DOI:10.16016/j.1000-5404.201907251

长链非编码 RNA LINC02163 在肝细胞肝癌中表达上调并促进肝癌细胞迁移和侵袭

罗 毅[1],房晓瑜[1],谢薇佳[1],周征宇[1],王友豪[1],王小军[2],江 艳[2],马翔宇[1] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学):军事预防医学系军队流行病学教研室[1],第一附属医院全军肝胆外科研究所[2]

[摘要] **目的** 研究长链非编码 RNA LINC02163 在肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma,HCC)组织及肝癌细胞系中的表达及对肝癌细胞迁移、侵袭的影响。**方法** 利用 Quantitative Real-time PCR(qRT-PCR)检测 LINC02163 在 5 株肝癌细胞系(HuH-7、HCCLM3、MHCC-97H、SNU-182 和 SMMC-7721)、正常肝细胞系(L02)和 60 例肝癌组织及其配对癌旁组织中的差异表达情况,分析 LINC02163 的表达水平与肝癌患者临床病理参数的关系;利用 Lipofectamine™ 2000 转染 LINC02163 小干扰 RNA(siRNA)至 HuH-7、HCCLM3 肝癌细胞内敲低 LINC02163 表达;通过 Transwell 实验检测敲低 LINC02163 后肝癌细胞迁移、侵袭能力的改变。**结果** LINC02163 在肝癌组织中的表达水平明显高于配对癌旁组织($P<0.001$);LINC02163 在肝癌组织中的表达与 TNM 分期、微血管侵犯(MVI)明显相关($P<0.01$);与正常肝细胞系(L02)比较,LINC02163 在 5 株肝癌细胞系中高表达($P<0.001$),其中在 HuH-7 细胞系中表达最高,其次是 HCCLM3 细胞系;肝癌细胞 HuH-7、HCCLM3 敲低 LINC02163 的表达后迁移和侵袭能力明显降低($P<0.01$)。**结论** LINC02163 在肝癌组织和肝癌细胞系中的表达上调,其可促进肝癌细胞的迁移和侵袭,故可能与肝癌的发生、发展密切相关。

[关键词] 长链非编码 RNA;LINC02163;肝癌;迁移;侵袭

[中图法分类号] R394.3; R730.23; R735.7 [文献标志码] A

Long non-coding RNA LINC02163 is up-regulated and promotes cell migration and invasion in hepatocellular carcinoma

LUO Yi[1], FANG Xaoyu[1], XIE Weijia[1], ZHOU Zhengyu[1], WANG Youhao[1], WANG Xiaojun[2], JIANG Yan[2], MA Xiangyu[1] [1]Department of Epidemiology, Faculty of Military Preventive Medicine, [2]Institute of Hepatobiliary Surgery, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression of long non-coding RNA LINC02163 in hepatocellular carcinoma (HCC) tissues and HCC cell lines, and its effect on the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. **Methods** The differential expression level of LINC02163 in 5 HCC cell lines (HuH-7, HCCLM3, MHCC-97H, SNU-182 and SMMC-7721), normal liver cell line (L02) and 60 HCC tissues and paired adjacent tissues was determined by quantitative real-time PCR (qRT-PCR), and the relationship between its expression level and the clinicopathological parameters of HCC patients was analyzed. Lipofectamine™ 2000 was used to transfect LINC02163 small interfering RNA (siRNA) into HCC HuH-7 and HCCLM3 cells in order to knockdown the expression. Then the changes of migration and invasion ability of HCC cells after the knock-down of LINC02163 were examined by Transwell assay. **Results** The expression level of LINC02163 in HCC tissues was significantly higher than that in paired adjacent tissues ($P<0.001$), and the level was significantly correlated with TNM stage and microvascular invasion (MVI) in the patients (all $P<0.01$). Compared with normal liver cell line (L02), LINC02163 was highly expressed in 5 HCC cell

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81302498)

[通信作者] 马翔宇,E-mail:xymacq@hotmail.com

lines ($P<0.001$), among which HuH-7 cells had the highest expression level, followed by HCCLM3 cells. LINC02163 knock-down significantly reduced the migration and invasion abilities in HuH-7 and HCCLM3 cells ($P<0.01$). **Conclusion** LINC02163 is up-regulated in HCC tissues and cell lines and promotes the migration and invasion of HCC cells, which may be closely associated with the occurrence and development of HCC.

[**Key words**] long non-coding RNA; LINC02163; hepatocellular carcinoma; migration; invasion

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81302498). Corresponding author: MA Xiangyu, E-mail: xymacq@hotmail.com

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma,HCC)是一种常见的消化道恶性肿瘤,其死亡率高居恶性肿瘤第3位[1]。我国每年死于肝癌的人数约38.3万,占全球肝癌死亡人数的51%[2],严重威胁我国人民健康。近几十年来,尽管HCC在手术治疗、放化疗以及分子靶向治疗等方面取得了很大进展,但由于高侵袭性、高转移性及高复发等特性,HCC患者预后差的现状仍未发生根本改变[3]。因此,探讨肝癌侵袭转移的机制,寻找有效的诊断分子标志物和治疗靶点成为目前HCC研究的重要方向。

长链非编码RNA(lncRNA)是转录本长度大于200个核苷酸而不具备蛋白质编码功能的RNA分子[4],其可以RNA的形式参与X染色体沉默、基因组印记、染色质修饰、转录干扰、转录激活和核内运输等多种生物学活动[5]。研究表明,lncRNA在肿瘤侵袭转移中发挥重要的调控作用[6],如ATB[7]、HOTAIR[8]和MVIH[9]可促进HCC的侵袭转移,而H19[10]可抑制HCC的侵袭转移。本研究前期通过生物信息学分析,筛选到1条可能对肝癌发生、发展起重要作用的lncRNA LINC02163(Ensembl ID: ENSG00000251026)。DONG等[11]研究指出,LINC02163在胃癌中发挥致癌基因的作用。但是,LINC02163在肝癌中的表达及其作用国内外尚少见相关报道。因此,本研究旨在探讨LINC02163在肝癌组织及细胞系中的表达情况,分析其与临床病理参数之间的关系,及其对肝癌细胞迁移、侵袭能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 细胞系 人肝癌细胞系HuH-7、HCCLM3、MHCC-97H、SNU-182、SMMC-7721以及人正常肝细胞系L02均购自中国科学院上海生命科学研究院干细胞库。

1.1.2 组织标本 收集2017年10月至2019年5月陆军军医大学第一附属医院HCC患者手术切除标本60例。其中男性49例,女性11例;年龄24~74岁,中位年龄53岁。入选标准:患者术前未进行放化疗、射频消融治疗,术后标本经病理组织学检查证实为HCC。排除标准:其他类型肝肿瘤。临床病理参数包括:患者的性别、年龄、肝硬化、AFP表达水平、肿瘤直径、数目、病理分级、TNM分期和微血管侵犯(MVI)情况。对照组标本来自于同一患者的癌旁组织,距离手术切缘至少2 cm,且术后病理检查未发现癌细胞。所收集的新鲜标本于离体30 min内收集,立即冷冻于液氮中,并放置于-80 ℃超低温冰箱中保存。本研究经陆军军医大学伦理委员会批准实施,标本检测在所有研究对象签署知情同意书后进行。

1.1.3 试剂 RPMI1640培养基、DMEM培养基购自Gibco公司,胎牛血清(FBS)购自杭州四季青生物有限技术公司,0.25%胰酶购自HyClone公司,TRIzol、Lipofectamine™ 2000转染试剂购自Invitrogen公司,逆转录试剂盒、荧光定量试剂盒均购自TaKaRa公司,Matrigel基质胶购自Corning公司,结晶紫溶液购自碧云天公司,siRNA购自上海吉玛公司,引物由上海生工公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 肝癌细胞系HuH-7、HCCLM3、MHCC-97H及正常肝细胞系L02复苏后置于含10%胎牛血清的DMEM培养基,SMMC-7721、SNU-182置于含10%胎牛血清的RPMI1640培养基,在37 ℃、5% CO_2培养箱中培养,细胞贴壁生长,隔天换液,3~5 d胰酶消化传代。

1.2.2 细胞转染 取对数生长期肝癌细胞,用0.25%胰酶消化,调整细胞至一定浓度,接种于6孔板。待其密度为50%~70%时用5 μL Lipofectamine™ 2000分别转染5 μL LINC02163 siRNA-18(si-18)和5 μL LINC02163 siRNA-151(si-151)至干扰组肝癌细胞中。si-18序列正义链:5′-GCAGAAACGUGUUGUAUUUTT-3′;反义链:5′-AAAUACAACACGUUUCUGCTT-3′。si-151序列正义链:5′-GCAACCAGUAGCAAAUUAUTT-3′;反义链:5′-AUAAUUUGCUACUG-

GUUGCTT-3′。阴性对照组加入与实验组等量的 Lipofectamine™ 2000 和 siRNA-NC(si-NC)。si-NC 序列正义链:5′-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3′;反义链:5′-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3′。将细胞分为3组,分别是干扰组(si-18)、干扰组(si-151)及阴性对照组(si-NC)。转染后培养箱中常规培养,6 h 后换成含双抗培养基,48 h 后收集 3 组细胞进行 qRT-PCR 检测转染效率等后续实验。

1.2.3 组织和细胞总 RNA 提取 采用 TRIzol 法提取 RNA 的具体步骤为:从液氮中取出肝癌组织,用无 RNA 酶的刀片切下 50 mg 左右标本,加 1 mL TRIzol,用组织研磨仪破碎,加入 200 μL 氯仿,颠倒混匀,冰上放置 15 min 后,4 ℃下 12 000 r/min 离心 15 min,取 400 μL 上清液至无 RNA 酶的 EP 管中,加 400 μL 异丙醇沉淀,然后加入适量 DEPC 水溶解。细胞总 RNA 的提取参考文献[12]报道的方法。对获得的总 RNA 采用分光光度仪检测浓度和纯度,并检查总 RNA 完整性。

1.2.4 逆转录和实时荧光定量 PCR 取 1 μg 总 RNA 按 TaKaRa 公司的逆转录试剂盒说明书进行逆转录反应得到 cDNA,-20 ℃保存。以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 合成扩增目的基因,以 β-actin 作为内参基因。反应体系 25 μL,包括 cDNA 模板 1 μL,上下游引物各 1 μL,TB Green Premix *Ex Taq* Ⅱ 12.5 μL,DEPC 水 9.5 μL。反应条件为 95 ℃预变性 30 s;95 ℃变性 5 s,60 ℃退火延伸 30 s,共 40 个循环。LINC02163 上游引物:5′-TGATGCTGTTGTGTCCAGAATTG-3′;LINC02163 下游引物:5′-CACTAGGGTCCGCAGCTTTA-3′;β-actin 上游引物:5′-CCACGAAACTACCTTCAACTCC-3′;β-actin 下游引物:5′-GTGATCTCCTTCTGCATCCTGT-3′。采用相对定量法,测定目的基因、内参基因的 PCR 产物的 Ct 值,代入公式(即 ΔCt=Ct 目的基因−Ct 内参基因,ΔΔCt=ΔCt 实验组−ΔCt 对照组),以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 LINC02163 的相对表达量。所有反应设 3 个复孔,实验重复 3 次。

1.2.5 Transwell 小室细胞侵袭实验 实验分组同细胞转染实验。将 Matrigel 基质胶与预冷的无血清培养基按 1∶8比例稀释。取 60 μL 稀释的基质胶均匀铺于 Transwell 上室内,于 37 ℃培养箱中放置 60 min。取 3 组细胞,加入胰酶消化,无血清的培养基制成 8×10^5/mL 的细胞悬液,每个 Transwell 上室中加入 100 μL 细胞悬液,下室内加入 550 μL 含 10%胎牛血清的培养基(注意避免气泡产生)。培养 24 h 后取出 Transwell 上室,用棉签擦去上室内部未穿过 PC 膜的细胞。无水甲醇固定 30 min,0.1%结晶紫溶液染色 15 min。倒置显微镜下(×200)随机选取 5 个视野拍照,计数染色的穿膜细胞数。每组细胞设 3 个复孔,实验重复 3 次。

1.2.6 Transwell 小室细胞迁移实验 将 Matrigel 基质胶包被的小室换成不含基质胶的小室,其余步骤同侵袭实验。

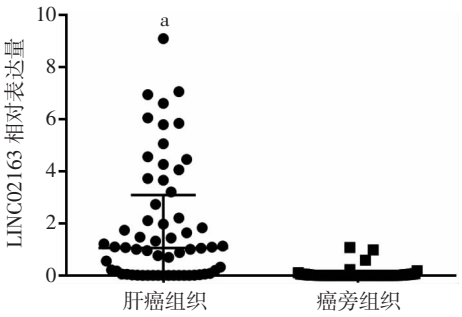
1.3 统计学分析

应用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析。计量资料若服从正态分布,两组间比较采用 t 检验;若非正态分布,配对样本采用 Wilcoxon 符号秩检验,两独立样本采用 Mann-Whitney *U* 检验。计数资料比较采用 χ^2 检验。检验水准:$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 LINC02163 在肝癌组织中的表达

经 qRT-PCR 检测肝癌以及其配对癌旁组织标本中 LINC02163 的表达,结果表明:与配对癌旁组织相比,LINC02163 在肝癌组织中的表达明显升高,差异有统计学意义($P<0.001$,图 1)。



a:$P<0.001$,与癌旁组织比较

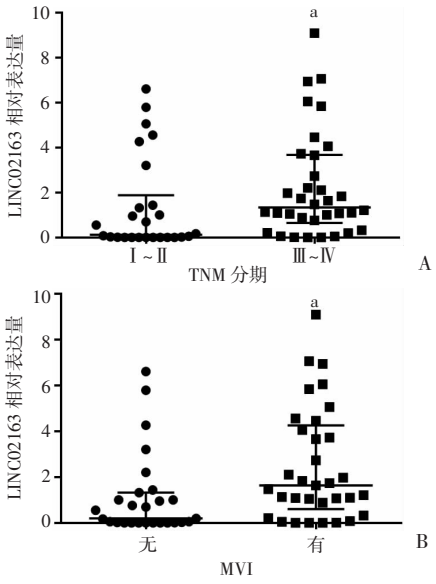
图 1 LINC02163 在肝癌组织与癌旁组织中表达的比较

2.2 LINC02163 的表达与 HCC 患者临床病理参数之间的关系

为了验证 LINC02163 在肝癌发生、发展过程中的作用,进一步分析 LINC02163 与肝癌临床病理参数之间的关系。将纳入研究的 60 例病例按照 HCC 组织的 LINC02163 相对表达量依次排序,并按中位数方法分为高表达组及低表达组各 30 例。用 χ^2 检验分别验证两组间临床一般情况及病理参数差异有无统计学意义。结果显示,LINC02163 的表达水平与性别、年龄、肝硬化、AFP 表达水平、肿瘤直径、数目、病理分级等无明显相关性,而与肿瘤 TNM 分期和微血管侵犯(MVI)有显著的关联($P<0.01$,表 1)。相比临床早期或无微血管侵犯的患者,LINC02163 的表达在临床晚期(Ⅲ~Ⅳ期)或有微血管侵犯患者中明显升高($P<0.01$,图 2)。

表 1 肝癌组织中 LINC02163 表达水平与肝癌患者临床病理参数关联性分析($n=60$)

参数	总例数	LINC02163 表达 低($n=30$)	LINC02163 表达 高($n=30$)	χ^2 值	P 值
年龄/岁				0.077	0.781
>55	19	9	10		
≤55	41	21	20		
性别				0.111	0.739
男性	49	24	25		
女性	11	6	5		
肝硬化				1.200	0.273
有	40	18	22		
无	20	12	8		
APF/ng·mL^{-1}				0.071	0.791
>20	37	19	18		
≤20	23	11	12		
肿瘤直径/cm				0.271	0.602
>5	26	12	14		
≤5	34	18	16		
肿瘤数目				0.373	0.542
单发	46	24	22		
多发	14	6	8		
病理分级				3.354	0.067
高/中分化	46	26	20		
低分化	14	4	10		
TNM 分期				6.787	0.009
Ⅰ~Ⅱ期	26	18	8		
Ⅲ~Ⅳ期	34	12	22		
微血管侵犯(MVI)				11.38	0.001
有	33	10	23		
无	27	20	7		

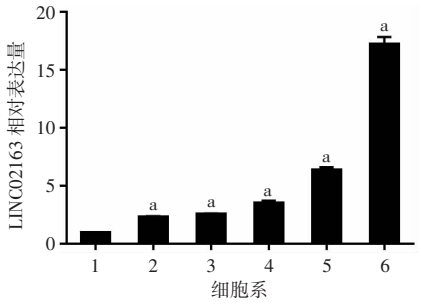


A:TNM 分期 a:$P<0.01$,与 TNMⅠ~Ⅱ比较;B:MVI a:$P<0.01$,与无微血管侵犯比较

图 2 肝癌组织中 LINC02163 表达与 TNM 分期及 MVI 之间关联分析

2.3 LINC02163 在肝癌细胞系中的表达

采用 qRT-PCR 检测了 LINC02163 在肝癌细胞系及人正常肝细胞系 L02 中的表达情况,结果显示,与 L02 相比,LINC02163 在 HuH-7、HCCLM3、MHCC-97H、SNU-182 和 SMMC-7721 细胞系的表达量均上调;在 HuH-7 和 HCCLM3 细胞系中相对高表达,而在 SMMC-7721 细胞系中相对低表达($P<0.001$,图 3)。基于以上结果,我们选择 HuH-7、HCCLM3 细胞系为后续敲低实验研究对象,继而研究 LINC02163 对肝癌细胞系生物学功能的影响。

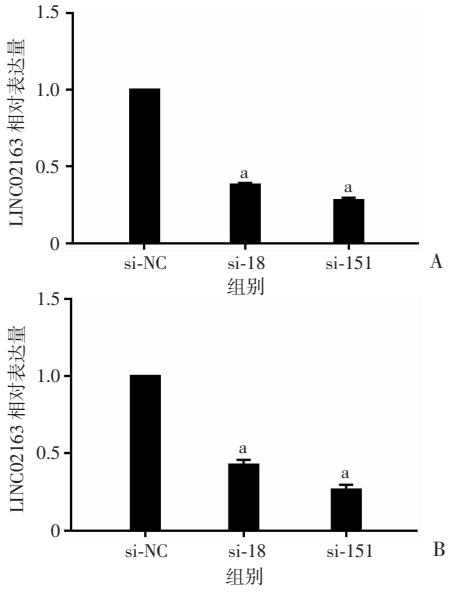


1:L02;2:SMMC-7721;3:SNU-182;4:MHCC-97H;5:HCCLM3;6:HuH-7 a:$P<0.001$,与 L02 比较

图 3 LINC02163 在肝癌细胞系中的表达

2.4 用 RNA 干扰技术可抑制 LINC02163 在肝癌细胞中的表达

将 si-18、si-151、si-NC 分别转染 HuH-7、HCCLM3 细胞系干扰 LINC02163 的表达 48 h 后,用 qRT-PCR 检测干扰效率。结果显示,与转染了 si-NC 的对照组相比,转染了 si-18、si-151 的实验组细胞 HuH-7、HCCLM3 中 LINC02163 的相对表达量明显低于 si-NC 对照组($P<0.01$,图 4),提示抑制表达成功,该两条 siRNA 可用于后续实验对 LINC02163 的敲低。



A:HuH-7;B:HCCLM3 a:$P<0.01$,与 NC 组比较

图 4 siRNA 转染 48 h 后 qRT-PCR 检测 HuH-7、HCCLM3 细胞中 LINC02163 的表达

2.5　敲低 LINC02163 表达对肝癌细胞迁移的影响

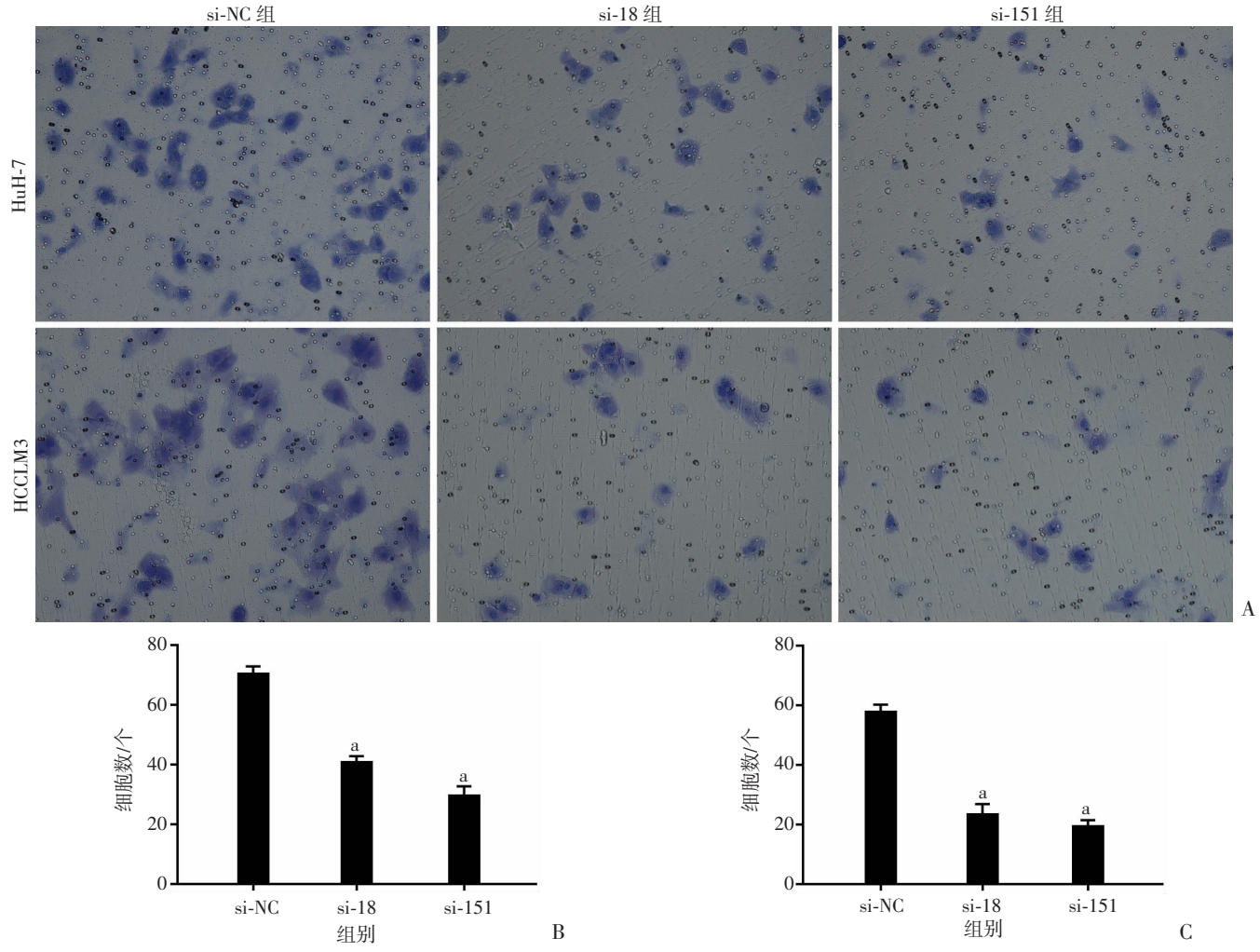
利用 Transwell 迁移实验检测敲低 LINC02163 表达对 HuH-7、HCCLM3 细胞迁移能力的影响,在无基质胶的条件下,观察敲低 LINC02163 表达的实验组与对照组穿过小室细胞的数量。该实验结果显示,HuH-7 与 HCCLM3 实验组迁移细胞数明显少于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$,图 5),表明敲低 LINC02163 表达可以显著抑制肝癌细胞的迁移能力。

2.6　敲低 LINC02163 表达对肝癌细胞侵袭的影响

利用 Transwell 侵袭实验检测敲低 LINC02163 表达对 HuH-7、HCCLM3 细胞侵袭能力的影响,在有基质胶的条件下,观察敲低 LINC02163 表达的实验组与对照组穿过小室细胞的数量。该实验结果显示,HuH-7 与 HCCLM3 实验组侵袭细胞数明显少于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$,图 6),表明敲低 LINC02163 表达可以显著抑制肝癌细胞的侵袭能力。

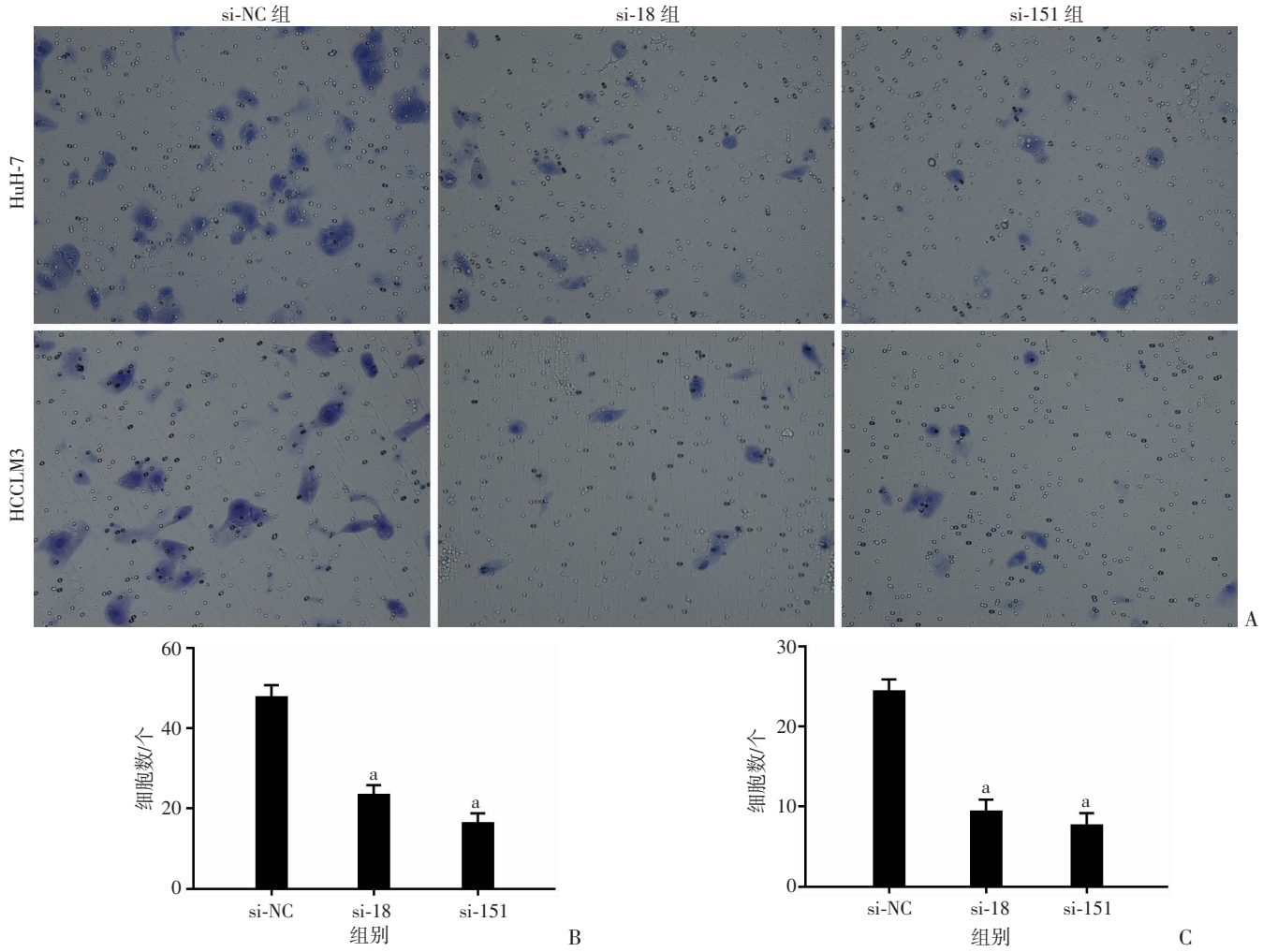
3　讨论

由于 HCC 发病隐匿,大多数患者被诊断时因已经浸润并发生远处转移而失去根治性手术机会,此外肝癌细胞侵袭转移能力强是导致 HCC 手术治疗失败和复发的重要原因[11-13]。因此,研究 HCC 细胞侵袭转移的分子机制,对寻找新的阻断治疗靶点以降低 HCC 细胞转移风险具有重要意义。LncRNA 因其缺乏完整的开放阅读框,不参与蛋白质编码功能,曾被认为是基因组转录过程中产生的“噪音”和“垃圾”而不受人们重视[14]。近年越来越多的研究表明,lncRNA 虽然不能编码蛋白质,但其广泛参与机体的生理与病理过程,在表观遗传水平、转录和转录后水平调控基因的表达。在肝癌的侵袭转移过程中 lncRNA 发挥着至关重要的作用。HOTAIR 能够通过抑制 RNA 结合区域蛋白 38(RBM38)的表达促进肝癌细胞的迁移和侵袭[15]。



A:Transwell 迁移实验检测结果(结晶紫×200);B:HuH-7 细胞迁移细胞数;C:HCCLM3 细胞迁移细胞数　a:$P<0.01$,与 si-NC 比较

图 5　敲低 LINC02163 表达对肝癌细胞迁移的影响



A:Transwell 侵袭实验检测结果(结晶紫×200);B: HuH-7 细胞侵袭细胞数;C: HCCLM3 细胞侵袭细胞数 a: $P<0.01$,与 si-NC 比较

图 6 敲低 LINC02163 表达对肝癌细胞侵袭的影响

MVIH 可以通过下调磷酸甘油酸激酶 1(PGK1)诱导血管生成,从而促进肝癌细胞转移[9]。ATB 通过与 miR-200 家族竞争性结合上调 ZEB1 和 ZEB2 蛋白的表达,从而诱导上皮-间质转化(EMT)和肝癌侵袭[7]。H19 能够通过增加组蛋白乙酰化激活 miR-200 家族,从而促进间质-上皮转化(MET),抑制肝癌细胞的迁移和侵袭[10]。

LINC02163 是一个新近发现的基因间 lncRNA 分子,位于人类染色体 5q21.2 区域,全长 316 bp,包含 3 个外显子。DONG 等[11]研究发现 LINC02163 在胃癌中呈高表达,且与胃癌患者的不良预后相关。而且在体外试验中发现,下调 LINC02163 表达后,胃癌细胞的增殖、侵袭能力减弱。在裸鼠体内试验中,LINC02163 低表达的胃癌细胞在裸鼠皮下成瘤质量显著减小,肺转移瘤数量也显著减少。进一步研究其机制发现 LINC02163 通过 miR-593-3p/FOXK1 信号轴介导了胃癌细胞的生长和转移。基于 TCGA 数据库分析,LINC02163 在肝癌组织中亦高表达,这提示我们去探究 LINC02163 在临床肝癌样本和细胞系中的表达水平及其具体作用。

本研究采用 qRT-PCR 检测 LINC02163 在 60 例 HCC 组织和配对癌旁组织中的差异表达,以及 5 种肝癌细胞系与正常肝细胞系中的差异表达。发现与癌旁组织和正常肝细胞相比,LINC02163 在肝癌组织和细胞中表达均明显升高($P<0.001$),在肝癌细胞系 HuH-7 和 HCCLM3 中的上调幅度明显,该结果提示 LINC02163 与肝癌发生、发展相关,可能参与了肝癌的癌变过程。进一步分析 LINC02163 的表达与 HCC 患者临床病理参数间的关系后发现,其表达水平与 TNM 分期、是否微血管侵犯(MVI)有关($P<0.01$),但与性别、年龄、肝硬化、AFP 表达水平、肿瘤直径、数目、肝癌的分化程度等无关,高 LINC02163 表达患者可能有

较高的 TNM 分期、较大的微血管侵犯(MVI)概率。已有研究[16]表明,MVI 是肝癌患者术后复发及转移的高危因素。上述结果提示,LINC02163 与肝癌进展密切相关,很可能参与了肝癌的侵袭转移过程。

为了进一步验证 LINC02163 是否参与调节肝癌细胞的迁移及侵袭过程,在体外实验中本研究选择 LINC02163 相对较高表达细胞系 HuH-7 及 HCCLM3 作为研究模型。我们应用 siRNA 技术特异性下调 LINC02163 表达,观察其对这两种肝癌细胞生物学功能的影响。Transwell 实验结果显示,下调 LINC02163 表达能显著抑制 HuH-7 及 HCCLM3 细胞的体外迁移、侵袭能力($P<0.01$)。以上结果说明,在 HCC 中 LINC02163 具有调控肝癌迁移和侵袭能力,可能是一种促进肝癌侵袭转移的致癌基因,这种作用与以往 LINC02163 在胃癌中的研究结果相一致[11]。

综上,本研究证实 LINC02163 在 HCC 中高表达,并且与 HCC 的 TNM 分期、MVI 密切相关,可能通过促进肝癌侵袭转移发挥致癌基因的作用。这表明 LINC02163 可能成为肝癌诊断的生物标志物和肝癌防治的新靶点。因此,在下一步的实验中我们将通过裸鼠体内实验验证这一结果,并探究 LINC02163 发挥促癌作用的具体信号通路,以期为阐明肝癌的分子机制及发现新的诊治方法奠定一定的理论基础。

参考文献:

[1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, *et al*. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132. DOI:10.3322/caac.21338.

[2] WANG F S, FAN J G, ZHANG Z, *et al*. The global burden of liver disease: the major impact of China[J]. Hepatology, 2014 2099-2108. DOI:10.1002/hep.27406.

[3] FORNER A, REIG M, BRUIX J. Hepatocellular carcinoma [J]. Lancet, 2018, 391(10127): 1301-1314. DOI:10.1016/S0140-6736(18)30010-2.

[4] SHIH J W, KUNG H J. Long non-coding RNA and tumor hypoxia: new players ushered toward an old arena[J]. J Biomed Sci, 2017, 24(1): 53. DOI:10.1186/s12929-017-0358-4.

[5] SHI X, SUN M, LIU H, *et al*. Long non-coding RNAs: a new frontier in the study of human diseases[J]. Cancer Lett, 2013, 339(2): 159-166. DOI:10.1016/j.canlet.2013.06.013.

[6] WEIDLE U H, BIRZELE F, KOLLMORGEN G, *et al*. Long non-coding RNAs and their role in metastasis[J]. Cancer Genom Proteom, 2017, 14(3): 143-160. DOI:10.21873/cgp.20027.

[7] YUAN J H, YANG F, WANG F, *et al*. A long noncoding RNA activated by TGF-beta promotes the invasion-metastasis cascade in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Cell, 2014, 25(5): 666-681. DOI:10.1016/j.ccr.2014.03.010.

[8] YANG T, HE X, CHEN A, *et al*. LncRNA HOTAIR contributes to the malignancy of hepatocellular carcinoma by enhancing epithelial-mesenchymal transition via sponging miR-23b-3p from ZEB1[J]. Gene, 2018, 670: 114-122. DOI:10.1016/j.gene.2018.05.061.

[9] YUAN S X, YANG F, YANG Y, *et al*. Long noncoding RNA associated with microvascular invasion in hepatocellular carcinoma promotes angiogenesis and serves as a predictor for hepatocellular carcinoma patients' poor recurrence-free survival after hepatectomy[J]. Hepatology, 2012, 56(6): 2231-2241. DOI:10.1002/hep.25895.

[10] ZHANG L, YANG F, YUAN J H, *et al*. Epigenetic activation of the MiR-200 family contributes to H19-mediated metastasis suppression in hepatocellular carcinoma[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(3): 577-586. DOI:10.1093/carcin/bgs381.

[11] DONG L, HONG H, CHEN X, *et al*. LINC02163 regulates growth and epithelial-to-mesenchymal transition phenotype *via* miR-593-3p/FOXK1 axis in gastric cancer cells[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2018, 46(sup2): 607-615. DOI:10.1080/21691401.2018.1464462.

[12] 周征宇,向颖,袁帅,等. 长链非编码 RNA LINC00324 对非小细胞肺癌细胞生物学功能的影响[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(4): 331-338. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201811031.
ZHOU Z Y, XIANG Y, YUAN S, *et al*. Effect of long noncoding RNA LINC00324 on biological functions of non-small cell lung cancer cells[J]. J Third Mil Med Univ, 2019, 41(4): 331-338. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201811031.

[13] OU H, LIU X, XIANG L, *et al*. NVM-1 predicts prognosis and contributes to growth and metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. Am J Cancer Res, 2017, 7(3): 554-564.

[14] WANG T H, CHAN C W, FANG J Y, *et al*. 2-O-Methylmagnolol upregulates the long non-coding RNA, GAS5, and enhances apoptosis in skin cancer cells[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(3): e2638. DOI:10.1038/cddis.2017.66.

[15] DING C, CHENG S, YANG Z, *et al*. Long non-coding RNA HOTAIR promotes cell migration and invasion *via* down-regulation of RNA binding motif protein 38 in hepatocellular carcinoma cells[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(3): 4060-4076. DOI:10.3390/ijms15034060.

[16] 刘驰,杨启,秦长岭. 微血管侵犯对早期肝癌肝切除术切缘选择及患者预后的影响[J]. 肝胆外科杂志, 2017, 25(5): 353-357.
LIU C, YANG Q, QIN C L. The effect of microvascular invasion on the choice of resection margin of hepatectomy for early stage cancer and the prognosis ofpatients[J]. J Hepatobil Surg, 2017, 25(5): 353-357.

(**收稿**:2019-07-31;**修回**:2019-09-21)

(编辑 张 维)