

## ·实验研究 Experimental research·

微小核糖核酸-7 调控表皮细胞生长因子受体  
对肝癌细胞增殖和转移的影响

杨 鹏, 何 洋, 李 成, 王黎洲, 蒋天鹏, 许国辉, 周 石

**【摘要】 目的** 探讨微小核糖核酸(miR)-7 是否通过靶向调控表皮细胞生长因子受体(EGFR)对人肝癌细胞侵袭和增殖产生影响。**方法** 传代培养 HepG2 人肝癌细胞,脂质体转染 miR-7 后使其表达上调或下调。荧光定量聚合酶链反应检测转染效率。蛋白印迹法检测 miR-7 上调或下调后肝癌细胞 EGFR 表达变化。溴化噻唑蓝四氮唑(MTT)法检测 miR-7 上调或下调后肝癌细胞增殖能力。划痕试验检测 miR-7 上调或下调后肝癌细胞迁移能力。**结果** 脂质体转染 HepG2 人肝癌细胞可控制 miR-7 表达,miR-7 表达与肝癌细胞 EGFR 表达呈负相关。miR-7 表达上调时,肝癌细胞增殖和迁移变慢;反之,miR-7 表达下调时,肝癌细胞增殖和迁移变快。**结论** miR-7 靶向调节 EGFR 表达,其表达与肝癌细胞增殖和迁移呈负相关。miR-7 可能是未来肝癌治疗新策略的潜在靶点。

**【关键词】** 肝癌;微小核糖核酸-7;表皮细胞生长因子受体;增殖;迁移

中图分类号:R735.7 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2021)-01-0043-05

**The effect of microRNA-7 regulating epidermal growth factor receptor on the proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma cells** YANG Peng, HE Yang, LI Cheng, WANG Lizhou, JIANG Tianpeng, XU Guohui, ZHOU Shi. College of Medical Imaging, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou Province 550004, China

Corresponding author: ZHOU Shi, E-mail: 156722229@qq.com

**【Abstract】 Objective** To clarify the effect of microRNA-7 (miR-7) on the invasion and proliferation of human hepatocellular carcinoma (HCC) cells through targeting regulation of epidermal growth factor receptor (EGFR). **Methods** Human HepG2 HCC cells were subcultured and miR-7 expression was up-regulated or down-regulated after miR-7 was transfected with liposome. The transfection efficiency of miR-7 expression was detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (PCR) method. The expressions of EGFR protein in HCC cells that were up-regulated or down-regulated by miR-7 were tested by Western Blot. MTT assay was used to test the proliferation ability of HCC cells that were up-regulated or down-regulated by miR-7. The migration ability of HCC cells that were up-regulated or down-regulated by miR-7 was checked by scratch test. **Results** The expression of miR-7 could be controlled by transfection of HepG2 HCC cells with liposomes, and the expression of miR-7 was negatively correlated with the expression of EGFR protein in HCC cells. When the expression of miR-7 was up-regulated, the proliferation and migration of HCC cells slowed down; on the contrary, when the expression of miR-7 was down-regulated, the proliferation and migration of HCC cells increased up. **Conclusion** MiR-7 can affect the expression of EGFR protein through targeting regulation, and the expression of EGFR bears a negative correlation with the proliferation and migration of HCC cells. Therefore, miR-7 may become a potential target for new therapeutic strategies for HCC in the future. (J Intervent Radiol, 2021, 30; 43-47)

**【Key words】** hepatocellular carcinoma; microRNA-7; epidermal growth factor receptor; proliferation; migration

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2021.01.011

基金项目:国家自然科学基金(81960328)、四川省科技计划项目(2018JY0128)

作者单位:550004 贵阳 贵州医科大学影像学院(杨 鹏、何 洋、李 成、王黎洲、蒋天鹏、周 石);四川省肿瘤医院介入科(许国辉)

通信作者:周 石 E-mail: 156722229@qq.com

肝细胞肝癌(HCC)是发生在肝内胆管或肝细胞内恶性肿瘤主要类型,其治疗方案包括手术切除、介入治疗、放化疗、生物治疗、靶向药物治疗等<sup>[1]</sup>。目前很多研究表明诸多癌症发生和发展与微小核糖核酸(microRNA, miRNA, miR)在体内表达增多有一定联系<sup>[2]</sup>,甚至限定某种特定 miR 表达增多,可能与某种特定癌症有着单一对象联系<sup>[3]</sup>。其中不同 miRNA 又大致分为两种,一种起类癌基因作用,另一类起抑癌基因作用<sup>[4]</sup>。有研究发现 miR-7 在肝癌、结肠癌、乳腺癌、肺癌中表达均有所下降,因此起到抑癌基因作用<sup>[5-6]</sup>,但具体作用机制未完全明确。表皮细胞生长因子受体(EGFR)可在大多数肿瘤中过度表达和/或突变,与肿瘤细胞增殖、侵袭和转移、血管生成密切相关<sup>[7]</sup>。近年临床研究证实 EGFR 存在于许多实体瘤体中,其表达与 miR-7 表达有一定关联<sup>[8]</sup>。因此,本研究探讨 miR-7 是否通过靶向调控肝癌细胞中 EGFR,进而对肝癌细胞增殖和侵袭转移产生影响,为其治疗新策略提供潜在靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

将 HepG2 人肝癌细胞株(美国菌种保藏中心 ATCC)置于 10%胎牛血清(FBS)并加入 100 mg/mL 链霉素、100 U/mL 青霉素的 Roswell Park 纪念研究所(RPMI)培养基,在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,观察细胞生长为 80%时进行细胞传代。

### 1.2 细胞转染和荧光定量聚合酶链反应检测

在线数据库(<http://www.xnicroma.org/microma/home.do>)查找相应资料,确定 EGFR 是否为 miR-7 目的基因;从 Ensembl 网站查找 EGFR 基因序列,再将找到的条件合适的基因序列复制到 Primer designing tool 网站设计合适引物,方便为下一步聚合酶链反应(PCR)实验做准备。将 HepG2 人肝癌细胞分为 miR-7 上调组和 miR-7 下调组,其中上调组又分为激动剂组(mimic)、激动剂阴性对照组(mimic negative)、空白对照组(mock);下调组又分为抑制剂组(inhibitor)、抑制剂阴性对照组(inhibitor negative)、空白对照组(mock)。

在 6 孔细胞培养板中接种适当数量 HepG2 人肝癌细胞,密度为 30%~50%。准备 mimic-Lipo2000 混合液:稀释制备 micro RNA mimic 50 μL,稀释制备 Lipo2000 250 μL,室温孵育 5 min;二者混匀,室温孵育 20 min。将混合液加入培养孔中,37℃、CO<sub>2</sub>

培养箱中培养,48~72 h 后测序。进入 Ensembl 网站查找 miR-7 基因序列,条件合适的基因序列复制至 Primer designing tool 网站设计合适引物。引物序列见表 1。

表 1 引物序列表

名称	序列
β-肌动蛋白 (actin)	上游:5'-ACTGTGCCGACCTCTTTGATT-3' 下游:5'-ACTGTCGCGCTTCCTAGATG-3'
EGFR	上游:5'-TAGGATCCGGTGAAAACCTGCTGCCAAAAC-3' 下游:5'-CGTCTAGAGCTAGTAAGGTGTGAAATGCTG-3'

取 TRIzol 裂解液(美国 Invitrogen 公司),按 1:0.2 比例加入氯仿,将混合后的 TRIzol 裂解液转移至离心管中,离心管中加入事先培养好的肝癌细胞,37℃恒温水浴锅孵育 10 min,放入 4℃离心机,10 000 r/min 离心 10 min。离心后取上层无色透明相,进行 RNA 沉淀。将无色透明相放入新 Eppendorf 管中,加入等体积异丙醇,37℃恒温水浴锅孵育 10 min,随即放入 4℃离心机,10 000 r/min 离心 10 min。弃上清,按 1:1.5 比例加入 TRIzol 裂解液和 75%乙醇对蛋白进行清洗,放入 4℃离心机,6 000 r/min 离心 5 min。采用紫外吸收法进行 RNA 质量检测,读取其在 260~280 nm 处吸收值。

### 1.3 蛋白印迹法检测 EGFR 表达

采用放射免疫沉淀测定(RIPA)裂解缓冲液(北京百泰克生物技术公司)从 HepG2 人肝癌细胞分离总蛋白。采用二辛可酸(BCA)测定试剂盒(美国 BioTek 公司)测定蛋白浓度。通过 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)(碧云天生物技术研究)所)分级分离总蛋白(20 μg),转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国 Millipore 公司)。含 0.1%Tween 溶液的 Tris 缓冲 0.9%NaCl 溶液(TBST)和 10%脱脂奶粉在室温下封闭 PVDF 膜 1 h,阻断非特异性位点。4℃下将膜与小鼠抗人 EGFR 单克隆一抗(1:1 000,ab155944)和小鼠抗人 GADPH 单克隆一抗(1:1 000,ab9484,英国 Abcam 公司)孵育过夜。TBST 洗涤膜 3 次,并与山羊抗小鼠 IgG 辣根过氧化物酶偶联的二抗体(1:3 000,ab6789,英国 Abcam 公司)室温下再孵育 2 h。TBST 洗涤 3 次,采用增强的化学发光溶液(美国 Thermo Fisher 科技公司)使膜可视化。

### 1.4 溴化噻唑蓝四氮唑法实验

每组细胞转染 24 h 后,磷酸缓冲液(PBS)清洗一遍,选用胰酶消化细胞,进行细胞计数,按每 200 μL 含 200 个细胞计数铺 96 孔板,各组细胞铺 8 个复

孔,共 4 块 96 孔板,置于 37℃、CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。设定 0 h、24 h、48 h、72 h 4 个时间点。在细胞 miRNA 或 siRNA 转染 48 h 后每孔加入溴化噻唑蓝四氮唑(MTT)溶液 20 μL,37℃孵育 4 h;弃上清,每孔加 150 μL 二甲基亚砷(DMSO)溶解(美国 Sigma-Aldrich 公司) 10 min,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)读数器(美国 BioTek 公司)检测 490 nm 处吸光度(OD),根据 OD 值计算细胞增殖率(细胞增殖率=每天细胞 MTT OD 值/0 d 细胞 MTT OD 值×100%)。

### 1.5 划痕试验

先用记号笔做好标志,每隔 0.5 cm 画一横线,每孔至少穿过 5 条线。HepG2 人细胞置于 CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中,定期更换培养液,37℃保温培养。将细胞接种在孔板中,待其生长至表面融合时,用无菌枪头在表层细胞上均匀划痕,随后用 PBS 轻柔洗涤。以 0 h、24 h、48 h 为时间点,观察不同时点细胞迁移情况,显微镜下观察并计数。

### 1.6 数据分析

采用 SPSS 19.0 软件对实验数据进行计算和分析,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,计量资料及组间和组内比较用相关性分析检验,计数和等级资料分析用卡方检验和秩和检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞转染效率

荧光定量 PCR 证实,miR-7 经脂质体转染后在 HepG2 细胞内转染成功,EGFR mRNA 表达与 miR-7 呈负相关。mimic 组、mimic negative 组、mock 组 EGFR mRNA 表达量分别为  $1213 \pm 0.97$ 、 $0.36 \pm 0.12$ 、 $0.58 \pm 0.3$ ; mimic 组与 mimic negative 组、mock 组相比,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。inhibitor 组、

inhibitor negative 组、mock 组 EGFR mRNA 表达量分别为  $1.8 \pm 0.56$ 、 $0.44 \pm 0.32$ 、 $4.03 \pm 0.76$ ; inhibitor 组与 inhibitor negative 组、mock 组相比,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 1。

### 2.2 EGFR 表达

蛋白印迹法观察显示,miR-7 表达同样与 EGFR 表达呈负相关。在上调组,EGFR 在 mimic 组表达下调,mimic negative 组和 mock 组次之,在下调组,EGFR 在 inhibitor 组表达上调,mimic negative 组和 mock 组次之;mimic 组、mimic negative 组、mock 组 EGFR 平均光密度值表达量分别为  $0.43 \pm 0.03$ 、 $0.28 \pm 0.26$ 、 $0.21 \pm 0.04$ ,mimic 组与 mimic negative 组、mock 组相比,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );inhibitor 组、inhibitor negative 组、mock 组 EGFR 表达量分别为  $0.21 \pm 0.05$ 、 $0.32 \pm 0.02$ 、 $0.19 \pm 0.03$ ,inhibitor 组与 inhibitor negative 组、mock 组相比,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 2。

### 2.3 miR-7 对肝癌细胞生长的影响

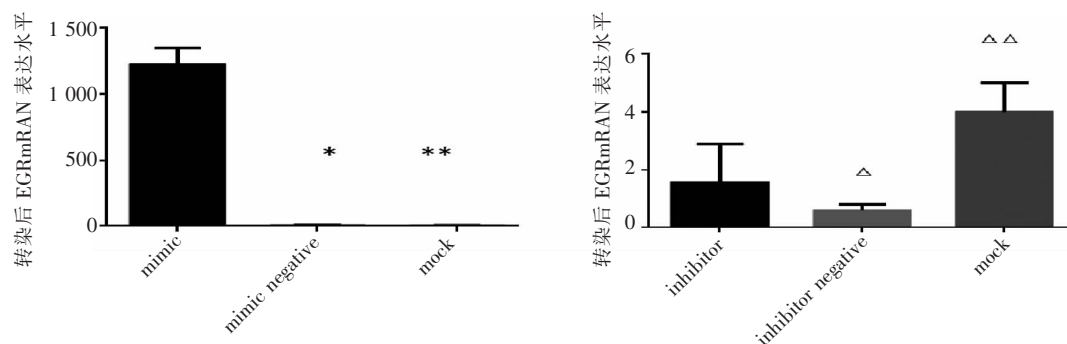
MTT 试验结果显示,在高表达组,随着 miR-7 表达上调,肝癌细胞增殖速度明显减慢;在低表达组,随着 miR-7 表达下调,肝癌细胞增殖速度明显增快,见表 2、图 3。

### 2.4 miR-7 对肝癌细胞侵袭速度的影响

划痕试验结果显示,在高表达组,mock 组划痕速度最快,随后依次为 mimic negative 组、mimic 组;在低表达组,inhibitor 组划痕速度最快,随后依次为 inhibitor negative 组、mock 组,见图 4。

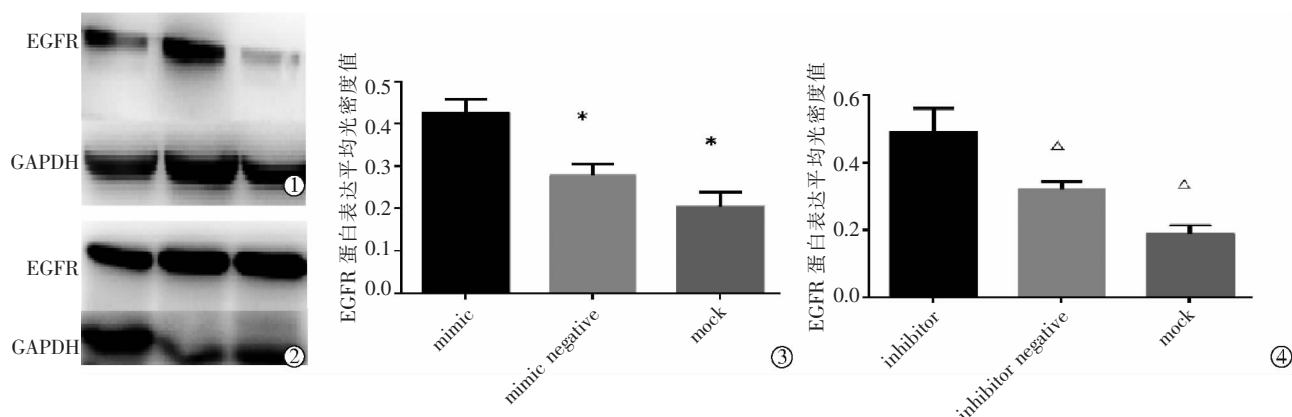
## 3 讨论

肝癌具体发病机制有诸多可能,目前认为最基本发病机制当属原癌基因与抑癌基因关系失衡<sup>[9-11]</sup>。有研究证实 miRNA 与原发性肝癌发展有着十分密切联系<sup>[12]</sup>。EGFR、血管内皮细胞生长因子受体



\* 与 mimic 组相比,  $P < 0.05$ ; \*\* 与 mimic 组相比,  $P < 0.01$ ; △ 与 inhibitor 组相比,  $P < 0.05$ ; △△ 与 inhibitor 组相比,  $P < 0.01$

图 1 EGFR mRNA 在上调各组和下调各组转染情况



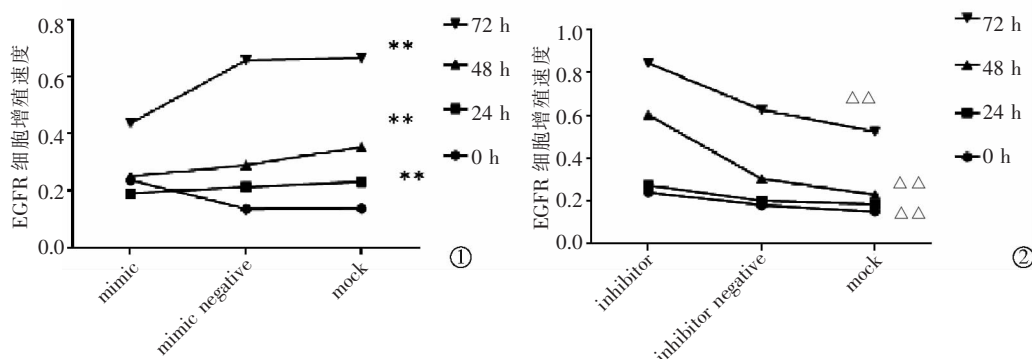
①EGFR 在 miR-7 上调组中表达(自左至右分别为 mimic 组、mimic negative 组、mock 组);②在 miR-7 下调组中表达(自左至右分别为 inhibitor 组、inhibitor negative 组、mock 组);③EGFR 在上调各组蛋白印迹检测结果;④在下调各组蛋白印迹检测结果

\* 与 mimic 组相比,  $P < 0.05$ ;  $\Delta$  与 inhibitor 组相比,  $P < 0.05$

图 2 EGFR 在 miR-7 中表达和蛋白印迹检测结果

组别	0 h	24 h	48 h	72 h
高表达组				
mimic	0.145±0.376	0.180±0.342	0.227±0.384	0.434±0.394
mimic negative	0.133±0.235**	0.207±0.784**	0.267±0.483**	0.665±0.482**
mock	0.135±0.456**	0.208±0.383**	0.302±0.732**	0.665±0.722**
低表达组				
inhibitor	0.243±0.566	0.277±0.382	0.604±0.783	0.845±0.345
inhibitor negative	0.184±0.320 $\Delta\Delta$	0.204±0.872 $\Delta\Delta$	0.306±0.982 $\Delta\Delta$	0.628±0.837 $\Delta\Delta$
mock	0.154±0.273 $\Delta\Delta$	0.187±0.823 $\Delta\Delta$	0.233±0.739 $\Delta\Delta$	0.526±0.642 $\Delta\Delta$

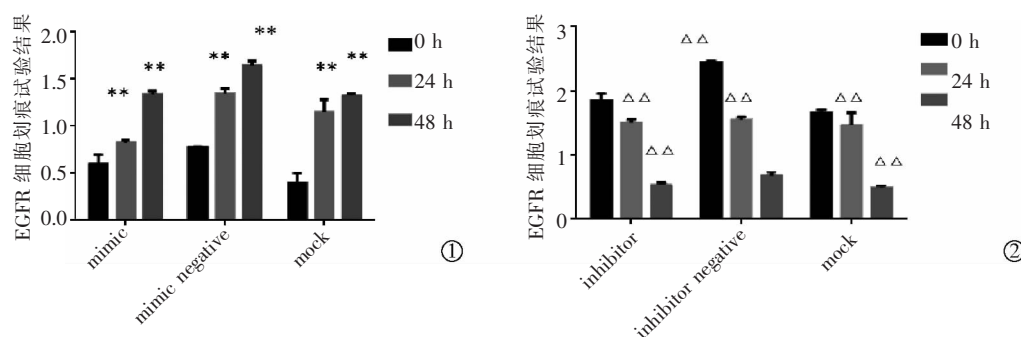
\*\* 与 mimic 组相比,  $P < 0.01$ ;  $\Delta\Delta$  与 inhibitor 组相比,  $P < 0.01$



①高表达组;②低表达组

\*\* 与 mimic 组相比,  $P < 0.01$ ;  $\Delta\Delta$  与 inhibitor 组相比,  $P < 0.01$

图 3 肝癌细胞在不同组间增殖速度



①高表达组;②低表达组

\*\* 与 mimic 组相比,  $P < 0.01$ ;  $\Delta\Delta$  与 inhibitor 组相比,  $P < 0.01$

图 4 肝癌细胞在不同组中的侵袭速度



(VEGFR)、肝细胞生长因子受体、成纤维细胞生长因子受体等,尤其是 VEGFR,是目前公认的最有效的肝癌靶向药物<sup>[13]</sup>。基于以上研究,本研究选择 EGFR 作为目的基因,通过相关调节因素 miRNA,观察是否能控制 EGFR 表达,进而从侧面印证 EGFR 可能作为肝癌治疗的一有意义靶点。

miRNA 家族中 miR-7,主要充当抑癌基因的作用。有研究显示,其具有控制肿瘤细胞生长、转移及抑制细胞分化的作用<sup>[14]</sup>。miR-7 同时还与体内多条信号转导通路相关,通过参与不同通路过程对体内不同生物活动和内环境稳态进行调节<sup>[15]</sup>。miR-7 可在包括肝癌、卵巢癌、胃癌、肺癌、乳腺癌、膀胱癌、胶质瘤、肠癌等多种肿瘤发展过程中起到关键作用<sup>[15]</sup>。有研究显示,miR-7 可通过抑制 EGFR 表达抑制乳腺癌细胞增殖和迁徙<sup>[16]</sup>。本研究发现 miR-7 在 HepG2 细胞转染成功后,荧光定量 PCR 检测显示 EGFR mRNA 表达量与 miR-7 呈负相关,蛋白印迹检测也证实 miR-7 表达与 EGFR 表达呈负相关,说明 EGFR 极有可能是原发性肝癌的关键基因之一;与之前报道<sup>[16]</sup>不同的是,验证了 miR-7 同样可通过调控 EGFR 抑制肝癌细胞增殖和迁移。

近期有研究发现 miR-7 可改变黏着斑激酶磷酸化及基质金属蛋白酶表达,从而介导肝癌细胞浸润和转移<sup>[17]</sup>。本研究通过 MTT 试验和划痕实验发现,miR-7 高表达 mimic 组中肝癌细胞增殖和转移速度明显低于阴性和空白对照组,miR-7 低表达 inhibitor 组中肝癌细胞增殖和转移速度明显高于阴性和空白对照组;表明肝癌细胞中 EGFR 表达对于细胞增殖和迁徙均有一定的调控作用,且受到内源性 miR-7 影响。

本研究结论认为,miR-7 可通过直接靶向调节 EGFR 蛋白表达,进而对肝癌细胞增殖和侵袭转移产生负相关调节影响,可能是未来肝癌治疗新策略的潜在靶点。

#### [参考文献]

[1] 杨登科,黄智,张帅,等. miR-23b 直接靶向 IL-11 抑制 SMMC-7721 细胞增殖研究[J]. 介入放射学杂志, 2019, 28: 358-366.

[2] Li B, Liu L, Li X, et al. miR-503 suppresses metastasis of hepatocellular carcinoma cell by targeting PRMT1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 464: 982-987.

[3] Li J, Fang L, Yu W, et al. MicroRNA-125b suppresses the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells by targeting transcriptional coactivator with PDZ-binding motif[J]. Oncol Lett, 2015, 9: 1971-1975.

[4] Zheng C, Li J, Wang Q, et al. MicroRNA-195 functions as a tumor suppressor by inhibiting CBX4 in hepatocellular carcinoma[J]. Oncol Rep, 2015, 33: 1115-1122.

[5] Hansen TB, Kjems J, Damgaard CK. Circular RNA and miR-7 in cancer[J]. Cancer Res, 2013, 73: 5609-5612.

[6] Wang F, Qiang Y, Zhu L, et al. MicroRNA-7 downregulates the oncogene VDACL1 to influence hepatocellular carcinoma proliferation and metastasis[J]. Tumour Biol, 2016, 37: 10235-10246.

[7] Normanno N, De Luca A, Bianco C, et al. Epidermal growth factor receptor(EGFR) signaling in cancer[J]. Gene, 2006, 366: 2-16.

[8] Caratelli S, Arriga R, Sconocchia T, et al. In vitro elimination of epidermal growth factor receptor-overexpressing cancer cells by CD32A-chimeric receptor T cells in combination with cetuximab or panitumumab[J]. Int J Cancer, 2020, 146: 236-247.

[9] 赵静怡. 癌症与非编码 RNA(miRNA 与 lncRNA)关系网络的构建和分析[D]. 苏州: 苏州大学, 2017.

[10] Song Y, He S, Zhuang J, et al. MicroRNA-601 serves as a potential tumor suppressor in hepatocellular carcinoma by directly targeting PIK3R3[J]. Mol Med Rep, 2019, 19: 2431-2439.

[11] Yegin Z, Aydin O, Koc H, et al. Expression profiles of proto-oncogene TWIST1 and tumor metastasis suppressor gene LASS2 in bladder cancer[J]. Cell Mol Biol, 2018, 64: 66-73.

[12] Karakatsanis A, Papaconstantinou I, Gazouli M, et al. Expression of microRNAs, miR-21, miR-31, miR-122, miR-145, miR-146a, miR-200c, miR-221, miR-222, and miR-223 in patients with hepatocellular carcinoma or intrahepatic cholangiocarcinoma and its prognostic significance[J]. Mol Carcinog, 2013, 52: 297-303.

[13] Choi KJ, Baik IH, Ye SK, et al. Molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma: present status and future directions[J]. Biol Pharm Bull, 2015, 38: 986-991.

[14] Xie J, Chen M, Zhou J, et al. miR-7 inhibits the invasion and metastasis of gastric cancer cells by suppressing epidermal growth factor receptor expression[J]. Oncol Rep, 2014, 31: 1715-1722.

[15] Giles KM, Barker A, Zhang PM, et al. MicroRNA regulation of growth factor receptor signaling in human cancer cells[J]. Methods Mol Biol, 2011, 676: 147-163.

[16] Cui YX, Bradbury R, Flamini V, et al. MicroRNA-7 suppresses the homing and migration potential of human endothelial cells to highly metastatic human breast cancer cells[J]. Br J Cancer, 2017, 117: 89-101.

[17] Liu L, Yang X, Li NF, et al. Circ\_0015756 promotes proliferation, invasion and migration by microRNA-7-dependent inhibition of FAK in hepatocellular carcinoma[J]. Cell Cycle, 2019, 18: 2939-2953.

(收稿日期:2020-02-08)

(本文编辑:秋实)