

DOI:10.16781/j.0258-879x.2018.12.1309

· 论 著 ·

长链非编码 RNA-8439 促进肝癌细胞多能因子 nanog 的表达

胡贻隽^{1,2}, 刘淑鹏², 程 凯², 徐贵霞², 胡晶晶^{1*}, 刘善荣^{1*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)长海医院实验诊断科, 上海 200433

2. 海军军医大学(第二军医大学)长海医院临床实验中心, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨长链非编码 RNA (lncRNA)-8439 与多能因子 nanog 的关系, 及 lncRNA 对肝癌细胞生长的影响。**方法** 在肝癌原发灶与转移灶组织中, 通过 lncRNA 测序与生物信息学分析方法筛选与多能因子 nanog、oct4、sox2 相关的差异表达 lncRNA。采用实时荧光定量 PCR (qPCR) 法检测差异表达的 lncRNA 在人肝癌细胞系 Hep3B、Huh7 细胞及对应的肿瘤悬浮球中的表达量。通过生物信息学分析明确 lncRNA-8439 与 nanog 结合的可能性, 采用荧光原位杂交方法观察 lncRNA-8439 在 Hep3B 和 Huh7 细胞中的定位。敲低 lncRNA-8439 后, 采用 qPCR 和蛋白质印迹法检测 2 种肝癌细胞中 nanog 的表达, 观察悬浮球生长情况。过表达 lncRNA-8439 后, 采用 qPCR 和蛋白质印迹法检测 2 种肝癌细胞中 nanog 的表达。**结果** 筛选到 9 种与多能因子相关的差异表达 lncRNA, 但仅 lncRNA-8439 在 2 种肝癌细胞悬浮球中呈一致的上调表达, 与对应的贴壁细胞相比差异均有统计学意义 (P 均 <0.01)。lncRNA-8439 的 3' 端有 nanog 结合位点。lncRNA-8439 在细胞核中表达, 细胞质中并无分布。敲低 lncRNA-8439 后, 2 种肝癌细胞中 nanog 表达量在 RNA 与蛋白水平均降低 (P 均 <0.01), 肝癌肿瘤悬浮球数量减少。过表达 lncRNA-8439 后, 2 种肝癌细胞中 nanog 表达量在 RNA 与蛋白水平均增加 (P 均 <0.01)。**结论** lncRNA-8439 通过促进多能因子 nanog 的表达影响肿瘤细胞的自我更新能力, 可能是导致肝癌侵袭和转移的原因。

[关键词] 肝细胞癌; 长链非编码 RNA; lncRNA-8439; 多能因子 nanog; 肿瘤转移

[中图分类号] R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2018)12-1309-08

Long non-coding RNA-8439 up-regulates expression of pluripotency factor nanog in hepatoma carcinoma cells

HU Yi-jun^{1,2}, LIU Shu-peng², CHENG Kai², XU Gui-xia², HU Jing-jing^{1*}, LIU Shan-rong^{1*}

1. Department of Laboratory Medicine, Changhai Hospital, Navy Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. Clinical Research Center, Changhai Hospital, Navy Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To explore the relationship between long non-coding RNA (lncRNA)-8439 and pluripotency factor nanog, and to investigate the potential effect of lncRNA-8439 on the growth of hepatoma carcinoma cells. **Methods** RNA-sequencing and bioinformatics tools were used to screen the differentially expressed lncRNA related to pluripotency factors (nanog, oct4 and sox2) in primary and metastatic tissues of hepatocellular carcinoma. The differentially expressed lncRNA levels were tested by real-time quantitative PCR (qPCR) in human hepatoma carcinoma cell lines, Hep3B and Huh7, and their corresponding suspended spheres. The potential of binding of lncRNA-8439 and nanog was determined using bioinformatics tools. Localization of lncRNA-8439 in the Hep3B and Huh7 cells was observed by fluorescence *in situ* hybridization. After knocking down lncRNA-8439, the expression levels of nanog in the Hep3B and Huh7 cells were detected by qPCR and Western blotting, and the growth status of suspended spheres was observed. After overexpressing lncRNA-8439, the expression levels of nanog were measured by qPCR and Western blotting in the two kinds of cancer cells. **Results** A total of 9 differentially expressed lncRNAs related to pluripotency factors were identified, while only lncRNA-8439 expression was significantly higher in the suspended spheres of two kinds of cancer cells compared with their corresponding adherent cells (both

[收稿日期] 2018-07-25 **[接受日期]** 2018-09-20

[基金项目] 国家自然科学基金(81402452), 上海市自然科学基金(14ZR1408500), 国家杰出青年科学基金(81425019). Supported by National Natural Science Foundation of China (81402452), Natural Science Foundation of Shanghai (14ZR1408500), and National Science Fund for Distinguished Young Scholars (81425019).

[作者简介] 胡贻隽, 硕士生. E-mail: yijun162@126.com

*通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-31162095, E-mail: luckyjingjing2000@163.com; Tel: 021-31162061, E-mail: liushanrong@hotmail.com

$P < 0.01$). LncRNA-8439 had binding sites of nanog at its 3' end. LncRNA-8439 was located in the nucleus of the Hep3B and Huh7 cells but not in the cytoplasm. After knocking down lncRNA-8439, the RNA and protein expression levels of nanog were significantly reduced in the Hep3B and Huh7 cells (all $P < 0.01$), and the number of suspended spheres was also reduced. After overexpressing lncRNA-8439, the RNA and protein expression levels of nanog were significantly up-regulated in the two kinds of cancer cells (all $P < 0.01$). **Conclusion** LncRNA-8439 affects self-renewal ability of hepatoma carcinoma cells through up-regulating expression of pluripotency factor nanog, which may be the cause of invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma.

[Key words] hepatocellular carcinoma; long non-coding RNA; lncRNA-8439; pluripotency factor nanog; neoplasm metastasis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(12): 1309-1316]

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是肝恶性肿瘤中最常见的病理类型, 其进展快, 恶性程度较高, 预后较差, 死亡率较高^[1]。肿瘤转移是人类恶性肿瘤疾病中致死性因素之一^[2], 探讨肿瘤转移的机制对于开发相关治疗策略、降低转移相关死亡率具有重要意义。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类转录本长度超过 200 核苷酸单位 (nucleotide) 的功能性 RNA 分子, 参与包括 HCC 在内的多种癌症的发生和发展过程, 且与许多肿瘤的发展与转移密切相关^[3-5]。

多能因子是保持细胞多潜能性和自我更新的核心基因, 具有抑制细胞分化的重要作用, 参与调控胚胎干细胞自我更新和多能性维持。核蛋白 oct4、nanog 和 sox2 是多能因子的 3 个主要成员^[6], 近年研究发现, 这 3 个多能因子在生殖细胞肿瘤和多种实体肿瘤中异常高表达, 参与正常细胞恶性转化, 调控肿瘤细胞的干性, 促进其增殖、迁移和侵袭等^[7-9]。它们的多重作用可能是推动肿瘤发展和转移的重要因素。本研究旨在寻找与多能因子相关的 lncRNA, 探讨其在 HCC 发展和转移中的作用, 为进一步探究 HCC 转移的机制提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 主要材料 临床标本为 2012 年 1 月至 8 月海军军医大学 (第二军医大学) 东方肝胆外科医院肝外六科行手术切除并经病理确诊的 HCC 原发灶组织及转移灶组织标本各 3 例, 标本获取后立即浸入 RNA 保存液并保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。人肝癌细胞系 Huh7、Hep3B 的原始细胞株均购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库。培养细胞的培养液、血清、胰酶、青霉素、链霉素、胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF)、成纤维细胞

生长因子 (fibroblast growth factor, FGF)、表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 均购自美国 Gibco 公司; 引物为生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成; 转染试剂脂质体 3000 及 TRIzol 试剂均购自美国 Invitrogen 公司; cDNA 反转录试剂盒及实时荧光定量 PCR 试剂盒购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; SYBR Taq 酶购自日本 TaKaRa 公司; lncRNA-8439 原位杂交探针、缓冲液等购自广州市锐博生物科技有限公司; 蛋白质印迹检测中使用的 nanog 抗体购自美国 Cell Signaling 公司, 二抗购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司。

1.2 差异表达 lncRNA 的筛选

1.2.1 LncRNA 测序 采集 HCC 患者原发灶与转移灶组织标本各 3 例, 根据 TRIzol 试剂操作说明抽提总 RNA, 检测 RNA 的纯度及完整性, 样品合格后分装保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。采用 AMPure XP beads 核酸纯化试剂盒 (美国 Beekman Coulter Beverly 公司) 筛选 cDNA。之后进行 PCR 扩增并再次使用 AMPure XP beads 核酸纯化试剂盒纯化 PCR 产物。获得 cDNA 文库并使用 Agilent2100 生物分析仪 (美国 Agilent Technologies 公司) 对 cDNA 文库进行质检。LncRNA 测序由上海康成生物有限公司完成。采用 Illumina HiSeq 测序平台, 对 HCC 患者原发灶和转移灶组织进行双端测序。采用 STAR 软件、HTSeq 软件和 edgeR 软件进行表达差异分析与筛选, 筛选的标准为变化倍数 > 2 或 < 0.5 且 $P < 0.05$, 并利用 Tree Viewer 软件进行簇分析。

1.2.2 生物信息学分析 使用 starBase V2.0 工具筛选与多能因子 sox2、oct4、nanog 相关的 lncRNA, 使用 lncRNadb 工具预测 lncRNA-8439 与 nanog 的相互作用位点。

1.3 细胞培养

1.3.1 细胞系培养 人肝癌细胞系 Huh7 和 Hep3B 采用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 0.1 g/L 链霉素的 DMEM 培养液, 置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养, 每天观察细胞生长情况, 隔天换液。

1.3.2 悬浮球培养 将 1 000 个单个 Huh7 和 Hep3B 细胞分别接种于包被聚 2-羟乙基甲基丙烯酸酯 [poly(2-hydroxyethyl methacrylate), polyHEMA] 涂层的 6 孔板。悬浮球采用 20 ng/mL IGF、1.0 ng/mL FGF 以及 20 ng/mL EGF 的 DMEM/F12 培养体系, 置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养 1 周。

1.4 实时荧光定量 PCR 用 TRIzol 试剂提取

细胞及组织总 RNA, 根据 cDNA 反转录试剂盒操作说明进行反转录合成 cDNA 的第一链。以合成的 cDNA 为模板, 扩增 lncRNA-8439、lncRNA-1711、lncRNA-3440、lncRNA-4374、lncRNA-5958、lncRNA-6183、lncRNA-6779、lncRNA-7921、lncRNA-5834、*nanog* 以及 *GAPDH* 基因 (引物序列见表 1)。PCR 反应体系为 20 μL; 反应条件: 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 15 s、60 °C 退火 60 s、72 °C 延伸 15 s, 共 45 个循环。以 lncRNA-8439 及 *nanog* 扩增产物荧光强度分别与 *GAPDH* 扩增产物荧光强度的比值代表其相对表达情况。以水为模板扩增的反应结果作为 PCR 扩增的阴性对照。

表 1 LncRNA 引物及小干扰 RNA 序列

Tab 1 LncRNA primer and small interfering RNA sequences

Name	Sequence (5'-3')
LncRNA-8439 qPCR primer	Forward: CTC CCA TTA AGC AAA GGA A Reverse: TTC CTT TGC TTA ATG GGA G
LncRNA-8439 clone primer	Forward: CGA GCT CTG CCA GCA CCA CCC TCA Reverse: GGA ATT CGA GGT GGA GTC TCG CTC TGT C
LncRNA-8439 RCS clone primer	Forward: TGC CAG CAC CAC CCT CA Reverse: GAG GTG GAG TCT CGC TCT GTC
LncRNA-1711 qPCR primer	Forward: GGC TCA CGC CTG TAA TCC C Reverse: ACG GAG TCT CGC TCT GTC G
LncRNA-3440 qPCR primer	Forward: GCG GGT GGA TCA CGA GGT CA Reverse: GAC GGA GTC TCG CTC TGT CG
LncRNA-4374 qPCR primer	Forward: AGG CTG AGG CAG GAG AAT GG Reverse: AGA TGG AGT CTC ACT CTA TCG CC
LncRNA-5958 qPCR primer	Forward: ATC ACG AGG TCA GGA GAT GGA G Reverse: GCC ATT CTC CCG CCT CAG
LncRNA-6183 qPCR primer	Forward: AAC ACG GTG AAA CCC TGT CTC TA Reverse: AGA GTC TTG CTC TGT CGC CCA
LncRNA-6779 qPCR primer	Forward: GGC GGA TCA CGA GGT CA Reverse: ACG GAG TCT CGC TCT GTC G
LncRNA-7921 qPCR primer	Forward: GCA TGT AAT CCC AGC ACT TTG Reverse: TCT CGG CTC ACT GCA AGC T
LncRNA-5834 qPCR primer	Forward: AGA CCA TCC TGG CTA ACA CGG Reverse: CTG CCT CCT GGG TTC ACG C
<i>Nanog</i> qPCR primer	Forward: AAT ACC TCA GCC TCC AGC AGA TG Reverse: TGC GTC ACA CCA TTG CTA TTC TTC
<i>GAPDH</i> qPCR primer	Forward: AGA AGG CTG GGG CTC ATT TG Reverse: AGG GGC CAT CCA CAG TCT TC
Small interfering RNA-2	Sense: CUC CCA UUA AGC AAA GGA A Antisense: UUC CUU UGC UUA AUG GGA G

LncRNA: Long non-coding RNA; qPCR: Real-time quantitative PCR; RCS: Reverse complementary sequence; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

1.5 荧光原位杂交 于 24 孔培养板中置入 10 mm×10 mm 玻片, 取生长状态良好并处于对数生长期的 Huh7 和 Hep3B 细胞, 分别按照每孔 6×10³ 个

细胞的密度接种于 24 孔板中。培养 24 h 后去除上清, 用 4 °C 多聚甲醛溶液固定, 用 0.1% 的 Triton X-100 通透, 加入预杂交液在 37 °C 下预杂交,

再分别加入 18S、U6、lncRNA-8439 anti-sense 和 lncRNA-8439 sense 探针于 42 °C 下杂交 16~20 h。然后用 2×柠檬酸钠缓冲液冲洗,滴加 DAPI 荧光染液于切片杂交区域染色 10 min,用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 清洗后在荧光显微镜下观察。

1.6 lncRNA-8439 干扰实验 取生长状态良好并处于对数生长期的 Huh7 和 Hep3B 细胞,按照每孔 5×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板中,培养 24 h。构建 lncRNA-8439 的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 序列 siRNA-1、siRNA-2、siRNA-3 和空载体。分别将每种细胞分为 4 组,即空载体对照组、siRNA-1 干扰组、siRNA-2 干扰组、siRNA-3 干扰组,待细胞贴壁后,将脂质体 3000 和 siRNA (或空载体) 的混合物滴入接种有细胞的培养板中,混匀培养,培养 4~6 h 后换为含血清的培养液,再培养 48 h 后用实时荧光定量 PCR 方法检测 siRNA 的干扰效率。siRNA-1 并无明显干扰效果,siRNA-2 和 siRNA-3 能有效抑制 lncRNA-8439 在 2 种细胞系中的表达,且 siRNA-2 干扰效果最佳,故后续用 siRNA-2 (序列见表 1) 进行干扰实验。通过 siRNA 干扰敲低 lncRNA-8439 表达后,采用实时荧光定量 PCR 和蛋白质印迹法检测 2 种 HCC 细胞中 nanog 的表达水平,并观察悬浮球生长情况。

1.7 lncRNA-8439 过表达实验 通过 NCBI 数据库获取 lncRNA-8439 的部分序列,根据其序列的反向互补序列 (reverse complementary sequence, RCS) 构建过表达载体 (序列见表 1)。取生长状态良好并处于对数生长期的 Huh7 和 Hep3B 细胞,按照每孔 5×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板中,转染

时细胞融合度达 60%~70%。按照脂质体 3000 转染试剂说明书分别将过表达质粒与对照质粒转染至细胞,转染 48 h 后提取 RNA 检测转染效率。Huh7 过表达组 lncRNA-8439 的表达量约为对照组的 10 倍,Hep3B 过表达组 lncRNA-8439 的表达量约为对照组的 8 倍。随后采用实时荧光定量 PCR 和蛋白质印迹法检测 2 种 HCC 细胞中 nanog 的表达。

1.8 蛋白质印迹分析 收集细胞,用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 细胞裂解液裂解,提取蛋白并定量。取 40 μ L 总蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜后以 5% 脱脂牛奶溶液封闭 1 h,加入一抗于 4 °C 下孵育过夜,再加入二抗常温孵育 1 h。用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。曝光,以内参 β -actin 为标准分析目的蛋白的相对表达量。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行数据处理。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用两样本均数比较的 *t* 检验 (若方差不齐则采用 Welch 校正的 *t* 检验)。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 多能因子相关 lncRNA 筛选 应用 lncRNA 测序分析 3 对 HCC 原发灶与转移灶组织 lncRNA 表达谱,对筛选出的差异表达 lncRNA 集簇分析,直观反映出 HCC 原发灶与转移灶组织标本间 lncRNA 有较大差异 (图 1)。实时定量验证结果与测序数据趋势基本一致,证实结果是准确、可靠的。通过生物信息学手段预测后筛选出 9 个与多能因子 nanog、oct4、sox2 相关的 lncRNA,分别为 lncRNA-1711、lncRNA-3440、lncRNA-4374、lncRNA-5958、lncRNA-6183、lncRNA-6779、lncRNA-7921、lncRNA-8439 和 lncRNA-5834。

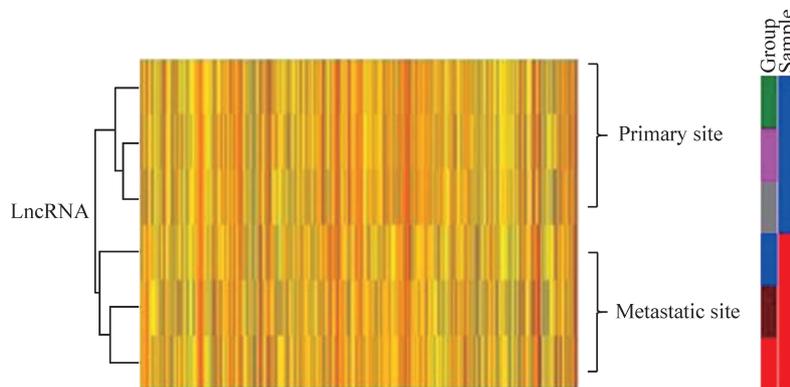


图 1 集簇分析 3 对肝癌原发灶与转移灶中的差异表达 lncRNA

Fig 1 Cluster analysis of differentially expressed lncRNAs in 3 pairs of primary and metastatic tissues of hepatocellular carcinoma

LncRNA: Long non-coding RNA

2.2 LncRNA-8439 在 2 种肿瘤悬浮球中呈一致的上调表达 采用实时荧光定量 PCR 检测上述 9 个 lncRNA 在人肝癌细胞系 Huh7 和 Hep3B 及其相应的肿瘤悬浮球中的表达量。结果 (图 2) 显示 9 个与肿瘤干细胞多能因子相关的 lncRNA

中, 仅有 lncRNA-8439 在 2 种肿瘤细胞悬浮球中呈一致上调表达, 与对应的贴壁细胞系表达量相比差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01), 故选择 lncRNA-8439 作进一步研究。

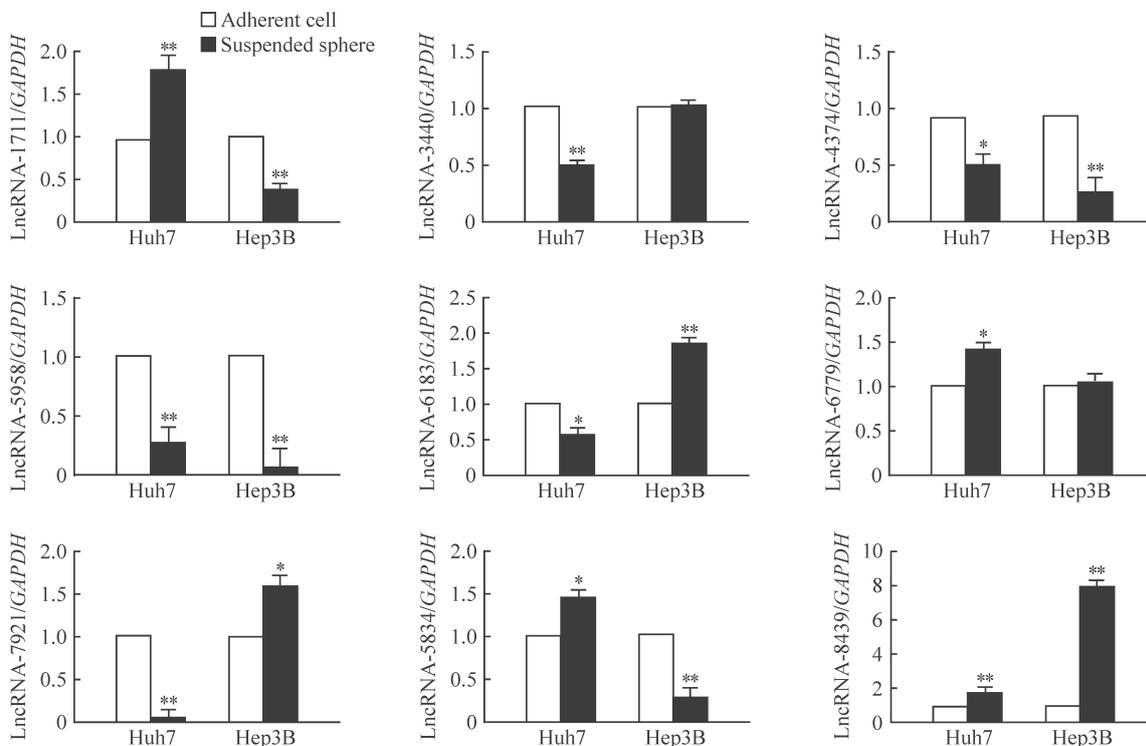


图 2 qPCR 检测 Huh7 和 Hep3B 贴壁细胞与悬浮球中 9 个多能因子相关 lncRNA 的表达量

Fig 2 Expression levels of 9 lncRNAs related to pluripotency factor in Huh7 and Hep3B adherent cells and their corresponding suspended spheres by qPCR

LncRNA: Long non-coding RNA; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; qPCR: Real-time quantitative PCR. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ vs adherent cell. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.3 LncRNA-8439 与多能因子 nanog 相关 使用 lncRNadb 工具对 lncRNA-8439 进行生物信息学分析, 得出 lncRNA-8439 与 nanog 结合具有可能性, LncRNA-8439 的 3' 端存在 nanog 结合位点 (图 3)。

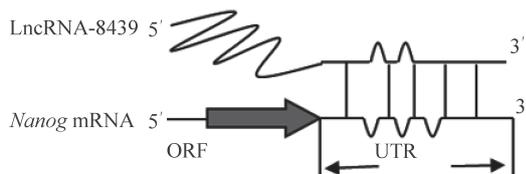


图 3 LncRNA-8439 与多能因子 nanog 的结合位点

Fig 3 Binding site of lncRNA-8439 and pluripotency factor nanog

LncRNA: Long non-coding RNA; ORF: Open reading frame; UTR: Untranslated region

2.4 LncRNA-8439 在 HCC 细胞中的分布 使用 lncRNA-8439 探针对 Huh7 和 Hep3B 细胞进行原位杂交, 结果 (图 4) 显示 lncRNA-8439 基本分布在细胞核中, 细胞质中并无表达。

2.5 敲低 lncRNA-8439 能降低 nanog 表达水平和肿瘤细胞悬浮球数量 使用 siRNA-2 在 Huh7 和 Hep3B 细胞中敲低 lncRNA-8439 的表达后, 分别收集细胞利用实时荧光定量 PCR 和蛋白质印迹法检测 nanog 的表达量, 结果显示干扰组中的 nanog 表达量在 RNA (图 5A) 和蛋白水平 (Huh7 细胞: 40.57 ± 1.19 vs 435.81 ± 6.75 , Hep3B: 18.50 ± 0.75 vs 470.13 ± 2.18 ; 图 5B) 均降低, 与对照组相比差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01)。同时, 干扰组的肿瘤细胞悬浮球数量明显少于对照组 (图 5C)。

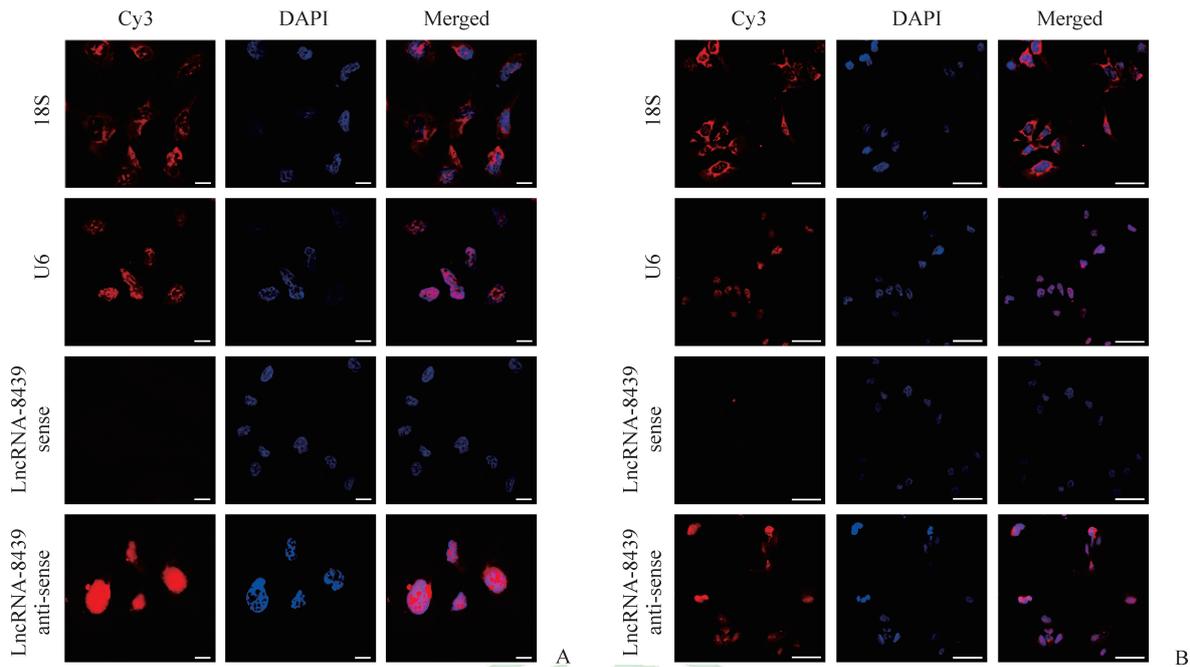


图4 荧光原位杂交显示 lncRNA-8439 在 Hep3B 细胞 (A) 和 Huh7 细胞 (B) 中的分布

Fig 4 Fluorescence *in situ* hybridization showing distributions of lncRNA-8439 in Huh7 (A) and Hep3B (B) cells

LncRNA: Long non-coding RNA. Scale bar: 50 μ m

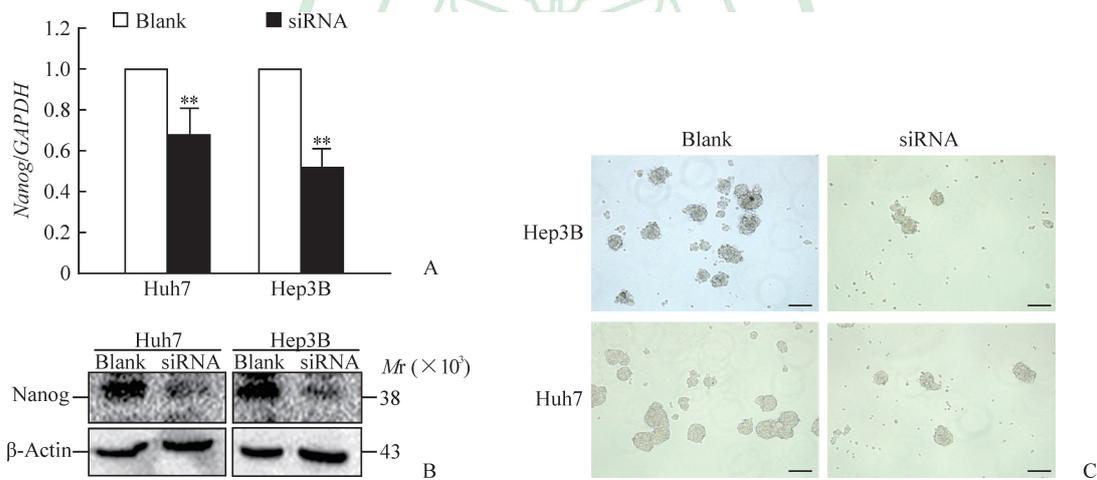


图5 干扰 lncRNA-8439 降低 nanog 表达水平及 Hep3B 和 Huh7 细胞悬浮球数量

Fig 5 Nanog expression level and number of suspended spheres were significantly reduced after knocking down lncRNA-8439

A, B: RNA and protein expression levels of nanog were reduced after lncRNA-8439 siRNA transfection respectively; C: Number of Hep3B and Huh7 suspended spheres was reduced after lncRNA-8439 siRNA transfection. Blank: The cells were transfected with blank vector. LncRNA: Long non-coding RNA; siRNA: Small interfering RNA; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. ** $P < 0.01$ vs blank. $n = 3, \bar{x} \pm s$. Scale bar: 100 μ m

2.6 过表达 lncRNA-8439 能提高 HCC 细胞中 nanog 的表达水平 在 Huh7 和 Hep3B 细胞中过表达 lncRNA-8439, 收集细胞利用实时荧光定量 PCR 和蛋白质印迹法检测 nanog 的表达量, 结果显示过表达组中的 nanog 表达量在 RNA

(图 6A) 和蛋白水平 (Huh7 细胞: 497.12 ± 7.28 vs 59.30 ± 0.86 , Hep3B 细胞: 530.80 ± 2.95 vs 80.31 ± 1.27 ; 图 6B) 均增高, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01)。

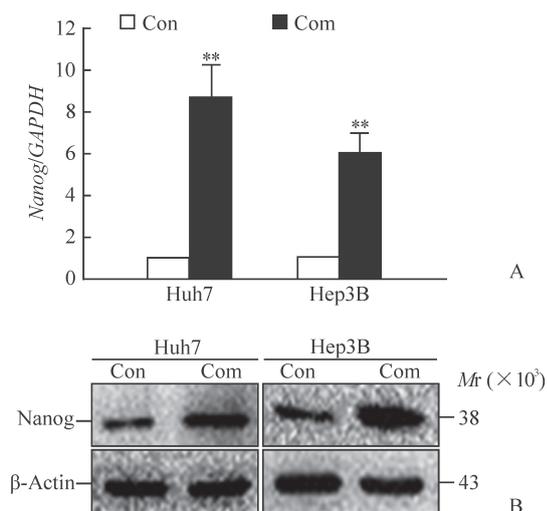


图 6 过表达 lncRNA-8439 使 nanog 表达水平提高
Fig 6 Expression level of nanog was increased after up-regulation of lncRNA-8439

A: RNA expression; B: Protein expression. LncRNA: Long non-coding RNA; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Con: Control; Com: Complementary. ** $P < 0.01$ vs control. $n = 3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

HCC 在我国的发生率和病死率均居前列, 手术切除仍是目前主要的治疗方式。然而, HCC 切除术后复发和转移成为影响手术效果和患者生存期的瓶颈。HCC 一旦发生转移, 即使积极治疗, 这些患者的 3 年生存率也不足 20%^[10]。包括 HCC 在内, 肿瘤转移导致的相关死亡率为 90%^[11], 因此对 HCC 转移机制的深入探讨有助于临床设计相关防治策略。

LncRNA 在表观遗传学、转录调控及转录后调控等多个层面上调控基因的表达水平, 近年来不断被证明其空间结构、表达水平与结合分子相互作用的异常与肿瘤的发生和转移有着密不可分的关系。如 lncRNA AK058003 在乳腺癌组织中的表达水平显著升高, 且可能通过影响 γ 突触核蛋白基因 (γ -synuclein gene, *SNCG*) 的表达水平促进乳腺癌的增殖、侵袭和转移^[12]; Huang 等^[13]报道, 在乙型肝炎相关 HCC 中, lncRNA Dreh 可以通过抑制波形蛋白 (vimentin) 的表达改变细胞骨架结构, 从而抑制转移。以上研究表明 lncRNA 可能通过诱导某些关键基因的表达促进包括 HCC 在内的多种肿瘤的侵袭与转移。

恶性肿瘤细胞具有无限的自我更新和不断分化形成新的亚克隆的能力, 从而赋予肿瘤组织生长、侵袭、转移和对治疗的抗性, 这两个能力与多能因子的表达密切相关。人胚胎 *nanog* 基因定位于 12 号染色体, *nanog* 能促进胚胎干细胞的自我更新, 使其保持未分化特性, 还能使终末分化细胞发生重编程而显示多能性^[13]。已有一些研究表明, *nanog* 能促进肿瘤细胞的侵袭与转移^[14-15]。在 HCC 中, 过表达的 *nanog* 可直接结合 Nodal 启动子并上调其表达, 激活 Smad3 信号通路, 诱导上皮间质转化 (epithelial mesenchymal transition, EMT), 导致细胞侵袭能力增强, 肝内转移也明显增加^[16]。*Nanog* 可促进 MMTV-Wnt1 转基因小鼠乳腺癌细胞增殖和远端转移, 同时能促进血小板源性生长因子 (platelet derived growth factor, *PDGF*) 等 EMT 相关基因的表达^[17]。另一方面, 近年来“肿瘤干细胞 (cancer stem cell, CSC)”假说逐渐被广泛接受, CSC 无限增殖、自我更新、侵袭性以及多向分化潜能被认为在肿瘤的发生、发展和侵袭、转移中发挥着重要作用^[18]。*Nanog* 通过调控 IGF 信号途径参与 HCC CSC 的维持, 并且使其体内致瘤能力更强^[9]。这些研究均表明 *nanog* 参与恶性肿瘤的发展与转移, 并参与某些外界因子对肿瘤转移的调控。

本研究通过 3 对 HCC 原发灶和转移灶的 lncRNA 进行测序和集簇分析, 发现原发灶和转移灶之间 lncRNA 表达谱有较大差异。为了探索多能因子相关的 lncRNA 在 HCC 细胞中的调控作用及对 HCC 发展与转移的影响, 我们从差异表达的 lncRNA 中利用 starBase V2.0 工具确定了 9 个与多能因子 *oct4*、*nanog*、*sox2* 相关的 lncRNA。通过实时荧光定量 PCR 检测这些 lncRNA 在 Hep3B 和 Huh7 细胞及其对应的肿瘤细胞悬浮球中的表达量, 挑选出 lncRNA-8439 作进一步研究。进一步利用生物信息学工具 lncRNADB 深入分析得出 lncRNA-8439 与 *nanog* 结合的可能性, 明确了 lncRNA-8439 和 *nanog* 的结合位点, 为两者存在作用关系找到了理论依据。荧光原位杂交实验进一步验证了 lncRNA-8439 在 HCC 细胞中表达, 其主要分布于细胞核中。通过干扰及过表达实验证实 lncRNA-8439 能调控 *nanog* 的表达, 且影响 HCC 细胞的成球能力。

综上所述, *nanog* 是 lncRNA-8439 调控 HCC 的重要靶基因, 影响 HCC 的转移和侵袭。但 lncRNA-8439 与 *nanog* 之间是否存在中间环节, 是否存在下游的调控分子以及相关的具体机制还有待进一步阐明。

[参考文献]

- [1] LIN D C, MAYAKONDA A, DINH H Q, HUANG P, LIN L, LIU X, et al. Genomic and epigenomic heterogeneity of hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2017, 77: 2255-2265.
- [2] LAMBERT A W, PATTABIRAMAN D R, WEINBERG R A. Emerging biological principles of metastasis[J]. *Cell*, 2017, 168: 670-691.
- [3] CHENG S, WANG L, DENG C H, DU S C, HAN Z G. ARID1A represses hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration through lncRNA MVIH[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 491: 178-182.
- [4] ZHAO M, WANG S, LI Q, JI Q, GUO P, LIU X. MALAT1: a long non-coding RNA highly associated with human cancers[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16: 19-26.
- [5] ZHAO Y, WU J, LIANGPUNSAKUL S, WANG L. Long non-coding RNA in liver metabolism and disease: current status[J]. *Liver Res*, 2017, 1: 163-167.
- [6] VAN SCHAIJK B, DAVIS P F, WICKREMESEKERA A C, TAN S T, ITINTEANG T. Subcellular localisation of the stem cell markers OCT4, SOX2, NANOG, KLF4 and c-MYC in cancer: a review [J]. *J Clin Pathol*, 2018, 71: 88-91.
- [7] RASTI A, MEHRAZMA M, MADJD Z, ABOLHASANI M, SAEEDNEJAD ZANJANI L, ASGARI M. Co-expression of cancer stem cell markers OCT4 and NANOG predicts poor prognosis in renal cell carcinomas[J/OL]. *Sci Rep*, 2018, 8: 11739. doi: 10.1038/s41598-018-30168-4.
- [8] WOO S R, LEE H J, OH S J, KIM S, PARK S H, LEE J, et al. Stabilization of HDAC1 via TCL1-pAKT-CHFR axis is a key element for NANOG-mediated multi-resistance and stem-like phenotype in immune-edited tumor cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503: 1812-1818.
- [9] TANG J, ZHONG G, WU J, CHEN H, JIA Y. SOX2 recruits KLF4 to regulate nasopharyngeal carcinoma proliferation via PI3K/AKT signaling[J/OL]. *Oncogenesis*, 2018, 7: 61. doi: 10.1038/s41389-018-0074-2.
- [10] JIANG H Y, CHEN J, XIA C C, CAO L K, DUAN T, SONG B. Noninvasive imaging of hepatocellular carcinoma: from diagnosis to prognosis[J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24: 2348-2362.
- [11] FIDLER I J, KRIPKE M L. The challenge of targeting metastasis[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2015, 34: 635-641.
- [12] HE K, WANG P. Unregulated long non-coding RNA-AK058003 promotes the proliferation, invasion and metastasis of breast cancer by regulating the expression levels of the gamma-synuclein gene[J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9: 1727-1732.
- [13] HUANG J F, GUO Y J, ZHAO C X, YUAN S X, WANG Y, TANG G N, et al. Hepatitis B virus X protein (HBx)-related long noncoding RNA (lncRNA) down-regulated expression by HBx (Dreh) inhibits hepatocellular carcinoma metastasis by targeting the intermediate filament protein vimentin[J]. *Hepatology*, 2013, 57: 1882-1892.
- [14] WATANABE M, OHNISHI Y, INOUE H, WATO M, TANAKA A, KAKUDO K, et al. NANOG expression correlates with differentiation, metastasis and resistance to preoperative adjuvant therapy in oral squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2014, 7: 35-40.
- [15] GUO T, KONG J, LIU Y, LI Z, XIA J, ZHANG Y, et al. Transcriptional activation of NANOG by YBX1 promotes lung cancer stem-like properties and metastasis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 487: 153-159.
- [16] SUN C, SUN L, JIANG K, GAO D M, KANG X N, WANG C, et al. NANOG promotes liver cancer cell invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition through NODAL/SMAD3 signaling pathway[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45: 1099-1108.
- [17] LU X, MAZUR S J, LIN T, APPELLA E, XU Y. The pluripotency factor nanog promotes breast cancer tumorigenesis and metastasis[J]. *Oncogene*, 2014, 33: 2655-2664.
- [18] 郁文博,王超. 肝癌干细胞表面标志物研究进展[J]. *中华消化杂志*, 2015, 35: 643-645.
- [19] SHAN J, SHEN J, LIU L, XIA F, XU C, DUAN G, et al. Nanog regulates self-renewal of cancer stem cells through the insulin-like growth factor pathway in human hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2012, 56: 1004-1014.

[本文编辑] 孙岩