

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.06.003

文章编号: 1005-8982(2016)06-0011-04

论著

## microRNA-10b 及靶基因 HOXD10 在肝癌细胞中的表达及侵袭能力的影响\*

熊建宁, 胡立春, 王亚兵, 段雪飞

(广东省佛山市南海区第三人民医院 肝胆外科, 广东 佛山 528244)

**摘要:目的** 探讨 microRNA-10b(miR-10b)及其靶基因同源异性盒基因 HOXD10 在肝癌细胞中的表达及转染 miR-10b 对肝癌细胞侵袭能力的影响。**方法** 分析 HOXD10 基因在 3 种肝癌细胞株 Huh7、HepG2、SMMC-7721 中的基础表达量,筛选出 HOXD10 基础表达量高的 HepG2 作为后续研究对象。设计合成外源性 miR-10b 序列,用脂质体瞬时转染肝癌细胞株,设置 miR-10b 转染组、无关序列转染组(阴性对照组)和未处理组(对照组)。用 RT-PCR 及 Western blot 检测肝癌细胞转染 miR-10b 后 HOXD10 基因及蛋白表达量的变化,细胞侵袭实验研究转染 miR-10b 对肝癌细胞侵袭能力。**结果** 在基因水平和 Western blot 分析蛋白水平 HOXD10 基因表达量  $2^{-\Delta\Delta CT}$  分别是  $(1.24 \pm 0.23)$ 、 $(1.00 \pm 0.02)$ ,  $P > 0.05$  差异无统计学意义。在蛋白分析 HepG2 细胞灰度计算值是值分别是 653.492 和 1 968.742,蛋白水平表达降低。HOXD10 基因在肝癌细胞株 HepG2 的表达量显著高于 Huh7 和 SMMC-7721;miR-10b 成功转染 HepG2 后,HOXD10 基因表达水平与对照组比较无明显变化,但 HOXD10 蛋白表达量与对照组比较下降及侵袭性也增强。**结论** miR-10b 可能通过抑制靶基因 HOXD10 表达发挥作用,促进肝癌细胞的侵袭。

**关键词:** 肝癌细胞;microRNA-10b;HOXD10;侵袭

**中图分类号:** R735.7

**文献标识码:** A

## Expression of miR-10b and target gene HOXD10 in liver cancer cell lines and its impact on tumor invasion\*

Jian-ning Xiong, Li-chun Hu, Ya-bing Wang, Xue-fei Duan

(Department of Hepatobiliary Surgery, the Third People's Hospital of Nanhai, Foshan, Guangdong 528244, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression of miR-10b and its targeted gene HOXD10 in hepatic carcinoma cell lines and its influence on tumor invasion. **Methods** Basic expression of HOXD10 gene in the three hepatic carcinoma cell lines (Huh7, HepG2 and SMMC-7721) was determined. Mature mimics of miR-10b were chemically synthesized and transiently transfected into higher HOXD10-expression cell line HepG2 cells via lipofectamine 2000. Cells were also transfected with empty vectors and unrelated fragment to serve as negative controls. The invasion of HepG2 cells was investigated by Transwell assay. The expressions of HOXD10 were detected by RT-PCR and Western blot. **Results** The expression levels of gene and protein at  $2^{-\Delta\Delta CT}$  were  $(1.24 \pm 0.23)$  and  $(1.00 \pm 0.02)$  without significant difference ( $P > 0.05$ ). In protein analysis of HepG2 cells, gray value was calculated to be 653.492 and 1968.742 respectively, and protein expression levels were reduced. Target gene HOXD10 was over-expressed in HepG2 cells and the ability of tumor invasion increased. **Conclusions** Synthesized miRNA-10b can regulate the expression of target gene HOXD10 and promote the invasion of the hepatic carcinoma cells.

**Keywords:** hepatic carcinoma cell; miRNA-10b; HOXD10; invasion

收稿日期: 2015-10-25

\* 基金项目: 广东省佛山市卫生和计划局医学科研课题(No: 2015343)

[通信作者] 胡立春, E-Mmail: [spring@126.com](mailto:spring@126.com), Tel: 13702984975

研究发现肿瘤发生、发展与 microRNA 的关系越来越密切。microRNA-10b(miR-10b)在乳腺癌、胰腺癌、胶质瘤等肿瘤组织中均有异常表达,并且与肿瘤的侵袭性和远处转移密切相关<sup>[1]</sup>。HOXD10(HomeoboxD10)被认为可能是miR-10b的靶基因,属于同源异型盒基因家族中的一员,位于2号染色体,是细胞分化、个体发育生长的关键基因位点。目前HOXD10基因与肿瘤发生、发展的关系研究,主要集中在乳腺癌、血液病、食道癌、胶质瘤等方面,与肝癌相关的研究较少<sup>[2]</sup>。本研究拟通过设计合成外源性miR-10b转染肝癌细胞株,转染成功后,验证HOXD10基因及蛋白表达量的变化,探讨转染miR-10b对肝癌细胞侵袭能力的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

肝癌细胞株 HepG2 由广东省医学科学院医学研究所细胞中心保存。RPMI 1640、DMEM 培养基和胎牛血清(Hyclone 公司),Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司),转染试剂 Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司),一抗 1:1 000,二抗 1:5 000(美国 Southern Biotech 公司),体外侵袭实验装置(美国 BD 公司),Transwell 侵袭小室(美国 Millipore 公司)。

### 1.2 生物信息学分析

TargetScan [<http://www.targetscan.org/>],picTar [<http://pictar.org/>],miRanda [<http://www.microrna.org/microrna/>]3种生物学软件分析 miR-10b 可能调控的靶基因,选取 HOXD10 为目的基因。引物及 miR-10b 序列由广州锐博生物科技有限公司合成。

### 1.3 试验方法

肝癌细胞用 DMEM、RPMI 1640 完全培养基传代培养,收集对数生长期的细胞进行实验。细胞瞬时转染,选择 HepG2 细胞脂质体转染 miR-10b mimics 24h 用 QPCR 检测。PCR 分析 mRNA 表达量,通过逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法克隆非翻译区(3'-UTR)引物序列为:HOXD10-正向引物:5'-CCGAAGTGCAGGAGAAGGAA;HOXD10-负向引物:5'-GTGTAAGGGCACCTCTTCTTTCTG,测序正确后常规方法转染 HepG2 细胞,同时在细胞内检测 HOXD10 表达量。Western blot 分析:用 BCA 法。体外细胞侵袭实验:细胞转染 miR-10b 后 HepG2 接种至侵袭装置,培养 24 h 后经吉姆萨染色对穿膜细胞计数。

## 1.4 统计学方法

所有实验数据用 SPSS 13.0 统计软件包进行分析。计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,进行正态性分析及独立样本 t-test,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HOXD10 在 3 种肝癌细胞中表达及构建高表达 miR-10b

Huh-7 细胞, HepG2 细胞, SMMC-7721 细胞 HOXD10 基因经 PCR 比较基础表达量  $2^{-\Delta\Delta CT}$  分别是 1.00、228.71 和 1.55, 见表 1、图 1。蛋白分析 HepG2 细胞灰度计算值是 930.22, Huh-7 是 406.00, SMMC-7721 是 249.00, 见图 2。通过基因和蛋白实验结果筛选出表达量高的 HepG2 细胞符合下一步实验要求。miR-10b 逆转录后表达量为  $(9\ 772.22 \pm 437.99)$ , 与阴性对照组比较,  $P < 0.05$ , 差异有统计学意义, 说明构建高表达 miR-10b 成功, 见表 2、图 3。

表 1 HOXD10 基因在 3 种肝癌细胞相对表达量 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	基础表达量 $2^{-\Delta\Delta CT}$
Huh7	1.00 ± 0.00
HepG2	228.71 ± 0.12
SMMC-7721	1.55 ± 0.01

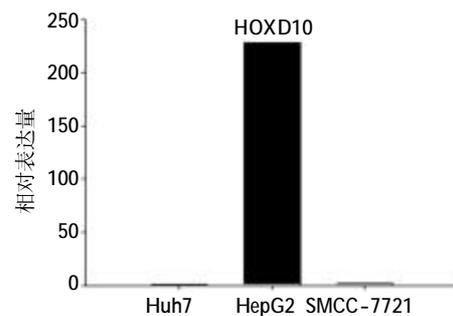
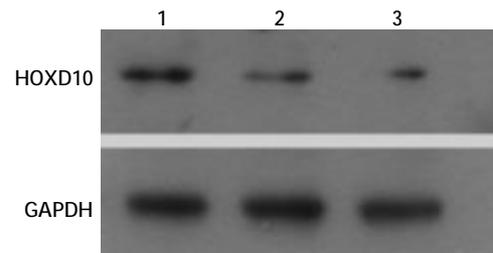


图 1 HOXD10 在肝癌 Huh7、HepG2 以及 SMMC-7721 细胞表达量比较



1: HepG2 细胞; 2: Huh-7 细胞; 3: SMMC-7721 细胞

图 2 HOXD10 在肝癌 Huh7、HepG2 以及 SMMC-7721 细胞蛋白表达

### 2.2 转染后 HOXD10 在肝癌细胞中基因及蛋白表达

HepG2 肝癌细胞中转染 miR-10b 的 HOXD10 实验组与阴性对照组,在基因水平和 Western blot 分析蛋白水平 HOXD10 基因表达量  $2^{-\Delta\Delta CT}$  分别是  $(1.24 \pm 0.23)$  和  $(1.00 \pm 0.02)$ ,  $P > 0.05$  差异无统计学意义。见表 3、图 4。在蛋白分析 HepG2 细胞灰度计算值分别是 1 968.742 和 653.492,蛋白水平表达降低,见图 5。

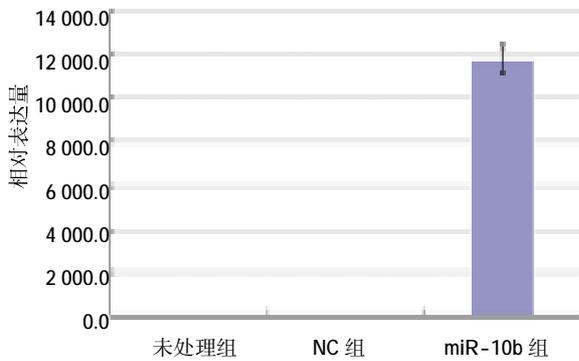
### 2.3 体外细胞侵袭实验

体外细胞侵袭实验穿膜细胞计数结果显示: HepG2 转染 miR-10b 过表达后  $(112.38 \pm 11.27)$ , 与阴性对照组  $(75.25 \pm 6.35)$  比较细胞侵袭能力增加  $(P < 0.05)$ 。见表 4。

表 2 转染 MiR-10b 基因在 3 种样品中  
相对表达量  $(\bar{x} \pm s)$

组别	基础表达量 $2^{-\Delta\Delta CT}$
未处理组	0
NC 组	$1.21 \pm 0.01$
miR-10b 组	$9\ 772.22 \pm 437.99$

注: NC: 过表达 miR-10b 的阴性对照组; miR-10b 组: 过表达 miR-10b 组; miR-10b 组与 NC 组比较,  $t = -35.705$ ,  $P = 0.000$



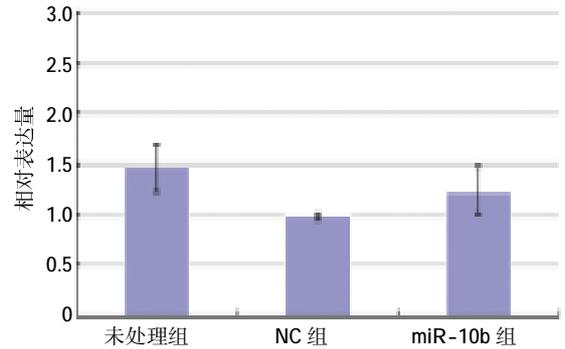
未处理组: HepG2; NC: 过表达 miR-10b 的阴性对照组; miR-10b: 过表达 miR-10b 组

图 3 miR-10b 在 3 种样品中的表达水平

表 3 转染后肝癌细胞株 HOXD10 基因相对表达量  
 $(\bar{x} \pm s)$

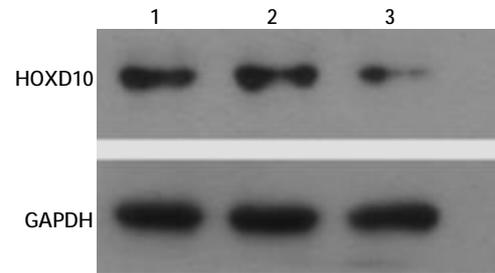
组别	基础表达量 $2^{-\Delta\Delta CT}$
未处理组	$1.47 \pm 0.22$
NC 组	$1.00 \pm 0.12$
miR-10b 组	$1.24 \pm 0.23$

注: NC: 过表达 miR-10b 的阴性对照组; miR-10b 组: 过表达 miR-10b 组; miR-10b 组与 NC 组比较,  $t = 6.245$ ,  $P = 0.220$



未处理组: HepG2; NC: 过表达 miR-10b 的阴性对照组; miR-10b: 过表达 miR-10b 组

图 4 miR-10b 在转染后 HOXD10 表达



1: 未处理组; 2: 阴性对照组; 3: miR-10b 组

图 5 Western blot 分析转染后蛋白表达

表 4 细胞侵袭实验穿膜细胞计数  $(\bar{x} \pm s)$

组别	细胞计数
未处理组	$79.38 \pm 4.16$
NC 组	$75.25 \pm 6.35$
miR-10b 组	$112.38 \pm 11.27$

注: 未处理组: HepG2; NC: 过表达 miR-10b 的阴性对照组; miR-10b 组: 过表达 miR-10b 组;  $F = 6.726$ ,  $P = 0.006$  组间差异有统计学意义, miR-10b 组与 NC 组比较,  $P = 0.043$

## 3 讨论

miRNA 在转录后基因表达和生物行为发展过程起着重要调控作用,大多数人类癌症与 miRNA 发挥抑癌基因或癌基因作用有关<sup>[3]</sup>。肿瘤发生在染色体易变位点上,即染色体上易发生丢失、移位或重复的部位,是微小 RNA 表达异常与某些肿瘤关系密切的原因<sup>[4]</sup>。肝细胞癌中 2 号染色体短臂发生突变,而 miR-10b 恰位于该突变部位。Ma 等<sup>[5]</sup>发现 miR-10b 高表达和肿瘤细胞的血管侵袭相关;特异性增加 miR-10b 表达量可促进肿瘤细胞的侵袭。Laderio 等<sup>[6]</sup>报道 109 例肝脏样本肝细胞癌 29 例、肝良性病变局灶性结节性增生 5 例,癌旁组织 93 例,其中 miR-10b 表达量显著高于良性病变和未发生肿瘤病

变的肝脏组织,同时把 miR-10b 看做肝脏肿瘤细胞侵袭性、转移的相关因素;说明在肝癌组织中 miR-10b 表达上调,可抑制某些靶基因表达而发挥癌基因作用。HOXD10 基因同样位于 2 号染色体,是细胞分化、个体发育生长的关键基因位点<sup>[7]</sup>。受到 miR-10b 及其他多种负性调控作用,HOXD10 在多数恶性肿瘤表达缺失,从而增强肿瘤细胞的侵袭能力<sup>[8]</sup>。Myers 等<sup>[9]</sup>研究表明持续表达的 HOXD10 基因,对乳腺肿瘤细胞新生血管的生成起到一定的抑制作用。Carrio 等<sup>[10]</sup>在 HOXD10 抑制脑胶质瘤细胞的侵袭和转移研究中同样发现,高表达 HOXD10 可以抑制新生毛细血管形成,从而抑制正常脑细胞向肿瘤细胞分化,因此,HOXD10 被认为是抑癌基因。上调 miR-10b 可以抑制 mRNA 编码 HOXD10 翻译过程,导致增加有潜在转移性质的基因 RhoC,并且发现随着进展期乳腺癌肿瘤侵袭程度增加,HOXD10 表达却逐渐消失<sup>[11]</sup>。HOXD10 过表达可以抑制 RhoC 蛋白的表达,进而可以阻止 miR-10b 诱导的肿瘤细胞发生侵袭转移<sup>[12]</sup>。Liao 等<sup>[13]</sup>试验 60 例不同肝细胞肝癌 TNM 分期中 miR-10b 表达情况与肝癌细胞转移能力相关,得出 miR-10b 负调控 HOXD10 在转录后水平通过 HOXD10 相关基因 RhoC/uPAR/MMPs 促进肝癌细胞转移和侵袭。

总结分析得出实验采用微小 RNA 瞬时转染方法,可以提高 miR-10b 基因在转染细胞 HepG2 细胞中的表达量,在靶基因基础表达量高的前提下,通过 RT-PCR 和 Western blot 方法研究在肝癌细胞中 HOXD10 基因和蛋白的表达情况,结果发现 HOXD10 在 mRNA 水平变化小而蛋白水平表达是降低的,说明 miR-10b 是通过转录后翻译阶段来调节靶基因的表达,该靶基因可能起到抑制癌基因作用,过表达 miR-10b 增加了 HepG2 细胞侵袭能力。miR-10b 过表达与肝细胞癌的侵袭关系密切,为进一步研究肝癌细胞的多种生物学特征提供实验依据。

#### 参 考 文 献:

- [1] Du J, Wang Y, Fu H, et al. Clinical and pathological features of miR-10b and RHOX gene expression in hepatocellular carcinoma [J]. Chinese Science Bulletin, 2014(19): 2249-2253.
- [2] Nakayama I, Shibasaki M, Yashima-Abo A, et al. Loss of HOXD10 expression induced by upregulation of miR-10b accelerates the migration and invasion activities of ovarian cancer cells[J]. Int J Oncol, 2013, 43(1): 63-71.
- [3] Iorio MV, Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation[J]. Cancer J, 2012, 18(3): 215-222.
- [4] Calin GA. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(2004): 2999-3004.
- [5] Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer[J]. 2007, 449(7163): 682-688.
- [6] Ladeiro Y, Couchy G, Balabaud C, et al. MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations [J]. Hepatology, 2008, 47(6): 1955-1963.
- [7] Tian Y, Luo A, Cai Y, et al. MicroRNA-10b promotes migration and invasion through KLF4 in human esophageal cancer cell lines[J]. J Biol Chem, 2010, 285(11): 7986-7994.
- [8] Lund AH. miR-10 in development and cancer[J]. Cell Death Differ, 2010, 17(2): 209-214.
- [9] Myers C, Charboneau A, Cheung I, et al. Sustained expression of homeobox D10 inhibits angiogenesis[J]. Am J Pathol, 2002, 161(6): 2099-2109.
- [10] Carrio M, Arderiu G, Myers C, et al. Homeobox D10 induces phenotypic reversion of breast tumor cells in a three-dimensional culture model[J]. Cancer Res, 2005, 65(16): 7177-7185.
- [11] Baffa R, Fassan M, Volinia S, et al. MicroRNA expression profiling of human metastatic cancers identifies cancer gene targets [J]. J Pathol, 2009, 219(2): 214-221.
- [12] Steeg Sa GS. Cancer:micromanagement of metastasis[J]. Nature, 2007, 449(7163): 671-673.
- [13] Liao CG, Kong LM, Zhou P, et al. miR-10b is overexpressed in hepatocellular carcinoma and promotes cell proliferation, migration and invasion through RhoC, uPAR and MMPs [J]. J Transl Med, 2014, 12: 234.

(张蕾 编辑)