

• 论 著 •

lncRNA MIR100HG 与肝细胞癌恶性生物学行为的相关性 及其与 hsa-miR-2355-3p 调控关系的研究

王 霞

南京医科大学附属淮安第一医院医学检验中心, 江苏淮安 223300

摘要:目的 探讨长链非编码 RNA(lncRNA)MIR100HG 在肝细胞癌组织中的表达及临床意义,并验证 lncRNA MIR100HG 与 hsa-miR-2355-3p 的调控关系及其对肝细胞癌细胞迁移和侵袭能力的影响。方法 采用实时荧光定量 PCR 检测 cDNA 芯片中 lncRNA MIR100HG 和 hsa-miR-2355-3p 的表达;分析肝细胞癌组织中 lncRNA MIR100HG 相对表达水平与患者临床病理参数及预后的关系;采用双荧光素酶报告实验验证 lncRNA MIR100HG 与 hsa-miR-2355-3p 之间的调控关系;通过 Transwell 实验验证 lncRNA MIR100HG 与 hsa-miR-2355-3p 对肝细胞癌细胞系 HepG2 迁移和侵袭能力的影响。结果 相较于 hsa-miR-2355-3p 在肝细胞癌组织中的表达下调, lncRNA MIR100HG 在肝细胞癌组织中异常高表达,肝细胞癌组织中 lncRNA MIR100HG 高表达组中肿瘤最大径越大,更倾向于淋巴结转移、血管侵犯、肿瘤远处转移;血清 γ -谷氨酰转氨酶水平越高,肿瘤 TNM 分期越高,更倾向于肿瘤复发。在 TNM I ~ IV 期、TNM I 期、TNM II 期的肝细胞癌患者中, lncRNA MIR100HG 高表达组患者总体生存率和无复发生存率较低表达组显著降低。多因素回归分析显示, lncRNA MIR100HG 异常高表达是肝细胞癌患者预后不良的独立危险因素。Transwell 实验表明,下调 hsa-miR-2355-3p 能够逆转 lncRNA MIR100HG 沉默介导的对肝细胞癌侵袭和迁移的抑制作用;双荧光素酶报告实验表明, lncRNA MIR100HG 可能与 hsa-miR-2355-3p 存在物理学上的结合位点。结论 lncRNA MIR100HG 异常高表达与肝细胞癌恶性生物学行为密切相关,其可能通过介导 hsa-miR-2355-3p 促进肝细胞癌迁移和侵袭。

关键词:肝细胞癌; 预后; 迁移

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2024.03.020

中图法分类号:R735.7

文章编号:1673-4130(2024)03-0365-08

文献标志码:A

Correlation between lncRNA MIR100HG and malignant biological behavior of hepatocellular carcinoma and its relationship with the regulation of hsa-miR-2355-3p

WANG Xia

Department of Medical Laboratory Center, Huai'an First Hospital Affiliated to
Nanjing Medical University, Huai'an, Jiangsu 223300, China

Abstract: **Objective** To investigate the expression and clinical significance of long non-coding RNA(lncRNA) MIR100HG in hepatocellular carcinoma tissues, and to verify the regulatory relationship of lncRNA MIR100HG and hsa-miR-2355-3p and its effect on migration and invasion ability of hepatocellular carcinoma cell. **Methods** Real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the expressions of lncRNA MIR100HG and hsa-miR-2355-3p in cDNA chips; the correlation between the lncRNA MIR100HG relative expression level in hepatocellular carcinoma tissues and clinicopathological parameters as well as prognosis were analyzed, dual luciferase reporter assay was applied to verify the regulatory relationship between lncRNA MIR100HG and hsa-miR-2355-3p, the effects of lncRNA MIR100HG and hsa-miR-2355-3p on the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cell line HepG2 were utilized by Transwell assay. **Results** Compared with the down-regulated expression of hsa-miR-2355-3p in hepatocellular carcinoma tissues, lncRNA MIR100HG was abnormally highly expressed in hepatocellular carcinoma tissues. In hepatocellular carcinoma tissues, lncRNA MIR100HG high-expression group had larger tumor maximum diameter, and were more prone to lymph node metastasis, vascular invasion, and distant tumor metastasis. The higher the level of serum gamma-glutamyl transpeptidase, the higher the TNM stage of tumor and the more inclined to tumor recurrence. In patients with hepatocellular carcinoma in TNM-stage I to IV, TNM-stage I and TNM-stage II, the overall survival rate and relapse-free survival rate of patients in the high expression group of lncRNA

MIR100HG were significantly lower than those in the low expression group. Multivariate regression analysis showed that abnormally high expression of lncRNA MIR100HG was an independent risk factor for poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. Transwell experiments showed that down-regulation of hsa-miR-2355-3p could reverse lncRNA MIR100HG silencing-mediated inhibition of invasion and migration of hepatocellular carcinoma cell; Dual luciferase reporter experiments indicated that lncRNA MIR100HG may interact with hsa-miR-2355-3p physically. **Conclusion** The abnormally high expression of lncRNA MIR100HG is closely related to the malignant biological behavior of hepatocellular carcinoma, which may promote hepatocellular carcinoma migration and invasion by mediating hsa-miR-2355-3p.

Key words: hepatocellular carcinoma; prognosis; migration

肝细胞癌是最常见的恶性肿瘤之一,也是全球癌症相关死亡的主要原因^[1]。2020 年,全球有近 90.6 万人被诊断出患有肝癌,其中最常见的类型是肝细胞癌^[2]。肝细胞癌是全球第三大癌症死亡原因,其 5 年生存率约为 18%^[3]。因此,迫切需要探索和识别诱导肿瘤进展的关键分子,明确其机制。长链非编码 RNA(lncRNA)属于长度超过 200 核苷酸的非编码 RNA,几乎不具备蛋白质编码的能力^[4],lncRNA 可以通过竞争性内源性 RNA 的方式调控微小 RNA(miRNAs)表达。越来越多的证据表明,lncRNA 在肝细胞癌发生发展过程中起到了重要作用^[5]。例如,lncRNA X-非活性特异性转录物通过 miR-192/三联基序蛋白 25 促进乙型肝炎病毒相关肝细胞癌细胞的增殖和迁移^[6]。有研究报道,miR-100-let-7a-2-miR-125b-1 宿主基因(MIR100HG)在结直肠癌、胃癌、三阴性乳腺癌、膀胱癌等多种恶性肿瘤中异常高表达,但是其在肝细胞癌中的表达和机制研究鲜有报道^[7-11]。因此,本研究通过检测 lncRNA MIR100HG 与 hsa-miR-2355-3p 在肝细胞癌组织中的表达并通过细胞实验分析二者的调控关系,探讨 lncRNA MIR100HG 对肝细胞癌发生、发展的影响。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017 年 6 月至 2018 年 10 月进行手术治疗的肝细胞癌患者 90 例作为研究对象,研究对象按照肿瘤 TNM 分期分为 TNM I 期 59 例、TNM II 期 24 例、TNM III 期 2 例、TNM IV 期 5 例。纳入标准:(1)完整的临床病理参数、随访资料;(2)肝细胞癌患者进行根治性手术前未接受放射治疗、化学治疗及靶向治疗。排除标准:(1)临床病理参数和随访资料缺失;(2)复发后继续选择手术治疗;(3)合并其他种类的肿瘤。每例患者取材肿瘤组织及对应的癌旁组织,癌旁组织距离肝细胞癌组织约 5 cm 以上。本研究使用 4 株肝细胞癌细胞系 HepG2、MH-CC97H、SK-HEP-1、SMMC-7721 和 1 株人正常肝脏细胞系 LO₂,HepG2、MHCC97H 由上海中科院细胞所提供,SK-HEP-1、SMMC-7721 购自于美国 ATCC 细胞库。

1.2 仪器与试剂 上海芯超生物有限公司提供 cD-

NA 芯片,芯片编号:HLivH180Su16,上海吉凯生物有限公司提供敲减 MIR100HG 的 3 个干扰片段(si-MIR100HG);上海生工生物有限公司提供 hsa-miR-2355-3p 类似物/抑制物、lncRNA MIR100HG 野生型、lncRNA MIR100HG 突变型双荧光素酶报告载体;美国赛默飞生物有限公司提供双荧光素酶报告基因检测试剂盒。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 肝细胞癌细胞系 SMMC-7721 在 RPMI 1640 中培养(含有 10%胎牛血清、1%青霉素、1%链霉素),其余细胞系在 DMEM 中培养,所有培养皿均置于 37℃、5%CO₂ 的湿润环境中培养。

1.3.2 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 lncRNA MIR100HG 和 hsa-miR-2355-3p 相对表达水平 使用 Trizol 试剂盒(购自美国赛默飞生物有限公司)提取细胞株中的总 RNA,随后将其逆转录为互补 DNA(cDNA),另外使用的 cDNA 芯片也是将组织抽提后的总 RNA 逆转录为 cDNA 后铺于微阵列。使用 qRT-PCR 试剂盒(购自美国西格玛生物有限公司)在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪上检测 lncRNA MIR100HG 和 hsa-miR-2355-3p 相对表达水平。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为 lncRNA MIR100HG 的内参,U6 为 hsa-miR-2355-3p 的内参,以 2^{-ΔΔC_t} 的形式表示相对表达水平,所用引物见表 1。

1.3.3 细胞迁移实验及侵袭实验 不同处理过的细胞在 12 孔板中进行培养,吸取细胞悬液加入 Transwell 上层小室中[侵袭实验在迁移实验基础上多铺一层基质胶(上层小室中),其余操作同迁移实验],将含有 10%胎牛血清的培养液加入到下层小室;当细胞密度达到 80%~90%时,将未通过筛孔的细胞用棉签刮去,磷酸缓冲盐溶液清洗掉受损的细胞,将通过筛孔的细胞使用 4%多聚甲醛固定后在显微镜下拍照。

1.3.4 细胞转染和双荧光素酶报告实验 取对数生长期 SMMC-7721 细胞并用含 10%胎牛血清的 DMEM 制备成单细胞悬液,均匀地接种于 6 孔板中,放置于 37℃、5%CO₂ 的孵育箱中孵育,敲减 lncRNA MIR100HG 所用寡核苷酸序列见表 1,选取 3 个 siRNAs 寡核苷酸中敲减效率最高的指标用于后续实验。

使用 Starbase2.0(<http://starbase.sysu.edu.cn/>)及生物信息学数据库验证 lncRNA MIR100HG 与 hsa-miR-2355-3p 的潜在结合位点,将含有 hsa-miR-2355-3p 结合位点的 lncRNA MIR100HG 野生型和突变型克隆到 pGL3 质粒上,构建双荧光素酶报告载体,使

用 lipofectamine 2000 依据产品说明书将双荧光素酶报告载体或阴性对照与 hsa-miR-2355-3p 类似物/抑制物共转染至 SMMC-7721 细胞中,48 h 后测定各组合荧光素酶活性,依据海肾萤光素酶活性将 lncRNA MIR100HG 标准化为相对表达水平。

表 1 引物序列和敲减 lncRNA MIR100HG 寡核苷酸序列(5'-3')

引物序列和寡核苷酸序列	序列	大小(bp)
lncRNA MIR100HG 上游	5'-GTGGCAGAGTAAGGGATGGA-3'	20
lncRNA MIR100HG 下游	5'-GGGGATGAACCATTGACAAC-3'	20
GAPDH 上游	5'-GAGGTGGTTATGACAAC-3'	19
GAPDH 下游	5'-TGGTCATAATGCAGAAGTA-3'	19
hsa-miR-2355-3p 上游	5'-ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA-3'	22
hsa-miR-2355-3p 下游	5'-GAATCTGCGAGAGACACCATC-3'	21
U6 上游	5'-GCTCTTTATTGGTGGCTTAAG-3'	21
U6 下游	5'-GCTGTTTGTGTGGCGGAATTAA-3'	21
siRNAs 寡核苷酸		
si-MIR100HG-1 #	5'-GCACTATAGATCATGAGCTT-3'	20
si-MIR100HG-2 #	5'-TATGTATAGAGAGCTGCTGA-3'	20
si-MIR100HG-3 #	5'-GACGACGGAAGTGTGTTGGAT-3'	20
阴性对照	5'-TTCTCCGAACGTGTCACGTAA-3'	21

1.4 统计学处理 采用 SPSS25.0 和 GraphPad Prism 统计软件进行数据分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用成组 t 检验、配对 t 检验,非正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,采用非参数 wilcoxon 秩和检验比较组间差异;计量资料采用率表达,组间比较采用 Pearson χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。将 90 例肝细胞癌组织中 lncRNA MIR100HG 相对表达水平排序,低于中位数定义为 lncRNA MIR100HG 低表达组,高于或等于中位数则定义为 lncRNA MIR100HG 高表达组;采用 Kaplan-Meier 曲线评估 lncRNA MIR100HG 表达对肝细胞癌患者总体生存率和无复发生存率的影响,lncRNA MIR100HG 高表达组、lncRNA MIR100HG 低表达组之间生存率比较采用 Log-Rank 法。采用 Cox 比例风险模型分析影响肝细胞癌患者生存时间的独立危险因素。每个独立实验至少进行 3 次, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肝细胞癌组织中 lncRNA MIR100HG 相对表达水平与患者临床病理参数的关系 肝细胞癌组织中

lncRNA MIR100HG 相对表达水平[4.251(3.260, 5.302)]高于癌旁组织中 lncRNA MIR100HG 相对表达水平[0.044(0.039, 1.037)],差异有统计学意义($Z = 8.206, P < 0.001$)。肝细胞癌组织中 hsa-miR-2355-3p 相对表达水平[0.056(0.025, 1.215)]低于癌旁组织中 hsa-miR-2355-3p 相对表达水平[3.120(2.100, 4.293)],差异有统计学意义($Z = 8.239, P < 0.001$)。肝细胞癌组织中 lncRNA MIR100HG 高表达组中肿瘤最大径越大,更倾向于淋巴结转移、血管侵犯、肿瘤远处转移;血清 γ -谷氨酰基转移酶(γ -GGT)水平越高,肿瘤 TNM 分期越高,更倾向于肿瘤复发($P < 0.05$)。因此,肝细胞癌组织中 lncRNA MIR100HG 相对表达水平与肿瘤最大径、淋巴结转移、血管侵犯、肿瘤远处转移,血清 γ -GGT 水平、肿瘤 TNM 分期及肿瘤复发有关,而肝细胞癌组织中 lncRNA MIR100HG 相对表达水平与患者性别、年龄、肿瘤数目、肝硬化状况、肝硬化结节个数、肿瘤包膜、乙肝表面抗原状态、血清甲胎蛋白(AFP)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平无关($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 肝细胞癌组织中 lncRNA MIR100HG 相对表达水平与患者临床病理参数的关系(n)

临床病理参数	n	lncRNA MIR100HG 低表达组	lncRNA MIR100HG 高表达组	χ^2	P
性别				0.450	0.502
男	80	39	41		
女	10	6	4		

续表 2 肝细胞癌组织中 lncRNA MIR100HG 相对表达水平与患者临床病理参数的关系(*n*)

临床病理参数	<i>n</i>	lncRNA MIR100HG 低表达组	lncRNA MIR100HG 高表达组	χ^2	<i>P</i>
年龄				2.166	0.141
≥60 岁	22	8	14		
<60 岁	68	37	31		
肿瘤数目				2.589	0.108
单个	79	42	37		
多个	11	3	8		
肝硬化				—	0.485 ^a
阴性	9	6	3		
阳性	81	39	42		
肝硬化结节				—	1.000 ^a
0~1 个	9	5	4		
2~3 个	81	40	41		
肿瘤包膜				1.607	0.205
不完整	48	21	27		
完整	42	24	18		
肿瘤最大径				6.428	0.011
<4 cm	42	27	15		
≥4 cm	48	18	30		
淋巴结转移				—	0.026 ^a
无转移	84	45	39		
有转移	6	0	6		
血管侵犯				—	0.006 ^a
无	82	45	37		
有	8	0	8		
肿瘤远处转移				—	0.026 ^a
无转移	84	45	39		
有转移	6	0	6		
乙肝表面抗原状态				0.067	0.796
阴性	19	9	10		
阳性	71	36	35		
血清 AFP 水平				0.431	0.512
≥400 μg/L	57	30	27		
<400 μg/L	33	15	18		
血清 ALT 水平				0.368	0.544
≥40 U/L	53	13	20		
<40 U/L	37	12	25		
血清 γ-GGT 水平				7.756	0.005
≥45 U/L	53	20	33		
<45 U/L	37	25	12		
肿瘤 TNM 分期				—	0.012 ^a
Ⅰ~Ⅱ期	83	45	38		
Ⅲ~Ⅳ期	7	0	7		
肿瘤复发				75.306	<0.001
无复发	41	41	0		
有复发	49	4	45		

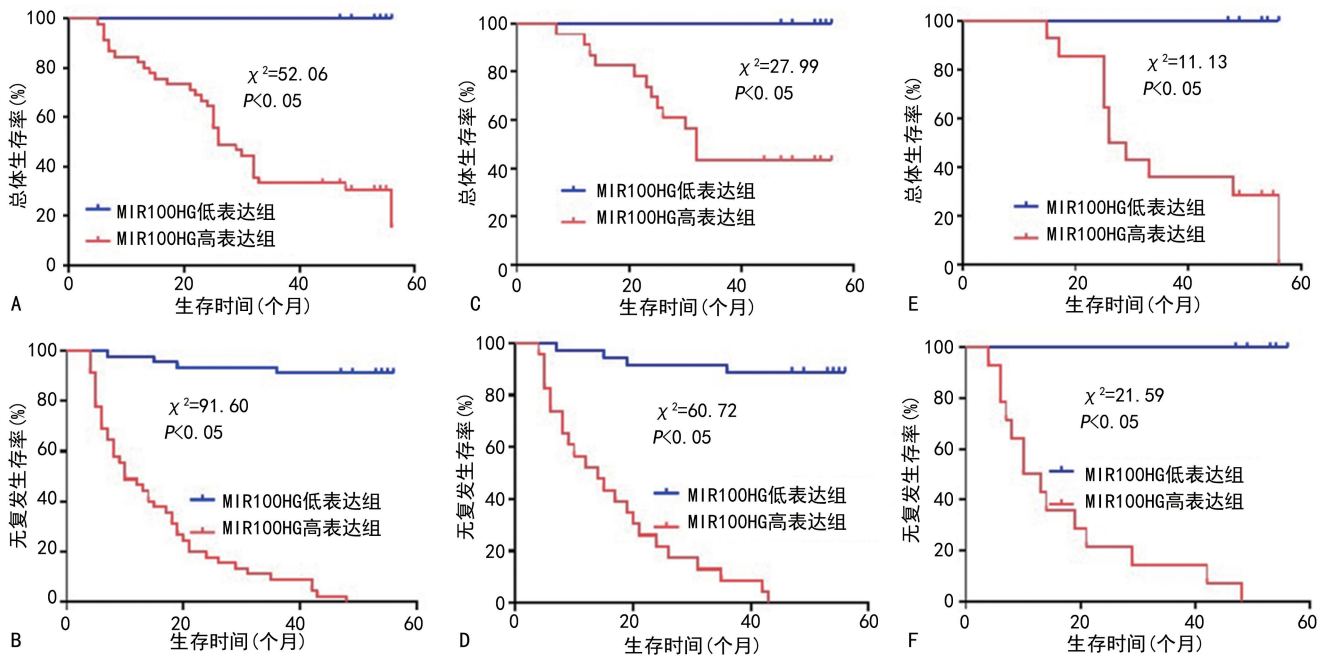
注：^a 表示 Fisher 精确检验，—表示无数据。

2.2 lncRNA MIR100HG 相对表达水平与肝细胞癌患者预后的关系

将肝细胞癌患者根据 TNM Ⅰ~Ⅳ期、TNM Ⅰ期、TNM Ⅱ期分别进行预后分析(由于 TNM Ⅲ期和Ⅳ期患者分别只有 2 例和 5 例,样本量

太少,无法单独进行分析),TNM I ~ IV 期、TNM I 期、TNM II 期肝细胞癌患者 lncRNA MIR100HG 高表达组总体生存率均低于低表达组,差异有统计学意义($\chi^2=52.06、27.99、11.13,P<0.05$);TNM I ~ IV 期、TNM I 期、TNM II 期肝细胞癌患者 lncRNA MIR100HG 高表达组无复发生存率均低于低表达组,差异有统计学意义($\chi^2=91.60、60.72、21.59,P<0.05$)。见图 1。经 Cox 比例风险模型探讨影响肝细胞癌患者生存时间的独立危险因素,发现有肿瘤远处转移、肿瘤 TNM III ~ IV 期、有复发和 lncRNA

MIR100HG 异常高表达(将 90 例肝细胞癌组织中 lncRNA MIR100HG 相对表达水平排序,高于或等于中位数则定义为 lncRNA MIR100HG 异常高表达)较之无肿瘤远处转移、TNM I ~ II 期、无复发和 lncRNA MIR100HG 低表达对肝细胞癌患者的预后均产生不利的影响,差异有统计学意义($HR=11.156、6.462、8.585、7.799,P<0.05$)。lncRNA MIR100HG 异常高表达是肝细胞癌患者预后不良的独立危险因素($P<0.05$)。见表 3、4。



注:A、B 分别评估 90 例 TNM I ~ IV 期肝细胞癌患者 lncRNA MIR100HG 高表达组、低表达组总体生存率和无复发生存率;C、D 分别评估 59 例 TNM I 期肝细胞癌患者 lncRNA MIR100HG 高表达组、低表达组总体生存率和无复发生存率;E、F 分别评估 24 例 TNM II 期肝细胞癌患者 lncRNA MIR100HG 高表达组、低表达组总体生存率和无复发生存率。

图 1 肝细胞癌患者 lncRNA MIR100HG 高表达组、低表达组总体生存率和无复发生存率的 Kaplan-Meier 生存曲线

表 3 影响肝细胞癌患者生存时间的单因素回归分析

因素	β	SE	Wald χ^2	HR(95%CI)	P
女	1.325	0.416	10.145	3.762(0.795~5.035)	>0.05
年龄≥60 岁	1.267	0.367	11.917	3.550(0.715~5.231)	>0.05
肿瘤数目多个	0.688	0.124	30.782	1.990(0.375~1.544)	>0.05
肝硬化阳性	1.024	0.357	8.226	2.784(1.815~3.783)	<0.05
肝硬化结节 2~3 个	1.107	0.498	4.941	3.025(0.796~4.481)	>0.05
肿瘤包膜不完整	0.601	0.243	6.027	1.824(0.627~3.256)	>0.05
肿瘤最大径≥4 cm	1.459	0.499	8.549	4.302(0.948~5.836)	>0.05
有淋巴结转移	3.112	1.126	7.639	22.466(9.296~25.163)	<0.05
有血管侵犯	1.211	0.399	9.211	3.357(1.257~4.547)	<0.05
有肿瘤远处转移	3.047	1.256	5.885	21.052(7.389~26.372)	<0.05
乙肝表面抗原状态阳性	1.007	0.399	6.370	2.737(0.862~3.482)	>0.05
血清 AFP≥400μg/L	1.768	0.677	6.819	5.859(3.675~7.183)	<0.05
血清 ALT≥40 U/L	0.697	0.235	8.797	2.008(0.749~3.245)	>0.05

续表 3 影响肝细胞癌患者生存时间的单因素回归分析					
因素	β	SE	Wald χ^2	HR(95%CI)	P
血清 γ -GGT $\geq$ 45 U/L	0.499	0.198	2.520	1.647(0.738~2.375)	>0.05
TNM Ⅲ~Ⅳ期	3.001	0.610	24.205	20.106(8.778~26.128)	<0.05
有复发	2.210	0.498	19.695	9.116(4.545~12.876)	<0.05
lncRNA MIR100HG 异常高表达	3.010	0.779	14.930	20.287(16.261~24.268)	<0.05

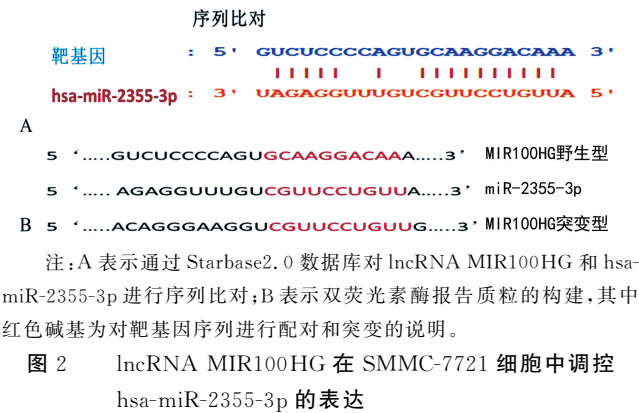
注:将 90 例肝细胞癌组织中 MIR100HG 相对表达水平排序,高于或等于中位数则定义为 lncRNA MIR100HG 异常高表达。

表 4 影响肝细胞癌患者生存时间的多因素回归分析					
因素	β	SE	Wald χ^2	HR(95%CI)	P
肝硬化阳性	0.491	0.216	5.167	1.634(0.796~2.461)	>0.05
有淋巴结转移	0.344	0.185	3.457	1.411(0.854~3.254)	>0.05
有血管侵犯	1.002	0.478	4.394	2.724(0.949~3.658)	>0.05
有肿瘤远处转移	2.412	0.466	26.791	11.156(8.576~14.061)	<0.05
血清 AFP $\geq$ 400 μ g/L	0.589	0.364	2.618	1.802(0.886~2.894)	>0.05
TNM Ⅲ~Ⅳ期	1.866	0.513	13.231	6.462(4.665~10.014)	<0.05
有复发	2.150	0.483	19.814	8.585(6.626~10.177)	<0.05
lncRNA MIR100HG 异常高表达	2.054	0.423	23.579	7.799(5.658~10.263)	<0.05

2.3 lncRNA MIR100HG 在肝癌细胞中的表达及敲减效率的验证 对 4 株肝细胞癌细胞系 HepG2、MHCC97H、SK-HEP-1、SMMC-7721 及人正常肝脏细胞系 LO₂ 中 lncRNA MIR100HG 相对表达水平进行检测,结果发现 4 株肝细胞癌细胞系 HepG2、MHCC97H、SK-HEP-1、SMMC-7721 中 lncRNA MIR100HG 相对表达水平分别为(2.50±0.20)、(2.60±0.18)、(1.30±0.11)、(6.30±0.16),其中肝细胞癌细胞系 HepG2、MHCC97H、SMMC-7721 细胞 lncRNA MIR100HG 相对表达水平高于人正常肝脏细胞系 LO₂ 中 lncRNA MIR100HG 相对表达水平(1.00±0.16),差异有统计学意义($P<0.05$);肝细胞癌细胞系 SK-HEP-1 与人正常肝脏细胞系 LO₂ 中 lncRNA MIR100HG 相对表达水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。选取肝细胞癌细胞系 SMMC-7721 转染 3 个干扰片段(si-MIR100HG),阴性对照、si-MIR100HG-1 号、si-MIR100HG-2 号、si-MIR100HG-3 号敲减后 lncRNA MIR100HG 相对表达水平分别为(1.00±0.16)、(0.76±0.05)、(0.60±0.05)、(0.07±0.02),其中 si-MIR100HG-3 号敲减后 lncRNA MIR100HG 相对表达水平显著下降($P<0.05$)。

2.4 lncRNA MIR100HG 在肝细胞癌细胞中可能调控 hsa-miR-2355-3p 的表达 通过使用 Starbase 2.0 数据库(<http://starbase.sysu.edu.cn/>),预测 hsa-miR-2355-3p 可能是 lncRNA MIR100HG 的下游靶标,预测结合位点见图 2A(处于 11 号染色体 121962377-121962398 位置)。肝细胞癌细胞系 SMMC-7721 中转染 si-MIR100HG 干扰片段后 hsa-miR-2355-3p 的相对表达水平(7.62±0.26)与阴性对

照(1.00±0.16)相比明显升高($P<0.001$)。此外,使用双荧光素酶报告实验进一步验证 lncRNA MIR100HG 和 hsa-miR-2355-3p 之间的是否存在物理学上的结合位点,通过构建与 hsa-miR-2355-3p 具有结合位点的 lncRNA MIR100HG 野生型和突变型双荧光素酶报告质粒。见图 2B。“microRNA 与 lncRNA 结合验证”实验结果显示,与阴性对照相比,共转染 hsa-miR-2355-3p 类似物能够抑制 lncRNA MIR100HG 野生型表达载体的荧光素酶活性[荧光素酶活性从(1.80±0.11)降为(0.7±0.09),差异有统计学意义($P<0.05$)],但 lncRNA MIR100HG 突变型表达载体的荧光素酶活性没有变化[荧光素酶活性从(1.90±0.12)降为(1.73±0.13),差异无统计学意义($P>0.05$)],结果提示 hsa-miR-2355-3p 可能是 lncRNA MIR100HG 的下游靶标。



2.5 下调 hsa-miR-2355-3p 逆转敲减 lncRNA MIR100HG 介导的肝细胞癌细胞迁移和侵袭能力的抑制 Transwell 实验结果显示,与阴性对照[细胞迁

移实验和侵袭实验细胞计数分别为(101±7)个和(45±2)个]相比,转染 si-MIR100HG 后[细胞迁移实验和侵袭实验细胞计数分别为(55±4)个和(11±1)个]能够明显抑制肝细胞癌细胞系 SMMC-7721 细胞迁移和侵袭能力($P < 0.001$)。联合转染 si-MIR100HG 和 hsa-miR-2355-3p 抑制物后发现,与单独转染 si-MIR100HG 相比[细胞迁移实验和侵袭实验细胞计数分别为(55±4)个和(11±1)个],联合转染后肝细胞癌细胞系 SMMC-7721 细胞迁移和侵袭能力得到恢复[细胞迁移实验和侵袭实验细胞计数分别

为(100±6)个和(39±2)个],差异有统计学意义($P < 0.001$),单独转染 hsa-miR-2355-3p 抑制物后[细胞迁移实验和侵袭实验细胞计数分别为(121±6)个和(59±8)个]发现,与阴性对照[细胞迁移实验和侵袭实验细胞计数分别为(101±7)个和(45±2)个]相比,肝细胞癌细胞系 SMMC-7721 细胞迁移和侵袭能力明显上调($P < 0.05$)。结果表明,敲减 lncRNA MIR100HG 抑制肝细胞癌细胞迁移和侵袭能力,下调 hsa-miR-2355-3p 可逆转其抑制功能。见图 3。

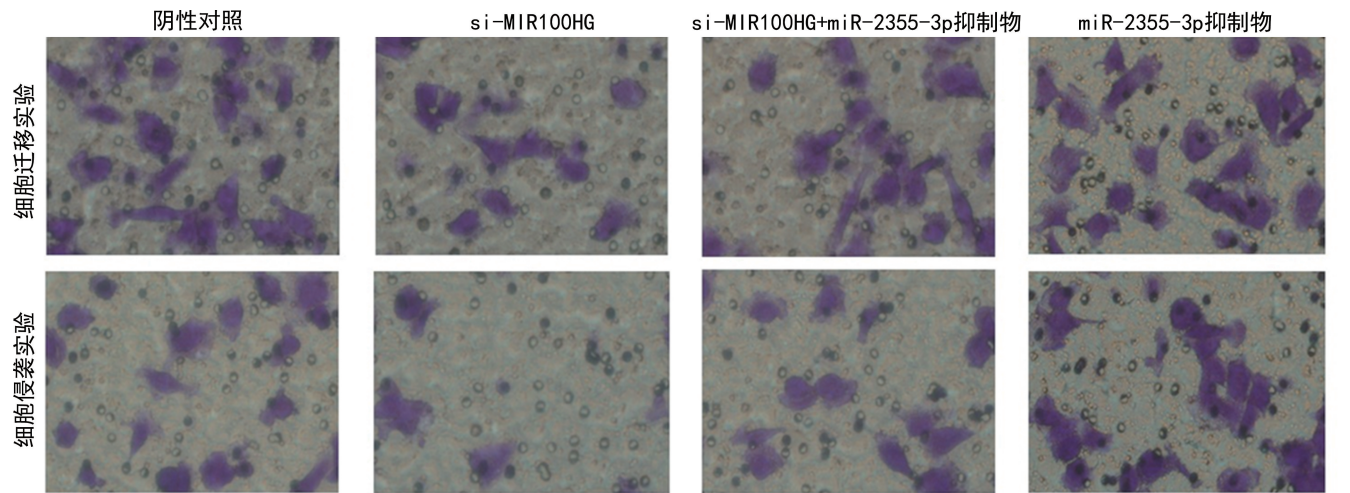


图3 转染 si-MIR100HG 及联合 hsa-miR-2355-3p 抑制物对肝细胞癌细胞系 SMMC-7721 细胞迁移和侵袭能力的影响(×100)

3 讨论

肝细胞癌是目前常见的高致死率的恶性肿瘤之一^[12]。70%~80%患者明确诊断时已经处于晚期,只能接受姑息治疗^[13-14]。因此,阐明肝细胞癌进展的分子机制迫在眉睫。近期许多研究报道 lncRNA 与肿瘤的许多恶性生物学行为密切相关^[15]。本研究结果显示,lncRNA MIR100HG 在肝细胞癌细胞系和肿瘤组织中异常高表达,推测其可能参与了肿瘤的发生。相关性分析证实,与 lncRNA MIR100HG 低表达组相比,lncRNA MIR100HG 高表达组的肿瘤最大径较大,血清 γ -GGT 水平较高, γ -GGT 主要存在于肝内胆管上皮和肝细胞浆中,升高往往因为胆汁淤积造成,在阻塞性黄疸、原发性肝癌及酒精性肝病发生时升高尤为明显^[16-17],以上结果提示 lncRNA MIR100HG 可能具有促进肝细胞癌发生增殖的能力。肝细胞癌细胞发生转移一般先侵袭基底膜,突破基底膜后侵犯血液系统和淋巴系统,进一步发生远处转移,肿瘤是否有侵袭性对预后影响很大^[18]。本研究结果显示,与 lncRNA MIR100HG 低表达组相比, lncRNA MIR100HG 高表达组肿瘤细胞越倾向于淋巴结转移和肿瘤远处转移;细胞迁移和侵袭实验也证实 lncRNA MIR100HG 有促进肝细胞癌细胞迁移和侵袭的作用,但是需要进一步的体内动物实验佐证。肿瘤 TNM

分期和复发与肿瘤进展密切相关,肿瘤 TNM 分期越高,患者预后往往不佳,治疗后肿瘤复发往往会导致患者的生存期大幅缩短,对患者的预后产生十分不利的影响^[19],相关性分析结果提示 lncRNA MIR100HG 与患者 TNM 分期及复发也有关,以上结果提示 lncRNA MIR100HG 异常高表达与肝细胞癌的发展密切相关。

将肝细胞癌患者根据 TNM I~IV 期、I 期、II 期分别进行预后分析,结果显示 lncRNA MIR100HG 高表达组的总体生存率和无复发生存率均明显低于低表达组,同时多因素回归分析也佐证肝细胞癌组织中 lncRNA MIR100HG 异常高表达是促进患者不良预后的独立危险因素。提示 lncRNA MIR100HG 可以有效预测 TNM I 和 II 期肝细胞癌患者的预后,其 lncRNA MIR100HG 异常高表达提示肝细胞癌患者预后不良,由于 TNM III 和 IV 期肝细胞癌患者例数太少,无法单独进行统计分析,今后研究会进一步纳入 TNM III 期和 IV 期肝细胞癌患者进行预后分析。

miRNAs 是一类约 22 个核苷酸大小的非编码 RNA,通过结合 mRNA 调控其表达^[20]。本研究通过数据库分析发现 lncRNA MIR100HG 与 hsa-miR-2355-3p 存在互补序列,hsa-miR-2355-3p 在肝细胞癌组织中的表达显著低于癌旁组织,且有研究报道 hsa-

miR-2355-3p 与肺癌和胰腺癌的恶性生物学行为密切相关^[21-22];在肝细胞癌细胞系 SMMC-7721 中敲减 lncRNA MIR100HG 后引起 hsa-miR-2355-3p 的上调,推测二者之间可能存在“此消彼长”的调控关系。通过进一步的 Transwell 实验结果推断 lncRNA MIR100HG 可能通过介导 hsa-miR-2355-3p 促进肝细胞癌细胞侵袭和迁移,此外,双荧光素酶报告实验初步推测 lncRNA MIR100HG 和 hsa-miR-2355-3p 二者可能存在物理学上的结合位点,但是需要进一步的确证实验证实。

综上所述,lncRNA MIR100HG 异常高表达与肝细胞癌恶性生物学行为密切相关,参与了肝细胞癌的发生、发展,并且可能通过介导 hsa-miR-2355-3p 促进肝细胞癌细胞系迁移和侵袭,其有望成为肝细胞癌患者潜在的预后标志物及分子治疗靶点。

参考文献

[1] VOGEL A, MEYER T, SAPISOCHIN G, et al. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet, 2022, 400 (10360): 1345-1362.

[2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

[3] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2022[J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72(1): 7-33.

[4] YU K, MEI Y, WANG Z, et al. LncRNA LINC00924 up-regulates NDRG2 to inhibit epithelial-mesenchymal transition via sponging miR-6755-5p in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. J Med Virol, 2022, 94(6): 2702-2713.

[5] LV E, SHENG J, YU C, et al. LncRNA influence sequential steps of hepatocellular carcinoma metastasis[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 136(5): 111224.

[6] WANG J, YIN G, BIAN H, et al. LncRNA XIST upregulates TRIM25 via negatively regulating miR-192 in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. Mol Med, 2021, 27(1): 41.

[7] LIU H, LI D, SUN L, et al. Interaction of lncRNA MIR100HG with hnRNPA2B1 facilitates m6A-dependent stabilization of TCF7L2 mRNA and colorectal cancer progression[J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 74.

[8] PENG J, MA Y, ZHAO X, et al. Constitutive β -Catenin overexpression represses lncRNA MIR100HG transcription via HDAC6-mediated histone modification in colorectal cancer[J]. Mol Cancer Res, 2022, 20(6): 949-959.

[9] LI J, XU Q, WANG W, et al. MIR100HG: a credible prognostic biomarker and an oncogenic lncRNA in gastric cancer[J]. Biosci Rep, 2019, 39(4): 20190171.

[10] WANG S, KE H, ZHANG H, et al. LncRNA MIR100HG promotes cell proliferation in triple-negative breast cancer through triplex formation with p27 loci[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(8): 805.

[11] ZHANG S, WANG Q, LI W, et al. MIR100HG Regulates CALD1 gene expression by targeting miR-142-5p to affect the progression of bladder cancer cells in vitro, as revealed by transcriptome sequencing[J]. Front Mol Biosci, 2021, 8(1): 793493.

[12] FORNER A, REIG M, BRUIX J. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet, 2018, 391(10127): 1301-1314.

[13] LIU X, QIN S. Immune checkpoint inhibitors in hepatocellular carcinoma: opportunities and challenges[J]. Oncologist, 2019, 24(1): 3-10.

[14] LIU L, GU M, MA J, et al. CircGPR137B/miR-4739/FTO feedback loop suppresses tumorigenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma[J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 149.

[15] LI G, KRYCZEK I, NAM J, et al. LIMIT is an immunogenic lncRNA in cancer immunity and immunotherapy[J]. Nat Cell Biol, 2021, 23(5): 526-537.

[16] CASTRO-GIL M P, TORRES-MENA J E, SALGADO R M, et al. The transcriptome of early GGT/KRT19-positive hepatocellular carcinoma reveals a downregulated gene expression profile associated with fatty acid metabolism[J]. Genomics, 2022, 114(1): 72-83.

[17] SURI A, SINGH N, BANSAL S K. A study on the serum γ -glutamyltranspeptidase and plasma osteopontin in alcoholic liver disease[J]. J Lab Physicians, 2022, 14(2): 101-108.

[18] LIN Y L, LI Y. Study on the hepatocellular carcinoma model with metastasis[J]. Genes Dis, 2020, 7(3): 336-350.

[19] JIAO X, WANG Y, WANG F, et al. Recurrence pattern and its predictors for advanced gastric cancer after total gastrectomy[J]. Medicine (Baltimore), 2020, 99(51): 23795.

[20] WANG J Y, YANG Y, MA Y, et al. Potential regulatory role of lncRNA-miRNA-mRNA axis in osteosarcoma[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 121(3): 109627.

[21] HAO L, ZHANG Q, QIAO H Y, et al. TRIM29 alters bioenergetics of pancreatic cancer cells via cooperation of miR-2355-3p and DDX3X recruitment to AK4 transcript[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2021, 24(1): 579-590.

[22] ZHAO Y, ZHANG W, YANG Y, et al. Diagnostic and prognostic value of microRNA-2355-3p and contribution to the progression in lung adenocarcinoma[J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 4747-4756.