

## miR-103 通过抑制 FBW7 的表达促进肝癌细胞增殖

李元宏<sup>1</sup>, 李卫萍<sup>2</sup>, 任来峰<sup>1</sup>, 宋维芳<sup>3</sup>

(山西医科大学汾阳学院 1.生物化学与分子生物学教研室,2.药理教研室,3.病理生理教研室,山西 汾阳 032200)

**摘要:**【目的】研究 miR-103 对肝癌细胞增殖功能的影响及其作用机制。【方法】Real time PCR 方法检测 miR-103 在肝癌组织和细胞中的表达。将 miR-103 inhibitor 转染到肝癌细胞中,分为实验组(转染 miR-103 inhibitor)和对照组(转染 Negative Control),通过 MTT 实验检测肝癌细胞的增殖变化。Real time PCR 和 Western blotting 检测转染 miR-103 mimics 后肝癌细胞中 FBW7 mRNA 和蛋白的表达变化。通过重荧光素酶报告基因实验检测转染 miR-103 mimics 或 inhibitor 后 FBW7-3' UTR 活性的变化。【结果】Real time PCR 结果显示 miR-103 在肝癌组织和 HepG2 细胞系中均高于癌旁组织和 LO2 肝细胞系 ( $P < 0.05$ )。MTT 实验结果显示,转染 miR-103 inhibitor 实验组肝癌细胞的存活细胞数低于对照组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。Real time PCR 和 Western blotting 结果显示,转染 miR-103 mimics 实验组肝癌细胞中 FBW7 的 mRNA 和蛋白表达水平都低于对照组。重荧光素酶报告基因实验结果显示,与对照组相比,转染 miR-103 mimics 的实验组中 FBW7-3' UTR 报告基因活性显著降低 ( $P < 0.05$ );与对照组相比,转染 miR-103 inhibitor 的实验组中 FBW7-3' UTR 活性显著升高 ( $P < 0.05$ )。进一步实验发现,转染 FBW7 后能显著下调由 miR-103 mimics 所引起的细胞增殖作用。【结论】miR-103 可以通过抑制 FBW7 的表达来促进肝癌细胞增殖。

**关键词:** miR-103;肝癌;增殖;FBW7

**中图分类号:** R735

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1672-3554(2014)04-0500-06

## miR-103 Promotes Hepatoma Cell Proliferation Through Inhibiting FBW7

LI Yuan-hong<sup>1</sup>, LI Wei-ping<sup>2</sup>, REN Lai-feng<sup>1</sup>, SONG Wei-fang<sup>3</sup>

(1.Department of Biochemistry and Molecular Biology, Fenyang College of Shanxi Medical University, Fenyang 032200, China;

2. Department of Pharmacology, Fenyang College of Shanxi Medical University, Fenyang 032200, China; 3. Department of Pathophysiology, Fenyang College of Shanxi Medical University, Fenyang 032200, China)

**Abstract:**【Objective】To investigate the effect of miR-103 on proliferation of hepatoma cells and its mechanism.【Methods】The expression of miR-103 was detected in hepatoma tissues and cells by real-time PCR. The effect of miR-103 inhibitor on proliferation of hepatoma cells was measured using MTT assay. The mRNA and protein levels of FBW7 were measured by real time PCR and Western blotting analysis when HepG2 cells were transfected with miR-103mimics.The FBW7-3' UTR activity was detected by luciferase reporter gene assay when HepG2 cells were transfected with miR-103mimics (or inhibitor).【Results】miR-103 was high expression in hepatoma tissues and HepG2 cell line compared with adjacent tissues and LO2 cell line. Compared with the control group, the number of viable cells of hepatoma cells was decreased when HepG2 cells were treated with miR-103 inhibitor. Compared with the control group, the mRNA and protein levels of FBW7 were significantly decreased when HepG2 cells were treated with miR-103 mimics. Compared with the control group, the FBW7-3'UTR activity was significantly decreased (or increased) when HepG2 cells were treated with miR-103 mimics (or inhibitor). Moreover, we found that the effect of miR-103mimics on cell proliferation was significantly abrogated by overexpression of FBW7.【Conclusion】MiR-103 was able to promote proliferation of hepatoma cells through targeting FBW7 mRNA 3' UTR.

**Key words:** miR-103; hepatoma; proliferation; FBW7

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2014,35(4):500-505]

收稿日期:2014-01-22

基金项目:中国肝炎防治基金(TQGB20120013)

作者简介:李元宏,硕士,讲师,研究方向:肿瘤分子生物学,E-mail:13033477672@163.com

细胞内控制着细胞周期调控、增殖和凋亡的绝大部分蛋白是受到泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin proteasome system)调节,这一系统在细胞分裂过程中发挥着不可替代的作用,其组分在肿瘤细胞中有着异常表达的现象。FBW 家族成员是 E3 泛素连接酶 SCF (SKP1-CUL1-F-box protein)组分中的一部分。FBW 蛋白通过识别和结合靶蛋白来决定着被降解蛋白的特异性。最近的研究还表明,FBW7 (F-box and WD repeat domain-containing 7)是一个重要的抑癌基因,通过促进各种癌基因蛋白的降解来发挥其抗肿瘤作用<sup>[1]</sup>。MicroRNAs(miRNA)是一类非编码蛋白的短序列 RNA 片段,长度大约为 22 个核苷酸,能够在转录后水平上通过抑制靶基因翻译或者降解靶基因 mRNA 来调节基因表达<sup>[2]</sup>。最近的几项研究表明,miRNA 在发育、分化、细胞增殖、凋亡、代谢和免疫力等生理过程中发挥着重要的作用<sup>[3-5]</sup>。miRNA 也可以在肿瘤发生和发展中发挥关键作用<sup>[4]</sup>。目前大部分研究集中在 FBW7 的泛素化降解途径上,而对 FBW7 的调节很少有报道。本研究旨在探讨 miR-103 对肿瘤细胞的增殖的影响。并通过生物信息学分析初步判断其可能靶向的几个相关的关键基因,并且通过 real time PCR, Western blotting 和报告基因证实其通过作用 FBW7 的 3'UTR 来实现其调控肿瘤细胞增殖。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

miR-103 mimics、miR-103 inhibitor 及其阴性对照 Negative Control 和 anti-Negative Control 均购自广州锐博公司、Lipofectamine 2000 与 RNA 提取试剂来自 Invitrogen 公司。高糖的 RPMI1640、DMEM 培养基和胎牛血清(FBS)从 Hyclone 公司购买。FBW7,  $\beta$ -actin 单克隆抗体购买于武汉三鹰(proteintech group)公司,高纯质粒小提试剂盒购买于 Promega 公司。实时荧光定量 PCR (real time PCR)试剂盒从 GeneCopoeia 公司购买。肝癌和癌旁组织由山西医科大学汾阳医院提供;HepG2 和 LO2 细胞系购自上海细胞库。

### 1.2 引物设计

FBW7-3'UTR 报告基因载体构建:针对 Genbank 报道的人源 FBW7 的基因片段

(NM\_033632.3)设计引物。根据 DIANA microT3.0 的预测包含了 miR-103 的结合位点。产物大小分别为 393 bp。引物序列如下:FBW7:上游引物:5' TGATGCTGGTGCTAGAAGT 3' 下游引物:5' TCTCCACAGAACAGGCAAG 3'。采用 PCR 的方法引入 miR-103 结合位点的突变。引物序列如下:FBW7 突变体:上游引物,5'-GTGGCCAACTTATTTAGCTACGTAAATGAAAGAAAG-3',下游引物,5'-CTTTCTTTTCATTTACGTAGCTAAATAAGTTTGGCCAC-3'。将扩增出的片段经双酶切后插入 pGL3-control 载体下游 XbaI 和 FseI 位点之间,分别命名为 FBW7-3'UTR 和 FBW7-3'UTR-mut,简称为 FBW7-3'UTR 和 FBW7-3'UTR-mut。FBW7 CDS 区克隆:引物设计,上游引物:5'-ATGTCAAAACCGGAAAACCTA-3',下游引物:5'-TTCACCTCATGTCCACATCAAA-3',将扩增的片段插入到 pCMV-tag2B 载体的 EcoRI 和 HindIII 位点之间。FBW7 siRNA 序列为 GCATATGATTTTATGCTAA。U6 作为检测 miR-103 的内参,上游引物为 5'-AGAGCCTGTGGTGTCCG-3'下游引物为 5'-CATCTTCAAAGCACTTCCCT-3'。

### 1.3 细胞培养

人肝细胞系 LO2 细胞用含 100 mL/L FBS 的 RPMI1640 培养基传代培养。人肝癌细胞系 HepG2 细胞用含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM (高糖)培养基。均置于 37 °C,含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。

### 1.4 细胞瞬时转染

以 24 孔板做报告基因为例,每个样做两个平行孔。将 150  $\mu$ L 的无血清培养基与 3  $\mu$ L 转染试剂(Lipofectamine 2000)混合,轻轻混匀,室温孵育 5 min,同时将 300 ng 重组后 FBW7-3'UTR 质粒与 150 ng pRL-TK 质粒加入分别含有 3.75 或 7.5  $\mu$ L 的 20  $\mu$ mol/L 的 miR-103 mimics 或 miR-103 inhibitor 的 150  $\mu$ L 无血清的培养基中,用手轻弹混合均匀,室温孵育 5 min。最后将上述两种溶液混合在一起,用手轻弹混匀,室温下孵育 20 min。向含有 450  $\mu$ L 的培养基的 24 孔板中每孔加入 50  $\mu$ L 混合液。将培养板置于 37 °C 体积分数为 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱内孵育 36 h。

### 1.5 real time PCR 检测

采用 Trizol 法提取细胞及组织总 RNA 将获得的 RNA 进行加尾(加尾反应体系如下:5  $\times$  buffer

10.0  $\mu\text{L}$ ,  $\text{MnCl}_2$  (25 mmol/L) 5.0  $\mu\text{L}$ , ATP (100 mmol/L) 0.5  $\mu\text{L}$ , RNA 模板 10.0  $\mu\text{g}$ , PAP 酶 (polyA 加尾酶 Ambion) 1.0  $\mu\text{L}$  (2U) DEPC 水 23.5  $\mu\text{L}$ , 总体积 50.0  $\mu\text{L}$ 。通过 M-MLV 逆转录酶合成 cDNA 第一链, 以此为模板进行 PCR 反应。用实时定量 PCR 方法检测 miR-103 在细胞系及组织中的表达水平。U6 作为内参照。miR-103 的相对表达水平以 Ct 表示, 公式:  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  计算。

### 1.6 重荧光素酶报告基因分析

将质粒 pRL-TK、FBW7-3'UTR 及 miR-103 mimics (或 miR-103 inhibitor) 共转染至 HepG2 细胞中, 36 h 后用 PBS 缓冲液洗细胞三次, 每孔中加入 100  $\mu\text{L}$   $1 \times$  Passive Lysis Buffer, 混匀。充分裂解细胞 30 min; 将 100  $\mu\text{L}$  的裂解液转移至 EP 管中, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  的报告基因 II 液测定萤火虫的荧光值, 最后加入 100  $\mu\text{L}$  的终止液测定海肾荧光值(内参)。每组实验重复 3 次。

### 1.7 MTT 分析

以文献报道为基础做 MTT 实验<sup>[6]</sup>。简要述之, 将生长在对数期生长的肝癌细胞 HepG2 接种于 96 孔板中, 每孔加入  $1 \times 10^3$  个细胞左右。每组做 8 个复孔, 按实验要求分别进行转染。本实验需要在 0、48 h 用酶标仪(波长 590 nm)测定各孔的吸光度(D)值, 以此对比细胞增殖能力。

### 1.8 Western blotting 检测 FBW7 蛋白的表达

分别取生长至 90% 的单层培养的细胞, 用预冷的 PBS 洗涤 3 次, 然后加细胞裂解液 RIPA 冰上放置 20 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ ,  $13\ 800 \times g$  离心 30 min, 收集上清定量分析。取 20  $\mu\text{g}$  已定量的总蛋白进行 12% SDS-PAGE 电泳分离, 电泳转移至 PVDF 膜上, 5%~10% 的脱脂奶粉 4 $^{\circ}\text{C}$  封闭过夜。用 5%~10% 的脱脂奶粉按比例稀释一抗和二抗, 室温孵育 2 h, PBST 后 TBST 溶液清洗 3 次, 每次 15 min。于暗室中曝光。

### 1.9 统计学方法

本实验主要采用 Student's-*t* 检验进行统计学分析,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 miR-103 在肝癌组织和细胞中高表达

为了研究 miR-103 在肝癌细胞中的表达情况, 我们选取了 10 对肝癌和癌旁组织以及 HepG2

和 LO2 这两株细胞系。应用 real time PCR 进行分析。miR-103 在肝癌组织中的表达水平高于癌旁组织 ( $P < 0.05$ , 图 1A), 在肝癌细胞系 HepG2 中的表达也高于永生化的 LO2 肝细胞系 ( $P < 0.05$ , 图 1B)。

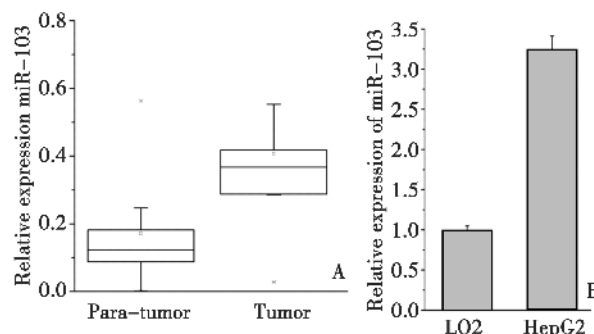


图 1 miR-103 在肝癌组织(A)和细胞系(B)中的表达  
Fig.1 The expression of miR-103 in HCC tissues(A) and cell line(B) was detected

### 2.2 miR-103 inhibitor 对肝癌细胞增殖的影响

前面我们发现 miR-103 在肝癌细胞系高表达, 但其具体功能还未见报道。本实验我们主要研究 miR-103 inhibitor 对细胞增殖的作用。采用 MTT 法分别检测 miR-103 inhibitor 组细胞和对照组细胞的生存率, 结果表明, 转染 48 h 后 miR-103 inhibitor 组的肝癌细胞吸光度(D)值 ( $0.133 2 \pm 0.027 2$ ) 显著低于对照组 ( $0.222 7 \pm 0.007 6$ , 图 2)。

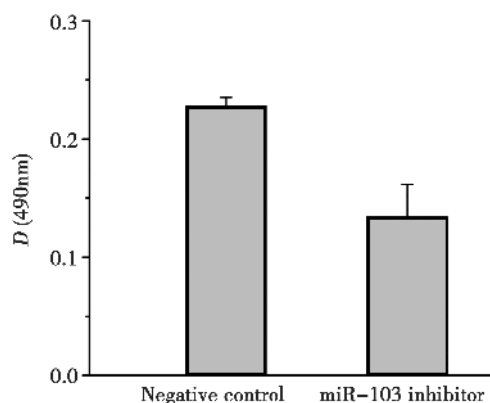


图 2 miR-103 inhibitor 对 HepG2 细胞增殖的影响  
Fig.2 The effect of miR-103 inhibitor on cell proliferation was detected

PubMed Links: [gene](#) | [miRNA](#) | [both](#)

Binding Type	UTR position	Score	Conservation	Also predicted by
8mer(pos 1)	765-793	5	12	targetscan
Position on Chromosome 4: 153462689 - 153462717				
Conservation Info rn4, mm8, oryCun1, bosTau2, canFam2, dasNov1, loxAfr1, echTel1, monDom4, galGal2, xenTro1, tetNig1		<pre> 3'UTR: 5' A AAACU UU 3'       GUGGCC UAU AUGCUGCU                       UAUCGG AUG UACGACGA miRNA: 3' AG GAC U 5'           </pre>		

图 3 miR-103 靶向 FBW7 的 3'UTR 示意图

Fig.3 The schematic program of miR-103 targeted FBW7 3'UTR

### 2.3 miR-103 靶基因预测

为了研究 miR-103 促进肝癌细胞增殖机制的研究, 我们用生物信息学软件进行预测。经过 Targetscan 和 DIANA-microT v3.0 预测, 我们发现 miR-103 可以靶向 FBW7 (图 3)。

### 2.4 miR-103 靶向 FBW7 的 3'UTR

为了验证这一预测结果, 我们进行了 Real time PCR 和 Western blotting 实验。结果显示 HepG2 转染 miR-103 mimics 后, FBW7 的 mRNA 和蛋白表达水平显著下降(图 4A-B)。接下来我们克隆了含有 miR-103 作用位点的 FBW7 的 3'UTR 和 miR-103 位点突变的 FBW7 的 3'UTR, 并将这一序列插入在 pGL3-Control 载体中, 命名 FBW7-3'UTR 和 FBW7-3'UTR-mut(图 4C)。将重组 FBW7-3'UTR 质粒分别与 miR-103 mimics 共转染 HepG2 细胞, 36 小时测定荧光值。结果显示转染 miR-103 mimics 的荧光表达量较对照组有明显下降 ( $P < 0.05$ ), 但 FBW7-3'UTR-mut 与 miR-103 mimics 共转染后荧光值无明显变化(图 4D)。我们还发现在加入 FBW7-3'UTR 的同时加入 miR-103 inhibitor 后, 与对照组相比实验组的荧光值明显升高 ( $P < 0.05$ ), 但 miR-103 inhibitor 不能影响 FBW7-3'UTR-mut 的荧光素表达量(图 4E)。结合以上实验结果我们得出一个结论: FBW7 是 miR-103 的一个靶基因。

### 2.5 miR-103 通过抑制 FBW7 的表达来促进肝癌细胞增殖

为了验证 miR-103 对肝癌细胞增殖作用是通过抑制 FBW7 的表达来实现的。我们首先研究干扰 FBW7 后, miR-103 对细胞增殖作用的影响。实验发现, FBW7 干扰后, Si-FBW7 组的肝癌细胞吸

光度 ( $D$ ) 值 ( $0.144 2 \pm 0.017 2$ ) 显著低于对照组 ( $0.247 8 \pm 0.021 9$ )。接下来我们克隆了 FBW7 的 CDS 区并插入到 pCMV-tag2B 中。结果发现转染 FBW7 后能显著下调由转染 miR-103 mimics 所引起的细胞增殖作用(图 5)。

## 3 讨论

FBW7 是一个重要的肿瘤抑制基因, 其功能缺失突变存在于多种肿瘤中包括直肠癌、胃癌、子宫内膜癌和白血病<sup>[7]</sup>。FBW7 可直接作用于多种转录激活因子或原癌基因, 如周期蛋白 E、c-Myc、c-Jun、Notch、和 mTOR 等并对其进行泛素化修饰, 随后被 26S 蛋白酶体降解<sup>[1]</sup>。FBW7 的表达受多方面的调控, 包括转录水平, 转录后水平, 翻译后修饰等等。p53 可调节 FBW7 的表达, 在胃癌患者中 p53 突变可引起 FBW7 含量降低。Yakobori 等<sup>[8]</sup>发现在胃癌中 FBW7 的低表达可以导致肿瘤增大、转移和预后差。在转录后水平, miR-223 可以靶向 FBW7 的 3'UTR 来抑制蛋白翻译, 进而增加了周期蛋白 E 的含量和基因组的不稳定性<sup>[9]</sup>。

miRNA 是一个小的非编码的 RNA, 在肿瘤中可以作为肿瘤抑制基因发挥作用。miR-103 是最近几年才发现的 miRNA。Annibali 等<sup>[10]</sup>发现 miR-103 可以靶向分化抑制子 ID2, 改变 miR-103 的表达可能参与神经癌的发展。Yu 等<sup>[11]</sup>报道 miR-103 可以通过下调 TIMP3 来调节子宫内膜癌细胞的生长和侵袭。miR-103 的表达受低氧诱导因子 1 $\alpha$  的调控, 其可以靶向 argonaute 1 (AGO1) 来促进肿瘤血管增生<sup>[12]</sup>。还有文献报道 miR-103 可以作为生物 marker 来检测早期的

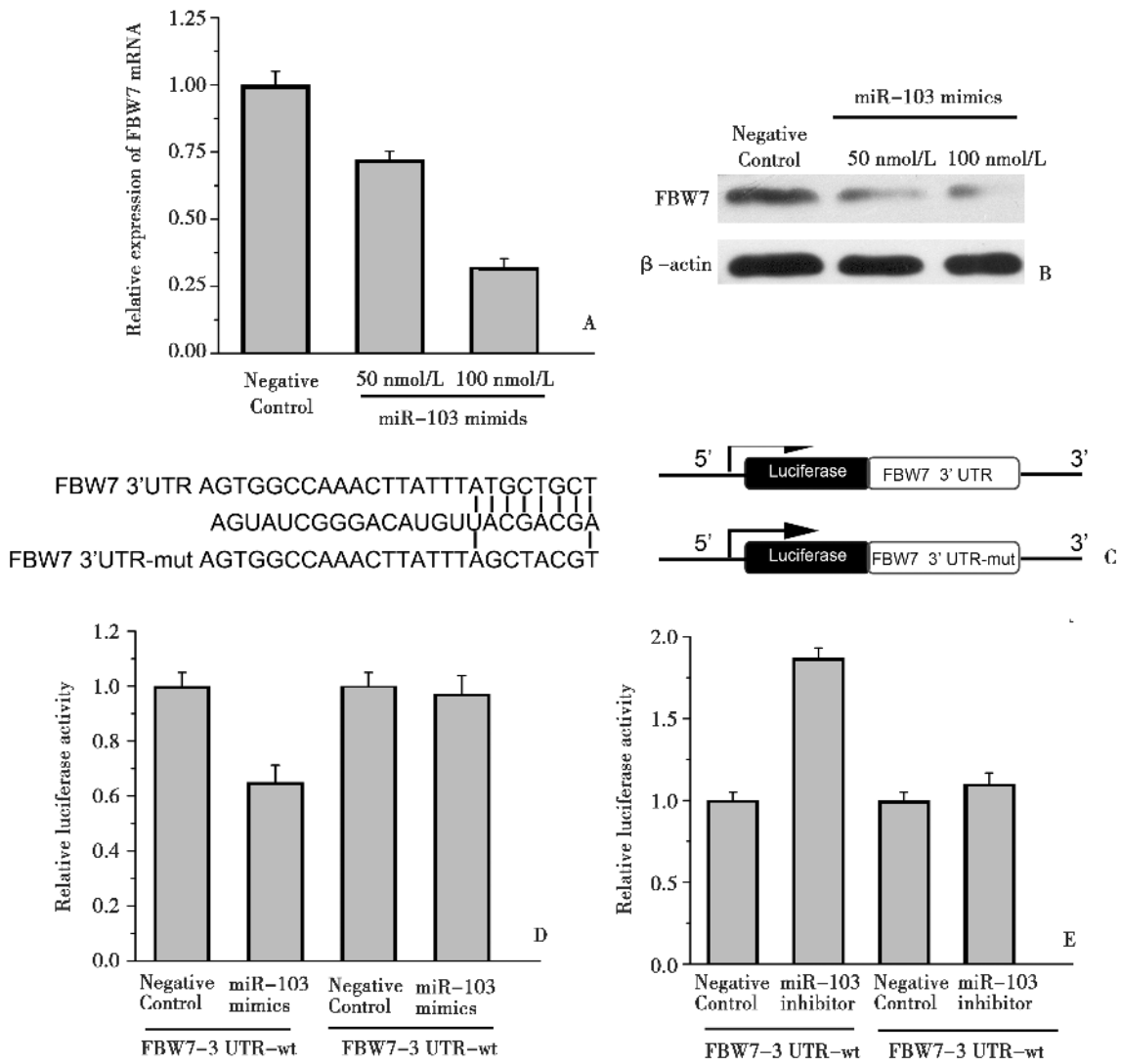


图 4 FBW7 是 miR-103 的靶基因

Fig.4 FBW7 is a target gene of miR-103

(A-B) The effects of miR-103 mimics on the levels of FBW7 mRNA and protein were detected. (C) The schematic program of the constructs of pGL3-Control-FBW7 3'UTR/mut. (D-E) The effects of miR-103 mimics and inhibitor on FBW7-3'UTR luciferase activity were detected.

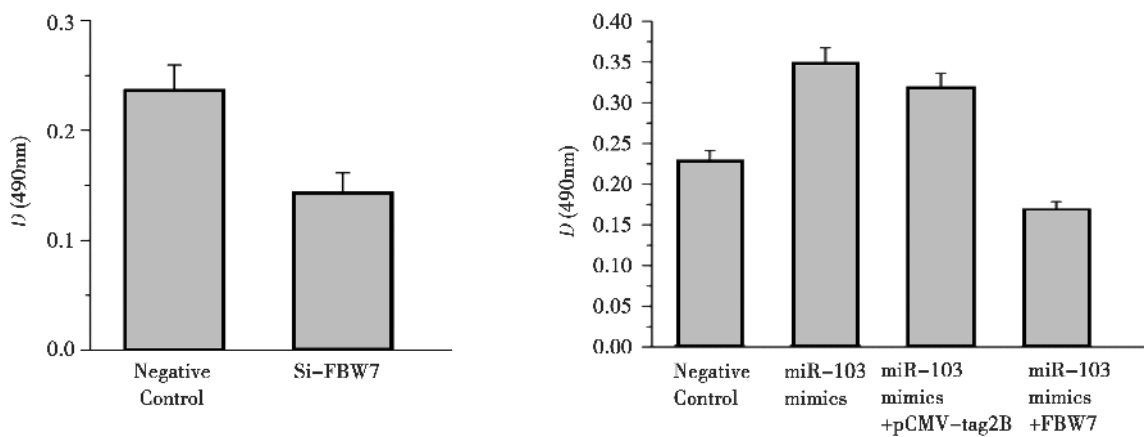


图 5 FBW7 对 HepG2 细胞增殖的影响

Fig.5 The effect of FBW7 on HepG2 cell proliferation was detected

弥漫型胃癌<sup>[13]</sup>。但是 miR-103 在肝癌中的表达情况和作用很少有报道。

在本实验我们发现 miR-103 在肝癌组织和细胞中都高表达,并在肝癌细胞增殖过程中发挥着重要的作用。而 miRNA 发挥作用通常是通过抑制靶基因的翻译或降解靶基因 mRNA 的 3'UTR 来实现的。应用生物信息学软件进行分析,我们发现 miR-103 可能作用于 FBW7 的 3'UTR。实验结果显示,转染 miR-103 mimics 能显著降低 FBW7 的 mRNA 和蛋白水平以及 FBW7-3'UTR 的报告基因活性,但这一作用可以被 miR-103 的抑制剂抵消。如果将 miR-103 的作用位点突变,miR-103 mimics 和 inhibitor 将失去对 FBW7-3'UTR-mut 的调节作用,回补实验发现,FBW7 可以抑制由于转染 miR-103 而引起的细胞增殖作用。所以我们得出一个结论:FBW7 是 miR-103 的一个靶基因,并且 miR-103 可以通过抑制 FBW7 的表达来促进肝癌细胞增殖。

综上所述,miR-103 可以促进肝癌细胞增殖,进一步研究发现 miR-103 可以靶向抑癌基因 FBW7 来促进肝癌细胞增殖。我们的发现进一步证实了 miR-103 可以作为一个癌基因在肝癌的增殖过程中发挥着重要的作用,可以作为一个诊断 marker 来检测肝癌的发生发展。

#### 参考文献

- [1] Wang Z, Inuzuka H, Zhong J, et al. Tumor suppressor functions of FBW7 in cancer development and progression [J]. FEBS Lett, 2012, 586(10): 1409-1418.
- [2] Mendell JT, Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease [J]. Cell, 2012, 148(6): 1172-1187.
- [3] Song JH, Meltzer SJ. MicroRNAs in pathogenesis, diagnosis, and treatment of gastroesophageal cancers [J]. Gastroenterology, 2012, 143(1): 35-47. e2.
- [4] Xiao C, Rajewsky K. MicroRNA control in the immune system: basic principles [J]. Cell, 2009, 136(1): 26-36.
- [5] Sun CY, She XM, Qin Y, et al. miR-15a and miR-16 affect the angiogenesis of multiple myeloma by targeting VEGF [J]. Carcinogenesis, 2013, 34(2): 426-435.
- [6] 徐福强,杨莹,张晓东,等. 癌蛋白 HBXIP 对卵巢癌细胞增殖功能的影响 [J]. 解放军医学杂志, 2013, 38(9): 27-30.  
Xu FQ, Yang Y, Zang XD, et al. Effect of oncoprotein HBXIP on the proliferation of ovarian cancer cells [J]. Med J Chin PLA, 2013, 38(9): 27-30.
- [7] Akhond S, Sun D, von der Lehr N, et al. FBXW7/hCDC4 is a general tumor suppressor in human cancer [J]. Cancer Res, 2007, 67(19): 9006-9012.
- [8] Yokobori T, Mimori K, Iwatsuki M, et al. p53-Altered FBXW7 expression determines poor prognosis in gastric cancer cases [J]. Cancer Res, 2009, 69(9): 3788-3794.
- [9] Xu Y, Sengupta T, Kukreja L, et al. MicroRNA-223 regulates cyclin E activity by modulating expression of F-box and WD-40 domain protein 7 [J]. J Biol Chem, 2010, 285(45): 34439-34446.
- [10] Annibali D, Gioia U, Savino M, et al. A new module in neural differentiation control: two microRNAs upregulated by retinoic acid, mir-9 and -103, target the differentiation inhibitor ID2 [J]. PLoS One, 2012, 7(7): e40269.
- [11] Yu DQ, Zhou HJ, Xun QY, et al. MicroRNA-103 regulates the growth and invasion of endometrial cancer cells through the downregulation of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 [J]. Oncol Letters, 2012, 3(6): 1221-1226.
- [12] Chen Z, Lai TC, Jan YH, et al. Hypoxia-responsive miRNA target argonaute 1 to promote angiogenesis [J]. J Clin Invest, 2013, 123(3): 1057-1067.
- [13] Rotkrue P, Shimada S, Mogushi K, et al. Circulating microRNAs as biomarkers for early detection of diffuse-type gastric cancer using a mouse model [J]. Br J Cancer, 2013, 108(4): 932-940.

(编辑 孙慧兰)