签按压止血,并在止血后迅速缝合腹腔。肝脏收集时间为手术后30、90、180、360 d。进行机理研究时将小鼠分为6组:①HBx 180 d组($n=10$),②HBx 180d-NS(生理盐水)组($n=10$),③HBx 180d-agomir-miR-145组($n=10$),④HBx 180 d-agomir-NC-miR-145(阴性对照)组($n=10$),⑤HBx 180 d-antagomir-miR-145组($n=10$),⑥HBx 180 d-antagomir-NC-miR-145(阴性对照)组($n=10$)。术后180 d,通过尾静脉注射agomir-miR-145a-5p、antagomir-miR-145a-5p、agomir-NC-miR-145a-5p、antagomir-NC-miR-145a-5p和生理盐水。24 h后对小鼠实施安乐死。所有收集的肝脏组织保存在4%多聚甲醛和液氮中,以备后续试验使用。

1.2.3 miR-145a-5p的agomir、antagomir、模拟物、抑制剂和对应NC miR-145a-5p模拟物是双链RNA:有义序列(5′-GUCCAGUUUUCCCAGGAAUCCCU-3′)和反义序列(5′-AGGGAUUCCUGGGAAAACUGGAC-3′),miR-145a-5p抑制剂为单链(5′-AGGGAUUCCUGGGAAAACUGGAC),且与miR-145a-5p完全互补。非靶向的阴性对照序列(对于模拟物:有义序列5′-UCACAACCUCCUAGAAAGAGUAGA-3′;反义序列5′-UCUACUCUUUCUAGGAGGUGUUGUGA-3′;对于抑制剂:5′-UCUACUCUUUCUAGGAGGUUGUGA-3′)用作对照。模拟物和抑制剂用于体外实验;miR-145a-5p agomir和antagomir分别与模拟物序列和抑制剂序列一样,但对组织细胞的亲和力更高,因此将agomir和antagomir用于体内实验。

1.2.4 苏木素-伊红(HE)染色法 小鼠肝脏切片脱蜡后染色并封片,于光学显微镜下观察拍照。

1.2.5 反转录-聚合酶链反应(qRT-PCR) 总RNA和miRNA经提取后检测其质量和相应浓度,反转录试剂盒将RNA和miRNA(茎环法)反转录为cDNA,利用SYBR荧光定量法检测其浓度,检测体系为10 μL(cDNA 2μL,SYBR 5 μL,引物1 μL,无酶水2 μL)。引物序列见表1。

1.2.6 Western blot检测 将适量的小鼠肝组织放入标记好的EP管中,加入200 μL预先配制的裂解液(RIPA:PMSF=100:1),用组织研磨机充分研磨后,在冰上放置30 min,每5分钟振动1次。裂解后,于4 ℃以12 000 r/min离心20 min,吸出上清液,用BCA法测定蛋白质浓度。将上样缓冲液添加到剩余的上清液中,在100 ℃下加热15 min,然后在-80 ℃下保存。电泳分离蛋白质后将其转移到PVDF膜上,用5%的脱脂奶粉封闭2 h,摇床上孵育一抗,于4 ℃下过夜。经TBST洗涤后,将PVDF膜与二抗在室温下孵育2 h。用ECL显色法显色,Analysis分析软件对目的条带进行检测分析。

表1 RT-PCR引物序列

基因	序列(5'-3')
GAPDH	上游:CTCGTCCCGTAGACAAAATGGT
	下游:GAGGTCAATGAAGGGGTCGTT
HBx	上游:TGCGGACGACCCTTCTCGGG
	下游:GGGCAACATTCGGTGGGCGT
c-Myc	上游:CCCAAGGGAAGACGATGACG
	下游:GCTGAGAAACCGCTCCACATAC
Kras	上游:GGACTCTGAAGATGTGCCTATGG
	下游:TGCTGAGGTCTCAATGAACGGA
U6	上游:AGAGAAGATTAGCATGGCCCCTG
	下游:ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG
miR-145a-5p	上游:CGGTCCAGTTTTCCCAGGA
	下游:AGTGCAGGGTCCGAGGTATT
Bcl-2	上游:TCCATCTGACCCTCCGCC
	下游:CCCAGTTCACCCCATCCCT
Bad	上游:CTCCGAAGGATGAGCGATGAG
	下游:TTGTCGCATCTGTGTTGCAGT
Bax	上游:TGAAGACAGGGGCCTTTTTG
	下游:AATTCGCCGGAGACACTCG
CyclinD1	上游:GCGTACCCTGACACCAATCTC
	下游:ACTTGAAGTAAGATACGGAGGGC
CyclinE	上游:CTCCGACCTTTCAGTCCGC
	下游:CACAGTCTTGTCAATCTTGGCA
CDK4	上游:TCAGCACAGTTCGTGAGGTG
	下游:TCCATCAGCCGTACAACATTG

1.2.7 细胞转染试验 HBx-EGFP-14-19细胞在96孔(或6孔)平板中以1×10^5/mL的浓度培养。用EndoFectinTM-Max转染试剂转染miR-145a-5p mimic、miR-145a-5p mimic NC、miR-145a-5p inhibitor和miR-145a-5p inhibitor NC。转染24 h后,进行后续操作。

1.2.8 细胞增殖试验(CCK-8) 在96孔板中以1×10^5/mL的浓度培养HBx-EGFP-14-19细胞,并根据上述转染方法对其进行处理。转染处理24 h后,向每个孔中添加10 μL CCK8试剂,并在37 ℃下孵育2~4 h,在多功能酶标仪上490 nm处测量光密度值$D(490)$。

1.3 统计学分析

GraphPad Prism 5统计软件统计数据,数据以$\bar{x}\pm s$

表示,采用单因素方差分析,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

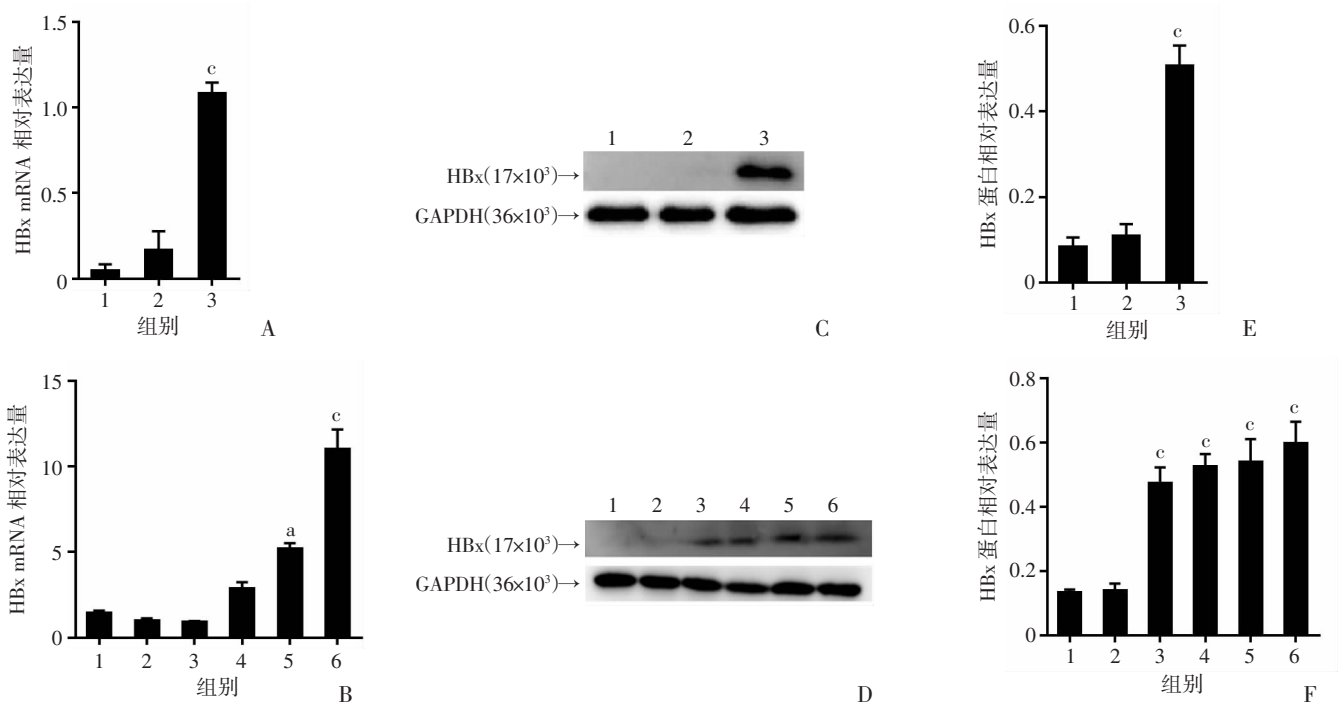
2 结果

2.1 体内外 HBx 表达鉴定

为了验证 HBx 是否成功转染到 14-19 细胞中,通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测 HBx-EGFP-14-19 细胞中 HBx 的表达。与 EGFP-14-19 细胞和 14-19 细胞相比,HBx 在 HBx-EGFP-14-19 细胞中特异性表达(图 1A、C、E)。qRT-PCR 和 Western blot 结果也表明,与正常组小鼠和 EGFP 组小鼠相比,HBx-EGFP-14-19 组小鼠在 30、90、180、360 d 能稳定表达 HBx(图 1B、D、F)。

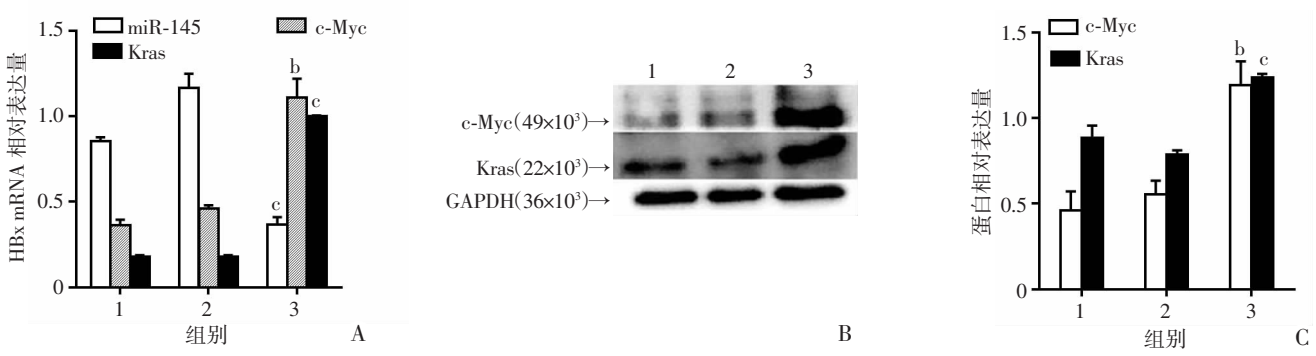
2.2 miR-145a-5p,c-Myc 和 Kras 在 3 种细胞株中的表达变化

与未转染 HBx 的 14-19 细胞相比,HBx-EGFP-14-19 细胞中 miR-145 a-5p 的表达低于 EGFP-14-19 组和 14-19 组(图 2A),而 c-Myc 和 Kras 的 mRNA 和蛋白质的表达增加(图 2)。



A、C、E:分别为 HBx 在细胞内 mRNA 和蛋白的表达 1:14-19 细胞株组;2:EGFP-14-19 细胞株组;3:HBx-EGFP-14-19 细胞株组;a:$P<0.05$,c:$P<0.001$,与 14-19 组、EGFP-14-19 组比较;B、D、F:分别为 HBx 在小鼠体内 mRNA 和蛋白的表达 1:NS 小鼠组;2:EGFP-14-19 小鼠组;3~6:分别为 30、90、180、360d 的 HBx-EGFP-14-19 小鼠组;a:$P<0.05$,c:$P<0.001$,与 NS 小鼠组、EGFP-14-19 小鼠组比较

图 1 细胞株及小鼠 HBx 的鉴定



1:14-19 细胞株组;2:EGFP-14-19 细胞株组;3:HBx-EGFP-14-19 细胞株组;b:$P<0.01$,c:$P<0.001$,与 14-19 组、EGFP-14-19 组比较。A:miR-145a-5p、c-Myc 和 Kras 的 mRNA 表达;B、C:c-Myc 和 Kras 的蛋白表达及半定量分析

图 2 miR-145,c-Myc 和 Kras 在 3 种细胞株中的表达

2.3　miR-145a-5p,c-Myc 和 Kras 在 HBx 小鼠不同时间时期的表达变化

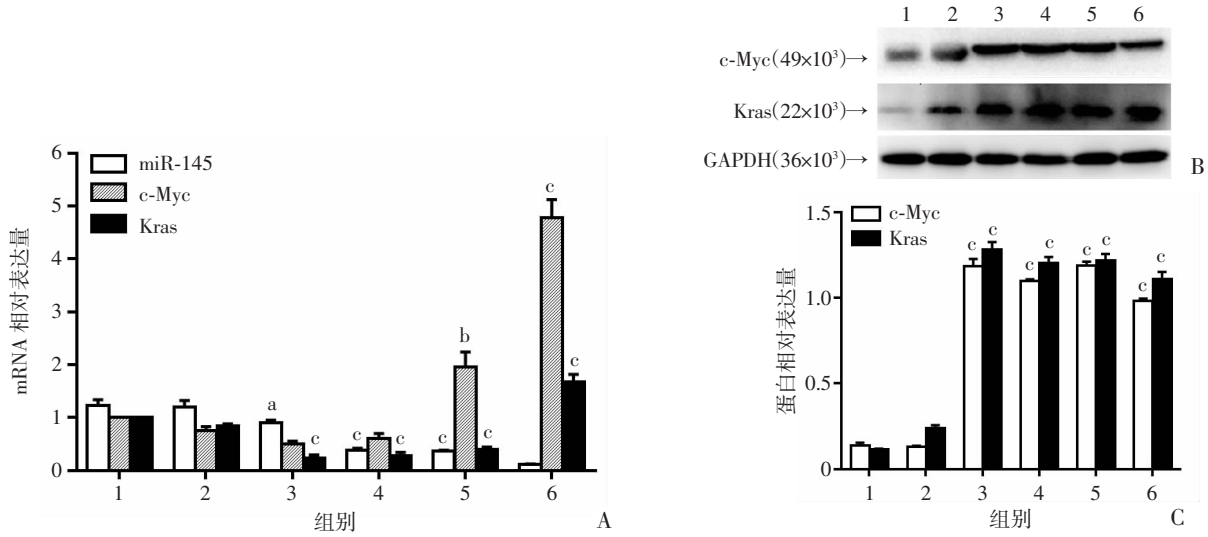
与未转染 HBx 的小鼠相比,miR-145a-5p 在 HBx 小鼠中的表达低于正常组和对照组,并且其表达随时间下降(图 3A)。c-Myc 的 mRNA 表达在第 30 和 90 天,与对照组和盐水组相比无统计学意义,而第 180 和 360 天时其表达明显高于对照组和盐水组(图 3A)。然而,Kras 的 mRNA 表达在 30、90、180 d 时,低于盐水组和对照组,但在第 360 天显着高于盐水组和对照组(图 3A)。在对 c-Myc 和 Kras 蛋白表达进行检测时发现,在 30、90、180、360 d 的蛋白表达均高于盐水组和对照组(图 3B、C)。表明 HBx 可以在体内和体外将 miR-145a-5p 维持在较低水平,从而降低 miR-145a-5p 对 c-Myc 和 Kras 的调节作用,并促进原癌基因 c-Myc 和 Kras 的表达。

2.4　小鼠肝脏组织肿瘤鉴定

观察 360 d 的 HBx 小鼠肝脏组织时,发现一些小鼠有肉眼可见的直径约 1 cm 的结节性病变从肝脏表面突出。HE 染色结果显示,肝小叶结构基本消失,肝细胞异型增生且大小不一,核染色质浓染及多核(图 4)。

2.5　miR-145a-5p 的上调抑制了 HBx-EGFP-14-19 细胞的增殖以及 c-Myc 和 Kras 的表达

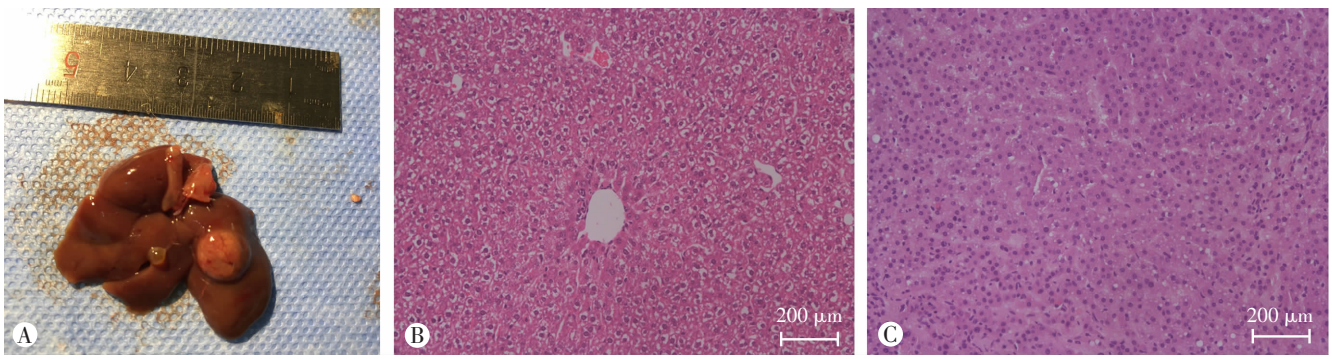
首先检测 miR-145a-5p,c-Myc 和 Kras 的表达,结果表明,miR-145a-5p 模拟物已成功转染到 HBx-EGFP-14-19 细胞和 HBx 小鼠中。与对照组相比,miR-145a-5p 的表达量升高可逆转由 HBx 引起的体外(图 5A~G)和体内(图 6)c-Myc、Kras、细胞周期因子和凋亡因子的异常表达。CCK-8 结果表明,miR-145a-5p 的过表达可以抑制 HBx-EGFP-14-19 细胞的增殖(图 5H)。



1:NS 小鼠组;2:EGFP-14-19 小鼠组;3~6:分别为 30、90、180、360 d 的 HBx-EGFP-14-19 小鼠组;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$,与 NS 小鼠组、EGFP-14-19 小鼠组比较。

A:miR-145a-5p、c-Myc 和 Kras mRNA 在各组 HBx 小鼠中的表达;B、C:c-Myc 和 Kras 蛋白在各组小鼠中的表达及半定量分析。

图 3　小鼠感染 HBx 后不同时期 miR-145、c-Myc 和 Kras 表达变化

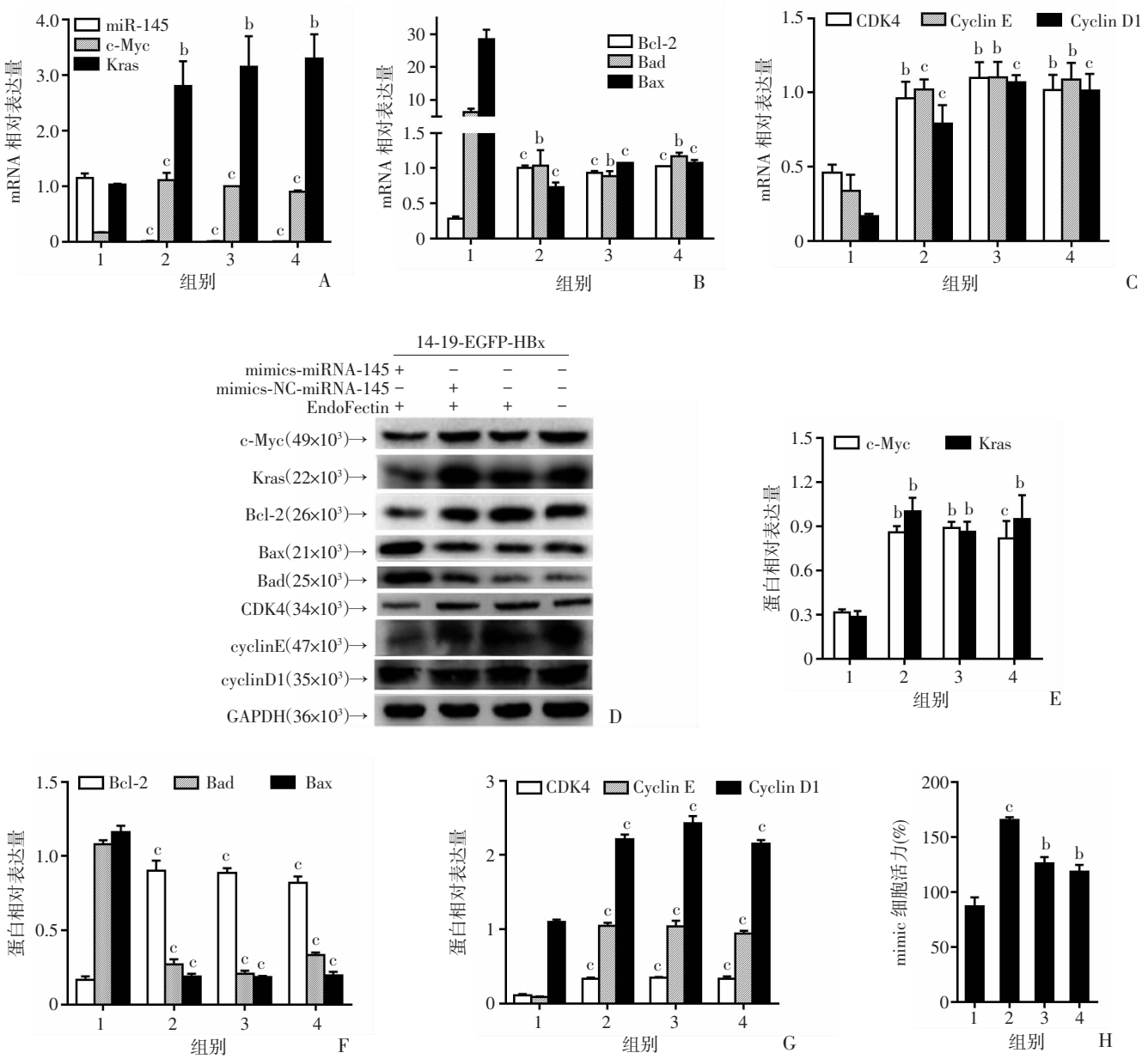


A:肝肿瘤组织照片;B:正常肝组织;C:肝癌组织

图 4　小鼠肝脏组织肿瘤的鉴定结果

2.6 下调 miR-145a-5p 可促进 HBx-EGFP-14-19 细胞增殖以及 c-Myc 和 Kras 的表达

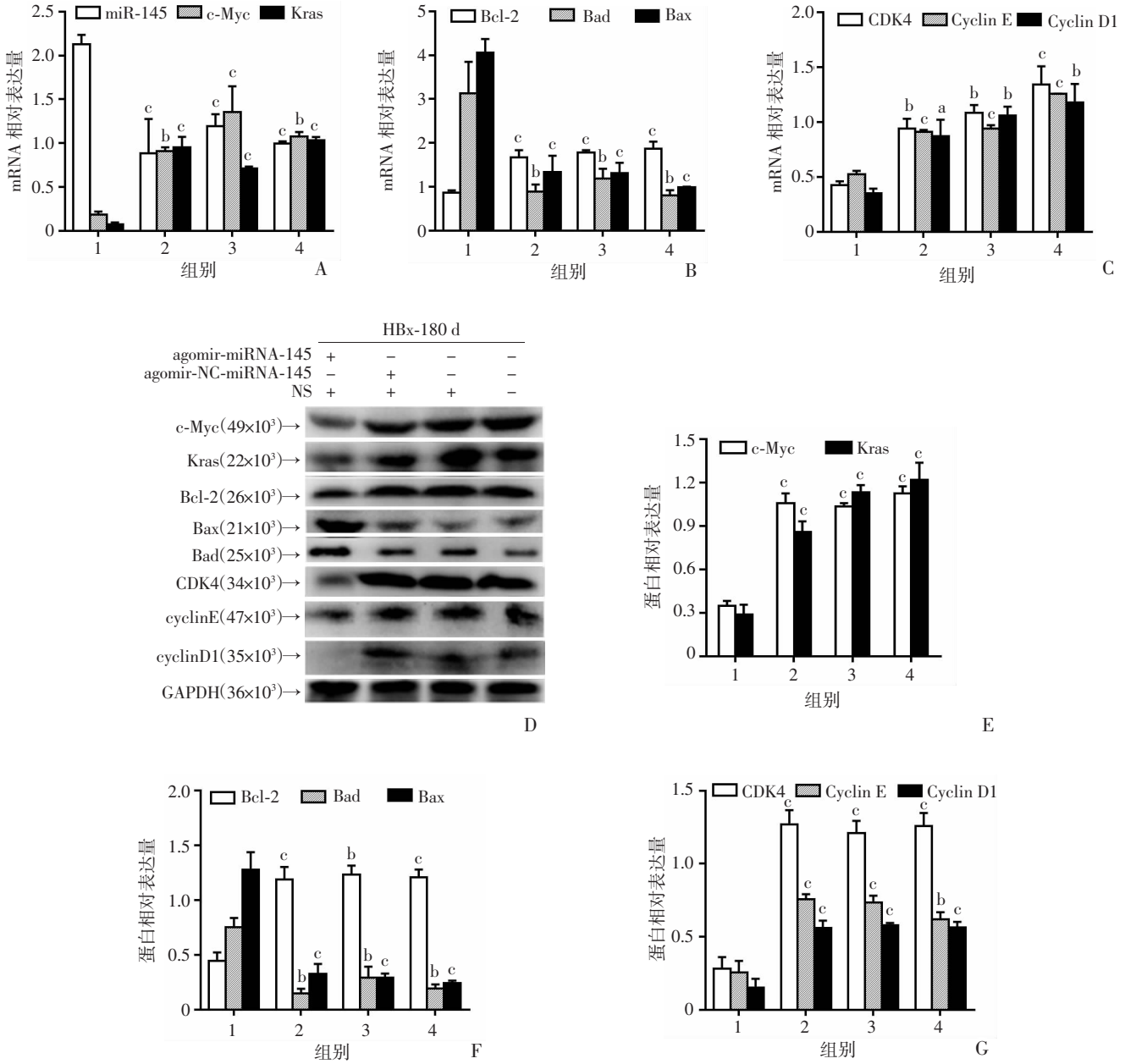
与对照组相比,miR-145 的体外表达量降低可促进由 HBx 引起的体外(图 7A ~ G)和体内(图 8)c-Myc、Kras、细胞周期因子和凋亡因子的异常表达。CCK8 结果表明,miR-145a-5p 的低表达可以促进 HBx-EGFP-14-19 细胞的增殖(图 7H)。



1:mimics-miR-145+EndoFectin+HBx-EGFP-14-19 细胞组;2:mimics-NC-miR-145+EndoFectin+HBx-EGFP-14-19 细胞组;3:EndoFectin+HBx-EGFP-14-19 细胞组;4:HBx-EGFP-14-19 细胞组;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$,与 mimics-miR-145+EndoFectin+HBx-EGFP-14-19 细胞组比较。

A:miR-145、c-Myc 和 Kras mRNA 表达;B:Bcl-2、Bad 和 Bax mRNA 表达;C:CDK4、CyclinE 和 Cyclin D1 的 mRNA 表达;D~G:c-Myc、Kras、Bcl-2、Bad、Bax、CDK4、CyclinE 和 Cyclin D1 的蛋白表达及半定量分析;H:转染 mimics-miR-145 后 HBx-EGFP-14-19 细胞活力。

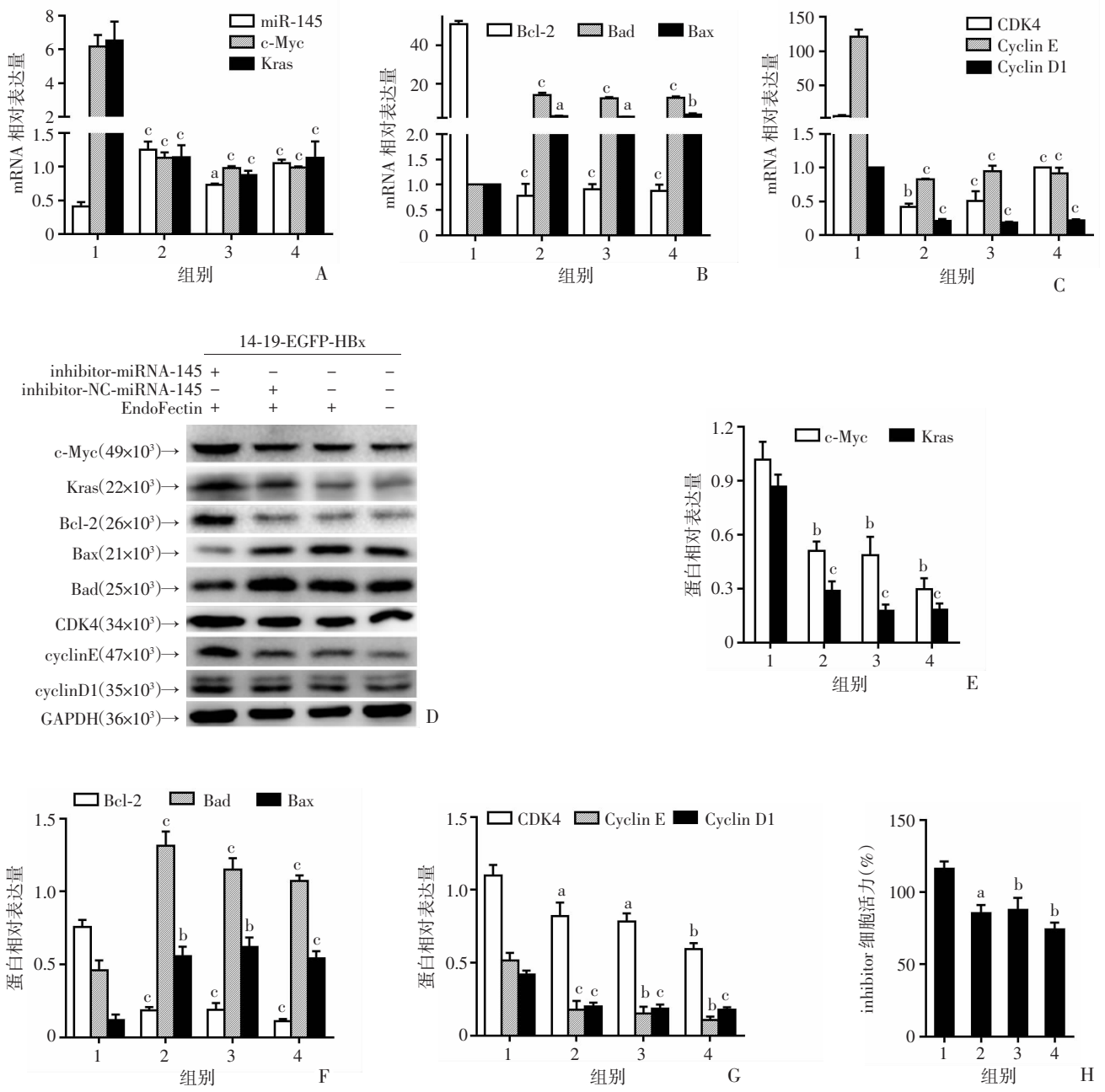
图 5 miR-145a-5p 模拟物在体外的作用



1:HBx180d-agomir-miR-145 小鼠组;2:HBx180d-agomir-NC-miR-145 小鼠组;3:HBx180d-NS;4:HBx180d;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$,与 HBx180d-agomir-miR-145 小鼠组比较

A:miR-145、c-Myc 和 Kras mRNA 表达;B:Bcl-2、Bad 和 Bax mRNA 表达;C:CDK4、CyclinE 和 Cyclin D1 的 mRNA 表达;D~G:c-Myc、Kras、Bcl-2、Bad、Bax、CDK4、CyclinE 和 Cyclin D1 的蛋白表达及半定量分析。

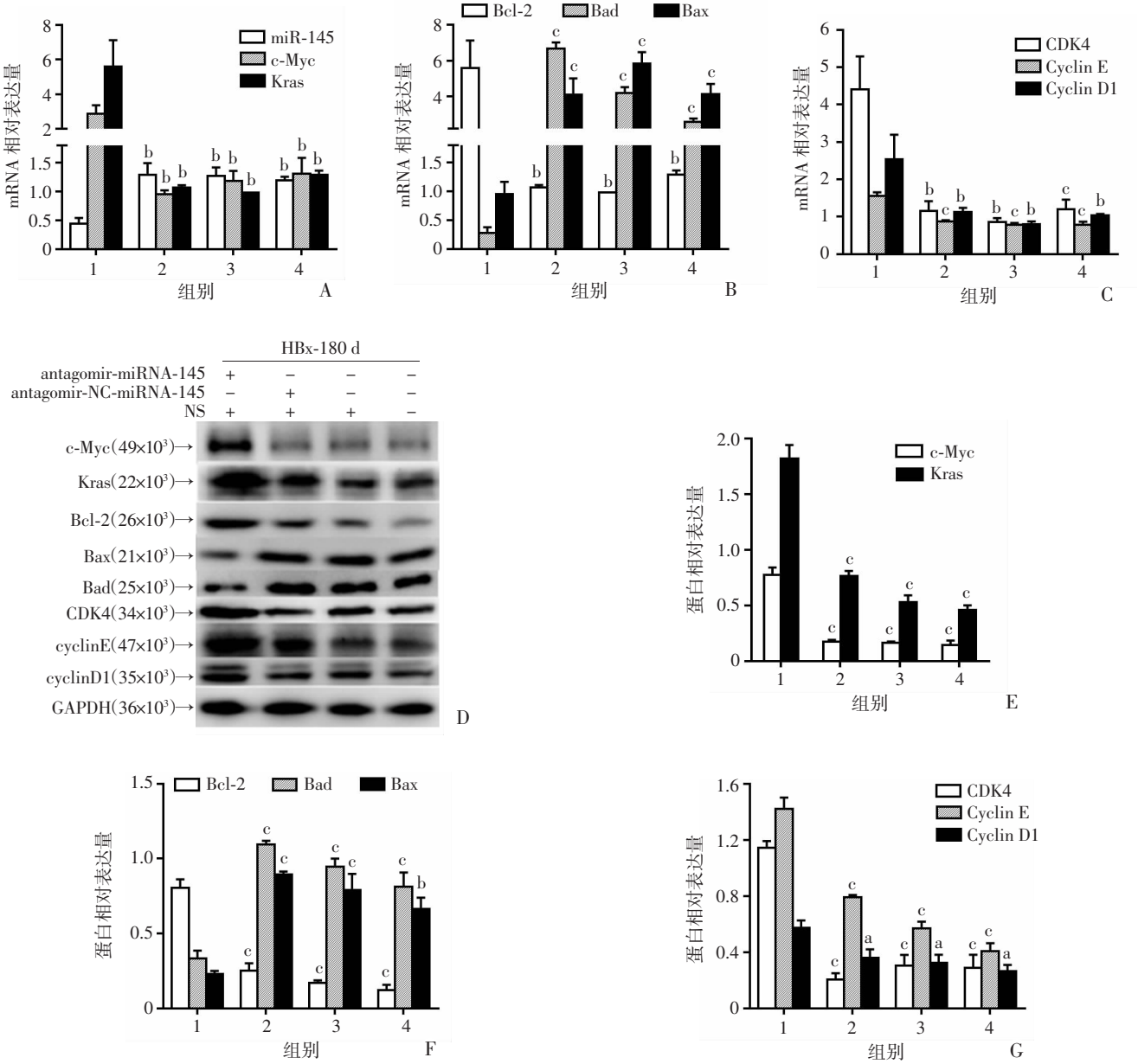
图 6 miR-145a-5p 模拟物在体内的作用



1:inhibitor-miR-145+EndoFectin+HBx-EGFP-14-19 细胞组;2:inhibitor -NC-miR-145+EndoFectin+HBx-EGFP-14-19 细胞组;3:EndoFectin+HBx-EGFP-14-19 细胞组;4:HBx-EGFP-14-19 细胞组;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$,与 inhibitor -miR-145+EndoFectin+HBx-EGFP-14-19 细胞组比较。

A:miR-145、c-Myc 和 Kras mRNA 表达;B:Bcl-2、Bad 和 Bax mRNA 表达;C:CDK4、CyclinE 和 Cyclin D1 的 mRNA 表达;D~G:c-Myc、Kras、Bcl-2、Bad、Bax、CDK4、CyclinE 和 Cyclin D1 的蛋白表达及半定量分析;H:转染 inhibitor-miR-145 后 HBx-EGFP-14-19 细胞活力

图 7 miR-145a-5p 抑制剂在体外的作用



1:HBx180d-antagomir-miR-145 小鼠组;2:HBx180d-antagomir-NC-miR-145 小鼠组;3:HBx180 d-NS;4:HBx180 d;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$,与 HBx180d-antagomir-miR-145 小鼠组比较。

A:miR-145、c-Myc 和 Kras mRNA 表达;B:Bcl-2、Bad 和 Bax mRNA 表达;C:CDK4、CyclinE 和 Cyclin D1 的 mRNA 表达;D~G:c-Myc、Kras、Bcl-2、Bad、Bax、CDK4、CyclinE 和 Cyclin D1 的蛋白表达及半定量分析。

图 8 miR-145a-5p 抑制剂在体内的作用

3 讨论

这项研究结果显示,当 HBx 显着上调时,它会导致肝癌的发生。miR-145a-5p 的表达在 HBx-EGFP-14-19 细胞和 HBx 小鼠中均被下调。miR-145a-5p 的表达随转染 HBx 时间的增长而降低。而当过表达 miR-145a-5p 时可抑制 HBx-EGFP-14-19 细胞的增殖,下调 miR-145a-5p 则可促进 HBx-EGFP-14-19 细胞的增殖。机制研究表明,可能通过 HBx-miR-145a-5p-c-Myc/Kras 轴促进 HCC 的形成。

HBV 在 HCC 的发生和发展中起着重要作用[15]。在 HBV 感染过程中,适应性免疫从免疫耐受转变为进行性免疫刺激,经过失活,激活和疲惫后,它会触发免疫反应疾病因子[16]。HBx 是 HBV 病毒中的关键基因片段,可干扰多种细胞过程,例如氧化,DNA 修复,信号转导,转录,蛋白质降解,细胞周期进程和凋亡。

HBx 的致癌因素可能是 HBx 介导的转录反式激活和信号通路[17]。HCC 具有较高的发病率和死亡率,当前有效的潜在治疗方法仍然仅限于手术切除和肝移植,给社会带来了沉重的负担[18]。在 HCC 的早期筛查中,并非总是能够找到最广泛使用的肝癌生物标志物-AFP(甲胎蛋白)。因此,迫切需要寻找新的诊断和特异性生物标志物用于靶向治疗[19]。

MiRNA 失调可导致多种癌症并影响细胞稳态[20]。MiR-145 可用于临床疾病的诊断,FU 等[21]检测结核病患者血清中 miR-145 的表达,并通过绘制特定的受体曲线来评估 miR-145 的诊断准确性。HE 等[22]研究显示,抗 miR-145 和减活 miR-145 均会触发小鼠肝脏的代谢性炎症。这从一定角度解释了 HBx 小鼠在老年期出现肝癌:miR-145 在老年 HBx 小鼠中表达较低,从而导致了代谢性肝炎和 HCC。

为了了解 HBx 是否可以通过调控 miR-145a-5p 表达导致肝癌的发生,我们使用两种不同的方法:抑制 miR-145a-5p 表达和过表达 miR-145a-5p。结果表明,抑制 miR-145-5p 会导致细胞增殖和周期加快,细胞凋亡减慢以及肿瘤因子的过度表达。而 miR-145a-5p 的过表达结果则与抑制 miR-145a-5p 相反。

作为 miR-145a-5p 的靶基因之一,c-Myc 已被证明为一种癌蛋白,在多种癌症(包括 HCC)和预后中均高度表达[23-24]。在动物实验中发现,c-Myc 的过度表达可导致低分化 HCC 的发生。目前,c-Myc 被认为是“不可治疗的”[25-26]。而 miR-145a-5p 的另外一个靶基因 Kras 在人类肝癌中突变被认为是最高的过度表达,Kras 属于 Ras 家族,HCC 中发现 Ras 通路均被激活[27]。YE 等[28]在转基因的 Alb-Cre; Kras G12D 小鼠中发现肝细胞特异性 KrasG12D 的表达可引起小鼠肝细胞癌,而在 KrasG12D 和 HBx 双转基因小鼠中,HBx 的共表达促进了 KrasG12D 诱导的 HCC 的发生和发展。以上研究表明,寻找 c-Myc 和 Kras 的上游调控因子可以抑制 HCC 的发生发展。

然而,基于 miRNA 的疗法的实施仍面临重大挑战,主要是解决 miRNA 模拟物/抑制剂被循环 RNA 酶破坏并将 miRNA 准确地递送至病灶的问题。随着美国食品药品监督管理局(FDA)批准首个用于治疗可损害心脏和神经功能的罕见疾病的 RNAi 药物 patisiran,核酸药物已成为临床事实,也为核酸药物的临床应用带来了曙光[29]。随着新型冠状病毒的全球流行,RNA 疫苗的研究也越来越多[30-31]。

综上所述,本研究通过观测 miR-145a-5p 在 HBx-EGFP-14-19 细胞和 HBx 小鼠中的生物学功能,为 miR-145a-5p 作为肝癌的诊断物和靶向治疗奠定了基础,miRNA 可能是今后在 HCC 进程中进行研究和干预的新方向。

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] Yongyan Chen, Zhigang Tian. HBV-Induced Immune Imbalance in the Development of HCC[J]. Front Immunol, 2019, 10: 2048. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02048.

[3] LEVRERO M, ZUCMAN-ROSSI J. Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2016, 64(Suppl 1): S84-S101. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.02.021.

[4] CHEN W S, YEN C J, CHEN Y J, *et al*. miRNA-7/21/107 contribute to HBx-induced hepatocellular carcinoma progression through suppression of maspin[J]. Oncotarget, 2015, 6(28): 25962-25974. DOI: 10.18632/oncotarget.4504.

[5] GAO F, SUN X Y, WANG L K, *et al*. Downregulation of MicroRNA-145 caused by hepatitis B virus X protein promotes expression of CUL5 and contributes to pathogenesis of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 37(4): 1547-1559. DOI: 10.1159/000438522.

[6] LI J F, DAI X P, ZHANG W, *et al*. Upregulation of microRNA-146a by hepatitis B virus X protein contributes to hepatitis development by downregulating complement factor H[J]. mBio, 2015, 6(2): e02459-e02414. DOI: 10.1128/mBio.02459-14.

[7] CHEN Z, ZENG H Z, GUO Y, *et al*. miRNA-145 inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation by targeting c-Myc[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2010, 29: 151. DOI: 10.1186/1756-9966-29-151.

[8] YU Y J, NANGIA-MAKKER P, FARHANA L, *et al*. miR-21 and miR-145 cooperation in regulation of colon cancer stem cells[J]. Mol Cancer, 2015, 14: 98. DOI: 10.1186/s12943-015-0372-7.

[9] SADEGHIYEH N, SEHATI N, MANSOORI B, *et al*. MicroRNA-145 replacement effect on growth and migration inhibition in lung cancer cell line[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 111: 460-467. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.12.094.

[10] KAZI A, XIANG S Y, YANG H, *et al*. GSK3 suppression upregulates β-catenin and c-Myc to abrogate KRas-dependent tumors[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 5154. DOI: 10.1038/s41467-018-07644-6.

[11] BANDOPADHYAY M, BANERJEE A, SARKAR N, *et al*.

Tumor suppressor microRNA miR-145 and onco microRNAs miR-21 and miR-222 expressions are differentially modulated by hepatitis B virus X protein in malignant hepatocytes[J]. BMC Cancer, 2014, 14: 721. DOI: 10.1186/1471-2407-14-721.

[12] GAI X C, TANG B F, LIU F M, *et al*. mTOR/miR-145-regulated exosomal GOLM1 promotes hepatocellular carcinoma through augmented GSK-3β/MMPs[J]. J Genet Genom, 2019, 46(5): 235-245. DOI: 10.1016/j.jgg.2019.03.013.

[13] DU W B, LI D, GUO X M, *et al*. Circ-PRMT5 promotes gastric cancer progression by sponging miR-145 and miR-1304 to upregulate MYC[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1): 4120-4130. DOI: 10.1080/21691401.2019.1671857.

[14] WANG X, HUO B N, LIU J, *et al*. Hepatitis B virus X reduces hepatocyte apoptosis and promotes cell cycle progression through the Akt/mTOR pathway in vivo[J]. Gene, 2019, 691: 87-95. DOI: 10.1016/j.gene.2018.12.054.

[15] CHATURVEDI V K, SINGH A, DUBEY S K, *et al*. Molecular mechanistic insight of hepatitis B virus mediated hepatocellular carcinoma[J]. Microb Pathog, 2019, 128: 184-194. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.01.004.

[16] CHEN Y Y, TIAN Z G. HBV-induced immune imbalance in the development of HCC[J]. Front Immunol, 2019, 10: 2048. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02048.

[17] ALI A, ABDEL-HAFIZ H, SUHAIL M, *et al*. Hepatitis B virus, HBx mutants and their role in hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(30): 10238-10248. DOI: 10.3748/wjg.v20.i30.10238.

[18] KIM D W, TALATI C, KIM R. Hepatocellular carcinoma (HCC): beyond sorafenib-chemotherapy[J]. J Gastrointest Oncol, 2017, 8(2): 256-265. DOI: 10.21037/jgo.2016.09.07.

[19] LUO P, WU S Y, YU Y L, *et al*. Current status and perspective biomarkers in AFP negative HCC: towards screening for and diagnosing hepatocellular carcinoma at an earlier stage[J]. Pathol Oncol Res, 2020, 26(2): 599-603. DOI: 10.1007/s12253-019-00585-5.

[20] MISHRA S, YADAV T, RANI V. Exploring miRNA based approaches in cancer diagnostics and therapeutics[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2016, 98: 12-23. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2015.10.003.

[21] FU Y H, YANG X, CHEN H Y, *et al*. Diagnostic value of miR-145 and its regulatory role in macrophage immune response in tuberculosis[J]. Genet Mol Biol, 2020, 43(2): e20190238. DOI: 10.1590/1678-4685-GMB-2019-0238.

[22] HE M, WU N, LEONG M C, *et al*. miR-145 improves metabolic inflammatory disease through multiple pathways[J]. J Mol Cell Biol, 2020, 12(2): 152-162. DOI: 10.1093/jmcb/mjz015.

[23] DANG C V. MYC on the path to cancer[J]. Cell, 2012, 149(1): 22-35. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.003.

[24] LIU P, GE M M, HU J J, *et al*. A functional mammalian target of rapamycin complex 1 signaling is indispensable for c-Myc-driven hepatocarcinogenesis[J]. Hepatology, 2017, 66(1): 167-181. DOI: 10.1002/hep.29183.

[25] SHACHAF C M, KOPELMAN A M, ARVANITIS C, *et al*. MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer[J]. Nature, 2004, 431(7012): 1112-1117. DOI: 10.1038/nature03043.

[26] CHOW E K, FAN L L, CHEN X, *et al*. Oncogene-specific formation of chemoresistant murine hepatic cancer stem cells[J]. Hepatology, 2012, 56(4): 1331-1341. DOI: 10.1002/hep.25776.

[27] KARNOUB A E, WEINBERG R A. Ras oncogenes: split personalities[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(7): 517-531. DOI: 10.1038/nrm2438.

[28] YE H, ZHANG C, WANG B J, *et al*. Synergistic function of Kras mutation and HBx in initiation and progression of hepatocellular carcinoma in mice[J]. Oncogene, 2014, 33(43): 5133-5138. DOI: 10.1038/onc.2013.468.

[29] LEDFORD H. Gene-silencing technology gets first drug approval after 20-year wait[J]. Nature, 2018, 560(7718): 291-292. DOI: 10.1038/d41586-018-05867-7.

[30] MULLIGAN M J, LYKE K E, KITCHIN N, *et al*. Phase Ⅰ/Ⅱ study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults[J]. Nature, 2020, 586(7830): 589-593. DOI: 10.1038/s41586-020-2639-4.

[31] WALSH E E, FRENCK R W Jr, FALSEY A R, *et al*. Safety and immunogenicity of two RNA-based covid-19 vaccine candidates[J]. N Engl J Med, 2020, 383(25): 2439-2450. DOI: 10.1056/NEJMoa2027906.

(收稿:2021-02-05;修回:2021-04-30)

(编辑 汪勤俭)