

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.03.006

· 基础研究 ·

miRNA 通过 *Mcl-1* 基因调控 HBV 阳性肝癌细胞对索拉菲尼的敏感性

黄锐¹, 伍刚¹, 许健¹, 郑波¹, 黄凌远², 赵婵娟³, 钟振东⁴ (1. 四川省医学科学院 四川省人民医院 肝胆外科, 四川 成都 610072; 2. 成都里来生物科技有限公司, 四川 成都 610000; 3. 四川大学 华西第二医院, 四川 成都 610041; 4. 四川省医学科学院 四川省人民医院 实验动物研究所, 四川 成都 610212)

[摘要] **目的:** 探讨干预 HBV 阳性肝癌细胞相关 miRNAs 对肝癌细胞索拉菲尼敏感性的影响。**方法:** qPCR 检测 HepG2.2.15 (HBV 阳性) 和 HepG2.vc (HBV 阴性) 肝癌细胞中 miR-29、miR-101 和 miR-193b 的表达, 以 HepG2.2.15 细胞中低表达的 miRNA 合成相应的 miRNA mimics, 并将目标 miRNA mimics 分别转染至 HepG2.2.15 和 HepG2.vc 细胞; qPCR 检测两种细胞中目标 miRNA 表达, Western blotting 检测目标 miRNA mimics 转染前后 Mcl-1 蛋白表达。同时分别向转染和非转染的 HepG2.2.15 和 HepG2.vc 细胞中分别加入 $(1 \times 10^{-9}) \sim (1 \times 10^{-3})$ mol/L 的索拉菲尼, 72 h 后测定索拉菲尼对细胞作用的 IC₅₀ 值和细胞凋亡率。**结果:** 与 HepG2.vc 细胞比较, HepG2.2.15 细胞中 miR-193b 的表达显著降低 ($P < 0.05$); 与 miR-193b mimics 转染前比较, HepG2.2.15 和 HepG2.vc 细胞中 miR-193b 的表达均有显著升高 ($P < 0.05$)。与 HepG2.vc 细胞比较, HepG2.2.15 细胞中 Mcl-1 蛋白表达显著增高 ($P < 0.05$); miR-193b mimics 转染后, HepG2.2.15 和 HepG2.vc 细胞中 Mcl-1 蛋白表达较两者转染前均有显著降低 ($P < 0.05$); miR-193b mimics 转染后, 索拉菲尼可显著增加两组细胞的凋亡率 ($P < 0.01$), 同时其对两组细胞作用的 IC₅₀ 值显著降低 [HepG2.2.15 细胞: (0.215 ± 0.028) vs (0.391 ± 0.025) mol/L, HepG2.vc 细胞: (0.315 ± 0.027) vs (0.654 ± 0.019) mol/L; 均 $P < 0.01$]。**结论:** HBV 相关肝癌细胞中 miR-193b 的低表达可能是癌细胞对索拉菲尼敏感性降低的原因, Mcl-1 可能为 miR-193b 的靶点, miR-193b mimics 与索拉菲尼具有显著协同作用。

[关键词] 乙型肝炎病毒; 肝癌; Mcl-1; miRNA; 索拉菲尼

[中图分类号] R735.7; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)03-0246-06

miRNA regulating the sensitivity of HBV-positive hepatocellular carcinoma cells to sorafenib by *Mcl-1* gene

HUANG Rui¹, WU Gang¹, XU Jian¹, ZHENG Bo¹, HUANG Lingyuan², ZHAO Chanjuan³, ZHONG Zhendong⁴ (1. Hepatobiliary Surgery People's Hospital of Sichuan Province, Sichuan Provincial Academy of Medical Sciences, Chengdu 610072, Sichuan, China; 2. Chengdu Lilai Biotechnology CO. LTD, Chengdu 610000, Sichuan, China; 3. Second Affiliated Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan, China; 4. Research Institute of Laboratory Animals, Sichuan Academy of Medical Sciences Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610212, Sichuan, China)

[Abstract] Objective: To investigate the miRNAs that can intervene *Mcl-1* expression in HBV-related liver cancers and to study their synergistic anti-cancer effect with sorafenib. **Methods:** The expressions of miR-29, miR-101 and miR-193b in HepG2.2.15 (HBV positive) and HepG2.vc (HBV negative) cells were detected by qPCR. miRNA mimics of low expressed genes in HepG2.2.15 cells were synthesized and transfected into HepG2.2.15 and HepG2.vc cells, respectively. qPCR was used to detect target miRNA expression. Western blotting was used to detect the expression of mcl-1 protein in cells before and after transfection. At the same time, $(1 \times 10^{-9}) \sim (1 \times 10^{-3})$ mol/L of sorafenib was add to both transfected and non-transfected HepG2.2.15 and HepG2.vc cells; 72 h later, the IC₅₀ and cell apoptosis was evaluated. **Results:** The expression of miR-193b in HepG2.2.15 cells was significantly lower than that in HepG2.2.15 cells ($P < 0.05$). The expression of miR-193b in HepG2.2.15 cells and HepG2.2.15 cells was significantly higher after miR-193b mimics transfection ($P < 0.05$). Compared with HepG2.vc cells, the expression of Mcl-1 protein in HepG2.2.15 cells was significantly increased ($P < 0.05$). The expression of Mcl-1 protein in HepG2.2.15 and HepG2.vc cells was significantly decreased after miR-193b mimics transfection ($P < 0.05$). After miR-193b mimics transfection, sorafenib could significantly increase apoptosis rate of both HepG2.2.15 and HepG2.vc cells. **Conclusion:** The low susceptibility of HBV-related liver cancer to sorafenib may be related with the low expres-

[基金项目] 四川省卫生厅资助项目 (No. 17PJ587)。Project supported by the Foundation of Health Department of Sichuan Province (No. 17PJ587)

[作者简介] 黄锐 (1972-), 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事肝胆胰脾肿瘤临床治疗和科研, E-mail: 790710374@qq.com

[通信作者] 钟振东 (ZHONG Zhendong, corresponding author), 博士, 研究员, 主要从事毒理病理学研究, E-mail: 511738602@qq.com

sion of miR-193b in cancer cells. *Mcl-1* might be used as a target of miR-193b, and miR-193b mimics have a significant synergistic effect with sorafenib.

[Key words] HBV; hepatocellular carcinoma; miRNA; sorafenib

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(3): 246-251. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.03.006]

原发性肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 发病较隐匿, 临床上发现时多属中晚期, 外科手术往往效果不佳, 故学界提倡以手术为主的综合治疗。其中分子药物靶向治疗是近年来发展的一种潜力巨大的疗法, 以索拉菲尼 (sorafenib) 为代表的靶向药物在 HCC 治疗中发挥重要作用。HCC 的病因较多, 在中国及西非地区, 乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染是重要致癌因素, 而在欧美地区则以丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 感染为主。有研究小组^[1]认为, HCV 感染的肝癌可能对索拉菲尼更为敏感。Fleischer 等^[2]研究发现, 抗凋亡促存活蛋白髓样细胞白血病-1 (myeloid cell leukemia-1, *Mcl-1*) 在肝癌组织中呈过量表达状态, 采用 PI3K 抑制剂 LY294002 可迅速下调肝癌细胞内 *Mcl-1* 水平并增加肝癌细胞对化疗药物的敏感性, 提示 *Mcl-1* 与肝癌的发生发展和耐药有关, 并可能是肝癌基因治疗的潜在靶点。许多研究^[4-5]证实, *Mcl-1* 转录后水平的表达还受多种微小 RNA (microRNA, miRNA) 的调控, 其中包括 miR-29(b)、miR-101、miR-133b、miR-153、miR-193b 等。miRNA 下调 *Mcl-1* 表达的主要机制是通过其“种子序列”结合到 *Mcl-1* mRNA 的 3' 端非翻译区 (3'-Untranslated Regions, 3'-UTR), 从而降解 mRNA 或不降解而抑制其翻译, 最终降低 *Mcl-1* 蛋白的表达。值得注意的是, 上述 miR-29(b) 和 miR-101 均在 HBV 为主的 HCC 中低表达^[6-7], 恢复其表达后能诱导肝癌细胞凋亡, 其机制是通过靶向沉默 *Mcl-1*。最新研究^[8]认为, HCV 相关肝癌中 miR-193b 表达升高, 抑制 *Mcl-1* 蛋白表达, 从而使 HCV 相关性肝癌对索拉菲尼更为敏感。此外, 在多种恶性肿瘤中, 包括乳腺癌、前列腺癌、恶性黑色素瘤、子宫内膜癌等都存在 miR-193b 低表达, 而同时存在 *Mcl-1* 过表达, 这可能是恶性肿瘤对靶向药物不敏感的原因。miR-29、miR-101 及 miR-193b 等 miRNA 能靶向 *Mcl-1*, miR-193b 高表达提高了 HCV 阳性肝癌细胞对索拉菲尼的敏感性。但是, miR-29、miR-101 在 HBV 感染为主的肝癌中低表达, 这可能是索拉菲尼疗效不如 HCV 感染者的原因。对于 HBV 阳性肝癌, miR-193b 表达高低的情况尚无报道, 其是否能发挥以上作用, 尚需进一步研究。本研究将检测上述 3 个 miRNAs 及 *Mcl-1* 在 HBV 相关肝癌细胞中的表达情况, 探讨它们的异常表达在转录后下调 *Mcl-1* 是否可能协同索拉菲尼治疗 HBV 相关肝癌, 旨在为索拉菲尼治疗

HBV 相关肝癌提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 细胞株、主要试剂及仪器

转染 HBV 基因组的 HepG2.2.15 细胞系购自美国 ATCC 公司, 转染 pcDNA3.1 空质粒的 HepG2.vc 细胞系本实验室建立并由本实验室保存。

索拉菲尼 (批号 170323) 由 Bayer Pharma AG 公司生产。兔抗人 *Mcl-1* 单克隆抗体购自威斯腾生物, Lipofectamine[®] 3000 转染试剂盒、DMEM 培养基、胎牛血清均购自 Gibco 公司, CellTiter 96[®] Aqueous 单溶液检测试剂盒购自上海创赛科技有限公司。miR-29、miR-101 和 miR-193b 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 目标 miRNA mimics 由美国 Biomic 生物技术有限公司设计并合成。Power PAC 200 型垂直式电泳仪为美国 BIO-RAD 公司产品, Image Lab3.0 型凝胶分析系统为美国 BIO-RAD 公司产品, PIKORed96 型 RT-PCR 扩增仪为美国 ThermoFisher 仪器有限公司生产, Coulter Epics-xl 型流式细胞仪为美国 Coulter 公司生产。

1.2 细胞培养

HepG2.2.15 细胞和 HepG2.vc 细胞培养用含 5% 胎牛血清、青霉素 (100 μg/ml)、链霉素 (100 U/ml) 的 DMEM 培养液, 置于 37 °C、5% CO₂ 孵育箱中培养, 3~4 d 传代一次, 取对数生长期细胞用于后续实验。

1.3 qPCR 检测肝癌细胞中 miR-29、miR-101 和 miR-193b 表达水平

分别提取 HepG2.2.15 和 HepG2.vc 细胞总 RNA, 逆转录为 cDNA; 用 PIKORed96PCR 扩增仪检测 miR-29、miR-101 和 miR-193b 的表达水平, 所有样本均设复孔。引物序列: miR-29, Forward 为 5'-AGATGGTGCACGATGCACAG-3', Reverse 为 3'-CGTTTTTAAACCTAAGAGTCAC-5'; miR-101, Forward 为 5'-TCTAAAAGCTGCGGAATT, Reverse 为 3'-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-5'; miR-193b, Forward 为 5'-CGCCAGGGTTCCAGTCACGAC-3', Reverse 为 3'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-5'。反应条件为 95 °C 变性 2 s, 然后 95 °C 10 s、60 °C 20 s, 共 40 个循环。以 β-actin 为内参照, 用 Piko Real 2.0 软件计算各检测样本 Ct 值, 采用 2^{-ΔΔCt} 方法计算 miR-29、miR-101 和 miR-193b 表达量。比较两组细胞各种 miRNA 表达水平, 寻找 HepG2.2.15 细胞中低表达 miRNA 作为

目标 miRNA, 合成相应的目标 miRNA mimics, 用于后续实验。

1.4 目标 miRNA mimics 转染肝癌细胞

实验分为目标 miRNA mimics 转染 HBV 阳性肝癌细胞组 (miRNA-HepG2.2.15 组) 和目标 miRNA-mimics 转染 HBV 阴性肝癌细胞组 (miRNA-HepG2.vc 组) 以及不转染目标 miRNA mimics 的阴性对照 HepG2.2.15 组和 HepG2.vc 组。取对数生长期 HepG2.2.15 和 HepG2.vc 细胞分别接种于 96 孔板 (5×10^5 个/孔), 置于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 孵箱中培养, 细胞汇合率达到 $70\% \sim 90\%$ 时, 按照 Lipofectamine[®] 3000 转染试剂盒说明书操作, 将目标 miRNA mimics 和 Lipofectamine[®] 3000 混合后分别转染 HepG2.2.15 细胞 (miRNA-HepG2.2.15 组) 和 HepG2.vc 细胞 (miRNA-HepG2.vc 组), 于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 孵箱中孵育 48 h。阴性对照 HepG2.2.15 组和 HepG2.vc 组加等量不含血清的 Opti-MEM 培养基, 于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 孵箱中孵育 48 h。

1.5 索拉菲尼处理 HepG2.2.15 和 HepG2.vc 细胞

实验分为无索拉菲尼处理 HepG2.2.15 对照组 (HepG2.2.15 组)、索拉菲尼处理目标 miRNA 转染前 HBV 阳性肝癌细胞组 (HepG2.2.15+sor 组)、索拉菲尼处理目标 miRNA 转染 HBV 阳性肝癌细胞组 (miRNA-HepG2.2.15+sor 组)、无索拉菲尼处理 HepG2.vc 对照组 (HepG2.vc 组)、索拉菲尼处理目标 miRNA 转染前 HBV 阴性肝癌细胞组 (HepG2.vc+sor 组) 和索拉菲尼处理目标 miRNA 转染 HBV 阴性肝癌细胞组 (miRNA-HepG2.vc+sor 组)。将 HepG2.2.15 组、miRNA-HepG2.2.15 组、HepG2.vc 组和 miRNA-HepG2.vc 组细胞分别接种 96 孔板 (1×10^5 个/孔) 铺板, 每组 6 个平行孔。HepG2.2.15+sor 组、miRNA-HepG2.2.15+sor 组、HepG2.vc+sor 组和 miRNA-HepG2.vc+sor 组加 $30 \mu\text{l}$ 梯度浓度 [$(1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-3}) \text{ mol/L}$] 的索拉菲尼溶液, HepG2.2.15 组和 HepG2.vc 组加等量培养基。加药后置于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 孵育箱中培养 72 h。

1.6 Western blotting 检测各组肝癌细胞 Mcl-1 蛋白的表达

提取 HepG2.2.15 组、miRNA-HepG2.2.15 组、HepG2.vc 组和 miRNA-HepG2.vc 组细胞总蛋白, Lowry 法蛋白定量。上样进行 $10\%\text{SDS-PAGE}$ 30 min, 转膜封闭后, 加兔抗人 Mcl-1 抗体 ($1:1\ 500$) 和兔抗人 RNU6 抗体 ($1:2\ 000$) 4°C 孵育过夜, 再与辣根酶标记山羊抗兔 IgG ($1:5\ 000$) 室温孵育 2 h, 然后放入化学发光凝胶成像仪, 根据信号的强弱适当调整曝光时间, 曝光、显影后用 Image Lab3.0 图像分析

系统测定各条带积分灰度。蛋白相对表达水平用目的蛋白积分灰度值 (IOD)/内参 IOD 表示。

1.7 CellTiter 96[®]AQueous 单溶液细胞增殖检测法测定各处理组肝癌细胞对索拉菲尼的敏感性

细胞培养 72 h 后, 利用 CellTiter 96[®]AQueous 单溶液检测试剂盒结合 XLfit 软件测定抑制 50% 细胞生长所需的药物浓度 (IC_{50})。按照 CellTiter 96[®]AQueous 单溶液检测试剂盒说明书操作, 分别向培养 72 h 的无索拉菲尼处理的对照 HepG2.2.15 组、HepG2.vc 组、HepG2.2.15+sor 组、miRNA-HepG2.2.15+sor 组、HepG2.vc+sor 组和 miRNA-HepG2.vc+sor 组细胞中加入 $20 \mu\text{l}$ 单溶液试剂, 孵育 4 h, 然后用酶标仪测定 490 nm 处各实验组细胞的光密度 (D) 值。细胞抑制率计算公式: 细胞抑制率 (%) = $[1 - \text{药物组光密度值} (D_{490, \text{药物}}) / \text{对照组光密度值} (D_{490, \text{对照}})] \times 100\%$ 。Graph Pad5.0 软件作图, 结合 IDB-SXLfit 软件计算 IC_{50} 值。

1.8 流式 Annexin V-FITC/PI 双染法检测肝癌细胞凋亡率

收集 HepG2.2.15 组、HepG2.2.15+sor 组、miRNA-HepG2.2.15+sor 组、HepG2.vc 组、HepG2.vc+sor 组和 miRNA-HepG2.vc+sor 组细胞于流式管中, 用 PBS 洗涤一次, 加入 1 ml 0.25% 胰酶消化细胞, 待细胞变圆且有部分细胞脱落, 即加入培养基终止消化。用移液枪将细胞悬液收集于流式管中, $300 \times \text{g}$ 离心 5 min, 弃上清。沉淀细胞用 $300 \mu\text{l}$ 结合缓冲液重悬。加 $5 \mu\text{l}$ Annexin V-FITC, 混匀后避光孵育 10 min, 加入 $5 \mu\text{l}$ PI, 混匀后避光孵育 5 min, 1 h 内用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.9 统计学处理

用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间采用单因素方差分析, 方差齐者组间进行 LSD 检验, 方差不齐者进行 Tamhane's T_2 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 miR-193b 在 HBV 阳性肝癌细胞中低表达

qPCR 检测结果 (图 1) 显示, HBV 阳性 HepG2.2.15 细胞中 miR-193b 的表达较 HBV 阴性 HepG2.vc 细胞显著降低 (0.58 ± 0.046 vs 0.83 ± 0.089 , $P < 0.05$)。而 MiR-29 和 miR-101 在两种细胞中的表达无显著差异 (MiR-29: 0.83 ± 0.079 vs 0.85 ± 0.058 ; miR101: 0.77 ± 0.085 vs 0.79 ± 0.069 , 均 $P > 0.05$)。因此以 miR-193b 为模版合成 miR-193b mimics, 用于后续实验。

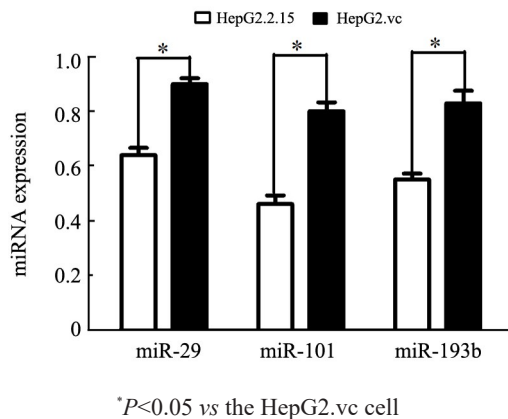


图1 HepG2.2.15和HepG2.vc细胞中三种miRNAs的表达
Fig. 1 Expressions of 3 kinds miRNAs in HepG2.2.15 and HepG2.vc cells

2.2 miR-193bRNA mimics 成功转染肝癌 HepG2.2.15 和 HepG2.vc 细胞

qPCR 检测结果(图2)显示, miRNA-HepG2.2.15 组和 miRNA-HepG2.vc 组细胞中 miR-193b 的表达较 HepG2.2.15 和 HepG2.vc 组均有显著升高(miRNA-HepG2.2.15: 0.86 ± 0.032 vs 0.57 ± 0.039 ; miRNA-HepG2.vc: 1.08 ± 0.045 vs 0.76 ± 0.047 ; 均 $P < 0.05$), 表明 miR-193bRNA mimics 转染成功。

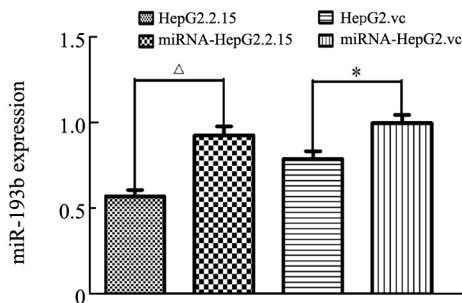


图2 转染前后 HepG2.2.15 和 HepG2.vc 细胞中 miR-193b 的表达
Fig. 2 Expression of mir-193b in HepG2.2.15 and HepG2.vc cells before and after transfection

2.3 转染 miR-193b mimics 后 2 种肝癌细胞中 Mcl-1 蛋白表达下调

Western blotting 结果(图3)显示, 未转染的 HepG2.2.15 细胞中 Mcl-1 蛋白表达比 HepG2.vc 细胞显著增多(0.85 ± 0.041 vs 0.64 ± 0.065 , $P < 0.05$)。而转染 miR-193b mimics 的 miRNA-HepG2.2.15 组和 miRNA-HepG2.vc 组细胞 Mcl-1 蛋白表达均较未转染 miR-193b mimics 的 HepG2.2.15 组和 HepG2.vc 组细胞显著降低(HepG2.2.15: 0.36 ± 0.029 vs 0.85 ± 0.041 ; HepG2.vc: 0.51 ± 0.045 vs 0.64 ± 0.065 ; 均 $P < 0.05$)。说

明转染 miR-193b mimics 增加 miR-193b 表达, 可抑制 Mcl-1 蛋白的表达。

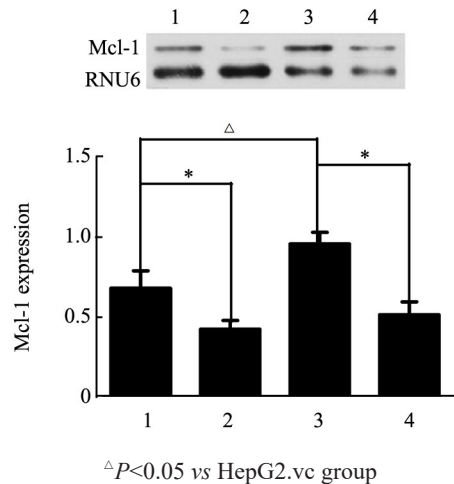


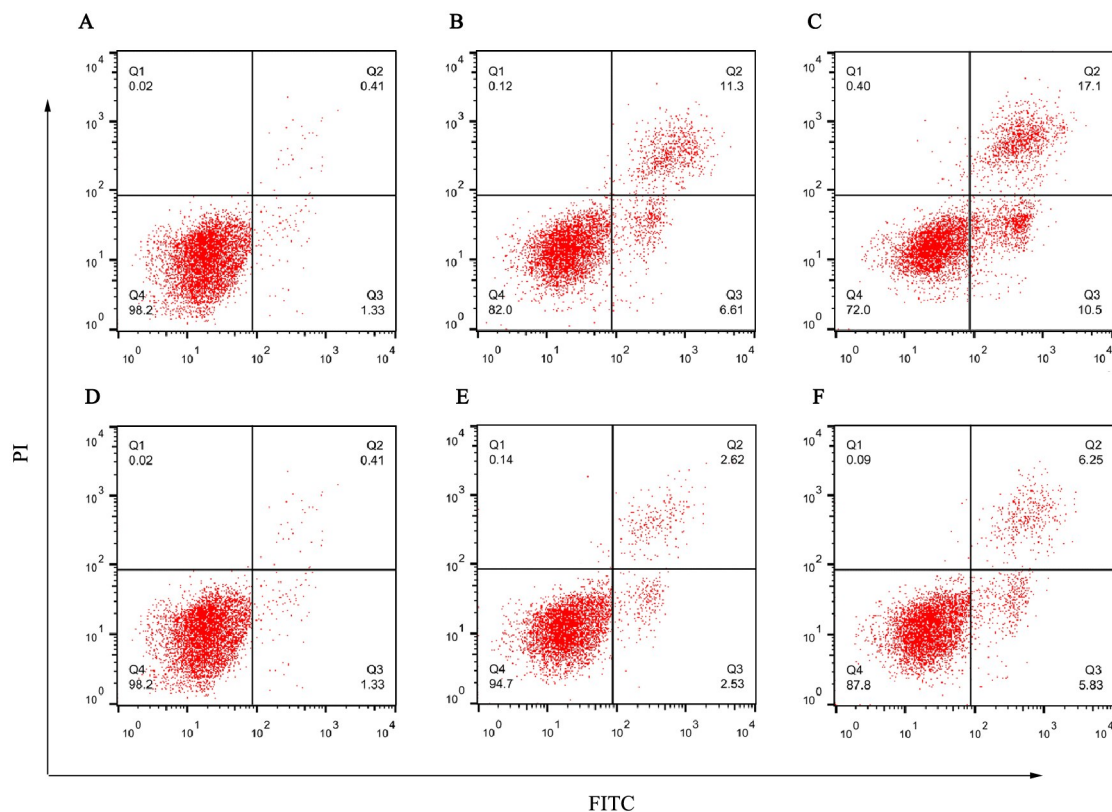
图3 转染 miR-193b mimics 前后 HepG2.2.15 和 HepG2.vc 细胞中 Mcl-1 蛋白的表达
Fig. 3 Expression of Mcl-1 protein in HepG2.2.15 and HepG2.vc cells before and after transfection with miR-193b mimics

2.4 转染 miR-193b mimics 后肝癌细胞对索拉菲尼的敏感性增大

CellTiter 96® Aqueous 单溶液细胞增殖检测结果显示, 转染 miR-193b mimics 的 miRNA-HepG2.2.15 组和 miRNA-HepG2.vc 组肝癌细胞的 IC₅₀ 值较未转染 miR-193b mimics 的 HepG2.2.15 组和 HepG2.vc 组显著降低[HepG2.2.15: (0.215 ± 0.028 vs 0.391 ± 0.025) mol/L; HepG2.vc: (0.315 ± 0.027 vs 0.645 ± 0.019) mol/L, 均 $P < 0.01$]。表明 miR-193b 高表达细胞对药物的耐受性降低, 药敏性提高。

2.5 转染 miR-193b mimics 促进肝癌细胞的凋亡

流式 Annexin V-FITC/PI 双染法结果(图4)显示, 索拉菲尼未处理对照组细胞凋亡率显著低于索拉菲尼处理组[HepG2.2.15: (1.86 ± 1.05)% vs (6.79 ± 1.56)%, (31.6 ± 2.82)%; HepG2.vc: (2.92 ± 1.12)% vs (9.65 ± 2.13)%, (24.5 ± 3.02)%, 均 $P < 0.05$]。说明索拉菲尼对 HepG2.2.15 和 HepG2.vc 肝癌细胞均有杀伤作用, 而转染 miR-193b mimics 的 miRNA-HepG2.2.15+sor 组和 miRNA-HepG2.vc+sor 组细胞凋亡率较未转染 miR-193b mimics 的 HepG2.vc+sor 组和 HepG2.2.15+sor 组均有极显著提高[HepG2.2.15+sor: (31.6 ± 2.82)% vs (6.79 ± 1.56)%; HepG2.vc+sor: (24.5 ± 3.02)% vs (9.65 ± 2.13)%, $P < 0.01$]。提示转染 miR-193b mimics 后, HepG2.2.15 细胞和 HepG2.vc 细胞对索拉菲尼的敏感性显著增加。



A: HepG2.2.15; B: HepG2.2.15+sor; C: miRNA-HepG2.2.15+sor; D: HepG2.vc5; E: HepG2.vc+sor; F: miRNA-HepG2.vc+sor;

图4 流式细胞仪检测各实验组 HepG2.2.15(A,B,C)和 HepG2.vc(D,E,F)细胞的凋亡

Fig. 4 Cell apoptosis of HepG2.2.15 and the HepG2.vc cells in various groups detected by flow cytometry

3 讨论

HCC 约占原发性肝癌的 70%~85%，早期很少发现，生存期较短。大约 90% HCC 患者源自肝硬化，主要由 HBV 或 HCV 感染、酒精滥用、非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH)、自身免疫性肝炎、原发性胆汁性肝硬化 (primary biliary cirrhosis, PBC) 等引起^[9]。近年来国内外研究基本明确了 HCC 的分子机制，为 HCC 的早期诊断和治疗奠定了基础。

miRNA 是一类由内源基因编码的长度约 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子，参与动植物的转录后基因表达调控。miRNA 与靶 mRNA 3'-UTR 的互补序列结合，然后诱导 mRNA 降解或翻译抑制，调节靶基因表达^[10-11]。目前，人类细胞中已鉴定出 1 000 多种 miRNA，60% 的人类基因组蛋白编码基因受其调控^[12]。miRNA 调节细胞的各种生理和病理过程，包括细胞生长、分化、增殖和凋亡^[13]。最近的研究^[14]表明，50% 以上的 miRNA 位于相关癌基因组区域，并且在癌症中表达频繁失调，表明 miRNA 在肿瘤发生中起关键作用。

miRNA 可通过靶向 HBV 基因表达所需的细胞转录因子或通过直接结合 HBV 转录物来调节 HBV 转录水平^[15]。本实验首次发现，miR-193b 在 HBV 阳性肝癌细胞中的表达较普通肝癌细胞显著减少。而 *Mcl-1* 是凋亡调节基因，其表达失衡可导致肿瘤的发生，过表达可保护肿瘤细胞免受药物诱导的细胞凋亡^[16]。因此，研究调节 *Mcl-1* 基因表达的细胞因子和相关信号传导途径就成为研究肿瘤发生机制及抗肿瘤治疗的一个关键环节。本实验结果可见，miR-193b 和 *Mcl-1* 表达呈此消彼长，HBV 阳性肝癌 HepG2.2.15 细胞转染 miR-193b mimics 前后比较，转染前 miR-193b 呈低表达，*Mcl-1* 蛋白高表达；而转染后 miR-193b 表达升高，*Mcl-1* 蛋白表达降低。结果显示 miR-193b 增多时，*Mcl-1* 蛋白表达受到明显抑制，提示 *Mcl-1* 可能是 miR-193b 的靶点。

为研究 miR-193b、*Mcl-1* 与肝癌细胞多耐药性之间的关系，实验进一步构建了 miR-193b mimics，并转染 HepG2.2.15 细胞和 HepG2.vc 细胞。结果发现，miR-193b 在两种细胞中表达增加后，两组细胞对索拉菲尼的敏感性显著增加，凋亡率显著增大。由此可见，HBV 相关肝癌细胞的耐药性与 miR-193b 抑制

或低表达有关。其机制可能是 miR-193b 抑制或减少后, *Mcl-1* 蛋白表达升高, 细胞耐药性增强。

综上所述, 本研究首次证实了 HBV 阳性肝癌细胞 miR-193b 表达下调可能是肝癌对索拉菲尼耐药性发生机制之一, 可能与负向调控抗凋亡蛋白 *Mcl-1* 表达有关。本研究结果显示 miR-193b 在肿瘤发生发展中发挥抑癌基因作用, 这为如何提高索拉菲尼的治疗效果提供了新的思路, 但其精细的作用机制尚需要进一步研究。

[参考文献]

- [1] BRUIX J, CHENG A L, MEINHARDT G, et al. Prognostic factors and predictors of sorafenib benefit in patients with hepatocellular carcinoma: analysis of two phase III studies[J]. *J Hepatol*, 2017, 67(5): 999-1008. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.06.026.
- [2] LIU L, CAO Y, CHEN C, et al. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5[J]. *Cancer Res*, 2007, 66(24): 11851-11858. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1377.
- [3] FLEISCHER B, SCHULZE H, SCHUCHMANN M, et al. *Mcl-1* is an anti-apoptotic factor for human hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2006, 28(1): 25-32. DOI: 10.3892/ijo.28.1.25.
- [4] RAHMANI M, AUST M M, BENSON E C, et al. PI3K/mTOR inhibition markedly potentiates HDAC inhibitor activity in NHL cells through BIM-and MCL-1-dependent mechanisms in vitro and in vivo[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(18): 4849-4860. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0034.
- [5] BEEKMAN A M, HOWELL L A. Small-molecule and peptide inhibitors of the pro-survival protein *Mcl-1*[J]. *Chem Med Chem*, 2016, 11(8): 802-813. DOI: 10.1002/cmdc.201500497.
- [6] XING T J, JIANG D F, HUANG J X, et al. Expression and clinical significance of miR-122 and miR-29 in hepatitis B virus-related liver disease[J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(3): 7912-7918. DOI: 10.4238/2014.September.29.4
- [7] XIE Y, YAO Q, BUTT A M, et al. Expression profiling of serum miRNA-101 in HBV-associated chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Biol Ther*, 2014, 15(9): 1248-1255. DOI: 10.4161/cbt.29688.
- [8] BRACONI C, VALERI N, GASPARINI P, et al. Hepatitis C virus proteins modulate microRNA expression and chemosensitivity in malignant hepatocytes[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(3): 957-962. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2123.
- [9] GONG J, HE X X, TIAN A. Emerging role of microRNA in hepatocellular carcinoma (Review)[J]. *Oncol Lett*, 2015, 9(5): 1027-1033. DOI: 10.3892/ol.2014.2816.
- [10] QI J, WANG J, KATAYAMA H, et al. Circulating microRNAs (cmRNAs) as novel potential biomarkers for hepatocellular carcinoma [J]. *Neoplasma*, 2012, 60(2): 135-142. DOI: 10.4149/neo_2013_018.
- [11] ZHOU J, YU L, GAO X, et al. Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(36): 4781-4788. DOI: 10.1200/JCO.2011.38.2697.
- [12] CHANG-HAO T S, BEHREN A, CEBON J, et al. The role of circulating microRNA in hepatocellular carcinoma[J]. *Front Biosci*, 2015, 20(12): 78-104. DOI: 10.3748/wjg.v20.i12.3078.
- [13] CALLEGARI E, ELAMIN B K, SABBIONI S, et al. Role of microRNAs in hepatocellular carcinoma: a clinical perspective[J]. *Oncotargets Ther*, 2013, 6(23): 1167-1178. DOI: 10.2147/OTT.S36161.
- [14] 周学, 杜宜兰, 金萍, 等. 癌症相关 microRNA 与靶基因的生物信息学分析[J]. *遗传*, 2015, 37(9): 855-864.
- [15] CHIU L Y, KISHNANI P S, CHUANG T P, et al. Identification of differentially expressed microRNAs in human hepatocellular adenoma associated with type I glycogen storage disease: a potential utility as biomarkers[J]. *J Gastroenterol*, 2014, 49(8): 1274-1284. DOI: 10.1007/s00535-013-0890-2.
- [16] QIN Y U, LIU Z Y, CHEN Q, et al. *Mcl-1* as a potential therapeutic target for human hepatocellular carcinoma[J]. *J Huazhong Univ Sci Technol [Med Sci]*, 2016, 36(4): 494-500. DOI: 10.1007/s11596-016-1614-7.

[收稿日期] 2017-12-16

[修回日期] 2018-02-22

[本文编辑] 韩丹