DOI:10.16016/j.2097-0927.202205009

miR-576-5p 调控 EMT 进程抑制肝癌细胞迁移和侵袭

崔 琦,王余彦,卢映君,曾爱中 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院感染科

[摘要] **目的** 探究 miR-576-5p 调控上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)进程在肝癌细胞迁移和侵袭中的影响。**方法** 采用 RT-qPCR 检测重庆医科大学附属第一医院肝胆外科 2020 年 6 月至 2021 年 1 月行肝癌切除术的 27 例患者的肝细胞癌组织(hepatocellular carcinoma,HCC)和癌旁组织,同时检测了肝癌细胞株和正常人肝细胞的 miR-576-5p 表达水平。将 miR-576-5p 类似物/阴性对照(miR-576-5p mimics/ mimics NC)转染到 hepG2 作为过表达组(mimics 组)和过表达对照组(mimics NC 组);将 miR-576-5p 抑制剂/阴性对照(miR-576-5p inhibitor/ inhibitor NC)转染至 SMMC-7721 中作为去表达组(inhibitor 组)及去表达对照组(inhibitor NC 组)。用 CCK-8 和 EDU 检测细胞增殖能力;划痕实验、Transwell 侵袭实验测定各组细胞侵袭和迁移能力;Western blot 检测各组细胞中 E-cadherin、N-cadherin 和 snail 蛋白表达水平变化。**结果** miR-576-5p 在肝细胞癌组织中较配对癌旁组织表达明显下降($P<0.001$),在肝癌细胞株中较正常人肝细胞表达偏低($P<0.001$)。SMMC-7721 inhibitor 组较 inhibitor NC 组增殖能力增强($P<0.001$,$P<0.001$),伤口愈合率显著增强($P<0.001$),transwell 小室迁移和侵袭穿孔细胞数明显增加($P<0.001$,$P<0.01$)。mimics 组较过表达对照组增殖能力减弱($P<0.01$,$P<0.01$),伤口愈合率显著降低($P<0.01$),迁移和侵袭穿孔细胞数明显减少($P<0.001$,$P<0.01$)。miR-576-5p 过表达组与其对照组比较,E-cadherin 蛋白表达显著增加,N-cadherin 和 snail 蛋白表达明显减少($P<0.001$,$P<0.05$,$P<0.05$),miR-576-5p 去表达则发生相反的变化($P<0.05$,$P<0.001$, $P<0.01$)。**结论** miR-576-5p 抑制肝癌细胞的增殖,同时阻碍 EMT 进程,抑制肝癌细胞侵袭和迁移。

[关键词] miR-576-5p;肝癌;上皮间质转化
[中图法分类号] R394.3; R73-37; R735.7 [文献标志码] A

miR-576-5p regulates the EMT process to inhibit migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells

CUI Qi, WANG Yuyan, LU Yingjun, ZENG Aizhong Department of Infectious Disease, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] Objective To investigate the effect of miR-576-5P on the migration and invasion of hepatocellular carcinoma (HCC) cells by regulating epithelial-mesenchymal transition (EMT) process. Methods RT-qPCR was used to detect miR-576-5p expression level in HCC cells and normal liver cells, hepatocellular carcinoma tissues and paraneoplastic tissues from 27 patients who accepted hepatectomy from June 2020 to January 2021 in the Department of Hepatobiliary Surgery of the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University. MiR-576-5p mimics and mimics NC were transfected into hepG2 cells as the over-expression group(mimics group) and the control group(mimics NC group) , and miR-576-5p inhibitor and inhibitor NC were transfected into SMMC-7721 cells as the de-expression group(inhibitor group) and the control group(inhibitor NC group). CCK-8 assay and EDU assay were used to detect the proliferative ability of cells. Transwell assay and wound healing assay were used to observe the changes of invasion and migration of cells in each group. The changes of expression level of E-cadherin, N-cadherin and snail in each group were detected by Western blotting. Results The expression of miR-576-5p in HCC tissues was significantly

[通信作者] 曾爱中,E-mail: aizhong9@ sina.com

2097-0927/Copyright © 2022, 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/)

lower than that in matched adjacent tissues($P<0.001$), and the expression of miR-576-5p was lower in HCC cells than that of normal liver cells ($P<0.001$). SMMC-7721 inhibitor group had enhanced proliferative capacity ($P<0.001$, $P<0.001$), significantly increased wound healing rate ($P<0.001$) and significantly increased migration and invasive perforated cells ($P<0.001$, $P<0.01$), compared to the inhibited NC group. HepG2 mimics group had lower proliferative capacity($P<0.01$, $P<0.01$), significantly lower wound healing rate($P<0.01$), and significantly fewer migration and invasive perforated cells than the mimics NC group($P<0.001$,$P<0.01$). The hepG2 mimics group showed a obviously increase in the expression of E-cadherin and a decrease in the expression of N-cadherin and snail compared to the mimics NC group ($P<0.001$, $P<0.05$, $P<0.05$), while the completely opposite changes occurred in the SMMC-7721 inhibitor groups ($P<0.05$, $P<0.001$, $P<0.01$). **Conclusion** MiR-576-5p inhibits the proliferation of hepatocellular carcinoma cells and prevents the EMT process to inhibit invasion and migration of cells.

[**Key words**] miR-576-5p; hepatocellular carcinoma; epithelial mesenchymal transition

Corresponding author: ZENG Aizhong, E-mail: aizhong9@sina.com

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)在全球常见的癌症死亡原因中居第四位[1]。由于缺乏有效的早期检测手段和有力的治疗方案,导致肝细胞癌预后较差[2]。研究肝细胞癌的发病机制及侵袭转移过程,发现新的诊断和治疗靶点是现阶段的研究重点。

miRNA 是一种具有组织特异性的、高度保守的、非蛋白质编码的小分子 RNA[3]。miRNA 可识别特异的靶基因,且与其 3'端非编码区(untranslated region, UTR)上结合位点结合,携带 RNA 诱导沉默复合物,达到抑制转录、切割或降解 mRNA 作用[4]。近年来,因为 miRNA 对基因表达的影响,在身体组织和体液中稳健存在的特性以及它们作为疾病生物标志物的潜在用途,miRNA 已成为基础和转化医学研究的热门领域[5]。较多研究证明,miRNA 在癌症中通过控制抑癌基因和原癌基因的表达来参与细胞增殖和凋亡的调节[6]。

上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是上皮细胞去分化为间充质表型的一种多步骤的生物学过程。EMT 是上皮细胞来源的恶性肿瘤细胞发生远处转移的重要驱动因素,而肝细胞是具有高度特化形态的上皮细胞[7]。因此,EMT 在 HCC 肝内和肝外转移中起着关键作用[8]。在 EMT 期间,上皮形态的丧失表现为上皮标志物减少,这与 HCC 去分化一致[9]。在 EMT 过程中,中间细丝系统(K8、K18、K19)的黏附连接组分 E-钙粘蛋白(E-cadherin)和细胞角蛋白表达减少,而间充质蛋白[如 N-钙粘蛋白(N-cadherin)、α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、成纤维细胞特异性蛋白(FSP-1)]和 EMT 转录因子(EMT-TFs)、锌指转录因子(nail)、Twist 和 E 盒结合锌指蛋白(zinc finger E-box binding homeobox, ZEB)的表达增加[10]。

已有相关研究阐述了 miR-576-5p 对结直肠癌[11]、食管鳞状细胞癌[12]、胃癌细胞[13]在增殖、迁移、凋亡等恶行表型上的影响,但 miR-576-5p 对 HCC 细胞增殖、迁移和凋亡等方面的影响及其相关的分子机制尚不明确。本研究将通过检测 27 例肝细胞癌确诊患者的癌组织及其癌旁组织、正常人肝细胞和肝癌细胞株 miR-576-5p 的表达水平,统计分析 miR-576-5p 的表达水平和临床特征的关系。通过将 SMMC-7721 转染 miR-576-5p inhibitor 和 hepG2 转染 miR-576-5p mimics,探讨其增殖、迁移和侵袭的影响以及对 EMT 的调控作用,为阐明肝细胞癌的发病机制和探索诊疗新靶点提供线索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床样本 从重庆医科大学附属第一医院肝胆外科 2020 年 6 月至 2021 年 1 月行肝癌切除术的 27 名手术患者中收集 HCC 样本及其配对癌旁组织,癌旁组织取肿瘤边缘>1 cm(远癌旁)范围的肝组织。所有患者病理诊断为肝细胞癌。在手术治疗前接受免疫治疗、化疗或放疗的患者被排除在外。该研究获得重庆医科大学第一附属医院伦理委员会的批准(2022-K85)。

1.1.2 试剂 MiR-576-5p 类似物、抑制剂及对应阴性对照均由广州锐博生物技术有限公司合成构建,TRIzol 试剂、Mir-X miRNA First-Strand Synthesis 和 SYBR Green PCR 试剂盒均购自日本 TAKARA 公司,CCK8 试剂盒购自美国 MCE 公司,EDU 试剂盒购自中国碧云天公司,0.8 μm Transwell 小室购自美国 corning 公司,Matrigel(基底胶)购自美国 BD 公司,*E-cadherin*、*N-cadherin* 和 *snail* 单克隆抗体购自中国武汉三鹰公司,胎牛血清购自以色列 BI 公司,DMEM 培养基购自

美国 Gibco 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及转染 所有细胞株由重庆医科大学传染病与寄生虫病学重点实验室购买和储存。细胞用 90% DMEM 高糖加 10% FBS 培养,于细胞孵箱生长(37 ℃,5% CO_2)。取对数生长期细胞接种适量细胞数于 6 孔板,待其密度长至 70% 左右,按 riboFECT™CP Reagent 说明书转染 miRNA mimics/inhibitor 和对应阴性对照。SMMC-7721 转染 miR-576-5p 抑制剂/阴性对照(miR-576-5p inhibitor/ inhibitor NC)作为去表达组及其对照组;hepG2 转染 miR-576-5p 类似物/阴性对照(miR-576-5p mimics/ mimics NC)作为过表达组及其对照组。

1.2.1 RT-qPCR 采用 TRIzol 试剂提取各组细胞总 RNA,取 1 μg 按照 Mir-X miRNA First-Strand Synthesis 反转录试剂盒(加尾法)操作手册反转录合成 cDNA。采用 SYBR Green PCR 试剂盒进行 RT-qPCR,U6 snRNA 作为内参,反应条件为:95 ℃ 10 min,95 ℃ 5 s,60 ℃ 20 s,40 个循环,95 ℃ 60 s,55 ℃ 30 s,95 ℃ 30 s。每个样品做 3 个复孔,反应结束后,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算并分析实验结果,扩增引物见表 1。

表 1 扩增引物序列

引物名称	序列(5′→3′)
mir-576-5p 特异引物	GCGCGATTCTAATTTCTCCACGTCTTT
反向:U6	TGGAACGCTTCACGAATTTGCG
正向:U6	GGAACGATACAGAGAAGATTAGC

1.2.3 CCK-8 将 SMMC-7721 按 miR-576-5p inhibitor、inhibitor NC,hepG2 按 mimics、mimics NC 分组种入 96 孔板中,在 37 ℃、5% CO_2 孵箱中培养 24 h,将培养板取出,在每个孔中添加 10 μL CCK-8 试剂,培养 1 h。在波长 450 nm 下,酶标仪检测每个孔的 D(450)值。

1.2.4 EDU 配置 EDU 工作液:按说明书用培养基 1∶500 稀释 EDU 试剂;在每孔中按 1∶1加入原有培养基和 EDU 工作液。孵箱孵育 2 h 后,用 4%多聚甲醛在常温下固定 15 min;洗涤 3 次;加入适量通透液,室温下孵育 20 min;洗涤 2 次;每孔加入 200 μL 按使用说明配制 click 反应液,避光下室温孵育 30 min;洗涤 3 次。用荧光显微镜观察拍照,Image J 软件测定平均荧光强度。

1.2.5 划痕实验 用记号笔在 6 孔板后,均匀画 5 条横线;将适量细胞接种至 6 孔板,按分组进行转染;待其长满,用 10 μL 枪头垂直于画线划痕;PBS 液洗 3 次,无血清培养基继续培养,用显微镜拍照。孵箱培养 24 h 后再次拍照,Image J 软件测量划痕面积,计算伤口愈合比。

1.2.6 Transwell 法检测细胞侵袭和迁移能力 Transwell 迁移实验:胰酶消化已转染满 24 h 的细胞,离心后用无血清培养基重悬,计数,稀释细胞悬液至合适浓度。每个小室上层加入 100 μL 细胞悬液,下层加入 600 μL 完全培养基,细胞孵箱中孵育 24 h。拿出小室吸干液体,在甲醛中固定 30 min,0.1%结晶紫染色 20 min,PBS 缓冲液清洗两遍,擦净小室上层细胞。用显微镜拍照观察,Image J 软件计数。

Transwell 侵袭实验:无血清培养基以 1∶8的比例稀释 Matrigel 基质胶,铺被至小室中,其余步骤同 Transwell 迁移实验相同。

1.2.7 Western blot 检测 E-Cadherin、N-Cadherin、Snail 蛋白表达 加入适量 RIPA 裂解液处理 3~5 min,细胞刮刀将细胞刮到 EP 管中;冰上吹打,裂解反应 30 min;4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min,收集上清总蛋白液入。依照 BCA 蛋白测定试剂盒操作说明检测蛋白浓度。5×蛋白上样缓冲液与蛋白溶液按 1∶4混合,100 ℃恒温变性 15 min。制胶,上样电泳,待溴酚蓝出现终止电泳。转膜;脱脂牛奶封闭 30 min;分别加入 *E-cadherin*(1∶1 000)、*N-cadherin*(1∶1 000)、*snail*(1∶1 000)和 *actin*(1∶2 000)一抗,4 ℃下摇床过夜;洗膜,室温孵育稀释二抗 30 min;TBST 洗膜 3 次。避光将 ECL 化学发光液加入显影剂显影。Image J 软件分析条带的灰度值,计算蛋白表达水平。

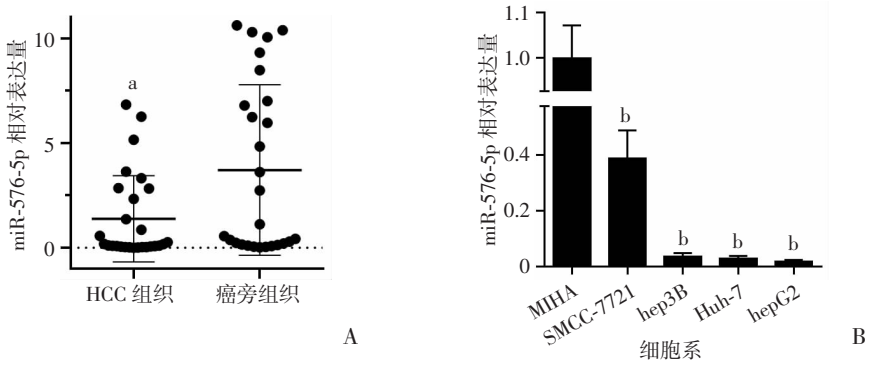
1.3 统计学分析

计量资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学分析,两两配对比较采用配对 t 检验,两组间比较采用 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 miR-576-5p 在 HCC 组织和肝癌细胞中表达下调

RT-qPCR 检测发现癌旁组织较肝癌组织表达量著升高($P<0.001$,图 1)。27 例患者标本的 miR-576-5p 表达量在年龄、性别、分化程度、有无乙肝、有无肝硬化、有无肿瘤远处转移、有无微血管管癌栓(microvascular invasion,MVI)等方面无显著性差异,但在肿瘤大小、肿瘤个数方面均有明显差异($P<0.05$,$P<0.001$,表 2)。运用 PCR 技术检测正常人肝细胞 MIHA 和 4 种肝癌细胞株 hepG2、SMMC-7721、hep3B、Huh-7 中 miR-576-5p 的表达,miR-576-5p 在 MIHA 中表达水平较高,肝癌细胞系中表达显著降低($P<0.001$,图 1B)。在肝癌细胞系中 SMMC-7721 表达量较高,hepG2 表达量较低,后续体外实验将 SMMC-7721 去表达 miR-576-5p,而 hepG2 过表达 miR-576-5p。



A:通过 RT-qPCR 检测 miR-576-5p 在 27 组成对的 HCC 组织中的表达($n=27$);B: RT-qPCR 检测 miR-576-5p 在 MIHA 细胞和 HCC 细胞系中的表达($n=5$) a: $P<0.001$,与癌旁组织组比较; b:$P<0.001$,与 MIHA 细胞比较

图 1 miR-576-5p 在 HCC 组织和细胞系中的表达 ($\bar{x}\pm s$)

表 2 miR-576-5p 的表达水平同临床参数之间的相关性 ($\bar{x}\pm s$)

临床特征	n	miR-576-5p 相对表达量	P
组织			0.001
癌旁组织	27	3.708±4.066	
癌组织	27	1.384±2.053	
性别			0.686
男	23	1.199±1.858	
女	4	0.797±1.494	
年龄/岁			0.513
≤60	18	0.976±1.269	
>60	9	1.466±2.607	
肿瘤大小/cm			0.024
<5	15	1.784±2.141	
≥5	12	0.333±0.672	
分化程度			0.455
中	22	1.163±1.890	
低	5	0.197±0.164	
肿瘤数/个			0.000
1	21	1.454±1.921	
≥2	6	0.039±0.037	
乙肝			0.296
无	7	2.049±2.774	
有	20	0.821±1.240	
肝硬化			0.415
无	11	2.920±3.803	
有	16	4.250±4.272	
转移			0.101
无	22	0.658±1.101	
有	5	3.259±2.746	
微血管管癌栓			0.931
无	14	1.110±1.637	
有	13	1.171±2.006	

2.2 miR-576-5p 在肝癌细胞中抑制增殖

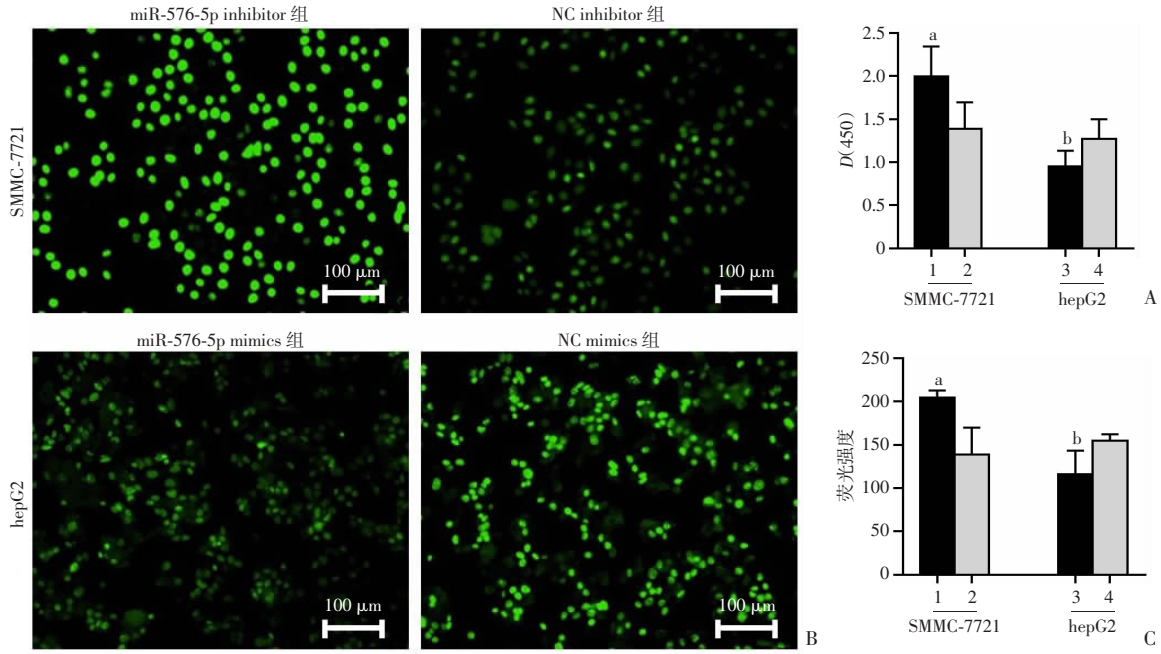
CCK-8 实验结果表明,SMMC-7721 inhibitor 组比 inhibitor NC 组 $D(450)$ 值明显增大($P<0.001$),而 hepG2 mimics 组,与 mimics NC 组比较,$D(450)$值显著减低($P<0.01$,图 2A)。EDU 细胞增殖实验后,荧光强度测量结果进一步验证了 CCK-8 的实验结果,揭示了 miR-576-5p 对肝癌细胞增殖的抑制作用(图 2B、C)。

2.3 miR-576-5p 在肝癌细胞中抑制迁移和侵袭

划痕实验结果可见,划痕 24 h 时 SMMC-7721 inhibitor 组伤口愈合比显著强于 inhibitor NC 组($P<0.001$),同时 hepG2 mimics 组伤口愈合比低于 mimics NC 组($P<0.01$,图 3),提示 miR-576-5P 对肝癌细胞迁移有抑制作用。Transwell 迁移/侵袭实验中 SMMC-7721 inhibitor 组细胞穿孔数均明显多于 inhibitor NC 组($P<0.001$,$P<0.01$),而 hepG2 mimics 组细胞穿孔数均明显少于 mimics NC 组($P<0.001$,$P<0.01$,图 4),进一步验证了 miR-576-5p 对 HCC 细胞迁移侵袭的抑制作用。

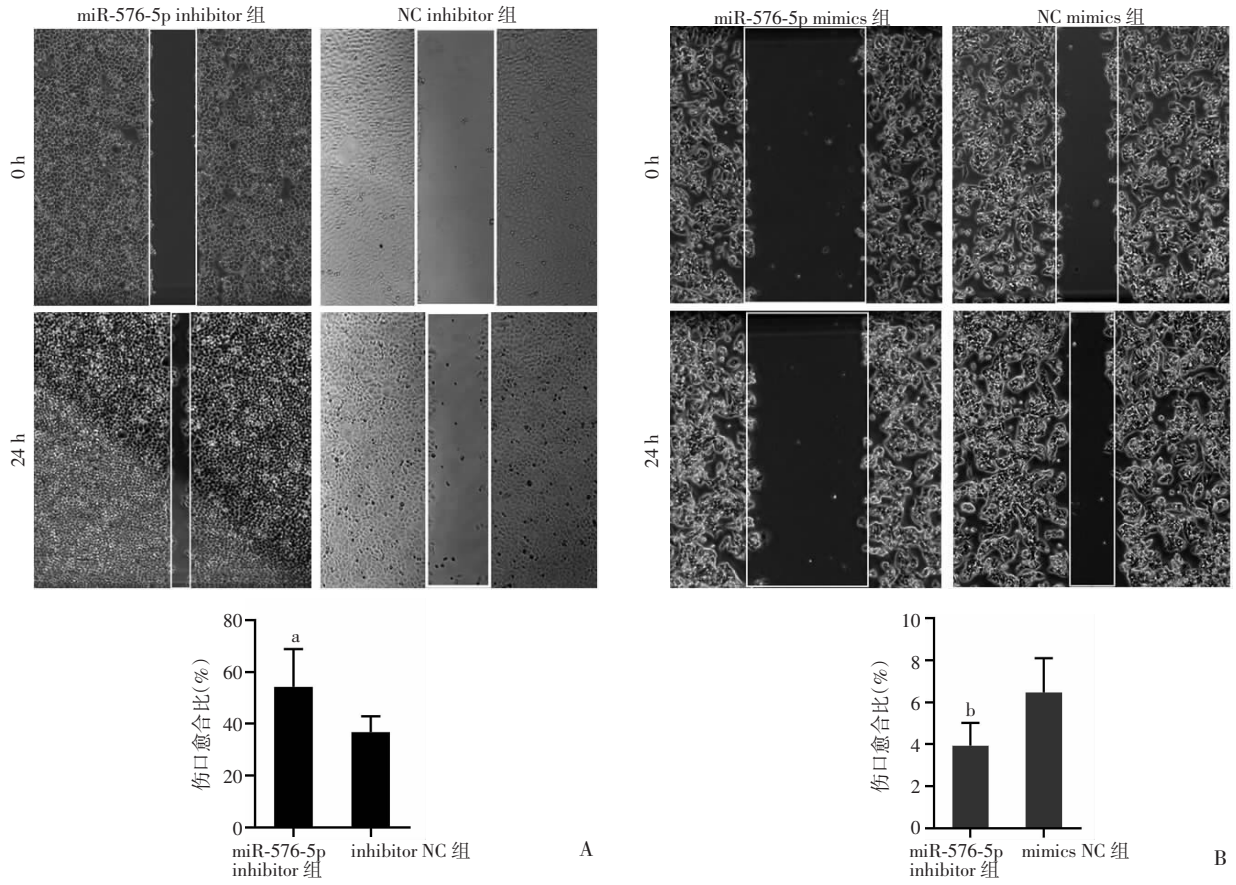
2.4 miR-576-5p 对肝癌细胞 EMT 的影响

蛋白质印迹分析结果表明,过表达的 miR-576-5p 增强了上皮标志物 E-cadherin 的表达,但降低了间充质标志物 N-cadherin 和 snail 的表达($P<0.01$,$P<0.05$,$P<0.05$)。相反,miR-576-5p 的去表达下调了 E-cadherin 的表达,但上调了 N-cadherin,snail 的表达($P<0.05$,$P<0.001$,$P<0.01$,图 5)。



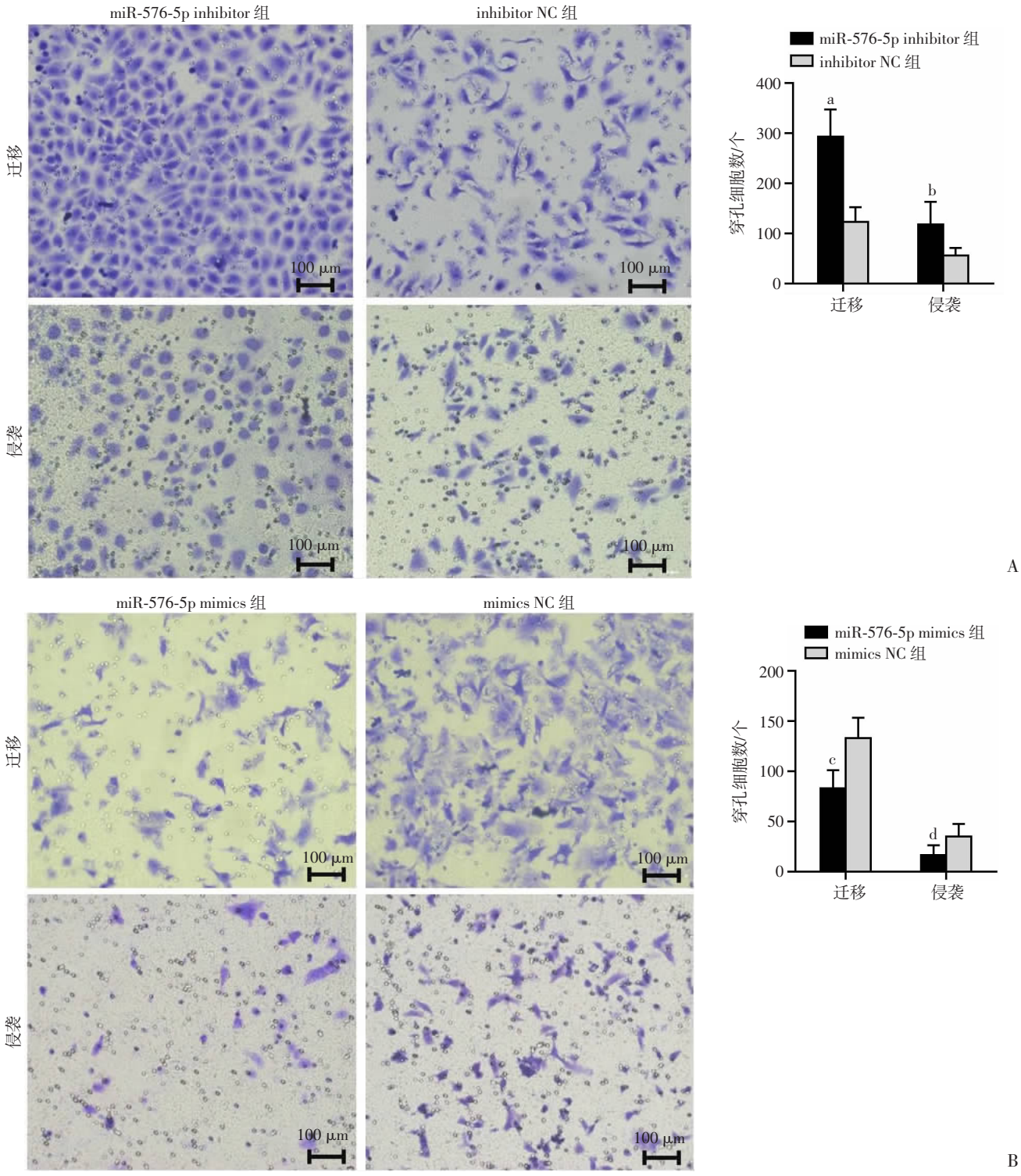
A:CCK-8 检测 miR-576-5p 对 SMCC-7721 和对 hepG2 细胞增殖能力的影响;B: EDU 实验检测 miR-576-5p 对 SMCC-7721 和 hepG2 增殖能力的影响;C:各组荧光强度对比 1: miR-576-5p inhibitor 组; 2: inhibitor NC 组; 3: miR-576-5p mimics 组; 4: mimics NC 组; a:$P<0.001$,与 inhibitor NC 组比较;b:$P<0.01$,与 mimics NC 组比较

图 2 miR-576-5p 在 HCC 细胞增殖中的抑制作用 ($n=4,\bar{x}\pm s$)



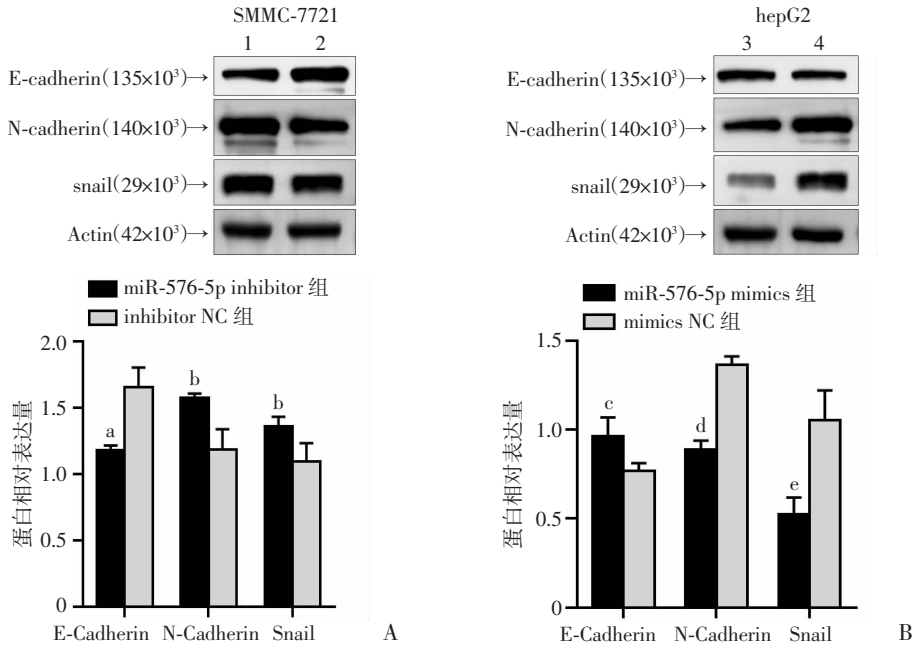
A:划痕实验检测 miR-576-5p 去表达对 SMCC-7721 细胞迁移能力的影响;B:划痕实验检测 miR-576-5p 过表达对 hepG2 细胞迁移能力的影响 a: $P<0.001$,与 inhibitor NC 组比较; b: $P<0.001$,与 mimics NC 组比较

图 3 miR-576-5p 在 HCC 细胞迁移中的抑制作用 ($n=2,\bar{x}\pm s$)



A: Transwell 迁移/侵袭实验检测 miR-576-5p 去表达对 SMCC-7721 细胞迁移和侵袭能力的影响;B: Transwell 迁移/侵袭实验检测 miR-576-5p 过表达对 hepG2 细胞迁移和侵袭能力的影响 a:$P<0.001$, b:$P<0.01$,与 inhibitor NC 组比较;c:$P<0.001$, d:$P<0.01$,与 mimics NC 组比较

图 4 miR-576-5p 在 HCC 细胞迁移和侵袭中的抑制作用 (结晶紫染色,$n=4$,$\bar{x}\pm s$)



A: SMCC-7721 细胞去表达 miR-576-5p 对 EMT 的作用;B: hepG2 细胞过表达 miR-576-5p 对 EMT 的作用 1: miR-576-5p inhibitor 组; 2: inhibitor NC 组; 3: miR-576-5p mimics 组; 4: mimics NC 组; a:$P<0.001$, b:$P<0.05$,与 inhibitor NC 组比较, c:$P<0.05$, d:$P<0.001$, e:$P<0.01$,与 mimics NC 组比较

图 5 miR-576-5p 在肝癌细胞中对 EMT 的阻碍作用

3 讨论

目前,HCC 治疗预后较差,即使手术切除术后,复发率也居高不下,而肿瘤复发和转移是影响 HCC 疗效的重要因素。因此,抑制肿瘤侵袭和迁移是 HCC 治疗有效的策略,充分探索肿瘤细胞的侵袭转移机制,是寻找有效治疗手段的必要过程[12]。

近年来,许多研究证实 miRNA 在肿瘤的生长转移过程中发挥着重要的作用[14]。研究表明 miRNA 在肝细胞癌的发生发展中有一定的作用。已有研究者发现 miR-21 表达的持续失调和相关细胞功能障碍可加速肝癌的发展[15]。另有研究证实,miR-597-5p 通过靶向 TEAD1 对肝癌细胞的恶性表型具有促进抑制作用[16]。本研究探索了 miR-576-5p 在肝细胞癌中的作用,通过检测 27 例肝细胞癌确诊患者的癌组织及其癌旁组织、正常人肝细胞和肝癌细胞株 miR-576-5p 的表达水平,统计分析 miR-576-5p 的表达水平和临床特征的关系。SMMC-7721 转染 miR-576-5p inhibitor 和 hepG2 转染 miR-576-5p mimics 后,探讨其增殖、迁移和侵袭的影响。

EMT 是指上皮细胞通过特定程序转化为具有间质表型细胞的生物学过程,在此过程中,上皮细胞获得间充质细胞的特征,细胞运动性和迁移能力增强[9]。在肿瘤恶性进展过程中,肿瘤细胞劫持该过程,改变自身细胞形态,进而增加其侵袭性和转移能力[17]。EMT 主要特征为上皮细胞标志物 E-cadherin 蛋白的丢失和间质细胞标志物 N-cadherin、Vimentin 蛋白和 EMT 转录因子(EMT-TFs)、nail、Twist 和 ZEB 的表达增加。已有较多证据表明,miRNAs 在肝癌 EMT 进程中发挥着重要的调节作用,能促进或抑制肿瘤细胞的侵袭与转移。有研究表明,miR-200 家族能维持上皮表型,从而促进 EMT 和 HCC 细胞侵袭[18]。进一步研究表明,*p*53 在 HCC 进展过程中常受损,能上调 miR-200 和 miR-192 家族成员,从而抑制 ZEB1/2 表达和诱导 EMT[19]。MiR-148 直接靶向 c-Met 并抑制 Met/Snail 信号传导,因此在 HCC 中充当肿瘤抑制因子[20]。同样,miR-451 增加化疗和放射敏感性并通过靶向 c-Myc 逆转 EMT[7]。本研究发现,miR-576-5p mimics 组,与其对照组比较,E-cadherin 蛋白表达增加,N-cadherin 和 snail 蛋白表达明显减少,抑制了 EMT 的进程。去表达组相比其对照组,则产生相反的作用效果,两结果相互印证。

本研究结果证实 miR-576-5p 在肝癌细胞中的作用,miR-576-5p 在 HCC 癌组织中较配对癌旁组织表达明显下降,在肝癌细胞株中低表达。SMMC-7721 去表达 miR-576-5p 可加快 SMMC-7721 细胞 EMT 进程,促进细胞的增殖、迁移和侵袭,而 hepG2 过表达 miR-576-5p 会抑制肝癌细胞相关恶性表型,为肝细胞癌的

临床靶向治疗提供新的靶点。

miR-576-5p 的靶基因鉴定是后续重要的工作。miRNA 主要通过与 3′-UTR 互补序列结合,诱导靶 mRNA 的降解。通过分析软件预测 miRNA 与 mRNAs 的 3′-UTR 区的结合位点,初步筛选出一批靶基因,其中包括原癌基因 *c-myc*、*TRIB*2、*asph* 等,还有与 EMT 相关基因 *ZEB*1、*TWIST*1、*snail* 等。miR-576-5p 调控 EMT 其可能与重要肿瘤相关信号通路存在潜在联系,其机制值得进一步探索,为肝癌靶向治疗的临床实践提供新的线索。

参考文献:

[1] SINGAL A G, LAMPERTICO P, NAHON P. Epidemiology and surveillance for hepatocellular carcinoma: new trends [J]. J Hepatol, 2020, 72(2): 250-261. DOI: 10.1016/j.jhep.2019.08.025.

[2] FUJIWARA N, FRIEDMAN S L, GOOSSENS N, *et al*. Risk factors and prevention of hepatocellular carcinoma in the era of precision medicine[J]. J Hepatol, 2018, 68(3): 526-549. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.09.016.

[3] BERTINO G, NERI S, BRUNO C M, *et al*. Diagnostic and prognostic value of alpha-fetoprotein, des-γ-carboxy prothrombin and squamous cell carcinoma antigen immunoglobulin M complexes in hepatocellular carcinoma[J]. Minerva Med, 2011, 102(5): 363-371.

[4] VALINEZHAD ORANG A, SAFARALIZADEH R, KAZEMZADEH-BAVILI M. Mechanisms of miRNA-mediated gene regulation from common downregulation to mRNA-specific upregulation[J]. Int J Genomics, 2014, 2014: 970607. DOI: 10.1155/2014/970607.

[5] VASUDEVAN S. Posttranscriptional upregulation by mRNAs [J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2012, 3(3): 311-330. DOI: 10.1002/wrna.121.

[6] HUANG V, PLACE R F, PORTNOY V, *et al*. Upregulation of Cyclin B1 by miRNA and its implications in cancer[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(4): 1695-1707. DOI: 10.1093/nar/gkr934.

[7] HUANG J Y, ZHANG K, CHEN D Q, *et al*. microRNA-451: epithelial-mesenchymal transition inhibitor and prognostic biomarker of hepatocelluar carcinoma[J]. Oncotarget, 2015, 6(21): 18613-18630. DOI: 10.18632/oncotarget.4317.

[8] NIETO M A. Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancercells[J]. Science, 2013, 342(6159): 1234850. DOI: 10.1126/science.1234850.

[9] GIANNELLI G, KOUDELKOVA P, DITURI F, *et al*. Role of epithelial tomesenchymal transition in hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2016, 65(4): 798-808. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.05.007.

[10] ÖSTERREICHER C H, PENZ-ÖSTERREICHER M, GRIVENNIKOV S I, *et al*. Fibroblast-specific protein 1 identifies an inflammatory subpopulation of macrophages in theliver [J]. PNAS, 2011, 108(1): 308-313. DOI: 10.1073/pnas.1017547108.

[11] LUO J L, LIU L Y, SHEN J W, *et al*. miR-576-5p promotes epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer by targeting the Wnt5a-mediated Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2021, 23(2): 94. DOI: 10.3892/mmr.2020.11733.

[12] ZHANG L Y, PAN K, ZUO Z K, *et al*. LINC01133 hampers the development of gastric cancer through increasing somatostatin *via* binding to mRNA-576-5p[J]. Epigenomics, 2021, 13(15): 1205-1219. DOI: 10.2217/epi-2020-0377.

[13] NI X F, ZHAO L H, LI G, *et al*. microRNA-548-3p and microRNA-576-5p enhance the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells via NRIP1 downregulation[J]. Neoplasma, 2018, 65(6): 881-887. DOI: 10.4149/neo_2018_171206N803.

[14] ROBERTS A P, LEWIS A P, JOPLING C L. miR-122 activates hepatitis C virus translation by a specialized mechanism requiring particular RNA components [J]. Nucleic acids research, 2011, 39(17): 7716-7729. DOI: 10.1093/nar/gkr426.

[15] GRAMANTIERI L, FORNARI F, FERRACIN M, *et al*. microRNA-221 targets bmf in hepatocellular carcinoma and correlates with tumor multifocality[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(16): 5073-5081. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0092.

[16] SUN X G, HOU Z Y, LI N, *et al*. miR-597-5p suppresses the progression of hepatocellular carcinoma *via* targeting transcriptional enhancer associate domain transcription factor 1 (TEAD1)[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2022, 58(2): 96-108. DOI: 10.1007/s11626-021-00614-1.

[17] PONNUSAMY M P, SESHACHARYULU P, LAKSHMANAN I, *et al*. Emerging role of mucins in epithelial to mesenchymal transition[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2013, 13(9): 945-956. DOI: 10.2174/15680096113136660100.

[18] YUAN J H, YANG F, WANG F, *et al*. A long noncoding RNA activated by TGF-β promotes the invasion-metastasis cascade in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Cell, 2014, 25(5): 666-681. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.03.010.

[19] KIM T, VERONESE A, PICHIORRI F, *et al*. P53 regulates epithelial-mesenchymal transition through microRNAs targeting ZEB1 and ZEB2[J]. J Exp Med, 2011, 208(5): 875-883. DOI: 10.1084/jem.20110235.

[20] ZHANG J P, ZENG C, XU L, *et al*. MicroRNA-148a suppresses the epithelial-mesenchymal transition and metastasis of hepatoma cells by targeting Met/Snail signaling[J]. Oncogene, 2014, 33(31): 4069-4076. DOI: 10.1038/onc.2013.369.

(收稿:2022-05-04;修回:2022-10-26)

(编辑 邓强庭)