

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.06.012

· 临床研究 ·

miR-223-3p 通过靶向 RAC1 调控肝细胞癌 SMMC-7721 细胞的增殖和凋亡

戚欣¹, 王会子^{2a}, 陈旭东^{2b}, 张天琦^{2c}, 于小琳³ (1. 东北电力大学医院 检验科, 吉林 吉林 132000; 2. 吉林市中心医院 a. 检验科; b. 消化内科; c. 特二心血管科, 吉林 吉林 132000; 3. 吉林大学口腔医院实验教学中心, 吉林 长春 130000)

[摘要] **目的:** 探讨 miR-223-3p 通过调控 Ras 相关 C3 肉毒素底物 1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, RAC1) 对肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 细胞增殖和凋亡的影响及其可能的作用机制。 **方法:** 选用 2016 年 8 月至 2018 年 8 月吉林市中心医院手术切除的 30 例 HCC 组织及其癌旁组织标本和人 HCC 细胞系 SMMC-7721、Bel-7402、HepG2 及人正常肝细胞 QSG-7701, 用 qPCR 检测 HCC 组织和细胞系中 miR-223-3p 的表达水平。分别将 miR-223-3p mimics、miR-223-3p inhibitor 和 siRAC1 转染至 SMMC-7721 细胞, 通过 CCK-8、克隆形成实验和 Annexin V-FITC/PI 染色流式细胞术检测 SMMC-7721 细胞的增殖、克隆形成和凋亡水平。用双荧光素酶报告基因实验检测 miR-223-3p 与 RAC1 的靶向关系, Western blotting 检测细胞中 RAC1 蛋白的表达水平。 **结果:** miR-223-3p 在 HCC 组织的表达水平显著低于癌旁组织 ($P < 0.01$), 其表达水平与肿瘤大小、TNM 分期及肿瘤分化病理特征相关 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); miR-223-3p 在 HCC 细胞系表达水平显著低于 QSG-7701 细胞 (均 $P < 0.01$), 以在 SMMC-7721 细胞中表达水平最低。双荧光素酶报告基因实验证实 RAC1 是 miR-223-3p 靶基因, miR-223-3p 靶向负调控 RAC1 的表达。转染 miR-223-3p mimics 显著抑制 SMMC-7721 细胞的增殖和克隆形成能力 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 并促进细胞凋亡 ($P < 0.01$); 转染 miR-223-3p inhibitor 则逆转 miR-223-3p mimics 对细胞的抑制作用。 **结论:** 过表达 miR-223-3p 抑制 HCC 细胞增殖和克隆形成能力并促进细胞凋亡, 其机制可能与靶向下调 RAC1 表达有关。

[关键词] miR-223-3p; Ras 相关 C3 肉毒素底物 1; 肝细胞癌; SMMC-7721 细胞; 增殖; 凋亡

[中图分类号] R735.7; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)06-0664-07

miR-223-3p regulates proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells by targeting RAC1

QI Xin¹, WANG Huizi^{2a}, CHEN Xudong^{2b}, ZHANG Tianqi^{2c}, YU Xiaolin³ (1. Department of Laboratory, School Clinic of Northeast Electric Power University, Jilin 132000, Jilin, China; 2a. Department of Laboratory; 2b. Department of Gastroenterology; 2c. Special Second Cardiovascular Department, Jilin Central Hospital, Jilin 132000, Jilin, China; 3. Experimental Teaching Center, Stomatological Hospital of Jilin University, Changchun 130000, Jilin, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of miR-223-3p on the proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma (HCC) cells by regulating Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1) and its possible mechanism. **Methods:** Thirty pairs of HCC and corresponding para-cancer tissues resected in Jilin Central Hospital from August 2016 to August 2018 were collected for this study; in addition, human HCC cell lines SMMC-7721, BEL-7402, HepG2 and human normal hepatocyte QSG-7701 were also collected. The expression level of miR-223-3p in HCC tissue and cell lines was detected by qPCR. miR-223-3p mimics, miR-223-3p inhibitor and siRAC1 were transfected into SMMC-7721 cells, respectively. CCK-8 assay, Colony formation assay and Annexin V-FITC/PI staining Flow cytometry were used to detect the proliferation, clone formation and apoptosis of SMMC-7721 cells, respectively. The relationship between miR-223-3p and RAC1 was confirmed by Dual luciferase reporter gene assay. The protein level of RAC1 in SMMC-7721 cells was detected by Western blotting. **Results:** The expression of miR-223-3p in HCC tissues was significantly lower than that in para-cancer tissues ($P < 0.01$), and had significant correlation with pathological characteristics, such as tumor size, TNM stage, Edmondson-Steiner grade (all $P < 0.05$ or $P < 0.01$). miR-223-3p expression in HCC cell lines was significantly lower than that in QSG-7701 cells with the lowest expression in SMMC-7721 cells. Dual luciferase reporter gene assay confirmed that RAC1 was a target gene of miR-223-3p, and miR-223-3p negatively regulated RAC1 expression. Over-expression of miR-223-3p significantly inhibited the

[作者简介] 戚欣(1987-),女,硕士,主管技师,主要从事肿瘤临床检验诊断学研究,E-mail: qc9010@sina.com

proliferation and colony formation ($P<0.05$ or $P<0.01$) of SMMC-7721 cells and promoted cell apoptosis ($P<0.01$). Contrarily, knock-down of miR-223-3p reversed the inhibitory effect of miR-223-3p mimics on cells. **Conclusion:** miR-223-3p over-expression inhibits proliferation and colony formation and promotes apoptosis of HCC cells, the mechanism of which may be related with its targeted down-regulation of RAC1.

[Key words] miR-223-3p; Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1); hepatocellular carcinoma (HCC); SMMC-7721 cell; proliferation; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(6): 664-670. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.06.012]

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是常见恶性肿瘤之一,为位居恶性肿瘤死亡的第3大肿瘤。目前虽在治疗策略上取得了较多进展,但因HCC具有高复发率和病灶转移迅速的特点^[1],患者5年生存率仍较低^[2],因此探究HCC发生发展的分子机制十分重要。随着近年来对微小RNA(microRNA, miRNA)的深入研究,越来越多的miRNA被证实作为癌基因或抑癌基因,与恶性肿瘤的进展密切相关。已有研究表明,miR-223-3p作为抑癌因子在HCC细胞中异常低表达^[3],并调控细胞增殖^[4],可作为HCC分子诊断的标志物^[5]。同时,Ras相关C3肉毒素底物1(Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, RAC1)作为Ras通路下游小分子蛋白,对调控细胞增殖和凋亡有重要作用^[6],作为促癌因子与多种恶性肿瘤相关。此外,生物信息学数据库预测RAC1为miR-223-3p的潜在靶基因。但miR-223-3p靶向RAC1对HCC细胞增殖和凋亡的作用及其机制尚未见报道。故此,本研究通过检测HCC组织和细胞系中miR-223-3p的表达,探讨miR-223-3p/RAC1分子轴对HCC细胞增殖和凋亡的影响及其机制,旨在为HCC的早期诊断和靶向治疗提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2016年8月至2018年8月吉林市中心医院手术切除的30例HCC组织及癌旁组织(距肿瘤边缘至少3 cm)标本,所有手术标本切除后立即置于含有RNA保存液的冻存管中,于-80℃超低温冰箱中保存备用。其中,男21例、女9例,年龄(46.8±8.9)岁。按照美国癌症联合委员会(AJCC)原发性肝癌TNM分级标准进行肿瘤TNM分级,依据Edmondson-Steiner有关分级标准进行肿瘤分化程度分级。病例纳入标准:(1)病理特征符合《新编常见恶性肿瘤诊治规范》所述HCC诊断指标;(2)经病理学检查,并由2名经验丰富的病理医师明确诊断为HCC;(3)患者均行根治性切除术;(4)HCV、HBV病毒感染类型或非病毒感染型HCC患者;(5)患者家属术前知情并同意。病例排除标准:(1)伴有酒精性肝病、肝血管瘤和肝脏腺瘤;(2)合并其他恶性肿瘤;(3)糖尿病、高血压等

基础性疾病;(4)手术前接受过放化疗;(5)手术前2周内服用激素类、免疫类药物;(6)术前行介入栓塞治疗;(7)临床资料不全。本研究通过所在医院临床伦理委员会批准,所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 细胞系及主要试剂

人HCC细胞系Bel-7402、HepG2、SMMC-7721和人肝细胞系QSG-7701购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。胰蛋白酶、青霉素、链霉素、RPMI-1640培养基、胎牛血清购自Gibco公司,SYBR® Premix Ex Taq II及TRIzol试剂盒购自TaKaRa公司,Lipofectamine™ 3000转染试剂盒购自美国Invitrogen公司,M-MLV逆转录试剂盒购于Promega公司,U6和miR-223-3p引物、miR-223-3p模拟物(mimics)、miR-223-3p抑制剂(inhibitor)、siRAC1由上海吉玛制药技术有限公司合成,PMSF、RIPA裂解液、BCA试剂盒购于北京碧云天生物科技公司,CCK-8试剂盒购于北京百奥莱博科技有限公司,RAC1抗体购自美国Abcam公司,辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗鼠IgG抗体购于Promega公司,质粒提取试剂盒、双荧光素报告基因试剂盒购自Promega公司,Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒购自美国BD公司。

1.3 细胞培养、转染及分组

所有细胞系均用含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素的RPMI 1640培养基,置于37℃、5% CO₂培养箱中常规培养。取对数生长期SMMC-7721细胞,用胰酶消化后调整细胞密度为1×10⁵个/ml后,接种于6孔板(2×10⁵个/孔)中。实验分为4组:miR-223-3p mimics组、miR-223-3p inhibitor组、siRAC1组、miR-223-3p inhibitor+siRAC1组,参照Lipofectamine™ 3000转染试剂盒说明书的方法分别将各载体转染至SMMC-7721细胞,48 h后检测转染效率。收集转染成功细胞,经0.25%胰蛋白酶消化,RPMI 1640培养液重悬后用于所需实验。

1.4 qPCR检测HCC组织和细胞系中miR-223-3p的表达水平

TRIzol试剂盒提取总RNA并检测其纯度(组织于检测前需在液氮条件下磨碎),依照试剂盒说明书

方法逆转录cDNA。随后PCR扩增逆转录产物,扩增体系为20 μ l,其中包括10 μ l SYBR[®] Premix Ex Taq II、0.8 μ l PCR Forward Primer、0.8 μ l PCR Reverse Primer、0.4 μ l ROX Reference Dye、2 μ l cDNA溶液、6 μ l dH₂O,每组样品设置3个复孔。反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性5 min,95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 15 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,共40个循环;72 $^{\circ}$ C延伸5 min。引物序列:miR-223-3p F为5'-GGGGTGTTCAGTTTGTCAA-3',R为5'-TGC GTGTTCGTGGAGTC-3';U6 F为5'-GCTTCGGCAG-CACATATACTAAAAT-3',R为5'-CGCTTCACGAAT TTGCGTGTTCAT-3'。采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}方法分析组织及细胞系中miR-223-3p的相对表达水平。

1.5 克隆形成实验检测SMMC-7721细胞的克隆形成能力

0.25%胰蛋白酶消化后吹打成单个细胞,RMPI-1640培养液重悬细胞,以300细胞/孔接种至6孔板中,每组细胞设置3个复孔,于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的培养箱中静置培养14 d。弃去上清液,PBS清洗2次,4%多聚甲醛固定20 min。弃去固定液,1%结晶紫染色20 min,统计克隆形成数目(以>50个细胞的集落计为1克隆)。

1.6 CCK-8法检测SMMC-7721细胞的增殖活力

0.25%胰蛋白酶消化后培养液重悬SMMC-7721细胞并调整密度至 1×10^5 个/ml,接种至96孔板(100 μ l/孔),每组细胞设置3个复孔。置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的培养箱中常规培养,分别于0、24、72和96 h检测细胞的增殖情况。每孔加入10 μ l CCK-8溶液,在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中孵育2 h后,于酶标仪上测定波长在450 nm处的光密度(D)值,绘制细胞生长曲线。

1.7 Annexin V-FITC/PI染色流式细胞术检测SMMC-7721细胞的凋亡水平

细胞经胰酶消化,3 000 \times g离心5 min,吸除上清液。加入1 ml预冷的70%乙醇,4 $^{\circ}$ C固定12~24 h。3 000 \times g离心5 min后沉淀细胞后,PBS重悬细胞。每管加入5 μ l Annexin V-FITC及5 μ l PI染色液,37 $^{\circ}$ C下避光共孵育30 min。经流式细胞仪检测并分析细胞周期,统计细胞的凋亡率。

1.8 双荧光素酶报告基因实验验证miR-223-3p与RAC1的靶向关系

利用StarBase预测miR-223-3p与RAC1靶向结合序列,分别设计合成RAC1野生型(WT)及其突变型(MUT)结合位点序列。PCR扩增位点片段,构建RAC1报告载体,分别为pGL3-RAC1 WT和pGL3-RAC1 MUT。参照转染说明书,将报告载体及miR-223-3p mimics转染入293T细胞,同时转染phRL-tk(海肾荧光素酶)为内参。转染48 h后收集细胞,采

用双荧光素酶报告基因检测试剂盒及酶标仪测定荧光值。

1.9 Western blotting(WB)检测SMMC-7721细胞中RAC1的表达水平

PMSF及RIPA提取细胞总蛋白,BCA试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品与上样缓冲液以5:1比例混合,沸水浴5 min。进行SDS-PAGE、转PVDF膜,5%脱脂牛奶室温封闭2 h。TBST洗膜后,加入RAC1一抗(1:1 000),4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。次日,漂洗2次后,加入HRP标记的羊抗鼠IgG二抗(1:1 000),室温避光孵育2 h,TBST洗膜后,加入ECL显影,用凝胶成像设备观察并拍照,用Image J软件分析蛋白条带的灰度值,以 β -actin为内参,分析RAC1的相对表达水平。

1.10 统计学处理

qPCR、克隆形成、CCK-8、流式细胞术、WB等实验均重复3次。采用SPSS 20.0软件对实验数据进行统计分析,用GraphPad Prism 7绘制统计图。正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用方差分析;miR-223-3p表达与患者临床病理特征相关性采用非参数 χ^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-223-3p在HCC组织及细胞系中低表达

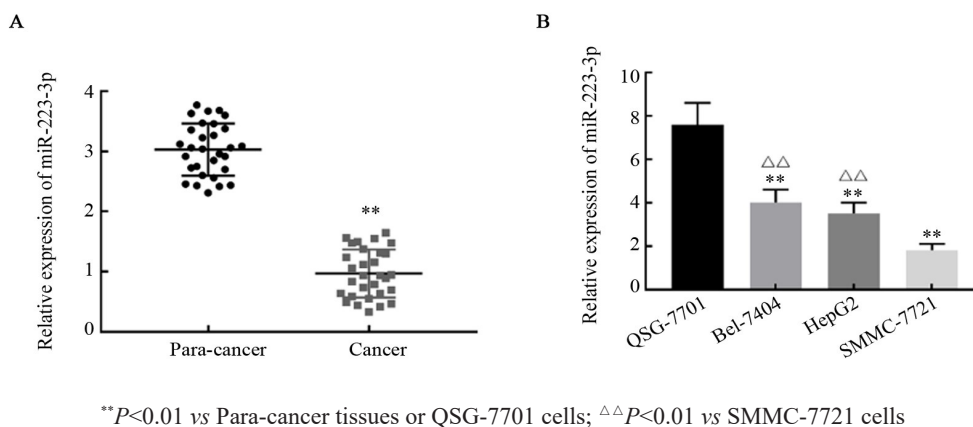
qPCR实验结果(图1)显示,miR-223-3p在HCC组织中的表达水平显著低于癌旁组织($t=19.09$, $P < 0.01$;图1A)。HCC患者miR-223-3p水平高低两组间肿瘤大小、TNM分期及肿瘤分化程度有显著差异(均 $P < 0.05$,表1)。miR-223-3p在Bel-7402、HepG2、SMMC-7721细胞中的表达水平显著低于QSG-7701细胞($t=9.62$, $P < 0.01$;图1B),以SMMC-7721细胞中表达水平最低(后续实验选择SMMC-7721细胞)。实验结果表明,miR-223-3p在HCC组织和细胞系中均低表达。

2.2 miR-223-3p调控SMMC-7721细胞增殖和凋亡

qPCR检测结果(图2A)显示,与对照组比较,转染miR-223-3p mimics后SMMC-7721细胞中miR-223-3p的表达水平显著上调($t=19.75$, $P < 0.01$);转染miR-223-3p inhibitor后细胞中miR-223-3p表达水平显著下调($t=13.94$, $P < 0.01$)。CCK-8和克隆形成实验结果(图2B、C)显示,与对照组比较,过表达miR-223-3p后SMMC-7721细胞的增殖(72 h: $t=7.21$, $P < 0.05$;96 h, $t=7.39$, $P < 0.05$)及克隆形成能力($t=4.85$, $P < 0.01$)均显著降低;敲降miR-223-3p后,对SMMC-7721细胞的增殖(72 h: $t=6.76$, $P < 0.05$;96 h, $t=7.14$, $P < 0.05$)及克隆形成能力($t=3.36$, $P < 0.05$)则

产生相反的作用。流式细胞术检测结果(图2D)显示,与对照组比较,过表达miR-223-3p显著上调SMMC-7721细胞的凋亡水平($t=4.96, P<0.01$);敲降

miR-223-3p显著下调细胞的凋亡水平($t=4.66, P<0.01$)。以上结果表明,miR-223-3p可调控SMMC-7721细胞的增殖能力及凋亡水平。



** $P<0.01$ vs Para-cancer tissues or QSG-7701 cells; $\Delta\Delta P<0.01$ vs SMMC-7721 cells

图1 miR-223-3p在HCC组织(A)和细胞系(B)中的表达

Fig.1 Expression of miR-223-3p in HCC tissues (A) and cell lines (B)

表1 miR-223-3p表达与HCC患者临床病理特征的关系(n)

Tab.1 The relationship between miR-223-3p expression and pathological characteristics of HCC patients (n)

Characteristic	N	Expression of miR-223-3p		χ^2	P
		Low	High		
Gender					
Male	22	16	6	0.01	0.947
Female	8	5	3		
Age (t/a)					
<40	14	9	5	0.66	0.523
≥40	16	12	4		
Tumor size (d/cm)					
<5	9	4	5	3.94	0.046
≥5	21	17	4		
TNM Stage					
I - II	12	7	5	4.82	0.028
III-IV	18	14	4		
Edmondson-Steiner grade					
I - II	10	5	5	4.26	0.019
III-IV	20	17	3		

2.3 miR-223-3p靶向负调控RAC1

StarBase预测miR-223-3p在RAC1 3'-UTR区有互补结合位点(图3A)。双荧光素酶报告基因实验结果(图3B)显示,miR-223-3p显著抑制pGL3-RAC1 WT的荧光素酶活性($t=7.74, P<0.01$),而当结合位点突变后,过表达miR-223-3p对荧光素酶活性无显著影响。WB实验结果(图3C)显示,与对照组相比,过表达miR-223-3p显著下调RAC1表达水平($t=6.61, P<0.01$);反之,敲降miR-223-3p,RAC1表达水平上调($t=7.48, P<0.01$)。上述结果表明,miR-223-3p靶

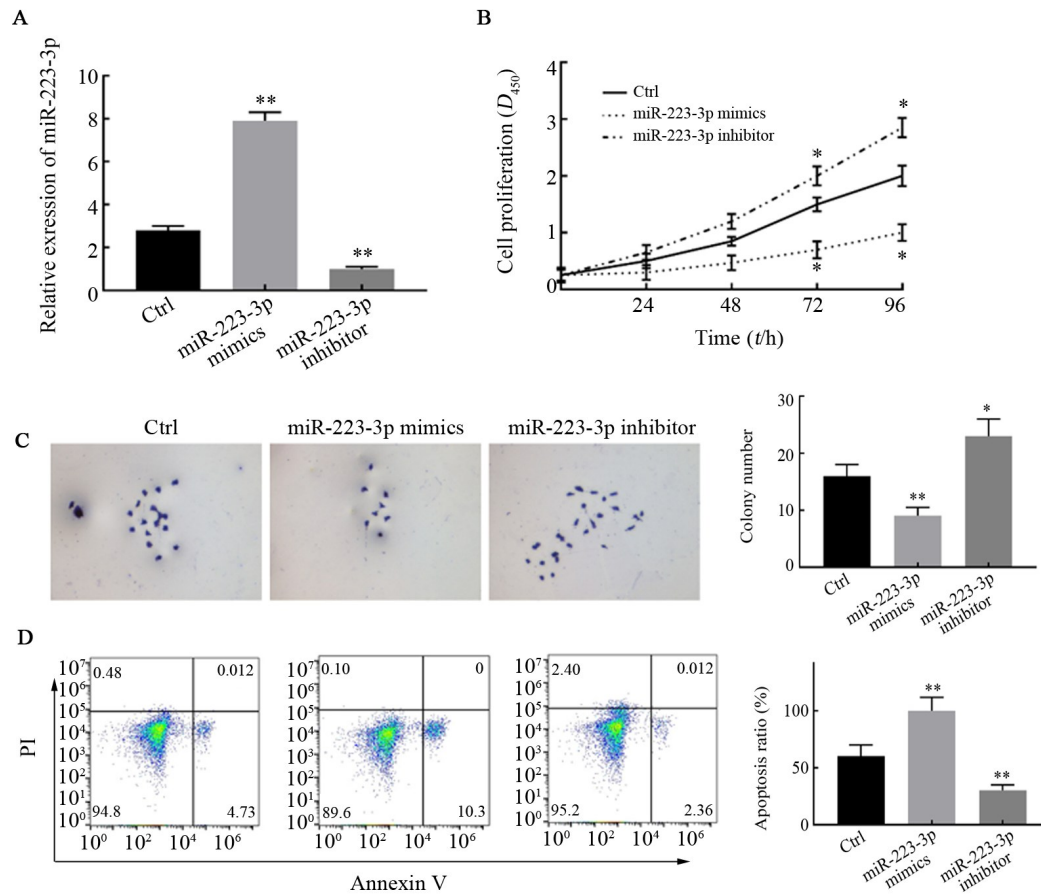
向负调控RAC1的表达。

2.4 miR-223-3p通过靶向RAC1抑制SMMC-7721细胞的增殖并诱导细胞凋亡

WB实验结果(图4A)显示,与对照组比较,敲降RAC1显著下调SMMC-7721细胞中RAC1蛋白水平($t=7.04, P<0.01$);与敲降RAC1组比较,同时敲降RAC1和miR-223-3p后细胞中RAC1表达水平显著上调($t=7.34, P<0.01$)。敲降RAC1后,显著抑制SMMC-7721细胞的增殖(72 h: $t=11.23, P<0.01$;96 h: $t=12.67, P<0.01$;图4B)和克隆形成能力($t=6.17, P<0.01$;图4C),并且诱导细胞凋亡($t=5.67, P<0.01$;图4D);而同时敲降RAC1和miR-223-3p对SMMC-7721细胞增殖、克隆形成和凋亡的影响与对照组相比差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。以上结果表明,miR-223-3p通过下调RAC1表达,抑制SMMC-7721细胞的增殖并诱导细胞凋亡。

3 讨论

HCC是原发性肝癌的最常见组织学亚型,是全球肿瘤死亡的第3大主要病因,同时也是第6大常见的恶性肿瘤。HCC具有侵袭性强和转移发生率高的特点,致死率高、预后差,甚至总体5年生存率<10%^[1],其中重要原因就是HCC发病隐匿,确诊时多为中晚期,错过手术切除治疗的最佳时期,而采取放、化疗也易发生复发或转移。因此,深入研究HCC发生发展的机制,积极寻求有效的诊断与治疗方法对于降低HCC发病率和提高患者的生存率具有重要意义。

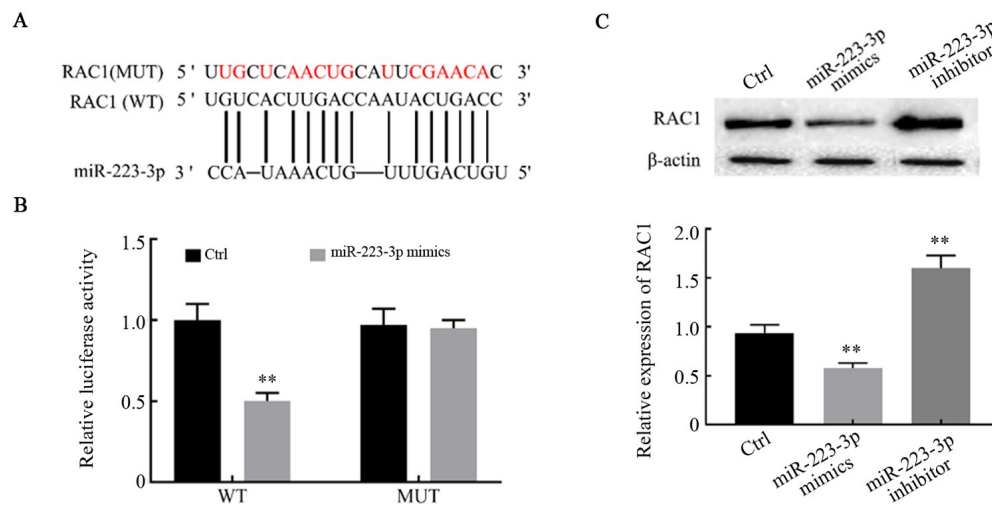


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Ctrl group

A: Expression of miR-223-3p detected by qPCR; B: Effect of miR-223-3p on colony formation of SMMC-7721 cells detected by colony formation assay ($\times 4$); C: Effect of miR-223-3p on the proliferation of SMMC-7721 cells detected by CCK-8; D: Effect of miR-223-3p on apoptosis of SMMC-7721 cells detected by Flow cytometry

图2 miR-223-3p对SMMC-7721细胞增殖、克隆形成和凋亡的影响

Fig.2 Effects of miR-223-3p on proliferation, colony formation and apoptosis of SMMC-7721 cells

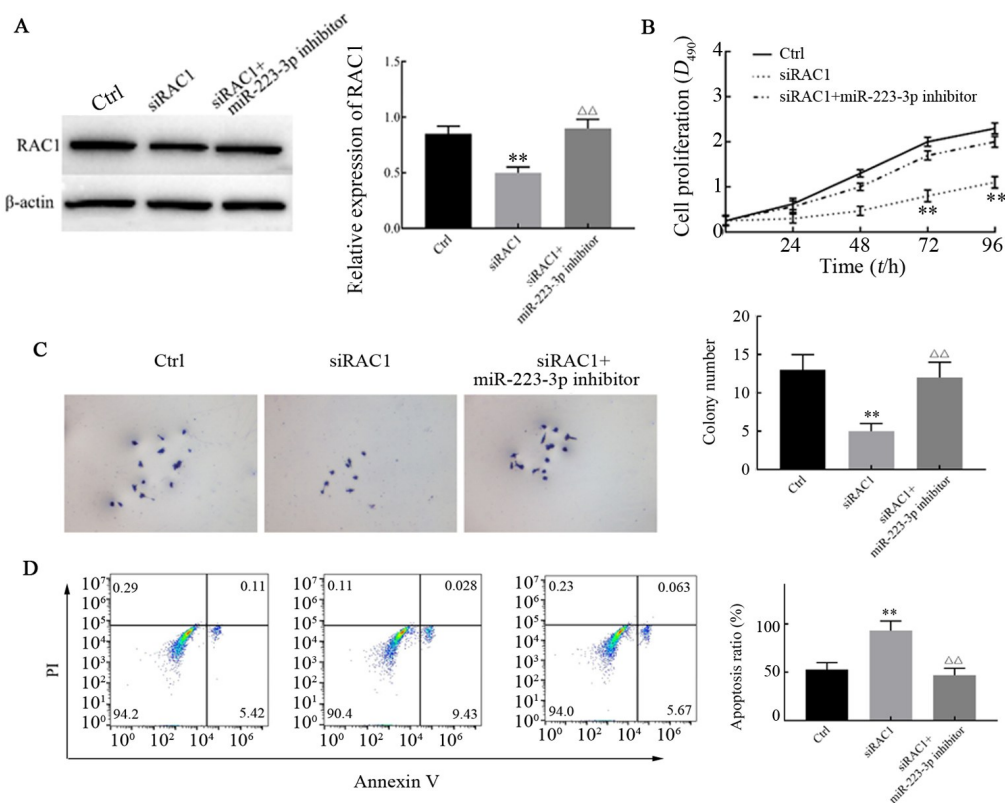


** $P < 0.01$ vs Ctrl group

A: The binding site between miR-223-3p and RAC1 was confirmed by StarBase; B: The relationship between miR-223-3p and RAC1 was verified by Dual-luciferase reporter gene assay; C: The expression of RAC1 protein in SMMC-7721 cells was measured by WB

图3 miR-223-3p靶向负调控RAC1

Fig.3 miR-223-3p targeted and negatively regulated RAC1



** $P < 0.01$ vs Ctrl group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs siRAC1 group

A: The expression of RAC1 in SMMC-7721 cells measured by WB; B: The cell proliferation ability measured by CCK-8; C: Colony formation of SMMC-7721 cells detected by Colony formation assay (×4); D: The percentage of apoptotic cells measured by Flow cytometry

图4 miR-223-3p靶向RAC1抑制SMMC-7721细胞增殖并诱导细胞凋亡

Fig.4 miR-223-3p suppressed proliferation and induced apoptosis of SMMC-7721 by targeting RAC1

近年来,随着对 miRNA 在各种肿瘤发病机制中作用研究的不断深入,为进一步明确发病机制提供了新的视角和思路。肿瘤细胞中某些特定的 miRNA 的表达水平异常,因此特异性 miRNA 的表达水平可作为肿瘤诊断和治疗的有效检测指标。例如,miR-223-3p 对不同细胞的增殖、迁移、侵袭等有重要的影响^[7]。本研究通过临床样本检测,发现 miR-223-3p 在 HCC 组织中低表达,且与患者的肿瘤大小、TNM 分期和肿瘤分化程度有显著相关性,提示 miR-223-3p 在 HCC 中可能发挥抑癌作用。进一步在体外实验发现,在 HCC 细胞中 miR-223-3p 异常低表达,促进了肿瘤细胞的体外增殖并抑制细胞凋亡,相反在 HCC 细胞中过表达 miR-223-3p 则显著抑制细胞增殖而促进其凋亡。此前,miR-223-3p 被报道在骨肉瘤细胞中通过直接靶向钙黏蛋白-6 抑制细胞增殖、侵袭和迁移^[8],成胶质细胞瘤中通过靶向 NLRP3 抑制细胞增殖和迁移等恶性表型^[9]。但也有研究发现,miR-223-3p 在部分肿瘤中扮演促癌分子,如在前列腺癌细胞^[10]和透明肾细胞癌^[11]中具有促癌作用,促进细胞体外恶性增殖。因此,推测 miR-223-3p 具有改变肿瘤细胞表

型的潜能,且其作用及机制存在肿瘤类型差异。许多 miRNA 都被发现在不同肿瘤中不仅具有不同的机制,并且可能发挥着截然不同的作用。本研究发现,miR-223-3p 对 HCC 存在促进作用,并通过进一步的机制研究证实 RAC1 为 miR-223-3p 所调控的靶分子,过表达 miR-223-3p 通过下调 RAC1 蛋白水平参与调控 HCC 细胞的增殖和凋亡。

RAC1 作为 Ras 通路中的重要产物,在通路中起到信号转换器、分子开关的作用。通过转录激活、细胞黏附、细胞骨架构建以及增强细胞间信号传递^[12]等,促进细胞增殖并抑制凋亡过程,引起肿瘤的发生^[13]。其表达还与与肿瘤患者的多种临床特征相关,例如高水平 RAC1 通常与肿瘤高 TNM 分期、高增殖能力、易转移复发等临床病理学因素密切相关^[6]。同时,YANG 等^[14]研究证实,III - IV 期 HCC 组织中 RAC1 表达水平高于 I - II 期,且 RAC1 高表达是患者预后不良因素之一。DEBIDDA 等^[15]研究报道,RAC1 调控细胞 ROS 积累和 p53 蛋白活性,影响小鼠成纤维细胞的细胞周期进程和凋亡。TEN 等^[16]研究认为,RAC1 通过其 C 端与核原癌基因 SET 的结合,促进肿瘤细胞的迁移。WANG 等^[17]

研究发现, RAC1 通过激活 JNK/c-Jun 通路, 从而促进胰腺癌的发生和进展。本研究体外实验发现, RAC1 作为 miR-223-3p 下游分子调控 HCC 细胞 SMMC-7721 的增殖与凋亡, 敲降 RAC1 显著抑制 SMMC-7721 细胞的增殖及凋亡。

综上所述, 本研究证实 miR-223-3p 与 HCC 发生发展有重要关系, 其机制是通过调控靶基因 RAC1 的表达而影响 HCC 细胞的增殖和凋亡, miR-223-3p 有望作为 HCC 潜在的诊断标志物和治疗靶点。

[参考文献]

- [1] ZUCMAN-ROSSI J, VILLANUEVA A, NAULT J C, et al. Genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Gastroenterology*, 2015, 149(5): 1226-1239[2019-10-08]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508515008690>. DOI: 10.1053/j.gastro.2015.05.061.
- [2] ZHANG R, ZHANG L J, YANG M L, et al. Potential role of microRNA-223-3p in the tumorigenesis of hepatocellular carcinoma: a comprehensive study based on data mining and bioinformatics[J/OL]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(2): 2211-2228[2019-10-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5783470/>. DOI: 10.3892/mmr.2017.8167.
- [3] OKSUZ Z, SERIN M S, KAPLAN E, et al. Serum microRNAs; miR-30c-5p, miR-223-3p, miR-302c-3p and miR-17-5p could be used as novel non-invasive biomarkers for HCV-positive cirrhosis and hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Biol Rep*, 2015, 42(3): 713-720. DOI: 10.1007/s11033-014-3819-9.
- [4] YU G F, CHEN X Z, CHEN S D, et al. MiR-19a, miR-122 and miR-223 are differentially regulated by hepatitis B virus X protein and involve in cell proliferation in hepatoma cells[J/OL]. *J Transl Med*, 2016, 14(1): 122[2019-10-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4858919/>. DOI: 10.1186/s12967-016-0888-7.
- [5] GIRAY B G, EMEKDAS G, TEZCAN S, et al. Profiles of serum microRNAs; miR-125b-5p and miR-223-3p serve as novel biomarkers for HBV-positive hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(7): 4513-4519. DOI: 10.1007/s11033-014-3322-3.
- [6] JI J, FENG X J, SHI M, et al. Rac1 is correlated with aggressiveness and a potential therapeutic target for gastric cancer[J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(3): 1343-1353. DOI: 10.3892/ijo.2015.2836.
- [7] YANG F H, XU Y G, LIU C, et al. NF- κ B/miR-223-3p/ARID1A Axis is involved in Helicobacter pylori CagA-induced gastric carcinogenesis and progression[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(1): 12 [2019-10-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5849037/>. DOI: 10.1038/s41419-017-0020-9.
- [8] JI Q B, XU X J, SONG Q, et al. MiR-223-3p inhibits human osteosarcoma metastasis and progression by directly targeting CDH6[J/OL]. *Mol Ther*, 2018, 26(5): 1299-1312[2019-10-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5993963/>. DOI: 10.1016/j.ymthe.2018.03.009.
- [9] DING Q P, SHEN L, NIE X H, et al. MiR-223-3p overexpression inhibits cell proliferation and migration by regulating inflammation-associated cytokines in glioblastomas[J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(9): 1330-1339. DOI: 10.1016/j.prp.2018.05.012.
- [10] WEI Y B, YANG J R, YI L, et al. MiR-223-3p targeting SEPT6 promotes the biological behavior of prostate cancer[J/OL]. *Sci Rep*, 2014, 4: 7546[2019-10-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4269886/>. DOI: 10.1038/srep07546.
- [11] XIAO W, WANG X G, WANG T, et al. MiR-223-3p promotes cell proliferation and metastasis by downregulating SLC4A4 in clear cell renal cell carcinoma[J/OL]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(2): 615-633[2019-10-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6366987/>. DOI: 10.18632/aging.101763.
- [12] BAKER M J, COOKE M, KAZANIETZ M G. Nuclear PKC ϵ -ECT2-Rac1 and ribosome biogenesis: a novel Axis in lung tumorigenesis[J]. *Cancer Cell*, 2017, 31(2): 167-169. DOI: 10.1016/j.ccell.2017.01.008.
- [13] GU Y, FILIPPI M D, CANCELAS J A, et al. Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases[J]. *Science*, 2003, 302(5644): 445-449. DOI: 10.1126/science.1088485.
- [14] YANG W Y, LV S, LIU X Y, et al. Up-regulation of Tiam1 and Rac1 correlates with poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2010, 40(11): 1053-1059. DOI: 10.1093/jcco/hyq086.
- [15] DEBIDDA M, WILLIAMS D A, ZHENG Y. Rac1 GTPase regulates cell genomic stability and senescence[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(50): 38519-38528. DOI: 10.1074/jbc.M604607200.
- [16] TEN KLOOSTER J P, LEEUWEN I V, SCHERES N, et al. Rac1-induced cell migration requires membrane recruitment of the nuclear oncogene SET[J/OL]. *EMBO J*, 2007, 26(2): 336-345[2019-10-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1783461/>. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601518.
- [17] WANG P, CHEN L, ZHANG J, et al. Methylation-mediated silencing of the miR-124 genes facilitates pancreatic cancer progression and metastasis by targeting Rac1[J]. *Oncogene*, 2014, 33(4): 514-524. DOI: 10.1038/onc.2012.598.

[收稿日期] 2020-02-05

[修回日期] 2020-05-15

[本文编辑] 党瑞山