



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2020.07.007
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2020.07.007
Chinese Journal of General Surgery, 2020, 29(7):827-838.

· 基础研究 ·

长链非编码 RNA RUSC1-AS1 对肝细胞癌恶性生物学行为的影响及其与微小 RNA-326 的关系

陈怡文¹, 郭冰沁², 李洪涛³

(1. 赣州市第三人民医院 / 赣南医学院附属老年医院 老年科, 江西 赣州 341000; 蚌埠医学院第一附属医院 2. 病理科 3. 肿瘤外科, 安徽 蚌埠 233004)

摘要

背景与目的: 有研究表明长链非编码 RNA RUSC1-AS1 (lncRNA RUSC1-AS1) 与肿瘤的恶性生物学行为密切相关, 但其对肝细胞癌 (肝癌) 的影响尚不清楚。笔者前期研究显示, lncRNA RUSC1-AS1 与微小 RNA-326 (miR-326) 存在结合位点, 因此本研究探讨 lncRNA RUSC1-AS1 在肝癌中的表达, 以及是否通过靶向 miR-326 调控肝癌细胞生物学行为。

方法: 用 qRT-PCR 检测 41 例肝癌组织和对应癌旁组织中 lncRNA RUSC1-AS1 与 miR-326 的表达。以 lncRNA RUSC1-AS1 表达抑制质粒 / 阴性对照质粒、miR-326 模拟物 / 阴性对照序列、miR-326 抑制物 / 阴性对照序列为工具, 采用 MTT 法、Transwell 法、流式细胞术、Western blot 法观察接受不同转染处理的 MHCC97-H 细胞的增殖能力、迁移和侵袭能力、凋亡以及相关蛋白表达的变化。采用荧光素酶报告实验分析 lncRNA RUSC1-AS1 和 miR-326 的靶向关系, 并用 qRT-PCR 验证。

结果: 与癌旁组织比较, 肝癌组织中 lncRNA RUSC1-AS1 表达水平明显升高, miR-326 表达水平明显降低 (均 $P < 0.05$)。转染 lncRNA RUSC1-AS1 表达抑制质粒或 miR-326 模拟物后, 肝癌 MHCC97-H 细胞的增殖能力以及迁移与侵袭能力明显降低, 细胞凋亡率明显升高, cyclin D1、MMP-2、MMP-9、Bcl-2 蛋白表达水平明显降低, P21、Bax 蛋白表达水平明显升高 (均 $P < 0.05$)。MHCC97-H 细胞转染 lncRNA RUSC1-AS1 表达抑制质粒的同时 miR-326 抑制物, 前者对 MHCC97-H 细胞以上作用被取消 (均 $P < 0.05$)。双荧光素酶报告实验及 qRT-PCR 验证结果显示, miR-326 为 lncRNA RUSC1-AS1 的靶分子。

结论: lncRNA RUSC1-AS1 在肝癌中表达上调, 其可通过靶向调控 miR-326 的表达促进肝癌细胞的恶性生物学行为。

关键词

癌, 肝细胞; RNA, 长链非编码; 微 RNAs; 细胞增殖; 肿瘤浸润; 细胞凋亡
中图分类号: R735.7

Influence of long non-coding RNA RUSC1-AS1 on malignant biological behaviors of hepatocellular carcinoma and its relationship with microRNA-326

CHEN Yiwen¹, GUO Bingqin², LI Hongtao³

(1. Department of Geriatrics, Ganzhou Third People's Hospital/Affiliated Geriatric Hospital of Gannan Medical University, Ganzhou, Jiangxi 341000, China; 2. Department of Pathology 3. Department of Oncological Surgery, Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui 233004, China)

收稿日期: 2020-05-15; 修订日期: 2020-06-13。

作者简介: 陈怡文, 赣州市第三人民医院 / 赣南医学院附属老年医院副主任医师, 主要从事恶性肿瘤发病机制方面的研究。

通信作者: 陈怡文, Email: cort313@126.com

Abstract

Background and Aims: Studies have demonstrated that long non-coding RNA RUSC1-AS1 (lncRNA RUSC1-AS1) has a close relationship with the malignant biological behaviors of tumors. However, its role in hepatocellular carcinoma (HCC) is still unclear. Our previous study demonstrated that there are binding interactions between lncRNA RUSC1-AS1 and microRNA-326 (miR-326). Therefore, this study was conducted to investigate the expression of lncRNA RUSC1-AS1 in HCC, and whether it regulates the biological behaviors of HCC cells by targeting miR-326.

Methods: The expressions of lncRNA RUSC1-AS1 and miR-326 in 41 paired specimens of HCC tissue and tumor adjacent were detected by qRT-PCR. Using lncRNA RUSC1-AS1 expression inhibition plasmid/negative control plasmid, miR-326 mimics/negative control sequences and miR-326 inhibitors/negative control sequences as tools, the changes in proliferative ability, migration and invasion abilities, and apoptosis as well as the expressions of the related proteins in HCC MHCC97-H cells after different transfection treatments were determined by MTT assay, Transwell assay, flow cytometry and western blot analysis, respectively. The targeting relationship between lncRNA RUSC1-AS1 and miR-326 was analyzed by luciferase report assay, and then validated by qRT-PCR.

Results: In HCC tissue compared with adjacent tissue, the expression level of lncRNA RUSC1-AS1 was significantly increased, and the expression level of miR-326 was significantly decreased (both $P < 0.05$). In MHCC97-H cells after transfection with lncRNA RUSC1-AS1 expression inhibition plasmid or miR-326 mimics, the proliferative ability as well as the migration and invasion abilities were significantly reduced, while the apoptosis rate was significantly increased, and the protein expression levels of cyclin D1, MMP-2, MMP-9, Bcl-2 were significantly reduced, while the protein expression levels of P21, Bax were significantly increased (all $P < 0.05$). In MHCC97-H cells transfected with lncRNA RUSC1-AS1 expression inhibition plasmid with simultaneous transfection of miR-326 inhibitors, the influences of the former on MHCC97-H cells were abolished (all $P < 0.05$). The results of luciferase report assay and qRT-PCR validation showed that miR-326 was a target molecule for lncRNA RUSC1-AS1.

Conclusion: The expression of lncRNA RUSC1-AS1 is up-regulated in HCC, and it can promote the malignant biological behaviors of HCC cells by targeting miR-326.

Key words

Carcinoma, Hepatocellular; RNA, Long Noncoding; MicroRNAs; Cell Proliferation; Neoplasm Invasiveness; Apoptosis

CLC number: R735.7

肝细胞癌（以下简称肝癌）是世界常见的恶性肿瘤之一，我国肝癌患者病死率在世界上占较高比例，癌细胞肝内转移是患者术后复发的重要原因^[1-2]。细胞增殖和凋亡调控的失衡是引起肿瘤发生发展的重要原因^[3]；肝癌细胞的迁移、侵袭是导致癌其转移的重要因素^[4]。然而，介导肝癌增殖、迁移、侵袭和凋亡的潜在分子机制尚未完全不清楚。长链非编码RNA（long non-coding RNA, lncRNA）是一类长度>200 nt的非编码RNA，其可通过多种方式发挥其生物学功能，研究^[5-7]表明lncRNA可以作为一种竞争性内源性RNA（competing endogenous RNA, ceRNA）与微小RNA（microRNA, miRNA）相互作用，参与调控靶基因的表达，在肿瘤的发生发展中发

挥重要的作用。大量研究^[8-10]表明，lncRNA在肿瘤的发生发展过程中起重要作用，可调控细胞增殖、分化、凋亡、迁移、侵袭等过程。既往研究发现敲除lncRNACASC15可以通过Y染色体上的性别决定区相关高迁移率族盒蛋白4（sex-determining region of Y chromosome related high mobility group box 4, SOX4）/Wnt/ β -连环蛋白（ β -catenin）信号通路明显抑制肝癌细胞的增殖，迁移和侵袭，并在体外促进细胞凋亡^[11]。沉默lncRNA LEF1-AS1可以抑制肝癌细胞的增殖和侵袭，且可抑制体内肿瘤的生长^[12]。RUSC1-AS1是一个新发现的肿瘤相关的lncRNA，研究^[13]表明RUSC1-AS1在乳腺癌组织中高表达，其表达水平与肿瘤大小和临床等级呈正相关，而与患者的整

体生存呈负相关;沉默RUSC1-AS1显著抑制了乳腺癌MCF-7和BT549细胞的活力、克隆能力及细胞周期进程并诱导了其凋亡。RUSC1-AS1在喉鳞状细胞癌中上调表达,非甲基化可调节RUSC1-AS1的表达,且RUSC1-AS1与可能是喉鳞状细胞癌的重要预后生物标志物^[14]。然而lncRNA RUSC1-AS1在肝癌中的表达和功能国内外尚未见报道。笔者前期采用Starbase预测显示,lncRNA RUSC1-AS1和微小RNA-326(miR-326)存在结合位点。因此,本研究检测lncRNA RUSC1-AS与miR-326在肝癌及癌旁组织中的表达,通过分子生物学实验分析lncRNA RUSC1-AS表达对于肝癌细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响及其与miR-326的关系。

1 材料与方法

1.1 一般资料

收集2017年1月—2019年12月收治的肝癌患者经手术切除的肝癌组织及对应的癌旁组织(距离肿瘤边缘2~5 cm)标本41例,其经病理检测确认为肝癌,患者手术前未进行过手术及放化疗,所有患者均知情且签署知情同意书,本研究经本院伦理委员会审核批准。

1.2 主要材料

肝癌MHCC97-H细胞购自美国ATCC;胎牛血清、RPMI-1640培养基购自美国Gibco公司;胰蛋白酶购自美国Sigma公司;TRIzol试剂、反转录试剂盒、荧光定量试剂盒购自日本Takara公司;Lipofectamine™ 2000转染试剂购自美国Invitrogen公司;miR-326模拟物/抑制物、lncRNA RUSC1-AS1表达抑制质粒及各自阴性对照购自广州锐博生物技术有限公司;四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)试剂盒购自武汉益普生物科技有限公司;RIPA蛋白裂解液购自北京百奥莱博科技有限公司;二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒购自美国Bio-world公司;聚偏二氟乙烯膜购自美国Millipore公司;ECL发光液购自美国Advansta公司;cyclin D1抗体购自美国Biorbyt公司;P21、MMP-2、MMP-9、Bcl-2、Bax、GAPDH抗体购自美国Abbiotec公司;Transwell小室、Matrigel胶购自美国BD公司;膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素/碘化丙锭(annexin V-FITC/PI)凋亡检测试剂盒购自上海BestBio贝博生物公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;荧光素

酶报告载体购自江苏百奥迈科生物技术有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养与分组 肝癌MHCC97-H细胞用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液在37℃、5%CO₂条件下培养,2 d换液1次,待细胞融合至80%~90%左右时,用胰蛋白酶进行消化传代,取对数生长期细胞进行实验。取对数生长期MHCC97-H细胞,按照每孔 2×10^5 个细胞接种于六孔板中,待细胞贴壁后根据Lipofectamine™ 2000说明书进行转染,将lncRNA RUSC1-AS1表达抑制质粒(si-RUSC1-AS1组)/阴性对照质粒(si-NC组)、miR-326模拟物(miR-326组)/阴性对照序列(miR-NC组)分别转染至MHCC97-H细胞中;将lncRNA RUSC1-AS1表达抑制质粒分别与miR-326抑制物(si-RUSC1-AS1+anti-miR-326组)及其阴性对照序列(si-RUSC1-AS1+anti-miR-NC组)转染至MHCC97-H细胞中。

1.3.2 qRT-PCR检测lncRNA RUSC1-AS1和miR-326的表达水平 用TRIzol试剂提取组织和细胞中的总RNA,将RNA反转录成cDNA,按照荧光定量试剂盒使用说明进行PCR,每个样品设3个重复,循环条件为95℃ 5 min,95℃ 30 s,60℃ 30 s;72℃ 30 s,共40个循环;60℃延长5 min。相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。lncRNA RUSC1-AS1和miR-326分别以GAPDH和U6为内参,lncRNA RUSC1-AS1上游引物序列:5'-CAG GGT CCC ACT ATG TTG CT-3',下游引物序列:5'-CCA TTT TAT AGG CGG GGA GT-3';GAPDH上游引物序列:5'-TGT TGC CAT CAA TCA CCC CTT-3',下游引物序列:5'-CTC CAC GAC GTA CTC AGCG-3';miR-326上游引物序列:5'-CAT CTG TCT GTT GGG CTG GA-3',下游引物序列:5'-AGG AAG GGC CCA GAG GCG-3';U6上游引物序列:5'-CGG GTT TGT TTT GCA TTT CT-3',下游引物序列:5'-AGT CCC AGC ATG AAC AGC TT-3';引物由上海生工生物工程公司合成。

1.3.3 MTT法检测细胞增殖 取对数生长期MHCC97-H细胞,按照每孔 5×10^4 个细胞接种于六孔板中,在各组细胞培养至24、48、72 h时,每孔分别加入5 mg/mL的MTT溶液20 μL,于培养箱中继续孵育4 h后弃去上清液,每孔加入DMSO 150 μL,振荡反应10 min使沉淀溶解,用酶标仪于波长450 nm处检测吸光度(OD)值。

1.3.4 Western blot 法 检测 cyclin D1、P21、MMP-2、MMP-9、Bcl-2、Bax 蛋白表达 用 RIPA 蛋白裂解液提取细胞总蛋白, 用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。各组蛋白上样量 60 μg , 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 经电转将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜上。用 5% 脱脂牛奶室温封闭 90 min, 分别加入相应的一抗 (1:800), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 再加入二抗 (1:1 200) 室温孵育 2 h, PBS 洗涤 3 次, 每次 10 min, 后在暗室中用 ECL 发光液显影, 用 ChemiDoc XRS+ 系统成像, 再用 Quantity One 凝胶分析软件处理, 测定各组蛋白条带的灰度值, 以目的条带和 GAPDH 条带的比值作为蛋白表达水平。

1.3.5 Transwell 检测细胞迁移和侵袭 细胞迁移实验: 分别将 600 μL 含胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养液和 200 μL 细胞悬液加入 Transwell 小室的下室和上室中, 放入细胞培养箱中培养 24 h。取出小室, 吸去培养液后用棉签轻轻擦去上层细胞, PBS 洗涤, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 再用 0.1% 结晶紫染色 10 min, 显微镜观察并拍照, 计算结晶紫染色细胞数即为迁移细胞数。细胞侵袭实验: 将 60 μL Matrigel 与 300 μL 无血清的 RPMI-1640 培养液中混匀, 然后取 100 μL 平铺于 Transwell 小室的上室, 凝固后按细胞迁移实验操作进行。

1.3.6 流式细胞仪检测细胞凋亡 取转染 48 h 后生长状态良好的细胞, 吸弃上清液, PBS 漂洗细胞 2 次, 吸弃 PBS 液, 加 1~2 mL 胰酶消化细胞使之脱壁, 静置 5~8 min, 轻摇使之形成均匀细胞悬液, 结合缓冲液终止消化, 分别加 annexin V-FITC 和 PI 各 5 μL , 轻摇混匀, 常温避光孵育 15 min, 上流式细胞仪检测细胞凋亡率。每组设 3 个复孔,

实验重复 3 次。

1.3.7 荧光素酶报告实验检测 lncRNA RUSC1-AS1 和 miR-326 的靶向关系 构建 lncRNA RUSC1-AS1 的野生型和突变型的荧光素酶表达载体质粒 WT-RUSC1-AS1 和 MUT-RUSC1-AS1, 用 LipofectamineTM 2000 将 WT-RUSC1-AS1 和 MUT-RUSC1-AS1 质粒分别与 miR-326 模拟物及相应的对照序列共转染至 293T 细胞中。转染 48 h 后按照说明书检测荧光素酶活性。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组比较行 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA RUSC1-AS1 和 miR-326 在肝癌组织中的表达

应用 qRT-PCR 检测 41 例肝癌组织和癌旁组织中 lncRNA RUSC1-AS1 和 miR-326 的表达水平, 结果显示, 与癌旁组织比较, 肝癌组织中 RUSC1-AS1 表达水平明显升高, miR-326 表达水平明显降低 (均 P < 0.05) (图 1)。

2.2 干扰 lncRNA RUSC1-AS1 表达对 MHCC97-H 细胞增殖的影响

与 si-NC 组比较, si-RUSC1-AS1 组 MHCC97-H 细胞中 RUSC1-AS1 表达水平明显降低, 24、48、72 h 细胞 OD 值明显降低, cyclin D1 蛋白表达水平明显降低, P21 蛋白表达水平明显升高 (均 P < 0.05) (图 2)。

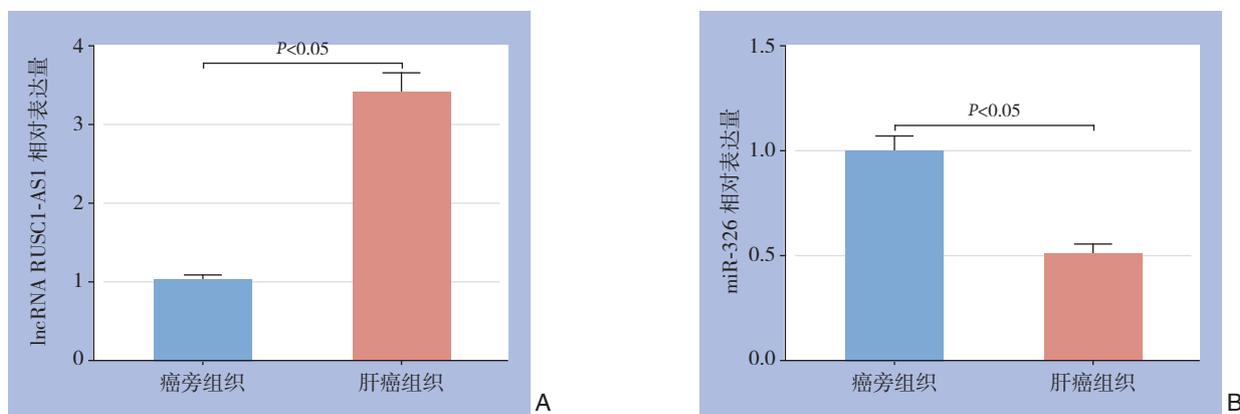


图 1 qRT-PCR 检测结果 A: lncRNA RUSC1-AS1 在肝癌组织中的表达; B: miR-326 在肝癌组织中的表达

Figure 1 Results of qRT-PCR detection A: Expression of lncRNA RUSC1-AS1 in HCC tissues; B: Expression of miR-326 in in HCC tissues

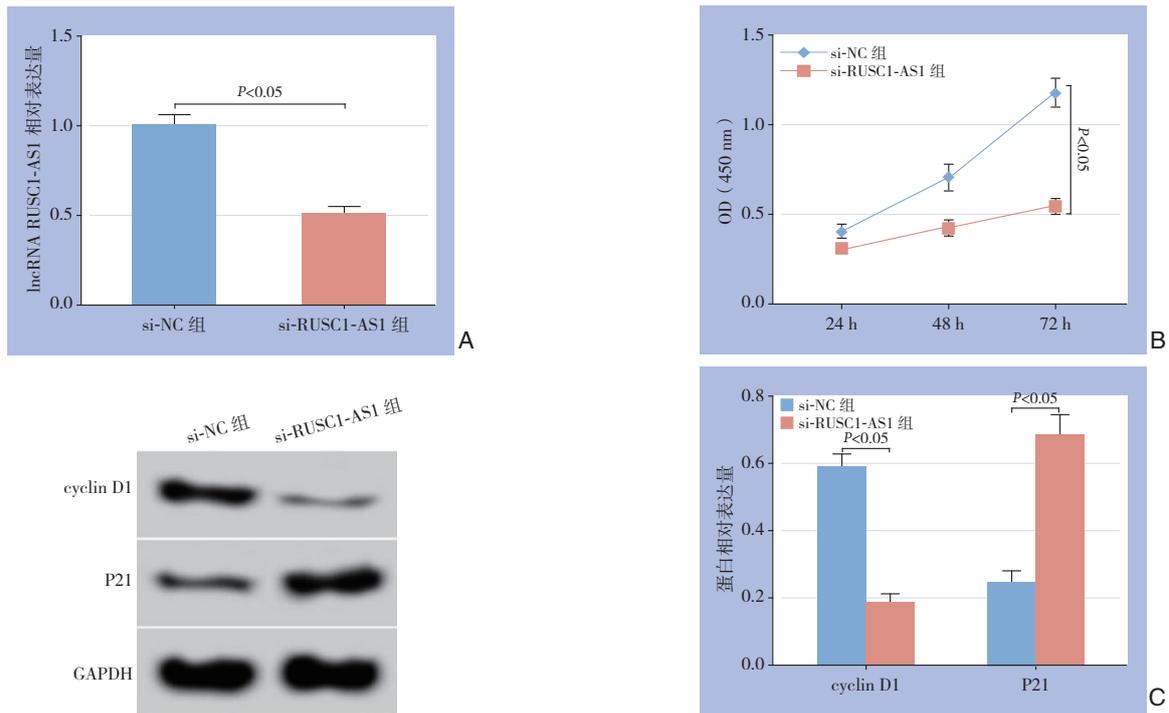


图 2 干扰 lncRNA RUSC1-AS1 表达对 MHCC97-H 细胞增殖的影响 A: lncRNA RUSC1-AS1 相对表达量; B: 细胞增殖曲线; C: 增殖相关蛋白的表达

Figure 2 Influence of lncRNA RUSC1-AS1 interference on proliferation of MHCC97-H cells A: Relative expression levels of lncRNA RUSC1-AS1; B: Cell proliferation curves; C: Expression levels of the proliferation-associated proteins

2.3 干扰 lncRNA RUSC1-AS1 表达对 MHCC97-H 细胞迁移、侵袭的影响

与 si-NC 组比较, si-RUSC1-AS1 组 MHCC97-H

细胞迁移、侵袭数明显降低, MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平明显降低 (均 $P < 0.05$) (图 3)。

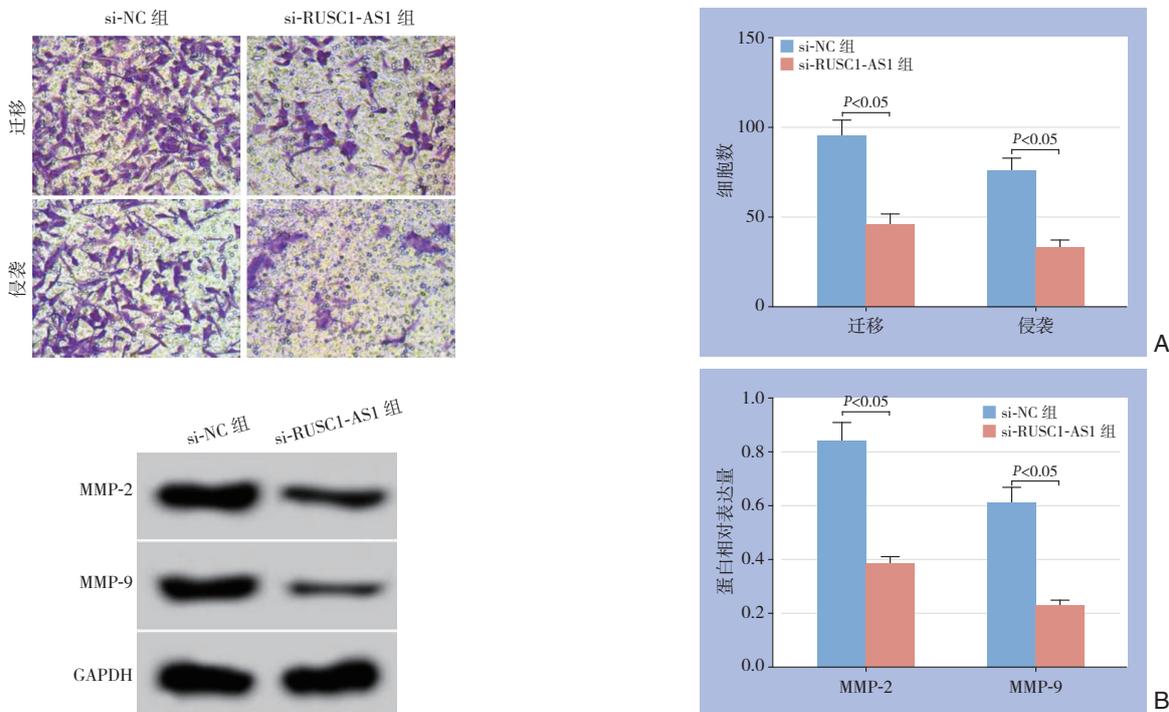


图 3 干扰 lncRNA RUSC1-AS1 表达对肝癌 MHCC97-H 细胞迁移、侵袭的影响 A: Transwell 实验结果; B: 迁移侵袭相关蛋白表达

Figure 3 Influence of lncRNA RUSC1-AS1 interference on migration and invasion of MHCC97-H cells A: Results of Transwell assay; B: Expression levels of the migration- and invasion-related proteins

2.4 干扰 lncRNA RUSC1-AS1 表达对 MHCC97-H 细胞凋亡的影响

与 si-NC 组比较, si-RUSC1-AS1 组 MHCC97-H

细胞凋亡率明显升高, Bcl-2 蛋白表达水平明显降低, Bax 蛋白表达水平明显升高 (均 $P < 0.05$) (图4)。

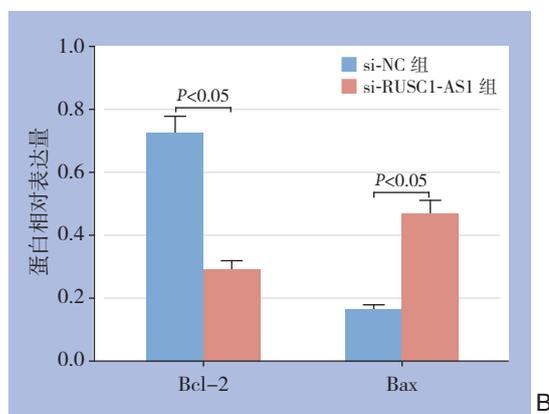
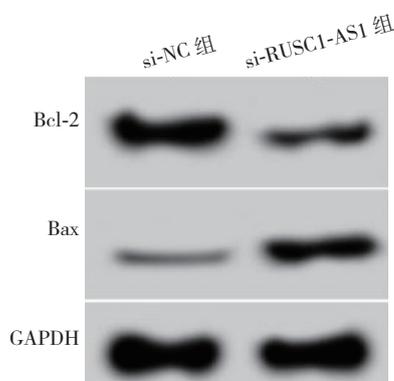
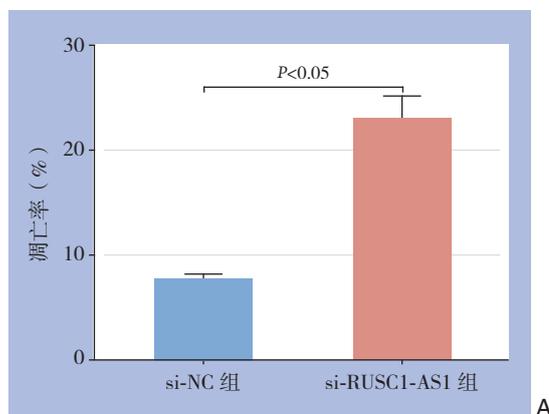
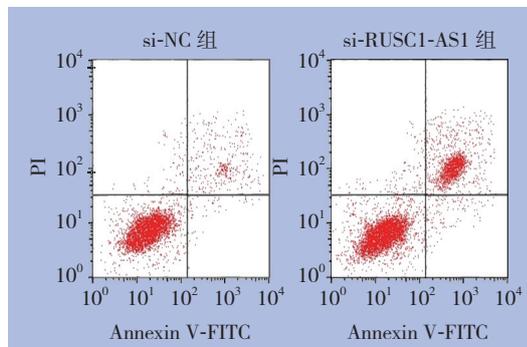


图4 干扰 lncRNA RUSC1-AS1 表达对肝癌 MHCC97-H 细胞凋亡的影响 A: 流式细胞术检测结果; B: 凋亡相关蛋白表达

Figure 4 Influence of lncRNA RUSC1-AS1 interference on apoptosis of MHCC97-H cells A: Results of flow cytometry analysis; B: Expression levels of apoptosis-related proteins

2.5 miR-326 过表达对 MHCC97-H 细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响

与 miR-NC 组比较, miR-326 组 MHCC97-H 细胞中 miR-326 表达水平明显升高, 24、48、72 h 细胞 OD 值明显降低, 细胞迁移、侵袭数明显降低, 细胞凋亡率明显升高, cyclin D1、MMP-2、MMP-9、Bcl-2 蛋白表达水平明显降低, P21、Bax 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$) (图5)。

2.6 干扰 lncRNA RUSC1-AS1 表达同时抑制 miR-326 表达对 MHCC97-H 细胞增殖、迁移侵袭和凋亡的作用

与 si-RUSC1-AS1+anti-miR-NC 组比较, si-RUSC1-AS1+anti-miR-326 组 MHCC97-H 细胞中 miR-326 表达水平明显降低, 24、48、72 h 细胞 OD 值明显升高, 细胞迁移、侵袭数明显升高, 细胞凋亡率明显降低, cyclin D1、MMP-2、MMP-9、Bcl-2 蛋白表达水平明显升高, P21、Bax 蛋白表达水平明显降低 (均 $P < 0.05$) (图6)。

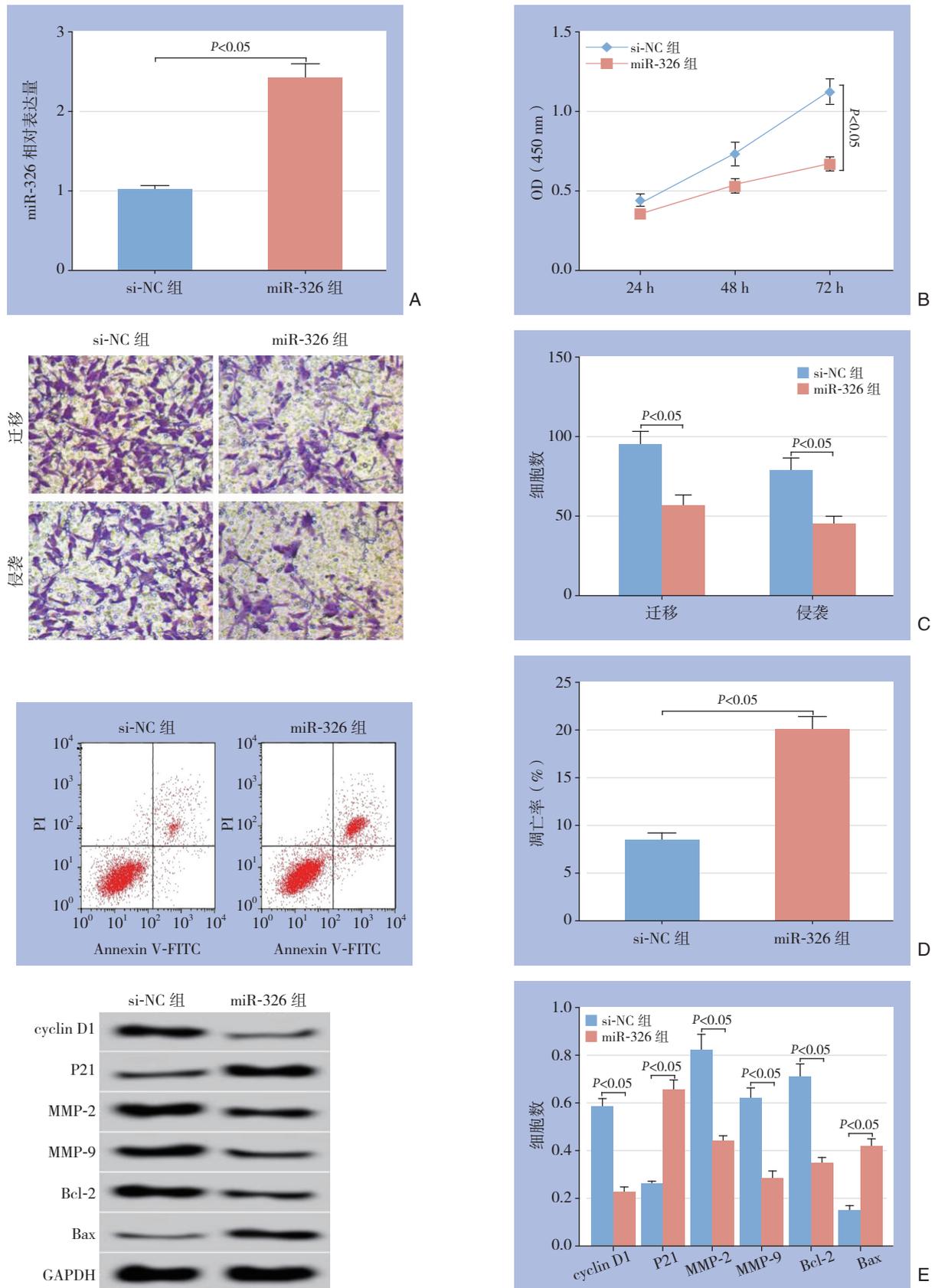


图 5 miR-326 过表达对肝癌 MHCC97-H 细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响 A: miR-326 相对表达量; B: 细胞增殖曲线; C: Transwell 实验结果; D: 流式细胞术检测结果; E: 增殖、迁移、侵袭和凋亡相关蛋白的表达
Figure 5 Influence of miR-326 overexpression on proliferation, migration, invasion and apoptosis of MHCC97-H cells A: Relative expression levels of miR-326; B: Cell proliferation curves; C: Results of Transwell assay; D: Results of flow cytometry analysis; E: Expression levels of proteins associated with proliferation, migration, invasion and apoptosis

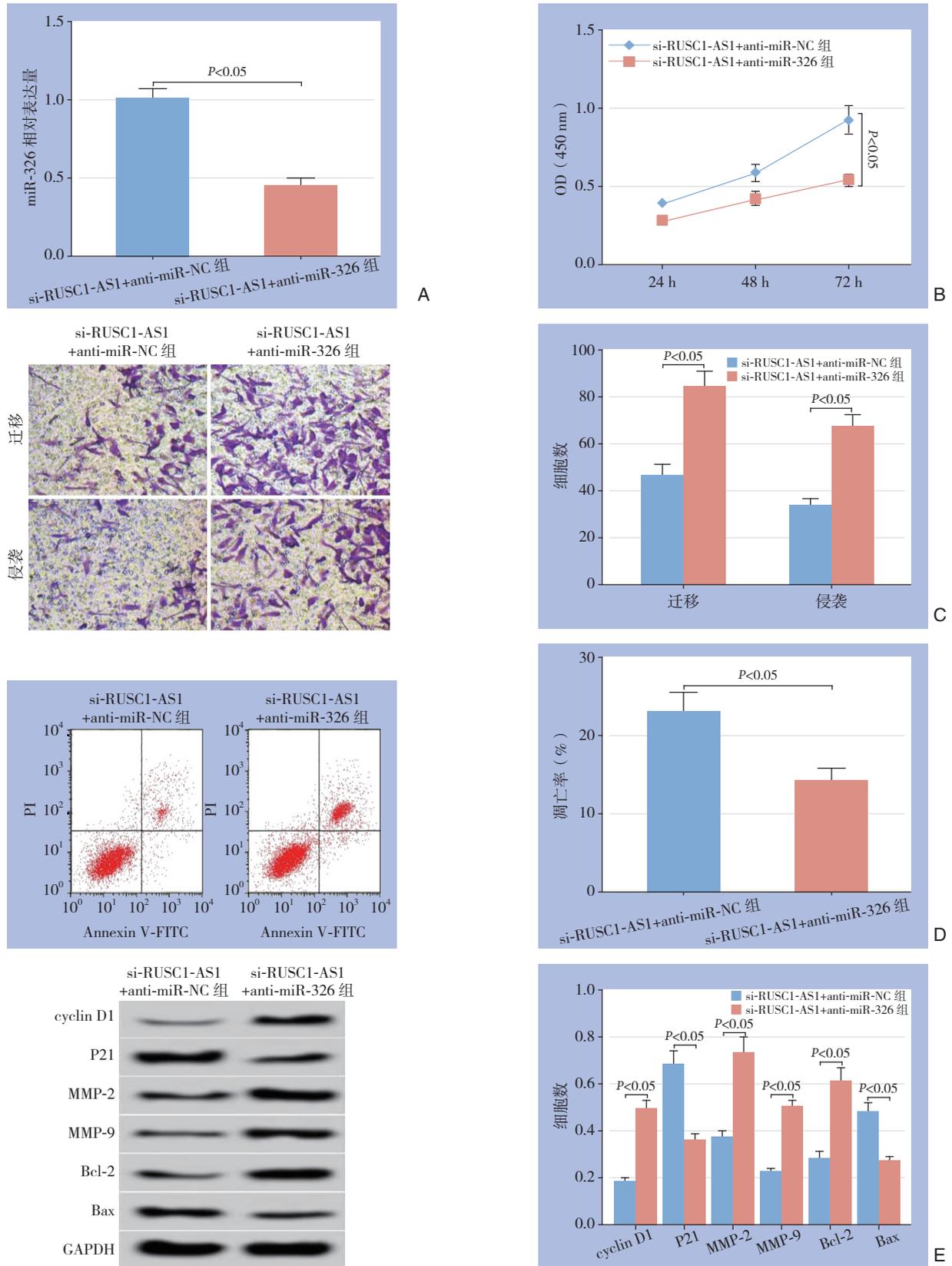


图 6 干扰 lncRNA RUSC1-AS1 表达同时抑制 miR-326 表达对 MHCC97-H 细胞增殖、迁移侵袭和凋亡的作用 A: miR-326 相对表达量; B: 细胞增殖曲线; C: Transwell 实验结果; D: 流式细胞术检测结果; E: 增殖、迁移、侵袭和凋亡相关蛋白的表达

Figure 6 Influence of lncRNA RUSC1-AS1 interference with miR-326 inhibition on proliferation, migration, invasion and apoptosis of MHCC97-H cells A: Relative expression levels of miR-326; B: Cell proliferation curves; C: Results of Transwell assay; D: Results of flow cytometry analysis; E: Expression levels of proteins associated with proliferation, migration, invasion and apoptosis

2.7 lncRNA RUSC1-AS1 靶向调控 miR-326 的表达

StarBase在线软件预测显示lncRNA RUSC1-AS1与miR-326存在互补的核苷酸序列(图7A)。在MHCC97-H细胞中共转染miR-326模拟物或阴性对照序列和WT-RUSC1-AS1或MUT-RUSC1-AS1,双荧光素酶报告实验结果显示(图7B),过表达miR-326明显降低包含WT-RUSC1-AS1质粒

的荧光素酶活性($P<0.05$),但不影响包含MUT-RUSC1-AS1质粒的荧光素酶活性($P>0.05$)。qRT-PCR检测转染lncRNA RUSC1-AS1过表达质粒、干扰质粒或阴性对照序列的MHCC97-H细胞中miR-326表达水平,结果显示,过表达RUSC1-AS1导致miR-326表达水平明显降低,抑制RUSC1-AS1表达导致miR-326表达水平明显升高(均 $P<0.05$)(图7C)。

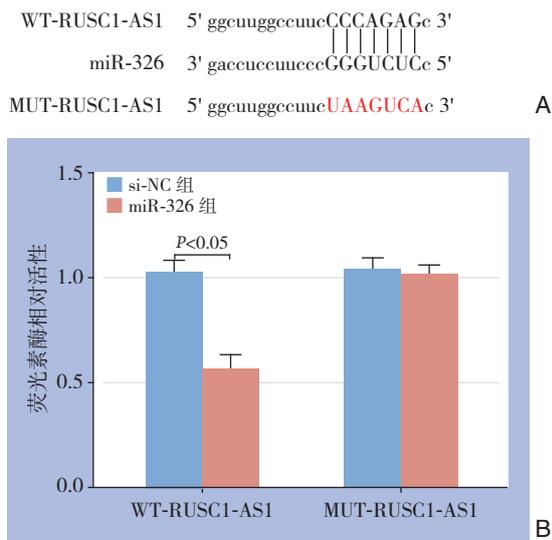


图7 lncRNA RUSC1-AS1 与 miR-326 的关系分析 A: lncRUSC1-AS1 的序列中含有与 miR-326 互补的核苷酸序列; B: 双荧光素酶报告实验结果; C: lncRNA RUSC1-AS1 调控 miR-326 的表达

Figure 7 Analysis of relationship between lncRNA RUSC1-AS1 and miR-326 A: Complementary nucleotide sequence of miR-326 in lncRUSC1-AS1 sequence; B: Results of luciferase report assay; C: Regulatory effect of lncRNA RUSC1-AS1 on miR-326 expression

3 讨论

越来越多的研究^[15-17]表明lncRNA在肝癌的发生发展中发挥重要的作用,其可能通过调控抑癌或致癌基因起作用。因此,研究影响肝癌的lncRNA对于揭示肝癌发生发展的分子机制至关重要。已有大量研究表明多种lncRNA影响肝癌的进展,如lncRNA LBX2-AS1通过充当miR-384的竞争内源RNA,从而上调胰岛素受体底物1(insulin receptor substrate-1, IRS1)的表达来驱动肝癌的发展;敲低lncRNA LBX2-AS1会减弱肝癌细胞增殖,迁移和侵袭,并在体外诱导其凋亡^[18]。LINC01139通过与miR-30家族竞争性结合,通过上调成髓细胞瘤转录因子第2亚型(MYB proto-oncogene like 2, MYBL2)来促进肝细胞癌的发展;LINC01139可能成为肝癌患者的潜在治疗靶点和预后生物标志物^[19]。近年来研究表明

lncRNA RUSC1-AS1在人类肿瘤中起重要作用,已有研究^[13-14]报道lncRNA RUSC1-AS1在乳腺癌、喉鳞状细胞癌中具有致癌作用。且有研究^[20]报道lncRNA RUSC1-AS1在宫颈癌组织和细胞系中高表达,RUSC1-AS1的高表达与宫颈癌患者的FIGO分期,淋巴结转移和较短的总生存期显著相关;干扰lncRNA RUSC1-AS1表达通过上调miR-744抑制了宫颈癌细胞的体外增殖,迁移和侵袭,诱导细胞凋亡;并阻碍体内肿瘤的生长。然而目前lncRNA RUSC1-AS1在肝癌发生发展中的作用尚不清楚。本研究重点研究lncRNA RUSC1-AS1在肝癌组织中的表达,并进一步探究lncRNA RUSC1-AS1对肝癌细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响及其潜在的作用机制。

本研究首先在20例肝癌组织和对应的癌旁组织中检测lncRNA RUSC1-AS1的表达差异,结果发现lncRNA RUSC1-AS1在肝癌组织中的表达水平

显著高于对应的癌旁组织,表明lncRNA RUSC1-AS1在肝癌组织可能起促癌作用,与在其他癌症中的作用相同。功能试验发现干扰lncRNA RUSC1-AS1表达后,肝癌MHCC97-H细胞在培养至24、48、72 h时细胞OD值显著降低,细胞迁移、侵袭数显著降低,细胞凋亡率显著升高,cyclin D1、MMP-2、MMP-9、Bcl-2蛋白表达水平显著降低,P21、Bax蛋白表达水平显著升高。cyclin D1、P21是细胞周期相关蛋白,其表达水平与细胞增殖有关,cyclin D1是正调控因子,P21是负调控因子,cyclin D1低表达,P21高表达抑制细胞增殖^[21]。MMP-2、MMP-9是基质金属蛋白酶家族成员,其高表达可降解细胞外基质,促进细胞迁移、侵袭^[22]。Bcl-2、Bax是调控细胞凋亡的关键因子,Bcl-2是抗凋亡因子,Bax是促凋亡因子,其表达水平可反映细胞凋亡情况^[23]。表明干扰lncRNA RUSC1-AS1表达可显著抑制MHCC97-H细胞增殖、迁移和侵袭,并促进细胞凋亡。

研究^[24-27]表明miRNA也参与调控肝癌细胞的发生发展过程,影响癌细胞的增殖、凋亡、转移等。有研究^[28]报道miR-326在肝癌组织和细胞系中下调表达,miR-326的低表达与肝癌患者的TNM分期,分化和淋巴结转移密切相关;miR-326过表达通过直接靶向LIM和SH3蛋白1(LIM and SH3 protein 1, LASP1)在体外抑制了肝癌细胞的增殖和侵袭,并激活了细胞凋亡。还有研究^[29]表明miR-326过表达可显著抑制前列腺癌细胞增殖,集落形成,迁移和侵袭,诱导G₀/G₁细胞周期阻滞并促进前列腺癌细胞凋亡。上调miR-326显著抑制了乳腺癌细胞生长和集落形成,且阻滞了细胞周期,并诱导了细胞凋亡^[30]。本实验结果显示,与癌旁组织相比,miR-326在肝癌组织中表达水平显著升高。过表达miR-326后,肝癌MHCC97-H细胞培养至24、48、72 h时细胞OD值显著降低,细胞迁移、侵袭数显著降低,细胞凋亡率显著升高,cyclin D1、MMP-2、MMP-9、Bcl-2蛋白表达水平显著降低,P21、Bax蛋白表达水平显著升高。说明过表达miR-326可显著抑制MHCC97-H细胞增殖、迁移和侵袭,并促进细胞凋亡。

为进一步研究lncRNA RUSC1-AS1对肝癌细胞的影响的机制是否与miR-326有关,本实验通过StarBase在线软件预测可能与lncRNA RUSC1-AS1结合的miRNA,结果发现lncRNA RUSC1-AS1与miR-326存在结合位点,双荧光素酶报告实验结

果证实lncRNA RUSC1-AS1可靶向miR-326。且过表达lncRNA RUSC1-AS1导致miR-326表达水平显著降低,抑制lncRNA RUSC1-AS1表达导致miR-326表达水平显著升高,表明lncRNA RUSC1-AS1确实可调控miR-326的表达。研究报道lncRNA可通过调控miR-326表达影响肿瘤进展,如lncRNA DDX11-AS1通过调节miR-326/IRS1轴促进胃癌的细胞进程和奥沙利铂耐药性^[31]。lncRNA TDRG1通过靶向miR-326调节子宫癌中丝裂原活化蛋白激酶1(mitogen-activated protein kinase1, MAPK1)的表达来促进细胞增殖、迁移和侵袭^[32]。lncRNA SNHG3通过靶向miR-326促进肝细胞肿瘤的发生^[33]。lncRNA H19可以作为ceRNA海绵来修饰miR-326并调节TWIST1表达参与肝细胞癌的发展^[34]。本实验结果显示,抑制miR-326表达的同时干扰lncRNA RUSC1-AS1表达,培养24、48、72 h后细胞OD值显著升高,且细胞迁移、侵袭数显著升高,细胞凋亡率显著降低,cyclin D1、MMP-2、MMP-9、Bcl-2蛋白表达水平显著升高,P21、Bax蛋白表达水平显著降低。说明抑制miR-326表达可能逆转了干扰lncRNA RUSC1-AS1表达对肝癌细胞增殖、迁移、侵袭的抑制和凋亡促进作用。

综上所述,肝癌组织中lncRNA RUSC1-AS1异常高表达,干扰lncRNA RUSC1-AS1表达可能通过上调miR-326表达抑制肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭,并促进细胞凋亡。lncRNA RUSC1-AS1的异常高表达可能是促进肝癌进展的驱动因素,其可作为生物治疗肝癌的潜在作用靶点。

参考文献

- [1] 鞠明光,徐锋,戴朝六.肝细胞癌微血管侵犯研究对外科肿瘤学切缘的启示[J].中华普通外科学文献:电子版,2018,12(5):292-296. doi:10.3877/cma.j.issn.1674-0793.2018.05.002.
Ju MG, Xu F, Dai ZL. Revelations of microvascular invasion investigation of liver cancer to surgical margins of oncological surgery[J]. Chinese Archives of General Surgery: Electronic Edition, 2018, 12(5):292-296. doi:10.3877/cma.j.issn.1674-0793.2018.05.002.
- [2] 樊嘉.我国肝癌诊疗和临床研究进展[J].中国实用外科杂志,2019,39(10):1010-1014. doi: 10.19538/j.cjps.issn1005-2208.2019.10.02.
Fan J. The advances in diagnosis, treatment and clinical research of hepatocellular carcinoma in China[J]. Chinese Journal of Practical Surgery, 2019, 39(10):1010-1014. doi: 10.19538/j.cjps.

- issn1005-2208.2019.10.02.
- [3] Shen Y, Xi F, Li H, et al. Telomerase reverse transcriptase suppression inhibits cell proliferation and promotes cell apoptosis in hepatocellular cancer[J]. *IUBMB Life*, 2018, 70(7):642-648. doi:10.1002/iub.1758.
- [4] Shi K, Ru Q, Zhang C, et al. Cyclin Y modulates the proliferation, invasion, and metastasis of hepatocellular carcinoma cells[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24:1642-1653. doi: 10.12659/msm.906075.
- [5] Xu JH, Chang WH, Fu HW, et al. The mRNA, miRNA and lncRNA networks in hepatocellular carcinoma: An integrative transcriptomic analysis from Gene Expression Omnibus[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(5):6472-6482. doi:10.3892/mmr.2018.8694.
- [6] Zhang G, Pian C, Chen Z, et al. Identification of cancer-related miRNA-lncRNA biomarkers using a basic miRNA-lncRNA network[J]. *Plos One*, 2018,13(5):e196681. doi:10.1371/journal.pone.0196681.
- [7] Zhao Y, Wang H, Wu C, et al. Construction and investigation of lncRNA-associated ceRNA regulatory network in papillary thyroid cancer[J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(3):1197-1206. doi:10.3892/or.2018.6207.
- [8] Zhou GR, Huang DP, Sun ZF, et al. Long non-coding RNA BCAR4 accelerates cell proliferation and suppresses cell apoptosis in gastric cancer via regulating MAPK/ERK signaling[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(7):3657-3664. doi:10.26355/eurrev_202004_20828.
- [9] Huang Z, Zhou JK, Peng Y, et al. The role of long noncoding RNAs in hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1):77. doi:10.1186/s12943-020-01188-4.
- [10] Zhou YG, Sun F, Zhou YF. Low expression of lncRNA TUBA4B promotes proliferation and inhibits apoptosis of colorectal cancer cells via regulating P15 and P16 expressions[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(6):3023-3029. doi:10.26355/eurrev_202003_20666.
- [11] Wang C, Zi H, Wang Y, et al. LncRNA CASC15 promotes tumour progression through SOX4/Wnt/ β -catenin signalling pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2020, 48(1):763-769. doi:10.1080/21691401.2019.1576713.
- [12] Gao J, Dai C, Yu X, et al. LncRNA LEF1-AS1 silencing diminishes EZH2 expression to delay hepatocellular carcinoma development by impairing CEBPB-interaction with CDCA7[J]. *Cell Cycle*, 2020, 19(8):870-883. doi:10.1080/15384101.2020.1731052.
- [13] Hu CC, Liang YW, Hu JL, et al. LncRNA RUSC1-AS1 promotes the proliferation of breast cancer cells by epigenetic silence of KLF2 and CDKN1A[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(15):6602-6611. doi:10.26355/eurrev_201908_18548.
- [14] Hui L, Wang J, Zhang J, et al. lncRNA TMEM51-AS1 and RUSC1-AS1 function as ceRNAs for induction of laryngeal squamous cell carcinoma and prediction of prognosis[J]. *PeerJ*, 2019, 7(1):e7456. doi:10.7717/peerj.7456.
- [15] 胡走肖, 郑小林. 长链非编码RNA MIF-AS1在肝癌中表达及其与上皮-间充质转化的关系[J]. *中国普通外科杂志*, 2019, 28(7):848-856. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2019.07.011. Hu ZX, Zheng XL. Expression of long non-coding RNA MIF-AS1 in hepatocellular carcinoma and its association with epithelial-mesenchymal transition[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2019, 28(7):848-856. doi :10.7659/j.issn.1005-6947.2019.07.011.
- [16] Jiao Y, Li Y, Jia B, et al. The prognostic value of lncRNA SNHG4 and its potential mechanism in liver cancer[J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(1):R20190729. doi:10.1042/BSR20190729.
- [17] Hu M, Han Y, Zhang Y, et al. lncRNA TINCR sponges miR-214-5p to upregulate ROCK1 in hepatocellular carcinoma[J]. *BMC Med Genet*, 2020, 21(1):2. doi:10.1186/s12881-019-0940-6.
- [18] Wang Y, Zhao Y, Zhang X, et al. Long noncoding RNA LBX2-AS1 drives the progression of hepatocellular carcinoma by sponging microRNA-384 and thereby positively regulating IRS1 expression[J]. *Pathol Res Pract*, 2020, 216(4):152903. doi:10.1016/j.prp.2020.152903.
- [19] Li ZB, Chu HT, Jia M, et al. Long noncoding RNA LINC01139 promotes the progression of hepatocellular carcinoma by upregulating MYBL2 via competitively binding to miR-30 family[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 525(3):581-588. doi:10.1016/j.bbrc.2020.02.116.
- [20] Guo Q, Zhang Q, Lu L, et al. Long noncoding RNA RUSC1-AS1 promotes tumorigenesis in cervical cancer by acting as a competing endogenous RNA of microRNA-744 and consequently increasing Bcl-2 expression[J]. *Cell Cycle*, 2020, 19(10):1222-1235. doi: 10.1080/15384101.2020.1749468.
- [21] Joa H, Blažević T, Grojer C, et al. Tylophorine reduces protein biosynthesis and rapidly decreases cyclin D1, inhibiting vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in organ culture[J]. *Phytomedicine*, 2019, 60:152938. doi: 10.1016/j.phymed.2019.152938.
- [22] Liao CL, Chu YL, Lin HY, et al. Bis demethoxycurcumin suppresses migration and invasion of human cervical cancer HeLa cells via inhibition of NF- κ B, MMP-2 and -9 pathways[J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(7):3989-3997. doi: 10.21873/anticancer.12686.
- [23] Huang Y, Fu Z, Dong W, et al. Serum starvation-induces down-regulation of Bcl-2/Bax confers apoptosis in tongue coating-related cells in vitro[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(4):5057-5064. doi:10.3892/mmr.2018.8512.
- [24] Ji L, Lin Z, Wan Z, et al. miR-486-3p mediates hepatocellular carcinoma sorafenib resistance by targeting FGFR4 and EGFR[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(4):250. doi:10.1038/s41419-020-2413-4.
- [25] Zhao X, Dou J, Cao J, et al. Uncovering the potential differentially

- expressed miRNAs as diagnostic biomarkers for hepatocellular carcinoma based on machine learning in The Cancer Genome Atlas database[J]. *Oncol Rep*, 2020, 43(6):1771-1784. doi: 10.3892/or.2020.7551.
- [26] Chen F, Ni X, Chen L, et al. miR-939-3p promotes epithelial-mesenchymal transition and may be used as a prognostic marker in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2020,19(4):2727-2732. doi:10.3892/ol.2020.11361.
- [27] El-Ahwany E, Mansy SS, Zoheiry M, et al. MicroRNA-195 vector influence on the development of gradually induced hepatocellular carcinoma in murine model[J]. *Ultrastruct Pathol*, 2020, 44(2): 203-210. doi:10.1080/01913123.2020.1744783.
- [28] Hu S, Ran Y, Chen W, et al. MicroRNA-326 inhibits cell proliferation and invasion, activating apoptosis in hepatocellular carcinoma by directly targeting LIM and SH3 protein 1[J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(3):1569-1578. doi:10.3892/or.2017.5810.
- [29] Liang X, Li Z, Men Q, et al. miR-326 functions as a tumor suppressor in human prostatic carcinoma by targeting Mucin1[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 108:574-583. doi:10.1016/j.biopha.2018.09.053.
- [30] Ghaemi Z, Soltani BM, Mowla SJ. MicroRNA-326 Functions as a Tumor Suppressor in Breast Cancer by Targeting ErbB/PI3K Signaling Pathway[J]. *Front Oncol*, 2019, 9(1):653. doi:10.3389/fonc.2019.00653.
- [31] Song W, Qian Y, Zhang MH, et al. The long non-coding RNA DDX11-AS1 facilitates cell progression and oxaliplatin resistance via regulating miR-326/IRS1 axis in gastric cancer[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(6):3049-3061. doi:10.26355/eurev_202003_20669.
- [32] Jiang H, Liang M, Jiang Y, et al. The lncRNA TDRG1 promotes cell proliferation, migration and invasion by targeting miR-326 to regulate MAPK1 expression in cervical cancer[J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19:152. doi:10.1186/s12935-019-0872-4.
- [33] Zhao Q, Wu C, Wang J, et al. LncRNA SNHG3 Promotes Hepatocellular Tumorigenesis by Targeting miR-326[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2019, 249(1):43-56. doi: 10.1620/tjem.249.43.
- [34] Wei LQ, Li L, Lu C, et al. Involvement of H19/miR-326 axis in hepatocellular carcinoma development through modulating TWIST1[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4):5153-5162. doi:10.1002/jcp.27319.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 陈怡文, 郭冰沁, 李洪涛. 长链非编码RNA RUSC1-AS1 对肝细胞癌恶性生物学行为的影响及其与微小RNA-326 的关系[J]. 中国普通外科杂志, 2020, 29(7):827-838. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2020.07.007

Cite this article as: Chen YW, Guo BQ, Li HT. Influence of long non-coding RNA RUSC1-AS1 on malignant biological behaviors of hepatocellular carcinoma and its relationship with microRNA-326[J]. *Chin J Gen Surg*, 2020, 29(7):827-838. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2020.07.007

关于一稿两投和一稿两用问题处理的声明

本刊编辑部发现仍有个别作者一稿两投和一稿两用, 为了维护本刊的声誉和广大读者的利益, 本刊就一稿两投和一稿两用问题的处理声明如下。

1. 一稿两投和一稿两用的认定: 凡属原始研究的报告, 同语种一式两份投寄不同的杂志, 或主要数据和图表相同、只是文字表达可能存在某些不同之处的两篇文稿, 分别投寄不同的杂志, 属一稿两投; 一经为两杂志刊用, 则为一稿两用。会议纪要、疾病的诊断标准和防治指南、有关组织达成的共识性文件、新闻报道类文稿分别投寄不同的杂志, 以及在一种杂志发表过摘要而将全文投向另一杂志, 不属一稿两投。但作者若要重复投稿, 应向有关杂志编辑部作出说明。

2. 作者在接到收稿回执后满 3 个月未接到退稿通知, 表明稿件仍在处理中, 若欲投他刊, 应先与本刊编辑部联系。

3. 编辑部认为文稿有一稿两投或两用嫌疑时, 应认真收集有关资料并仔细核对后再通知作者, 在作出处理决定前请作者就此问题作出解释。编辑部与作者双方意见发生分歧时, 由上级主管部门或有关权威机构进行最后仲裁。

4. 一稿两投一经证实, 则立即退稿, 对该作者作为第一作者所撰写的论文, 2 年内将拒绝在本刊发表; 一稿两用一经证实, 将择期在杂志中刊出作者姓名、单位以及该论文系重复发表的通告, 对该作者作为第一作者所撰写的论文, 2 年内拒绝在本刊杂志发表。本刊将就此事向作者所在单位和该领域内的其他科技期刊进行通报。

中国普通外科杂志编辑部