

## • 实验研究 Experimental research •

## 微小核糖核酸-155 对肝癌细胞增殖、侵袭迁移和凋亡的影响

秦焕蓉, 吴祥锴, 江哲宇, 张 赞, 林丽云, 王黎洲, 周 石

**【摘要】 目的** 探究微小核糖核酸(miR)-155 靶向蛋白酪氨酸磷酸酶非受体 21 型(PTPN21)调控磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)信号通路对肝癌细胞增殖、迁移、侵袭的影响。**方法** 体外培养 Huh7 人肝癌细胞并通过 miR-155 沉默慢病毒(sh-miR-155)转染下调 miR-155。实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测 Huh7 细胞 miR-155 沉默效果,获得稳转细胞株后将细胞株随机分为:Blank 组(正常 Huh7 细胞)、shNC 组(Huh7 细胞+miR-155 空载体)、sh-miR-155 组(Huh7 细胞+miR-155 沉默)、sh-miR-155+Recilisib 组(Huh7 细胞+miR-155 沉默+PI3K-AKT 激动剂)、shNC+Recilisib 组(Huh7 细胞+miR-155 空载体+PI3K-AKT 激动剂)。双荧光素酶实验检测 PTPN21 是否为 miR-155 的下游;溴化噻唑蓝四氮唑(MTT)法检测各组细胞增殖能力;流式细胞术测定各组细胞凋亡水平;Transwell 实验分析各组细胞侵袭与迁移能力;蛋白质印迹检测各组 PTPN21、通路相关蛋白 PI3K、P-PI3K、AKT、P-AKT 及凋亡相关蛋白 BAX、BCL-2、Caspase-3 表达变化差异。**结果** sh-miR-155 组中 miR-155 的表达水平低于 Blank 组及 shNC 组( $P<0.0001$ ), miR-155 在 Blank 组及 shNC 组表达水平差异无统计学意义( $P>0.05$ )。MTT 结果显示,sh-miR-155 组中 Huh7 细胞在 2、3、4、5 d 时 A 值均低于 Blank 组及 shNC 组( $P<0.0001$ ),而 Blank 组与 shNC 组差异无统计学意义( $P>0.05$ );sh-miR-155 组在 2、3、4、5 d 时 A 值低于 sh-miR-155+Recilisib 组及 shNC+Recilisib 组( $P=0.0052$ ,  $P<0.0001$ ),而 sh-miR-155+Recilisib 组在 2、3、4、5 d 时 A 值低于 shNC+Recilisib 组( $P<0.0001$ )。Blank 组与 shNC 组迁移及侵袭细胞数差异无统计学意义( $P>0.05$ ),激活 PI3K-AKT 信号通路后,与 Blank 组相比,shNC+Recilisib 组肝癌细胞的迁移、侵袭能力显著增加( $P<0.0001$ )。相反,沉默 miR-155 后 Huh7 细胞的迁移及侵袭细胞数明显低于 Blank 组及 shNC 组( $P<0.0001$ ),而 PI3K 激动剂逆转了这一现象,与 sh-miR-155 组相比,sh-miR-155+Recilisib 组肝癌细胞的迁移、侵袭能力增强( $P=0.0002$ )。慢病毒转染 Huh7 人肝癌细胞以沉默 miR-155,下调 miR-155 抑制 PTPN21 调控 PI3K-AKT 信号通路从而抑制肝癌细胞的侵袭、迁移、增殖能力,促进肝癌细胞凋亡。**结论** miR-155 通过靶向 PTPN21 调控 PI3K-AKT 信号通路抑制肝癌细胞的迁移、侵袭、增殖。miR-155 可能是未来肝癌治疗潜在靶点。

**【关键词】** 肝癌;微小核糖核酸-155;蛋白酪氨酸磷酸酶非受体 21 型;磷脂酰肌醇 3-激酶;蛋白激酶 B  
中图分类号:R735.7 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2024)-01-0044-08

**The effect of microRNA-155 on the proliferation, invasion, migration and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells** QIN Huanrong, WU Xiangkai, JIANG Zheyu, ZHANG Yun, LIN Liyun, WANG Lizhou, ZHOU Shi. School of Medical Imaging, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou Province 550004, China

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

**【Abstract】 Objective** To discuss the effect of PI3K-AKT signaling pathway regulated by microRNA-155(miRNA-155) targeted protein tyrosine phosphatase non-receptor type 21(PTPN21) on the proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma(HCC) cells. **Methods** Lentivirus transfection was used to silence the expression of miRNA-155 in human Huh7 HCC cells, and real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the silencing effect of miR-155. After obtaining stable

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2024.01.009

基金项目: 国家自然科学基金(82060333), 2022 年贵州省卫生健康委省级医学重点学科建设项目

作者单位: 550004 贵州贵阳 贵州医科大学影像学院(秦焕蓉、吴祥锴、江哲宇); 贵州医科大学附属医院介入科(王黎洲、周 石); 织金县医院(张 赞、林丽云)

通信作者: 周 石 E-mail: 156722229@qq.com

cell lines, the cell lines were randomly divided into Blank group(normal Huh7 cells), shNC group (Huh7 cells+empty miR-155 vector), sh-miR-155(Huh7 cells+miR-155 silencing), sh-miR-155+Recilisib group (Huh7 cells+miR-155 silencing+PI3K-AKT agonist), shNC+Recilisib group (Huh7 cells+empty miR-155 vector+PI3K-AKT agonist). Dual luciferase assay was used to determine whether PTPN21 was the downstream of miR-155. The cell proliferation ability of cells in each group was detected by MTT assay. The apoptosis level of each group was tested by flow cytometry. The invasion and migration ability of cells was assessed by Transwell assay. Western blot analysis was used to observe the differences in protein expression of PTPN21, PI3K, P-PI3K, AKT, P-AKT, and apoptosis-related proteins including BAX, BCL-2 and caspase-3 in all groups. **Results** The expression level of miR-155 in sh-miR-155 group was lower than that in Blank group and shNC group( $P<0.0001$ ), and the difference in miR-155 expression level between Blank group and shNC group was not statistically significant ( $P>0.05$ ). MTT results showed that A values of Huh7 cells at 2, 3, 4 and 5 day in sh-miR-155 group were lower than those in Blank group and shNC group ( $P<0.0001$ ), while these differences between Blank group and shNC group were not statistically significant ( $P>0.05$ ). In sh-miR-155 group the A values at 2, 3, 4 and 5 day were lower than those in sh-miR-155+Recilisib group and shNC+Recilisib group( $P=0.0052$  and  $P<0.0001$ , respectively), while the A values at 2, 3, 4 and 5 day in sh-miR-155+Recilisib were lower than those in shNC+Recilisib group( $P<0.0001$ ). There was no significant differences in cell migration and number of invasion cells between the Blank group and shNC group ( $P>0.05$ ). After activation of PI3K-AKT signaling pathway, the migration and invasion capacity of HCC cells in the shNC+Recilisib group were significantly enhanced when compared with the Blank group ( $P<0.0001$ ). In contrast, the number of migrated and invaded Huh7 cells after miR-155 silencing was significantly lower than that in the Blank group and shNC group( $P<0.0001$ ) and this phenomenon became reversed by PI3K agonist. Compared with the sh-miR-155 group, in the sh-miR-155+Recilisib group the migration and invasion ability of HCC cells was enhanced( $P=0.0002$ ). Lentiviral transfection of Huh7 human HCC cells to silence miR-155 and downregulate miR-155 inhibiting PTPN21 regulation of the PI3K-AKT signaling pathway, thus inhibiting the invasion, migration and proliferation ability of HCC cells and promoting the apoptosis of HCC cells. **Conclusion** miR-155 inhibits the migration, invasion and proliferation of HCC cells through targeting PTPN21 regulation of PI3K-AKT signaling pathway. The miR-155 may be a potential therapeutic target for HCC in the future. (J Intervent Radiol, 2024, 32: 44-51)

**【Key words】** hepatocellular carcinoma; microRNA-155; protein tyrosine phosphatase non-receptor type 21; phosphatidylinositol 3-kinase; protein kinase B

在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)进展过程中有多种基因改变,其中微小核糖核酸(miRNA)参与细胞分化、代谢和发育等各种生物过程,在肿瘤组织中异常表达,与肿瘤发生密切相关<sup>[1-5]</sup>。研究发现,乳腺癌患者 miR-155 水平升高有利于抗肿瘤免疫特征且与更好的预后相关<sup>[6]</sup>;而宫颈癌患者 miR-155 水平升高与不良预后相关<sup>[7]</sup>。miR-155 在肝癌中表达上调,通过 PI3K-AKT 通路抑制磷酸酶和紧张素同源物(PTEN)进而促进肝癌的进展<sup>[8]</sup>。然而 miR-155 是否存在其他下游靶点影响肝癌的进展仍不清楚。本研究通过构建 miR-155 沉默稳转株以探讨 miR-155 对肝癌细胞增殖、侵袭、迁移和凋亡影响的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

用含 10%FBS,1%青、链霉素的完全培养基培

养 Huh7 人肝癌细胞(中国科学院细胞库),当细胞融合度达到 85%以上时进行传代培养,3 次传代后待细胞状态稳定后进行检测。

### 1.2 稳转株构建

取对数增长期的 Huh7 肝癌细胞  $1\times 10^5$  个接种于 6 孔板,待细胞生长至 30%~40%,根据慢病毒说明书中推荐的复感染指数=5,换算最佳接种病毒滴度进行转染操作,分别转染 shNC、sh-miR-155 慢病毒,转染 16 h 后进行细胞换液。待细胞长至 85%左右将细胞传代至 T25 培养瓶,3~4 d 基因表达稳定后,将细胞用胰酶消化离心传代,细胞贴壁后用含 2  $\mu\text{g/mL}$  嘌呤霉素的完全培养基进行稳转细胞株的筛选,反复药筛。待无细胞死亡时,实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测病毒转染效果,转染成功后传代冻存 10 管稳转株,以备后续实验使用,在此过程中用含 1  $\mu\text{g/mL}$  嘌呤霉素的完全培养基维持。阴性对照组为转染空载病

毒细胞(shNC),转染抑制基因病毒(sh-miR-155)为沉默组。

### 1.3 RT-qPCR

将 Blank、shNC、sh-miR-155 三组细胞分别取  $2 \times 10^4$  个接种于 6 孔板,待细胞长至 90% 左右,采用 RNA 快速提取试剂盒(上海奕杉生物科技有限公司)分别提取各组 RNA,反转录试剂盒(日本 TaKaRa)将 RNA 反转录为 cDNA,RT-qPCR 得到各组 Ct 值。U6 作为内参,根据公式:① $\Delta Ct$ =各组 Ct1(miR-155)-Ct2(U6);② $\Delta\Delta Ct$ =各组  $\Delta Ct$  值-Blank 组的  $\Delta Ct$  均值;③miR-155 表达= $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ;④miR-155 相对表达=各组  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ /Blank 组  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

### 1.4 MTT 实验

将 Blank、shNC、sh-miR-155、sh-miR-155 + Recilisib、shNC+Recilisib 等 5 组细胞分别用胰酶消化后用完全培养基重悬,调整细胞数量为  $1 \times 10^4$  个/mL。以每孔 100  $\mu$ L 接种于 96 孔板,每组设置三个复孔,待细胞贴壁生长后,每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL,即 0.5%MTT)10  $\mu$ L,继续培养 4 h,加入结晶紫溶液,放入酶标仪 A490 nm 和 A630 nm 处测量各孔的吸光度值。按照公式计算细胞增殖率=[A experimental group(630 nm-490 nm)/A blank group(630 nm-490 nm)] $\times 100\%$ 。

### 1.5 Transwell 实验

①迁移:取各组对数生长期细胞,将细胞消化、离心后,细胞计数,每室铺  $2 \times 10^4$  个细胞,向小室下室加入含 20%FBS 的高糖培养基,再轻轻向小室上室加入细胞悬液,避免出现气泡,将培养板置于培养箱 48 h 后收样,上室细胞用棉签擦拭,接着使用 4%多聚甲醛固定 30 min,0.1%结晶紫染色 20 min,用水清洗后晾干,使用倒置显微镜于 200 倍视野下拍 5 个视野。②侵袭:提前将枪头和小室放入 $-20^\circ$ 冰箱预冷,向小室上室加入基质胶使其均匀地铺在小室,第 2 天提前半小时将小室置于无血清的培养基中水化,取各组对数生长期细胞,按每室铺  $5 \times 10^4$  个细胞计算细胞悬液量,接着向小室下室加入含 20%FBS 培养基。然后将小室置于 24 孔板内,每孔加入无血清细胞悬液到小室上室中,细胞生长 48 h 后,弃去培养基,用棉签轻轻擦拭干净上室中的基质胶,下室加入 1 mL 多聚甲醛固定约 30 min,然后用 0.1%结晶紫浸泡 20 min,PBS 涮洗 3 遍,晾干后将 24 孔板置于 200 倍显微镜下选取 5 个视野拍照并计数。

### 1.6 流式细胞术

将各组细胞消化、离心后,计数并调整细胞为  $2 \times 10^5$  个/mL,培养体系为 2 mL 接种于 6 孔板,培养箱培养 24 h,离心收取细胞沉淀,按照试剂盒说明书依次加入 Annexin V-APC/PI 结合液,Annexin V-APC 和 PI 染液混匀,轻轻吹打重悬细胞,室温孵育 10~15 min,加入预冷 PBS 混匀,上机检测各组细胞凋亡情况。

### 1.7 双荧光素酶实验

为了检测 PTPN21 与 miR-155 结合,取对数生长期 293T 细胞,将其随机分为转染 miR-155 模拟物组(mimicNC 组)和转染 miR-155 抑制剂组(miR-155-3p mimic 组),细胞计数,计算细胞密度为  $5 \times 10^4$  个/mL 所需细胞悬液量,分别接种至 48 孔细胞培养板,每个浓度梯度 3 个复孔。制备转染复合物,转染后 48 h,收集细胞检测各组荧光素酶活性,取样品 20  $\mu$ L,加入 100  $\mu$ L 荧光素酶检测试剂测得相对光单位 1(RLU1),完成后,加入 100  $\mu$ L 海肾荧光素酶检测试剂测得相对光单位 2(RLU2)。目的基因的激活程度=RLU1/RLU2。

### 1.8 蛋白质印迹实验

胰酶消化细胞获得细胞沉淀,向 Western 及 IP 裂解液中加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂(Western 及 IP 裂解液:酶抑制剂=100:1)。在冰上充分裂解 30 min,每 5 min 震荡 1 次,超声破碎后通过高速离心机(12 000 r,15 min)获得蛋白上清液,并使用 BCA 试剂盒(索莱宝)配合酶标仪在 562 nm 波长条件下测量细胞的蛋白浓度。在 60 V(30 min)和 110 V(1 h)下,采用一步法聚丙烯酰胺凝胶快速制备试剂盒(10%)(上海雅酶生物医药科技有限公司)凝胶电泳分离蛋白。电泳后,在  $4^\circ\text{C}$  冷室中用湿电转移法将蛋白转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(德国 Amersham 公司)上。然后,将 PVDF 膜用 5%脱脂牛奶密封,室温孵育 2 h,一抗在  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜。次日用含 0.1%Tween-20 的 Tris 缓冲盐溶液(TBST)洗涤 3 次,加入羊抗兔 IgG 二抗,室温孵育 2 h,再次用 TBST 洗涤 3 次,将膜用 ECL 曝光液浸泡在暗盒里孵育 30 s 左右放入凝胶成像系统中,最后再将条带导入 Image J 软件进行各组蛋白表达水平灰度分析。

### 1.9 统计学分析

采用 SPSS 26.0 统计软件分析实验数据。正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组资料比较采用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。折线图及柱状图通过

GraphPad 8.0 软件制作。

## 2 结果

### 2.1 shNC 和 sh-miR-155 转染 Huh7 人肝癌细胞

RT-qPCR 检验转染效果, sh-miR-155 组中 miR-155 的表达水平显著低于 Blank 组及 shNC 组 ( $P < 0.0001$ ), miR-155 在 Blank 组及 shNC 组表达水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见图 1。

### 2.2 miR-155 靶向调控 PTPN21 的表达

根据 microRNA 靶基因预测在线数据库 ([http://www.targetscan.org/vert\\_70/](http://www.targetscan.org/vert_70/)) (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>) 和 (<http://mirdb.org/miRDB/>) 预测 PTPN21 基因 3' 非翻译区 (PTPN21-3'-UTR) 上存在

与 miR-155 的潜在靶向结合点。双荧光素酶实验结果显示, miR-155-3p 与 PTPN21 有 2 个结合位点, 2 个位点分别设计 PTPN21-3'UTR 突变序列 (PTPN21-3'UTR MUT-1) 和 (PTPN21-3'UTR MUT-2)。miR-155-3p 可以和 PTPN21-3'UTR 野生型 (PTPN21-3'UTR WT) 结合使双荧光素酶活性增强, MUT-1 位点突变后双荧光素酶的活性也增强, 说明该位点不是结合位点; 而 MUT-2 位点突变后双荧光素酶活性没有变化, 说明该位点是结合位点。通过双荧光素酶实验得出: miR-155-3p 可与 PTPN21 结合, 且结合位点是 MUT-2 对应的序列, 见图 2。

### 2.3 沉默 miR-155 抑制肝癌细胞的增殖

MTT 结果显示, sh-miR-155 组中 Huh7 细胞在

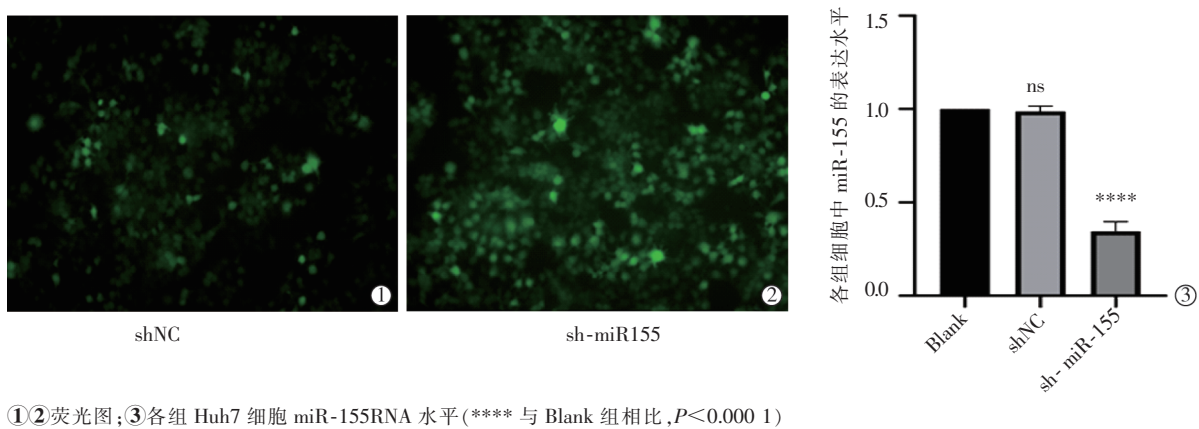
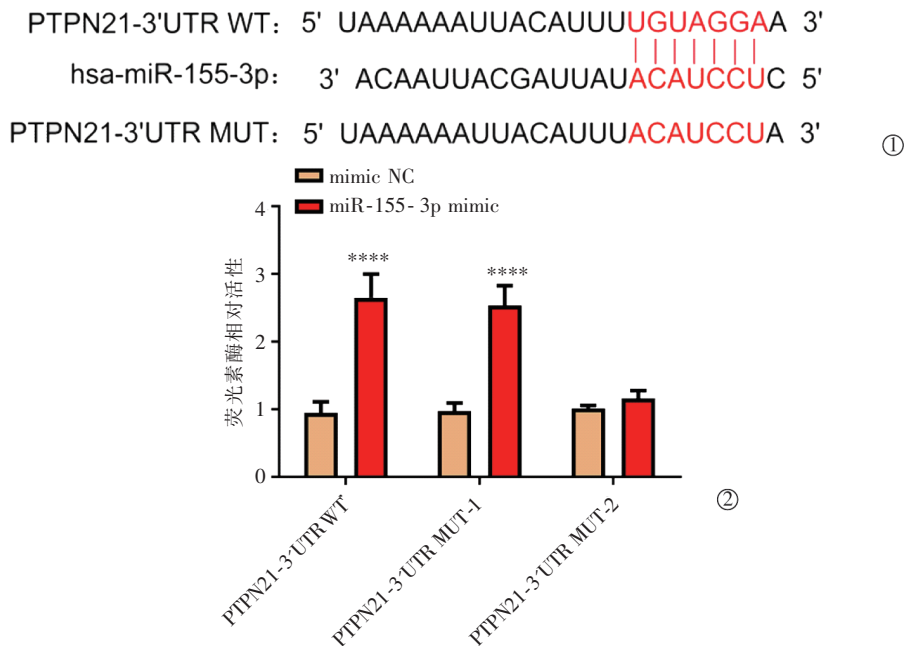


图 1 转染 shNC、sh-miR-155 后荧光图及其转染效率



①生物信息学分析表明 miR-155 靶向 PTPN21; ②荧光素酶活性 (与 mimicNC 相比, \*\*\*\* $P < 0.0001$ )

图 2 双荧光素酶实验检测 miR-155 与 PTPN21 的关系



2、3、4、5 d 时 A 值均低于 Blank 组及 shNC 组 ( $P < 0.000 1$ ), 而 Blank 组与 shNC 组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); sh-miR-155 组在 2、3、4、5 d 时 A 值低于 sh-miR-155+Recilisib 组及 shNC+Recilisib 组 ( $P = 0.005 2$ ,  $P < 0.000 1$ ), 而 sh-miR-155+Recilisib 在 2、3、4、5 d 时 A 值低于 shNC+Recilisib 组 ( $P < 0.000 1$ ), 见图 3。

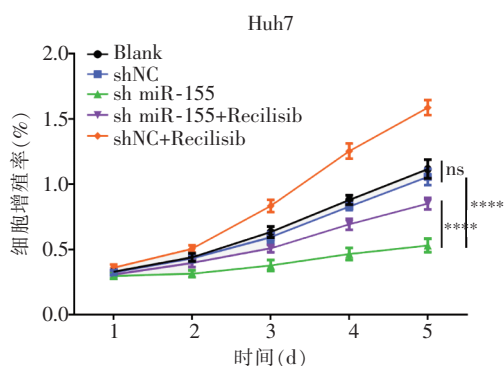


图 3 MTT 检测各组细胞增殖能力 (\*\*\*\* 与 Blank 组相比,  $P < 0.000 1$ )

#### 2.4 沉默 miR-155 抑制肝癌细胞的迁移和侵袭

Blank 组与 shNC 组迁移及侵袭细胞数差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 在激活 PI3K-AKT 信号通路后, 与 Blank 组相比, shNC+Recilisib 组肝癌细胞的

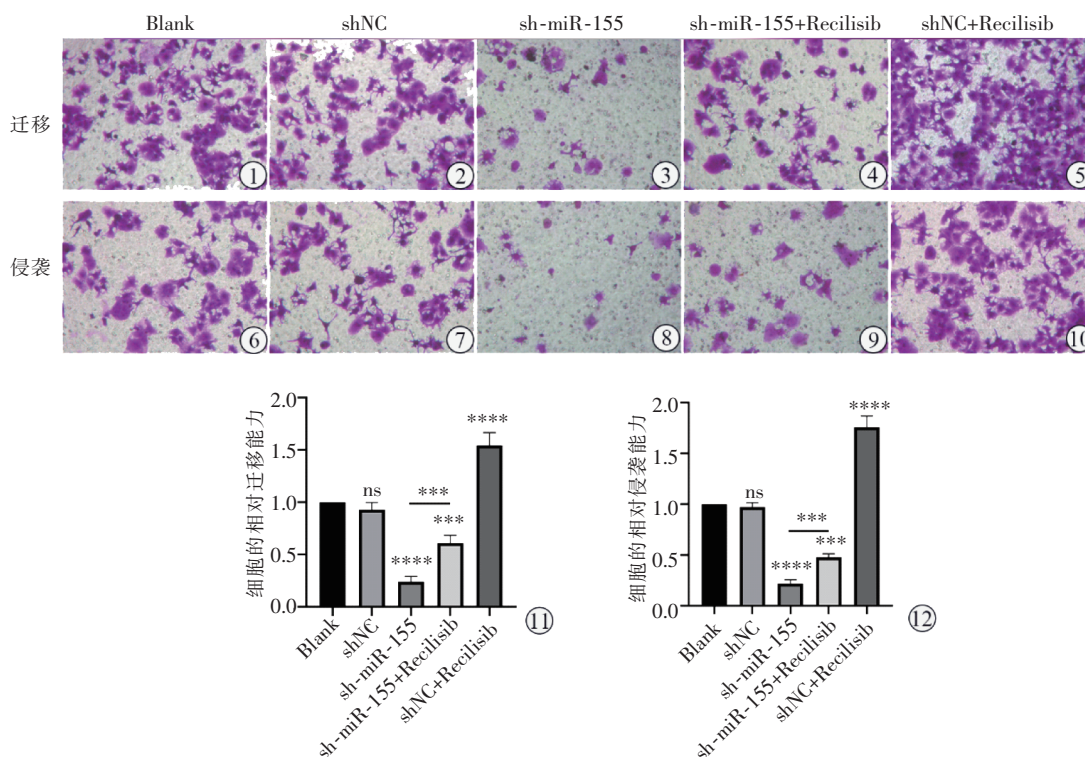
迁移、侵袭能力显著增加 ( $P < 0.000 1$ )。相反, 沉默 miR-155 后 Huh7 细胞的迁移及侵袭细胞数明显低于 Blank 组及 shNC 组 ( $P < 0.000 1$ ), 而 PI3K 激动剂逆转了这一现象, 与 sh-miR-155 组相比, sh-miR-155+Recilisib 组肝癌细胞的迁移、侵袭能力增强 ( $P = 0.000 2$ ), 见图 4。

#### 2.5 敲低 miR-155 促进肝癌细胞的凋亡

流式细胞术结果显示, Blank 组、shNC 和 shNC+Recilisib 组之间细胞凋亡率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与 Blank 组相比, sh-miR-155 组细胞凋亡率显著增加 ( $P < 0.000 1$ ), 并且 sh-miR-155 组细胞凋亡率高于 sh-miR-155+Recilisib 组 ( $P < 0.000 1$ ), 见图 5。

#### 2.6 miR-155 对 PTPN21、PI3K-AKT 信号通路及凋亡相关蛋白的影响

蛋白印迹实验结果显示, 与 Blank 组相比, 沉默 miR-155 后促凋亡蛋白 Caspase-3 和 BAX 表达水平显著增加 ( $P < 0.000 1$ ), 而抗凋亡蛋白 BCL2 的表达量明显降低 ( $P < 0.000 1$ ); 此外, sh-miR-155 组与 Blank 组相比 PTPN21 表达明显下调 ( $P < 0.000 1$ ), 而在 PI3K-AKT 信号通路激活时 PTPN21 表达较 sh-miR-155 组高 ( $P < 0.000 1$ ), 但 sh-miR-155+Recilisib 组 PTPN21 表达仍低于 Blank 组 ( $P = 0.000 2$ ); 与 Blank



①~⑤各组肝癌细胞迁移能力; ⑥~⑩各组肝癌细胞的侵袭能力; ⑪各组肝癌细胞迁移能力柱状图; ⑫各组肝癌细胞侵袭能力柱状图 (与 Blank 组相比, ns:  $P > 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.000 1$ )

图 4 Transwell 检测各组细胞侵袭及迁移能力

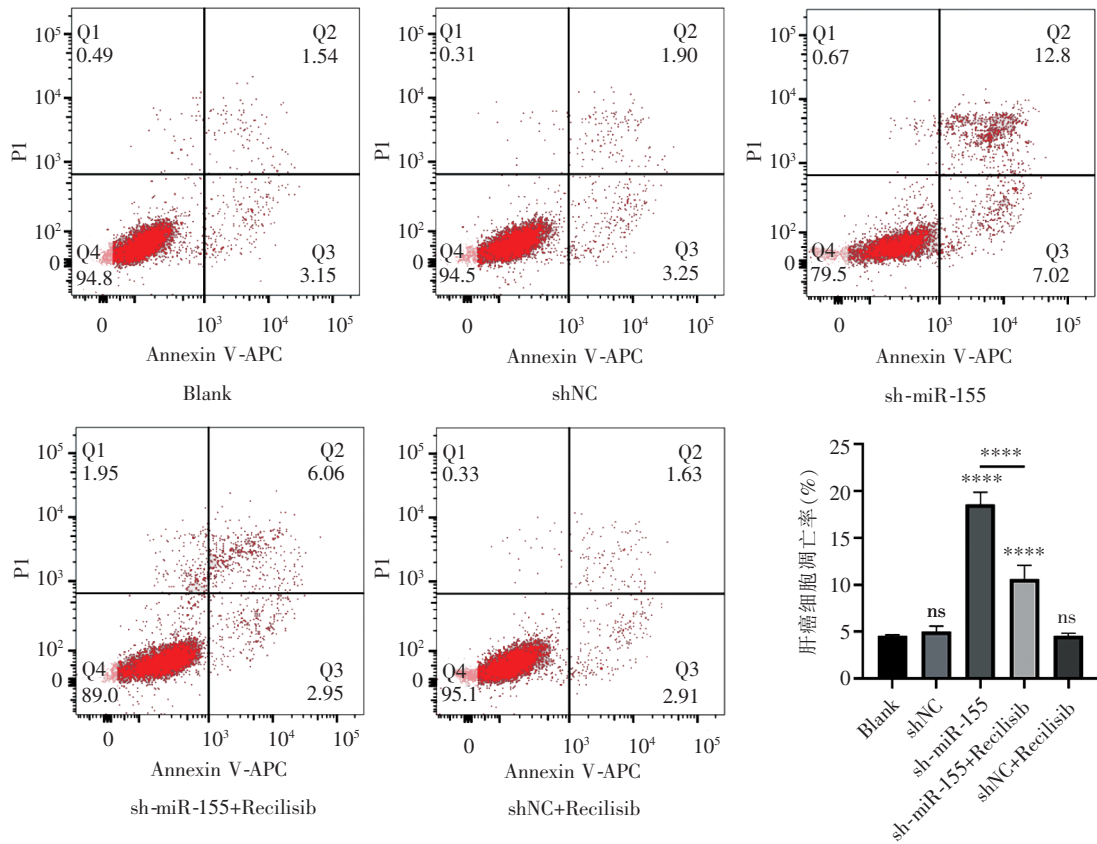


图 5 各组肝癌细胞流式细胞术图及凋亡分析柱状图(与 Blank 组相比,ns: $P>0.05$ ;\*\*\*\*: $P<0.0001$ )

组相比,在沉默 miR-155 后 P-AKT 和 P-PI3K 的表达显著下降( $P<0.0001$ ),且 sh-miR-155+Recilisib 组 P-AKT 和 P-PI3K 表达也较 Blank 组低( $P=0.0177$ ,  $P=0.0313$ ),而 sh-miR-155+Recilisib 组 P-AKT 和 P-PI3K 表达较 sh-miR-155 组高( $P<0.0001$ ,  $P=0.0014$ ),PI3K 与 AKT 在各组肝癌细胞之间的差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见图 6。

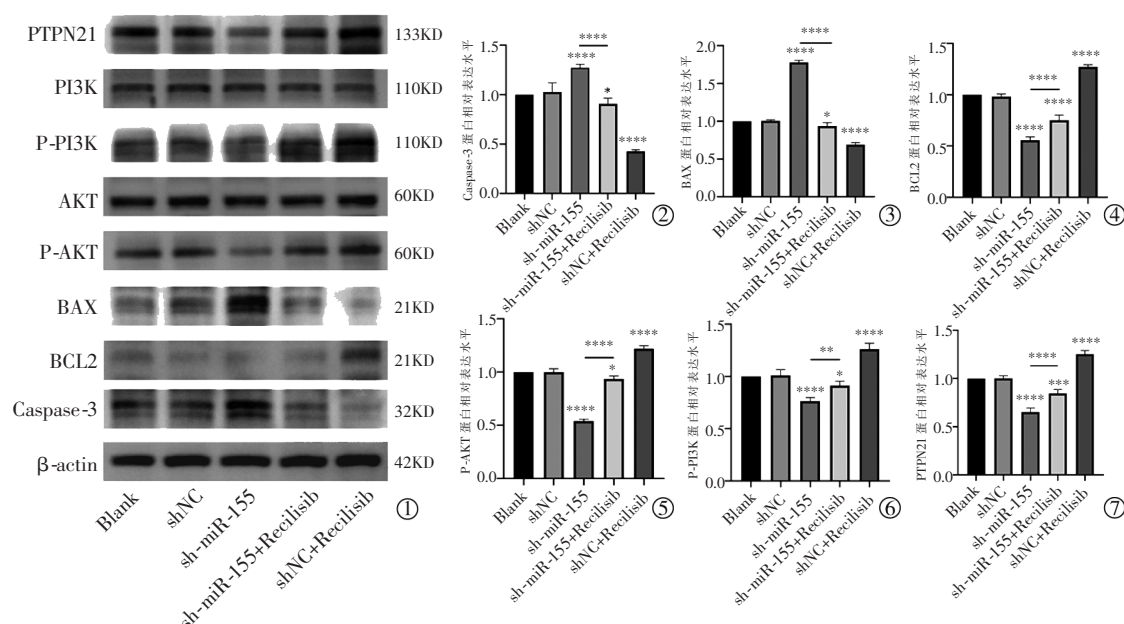
### 3 讨论

研究表明,miRNA 与肿瘤的发生有密切关系,致癌相关 miRNA 的过表达通过沉默肿瘤抑制因子或参与细胞分化中的某一过程,最终影响肿瘤组织血管生成、增殖及侵袭水平导致肿瘤形成<sup>[9-11]</sup>。miR-155 作为一类癌症相关 miRNA,在各种肿瘤细胞中表达量增加,如胃癌、膀胱癌、结直肠癌、乳腺癌和其他实性恶性肿瘤,并发挥不同的作用<sup>[12]</sup>。此外,miR-155 在肝癌中高表达,并与 HCC 患者不良的临床病理特征和较低生存率相关<sup>[13]</sup>。本研究通过构建 miR-155 沉默稳转株,探讨下调 miR-155 后对肝癌细胞增殖和侵袭迁移影响的机制。

PTPN21 在肺癌<sup>[14]</sup>、膀胱肿瘤<sup>[15]</sup>及非霍奇金淋

巴瘤<sup>[16]</sup>中高表达,同时参与肿瘤细胞的生长过程,但其在肝癌中的作用机制尚不明确。本研究发现,PTPN21 基因 3'-UTR 上存在与 miR-155 相结合的潜在靶点。双荧光素酶实验结果显示,miR-155-3p 与 PTPN21 有 2 个结合位点,2 个位点分别设计突变序列 MUT-1 和 MUT-2,MUT-1 位点突变后双荧光素酶的活性增强,而 MUT-2 位点突变后双荧光素酶活性没有变化,说明 MUT-2 是结合位点,并且 miR-155 沉默可以抑制 PTPN21 的表达,提示 PTPN21 是 miR-155 的下游靶点。

PI3K-AKT 通路是调控细胞生长、代谢、增殖、存活、转录和蛋白质合成的关键调控中心<sup>[17]</sup>。研究表明,miRNA 在调控 PI3K-AKT 通路中发挥着至关重要的作用,其通过靶向 PI3K-AKT 信号轴,在调节细胞增殖、凋亡和代谢方面具有重要意义<sup>[18-19]</sup>。本研究发现下调 miR-155 后,各组 PI3K、AKT 总蛋白变化不明显,而磷酸化蛋白 P-PI3K、P-AKT 表达量明显下降,提示 miR-155 的表达与 PI3K-AKT 通路呈正相关。为了进一步验证 miR-155 对肝癌细胞生长影响是通过 PI3K-AKT 通路实现的,本实验在 shNC 组及沉默 miR-155 的同时应用 PI3K-AKT 通路激



①电泳图;②Caspase-3 蛋白相对表达;③BAX 蛋白相对表达;④BCL2 蛋白相对表达;⑤P-AKT 蛋白相对表达;⑥P-PI3K 蛋白相对表达;⑦PTPN21 蛋白相对表达(与 Blank 组相比,\*: $P<0.05$ ;\*\*: $P<0.01$ ;\*\*\*: $P<0.001$ ;\*\*\*\*: $P<0.0001$ )

图 6 蛋白质印迹检测 PTPN21、PI3K-AKT 信号通路及凋亡相关蛋白

动剂,观察 PI3K-AKT 通路相关蛋白的变化情况,结果显示,与 shNC+Recilisib 组相比,miR-155 可抑制 P-PI3K 及 P-AKT 的表达,提示 miR-155 可通过调控 PI3K-AKT 通路影响 HCC 生长。MTT 实验发现,沉默 miR-155 可抑制肝癌细胞的增殖。此外,流式细胞术结果显示,与 Blank 组及 shNC 组相比,sh-miR-155 组细胞凋亡率显著增加,Blank 组和 shNC 组细胞凋亡量无显著变化,差异无统计学意义。细胞凋亡常与多个信号传导通路密切相关,其中 BCL-2 及 Caspase 家族蛋白扮演着重要角色,当细胞进入凋亡途径时,抑凋亡蛋白 BCL-2 表达水平下调,而促凋亡蛋白 BAX 表达上调,其下游 Caspase 家族蛋白接受凋亡信号,进而激活 Caspase-3 活化,执行凋亡程序<sup>[20]</sup>。本研究结果显示,sh-miR-155 组与 Blank 组及 shNC 组相比,抑凋亡蛋白 BCL-2 表达水平显著降低,促凋亡蛋白 Caspase-3 及 BAX 表达水平显著提高,加速了肝癌细胞凋亡进程。

有研究表明,沉默 PTPN21 通过调控 PI3K-AKT 信号通路抑制胶质瘤的进展<sup>[21]</sup>。本研究中,Transwell 结果显示,沉默 miR-155 明显抑制肝癌细胞侵袭及迁移。以上实验表明,miR-155 通过靶向 PTPN21 调控 PI3K-AKT 信号通路,进而影响肝癌细胞生长,提示 miR-155 在肝癌发生发展过程中发挥促癌基因的作用。

综上所述,沉默 Huh7 细胞中 miR-155 通过靶向 PTPN21 调控 PI3K-AKT 信号通路抑制肝癌细胞

生长。因此,miR-155 可能是未来 HCC 患者的辅助诊断指标之一,也为临床治疗 HCC 患者提供了新的治疗靶点。

#### [参考文献]

- [1] Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault JC, et al. Genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2015, 149: 1226-1239.
- [2] 杨鹏,何洋,李成,等.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[J]. *介入放射学杂志*, 2021, 30:43-47.
- [3] Liu J, Fan L, Yu H, et al. Endoplasmic reticulum stress causes liver cancer cells to release exosomal miR-23a-3p and up-regulate programmed death ligand 1 expression in macrophages[J]. *Hepatology*, 2019, 70: 241-258.
- [4] Santos DAR, Gaiteiro C, Santos M, et al. MicroRNA biomarkers as promising tools for early colorectal cancer screening: a comprehensive review[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24: 11023.
- [5] Chen S, Wang Y, Li D, et al. Mechanisms controlling microRNA expression in tumor[J]. *Cells*, 2022, 11: 2852.
- [6] Wang J, Wang Q, Guan Y, et al. Breast cancer cell-derived microRNA-155 suppresses tumor progression via enhancing immune cell recruitment and antitumor function[J]. *J Clin Invest*, 2022, 132: e157248.
- [7] Fang H, Shuang D, Yi Z, et al. Up-regulated microRNA-155 expression is associated with poor prognosis in cervical cancer patients[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 83: 64-69.
- [8] Fu X, Wen H, Jing L, et al. MicroRNA-155-5p promotes hepatocellular carcinoma progression by suppressing PTEN through

- the PI3K/Akt pathway[J]. Cancer Sci, 2017, 108: 620-631.
- [9] 王 奕, 韩 涛, 张志强, 等. 血清微小核糖核酸-599 与肝细胞肝癌 TACE 治疗预后的相关性[J]. 介入放射学杂志, 2021, 30: 1265-1270.
- [10] Zhang Y, Li X, Zhang Y, et al. Pegylated interferon- $\alpha$  inhibits the proliferation of hepatocellular carcinoma cells by downregulating miR-155[J]. Ann Hepatol, 2019, 18: 494-500.
- [11] Eldosoky MA, Hammad R, Elmadbouly AA, et al. Diagnostic significance of hsa-miR-21-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-199a-5p panel and ratios in hepatocellular carcinoma on top of liver cirrhosis in HCV-infected patients[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24: 3157.
- [12] Basova P, Pesta M, Sochor M, et al. Prediction potential of serum miR-155 and miR-24 for relapsing early breast cancer[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18: 2116.
- [13] Guan C, Yang F, He X, et al. Clinical significance of microRNA-155 expression in hepatocellular carcinoma[J]. Oncol Lett, 2016, 11: 1574-1580.
- [14] Wang CC, Shen WJ, Anuraga G, et al. Novel potential therapeutic targets of PTPN families for lung cancer[J]. J Pers Med, 2022, 12: 1947.
- [15] Carlucci A, Porpora M, Garbi C, et al. PTPD1 supports receptor stability and mitogenic signaling in bladder cancer cells[J]. J Biol Chem, 2010, 285: 39260-39270.
- [16] Plani-Lam JH, Chow TC, Fan YH, et al. High expression of PTPN21 in B-cell non-Hodgkin's gastric lymphoma, a positive mediator of STAT5 activity[J]. Blood Cancer J, 2016, 6: e388.
- [17] Han W, Wang N, Kong R, et al. Ligand-activated PPAR $\delta$  expression promotes hepatocellular carcinoma progression by regulating the PI3K-AKT signaling pathway[J]. J Transl Med, 2022, 20: 86.
- [18] Ghafouri-Fard S, Abak A, Tondro Anamag F, et al. The emerging role of non-coding RNAs in the regulation of PI3K/AKT pathway in the carcinogenesis process[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 137: 111279.
- [19] Rahmani F, Ziaemehr A, Shahidsales S, et al. Role of regulatory miRNAs of the PI3K/AKT/mTOR signaling in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma[J]. J Cell Physiol, 2020, 235: 4146-4152.
- [20] 吴佳明, 邓忠权, 朱 奕, 等. MicroRNA-431-5p 在胃癌组织中低表达: 基于线粒体和 Bax/Bcl-2/caspase 3 信号通路[J]. 南方医科大学学报, 2023, 43: 537-543.
- [21] Li XQ, Liu BC, Jiang XB, et al. Inhibition of PTPN21 has antitumor effects in glioma by restraining the EGFR/PI3K/AKT pathway[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2022, 451: 116180.
- (收稿日期: 2023-07-03)  
(本文编辑: 新 宇)

欢迎投稿 欢迎订阅 欢迎刊登广告