

miR-206 过表达靶向 VEGFA 对人肝癌 HepG2 细胞侵袭和迁移的抑制作用

王小明¹, 余 珊¹, 赵晓姬²

(1. 攀枝花市中心医院消化内科, 四川 攀枝花 617067; 2. 绵阳市第三人民医院检验科 四川省精神卫生中心, 四川 绵阳 621000)

【摘要】 目的 探究 miR-206 过表达对人肝癌 HepG2 细胞侵袭和迁移的影响及其分子机制。**方法** HepG2 细胞分为四组: HepG2 空白对照组, miR-206 mimic 组, pc-VEGFA 组和 miR-206 mimic + pc-VEGFA 组。qRT-PCR 检测 miR-206 表达和 VEGFA 的 mRNA 水平。荧光素酶实验确认 miR-206 与 VEGFA 的靶向关系。Western blot 检测 VEGFA, 抗波形蛋白, N-钙粘蛋白和纤维连接蛋白的表达。Transwell 检测细胞侵袭。划痕实验分析细胞迁移。**结果** 转染 miR-206 mimic 后 HepG2 细胞中 miR-206 表达显著上升, VEGFA 的 mRNA 水平显著下降 ($P < 0.001$)。miR-206 与 VEGFA 存在直接靶向关系。与对照组相比, miR-206 mimic 组 VEGFA 的蛋白水平, 每个视野下的侵袭细胞数目, 愈合率显著下降 ($P < 0.01$)。pc-VEGFA 组 VEGFA 的蛋白水平, 每个视野下的侵袭细胞数目, 愈合率显著高于对照组 ($P < 0.01$)。与 pc-VEGFA 组相比, miR-206 mimic + pc-VEGFA 组 VEGFA 的蛋白水平, 每个视野下的侵袭细胞数目, 愈合率显著降低 ($P < 0.01$)。miR-206 mimic 组 vimentin, N-cadherin 和 Fibronectin 表达低于对照组 ($P < 0.01$)。pc-VEGFA 组 vimentin, N-cadherin 和 Fibronectin 表达高于对照组 ($P < 0.01$)。与 pc-VEGFA 组相比, miR-206 mimic + pc-VEGFA 组 vimentin, N-cadherin 和 Fibronectin 表达降低 ($P < 0.01$)。**结论** miR-206 过表达通过靶向 VEGFA 抑制人肝癌 HepG2 细胞侵袭和迁移。

【关键词】 肝癌; miR-206; VEGFA; 侵袭; 迁移; 上皮间质转化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 08-0095-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.08.017

miR-206 overexpression inhibits the invasion and migration of liver cancer cell line HepG2 by targeting VEGFA

WANG Xiaoming¹, YU Shan¹, ZHAO Xiaojie²

(1. Department of Gastroenterology, Central Hospital of Panzhihua, Panzhihua 617067, China;

2. Department of Clinical Laboratory, The Third People's Hospital of Mianyang City,

Sichuan Mental Health Center, Mianyang 621000)

【Abstract】 Objective To explore the effect of miR-206 overexpression on the invasion and migration of the liver cancer cell line HepG2. **Methods** HepG2 cells were divided into four groups: HepG2 (control) group, miR-206 mimic group, pc-VEGFA group, and miR-206 mimic + pc-VEGFA group. The expression of miR-206 and level of VEGFA mRNA were analyzed by quantitative real-time reverse-transcription PCR. A luciferase experiment was used to confirm the targeting

of VEGFA by miR-206. The expression of VEGFA, vimentin, N-cadherin, and fibronectin was detected by western blotting. Cell invasion was measured by a Transwell assay. Cell migration was determined by a scratch assay. **Results** After transfection with miR-206 mimic in HepG2 cells, the expression of miR-206 was increased with declined mRNA level of VEGFA ($P < 0.001$). VEGFA was a direct target of miR-206. Compared with control group, the protein level of VEGFA, the number of invasive cells per field and scratch healing rate in miR-206 mimic group was reduced ($P < 0.01$). The protein level of VEGFA, the number of invasive cells per field and scratch healing rate in pc-VEGFA group was higher than control group ($P < 0.01$). Compared with pc-VEGFA group, the protein level of VEGFA, the number of invasive cells per field and scratch healing rate in miR-206 mimic + pc-VEGFA group was decreased ($P < 0.01$). The expression of vimentin, N-cadherin and Fibronectin in miR-206 mimic group was lower than control group ($P < 0.01$). The expression of vimentin, N-cadherin and Fibronectin in pc-VEGFA group was higher than control group ($P < 0.01$). Compared with pc-VEGFA group, the expression of vimentin, N-cadherin and Fibronectin in miR-206 mimic + pc-VEGFA group was reduced ($P < 0.01$). **Conclusions** The overexpression of miR-206 inhibits the invasion and migration of liver cancer HepG2 cells by targeting VEGFA.

【Keywords】 liver cancer; miR-206; VEGFA; invasion; migration; epithelial-mesenchymal transition

据统计 2015 年全世界新增肝癌病例 85.4 万, 发病率第六位; 肝癌死亡病例 84 万, 死亡率第四位^[1]。目前对早期肝癌的治疗一般采用外科手术进行部分切除或者进行肝脏移植再结合术后的辅助性治疗; 对中后期的肝癌患者只能采取化疗, 免疫疗法及靶向治疗等^[2]。靶向治疗是一种新兴的治疗方法, 寻找合适的靶点对靶向治疗至关重要。小 RNA (MicroRNAs, miRs) 是一类短的非编码 RNA, 长度仅为 22 个核苷酸左右, 会影响基因表达的转录后调控。目前发现许多在肝癌中异常表达的 miRs, 这些 miRs 在肝癌的发生发展中发挥着重要作用, 有望成为靶向治疗的靶点^[3-4]。深入研究 miRs 在肝癌中的作用对肝癌的治疗具有重要意义。本研究的主要目的是探索 miR-20 在人肝癌 HepG2 细胞侵袭和迁移中的功能。

1 材料和方法

1.1 细胞

人肝癌细胞系 HepG2 来源于 ATCC (American Type Culture Collection)。

1.2 主要试剂

DMEM 培养基、胎牛血清及转染试剂 TurboFect Transfection Regent 购自赛默飞世尔科技公司; RNA 提取试剂盒和定量 PCR 试剂盒 SYBR Premix Ex Taq™ 购自大连 Takara 公司; 载体 pcDNA3.1-EGFP 购自 Biofeng; 荧光素酶检测试剂盒来源于 Promega 公司; Transwell 小室及人工基底膜购自美国 BD 公司; 抗血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA) 抗体、抗波形蛋白 (vimentin) 抗体、抗 N-钙粘蛋白 (N-cadherin) 抗体和抗纤维

连接蛋白 (fibronectin) 抗体购自 Abcam 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养分组与转染

HepG2 细胞于含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的 DMEM 培养基, 并置于 37℃ 5% CO₂ 的恒温培养箱中培养。当细胞增殖到约 80% 进行传代。通过转染 miR-206 mimic 过表达 miR-206, 转染 pc-VEGFA 过表达 VEGFA。HepG2 细胞分为四组: HepG2 组 (对照组), miR-206 mimic 组, pc-VEGFA 组和 miR-206 mimic + pc-VEGFA 组。按照转染试剂 TurboFect Transfection Regent 的说明书向 HepG2 细胞单独或同时转染 miR-206 mimic 和 pc-VEGFA 过表达载体。

1.3.2 qRT-PCR 扩增分析

用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 然后反转成 cDNA, 最后进行 PCR, miR-206 上游引物: 5'-CA-GATCCGATTGGAATGTAAGG-3', miR-206 下游引物: 5'-ATGC TTGTTCTCGTCTCTGTGTC-3'。VEGFA 上游引物: 5'-CCAGCAGAAAGAG GAAAGAGG-TAG-3', VEGFA 下游引物: 5'-CCCCAAAAGCAG-GTCACTCAC-3'。

根据 SYBR Premix Ex Taq™ 说明书进行 qRT-PCR, 用公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算相对表达量。

1.3.3 荧光素酶实验

首先用洗涤液洗涤待测细胞, 弃去洗涤液后在孔中加入 1 倍的细胞裂解液将细胞裂解。室温下, 振荡器上振荡 5~10 min, 移入离心管中进行离心, 3000 r/min 5 min, 离心后取上清进行发光测定。按照试剂盒说明书和仪器操作说明对待测样品进行发光值测定。

1.3.4 Western blot 检测 VEGFA, 抗波形蛋白, N-钙粘蛋白和纤维连接蛋白的表达

用 PBS 清洗待测细胞 3 次, 加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液进行总蛋白提取, 100℃ 变性 5 min。然后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离并转至 PVDF 膜。5% 的 BSA 封闭 1 h, 再加入相应的一抗, 4℃ 过夜孵育, 第 2 天加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 1.5 h。最后加入发光液后于凝胶成像仪进行曝光拍照并统计灰度值计算相对表达量。

1.3.5 Transwell 检测细胞侵袭

首先用无血清的培养基将待测细胞制成 1×10^6 个/mL 的细胞悬液, 然后将细胞悬液加入铺有人工基底膜的 transwell 的上室中, 同时在下室中加入含 20% 胎牛血清的培养基。37℃ 培养 24 h 后, 用 0.5% 的结晶紫对上室底部细胞进行染色, 并用棉签除去上室内侧的细胞。显微镜下观察并统计细胞数量。

1.3.6 划痕检测细胞迁移

待测细胞制成 1×10^6 个/mL 的细胞悬液后加入 6 孔板中, 过夜培养至形成单层细胞。在单层细胞上用 10 μ L 的枪头划横线, PBS 洗 3 次以洗去因划痕而脱落的细胞。显微镜下拍照测量划痕宽度, 培养 24 h 后再取出拍照测量划痕宽度。

1.4 统计学方法

用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析, 实验数据以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两两比较用独立的 t 检验, $P < 0.05$ 为差有显著性。

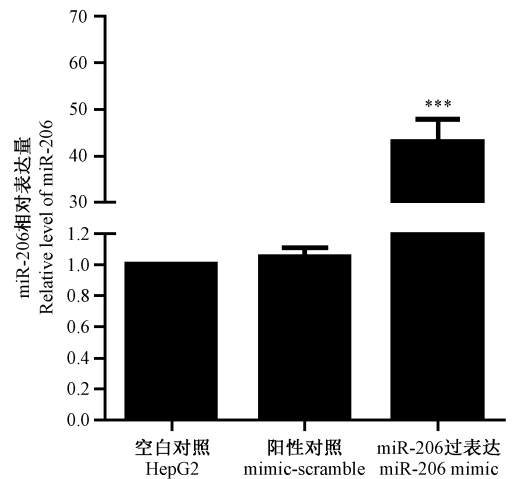
2 结果

2.1 miR-206 mimic 对肝癌细胞 HepG2 中 miR-206 表达的影响

由图 1 可知, 转染 mimic-scramble 后 HepG2 细胞中 miR-206 表达没有明显变化。转染 miR-206 mimic 后 HepG2 细胞中 miR-206 表达显著上升 ($P < 0.001$)。由此可见, miR-206 mimic 可显著增强 HepG2 细胞中 miR-206 的表达。

2.2 miR-206 过表达对 HepG2 细胞 VEGFA 的 mRNA 水平的影响

如图 2 所示, 转染 mimic-scramble 不会影响 VEGFA 的 mRNA 水平。转染 miR-206 mimic 会显著降低 VEGFA 的 mRNA 水平 ($P < 0.001$)。以上结果说明, miR-206 过表达可减弱 HepG2 细胞 VEGFA 的 mRNA 水平。

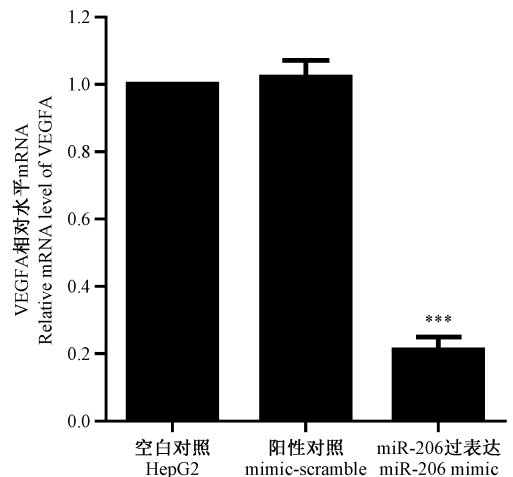


注: 与对照组比较, *** $P < 0.001$ 。

图 1 qRT-PCR 检测 HepG2 细胞中 miR-206 表达

Note. Compared with the control group, *** $P < 0.001$.

Figure. 1 qRT-PCR detection of miR-206 expression in HepG2 cells



注: 与对照组比较, *** $P < 0.001$ 。

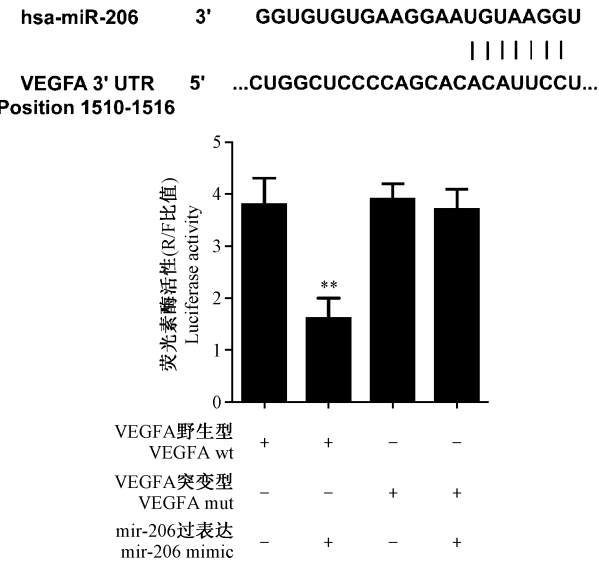
图 2 qRT-PCR 检测 HepG2 细胞中 VEGFA 的 mRNA 水平

Note. Compared with the control group, *** $P < 0.001$.

Figure. 2 qRT-PCR detection of VEGFA mRNA levels in HepG2 cells

2.3 miR-206 与 VEGFA 的靶向关系

生物信息学预测显示 miR-206 可直接靶向 VEGFA, 利用荧光素酶实验验证 miR-206 与 VEGFA 的靶向关系。如图 3 所示, 向 VEGFA 野生型的细胞中转染 miR-206 mimic 后荧光素酶活性显著下降 ($P < 0.01$)。但向 VEGFA 突变型的细胞中转染 miR-206 mimic 后荧光素酶活性却没有明显变化。上述结果表明, miR-206 与 VEGFA 存在直接靶向关系。



注: +: 添加; -: 不添加; 与 VEGFA 野生型的细胞比, ** $P < 0.01$ 。

图 3 荧光素酶实验检测 miR-206 与 VEGFA 的靶向关系

Note. +: Add. -: Not add. Compared with the VEGFA wildtype cells, ** $P < 0.01$ 。

Figure. 3 Luciferase assay to detect the targeted relationship between miR-206 and VEGFA

2.4 miR-206 对 VEGFA 表达的影响

由图 4 可知,miR-206 mimic 组 VEGFA 的蛋白水平显著低于对照组 ($P < 0.01$)。pc-VEGFA 组 VEGFA 的蛋白水平显著高于对照组 ($P < 0.01$)。与 pc-VEGFA 组相比,miR-206 mimic + pc-VEGFA 组 VEGFA 的蛋白水平显著降低 ($P < 0.01$)。由此可见,miR-206 负向调控 VEGFA 表达。

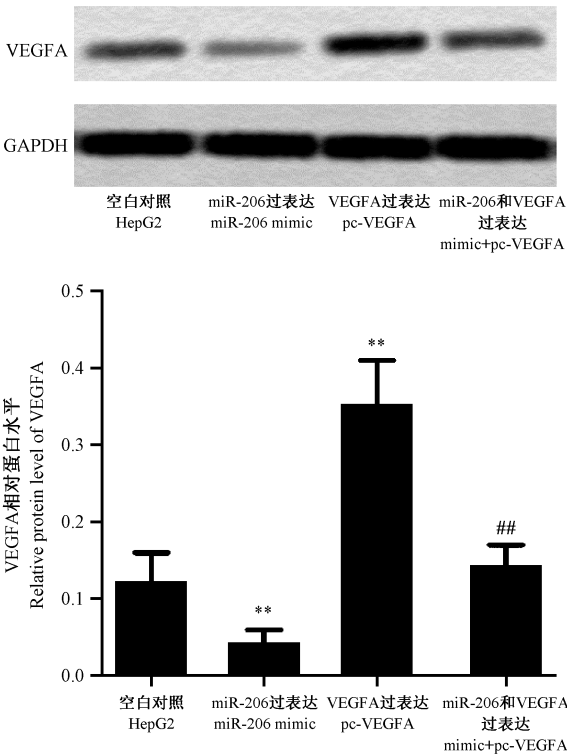
2.5 miR-206 过表达靶向 VEGFA 对 HepG2 细胞侵袭的影响

如图 5 所示,miR-206 mimic 组每个视野下的侵袭细胞数目显著少于对照组 ($P < 0.01$)。pc-VEGFA 组每个视野下的侵袭细胞数目显著多于对照组 ($P < 0.01$)。与 pc-VEGFA 组相比,miR-206 mimic + pc-VEGFA 组每个视野下的侵袭细胞数目显著下降 ($P < 0.01$)。以上结果说明,miR-206 过表达可通过靶向 VEGFA 减弱 HepG2 细胞侵袭。

2.6 miR-206 过表达靶向 VEGFA 对 HepG2 细胞迁移的影响

图 6 显示,miR-206 mimic 组划痕愈合率显著低于对照组 ($P < 0.01$)。pc-VEGFA 组划痕愈合率显著高于对照组 ($P < 0.01$)。与 pc-VEGFA 组相比,miR-206 mimic + pc-VEGFA 组划痕愈合率显著降低

($P < 0.01$)。上述结果表明,miR-206 过表达可通过靶向 VEGFA 抑制 HepG2 细胞迁移。

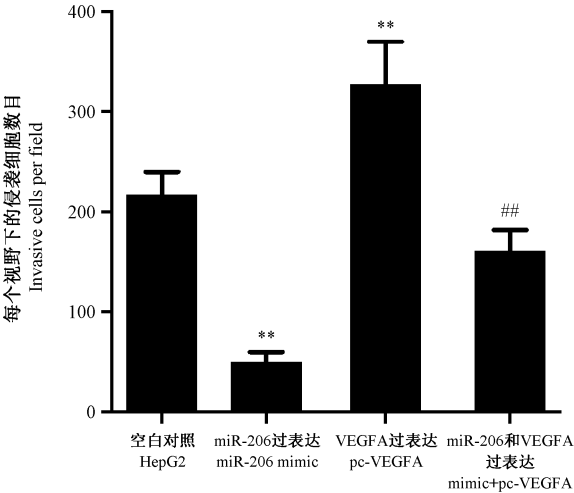


注:与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与 pc-VEGFA 组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 4 蛋白印记检测 VEGFA 的蛋白水平

Note. Compared with the control group, ** $P < 0.01$ 。 Compared with the pc-VEGFA group, ## $P < 0.01$ 。

Figure. 4 Protein imprinting to detect protein levels of VEGFA



注:与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与 pc-VEGFA 组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 5 Transwell 检测细胞侵袭

Note. Compared with the control group, ** $P < 0.01$ 。 Compared with the pc-VEGFA group, ## $P < 0.01$ 。

Figure. 5 Transwell assay for the detection of cell invasion

2.7 miR-206 过表达靶向 VEGFA 对 HepG2 细胞上皮间质转化相关蛋白表达的影响

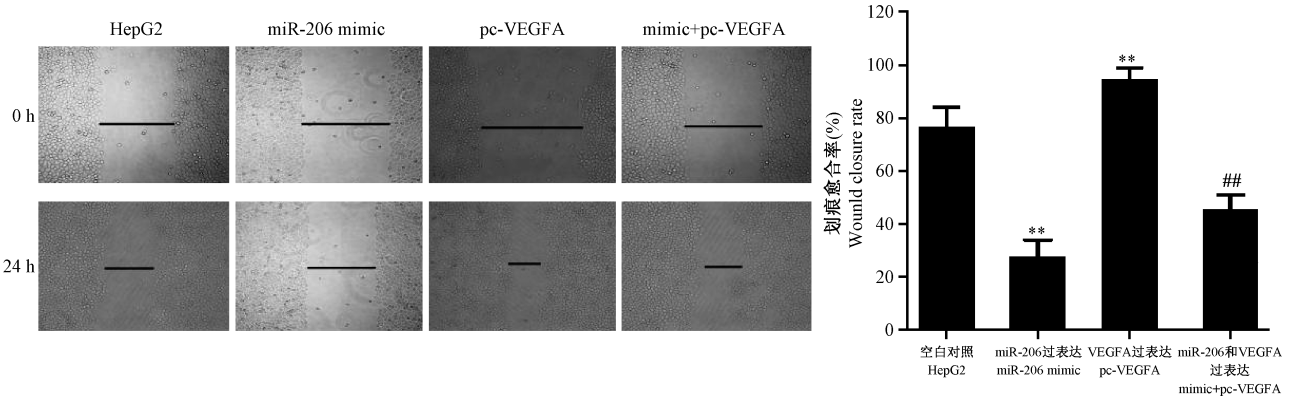
由图 7 可知,miR-206 mimic 组 vimentin, N-cadherin 和 Fibronectin 表达低于对照组 ($P < 0.01$)。pc-VEGFA 组 vimentin, N-cadherin 和 Fibronectin 表达高于对照组 ($P < 0.01$)。与 pc-VEGFA 组相比,miR-206 mimic + pc-VEGFA 组 vimentin, N-cadherin 和 Fibronectin 表达降低。由此可见,miR-206 过表达可通过靶向 VEGFA 减弱 HepG2 细胞上皮间质转化相关蛋白 vimentin, N-cadherin 和 Fibronectin 表达。

3 讨论

随着分子生物学的发展和非编码 RNA 的发现,microRNAs 受到越来越多的关注。大量研究表明 microRNAs 的异常表达常与包括癌症在内

的各类疾病相关。这些 microRNAs 在癌症的发展进程中起着重要作用,会影响所有的生物学过程^[5-6]。越来越多的文献报道 microRNAs 可通过靶向目标基因的方式调控癌细胞的增殖,凋亡,侵袭及迁移等^[7-8]。miR-206 作为一种独立的预后因素,在癌症中的作用受到了越来越多研究者的青睐^[1,2,9-10]。

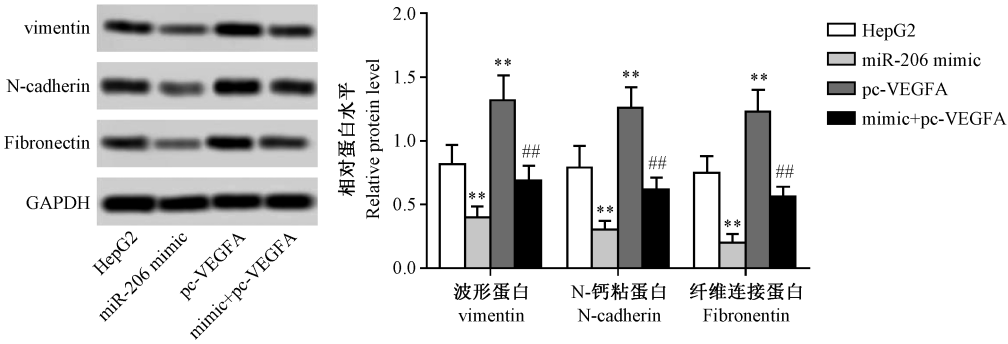
大量研究表明 miR-206 在调控细胞侵袭和迁移方面发挥着重要作用。有数据显示 miR-206 可直接靶向 FMNL2 降低结肠直肠癌细胞侵袭^[11]。Zhang 等^[12]发现在非小细胞肺癌中,miR-206 与 SOX9 存在直接靶向,可抑制细胞侵袭。据报道 miR-206 可通过靶向 ANXA2 和 KRAS 减弱胰腺癌细胞侵袭^[13]。有数据显示在肾细胞癌中 miR-206 可靶向 GAK 降低细胞迁移能力^[14]。Huang 等^[15]发现 miR-206 可负向调控 YRDC 抑制膀胱癌细胞迁移。有研



注:与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与 pc-VEGFA 组比较, ## $P < 0.01$ 。

Figure 6 Scratch test analysis of cell migration

Note. Compared with the control group, ** $P < 0.01$. Compared with the pc-VEGFA group, ## $P < 0.01$.



注:与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与 pc-VEGFA 组比较, ## $P < 0.01$ 。

Figure 7 Western blot 检测上皮间质转化相关蛋白表达

Note. Compared with the control group, ** $P < 0.01$. Compared with the pc-VEGFA group, ## $P < 0.01$.

究发现在乳腺癌中过表达 miR-206 可通过靶向 PFKFB3 抑制细胞迁移^[16]。

越来越多的文献报道肝癌中也存在许多可以调控细胞侵袭和迁移的 microRNAs。有研究表明在肝癌细胞中,miR-625 可直接靶向 IGF2BP1 降低细胞侵袭^[17]。Liu 等^[18]发现 miR-141 与 Tiam1 存在直接靶向,可抑制肝癌细胞侵袭。Li 等^[19]发现在肝癌细胞 LM3 中,miR-26b 与 EphA2 存在直接靶向关系,可降低细胞迁移。有数据显示在肝癌细胞 Huh7 和 HepG2 中,miR-150-5p 可直接靶向 MMP-14 减弱细胞迁移^[20]。

本研究表明,在肝癌细胞 HepG2 中,miR-206 与 VEGFA 存在直接靶向关系,负向调控 VEGFA 表达;miR-206 过表达可通过靶向 VEGFA 抑制细胞侵袭和迁移,减弱上皮间质转化相关蛋白 vimentin, N-cadherin 和 Fibronectin 表达。下一步将通过体内实验研究 miR-206 在肝癌的发生发展过程中的功能及其机制,为寻找肝癌的治疗靶点奠定基础。

参考文献:

- [1] Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: A systematic analysis for the global burden of disease study [J]. JAMA Oncol, 2017,3(4):524-548.
- [2] Liu CY, Chen KF, Chen PJ. Treatment of liver cancer [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2015,5(9):a021535.
- [3] Yang J, Han S, Huang W, et al. A meta-analysis of microrna expression in liver cancer [J]. PLoS One, 2014,9(12):e114533.
- [4] Callegari E, Gramantieri L, Domenicali M, et al. Micrnas in liver cancer: A model for investigating pathogenesis and novel therapeutic approaches [J]. Cell Death Differ, 2015,22(1):46-57.
- [5] Acunzo M, Romano G, Wernicke D, et al. Microrna and cancer--a brief overview [J]. Adv Biol Regul, 2015,57:1-9.
- [6] Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. Micrnas in cancer: Biomarkers, functions and therapy [J]. Trends Mol Med, 2014,20(8):460-469.
- [7] Han Y, Kuang Y, Xue X, et al. Nlk, a novel target of mir-199a-3p, functions as a tumor suppressor in colorectal cancer [J]. Biomed Pharmacother., 2014,68(5):497-505.
- [8] Yoda S, Soejima K, Hamamoto J, et al. Claudin-1 is a novel tar-

get of mir-375 in non-small-cell lung cancer [J]. Lung cancer, 2014,85(3):366-372.

- [9] Chen QY, Jiao DM, Wu YQ, et al. Mir-206 inhibits hgf-induced epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis in non-small cell lung cancer via c-met /pi3k/akt/mTOR pathway [J]. Oncotarget, 2016,7(14):18247-18261.
- [10] Sun P, Sun D, Wang X, et al. Mir-206 is an independent prognostic factor and inhibits tumor invasion and migration in colorectal cancer [J]. Cancer Biomark, 2015,15(4):391-396.
- [11] Ren XL, He GY, Li XM, et al. Microrna-206 functions as a tumor suppressor in colorectal cancer by targeting fmn12 [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2016,142(3):581-592.
- [12] Zhang YJ, Xu F, Zhang YJ, et al. Mir-206 inhibits non small cell lung cancer cell proliferation and invasion by targeting sox9 [J]. Int J Clin Exp Med, 2015,8(6):9107-9113.
- [13] Keklikoglou I, Hosaka K, Bender C, et al. Microrna-206 functions as a pleiotropic modulator of cell proliferation, invasion and lymphangiogenesis in pancreatic adenocarcinoma by targeting anxa2 and kras genes [J]. Oncogene, 2015,34(37):4867-4878.
- [14] Wei C, Wang S, Ye ZQ, et al. Mir-206 inhibits renal cell cancer growth by targeting gak [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2016,36(6):852-858.
- [15] Huang B, Zhai W, Hu G, et al. Microrna-206 acts as a tumor suppressor in bladder cancer via targeting yrdc [J]. Am J Transl Res, 2016,8(11):4705-4715.
- [16] Ge X, Lyu P, Cao Z, et al. Overexpression of mir-206 suppresses glycolysis, proliferation and migration in breast cancer cells via pfkfb3 targeting [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015,463(4):1115-1121.
- [17] Zhou X, Zhang CZ, Lu SX, et al. Mir-625 suppresses tumour migration and invasion by targeting igf2bp1 in hepatocellular carcinoma [J]. Oncogene, 2015,34(8):965-977.
- [18] Liu Y, Ding Y, Huang J, et al. Mir-141 suppresses the migration and invasion of hcc cells by targeting tiam1 [J]. PLoS One, 2014,9(2):e88393.
- [19] Li H, Sun Q, Han B, et al. Mir-26b inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation, migration, and invasion by targeting epha2 [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015,8(5):4782-4790.
- [20] Li T, Xie J, Shen C, et al. Mir-150-5p inhibits hepatoma cell migration and invasion by targeting mmp14 [J]. PLoS One, 2014,9(12):e115577.

[收稿日期]2018-03-15