doi:10.11659/jjssx.04E022083

·基础研究·

miRNA-211 通过 BIN1 介导肝癌细胞 PD-L1 依赖的免疫逃逸研究

赵 亮[1],艾尔哈提·胡赛音[1],布祖克拉·阿布都艾尼[2],尼加提江·艾比布拉[1],亚力坤·赛来[1] (1.新疆医科大学第一附属医院全科医学科/普通外科,新疆 乌鲁木齐 830054;2.新疆医科大学第一附属医院重症二科,新疆 乌鲁木齐 830054)

[摘 要] **目的** 探讨 miR-211 对程序性死亡-配体 1(PD-L1)介导的肝癌细胞免疫逃逸作用及其相关机制。**方法** 收集我院 19 例肝癌患者肿瘤组织,通过 qRT-PCR 检测肝癌组织中 miR-211 和 PDL1 表达水平并分析两者的相关性。检测人肝癌 HepG2、HCCLM3 细胞和人正常肝上皮细胞 HL-02 中 miR-211 和 PD-L1 表达水平。将 HepG2 细胞分为 miR-NC 组(转染 miR-NC)、miR-211 组(转染 miR-211),检测 2 组细胞中 miR-211 和 PD-L1 表达水平以及 NK-92 细胞对肝癌细胞的杀伤率。采用荧光素酶报告基因实验检测 miR-211 和 BIN1 的靶向关系。再将 HepG2 细胞分为 miR-NC + oe-NC 组(转染 miR-NC 和 oe-NC)、miR-211 + oe-NC 组(转染 miR-211 和 oe-NC)及 miR-211 + oe-BIN1 组(转染 miR-211 和 oe-BIN1),检测各组细胞中 miR-211、BIN1 和 PD-L1 表达及 NK-92 细胞对肝癌细胞的杀伤率。**结果** 肝癌患者肿瘤组织中 miR-211 和 PD-L1 表达呈正相关($r=0.600\ 7$,$P=0.001$)。与 HL-02 细胞比较,HepG2 和 HCCLM3 细胞中 miR-211、PD-L1 表达水平升高($P<0.05$);与 miR-NC 组比较,miR-211 组 miR-211、PD-L1 表达水平升高($P<0.05$),NK-92 细胞对肝癌细胞的杀伤率降低($P<0.05$)。miR-211 靶向结合并抑制 BIN1。与 miR-NC + oe-NC 组比较,miR-211 + oe-NC 组 miR-211、PD-L1 表达水平升高($P<0.05$),BIN1 表达水平降低($P<0.05$),NK-92 细胞对肝癌细胞的杀伤率降低($P<0.05$)。与 miR-211 + oe-NC 组比较,miR-211 + oe-BIN1 组 BIN1 表达水平升高($P<0.05$),PD-L1 表达水平降低($P<0.05$),NK-92 细胞对肝癌细胞的杀伤率升高($P<0.05$)。**结论** 在肝癌细胞中,miR-211 靶向抑制 BIN1 表达,从而促进 PD-L1 依赖的免疫逃逸。

[关键词] miRNA-211;程序性死亡-配体 1;桥联整合子 1;肝癌;免疫逃逸

[中图分类号] R735.7 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-04-20

miRNA-211 mediated PD-L1 dependent immune escape by BIN1 in hepatocellular carcinoma cells

ZHAO Liang[1], Aierhati Husaiyin[1], Buzukela Abuduaini[2], Nijiatijiang Aibibula[1], Yalikun Sailai[1] (1. Department of General Medicine/General Surgery, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang 830054, China; 2. Second Department of Intensive Care, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang 830054, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of miR-211 on programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1) mediated immune escape of hepatocellular carcinoma cells and its related mechanism. **Methods** The tumor tissues of 19 hepatocellular carcinoma patients were collected, and the expression levels of miR-211 and PD-L1 in tumor tissues were detected by qRT-PCR, and their correlation was analyzed. The expression levels of miR-211 and PD-L1 in human hepatocellular carcinoma cells of HepG2 and HCCLM3, and human normal hepatic epithelial cells of HL-02 were detected. HepG2 cells were divided into the control group (transfected with miR-NC) and miR-211 group (transfected with miR-211), and the expression levels of miR-211 and PD-L1, and the cell killing rate of NK-92 cells to hepatocellular carcinoma cells in the two groups were detected. The targeting relationship between miR-211 and BIN1 was detected by the luciferase reporting assay. HepG2 cells were then divided into the miR-NC + oe-NC group (transfected with miR-NC and oe-NC), miR-211 + oe-NC group (transfected with miR-211 and oe-NC), and miR-211 + oe-BIN1 group (transfected with miR-211 and oe-BIN1), and the expression levels of miR-211, BIN1 and PD-L1 and the cell killing rate of NK-92 cells to hepatocellular carcinoma cells in each group were detected. **Results** The expression levels of miR-211 and PD-L1 in tumor tissues of hepatocellular carcinoma patients were positively correlated ($r=0.600\ 7$, $P=0.001$). Compared with HL-02 cells, the expression levels of miR-211 and PD-L1 in HepG2 and HCCLM3 cells were increased ($P<0.05$). Compared with the miR-NC group, the expression levels of miR-211 and PD-L1 in the miR-211 group were increased ($P<0.05$), and the cell killing rate of NK-92 cells to the hepatocellular carcinoma cells was decreased ($P<0.05$). miR-211 targeted binding BIN1 and inhibited its expression. Compared with the miR-NC + oe-NC group, the expression levels of miR-211 and PD-L1 in the miR-211 + oe-NC group were increased ($P<0.05$), the expression level of BIN1 was decreased ($P<0.05$), and the killing rate of NK-92 cells to the hepatocellular carcinoma cells was decreased ($P<0.05$). Compared with the miR-211 + oe-NC group, the expression level of BIN1 in the miR-211 + oe-BIN1 group was

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2019D01C062)

[通信作者] 亚力坤·赛来,E-mail:315810843@qq.com

increased ($P<0.05$), the expression level of PD-L1 was decreased ($P<0.05$), and the killing rate of NK-92 cells to the hepatocellular carcinoma cells was increased ($P<0.05$). **Conclusion** miR-211 promotes PD-L1-dependent immune escape by the targeted inhabitation of BIN1 expression in hepatocellular carcinoma cells.

Keywords: miRNA-211; programmed cell death 1 ligand 1; BIN1; hepatocellular carcinoma; immune escape

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种原发性肝癌[1],其具有高死亡率、强侵袭性、易转移、高复发率和高致死率的特点,给患者及其家庭带来了沉重的经济及精神负担,极大危害患者的生命健康[2]。尽管肝癌的诊断与治疗已经取得了巨大的进展,但由于肿瘤细胞的免疫逃逸,目前肝癌的治疗效果及预后仍不容乐观。

随着高通量测序技术的发展,越来越多的非编码RNA被发现,其在表观遗传修饰中发挥重要作用,可调控基因和染色体表达,从而影响细胞生长及分化,有极大的研究价值。miRNA是生物体内长度为17~22个核苷酸的高度保守的内源性非编码小分子RNA,可以调控蛋白质的翻译过程[3]。miRNA-211是一种miRNA,近年来越来越多的研究报道miR-211与癌症的发展相关。Hu等[4]的研究发现,结直肠癌患者的血液中miR-221显著增加,并且体液循环中的miR-211可作为诊断结直肠癌的敏感标志物;Chen等[5]发现,与相邻非肿瘤组织相比,miR-211在软骨肉瘤中的表达显著增加,miR-211过表达可促进软骨肉瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。

免疫逃逸是肿瘤细胞逃避免疫细胞杀伤的一种方式,也是肿瘤细胞在体内进展的主要原因,通过改变自身表型,降低免疫细胞对其识别能力,从而逃避免疫系统的攻击[6]。程序性死亡因子1(programmed death 1, PD-1)/程序性死亡-配体1(programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1)信号通路可抑制T细胞的增殖与活化,是目前肿瘤免疫治疗的研究热点。研究表明,肿瘤细胞中PD-L1的异常表达会促进肿瘤细胞的免疫逃逸,从而降低免疫治疗效果[7]。一些miRNAs可以通过干扰免疫攻击相关分子的表达来影响癌症免疫监视和免疫逃逸[8]。Yao等[9]发现内质网应激诱导的外泌体miR-27a-3p可以通过调节巨噬细胞中PD-L1表达促进乳腺癌细胞的免疫逃逸。有研究表明,miR-211与肝癌的发展相关,人体外周血循环中的miR-211水平对于肝癌具有一定的诊断价值,并能预测肝癌患者的预后[10]。然而miR-211在调节肝癌发展中的作用和潜在分子机制仍需进一步研究。本研究探讨肝癌细胞中miR-211能否通过PD-L1介导肿瘤细胞的免疫逃逸,以期为肝癌的免疫治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 临床样本

收集2019年3月至2021年3月于我院接受手术切除的19例肝癌患者肿瘤组织,年龄46~61岁。纳入标准:①符合肝癌诊断标准,且经病理学检查诊断为肝癌;②未接受放、化疗等。排除标准:①凝血功能异常;②并发其他恶性肿瘤;③心、肾、肺功能异常。术中切除的新鲜标本置于-80 ℃冰箱保存。本研究经我院医学伦理委员会审核批准(20190116024),所有患者家属均对本研究知情,并签署知情同意书。

1.2 细胞和主要试剂

人正常肝上皮细胞HL-02、肝癌细胞株HCCLM3和HepG2购自中科院上海细胞库;NK-92细胞购自美国ATCC公司;RPMI 1640培养基和胎牛血清购自美国Giboco公司;Lipofectamine™2000购自美国Invitrogen公司,TRIzol、逆转录试剂盒和SYBR Green试剂购自上海翌圣公司;NK细胞杀伤活性检测试剂购自美国Promega公司,BIN1-WT(野生型)和BIN1-MUT(突变型)质粒由南京金斯瑞生物科技有限公司利用生物信息学数据库和Primer5.0软件设计构建;过表达载体阴性对照(oe-NC)、BIN1过表达载体(oe-BIN1)购自武汉金开瑞生物工程有限公司;PD-L1抗体、BIN1抗体、GAPDH抗体购自英国Abcam公司,PD-L1、miR-211、BIN1、GAPDH的引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 人正常肝上皮细胞HL-02、肝癌细胞株HCCLM3和HepG2均使用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基培养,NK-92细胞培养于含20%胎牛血清及1%青链霉素混合液的L500培养液中,并置于37 ℃、5% CO_2的细胞培养箱中培养,同时根据细胞生长密度更换新鲜的培养基,待细胞生长融合度为80%~90%时进行消化和传代,并取对数生长期的细胞进行后续实验。

1.3.2 细胞转染与分组 取对数生长期的HepG2细胞以3.5×10^6个/孔的密度接种于6孔板中,待细胞生长融合度为80%~90%时,将细胞分为miR-NC组(转染miR-NC)、miR-211组(转染miR-211)、miR-NC+

oe-NC 组(转染 miR-NC 和 oe-NC)、miR-211 + oe-NC 组(转染 miR-211 和 oe-NC)及 miR-211 + oe-BIN1 组(转染 miR-211 和 oe-BIN1)。

1.3.3 NK 细胞毒性实验 按 NK 细胞杀伤活性检测试剂盒说明书操作。以培养 24 h 后的 NK-92 细胞为效应细胞,以经不同方式处理的 HepG2 细胞为靶细胞,600 g 离心 5 min,并以 PBS 洗涤 2 次,按 2∶1、5∶1、10∶1效靶比加入 96 孔板,每组设 3 个复孔,37 ℃、5% CO_2培养箱继续培养 3 h。加入 10 μL 裂解液继续培养 1 h,再次离心后吸上清转板,加反应底物并于室温避光放置 30 min,加反应终止液终止反应,于酶标仪下检测 450 nm 波长处的 OD 值。计算细胞杀伤活性,实验重复 3 次,取平均值。细胞杀伤率(%)=(实验组平均 OD 值 - 靶细胞自然释放组平均 OD 值 - 效应细胞自然释放组平均 OD 值)/(靶细胞最大释放组平均 OD 值 - 靶细胞自然释放组平均 OD 值)×100%。

1.3.4 荧光素酶报告基因实验 通过 TargetScan-Human ver.7.2 在线预测软件对 miR-211 进行生物学分析,根据实验设计分别将携带 BIN1-WT 和 BIN1-MUT 的质粒转染到经 miR-NC、miR-211 转染处理的 HepG2 细胞中,常规培养 2 d;按照荧光素酶检测试剂盒说明书,采用酶标仪测定荧光素酶活性。相对荧光素酶活性 = 报告基因酶活性/海肾萤光素酶活性。

1.3.5 qRT-PCR 检测肿瘤组织或细胞中 PD-L1、miR-211、B1N1 的表达 使用 TRIzol 试剂提取肝癌组织样本及肝癌细胞株 HCCLM3 和 HepG2 中的总 RNA,酶标仪检测总 RNA 的纯度和含量。按照 qRT-PCR试剂盒说明书依次进行逆转录和 qRT-PCR 实验,反应体系:cDNA 模板 2 ng,上下游引物各 0.4 μL,SYBR Primix Ex TaqTM 5 μL,ddH_2O 补充至 10 μL;反应条件:95 ℃预变性 30 s,95 ℃变性 7 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃ 15 s,40 个循环周期,引物序列见表 1。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mRNA 的相对表达量。

表 1 引物序列

基因		引物
GAPDH	正向	5'-AATGGGCAGCCGTTAGGAAA-3'
	反向	5'-GCGCCCAATACGACCAAATC-3'
PD-L1	正向	5'-TTGCTGAACGCCCCATACAA-3'
	反向	5'-TGTCCCGTTCCAACACTGAG-3'
miR-211	正向	5'-CCCTTTGTCATCCTTCGCCTA-3'
	反向	5'-GGGAAGTGACAACTGAGCAC-3'
BIN1	正向	5'-GGCTGCGCAGAAAGAAGAAC-3'
	反向	5'-GAGAGCTCTGAGATGGGGAC-3'

1.3.6 Western blot 检测肿瘤组织或细胞中 PD-L1、BIN1 的表达 收集各组细胞,使用 RIPA 裂解液提取总蛋白,通过 BCA 法进行蛋白定量。样品变性后通过 SDS-PAGE 凝胶电泳(120 V,60 min)分离,并将蛋白转至 PVDF 膜(300 mA,50 min)。5% 脱脂牛奶 4 ℃封闭 1 h,TBST 洗膜 5 min,3 次,加入 PD-L1 抗体(1∶1 000)、BIN1 抗体(1∶1 000),4 ℃摇床孵育过夜。TBST 洗膜 5 min,3 次,加入 HRP 标记的羊抗兔二抗(1∶1 000)37 ℃孵育 1 h,TBST 洗膜 5 min,5 次。显影曝光,使用 Image-Pro Plus 图像分析系统对蛋白条带的灰度值进行分析。实验重复 3 次,取平均值。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 19.0 和 GraphPad Prism 8.0 统计软件进行数据分析。采用 *Pearson* 相关系数法分析 PD-L1 和 miR-211 的相关性,符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *LSD-t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝癌组织中 PD-L1 和 miR-211 表达的相关性

肝癌组织中 PD-L1 和 miR-211 的表达呈正相关($r = 0.600\ 7$,$P = 0.001$),见图 1。

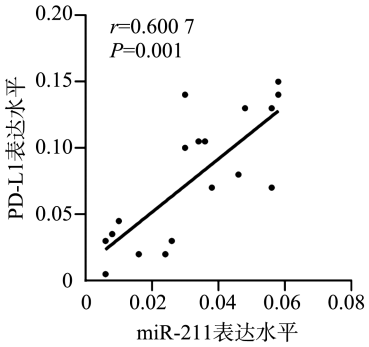


图 1 肝癌组织中 PD-L1 和 miR-211 表达的相关性分析

2.2 不同细胞中 PD-L1 和 miR-211 的表达水平

与正常肝 HL-02 细胞比较,肝癌 HCCLM3 和 HepG2 细胞中 miR-211 和 PD-L1 mRNA 表达水平升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图 2a。Western blot 结果显示,与 HL-02 细胞比较,HCCLM3 和 HepG2 细胞中 PD-L1 蛋白表达水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2b。因此,选择 miR-211 相对表达水平较低的 HepG2 细胞进行后续实验。

2.3 过表达 miR-211 促进肝癌细胞中 PD-L1 表达

qRT-PCR 结果显示,与 miR-NC 组比较,miR-211 组 HepG2 细胞中 miR-211 和 PD-L1 mRNA 表达水平升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图 3a。Western blot 结果显示,与 miR-NC 组比较,miR-211 组

HepG2 细胞中 PD-L1 蛋白表达水平升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 3b。

2.4 过表达 miR-211 降低 NK-92 细胞对肝癌细胞的杀伤率

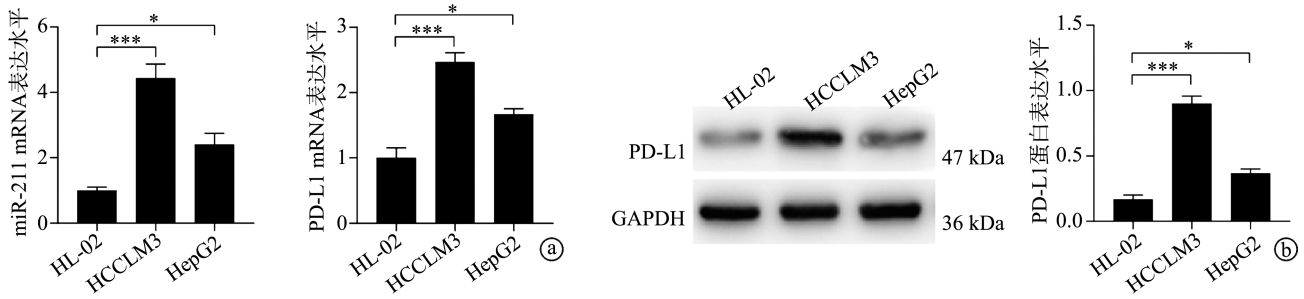
NK 细胞毒性实验结果显示,与 miR-NC 组比较,miR-211 组 HepG2 细胞在不同 NK-92∶HepG2效靶比时 NK-92 细胞对肝癌细胞的杀伤率均显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 4。

2.5 miR-211 靶向 BIN1

TargetScanHuman ver. 7. 2 在线预测软件结果显示,miR-211 的潜在靶点为 BIN1,见图 5a。qRT-PCR 结果显示,与 miR-NC 组比较,miR-211 组 HepG2 细胞中BIN1 mRNA表达水平降低,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 5b。荧光素酶报告基因检测结果显示,与 miR-NC 组比较,miR-211 组 HepG2 细胞在 BIN1-WT 中荧光素酶活性降低($P<0.05$),而在 BIN1-MUT 中荧光素酶活性无显著变化($P>0.05$),见图 5c。

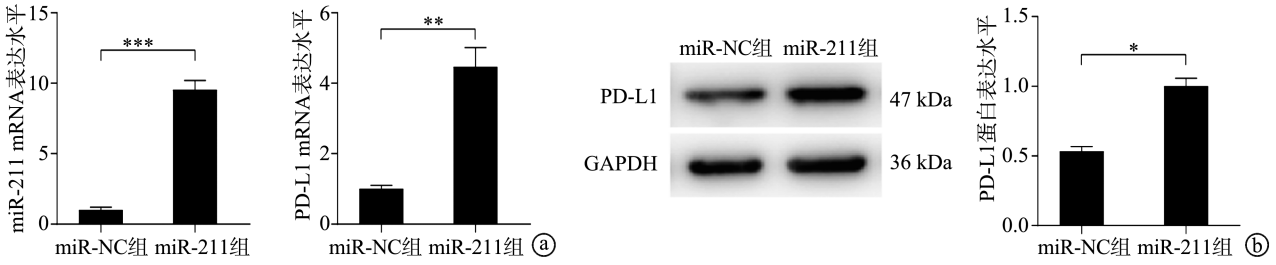
2.6 过表达 BIN1 逆转 miR-211 对肝癌细胞 PD-L1 表达的促进作用

qRT-PCR 和 Western blot 结果显示,与 miR-NC + oe-NC 组比较,miR-211 + oe-NC 组 HepG2 细胞 miR-211 和 PD-L1 表达水平升高,BIN1 表达水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。与 miR-211 + oe-NC 组比较,miR-211 + oe-BIN1 组 HepG2 细胞 BIN1 表达水平升高,PD-L1 表达水平降低($P<0.05$),而 miR-211 表达水平无显著变化($P>0.05$),见图 6。



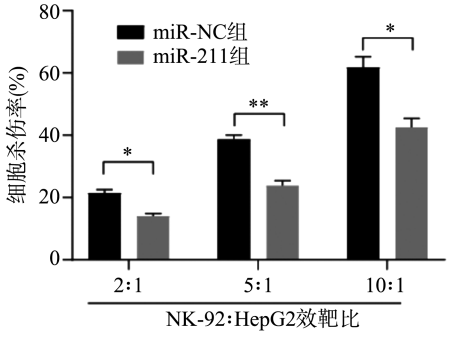
a:qRT-PCR 检测 miR-211 和 PD-L1 mRNA 表达水平;b:Western blot 检测 PD-L1 蛋白表达水平 *:$P<0.05$;***:$P<0.001$

图 2 HL-02、HCCLM3、HepG2 细胞中 PD-L1 和 miR-211 表达水平比较



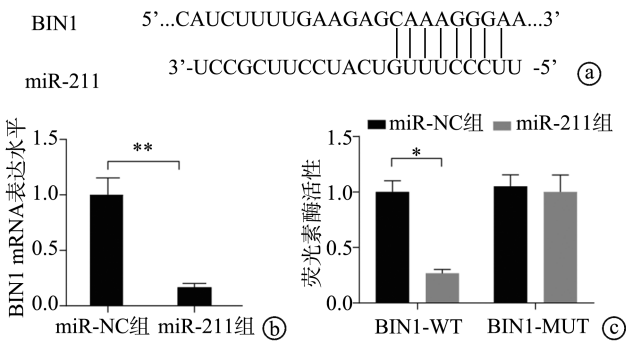
a:qRT-PCR 检测 miR-211 和 PD-L1 mRNA 表达;b:Western blot 检测 PD-L1 蛋白表达 *:$P<0.05$;**:$P<0.01$;***:$P<0.001$

图 3 HepG2 细胞中过表达 miR-211 对 PD-L1 的影响



*:$P<0.05$;**:$P<0.01$

图 4 过表达 miR-211 降低 NK-92 细胞对肝癌细胞的杀伤率

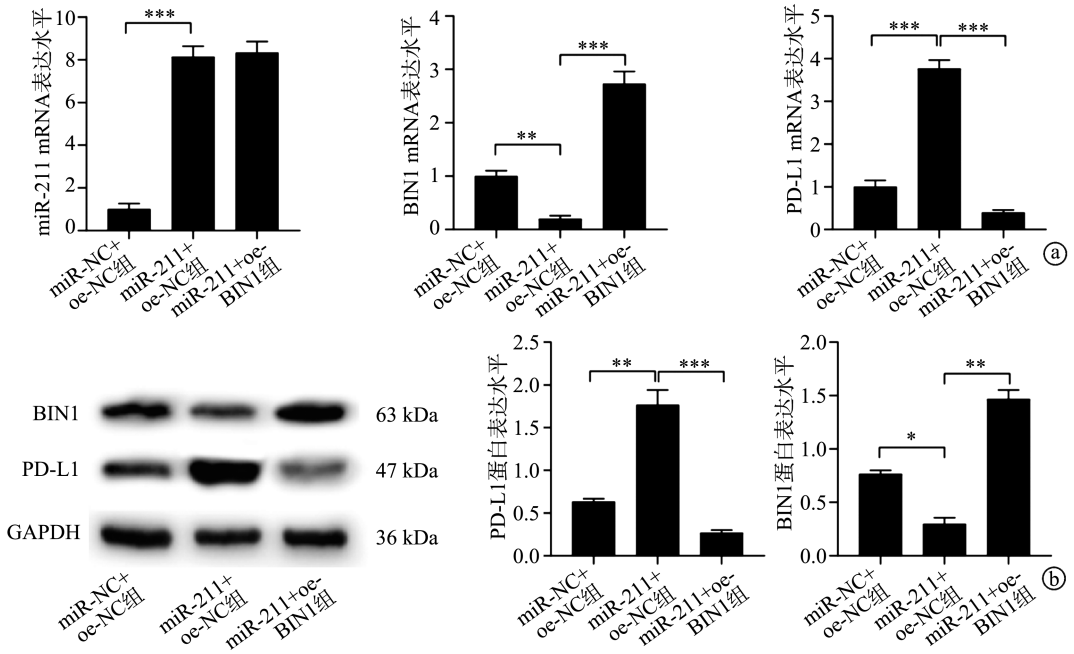


a:miR-211 和 BIN1 的结合位点预测;b:qRT-PCR 检测 BIN1 mRNA 表达水平;c:荧光素酶报告基因实验检测 miR-211 和 BIN1 结合情况 *:$P<0.05$;**:$P<0.01$

图 5 miR-211 靶向抑制 BIN1

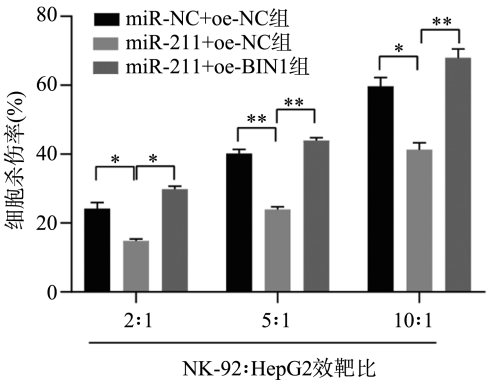
2.7 过表达 BIN1 逆转 NK-92 细胞对肝癌细胞的杀伤率

NK 细胞毒性实验结果显示,与 miR-NC + oe-NC 组比较,miR-211 + oe-NC 组在不同 NK-92∶HepG2效靶比时 NK-92 细胞对肝癌细胞的杀伤率降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 miR-211 + oe-NC 组比较,miR-211 + oe-BIN1 组在不同 NK-92∶HepG2效靶比时 NK-92 细胞对肝癌细胞的杀伤率升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 7。



a:qRT-PCR 检测 miR-211、BIN1、PD-L1 mRNA 表达;b:Western blot 检测 PD-L1、BIN1 蛋白表达 *:$P < 0.05$;**:$P < 0.01$;***:$P < 0.001$

图 6 HepG2 细胞中过表达 miR-211 和 BIN1 对 PD-L1 表达的影响



*:$P < 0.05$;**:$P < 0.01$

图 7 HepG2 细胞中过表达 miR-211 和 BIN1 对 NK 细胞敏感性的影响

3 讨论

近年来,肝癌在世界范围内的发病率呈上升趋势,我国肝癌导致的社会和经济负担在所有肿瘤中排名第一[11]。目前手术切除和肝移植是肝癌的主要治疗方式。随着医疗技术的发展,肝癌患者的生活质量日益提高,但术后复发严重影响患者的预后[12]。

非编码 RNA 是人类基因转录组的主要组成部分,包括 miRNA、小核 RNA、长链非编码 RNA 和环状 RNA[13]。miRNA 是内源性产生的长度为 17 ~ 22 个核苷酸的单链非编码 RNA,可通过识别同源序列和干扰转录、翻译或表观遗传过程来调节基因表达。miRNA 几乎影响了所有的遗传途径,包括细胞周期检查点、细胞增殖及细胞凋亡等过程[14]。有研究表明,miRNA 参与了癌症的发展,miRNA 表达的失调与各种癌症的发生相关[15]。Lu 等[16]对人类正常组织和肿瘤组织中的 217 种 miRNAs 进行分析发现,与正常组织相比,肿瘤组织中的 miRNAs 表达谱发生了显著变化。先前的研究揭示了 miR-211 作为肿瘤抑制因子或肿瘤启动子,在一些癌症的发展中发挥着关键的作用[17]。Ye 等[18]发现,miR-211 在人类非小细胞肺癌细胞系和组织中表达上调,miR-211 的过表达增强了非小细胞肺癌细胞的增殖、侵袭能力。Zhao 等[19]在结直肠癌组织和细胞中检测到 miR-211 表达上调,miR-211 可能通过脂肪酸结合蛋白 4 促进 SW480 细胞的迁移、侵袭和上皮间质转化。有研究表明,miR-211 参与了肝癌的发展[20]。Ura 等[21]测定了肝癌组织中 188 个 miRNAs 的表达发现,miR-211 的表达显著上调。miR-211 在肝

癌组织中表达上调,过表达 miR-211 的肝癌细胞显示出更强的侵袭能力[22]。本研究结果显示,肝癌组织和细胞中 miR-211 的表达水平均显著上调,与以上研究结果基本一致,提示 miR-211 可能参与肝癌的发展。

肿瘤免疫逃逸是指肿瘤细胞通过各种机制躲避免疫系统的识别和攻击,从而使肿瘤得以发展和转移。PD-1 与其配体 PD-L1 结合后,可激活细胞内信号通路,抑制免疫细胞的激活,从而减少免疫细胞分泌抗体和细胞因子,甚至耗尽免疫细胞,从而维持免疫系统稳态,帮助肿瘤实现免疫逃逸[23]。本研究结果显示,肝癌组织和细胞中 PD-L1 的表达水平均显著上调,且与 miR-211 的表达呈正相关;过表达 miR-211 降低了 NK-92细胞对肝癌细胞的杀伤率,说明 miR-211 可能通过促进 PD-L1 的表达帮助肿瘤细胞实现免疫逃逸。

BIN1 是 BAR 蛋白家族的一员,有研究发现在 76% 的原发性肝癌和多个肝癌细胞系中 BIN1 的 mRNA和蛋白表达均显著下调,BIN1 的缺失可能促进肝癌细胞的快速生长[24]。有研究发现,BIN1 通过抑制非小细胞肺癌中的 c-MYC 和 EGFR/MAPK 信号通路来逆转 PD-L1 介导的免疫逃逸,BIN1 和 PD-L1 的异常表达可能是患者预后不良的影响因素[25]。本研究通过 TargetScanHuman ver. 7. 2 在线预测软件预测发现,BIN1 是 miR-211 可能的靶标,通过荧光素酶报告基因系统证实两者能够直接结合;此外,qRT-PCR 和 Western blot 结果显示,过表达 BIN1 可逆转 miR-211 对肝癌细胞 PD-L1 表达的促进作用,并增加 NK-92 细胞对肝癌细胞的杀伤率。以上结果说明,miR-211 通过靶向抑制 BIN1 从而调节 PD-L1 介导的肝癌细胞的免疫逃逸。

综上所述,本研究发现 miR-211 和 PD-L1 在肝癌组织和细胞中高表达,且二者表达呈正相关,miR-211 可能通过 PD-L1 依赖的免疫逃逸机制促进肝癌的发展。此外,我们还发现,miR-211 的促肿瘤作用通过 BIN1 介导,提示 miR-211 与 BIN1 可能是肝癌治疗的新靶点,可为进一步探讨肝癌的免疫疗法提供新的思路,但还需要在动物模型中进一步验证。

[参考文献]

[1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7 – 34. doi: 10. 3322/caac. 21551.

[2] Marengo A, Rosso C, Bugianesi E. Liver cancer: connections with obesity, fatty liver, and cirrhosis[J]. Annu Rev Med, 2016, 67: 103 – 117. doi: 10. 1146/annurev-med-090514-013832.

[3] Chen L, Heikkinen L, Wang C, et al. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools[J]. Brief Bioinform, 2019, 20(5): 1836 – 1852. doi: 10. 1093/bib/bby054.

[4] Hu J, Zhang J, Yu M, et al. Circulating miR-221/222 reduces CD4$^+$ T cells by inhibiting CD4 expression in colorectal cancer[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2021, 53(10): 1367 – 1376. doi: 10. 1093/abbs/gmab106.

[5] Chen C, Tian A, Zhou H, et al. Upregulation of miR-211 promotes chondrosarcoma development via targeting tumor suppressor VHL[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 2935 – 2943. doi: 10. 2147/OTT. S239887.

[6] Kim SK, Cho SW. The evasion mechanisms of cancer immunity and drug intervention in the tumor microenvironment[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 868695. doi: 10. 3389/fphar. 2022. 868695.

[7] Stein A, Simnica D, Schultheiß C, et al. PD-L1 targeting and subclonal immune escape mediated by PD-L1 mutations in metastatic colorectal cancer[J]. J Immunother Cancer, 2021, 9(7): e002844. doi: 10. 1136/jitc – 2021 – 002844.

[8] Yi M, Xu L, Jiao Y, et al. The role of cancer-derived microRNAs in cancer immune escape[J]. Hematol Oncol, 2020, 13(1): 25. doi: 10. 1186/s13045 – 020 – 00848 – 8.

[9] Yao X, Tu Y, Xu Y, et al. Endoplasmic reticulum stress-induced exosomal miR-27a-3p promotes immune escape in breast cancer via regulating PD-L1 expression in macrophages[J]. Cell Mol Med, 2020, 24(17): 9560 – 9573. doi: 10. 1111/jcmm. 15367.

[10] Ahmed EK, Fahmy SA, Effat H, et al. Circulating miR-210 and miR-1246 as potential biomarkers for differentiating hepatocellular carcinoma from metastatic tumors in the liver[J]. Med Biochem, 2019, 38(2): 109 – 117. doi: 10. 2478/jomb – 2018 – 0010.

[11] GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013[J]. Lancet, 2015, 385(9963): 117 – 171. doi: 10. 1016/S0140 – 6736(14)61682 – 2.

[12] Jiang XJ, Wang J, Deng XY, et al. Immunotherapy targeted to immune checkpoint: a revolutionary breakthrough in cancer therapy[J]. Prog Biochem Biophys, 2018, 45(11): 1178 – 1186.

[13] Lu TX, Rothenberg ME. MicroRNA[J]. Allergy Clin Immunol, 2018, 141(4): 1202 – 1207. doi: 10. 1016/j. jaci. 2017. 08. 034.

[14] Li C, Hashimi SM, Good DA, et al. Apoptosis and microRNA aberrations in cancer[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2012, 39(8): 739 – 746. doi: 10. 1111/j. 1440 – 1681. 2012. 05700. x.

[15] He B, Zhao Z, Cai Q, et al. miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in cancer[J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(14): 2628 – 2647. doi: 10. 7150/ijbs. 47203.

[16] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. Nature, 2005, 435(7043): 834 – 838. doi: 10. 1038/nature03702.

[17] Shirvani H, Ghanavi J, Aliabadi A, et al. MiR-211 plays a dual role in cancer development: from tumor suppressor to tumor enhancer[J]. Cell Signal, 2022, 101: 110504. doi: 10. 1016/j. cellsig. 2022. 110504.

[18] Ye L, Wang H, Liu B. miR-211 promotes non-small cell lung cancer proliferation by targeting SRCIN1[J]. Tumour Biol, 2016, 37(1): 1151 – 1157. doi: 10. 1007/s13277 – 015 – 3835 – y.

[19] Zhao D, Ma Y, Li X, et al. microRNA-211 promotes invasion and migration of colorectal cancer cells by targeting FABP4 via PPARγ[J]. Cell Physiol, 2019. doi: 10. 1002/jcp. 28190.

doi:10.11659/jjssx.11E022015

·基础研究·

体外膜肺氧合辅助下急性呼吸衰竭动物模型的远距离转运

李畑波,李仕杰,陈祥舟,张秋霞,刘宸铖,王 咏 (陆军军医大学第二附属医院心血管外科/全军心血管外科研究所,重庆 400037)

[摘 要] **目的** 介绍一种在体外膜肺氧合(ECMO)辅助下远距离转运急性呼吸衰竭(ARF)动物模型的方法。**方法** 选用成年泰国小香猪5头,经麻醉诱导后逐层分离股动静脉,制作ARF模型,随后经股动静脉插管予ECMO辅助呼吸、循环,情况稳定后进行远距离转运。期间记录转运距离、ECMO转流时间、转运过程中的突发情况等关键数据。**结果** 本实验共进行5次,每次均到达计划目的地且能安全返回出发地。制作缺氧模型氧分压35.2~64.5 mmHg,平均(54.7±10.2)mmHg;ECMO辅助后氧分压345~420 mmHg,平均(395.1±45.8)mmHg;ECMO转流时间120~450 min,平均(258.9±67.4)min;转运距离8~70 km,平均(58.5±12.7)km。在5次转运过程中出现了3次突发情况,1次为管道打折、1次为不明原因流量下降、1次为置管处出现渗血。**结论** 建立ARF模型后在ECMO辅助下进行远距离转运的方法简单实用,可为ECMO辅助下院间转运、战创伤的后方转运等远距离转运提供参考。

[关键词] 体外膜肺氧合;远距离转运;急性呼吸衰竭;动物模型

[中图分类号] R654.2;R608 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-11-03

Long-distance transport of acute respiratory failure animal model assisted by extracorporeal membrane oxygenation

LI Tian-bo, LI Shi-jie, CHEN Xiang-zhou, ZHANG Qiu-xia, LIU Chen-cheng, WANG Yong (Center of Cardiovascular Surgery, Second Hospital of Army Medical University/Cardiovascular Surgery Institute of PLA, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To introduce a method of long-distance transport of acute respiratory failure (ARF) animal model assisted by extracorporeal membrane oxygenation (ECMO). **Methods** A total of 5 adult Thai baby pigs were selected. After anesthesia induction, the femoral arteries and veins were separated layer by layer to establish the ARF models. Then, ECMO was administered to assist respiration and circulation through femoral arteriovenous intubation and a long-distance transport was carried out when the condition was stable. And key data such as transport distance, ECMO bypass time, and emergencies during transport were recorded. **Results** The experiment was carried out 5 times, and each time the planned destination was reached and the starting point was returned safely. The partial pressure of oxygen in the hypoxic model was 35.2 to 64.5 mmHg, with an average of (54.7±10.2) mmHg, and the partial pressure of oxygen after ECMO assisted was 345 to 420 mmHg, with an average of (395.1±45.8) mmHg; the ECMO bypass time was 120 to 450 minutes, with an average of (258.9±67.4) minutes; the transport distance was 8 to 70 km, with an average of (58.5±12.7) km. During the 5 transports, 3 emergencies occurred,

[基金项目] 陆军军医大学临床技术创新培育项目(CX2019JS216)

[通信作者] 王 咏,E-mail:wy003236@163.com

[20] Qin X, Zhang J, Lin Y, et al. Identification of miR-211-5p as a tumor suppressor by targeting ACSL4 in hepatocellular carcinoma[J]. J Transl Med, 2020, 18(1): 326. doi: 10.1186/s12967-020-02494-7.

[21] Ura S, Honda M, Yamashita T, et al. Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2009, 49(4): 1098-1112. doi: 10.1002/hep.22749.

[22] 颜 艳,王 琴,李 巍,等. 微小RNA-211靶定雌激素受体α促进肝癌细胞侵袭的研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2015, 23(7): 527-532. doi: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2015.07.012.

[23] Dermani FK, Samadi P, Rahmani G, et al. PD-1/PD-L1 immune checkpoint: potential target for cancer therapy[J]. Cell Physiol, 2019, 234(2): 1313-1325. doi: 10.1002/jcp.27172.

[24] Pan K, Liang XT, Zhang HK, et al. Characterization of bridging integrator 1 (BIN1) as a potential tumor suppressor and prognostic marker in hepatocellular carcinoma[J]. Mol Med, 2012, 18(1): 507-518. doi: 10.2119/molmed.2011.00319.

[25] Wang J, Jia Y, Zhao S, et al. BIN1 reverses PD-L1-mediated immune escape by inactivating the c-MYC and EGFR/MAPK signaling pathways in non-small cell lung cancer[J]. Oncogene, 2017, 36(45): 6235-6243. doi: 10.1038/onc.2017.217.

(编辑:龙小芬)