

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.05.011

· 临床研究 ·

## miR-195 靶向 TLR4 并阻断 NF- $\kappa$ B 通路抑制肝癌细胞 HepG2 增殖和转移

陈鹏<sup>1</sup>, 崔锐<sup>1</sup>, 梁鸿飞<sup>1</sup>, 陈晨<sup>2</sup> (1. 昆明医科大学第二附属医院肝胆胰外科, 云南昆明 650101; 2. 云南省第二人民医院眼科, 云南昆明 650021)

**[摘要]** **目的:** 探讨 miR-195/Toll 样受体 4 (TLR4) 分子轴通过调控 NF- $\kappa$ B 通路对肝癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响。**方法:** 收集 2016 年 3 月至 2017 年 1 月昆明医科大学第二附属医院外科手术切除的 25 例肝癌组织以及对应的癌旁组织标本; 肝癌 HepG2 细胞培养完成后分为 4 组, 即对照组 (NC)、miR-195 mimic 组 (miR-195 组)、TLR4 敲降组 (si-TLR4 组) 和 miR-195 inhibitor 联合 TLR4 敲降组 (si-TLR4+miR-195 inhibitor 组)。采用 qPCR 检测 miR-195 在肝癌组织和细胞系中的表达水平; 采用 CCK-8 法检测上述各组细胞的增殖活力, Transwell 法检测各组细胞的侵袭能力, 划痕愈合实验检测细胞迁移能力, 双荧光素酶报告基因验证 miR-195 和 TLR4 的靶向调控关系, WB 检测 TLR4 和 NF- $\kappa$ B p65 蛋白的表达。**结果:** miR-195 在肝癌组织中低表达 ( $P < 0.01$ )。相比于人肝上皮细胞 (THLE-3), miR-193 在肝癌细胞系 (HepG2 和 Huh-7) 中低表达 ( $P < 0.01$ ), 且 HepG2 细胞中的表达水平最低。过表达 miR-195 后 HepG2 细胞增殖活力明显低于对照组 ( $P < 0.01$ ), 穿膜细胞明显减少 ( $P < 0.01$ ), HepG2 细胞迁移能力明显下调 ( $P < 0.01$ )。过表达 miR-195 可明显抑制 TLR4 蛋白的表达水平 ( $P < 0.05$ ), 且 TLR4 与 miR-195 的表达呈负相关 ( $R^2 = 0.602, P < 0.0001$ )。过表达 miR-195 可靶向下调 TLR4 并阻断 NF- $\kappa$ B 通路抑制 HepG2 细胞增殖、侵袭和迁移能力 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。**结论:** miR-195 能够抑制 HepG2 细胞增殖、侵袭及迁移能力, 其机制可能与靶向调控 TLR4 并阻断 NF- $\kappa$ B 通路影响细胞生物学行为有关。**[关键词]** 肝癌; HepG2 细胞; miR-195; Toll 样受体 4; NF- $\kappa$ B 通路  
**[中图分类号]** R735.7; R730.59 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)05-0550-07

## miR-195 targets TLR4 to inhibit proliferation and metastasis of liver cancer cells via blocking NF- $\kappa$ B pathway

CHEN Peng<sup>1</sup>, CUI Rui<sup>1</sup>, LIANG Hongfei<sup>1</sup>, CHEN Chen<sup>2</sup> (1. Department of Hepatic-Biliary-Pancreatic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, Yunnan, China; 2. Department of Ophthalmology, The Second People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650021, Yunnan, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of miR-195/TLR4 axis on the proliferation, invasion and migration of liver cancer cells via regulating NF- $\kappa$ B pathway. **Methods:** Twenty-five pairs of liver cancer tissues and corresponding adjacent tissues surgically resected at the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University from March 2016 to January 2017 were collected for this study. Liver cancer HepG2 cells were cultured and then randomly divided into four groups: control group (NC), miR-195 mimic group (miR-195), TLR4 knockdown group (si-TLR4), and miR-195 inhibitor combined with TLR4 knockdown group (si-TLR4+miR-195 inhibitor). qRT-PCR was used to detect the expression of miR-195 in liver cancer tissues and cell lines. CCK-8 assay was used to evaluate the cell viability of each group. Transwell and Wound healing assay were applied to detect the invasion and migration ability of HepG2 cells, respectively. Dual-luciferase reporter gene assay was used to verify the targeted regulation of TLR4 by miR-195. WB was applied to analyze the protein expressions of TLR4 and NF- $\kappa$ B p65. **Results:** miR-195 was down-regulated in the liver cancer tissues compared with adjacent tissues ( $P < 0.01$ ). Compared with human hepatic epithelial cells (THLE-3), the expression of miR-193 in liver cancer cell lines (HepG2 and Huh-7) was down-regulated ( $P < 0.01$ ), and the expression level in HepG2 cells was the lowest. The proliferation, invasion and migration of HepG2 cells was significantly suppressed after over-expression of miR-195 (all  $P < 0.01$ ). Moreover, over-expression of miR-195 significantly down-regulated TLR4 protein expression ( $P < 0.05$ ), and TLR4 was negatively correlated with miR-195 ( $R^2 = 0.602, P < 0.0001$ ). Furthermore, miR-195 over-expression inhibited proliferation, invasion and migration of HepG2 cells by targeting

**[基金项目]** 云南省科技计划项目-面上项目 (No.2014FB194, 2016FB133); 云南省应用基础研究 (昆明医科大学联合专项) [No.2017FE467(-182)]。Project supported by the Science and Technology Project Foundation of Yunnan Province (No.2014FB194, 2016FB133), and the Yunnan Applied Basic Research Project [No.2017FE467(-182)]

**[作者简介]** 陈鹏 (1975-), 男, 博士, 副教授, 主要从事肝胆外科基础与临床研究, E-mail: bbs332@126.com

**[通信作者]** 陈晨 (CHEN Chen, corresponding author), 博士, 主治医师, 主要从事眼底疾病分子机制研究, E-mail: chenchenmd@aliyun.com

TLR4 expression and blocking NF- $\kappa$ B pathway ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** miR-195 over-expression can inhibit the proliferation, invasion and migration of HepG2 cells. The mechanism may be related with targeting TLR4 and blocking the NF- $\kappa$ B pathway to affect cell biological behaviors.

**[Key words]** liver cancer; HepG2 cell; miR-195; Toll-like receptors 4 (TLR4); NF- $\kappa$ B pathway

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(5): 550-556. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.05.011]

原发性肝癌是我国常见的恶性消化系统肿瘤。虽然最近几年在肝癌的诊断和治疗方面取得了一些进展,但在过去十年里伴有转移患者的总生存期和预后并没有得到显著改善。因此,探讨肝癌细胞增殖和转移的相关机制对延长患者总生存期和改善预后具有重要的临床意义。近年来,多项研究证实, MicroRNA (miRNA) 广泛参与调控包括肝癌在内的多种恶性肿瘤细胞增殖、侵袭、凋亡等过程。例如, miR-195 作为抑癌基因,在结肠癌<sup>[1]</sup>、乳腺癌<sup>[2]</sup>和肝癌<sup>[3]</sup>等肿瘤组织或细胞系中低表达。同时, Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 高表达与肝癌患者总生存率短呈正相关<sup>[4]</sup>,且 TLR4 信号通路上调与肝癌细胞高侵袭和转移能力密切相关<sup>[5-6]</sup>。为此,本研究拟探讨 miR-195 通过调控 TLR4 介导 NF- $\kappa$ B 通路对肝癌 HepG2 细胞增殖、侵袭和迁移的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 组织标本、细胞系和主要试剂

收集 2016 年 3 月至 2017 年 1 月昆明医科大学第二附属医院外科手术切除的 25 例肝癌组织以及对应的癌旁组织标本,均经病理学证实且术前均未接受手术、放疗和化疗。患者手术前均告知并签署知情同意书。所有标本于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存。

人肝癌细胞系 (HepG2 和 Huh-7)、人肝上皮细胞 (THLE-3) 和 293T 细胞均购自美国菌种保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC)。胎牛血清和 DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司,转染试剂 turbofect transfection reagent 购自赛默飞世尔公司, RIPA 细胞裂解液购自碧云天生物技术有限公司, TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司,反转录试剂盒 One Step PrimeScript<sup>®</sup> miRNA cDNA Synthesis Kit 和定量 PCR 试剂盒 SYBR Premix Ex Taq<sup>™</sup> 购自日本 TaKaRa 公司, miR-195 mimics/inhibitor 和 TLR4 慢病毒过表达载体购自上海吉玛制药技术有限公司, pGL3-Promoter 质粒和 pRL-TK 质粒以及双荧光素酶报告基因检测试剂盒均购自美国 Promega 公司, CCK-8 试剂盒购自南京建成生物工程研究所, Transwell 小室及人工基底膜购自美国康宁公司, 蛋白提取试剂盒和 SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒均购自美国 Bio-Rad 公司, 免疫印迹一抗 (兔抗人 p65 抗体、TLR4 抗体和 GAPDH 抗体) 和二抗 (羊抗兔 IgG (H+L)) 均购

于购自 Santa Cruz 公司。

### 1.2 细胞培养和转染

肝癌细胞和人肝上皮细胞采用含 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素的 DMEM 培养基在  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的恒温培养箱中常规培养,当细胞汇合度为 70%~80% 时进行传代。为了提高/降低 miR-195 和降低 TLR4 表达,按照转染试剂 Turbofect transfection reagent 说明书,分别将 miR-195 mimic/inhibitor 及 TLR4 敲降质粒转入 HepG2 细胞中。HepG2 细胞分为 4 组,即对照组 (NC)、miR-195 mimic 组 (miR-195 组)、TLR4 敲降组 (si-TLR4 组) 和 miR-195 inhibitor 联合 TLR4 敲降组 (si-TLR4+miR-195 inhibitor 组)。

### 1.3 qPCR 检测 miR-195 和 TLR4 的表达水平

转染 48 h 后,收集培养的各组细胞。采用 TRIzol 试剂抽取各组细胞中总 RNA,并进行定量分析。随后采用逆转录试剂盒合成 cDNA,反应条件为  $40^{\circ}\text{C}$  变性 60 min、 $25^{\circ}\text{C}$  5 min、 $85^{\circ}\text{C}$  5 min。然后取 2  $\mu\text{l}$  逆转录产物进行 PCR 反应,反应条件为  $95^{\circ}\text{C}$  变性 15 s、 $55^{\circ}\text{C}$  退火 30 s、 $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 s,进行 30 个循环扩增。qPCR 引物序列见表 1。采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法以 GAPDH 为内参计算 miR-195 和 TLR4 的表达水平。

表 1 qPCR 引物序列  
Tab.1 Primer sequences of qPCR

Gene	Sequence of primer
miR-195	F:5'-GATAGCAGCACAGAAATATTGGC-3' R:5'-CAGTGCCTGTCGTGGAGT-3'
TLR4	F:5'-ACCTCCCCTTCTCAACCAAG-3' R:5'-GGCTCTGATATGCCCCATCT-3'
GAPDH	F:5'-GCAAGTTCAACGGCACAG-3' R:5'-GCCAGTAGACTCCACGACAT-3'

### 1.4 WB 检测 TLR4 和 p65 蛋白的表达水平

采用预冷的 PBS 缓冲液将待测细胞清洗 3 次,加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液提取总蛋白,  $100^{\circ}\text{C}$  变性 5 min。等量蛋白进行 10% SDS-PAGE 分离后,电转至 PVDF 膜。经 5% 的 BSA 封闭 1 h 后,加入一抗 TLR4 抗体 (1:1 000) 和 p65 抗体 (1:1 000),  $4^{\circ}\text{C}$  过夜孵育。加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:1 000), 室温孵育 1.5 h。充分洗膜后,加入发光液后于凝胶成像仪进行曝光拍照,并统计灰度值计算

相对表达量。

### 1.5 CCK-8法检测HepG2细胞增殖活力

将各组待测细胞用稀释到10%的CCK-8溶液制成 $1 \times 10^6$ 个/ml的细胞悬液,然后在37℃恒温培养箱中培养4h,最后检测450nm处光密度(D)值,计算细胞增殖倍数,绘制生长曲线。

### 1.6 Transwell检测HepG2细胞侵袭能力

将4℃过夜溶解的Matrigel胶,用无血清的培养基在冰上按1:7的比例稀释。将带有8μm微孔聚碳酸酯膜的Transwell小室置于无菌24孔板中,由此形成上、下两个小室。向上室中加入25μl Matrigel胶,快速晃动24孔板,使其均匀铺满小室底部,避免产生气泡,37℃无菌保持过夜,以确保Matrigel胶充分聚合。分别收集转染miR-NC、miR-195 mimic、siNC、si-TLR4、si-TLR4+miR-195 inhibitor细胞。培养24h后,用胰蛋白酶消化细胞,制成单细胞悬液并计数。将各组细胞分别加入Transwell小室的上室( $1.5 \times 10^5$ 个/小室),下室中加入650μl含10%胎牛血清的DMEM培养液,常规培养48h,用棉签擦净上室细胞。PBS清洗后(清洗3次),采用0.1%的结晶紫染色20min,于倒置相差显微镜下( $\times 200$ )观察并拍照,随机观察5个视野,计数穿膜细胞数。

### 1.7 划痕实验检测HepG2细胞迁移能力

将各组待测细胞制成细胞密度为 $1 \times 10^6$ 个/ml的细胞悬液100μl加入到6孔板中,过夜培养至形成单层细胞。在单层细胞上用10μl的枪头划横线,用PBS洗3次以去除因划线而脱落的细胞,显微镜下拍照记录划痕宽度,记录为初始划痕宽度。继续培养24h后,显微镜下再次拍照记录划痕宽度。划痕愈合率=(初始划痕宽度-培养24h后划痕宽度)/初始划痕宽度 $\times 100\%$ 。

### 1.8 双荧光素酶报告基因验证miR-195和TLR4的靶向作用关系

采用PCR扩增miR-195与TLR4结合片段并插

入荧光素酶载体,构建TLR4野生质粒。用基因突变技术将结合片段中部分核苷酸突变,构建TLR4突变质粒。采用miR-195 mimic和TLR4野生质粒或突变质粒共转染293T细胞。具体步骤为取5μl的opti-MEM稀释0.4μl Lipofectamine LTX,再取5μl的opti-MEM稀释0.1μl Plus和要转染的各组质粒,轻弹混匀后瞬时离心,室温静置5min;然后将稀释的质粒加到稀释的LTX中,轻弹混匀后瞬时离心,室温静置20min。取上述混合体系10μl加入到含90μl培养基的96孔板的各孔中。转染48h后在荧光素酶测定仪上检测各组细胞的荧光强度。利用报告基因试剂盒检测各组的荧光素酶活性,具体方法为每孔中加入100μl的上述底物试剂,室温避光静置10min后,在荧光素酶测定仪上检测萤火虫荧光素酶的活性。再将按Dual-Glo Stop buffer: Dual-GloStop substrate=100:1体积比配制的混合物100μl加入其中,室温避光放置10min后,检测细胞中海肾荧光素酶的活性。设置3个重复样本。

### 1.9 统计学处理

采用SPSS 20.0统计软件,所有实验独立重复3次,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间的均数比较采用 $t$ 检验,多组间数据比较采用单因素方差分析。采用GraphPad Prism 7软件对实验数据进行相关图片的绘制。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-195在肝癌组织和细胞系中低表达

qPCR检测结果证实,miR-195在25例肝癌组织中的表达水平明显低于癌旁组织( $P < 0.01$ ,图1A);相比于人肝上皮细胞(THLE-3),miR-195在肝癌细胞系(HepG2和Huh-7)中低表达( $P < 0.01$ ,图1B),且HepG2细胞中的表达水平最低。由此可知,miR-195的低表达可能与肝癌的发生发展密切相关。

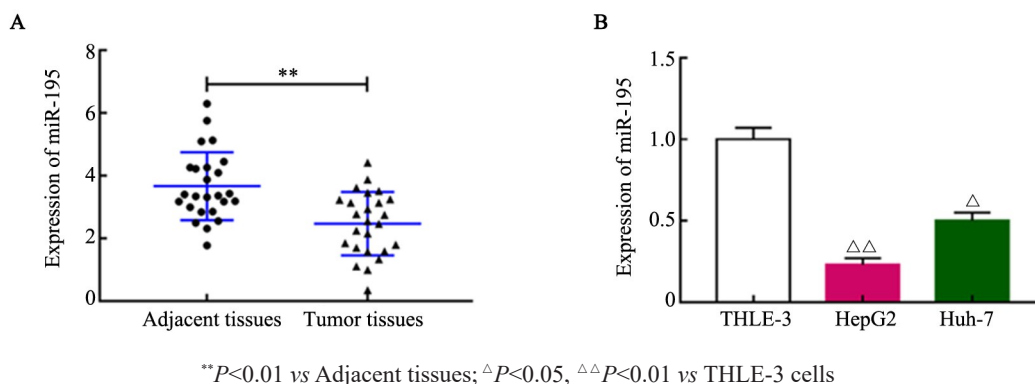


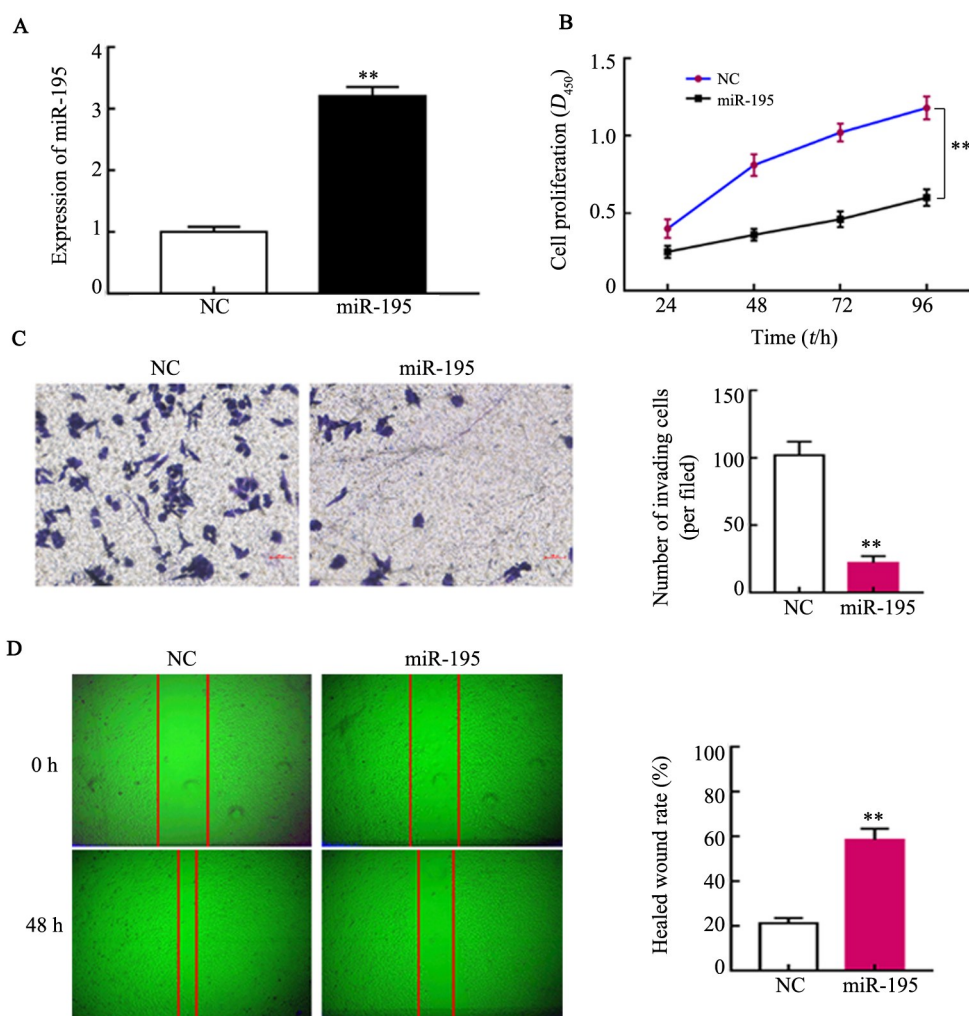
图1 miR-195在肝癌组织(A)和细胞系(B)中的表达水平

Fig. 1 Expression of miR-195 in liver cancer tissues (A) and cell lines (B)

## 2.2 过表达 miR-195 抑制了 HepG2 细胞增殖、侵袭和迁移

qPCR 检测结果(图 2A)显示,相比于对照组,转染 miR-195 mimic 可明显上调 HepG2 细胞中 miR-195 的表达水平( $P<0.01$ )。CCK-8 检测结果(图 2B)显示,过表达 miR-195 后 HepG2 细胞增殖活力明显低于

对照组( $P<0.01$ )。Transwell 细胞侵袭实验结果(图 2C)显示,转染 miR-195 mimic 后,与对照组相比 HepG2 细胞穿膜明显减少( $P<0.01$ );划痕实验结果(图 2D)表明,过表达 miR-195 可明显下调 HepG2 细胞迁移能力( $P<0.01$ )。



\*\* $P<0.01$  vs NC group

A: qPCR was used to measure the expression of miR-195 in NC and miR-195 group;

B: CCK-8 assay was applied to evaluate the proliferation of HepG2 cells in NC and miR-195 group;

C: Transwell assay was used to detect the invasion of HepG2 cells in NC and miR-195 group ( $\times 200$ );

D: Wound healing assay was used to evaluate the migration of HepG2 cells in NC and miR-195 group at 0 and 48 h ( $\times 40$ )

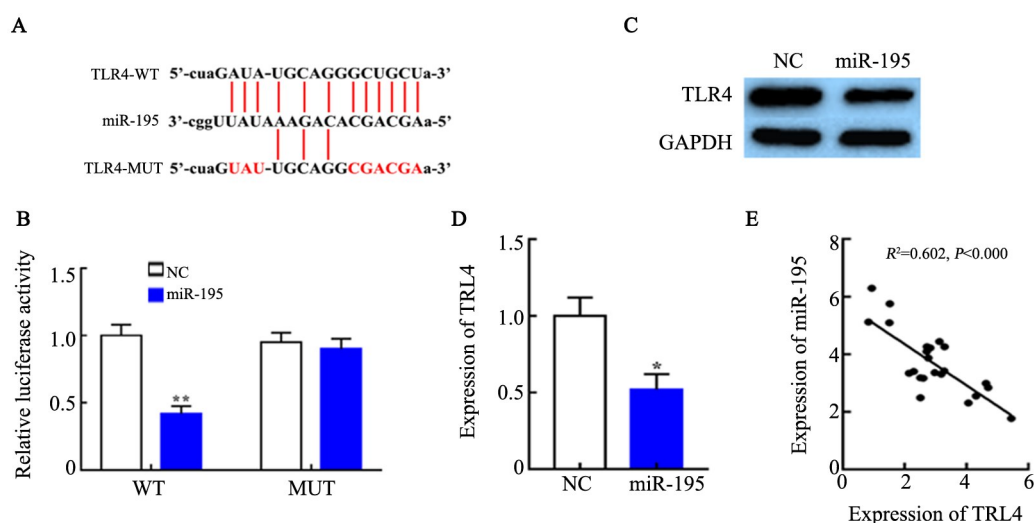
图 2 过表达 miR-195 对 HepG2 细胞增殖、侵袭和迁移的影响

Fig. 2 Effect of miR-195 over-expression on the proliferation, invasion and migration of HepG2 cells

## 2.3 miR-195 靶向负调控 TLR4

生物信息学分析发现,TLR4 的 3'UTR 上存在潜在的 miR-195 结合位点(图 3A)。双荧光素酶报告分析结果证明,miR-195 转染组 TLR4 相对荧光强度明显低于对照组( $P<0.01$ ,图 3B);TLR4 3'UTR 中的 miRNA-195 结合位点发生突变后,miR-195 mimic 对

报告基因的抑制作用消失,即 miR-195 mimic 转染组与 miR-NC 组相比,TLR4 荧光强度差异无统计学意义( $P>0.05$ )。WB 检测结果显示,过表达 miR-195 可明显抑制 TLR4 蛋白的表达( $P<0.05$ ,图 3C、D)。此外,25 例肝癌组织样本检测显示,TLR4 与 miR-195 的表达呈负相关( $R^2=0.602$ , $P<0.0001$ ,图 3E)。



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs NC group

- A: TLR4 was predicted to be a target of miR-195 by the online programs starBase;
- B: Dual-luciferase reporter gene assay was used to verify the relationship between miR-195 and TLR4;
- C and D: The expression of TLR4 was detect by qPCR and Wb
- E: Pearson correlation coefficient was applied to analyze the relationship between miR-195 and TLR4.

图3 miR-195与TLR4 3'UTR的靶向关系

Fig. 3 Relationship between miR-195 and TLR4 3'UTR

#### 2.4 miR-195 靶向 TLR4 并阻断 NF- $\kappa$ B 通路抑制 HepG2 细胞增殖、侵袭和迁移

WB 检测结果(图 4A)显示,相比于对照组,敲降 TLR4 可明显下调 TLR4 和 p65 蛋白的表达水平( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。miR-195 inhibitor 联合 TLR4 敲降质粒转染于 HepG2 细胞中后,相比于仅转染 TLR4 敲降质粒组,NF- $\kappa$ B p65 蛋白的表达水平上调,TLR4 表达上调( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。

CCK-8 法检测结果(图 4B)表明,敲降 TLR4 后, HepG2 细胞增殖活力明显低于对照组和同时敲降 miR-195 和 TLR4 组(均  $P < 0.01$ )。Transwell 检测结果(图 4C)显示,miR-195 inhibitor 联合 TLR4 敲降质粒转染 HepG2 细胞后,与仅转染 TLR4 敲降质粒组或对照组相比, HepG2 细胞侵袭能力明显增加(均  $P < 0.01$ )。同样,划痕实验结果(图 4D)证实,相比于对照组,敲降 TLR4 可明显下调 HepG2 细胞迁移能力( $P < 0.01$ ),而同时敲降 miR-195 和 TLR4 后 HepG2 细胞迁移能力与对照组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

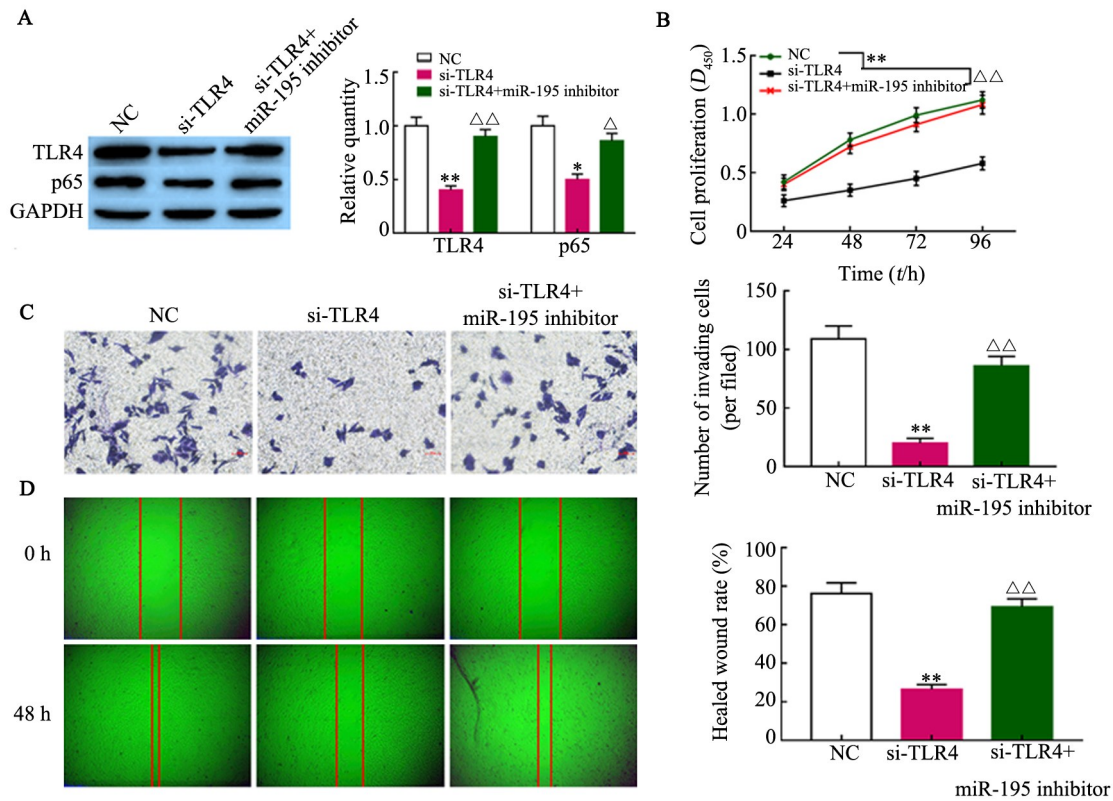
### 3 讨论

近年来,miRNA 功能失调在调节肿瘤细胞侵袭及转移过程中发挥着重要的作用,但其具体分子作用机制还不是十分清楚。多项研究证实,miR-195 低表达与多种恶性肿瘤的发生发展密切相关。例如, FENG 等<sup>[7]</sup>研究证实,过表达 miR-195 可显著抑制结

直肠癌细胞增殖、转移和降低肿瘤细胞耐药性。CAI 等<sup>[8]</sup>研究表明,过表达 miR-195 通过靶向下调 PRR11 抑制前列腺癌细胞增殖和血管生成。ZHOU 等<sup>[9]</sup>研究证实,过表达 miR-195 通过靶向下调 Smad3 可显著抑制宫颈癌细胞增殖、侵袭和迁移能力。WANG 等<sup>[10]</sup>研究发现,miR-195 通过靶向下调 TRIM14 抑制口腔鳞状细胞癌细胞增殖、侵袭和迁移能力。本研究同样证实,miR-195 在肝癌组织和细胞系中低表达,其过表达可明显抑制肝癌 HepG2 细胞增殖、侵袭和迁移能力,进一步证实了 miR-195 高表达在肿瘤进程中发挥抑癌作用。

研究众多 Toll 样受体后,发现其中 TLR4 是一类重要的固有免疫分子。在比较正常肝组织和肝癌组织后,人们发现 TLR4 在肝癌组织中有较高的表达率,且远期随访发现,与 TLR4 低表达率的肝癌患者相比,TLR4 高表达率的肝癌患者的无瘤生存率和总生存率均缩短<sup>[11-12]</sup>。TLR4 与 LPS 结合时所导致的 TLR4 信号上调被证实在体外能促进肝癌细胞株的侵袭和转移能力<sup>[13-14]</sup>。YE 等<sup>[15]</sup>研究证实,敲降 TLR4 能够明显抑制结直肠癌细胞增殖和侵袭能力。同时,敲降 TLR4 通过阻断 NF- $\kappa$ B 通路抑制结直肠癌细胞迁移和上皮间质转化<sup>[16]</sup>。WANG 等<sup>[17]</sup>同样研究证实,TLR4 通过激活 NF- $\kappa$ B 通路促进前列腺癌细胞增殖、迁移和侵袭。这些研究表明,TLR4 信号通路激活可能在肝癌细胞侵袭转移过程中起到重要作用。

本研究也证实, 敲降 TLR4 可明显抑制 p65 蛋白的表达, 且显著抑制了 HepG2 细胞增殖、侵袭和迁移能力。



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs NC group;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs si-TLR4 group;

- A: WB was used to measure the expression of TLR4 and p65 in NC, si-TLR4 and si-TLR4+miR-195 inhibitor group;  
 B: CCK-8 assay was applied to evaluate the proliferation of HepG2 cells in NC, si-TLR4 and si-TLR4+miR-195 inhibitor group;  
 C: Transwell assay was used to detect the invasion of HepG2 cells in NC, si-TLR4 and si-TLR4+miR-195 inhibitor group ( $\times 200$ );  
 D: Wound healing assay was used to evaluate the migration of HepG2 cells in NC, si-TLR4 and si-TLR4+miR-195 inhibitor group ( $\times 40$ )

图4 miR-195/TLR4 分子轴通过 NF-κB 通路对 HepG2 细胞增殖、侵袭和迁移的影响

Fig.4 Effect of miR-195/TLR4 axis on the proliferation, invasion and migration of HepG2 cells via NF-κB pathway

综上所述, miR-195 低表达与肝癌细胞增殖、侵袭和迁移密切相关, 且过表达 miR-195 通过靶向下调 TLR4 并阻断 NF-κB 通路抑制 HepG2 细胞增殖、侵袭和迁移能力。

[参考文献]

[1] LI B, WANG S, WANG S. MiR-195 suppresses colon cancer proliferation and metastasis by targeting WNT3A[J]. Mol Genet Genomics, 2018, 293(5):1245-1253. DOI: 10.1007/s00438-018-1457-y.  
 [2] MARQUES M M, EVANGELISTA A F, MACEDO T, et al. Expression of tumor suppressors miR-195 and let-7a as potential biomarkers of invasive breast cancer[J]. Clinics (Sao Paulo), 2018, 73:e184. DOI: 10.6061/clinics/2018/e184.  
 [3] WANG M, ZHANG J, TONG L, et al. MiR-195 is a key negative regulator of hepatocellular carcinoma metastasis by targeting FGF2 and VEGFA[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(11):14110-14120.  
 [4] REN B, LUO S, TIAN X, et al. Curcumin inhibits liver cancer by inhibiting DAMP molecule HSP70 and TLR4 signaling[J]. Oncol

Rep, 2018, 40(2): 895-901. DOI: 10.3892/or.2018.6485.  
 [5] EARL T M, NICOUD I B, PIERCE J M, et al. Silencing of TLR4 decreases liver tumor burden in a murine model of colorectal metastasis and hepatic steatosis[J]. Ann Surg Oncol, 2009, 16(4): 1043-1050. DOI: 10.1245/s10434-009-0325-8.  
 [6] 邱双健, 叶胜龙, 吴志全, 等. 肝癌细胞上清液对树突状细胞的抑制作用与 NF-κB 通路有关[J]. 中华肝胆外科杂志, 2004, 10(8): 57-60.  
 [7] FENG C, ZHANG L, SUN Y, et al. GDPD5, a target of miR-195-5p, is associated with metastasis and chemoresistance in colorectal cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 101:945-952. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.03.028.  
 [8] CAI C, HE H, DUAN X, et al. miR-195 inhibits cell proliferation and angiogenesis in human prostate cancer by downregulating PRR11 expression[J]. Oncol Rep, 2018, 39(4): 1658-1670. DOI: 10.3892/or.2018.6240.  
 [9] ZHOU Q, HAN L R, ZHOU Y X, et al. MiR-195 suppresses cervical cancer migration and invasion through targeting smad3[J]. Int J Gynecol Cancer, 2016, 26(5): 817-824. DOI: 10.1097 / igc.

- 0000000000000686.
- [10] WANG T, REN Y, LIU R, et al. miR-195-5p suppresses the proliferation, migration, and invasion of oral squamous cell carcinoma by targeting TRIM14[J/OL]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 7378148 [2018-012-11]. <https://doi.org/10.1155/2017/7378148>. DOI: 10.1155/2017/7378148.
- [11] JOFFRE O P, SEGURA E, SAVINA A, et al. Cross-presentation by dendritic cells[J]. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12(8): 557-569. DOI: 10.1038/nri3254.
- [12] SEIFERT L, DEUTSCH M, ALOTHMAN S, et al. Dectin-1 regulates hepatic fibrosis and hepatocarcinogenesis by suppressing TLR4 signaling pathways[J]. *Cell Rep*, 2015, 13(9): 1909-1921. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.10.058.
- [13] LI J, YIN J, SHEN W, et al. TLR4 promotes breast cancer metastasis via Akt/GSK3beta/beta-catenin pathway upon LPS stimulation [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2017, 300(7): 1219-1229. DOI: 10.1002/ar.23590.
- [14] ZHANG X, WANG C, SHAN S, et al. TLR4/ROS/miRNA-21 pathway underlies lipopolysaccharide instructed primary tumor outgrowth in lung cancer patients[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(27): 42172-42182. DOI: 10.18632/oncotarget.9902.
- [15] YE K, WU Y, SUN Y, et al. TLR4 siRNA inhibits proliferation and invasion in colorectal cancer cells by downregulating ACAT1 expression[J]. *Life Sci*, 2016, 155(1):133-139. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.05.012.
- [16] YE K, CHEN Q W, SUN Y F, et al. Loss of BMI-1 dampens migration and EMT of colorectal cancer in inflammatory microenvironment through TLR4/MD-2/MyD88-mediated NF-kappaB signaling [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(2): 1922-1930. DOI: 10.1002/jcb.26353.
- [17] WANG W, WANG J. Toll-like receptor 4 (TLR4)/cyclooxygenase-2 (COX-2) regulates prostate cancer cell proliferation, migration, and invasion by NF-kappaB activation[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 5588-5597. DOI: 10.12659/msm.906857.

[收稿日期] 2018-12-24

[修回日期] 2019-04-26

[本文编辑] 黄静怡