doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.03.004

长链非编码 RNA HIT 在肝癌中的表达及意义 *

杨哲锋[1,2] 郝晓坤[1] 杨 针[1] 夏聪聪[1] 杨诏旭[1△]

(1 空军军医大学西京医院肝胆胰脾外科 陕西 西安 710032;2 渭南市第三医院普外科 陕西 渭南 714100)

摘要 目的:探讨长链非编码 RNA HIT(lncRNA-HIT)在原发性肝癌中的表达及其与患者临床病理特征的相关性,寻找肝癌治疗的新靶点。**方法:**收集并筛选 2015 年 1 月至 2018 年 1 月在空军军医大学第一附属医院行手术治疗的 80 例经病理证实的肝细胞癌患者的肝癌组织和癌旁组织。采用实时定量聚合酶连反应 (qRT-PCR) 法检测患者手术切除的肝癌组织及相应的癌旁组织中 lncRNA-HIT 的表达,并分析 HIT 与患者临床病理参数之间的关系。**结果:**原发性肝癌组织中 lncRNA-HIT 的表达(6.17± 4.38)明显高于癌旁组织(2.81± 2.58),约为癌旁组织的 2.20 倍(*P<0.05*),肝癌组织中 HIT 的表达与肝癌 TNM 分期、肿瘤大小和数量显著相关(*P<0.05*),而与性别、年龄、肝硬化、HBV、AFP 无显著相关性(*P>0.05*)。**结论:**lncRNA-HIT 在肝癌组织中呈高表达,可能在肝癌发生发展过程起重要作用,并可能作为肝癌治疗的新靶点。

关键词:长链非编码 RNA;lncRNA-HIT;原发性肝癌

中图分类号:R735.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)03-416-04

Expression and Significance of Long Non-coding RNA HIT in the Hepatocellular Carcinoma*

YANG Zhe-feng[1,2], HAO Xiao-kun[1], YANG Zhen[1], XIA Cong-cong[1], YANG Zhao-xu[1△]

(1 Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of General Surgery, Third Hospital of Weinan, Weinan, Shaanxi, 714100, China)

ABSTRACT Objective: To explore the expression of lncRNA HIT in the hepatocellular carcinoma (HCC) and its correlation with the clinicopathologic characteristics of patients, and find new target for HCC treatment. **Methods:** From January 2015 to January 2018, the liver cancer tissues and adjacent tissues of 80 cases of patients who underwent surgical treatment were collected and screened with pathologically confirmed hepatocellular carcinoma in the First Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University. qRT-PCR was performed to measure the expression level of the lncRNA HIT in 80 cases of HCC specimens and paired adjacent normal liver tissues (ANLTs) after surgery and the correlation between lncRNA HIT expression in the HCC patients and clinical characteristics were further analyzed. **Results:** The expression of lncRNA HIT in HCC tissue (6.17± 4.38) was significantly higher than that in the ANLTs (2.81± 2.58), nearly 2.20 times to ANLTs (*P<0.05*). The expression of lncRNA HIT in HCC tissues was significantly related with the TNM stage, tumor size and number. However, there was no obvious correlation with the age, gender, liver cirrhosis, HBV and AFP (*P> 0.05*). **Conclusion:** The expression of lncRNA HIT was up-regulated in the HCC tissues, it may be involved in in the development and progression of HCC and used as a new target for the treatment of HCC.

Key words: Long non-coding RNA; LncRNA-HIT; Hepatocellular carcinoma

Chinese Library Classification(CLC): R735.7 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2019)03-416-04

前言

近年来,肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)已经成为发病率最高的癌症之一,且死亡率逐年上升,占全球癌症相关死亡的三分之一[1-3]。HBV 或 HCV 感染、酒精和烟草的摄入以及肝硬化是 HCC 发生的主要原因[2,4,5]。尽管,有关肝癌发生发展的分子机制的研究已深入展开,但其治疗效果及总体生存率仍不容乐观。

长链非编码 RNA(lncRNA)是一类长度 >200 个核苷酸,不编码蛋白质的 RNA[6,7]。越来越多的研究表明 lncRNA 的表达失调参与了肿瘤的发生发展,包括肝癌[8]。HCC 相关的 lncRNA 在肝癌发生发展中发挥重要的调节作用,参与 HCC 的增殖、分化、凋亡、侵袭、转移等[9-13]。研究显示敲除 lncRNA-HIT 导致乳腺癌细胞迁移、侵袭能力下降及肿瘤生长和转移减少[14]。此外,lncRNA-HIT 在非小细胞肺癌中显著上调,下调 lncRNA-HIT 抑制了非小细胞肺癌的侵袭,转移等过程[15]。lncRNA-HIT 通过 TGF-β 调节 EMT 过程参与乳腺癌侵袭和转移过程,并且可能是乳腺癌潜在治疗靶点[14]。然而,lncRNA-HIT 在肝癌中的表达

* 基金项目:陕西省自然科学基础研究计划项目(2013JM4055)

作者简介:杨哲锋(1972-),男,硕士,主要从事肝癌相关机制研究,E-mail: yangzhefeng1972@163.com

△通讯作者:杨诏旭(1976-),男,副主任医师,主要从事肝癌相关机制研究,E-mail: yangzx@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2018-06-21 接受日期:2018-07-20)

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

水平及临床意义仍未见报道。本研究通过实时荧光定量 PCR 检测 HIT 在肝癌及对应癌旁组织中的表达情况并分析其与肝癌患者临床病理特征之间的关系，旨在为肝癌的病理诊断、治疗提供临床参考依据。

1 资料与方法

1.1 资料与试剂

收集并筛选 2015 年 1 月至 2018 年 1 月在空军军医大学第一附属医院行手术治疗的 80 例经病理证实的肝细胞癌患者的肝癌组织和癌旁组织。确保所有患者术前均未接受放化疗及射频消融等治疗且临床资料完整。本研究经医院伦理委员会批准同时所有患者均签署使用其组织样本知情同意书。所有组织获取后立即放入液氮中保存。

Trizol 试剂(TAKARA，大连宝生物)提取组织 RNA，Prime Script™ RTⅡ逆转录试剂盒及 SYBR® Premix Ex TaqⅡ实时荧光定量 PCR 试剂盒(TAKARA，大连宝生物)；PCR 引物设计合成 (上海生工生物科技公司)；IQ5™荧光定量 PCR 反应仪(Bio-Rad，美国)。

1.2 方法

1.2.1 组织 RNA 提取和 cDNA 合成 新鲜取得肝癌组织及癌旁组织切取绿豆大小组织块置于含 500 μL Trizol 试剂的 1.5mL RNase free 离心管中，组织研磨器研磨至无可见组织块后外加 500 μL Trizol 试剂提取总 RNA，具体操作按照试剂说明书进行。取 1 μL RNA 溶液于紫外分光光度计检测 RNA 纯度(A260/A280)，取 2 μL RNA 溶液行琼脂糖凝胶电泳实验，凝胶成像仪检测总 RNA 有无降解。所有样本经检测合格后采用 Prime ScriptTM RTⅡ逆转录试剂盒进行逆转录反应，反应所得 cDNA 与 -80 ℃保存。

1.2.2 qRT-PCR 反应 取 1 微升新合成的 10 倍稀释的 cDNA 为模板，以 β-Actin 为内参。采用相对定量 $2^{-\triangle\triangle\alpha}$ 方法进行定量分析 lncRNA-HIT 的表达。引物序列：β-Actin 上游：5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3'；下游：5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'；lncRNA-HIT 上游：5'-TGAAAGGGAGAGAAAGGAAAGG-3'；下游：5'-GACAGTCTAGGCATTGCTGAT-3'。PCR 反应体系：10 μL；反应条件：95 ℃ 预变性 30 s，95 ℃ 3 s，59 ℃ 30 s，40 个循环。实验重复 3 次。

1.3 统计学分析

数据分析采用 SPSS 22.0 软件进行。计量结果以均数± 标准差表示，组间比较采用 t 检验。*P* 值 <0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA-HIT 在肝癌组织中的表达

qRT-PCR 定量检测 lncRNA-HIT 在肝癌和癌旁组织中的表达，结果显示 lncRNA-HIT 在肝癌及癌旁组织中的表达水平分别为 (6.17± 4.38) 和 (2.81± 2.58)。与癌旁组织相比，lncRNA-HIT 的表达水平在肝癌组织中显著升高，约为癌旁组织的 2.20 倍(*P<0.05*)(图 1)。

2.2 lncRNA-HIT 表达与肝癌不同临床病理特征之间的关系

通过分析 PCR 结果将患者分为 lncRNA-HIT 高表达组和低表达组(n=40)，分析其表达水平与肝癌患者临床病理资料之间的关系。结果如表 1 所示，患者肝癌组织中 lncRNA-HIT 的表达与肝癌的 TNM 分期(*P*=0.012)、肿瘤大小(*P*=0.007)和数量显著相关(*P*=0.007)；而与性别(*P*=0.412)、年龄(*P*=0.204)、肝硬化(*P*=0.007)、HBV(*P*=0.228)和 AFP(*P*=0.348)均无明显相关性。

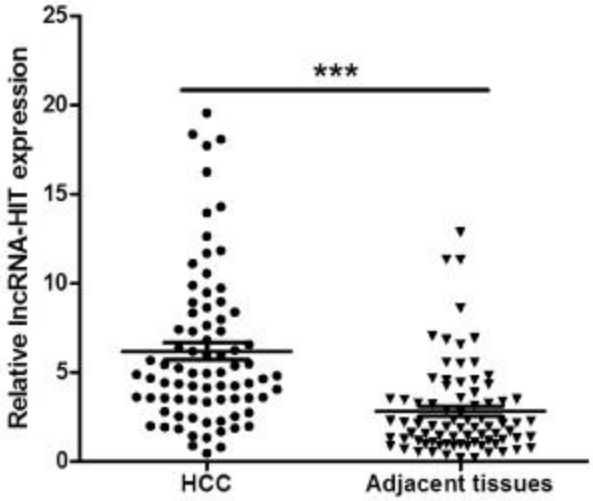


图 1 lncRNA-HIT 在肝癌和癌旁组织中的表达

Fig.1 The expression of lncRNA-HIT in HCC and adjacent tissues

3 讨论

肝癌是全球第六大常见癌症，每年大约有 700,000 人死于肝癌，在我国肝癌的发病率和死亡率高居所有恶性肿瘤的第三位[16]，肝癌已经成为严重威胁我国人民生命和健康的一大杀手[17]。晚期诊断、放化疗成功率低加之高的肿瘤复发率使得肝癌患者的总体生存率较差[2,18]。尽管有关肝癌发生发展分子机制的相关研究已深入展开，但其治疗效果及总体生存情况仍不容乐观[19]。因此，探寻新的肝癌早期诊断和预后预测的分子标志物及 HCC 的治疗靶点仍具有十分重要的临床意义。

长链非编码 RNA(lncRNA)是一类长度在 200 个核苷酸至几千个核苷酸的一类不编码蛋白质的 RNA，通常由 RNA 聚合酶Ⅱ转录[7]。与小分子 RNA 相比，lncRNA 相对更长，空间结构也更复杂，因而参与调控的生物学过程也更为复杂、多样[20]。越来越多的研究表明 lncRNA 的失调参与了肿瘤的发生发展，包括肝癌[6,8]。肝癌中 lncRNA HULC 的表达水平与肿瘤的分级显著相关，提示 lncRNA HULC 在癌症进展的早期阶段发挥重要作用，lncRNA HULC 还可通过靶向和抑制 p18 来促进 HCC 的增殖[21,22]。转移相关的肺腺癌转录物 1(MALAT-1)是在 HCC 中显著上调的 lncRNA，lncRNA MALAT-1 与 mRNA 的选择性剪接相关，并与 SF2/ASF(富含丝氨酸 / 精氨酸的核磷蛋白家族)和 CC3 抗原相互作用调节 SR 蛋白，进而调控不同前体 mRNA 的选择性剪接[23]。此外，HCC 中高表达的 LncRNA HEIH 通过与 zeste 同源物 2 的增强子结合而促进肝癌细胞周期停滞[24]。lncRNA-HIT，转化生长因子 -β(TGF-β)诱导的 HOXA 转录物，是在乳腺癌中鉴定的，与 EMT 相关的一种新长链非编码 RNA；lncRNA-HIT 在乳腺癌，非小细胞肺癌中显著高表达，参与肿瘤的侵袭转移，且其表达水平与肿瘤分级及疾病的进展程

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 1 肝癌组织中 lncRNA-HIT 的表达与临床病理特征的关系

Table 1 Correlation between lncRNA-HIT expression and clinicopathological characteristics of HCC

HCC features	LncRNA-HIT expression		x^2	p value
	Low(n=40)	High(n=40)		
Gender			0.672	0.412
Male	30	33		
Female	10	7		
Age			1.614	0.204
＜50	13	8		
≥ 50	27	32		
Cirrhosis			2.469	0.116
Absence	26	31		
Presence	14	9		
HBV			1.455	0.228
Absence	15	10		
Presence	25	30		
AFP			0.879	0.348
Low	16	12		
High	24	28		
TNM stage			6.241	0.012
Ⅰ-Ⅱ	29	18		
Ⅲ-Ⅳ	11	22		
Maximal tumor size			7.218	0.007
＜5 cm	27	15		
≥ 5 cm	13	25		
Tumor number			7.366	0.007
Single	29	17		
Multiple	11	23		

度显著相关[14,15]。研究表明，lncRNA-HIT 主要通过抑制 E 钙黏蛋白启动子活性进而影响其 mRNA 水平，E 钙黏蛋白表达下调可以促进 lncRNA-HIT 所诱导的 EMT 细胞迁移和侵袭的过程；此外，lncRNA-HIT 表达下调可抑制 TGF-β 诱发的转移和侵袭过程。

本研究结果显示 lncRNA-HIT 在肝癌组织中显著高表达，提示其可能参与了肝癌的发生。此外，进一步分析 lncRNA-HIT 的表达水平与肝癌临床病理参数的相关性，结果显示 lncRNA-HIT 的表达水平与肝癌 TNM 分期、肿瘤大小和数量相关，提示高表达的 lncRNA-HIT 可能与肝癌的进展密切相关。后续研究中，我们将探讨 lncRNA-HIT 与肝癌患者预后的关系及其与肝癌增殖、侵袭和转移等相关肿瘤生物学功能之间的关系，从而揭示其在肝癌发生发展中所扮演的角色，为肝癌的诊疗奠定一定的理论基础。

综上所述，lncRNA-HIT 在肝癌组织中呈高表达，可能在肝癌发生发展过程起重要作用，并可能作为肝癌治疗的新靶点，但 lncRNA-HIT 参与肝癌细胞发生发展的机制有待进一步研究。

参 考 文 献(References)

[1] Han LL, Lv Y, Guo H, et al. Implications of biomarkers in human hepatocellular carcinoma pathogenesis and therapy [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(30): 10249-10261

[2] El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma:epidemiology and molecular carcinogenesis [J]. Gastroenterology, 2007, 132(7): 2557-2576

[3] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics,2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108

[4] Bertino G, Demma S, Ardiri A, et al. Hepatocellular carcinoma: novel molecular targets in carcinogenesis for future therapies [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 203693

[5] Su CW, Lei HJ, Chau GY, et al. The effect of age on the long-term prognosis of patients with hepatocellular carcinoma after resection surgery: a propensity score matching analysis [J]. Arch Surg, 2012, 147(2): 137-144

[6] Gutschner T, Diederichs S. The hallmarks of cancer: a long

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

non-coding RNA point of view[J]. RNA Biol, 2012, 9(6): 703-719

[7] Mattick JS. The genetic signatures of noncoding RNAs [J]. PLoS Genet, 2009, 5(4): e1000459

[8] Collins JF. Long noncoding RNAs and hepatocellular carcinoma [J]. Gastroenterology, 2015, 148(2): 291-294

[9] Zhou M, Zhang XY, Yu X. Overexpression of the long non-coding RNA SPRY4-IT1 promotes tumor cell proliferation and invasion by activating EZH2 in hepatocellular carcinoma [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 85: 348-354

[10] Wang Y, Hu Y, Wu G, et al. Long noncoding RNA PCAT-14 induces proliferation and invasion by hepatocellular carcinoma cells by inducing methylation of miR-372 [J]. Oncotarget, 2017, 8 (21): 34429-34441

[11] Zhao B, Hou X, Zhan H. Long non-coding RNA PCAT-1 over-expression promotes proliferation and metastasis in non-small cell lung cancer cells [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8 (10): 18482-18487

[12] Mang Y, Li L, Ran J, et al. Long noncoding RNA NEAT1 promotes cell proliferation and invasion by regulating hnRNP A2 expression in hepatocellular carcinoma cells [J]. Onco Targets Ther, 2017, 10: 1003-1016

[13] Li SP, Xu HX, Yu Y, et al. LncRNA HULC enhances epithelial-mesenchymal transition to promote tumorigenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma via the miR-200a-3p/ZEB1 signaling pathway[J]. Oncotarget, 2016, 7(27): 42431-42446

[14] Richards EJ, Zhang G, Li ZP, et al. Long non-coding RNAs (LncRNA) regulated by transforming growth factor (TGF) beta: LncRNA-hit-mediated TGFbeta-induced epithelial to mesenchymal transition in mammary epithelia [J]. J Biol Chem, 2015, 290 (11): 6857-6867

[15] Jia X, Wang Z, Qiu L, et al. Upregulation of LncRNA-HIT promotes migration and invasion of non-small cell lung cancer cells by association with ZEB1[J]. Cancer Med, 2016, 5(12): 3555-3563

[16] Stroehl YW, Letzen BS, van Breugel JM, et al. Intra-arterial therapies for liver cancer: assessing tumor response [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2017,17(2): 119-127

[17] Sapisochin G, Bruix J. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: outcomes and novel surgical approaches [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017, 14(4): 203-217

[18] El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma [J].N Engl J Med, 2011, 365 (12): 1118-1127

[19] Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med, 2008, 359(4): 378-390

[20] Wang KC, Chang HY. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs[J]. Mol Cell, 2011, 43(6): 904-914

[21] Wang J, Liu X, Wu H, et al. CREB up-regulates long non-coding RNA, HULC expression through interaction with microRNA-372 in liver cancer[J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(16): 5366-5383

[22] Hammerle M, Gutschner T, Uckelmann H, et al. Posttranscriptional destabilization of the liver-specific long noncoding RNA HULC by the IGF2 mRNA-binding protein 1 (IGF2BP1)[J]. Hepatology, 2013, 58(5): 1703-1712

[23] Lai MC, Yang Z, Zhou L, et al. Long non-coding RNA MALAT-1 overexpression predicts tumor recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation[J]. Med Oncol, 2012, 29(3): 1810-1816

[24] Yang F, Zhang L, Huo XS, et al. Long noncoding RNA high expression in hepatocellular carcinoma facilitates tumor growth through enhancer of zeste homolog 2 in humans [J]. Hepatology, 2011, 54(5): 1679-1689

(上接第 424 页)

[10] Vadillo E, Dorantes-Acosta E, Pelayo R, et al. T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL): New insights into the cellular origins and infiltration mechanisms common and unique among hematologic malignancies[J]. Blood Rev, 2018, 32(1): 36-51

[11] Mi JQ, Li JM, Shen ZX, et al. How to manage acute promyelocytic leukemia[J]. Leukemia, 2012, 26(8): 1743-1751

[12] 张鹏, 王树叶, 胡龙虎, 等. 三氧化二砷治疗急性早幼粒细胞白血病七年总结 -- 附 242 例分析[J].中华血液学杂志, 2000, 02: 10-13

[13] Colin O, Julian A, Puyade M, et al. Relapse of acute promyelocytic leukemia in the central nervous system revealed by isolated dementia [J]. Rev Med Interne, 2016, 37(12): 844-848

[14] Gupta V, Gonsalves W, Patnaik M, et al. Central nervous system relapse in acute promyelocytic leukemia: a single institution experience[J]. Leuk Lymphoma, 2013, 54(12): 2728-2730

[15] Marz M, Meyer S, Erb U, et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia-Conquering the CNS across the choroid plexus [J]. Leuk Res, 2018, 71: 47-54

[16] Lima M. Extranodal NK/T cell lymphoma and aggressive NK cell leukaemia: evidence for their origin on CD56+bright CD16-/+dim NK cells[J]. Pathology, 2015, 47(6): 503-514

[17] Yap LW, Brok J, Pritchard-Jones K. Role of CD56 in Normal Kidney Development and Wilms Tumorigenesis [J]. Fetal Pediatr Pathol, 2017, 36(1): 62-75

[18] Testa U, Lo-coco F. Prognostic factors in acute promyelocytic leukemia: strategies to define high-risk patients [J]. Ann Hematol, 2016, 95(5): 673-680

[19] Ono T, Takeshita A, Kishimoto Y, et al. Expression of CD56 is an unfavorable prognostic factor for acute promyelocytic leukemia with higher initial white blood cell counts [J]. Cancer Sci, 2014, 105(1): 97-104

[20] Lei X, Deng Z, Duan E. Uniform Embryoid Body Production and Enhanced Mesendoderm Differentiation with Murine Embry onic Stem Cells in a Rotary Suspension Bioreactor [J]. Methods Mol Biol, 2016, 1502: 63-75

[21] Zhang S, Zheng D, Wu Y, et al. Simulated Microgravity Using a Rotary Culture System Compromises the In Vitro Develop ment of Mouse Preantral Follicles[J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0151062

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn