



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.01.011  
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2018.01.011  
Chinese Journal of General Surgery, 2018, 27(1):68-74.

· 基础研究 ·

## 上调 miR-449a 表达对肝癌细胞生长和侵袭能力的影响

邓雪松<sup>1</sup>, 潘红艳<sup>2</sup>, 成俊<sup>1</sup>, 卢贵余<sup>1</sup>, 詹勇强<sup>1</sup>, 倪勇<sup>1</sup>, 王成友<sup>1</sup>

(1. 深圳大学第一附属医院 / 深圳市第二人民医院 肝胆外科, 广东 深圳 518035; 2. 深圳市南山区人民医院 消化内科, 广东 深圳 518052)

### 摘要

**目的:** 探讨 miR-449a 在肝癌 (HCC) 细胞中的表达及其对 HCC 细胞生物学行为的影响。

**方法:** 用 qRT-PCR 检测 miR-449a 在正常肝细胞 L02 和 4 种 HCC 细胞株 (HepG2、Hep3B、SMMC-7721 和 Bel-7402) 的表达。用脂质体法将 miR-449a 模拟物或阴性对照序列转染 HCC 细胞后, 分别用 CCK-8 法、流式细胞术、Transwell 小室实验检测细胞增殖、细胞周期、侵袭能力的变化, 并观察以上两种不同转染的 HCC 细胞在裸鼠体内的成瘤情况。

**结果:** miR-449a 在 4 种 HCC 细胞株的表达水平均明显低于 L02 细胞 (均  $P < 0.05$ ), 其中在 Bel-7402 细胞表达的水平最低。与转染阴性对照序列的 Bel-7402 细胞比较, 转染 miR-449a 模拟物的 Bel-7402 细胞增殖活性明显降低、G<sub>1</sub>/S 期阻滞明显增加、穿室细胞数明显减少 (均  $P < 0.05$ ); 与转染阴性对照序列的 Bel-7402 细胞比较, 转染 miR-449a 模拟物的 Bel-7402 细胞在裸鼠体内成瘤后的移植瘤质量与体积均明显减小 (0.748 g vs. 1.234 g; 33.667 mm<sup>3</sup> vs. 1400.500 mm<sup>3</sup>, 均  $P < 0.05$ )。

**结论:** HCC 细胞中 miR-449a 表达降低, 上调 miR-449a 表达可以抑制 HCC 细胞在体内外的生长。

### 关键词

癌, 肝细胞; 微 RNAs; 细胞增殖; 肿瘤移植; 小鼠, 裸

中图分类号: R735.7

## Expression and action of miR-449a in hepatocellular carcinoma cells

DENG Xuesong<sup>1</sup>, PAN Hongyan<sup>2</sup>, CHENG Jun<sup>1</sup>, LU Guiyu<sup>1</sup>, ZHAN Yongqiang<sup>1</sup>, NI Yong<sup>1</sup>, WANG Chengyou<sup>1</sup>

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital of Shenzhen University/the Second People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen Guangdong 518035, China; 2. Department of Gastroenterology, Nanshan People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen Guangdong 518052, China)

### Abstract

**Objective:** To investigate the miR-449a expression in hepatocellular carcinoma (HCC) cells and its effect on biological behaviors of HCC cells.

**Methods:** The miR-449a expressions in normal hepatic L02 cells and 4 types of HCC lines (HepG2, Hep3B, SMMC-7721 and Bel-7402) were determined by qRT-PCR method. HCC cells were transfected with miR-449a mimics or scrambled sequences via lipofection, and then, the changes in cell proliferation, cell cycle and invasion ability were detected by CCK-8 assay, flow cytometry and Transwell assay respectively; moreover, the tumor

**基金项目:** 广东省医学科研基金资助项目 (A2017338); 广东省科学技术厅科技计划科研基金资助项目 (2014A020212701); 深圳市卫生计生系统科研项目 (201401015); 深圳市第二人民医院临床研究项目 (20173357201806)。

**收稿日期:** 2017-08-03; **修订日期:** 2017-12-16。

**作者简介:** 邓雪松, 深圳大学第一附属医院 / 深圳市第二人民医院副主任医师, 主要从事肝癌分子生物学行为方面的研究。

**通信作者:** 倪勇, Email: szniyong@qq.com

formations of the HCC cells with above transfections in nude mice were observed.

**Results:** The miR-449a expression levels in the 4 HCC cells were all significantly lower than those in L02 cells (all  $P < 0.05$ ), and showed the lowest level in Bel-7402 cells. Compared with Bel-7402 cells transfected with scrambled sequences, the proliferative activity was significantly inhibited,  $G_1/S$  phase arrest was significantly increased, and the number of migrating cells was significantly decreased in Bel-7402 cells transfected with miR-449a mimics (all  $P < 0.05$ ). The weight and volume of xenografts derived from Bel-7402 cells transfected with miR-449a mimics in nude mice were all decreased compared with those derived from Bel-7402 cells transfected with scrambled sequences (0.748 g vs. 1.234 g; 33.667 mm<sup>3</sup> vs. 1400.500 mm<sup>3</sup>, both  $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** The miR-449a expression is decreased in HCC cells, and up-regulating miR-449a expression can suppress the growth of HCC cells in vivo and in vitro.

## Key words

Carcinoma, Hepatocellular; MicroRNAs; Cell Proliferation; Neoplasm Transplantation; Mice, Nude

**CLC number:** R735.7

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 属于高度恶性肿瘤, 是我国癌症中的第二号杀手, 严重威胁国人健康, 并且造成巨大的经济和社会负担<sup>[1]</sup>。目前, 随着肝切除技术的不断进步和多种治疗手段日益完善<sup>[2-4]</sup>, HCC疗效有了跨越性的进步, 但是远期存活率并没有显著提高, 其重要的原因是HCC自身的分子生物学行为容易导致术后的复发与转移<sup>[5-7]</sup>。新近研究<sup>[8]</sup>表明, HCC癌组织中异常表达的miR-449a与术后肿瘤复发、转移密切相关, 是导致患者不良预后的重要因素之一。然而, 关于miR-449a如何影响HCC分子生物学行为, 调控HCC发生发展的病理过程, 目前鲜有研究报道。为此, 本研究采用脂质体转染技术, 诱导HCC细胞miR-449a表达上调, 进行体外细胞功能学实验和体内成瘤实验, 探讨上调miR-449a表达对HCC细胞生长和侵袭能力的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞株与细胞培养

永生系肝细胞L02, HCC细胞株HepG2、Hep3B、SMMC-7721和Bel-7402, 均购自中国科学院上海细胞库, L02采用含10%FBS的RPMI 1640培养基进行培养, HCC细胞株采用含10%FBS的DMEM培养基进行培养。细胞单层贴壁, 密度达90%, 进行细胞传代。

### 1.2 实验裸鼠

3~4周龄雌性BALB/c裸鼠购自中国科学院上海实验动物中心。

### 1.3 细胞冻存与复苏

收集对数生长期细胞, 胰酶消化, 500 r/min离

心5 min, 沉淀的细胞重新悬浮于冻存液 (5 × 10<sup>6</sup>细胞: 0.5 mL冻存液), 加入冻存管中, 每管1.0 mL, 放至程序降温盒中置于-80 °C冰箱, 48 h后移入液氮中保存。液氮罐取出冻存管, 立即置入37 °C水浴中, 待完全解冻后, 细胞悬液移至15 mL的离心管中, 并加入新鲜培养基5 mL, 500 r/min离心5 min, 弃上清, 将细胞重新悬浮于1 mL新鲜培养液并移至细胞培养瓶, 37 °C、5%CO<sub>2</sub>中培养。

### 1.4 主要仪器与试剂

低温高速离心机 (德国Eppendorf公司); -80 °C低温冰箱 (日本Sanyo公司); 960型号酶标仪 (日本Meter Tech公司); LightCycler<sup>®</sup>480 II System、荧光定量PCR专用96孔板 (瑞士Roche公司); 流式细胞仪 (美国Beckman Coulter公司); Transwell小室 (美国Millipore公司); TRIzol细胞裂解液、Lipofectamine 2000转染试剂盒 (美国Invitrogen公司); miScript II RT试剂盒、miScript SYBR Green PCR试剂盒、Hs-miR-449-1 miScript引物和Hs-RNU6-2-11 miScript引物 (德国Qiagen公司); DMEM、RPMI 1640、FBS和胰蛋白酶消化液 (美国Gibco公司); CCK-8细胞活性检测试剂盒 (日本Dojindo公司); 细胞凋亡检测试剂盒、Matrigel胶 (美国BD公司)。

### 1.5 主要方法

**1.5.1 qRT-PCR 检测 miR-449a 表达** TRIzol 裂解提取总 RNA (包含 miRNA), 使用核酸蛋白测定仪以吸光度法测量 RNA 浓度, 按照 miScript II 试剂盒说明书配成 20 μL 反应体系进行逆转录 cDNA, 根据 miScript SYBR 试剂盒说明书配制 20 μL 反应体系进行实时定量 PCR, 通过荧光定量

PCR 获取 Ct 值 (threshold cycle number, 阈值循环数), 采用 U6 作为内参照。计算基因相对表达量用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示, 该数值表示目的基因的表达式相对于对照样品表达量的位数。每个样品设定 3 个复孔, 进行 3 次实验, 计算各样本的平均 Ct 值和  $\Delta Ct$ , 并由此计算  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{目的} - \Delta Ct_{对照}$ 。

**1.5.2 细胞转染** siRNA 由上海吉玛公司设计、合成 (has miR-449a 模拟物正义链: 5'-UGG CAG UGU AUU GUU AGC UGG U-3', 反义链: 5'-CAG CUA ACA AUA CAC UGC AAU U-3'; 阴性对照正义链: 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3', 反义链: 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3')。转染前 1 d,  $5 \times 10^5$  细胞/孔接种于 6 孔板, 每孔加入 2 mL 含 10%FBS 的 DMEM 培养基, 在 24 h 内使每孔细胞密度达到 70%~90%; 转染当天, 弃培养液, PBS 清洗细胞 2 次, 每孔加入 1.5 mL 无血清 DMEM 培养液。混匀 Lipofectamin 2000 试剂: 取 2 个 1.5 mL EP 管, 均加入 250  $\mu$ L 无血清 DMEM 培养液, 其中 1 管加入 10  $\mu$ L Lipofectamin 2000 试剂, 轻轻混匀, 室温放置 5 min; 另 1 管加入 5  $\mu$ L 浓度为 20  $\mu$ M has miR-449a mimic (或 mimic-NC); 将 2 管液体混合, 轻柔混匀, 室温放置 20 min, 形成复合物。将 500  $\mu$ L 复合物加到含有细胞和培养基的 6 孔板中, 摇晃并混匀, 放入 5%CO<sub>2</sub>、37  $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 6 h, 移液器吸除含 Lipofectamin 2000 复合物的培养基, 重新加入 10%FBS 的 DMEM 培养基继续培养 48 h。

**1.5.3 CCK-8 方法检测细胞的增殖** 选取对数生长期的细胞接种于 96 孔板, 每孔加入  $1 \times 10^4$  个细胞悬液, 设 6 个平行孔, 重复 3 次, 分别于 24、48、72 h 后取出培养板, 吸尽原培养液, 加入培养液与 CCK-8 按 1:9 混合的反应液, 每孔加入 200  $\mu$ L, 并设置 6 个单纯检测液的培养孔作为空白对照, 继续 37  $^{\circ}$ C 培养箱内孵育 1~2 h, 取出培养板采用酶标仪于 450 nm 处检测各孔吸光度值 (OD 值), 每孔实测 OD 值减去空白对照 OD 值, 取 3 次实验的平均值, 记录为  $A_{450}$  值, 并绘制细胞生长曲线。

**1.5.4 流式细胞仪检测细胞周期** 细胞经胰酶消化后收集至离心管中, PBS 洗涤 2 次, 用 70% 乙醇重悬放置 -20  $^{\circ}$ C 冰箱固定过夜, 离心, 去上清, PBS 洗涤 2 次, 加入 DNA Prep 染色剂, 染色 30 min 后上机检测细胞周期。

**1.5.5 Transwell 小室实验检测细胞的侵袭能力** 将 20  $\mu$ L Matrigel (原液为 9 mg/mL, 用无血清 DMEM 培养液按 1:9 稀释) 涂抹于 Transwell 小室

内表面, 将小室放入 24 孔板中, 于 37  $^{\circ}$ C 培养箱中放置 30 min, 制备 Matrigel 凝胶; 吸取 200  $\mu$ L 含总量为  $4.8 \times 10^4$  个细胞的细胞悬液, 均匀滴加于 Transwell 小室内; 24 孔板内分别加入 600  $\mu$ L/孔含 20%FBS 的 DMEM 培养基并将小室浸入其中; 继续培养 48、72 h 后取出小室, 置于甲醇中固定 15 min; 弃去固定液, 加适量 0.1% 结晶紫染色 20 min; PBS 漂洗 3 次, 用棉签擦尽小室内的凝胶和未穿透凝胶的细胞; 切膜, 放置载玻片上进行封片; 高倍镜下随机选取 5 个视野进行细胞计数 (每高倍视野, HPF) 及拍照。

**1.5.6 建立皮下种植瘤的裸鼠模型** 取对数生长期成功转染的 Bel-7402 细胞 (miR-449a 模拟物转染和阴性对照序列转染), 经胰酶消化, PBS 洗涤 2 次, 计数并调整细胞浓度  $2.5 \times 10^7$ /mL, 以 0.4 mL ( $1 \times 10^7$  细胞/只) 接种于裸鼠右前肢腋窝皮下, 分别记为 miR-449a 模拟物组和阴性对照组, 每组接种 6 只; 观察皮下成瘤情况, 皮下成瘤 28 d 后, 处死裸鼠, 切除并取出种植瘤, 电子天秤称重 (g), 游标卡尺测量瘤体长度 (L)、宽度 (W), 按  $L \times W^2/2$  计算瘤体近似体积 ( $\text{mm}^3$ )。

## 1.6 统计学处理

实验结果以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 进行表示, 采用 SPSS 20.0 统计软件以 *t* 检验进行统计分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-449a 在 Bel-7402 细胞表达的水平最低

检测 miR-449a 在永生系肝细胞 L02 和 4 种具有不同复发转移潜能 HCC 细胞株 HepG2、SMC-7721、Hep3B 和 Bel-7402 的表达水平, 以 L02 作为参照, 上述 5 种细胞株 miR-449a 的相对表达水平依次为:  $1.0 \pm 0.0$ 、 $0.76 \pm 0.09$ 、 $0.48 \pm 0.11$ 、 $0.41 \pm 0.09$ 、 $0.28 \pm 0.05$ 。实验结果表明, miR-449a 在 HCC 细胞株的表达水平均明显低于 L02 细胞 (均  $P < 0.05$ ) (图 1), 其中 HCC 细胞株 Bel-7402 的 miR-449a 表达水平最低。为此, 实验选取 Bel-7402 细胞作为进一步研究的对象。

### 2.2 miR-449a 表达上调的 Bel-7402 细胞制备情况

Lipofectamine 2000 介导 miR-449a 模拟物 (miR-449a 模拟物组) 和阴性对照序列 (阴性对照组) 转染 Bel-7402 细胞。qRT-PCR 检测结果表明 miR-449a 模拟物组细胞 miR-449a 表达水平明显高于阴性对照组细胞 ( $P < 0.001$ ) (图 2)。

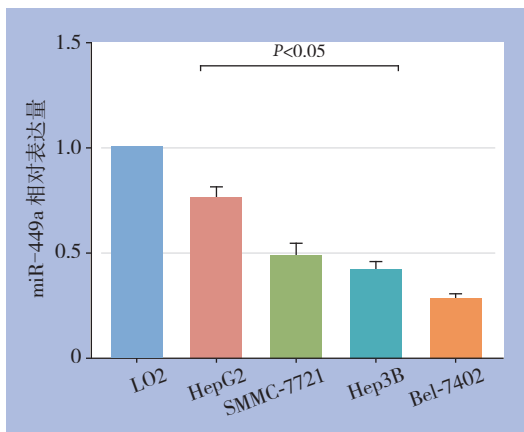


图 1 各组细胞株 miR-449a 的表达水平

Figure 1 Expression levels of miR-449a in each studied cell line

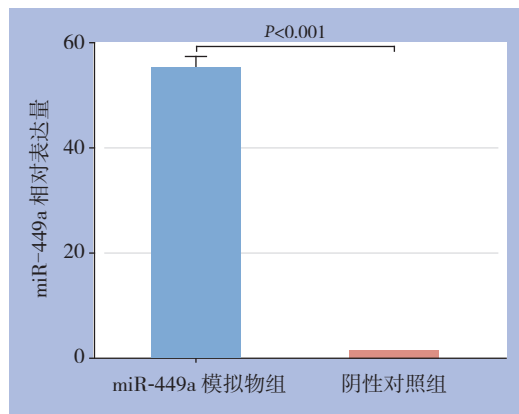


图 2 不同转染 Bel-7402 细胞 miR-449a 的表达水平比较

Figure 2 Comparison of miR-449a expression levels in Bel-7402 cells with different transfections

### 2.3 上调 miR-449a 表达对 Bel-7402 细胞增殖活性的影响

CCK-8 检测结果表明, miR-449a 模拟物组在转染 24、48、72 h 的增殖活性 ( $A_{450}$  值) 分别为

$0.226 \pm 0.150$ 、 $0.279 \pm 0.017$ 、 $0.371 \pm 0.012$ , 均明显低于阴性对照组细胞相应时间点  $A_{450}$  值 ( $0.338 \pm 0.016$ 、 $0.411 \pm 0.019$ 、 $0.465 \pm 0.014$ ) (均  $P < 0.001$ ) (图 3)。

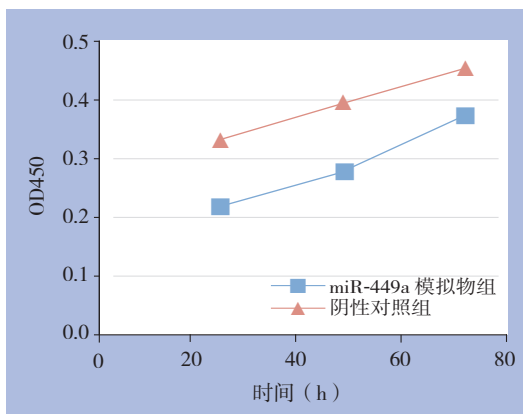
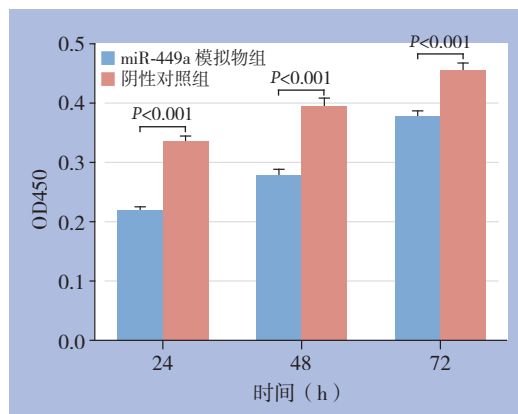


图 3 miR-449a 高表达对 Bel-7402 细胞增殖的影响

Figure 3 Influence of miR-449a overexpression on proliferation of Bel-7402 cells



### 2.4 上调 miR-449a 表达能够阻滞 Bel-7402 细胞生长周期的转换

流式细胞仪检测结果表明, miR-449a 模

拟物组细胞处于  $G_1$  期的比例明显高于阴性对照组 [ $(69.20 \pm 0.61) \%$  vs.  $(58.68 \pm 0.78) \%$ ,  $P < 0.001$ ] (图 4)。

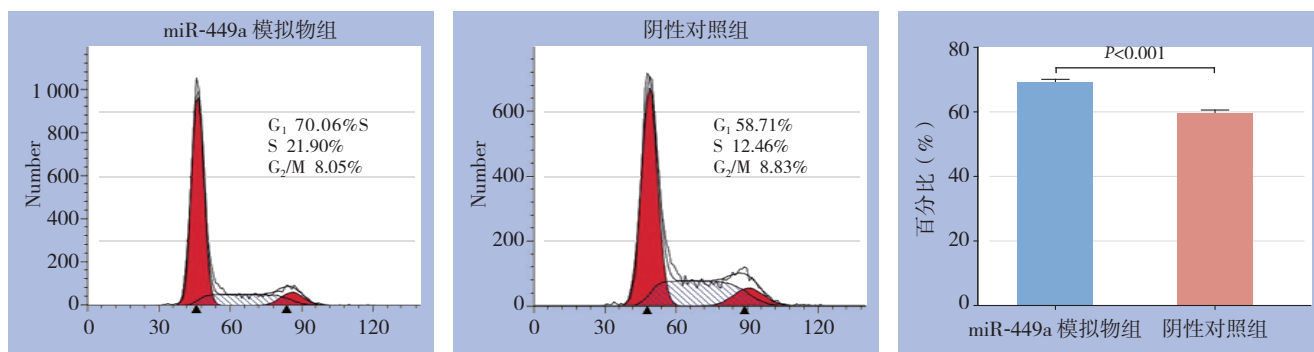


图 4 miR-449a 高表达对 Bel-7402 细胞  $G_1/S$  期转换的影响

Figure 4 Influence of miR-449a overexpression on  $G_1/S$  switch in Bel-7402 cells



## 2.5 上调 miR-449a 表达对 Bel-7402 细胞体外侵袭能力的影响

侵袭实验结果表明, miR-449a 模拟物组细胞

穿过 Transwell 小室的细胞数明显少于阴性对照组 [ ( 396.67 ± 15.28 ) /HPF vs. ( 723.33 ± 32.15 ) /HPF,  $P < 0.001$  ] ( 图 5 ) 。

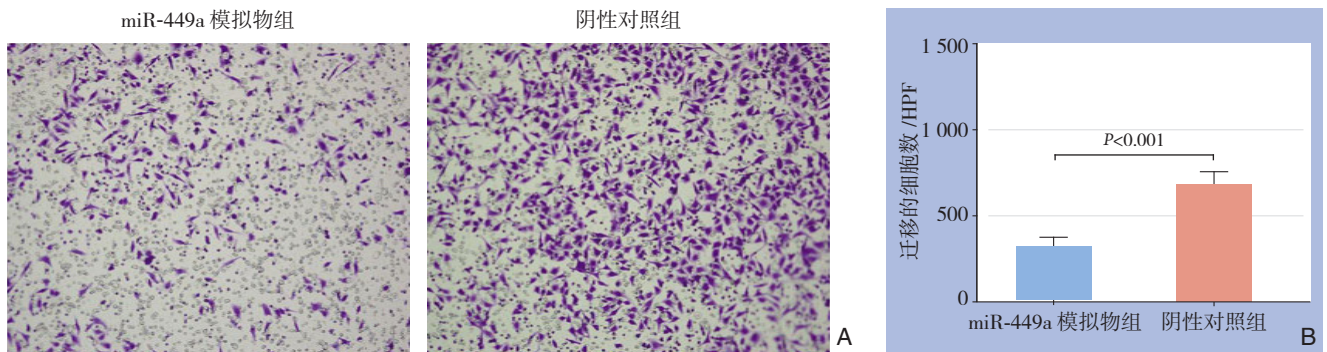


图 5 miR-449a 高表达对 Bel-7402 细胞侵袭能力的影响 ( × 200 )

Figure 5 Influence of miR-449a overexpression on invasion ability in Bel-7402 cells ( × 200 )

## 2.6 上调 miR-449a 表达对 Bel-7402 细胞体内成瘤能力的影响

采用皮下注射肿瘤细胞的方法, 成功建立皮下种植瘤的裸鼠模型 ( 图 6 ) 。实验结果表明, miR-449a 模拟物组移植后瘤体的质量明显低于

阴性对照组 [ ( 0.748 ± 0.408 ) g vs. ( 1.234 ± 0.134 ) g,  $P < 0.05$  ], 瘤体的体积也明显小于阴性对照组 [ ( 733.667 ± 340.100 ) mm<sup>3</sup> vs. ( 1 400.500 ± 88.245 ) mm<sup>3</sup>,  $P < 0.001$  ] ( 图 7 ) 。

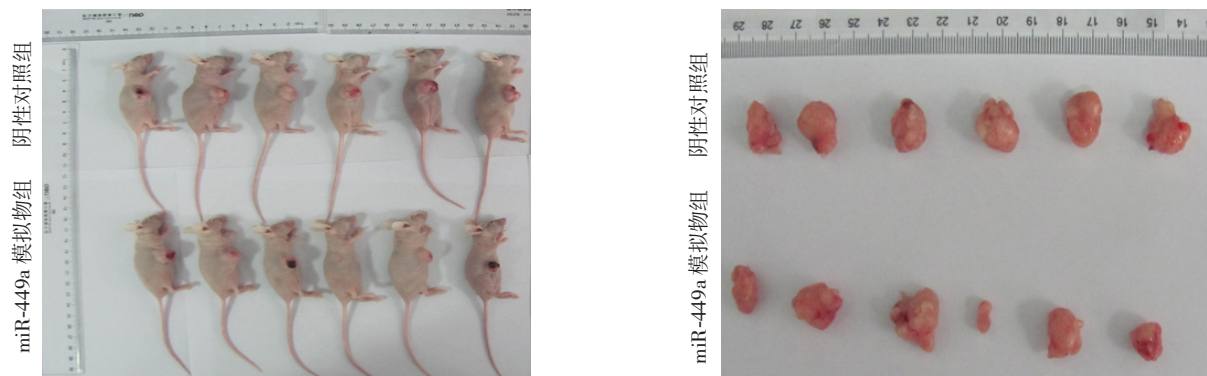


图 6 裸鼠成瘤情况

Figure 6 Tumor formation in the nude mice

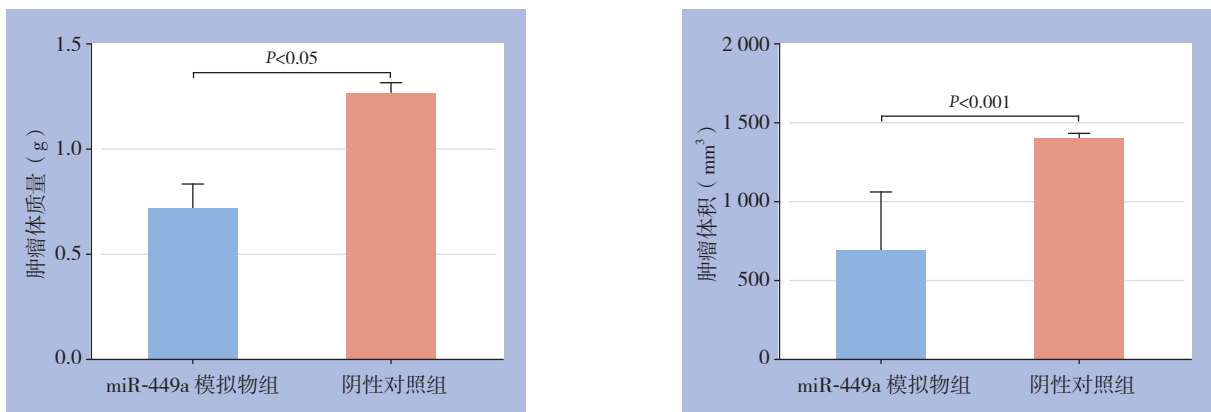


图 7 两组移植瘤质量与体积的比较

Figure 7 Comparison of the weight and volume of xenografts between the two groups

### 3 讨论

近年来,大量的研究<sup>[9-11]</sup>证实miRNA在HCC病理过程中表现癌基因或抑癌基因的作用,调控HCC细胞的生长<sup>[12]</sup>、分化<sup>[13]</sup>、凋亡<sup>[14]</sup>、血管生成<sup>[15]</sup>以及侵袭转移<sup>[16-18]</sup>等分子生物行为。miR-96<sup>[19]</sup>、miR-182<sup>[19]</sup>、miR-210<sup>[20]</sup>和miR-3127<sup>[21]</sup>在HCC癌组织的表达上调,可以通过逃避或削弱相关抑癌基因或抑癌因子的调控,发挥癌基因的作用,促进肿瘤细胞的增殖、侵袭和成瘤能力。我们研究团队前期实验表明,在HCC癌组织和细胞株中miR-34a<sup>[22]</sup>、miR-145<sup>[23]</sup>表达下调,其抑癌效应被削弱,进而导致HCC细胞的增殖、生长和侵袭能力的增强。最近的研究<sup>[8]</sup>表明,HCC癌组织中miR-449a异常表达参与了HCC发生发展的过程,其对HCC分子生物行为的调控作用也逐渐得到了关注。为研究miR-449a异常表达对HCC分子生物行为的影响,本实验首先检测了miR-449a在肝细胞L02和4种HCC细胞株HepG2、Hep3B、SMC-7721、Bel-7402的表达水平,结果表明miR-449a在HCC细胞株的表达水平均显著低于L02细胞,其中HCC细胞株Bel-7402的miR-449a表达水平最低。为此,本实验选取Bel-7402细胞作为进一步研究的对象。本研究采用脂质体转染技术,诱导Bel-7402细胞miR-449a表达水平改变,成功上调miR-449a的表达。进一步体外细胞功能实验表明,上调miR-449a表达能够抑制Bel-7402细胞的增殖、阻滞细胞G<sub>1</sub>/S期的转换和减弱细胞的侵袭能力,提示改变miR-449a表达水平对HCC细胞的分子生物行为具有调控作用。

成瘤作用是HCC细胞恶性生物行为的一个重要特性,反映了肿瘤细胞的生长和侵袭能力<sup>[24-26]</sup>。为验证miR-449a在体内是否具有调控HCC生长的效应,本研究进行体内胞实验,采用转染miR-449a模拟物的Bel-7402细胞和阴性对照序列的Bel-7402细胞对裸鼠进行皮下注射,成功制备种植瘤的裸鼠模型。实验结果显示,miR-449a模拟物组肿瘤的平均质量和体积均显著低于阴性对照组,表明上调miR-449a表达能够抑制Bel-7402细胞体内成瘤的能力,提示miR-449a在体内具有抑制肿瘤生长的效应。

综上所述,本研究表明miR-449a在HCC细胞株呈现表达下调,通过上调miR-449a在Bel-7402细胞的表达水平,能够抑制细胞的增殖活性、阻

滞细胞周期G<sub>1</sub>/S期的转换、减弱细胞的体外侵袭能力和体内成瘤能力。因此,下一步将深入探讨miR-449a作用的靶基因,以及相关癌信号通路重要功能蛋白的表达和活性的改变有关,进一步阐明miR-449a调控HCC分子生物行为的具体机制,寻求能有效干预HCC无限制生长和高度侵袭转移的分子策略。

### 参考文献

- [1] 陈万青,郑荣寿,张思维,等. 2012年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2016, 25(1):1-8. doi:10.11735/j.issn.1004-0242.2016.01.A001.  
Chen WQ, Zheng RS, Zhang SW, et al. Report of Cancer Incidence and Mortality in China, 2012[J]. China Cancer, 2016, 25(1):1-8. doi:10.11735/j.issn.1004-0242.2016.01.A001.
- [2] 王志明,周乐杜,吕新生,等. 原发性肝癌治疗方法的选择:附265例报告[J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13(12):908-911.  
Wang ZM, Zhou LD, Lu XS, et al. The selection of treatment modalities for primary liver cancer:a report of 265 cases[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2004, 13(12):908-911.
- [3] 中华外科学会肝脏外科学组. 原发性肝癌外科治疗方法的选择[J]. 中国普通外科杂志, 2001, 10(2):99-101.  
Liver Surgery Group of Chinese Surgery Association. Selection of surgical treatment of primary hepatic cancer[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2001, 10(2):99-101.
- [4] 戴卫东,胡继雄,苗雄鹰,等. 腹腔镜一期开腹二期ALPPS治疗巨块型肝癌的疗效分析[J]. 中国普通外科杂志, 2017, 26(8):1042-1048. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.08.013.  
Dai WD, Hu JX, Miao XY, et al. Efficacy of laparoscopic first stage and open second stage ALPPS for huge hepatocellular carcinoma[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2017, 26(8):1042-1048. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.08.013.
- [5] Oliveri RS, Wetterslev J, Gluud C. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet, 2012, 380(9840):470-471. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61285-9.
- [6] Díaz-González Á, Forner A. Surveillance for hepatocellular carcinoma [J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2016, 30(6):1001-1010. doi: 10.1016/j.bpg.2016.10.006.
- [7] 蔡云峰,苏树英,甄作均. 肝癌组织c-met表达与肝癌术后预后的关系[J]. 中国普通外科杂志, 2013, 22(12):1580-1584. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2013.12.011.  
Cai YF, Su SY, Zhen ZJ. Relationship between c-met expression level and postoperative prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2013, 22(12):1580-1584. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2013.12.011.

- [8] Chen SP, Liu BX, Xu J, et al. MiR-449a suppresses the epithelial-mesenchymal transition and metastasis of hepatocellular carcinoma by multiple targets[J]. BMC Cancer, 2015, 15:706. doi: 10.1186/s12885-015-1738-3.
- [9] Callegari E, Elamin BK, Sabbioni S, et al. Role of microRNAs in hepatocellular carcinoma: a clinical perspective[J]. Onco Targets Ther, 2013, 6:1167-1178. doi: 10.2147/OTT.S36161.
- [10] 周密, 汤成泳, 张国庆, 等. 上调miR-101对肝细胞癌生物学行为的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(7):963-969. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.07.009.  
Zhou M, Tang CY, Zhang GQ, et al. Impact of upregulating miR-101 on biological behavior of hepatocellular carcinoma[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(7):963-969. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.07.009.
- [11] Xu J, Li J, Zheng TH, et al. MicroRNAs in the Occurrence and Development of Primary Hepatocellular Carcinoma[J]. Adv Clin Exp Med, 2016, 25(5):971-975. doi: 10.17219/acem/36460.
- [12] Lin J, Huang S, Wu S, et al. MicroRNA-423 promotes cell growth and regulates G(1)/S transition by targeting p21Cip1/Waf1 in hepatocellular carcinoma[J]. Carcinogenesis, 2011, 32(11):1641-1647. doi: 10.1093/carcin/bgr199.
- [13] 张立, 张迪, 李孝彬, 等. microRNA-616在肝癌中的表达及临床意义[J]. 中国普通外科杂志, 2016, 25(7):991-997. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.07.010.  
Zhang L, Zhang D, Li XB, et al. Expression of microRNA-616 in hepatocellular carcinoma and its clinical significance[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(7):991-997. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.07.010.
- [14] Xu J, Zhu X, Wu L, et al. MicroRNA-122 suppresses cell proliferation and induces cell apoptosis in hepatocellular carcinoma by directly targeting Wnt/ $\beta$ -catenin pathway[J]. Liver Int, 2012, 32(5):752-760. doi: 10.1111/j.1478-3231.2011.02750.x.
- [15] Yang X, Zhang XF, Lu X, et al. MicroRNA-26a suppresses angiogenesis in human hepatocellular carcinoma by targeting hepatocyte growth factor-cMet pathway[J]. Hepatology, 2014, 59(5):1874-1885. doi: 10.1002/hep.26941.
- [16] Li N, Fu H, Tie Y, et al. miR-34a inhibits migration and invasion by down-regulation of c-Met expression in human hepatocellular carcinoma cells[J]. Cancer Lett, 2009, 275(1):44-53. doi: 10.1016/j.canlet.2008.09.035.
- [17] Yang XW, Zhang LJ, Huang XH, et al. miR-145 suppresses cell invasion in hepatocellular carcinoma cells: miR-145 targets ADAM17[J]. Hepatol Res, 2014, 44(5):551-559. doi: 10.1111/hepr.12152.
- [18] 梁治坤, 程凡天, 胡走肖, 等. miR-150-5p抑制肝癌细胞的迁移和侵袭及其机制[J]. 中国普通外科杂志, 2016, 25(8):1175-1179. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.08.015.  
Liang ZK, Cheng FT, Hu ZX, et al. Inhibitory effect of miR-150-5p on migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells and its mechanism[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(8):1175-1179. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.08.015.
- [19] Wang TH, Yeh CT, Ho JY, et al. OncomiR miR-96 and miR-182 promote cell proliferation and invasion through targeting ephrinA5 in hepatocellular carcinoma[J]. Mol Carcinog, 2016, 55(4):366-375. doi: 10.1002/mc.22286.
- [20] Ying Q, Liang L, Guo W, et al. Hypoxia-inducible microRNA-210 augments the metastatic potential of tumor cells by targeting vacuole membrane protein 1 in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2011, 54(6):2064-2075. doi: 10.1002/hep.24614.
- [21] Jiang J, Zhang Y, Guo Y, et al. MicroRNA-3127 promotes cell proliferation and tumorigenicity in hepatocellular carcinoma by disrupting of PI3K/AKT negative regulation[J]. Oncotarget, 2015, 6(8):6359-6372.
- [22] Cheng J, Zhou L, Xie QF, et al. The impact of miR-34a on protein output in hepatocellular carcinoma HepG2 cells[J]. Proteomics, 2010, 10(8):1557-1572. doi: 10.1002/pmic.200900646.
- [23] Wang Y, Hu C, Cheng J, et al. MicroRNA-145 suppresses hepatocellular carcinoma by targeting IRS1 and its downstream Akt signaling[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 446(4):1255-1260. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.03.107.
- [24] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011, 144(5):646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [25] Li Y, Kowdley KV. Cellular microRNA and the tumorigenesis of hepatocellular carcinoma[J]. Ann Hepatol, 2012, 11(2):272-274.
- [26] 阮柏, 刘杰, 窦科峰. 肝脏干细胞恶性转化的研究进展[J]. 国际外科学杂志, 2013, 40(1):42-46. doi:10.3760/cma.j.issn.1673-4203.2013.01.014.  
Ruan B, Liu J, Du KF. Progress on malignant transformation of hepatic stem cells[J]. International Journal of Surgery, 2013, 40(1):42-46. doi:10.3760/cma.j.issn.1673-4203.2013.01.014.

( 本文编辑 宋涛 )

本文引用格式: 邓雪松, 潘红艳, 成俊, 等. 上调miR-449a表达对肝癌细胞生长和侵袭能力的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2018, 27(1):68-74. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.01.011

Cite this article as: Deng XS, Pan HY, Cheng J, et al. Influence of upregulating miR-449a expression on growth and invasion abilities in hepatocellular carcinoma cells[J]. Chin J Gen Surg, 2018, 27(1):68-74. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.01.011