

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.01.009

· 基础研究 ·

miR-765 靶向 II 型多磷酸肌醇 4-磷酸酶调控肝细胞癌细胞的增殖

谢星^a, 王小农^b, 谢斌辉^b, 何晓^b, 谢元康^b, 曾青山^a(赣南医学院 a. 第一临床医学院; b. 第一附属医院 肝胆外科, 江西 赣州 341000)

[摘要] **目的:** 探讨微小 RNA(miR)-765 对 II 型多磷酸肌醇 4-磷酸酶(inositol polyphosphate 4-phosphatase type II, INPP4B)调控及其对肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)细胞增殖的影响。**方法:** 采用实时定量 PCR 检测 8 例 HCC 组织和癌旁组织以及 8 组 HCC 细胞株中的 miR-765 的表达水平;MTT 法检测过表达 miR-765 对 HCC 细胞增殖的影响;利用分子生物学技术构建 INPP4B 的 3'-UTR 报告基因,分析 miR-765 对 INPP4B 的调控作用,然后采用 Western blotting 法分别检测过表达和沉默 miR-765 对 INPP4B 蛋白表达的影响;应用 Western blotting 法和克隆形成实验探讨特异性抑制 INPP4B 对 HCC 细胞株增殖的影响。**结果:** 在 HCC 癌组织以及 HCC 细胞株中高表达 miR-765($P < 0.05$)。转染 miR-765 促进 HCC 细胞的增殖[(3.78 ± 1.25) vs (2.06 ± 0.47), $P < 0.05$]。miR-765 能够显著下调 INPP4B 的 3'-UTR 报告基因的荧光表达[(0.42 ± 0.01) vs (1.01 ± 0.01), $P < 0.05$],显著上调 INPP4B 蛋白的表达[(0.92 ± 0.04) vs (0.42 ± 0.02), (0.62 ± 0.03), $P < 0.05$]。特异性抑制 INPP4B 后明显促进 HCC 细胞的增殖[(238.0 ± 1.73) vs (66.33 ± 5.04), $P < 0.05$]。**结论:** miR-765 通过调控 INPP4B 的表达来促进 HCC 细胞的增殖。

[关键词] 肝细胞癌;微小 RNA-765;II 型多磷酸肌醇 4-磷酸酶;细胞增殖

[中图分类号] R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)01-0043-05

miR-765 regulates hepatocellular carcinoma cell proliferation through targeting INPP4B

XIE Xing^a, WANG Xiaonong^b, XIE Binhui^b, HE Xiao^b, XIE Yuankang^b, ZENG Qingshan^a(a. the First Clinical Medical College; b. Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital of Gannan Medical University, Ganzhou 341000, Jiangxi, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the regulating effect of miR-765 on inositol polyphosphate 4-phosphatase type II (INPP4B) and its influence on the proliferation of hepatocellular carcinoma cells (HCC). **Methods:** Quantitative Real-time PCR was used to detect the expression of miR-765 in 8 pairs of HCC tissues and adjacent tissues as well as its expression in 8 sets of hepatocellular carcinoma cell lines. Methyl thiazol tetrazolium (MTT) assay was used to detect the influence of miR-765 over-expression on proliferation of HCC cell line. Molecular biology technique was used to construct 3'-UTR reporter gene of INPP4B, and to analyze the regulation effect of miR-765 on INPP4B; Western blotting was used to examine the effect of miR-765 over-expression/silencing on INPP4B protein expression; Colony formation assay together with Western blotting were applied to investigate the specific inhibition of INPP4B on the proliferation of HCC cell lines. **Results:** miR-765 was highly expressed in HCC tissues and HCC cells ($P < 0.05$). miR-765-mimics transfection significantly increased the proliferation capacity of HCC cell line ([3.78 ± 1.25] vs [2.06 ± 0.47], $P < 0.05$). miR-765 could significantly down-regulate the luciferase expression of pGL3-INPP4B-3' UTR reporter gene ([0.42 ± 0.01] vs [1.01 ± 0.01], $P < 0.05$) and also up-regulate the expression of INPP4B ([0.92 ± 0.04] vs [0.42 ± 0.02], [$0.62 \pm$

[基金项目] 江西省科技基金资助项目(No. 20151BBG70085);江西省教育基金资助项目(No. GJJ14681)。Project supported by the Science and Technology Foundation of Jiangxi Province(No. 20151BBG70085), and the Education Foundation of Jiangxi Province(No. GJJ14681)

[作者简介] 谢星(1990 -),男,硕士生,主要从事肝癌的发病机制研究, E-mail:254288592@qq.com

[通信作者] 王小农(WANG Xiaonong, corresponding author),主任医师,硕士生导师,主要从事肝癌及肝门部胆管管的临床研究, E-mail: xiaonongwang@sina.com

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170110.1519.014.html>

0.03], $P < 0.05$). Specific inhibition of INPP4B significantly promoted the proliferation of HCC cells ($[238.0 \pm 1.73]$ vs $[66.33 \pm 5.04]$, $P < 0.05$). **Conclusion:** miR-765 promotes the proliferation of HCC cells by down-regulating INPP4B expression.

[**Key words**] hepatocellular carcinoma; miR-765; inositol polyphosphate 4-phosphatase type II (INPP4B); cell proliferation

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(1): 43-47. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.01.009]

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者的病死率位居肿瘤病死率的第3位^[1]。HCC主要由多种致病因素,如乙型、丙型肝炎病毒感染和黄曲霉毒素污染的食物等所引起^[2-3]。手术切除和肝移植仍是该病目前最佳的治疗方法。但是HCC患者术后预后极差,其5年生存率仅为10%~20%^[4]。因此,寻找新的、有效的治疗方法极为重要。MicroRNAs(miRNA)通过与其特定的靶mRNA分子的3'非编码区(3'-UTR)互补结合,在基因表达转录后水平上扮演了重要的调控角色^[5-6]。近年的研究^[7-8]发现,越来越多的miRNA与肿瘤细胞分化、增殖、凋亡和侵袭密切相关。本研究通过观察miR-765靶向II型多磷酸肌醇4-磷酸酶(inositol polyphosphate 4-phosphatase type II, INPP4B)对HCC细胞增殖的影响,探讨其调控机制,旨在为HCC的诊治提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞系、主要试剂和手术标本

8组HCC细胞系(Hep3B、Huh7、HepG2、HCCC-9810、BEL-7402、QGY-7703、MHCC97L和MHCC97H)以及LO2细胞均购自中科院模式培养物集存库。细胞培养基DMEM、胎牛血清、TRIzol试剂均购自Life公司,逆转录试剂盒、SYBR Green试剂盒购自美国Bio-Rad公司,蛋白印迹所用抗体均购自美国Cell Signaling Technology公司,MTT试剂购自美国Sigma公司,miR-765相关质粒载体以及对照均购自广州锐博生物科技有限公司(PCR引物也由该公司合成),双荧光素酶报告基因载体购自美国Promega公司,转染所用试剂以及INPP4B siRNA均由广州锐博生物科技公司合成和纯化,Lipofectamine 2000试剂购自美国Invitrogen公司。8例手术标本来自于2013年9月至2014年6月在赣南医学院第一附属医院肝胆外科行手术治疗的HCC患者。标本的获得均通过告知患者本人以及家属并签署知情同意书,研究方案征得医院伦理委员会的批准。

1.2 HCC细胞株的培养

8组HCC细胞均用含10%胎牛血清DMEM培

养基,37℃,5%CO₂的饱和湿度细胞培养箱中培养,2d传代1次。选取处于对数生长期的细胞进行后续实验。

1.3 实时定量PCR法检测HCC细胞株和HCC组织miR-765的表达

使用TRIzol法提取8组HCC及其癌旁组织的总RNA。然后进行逆转录得到cDNA,使用实时定量PCR法检测样本中的miR-765的表达水平,以β-actin作为内参。引物序列miR-765上游引物:5'-GUAGCCAAGGAATCCGAAGGA-3',下游引物:5'-GCCAGGAAGGAGGACGAAGGT-3';β-actin上游引物:5'-GTCCACCGCAAATGCTFCTA-3',下游引物:5'-TGCTGTACCTTCACCGTTC-3'。数据分析采用2-CT法。每个样本设3个复孔,实验重复3次。

1.4 MTT法检测转染miR-765对HCC细胞增殖的影响

取对数生长期的HepG2细胞,以 2×10^5 个/孔均匀接种于6孔板中,常规方法将miR-765拟物、miR-765抑制剂和空白对照(NC)分别转染到HepG2细胞中。培养后将不同组的细胞以 3×10^3 个/孔接种到96孔板中,每组细胞设置6个复孔,每组设置3块96孔板,分6个时间点(0、1、2、3、4、5d)检测,在每个时间点向每孔加入10μl的无菌MTT溶液,继续培养4h后,终止培养,弃除孔内培养上清液,对于悬浮细胞需要离心后再吸弃孔内培养上清液。每孔加100μl DMSO,振荡10min,使结晶物充分融解。在酶联免疫检测仪490nm波长处测定各孔光密度(D)值。实验重复3次。

1.5 双荧光素酶报告载体的构建与检测

利用生物信息学软件TargetSan的microRNA靶基因预测软件对miR-765的靶基因进行预测,发现INPP4B有可能是miR-765的作用靶点之一。用PCR法对HepG2细胞的cDNA进行INPP4B的3'-UTR扩增。将INPP4B的3'-UTR插入到荧光素酶报告基因载体制成重组载体,用Lipofectamine 2000将INPP4B基因的荧光素酶载体和miR-765模拟物及其miR-765突变型和miR-765抑制剂、阴性对照(NC)共转染至HepG2细胞中。应用双荧光素酶报

告系统,按照说明书检测转染后各组的细胞荧光素酶报告基因活性,计算相对荧光值。

1.6 Western blotting 检测转染 miR-765 后 INPP4B 蛋白水平

收取转染了 miR-765 模拟物、miR-765 抑制剂以及 miR-765 突变型和 NC 的 HepG2 细胞,利用 Western blotting 检测转染后 INPP4B 蛋白水平。将各组细胞用 RIPA 裂解液裂解,离心取上清后上样进行蛋白印迹实验。经 10% SDS PAGE 胶在 110 V 恒压电泳 2.5 h 后,转移蛋白至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,封闭液(含 5% 脱脂奶粉的 TBST)封闭 1 h。一抗孵育时使用比例为 1:1 000, α -Tubulin 为内参分析目的蛋白表达,4 °C 过夜。然后 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。利用增强型化学发光试剂(ECL)显色后暗室片曝光,实验重复 3 次。

1.7 克隆形成实验和 Western blotting 检测 INPP4B 对 HCC 细胞增殖的影响

取处于生长对数期的 HepG2 细胞利用 Lipofectamine 2000 将 si-INPP4B 和 NC 转染入细胞中,分别进行克隆形成实验和 Western blotting 检测,蛋白提取和蛋白印迹实验的相关步骤参照前文。将转染好的细胞以 0.5×10^3 个/孔接种于 6 孔板中培养,观察细胞克隆出现的时间。实验重复 3 次。

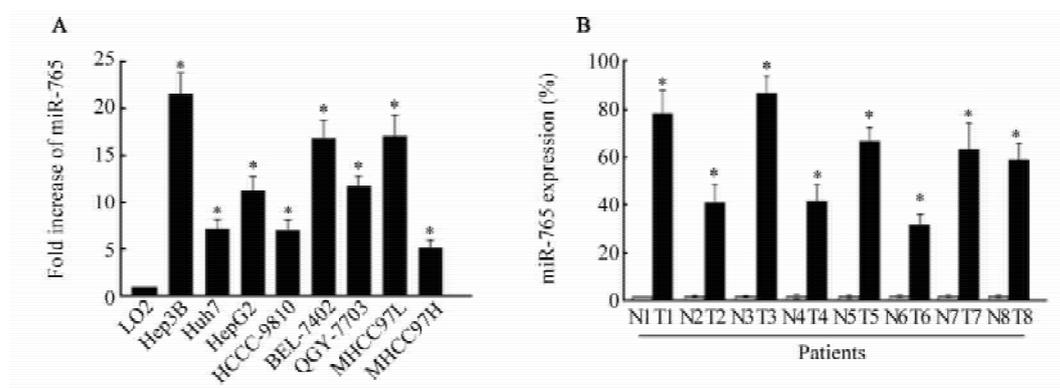
1.8 统计学处理

实验数据采用 SPSS16.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HCC 细胞株和 HCC 组织中 miR-765 高表达

实时定量 PCR 检测结果(图 1)显示,miR-765 在 8 组 HCC 细胞株(图 1A)及 8 例 HCC 组织中表达均明显增高(均 $P < 0.05$)(图 1B)。



A: miR-765 expression in HCC cell lines; B: miR-765 levels in HCC tissues and normal control

* $P < 0.05$ vs LO2 cell group or NC group

图 1 HCC 细胞株和 HCC 组织中 miR-765 的表达

Fig. 1 Expressions of miR-765 in HCC tissues and hepatocellular carcinoma cell lines

2.2 转染 miR-765 促进 HCC 细胞的增殖

以 HepG2 细胞作为研究模型,MTT 法检测转染 miR-765 模拟物、miR-765 抑制剂和 NC 组的细胞增殖结果(图 2)显示,转染 miR-765 可以促进 HepG2 细胞的增殖[(3.78 ± 1.25) vs (2.06 ± 0.47), $P < 0.05$];而转染 miR-765 抑制剂可抑制 HepG2 细胞的增殖[(1.51 ± 0.23) vs (2.54 ± 0.61), $P < 0.05$]。

2.3 INPP4B 是 miR-765 的作用靶点

用 TargetSan 的 microRNA 靶基因预测软件对 miR-765 的靶基因进行预测,发现 INPP4B 极有可能为 miR-765 的作用靶点。通过 pGL3-INPP4B-3'UTR 荧光素酶报告基因进行验证,与 NC 组比较,转染

miR-765 的 INPP4B-3'UTR 荧光素酶活性明显下降[(0.42 ± 0.01) vs (1.01 ± 0.01), $P < 0.05$],转染 miR-765 抑制剂的 INPP4B-3'UTR 荧光素酶活性显著升高[(3.70 ± 0.65) vs (1.01 ± 0.01), $P < 0.05$]。

2.4 miR-765 抑制 INPP4B 的表达

Western blotting 检测转染 miR-765 模拟物、miR-765 抑制剂和 NC 组的 HepG2 细胞的 INPP4B 的表达及其下游信号分子的结果显示,与 miR-765 组和 NC 组比较,miR-765 抑制组的 INPP4B 蛋白表达明显上调[(0.92 ± 0.04) vs (0.42 ± 0.02)、(0.62 ± 0.03),均 $P < 0.05$]。

2.5 抑制 INPP4B 后促进 HCC 细胞的增殖

利用 siRNA 特异性使 INPP4B 表达沉默,通过

Western blotting 法检测转染效率, 利用克隆形成实验证实使 INPP4B 表达沉默后能使 HCC 细胞增殖

能力增强[(238.00 ± 173.01) vs (66.33 ± 5.04), $P < 0.05$]。

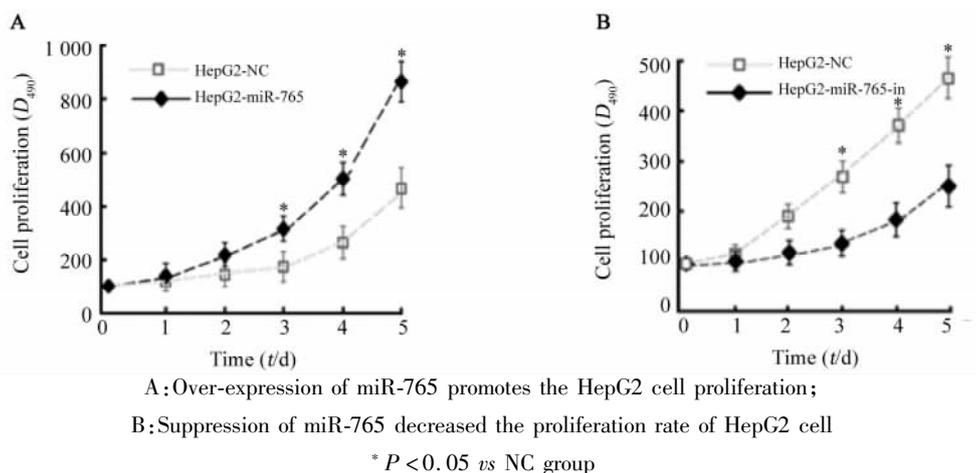


图 2 转染 miR-765 促进 HCC 细胞的增殖

Fig. 2 Transfection with miR-765 promoted HCC cell proliferation

3 讨论

HCC 的发生发展是一个复杂过程。传统的治疗方式如手术切除的或者接受综合治疗的肝癌患者其生存率仍然较低。近年来,以索拉菲尼、西妥昔单抗等为代表的新型分子靶向药物在临床实践中取得了显著的疗效,表明分子靶向治疗理论的正确性与可行性。而 miRNA 在多种肿瘤中通过影响多基因表达从而导致肿瘤的发生发展,故 miRNA 也被认为是肿瘤诊断和治疗的潜在新靶点^[9-10]。miR-765 已在多种肿瘤,如肾上腺嗜铬细胞瘤、直肠癌、骨肉瘤和上皮样肉瘤均有过表达^[11-14],而 INPP4B 则是一种脂质磷酸酶,在乳腺癌、肺癌、喉癌和黑色素瘤中作为一种潜在的肿瘤抑制因子,起负调控 PI3K/Akt 信号通路的作用^[16-19],从而抑制肿瘤细胞增殖、促进细胞凋亡^[20-21],但是目前 miR-765 在 HCC 细胞中的表达情况及其与 INPP4B 的关系未见相关文献报道。

本课题研究首次发现,HCC 细胞中 miR-765 高表达。miR-765 的过表达能显著促进 HCC 细胞的增殖,沉默 miR-765 表达则抑制 HCC 细胞的增殖。同时表明,在 HCC 细胞中 miR-765 通过靶向作用 INPP4B 的 mRNA 的 3'-UTR,使 INPP4B 表达抑制,而抑制 INPP4B 表达后则促进了 HCC 细胞的增殖,这些结果提示,在 HCC 的发生发展中 miR-765 可能是通过介导 INPP4B 表达来发挥其生物学功能。

总之,本研究表明,miR-765 在 HCC 中通过结合 INPP4B 的 mRNA 3'-UTR 来抑制 INPP4B 的表

达,使 HCC 细胞的增殖能力增强;在 HCC 发生发展中 miR-765 的基本功能是抑制 INPP4B 表达。研究结果提示,miR-765 在 HCC 的发生发展过程中扮演着重要的角色,可能成为 HCC 诊断和治疗的一个新靶点。

[参考文献]

- [1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108. DOI: 10. 3322/caac. 21262.
- [2] MATHEW M A, KURIAN S C, VARGHESE A P, et al. HBx gene mutations in hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma [J]. Gastroenterol Res, 2014, 7(1): 1- 4. DOI: 10. 14740/gr589w.
- [3] BALOGH J, VICTO D 3rd, ASHAM E H, et al. Hepatocellular carcinoma: a review [J/OL]. J Hepatocell Carcinoma, 2016, 5(3): 41-53 [2016-07-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5063561/>. DOI:10. 2147/JHC. S61146.
- [4] SIEGEL R, MA J, ZOU Z, et al. Cancer statistics, 2014 [J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1): 9-29. DOI: 10. 3322/caac. 21208.
- [5] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297. DOI:10. 1016/S0092-8674(04)00045-5.
- [6] AMBROS V. The functions of animal microRNAs [J]. Nature, 2004, 431(7006): 350-355. DOI:10. 1038/nature02871.
- [7] SHAH M Y, FERRAJOLI A, SOOD A K, et al. microRNA therapeutics in cancer-an emerging concept [J]. EBioMedicine, 2016, 10(12): 34-42. DOI:10. 1016/j. ebiom. 2016. 09. 017.
- [8] FARAZI T A, HOELL J I, MOROZOV P, et al. MicroRNAs in human cancer [J/OL]. Adv Exp Med Biol, 2013, 774: 1-20 [2016-07-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/>

- PMC3704221/. DOI: 10.1007/978-94-007-5590-1_1.
- [9] Kawaguchi T, Komatsu S, Ichikawa D, et al. Circulating microRNAs: a next-generation clinical biomarker for digestive system cancers[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(9): pii: E1459 [2016-07-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5037738/>. DOI: 10.3390/ijms17091459.
- [10] RABINOWITS G, GERCEL C, DAY J M, et al. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer[J]. *Clin Lung Cancer*, 2009, 10(1):42-46. DOI: 10.3816/CLC.2009.n.006.
- [11] TOMBOL Z, EDER K, KOVACS A, et al. MicroRNA expression profiling in benign (sporadic and hereditary) and recurring adrenal pheochromocytomas[J]. *Mod Pathol*, 2010, 23(12):1583-1595. DOI: 10.1038/modpathol.2010.164.
- [12] DELLA VITTORIA SCARPATI G, FALCETTA F, CARLOMAGNO C, et al. A specific miRNA signature correlates with complete pathological response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2012, 83(4):1113-1119. DOI: 10.1016/j.ijrobp.
- [13] DAI N, ZHONG Z Y, CUN Y P, et al. Alteration of the microRNA expression profile in human osteosarcoma cells transfected with APE1 siRNA[J]. *Neoplasma*, 2013, 60(4):384-394. DOI: 10.4149/neo_2013_050.
- [14] PAPP G, KRAUSZ T, STRICKER T P, et al. SMARCB1 expression in epithelioid sarcoma is regulated by miR-206, miR-381, and miR-671-5p on Both mRNA and protein levels[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2014, 53(2):168-176. DOI: 10.1002/gcc.22128.
- [15] BERTUCCI M C, MITCHELLI C A. Phosphoinositide 3-kinase and INPP4B in human breast cancer[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2013, 1280: 1-5. DOI: 10.1111/nyas.12036.
- [16] STJERNSTROM A, KARLSSON C, FERNANDEZ O J, et al. Alterations of INPP4B, PIK3CA and pAkt of the PI3K pathway are associated with squamous cell carcinoma of the lung[J]. *Cancer Med*, 2014, 3(2): 337-348. DOI: 10.1002/cam4.191.
- [17] PEREZ-LORENZO R, GILL K Z, SHEN C H, et al. A tumor suppressor function for the lipid phosphatase INPP4B in melanocytic neoplasms[J]. *J Invest Dermatol*, 2014, 134(5):1359-1368. DOI: 10.1038/jid.2013.511.
- [18] AGOULNIK I U, HODGSON M C, BOWDEN W A, et al. INPP4B: the new kid on the PI3K block[J]. *Oncotarget*, 2011, 2(4): 321-328. DOI: 10.18632/oncotarget.260.
- [19] KIM J S, YUN H S, UM H D, et al. Identification of inositol polyphosphate 4-phosphatase type II as a novel tumor resistance biomarker in human laryngeal cancer HEp-2 cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13(13):1307-1318. DOI: 10.4161/cbt.21788.
- [20] SARBASSOV D D, GUERTIN D A, ALI S M, et al. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor/TOR complex[J]. *Science*, 2005, 307(5712):1098-1101. DOI: 10.1126/science.1106148.
- [21] HODGSON M C, SHAO U, FROLOV A, et al. Decreased expression and androgen regulation of the tumor suppressor gene INPP4B in prostate cancer[J]. *Cancer Res* 2011, 71(2):572-582. DOI: 10.1158/0008-5472.
- [收稿日期] 2016 - 07 - 26 [修回日期] 2016 - 11 - 04
- [本文编辑] 党瑞山

· 读者 · 作者 · 编者 ·

参考文献题名后应标注文献类型和文献载体标识代码

本刊参考文献按照国家标准 GB/T 7714-2015《信息与文献 参考文献著录规则》的要求进行著录。该国家标准要求,每条文献的题名后都应标上[文献类型标识代码]或[文献类型标识代码/文献载体标识代码]。对纸质文献,如为期刊中析出文献,题名后应标上[J];如为专著中析出文献,题名后应标上[M]。对电子资源类文献,如为网络期刊析出文献,题名后须标上[J/OL];如为网络专著中析出文献,题名后须标上[M/OL]。常用文献类型标识和电子文献载体标识代码见表 1。

表 1 文献类型和文献载体标识代码

文献类型	标识代码	文献类型	标识代码	载体类型	标识代码
期 刊	J	报 纸	N	磁 带	MT
专 著	M	专 利	P	磁 盘	DK
汇 编	G	标 准	S	光 盘	CD
会 议 录	C	数 据 库	DB	联机网络	OL
学 位 论 文	D	计 算 机 程 序	CP		
报 告	R	电 子 公 告	EB		