· 临床基础 ·

微小 RNA-3682-3p 通过下调 GAS8 基因促进肝癌细胞迁移、侵袭的研究

王 亮，姚博文，陈天翔，殷国志*
西安交通大学第一附属医院 肝胆外科，陕西 西安 710061

摘 要：目的 探讨肝细胞癌中 miR-3682-3p 的表达情况、临床意义和作用机制。**方法** 待实验所需肝癌细胞、正常肝细胞（L02）培养与转染后，采用实时定量 PCR（qPCR）检测 miR-3682-3p 在肝癌组织、癌旁组织、L02 细胞和肝癌细胞系中的表达情况，利用 TCGA 数据库分析正常肝组织、肝癌组织中 miR-3682-3p 的表达差异，分析 miR-3682-3p 的表达与肝癌患者临床病理特征、预后的关系；通过 Transwell 实验评价细胞侵袭、迁移能力；通过 TargetScan 数据库预测获得下游靶基因，采用 qPCR、Western blotting 法分析 miR-3682-3p 对生长抑制特异性基因 8（GAS8）的表达的调控作用，并利用双荧光素酶报告基因实验加以验证。**结果** 与癌旁组织和正常肝细胞比较，miR-3682-3p 在肝癌组织、细胞系中均高表达（$P<0.05$），并与门静脉侵犯、Edmondson 分级、TNM 分期有关；基于 TCGA 数据库数据的生存分析显示，miR-3682-3p 高表达与不良预后相关；在 MHCC97-H 细胞中敲减 miR-3682-3p 显著抑制细胞的侵袭、迁移（$P<0.05$）；通过生物信息学预测加以实验验证证实 GAS8 是 miR-3682-3p 的直接靶基因，并通过回复实验证实 GAS8 介导了 miR-3682-3p 对肝癌细胞侵袭及迁移能力的促进作用。**结论** miR-3682-3p 在肝癌中通过靶向抑制抑癌基因 GAS8 从而促进肝癌细胞侵袭、迁移。

关键词：miR-3682-3p；肝细胞癌；GAS8；迁移；侵袭
中图分类号：R979.1 **文献标志码：**A **文章编号：**1674 - 5515(2019)07 - 2172 - 07
DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.07.053

miR-3682-3p promotes hepatocellular carcinoma cell migration and invasion through by targeting GAS8

WANG Liang, YAO Bo-wen, CHEN Tian-xiang, YIN Guo-zhi
Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

Abstract: Objective To investigate the expression level, clinical significance and mechanisms of miR-3682-3p in human hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** After the HCC cells and normal hepatocytes (L02) were cultured and transfected, Real-time quantitative PCR (qPCR) was used to detect the expression of miR-3682-3p in HCC tissues and paracancerous tissues, L02normal liver cells, and HCC cell lines. TCGA database was used to analyze miR-3682 in normal liver tissues and liver cancer tissues, and expression difference, analysis of the relationship between miR-3682-3p expression and clinicopathological features and prognosis of patients with HCC. Transwell assay was used to evaluate the invasion and migration ability of cells. The target gene was predicted by TargetScan database, and the regulation of GAR8 expression by miR-3682-3p was analyzed by qPCR and Western blotting, and the dual luciferase reporter gene assay was used. **Results** Compared with tumor adjacent tissues or normal hepatic cell, miR-3682-3p was increased in HCC tissue and cell lines ($P < 0.05$). The miR-3682-3p expression was significantly related with the portal vein infiltration, advanced Edmondson degree, and advanced TNM stage. The result of overall survival investigated by TCGA database showed the survival rate in patients with high miR-3682-3p expression was significantly lower than that in those with low miR-3682-3p expression ($P < 0.05$). Knockdown of miR-3682-3p significantly inhibited MHCC97-H cell migration and invasion compared with negative controls ($P < 0.05$). GAS8, as the potential downstream of miR-3682-3p, was validated by luciferase reporter assay. Rescue assay illuminated that GAS8 mediates the effects of miR-3682-3p on migration and invasion of

收稿日期：2019-03-19
基金项目：陕西省自然科学基础研究计划项目（2017JM8002）
作者简介：王 亮（1994—），男，博士，研究方向为肝脏肿瘤。E-mail: wangliangdoctor@sina.com
***通信作者** 殷国志（1983—），男，主治医师，博士，研究方向为肝脏肿瘤。E-mail: yinguozhi2005@126.com

HCC cells. **Conclusion** miR-3682-3p is upregulated in HCC, which promotes HCC cell migration and invasion through by targeting GAS8.

Key words: miR-3682-3p; hepatocellular carcinoma; GAS8; migration; invasion

肝癌是全球癌症原因致死第 3 大肿瘤[1-3]。由于乙肝的流行，中国成为了肝癌的重灾区[4-5]。肝癌的早期转移、高复发率是导致肝癌预后不良的重要原因[6-7]。因此，寻找在肝癌发生发展过程中的关键分子作为治疗靶点尤为重要。微小 RNA（microRNA，miRNA）是一类长度为 20 个核苷酸左右的非编码 RNA，可与靶基因的 3’非翻译区（3’UTR）结合，抑制或降解靶 mRNA，实现对靶基因在转录后水平的调控。大量研究表明，失调的 miRNA 通过调控肿瘤细胞的多种表型（增殖[8]、细胞周期[9]、自噬[10]、侵袭[11]和迁移[12]），从而在肝癌进展中起到重要作用。miR-3682-3p 在肝癌中的表达、作用和机制未见报道。生长抑制特异性基因 8（growth arrest specific gene8，GAS8）在乳腺癌和肝癌病人表达缺失[13]，而且研究证实 GAS8 可抑制肝癌细胞的侵袭和转移[14]。本课题通过检测 miR-3682-3p 在肝癌及其对应癌旁组织中的表达水平，进而分析 miR-3682-3p 的表达与患者临床病理特征、预后的相关性；并通过功能学实验对 miR-3682-3p 功能进行了验证，证实了 miR-3682-3p 在肝癌中通过靶向抑制抑癌基因 GAS8，从而促进肝癌细胞侵袭、转移，为肝癌的治疗提供新靶点。

1 材料与方法

1.1 组织标本和细胞

收集并筛选的 56 对肝癌组织及其对应的癌旁组织来自 2015 年 7 月—2016 年 12 月在西安交通大学第一附属医院肝胆外科接受手术治疗后病理证实为肝癌的患者，对应的癌旁组织为距肿瘤边缘＞2 cm 的肝组织，所有入组的患者均签订了知情同意书，所有入组患者术前均未接受化疗、放疗等其他辅助治疗，所有取得的组织均保存在液氮或多聚甲醛（40 g/L）中。本课题经过西安交通大学第一附属医院伦理委员会审核。正常永生化人肝（L02）细胞和肝癌细胞株 Hep3B、HepG2、SMMC-7721、MHCC97-L、MHCC97-H 均购自中国科学院上海细胞库。

1.2 试剂

抽提 RNA 的 TRIzol 试剂（货号 15596018，200 mL）及转染所用的脂质体（Lipofectamine^{TM} 2000，货号 11668019，1.5 mL）均购自 Invitrogen 公司；miR-3682-3p inhibitors（anti-miR-3682-3p，货号 miR 20018110-1-5，5nmol）和阴性对照序列 （anti-miR-NC，货号 miR2N0000001-1-5，5 nmol）及 miRNA 内参 U6 引物（货号 miRAN0002-1-100，100T）均购自 RiboBio 公司；GAS8 siRNA（si-GAS8，货号 SR301741，2 nmol）和 Negative Control siRNA（si-control，货号 SR30004，2 nmol）购自 OriGene 公司；miRNA 逆转录试剂盒（All-in-One^{TM} miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit）、miRNA qPCR 试剂盒（All-in-One^{TM} miRNA qPCR Kit）均购自 Genecopoeia 公司；胎牛血清（FBS）购自 Gibco 公司；DMEM 购自 Thermo Fisher Scientific 公司；ECL 发光液购自 Milipore 公司；GAS8（货号 ab236386，100 μL）和 β-actin（货号 ab8226，100 μg）抗体从 Abcam 公司购得；BCA 蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司；Matrigel 基质胶购自 BD 公司；RIPA 裂解液（强）购自西安赫特生物科技有限公司；Transwell 小室购自 Becton Dickinson Labware 公司。

1.3 细胞培养

正常永生化人肝 L02 细胞、肝癌细胞均用含 10%胎牛血清、100 IU/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养基中培养。培养箱条件为 5% CO_2、37 ℃。

1.4 转染

细胞接种于 6 孔板中，在细胞汇合度达 60%左右时按照 Lipofectamine^{TM} 2000 说明书以 100 nmol miR-3682-3p inhibitors、阴性对照组加入 6 孔板中，用无双抗含 10% FBS DMEM 培养基培养 6 h 后更换成完全培养基继续培养，48 h 后收取细胞进行转染效率检测和功能学实验。MHCC97-H 细胞接种于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中，置于 5% CO_2、37 ℃的恒温培养箱中培养至对数生长期用于实验。将培养后的 MHCC97-H 细胞铺于 6 孔板中，待细胞长至密度 70%时根据 Lipofectamine^{TM} 2000 说明书转染等量的阴性对照和 GAS8 siRNA，6 h 后换成完全培养基继续培养，培养 48 h 后检测 GAS8 的表达。通过 qPCR 检验转染效率。

1.5 miR-3682-3p 在肝癌中的表达

采用实时定量 PCR（qPCR）检测 miR-3682-3p 在肝癌组织、癌旁组织、L02 细胞和肝癌细胞株（Hep3B、HepG2、SMMC-7721、MHCC97-L、MHCC97-H）中的表达情况。首先，TRIzol 法提取肝癌组织和细胞中 RNA，按照 miRNA 逆转录试剂盒说明书上的步骤进行逆转录操作，按照 miRNA qPCR 试剂盒说明书上的步骤进行 qPCR，分别以 U6、β-actin 为内参，最终通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分别计算肝癌组织、癌旁组织、L02 细胞和肝癌细胞系中 miR-3682-3p 的相对表达量。每个样本重复 3 次。以 miR-3682-3p 在组织中表达的中位表达水平为分界点，将 56 例肝癌组织分为 miR-3682-3p 高表达组（n＝29）和低表达组（n＝27），分析 miR-3682-3p 表达水平与肝癌患者病理特征的关系；TCGA 数据库分析 miR-3682-3p 表达与肝癌患者预后相关性情况。

1.6 敲减 miR-3682-3p 对肝癌细胞侵袭、迁移能力的影响

在 MHCC97-H 细胞中敲减 miR-3682-3p，通过 Transwell 实验来评价细胞侵袭、迁移能力。DMEM 重悬转染 48 h 后的 MHCC97-H 细胞并调整细胞浓度为 1×10^6/mL。进行 Transwell 迁移实验时不铺胶；进行 Transwell 侵袭实验时需要铺基质胶（按 1∶8 稀释 50 mg/L Matrigel）。24 孔板下室加入 600 μL 完全培养基，上室加入各组细胞悬液 200 μL。培养 24 h 后取出小室，用 PBS 溶液清洗 3 次，多聚甲醛（40 g/L）固定 15 min，用结晶紫（1 g/L）染色 20 min 后用 PBS 溶液清洗，最后通过倒置显微镜进行观察计数，每个样本随机选取 8 个视野进行计数，并求其平均数，以此评估细胞的侵袭、迁移能力。每组重复 3 次。

1.7 miR-3682-3p 的直接靶基因的检测

用 TargetScan 数据库（http://www.targetscan.org/）预测 miR-3682-3p 的靶基因，并获得预测价值较高的靶基因 GAS8。利用 Western blotting 试验检测 miR-3682-3p 中靶基因 GAS8 的表达情况。实验所用蛋白均通过 RIPA 裂解液提取，并用 BCA 法进行定量。蛋白经 SDS-PAGE 电泳（上样量 40 μg/孔）分离后通过湿转法转移至 PVDF 膜，封闭（5%脱牛奶粉）2 h 后，一抗（GAS8，1∶100；β-actin，1∶1 000）4 ℃孵育过夜；次日用 TBST 溶液（TBS，1 mL/L 聚山梨酯 20）洗膜 3 次，8 min/次；分别加 HRP 标记的抗兔或抗小鼠二抗（1∶10 000），室温孵育 1 h；TBST（TBS，1 mL/L 聚山梨酯 20）洗膜 3 次，8 min/次；ECL 化学发光液暗室显影。而后构建含 GAS8 野生型和突变型 3’UTR-荧光素酶表达载体（WT-3’UTR 和 MUT-3’UTR）。实验分为 WT-3’UTR、MUT-3’UTR 组。取对数生长期细胞接种于 24 孔板，待细胞汇合度达 60%左右时，分别将 WT-3’UTR、MUT-3’UTR 质粒转染至细胞中，同时分别转染 miR-3682-3p inhibitors 和阴性对照。使用荧光素酶报告基因实验检测仪进行双荧光素酶报告基因实验测定。实验结果以荧光素酶活性和海肾荧光活性的比值进行统计学分析。实验重复 3 次。

1.8 GAS8 介导 miR-3682-3p 对肝癌细胞侵袭、迁移能力的影响

为探究 GAS8 是否参与了 miR-3682-3p 对肝癌细胞侵袭、迁移能力的调节作用，进行了回复实验。在敲减 miR-3682-3p 的 MHCC-97H 细胞中，利用小干扰敲低 GAS8。Western blotting 法检测敲减效率后进行功能学验证（操作同 1.7）。GAS8 介导 miR-3682-3p 对肝癌细胞侵袭、迁移能力的实验操作同 1.6。

1.9 统计学处理

使用 SPSS 22.0 等统计软件进行数据处理。所有结果均以 $\bar{x}\pm s$ 形式呈现，组间进行 t 检验；通过 χ^2 检验来分析 miR-3682-3p 表达与临床病理资料间的相关性，Spearman 相关性检验分析 miR-3682-3p 与 GAS8 表达的相关性；利用 Graphpad Prism 7、Adobe PhotoShop CS6、Adobe Illustrator CC 进行图表的绘制。

2 结果

2.1 miR-3682-3p 在肝癌中的表达

miR-3682-3p 在肝癌组织、癌旁组织中的表达情况分别为 2.024 0±0.695 2、4.332 0±1.050 0。结果显示，肝癌组织中 miR-3682-3p 的表达显著高于对应的癌旁组织（P＜0.001）。

TCGA 数据库检索的 miR-3682-3p 在 50 例正常组织、370 例肝癌组织中的表达情况见图 1。结果显示，miR-3682-3p 在正常组织中的表达水平明显低于肝癌组织（P＜0.05）。

L02 细胞、肝癌细胞株（Hep3B、HepG2、SMMC-7721、MHCC97-L、MHCC97-H）中 miR-3682-3p 的表达情况见表 1。结果显示，miR-3682-3p 在各肝癌细胞系中的表达均高于 L02 细胞（P＜0.05），且在 MHCC-97H 细胞中表达最高。

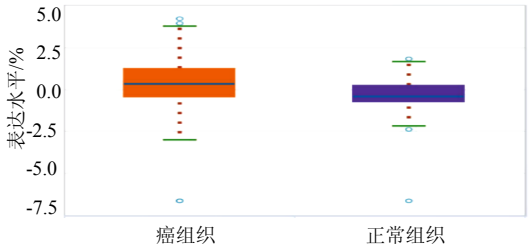


图 1 miR-3682-3p 在正常组织和肝癌组织中的表达水平

Fig. 1 Level of miR-3682-3p in normal tissues and HCC tissue

表 1 miR-3682-3p 在 L02 细胞和肝癌细胞系中表达（n=3）

Table 1 Levels of miR-3682-3p in HCC cell lines and L02 cell (n=3)

细胞系	miR-3682-3p 表达
L02	1
HepG2	1.656 0±0.110 2*
Hep3B	2.227 0±0.150 9*
MHCC97-L	2.533 0±0.107 9*
SMMC-7721	3.417 0±0.181 5*
MHCC97-H	4.460 0±0.120 2**

与 L02 组比较：*P<0.05 **P<0.01

*P < 0.05 **P < 0.01 *vs* L02 group

不同表达的 miR-3682-3p 与肝癌患者的临床病理特征之间的关系情况见表 2。结果显示，miR-3682-3p 的表达水平与门静脉侵犯、Edmondson 分级、TNM 分期有关。

生存期分析结果显示，miR-3682-3p 低表达组患者的总生存时间显著高于 miR-3682-3p 高表达组（P<0.001），见图 2。

2.2 敲减 miR-3682-3p 对肝癌细胞侵袭、迁移能力的影响

miR-3682-3p inhibitor（anti-miR-3682-3p）组 miR-3682-3p 表达水平（0.113 0±0.023 9）显著低于阴性对照组（anti-miR-NC）表达水平（1.000 0±0.000 0）（P<0.001）；miR-3682-3p 对 MHCC97-H 细胞迁移、侵袭的影响见图 3。结果显示，敲减 miR-3682-3p 后，相较于对照组，miR-3682-3p inhibitor 组迁移、侵袭的细胞数均显著减少（P<0.05），见表 3。

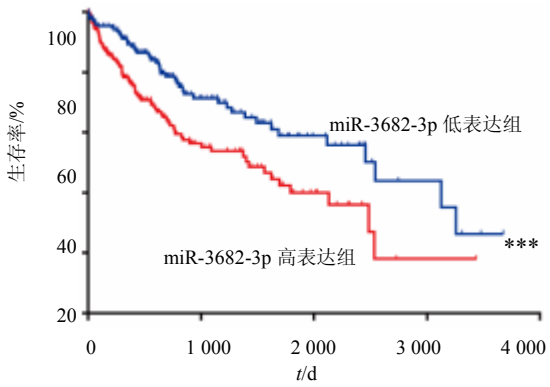
2.3 miR-3682-3p 的直接靶基因的检测

TargetScan 数据库预测结果见图 4。结果显示，miR-3682-3p 在 GSA8 mRNA 的 3'UTR 有相应的结合位点；肝癌组织和癌旁组织中 GSA8mRNA 的表达分别为（2.979 0±0.785 2）、（4.236 0±0.943 9），提示 GAS8 在肝癌组织中的表达低于癌旁组织中的表达（P<0.001）。

表 2 miR-3682-3p 表达量与肝癌患者临床病理特征的关系

Table 2 Relation between miR-3682-3p expression and clinicopathologic features of patients with hepatocellular carcinoma

观察项目		n/例	miR-3682-3p 例数		P 值
			高表达组	低表达组	
年龄	≥60	37	20	17	0.635
	<60	19	9	10	
性别	男	40	22	18	0.447
	女	16	7	9	
HBV 感染	无	10	4	6	0.636
	有	46	25	21	
甲胎蛋白/(ng·mL^{-1})	≤400	13	5	8	0.273
	>400	43	24	19	
肿瘤直径	≤5 cm	26	11	15	0.186
	>5 cm	30	18	12	
肿瘤个数	1 个	36	17	19	0.359
	≥2 个	20	12	8	
门静脉侵犯	无	35	13	22	0.005
	有	21	16	5	
Edmondson 分级	Ⅰ+Ⅱ	31	10	21	0.001
	Ⅲ+Ⅳ	25	19	6	
TNM 分期	Ⅰ+Ⅱ	46	20	26	0.02
	Ⅲ+Ⅳ	10	9	1	



与 miR-3682-3p 低表达组比较：***P<0.001

**P < 0.01 *vs* miR-3682-3p low expression group

图 2 生存期分析

Fig. 2 Prognostic analysis

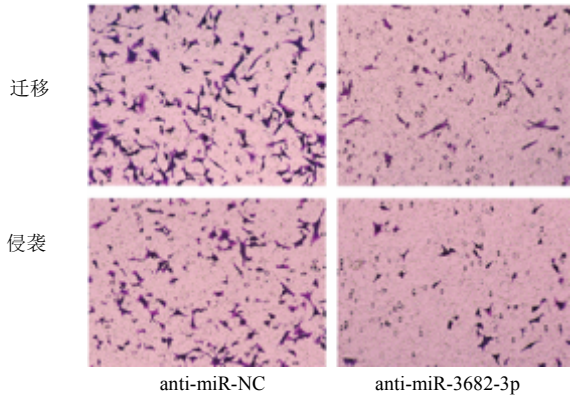


图 3 miR-3682-3p 对 MHCC97-H 细胞迁移、侵袭的影响

Fig. 3 Influence of miR-3682-3p on migration and invasion abilities of MHCC97-H cells

表 3 Transwell 实验检测细胞迁移、侵袭能力（n=3）

Table 3 Cell migration and invasion abilities measured by Transwell assay (n=3)

实验	组别	细胞数/个
迁移	anti-miR-NC	125.00±7.000
	anti-miR-3682-3p	46.67±6.658*
侵袭	anti-miR-NC	80.67±4.509
	anti-miR-3682-3p	24.00±3.000*

与 anti-miR-NC 组比较：*P<0.05

*P < 0.05 *vs* anti-miR-NC group

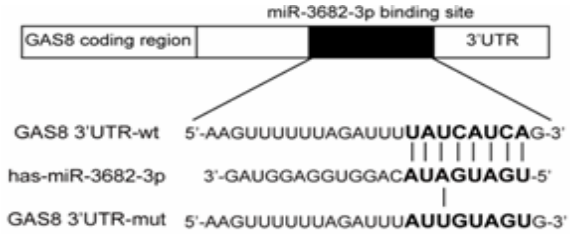


图 4 TargetScan 数据库预测结果

Fig. 4 Results predicted by TargetScan

肝癌组织中 miR-3682-3p 与 GAS8 的表达呈负相关（r=−0.633 6，P<0.000 1），见图 5；敲减 miR-3682-3p 对 GSA8 蛋白表达的影响情况见图 6；敲减 miR-3682-3p 后，GAS8 的表达明显被上调，anti-miR-NC、anti-miR-3682-3p 组的 miR-3682-3p 表达水平分别为（1.000±0.000）、（2.050±0.242）（n=3，P<0.001），表明 miR-3682-3p 可负向调控 GAS8 的表达；荧光素酶报告基因实验结果显示，敲低 miR-3682-3p 可以增强野生型 wt-3'UTR of GAS8 的荧光素酶的活性，而对于突变型无增强作用，见表 4。

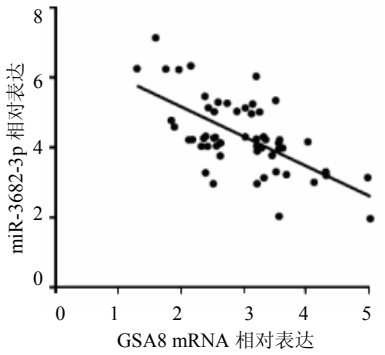


图 5 Spearman 相关分析

Fig. 5 Spearman correlation analysis

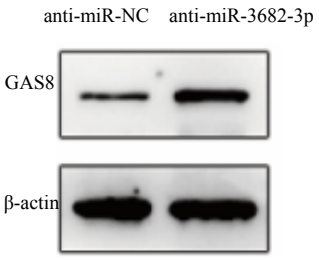


图 6 敲减 miR-3682-3p 对 GSA8 蛋白表达的影响

Fig. 6 Protein levels of GSA8 in silencing miR-3682-3p in MHCC97-H cells

表 4 荧光素酶报告基因实验（n=3）

Table 4 Luciferase reporter gene assay (n=3)

类别	组别	荧光素酶活性
野生	anti-miR-NC	1
	anti-miR-3682-3p	1.558 00±0.067 55**
突变	anti-miR-NC	1
	anti-miR-3682-3p	1.013 00±0.039 58

与 anti-miR-NC 组比较：**P<0.01

**P < 0.01 *vs* anti-miR-NC group

2.4 GAS8 介导 miR-3682-3p 对肝癌细胞侵袭、迁移能力的影响

与对照组（si-control）比较，实验组（si- GAS8）GSA8 蛋白表达明显减弱（P<0.05），见图 7、表 5。

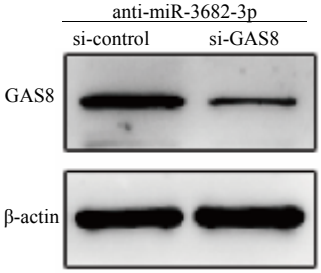


图 7 转染效率检测

Fig. 7 Transfection efficiency detection

表 5 转染效率检测结果（n=3）

Table 5 Transfection efficiency detection (n=3)

组别	GSA8 蛋白表达情况
anti-miR-3682-3p+si-control	2.682 0±0.261 4
anti-miR-3682-3p+si-GAS8	1.779 0±0.176 2*

与 si-control 组比较：*P<0.05

*P < 0.05 *vs* si-control group

Transwell 实验结果表明，与对照组（si-control）比较，实验组（si-GAS8）MHCC-97H 细胞的迁移、侵袭能力均明显增强（P<0.05），见图 8、表 6。

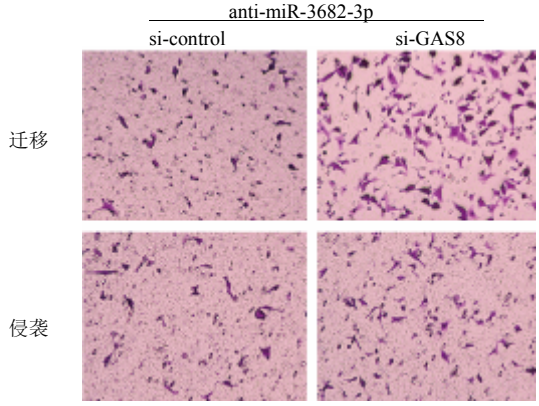


图 8 通过 Transwell 进行回复实验结果

Fig. 8 Rescue assay by transwell

表 6 Transwell 实验检测细胞迁移、侵袭能力（n=3）

Table 6 Cell migration and invasion abilities measured by Transwell assay (n=3)

实验	组别	细胞数/个
迁移	anti-miR-3682-3p+si-control	52.330±3.512
	anti-miR-3682-3p+si-GAS8	116.300±7.371*
侵袭	anti-miR-3682-3p+si-control	24.330±6.110
	anti-miR-3682-3p+si-GAS8	85.330±9.074*

与 si-control 组比较：*P<0.05

*P < 0.05 *vs* si-control group

3 讨论

研究表明，miRNA 可参与调节肝癌细胞的增殖[12, 15-16]、凋亡[17-18]、侵袭[19-20]、迁移[21-22]和化疗抵抗性[23-26]等多种生物学行为，从而在肝癌进展中发挥重要作用。本课题组之前的研究发现，miRNA-645 通过抑制 SOX30 介导的 p53 转录激活从而抑制肝癌进展[15]；miRNA-1468 通过激活 PPAR-γ 介导的 AKT 信号通路从而促进肝癌进展[16]。关于 miR-3682-3p 在肿瘤中的作用目前尚未见报道。本研究探索了 miR-3682-3p 与肝癌的关系。实验首先检测了 miR-3682-3p 在肝癌组织及对应的癌旁组织、肝癌细胞、正常肝细胞中的表达情况，并分析了其与肝癌患者临床病理特征、预后的相关性，发现其在肝癌中高表达，并与不良预后相关，提示其在肝癌中可能起到促癌作用。实验在 MHCC97-H 细胞中敲低 miR-3682-3p 的表达，用 Transwell 实验检测了其对肝癌细胞侵袭、迁移能力的影响，发现 miR-3682-3p 可以促进肝癌细胞侵袭、迁移，从而起到促癌作用。而 miR-3682-3p 在体内是否同样可以促进肝癌细胞侵袭和迁移能力，以后加以探索。

GAS8 之前被称为 GAS11，位于 16 号染色体上，在乳腺癌和肝癌中表达缺失[13]，提示 Gas 基因具有抑制肿瘤生长的作用。研究表明在衰老和休眠的二倍体成纤维细胞中表达 Gas8 上调，故认为它对衰老和休眠时细胞的生长具有调控作用[17]。研究表明，Gas8 在 COS7 胞中定位于高尔基体[18]。Gas8 mRNA、Gas8 蛋白在成年鼠睾丸中的含量较高，在雄性精母细胞形成的减数分裂后期，Gas8 表达受调控[19]，已有报道称 Gas8 在成年雄性小鼠睾丸中表达量较高[19]。GAS8 作为进化上保守的微管结合蛋白[20]，可能会干扰微管功能，此外，GAS8 还被证明参与细胞骨架功能[21]，雄性配子发生[19]，运动纤毛功能[22]和原发性纤毛运动障碍[23-24]。之前的研究表明 GAS8 可以抑制肝癌和甲状腺癌的恶性特征，包括增殖、侵袭和转移[25]，但 GAS8 与 miRNA 的作用未见报道。在本研究中，实验通过生物信息学分析发现 GAS8 可能是 miR-3682-3p 的靶基因，通过统计学分析发现，在肝癌组织中 miR-3682-3p 与 GAS8 的表达呈负相关，而且通过在肝癌细胞中敲减 miR-3682-3p 发现其可以上调 GAS8 的表达，最后通过双荧光素酶报告基因实验证实了 miR-3682-3p 与 GAS8 mRNA 3’UTR 的直接结合。通过回复实验在肝癌细胞同时敲减 miR-3682-3p 和 GAS8 证实 GAS8 介导了 miR-3682-3p 对肝癌细胞侵袭、迁移能力的促进作用。在本研究中，没有对 GAS8 抑癌机制做深入探索，而把焦点集中在 miR-3682-3p 和 GAS8 的直接调控上。

综上所述，在肝癌组织及细胞中 miR-3682-3p 的表达均显著升高。miR-3682-3p 的高表达与肝癌的恶性临床病理特征密切相关。另外，miR-3682-3p 高表达预示患者预后不良。在肝癌中，miR-3682-3p 通过靶向抑制抑癌基因 GAS8 从而促进肝癌细胞侵袭、迁移。因此，miR-3682-3p 可以作为新的肝癌分子标志物和治疗的潜在靶点。

参考文献

[1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, *et al*. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.

[2] Miller K D, Siegel R L, Lin C C, *et al*. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(4): 271-289.

[3] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(1): 7-30.

[4] Islami F, Chen W, Yu X Q, *et al*. Cancer deaths and cases attributable to lifestyle factors and infections in China, 2013 [J]. *Ann Oncol*, 2017, 28(10): 2567-2574.

[5] Chen W, Zheng R, Baade P D, *et al*. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.

[6] Braillon A. Hepatocellular carcinoma [J]. *Lancet*, 2012, 380(9840): 469

[7] Greten T F, Wang X W, Korangy F. Current concepts of immune based treatments for patients with HCC: from basic science to novel treatment approaches [J]. *Gut*, 2015, 64(5): 842-848.

[8] Dou C, Zhou Z, Xu Q, *et al*. Hypoxia-induced TUFT1 promotes the growth and metastasis of hepatocellular carcinoma by activating the Ca2+/PI3K/AKT pathway [J]. *Oncogene*, 2019, 38(8): 1239-1255.

[9] Ma Y S, Lv Z W, Yu F, *et al*. MicroRNA-302a/d inhibits the self-renewal capability and cell cycle entry of liver cancer stem cells by targeting the E2F7/AKT axis [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 252.

[10] Wang J, Chen J, Liu Y, *et al*. Hepatitis B Virus Induces Autophagy to Promote its Replication by the Axis of miR-192-3p-XIAP Through NF kappa B Signaling [J]. *Hepatology*, 2019, 69(3): 974-992.

[11] Luo C, Yin D, Zhan H, *et al*. microRNA-501-3p suppresses metastasis and progression of hepatocellular carcinoma through targeting LIN7A [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(5): 535.

[12] Roy S, Hooiveld G J, Seehawer M, *et al*. microRNA 193a-5p regulates levels of nucleolar- and spindle-associated protein 1 to suppress hepatocarcinogenesis [J]. *Gastroenterology*, 2018, 155(6): 1951-1966.

[13] Whitmore S A, Settasatian C, Crawford J, *et al*. Characterization and screening for mutations of the growth arrest-specific 11 (GAS11) and C16orf3 genes at 16q24.3 in breast cancer [J]. *Genomics*, 1998, 52(3): 325-331.

[14] Pan W, Zhang N, Liu W, *et al*. The long noncoding RNA GAS8-AS1 suppresses hepatocarcinogenesis by epigenetically activating the tumor suppressor GAS8 [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(44): 17154-17165.

[15] Tao J, Liu Z, Wang Y, *et al*. MicroRNA-645 represses hepatocellular carcinoma progression by inhibiting SOX30-mediated p53 transcriptional activation [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 121: 214-222.

[16] Liu Z, Wang Y, Dou C, *et al*. MicroRNA-1468 promotes tumor progression by activating PPAR-γ-mediated AKT signaling in human hepatocellular carcinoma [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 49.

[17] Ning Y, Xu J F, Li Y, *et al*. Telomere length and the expression of natural telomeric genes in human fibroblasts [J]. *Hum Mol Genet*, 2003, 12(11): 1329-1336.

[18] Colantonio J R, Bekker J M, Kim S J, *et al*. Expanding the role of the dynein regulatory complex to non-axonemal functions: association of GAS11 with the Golgi apparatus [J]. *Traffic*, 2006, 7(5): 538-548.

[19] Yeh S D, Chen Y J, Chang A C, *et al*. Isolation and properties of Gas8, a growth arrest-specific gene regulated during male gametogenesis to produce a protein associated with the sperm motility apparatus [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(8): 6311-6317.

[20] Nishimura N, Araki K, Shinahara W, *et al*. Interaction of Rab3B with microtubule-binding protein Gas8 in NIH 3T3 cells [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2008, 474(1): 136-142.

[21] Hill K L, Hutchings N R, Grandgenett P M, *et al*. T lymphocyte-triggering factor of african trypanosomes is associated with the flagellar fraction of the cytoskeleton and represents a new family of proteins that are present in several divergent eukaryotes [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(50): 39369-39378.

[22] Lewis W R, Malarkey E B, Tritschler D, *et al*. Mutation of growth arrest specific 8 reveals a role in motile cilia function and human disease [J]. *PLoS Genet*, 2016, 12(7): e1006220.

[23] Olbrich H, Cremers C, Loges N T, *et al*. Loss-of-function GAS8 mutations cause primary ciliary dyskinesia and disrupt the nexin-dynein regulatory complex [J]. *Am J Hum Genet*, 2015, 97(4): 546-554.

[24] Jeanson L, Thomas L, Copin B, *et al*. Mutations in GAS8, a gene encoding a nexin-dynein regulatory complex subunit, cause primary ciliary dyskinesia with axonemal disorganization [J]. *Hum Mutat*, 2016, 37(8): 776-785.

[25] Pan W, Zhou L, Ge M, *et al*. Whole exome sequencing identifies lncRNA GAS8-AS1 and LPAR4 as novel papillary thyroid carcinoma driver alternations [J]. *Hum Mol Genet*, 2016, 25(9): 1875-1884.