

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.12.005

miR-4465通过靶向下调HMGA1的表达抑制肝细胞癌Hep3B细胞的恶性生物学行为

张博超^{1,2}, 马思源¹, 朱萍¹, 赵晓晓¹, 王成¹, 刘静文¹, 蒋平¹, 浦春¹ (1. 皖南医学院第一附属医院 检验科, 安徽芜湖 241002; 2. 安徽省濉溪县医院 检验科, 安徽 淮北 235100)

[摘要] **目的:** 探讨 miR-4465 靶向高迁移率族蛋白 A1 (HMGA1) 对肝细胞癌 Hep3B 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。**方法:** 收集 2020 年 5 月至 2021 年 9 月在皖南医学院第一附属医院确诊为肝细胞癌患者的 16 对癌组织和癌旁组织样本, 采用 qPCR 分析 miR-4465 在肝细胞癌组织和 Hep3B、Huh7 细胞中的表达情况, 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-4465 与 HMGA1 的调控关系。按转染物的不同将 Hep3B 细胞分为 mimics-NC 组、miR-4465-mimics 组、inhibitor-NC 组、miR-4465 inhibitor 组、si-NC 组、si-HMGA1 组; 另外分组转染 mimics-NC+pcDNA-NC、miR-4465 mimics+pcDNA-NC 和 miR-4465 mimics+pcDNA-HMGA1 进行回复实验。采用 qPCR 和 WB 法检测各组细胞中 HMGA1 mRNA 和蛋白水平的变化, CCK-8 法检测各组细胞增殖能力的变化, 划痕实验检测各组细胞迁移能力的变化, Transwell 实验检测各组细胞侵袭能力的变化。**结果:** miR-4465 在肝细胞癌组织和细胞中的表达水平显著低于癌旁组织和正常肝细胞 ($P<0.05$ 或 $P<0.001$)。转染 48 h 后, 过表达 miR-4465 的 Hep3B 细胞增殖、迁移和侵袭能力均显著下降 ($P<0.05$ 、 $P<0.01$ 或 $P<0.001$); 敲低 miR-4465 后细胞的增殖、迁移和侵袭能力均明显升高 ($P<0.05$ 、 $P<0.01$ 或 $P<0.001$)。双荧光素酶报告实验验证了 HMGA1-3'UTR 与 miR-4465 的靶向结合关系, miR-4465 可以靶向下调 HMGA1 mRNA 和蛋白质的表达 (均 $P<0.01$)。过表达 HMGA1 能部分逆转过表达 miR-4465 对细胞增殖、迁移、侵袭的抑制作用及 HMGA1 表达的抑制作用 (均 $P<0.05$)。**结论:** miR-4465 通过靶向下调 HMGA1 在肝细胞癌 Hep3B 细胞中的表达, 从而抑制 Hep3B 细胞的恶性生物学行为。

[关键词] miR-4465; 高迁移率族蛋白 A1; 肝细胞癌; Hep3B 细胞; 增殖; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R735.7; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)12-1066-08

miR-4465 inhibits the malignant biological behaviors of hepatocellular carcinoma Hep3B cells by targeting and downregulating the expression of HMGA1

ZHANG Bochao^{1,2}, MA Siyuan¹, ZHU Ping¹, ZHAO Xiaoxiao¹, WANG Cheng¹, LIU Jingwen¹, JIANG Ping¹, PU Chun¹ (1. Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, Anhui, China; 2. Clinical Laboratory, Anhui Province Suixi County Hospital, Huaibei 235100, Anhui, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of miR-4465 targeting high mobility group protein A1 (HMGA1) on the proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma Hep3B cells. **Methods:** Sixteen pairs of cancer tissues and adjacent tissue samples from patients diagnosed with hepatocellular carcinoma in the First Affiliated Hospital of Wannan Medical College from May 2020 to September 2021 were collected. The expression of miR-4465 in hepatocellular carcinoma tissues and Hep3B and Huh7 cells was analyzed by qPCR, and the regulatory relationship between miR-4465 and HMGA1 was verified by dual luciferase reporter gene assay. According to the different transfections, Hep3B cells were group, si-NC group, and si-HMGA1 group for transfection; in addition, mimics-NC+pcDNA-NC, miR-4465 mimics+pcDNA-NC, and miR-4465 mimics+pcDNA-HMGA1 were transfected for rescue experiments. The changes of mRNA and protein levels of HMGA1 in each group were detected by qPCR and WB assay; the changes in cell proliferation activity in each group were detected by CCK-8 method; the changes in cell migration ability in each group were detected by scratch assay, and the changes in cell invasion ability in each group were detected by Transwell assay. **Results:** The expression of miR-4465 in hepatocellular carcinoma tissues and cells was significantly lower than that in adjacent tissues and normal liver cells ($P<0.05$ or $P<0.001$). After transfection for 48 h, the proliferation, migration and invasion abilities of Hep3B cells

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (No. 81772180); 安徽省教育厅省级自然科学重点项目 (No. KJ2016A722); 安徽省大学生创新训练项目 (No. s202110368042)

[作者简介] 张博超 (1995—), 男, 硕士, 主管检验师, 主要从事肿瘤标志物相关研究。E-mail: 1391489058@qq.com

[通信作者] 浦春, E-mail: philipcpu@163.com

overexpressing miR-4465 were significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$ or $P<0.001$); the proliferation, migration and invasion abilities of Hep3B cells with miR-4465 knockdown were increased ($P<0.05$, $P<0.01$ or $P<0.001$). The binding relationship between HMGA1-3'UTR and miR-4465 was verified by dual luciferase report gene experiment. miR-4465 could target and down-regulate the mRNA and protein expression of HMGA1 (all $P<0.01$). Over-expression of HMGA1 partially restored the inhibitory effects of miR-4465 overexpression on cell proliferation, migration and invasion as well as HMGA1 expression (all $P<0.05$). **Conclusion:** miR-4465 inhibits the malignant biological behaviors of hepatocellular carcinoma Hep3B cells by down-regulating the expression of HMGA1 in the cells.

[Key words] miR-4465; high mobility group protein A1 (HMGA1); hepatocellular carcinoma; Hep3B cell; proliferation; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(12):1066-1073. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.12.005]

2020年统计资料表明,原发性肝癌是全球第六大肿瘤,每年约有90.6万例新发患者和83万例病死患者^[1]。在中国,原发性肝癌的发生率为17.7/10万,病死率为16.4/10万,位居全球第九位^[2]。原发性肝癌可分为肝细胞癌和胆管性肝癌,其中肝细胞癌占肝癌的绝大多数。肝细胞癌患者的低生存率是由于早期无症状而未被发现,中晚期诊断后失去最佳治疗期^[3]。miR-4465是一种微小非编码RNA,长度为70 bp,位于6号染色体,被发现在小细胞肺癌、鼻咽癌中表达下调^[4-5],而其在肝癌中的作用少见报道。高迁移率族蛋白A1 (high mobility group protein A1, HMGA1)是一种与染色质结合的蛋白质,定位于细胞核中,可以通过与双链DNA中富含A和T的小沟结合来改变DNA的构象,并与转录因子相互作用以调节转录^[6]。HMGA1在包括肝细胞癌在内的大多数恶性肿瘤中过度表达^[7-9]。ANDREOZZI等^[7]研究发现, HMGA1的mRNA和蛋白表达水平在正常肝到肝硬化再到肝细胞癌的进展阶段中逐步增加,且与不良预后相关。本研究将miR-4465作为研究对象,探究miR-4465对肝细胞癌Hep3B细胞增殖、迁移和侵袭的影响,并初步探索其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料和设备

人肝细胞癌细胞Hep3B和Huh7购自武汉普诺赛生物科技有限公司,人正常肝细胞THLE-2由万物生物公司提供,均用含10%胎牛血清(PBS)的DMEM培养基、置于37℃, 5%CO₂的培养箱中常规培养。FBS购自Gibco公司, Hyclone DMEM高糖培养基购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司, TRIzol试剂、12%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶均购自上海碧云天生物技术有限公司, HMGA1、miR-4465引物购自生工生物工程(上海)有限公司, miR-4465 mimics、miR-4465 inhibitor、si-HMGA1、pcDNA-HMGA1、相应的阴性对照及转染试剂riboFECT™ CP均购自广州锐博生物技术有限公司, 反转录所用试剂盒

miRcute Plus miRNA First-Strand cDNA Kit 和 FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix、以及定量PCR试剂盒 miRcute Plus miRNA qPCR Kit 和 SuperReal PreMix Plus均购自天北京天根生化科技有限公司, 羊抗兔IgG购自上海碧云天生物技术有限公司, 兔抗人单克隆抗体HMGA1购自Abcam公司、兔抗人单克隆抗体β-actin购自Cell Signaling Technology公司, ECL成像系统购自伯乐生命医学产品(上海)有限公司, 反转录PCR仪购自Eppendorf公司, 定量PCR仪购自罗氏公司。

1.2 临床标本收集

收集2020年5月至2021年9月间在皖南医学院第一附属医院(弋矶山医院)确诊为肝细胞癌的组织样本16对(癌组织和癌旁组织), 其中男性14例、女性2例; 年龄48~74岁, 中位年龄66岁; 高分化2例、中分化10例、低分化4例; 癌转移2例、未转移14例。所有患者术前均未接受化疗、放疗或其他抗癌治疗。所有肝癌样本均经过活体组织病理检查并证实为肝细胞癌。研究方案经所在医院医学伦理委员会审查批准(2020伦审研第21号), 所有纳入研究的患者均已签署知情同意书。

1.3 细胞分组和转染

取生长状态良好的Hep3B细胞以 2×10^5 个/孔接种于6孔板, 24 h后, 按转染物的不同将Hep3B细胞分为mimics-NC组、miR-4465-mimics组、inhibitor-NC组、miR-4465 inhibitor组、si-NC组、si-HMGA1组; 另外, 分组转染mimics-NC+pcDNA-NC、miR-4465 mimics+pcDNA-NC和miR-4465 mimics+pcDNA-HMGA1进行回复实验。按照试剂说明书使用riboFECT™ CP将miR-4465 mimics、miR-4465 inhibitor、si-HMGA1、pcDNA-HMGA1及相应的阴性对照转染细胞, 同时设置空白对照组。各组均设3个复孔。

1.4 qPCR法检测肝细胞癌组织和细胞中miR-4465和HMGA1 mRNA的表达

采用TRIzol试剂分别提取50 mg冷冻组织或各组细胞的总RNA, 用分光光度法确定提取的总RNA

纯度。使用 miRcute Plus miRNA First-Strand cDNA Kit 和 FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix 反转录试剂盒将总 RNA 反转录为 miR-4465 和 HMGA1 的 cDNA, 然后利用 miRcute Plus miRNA qPCR Kit 和 SuperReal PreMix Plus 进行 miR-4465 和 HMGA1 的 qPCR 检测。miR-4465 的 qPCR 循环: 95 °C 15 min; 94 °C 20 s、60 °C 34 s, 共 45 个循环; 95 °C 解离 10 s, 60 °C 60 s、95 °C 15 s。HMGA1 的 qPCR 循环: 95 °C 15 min; 95 °C 10 s、60 °C 20 s, 共 45 个循环; 95 °C 解离 10 s, 60 °C 60 s、95 °C 15 s。将 GAPDH 作为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 HMGA1 mRNA 的相对表达水平。将 U6 作为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-4465 的相对表达水平。每种样品设置 3 个复管。引物序列见表 1。

表 1 qPCR 引物序列

基因名称	序列(5'-3')
miR-4465	正向引物: GCGCCTCAAGTAGTCTGACCAG 反向引物: 试剂盒生产商提供通用引物
U6	正向引物: CGCTTCGGCACATATAC 反向引物: 试剂盒生产商提供通用引物
HMGA1	正向引物: CGAAGTGCCAACTAAGAGACC 反向引物: GATGCCCTCCTCTCTCCTTCTCT
GAPDH	正向引物: CATCAAGAAGGTGGTGAAGCAG 反向引物: GTGTCGCTGTTGAAGTCAGAG

1.5 WB 法检测转染后各组 Hep3B 细胞中 HMGA1 蛋白的表达

将 990 μ L 的 RIPA 裂解液和 10 μ L 的 PMSF 溶液, 配制成的含 1 mmol/L 的 PMSF 的裂解溶液, 冰上提取各组细胞总蛋白, BCA 试剂盒测定各蛋白样本的浓度。取 40 μ g 蛋白行 SDS-PAGE, 80 V 电泳 40 min, 待蛋白预染条带从浓缩胶移动至分离胶后, 110 V 电泳 90 min, 及时观察条带移动情况; 电泳仪设置 300 mA, 转膜 60 min, TBST 溶液稀释脱脂奶粉混合配制 5% 的牛奶封闭液, 倒入封闭盒中, 取出膜放入封闭盒中, 将有条带面朝下, 室温摇床 1 h。分别用 1:10 000 稀释的兔抗人 HMGA1 单克隆抗体和 1:1 000 稀释的兔抗人 β -actin 单克隆抗体在 4 °C 摇床过夜; 第二天加入 1:1 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 室温轻摇 1 h。将 ECL 显影液中 A 液和 B 液按照 1:1 的比例混合, 避光保存。将膜中剩余水分抽干后, 在膜上滴加显影液, 再放入凝胶成像系统中进行显影分析。以 β -actin 为内参, 采用 ImageJ 软件分析各条带灰度值, 以目的蛋白条带灰度值比内参蛋白条带灰度值作为目的蛋白相对表达水平。

1.6 CCK-8 法检测调控 miR-4465 和 HMGA1 mRNA 表达对 Hep3B 细胞增殖的影响

取生长良好的 Hep3B 细胞进行细胞转染后, 接

种于 96 孔板, 每孔 4×10^3 个细胞(各 3 个复孔), 在 24、48、72、96 h 时, 每孔加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液, 37 °C 处理 2 h, 酶标仪检测 450 nm 处的光密度(D 值), 以 D 值代表细胞增殖活力, 绘制细胞活力曲线。

1.7 划痕实验检测调控 miR-4465 和 HMGA1 mRNA 表达对 Hep3B 细胞迁移的影响

显微镜下察看 6 孔板中 Hep3B 细胞的形态和汇合度, 如果细胞形态良好, 汇合度达到 100% 时, 即可进行划痕实验。2 mL PBS 缓冲液冲洗 2 次, 取 100 μ L 移液器吸头, 在每孔中间垂直划出竖直线, 尽量保证划线宽度相同, 再用 PBS 缓冲液反复清洗至没有漂浮的细胞碎片。每孔加入 2 mL 1% FBS 的完全培养液, 以排除血清对细胞迁移的影响。显微镜下拍摄 0 h 的划痕照片, 将 6 孔板放入细胞培养箱中常规培养 24、48 h 后, 拍摄划痕照片。用 Image J 软件处理划痕照片图像数据。划痕愈合率 = (0 h 划痕距离 - 24 h/48 h 划痕距离) / 0 h 划痕距离 $\times 100\%$ 。每组设置 3 个复孔。

1.8 Transwell 实验检测调控 miR-4465 和 HMGA1 mRNA 表达对 Hep3B 细胞侵袭的影响

Matrigel 基质胶置 4 °C 过夜至融化, 将基质胶: DMEM 按照 1:8 混合稀释, 在上室底部加入 100 μ L Matrigel 基质胶稀释液处理 2 h 后晾干。将细胞密度调整为 1×10^5 个/mL, 在上室中加入 200 μ L 无 FBS 的细胞悬液, 保证每个上室中细胞总数为 2×10^4 个。下室加入 500 μ L 温热的含 20% FBS 的细胞培养液, 在细胞培养箱中放置 24 h。吸出上室液体, 用预冷的 PBS 缓冲液清洗 3 遍, 500 μ L 4% 多聚甲醛加入到下室新孔, 放入上室, 室温固定 30 min 后风干; 取 500 μ L 结晶紫加入到下室新孔中, 放入上室, 20 min 后用棉签小心擦去上室细胞, PBS 清洗 3 次, 用显微镜对小室底部细胞进行观察, 拍照, 计数。每组设置 3 个复孔。

1.9 双荧光素酶报告基因实验检测 miR-4465 和 HMGA1 mRNA 之间的靶向关系

转染前一晚将 Hep3B 细胞以 1×10^5 个/孔接种于 24 孔板, 确保转染时细胞汇合度达到 70%~80%, 利用 lipofectamine 试剂将 HMGA1-WT 质粒和 HMGA1-MUT 质粒与 miR-4465 mimics 或 mimics-NC 共转染至细胞中, 48 h 后检测荧光素酶活性强度。每组检测设置 3 个复孔。

1.10 统计学处理

所有实验独立重复 3 次。采用 SPSS17.0、GraphPad Prism8.0 统计学软件对数据进行统计分析和图片绘制。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

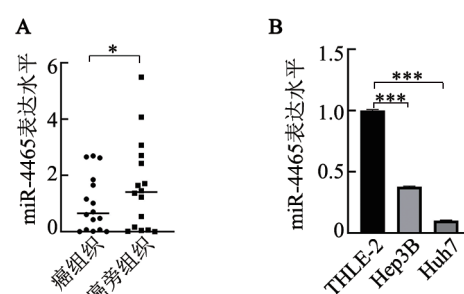
2.1 miR-4465在肝细胞癌组织和细胞中呈低表达

qPCR检测结果显示,miR-4465在肝细胞癌组织中的表达水平显著低于癌旁组织($P<0.05$,图1A);miR-4465在肝细胞癌Hep3B、Huh7细胞中的表达水平均显著低于正常肝Huh7细胞(均 $P<0.001$,图1B)。

2.2 过表达或敲减miR-4465可明显抑制或促进Hep3B细胞的增殖、迁移和侵袭能力

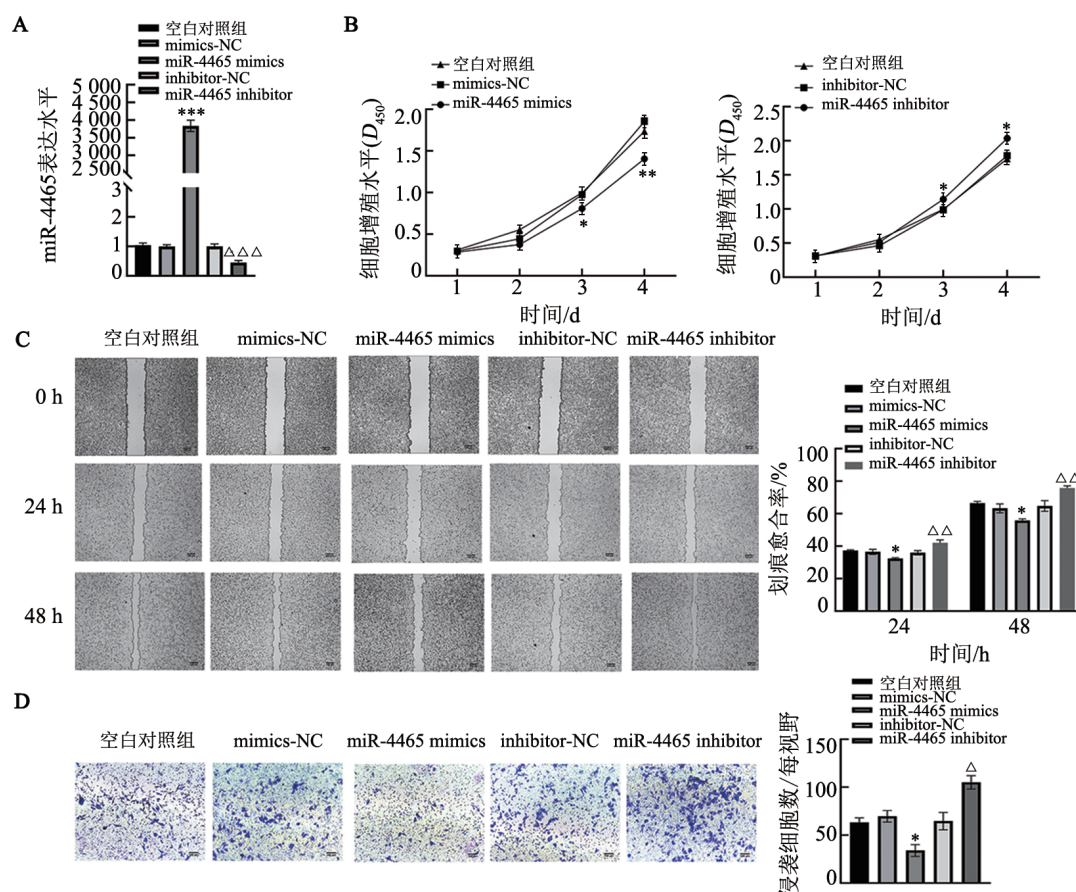
qPCR检测结果(图2A)显示,与空白对照组和mimics-NC组相比,miR-4465 mimics组Hep3B细胞中miR-4465的表达水平均显著升高(均 $P<0.001$);与inhibitor-NC组相比,miR-4465 inhibitor组细胞中miR-4465的表达水平均显著降低(均 $P<0.001$)。实验结果说明,在Hep3B细胞中成功过表达或敲减了miR-4465的表达。CCK-8实验检测结果(图2B)显示,与空白对照组和mimics-NC组相比,miR-4465 mimics组Hep3B细胞增殖水平明显降低($P<0.01$);与inhibitor-NC组相比,miR-4465 inhibitor组细胞增殖水平提升($P<0.05$)。实验结果说明,过表

达或敲减miR4465可抑制或促进Hep3B细胞的增殖能力。划痕实验和侵袭实验结果(图2C、D)显示,与空白对照组和mimics-NC组相比,miR-4465 mimics组细胞中迁移能力和侵袭能力显著降低(均 $P<0.05$);与inhibitor-NC组相比,miR-4465 inhibitor组细胞中迁移能力和侵袭能力明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。实验结果说明,过表达或敲减miR-4465可抑制或促进Hep3B细胞的迁移和侵袭能力。



A:miR-4465在肝细胞癌组织中的表达水平;B:miR-4465在肝细胞癌细胞中的表达水平。* $P<0.05$,*** $P<0.001$ 。

图1 miR-4465在肝癌组织和细胞中呈低表达



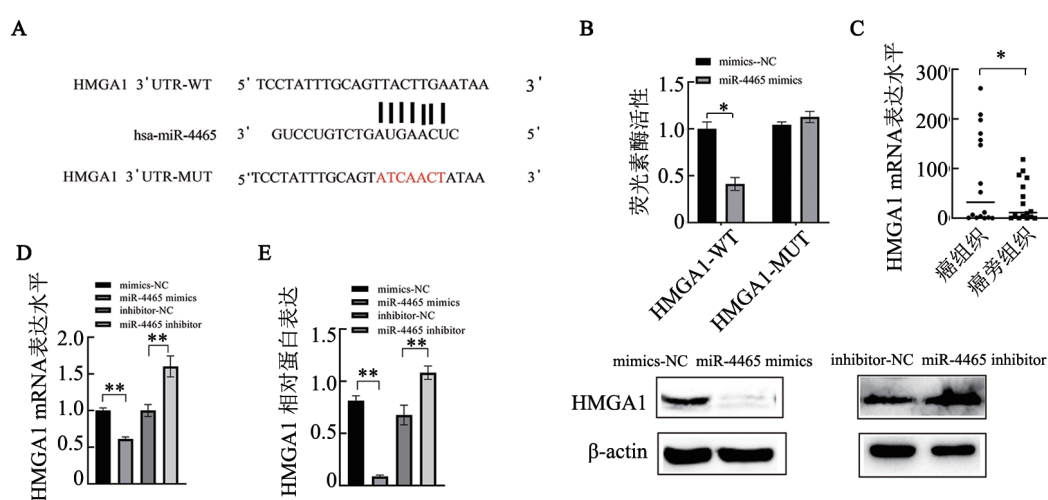
A:qPCR法检测Hep3B细胞中miR-4465的表达水平;B:CCK-8法检测Hep3B细胞的增殖水平;C:划痕实验检测Hep3B细胞的迁移能力($\times 100$);D:Transwell实验检测Hep3B细胞的侵袭能力($\times 200$)。与空白对照组或mimics-NC组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与inhibitor-NC组相比, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$, $\Delta\Delta\Delta P<0.001$ 。

图2 过表达或敲降miR-4465对Hep3B细胞的增殖、迁移和侵袭能力的影响

2.3 miR-4465 与 HMGA1 可直接结合调控 Hep3B 细胞中 HMGA1 的表达

通过 ENCORI 数据库预测发现, HMGA1 与 miR-4465 存在互补结合位点(见图 3A)。双荧光素酶报告基因实验检测结果(图 3B)显示,在转染克隆有 HMGA1 野生型基因质粒的实验中,与 mimics-NC 组相比较,miR-4465 mimics 组 HMGA1-WT 荧光素酶活性明显降低($P<0.05$);在转染克隆有 HMGA1 突变型基因质粒的实验中,与 mimics-NC 组相比较,miR-4465 mimics 组 HMGA1-MUT 荧光素酶活性无明显变化($P>0.05$)。实验结果表明, HMGA1

基因与 miR-4465 存在相互作用关系。qPCR 检测了 HMGA1 在组织中的表达水平,结果(图 3C)显示,肝癌组织中 HMGA1 表达水平高于癌旁组织($P<0.05$)。qPCR 和 WB 实验检测结果(图 3D、E)显示,与 mimics-NC 组相比,miR-4465 mimics 组细胞的 HMGA1 的 mRNA 和蛋白水平下降;与 inhibitor-NC 组相比,miR-4465 inhibitor 组细胞的 HMGA1 mRNA 和蛋白水平升高(均 $P<0.01$)。实验结果说明,过表达或敲减 miR-4465 可降低或上调 Hep3B 细胞中 HMGA1 的表达。



A: ENCORI 数据库预测 HMGA1 与 miR-4465 存在互补结合位点; B: miR-4465 mimics、mimics-NC 分别与 HMGA1 野生型质粒和突变型质粒共转染后, 各组细胞的荧光素酶活性; C: qPCR 法检测 HMGA1 mRNA 在肝细胞癌组织中的表达情况; D: qPCR 法检测转染后各组细胞内 HMGA1 mRNA 的表达水平; E: WB 法检测转染后各组细胞内 HMGA1 蛋白的表达水平。

与癌旁组织或 mimics-NC 或 inhibitor-NC 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图3 HMGA1 基因与 miR-4465 存在相互作用关系

2.4 敲降 HMGA1 能抑制 Hep3B 细胞的增殖、迁移和侵袭

qPCR 检测结果(图 4A、B)显示,与 si-NC 组相比,si-HMGA1 组细胞中 HMGA1 的 mRNA 和蛋白质表达水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.001$)。CCK-8 法检测结果(图 4C)显示,与 si-NC 组相比,si-HMGA1 组 Hep3B 细胞的增殖能力明显降低($P<0.05$)。划痕实验和侵袭实验检测结果(图 4D、E)显示,与 si-NC 组相比,si-HMGA1 组 Hep3B 细胞的迁移能力和侵袭能力均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。实验结果说明,敲降 HMGA1 能明显抑制 Hep3B 细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

2.5 miR-4465 通过靶向下调 HMGA1 的表达抑制 Hep3B 细胞的增殖、迁移和侵袭

qPCR 和 WB 法检测 Hep3B 细胞中 HMGA1 的表达,结果(图 5A、B)显示,与对照组相比,单独过表达 miR-4465 后细胞中 HMGA1 水平明显降低

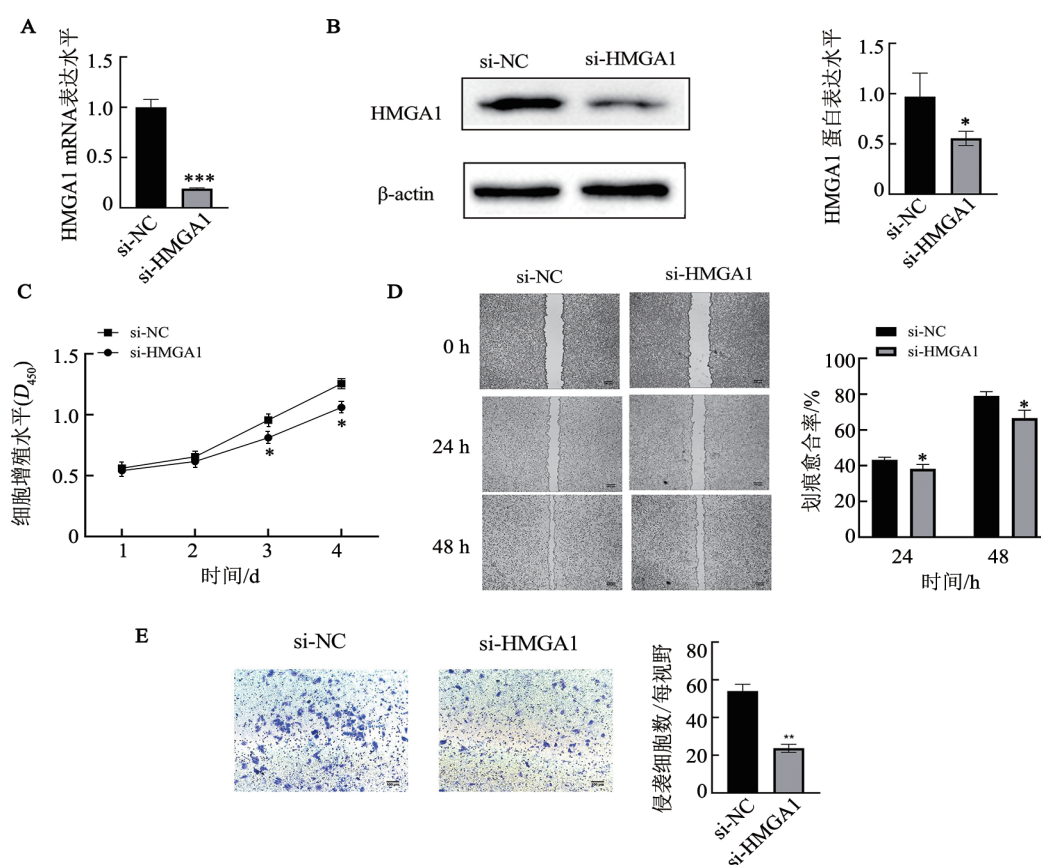
($P<0.01$);与单独过表达 miR-4465 相比,同时过表达 HMGA1 和 miR-4465 后细胞的 HMGA1 水平明显升高($P<0.01$)。CCK-8 实验、划痕实验和 Transwell 实验验证转染后肝癌细胞的增殖和侵袭能力的变化,结果(图 5C、E)显示,与对照组相比,单独过表达 miR-4465 后细胞的增殖、迁移和侵袭能力明显降低(均 $P<0.05$);与单独过表达 miR-4465 相比,同时过表达 HMGA1 和 miR-4465 后细胞的增殖、迁移和侵袭能力明显升高(均 $P<0.05$)。实验结果说明,miR-4465 通过靶向下调 HMGA1 的表达抑制 Hep3B 细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

3 讨论

miRNA 在血液、唾液及血浆中均存在,这表明循环 miRNA 可以作为各种癌症的诊断指标^[10-11]。相比正常组织和细胞,miRNA 在肝细胞癌组织和细胞中的差异表达,使 miRNA 成为潜在的肝

细胞癌标志物^[12-13]。miRNA能够通过调节基因的表达来维持细胞增殖功能、促进免疫逃逸、防止细胞坏死以及诱导癌细胞侵袭和转移,从而干扰肝细胞癌细胞的恶性生物学行为^[14-17],这可能为探索肝细胞癌治疗靶点提供新思路。miR-4465是miR-26家族的成员之一,研究^[4]发现其在非小细胞癌中通过靶向Zeste增强子同源物2(enhancer of zeste homolog 2, EZH2)发挥抑癌作用。本研究探讨了miR-4465是否参与肝细胞癌的发生发展,首先验证了miR-4465在正常细胞THLE-2和肝细胞癌细胞中的表达差异,发现miR-4465在肝细胞癌细胞中表达下调,并在组织样

本中得到进一步验证。此外,过表达miRNA-4465后,Hep3B细胞的增殖、迁移和侵袭能力受到了抑制;而抑制miR-4465的表达后,Hep3B细胞的增殖、迁移和侵袭能力明显增强。为进一步研究miR-4465在肝细胞癌中的作用机制,通过生物信息学软件分析获知HMGA1可能是miR-4465的下游靶点,并通过双荧光素酶报告实验进一步证实。qPCR和WB法检测结果显示,过表达miR-4465后HMGA1表达下调,抑制miR-4465后HMGA1表达上调,这说明miR-4465可以调控肝细胞癌细胞中HMGA1的表达,进而发挥抑癌作用。



A: qPCR法检测Hep3B细胞中HMGA1的mRNA表达水平; B: WB法检测Hep3B细胞中HMGA1蛋白表达水平; C: CCK-8法检测Hep3B细胞的增殖能力; D: 划痕实验检测Hep3B细胞的迁移能力($\times 100$); E: Transwell实验检测Hep3B细胞的侵袭能力($\times 200$)。

与si-NC组相比,* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

图4 敲降HMGA1表达对Hep3B细胞的增殖、迁移和侵袭的影响

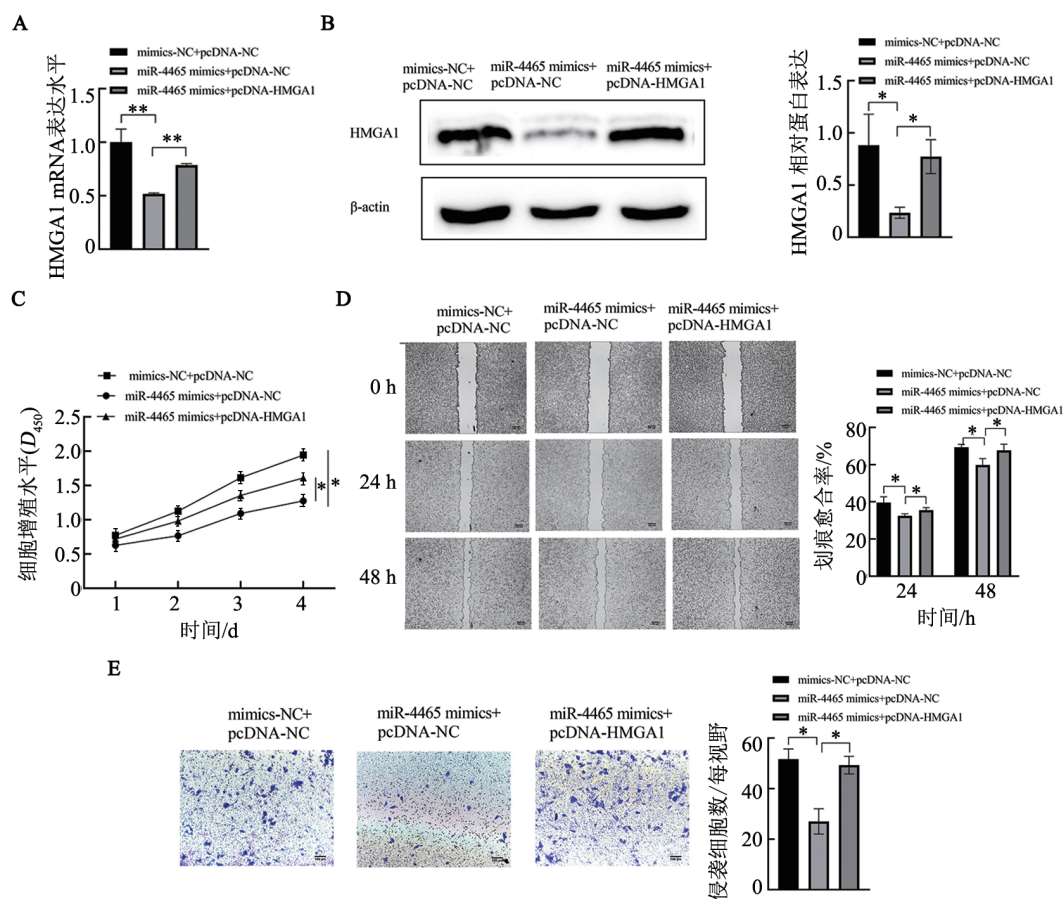
HMGA1是具有高迁移率的小核蛋白,位于染色体6p21,由3个家族成员组成:HMGA1a、HMGA1b和HMGA1c^[18]。HMGA1缺乏内在的转录活性,但可以重塑染色体结构,作为“结构转录因子”调控蛋白与DNA之间的相互作用。HMGA1优先与富含AT序列的DNA结合并将DNA募集到结合位点,进而发挥调控作用。HMGA1在正常组织中表达很低,而在恶性肿瘤中高表达并与不良预后相关,如乳腺

癌^[19]、结直肠癌^[20]、肺癌^[21]等,作为重要的癌基因在肿瘤发生、发展中发挥重要作用。在肝癌中,研究^[22]发现HMGA1通过激活NF- κ B-CCL2信号促进巨噬细胞募集,诱导了肝癌的侵袭性。本研究结果显示,HMGA1在肝细胞癌组织中呈高表达,且其表达受到Hep3B细胞中miR-4465的负向调控。抑制HMGA1的表达后,Hep3B细胞的增殖、迁移和侵袭能力明显降低。回复实验结果也表明,

过表达 HMGA1 部分恢复过表达 miR-4465 对细胞增殖、迁移、侵袭的抑制作用及 HMGA1 的表达抑制作用。

综上所述,本研究初步阐明了 miR-4465 在肝细

胞癌中抑癌作用的机制,miR-4465 可以通过调控 HMGA1 途径抑制肝细胞癌 Hep3B 细胞的恶性生物学行为,具有作为肝癌患者早期诊断和治疗新型标志物的潜力。



A: qPCR 法检测 Hep3B 细胞中 HMGA1 mRNA 的表达水平; B: WB 法检测 Hep3B 细胞中 HMGA1 蛋白表达水平; C: CCK-8 法检测 Hep3B 细胞的增殖能力; D: 划痕实验检测 Hep3B 细胞的迁移能力($\times 100$); E: Transwell 实验检测 Hep3B 细胞的侵袭能力($\times 200$)。

与 mimics-NC+pcDNA-NC 或 miR-4465+pcDNA-NC 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图5 同时转染 miR-4465 mimics 和 pcDNA-HMGA1 可逆转单独过表达 miR-4465 对 Hep3B 细胞增殖、迁移、侵袭能力的抑制作用

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, *et al.* Cancer statistics, 2022[J]. CA A Cancer J Clinicians, 2022, 72(1): 7-33. DOI: 10.3322/caac.21708.
- [2] XIA C F, DONG X S, LI H, *et al.* Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants[J]. Chin Med J, 2022, 135(5): 584-590. DOI: 10.1097/cm9.0000000000002108.
- [3] GE X Y, YAO Y, LI J, *et al.* Role of lncRNAs in the epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma[J/OL]. Front Oncol, 2021, 11: 690800[2023-07-09]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC8185227/>. DOI: 10.3389/fonc.2021.690800.
- [4] SUN J, TIAN X, LU S Q, *et al.* MicroRNA-4465 suppresses tumor proliferation and metastasis in non-small cell lung cancer by directly targeting the oncogene EZH2[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 96: 1358-1362. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.11.070.
- [5] LI Q G, XIAO T, ZHU W, *et al.* HDAC7 promotes the oncogenicity of nasopharyngeal carcinoma cells by miR-4465-EphA2 signaling axis[J/OL]. Cell Death Dis, 2020, 11(5): 322[2023-07-09]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32376822/>. DOI: 10.1038/s41419-020-2521-1.
- [6] WANG L, ZHANG J, XIA M, *et al.* High mobility group A1 (HMGA1): structure, biological function, and therapeutic potential[J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(11): 4414-4431. DOI: 10.7150/ijbs.72952.
- [7] ANDREOZZI M, QUINTAVALLE C, BENZ D, *et al.* HMGA1 expression in human hepatocellular carcinoma correlates with poor prognosis and promotes tumor growth and migration in *in vitro* models[J]. Neoplasia, 2016, 18(12): 724-731. DOI: 10.1016/j.neo.2016.10.002.
- [8] ZANIN R, PEGORARO S, ROS G, *et al.* HMGA1 promotes breast cancer angiogenesis supporting the stability, nuclear localization and transcriptional activity of FOXM1[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 1-23. DOI: 10.1186/s13046-019-1307-8.
- [9] CHANG H P, SUN J T, CHENG C Y, *et al.* High mobility group A 1 expression as a poor prognostic marker associated with tumor invasiveness in gastric cancer[J/OL]. Life, 2022, 12(5): 709[2023-07-

- 09]. <https://doi.org/10.3390/life12050709>. DOI: 10.3390/life12050709.
- [10] ZAPOROZHCHENKO I A, MOROZKIN E S, PONOMARYOVA A A, *et al.* Profiling of 179 miRNA expression in blood plasma of lung cancer patients and cancer-free individuals[J/OL]. *Sci Rep*, 2018, 8: 6348[2023-07-09]. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24769-2>. DOI: 10.1038/s41598-018-24769-2.
- [11] SU F, GAO Z Y, LIU Y Y, *et al.* Integrated tissue and blood miRNA expression profiles identify novel biomarkers for accurate non-invasive diagnosis of breast cancer: preliminary results and future clinical implications[J/OL]. *Genes*, 2022, 13(11): 1931[2023-07-09]. <https://doi.org/10.3390/genes13111931>. DOI: 10.3390/genes13111931.
- [12] YAN C H, SHI X D, WANG Q S, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of microRNA involved in small cell lung cancer *via* deep sequencing[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(5): 2633-2642. DOI: 10.3892/mmr.2014.2535.
- [13] HÜCKER S M, FEHLMANN T, WERNO C, *et al.* Single-cell microRNA sequencing method comparison and application to cell lines and circulating lung tumor cells[J/OL]. *Nat Commun*, 2021, 12: 4316[2023-07-09]. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24611-w>. DOI: 10.1038/s41467-021-24611-w.
- [14] SUR S, STEELE R, SHI X, *et al.* miRNA-29b inhibits prostate tumor growth and induces apoptosis by increasing BIM expression[J/OL]. *Cells*, 2019, 8(11): E1455[2023-07-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6912792/>. DOI: 10.3390/cells8111455.
- [15] ZHOU C F, WEI W F, MA J, *et al.* Cancer-secreted exosomal miR-1468-5p promotes tumor immune escape *via* the immunosuppressive reprogramming of lymphatic vessels[J]. *Mol Ther*, 2021, 29(4): 1512-1528. DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.12.034.
- [16] LI J, JIN H R, YU H, *et al.* miRNA-1284 inhibits cell growth and induces apoptosis of lung cancer cells[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(3): 3049-3054. DOI: 10.3892/mmr.2017.6949.
- [17] BARTEL D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. *Cell*, 2009, 136(2): 215-233. DOI: 10.1016/j.cell.2009.01.002.
- [18] VIGNALI R, MARRACCI S. HMGA genes and proteins in development and evolution[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(2): 654[2023-07-09]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31963852/>. DOI: 10.3390/ijms21020654.
- [19] HUANG R X, HUANG D Q, DAI W R, *et al.* Overexpression of HMGA1 correlates with the malignant status and prognosis of breast cancer[J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 404(1): 251-257. DOI: 10.1007/s11010-015-2384-4.
- [20] KETTUNEN E, ANTTILA S, SEPPÄNEN J K, *et al.* Differentially expressed genes in nonsmall cell lung cancer: expression profiling of cancer-related genes in squamous cell lung cancer[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2004, 149(2): 98-106. DOI: 10.1016/S0165-4608(03)00300-5.
- [21] BALCERCZAK M, PASZ-WALCZAK G, BALCERCZAK E, *et al.* HMGI(Y) gene expression in colorectal cancer: comparison with some histological typing, grading, and clinical staging[J]. *Pathol Res Pract*, 2003, 199(10): 641-646. DOI: 10.1078/0344-0338-00475.
- [22] CHEN J M, JI K, GU L Y, *et al.* HMGA1 promotes macrophage recruitment *via* activation of NF- κ B-CCL2 signaling in hepatocellular carcinoma[J/OL]. *J Immunol Res*, 2022, 2022: 4727198[2023-07-09]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC9242763/>. DOI: 10.1155/2022/4727198.

[收稿日期] 2023-08-18

[修回日期] 2023-11-11

[本文编辑] 黄静怡