

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.03.006

· 基础研究 ·

## miR-377-5p 通过下调 HIF-1 $\alpha$ 及其相关 VEGF 信号通路抑制肝细胞癌 HepG2 细胞的增殖和侵袭

杨晋, 贺凯, 张孟瑜, 吴力乐, 秦蜀, 冯春红, 罗鸣, 夏先明(西南医科大学附属医院 肝胆外科, 四川 泸州 646000)

**[摘要]** **目的:** 探讨 miR-377-5p 与缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1, HIF-1 $\alpha$ ) 的靶向关系以及通过控血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 信号通路对肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC) 细胞增殖、侵袭和 EMT 的调控作用。**方法:** qPCR 检测 35 例人 HCC 组织及癌旁组织标本中 miR-377-5p 的表达水平。将 HepG2 细胞分为对照组、mimic NC 组、miR-377-5p mimic 组, qPCR 检测转染效率; EdU 染色、Transwell 和 Western blotting(WB) 检测 miR-377-5p 过表达对 HepG2 细胞增殖、侵袭及其增殖相关蛋白 Ki-67、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 及上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT) 标志蛋白 E-cadherin、N-cadherin 表达的影响; qPCR、WB 检测 miR-377-5p 过表达对 HepG2 细胞中, 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 表达的影响。荧光素酶报告基因实验验证 miR-377-5p 与 HIF-1 $\alpha$  基因的靶向关系。**结果:** HCC 组织中 miR-377-5p 表达水平较癌旁组织降低( $P < 0.01$ )。与对照组相比, miR-377-5p mimic 组 HepG2 细胞中 miR-377-5p 水平明显升高, 细胞的增殖、侵袭能力降低(均  $P < 0.01$ ), EMT、N-cadherin 表达水平降低(均  $P < 0.01$ ) 而 E-cadherin 表达水平显著升高( $P < 0.01$ ); miR-377-5p mimic 组中 HIF-1 $\alpha$  mRNA 和蛋白表达水平均降低( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。miR-377-5p 靶向抑制 HIF-1 $\alpha$  基因表达, 并抑制 VEGF 通路的激活(均  $P < 0.05$ )。**结论:** miR-377-5p 通过靶向抑制 HIF-1 $\alpha$  基因表达和下调 VEGF 信号通路从而抑制 HepG2 细胞的增殖、侵袭和 EMT。

**[关键词]** miR-377-5p; 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ ; 肝细胞癌; HepG2 细胞; 增殖; 侵袭; 上皮间质转化  
**[中图分类号]** R735.7; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)03-0248-07

## miR-377-5p inhibits proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma HepG2 cells by down-regulating HIF-1 $\alpha$ and related VEGF signaling pathway

YANG Jin, HE Kai, ZHANG Mengyu, WU Lile, QIN Shu, FENG Chunhong, LUO Ming, XIA Xianming (Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China)

**[Abstract] Objective:** To explore the targeting relationship between miR-377-5p and hypoxia inducible factor-1 (HIF-1 $\alpha$ ), and investigate the regulatory effect of miR-377-5p on proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of hepatocellular carcinoma (HCC) cells through vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway. **Methods:** The expression of miR-377-5p in 35 pairs of human HCC tissues and para-cancerous tissues was detected by qPCR. Then, HepG2 cells were divided into control group, mimic-NC group and miR-377-5p mimic group. qPCR was used to detect the transfection efficiency; the effects of miR-377-5p over-expression on proliferation and invasion of HepG2 cells were examined by EdU staining and Transwell assay, respectively; and the effect of miR-377-5p over-expression on the expressions of proliferation-related protein Ki-67, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers (E-cadherin and N-cadherin) were detected by Western blotting (WB); the effect of miR-377-5p over-expression on the expression of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in HepG2 cells was detected by qPCR and WB; and the targeting relationship between miR-377-5p and HIF-1 $\alpha$  gene was determined by Luciferase reporter gene assay. **Results:** The expression of miR-377-5p in HCC tissues was significantly lower than that in para-cancerous tissues ( $P < 0.01$ ). Compared with the control group, the expression of miR-377-5p in HepG2 cells of miR-377-5p mimic group elevated significantly, and the proliferation, invasion and the expression of N-cadherin proteins decreased, significantly (all  $P < 0.01$ ), while the expression of E-cadherin increased significantly ( $P < 0.01$ ). At the same time, the mRNA and protein expressions of HIF-1 $\alpha$  in miR-377-5p mimic group decreased

**[基金项目]** 四川省卫生和计划生育委员会科研资助项目(No.16PJ149)。Project supported by the Scientific Research Item of Health and Family Planning Commission of Sichuan Province (No.16PJ149)

**[作者简介]** 杨晋(1989-), 男, 博士, 主治医师, 主要从事肝胆胰肿瘤的研究, E-mail: ab9tets5jepq4@sina.com

**[通信作者]** 夏先明(XIA Xianming, corresponding author), 硕士, 教授, 主要从事肝胆胰外科疾病的基础与临床研究, E-mail: xxm6206@126.com

significantly ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). miR-377-5p targetedly inhibited the expression of HIF-1 $\alpha$  gene and suppressed the activation of VEGF pathway (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** miR-377-5p inhibits the proliferation, invasion and EMT of HepG2 cells via targetedly inhibiting HIF-1 $\alpha$  expression and suppressing the activation of VEGF signaling pathway.

**[Key words]** miR-377-5p; hypoxia inducible factor-1 (HIF-1 $\alpha$ ); hepatocellular carcinoma (HCC); HepG2 cell; proliferation; invasion; epithelial-mesenchymal transition (EMT)

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(3): 248-254. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.03.006]

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是消化系统最常见的恶性肿瘤之一。诱发HCC的原因较多,如乙型肝炎病毒<sup>[1]</sup>、肥胖<sup>[2]</sup>、脂肪肝<sup>[3]</sup>、真菌毒素积累<sup>[4]</sup>等,这使得HCC的发病率持续上升<sup>[5-6]</sup>。目前,分子靶向药物治疗是晚期HCC的主要治疗手段<sup>[7]</sup>。近年来,随着对微小RNA(microRNA, miRNA)研究的深入,miRNA逐渐成为肿瘤治疗领域的研究热点<sup>[8-9]</sup>。其中,miR-377是miRNA家族中重要一员,位于人类染色体14q32.2区域的miRNA簇上,其成熟体包括miR-377-3p和miR-377-5p。研究表明,miR-377-3p在胃癌<sup>[10]</sup>、卵巢癌<sup>[11]</sup>中发挥抑制肿瘤的重要作用,而miR-377-5p仅被简单地提及,其发挥的作用机制尚不明朗。缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )是具有转录活性的核蛋白,缺氧时HIF-1 $\alpha$ 稳定表达并与HIF-1 $\beta$ 形成二聚体,诱导下游基因转录以及缺氧反应<sup>[12]</sup>。HIF-1 $\alpha$ 在低氧条件下调控血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF),控制血管生成、细胞增殖和转移,在肿瘤的发生发展中起重要作用<sup>[13]</sup>。因此,本课题通过研究miR-377-5p对HCC细胞中HIF-1 $\alpha$ 基因和VEGF信号通路的调控作用以及对HCC细胞的增殖、侵袭和上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的影响,旨在为临床上对HCC的靶向治疗提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 组织标本、细胞株及主要试剂

35例HCC及相应的癌旁组织标本均由南昌大学第二附属医院提供。其中男性22例,女13例,年龄38~71岁,中位年龄55岁;肿瘤组织均经病理学证实为HCC组织。所有患者术前均未进行放疗或其他治疗,标本采集前均告知患者并签署知情同意书,且获得所在医院伦理委员会批准。

人HCC细胞株HepG2购自北京协和基础研究所细胞中心。

胎牛血清、RPMI 1640高糖培养基购自美国Gibco公司,胰酶购自北京索莱宝公司,TRIzol Reagent、TaqMan miRNA逆转录试剂盒、TaqMan miRNA定量PCR试剂盒购自美国Thermo Fisher公司,逆转录试剂盒、PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司,Lipofectamine<sup>®</sup> 2000试剂购自美国Invitrogen公司,EdU细胞增殖检测试剂盒购

自北京索莱宝公司,HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、VEGFR2、p38、 $\beta$ -Actin兔抗人一抗及辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗均购自CST公司。

### 1.2 细胞培养、转染及分组处理

HepG2细胞复苏后,在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>条件下将细胞培养于含10%FBS的RPMI 1640高糖培养基中,当细胞汇合度达90%时进行细胞传代培养。

传代2~3次,待细胞状态稳定后取对数生长期细胞用于实验。将HepG2细胞以 $1 \times 10^5$ 个/孔的密度培养于6孔板,待细胞汇合度达50%时,将细胞分为Control、mimic NC、miR-377-5p mimic、HIF-1 $\alpha$ 、mimic+HIF-1 $\alpha$ 组,除Control组不做处理以外,其余各组根据对应组别分别加入mimic NC、miR-377-5p mimic、HIF-1 $\alpha$ 过表达载体,操作步骤按照转染试剂盒说明书的方法执行即可,转染48 h后用于后续试验。

### 1.3 qPCR检测HCC组织与HepG2细胞中miR-377-5p和HIF-1 $\alpha$ 的表达

HCC肿瘤组织及癌旁组织或HepG2细胞均使用TRIzol Reagent提取总RNA,通过超微量核算蛋白测定仪测定浓度。用TaqMan miRNA逆转录试剂盒或TaKaRa逆转录试剂盒合成cDNA。引物序列:miR-377-5p F为5'-GTCGTGGAGTCGGCAATT-3', R为5'-GGCATCACACAAAGGCAAC-3'; HIF-1 $\alpha$  F为5'-ATTCCAGCAGACTCAAATACAAGA-3', R为5'-GACTCAAAGCGACAGATAACACG-3';  $\beta$ -actin F为5'-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3', R为5'-GCTGTACC TTCACCGTTCC-3'。PCR反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性2 min,95 $^{\circ}$ C变性15 s,59 $^{\circ}$ C退火15 s,共35个循环。目的分子mRNA相对表达水平通过2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>法进行计算。

### 1.4 荧光素酶报告基因实验验证miR-377-5p与HIF-1 $\alpha$ 的靶向关系

应用生物信息学软件PicTar、TargetScan数据库对miR-377-5p与HIF-1 $\alpha$ 的靶向关系进行预测。构建HIF-1 $\alpha$ 野生型(Wt)和突变型(Mut)pGL3-荧光素酶报告载体。将HepG2细胞分为空白对照组、HIF-1 $\alpha$  Wt组、HIF-1 $\alpha$  Mut组,分别将miR-377-5p mimic与构建的HIF-1 $\alpha$  Wt和Mut荧光质粒共转染至HepG2细胞,且各组分别设置miR-377-5p mimic NC阴性对照,每组设3个复孔,48 h后通过荧光素酶报告基因检测系统检测荧光素酶活性。

### 1.5 EdU 染色法检测 HepG2 细胞的增殖能力

将 miR-377-5p mimic 以及阴性对照 miR-377-5p mimic NC 分别转染至 HepG2 细胞, 48 h 后按照 EdU 细胞增殖检测试剂盒操作说明进行即可。每孔加入 50  $\mu\text{mol/L}$  的 EdU 100  $\mu\text{l}$  培养基孵育 2 h, PBS 清洗后, 每孔加入 4% 多聚甲醛固定 30 min, 弃固定液后, 每孔加入甘氨酸对固定液进行中和反应, PBS 清洗后每孔加入 100  $\mu\text{l}$  渗透剂后孵育 10 min; PBS 清洗; 每孔加入 100  $\mu\text{l}$  的 1 $\times$ Apollo 染色液孵育 30 min, 弃染色反应液; 加入 100  $\mu\text{l}$  0.5% Triton X-100 清洗 2~3 次; 每孔加入 100  $\mu\text{l}$  甲醇清洗后再 PBS 清洗。每孔加入 100  $\mu\text{l}$  Hoechst 33342 反应液孵育 30 min 后, PBS 清洗, 共聚焦显微镜获取图像及分析。通过计数与 EdU 染料结合的细胞数目, 衡量细胞的增殖能力。

### 1.6 Transwell 实验检测 HepG2 细胞的侵袭能力

将各转染组 HepG2 细胞以  $1 \times 10^5/\text{ml}$  密度接种 200  $\mu\text{l}$  预铺有 Matrigel 基质胶的 Transwell 小室上室, 下室加入 600  $\mu\text{l}$  含 20% FBS 的 RPMI 1640 培养基。于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 24 h 后, 用棉签擦去基质胶和上室未穿膜细胞, 4% 多聚甲醛固定 10 min 后, Giemsa 染色 30 min, 光学显微镜下随机选择 5 个视野观察、计数侵袭细胞数。

### 1.7 Western blotting (WB) 检测 HepG2 细胞中 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、VEGFR2、p38 蛋白的表达

将各转染组 HepG2 细胞消化, 以  $1 \times 10^5$  个细胞/孔分别培养于 6 孔板, 48 h 后使用 PBS 清洗细胞, 用含有 PMSF 的 RIPA 裂解液裂解细胞, 提取总蛋白。BCA 试剂盒检测蛋白浓度后, 进行 SDS-PAGE、转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 120 min 后, 加入稀释度均为 1:1 000 的 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、VEGFR2、p38 和  $\beta$ -Actin 一抗, 后加入 1:2 000 的 HRP 标记的山羊抗兔二抗室温孵育 60 min 后, 加入 BCL 化学发光显色液, 于暗室中进行曝光显影, 分析蛋白条带的灰度值, 以  $\beta$ -actin 作为内参进行比较。

### 1.8 统计学处理

qPCR、EdU、Transwell、WB 等实验均重复 3 次。所有实验数据均用统计软件 SPSS 19.0 进行统计分析。正态分布的计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较用独立的  $t$  检验, 多组间比较采用单因素方差分析。以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-377-5p 在 HCC 组织中低表达

qPCR 检测结果 (图 1) 显示, HCC 组织中 miR-377-5p 的表达水平显著低于癌旁组织 ( $P < 0.01$ )。

### 2.2 miR-377-5p 过表达可抑制 HepG2 细胞的增殖

转染 miR-377-5p mimic 后, miR-377-5p mimic 组 HepG2 细胞中 miR-377-5p 表达水平显著高于对照组和 mimic-NC 组 (均  $P < 0.01$ , 图 2A)。结果说明, 成功构建 miR-377-5p 过表达 HepG2 细胞株。EdU 染色结果 (图 2B) 所示, miR-377-5p mimic 组 HepG2 细胞的增殖率显著低于对照组和 mimic-NC 组 (均  $P < 0.01$ )。WB 实验 (图 2B) 显示, miR-377-5p mimic 组 HepG2 细胞中 Ki-67、PCNA 蛋白表达水平均显著低于对照组和 mimic-NC 组 (均  $P < 0.01$ )。结果表明, miR-377-5p 过表达显著抑制 HepG2 细胞的增殖并下调增殖相关蛋白 Ki-67、PCNA 的表达水平。

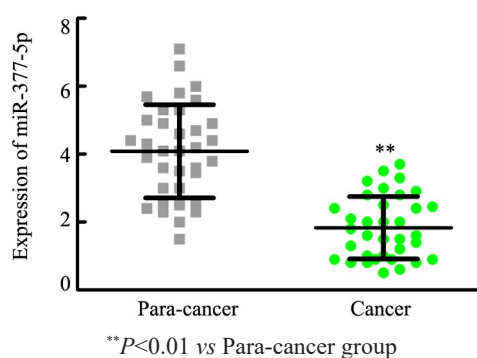


图 1 miR-377-5p 在 HCC 组织中的表达

Fig.1 Expression of miR-377-5p in HCC tissues

### 2.3 miR-377-5p 过表达可抑制 HepG2 细胞的侵袭及 EMT

Transwell 实验结果 (图 3A) 显示, miR-377-5p mimic 组 HepG2 细胞的侵袭数量显著少于对照组和 mimic-NC 组 (均  $P < 0.01$ )。WB 实验结果 (图 3B) 显示, 与对照组和 mimic-NC 组比较, miR-377-5p mimic 组 HepG2 细胞中 E-cadherin 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), 而 N-cadherin 表达水平显著下降 ( $P < 0.01$ )。实验结果表明, miR-377-5p 过表达显著抑制 HepG2 细胞的侵袭能力及 EMT 进程。

### 2.4 miR-377-5p 靶向抑制 HIF-1 $\alpha$ 基因

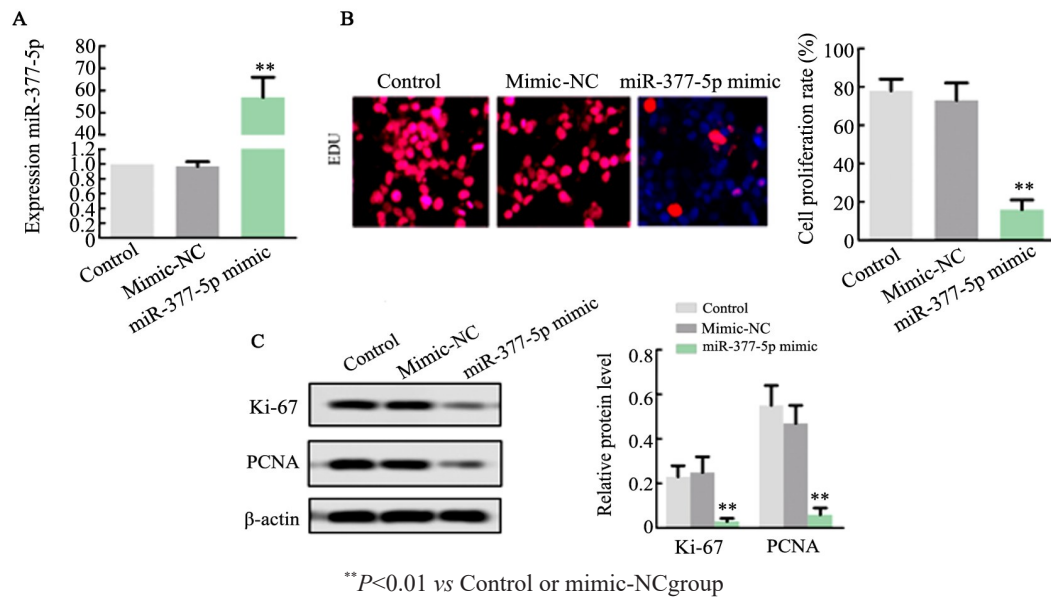
通过生物信息学软件及相关数据库预测 miR-377-5p 与 HIF-1 $\alpha$  的靶向关系, HIF-1 $\alpha$  基因序列上存在与 miR-377-5p 相结合的位点 (图 4A)。转染 miR-377-5p mimic 后, qPCR 实验结果 (图 4B) 显示, 与对照组和 mimic-NC 组比较, miR-377-5p mimic 组 HepG2 细胞中 HIF-1 $\alpha$  mRNA 表达水平显著下降 ( $P < 0.05$ ); WB 实验结果 (图 4C) 显示, miR-377-5p mimic 组 HepG2 细胞中 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达水平显著下降 ( $P < 0.01$ )。转染 pc-HIF-1 $\alpha$  后, qPCR 实验结果 (图 4D) 显示, 与对照组和 Vector 组比较, pc-HIF-1 $\alpha$  转染组 HepG2 细胞中 HIF-1 $\alpha$  mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ )。荧光素酶报告基因实验结果 (图 4E) 显示, 与 Vector 组和 HIF-1 $\alpha$  Mut 组比较, HIF-1 $\alpha$  Wt 组荧光素酶活性显著

下降( $P<0.01$ )。实验结果表明,miR-377-5p靶向作用于HIF-1 $\alpha$ ,从而在mRNA和蛋白水平上下调HIF-1 $\alpha$ 的表达。

### 2.5 miR-377-5p逆转HIF-1 $\alpha$ 过表达诱导的VEGF通路活化

WB实验结果显示,与对照组比较,miR-377-5p mimic组HepG2细胞中HIF-1 $\alpha$ 蛋白的表达水平显著下降( $P<0.05$ ),HIF-1 $\alpha$ 组中HIF-1 $\alpha$ 蛋白的表达水平

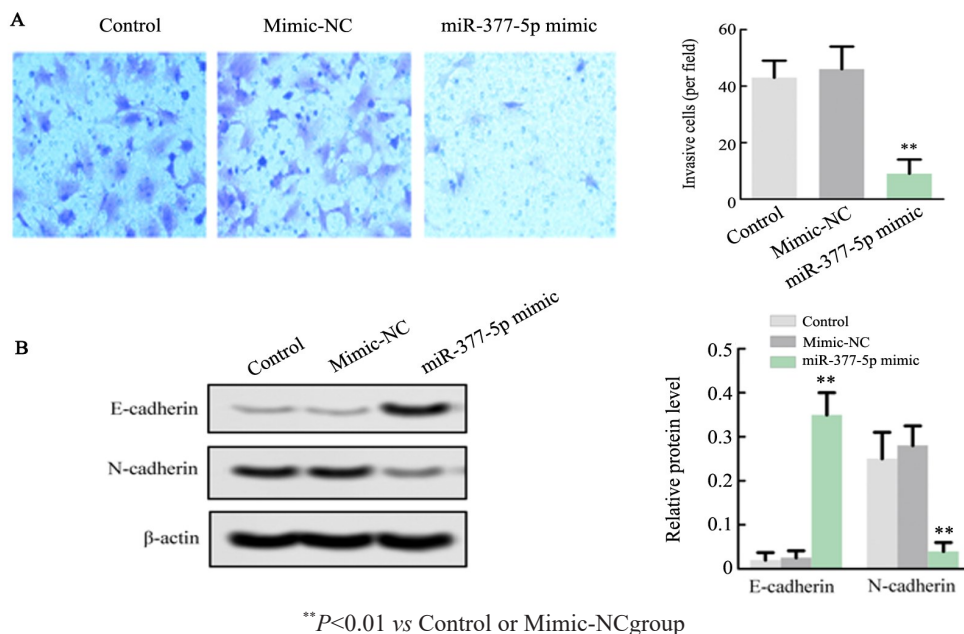
显著上升( $P<0.05$ );与HIF-1 $\alpha$ 组比较,miR-377-5p mimic组HepG2细胞中HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达水平显著下降( $P<0.05$ ;图5A)。与对照组比较,miR-377-5p mimic组细胞中VEGF、VEGFR2、p38蛋白表达水平均显著下降(均 $P<0.05$ ),HIF-1 $\alpha$ 组中VEGF、VEGFR2、p38蛋白表达水平均显著上升(均 $P<0.05$ ),与HIF-1 $\alpha$ 组相比,miR-377-5p mimic组中VEGF、VEGFR2、p38蛋白表达量均显著下降(均 $P<0.05$ ,图5B)。



A: Transfection of miR-377-5p in cells; B: The proliferation of cells was determined by EdU assay ( $\times 400$ ); C: The expressions of proliferation-related proteins were detected by WB assay

图2 miR-377-5p过表达对HepG2细胞增殖的影响

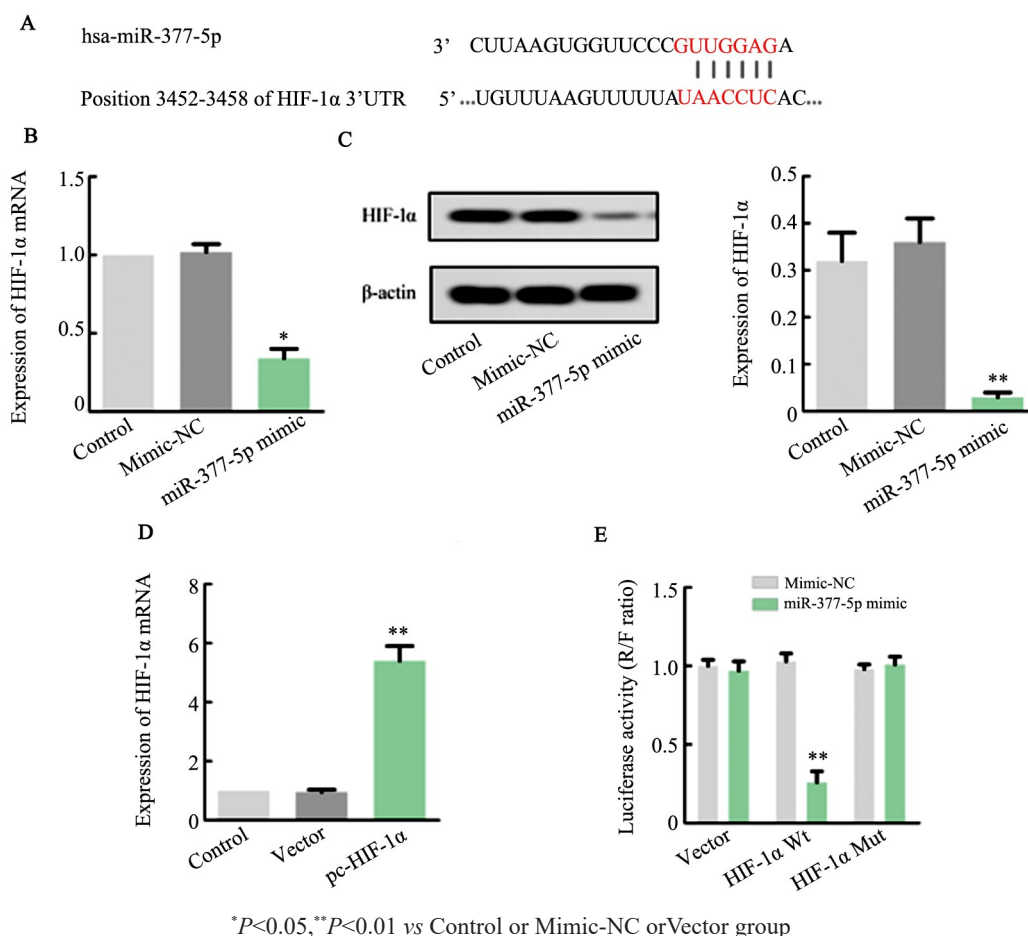
Fig.2 Effects of miR-377-5p over-expression on proliferation of HepG2 cells



A: The cell invasion was determined by Transwell test (Giemsa staining, $\times 400$ ); B: The expressions of EMT-related proteins were detected by WB assay

图3 miR-377-5p过表达对HepG2细胞侵袭的影响

Fig.3 Effects of miR-377-5p over-expression on invasion of HepG2 cells



A: Prediction of target gene of miR-377-5p; B: The gene expression of HIF-1α; C: Relative protein level of HIF-1α; D: Transfection of HIF-1α over-expression vector; E: Luciferase assay for testing the targeting relationship between miR-377-5p and HIF-1α

图4 miR-377-5p与HIF-1α基因的靶向关系

Fig.4 Targeting relationship between miR-377-5p and HIF-1α gene

### 3 讨论

随着HCC发病率逐年升高,人类的健康受到了严重的威胁。中国是乙型肝炎的高发国家,使得HCC成为中国最常见的恶性肿瘤之一<sup>[14]</sup>。目前,临床上对于HCC的治疗主要取决于HCC临床分期,治疗方案包括肝切除术<sup>[15]</sup>、局部消融治疗<sup>[16]</sup>、分子靶向药物治疗、栓塞治疗等<sup>[17]</sup>。近年来研究发现,miR-377在多种肿瘤中起重要作用。WANG等<sup>[10]</sup>发现,miR-377在胃癌组织及细胞系中表达显著低于正常的胃组织,且miR-377过表达可抑制胃癌细胞增殖、迁移和侵袭。CAO等<sup>[18]</sup>发现,在宫颈癌组织中miR-337-3p的表达水平显著低于正常组织,且miR-337-3p表达水平与宫颈癌的主要临床病理特征密切相关。本研究结果发现,在HCC组织中miR-337-5p的表达水平显著低于癌旁组织。结果提示,miR-337-5p可能也起到抑制HCC发展的重要作用。

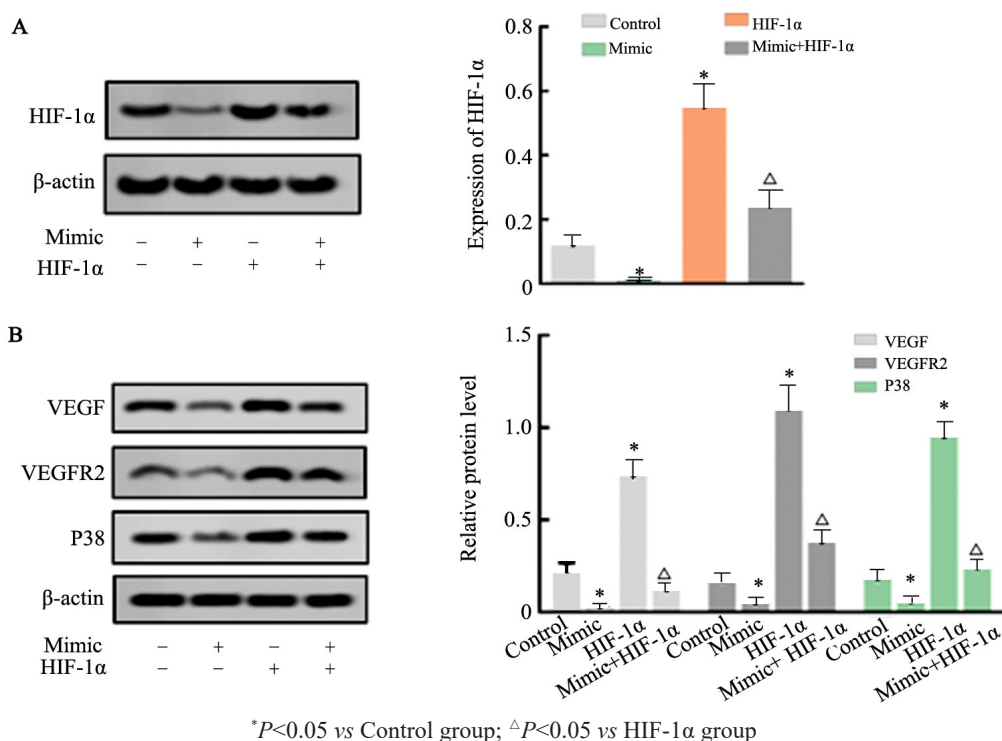
为进一步验证上述的猜想,本课题研究了miR-377-5p对HepG2细胞增殖及增殖相关蛋白和EMT标志性蛋白表达的影响以及对HCC细胞侵袭力的影

响。Ki-67是与核糖体RNA转录有关的核蛋白,近几十年来,Ki-67蛋白已被广泛用作人肿瘤细胞的增殖标志物<sup>[19]</sup>。增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)在DNA复制和复制相关过程中起关键作用,同时发挥启动细胞增殖的作用,可较好反应细胞增殖状态<sup>[20]</sup>。在肿瘤组织中,EMT的过度活化导致肿瘤细胞的迁移、侵袭能力增强<sup>[21]</sup>,而细胞黏附因子E-cadherin表达下调,N-cadherin表达上调是EMT活化的标志。本研究结果显示,miR-377-5p过表达可以显著降低HepG2细胞增殖水平和侵袭能力,下调增殖相关蛋白Ki-67、PCNA的表达量,同时上调E-cadherin、下调N-cadherin。这提示miR-377-5p过表达抑制HepG2细胞的增殖,同时还抑制EMT过程减少HCC细胞的转移及侵袭。

HIF-1普遍存在于人和哺乳动物细胞内,其活性亚基HIF-1α的表达受缺氧信号的调控。有研究<sup>[22]</sup>显示,缺氧可以通过活化EMT过程促进喉癌细胞侵袭和迁移。LEE等<sup>[23]</sup>发现,ELK3可以通过调控HIF-1α表达促达,进而促进HCC细胞的迁移和侵袭。此外,ZHANG等<sup>[24]</sup>发现,HIF-1α通过与结肠癌细胞中的肿

瘤起始因子E盒结合锌指蛋白1(zinc finger E-box binding protein1, ZEB1)的启动子结合而增强EMT和肿瘤转移。本研究结果显示,miR-377-5p可以靶

向抑制HIF-1 $\alpha$ 基因的表达,其机制可能是miR-377-5p调控HIF-1 $\alpha$ 基因的表达进而影响HepG2细胞的增殖和侵袭。



\* $P < 0.05$  vs Control group;  $\Delta P < 0.05$  vs HIF-1 $\alpha$  group  
 A: Effect of miR-377-5p on protein level of HIF-1 $\alpha$ ; B: Effect of miR-377-5p and HIF-1 $\alpha$  on VEGF pathway  
 图5 miR-377-5p对HIF-1 $\alpha$ 过表达诱导的VEGF通路活化的影响

Fig.5 Effects of miR-377-5p on activation of VEGF pathway induced by over-expression of HIF-1 $\alpha$

VEGF是一种血管内皮细胞的特异性有丝分裂原,在低氧环境下VEGF与内皮细胞膜上VEGF受体结合,进而激活有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK),诱导血管内皮细胞增生。同时,VEGF是HIF-1的靶基因之一,受HIF-1作用的调控。VEGF受体主要分为3种,其中VEGFR-1和VEGFR-2主要分布在肿瘤血管内皮表面,调控肿瘤血管的生成<sup>[25-26]</sup>。已有较多的研究<sup>[27]</sup>证实,VEGF对肿瘤细胞EMT发挥着调控作用。MAPK可以分为4个亚族,其中p38、MAPK在近几年中被发现与多种肿瘤细胞凋亡有密切关系。有研究<sup>[28]</sup>显示,在乳腺癌MCF-7细胞中VEGF/VEGFR2和p38之间存在信号转导的联系,并且抑制该通路的活性有助于降低乳腺癌MCF-7细胞对三苯氧胺耐药性。本研究结果显示,miR-377-5p过表达显著抑制HIF-1 $\alpha$ 蛋白的表达,并逆转HIF-1 $\alpha$ 过表达诱导的下游靶基因VEGF、VEGFR2、p38蛋白表达水平升高。

综上所述,miR-377-5p可以靶向抑制HIF-1 $\alpha$ 基因的表达,进而抑制EMT进程,减弱HepG2细胞侵袭与转移能力;另一方面,通过下调HIF-1 $\alpha$ 表达,抑制HIF-1 $\alpha$ /VEGF/p38通路,进而抑制HepG2细胞的

增殖和侵袭。目前,关于miR-377-5p作用机制的相关报道不多,且大量研究证明在癌症患者中HIF-1的靶基因乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)水平明显升高,因此后期本课题组将探究miR-377-5p靶向抑制HIF-1 $\alpha$ 基因后对LDH和下游MAPK通路的调控作用,以期进一步探明miR-377-5p在抑制肿瘤发展过程中的作用机制。

### [参考文献]

- [1] MASSARWEH N N, EL-SERAG H B. Epidemiology of hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma[J/OL]. Cancer Control, 2017, 24(3): 1073274817729245[2019-07-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5937247/>. DOI: 10.1177/1073274817729245.
- [2] KEW M C. Obesity as a cause of hepatocellular carcinoma[J]. Ann Hepatol, 2015, 14(3): 299-303. DOI:10.1016/s1665-2681(19)31267-0.
- [3] MARENGO A, ROSSO C, BUGIANESI E. Liver cancer: connections with obesity, fatty liver, and cirrhosis[J]. Annu Rev Med, 2016, 67: 103-117. DOI:10.1146/annurev-med-090514-013832.
- [4] GRAVITZ L. Liver cancer[J]. Nature, 2014, 516(7529): S1. DOI: 10.1038/516S1a.
- [5] 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.
- [6] CHACKO S, SAMANTA S. Hepatocellular carcinoma: A life-threatening disease[J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2016, 84: 1679-1688. DOI:10.1016/j.biopha.2016.10.078.
- [7] MOKDAD A A, SINGAL A G, YOPP A C. Treatment of liver cancer [J]. *JAMA*, 2016, 315(1): 100. DOI:10.1001/jama.2015.15431.
- [8] 田敬华, 杨金玲, 秦杰, 等. miR-34 启动子甲基化在胃癌发病过程中的作用研究[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(1): 17-21. DOI: CNKI:SUN:YXYQ.0.2019-01-005
- [9] WU Q, YANG Z P, SHI Y Q, et al. MiRNAs in human cancers: the diagnostic and therapeutic implications[J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20(33): 5336-5347. DOI:10.2174/1381612820666140128204914.
- [10] WANG C Q, CHEN L, DONG C L, et al. MiR-377 suppresses cell proliferation and metastasis in gastric cancer via repressing the expression of VEGFA[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(22): 5101-5111. DOI:10.26355/eurrev\_201711\_13826.
- [11] YU R F, CAI L M, CHI Y G, et al. MiR-377 targets CUL4A and regulates metastatic capability in ovarian cancer[J/OL]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(6): 3147-3156[2019-07-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5881808/>. DOI:10.3892/ijmm.2018.3540.
- [12] LIU W, SHEN S M, ZHAO X Y, et al. Targeted genes and interacting proteins of hypoxia inducible factor-1[J/OL]. *Int J Biochem Mol Biol*, 2012, 3(2): 165-178[2019-07-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3388736/>.
- [13] HU Y Z, LIU J, HUANG H. Recent agents targeting HIF-1 $\alpha$  for cancer therapy[J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114(3): 498-509. DOI: 10.1002/jcb.24390.
- [14] ZHENG R S, ZUO T, ZENG H M, et al. Mortality and survival analysis of liver cancer in China[J]. *Chin J Oncol*, 2015, 37(9): 697-702.
- [15] HARTKE J, JOHNSON M, GHABRIL M. The diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Semin Diagn Pathol*, 2017, 34(2): 153-159. DOI:10.1053/j.semcp.2016.12.011.
- [16] SHETA E, EL-KALLA F, EL-GHARIB M, et al. Comparison of single-session transarterial chemoembolization combined with microwave ablation or radiofrequency ablation in the treatment of hepatocellular carcinoma: a randomized-controlled study[J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2016, 28(10): 1198-1203. DOI: 10.1097/MEG.0000000000000688.
- [17] KEATING G M. Sorafenib: A review in hepatocellular carcinoma [J]. *Target Oncol*, 2017, 12(2): 243-253. DOI:10.1007/s11523-017-0484-7.
- [18] CAO X M. Role of miR-337-3p and its target Rap1A in modulating proliferation, invasion, migration and apoptosis of cervical cancer cells[J]. *Cancer Biomark*, 2019, 24(3): 257-267. DOI: 10.3233/CBM-181225.
- [19] SUN X M, KAUFMAN P D. Ki-67: more than a proliferation marker[J/OL]. *Chromosoma*, 2018, 127(2): 175-186[2019-07-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5945335/>. DOI: 10.1007/s00412-018-0659-8.
- [20] CHOE K N, MOLDOVAN G L. Forging ahead through darkness: PCNA, still the principal conductor at the replication fork[J/OL]. *Mol Cell*, 2017, 65(3): 380-392[2019-07-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5302417/>. DOI:10.1016/j.molcel.2016.12.020.
- [21] AIELLO N M, KANG Y B. Context-dependent EMT programs in cancer metastasis[J/OL]. *J Exp Med*, 2019, 216(5): 1016-1026[2019-07-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6504222/>. DOI:10.1084/jem.20181827.
- [22] ZUO J, WEN J, LEI M S, et al. Hypoxia promotes the invasion and metastasis of laryngeal cancer cells via EMT[J]. *Med Oncol*, 2016, 33(2): 15. DOI:10.1007/s12032-015-0716-6.
- [23] LEE J H, HUR W, HONG S W, et al. ELK3 promotes the migration and invasion of liver cancer stem cells by targeting HIF-1 $\alpha$ [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(2): 813-822. DOI:10.3892/or.2016.5293.
- [24] ZHANG W J, SHI X P, PENG Y, et al. HIF-1 $\alpha$  promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis through direct regulation of ZEB1 in colorectal cancer[J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0129603 [2019-07-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4461314/>. DOI:10.1371/journal.pone.0129603.
- [25] TAKAHASHI S. Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy[J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34(12): 1785-1788. DOI:10.1248/bpb.34.1785.
- [26] 邓大炜, 吴斌, 严舒, 等. FOXQ1 介导 TGF- $\beta$ 1 信号通路调控胰腺癌 PANC-1 细胞体外血管生成[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(1): 68-72. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.01.012.
- [27] BACHELDER R E, CRAGO A, CHUNG J, et al. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(15): 5736-5740.
- [28] JOHNSON G L, LAPADAT R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases[J]. *Science*, 2002, 298(5600): 1911-1912. DOI:10.1126/science.1072682.
- [收稿日期] 2019-11-29 [修回日期] 2020-02-08  
[本文编辑] 党瑞山