

# miR-198 通过靶向 ZEB2 调控 EMT 过程抑制肝癌细胞增殖和迁移的机制研究

陈 偲<sup>1</sup>, 李忠辉<sup>2a</sup>, 王 颖<sup>2b</sup>

(1. 解放军联勤保障部队第九六九医院感染科, 呼和浩特 010010; 2. 内蒙古包头市昆都仑区包钢医院

a. 肿瘤内科; b. 老年病科, 内蒙古包头 014010)

**摘要:** 目的 探讨微小核糖核酸-198 (miR-198) 在肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 组织细胞中的表达及其对癌细胞增殖、迁移的影响及其相关机制。方法 采用 qRT-PCR 检测 miR-198 在 HCC 组织及细胞 (HepG2, Hep3G, MHCC97H, Huh7) 中的表达情况; 采用脂质体 2000 向 Huh7 细胞中单独转染 miR-198 mimics, 共转染 miR-198 mimics 和 pcDNA3.1-ZEB2; 生物信息学网站预测 miR-198 的潜在靶基因, 采用双荧光素酶报告基因实验进行验证; 采用 Western blot 检测 E 盒结合锌指蛋白 2 (E-box binding zinc finger protein 2, ZEB2) 及上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transformation, EMT) 相关蛋白表达; CCK-8 法和细胞划痕实验检测 Huh7 细胞增殖和迁移能力。结果 20 例 HCC 组织中 miR-198 相对表达量 ( $0.354 \pm 0.022$ ) 明显低于邻近正常组织 ( $4.762 \pm 1.135$ ) 差异有统计学意义 ( $t=17.365$ ,  $P < 0.001$ )。HCC 细胞系 HepG2 ( $0.589 \pm 0.103$ ), Hep3G ( $0.495 \pm 0.086$ ), MHCC97H ( $0.558 \pm 0.056$ ) 和 Huh7 ( $0.362 \pm 0.045$ ) 中 miR-198 相对表达量较正常肝细胞 LO2 ( $1.823 \pm 0.125$ ) 显著降低 ( $t=17.159, 18.466, 17.590, 20.315$ , 均  $P < 0.05$ )。miR-198 mimics 组细胞增殖 ( $0.398 \pm 0.146$  vs  $0.691 \pm 0.213$ ) 和迁移能力 ( $20.012 \pm 2.103$  vs  $84.032 \pm 6.512$ ) 较对照组明显降低 ( $t=1.965, 52.459$ , 均  $P < 0.001$ )。miR-198 mimics 组细胞中 E-cadherin 表达较对照组明显升高, N-cadherin 和 Vimentin 表达较对照组明显降低 ( $t=18.478, 17.550, 19.706$ , 均  $P < 0.01$ )。ZEB2 是 miR-198 的靶基因, miR-198 负调控 ZEB2。20 例 HCC 组织中 ZEB2 相对表达量 ( $3.621 \pm 1.143$ ) 明显高于邻近正常组织 ( $0.736 \pm 0.030$ ), 差异有统计学意义 ( $t=11.284$ ,  $P < 0.001$ ), 与 miR-198 表达呈负相关 ( $r=-0.702$ ,  $P < 0.05$ )。共转染过表达 ZEB2 逆转了 miR-198 mimics 对 HCC 细胞增殖、迁移和 EMT 的抑制作用。结论 miR-198 在 HCC 组织和细胞中表达下调, miR-198 通过靶向负调控 ZEB2 的表达抑制 Huh7 细胞的增殖和迁移。

**关键词:** 肝细胞癌; 微小核糖核酸-198; E 盒结合锌指蛋白 2 (ZEB2); 增殖; 迁移; 上皮间质转化

**中图分类号:** R735.7; R730.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2022) 04-023-07

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2022.04.005

## Study on the Mechanism of miR-198 Inhibiting the Proliferation and Migration of Hepatoma Cells by Regulating EMT Process by Targeting ZEB2

CHEN Si<sup>1</sup>, LI Zhong-hui<sup>2a</sup>, WANG Ying<sup>2b</sup>

(1. Department of Infectious Disease, PLA Joint Support Unit 969 Hospital, Hohhot 010010, China; 2a. Department of Oncology; 2b. Department of Geriatric, Inner Mongolia Baotou Kundulun District Baogang Hospital, Inner Mongolia Baotou 010010, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression of micro RNA (miR) -198 in hepatocellular carcinoma (HCC) tissues and its effects on the proliferation and migration of cancer cells and related mechanisms. **Methods** qRT-PCR was used to detect the expression of miR-198 in HCC tissues and cells (HepG2, Hep3G, MHCC97H, Huh7). The liposome 2000 was used to transfect miR-198 mimics alone, co-transfect miR-198 mimics and pcDNA3.1-ZEB2 into Huh7 cells. Bioinformatics website predicted that the potential target gene of miR-198, and the double luciferase reporter gene experiment was used for verification. Western blot was used to detect the expression of E-box binding zinc finger protein 2 (ZEB2) protein and epithelial-mesenchymal transformation (EMT) related proteins, and CCK-8 and scratch test were used to detect the proliferation and migration ability of Huh7 cells. **Results** The relative expression of miR-198 in 20 HCC tissues ( $0.354 \pm 0.022$ ) was significantly lower than that in adjacent normal tissues ( $4.762 \pm 1.135$ ), with the difference was statistically significant ( $t=17.365$ ,  $P < 0.001$ ). HCC

**基金项目:** 内蒙古自然科学基金项目 (2019BS08056)。

**作者简介:** 陈偲 (1984-), 女, 硕士研究生, 副主任医师, 研究方向: 肝脏疾病的诊治, E-mail: chensipla@163.com。

**通讯作者:** 王颖 (1978-), 女, 研究生, 副主任医师, 研究方向: 老年人恶性肿瘤的治疗, E-mail: 595400820@qq.com。

cell lines HepG2 ( $0.589 \pm 0.103$ ), Hep3G ( $0.495 \pm 0.086$ ), MHCC97H ( $0.558 \pm 0.056$ ) and Huh7 ( $0.362 \pm 0.045$ ) was significantly lower than that in normal liver cells LO2 miR-198 in normal liver cell ( $1.823 \pm 0.125$ ) ( $t=17.159, 18.466, 17.590, 20.315$ , all  $P < 0.05$ ). The proliferation( $0.398 \pm 0.146$  vs  $0.691 \pm 0.213$ ) and migration( $20.012 \pm 2.103$  vs  $84.032 \pm 6.512$ ) of miR-198 mimics group were significantly decreased compared with the control group ( $t=1.965, 52.459$ , all  $P < 0.001$ ). The expression of E-cadherin( $2.010 \pm 0.089$  vs  $1.001 \pm 0.032$ ) in miR-198 mimics group was significantly higher than that in control group, and the expression of N-cadherin( $0.362 \pm 0.056$  vs  $1.001 \pm 0.029$ ) and Vimentin( $0.356 \pm 0.048$  vs  $1.000 \pm 0.030$ ) was significantly lower than that in control group ( $t=18.478, 17.550, 19.706$ , all  $P < 0.01$ ). ZEB2 was the target gene of miR-198 and miR-198 negatively regulates ZEB2. The relative expression of ZEB2 in 20 HCC tissues ( $3.621 \pm 1.143$ ) was significantly higher than that in adjacent normal tissues ( $0.736 \pm 0.030$ ), the difference was statistically significant ( $t=11.284, P < 0.001$ ), and was negatively correlated with miR-198 expression ( $r = -0.702, P < 0.05$ ). Overexpression of ZEB2 by cotransfection reversed the inhibitory effect of miR-198 mimics on HCC cell proliferation, migration and EMT. **Conclusion** MiR-198 was down-regulated in HCC tissues and cells, and inhibits the proliferation and migration of Huh7 cells by negatively regulating the expression of ZEB2.

**Keywords:** hepatocellular carcinoma; miR-198; E-box binding zinc finger protein 2(ZEB2); proliferation; migration; epithelial-mesenchymal transition

原发性肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 简称肝癌, 是目前全球发病率第五和死亡率第三的恶性肿瘤, 其中约 50% 的新发 HCC 病例来自中国, 每年大约 60 万患者因 HCC 死亡<sup>[1-2]</sup>。HCC 因缺乏敏感度和特异度高的肿瘤分子标志物, 早期诊断困难, 故从分子机制上探索 HCC 的发生和发展, 寻找有效的生物治疗靶点是当前研究的重要方向<sup>[3]</sup>。微小核糖核酸 (microRNAs, miRNAs) 是一种内源性非编码小分子 RNA, 大约由 21 ~ 25 个核苷酸组成, 通常可靶向一个或者多个 mRNA 通过翻译水平的抑制或断裂靶标 mRNAs 而调节基因表达, 参与肿瘤多种生物学过程, 例如细胞分化、增殖、凋亡及上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transformation, EMT) 等<sup>[4]</sup>。越来越多研究表明 miRNAs 在肺癌、食管癌、胰腺癌及结肠癌等<sup>[5-9]</sup>癌症中普遍存在表达失调的现象, 广泛参与多种肿瘤进程, 是一种新的肿瘤研究分子靶标。目前有关 miR-198 在肺腺癌<sup>[10]</sup>、乳腺癌<sup>[11]</sup>、卵巢癌<sup>[12]</sup>中的异常表达均有报道, 但是 miR-198 与 HCC 的发生、发展关系的研究鲜少。因此本研究以 HCC 细胞 Huh7 为研究对象, 探讨 miR-198 对 Huh7 细胞增殖和迁移能力的影响及其作用机制。

## 1 材料及方法

1.1 研究对象 选取人 HCC 细胞株 HepG2, Hep3G, MHCC97H, Huh7 及人正常肝细胞 chang liver, LO2 进行研究, 所有细胞均购自中国科学院上海细胞库。选取 2020 年 1 ~ 3 月解放军联勤保障部队第九六九医院病理科留存的 20 例 HCC 患者的癌组织及邻近正常组织标本, 经病理诊断后在液氮中低温保存备用; 患者术前未接受任何相关放疗及新辅助治疗。

1.2 仪器及试剂 RPMI-1640 培养基、胎牛血清 (美

国 Thermo Fisher 公司); 胰蛋白酶 (美国 gibco 公司); Trizol 试剂 (捷世康生物科技有限公司); 脂质体 2000 (北京天根生化科技公司); miR-198 mimics, mimics NC 由上海生工生物工程有限公司合成; pcDNA3.1-ZEB2 质粒、空载体 vector 质粒、ZEB2 3' -UTR-wt, ZEB2 3' -UTR-mut 报告基因质粒由 Invitrogen 公司设计构建; 逆转录试剂盒 (美国 Sigma 公司); 荧光定量 PCR 扩增仪 (Applied Biosystems 公司); BCA 蛋白浓度检测试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司); 免疫印迹所需兔抗人 ZEB2 多克隆抗体及 HRP 二抗 (Abcam 公司); CCK-8 试剂盒 (碧云天生物公司); 双荧光素酶报告基因系统 [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司]。

## 1.3 方法

1.3.1 细胞培养与传代: 本研究中所有细胞株均使用含 10g/dl 胎牛血清 RPMI-1640 培养液常规培养至细胞贴壁后, 0.25 g/dl 胰蛋白酶消化, 吹打制成单细胞悬液, 进行细胞传代。

1.3.2 细胞转染和分组: 取对数生长期待测细胞以  $1 \times 10^5$ /孔接种于 6 孔板, 待生长密度至 85% 时参照脂质体 2000 说明书进行转染, 后常规培养 2 天, 胰蛋白酶消化, 收集细胞进行实验。分组: 转染 miR-198 mimics 的细胞作为 miR-198 过表达组 (miR-198 mimics), 转染 mimics NC 作为阴性对照组 (mimics NC), 不作任何干预的细胞为空白对照组 (Blank), 转染 miR-198 mimics 与 pcDNA3.1-ZEB2 的细胞作为共转染组 (miR-198 mimics+pcDNA3.1-ZEB2)。

1.3.3 双荧光素酶报告基因实验: 检索生物信息学数据库预测 miR-198 的潜在靶基因, 发现 ZEB2 可能是 miR-198 的靶基因。利用荧光素酶报告基因实验进行验证, 构建包含 miR-198 结合区域在内

的 ZEB2 3'-UTR-wt 野生型和 ZEB2 3'-UTR-mut 突变型荧光报告基因质粒,与 miR-198 mimics 或 mimicsNC 共转染到待测细胞中,双荧光素酶报告基因系统检测细胞内荧光素酶活性。

1.3.4 qRT-PCR 实验: Trizol 法提取组织及细胞总 RNA, 逆转录成 cDNA, 以此为模板配置反应体系行 PCR 扩增实验, 扩增体系为: PCR 正反向引物 各 1  $\mu$ l, SYBR Premix Eaq™II(2 $\times$ ) 12.5  $\mu$ l, cDNA 2  $\mu$ l, 终体积 25  $\mu$ l。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 35 s, 循环 40 次。以 U6 作为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 miR-198 和 ZEB2 mRNA 相对表达。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Name	Primer Sequence
miR-198 F	5'-GGTCCAGAGGGGAGATAGGTC-3'
miR-198 R	5'-GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTGAAC-3'
ZEB2 F	5'-CAAUGUAGUGGACACAGGUUCUGAA-3'
ZEB2 R	5'-CAACGAGAUUCUACAAGCCUCUGAA-3'
U6 F	5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
U6 R	5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'

1.3.5 Western blot 实验: 收集细胞, 加入 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, BCA 法检测蛋白浓度。取等量蛋白上样, SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 转移到 PVDF 膜, 5 g/dl 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入一抗孵育过夜; 次日 PBS 清洗 2 次, 加入 HRP 二抗孵育 1 h, PBS 清洗 2 次, ECL 显色, 凝胶成像系统拍照, 以  $\beta$ -Actin 为内参采用 Gel-Pro Analyzer 软件进行灰度分析。

1.3.6 细胞增殖实验: 将  $1 \times 10^4$  个细胞接种到 96 孔板, 每孔体积 100  $\mu$ l, 24 h 后避光条件下加入 10  $\mu$ l 的 CCK-8 试剂, 培养 0, 24, 48, 72 h 时在 450 nm 波长下用酶标仪测定吸光度 ( $A$  值), 绘制细胞增殖曲线, 实验重复 3 次取平均值。

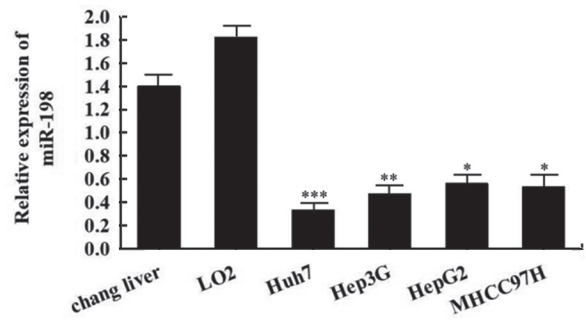
1.3.7 细胞迁移实验: 将转染后细胞胰酶消化制成细胞悬液,  $1 \times 10^6$  孔接种于 6 孔板, 37 $^{\circ}$ C, 5ml/dl CO<sub>2</sub> 培养 24 h; 次日用枪头垂直于 6 孔板划痕, PBS 冲洗 2 次, 无血清培养基继续培养 0 h, 48 h 拍照, 并测量划痕的宽度, 计算细胞迁移愈合率。细胞迁移愈合率 = (迁移宽度 / 划痕宽度)  $\times$  100%, 实验重复 3 次取平均值。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件进行实验数据分析, 数据用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间差异比较采用 one way ANOVA 分析, 组间两两比较采用 LSD- $t$  检验; 癌组织及癌旁正常组织中

差异比较采用配对  $t$  检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

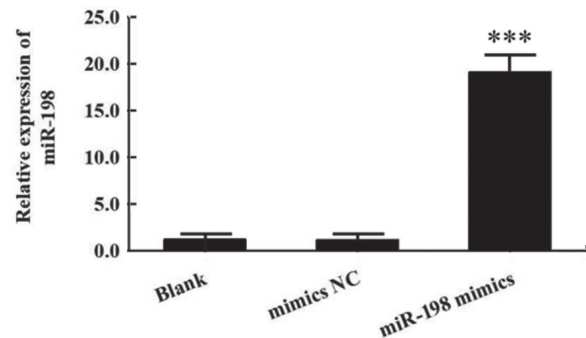
2.1 miR-198 在 HCC 组织及细胞中表达 qRT-PCR 检测发现, 20 例 HCC 组织中 miR-198 相对表达量 ( $0.354 \pm 0.022$ ) 明显低于邻近正常组织 ( $4.762 \pm 1.135$ ), 差异有统计学意义 ( $t=17.365$ ,  $P < 0.001$ )。与人正常肝细胞 LO2 相比, HCC 细胞 HepG2 ( $0.589 \pm 0.103$ ), Hep3G ( $0.495 \pm 0.086$ ), MHCC97H ( $0.558 \pm 0.056$ ), Huh7 ( $0.362 \pm 0.045$ ) 中 miR-198 相对表达量均呈现不同程度的降低 ( $t=17.159, 19.446, 17.590, 20.315$ , 均  $P < 0.001$ ), 其中 Huh7 细胞表达量最低, 见图 1, 选取 Huh7 细胞用于后续实验。



注: 与 chang liver 和 LO2 细胞相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

图 1 miR-198 在不同 HCC 细胞株及人正常肝细胞中的表达水平

2.2 miR-198 对 HCC 细胞增殖和迁移的影响 qRT-PCR 检测显示, miR-198 mimics 组细胞中 miR-198 表达较 Blank 组和 mimics NC 组显著升高 ( $t=13.433, 13.256$ , 均  $P < 0.001$ ), 见图 2。表明 miR-198 mimics 的转染使 Huh7 细胞中 miR-198 过表达, 转染有效, 可用于后续实验。



注: 与 Blank 组和 mimics NC 组比, \*\*\* $P < 0.001$ 。

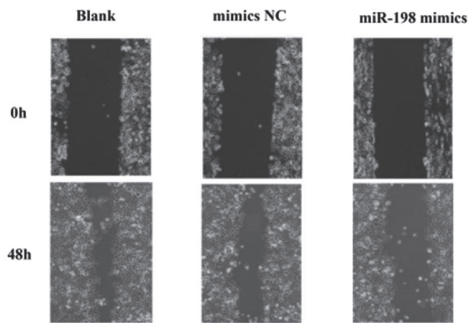
图 2 qRT-PCR 检测转染 miR-198 mimics 后 miR-198 的表达

CCK-8 检测结果显示, 与 Blank 组和 mimics NC 组相比, miR-198 mimics 组的增殖能力明显下降 ( $P < 0.05$ ), 见图 3。划痕实验检测结果显示,



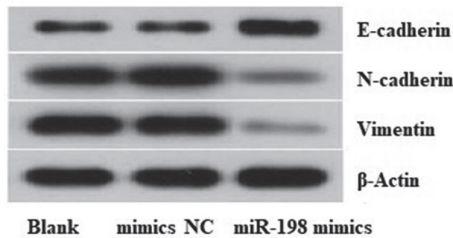
与 Blank 组和 mimics NC 组相比, miR-198 mimics 组 Huh7 细胞迁移能力显著降低 ( $F=52.771$ ,  $P < 0.001$ ), 见图 4。

2.3 miR-198 对 HCC 细胞 EMT 相关标志蛋白的影响 见图 5。Western blot 检测 EMT 相关标志蛋白 E-cadherin, N-cadherin, Vimentin 表达水平显示, miR-198 mimics 组细胞中 E-cadherin 表达较 Blank 组和 mimics-NC 组显著升高 ( $P < 0.01$ ), N-cadherin 和 Vimentin 表达较 Blank 组和 mimics-NC 组显著降低 (均  $P < 0.01$ )。



注: 与 Blank 组和 mimics NC 组比,  $***P < 0.001$ 。

图 4 转染 miR-198 mimics 对 Huh7 细胞体外迁移的影响



注: 与 Blank 组和 mimics NC 组比,  $**P < 0.01$ 。

图 5 转染 miR-198 mimics 对 EMT 相关蛋白表达的影响

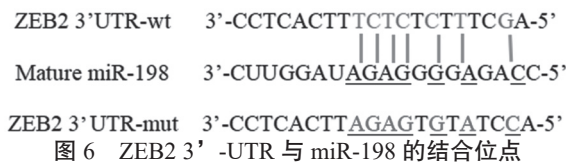
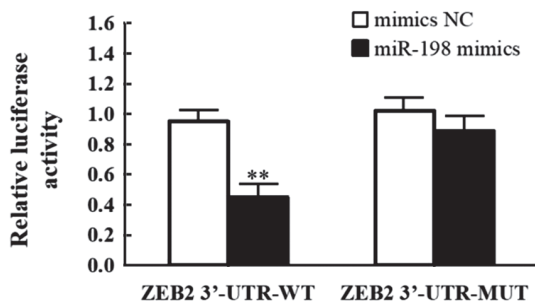


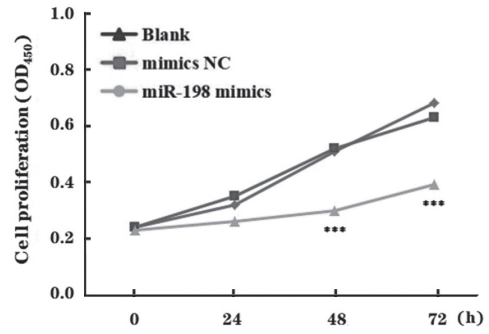
图 6 ZEB2 3'-UTR 与 miR-198 的结合位点



注: 与 mimics NC 组比,  $***P < 0.01$ 。

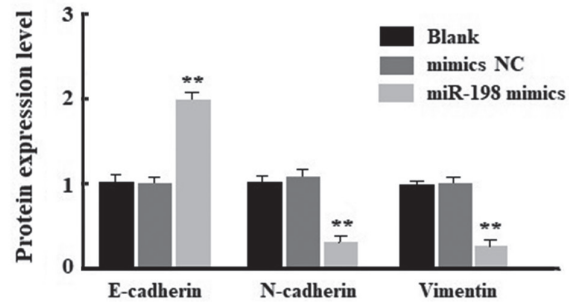
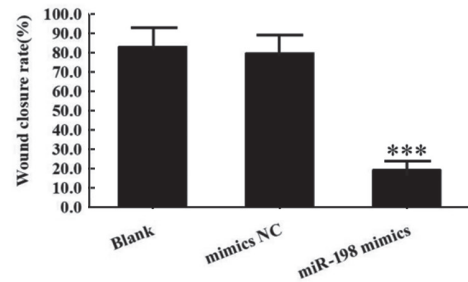
图 7 荧光素酶报告基因实验检测 Huh7 细胞中荧光素酶活性

2.4 miR-198 与 ZEB 靶向结合关系验证 生物信



注: 与 Blank 组和 mimics NC 组比,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ 。

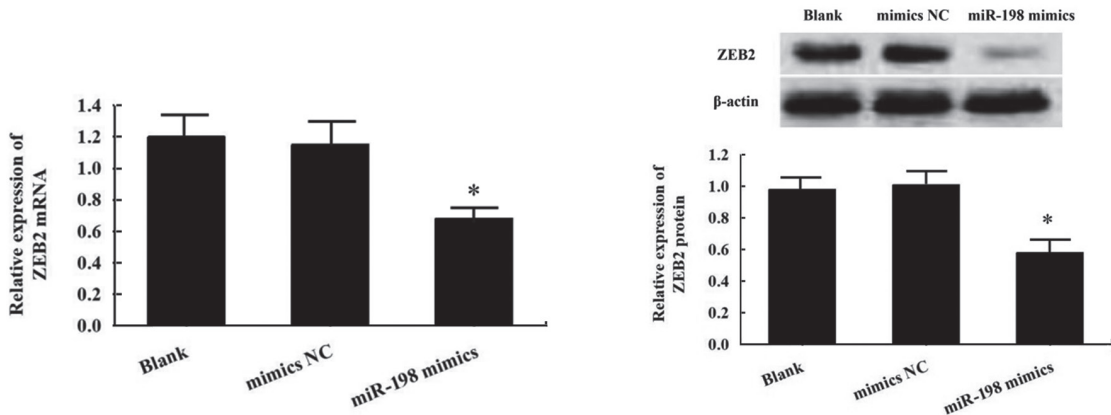
图 3 转染 miR-198 mimics 对 Huh7 细胞体外增殖的影响



息学软件预测发现, ZEB2 3'-UTR 与 miR-198 存在结合位点, 见图 6。双荧光素酶报告基因实验验证显示, miR-198 mimics 组 ZEB2-3'-UTR-WT 质粒荧光强度明显降低 ( $P < 0.01$ ), ZEB2-3'-UTR-MUT 质粒荧光强度变化无显著影响 ( $P > 0.05$ ), 见图 7。提示 ZEB2 是 miR-198 的靶基因。进一步检测发现, 相比于 Blank 组和 mimics NC 组, miR-198 mimics 组细胞中 ZEB2 mRNA 和 ZEB2 蛋白表达水平显著降低 ( $F=17.696$ ,  $436.609$ ,  $P < 0.05$ ), 见图 8。表明 miR-198 靶向负调控 ZEB2 表达。

2.5 HCC 组织中 ZEB2 表达及与 miR-198 的相关性 qRT-PCR 检测发现, 20 例 HCC 临床组织中 ZEB2 相对表达量 ( $3.621 \pm 1.143$ ) 明显高于邻近正常组织 ( $0.736 \pm 0.030$ ), 差异有统计学意义 ( $t=11.284$ ,  $P < 0.001$ ); Spearman 相关性分析显示, HCC 组织中 miR-198 和 ZEB2 呈显著负相

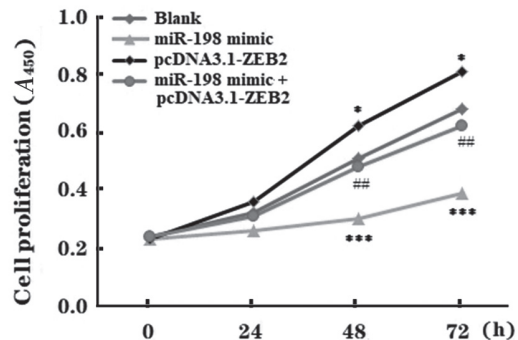
关 ( $r=-0.702$ ,  $P < 0.05$ )。



注: 与 Blank 组和 mimics NC 组比, \* $P < 0.05$

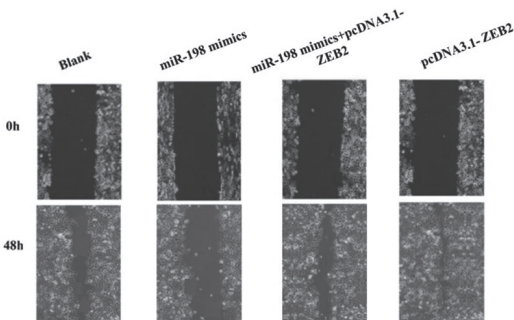
图8 qRT-PCR 和 Western blot 检测 miR-198 mimics 对 ZEB2 mRNA 和蛋白表达的影响

2.6 miR-198 靶向调控 ZEB2 抑制 HCC 细胞的增殖和迁移 研究转染 pcDNA3.1-ZEB2 过表达细胞中 ZEB2, 经细胞实验检测显示, 过表达 ZEB2 明显促进了 HCC 细胞的增殖和迁移 ( $P < 0.05$ ), 提示 ZEB2 发挥原癌基因属性; 在 miR-198 mimic 组共转染 pcDNA3.1-ZEB2 后, 细胞增殖和迁移能力较单独转染 miR-198 mimics 组显著增加 ( $P < 0.05$ ), 基本恢复至正常水平, 见图 9, 图 10。提示共转染 pcDNA3.1-ZEB2 能够逆转 miR-198 mimics 对 Huh7 细胞的增殖和迁移的抑制作用, 由此可见 miR-198 通过靶向负调控 ZEB2 表达可抑制 Huh7 细胞的增殖和迁移。



注: 与 Blank 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; miR-198 mimics+pcDNA3.1-ZEB2 与 miR-198 mimics 比较, ## $P < 0.01$ 。

图9 共转染 miR-198 mimics 和 pcDNA3.1-ZEB2 对 Huh7 细胞体外增殖的影响



注: 与 Blank 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; miR-198 mimics+pcDNA3.1-ZEB2 与 miR-198 mimics 比较, ## $P < 0.01$ 。

图10 共转染 miR-198 mimics 和 pcDNA3.1-ZEB2 对 Huh7 细胞体外迁移的影响

2.7 miR-198 靶向调控 ZEB2 抑制 HCC 细胞的 EMT 过程 Western blot 检测显示, miR-198 mimics+vector 组细胞中 E-cadherin 表达较 Blank 组显著升高 ( $P < 0.01$ ), N-cadherin 和 Vimentin 表达较 Blank 组则显著降低 ( $P < 0.01$ ), 与 miR-198 mimics 组无明显差异 ( $P > 0.05$ ); 在 miR-198 mimics 组细胞中共转染 pcDNA3.1-ZEB2 后, E-cadherin 和 N-cadherin, Vimentin 表达水平被显著逆转, 提示过表达 ZEB2 逆转了 miR-198 mimics 对 EMT 的抑制作用, 见图 11。说明 miR-198 靶向

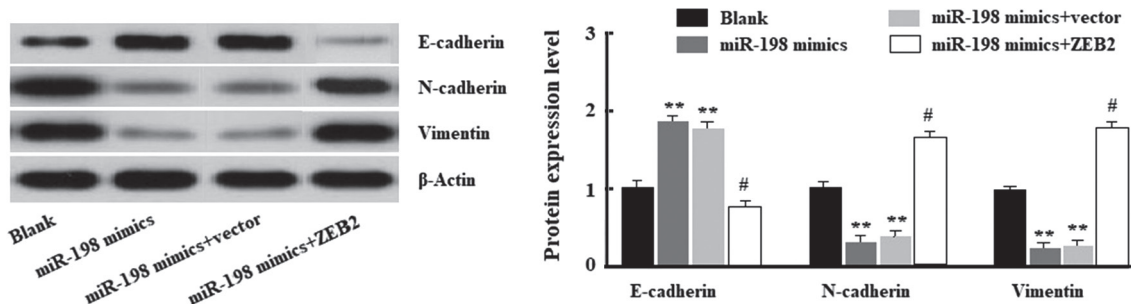
调控 ZEB2 可能通过 EMT 途径参与 HCC 细胞的增殖和迁移。

### 3 讨论

我国 HCC 占全球肝癌发生率的 50% 左右, 每年因 HCC 导致近 60 万人死亡, 乙型肝炎病毒感染 (HBV) 是 HCC 的常见病因, 其他危险因素常见黄曲霉素 B1、过量酒精滥用、药物、血色素沉着病和肥胖等<sup>[2,13]</sup>。miRNAs 具有高度保守性, 不易被降解, 调控下游靶基因和下游蛋白表达是 miRNAs 调控癌症发展的主要机制。miRNAs 即可

作为预测癌症发生发展的指标,也可作为治疗癌症的分子靶点,因此寻找与癌症发生相关的 miRNAs

及下游靶基因将有助于癌症的诊断和治疗<sup>[14-15]</sup>。



注:与 Blank 组比, \*\* $P < 0.01$ ; 与 miR-198 mimics 组比, # $P < 0.01$ 。

图 11 miR-198 靶向 ZEB2 抑制 HCC 细胞 EMT 过程

近年来研究发现,乳腺癌组织细胞中 miR-198 显著低表达,起抑癌基因的作用<sup>[11]</sup>;非小细胞肺癌(NSCLC)中,miRNA-198 抑制 HGF/c-MET 信号通路可克服放疗耐药性,诱导细胞凋亡<sup>[16]</sup>;王磊等<sup>[17]</sup>研究发现,HCC 组织中 miR-198 表达显著降低,与临床病理特征及患者预后密切相关,miR-198 低表达促进肝癌进展,提示其作为一种抑癌基因参与肿瘤的发生发展。而本研究探究发现,HCC 组织及细胞中 miR-198 同样显著低表达,其过表达显著抑制了 HCC 细胞的增殖和迁移,表明 miR-198 在 HCC 发生发展过程中扮演着重要角色,故对其进行研究具有积极意义。

研究运用生物信息学网站预测 miR-198 靶基因,发现 E 盒结合锌指蛋白 2 (E-box binding zinc finger protein 2, ZEB2) 与 miR-198 存在结合位点,双荧光素酶实验证实 ZEB2 是 miR-198 的靶基因,miR-198 靶向负调控 ZEB2 表达。ZEB2 是由 ZFH1B 基因所编码的蛋白,其 CDS 区是 3572bp,拥有 8 个内含子和 9 个外显子。ZEB2 是 ZEB 家族的一员,ZEB 家族是上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transformation, EMT)的重要调控因子<sup>[18]</sup>。发现 ZEB2 通过抑制 E-cadherin, mac-1 和 Mucoprotein, Desmocollin 等相关蛋白转录,能够上调 N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达,参与 EMT 发生过程<sup>[19-20]</sup>。此外,ZEB2 表达失调与多种类型肿瘤的发生发展密切相关,包括结直肠癌、胃癌、肾癌、胰腺癌、卵巢癌等。而本研究结果显示 miR-198 mimics 可以上调 E-cadherin 蛋白表达,下调 N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达,说明 miR-198 过表达抑制了 HCC 细胞 EMT 过程;进一步在 miR-198 mimics 细胞中共转染 pcDNA3.1-ZEB2,发现 ZEB2 过表达逆转了 miR-198 mimics 对 HCC 细胞增殖、迁移能力和 EMT 的抑制过程,提示 miR-198 通过靶向下调 ZEB2 抑制 HCC 细胞的增殖和迁移与其抑制 EMT 过程有关。本研究探讨了 miR-

198 调控 HCC 发生发展的作用机制,为其靶向治疗提供了分子靶标及思路,但癌基因参与调控肿瘤发生的作用机制复杂,故 miR-198 在 HCC 中发挥作用的更深入的信号分子通路还需进一步继续探究。

综上所述,HCC 组织和细胞中 miR-198 显著低表达,其通过靶向调控 ZEB2 抑制细胞上皮-间质转化进而参与 HCC 的发生发展。miR-198/ZEB2 有望成为 HCC 生物治疗的潜在靶点之一。

#### 参考文献:

- [1] 刘宗超,李哲轩,张阳,等. 2020 全球癌症统计报告解读[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志,2017(2):1-13. LIU Zongchao, LI Zhexuan, ZHANG Yang, et al. Interpretation on the report of Global Cancer Statistics 2020 [J]. Journal of Multidisciplinary Cancer Management(Electronic Version), 2017(2):1-13.
- [2] KULIK L, EL-SERAG H B. Epidemiology and management of hepatocellular carcinoma [J]. Gastroenterology, 2019, 156(2):477-491, e1.
- [3] 张振,潘晴,刘旭,等. circRNA 与肿瘤发生的研究进展[J]. 现代检验医学杂志,2018,33(2):157-159, 164. ZHANG Zhen, PAN Qing, LIU Xu, et al. Research progress of the relationship between circular RNA and tumorigenesis [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(2):157-159, 164.
- [4] LI Jiao, SUN Dan, PU Wenchen, et al. Circular RNAs in cancer: biogenesis, function, and clinical significance[J]. Trends in Cancer, 2020, 6(4): 319-336.
- [5] JIA Guiqing, TANG Youyin, DENG Gang, et al. MiR-590-5p promotes liver cancer growth and chemotherapy resistance through directly targeting FOXO1[J]. American Journal of Translational Research, 2019, 11(4): 2181-2193.
- [6] SUN Wu, WANG Xiaojun, LI Jialu, et al. MicroRNA-181a promotes angiogenesis in colorectal cancer by targeting SRCIN1 to promote the SRC/VEGF signaling pathway[J]. Cell Death & Disease, 2018, 9(4): 438.
- [7] HAN D L, WANG L L, ZHANG G F, et al. MiRNA-485-5p, inhibits esophageal cancer cells proliferation and invasion by down-regulating O-linked N-acetylglucosamine transferase[J]. European Review



- for Medical and Pharmacological Sciences, 2019, 23(7): 2809-2816.
- [8] FESLER A, JU Jingfang. Development of microRNA-based therapy for pancreatic cancer[J]. Journal of Pancreatolgy, 2019, 2(4): 147-151.
- [9] LIN Wan, MIAO Yu, MENG Xiangkun, et al. MiRNA-765 mediates multidrug resistance via targeting BATF2 in gastric cancer cells[J]. FEBS Open Bio, 2020, 10(6): 1021-1030.
- [10] WANG Shishuo, FANG Yeying, HUANG Jiacheng, et al. Clinical value of microRNA198-5p downregulation in lung adenocarcinoma and its potential pathways[J]. Oncology Letters, 2019, 18(3): 2939-2954.
- [11] 邵建斌, 杨梅兰. miR-198 靶向 MAPK1 对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖和凋亡的调控作用 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2018, 25(12):1259-1263.
- SHAO Jianbin, YANG Meilan. MiR-198 regulates proliferation and apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells via targeting MAPK1 [J]. Chinese Journal of Cancer Biotherapy, 2018, 25(12):1259-1263.
- [12] XU Fei, NI Mengdong, LI Jiajia, et al. Circ0004390 promotes cell proliferation through sponging miR-198 in ovarian cancer[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2020, 526(1): 14-20.
- [13] 张鑫浩, 张涛元, 李俏, 等. 基于 GEO 芯片数据的肝癌关键生物标志物的筛选与鉴定及生物信息学分析 [J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(4):26-31.
- ZHANG Xinhao, ZHANG Taoyuan, LI Qiao, et al. Screening, identification and bioinformatics analysis of key biomarkers for hepatocellular carcinoma based on GEO chip data [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(4):26-31.
- [14] CHEN Liang, HEIKKINEN L, WANG Changliang, et al. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools[J]. Briefings in Bioinformatics, 2019, 20(5): 1836-1852.
- [15] SALIMINEJAD K, KHORRAM KHORSHID H R, SOLEYMANI FARD S, et al. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods[J]. Journal of Cellular Physiology, 2019, 234(5): 5451-5465.
- [16] ZHU Lin, XUE Feng, XU Xiangying, et al. MicroRNA198 inhibition of HGF/c-MET signaling pathway overcomes resistance to radiotherapy and induces apoptosis in human non-small-cell lung cancer[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2018, 119(9): 7873-7886.
- [17] 王磊, 师国珍. miR-198 在肝细胞癌组织中的表达 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2019, 33(9):904-906.
- WANG Lei, SHI Guozhen. Expression of miR-198 in hepatocellular carcinoma [J]. Journal of Chinese Practical Diagnosis and Therapy, 2019, 33(9):904-906.
- [18] ASHRAFIZADEH M, ANG H L, MOGHADAM E R, et al. MicroRNAs and their influence on the ZEB family: Mechanistic aspects and therapeutic applications in cancer therapy[J]. Biomolecules, 2020, 10(7): 1040.
- [19] GLOUSHANKOVA N A, ZHITNYAK I Y, RUBTSOVA S N. Role of Epithelial-Mesenchymal transition in tumor progression[J]. Biochemistry(Mosc), 2018, 83(12): 1469-1476.
- [20] 张青云, 傅俊江, 陈汉春. 上皮间质转化介导肿瘤转移的分子机制 [J]. 生命科学研究, 2018, 22(6):503-510.
- ZHANG Qingyun, FU Junjiang, CHEN Hanchun. The molecular mechanism of epithelial-mesenchymal transition mediating tumor metastasis [J]. Life Science Research, 2018, 22(6):503-510.

收稿日期: 2021-01-07

修回日期: 2021-09-08

## (上接第17页)

- National Health Commission. Esophageal cancer diagnosis and treatment specification(2018 edition) [J]. Chinese Journal of Digestion and Medical Imageology(Electronic Edition), 2019, 9(4): 158-192.
- [10] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2017[J]. CA-A Cancer Journal for Clinicians, 2017, 67(1): 7-30.
- [11] 肖小平, 张熊, 秦光明. 食管癌和良性食管疾病患者血浆 miRNA-21 和 miRNA-143 检测的临床应用研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(4):72-75, 139.
- XIAO Xiaoping, ZHANG Xiong, QIN Guangming. Clinical research of detecting plasma miRNA-21 and miRNA-143 for identifying early esophageal cancer and benign esophageal diseases[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(4):72-75, 139.
- [12] AMES H M, YUAN Ming, VIZCAINO M A, et al. MicroRNA profiling of low-grade glial and glioneuronal tumors shows an independent role for cluster 14q3231 member miR-487b[J]. Modern Pathology, 2017, 30(2): 204-216.
- [13] CHEN Hongli, WANG Xiaman, BAI Ju, et al. Expression, regulation and function of miR-495 in healthy and tumor tissues[J]. Oncology Letters, 2017, 13(4): 2021-2026.
- [14] 杨萍, 汪莉, 王青, 等. 奥沙利铂联合放疗治疗鼻咽癌患者的效果及对血清 Bcl-2, Bax 蛋白水平的影响 [J]. 河南医学研究, 2019, 28(19):3467-3471.
- YANG Ping, WANG Li, WANG Qing, et al. Effect of oxaliplatin combined with radiotherapy on serum Bcl-2, Bax protein level in patients with nasopharyngeal carcinoma [J]. Henan Medical Research, 2019, 28(19): 3467-3471.
- [15] WU Gang, CHEN Guangzong, ZHOU Jialiang, et al. Liriodenine enhances radiosensitivity in esophageal cancer ECA-109 cells by inducing apoptosis and G/M arrest[J]. Oncology Letters, 2018, 16(4): 5020-5026.
- [16] SUN Lei, WEI Lingyun, WEI Lei, et al. Correlation between Bax gene polymorphisms and esophagus cancer[J]. Oncology Letters, 2018, 16(6): 7097-7101.

收稿日期: 2021-09-03

修回日期: 2021-10-30