

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.09.001

• 基础研究 •

miR-369-3p 靶向 FGF9 信号通路调控肝癌细胞增殖与侵袭 *

李江斌¹ 何 丽² 董 瑞¹ 徐 岩¹ 鲁建国^{1Δ}

(1 中国人民解放军空军军医大学唐都医院普通外科 陕西 西安 710038;

2 中国人民解放军空军军医大学唐都医院感染科 陕西 西安 710038)

摘要 目的: 阐明脂代谢相关 miR-369-3p 在肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)病理组织中的表达特征及其与临床预后的相关性,解析 miR-369-3p 在 HCC 细胞中的作用性质及相应分子机理。**方法:** 实时定量 PCR 法检测 miR-369-3p 在 HCC 病理组织和细胞中的表达变化,并通过 Spearman's 法分析 miR-369-3p 表达水平与临床病理资料相关性;CCK-8 检测、Transwell 穿透小室实验和裸鼠荷瘤实验检测敲低内源性 miR-369-3p 表达后对 HCC 细胞增殖和侵袭性的影响作用;利用生物信息学分析、瞬时转染、定点突变和荧光素酶报告基因活性检测分析 miR-369-3p 对纤维母细胞生长因子 9(fibroblast growth factor 9, FGF9)的转录后调控作用。**结果:** miR-369-3p 在 HCC 病理组织 (n=68) 和细胞中异常低表达,且此低表达趋势与 HCC 患者预后呈显著负相关关系 ($\chi^2=6.907, P=0.0086$);敲低内源性 miR-369-3p 可显著促进 HCC 细胞的增殖、侵袭性;参与调控这一抑瘤效应的关键分子机制可能是 miR-369-3p 与 FGF9 的 3'-UTR 区直接结合,在转录后水平抑制 FGF9 mRNA 的稳定性,进而抑制后者表达水平。**结论:** miR-369-3p 可通过靶向 FGF9 信号在转录后调控水平负性调控肝癌细胞增殖和侵袭过程,在肝癌发生和进展过程中发挥关键抑癌作用。

关键词: 肝癌;miR-369-3p;增殖;侵袭;纤维母细胞生长因子 9;转录后调控

中图分类号: R-33;R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2020)09-1601-08

Regulation of Hepatocellular Carcinoma Cell Proliferation and Invasion
by miR-369-3p Via Targeting FGF9 Signaling Pathway*LI Jiang-bin¹, HE Li², DONG Rui¹, XU Yan², LU Jian-guo^{1Δ}

(1 Department of General Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China;

2 Department of Infectious Disease, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression and clinical relevance of miR-369-3p, a lipid metabolism-related miRNA, in hepatocellular carcinoma (HCC) tissues, and to reveal the functional details and corresponding molecular basis of miR-369-3p in HCC cells. **Methods:** Expression levels of miR-369-3p were determined in HCC cell lines and surgically removed HCC tissues using RT-qPCR analysis. Effects of miR-369-3p manipulation on HCC progression were evaluated using cell proliferation, cell invasion and xenograft assays. Finally, bioinformatics analysis, transient transfection, site-directed mutagenesis and luciferase reporter assay were incorporated to determine the potential regulation of fibroblast growth factor 9 (FGF9) expression by miR-369-3p. **Results:** miR-369-3p expression was markedly down-regulated in surgical HCC specimens (n=68), and this down-regulation trend correlated well to disease progression and predicted a poor prognosis in HCC patients ($\chi^2=6.907, P=0.0086$). Functionally, miR-369-3p depleted-cells had significantly higher proliferative, invasive and in vivo tumor formation potential, compared to Ctrl cells. One major mechanism accounting for the above-mentioned tumor suppressor effects of miR-369-3p is that miR-369-3p may inhibit the FGF9 expression at the posttranscriptional level via directly binding to its 3'-UTR. **Conclusion:** miR-369-3p may negatively regulate the proliferation and invasion of HCC cells by directly targeting the FGF9 signaling pathway at the posttranscriptional level. Collectively, miR-369-3p may function as a potent tumor suppressor during the development and progression of HCC.

Key words: Hepatocellular carcinoma (HCC); miR-369-3p; Proliferation; Invasion; Fibroblast growth factor 9 (FGF9); Posttranscriptional regulation

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)09-1601-08

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31271248)

作者简介:李江斌(1982-),男,博士,副教授,主要研究方向:肝癌恶性进展的分子机理研究,

E-mail: fengkai_2014@126.com; ljb0511@163.com

Δ 通讯作者:鲁建国,男,博士,教授,主要研究方向:肝癌恶性进展的分子机理研究, E-mail: lujguo@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2019-10-23 接受日期:2019-11-18)

前言

肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是全球范围内最常见恶性肿瘤之一, 发病率在所有癌症中位居第五, 致死率第二^[1,2]。目前研究明确, HCC 细胞的增殖与侵袭能力与疾病的发生、发展过程密切相关^[3,4], 鉴于此, 研究阐明促进 HCC 细胞发生增殖或侵袭的分子机制有助于找到新的更有效的治疗靶点。MicroRNAs (miRNAs) 是一类由内源基因编码的长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子, 它们通过结合于目标 mRNA 的 3' 非翻译区 (3'-UTRs) 在转录或者转录后水平调节靶基因的表达水平, 进而抑制蛋白表达量^[5]。大量研究显示, miRNAs 失调是包括癌症在内多种疾病发生的重要诱因之一; miRNAs 即可作为原癌基因又可作为抑癌基因发挥调节作用^[6]。先前相关研究中高通量分析显示, miR-369-3p 在消化管恶性组织中异常低表达^[7,8], 提示前者有可能作为抑癌分子发挥重要调节作用。然而, 目前针对 miR-369-3p 在 HCC 细胞中的具体作用及其相应分子机制还未见任何报道。

在本研究中, 我们选择研究 miR-369-3p 在 HCC 细胞增殖、侵袭过程中的表达特点及其作用性质, 主要基于以下原因: (1) miR-369-3p 为脂代谢相关 miRNA^[9], 而脂代谢紊乱是目前公认的参与 HCC 病理进展的关键代谢因素之一^[10,11]。(2) 细胞信号通路高通量分析显示, miR-369-3p 与参与调控细胞增殖、侵袭过程的关键信号通路 MAPK、PI3K-Akt 等通路均有重要 crosstalk^[9]。(3) 在先天性巨结肠^[12]、甲状腺癌^[13]和胃癌^[14]中, miR-369-3p 已被证实可通过调控细胞增殖、侵袭过程发挥对疾病的重要抑制 / 抵抗作用。在本研究中, 我们试图评估 miR-369-3p 在 HCC 病理组织中的表达特点、阐明 miR-369-3p 对 HCC 细胞增殖、侵袭的作用, 并剖析相应机制。

1 材料与方法

1.1 人肝癌病理组织样本

在获得所有患者的书面知情同意后, 我们获取了空军军医大学唐都医院普通外科 68 名患者的 HCC 组织和相应癌旁正常组织 (adjacent nontumorous liver tissues, ANLTs), 本课题参与 HCC 患者未接受任何放、化疗治疗。HCC 病理组织于手术取出后迅速置于液氮冷冻, 随后保存于 -80℃ 直到用时取出。本课题涉及人源材料的相关操作流程获中国人民解放军空军军医大学唐都医院伦理委员会批准, 研究方案严格遵守赫尔辛基公约相关规定。

1.2 细胞培养

人肝癌细胞系 (HepG2、SMC7721、HCCLM3、MHCC97-H 和 Huh-7) 及人正常肝细胞 Lo2 均购自美国菌种收集所 (ATCC, Rockville, MD, USA)。细胞培养于含有 10% 胎牛血清的杜尔伯克改良伊格培养基 (DMEM) 中, 培养温度 37℃ (5% CO₂)。

1.3 细胞转染

miR-369-3p 抑制剂、miR-369-3p 模拟物及相应阴性对照由广州 RiboBio 公司设计并合成, 细胞转染参考文献^[15]进行: HepG2 和 HCCLM3 细胞以 2×10^5 浓度接种于六孔板中, 每孔加 1 mL 不加抗生素的完全培养基。当细胞培养至 80% 融合率,

利用 HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen, Hilden, German) 进行 miR-369-3p 抑制剂、miR-369-3p 模拟物及相应阴性对照物的转染, 每种转染物按照 100nM 浓度转染。细胞转染 4-6 小时后, 弃去培养液, 细胞重悬于含 10% 胎牛血清的 DMEM 中继续培养 24 小时。稳定敲除 FGF9 的 HepG2 细胞构建: HepG2 细胞生长至对数期后, 常规胰蛋白酶消化后以 5×10^5 孔密度接种于六孔板中, 继续培养至 70-80% 细胞融合率, 随后利用 HiPerFect Transfection Reagent 在细胞中转染干扰质粒 pLKO.1-FGF9 或空白质粒 (Sigma-Aldrich, Shanghai, China), 转染 24 小时后在培养细胞中加入 400 μ g/mL 的 G418 (Thermo Fisher Scientific, Shanghai, China) 进行阳性克隆筛选, 筛选时间约为 2 周。最终利用蛋白免疫印迹确定 HepG2 细胞中的 FGF9 敲除效果。

1.4 细胞增殖检测

转染 24 小时后收获细胞, 并重悬于 96-孔板中, 每孔加 200 μ L 新鲜培养液, 细胞浓度为 2×10^3 孔, 利用 CCK-8 试剂盒 (Dojindo Laboratories, Shanghai, China) 每隔一天检测细胞增殖情况, 连续持续 5 天。CCK-8 检测: 每孔添加 10 μ L CCK-8 溶液, 于 37℃、5% CO₂ 条件下培养 24 小时, 之后利用 Bio-Tek 酶标仪检测 490 nm 吸光值。实验至少独立重复三次以上。

1.5 细胞侵袭性检测

参考文献^[15]利用 Transwell 穿透小室实验检测细胞侵袭性变化: 利用 BD 基质胶包被 Transwell 穿透小室上层, 随后将细胞以 1×10^5 密度接种于 Transwell 上层小室, 持续培养 48 小时后, 将上层细胞移去, 利用预冷的 4% 多聚甲醛将透过上层侵袭如下层的细胞固定 10 分钟后, 随后利用 0.1% 结晶紫染色液 (Sigma-Aldrich) 室温染色 10 分钟, 加入 500 μ L 的 33% 冰醋酸与细胞中, 利用分光光度测定法检测结晶紫在 570 nm 处的吸光度值, 进而评估细胞侵袭性变化。

1.6 体内荷瘤实验

在转染 miR-369-3p 抑制剂 48 小时后, 将肝癌细胞 HepG2 和 HCCLM3 种植于成年雄性 BALB/c 裸鼠体内获得异种移植瘤: 将转染后的细胞以 5×10^6 浓度与事先预冷的基质胶 (BD Bioscience, San Diego, CA, USA) 混合, 随后皮下注射于裸鼠背部侧面 (n=10/实验组)。老鼠饲养 ~5 周, 每隔 3 天利用游标卡尺测量肿瘤移植物的尺寸, 进而判断瘤细胞体内生长状况。肿瘤体积 = (长度 $\times$ 宽度²)/2^[16]; 瘤细胞接种后 30 天处死动物并收获瘤组织并拍照。本课题所用成年雄性 BALB/c 裸鼠从中国人民解放军空军军医大学实验动物中心获得, 所涉及动物实验操作步骤严格遵循美国国立卫生院发布《实验动物的护理和使用指南》(1996 修订版, No. 85-23) 相关规定并通过中国人民解放军空军军医大学唐都医院动物实验伦理委员会批准 (FMMU2016-4012)。所有动物操作均在戊巴比妥钠麻醉 (0.05 mg/g 体重, 腹腔注射) 下进行, 实验中采用一切可能方法减轻小鼠疼痛与不适。

1.7 RNA 提取和实时定量 PCR

参考文献报道^[17], 利用 QIAGEN 的 miRNeasy 提取试剂盒从肝癌组织或者细胞中提取 mRNA 和 miRNA, RNA 浓度和质量利用 Thermo Fisher Scientific 的 NanoDrop 分光光度计进行检测。cDNA 合成利用 TaKaRa 的 TaqMan[®] MicroRNA

reverse transcription kit 和 TaqMan® Universal PCR Master Mix RT 反应试剂盒 (Ambion, TX, USA) 来完成, RT 反应在 ABI 7500 fast 实时定量 PCR 系统中完成。hsa-miR-369-3p 引物^[18]、U6 snRNA 正向引物分别由 Sigma-Aldrich (MystiCq® microRNA qPCR Assay Primer, 产品号: MIRAP00347) 和 Agilent (产品号: 600750) 提供。其余靶基因引物: *FGF9*, 5'-GGACTAAACG-GCACCAGAAA-3' and 5'-CCATCCAAGCCTCCATCATA-3'^[17]; *GAPDH*, 5'-TCTCCTCTGACTTCAACAGCGA-3' and 5'-GTC-CACCACCCTGTTGCTGT-3'^[19]。各靶基因的相对表达含量利用 Ct 差值比较法 ($\Delta\Delta Ct$) 计算。

1.8 蛋白提取和免疫印迹检测

利用含有 Beyotime 蛋白酶抑制剂的放射免疫沉淀检测缓冲液 (RIPA) 来提取蛋白质, 蛋白浓度用 Beyotime 的 BCA 蛋白检测试剂盒测定。随后, 将 20 μ g 蛋白裂解物混合 7.5 μ L 上样混合液并在 100 °C 变形反应 5 分钟, 随后进行 10% SDS-PAGE 电泳, 电泳结束蛋白被转移至聚偏氟乙烯膜 (PVDF) 膜上。将 PVDF 膜用包含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液室温封闭 1 小时, 随后进行一抗杂交: *FGF9* (1:1000; ab71395; Abcam, Cambridge, MA, USA) 和 β -ACTIN (1:2000; ab8227, Abcam, Cambridge, MA, USA), 4 °C 孵育过夜。随后利用 TBST 洗涤杂交膜 15 分钟, 随后进行二抗杂交: 1:2000 (HRP Goat Anti-Rabbit 二抗, ab6721, Abcam; 用包含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液稀释), 室温反应 1 小时。杂交好的膜最终与 ECL™ Western Blotting Detection Reagents 的 A、B 混合液进行反应, 从而显示杂交的蛋白信号。

1.9 载体构建和双荧光素酶报告基因检测

我们从 Genecopoeia (Rockville, MD USA) 购得包含人 *FGF9* 3'-UTR 的 pEZ-XT01 质粒, 利用 *SacI*、*NotI* 酶切位点剪切下 *FGF9* 的 3'-UTR 片段, 克隆进 psiCHECK-2 载体 (Promega, Shanghai, China), 克隆位点为 *PmeI* 和 *NotI*。我们利用 Agilent Technologies 的 QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis 试剂盒突变 *FGF9* 3'-UTR 上包含 miR-369-3p 结合位点序列后, 将突变片段克隆进 psiCHECK-2 载体, 克隆引物为 5'-TGTAATAAATCAAGCAAGAGGCAGCCCTCCAGGAG-3' (forward) and 5'-CTCCTGGAGGGCTGCCTCTTGCTTGATTATTACA-3' (reverse)。随后利用 HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen, Hilden, German) 将 500 ng pMIR-REPOR-*FGF9*-WT、pMIR-REPOR-*FGF9*-Mut 以及 50 nM 的 miR-369-3p 模拟物和相应阴性对照共转染于 HepG2 细胞, 转染 48 小时后利用 Promega 双荧光素酶报告基因检测系统检测荧光素酶报告基因活性。

1.10 统计学分析

所有实验数据利用 SPSS 软件 (19.0 版本) 进行统计学分析 (双尾非配对 T 检验), 结果以均数 $\pm$ 标准差表示; miR-369-3p 与 *FGF9* 表达关系、miR-369-3p 表达含量与临床病理资料相关性均用 Spearman's 相关分析法进行统计分析。P < 0.05 被认为具有显著统计学差异。

2 结果

2.1 miR-369-3p 在人肝癌病理组织和肝癌细胞中异常低表达

为了研究 miR-369-3p 在肝癌细胞中的作用性质, 我们首先利用实时定量 PCR 考察了 miR-369-3p 在 68 例人肝癌病理组织 (HCC) 和 10 例癌旁正常组织 (ANLTs) 中的表达含量, 总体看来, miR-369-3p 在 HCC 中表达含量比在 ANLTs 中降低 ~58.4% ($P < 0.01$, 图 1A), 进一步与临床病理资料对比分析, 发现 miR-369-3p 低表达水平与 HCC 的肿瘤结节数目 ($P = 0.021$)、血管侵袭 ($P = 0.012$) 和肝癌分期 ($P = 0.007$) 均呈显著性相关关系 (表 1)。Kaplan-Meier 生存分析显示, 在 68 例肝癌患者中, miR-369-3p 低表达水平的患者其总体生存率较低 ($P = 0.0086$, $\chi^2 = 6.907$, 图 1B), 提示 miR-369-3p 表达水平与临床患者预后密切相关。为了进一步确定 miR-369-3p 表达趋势, 我们利用实时定量 PCR 检测了 miR-369-3p 在五种肝癌细胞系和一个人正常肝细胞中的表达差异情况, 结果显示, 相对于正常肝细胞, miR-369-3p 在五种肝癌细胞中表达量均显著降低 (图 1C)。以上结果高度提示, miR-369-3p 低表达水平很可能是肝癌细胞固有的内在特征之一。

2.2 抑制 miR-369-3p 内源性表达含量显著增强人肝癌细胞的增殖和侵袭性

为了在体外水平研究 miR-369-3p 在肝癌细胞中的作用特点, 我们首先利用瞬时转染 miR-369-3p 抑制剂的方法在 HepG2、HCCLM3 细胞中敲低了内源性 miR-369-3p 的表达含量 (图 2A)。随后连续 5 天细胞培养显示, 敲低 miR-369-3p 表达可显著增强细胞增殖状态 (图 2B、2C)。裸鼠荷瘤实验证实, 由 miR-369-3p 敲低的肝癌细胞其荷瘤速度明显高于对照组细胞, 尤其至瘤体生长末期, 提示敲低 miR-369-3p 表达对肝癌细胞的增殖的促进作用同样适用于体内环境 (图 2D、2E)。此外, 敲低 miR-369-3p 表达后, 肝癌细胞在 48 小时内从 Transwell 穿透小室上层侵袭进入下层的概率平均增加 2.9 倍 (HepG2 细胞)、1.4 倍 (HCCLM3 细胞), 因此, 敲低 miR-369-3p 表达同样促进肝癌细胞体外侵袭能力 (图 2F)。

2.3 miR-369-3p 通过直接靶向 *FGF9* 的 3'-UTR 区负性调控 *FGF9* 信号的表达水平

通过联合使用 microRNA.org、TargetScan 公共数据库, 我们发现 *FGF9* 的 3'-UTR 区含有与 miR-369-3p 结合的保守位点 (图 3A), 细胞表达检测显示, HepG2 细胞瞬时转染 miR-369-3p 抑制剂后, 可显著刺激 *FGF9* 蛋白的表达水平 (图 3B), 反之, HepG2 细胞瞬时转染 miR-369-3p 模拟物后, *FGF9* 蛋白表达水平锐减 (图 3C), 我们随后利用实时定量 PCR 证实, HepG2 细胞瞬时转染 miR-369-3p 模拟物后 *FGF9* mRNA 表达水平也显著降低 (图 3D), 以上结果提示 miR-369-3p 可能通过抑制影响 mRNA 的稳定性直接调控 *FGF9* 表达水平。为了进一步证实 miR-369-3p 与 *FGF9* 的 3'-UTR 区的相互作用, 我们构建了包含人 *FGF9* 3'-UTR 的野生型 psiCHECK-2-*FGF9*-Luc 和突变型 *FGF9* 的 3'-UTR 区与 miR-369-3p 结合位点的突变型 psiCHECK-2-*FGF9*-Luc 质粒, 随后的荧光素酶报告基因活性检测实验显示, HepG2 细胞瞬时转染 miR-369-3p 模拟物后, 可抑制 ~70.2% 的 *FGF9* 3'-UTR 区荧光素酶活性, 反之共转染突变型 psiCHECK-2-*FGF9*-Luc 质粒和 miR-369-3p 模拟物, 上述荧光素酶活性的抑制效应完全消失 (图 3E)。在随后的 Spearman's 相关性分析中, 我们还观察到在 68 例肝癌病理组

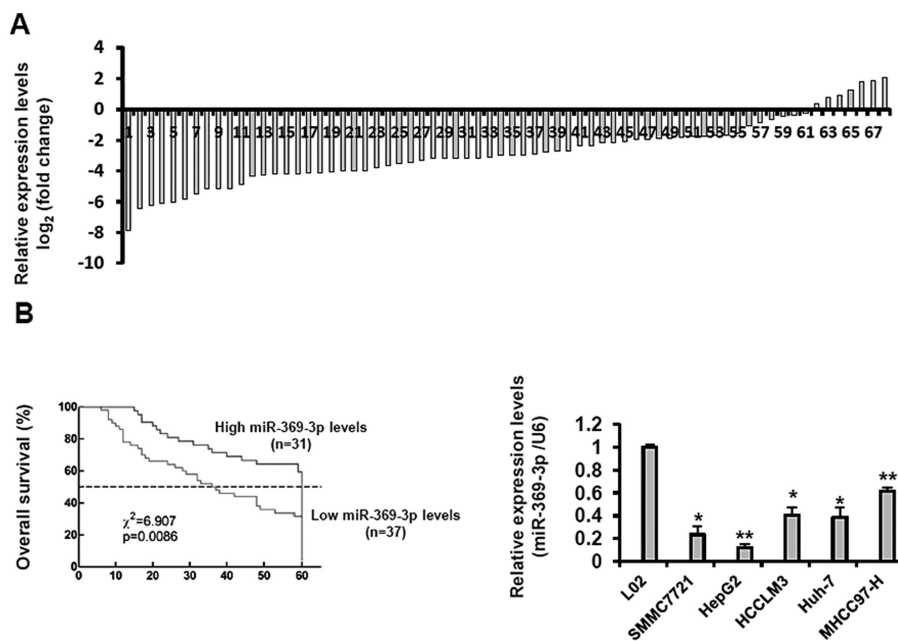


图1 miR-369-3p 在人肝癌病理组织和肝癌细胞中异常低表达

(A)实时定量 PCR 检测 miR-369-3p 在 68 例 HCC 病理组织和对应 68 例癌旁正常组织 (ANLTs) 中的表达水平;

(B)Kaplan-Meier 生存分析 miR-369-3p 表达含量与 68 例 HCC 患者总生存率的相关性;

(C)实时定量 PCR 检测 miR-369-3p 在不同 HCC 细胞和人正常肝细胞 Lo2 中的表达水平(*P<0.05 and **P<0.01)。

Fig. 1 miR-369-3p is significantly down-regulated in (A) Expression levels of miR-369-3p in 68 cases of HCC tissues and 68 cases of adjacent normal hepatic tissues (ANHTs) were evaluated using RT-qPCR. (B) Kaplan-Meier analysis of the association of miR-369-3p expression and overall survival of patients with HCC.

(C) Expression levels of miR-369-3p in different HCC cells and a normal human hepatic cell line Lo2 were assessed using RT-qPCR.

Each sample was analyzed in triplicate and values are expressed as levels (mean±S.D.) relative to the values in Lo2 cells (*P<0.05 and **P<0.01).

织中,miR-369-3p 表达水平与 *FGF9* mRNA 表达水平呈显著负相关关系($P=0.0177$, $r=-0.6625$,图 3F)。以上结果高度提示,在肝癌细胞中,miR-369-3p 可通过直接靶向 *FGF9* 的 3'-UTR 区负性调控 *FGF9* 信号的表达水平。

2.4 FGF9 抑制可有效逆转由于 miR-369-3p 缺失引起的肝癌细胞增殖和侵袭状态

为了进一步从功能上验证 miR-369-3p 对 *FGF9* 信号的负性调控作用,我们建立了稳定敲除 *FGF9* 的 HepG2 细胞 (HepG2^{FGF9-/-})。如图 4A 所示,在野生型 HepG2 细胞中瞬时转染 miR-369-3p 抑制剂后,可显著刺激 *FGF9* 蛋白的表达水平,而在 HepG2^{FGF9-/-} 细胞中瞬时转染 miR-369-3p 抑制剂后,*FGF9* 蛋白表达始终缺失,从侧面提示我们的细胞模型建立是成功的。随后的细胞增殖检测(图 4B)和细胞侵袭性分析(图 4C)显示,通过敲除 *FGF9* 表达,可完全逆转由于 miR-369-3p 缺失引起的肝癌细胞增殖和侵袭状态,提示 *FGF9* 信号是肝癌细胞中 miR-369-3p 最关键的下游效应分子。

3 讨论

大量研究证实,特定 miRNA 表达和功能紊乱,在恶性肿瘤的病理发生和恶性进展过程中发挥关键调控作用;目前研究表明有超过 50%的 miRNAs 位于染色体上癌症相关基因组片段或脆性部位^[20]。鉴于此,最近关于 miR-369-3p 在肿瘤生物学的作用及其机制引起了较多关注。miR-369-3p 在人恶性胶质瘤病理组织中异常低表达,在胶质瘤细胞中过表达外源性

miR-369-3p 后可显著抑制瘤细胞的增殖和迁移性^[21]。miR-369-3p 在人结直肠癌和骨肉瘤组织中均异常低表达^[22,23],过表达外源性 miR-369-3p 可显著抑制结直肠癌细胞的增殖和侵袭性,同时促进癌细胞的间质-上皮转换^[23]。类似的,miR-369-3p 在甲状腺癌^[13]和胃癌细胞^[7]中均发挥显著抑瘤效应。我们的研究结果与这些报道一致,miR-369-3p 在肝癌病理组织中异常低表达,且此低表达趋势与患者的预后呈显著负相关关系。综合以上结果推测,miR-369-3p 主要作为抑癌分子在不同类恶性肿瘤组织中发挥关键调控作用。然而最近一项研究显示,miR-369-3p 在顺铂耐药性非小细胞肺癌 (NSCLC) 病理组织中显著高表达,miR-369-3p 通过直接靶向核苷酸糖转运体 SLC35F5 而促进 NSCLC 细胞顺铂耐药性病理发生^[18]。根据以上研究结果,我们提出如下科学猜想:在肿瘤发生起始阶段,miR-369-3p 可能主要发挥抑癌功能,而在肿瘤恶性进展阶段,则以促瘤作用为主;miR-369-3p 在肿瘤细胞中的作用性质很可能与肿瘤类型、瘤细胞分化程度及所处细胞微环境密切相关。

通过功能丧失(loss-of-function)实验,我们证实 miR-369-3p 表达降低可显著提升肝癌细胞体外、体内增殖能力,实际上,miR-369-3p 对细胞增殖能力的调控作用在多种正常或肿瘤细胞中都有报道,例如,敲低 miR-369-3p 可显著抑制原代培养骨髓软骨细胞的增殖力,同时促进后者的肥大分化过程,因而 miR-369-3p 在长骨发育过程中发挥重要促进作用^[24]。在胃癌细胞,由于甲基化作用导致 miR-369-3p 表达水平降低,是引起胃癌细胞增殖力升高的重要因素之一^[7]。类似的,miR-369-3p 可分

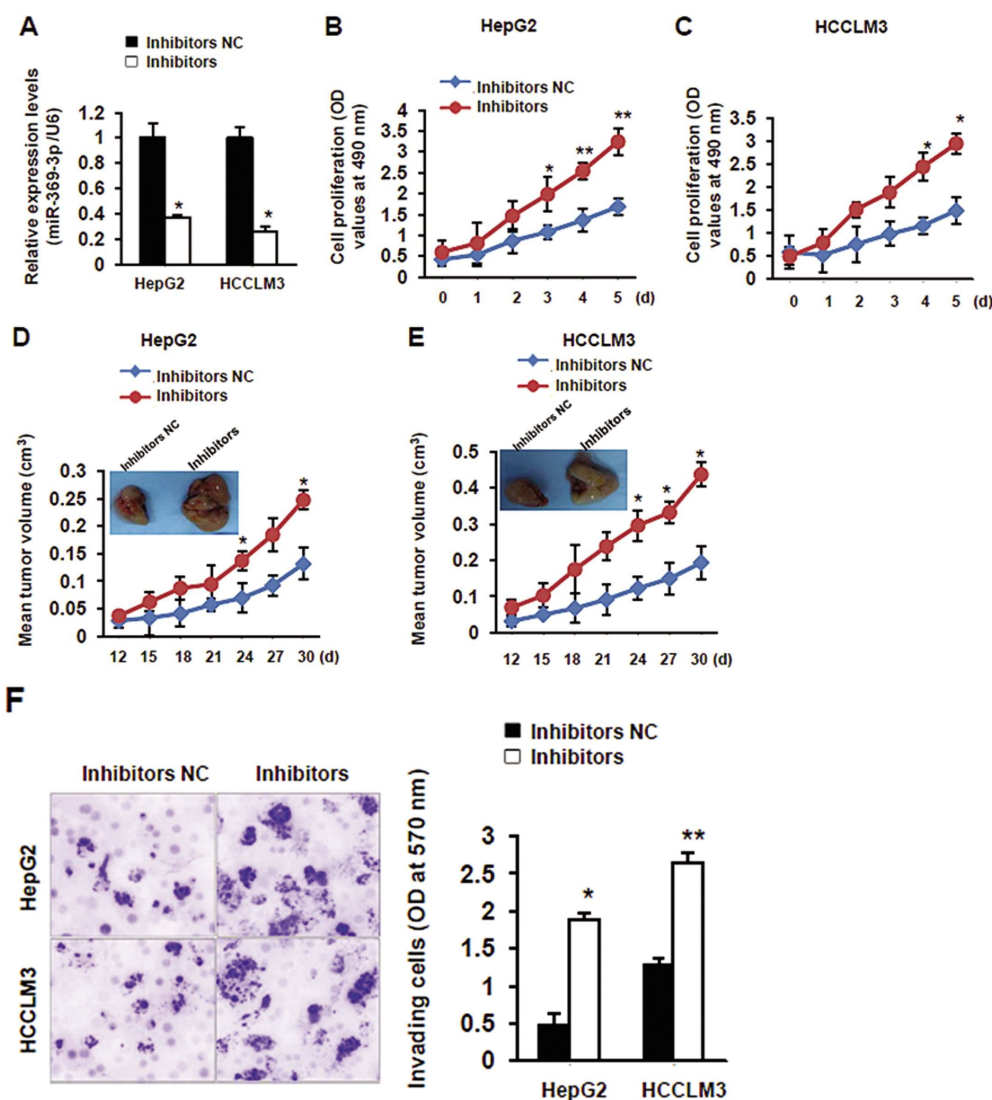


图2 敲低 miR-369-3p 表达水平显著促进肝癌细胞增殖、侵袭和体内成瘤特性

(A) 利用 HiPerFect 转染试剂分别在 HepG2、HCCLM3 细胞中转染 miR-369-3p 抑制剂或相应阴性对照 (Inhibitors-NC), 转染 48 小时后利用实时定量 PCR 检测 miR-369-3p 在细胞中的表达水平 (* $P < 0.05$); (B-C) 利用商品化的 CCK-8 试剂盒检测不同转染细胞的细胞增殖能力 (与 Inhibitors-NC 转染细胞比较 * $P < 0.05$ 和 ** $P < 0.01$); (D-E) 转染 48 小时后, 将细胞以 5×10^6 浓度皮下注射于成年雄性裸鼠背部侧面, 随后每隔 3 天利用游标卡尺测量肿瘤移植物的尺寸, 进而判断瘤细胞体内生长状况 (与 Inhibitors-NC 转染细胞比较 * $P < 0.05$ 和 ** $P < 0.01$); (F) 细胞转染 48 小时后, 利用 Transwell 穿透小室实验在 570 nm 处检测经过 48 小时培养后侵袭进入穿透小室下层的细胞光密度值, 进而判断细胞侵袭性变化 (与 Inhibitors-NC 转染细胞比较 * $P < 0.05$ 和 ** $P < 0.01$).

Fig. 2 miR-369-3p down-regulation promotes HCC cell proliferation, invasion and in vivo tumor formation

(A) HepG2 and HCCLM3 cells were transfected with synthetic miR-369-3p inhibitors or the corresponding negative controls (Inhibitors-NC) using HiPerFect Transfection Reagent for 48 h. Expression levels of miR-369-3p in HCC cells with different transfections were then determined by RT-qPCR (* $P < 0.05$). (B-C) Cell proliferation was determined using the CCK-8 kit, following the manufacturer's protocol (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared to the values in Inhibitors-NC-transfected cells). (D-E) 48 h after transfection, HCC cells (5×10^6) were injected subcutaneously into the upper flank regions of nude mouse (adult male BALB/c). The tumor size was then measured and recorded by caliper every three days (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared to the values in Inhibitors-NC-transfected cells). (F) Shown are the absorptions at 570 nm of cells treated with different transfection plus a 48-h culture, in the lower chambers of transwells (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$).

别通过靶向 SOX4 信号和 TSPAN13 信号抑制人神经母细胞瘤细胞和甲状腺癌细胞的增殖过程^[12,13]。据此推论, 对细胞增殖的负性调控作用可能是 miR-369-3p 生物学功能中最显著的一个作用特点。实际上, 先前细胞信号通路高通量分析已显示, miR-369-3p 与参与调控细胞增殖的关键信号通路 MAPK、PI3K-Akt 等通路均有重要 crosstalk^[9], 因此, 在随后的研究中, 我们将重点探讨 MAPK、PI3K-Akt 等通路可否通过干预

miR-369-3p 表达水平进而参与对肝癌细胞增殖和恶性进展过程的调控过程。

通过综合利用生物信息学分析、体外转染、定点突变和荧光素酶报告基因活性检测等研究手段, 我们鉴定出 FGF9 很可能是肝癌细胞中受 miR-369-3p 调控的直接下游靶点。大量研究证实, 纤维母细胞生长因子家族分子参与对肝脏发育、肝癌发生和进展的关键内分泌、旁分泌调控过程^[29]。涉及到 FGF9 的

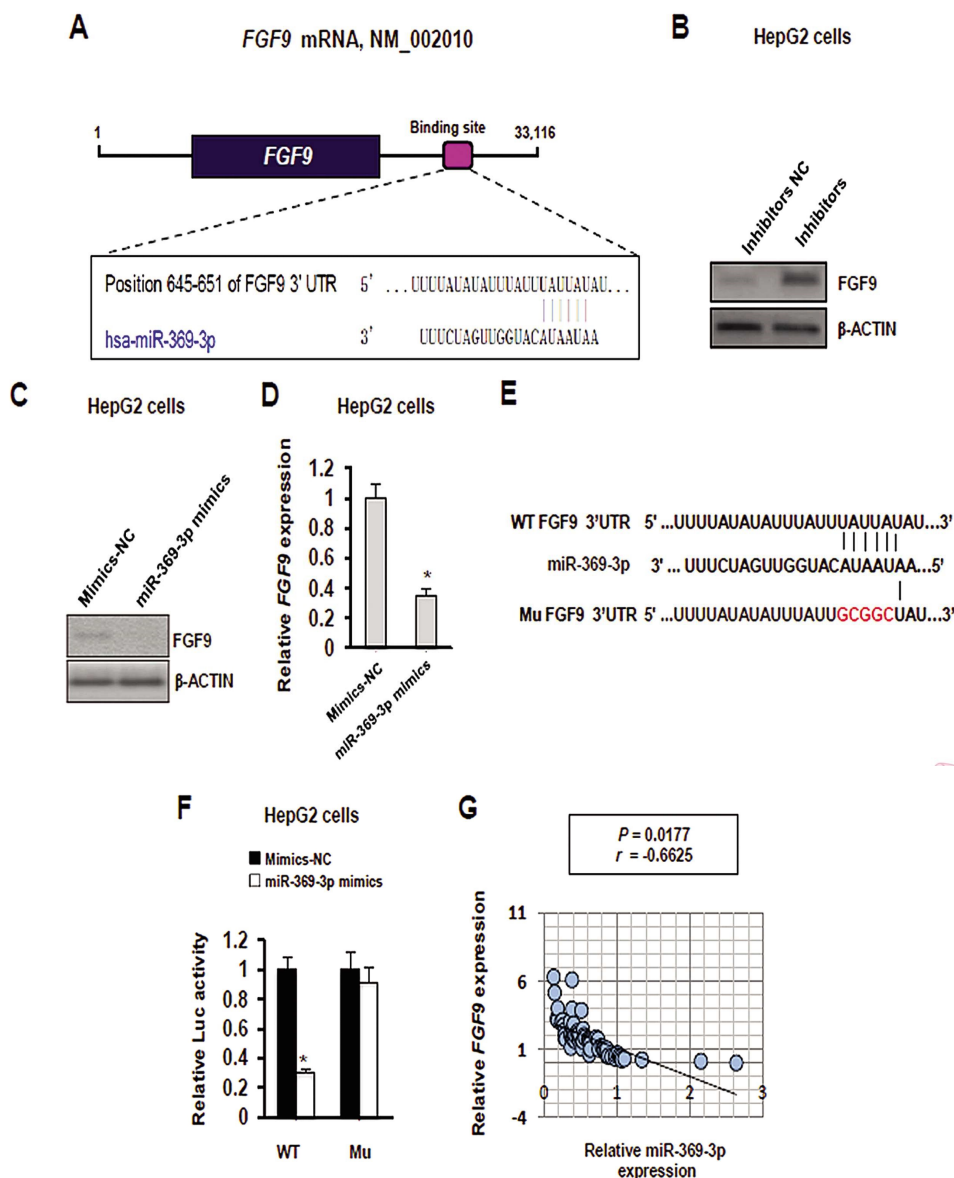


图3 肝癌细胞中 miR-369-3p 对 FGF9 的直接调控作用

(A)生物信息学分析显示 FGF9 的 3'-UTR 区含有 miR-369-3p 结合的保守位点;(B-C)在 HepG2 中瞬时转染 miR-369-3 抑制物 / 模拟物,同时转染相应阴性对照,转染 48 小时后利用蛋白质免疫印迹检测 FGF9 的表达水平;(D)在 HepG2 中瞬时转染 miR-369-3 模拟物,同时转染相应阴性对照,转染 48 小时后利用 RT-qPCR 检测 FGF9 mRNA 的表达水平 (与 Mimics-NC 转染细胞比较 $*P<0.05$);(E)图示 psiCHECK-2-FGF9-Luc-WT 和 psiCHECK-2-FGF9-Luc-Mu 质粒结构;(F)将 pMIR-REPOR-FGF9-WT、pMIR-REPOR-FGF9-Mut 以及 miR-369-3p 模拟物和相应阴性对照共转染于 HepG2 细胞,转染 48 小时后利用 Promega 双荧光素酶报告基因检测系统检测荧光素酶报告基因活性(与 Mimics-NC 转染细胞比较 $*P<0.05$);(G)RT-qPCR 结合 Spearman's 相关分析法分析 miR-369-3p 与 FGF9 mRNA 在 68 例 HCC 病理组织中的表达关系。

Fig. 3 miR-369-3p directly targets fibroblast growth factor 9 (FGF9) in HCC cells

(A)Elucidation of the putative binding site of miR-369-3p on the 3'-UTR of FGF9 gene by bioinformatics analysis. (B-C) HepG2 cells were transfected with miR-369-3p mimics/inhibitors, along with the corresponding negative controls, for 48 h, followed by Western blotting analysis. (D) HepG2 cells were transfected with miR-369-3p mimics or Mimics-NC for 48 h, followed by RT-qPCR analysis. ($*P<0.05$ compared to the values in Mimics-NC-transfected cells). (E) Diagram showing the structure of psiCHECK-2-FGF9-Luc-WT and psiCHECK-2-FGF9-Luc-Mu plasmids. (F) Luciferase reporter assay with co-transfection of psiCHECK-2-FGF9-Luc-WT or psiCHECK-2-FGF9-Luc-Mu and miR-369-3p mimics in HepG2 cells ($*P<0.05$ compared to the values in Mimics-NC-transfected cells). (G) Correlation between miR-369-3p levels and FGF9 mRNA expression in HCC specimens ($n=68$) was determined using RT-qPCR, followed by the Spearman's test.

具体作用,有两个特点需要重点强调下:① FGF9 敲除小鼠其肝功并无异常^[26];而在肝损伤模型中,FGF9 在肝星形细胞中迅速高表达,并可通过胸腺嘧啶核苷的掺入而显著增强肝细胞损伤后的增殖能力^[27]。考虑到肝星形细胞对肝纤维化、肝癌发生过程中的关键作用^[28],这些研究结果提示 FGF9 可能通过旁分泌

调控方式促进肝细胞增殖、进而促进肝纤维化、肝癌的病理发生过程。② 在所有 FGF 家族分子中,目前研究比较明确的是在肝细胞中,FGF5、FGF9 主要受 miRNAs 的精细调控,例如,最新研究显示,miR-140-5p 可通过直接靶向 FGF9 信号促进肝癌细胞的增殖和转移过程^[16]。我们的研究进一步拓展了对肝癌细胞

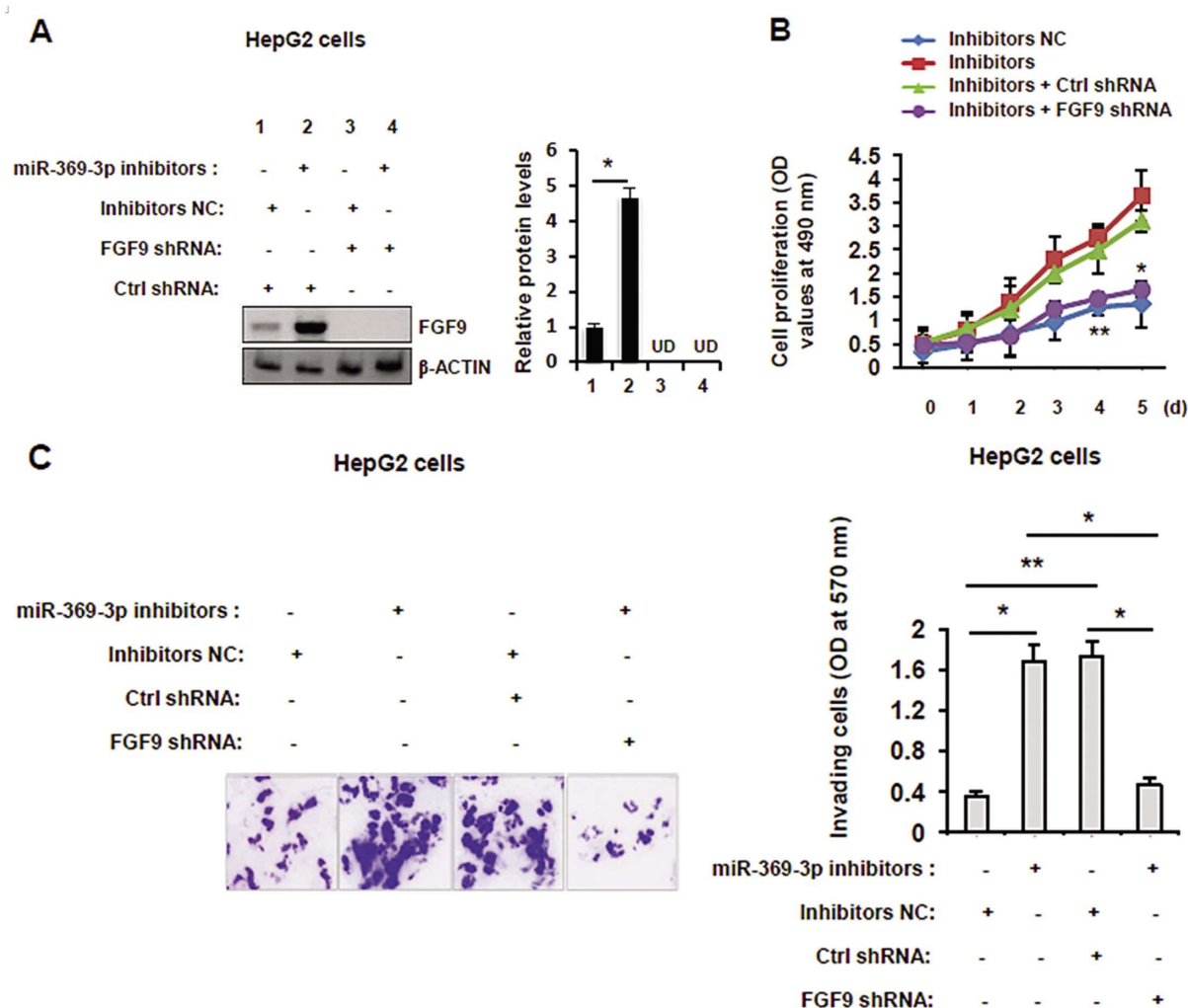


图 4 在 HepG2 细胞中稳定敲除 FGF9 可成功逆转 miR-369-3p 缺陷诱导的 HCC 细胞增殖与侵袭性

(A) HepG2^{FGF9-/-} 细胞构建方法详见“材料与方法”。HepG2^{FGF9-/-} 细胞与对照细胞瞬时转染 miR-369-3p 抑制物;转染 48 小时后,利用蛋白质免疫印迹检测 FGF9 的表达水平;右图,蛋白相对定量分析,UD,未检测到。(B)利用商品化的 CCK-8 试剂盒检测不同转染细胞的细胞增殖能力(与 Inhibitors + Ctrl shRNA 转染细胞比较 * $P<0.05$ 和 ** $P<0.01$);

(C)细胞转染 48 小时后,利用 Transwell 穿透小室实验在 570 nm 处检测经过 48 小时培养后侵袭进入穿透小室下层的细胞光密度值,进而判断细胞侵袭性变化(与 Inhibitors + Ctrl shRNA 转染细胞比较 * $P<0.05$ 和 ** $P<0.01$)。

Fig. 4 Stable knockdown of FGF9 abrogates miR-369-3p deficiency-induced HCC cell proliferation and invasion in HepG2 cells

(A) HepG2^{FGF9-/-} cells were generated as described in the 'MATERIALS AND METHODS' section. HepG2^{FGF9-/-} cells and control cells were transiently transfected with miR-369-3p inhibitors for 48 h, followed by Western blot analysis. Right panel, densitometric scanning of immunoblots. UD, undetectable. (B) Cell proliferation was determined using the CCK-8 kit, following the manufacturer's protocol (* $P<0.05$ and ** $P<0.01$ compared to Inhibitors + Ctrl shRNA cells). (C) Shown are the absorptions at 570 nm of cells treated with different transfection plus a 48-h culture, in the lower chambers of transwells (* $P<0.05$ and ** $P<0.01$).

胞中 miRNAs 靶向 FGF9 的调控网络的认识^[29, 30],据此推测, FGF9 可能通过旁分泌调控方式(肝星形细胞)和 miR-140-5p 或 miR-369-3p 介导的自身转录后调控方式(肝细胞),发挥对肝细胞增殖的重要调控作用。因此,继续深入研究 miR-369-3p/FGF9 调控网络的上下游作用机理将为阐明促进肝癌细胞增殖加速进而导致恶性进展加剧的关键作用机理提供重要新线索。

综上,本课题研究结果显示,脂代谢相关 miR-369-3p 可通过靶向 FGF9 信号负性调控肝癌细胞增殖和侵袭过程,在肝癌发生和进展过程中发挥关键抑癌作用;我们的临床资料分析也提示 miR-369-3p 表达水平变化可能作为肝癌预后的

一个潜在的生物标志物;对其作用机制的深入研究具有重要转化医学意义。

参考文献(References)

- [1] Xu X, Chen J, Wei Q, et al. Clinical practice guidelines on liver transplantation for hepatocellular carcinoma in China (2018 edition) [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2019, 18(4): 307-312
- [2] Xu XF, Xing H, Han J, et al. Risk Factors, Patterns, and Outcomes of Late Recurrence After Liver Resection for Hepatocellular Carcinoma: A Multicenter Study From China[J]. JAMA Surg, 2019, 154(3): 209-217
- [3] Yang X, Zhang D, Liu S, et al. KLF4 suppresses the migration of hepatocellular carcinoma by transcriptionally upregulating

- monoglyceride lipase[J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(6): 1019-1029
- [4] Qian YY, Liu ZS, Yan HJ, et al. Pterostilbene inhibits MTA1/HDAC1 complex leading to PTEN acetylation in hepatocellular carcinoma[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 101: 852-859
- [5] Sulas P, Di Tommaso L, Novello C, et al. A Large Set of miRNAs Is Dysregulated from the Earliest Steps of Human Hepatocellular Carcinoma Development[J]. *Am J Pathol*, 2018, 188(3): 785-794
- [6] Koduru SV, Leberfinger AN, Kawasawa YI, et al. Non-coding RNAs in Various Stages of Liver Disease Leading to Hepatocellular Carcinoma: Differential Expression of miRNAs, piRNAs, lncRNAs, circRNAs, and sno/mt-RNAs[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 7967
- [7] Dong L, Zhang Z, Xu J, et al. Consistency analysis of microRNA-arm expression reveals microRNA-369-5p/3p as tumor suppressors in gastric cancer[J]. *Mol Oncol*, 2019, 13(7): 1605-1620
- [8] Zou Y, Yao S, Chen X, et al. LncRNA OIP5-AS1 regulates radioresistance by targeting DYRK1A through miR-369-3p in colorectal cancer cells[J]. *Eur J Cell Biol*, 2018, 97(5): 369-378
- [9] Lopez S, Bermudez B, Montserrat-de la Paz S, et al. A microRNA expression signature of the postprandial state in response to a high-saturated-fat challenge[J]. *J Nutr Biochem*, 2018, 57: 45-55[Epub ahead of print]
- [10] Li Z, Guan M, Lin Y, et al. Aberrant Lipid Metabolism in Hepatocellular Carcinoma Revealed by Liver Lipidomics[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(12): pii: E2550
- [11] Skill NJ, Scott RE, Wu J, et al. Hepatocellular carcinoma associated lipid metabolism reprogramming[J]. *J Surg Res*, 2011, 169(1): 51-56
- [12] Pan W, Yu H, Zheng B, et al. Upregulation of MiR-369-3p suppresses cell migration and proliferation by targeting SOX4 in Hirschsprung's disease[J]. *J Pediatr Surg*, 2017, 52(8): 1363-1370
- [13] Li P, Dong M, Wang Z. Downregulation of TSPAN13 by miR-369-3p inhibits cell proliferation in papillary thyroid cancer (PTC) [J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2019, 19(2): 146-154
- [14] Hao E, Yu J, Xie S, et al. Up-regulation of miR-888-5p in hepatocellular carcinoma cell lines and its effect on malignant characteristics of cells[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2017, 31(1): 163-169
- [15] Zhao G, Li Y, Wang T. Potentiation of docetaxel sensitivity by miR-638 via regulation of STARD10 pathway in human breast cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 487(2): 255-261
- [16] Yang H, Fang F, Chang R, et al. MicroRNA-140-5p suppresses tumor growth and metastasis by targeting transforming growth factor beta receptor 1 and fibroblast growth factor 9 in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2013, 58(1): 205-217
- [17] Rao C, Miao X, Zhao G, et al. MiR-219a-5p enhances cisplatin sensitivity of human non-small cell lung cancer by targeting FGF9[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 114: 108662. [Epub ahead of print]
- [18] Hao GJ, Ding YH, Wen H, et al. Attenuation of deregulated miR-369-3p expression sensitizes non-small cell lung cancer cells to cisplatin via modulation of the nucleotide sugar transporter SLC35F5 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 488(3): 501-508
- [19] Cai W, Chen G, Luo Q, et al. PMP22 Regulates Self-Renewal and Chemoresistance of Gastric Cancer Cells[J]. *Mol Cancer Ther*, 2017, 16(6): 1187-1198
- [20] 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 Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424
- [21] Shahar T, Granit A, Zrihan D, et al. Expression level of miRNAs on chromosome 14q32.31 region correlates with tumor aggressiveness and survival of glioblastoma patients[J]. *J Neurooncol*, 2016, 130(3): 413-422
- [22] Thayanithy V, Sarver AL, Kartha RV, et al. Perturbation of 14q32 miRNAs-cMYC gene network in osteosarcoma[J]. *Bone*, 2012, 50(1): 171-181
- [23] Wang J, Wang H, Liu A, et al. Lactate dehydrogenase A negatively regulated by miRNAs promotes aerobic glycolysis and is increased in colorectal cancer[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(23): 19456-19468
- [24] Jee YH, Wang J, Yue S, et al. mir-374-5p, mir-379-5p, and mir-503-5p Regulate Proliferation and Hypertrophic Differentiation of Growth Plate Chondrocytes in Male Rats[J]. *Endocrinology*, 2018, 159(3): 1469-1478
- [25] Itoh N, Nakayama Y, Konishi M. Roles of FGFs As Paracrine or Endocrine Signals in Liver Development, Health, and Disease [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2016, 4: 30
- [26] Colvin JS, White AC, Pratt SJ, et al. Lung hypoplasia and neonatal death in Fgf9-null mice identify this gene as an essential regulator of lung mesenchyme[J]. *Development*, 2001, 128(11): 2095-2106
- [27] Antoine M, Wirz W, Tag CG, et al. Expression and function of fibroblast growth factor (FGF) 9 in hepatic stellate cells and its role in toxic liver injury[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 361(2): 335-341
- [28] Makino Y, Hikita H, Kodama T, et al. CTGF Mediates Tumor-Stroma Interactions between Hepatoma Cells and Hepatic Stellate Cells to Accelerate HCC Progression[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(17): 4902-4914
- [29] Li K, Pan J, Wang J, et al. MiR-665 regulates VSMCs proliferation via targeting FGF9 and MEF2D and modulating activities of Wnt/ β -catenin signaling[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(10): 4402-4414
- [30] He X, Chen SY, Yang Z, et al. miR-4317 suppresses non-small cell lung cancer (NSCLC) by targeting fibroblast growth factor 9 (FGF9) and cyclin D2 (CCND2)[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 230