

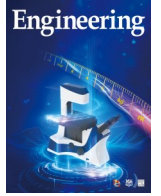


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Hepatocellular Carcinoma—Article

促进肝癌致癌活性和细胞代谢的新型介质——miR-516a-3p

芮韬^a, 张学优^{b,c}, 冯时^{b,c}, 黄海涛^{b,c}, 詹少伟^{b,c}, 谢海洋^{b,c}, 周琳^{b,c}, 郑树森^{b,c,*}, 凌琪^{b,c,*}

^a Department of Surgery, Affiliated Hangzhou First People's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China

^b Department of Surgery, Collaborative Innovation Center for the Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China

^c Key Laboratory of Organ Transplantation, Research Center for Diagnosis and Treatment of Hepatobiliary Diseases, Zhejiang Province, Hangzhou 310003, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 August 2020
Revised 11 June 2021
Accepted 26 July 2021
Available online 19 October 2021

关键词

肝细胞肝癌
miRNA 簇
外泌体
多组学

摘要

肝细胞肝癌(HCC)是目前最致命的恶性肿瘤之一。根据先前的研究,19号染色体miRNA簇(C19MC)与肝癌患者的肿瘤高负荷和不良预后相关。目前的研究旨在探讨miR-516a-3p在HCC中的作用。miR-516a-3p是一种由C19MC 4个致癌前体miRNA(即mir-516a-1、mir-516a-2、mir-516b-1和mir-516b-2)所共同剪接而成的相同的成熟体miRNA。在肝癌队列中,与瘤旁组织相比,miR-516a-3p在肝癌组织中显著高表达。肿瘤miR-516a-3p的高表达与肝癌高肿瘤负荷相关,可以区分高HCC复发率和死亡率,并独立预测肝癌的不良预后。进一步通过体外实验发现miR-516a-3p增强了肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭性,并通过体内实验验证miR-516a-3p促进了肿瘤的增殖和远处转移能力。在肝癌细胞中,miR-516a-3p可以通过外泌体进行递送,并增加受体肝癌细胞的致癌活性。此外,为探索miR-516a-3p致癌的潜在机制,本研究进行了全面的转录组学、蛋白质组学和代谢组学分析。多组学DIABLO分析显示,蛋白质组学和代谢组学数据之间具有密切的相关性和较强的聚类一致性。进一步证实了6种基因的mRNA(即LMBR1、CHST9、RBM3、SLC7A6、PTGFRN和NOL12)是miR-516a-3p的直接靶点,并在miR-516a-3p介导的代谢调节中发挥核心作用。综合多组学和共富集途径分析表明,miR-516a-3p可以调节肝癌细胞的代谢途径,特别是嘌呤代谢和嘧啶代谢。总之,本研究发现,miR-516a-3p可以通过调节细胞代谢和外泌体递送系统影响相邻细胞,促进肝癌细胞的肿瘤恶性进展。因此,miR-516a-3p可作为肝癌治疗的新分子靶点。

© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

肝细胞肝癌(HCC)是最常见的恶性肿瘤之一,且其预后效果很差[1]。HCC的发病率比其他任何癌症都增长得更快,这值得引起人们极大的关注[2]。在过去的几十年中,女性和男性HCC的死亡率都有所增加。而手术是HCC的重要治疗手段[3]。尽管结合了靶向药物治疗[4]、

局部消融[5]、经导管动脉化疗栓塞[6],甚至肝移植等治疗手段[7],但HCC的预后效果仍然很差。因此,必须尝试去更好地了解HCC的发病机制从而探索其可能的治疗靶点。

microRNA(miRNA)是一种长度为18~25个核苷酸的小型非编码RNA,通过靶向肿瘤相关通路,在调节肿瘤发生和肿瘤进展中发挥关键作用[8]。目前,miRNA簇

* Corresponding authors.

E-mail addresses: shuzheng@zju.edu.cn (S. Zheng), Lingqi@zju.edu.cn (Q. Ling).

2095-8099/© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

英文原文: *Engineering* 2022, 16(9): 162–175

引用本文: Tao Rui, Xueyou Zhang, Shi Feng, Haitao Huang, Shaowei Zhan, Haiyang Xie, Lin Zhou, Shusen Zheng, Qi Ling. MiR-516a-3p is a Novel Mediator of Hepatocellular Carcinoma Oncogenic Activity and Cellular Metabolism. *Engineering*, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.07.020>

被定义为一组从相同方向或相邻基因组转录的前体 miRNA (pre-miRNA) [9], 其调控和表达具有高度一致性的特点[10], 在癌症的调控中极有吸引力。此外, 由于相同或相似的种子区域, miRNA 簇可以靶向相同的基因或途径, 并实现共同的效果[11–12]。19 号染色体 miRNA 簇 (C19MC) 作为最大的 miRNA 簇, 包含 46 个 pre-miRNA [13]。之前的研究通过挖掘癌症基因组图谱 (TCGA) (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) miRNA 谱, 证明了在 HCC 组织差异上调的前 50 和前 100 个 miRNA 中, 分别有 37 个 (80.4%) 和 45 个 (97.8%) 属于 C19MC [14]。这些结果与其他研究结果[15–17]一致, 表明 C19MC 可能是 HCC 的一种新型预后生物标志物。然而, 目前缺乏功能性研究用于探索 C19MC 成员对 HCC 影响的机制。

miRNA 有可能在不同类型的细胞之间转运, 包括癌细胞和邻近细胞, 而这可能会影响受体细胞的生物学特征 [18]。外泌体或细胞外囊泡是研究细胞间通讯最常用的 miRNA 载体, 有助于恶性肿瘤的转移[19]。一些研究表明, C19MC 会通过外泌体转移到其他区域。C19MC 在人胎盘滋养层细胞中通过外泌体介导转移, 从而获得病毒抗性这一现象已受到广泛关注[20–21]。Bullerdiek 等[22]还提出了一个假设, 即外泌体衍生的 C19MC 可能作为治疗肿瘤的靶点。然而, 目前仍没有实验研究表明, 可以通过外泌体转移 C19MC, 从而调节肿瘤细胞。因此, 本研究旨在探讨 HCC 中 C19MC 通过外泌体的生物学功能性转移。

本研究发现 C19MC 的 4 种致癌前体 miRNA (即 mir-516a-1、mir-516a-2、mir-516b-1 和 mir-516b-2) 共同剪接了一个相同的成熟 miRNA, 命名为 miR-516a-3p。在 82 例 HCC 患者队列中评估了 miR-516a-3p 的临床价值, 以及 miR-516a-3p 在体外和体内对 HCC 恶性行为的影响, 并通过研究外泌体检测了 miR-512-3p 的细胞间转运。还进行了多组学 (即转录组学、蛋白质组学和代谢组学) 分析, 从而系统地探索 miR-516a-3p 介导的致癌的分子机制。

2. 材料和方法

2.1. 癌症基因组图谱数据分析

按照先前所述方法[14]分析 TCGA 数据。简而言之, HCC 患者和非肿瘤对照组的 miRNA 序列和临床数据来自 TCGA 数据库。edgR 包用于标准化 miRNA 测序并筛选差异 miRNA。根据受试者操作特征 (ROC) 曲线计算的每个 miRNA 的截断值, 将 miRNA 的表达水平分为高表达组 and 低表达组。采用对数秩检验进行 Kaplan-Meier 分析, 以

检测 miRNA 表达与 HCC 总生存率 (OS) 的相关性。采用单变量 Cox 比例风险回归分析筛选 HCC OS 的危险因素。使用卡方检验以分析具有 miRNA 表达的 HCC 的临床病理特征。

2.2. 代谢组学

代谢组学分析按照之前所述方法进行[23]。对于代谢物提取, 将 5×10^6 个 (每个样本) miR-516a-3p 转染的 SNU-449 ($n = 8$) 及其对照用于代谢组学分析。根据制造商的说明, 提取并转移所有样品的代谢物, 用于高效液相色谱串联质谱 (HPLC-MS/MS) 分析。对于代谢物鉴定, 使用 MSconvert 软件 (ProteoWizard, 美国) 将原始质谱 (MS) 数据转换为 mzXML, 并使用 XCMS 软件包从软件中提取。根据每个离子的保留时间 (RT) 和质荷比 (m/z) 数据, 通过软件的 metaX 包识别 MS1 谱图。特别是, MS2 光谱与内部标准光谱库相匹配。然后使用京都基因组百科全书 (KEGG) 数据库以及人类代谢组数据库 (HMDB) 鉴定和注释 MS2 光谱的代谢物。使用 MetaboAnalyst 4.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>) [24] 对已鉴定的代谢物进行通路富集。

2.3. 蛋白质组学

对 5×10^6 个 (每个样本) miR-516a-3p 转染的 SNU-449 ($n = 3$) 及其对照进行蛋白质组学分析。简而言之, 用裂解缓冲液从样品中提取蛋白质, 然后煮沸并以 15 000 g 离心 15 min。进行二辛可宁酸 (BCA) 蛋白质测定 (Beyotime, 中国) 以检测所有样品的蛋白质浓度。将每个样品 20 μ g 蛋白质在 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 凝胶上进行分离, 并用考马斯蓝染色后, 进行凝胶内过滤辅助样品制备。根据制造商的说明, 这些肽用串联质量标签 (TMT) (Thermo Fisher Scientific, 美国) 标记。在液相色谱串联质谱 (LC-MS/MS) 分析之前, TMT 肽通过高 pH 值 (pH = 10) Agilent 1260 Infinity II 反相 (RC) -HPLC 系统 (中国安捷伦科技有限公司) 进行分离。使用配备 Acclaim PepMap 快速分离液相色谱 (RSLC) 柱 (Thermo Fisher Scientific) 的 Easy-nLC 超高效液相色谱 (UHPLC) 系统 (Thermo Fisher Scientific) 分离肽级分, 流速为 $300 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。AQ Exactive Plus MS (Thermo Fisher Scientific) 用于 MS 分析。接下来, 使用 Mascot 2.6 (Matrix Science, 英国) 和 Proteome Discoverer 2.1 (Thermo Fisher Scientific) 搜索原始数据, 然后与蛋白质组数据库 (Uniprot_HomoSapiens_20386_20180905) 进行匹配。使用在线数据库 KEGG Orthology Based Annota-

tion System (KOBAS) 3.0 (kobas.cbi.pku.edu.cn.) 对差异蛋白进行KEGG分析。

2.4. 转录组学

对每个样本中 5×10^6 个 (每个样本) miR-516a-3p 转染的 SNU-449 ($n = 3$) 及其对照进行转录组学分析。简言之, 使用 TRIzol 试剂 (Invitrogen, 美国) 提取总 RNA, 并用聚 T 寡核苷酸连接的磁珠纯化 mRNA。使用 mRNA 序列样品制备试剂盒 (Illumina, 美国) 将 mRNA 反向转录为 cDNA 文库。用 AMPureXP 珠纯化 cDNA, 并利用聚合酶链反应 (PCR) 扩增进行扩增。然后使用 Illumina HiSeq X Ten 系统 (Illumina, 美国) 对总测序文库进行测序。Hisat 软件包通过将读数映射到参考基因组来分配样品的读数。执行 StringTie 以组装映射的读取。使用 KOBAS 3.0 进行差异 mRNA 的 KEGG 分析。

2.5. 用蛋白质组学和转录组学分析靶基因

使用在线分析数据库 TargetScan[†] 筛选 miR-516a-3p 的潜在靶向基因。将所有候选靶向基因与蛋白质组学或转录组学的下调蛋白或转录物的数据重叠。然后将重叠的蛋白质或转录本设置为 miRNA 的潜在靶点并突出显示为节点。靶向基因效应的系统分析如下: ① 通过使用 corplot R 软件包的 Pearson 相关检验, 评估靶向基因和差异基因之间的相关性; ② 根据功能富集程度将差异基因划分为基因集, 并基于 Bray-Curtis 距离的 Mantel 检验构建目标基因与基因集之间的网络。

2.6. 多组学综合分析

与差异变量的传统统计方法不同, 使用潜在成分 (DIABLO) 模型的生物标志物发现数据集分析致力于使用多变量探索方法, 选择多维度和多功能水平的变量 [25]。通过 L1 惩罚同时选择特征使得构建的信号网络模型更具有生物学上的解释性。因此, DIABLO 已被广泛用于分析细胞生物学、探索机制、挖掘路径和构建结构。在本研究中, 将转录物、蛋白质和代谢物的基质输入 DIABLO, 以确定生物相关特征的主要组合。该模型由两部分组成, 每个部分包含 90 个特征, 这些特征是在所有三种数据类型中联合选择的 (每个数据类型有 2×30 个特征)。使用加权基因相关网络分析 (WGCNA) R 软件包, 采用基于模块的方法将组学变量数据集转换为通路数据集。MixOmics R 软件包用于研究变量之间的相关性。使用 R 软件包构建群落结构以直观地描述变量之间的关联。Metscape 3 (KEGG 和 EHMN 的内部交互数据库) 用于构

建分支连接网络, 并整合基因表达谱 (即转录组学和蛋白质组学) 和代谢组学 [26]。

2.7. 细胞培养

HCC 细胞系即 SNU-449、Hep G2、HUH-7 和 LM3 购自美国典型培养物保藏中心或中国科学院细胞库。用于细胞培养的培养基如下: 将 RPMI 1640 培养基 (GIBCO, 美国) 用于 SNU-449; Hep G2 使用 Eagle 的最低基本培养基 (Thermo Fisher Scientific, 美国); HUH-7 和 LM3 使用 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (Thermo Fisher Scientific, 美国)。所有培养基均添加 10% 胎牛血清 (FBS) (Bio-IND, 中国)。细胞在 37 °C 下的含有 5% 二氧化碳 (CO₂) 的加湿培养箱中进行培养。

2.8. 细胞转染

为体外实验合成了 miR-516a-3p 模拟寡核苷酸、抑制剂寡核苷酸及其对照 (RiboBio, 中国)。根据制造商的说明, 使用 RiboFECT (RiboBio) 有效转染这些 RNA 寡核苷酸 [模拟物为 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (nM), 抑制剂为 200 nM]。构建慢病毒载体颗粒 (Genepharma, 中国) 以稳定表达 miR-516a-3p 抑制剂用于体内实验。简而言之, 将 miR-516a-3p 抑制剂序列克隆到第三代包装系统载体中。载体转染 293T 细胞; 然后, 从上清液中收集并浓缩慢病毒颗粒。用 1×10^7 个感染性慢病毒颗粒单位转导 2×10^5 个 LM3 细胞 (感染倍数为 50)。稳定表达 miR-516a-3p 抑制剂的 LM3 细胞用 $2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 嘌呤霉素 (Thermo Fisher Scientific) 筛选两周。

2.9. 定量逆转录 PCR (qRT-PCR)

根据制造商的说明, 使用 miRNeasy Mini Kit (编号 217004; Qiagen, 德国) 和 RNeasy MinElute Cleanup Kit (编号 74204; Qiagen, 德国) 从 HCC 细胞中提取和纯化总 RNA 和 miRNA。为了分离细胞上清液的外泌体 RNA, 使用 anexoRNeasy Maxi Kit (编号 77164; Qiagen)。ABulge-Loop miRNA qRT-PCR Starter Kit (C10211, RiboBio) 用于检测前体 miRNA 和成熟 miRNA 的表达。简而言之, 对于茎环 miRNA qRT-PCR, 使用特异性逆转录引物合成 pre-miRNA 或 miRNA cDNA, 分别在 42 °C 保持 60 min 和 70 °C 保持 10 min。然后在 95 °C、15 s 和 60 °C、30 s 每个循环条件下进行 40 个循环的 PCR 扩增 (对于前体 miRNA, 使用 55 °C 的温度)。U6 作为归一化对照, 用循环阈值 (CT) 值比较 ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$) 法计算相对表达量。miR-516a-3p (MQPS0001726-1)、miR-516a-5p

[†] http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert_71/targetscan.cgi?mirg=hsamiR-516a-3p

(MQPS0001727-1) 和 miR-516b-5p (MQPS0001730-1) 的逆转录引物和 PCR 扩增引物是合成的, 购自 RiboBio 公司。其他引物序列显示在附录 A 的表 S1 中。

2.10. 免疫印迹分析

如前所述进行蛋白质免疫印迹分析[27]。简言之, 在定量和煮沸后, 将所有收集的蛋白质用 10% SDS-PAGE 凝胶 (FD341-100; Fudebio, 中国) 电泳, 然后转移到平衡的聚偏二氟乙烯膜上。然后在室温下封闭膜 1 h, 并在 4 °C 下与一抗孵育过夜。在用增强化学发光 (ECL) 系统 (Biotanone, 中国) 和 FDbio-FemtoECL (FD8380; Fudebio, 中国) 检测之前, 将膜与二级抗 Rabbit 免疫球蛋白 G (IgG) 或抗小鼠 IgG 辣根过氧化物酶 (HRP) 连接抗体一起孵育。附录 A 的表 S2 中列出了使用的所有 15 种抗体。

2.11. 细胞计数试剂盒-8(CCK-8)和 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶(EdU)测定

CCK-8 测定和 EDU 测定用于检测细胞增殖。将已用 miR-516a-3p 寡核苷酸转染的 HCC 细胞系接种在 96 孔板 (用于 CCK-8) 或 24 孔板 (对于 EdU) 中 24 h。添加 CCK-8 试剂 (Dojindo Molecular Technologies, 日本) 培养 1 h (用培养基稀释, 1 : 10), 并使用分光光度读数仪 (Multiskan FC, Thermo Scientific) 检测 450 nm 处的吸光度。根据制造商的说明, 使用 ClickiTEdU Alexa Fluor 488 检测试剂盒 (Invitrogen, 美国) 测量细胞增殖。使用荧光显微镜 (Photometrics Prime, 美国) 拍摄荧光图像。绿色荧光细胞与蓝色荧光细胞的比例即反映增殖效率。

2.12. 实时细胞分析(RTCA)测定

使用 RTCA 以监测细胞指数 (CI), 该方法以无标记的实时方式反映细胞增殖和侵袭。配备 E-Plate 96 的 AnxCELLigence RTCA 单板 (SP) 仪器用于细胞增殖。使用配备 CIM-Plate 16 (预涂 Matrigel) 的 xCELLigence RTCA 双用途 (DP) (ACEA Biosciences, 美国) 仪器来确定细胞侵袭。将转染 miRNA 寡核苷酸 24 h 的 HCC 细胞接种于 E-Plate 96 或 CIM-Plate 16, 然后根据制造商的说明实时检测 CI。

2.13. 菌落形成实验

使用 miR-516a-3p 寡核苷酸转染 24 h 后, 将 HCC 细胞接种在 12 孔板中, 每三天更换一次培养基。两周后, 使用多聚甲醛固定细胞, 并用结晶紫将细胞染色 (Sigma-Aldrich, 德国)。

2.14. 细胞侵袭实验

Transwell 系统 (Corning Inc.) 用于细胞迁移和侵袭测定。简而言之, 用 miR-516a-3p 寡核苷酸转染 HCC 细胞 24 h。对于侵袭试验, 将 Matrigel (BD Biosciences, 美国) 预涂到装饰 Transwell 膜的上室中, 并与无血清培养基一起孵育 2 h。Matrigel 不用于迁移测定。转染的细胞在上室用无血清培养基重悬, 配套的 24 孔板的下室装有血清培养基。培养 24 h 后, 用多聚甲醛固定小室并用结晶紫染色。对染色的细胞进行计数以评估其侵袭能力。

2.15. 双荧光素酶报告分析

按照先前所述[27], 分别合成了 6 个候选靶 (LM-BR1、CHST9、RBM3、SLC7A6、PTGFRN 和 NOL12) 的野生型或突变型 3'非翻译区 (3'UTR) 的序列, 并克隆到 pmirGLO 载体上 (Repopio, 中国)。然后使用 lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, 美国), 用构建的载体和 miR-516a-3p 模拟物或对照模拟物共转染 293T 细胞。48 h 后, 根据制造商的说明, 用双荧光素酶报告试剂盒 (Vazyme, 中国) 检测所有细胞的双荧光素酶活性。

2.16. Cy3 标记 miR-516a-3p 外泌体转移检测

使用两种形式的培养系统来检测 miR-516a-3p 外泌体转移的途径。一种形式是共培养测定。用 Cy3-miR-516a-3p 模拟物转染后, 收获细胞并用无血清培养基洗涤三次。然后将它们接种在 Transwell 系统 (0.4 μ m, 聚碳酸酯膜; Corning Inc.) 的上室中, 将未处理的 HCC 细胞预先接种在下室中。24 h 后, 将下室中的细胞用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤三次。观察细胞上的 Cy3 红色荧光。另一种共培养系统形式是培养基转移。在 6 cm 培养皿中转染 Cy3-miR-516a-3p 模拟物 24 h 后, 将 HCC 细胞洗涤三次, 然后用无血清培养基培养 24 h。收集培养基并在 4 °C 下以 3000 g 离心 5 min 以去除细胞碎片。然后将上清液转移并培养到 24 孔板中, 预先接种未处理的 HCC 细胞。24 h 后, 用 PBS 洗涤细胞三次, 用荧光显微镜观察。对于这两种形式的培养系统, 每一种都用外来体产生抑制剂 GW4869 (20 μ M; MedChemExpress, 美国) 处理, 并用作对照组。

2.17. 外泌体纯化、鉴定和共培养

HCC 细胞 (稳定过表达 miR-516a-3p 的 SNU-449 和未处理的 SNU-449) 在 15 cm 培养皿中生长至有 80% 融合后, 用 10 mL 无血清培养基替换原代培养基。24 h 后, 将上清液在 4 °C 下以 3000 g 离心 5 min, 然后用 Millex GV 过滤装置 (0.22 μ m; Merck Millipore, 德国) 过滤。随后

根据制造商的说明，使用 exoEasy Maxi 试剂盒 (No.76064; Qiagen, 德国) 提取和纯化上清液中的外泌体。最后，用 400 μ L 洗脱缓冲液洗脱被膜吸收的外泌体。exoRNeasy Maxi 试剂盒 (No.77164; Qiagen, 德国) 用于分离外泌体 RNA。

为了观察外泌体结构，将外泌体连接到铜网格上，并用磷钨酸 (2%) 负染色 1.5 min。样品干燥 15 min 后，用透射电子显微镜 (Tecnai G2 Spirit 120 kV; Thermo Fisher Scientific, 美国) 观察铜网格上的外泌体。根据制造商的说明，使用 Nano-ZS90 仪器 (Malvern, 英国) 测量外泌体的流体动力学直径分布。总共测试 5 个样品，每个样品测试三次。

对于外泌体和细胞共培养，使用缓冲液洗脱外泌体。然后，将 125 μ L 的外泌体洗脱液添加到含有 HCC 细胞的 6 cm 培养皿中，培养皿含有 2.5 mL 培养基。24 h 后收集细胞用于进一步的实验。

2.18. 患者和标本

从在浙江大学医学院附属第一医院接受肝切除术的患者中获得 HCC 细胞和匹配的邻近非肿瘤组织。共纳入 82 例 HCC 患者：28 例女性 (34.1%) 和 54 例男性 (65.9%)，平均年龄为 (54.6 \pm 12.9) 岁。其中，44 例 (53.7%) 为美国癌症联合委员会 (AJCC) 低分期，38 例 (46.3%) 为 AJCC 高分期；38 例 (46.3%) 乙型肝炎病毒 (HBV) 感染阳性，44 例 (53.7%) HBV 感染阴性。所有患者通过术后组织病理学证实为 HCC。本研究方案由浙江大学医学院附属第一医院伦理委员会批准。参与者均提供了参与本研究的知情同意书。

2.19. 肿瘤模型

Balb/c 雄性裸鼠 (6~8 周龄) 购自中国科学院上海实验动物中心，按照《国家研究所实验动物护理与使用指南》(National Institute Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) 中的标准对小鼠进行护理。在给小鼠注射细胞之前，先将小鼠随机分组。为了尽量减少小鼠的痛苦，所有小鼠在处死前都通过吸入 CO₂ 进行麻醉和安乐死。动物研究方案经浙江大学医学院附属第一医院伦理委员会批准。从小鼠所有者处获得小鼠参与实验的书面知情同意书。按之前所述方式使用肿瘤模型[27]。简而言之，将筛选出的稳定表达 miR-516a-3p 抑制剂的 LM3 细胞系 (2 \times 10⁶) 及其对照，皮下注射到小鼠 (6 周，每组 n = 6) 右侧腹部。28 d 后处死小鼠，收集所有肿瘤标本进行冷冻保存或固定保存。为了进一步评估体内的侵袭和转移能

力，使用原位 HCC 小鼠模型 (8 周，每组 n = 5)。将稳定表达 miR-516a-3p 抑制剂的 LM3 细胞株或其对照 (1 \times 10⁶, 1:1 基质胶, 50 μ L) 分别移植于小鼠肝右叶。42 d 后，用活体生物发光成像评估侵袭和转移。

2.20. 统计分析

使用平均值 \pm 标准差 (SD) 或中位数 \pm 四分位数范围 (IQR) 描述定量变量。采用 t 或 Mann-Whitney 检验分析两组之间定量变量的比较。在两个以上的组中使用了单因素方差分析 (ANOVA) 和 Bonferroni 校正。通过计算最佳 Youden 指数，同时考虑敏感性和特异性，用 ROC 曲线检测 82 例 HCC 样本中 miR-516a-3p 表达的最佳截止值 ($-\Delta$ CT=3.979704795)。采用对数秩检验评估 Kaplan-Meier 生存曲线。采用单变量和多变量 Cox 比例风险回归分析筛选 HCC 预后的危险因素。所有体外实验均独立，至少重复三次。使用统计产品和服务解决方案 (SPSS) 软件 (版本 19.0) 进行统计分析， P 值小于 0.05 被设置为显著性水平。*、**、***和****分别表示 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 和 $P < 0.0001$ 。如上所述进行多组学整合的统计分析。

3. 结果

3.1. 源自 C19MC 4 种致癌 miRNA 前体的 miR-516a-3 与晚期 HCC 呈正相关，并独立预测肿瘤复发率和死亡率风险

使用 TCGA 数据库，证明了 HCC 中有几个 C19MC 显著上调[14]。在本研究中，进一步检索了 miRBase 数据库 (<http://www.mirbase.org/>)，发现 C19MC 的 4 个成员 (miR-516a-1、miR-516a-2、miR-516b-1 和 miR-516b-2) 共剪接了一个相同成熟的 miRNA，即 miR-516a-3p (见附录 A 中的图 S1)。首先，根据来自 TCGA 的数据，证实了与非肿瘤组织相比，HCC 组织中 4 种 miRNA 前体显著上调[图 S2 (a)]。发现 HCC 中 4 种 miRNA 前体的高度表达与患者的生存率差具有显著相关性[见附录 A 中的图 S2 (b)、(c)]。在本文样本中进一步证实了 HCC 组织中 4 种 miRNA 前体的高表达[见附录 A 中的图 S3 (a)]。本研究进一步证明，在 4 种常用的 HCC 细胞系中，miR-516a-3p 的表达显著高于互补链 (miR-516a-5p 和 miR-516b-5p) [见附录 A 中的图 S3 (b)、(c)]。本文研究结果表明，miR-516a-3p 是来自 4 种 pre-miRNA 功能成熟的 miRNA [见附录 A 中的图 S3 (d)]。

在本文的样本中，HCC 组织中的 miR-516a-3p 表达显著上调[图 1 (a)]。进一步将肿瘤 miR-516a-3p 表达与

HCC特征相关联，发现肿瘤尺寸大于8 cm（与肿瘤尺寸小于8 cm相对）、多个肿瘤（与单个肿瘤相对）和AJCC III-IV期（与I-II期相对）中的肿瘤miR-516a-3p水平显著较高[图1 (b) ~ (d)]。此外，与miR-516a-3p水平较低的患者相比，miR-516a-3p水平较高的患者的无瘤生存率和总生存率明显较低[图1 (e)、(f)]。在多变量Cox分析中，肿瘤miR-516a-3p表达被证明是HCC复发率和死亡率的独立影响因素[图1 (g)、(h)]。关于预测癌症复发概率，AJCC分期和肿瘤miR-516a-3p表达的曲线下面积(AUC)分别为0.673和0.641。当两个变量合并时，AUC显著增加至0.722（均小于0.05）[图1 (i)]。本研究进一

步证实，肿瘤miR-516a-3p的高度表达也提高了预测HCC死亡率的准确度。当AJCC分期和miR-516a-3p表达相结合时，AUC从0.740显著增加至0.792（所有 $P < 0.05$ ）[图1 (j)]。

3.2. MiR-516a-3p在体内外增强了HCC细胞的增殖、侵袭性和细胞迁移

本研究进行了一系列实验以评估miR-516a-3p对体外HCC增殖的影响[见图(2)及附录A中的图S4、S5]。所有实验(CCK8、RTCA、EdU和细胞簇形成)表明，miR-516a-3p的过表达显著促进了HUH-7和SNU-449细胞的增殖[见图2 (a)和附录A中的S4 (a)、(c)和(e)]，

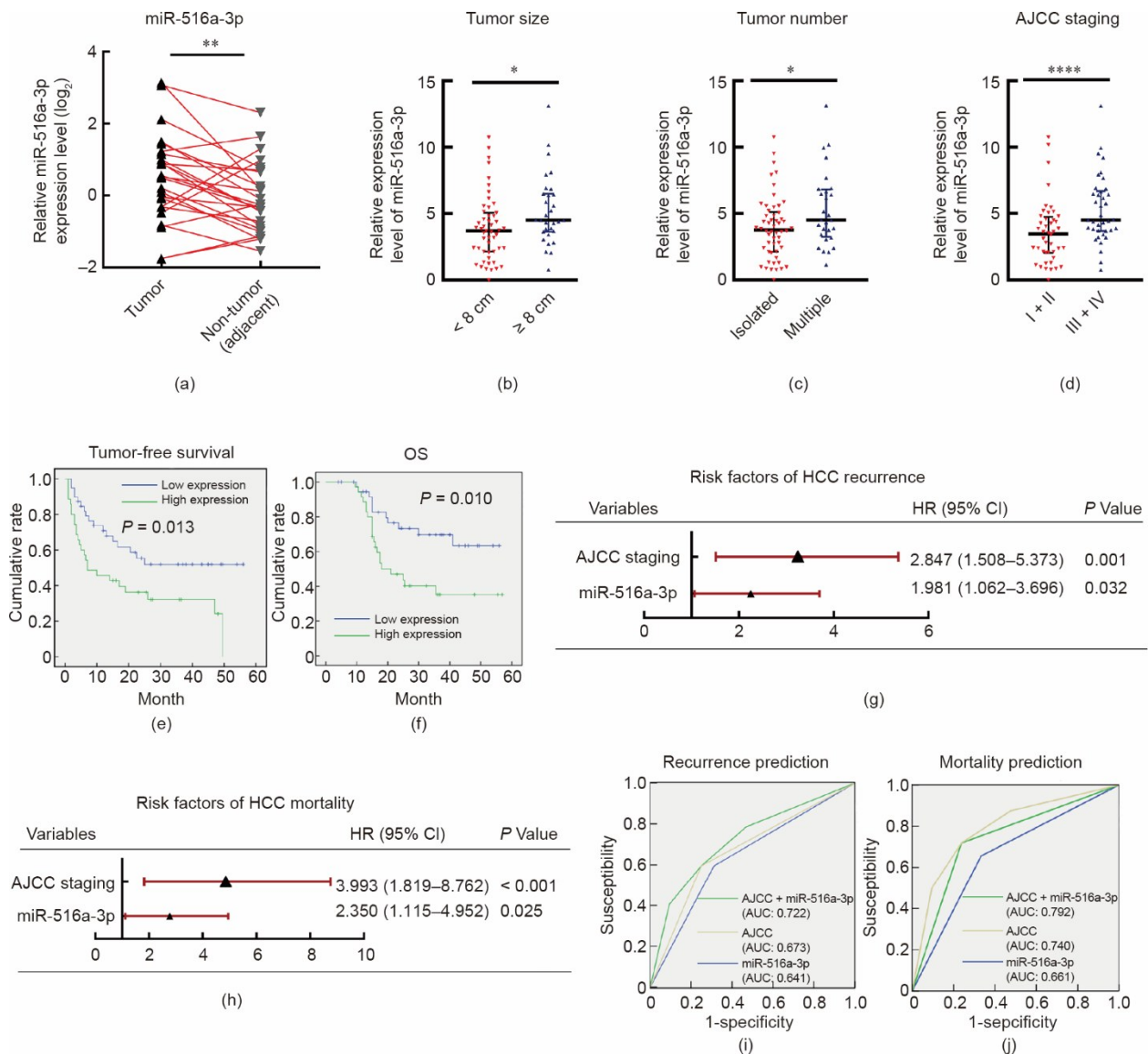


图1. miR-516a-3p与HCC恶性程度呈正相关。(a)与相邻的非肿瘤组织相比，HCC组织中miR-516a-3p上调 ($n = 25$) (配对 t 检验)；(b) ~ (d)肿瘤miR-516a-3p的高表达与肿瘤尺寸(b)、肿瘤数量(c)和高AJCC分期(d) ($n = 82$)呈正相关(Mann-Whitney检验)；(e)、(f)Kaplan-Meier检验和对数秩检验证实，肿瘤miR-516a-3p的高表达可区分低HCC无瘤生存率(e)和OS(f)；(g)、(h)多变量Cox比例风险模型表明，肿瘤miR-516a-3p表达是HCC复发率(g)和死亡率(h)的独立风险因素；(i)、(j)ROC的AUC显示，肿瘤miR-516a-3p表达提高了对HCC复发率(i)和死亡率(j)的预测。HR: 危害比。

而敲除 miR-516a-3p 则抑制了 HCC 细胞的增殖[见图 2 (b) 和附录 A 中的 S4 (b)、(d) 和 (f)]。本文进行了 Transwell 分析, 并观察到 miR-516a-3p 的过表达显著增加了 HUH-7 和 SNU-449 细胞的迁移和侵袭性[见附录 A 中的图 S5 (a) 和 (c)], 而 miR-516-3p 的敲除则具有相反的作用[见附录 A 中的图 S5 (b)、(d)]。使用 Transwell 系统的 RTCA 进一步验证了 miR-516a-3p 对 HCC 细胞侵袭的影响[图 2 (c) 和 (d)]。

此外, 使用稳定的 miR516a-3p 表达抑制剂或其对照

的 LM3 细胞系建立皮下裸鼠 HCC 模型。皮下注射 4 周后处死小鼠, 测量肿瘤体积。结果表明, miR-516a-3p 抑制剂显著抑制了 HCC 的生长[图 2 (e)]。与对照组相比, miR-516a-3p 抑制剂导致肿瘤体积更小[图 2 (f)]、质量更轻[图 2 中 (g)]。为评估 miR-516a-3p 在肿瘤转移中的作用, 建立了 HCC 原位小鼠模型。将稳定表达 miR-516a-3p 抑制剂的 LM3 细胞株或其对照细胞移植于裸鼠右肝 6 周。荧光素酶显像用于评估肿瘤的生长和转移; 结果表明, 与对照组相比, miR-516a-3p 抑制剂组在肝脏(原发肿

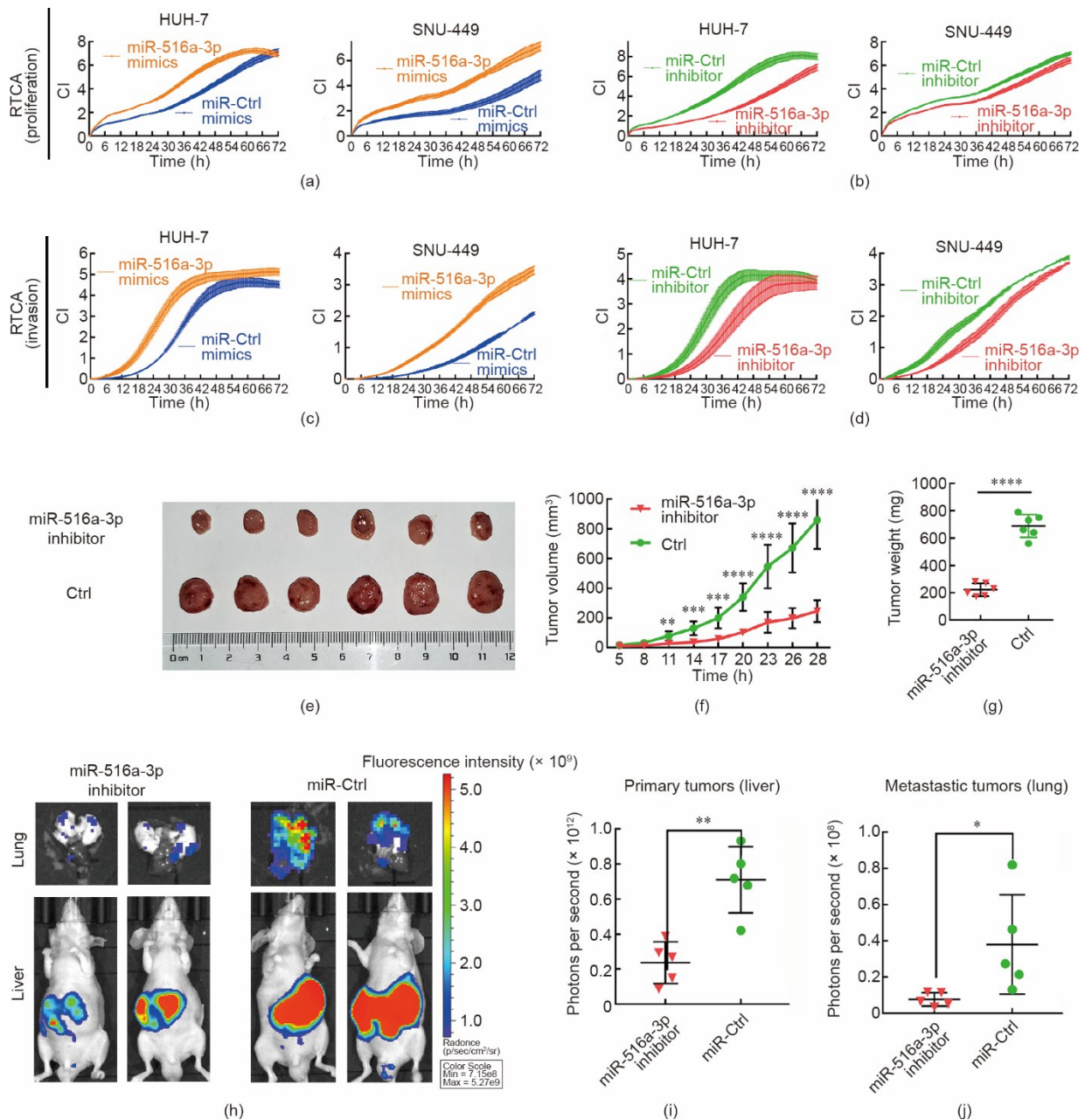


图 2. miR-516a-3p 在体内外导致 HCC 细胞成为恶性肿瘤。(a)、(b) RTCA 记录了转染 miR-516a-3p 模拟物和 miR-516a-3p 抑制剂或其对照物之后 HUH-7 和 SNU-449 的细胞增殖指数; (c)、(d) CI 的变化反映了 RTCA 转染 miR-516a-3p 模拟物或抑制剂后 HUH-7 和 SNU-449 的侵袭性; (e) ~ (g) 使用稳定的 miR-516a-3p 表达抑制剂的 LM3 细胞及其对照以建立异种小鼠模型; (h) ~ (j) HCC 原位小鼠模型的生物发光成像, 反映了腹腔肿瘤负荷和接种稳定的 miR-516a-3p 表达抑制剂的 LM3 细胞或对照组后的肺转移。

瘤)和肺部(转移肿瘤)的肿瘤负担均较低[见图2(h)~(j)和附录A中的图S6]。

3.3. miR-516a-3p通过外泌体在HCC细胞之间传递并增加受体细胞的致癌活性

将Cy3标记的miR-516a-3p转染的SNU-449细胞(供体细胞)与未经处理的SNU-449细胞(受体细胞)共同培养。观察到,在共培养24 h后,受体细胞发出强烈的Cy3-miR-516a-3p荧光(见附录A中的图S7),表明miR-516a-3p可以在HCC细胞之间转移。

进一步评估了外泌体介导的HCC细胞间的miR-516a-3p传递。将GW4869添加到共培养系统中,观察到受体

细胞的Cy3荧光显著减弱[图3(a)]。此外,在含有GW4869或二甲基亚砜(DMSO)的无血清培养基中培养供体细胞24 h,然后收集培养基并将其转移到受体细胞。结果发现,GW4869也削弱了受体细胞对Cy3荧光的吸收[图3(b)]。

接下来,从miR-516a-3p过表达的SNU-449细胞中分离出外泌体(^{exo}516a-3dp)。通过透射电子显微镜确定该外泌体直径约为100 nm[见附录A中的图S8(a)]。动态光散射(DLS)用于描述水合颗粒的分布[见附录A中的图S8(b)]。阳性外泌体标记(CD9、CD81、CD63、TSG101、HSP70和HSP90)进一步证实了纯化外泌体的

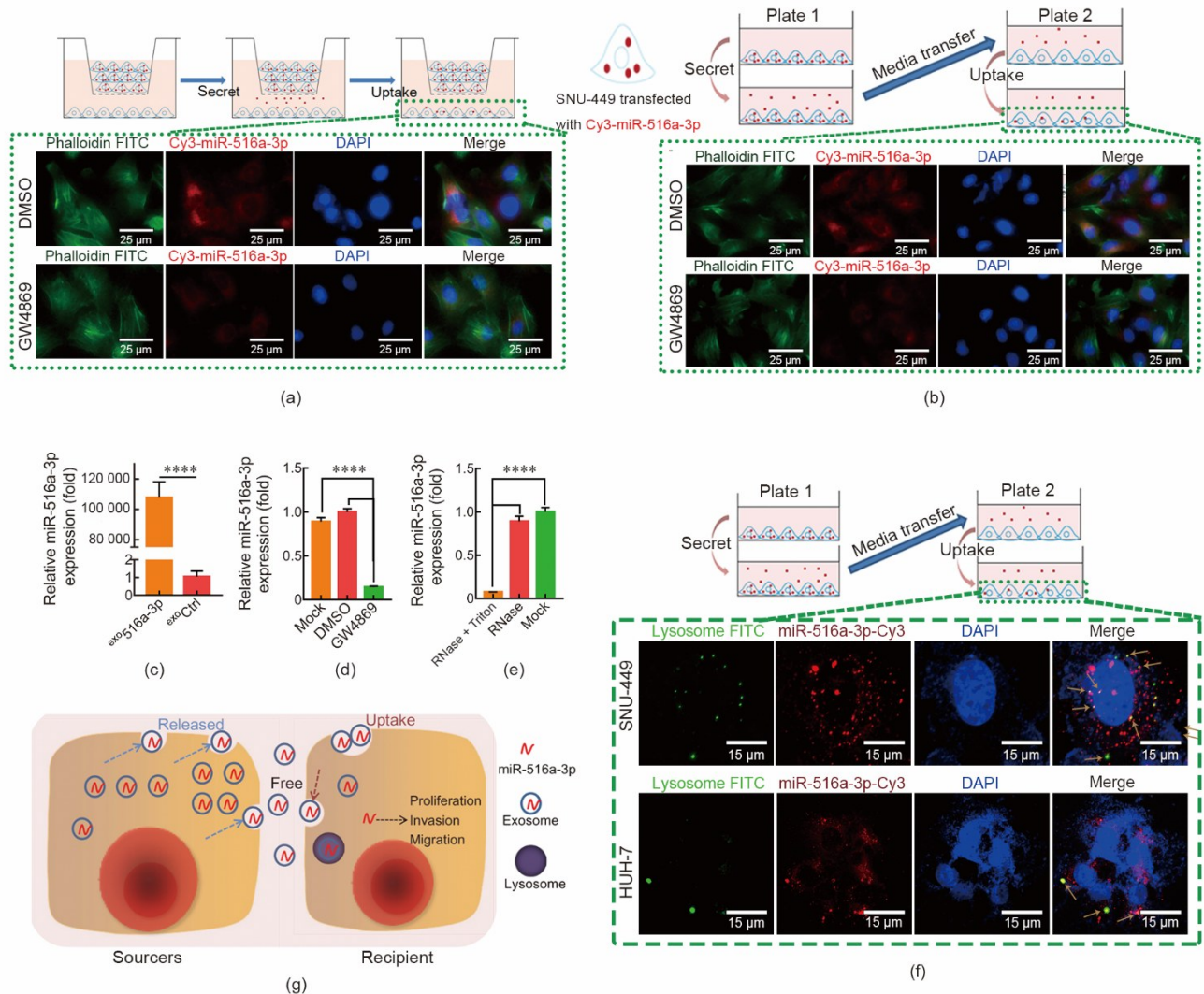


图3. miR-516a-3p通过外泌体在HCC细胞之间转移。(a)使用GW4869或DMSO处理共培养系统24 h后,用红色荧光信号(Cy3)观察受体细胞(绿色虚线);(b)供体细胞与GW4869或DMSO培养24 h后,将培养基转移至受体细胞(绿色虚线),观察到红色荧光信号(Cy3);(c)实时PCR分析^{exo}516a-3p外泌体与^{exo}Ctrl外泌体的miR-516a-3dp表达水平;(d)实时PCR分析用GW4869、DMSO处理及空白对照组中过表达miR-516a-3p的SNU-449细胞外泌体中miR-516a-3p的表达水平;(e)实时PCR分析使用RNase或结合Triton X-100处理的RNase中miR-516a-3p过表达的SNU-449细胞外泌体的miR-516a-3p表达水平;(f)用FITC溶酶体对SNU-449细胞和HUH-7(绿色虚线)进行染色,并用共焦荧光显微镜进行观察,箭头表示Cy3标记的miR-516a-3p和溶酶体的共定位;(g)示意图表明,在HCC细胞中实现了miR-516a-3p通过外泌体进行转移。DAPI: 4,6-二氨基-2-苯基喹啶; DMSO: 二甲基亚砜; FITC: 异硫氰酸荧光素; RNase: 核糖核酸酶; ^{exo}516a-3p: 分离的外泌体; ^{exo}Ctrl: 外泌体控制。

特性[见附录A中的图S8(c)]。提取外泌体miRNA,并发现与外泌体对照组($^{exo}Ctrl$)相比,miR-516a-3p在 $^{exo}516a-3p$ 中大量富集[图3(c)]。GW4869显著抑制了 $^{exo}516a-3p$ 的释放[图3(d)]。进一步使用Triton X-100破坏外泌体的膜并释放其中包裹的内容物。然后使用核糖核酸酶(RNase)降解外泌体miR-516a-3p[图3(e)]。有趣的是,在将受体细胞用供体细胞的培养基处理后,用异硫氰酸荧光素(FITC)-溶酶体荧光标记溶酶体,发现Cy3-miR-516a-3p与FITC-lysosome产生共定位[图3(f)]。

进一步评估外泌体介导下miR-516a-3p转移在HCC细胞中的作用。用纯化的 $^{exo}516a-3p$ 培养SNU-449和HUH-7细胞24h后,发现这些细胞中miR-516a-3p表达显著增加[见附录A中的图S9(a)]。受体细胞中肿瘤恶化程度显著增强,包括细胞簇形成、细胞增殖、迁移和侵袭性[见附录A中的图S9(b)~(e)]。因此,研究认为外泌体介导下RNA传递在miR-516a-3p诱导HCC细胞致癌活性的增加中起着重要作用[图3(g)]。

3.4. 多组学网络发现策略揭示三个“组学”的相关性和差异性

本研究进行了转录组学、蛋白质组学和代谢组学分析,以绘制多组学miR-516a-3p调节的分子网络。为了成功地选择每个组学中的代表变量,采用用于组学研究的DIABLO方法模型——一种用于整合相关生物过程和区分不同表型的多组学方法[见附录A中的图S10(A)和(b)]。接下来,进行了偏最小二乘判别分析(PLS-DA),并创建了聚类热图,以证明数据集的可变表达谱可以将过表达miR-516a-3p的SNU-449细胞与对照细胞区分开来[见图4(a)和附录A中的图S10(c)]。然后,构建了数据集相关性的概述,最终确定了强相关性,遵循“中心法则”[图4(b)]。通过变量相关性分析,Circos图表明三个组学的变量是相互关联的[图4(c)]。从圆形相关系数图中,发现蛋白质组学和代谢组学数据集之间基于聚类的一致性,该图可以将数据的相关性程度更好地可视化。相反,转录组变量则与其他两个数据集相对分离[图4(d)]。当将多组学变量的特征转换为可视化集合时,通过成分分析进一步验证了这些结果。蛋白质组学和代谢组学中的变量紧密聚集在一起,而转录组学的变量与其他两个数据集相对不同[图4(e)]。

3.5. 蛋白质组学的深度分析揭示miR-516a-3p通过直接抑制6个核心靶点调控HCC细胞的代谢

进行蛋白质组学筛选以探索影响miR-516a-3p的分

子。在过表达miR-516a-3p的SNU-449细胞和对照细胞之间,有248个蛋白质的表达存在显著差异[图5(a)]。KEGG分析表明,差异表达的蛋白质在代谢途径中显著富集,包括碳代谢、氨基酸生物合成、嘧啶代谢、嘌呤代谢、糖酵解/糖异生和戊糖磷酸途径[图5(b)]。值得注意的是,miR-516a-3p的过表达全面上调了在代谢途径中富集的蛋白质[图5(c)]。

为了确定miR-516a-3p的直接靶点,将下调蛋白与miR-516a-3p(TargetScan)的潜在靶点重叠,发现了16个候选蛋白[图5(d)]。为了将潜在靶点与富集路径相关联,进一步使用Mantel检验。最后,6种蛋白质(LM-BR1、CHST9、RBM3、SLC7A6、PTGFRN和NOL12)被证明是miR-516a-3p的直接靶点,构成了一个蛋白质相互作用网络,在调节富集代谢途径中发挥着中心作用[图5(d)]。此外,这6个蛋白与其他差异表达蛋白显著相关,表明它们在miR-516a-3p相互作用分子中的中心作用(见附录A中的图S11)。接下来,使用实验方法确认6种蛋白全部都是HCC细胞中miR-516a-3p的直接靶点。首先,正如蛋白质印迹法分析所检测到的,在miR-516a-3p的作用下,6个靶点的表达水平下调(见附录A中的图S12)。此外,构建了包含6个候选靶点(LM-BR1、CHST9、RBM3、SLC7A6、PTGFRN和NOL12)的野生型或突变型3'UTR的荧光素酶报告载体[见附录A中的图S13(a)],并进行了双荧光素酶报告分析。在与miR-516a-3p和野生型3'UTR载体共转染后,荧光素酶的活性受到不同程度的抑制,而突变型对应组没有出现这种情况[见附录A中的图S13(b)]。因此,蛋白质组学与实验证据的结合为miRNA靶点的研究提供了新的见解。

本文还比较了差异转录组图谱[见附录A中的图S14(a)和(b)]。KEGG分析显示了差异基因在代谢途径中有显著富集[见附录A中的图S14(c)]。将下调基因与miR-516a-3p(TargetScan 7.2)的潜在靶点重叠,发现22个候选基因[见附录A中的图S14(d)]。然而,它们都与富集路径和其他差异表达基因没有显著相关性[见附录A中的图S14(d)和(e)]。

3.6. miR-516a-3p使嘌呤和嘧啶代谢物在HCC细胞中异常累积

进行非靶向代谢组学研究,以验证miR-516a-3p对HCC代谢调节的影响。主成分分析(PCA)和PLS-DA用于质量控制[见附录A中的图S15(a)]。在过表达miR-516a-3p的SNU-449细胞和对照细胞之间,在正离子模式和负离子模式下,分别有81个和92个显著差异表达的化

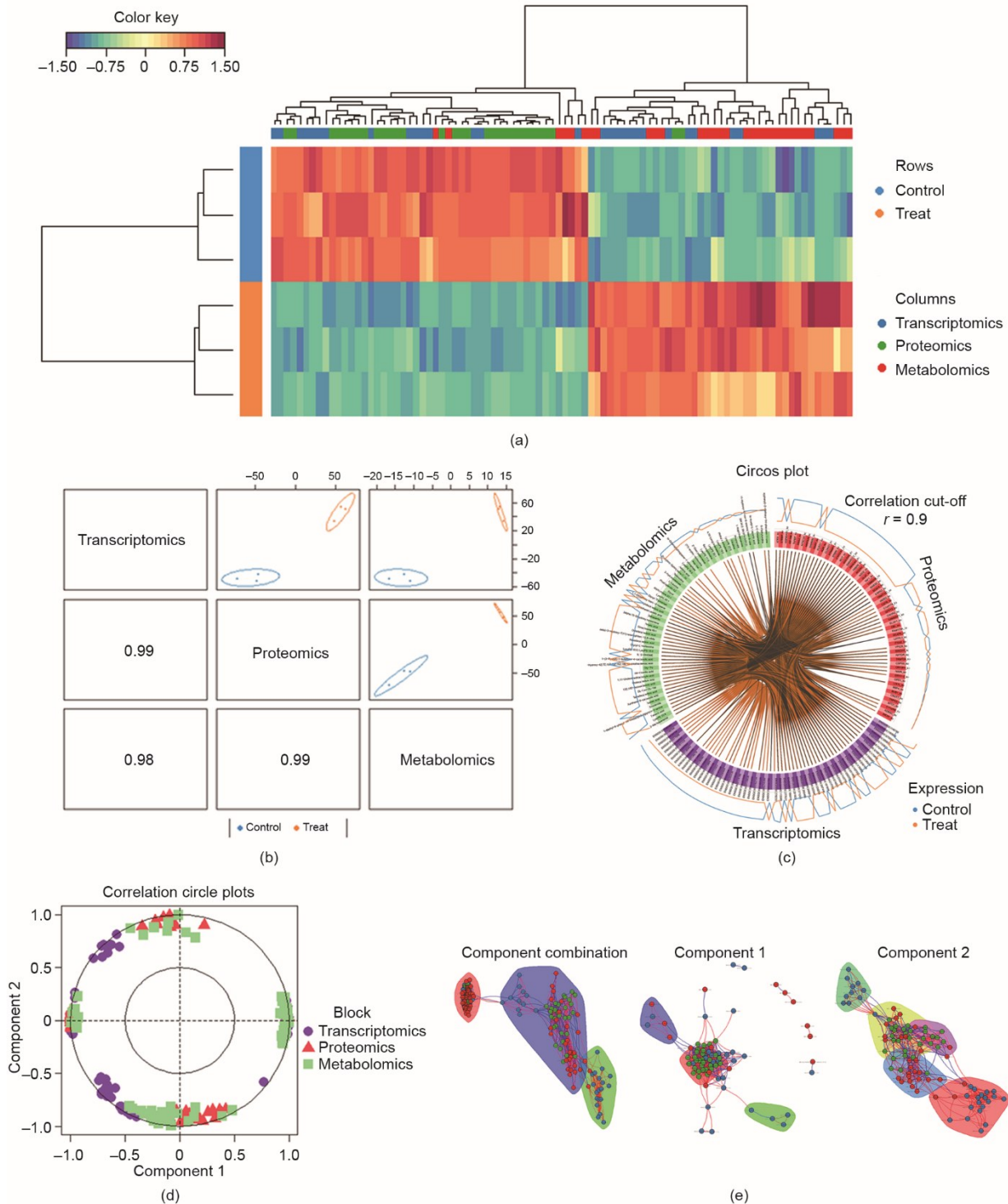


图4. 转录组学与蛋白质组学和代谢组学相对关联并有所区别。(a) 三个组学中所选变量的聚类热图；(b) 相关性结构表明，蛋白质组学、转录组学和代谢组学与所选变量之间有很强的相关性；(c) Circos图表示不同组学中所选变量的相互关系；(d) 圆形相关系数图强调了每个选定变量对相对关联性的贡献，每个变量点的位置表明了相关性和区分程度；(e) 在不同水平上整合多组学的社区相关网络，根据相关性，紧密关联的变量被自动聚类为不同社区。

合物[见图6(a)和附录A中的图S15(b)]。使用MetaboAnalyst 4.0进行Mummichog分析，结果表明，通过过表达miR-516a-3p诱导的代谢特征与嘌呤代谢、嘧啶代谢、鞘脂代谢、柠檬酸循环、色氨酸代谢、甘油磷脂代

谢、亚油酸代谢、花生四烯酸代谢以及乙醛酸和二羧酸代谢途径相关[图6(b)]。

进一步重叠蛋白质组学和代谢组学中的富集途径。共通路分析揭示了嘌呤和嘧啶代谢在miR-516a-3p介导网络

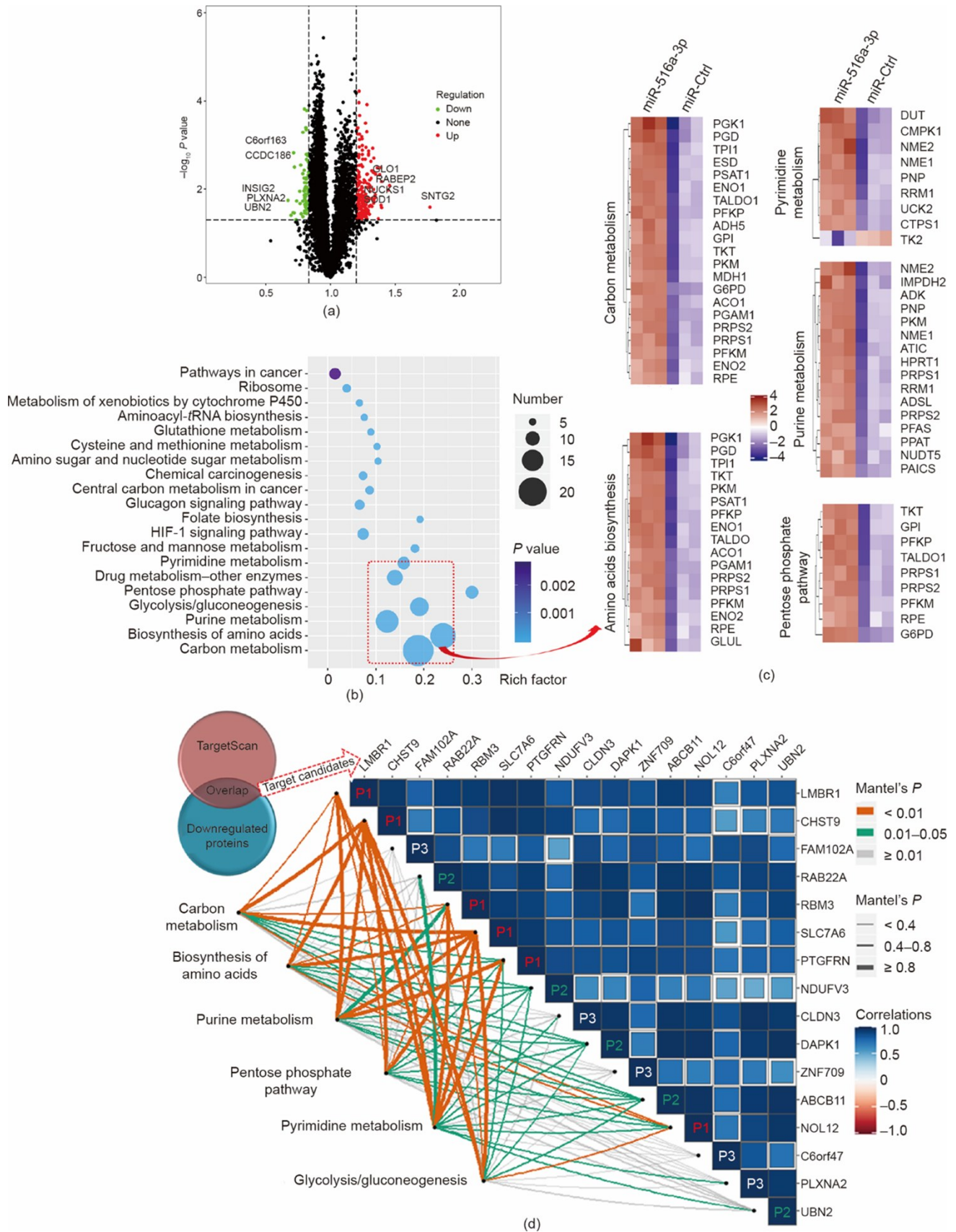


图5. 蛋白质组学显示，miR-516a-3p通过直接抑制6个核心靶点来调节HCC细胞的代谢。(a)火山图展示了miR-516a-3p组和miR对照组之间的差异蛋白质组变量；(b)气泡图显示了蛋白质组学中最重要20个KEGG条目；(c)富含关键代谢途径的蛋白质的表达水平；(d)彩色线条显示了目标蛋白与蛋白质组学富集途径之间的相关性，蓝色三角形图显示了目标蛋白质之间的相关性。红色的“P1”突出了相关性最强的目标。

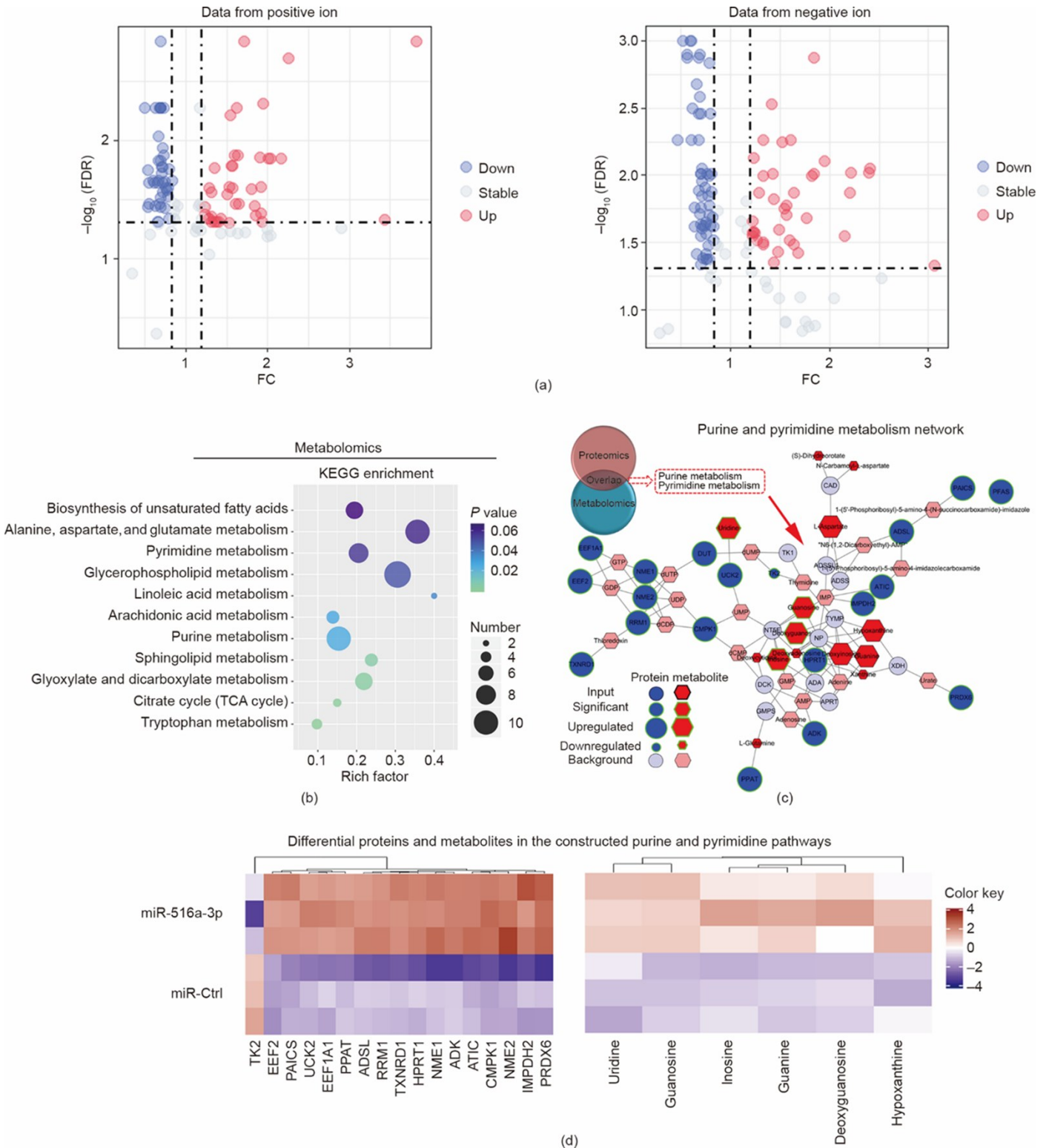


图6. 代谢组学和蛋白质组学的结合表明，miR-516a-3p在HCC细胞中异常积累嘌呤和嘧啶代谢物。(a)火山图表明，代谢组学中正（左）和负（右）离子模式的差异代谢物均可以区分miR-516a-3p组和miR对照组；(b)气泡图显示了使用MetaboAnalyst 4.0进行Mummichog分析的代谢组学的重要路径项目；(c)分支网络直观地显示了由miR-516a-3p控制的蛋白质和代谢物水平中嘌呤和嘧啶途径的激活；(d)热图显示miR-516a-3p上调了嘌呤和嘧啶代谢途径中富含的关键蛋白和代谢物的表达水平。FDR：错误发现率；FC：折叠变化。

中的潜在中心作用[图6 (c)]。miR-516a-3p的过表达显著上调了嘌呤和嘧啶途径中的蛋白质（EEF2、PAICS、

UCK2、NME1、NME2、CMPK1等）和代谢物（尿苷、鸟苷、肌苷、鸟嘌呤、脱氧鸟苷和次黄嘌呤）[图6 (d)]。

4. 讨论

许多方法已被用于探索肿瘤特异性miRNA。由于TCGA数据库样本量大、肿瘤类型多样、临床数据充足，因此受到广泛研究。通过TCGA miRNA图谱，筛选出4名C19MC成员，这些成员在HCC显著解除管制的pre-miRNA中排名靠前，并且预测患者存活率较差。之前的两项研究表明，C19MC的其他成员（一项研究中的miR-519d、miR-519a和miR-519c-3p，另一项研究中的miR-517a和miR-510c）在HCC发育和进展中充当致癌基因[16–17]。越来越多的证据表明，miRNA簇成员可以作用于相同的肿瘤调节通路并表现出相似的作用[9,28]。因此，建议将miRNA簇视为一起作用（即作为一个“团队”），这可以比作几只蚂蚁共同工作以执行单一功能。

成熟的miRNA（而不是它们的pre-miRNA）在细胞生理病理学中发挥作用。有趣的是，4种致癌pre-miRNA共同剪接了相同的成熟miRNA，即miR-516a-3p。然后关注miR-516a-3p并观察其重要的临床价值。发现肿瘤中高水平的miR-516-3p与晚期HCC相关，并预测患者预后不良。将肿瘤miR-516a-3p水平纳入AJCC分期系统，大大提高了预测术后HCC复发和患者生存的诊断准确性。体外和体内实验进一步证明miR-516a-3p具有致癌性，导致恶性行为增强，包括增殖和侵袭。因此，建议将miR-516a-3p作为治疗HCC的新靶点，从而改善预后预测。

进一步证明，miR-516a-3p不仅会影响宿主或供体癌细胞，还影响在转移中起作用的其他细胞。miR-516a-3p可以通过外泌体传递，从而增加受体细胞的致癌性。通过外泌体抑制剂阻断细胞间交流，可降低miR-516a-3p转运和恶性行为传递。值得注意的是，转移的miR-516a-3p整合到受体细胞的溶酶体中，表明溶酶体参与了外泌体内容物的释放。这些结果与以前报道[29–30]的一致。这些发现有助于理解癌细胞之间的合作，并可提供一种治疗策略来控制癌症进展过程中细胞的相互作用。

对miR-516-3p的功能进行了多组学分析。显著差异表达的基因、蛋白质和代谢物的富集表明，miR-516-3p触发的致癌信号在代谢调节中起着核心作用。通过对蛋白质组学的深入分析，构建一个完整的蛋白质相互作用网络，并确定了miR-516-3p调控的异常代谢中的6个关键参与者：蛋白质LMBR1、CHST9、RBM3、SLC7A6、PTGFRN和NOL12。根据以往研究，其中LMBR1 [31]和RBM3 [32]参与胰岛素信号转导和葡萄糖代谢；而PTGFRN与脂滴积累有关[33]；NOL12在RNA代谢和DNA维护中至关重要[34]；SLC7A6则是氨基酸转运蛋白[35]。在

本研究中，确认miR-516-3p直接靶向这6种核心蛋白。进一步构建6个蛋白紧密相连的蛋白质网络，随后评估了这6个蛋白如何调节癌症代谢，如碳代谢、嘌呤和嘧啶代谢。因此，通过蛋白质组学产生的靶点-通路相互作用网络，从一个新的角度显著地展示了miRNA的机制和功能。

代谢组学可以更好地理解癌症代谢失调。本研究结果与蛋白质组学数据高度一致，表明miR-516-3p激活了包括嘌呤代谢、嘧啶代谢、氨基酸代谢和不饱和脂肪酸代谢的代谢途径。蛋白质组学和代谢组学数据集的综合分析进一步揭示了嘌呤和嘧啶代谢在miR-516a-3p诱导的代谢失调中的关键作用。嘌呤和嘧啶代谢涉及异常的DNA复制和RNA合成，促进了癌细胞的失控增殖以及积极的表型维持[36–37]。嘌呤和嘧啶代谢的增强是致癌和癌症发展的标志[37–38]。Ma等[39]证实嘌呤代谢的激活促进了HCC的进展。Santana Codina等[40]表明，致癌的kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因（KRAS）通过触发核苷酸合成促进胰腺癌。Feng等[41]证明UHMK1通过激活嘌呤合成引发胃癌。此外，本研究中确定的丰富代谢途径彼此密切相关，对恶性行为具有协同作用。例如，一种碳代谢和戊糖磷酸途径的激活可以为嘌呤和嘧啶代谢物的从头合成提供必要的碳源[42]。然而，在本研究中，在非靶向代谢组学中无法识别富含碳代谢途径的代谢物，这是该方法产生的不可避免的偏差[43]。

相信多组学策略是一种非常有前途的方法，可用于揭示miR-516-3p的关键生物学功能。由于miRNA通过翻译抑制或mRNA降解来抑制靶标，因此大多数miRNA的功能探索都是从根据匹配的种子区域识别靶mRNA开始，并在特定通路结束。然而，众所周知，miRNA具有许多潜在靶标并通过多种途径进行生物活动。多组学研究不仅提供了一种检测直接和间接目标的高效方法，而且还提供了一个全面的分子筛选网络。综合分析可以进一步识别复杂网络的核心机制。此外，虽然在转录组学的单一维度上没有提出有价值的目标，但使用基于聚类的算法来发现转录组学数据与蛋白质组学和代谢组学数据的偏差是非常有趣的，表明细胞病理生理学中转录和翻译控制之间的差异。大蛋白和小代谢物之间的相互作用在控制各种细胞过程中起着重要作用[44]，因此值得更多关注。

应该指出的是，使用转录组学来探索miRNA的靶点有一个缺点。本研究未能确定转录组学的目标候选基因是否与富集途径和其他差异表达基因显著相关。这可能是由于miR-516a-3p的作用依赖于对mRNA翻译的抑制，而不是mRNA降解。因此，蛋白质组学是研究miRNA靶点的首选技术。

本研究仍有一些局限性。首先，miR-516-3p的临床价值需要在样本量较大的不同种族群体中进行验证。其次，多组学分析只提供了miR-516-3p介导的综合分子网络的鸟瞰图。针对某些细胞代谢和致癌活动的特定途径的细节需要进一步确认。再次，非靶向代谢组学无法完全检测氨基酸代谢或碳代谢中的代谢物。为了分析特定的代谢途径并避免产生偏见，首选靶向代谢组学。

总之，本研究结果已经证明，对共剪接成熟miRNA产物的分析可能是研究miRNA簇功能的一种新策略。这项研究通过探索一种成熟的miRNA，揭示C19MC 4个关键成员的致癌性，这或许可以被称为“一石二鸟”（killing four birds with one stone）。miR-516a-3p可以增强肿瘤的恶性行为，并通过外泌体传递系统影响邻近的HCC细胞。这一发现有望为HCC治疗和预后预测提供一个新的分子靶点。此外，据了解，本研究是第一个使用多组学方法探索miRNA功能的研究，具有多种优点。这一综合分析为miRNA调控癌症代谢和恶性活动提供了新的思路。

致谢

本研究得到了国家自然科学基金项目(81771713和81721091)和浙江省自然科学基金项目(LR18H030001)的资助。

Authors' contributions

Tao Rui, Qi Ling, and ShusenZheng performed and organized the study. Shusen Zheng and Qi Ling provided funding support. Tao Rui performed most of the experiments. Xueyou Zhang and Shi Feng participated in bioinformatic analyses. Lin Zhou and Haiyang Xie contributed to the analysis of clinical information. Tao Rui, Qi Ling, ShaoweiZhan, and Haitao Huang finished the statistical analysis. Tao Rui and Qi Ling finished the manuscript. Shusen Zheng reviewed the manuscript. All authors have approved the final manuscript.

Compliance with ethics guidelines

Tao Rui, Xueyou Zhang, Shi Feng, Haitao Huang, Shaowei Zhan, Haiyang Xie, Lin Zhou, Shusen Zheng,

and Qi Ling declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

References

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 2018; 68(1):7–30.
- [2] Cronin KA, Lake AJ, Scott S, Sherman RL, Noone AM, Howlander N, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, part I: national cancer statistics. *Cancer* 2018;124(13):2785–800.
- [3] Ryder SD. Guidelines for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma (HCC) in adults. *Gut* 2003;52:iii1–8.
- [4] Bruix J, Qin S, Merle P, Granito A, Huang YH, Bodoky G, et al. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2017;389(10064):56–66.
- [5] Livraghi T, Meloni F, Di Stasi M, Rolle E, Solbiati L, Tinelli C, et al. Sustained complete response and complications rates after radiofrequency ablation of very early hepatocellular carcinoma in cirrhosis: is resection still the treatment of choice? *Hepatology* 2008;47(1):82–9.
- [6] Bruix J, Sala M, Llovet JM. Chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004;127(5 Suppl 1):S179–88.
- [7] Sapisochin G, Bruix J. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: outcomes and novel surgical approaches. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017; 14(4):203–17.
- [8] Berindan-Neagoe I, Monroig PDC, Pasculli B, Calin GA. MicroRNAome genome: a treasure for cancer diagnosis and therapy. *CA Cancer J Clin* 2014; 64(5): 311–36.
- [9] Wang Y, Luo J, Zhang H, Lu J. microRNAs in the same clusters evolve to coordinately regulate functionally related genes. *Mol Biol Evol* 2016; 33(9): 2232–47.
- [10] Kabekkodu SP, Shukla V, Varghese VK, D'Souza J, Chakrabarty S, Satyamoorthy K. Clustered miRNAs and their role in biological functions and diseases. *Biol Rev* 2018;93(4):1955–86.
- [11] Gennarino VA, D' Angelo G, Dharmalingam G, Fernandez S, Russolillo G, Sanges R, et al. Identification of microRNA-regulated gene networks by expression analysis of target genes. *Genome Res* 2012;22(6):1163–72.
- [12] Pagliuca A, Valvo C, Fabrizi E, di Martino S, Biffoni M, Runci D, et al. Analysis of the combined action of miR-143 and miR-145 on oncogenic pathways in colorectal cancer cells reveals a coordinate program of gene repression. *Oncogene* 2013;32(40):4806–13.
- [13] Noguer-Dance M, Abu-Amero S, Al-Khtib M, Lefevre A, Coullin P, Moore GE, et al. The primate-specific microRNA gene cluster (C19MC) is imprinted in the placenta. *Hum Mol Genet* 2010;19(18):3566–82.
- [14] Rui T, Xu S, Zhang X, Huang H, Feng S, Zhan S, et al. The chromosome 19 microRNA cluster, regulated by promoter hypomethylation, is associated with tumour burden and poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *J Cell Physiol* 2020;235(9):6103–12.
- [15] Augello C, Vaira V, Caruso L, Destro A, Maggioni M, Park YN, et al. MicroRNA profiling of hepatocarcinogenesis identifies C19MC cluster as a novel prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2012;32(5): 772–82.
- [16] Fornari F, Milazzo M, Chieco P, Negrini M, Marasco E, Capranico G, et al. In hepatocellular carcinoma miR-519d is up-regulated by p53 and DNA hypomethylation and targets CDKN1A/p21, PTEN, AKT3 and TIMP2. *J Pathol* 2012;227(3):275–85.
- [17] Toffanin S, Hoshida Y, Lachenmayer A, Villanueva A, Cabellos L, Mínguez B, et al. MicroRNA-based classification of hepatocellular carcinoma and oncogenic role of miR-517a. *Gastroenterology* 2011;140(5):1618–28.e16.
- [18] Mills J, Capece M, Cocucci E, Tessari A, Palmieri D. Cancer-derived extracellular vesicle-associated microRNAs in intercellular communication: one cell's trash is another cell's treasure. *Int J Mol Sci* 2019;20(24):6109.
- [19] Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014;30(1):255–89.
- [20] Delorme-Axford E, Bayer A, Sadovsky Y, Coyne CB. Autophagy as a mechanism of antiviral defense at the maternal-fetal interface. *Autophagy* 2013; 9(12):2173–4.

- [21] Delorme-Axford E, Donker RB, Mouillet JF, Chu T, Bayer A, Ouyang Y, et al. Human placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(29):12048–53.
- [22] Bullerdiek J, Flor I. Exosome-delivered microRNAs of “chromosome 19 microRNA cluster” as immunomodulators in pregnancy and tumorigenesis. *Mol Cytogenet* 2012;5(1):27.
- [23] Zhang X, Ye P, Huang H, Wang B, Dong F, Ling Q. TCF7L2 rs290487 C allele aberrantly enhances hepatic gluconeogenesis through allele-specific changes in transcription and chromatin binding. *Aging* 2020;12(13):13365–87.
- [24] Chong J, Soufan O, Li C, Caraus I, Li S, Bourque G, et al. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res* 2018;46(W1):W486–94.
- [25] Singh A, Shannon CP, Gautier B, Rohart F, Vacher M, Tebbutt SJ, et al. DIABLO: an integrative approach for identifying key molecular drivers from multi-omics assays. *Bioinformatics* 2019;35(17):3055–62.
- [26] Karnovsky A, Weymouth T, Hull T, Tarcea VG, Scardoni G, Laudanna C, et al. Metscape 2 bioinformatics tool for the analysis and visualization of metabolomics and gene expression data. *Bioinformatics* 2012;28(3):373–80.
- [27] Rui T, Zhang X, Feng S, Huang H, Zhan S, Xie H, et al. The similar effects of miR-512-3p and miR-519a-2-5p on the promotion of hepatocellular carcinoma: different tunes sung with equal skill. *Front Oncol* 2020;10:1244.
- [28] Meunier J, Lemoine F, Soumillon M, Liechti A, Weier M, Guschanski K, et al. Birth and expression evolution of mammalian microRNA genes. *Genome Res* 2013;23(1):34–45.
- [29] Heusermann W, Hean J, Trojer D, Steib E, von Bueren S, Graff-Meyer A, et al. Exosomes surf on filopodia to enter cells at endocytic hot spots, traffic within endosomes, and are targeted to the ER. *J Cell Biol* 2016;213(2):173–84.
- [30] Tian T, Wang Y, Wang H, Zhu Z, Xiao Z. Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy. *J Cell Biochem* 2010;111(2):488–96.
- [31] Tseng LL, Lin CL, Tzen KY, Chang SC, Chang MF. LMBD1 protein serves as a specific adaptor for insulin receptor internalization. *J Biol Chem* 2013; 288(45):32424–32.
- [32] Shi H, Yao R, Lian S, Liu P, Liu Y, Yang YY, et al. Regulating glycolysis, the TLR4 signal pathway and expression of RBM3 in mouse liver in response to acute cold exposure. *Stress* 2019;22(3):366–76.
- [33] Orlicky DJ, Lieber JG, Morin CL, Evans RM. Synthesis and accumulation of a receptor regulatory protein associated with lipid droplet accumulation in 3T3-L1 cells. *J Lipid Res* 1998;39(6):1152–61.
- [34] Scott DD, Trahan C, Zindy PJ, Aguilar LC, Delubac MY, Van Nostrand EL, et al. Nol12 is a multifunctional RNA binding protein at the nexus of RNA and DNA metabolism. *Nucleic Acids Res* 2017;45(21):12509–28.
- [35] Liu P, Ge M, Hu J, Li X, Che L, Sun K, et al. A functional mammalian target of rapamycin complex 1 signaling is indispensable for c-Myc-driven hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2017;66(1):167–81.
- [36] Vander Heiden MG, DeBerardinis RJ. Understanding the intersections between metabolism and cancer biology. *Cell* 2017;168(4):657–69.
- [37] Villa E, Ali ES, Sahu U, Ben-Sahra I. Cancer cells tune the signaling pathways to empower de novo synthesis of nucleotides. *Cancers* 2019;11(5):688.
- [38] Yin J, Ren W, Huang X, Deng J, Li T, Yin Y. Potential mechanisms connecting purine metabolism and cancer therapy. *Front Immunol* 2018;9:1697.
- [39] Ma F, Zhu Y, Liu X, Zhou Q, Hong X, Qu C, et al. Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 3 loss activates purine metabolism and promotes hepatocellular carcinoma progression. *Hepatology* 2019;70(5):1785–803.
- [40] Santana-Codina N, Roeth AA, Zhang Yi, Yang A, Mashadova O, Asara JM, et al. Oncogenic KRAS supports pancreatic cancer through regulation of nucleotidesynthesis. *Nat Commun* 2018;9(1):4945.
- [41] Feng X, Ma D, Zhao J, Song Y, Zhu Y, Zhou Q, et al. UHMK1 promotes gastric cancer progression through reprogramming nucleotide metabolism. *Embo J* 2020;39(5):e102541.
- [42] Newman AC, Maddocks ODK. One-carbon metabolism in cancer. *Br J Cancer* 2017;116(12):1499–504.
- [43] Ribbenstedt A, Ziarrusta H, Benskin JP, Schopfer FJ. Development, characterization and comparisons of targeted and non-targeted metabolomics methods. *PLoS ONE* 2018;13(11):e0207082.
- [44] Piazza I, Kochanowski K, Cappelletti V, Fuhrer T, Noor E, Sauer U, et al. A map of protein-metabolite interactions reveals principles of chemical communication. *Cell* 2018;172(1–2):358–72.e23.