

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.02.006

## 综合性分析 miR-224 在肝癌中的表达及其生物学作用

宗彦红<sup>1</sup>, 于芳<sup>1</sup>, 刘义龙<sup>2</sup>, 霍丽静<sup>1</sup>, 唐志鹏<sup>1</sup>, 谭鹤<sup>1</sup>, 帖彦清<sup>1</sup> (1. 河北省人民医院 检验科, 河北 石家庄 050051; 2. 武警石家庄支队保障大队卫生队, 河北 石家庄 050051)

**[摘要]** **目的:** 分析 miR-224 在肝癌患者肿瘤组织和血浆中的表达水平及其与临床病理特征、诊断和预后之间的相关性, 并进一步通过生物信息学方法和体外实验分析其在肝癌发生发展中的作用机制。**方法:** 利用基因表达数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)中大样本数据分析 miR-224 在肝癌患者肿瘤组织及正常组织中的表达水平。采用 qPCR 法检测 2017 年 1 月至 2020 年 1 月间于河北省人民医院手术切除的 80 例临床肝癌患者肿瘤组织和对应癌旁组织中 miR-224 的表达水平, 检测 miR-224 在 30 例肝癌患者血浆中的表达水平。利用 Kaplan-Meier plotter 数据库分析 miR-224 的表达水平与肝癌患者的总生存时间之间的相关性。利用生物信息学手段分析 miR-224 所参与的生物学过程和信号通路。向肝癌 HepG2 细胞转染 miR-224 inhibitor, 采用克隆形成实验、Transwell 小室实验、qPCR 和 WB 法分别检测敲低 miR-224 表达对肝癌 HepG2 细胞增殖、侵袭能力以及 EMT 相关分子表达水平的影响。**结果:** GEO 数据库分析结果显示, miR-224 在肝癌组织中的表达水平显著高于正常组织。临床标本验证结果表明, miR-224 在肝癌患者肿瘤组织和血浆中的表达水平显著高于对应的癌旁组织和健康人血浆(均  $P < 0.01$ )。miR-224 的表达水平与肝癌患者的 TNM 分期、淋巴结转移状态和肿瘤大小显著相关( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。ROC 分析发现, miR-224 在肝癌诊断方面具有较强的能力, 且 miR-224 的表达水平升高与肝癌患者的预后不良显著相关( $P < 0.05$ )。功能富集分析发现, miR-224 主要参与 mTOR 信号通路、AGE-RAGE 信号通路、Rap1 信号通路、Ras 信号通路、ErbB 信号通路、HIF-1 信号通路以及 p53 信号通路等肿瘤发生发展相关的信号通路。敲低 miR-224 可显著抑制 HepG2 细胞的克隆形成和侵袭, 影响 EMT 相关标志物的表达( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。**结论:** miR-224 在肝癌组织和血浆中显著高表达, 且与肝癌患者的预后不良显著相关, 敲低 miR-224 表达可抑制肝癌 HepG2 细胞的克隆形成、侵袭和 EMT 进程。

**[关键词]** miR-224; 肝癌; 预后; 生物信息学; EMT

**[中图分类号]** R735.7; R730.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)02-0135-08

## Comprehensive analysis on expression and biological role of miR-224 in hepatocellular carcinoma

ZONG Yanhong<sup>1</sup>, YU Fang<sup>1</sup>, LIU Yilong<sup>2</sup>, HUO Lijing<sup>1</sup>, TANG Zhipeng<sup>1</sup>, TAN He<sup>1</sup>, TIE Yanqing<sup>1</sup> (1. Department of Clinical Laboratory, Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang, 050051, Hebei, China; 2. Medical Team, The Shijiazhuang Detachment of the Armed Police Security Team, Shijiazhuang 050051, Hebei, China)

**[Abstract] Objective:** To analyze the expression level of miR-224 in cancer tissues and plasma of hepatocellular carcinoma (HCC) patients, and its correlation with clinicopathological characteristics, diagnosis and prognosis of HCC patients, and to further analyze its mechanism of action in the occurrence and development of liver cancer through bioinformatics analysis and *in vitro* experiments. **Methods:** The expression level of miR-224 in HCC tissues and normal tissues was analyzed using large sample data from Gene Expression Omnibus (GEO). qPCR method was used to verify the expression level of miR-224 in the tumor tissues and corresponding adjacent tissues that surgically resected from 80 HCC patients in Hebei Provincial People's Hospital from January 2017 to January 2020; in addition, the miR-224 level was also examined in plasma samples from 30 HCC patients. The Kaplan-Meier plotter database was used to analyze the correlation between the miR-224 expression and the overall survival time of HCC patients. The biological processes and signal pathways involving miR-224 were analyzed using bioinformatics tools. Hepatocellular carcinoma HepG2 cells were transfected with miR-224 inhibitor, and then Clone formation experiment, Transwell chamber experiment, qPCR and WB methods were used to detect the effect of miR-224 knockdown on the proliferation and invasion of HepG2 cells and the expression level of EMT-related molecules. **Results:** The results of GEO database analysis showed that the expression level of miR-224 in HCC tissues was significantly higher than that in normal tissues. The results of clinical specimen

**[基金项目]** 河北省医学科学研究青年课题计划资助项目(No. 20170297); 河北省教育厅 2020 年度河北省高等学校人文社会科学研究重点项目资助(No. SD201076)。Project supported by the Youth Fund Project of Medical Science Research of Hebei Province (No. 20170297), and the Humanities and Social Science Research Key Project from Higher Education Institutions of Hebei Province in 2020 (No. SD201076)

**[作者简介]** 宗彦红(1986-), 女, 硕士, 主管技师, 主要从事肿瘤发生发展的机制及治疗研究, E-mail: 365725022@qq.com

**[通信作者]** 帖彦清(TIE Yanqing, corresponding author), 硕士, 主任技师, 主要从事肿瘤化疗与生物治疗的研究, E-mail: 22742513@qq.com

verification showed that the expression level of miR-224 in the tumor tissues and plasma of HCC patients was significantly higher than that in the corresponding adjacent tissues and plasma from healthy controls (all  $P < 0.01$ ). The expression level of miR-224 was significantly correlated with the TNM stage, lymph node metastasis status and tumor size of HCC patients ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). ROC analysis indicated that miR-224 showed a prominent diagnostic value in liver cancer, and the increased expression level of miR-224 was significantly related to the poor prognosis of HCC patients ( $P < 0.05$ ). Functional enrichment analysis revealed that miR-224 was mainly involved in the mTOR signaling pathway, AGE-RAGE signaling pathway, Rap1 signaling pathway, Ras signaling pathway, ErbB signaling pathway, HIF-1 signaling pathway and p53 signaling pathway and other signaling pathways related to tumor occurrence and development. Knockdown of miR-224 could significantly inhibit the colony formation and invasion of HepG2 cells and affect the expression of EMT-related markers ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** miR-224 is highly expressed in HCC tissues and plasma and is significantly related to the poor prognosis of HCC patients. Knockdown of miR-224 expression can inhibit the colony formation, invasion and EMT process of liver cancer HepG2 cells.

**[Key words]** miR-224; hepatocellular carcinoma; prognosis; bioinformatics; EMT

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(2): 135-142. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.02.006]

在全球范围内,肝癌是最常见的恶性肿瘤之一,发病率和病死率分别在恶性肿瘤中排名第五和第三<sup>[1-2]</sup>。肿瘤细胞的高侵袭性和易转移是HCC治疗的主要挑战。在中国,肝癌的病死率排名第二,每年约有11万患者死于肝癌<sup>[3]</sup>。HCC的特点是起病隐晦、早期诊断困难和预后不良,约80%的HCC患者在诊断时已经处于晚期。而肝癌的发生、发展、转移和复发的分子机制十分复杂,尚未完全阐明。因此,研究肝癌的分子机制对于改善肝癌的预防、诊断、治疗和预后具有重要意义。miRNA在多种人类恶性肿瘤的发生发展中起关键作用<sup>[4-5]</sup>。如miR-21<sup>[6]</sup>、miR-193a<sup>[7]</sup>、miR-143<sup>[8]</sup>和miR-23<sup>[9]</sup>等miRNA参与了食道癌等多种肿瘤的发生发展。近年来研究发现,miR-224在多种恶性肿瘤组织中异常表达,如非小细胞肺癌<sup>[10]</sup>、宫颈癌<sup>[11]</sup>、结直肠癌<sup>[12]</sup>、膀胱癌<sup>[13]</sup>、胶质瘤<sup>[14]</sup>、前列腺癌<sup>[15-16]</sup>和消化道癌<sup>[17]</sup>等。而miR-224在肝癌中的研究较少,因此本研究利用美国国立生物基因表达数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)中的大样本数据结合临床标本验证的方式系统分析miR-224在肝癌中的表达及其生物学作用,以期对肝癌的诊疗提供参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 GEO数据集的选择和处理

本研究所用到的公共数据库的数据集是来自基因表达数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)<sup>[18]</sup>中的GSE10694、GSE36915和GSE115016三个数据集,且下载获得数据后利用R软件中Limma包进行数据的标准化以及癌组织和正常组织的差异性分析。

### 1.2 临床资料

收集2017年1月至2020年1月间河北省人民医院手术切除的80例肝癌患者的原发灶组织及距肿瘤原发灶边缘 $>5.5$  cm的癌旁组织,所有患者术前

均未接受过放射治疗和化疗。此外,收集30例肝癌患者的血浆和30例健康人的血浆样本。本研究方案通过河北省人民医院伦理委员会的审查、批准,所有受试患者签署知情同意书。

### 1.3 细胞及主要试剂

人肝癌细胞系HepG2细胞由河北省人民医院保存,miR-224重组质粒及引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,反转录试剂盒、转染试剂Lipo 2000、6孔板和Transwell小室均购自美国Promega公司,胰蛋白酶和TRIzol试剂购自北京索莱宝科技有限公司,胎牛血清购自美国BI公司,RPMI 1640购自美国Gibco公司。兔抗人E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(vimentin)及GAPDH单克隆抗体均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG)购自美国KPL公司,电化学发光试剂购自北京索莱宝生物科技有限公司。

### 1.4 miR-224靶基因的确定及富集分析

利用Targetscan (<http://www.targetscan.org/>)<sup>[19]</sup>和miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>)<sup>[20]</sup>数据库进行miR-224的靶基因预测,而后对两个数据库的预测结果取交集,对所得的共同靶基因利用Clusterprofile<sup>[21]</sup>包进行功能富集分析。

### 1.5 qPCR法检测肝癌患者组织和血浆中miR-224的表达

采用苯酚-氯仿抽提法分别提取肝癌及癌旁组织的总RNA。用紫外分光光度计检测各组织中总RNA的浓度和纯度。将总RNA反转录成cDNA,再以cDNA为模板进行qPCR检测。miR-224的上游引物序列为5'-ACACTCCAGCTGGGCAAGTCACTAGTGGT-3',下游引物序列为5'-TGGTGTCC TGGAGTCG-3'。以U6为内参,其上游引物序列

为 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', 下游引物序列为 5'-AACGCTTACGAATTTGCGT-3'。应用 qPCR 法检测 miR-224 在肝癌组织及癌旁组织和血浆中的表达水平, 反应条件为 95 °C 预变性 60 s, 95 °C、15 s, 60 °C、40 s, 72 °C、40 s, 共 46 个循环。以每个荧光信号达到阈值时经历的循环次数作为 Ct 值,  $\Delta Ct = Ct(\text{miR-224}) - Ct(\text{U6})$ , miR-224 的相对表达量用  $2^{-\Delta Ct}$  法计算。

#### 1.6 分析 miR-224 与肝癌患者预后的相关性及其在诊断肝癌患者方面的能力

用 R 软件中的 pROC 包进行的受试者工作特征 (ROC) 曲线分析, 以探索 miR-224 区分肝癌患者与健康个体的敏感性和特异性。Kaplan-Meier plotter (<http://kmpplot.com/>) 是一个包含了 TCGA 和 GEO 数据库中多基因大样本的在线数据库。为了分析 miR-224 的表达水平与肝癌患者总生存时间之间的相关性, 本研究将肝癌患者分为 miR-224 高表达组和 miR-224 低表达组, 利用 K-M 生存曲线分析了 miR-224 表达水平与肝癌患者的总生存时间 (OS) 之间的相关性。

#### 1.7 构建敲低 miR-224 表达的 HepG2 细胞系

取对数生长期的 HepG2 细胞接种于 6 孔板中, 待细胞汇合 75%~80% 时按照 Lipo2000 说明书操作, 以无血清 DMEM 培养液配制转染试剂及质粒工作液, 向 HepG2 细胞中转染两种 miR-224 inhibitor 及阴性对照 (NC 组) 质粒。转染 6 h 后更换为含 10% 胎牛血清的完全培养液, 继续培养 24~48 h, 收集 HepG2 细胞, 提取总 RNA, 采用 qPCR 法检测转染效率。

#### 1.8 克隆形成实验检测敲低 miR-224 对 HepG2 细胞增殖能力的影响

转染后的 HepG2 细胞培养 24 h 后常规消化并重悬于培养液中, 接种于 6 孔板 ( $5 \times 10^3$  个/孔), 常规培养 1 周。用 4% 多聚甲醛溶液固定 30 min, 0.1% 结晶紫染色 30 min, 光学显微镜下计数克隆形成数 (大于 50 个细胞的细胞群计为 1 个克隆), 并计算克隆形成率。克隆形成率 = 细胞克隆数/接种细胞数  $\times 100\%$ 。

#### 1.9 Transwell 小室实验检测敲低 miR-224 对 HepG2 细胞侵袭能力的影响

转染后的 HepG2 细胞培养 24 h 后常规消化并重悬于培养液中, 调整细胞密度为  $1 \times 10^5$  个/ml。将细胞悬液以 100  $\mu\text{l}$ /孔接种于基质胶包被的 Transwell 小室的上室中, 下室中加入完全培养液 (750  $\mu\text{l}$ /孔)。将接种细胞后的 Transwell 小室置于培养箱中常规培养 24 h 后, 用 4% 多聚甲醛溶液固定, 并进行结

晶紫染色。棉签擦去上室面残余细胞, 在倒置相差显微镜下计数穿过小室膜的细胞数量, 以此反映细胞的侵袭能力。

#### 1.10 qPCR、WB 法分别检测敲低 miR-224 对 HepG2 细胞中 EMT 标志物 mRNA 和蛋白水平表达的影响

应用 qPCR 法检测敲低 miR-224 的 HepG2 细胞中 E-cadherin、N-cadherin 及 vimentin mRNA 的表达情况。E-cadherin 的上游引物序列: 5'-CGAGA GCTACACGTTACGG-3'; 下游引物序列: 5'-GGCC TTTTACTGTAATCACACC-3'。N-cadherin 的上游引物序列: 5'-CAACTTGCCAGAAA ACTCCAGG-3'; 下游引物序列: 5'-ATGAAACCGGGCTATCTGCTC-3'。Vimentin 的上游引物序列: 5'-CGCCTG CAGGATGAGATTCAG-3'; 下游引物序列: 5'-TC AGGGAGGAAAAGTTTGAAA -3'。反应条件为 95 °C 预变性 60 s, 95 °C、15 s, 60 °C、40 s, 72 °C、40 s, 共 46 个循环。以每个荧光信号达到阈值时经历的循环次数作为 Ct 值, 相对表达量用  $2^{-\Delta Ct}$  法计算。

按照蛋白提取试剂盒操作流程抽提细胞总蛋白。按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书测定蛋白浓度。取适量蛋白样品进行 10% SDS-PAGE 分离蛋白, 将分离后的蛋白转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入稀释后的一抗 [兔抗人 E-cadherin, N-cadherin, vimentin 及 GAPDH (内参照) 单克隆抗体 (体积稀释比例分别为 1:2000、1:6000、1:2000 和 1:10000)], 在摇床上 4 °C 孵育过夜; 加入稀释的二抗 [辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (体积稀释比例为 1:10000)], 室温孵育 1 h 后, 用 TBST 清洗膜 3 次, 在 PVDF 膜上滴加电化学发光剂, 曝光、显影。

#### 1.11 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计学软件对所有的数据进行统计学分析, 所有实验均独立重复 3 次, 正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用秩和检验分析 miR-224 在肝癌组织及相应癌旁组织和血浆中的表达差异及其与临床病理资料间的关系, 两独立样本比较采用 *t* 检验和近似 *t* 检验, 且均为双侧检验。以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 在 GEO 数据库资料中 miR-224 的表达

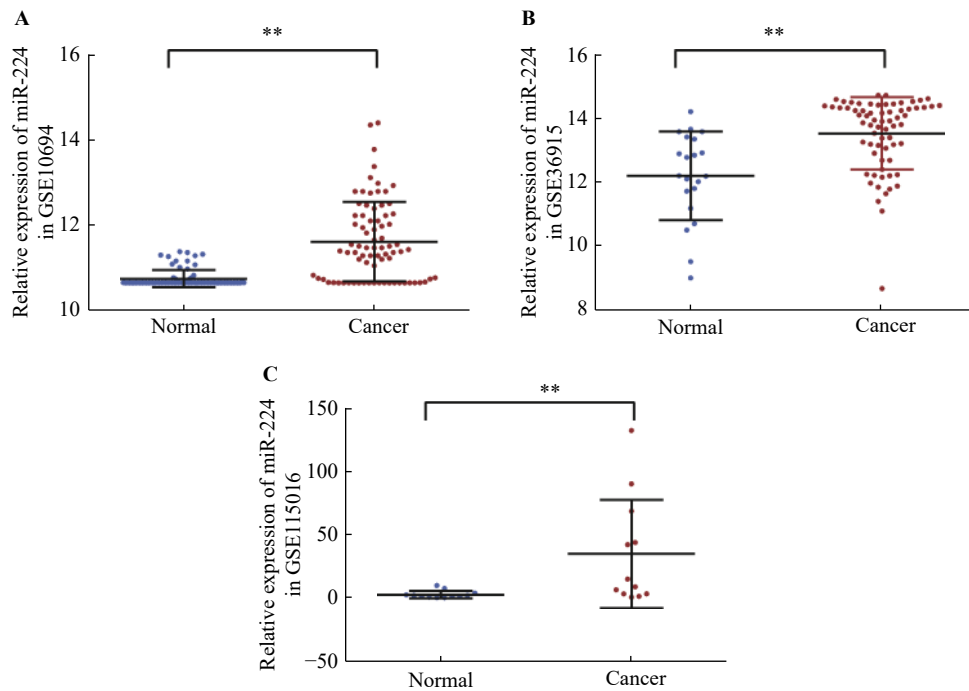
本研究从 GEO 数据库中下载获得 GSE10694、GSE36915 和 GSE115016 三个数据集 (表 1), 利用 R 和 GraphPad 软件分析上述数据集中 miR-224 在

肿瘤组织和正常组织中的表达, 结果(图 1)显示, miR-224 在肝癌患者肿瘤组织中的表达水平显著高于非肿瘤正常组织(在 GSE10694、GSE36915 和

GSE115016 数据集中分别为  $10.74 \pm 0.21$  vs  $11.61 \pm 0.93$ ,  $12.21 \pm 1.39$  vs  $13.79 \pm 1.04$  和  $3.40 \pm 0.88$  vs  $35.19 \pm 12.22$ , 均  $P < 0.01$ )。

表 1 3 个 GEO 数据集的详细信息  
Tab.1 Details of the three GEO data sets

Data set	Platform	Country	Year	Tumor tissues (n)	Normal tissues (n)
GSE10694	GPL6542	China	2012	78	78
GSE36915	GPL8179	China	2014	68	21
GSE115016	GPL21572	China	2017	12	12



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  A: GSE10694; B: GSE36915; C: GSE115016

图 1 miR-224 在 GEO 数据集集中的表达水平

Fig.1 miR-224 expression in the GEO datasets

2.2 miR-224 在肝癌患者组织和血清中高表达

qPCR 检测结果显示, miR-224 在肝癌患者肿瘤组织中的表达水平显著高于对应的癌旁组织 ( $3.96 \pm 1.40$  vs  $2.33 \pm 0.97$ ,  $P < 0.01$ , 图 2A); miR-224 在肝癌患者血浆中的相对表达水平也显著高于健康

人群 ( $10.14 \pm 1.57$  vs  $6.13 \pm 1.46$ ,  $P < 0.01$ , 图 2B)。进一步分析 miR-224 的表达水平与 80 例肝癌患者临床病理特征之间的相关性发现, miR-224 的表达水平与肝癌患者的 TNM 分期、淋巴结转移状态和肿瘤大小显著相关 ( $P < 0.05$ , 表 2)。

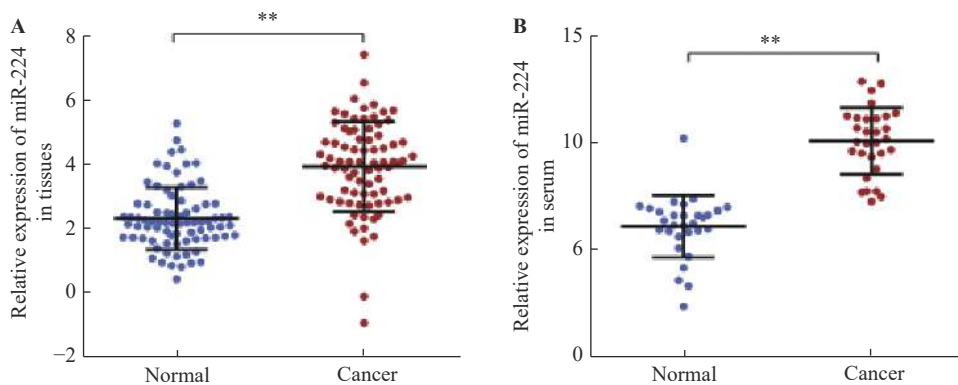


图 2 miR-224 在肝癌组织 (A) 和患者血浆 (B) 中的表达

Fig.2 Expression of miR-224 in tumor tissues (A) and plasma (B) of patients with hepatocellular carcinoma

表 2 miR-224 的表达水平与 80 例肝癌患者临床病理特征之间的相关性  
 Tab.2 Correlation between miR-224 expression and clinicopathological characteristics of 80 patients with hepatocellular carcinoma

Clinicopathological characteristics	Case (N)	miR-224		$\chi^2$	P
		Low	High		
Age (t/a)				0.011	0.560
<50	28	9	19		
≥50	42	13	29		
Gender				0.970	0.231
Male	55	24	31		
Female	25	8	17		
TNM stage				14.197	0.001
I + II	22	18	4		
III + IV	48	16	32		
Lymph node metastasis				5.527	0.017
Positive	36	20	16		
Negative	44	13	31		
Tumor size (d/cm)				12.075	0.001
<5	27	18	9		
≥5	53	14	39		

### 2.3 miR-224 与肝癌患者的生存时间之间的相关性

利用 80 例肝癌患者组织中 miR-224 的相对表达量分析其在肝癌患者诊断中的价值, ROC 分析结果 (图 3A) 显示, 曲线下面积为 0.933, 说明 miR-224 具有较强的肝癌诊断价值。为了进一步分析 miR-224 的表达与肝癌患者预后之间的相关性,

利用 Kaplan-Meier-plotter 数据库分析了 miR-224 的表达水平与肝癌患者总生存时间之间的相关性, 结果 (图 3B) 显示, miR-224 高表达组的肝癌患者的总生存时间均显著短于 miR-224 低表达组的肝癌患者 ( $HR=1.56$ ,  $95\%CI: 1.07\sim 2.28$ ,  $P=0.019$ )。

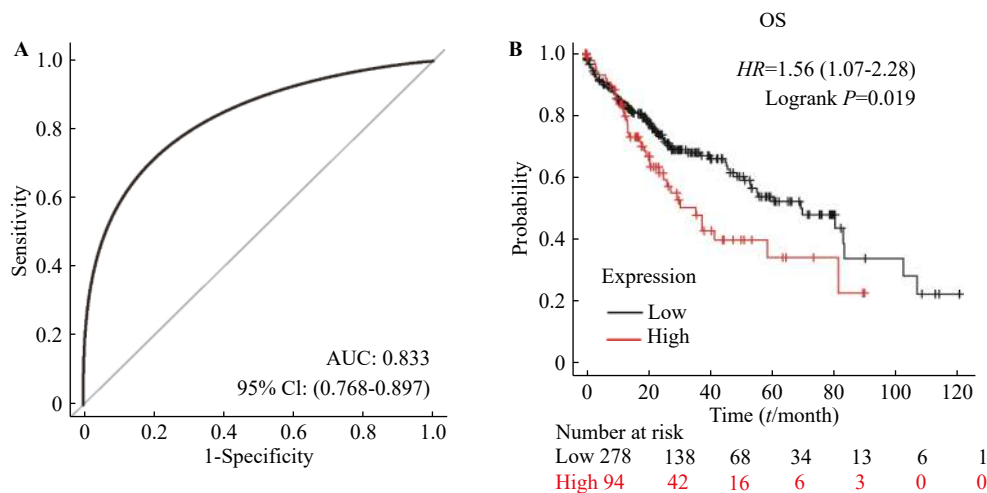


图 3 miR-224 在肝癌诊断方面的价值 (A) 及其表达水平与肝癌患者 OS (B) 之间的相关性  
 Fig.3 The diagnostic value of miR-224 (A) in hepatocellular carcinoma and its correlation with the OS (B) of hepatocellular carcinoma patients

### 2.4 miR-224 靶基因的富集分析

对所获得的 miR-224 的靶基因进行 GO 和 KEGG 通路富集分析发现, miR-224 主要参与的生物过程包括调节细胞生长、细胞生长老化、细胞的发育、甲状腺激素介导的信号传导途径、PI3K 信号传导途径以及磷脂酰肌醇介导的信号传导等 (图 4A)。而所

参与的信号通路主要为干细胞多能性的信号通路、mTOR 信号通路、晚期糖基化终产物 (Advanced glycation endproducts, AGE-RAGE) 信号通路、Rap1 信号通路、Ras 信号通路、ErbB 信号通路、HIF-1 信号通路以及 p53 信号通路等 (图 4B)。

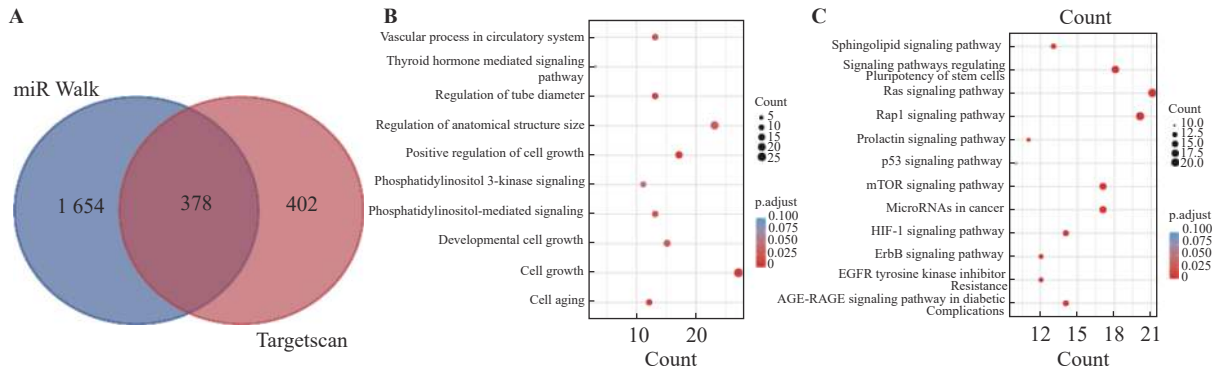


图 4 miR-224 靶基因的 GO ( A ) 和 KEGG ( B ) 富集分析  
 Fig.4 GO (A) and KEGG (B) enrichment analyses of miR-224 target genes

2.5 低表达 miR-224 显著抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖和侵袭能力

克隆形成实验结果 (图 5A) 显示, 沉默 miR-224 的表达后的 miR-224 inhibitor 组 HepG2 细胞克隆形成数较 NC 组明显减少 [(150.67±15.31) vs (188.67±18.01) 个,  $P<0.05$ ]。Transwell 小室实验分析结果 (图 5B) 显示, miR-224 inhibitor 组穿过人工基底膜的细胞数量较 NC 组明显减少 [(127.67±16.50) vs (78.04±15.39) 个,  $P<0.01$ ]。

2.6 敲低 miR-224 表达影响 HepG2 细胞中 EMT 相关蛋白表达

qPCR 分析结果 (图 6A) 显示, 与 NC 组相比, miR-224 inhibitor 组 HepG2 细胞中 E-cadherin mRNA 水平显著升高 ( $P<0.01$ ), N-cadherin 和 vimentin 基因的 mRNA 水平均明显降低 (均  $P<0.01$ )。WB 法分析结果 (图 6B) 显示, 敲低 miR-224 对 HepG2 细胞中上述基因的蛋白表达有相似影响。

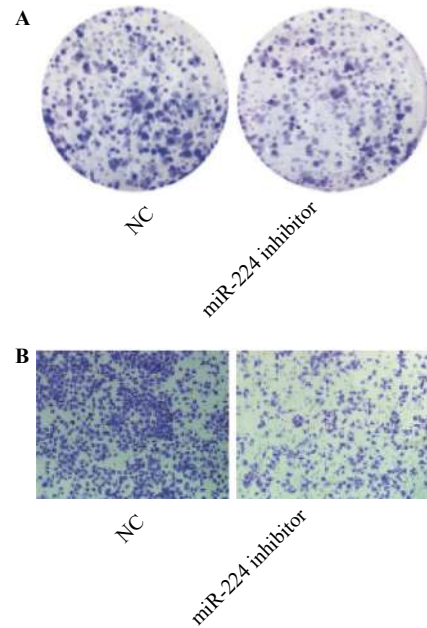


图 5 低表达 miR-224 抑制肝癌 HepG2 细胞的克隆形成 ( A ) 和侵袭 ( B ) 能力  
 Fig.5 Down-regulated expression of miR-224 inhibited the clone formation (A) and invasion (B) of hepatocellular carcinoma HepG2 cells

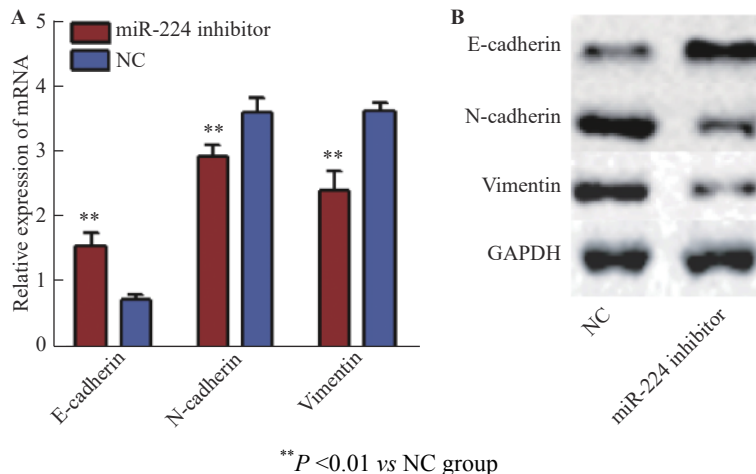


图 6 敲低 miR-224 表达对 HepG2 细胞中 EMT 标志物 E-cadherin、N-cadherin 和 vimentin 的 mRNA ( A ) 和蛋白 ( B ) 表达水平的影响  
 Fig.6 The effect of miR-224 knockdown on the mRNA (A) and protein (B) expressions of EMT markers E-cadherin, N-cadherin and vimentin in HepG2 cells

### 3 讨论

肝癌是全球范围内最常见的消化道恶性肿瘤之一, 尽管近年来诊疗手段的快速发展, 使得肝癌的诊断和治疗效果显著, 但肝癌患者的预后仍然较差, 因此寻找特异性的肿瘤标志物对于肝细胞癌的治疗尤为迫切。且近年来, 越来越多的研究<sup>[22-24]</sup>表明 miR-224 在恶性肿瘤的发生发展中发挥着重要的作用。

CUI 等<sup>[10]</sup>研究发现, miR-224 在 NSCLC 组织中的表达水平显著高于癌旁组织, 在转移性肺癌组织中表达水平更高, 且体外实验证明增加 miR-224 的表达水平会显著促进肺癌细胞的增殖、侵袭和迁移能力。同样, WANG 等<sup>[25]</sup>分析发现, miR-224 在 NSCLC 组织中高表达, 且通过靶向 PTEN/PI3K 信号通路在细胞自噬和凋亡等生物学过程中发挥重要作用。ZHU 等<sup>[26]</sup>研究发现, miR-224 在胰腺癌组织和细胞中的表达水平显著升高, 且 miR-224 的过表达明显促进了胰腺癌细胞的增殖、迁移和转移, 而敲减 miR-224 具有相反的作用。HE 等<sup>[27]</sup>研究发现, miR-224 在胃癌组织中高表达, 且其表达水平受 HIF-1 $\alpha$  的调控; 敲减 miR-224 可明显抑制缺氧诱导的细胞生长、迁移和侵袭以及体内肿瘤体积的生长, 而 miR-224 过表达产生相反的作用; 机制研究表明, 低氧诱导的 miR-224 通过下调 RASSF8 而促进胃癌细胞的生长、迁移和侵袭, 说明 miR-224 可作为低氧性胃癌潜在的治疗靶标。CHENG 等<sup>[28]</sup>发现, 与正常乳腺细胞相比, 转移性乳腺癌和非转移性乳腺癌细胞中的 miR-224 表达水平显著上调, 且 miR-224 抑制剂明显促进了乳腺癌细胞的自噬, miR-224/Smad4 调控自噬可能是导致乳腺癌转移的新型调控网络。而有多项研究<sup>[15, 29-30]</sup>结果表明, miR-224 在前列腺癌组织中的表达水平较正常组织显著下调, 敲减 miR-224 的表达能够显著提高前列腺癌细胞的增殖、侵袭和转移能力, 同时 miR-224 的表达水平降低与前列腺癌患者的预后较差显著相关。此外, CHEN 等<sup>[31]</sup>研究发现, miR-224 在前列腺癌细胞的免疫逃逸中发挥着重要的作用。研究<sup>[22, 32-33]</sup>发现, miR-224 在结直肠癌组织样本中的表达水平显著上调, 并且与疾病复发和预后不良显著相关。且过表达 miR-224 可显著促进肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力。本研究通过利用 GEO 数据库中的大样本数据以及临床肝癌患者的组织和血浆分析发现, miR-224 在肝癌患者的癌组织和血浆中表达水平显著升高, 且与肝癌患者的预后不良显著相关, 其具有成为肝癌诊断、预后标志物的潜力。功能富集分析发现, miR-224 主要参与 mTOR 信号

通路、AGE-RAGE 信号通路、Rap1 信号通路、Ras 信号通路、ErbB 信号通路、HIF-1 信号通路以及 p53 信号通路等肿瘤发生发展相关的信号通路。体外机制研究发现 miR-224 低表达可显著抑制肝癌细胞的增殖、侵袭和 EMT 进程。

综上所述, 本研究发现 miR-224 在肝癌患者的肿瘤组织和血浆中呈高表达, 具有成为肝癌诊断、预后标志物的潜力; 并且其参与了 mTOP、p53 等肿瘤相关信号通路, 敲低其表达能够抑制肝癌细胞的增殖、侵袭和 EMT 进程。本课题组将会进一步研究 miR-224 在肝癌中的具体作用机制, 以期对肝癌的早期诊断和治疗提供更多的参考依据。

### [参考文献]

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA: A Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424. DOI: 10.3322/caac.21492.
- [2] MILLER K D, NOGUEIRA L, MARIOTTO A B, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019[J]. *CA: A Cancer J Clin*, 2019, 69(5): 363-385. DOI: 10.3322/caac.21565.
- [3] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA: A Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.
- [4] BERINDAN-NEAGOE I, MONROIG P D C, PASCULLI B, et al. MicroRNAome genome: a treasure for cancer diagnosis and therapy[J]. *CA: A Cancer J Clin*, 2014, 64(5): 311-336. DOI: 10.3322/caac.21244.
- [5] MATKOVICH S J, HU Y, DORN G W. Regulation of cardiac microRNAs by cardiac microRNAs[J]. *Circ Res*, 2013, 113(1): 62-71. DOI: 10.1161/circresaha.113.300975.
- [6] CHEN X H, CAI S N, LI B X, et al. MicroRNA-21 regulates the biological behavior of esophageal squamous cell carcinoma by targeting RASA1[J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(3): 1627-1637. DOI: 10.3892/or.2018.6944.
- [7] YI Y, CHEN J, JIAO C, et al. Upregulated miR-193a-3p as an oncogene in esophageal squamous cell carcinoma regulating cellular proliferation, migration and apoptosis[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(6): 4779-4784. DOI: 10.3892/ol.2016.5229.
- [8] ANSARI M H, IRANI S, EDALAT H, et al. Deregulation of miR-93 and miR-143 in human esophageal cancer[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(3): 3097-3103. DOI: 10.1007/s13277-015-3987-9.
- [9] CUI M, YAO X, LIN Y, et al. Interactive functions of microRNAs in the miR-23a-27a-24-2 cluster and the potential for targeted therapy in cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(1): 6-16. DOI: 10.1002/jcp.28958.
- [10] CUI R, MENG W, SUN H L, et al. MicroRNA-224 promotes tumor progression in non-small cell lung cancer[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(31): E4288-E4297 [2020-07-11]. <https://www.pnas.org/content/112/31/E4288.long>. DOI: 10.1073/pnas.1502068112.
- [11] CONG L X, ZHANG F, SHANG H H. Notch1 targeted regulation

- of mir-224/LRIG2 signaling for the proliferation and apoptosis of cervical cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(4): 2304-2308. DOI: 10.3892/ol.2017.5676.
- [12] ZHU Y, XU A, LI J, et al. Fecal miR-29a and miR-224 as the noninvasive biomarkers for colorectal cancer[J]. *Cancer Biomark*, 2016, 16(2): 259-264. DOI: 10.3233/cbm-150563.
- [13] YANG C D, YUAN W B, YANG X, et al. Circular RNA circ-ITCH inhibits bladder cancer progression by sponging miR-17/miR-224 and regulating p21, PTEN expression[J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 19. DOI: 10.1186/s12943-018-0771-7.
- [14] HUANG S, QI P, ZHANG T, et al. The HIF-1 $\alpha$ /miR-224-3p/ATG5 axis affects cell mobility and chemosensitivity by regulating hypoxia-induced protective autophagy in glioblastoma and astrocytoma[J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(3): 1759-1768. DOI: 10.3892/or.2018.6929.
- [15] GAN B L, ZHANG L J, GAO L, et al. Downregulation of miR-224-5p in prostate cancer and its relevant molecular mechanism via TCGA, GEO database and in silico analyses[J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(6): 3171-3188. DOI: 10.3892/or.2018.6766.
- [16] KRISTENSEN H, HALDRUP C, STRAND S, et al. Hypermethylation of the GABRE~miR-452~miR-224 promoter in prostate cancer predicts biochemical recurrence after radical prostatectomy[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(8): 2169-2181. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-13-2642.
- [17] ZHANG L, HUANG L S, CHEN G, et al. Potential targets and clinical value of MiR-224-5p in cancers of the digestive tract[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(2): 682-700. DOI: 10.1159/000485281.
- [18] BARRETT T, WILHITE S E, LEDOUX P, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(D1): D991-D995. DOI: 10.1093/nar/gks1193.
- [19] AGARWAL V, BELL G W, NAM J W, et al. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs[J/OL]. *Elife*, 2015, 4: e05005 [2020-07-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26267216/>. DOI: 10.7554/elife.05005. DOI: 10.7554/elife.05005.
- [20] STICHT C, DE LA TORRE C, PARVEEN A, et al. miRWalk: an online resource for prediction of microRNA binding sites[J/OL]. *PLoS One*, 2018, 13(10): e0206239 [2020-07-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30335862/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0206239.
- [21] YU G C, WANG L G, HAN Y Y, et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. *Omics*, 2012, 16(5): 284-287. DOI: 10.1089/omi.2011.0118.
- [22] ZHOU J Z, HU M R, WANG F, et al. miR-224 controls human colorectal cancer cell line HCT116 proliferation by targeting Smad4[J]. *Int J Med Sci*, 2017, 14(10): 937-942. DOI: 10.7150/ijms.19565.
- [23] WANG M, DENG X, YING Q, et al. MicroRNA-224 targets ERG2 and contributes to malignant progressions of meningioma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 460(2): 354-361. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.03.038.
- [24] YU L, ZHANG J, GUO X, et al. MicroRNA-224 upregulation and AKT activation synergistically predict poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Epidemiol*, 2014, 38(4): 408-413. DOI: 10.1016/j.canep.2014.05.001.
- [25] WANG G, HAN J, ZHUANG L, et al. Serum starvation induces cell death in NSCLC via miR-224[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 3953-3962. DOI: 10.2147/ott.s186613.
- [26] ZHU G, ZHOU L, LIU H, et al. MicroRNA-224 promotes pancreatic cancer cell proliferation and migration by targeting the TXNIP-mediated HIF1 $\alpha$  pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 48(4): 1735-1746. DOI: 10.1159/000492309.
- [27] HE C, WANG L, ZHANG J, et al. Hypoxia-inducible microRNA-224 promotes the cell growth, migration and invasion by directly targeting RASSF8 in gastric cancer[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 35. DOI: 10.1186/s12943-017-0603-1.
- [28] CHENG Y, LI Z, XIE J, et al. MiRNA-224-5p inhibits autophagy in breast cancer cells via targeting Smad4[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 506(4): 793-798. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.10.150.
- [29] WAN Y, ZENG Z C, XI M, et al. Dysregulated microRNA-224/apelin axis associated with aggressive progression and poor prognosis in patients with prostate cancer[J]. *Hum Pathol*, 2015, 46(2): 295-303. DOI: 10.1016/j.humpath.2014.10.027.
- [30] LIN Z Y, HUANG Y Q, ZHANG Y Q, et al. MicroRNA-224 inhibits progression of human prostate cancer by downregulating TRIB1[J]. *Int J Cancer*, 2014, 135(3): 541-550. DOI: 10.1002/ijc.28707.
- [31] CHEN C H, LI S X, XIANG L X, et al. HIF-1 $\alpha$  induces immune escape of prostate cancer by regulating NCR1/NKp46 signaling through miR-224[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(1): 228-234. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.06.007.
- [32] ZHANG G J, ZHOU H, XIAO H X, et al. Up-regulation of miR-224 promotes cancer cell proliferation and invasion and predicts relapse of colorectal cancer[J]. *Cancer Cell Int*, 2013, 13(1): 104. DOI: 10.1186/1475-2867-13-104.
- [33] ZHANG X M, ZHANG X, LIU C, et al. MiR-224 promotes colorectal cancer cells proliferation via downregulation of P21WAF1/CIP1[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(3): 941-946. DOI: 10.3892/mmr.2014.1900.

[收稿日期] 2020-09-20

[修回日期] 2021-01-11

[本文编辑] 黄静怡