DOI:10.16016/j.1000-5404.202101151

LncRNA SNHG12 通过 miR-129-5p/GTPBP4 对肝细胞癌进展的促进作用

章诺贝[1],沈 浩[1],黄神安[1],陈 新[2] 330000 南昌,南昌大学第二附属医院:消化内科[1],核医学科[2]

[摘要] **目的** 探讨长链非编码 RNA(LncRNA)核仁小 RNA 宿主基因 12(small nucleolar RNA host gene 12, SNHG12)对肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)发展的调控机制。**方法** 通过 RT-qPCR 检测长链非编码 RNA(long noncoding RNA, LncRNA) SNHG12 在肝癌组织和肝癌细胞系中的表达水平;分析肝癌组织中 LncRNA SNHG12 的表达水平与 HCC 患者临床病理参数的关系;运用 MTT 实验、细胞集落形成实验、Transwell 实验、划痕愈合实验、裸鼠成瘤实验检测 LncRNA SNHG12、miR-129-5p、GTPBP4 在肝癌细胞活性、增殖、迁移、侵袭中的作用;采用荧光素酶报告基因、RT-qPCR、Western blot 实验来评估 LncRNA SNHG12、miR-129-5p、GTPBP4 之间的互相作用。**结果** LncRNA SNHG12 在肝癌组织和肝癌细胞系中表达上调($P<0.05$);LncRNA SNHG12 表达水平较高的 HCC 患者相比其表达水平较低的患者预后更差($P<0.05$);LncRNA SNHG12 表达水平与肿瘤大小、TNM 分期、淋巴结转移存在正相关的关系;LncRNA SNHG12 可促进 HCC 的细胞活性、增殖、迁移及侵袭($P<0.05$);miR-129-5p 在肝癌组织中表达下调,其可抑制肝癌细胞活性、增殖、迁移及侵袭($P<0.05$); LncRNA SNHG12 可通过与 miR-129-5p 进行竞争性结合,从而促进 GTPBP4 的表达($P<0.05$);GTPBP4 在 HCC 组织中表达上调,其可促进肝癌细胞活性、增殖、迁移及侵袭($P<0.05$)。**结论** LncRNA SNHG12 可通过调控 miR-129-5p/GTPBP4 轴从而促进 HCC 的进展。

[关键词] 肝细胞癌;LncRNA SNHG12;miR-129-5p;GTPBP4
[中图法分类号] R394.3; R730.23; R735.7 [文献标志码] A

Long non-coding RNA SNHG12 promotes progression of hepatocellular carcinoma through miR-129-5p/GTPBP4

ZHANG Nuobei[1], SHEN Hao[1], HUANG Shen'an[1], CHEN Xin[2] [1]Department of Gastroenterology, [2] Department of Nuclear Medicine, Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi Province, 330000, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the regulatory mechanism of long non-coding RNA (LncRNA) small nucleolar RNA host gene 12 (SNHG12) on the development of hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** The expression levels of SNHG12 in HCC tissues as well as in HCC cell lines were detected by RT-qPCR, and the correlation between the SNHG12 level and the clinicopathological parameters of HCC patients was then analyzed. The effects of SNHG12, miR-129-5p and GTPBP4 on the activity, proliferation, migration and invasion of HCC cells were determined using MTT assay, cell colony formation test, Transwell test, scratch healing assay and xenograft tumor growth assay, respectively. Finally, luciferase reporter gene, RT-qPCR and Western blotting were employed to evaluate the interactions among SNHG12, miR-129-5p and GTPBP4. **Results** The expression of SNHG12 was up-regulated in both HCC tissues and HCC cell lines ($P<0.05$). HCC patients with higher expression level of SNHG12 had a worse prognosis than those with lower level ($P<0.05$), and its level was positively correlated with tumor size, TNM stage and lymph node metastasis. LncRNA SNHG12 promoted the viability, proliferation, migration and invasion of HCC cells

[基金项目] 国家自然基金地区科学基金项目(81760427);江西省自然科学基金(20202BABL206094,20202BABL216037);江西省卫生健康委科技计划(20201037,202110042)

[通信作者] 陈 新,E-mail:13870979404@163.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

($P<0.05$), whereas, miR-129-5p was down-regulated in HCC tissues and showed inhibitory effects on above biological behaviors of HCC cells ($P<0.05$). Moreover, through competitively binding with miR-129-5p, SNHG12 promoted GTPBP4 expression ($P<0.05$), which was up-regulated in HCC tissues and facilitated the activity, proliferation, migration and invasion of HCC cells ($P<0.05$). **Conclusion** LncRNA SNHG12 promotes the progression of HCC by regulating the miR-129-5p/GTPBP4 axis.

[**Key words**] hepatocellular carcinoma; LncRNA SNHG12; miR-129-5p; GTPBP4

Supported by the Regional Program of National Natural Science Foundation of China (81760427), the Natural Science Foundation of Jiangxi Province (20202BABL206094, 20202BABL216037), and the Science and Technology Plan of Jiangxi Provincial Health Commission (20201037, 202110042).
Corresponding author: CHEN Xin, 13870979404@163.com

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)是世界范围内最普遍的恶性肿瘤之一,也是癌症致死率的第3大原因[1]。尽管在早期HCC诊断和新疗法开发方面已经取得了一定的进步,但是该疾病的预后依然较差,尤其是它的复发率较高[2]。因此,了解HCC的发病机制、确认分子在其中所起到的关键作用,对于该疾病的早期诊断与治疗来说尤为重要。

长链非编码RNA(long noncoding RNA,LncRNA)是一类转录本长度超过200nt的RNA分子,它们并不编码蛋白,而是以RNA的形式在多种层面上(表观遗传调控、转录调控以及转录后调控等)调控基因的表达水平。大量证据表明LncRNA可能在多种生物学过程中起到了重要的作用,LncRNA的失调可能在包括癌症在内的不同疾病发展过程中扮演了重要的角色[3-4]。尽管利用RNA测序技术已经发现了成千上万种LncRNA,但它们的功能在很大程度上仍尚不清楚。据报道,LncRNA SNHG12在包括胰腺癌、肾癌、宫颈癌在内的多种癌症中表达上调,并扮演致癌基因的角色[5-7]。尽管LncRNA SNHG12也被发现在HCC中出现表达上调现象[8-9],但是其在HCC的发展过程中的临床意义和生物学作用尚未阐明。在本研究中,我们研究了LncRNA SNHG12在HCC中的表达、临床意义、功能及作用机制。

1 材料与方法

1.1 组织样本与细胞培养

在2010年1月到2018年12月期间,从南昌大学第二附属医院总共采集了90对HCC组织与匹配的正常肝脏组织。所有组织样本均由病理学医师展开了病理学和组织学检查。研究获得了南昌大学第二附属医院伦理委员会的批准,得到了所有患者的知情同意书(审批号:2020-023)。在添加了10%胎牛血清FBS,(Gibco,美国)和1%链霉素-青霉素(100 μg/mL链霉素、100单位/mL青霉素)的DMEM或RPMI1640培养基中,培养人类肝癌细胞系HepG2.2.15、SMMC-7721、Huh7、SMMC-7721,以及人类正常肝脏细胞系L02。细胞放入含有5% CO_2 的加湿箱中,在37℃下培养。实验中采用的所有细胞系均接受了防伪验证,培养过程中远离细菌和支原体感染。

1.2 RNA分离与RT-qPCR

根据厂商说明,利用TRIzol试剂(Thermo Fisher Scientific,美国)从新鲜组织和培养细胞中分离出总RNA。通过ReadyScript© cDNA Synthesis Mix(Sigma-Aldrich,美国)合成cDNA。mRNA和LncRNA的水平通过FastStart Universal SYBR Green Master(ROX)(Roche,德国)来量化,利用β-actin作为内参实现mRNA水平的标准化。根据厂商说明,利用miRNA-specific TaqMan MiRNA实验试剂盒(miR-129-5p, ID 462051_mat, Thermo Fisher Scientific,美国)量化miRNA的水平。利用U6 snRNA(ID 001973, Thermo Fisher Scientific,美国)标准化miR-129-5p的表达。使用的PCR引物如下:LncRNA SNHG12正义链5′-CACCATGTTGGCCAGGCTGGT-3′;LncRNA SNHG12反义链5′-GGCCAAAGAGTGACCATCATC-3′;GTPBP4正义链5′-GGCAAGGACTGCCTGGTGCTGGTTT-3′;GTPBP4反义链5′-GGGCCCCCAAAGCCGCAGTGCAGGT-3′;β-actin正义链5′-ATCCACGAAACTACCTTCAACTC-3′;β-actin反义链5′-GAGGAGCAATGATCTTGATCTTC-3′。

1.3 细胞转染

根据厂商说明,利用Lipofectamine 2000(Invitrogen,美国)将miRNA或质粒转染到肝癌细胞中。根据厂商说明,用携带空慢对照载体或LncRNA SNHG12敲除载体-shR-LncRNA SNHG12的慢病毒来感染肝癌细胞。

1.4 MTT细胞活性实验

将3×10^3个Huh7或HepG2细胞转染上指定的质粒,然后种植到96孔板中,培育24 h。接下来,在加入MTT后的第24、48、72 h评估细胞增殖率,利用Quant通用微孔板分光光度计(BioTek,美国)测量490 nm处

的光密度值 D(490)。

1.5 细胞集落形成实验

将 Huh7 或 HepG2 细胞转染上指定的质粒,然后种植到 12 孔板中(每孔 300 个细胞),培养 12 d。接下来,用结晶紫让细胞染色,计数大于 50 个细胞(菌落)的细胞块。

1.6 细胞侵袭实验

利用 8 μm 孔隙聚碳酸酯膜的 Transwell 小室来评估细胞的侵袭能力。上室涂有基质胶,用于侵袭分析或未涂覆基质胶进行迁移分析。上室每孔有 1 000 个/孔浓度的细胞以及无血清培养基,底部腔室为含有 10% FBS 的 DMEM。48 h 后,通过使用 4%甲醇固定细胞,然后用 0.1%结晶紫(Sigma-Aldrich,美国)染色。在 5 个不同的视野(×100 倍)中,分别对迁移和侵袭的细胞进行计数。

1.7 划痕愈合迁移实验

肝癌细胞种植到 12 孔板中,培养达到 70%左右的融合度。接下来,利用一个 50μL 小管的管尖部分造成划痕。通过 1×PBS 除去没有附壁的细胞。再次将细胞放入含有 10% FBS 的 DMEM 中分别培养 0、48、72 h。每孔随机选择 3 个观察范围。

1.8 荧光素酶报告基因实验

使用 GTPBP4 野生型(wt)或突变型(mut)启动子报告子与 LncRNA SNHG12 或 miR-129-5p 进行重组后转染 HuH-7 和 HepG2 细胞系。转染 48 h 后,使用双荧光素酶报告检测系统(Promega,美国)检测荧光素酶活性。

1.9 Western blot 检测

用 RIPA 裂解液裂解转染后的细胞,然后采用蛋白酶抑制剂混合物(Roche,德国)提取总蛋白质。总蛋白质的浓度采用 BCA 法测定(Beyotime)。采用 10% SDS-PAGE 分离出蛋白质裂解物(30 μg/lane),然后转移到聚偏二氟乙烯薄膜上。按照厂商说明,将薄膜与一抗在 4 ℃下过夜培养:用来抵抗 GTPBP4 抗体 ab104017),、Survivin 蛋白抗体(ab469)、E-钙黏蛋白抗体(ab1416)、GAPDH 抗体 (EPR16891),抗体购自 Abcam(Eugene,美国)。接下来,将薄膜放在 HRP 相关二抗(Jackson,美国)中培养,然后用 Alpha Innotech(美国)成像软件量化 Western blot 的数据。

1.10 免疫组织化学染色分析(IHC)

GTPBP4 抗体稀释比例为 1∶6 000,以 PBS 做阴性对照,免疫组织化学采用 S-P 法。原始实验数据的判读方式:判读 GTPBP4 的染色强度(0/1+/2+/3+)和染色阳性率,癌组织和癌旁组织分别判读。原始实验数据的标准化方案:染色强度评分:0 分(阴性),1 分(1+),2 分(2+),3 分(3+)。染色阳性率评分:0 分(阴性),1 分(1%~25%),2 分(26%~50%),3 分(51%~75%),4 分(76%~100%)。总评分和分组:以“染色强度评分”和“染色阳性率评分”的乘积为总评分进行分组,≤3 分为抗体低表达组,>3 分为抗体高表达组。

1.11 体内裸鼠实验

所采用的动物计划得到了南昌大学第二附属医院动物管理委员会的批准(审批号:2020-671)。获取 6 周龄 BALB/c 无胸腺雌性裸鼠(中国上海中科院动物学学院),用于体内研究。在开始接种肿瘤细胞之前,将动物通过完全随机化分组。将转染了慢病毒或 lenti-shR-LncRNA SNHG12 的 Huh7 细胞(1×10^7)以皮下注射方式接种到裸鼠的腋窝。每 1 组内包括 6 只小鼠。利用电子秤和游标卡尺分别测定肿瘤的重量与大小,用 t 检验来比较各组之间的肿瘤生长情况。每个实验重复 3 次。

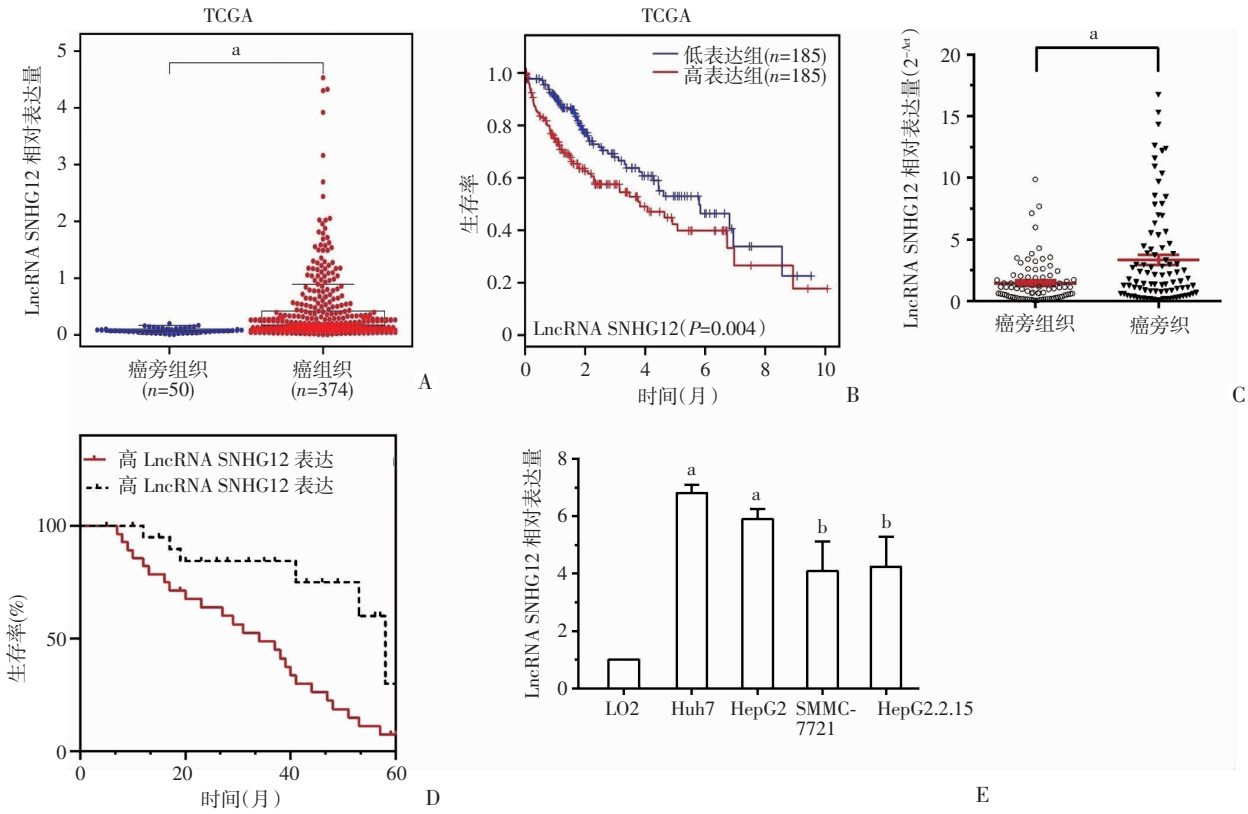
1.12 统计学分析

数据分析采用 Student's t 检验、单向 ANOVA、双向 ANOVA 检验进行。用 Kaplan-Meier 法构建生存曲线,然后用的对数秩分析该曲线。LncRNA SNHG12 表达与临床病理特征之间的关联采用 Pearson 卡方检验来分析。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 HCC 中的 LncRNA SNHG12 表达与临床病理特征之间的关系

按照癌症基因组图谱(TCGA),我们首先分析了 LncRNA SNHG12 在 HCC 患者中的表达水平和预后值。发现与正常肝脏组织相比(正常组;$n=50$),LncRNA SNHG12 在 HCC 组织中被上调(肿瘤组;$n=374$)($P<0.05$,图 1A)。随后的 Kaplan-Meier 生存曲线分析表明对于 LncRNA SNHG12 表达水平较高的 HCC 患者,其 10 年整体生存率要低于那些 LncRNA SNHG12 表达水平低的患者($P<0.05$,图 1B)。接着,我们对 LncRNA SNHG12 在 90 对 HCC 肿瘤组织和相邻正常组织中的表达水平进行评估。与 TCGA 数据一致,我们发现相比于相邻正常组织,LncRNA SNHG12 的表达水平在 HCC 组织中出现显著上调($P<0.05$,图 1C)。此外,我们发现 LncRNA SNHG12 表达水平较高的 HCC 患者,其 5 年整体生存率要低于那些 LncRNA SNHG12 表达水平较低的患者($P<0.05$,图 1D)。我们还对正常人类肝脏细胞系 L02 和 4 个肝癌细胞系 Huh7、HepG2、SMMC-7721、HepG2.2.2.15 中的 LncRNA SNHG12表达展开比较。我们发现在4个肝



A:根据癌症基因图谱(TCGA)中的微阵列数据集合,相比于正常肝脏组织(正常组;$n=50$),LncRNA SNHG12 在 HCC 组织中被上调(肿瘤组;$n=374$);B:按照 TCGA 的数据集合,利用 Kaplan-Meier 生存曲线来评估 LncRNA SNHG12 表达较高和较低 HCC 患者的预后情况;C:利用 RT-qPCR 来检测 90 对 HCC 和相邻正常组织中的 LncRNA SNHG12 表达;D:基于 90 对 HCC 患者的数据集合,利用 Kaplan-Meier 生存曲线来评估 LncRNA SNHG12 表达较高和较低的 HCC 患者预后情况;E:正常人类肝脏细胞系 L02 和 4 种肝癌细胞系中的 LncRNA SNHG12 表达水平　a:$P<0.01$; b: $P<0.001$

图 1　LINC00346 在 HCC 中表达上调并与患者预后有关

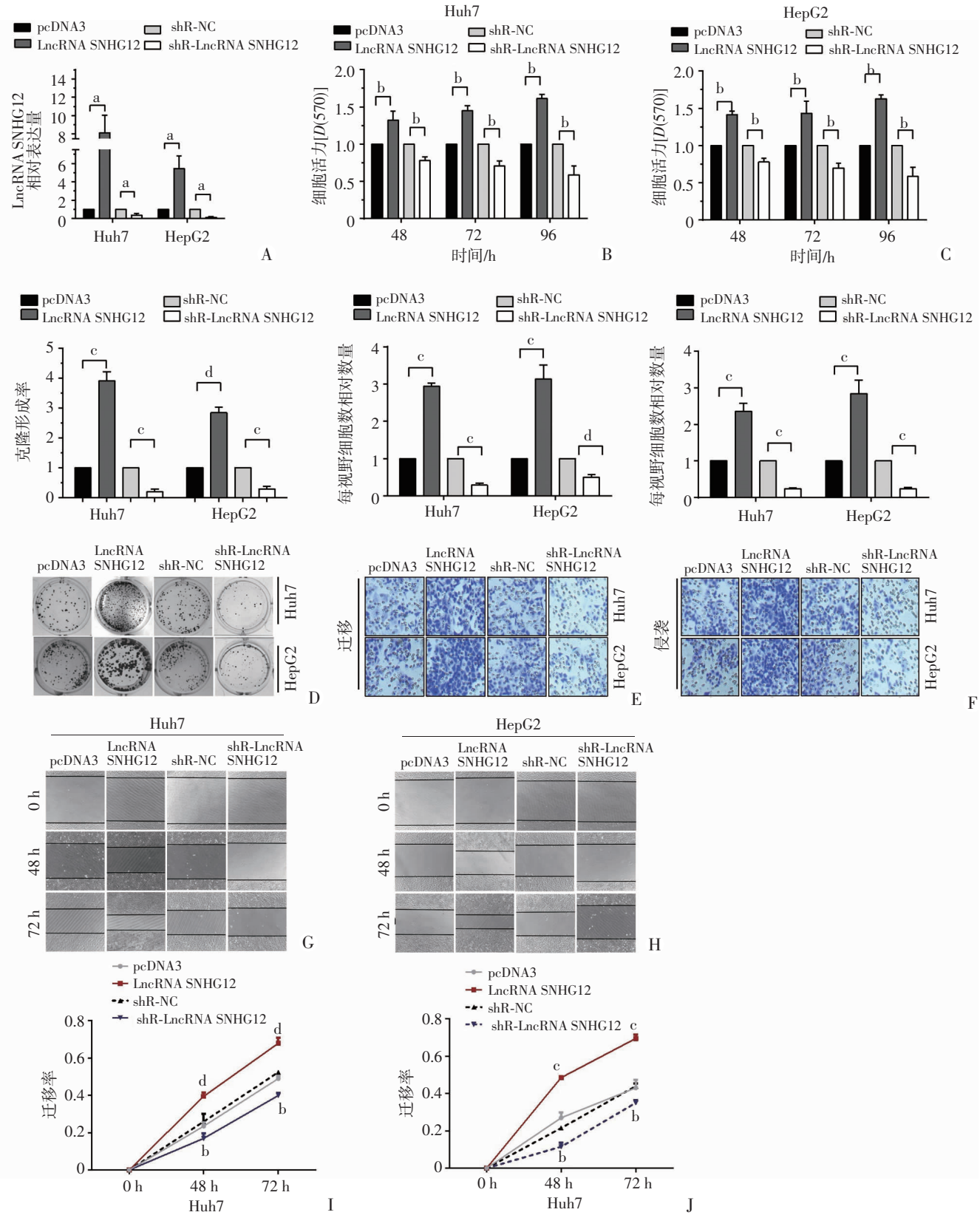
癌细胞系中的 LncRNA SNHG12 表达水平要高于正常人类肝脏细胞系($P<0.05$,图 1E)。最后,我们分析了 LncRNA SNHG12 表达水平与其他临床病理特征之间的关联,发现 LncRNA SNHG12 表达水平与肿瘤大小、TNM 分期、淋巴结转移存在正相关的关系($P<0.05$)。

2.2　LncRNA SNHG12 对肝癌细胞增殖与侵袭的影响

为了观察 LncRNA SNHG12 表达对肝癌细胞恶性行为的影响,我们首先测定了 LncRNA SNHG12 在 Huh7 和 HepG2 细胞在转染后的表达水平,以确认 LncRNA SNHG12 过表达与敲除质粒的有效性($P<0.05$,图 2A)。接下来,展开 MTT、集落形成实验、Transwell 实验、划痕愈合实验。我们发现 LncRNA SNHG12 的过表达能够增强 HCC 的细胞活性、增殖、迁移及侵袭,而 LncRNA SNHG12 表达沉默则可抑制 HCC 的细胞活性、增殖、迁移及侵袭($P<0.05$,图 2B~E)。因此,我们认为,LncRNA SNHG12 在 HCC 的细胞中扮演了致癌基因的角色。

表 1　LncRNA SNHG12 在 HCC 患者中的临床以及病理特征

临床及病理特征	例数	LncRNA SNHG12 表达水平		P 值
		高	低	
年龄(岁)				
≥50	52	8	44	$P=0.911$
<50	48	7	41	
性别				
男	74	10	61	$P=0.202$
女	16	5	11	
肿瘤大小				
≥5 cm	46	4	42	$P=0.038$
<5 cm	44	11	33	
TNM 分期				
Ⅰ-Ⅱ	60	14	46	$P=0.016$
Ⅲ-Ⅳ	30	1	29	
淋巴结转移				
有	49	13	36	$P=0.006$
无	41	2	39	

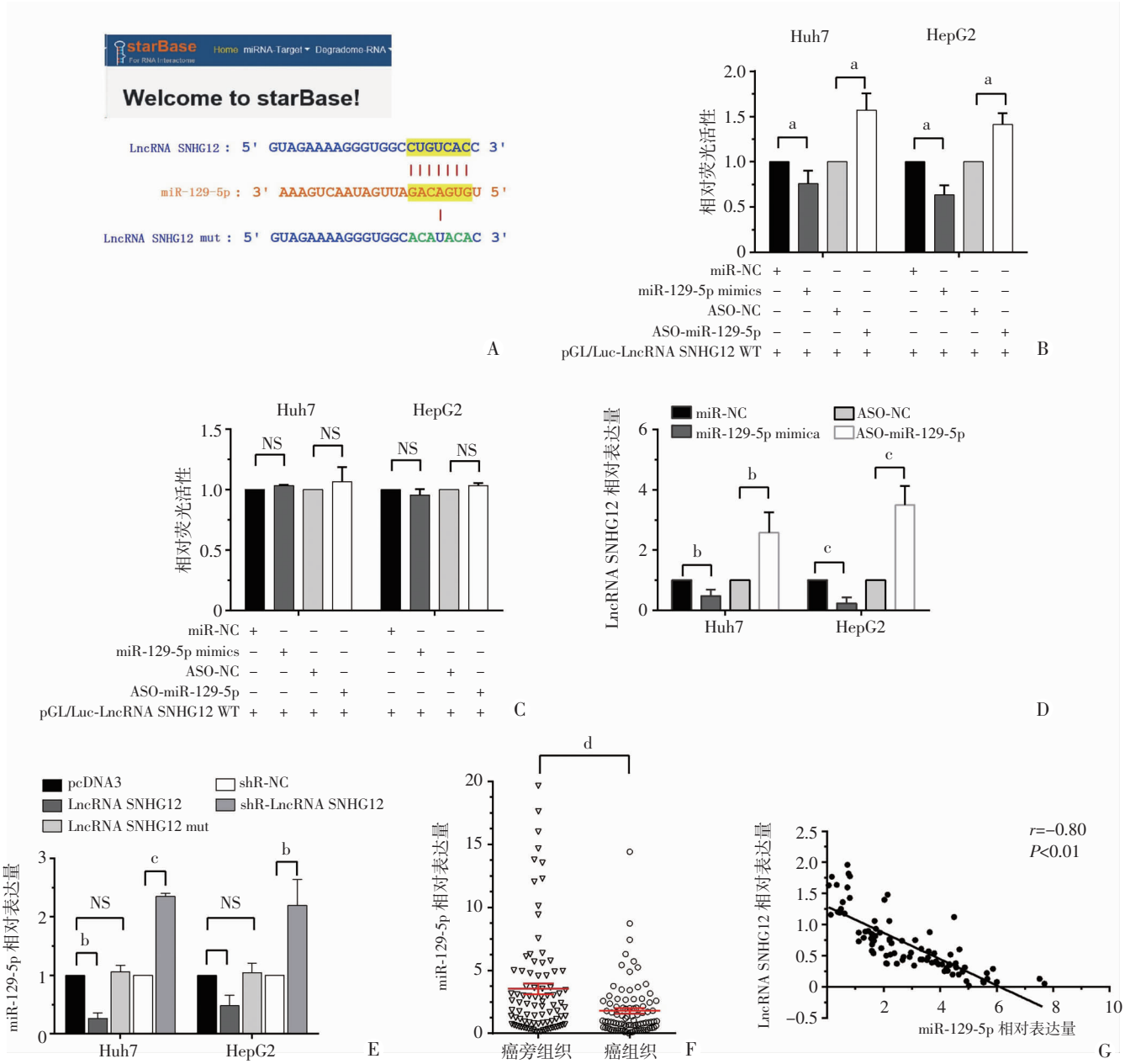


A: RT-qPCR 检测肝癌细胞中的 LncRNA SNHG12 过表达或敲除效力;B~D:MTT 和集落形成实验检测 HCC 的细胞活性和增殖能力(×100);E~J:Transwell 和划痕愈合实验分别检测 HCC 的细胞侵袭和迁移 a: $P<0.0001$, b:$P<0.05$, c:$P<0.001$, d:$P<0.01$

图 2 LncRNA SNHG12 促进肝癌细胞的增殖与侵袭

2.3　LncRNA SNHG12 在肝癌细胞中与 miR-129-5p 的相互作用

利用在线软件程序 starBase v3.0(http://starbase.sysu.edu.cn/)预测 miR-129-5p 是 LncRNA SNHG12 的潜在下游靶标(图 3A)。为了确认 LncRNA SNHG12 直接靶向作用于 miR-129-5p 的假设,将野生型或变异型 LncRNA SNHG12 序列插入荧光素酶报告基因质粒中。随后的荧光素酶报告基因实验表明 miR-129-5p 确实能够直接与 LncRNA SNHG12 结合($P<0.05$,图 3B、3C)。此外,我们发现 miR-129-5p 可以影响内源性 LncRNA SNHG12 表达水平($P<0.05$,图 3D)。相反,我们发现内源性 miR-129-5p 表达水平受 LncRNA SNHG12 过表达或敲低的影响($P<0.05$,图 3E)。我们还发现,miR-129-5p 表达在 HCC 组织中被显著下调,而且展示出与 LncRNA SNHG12 表达之间的负相关关系($P<0.05$,图 3F、3G)。结合起来看,这些结果显示 LncRNA SNHG12 可能充当 miR-129-5p 的分子海绵,从而下调 miR-129-5p 的表达水平。



A:使用 StarBase v3.0 软件来预测潜在 LncRNA SNHG12 miRNA 靶标;B、C:荧光素酶报告基因实验验证 miR-129-5p 是 LncRNA SNHG12 的一个靶向目标;D:RT-qPCR 检测 miR-129-5p 影响内源性 LncRNA SNHG12 的水平;E:RT-qPCR 检测 LncRNA SNHG12 影响内源性 miR-129-5p 的水平;F:RT-qPCR 测定 90 对 HCC 和相邻正常组织中的 miR-129-5p 水平;G:LncRNA SNHG12 与 miR-129-5p 表达之间相关性分析　a:$P<0.05$,;b:$P<0.01$,;c:$P<0.001$,;d:$P<0.0001$,NS:无统计学意义

图 3　LncRNA SNHG12 靶向 miR-129-5p 的情况

2.4 LncRNA SNHG12 通过 miR-129-5p 调控肝癌细胞的增殖与侵袭

我们通过 RT-qPCR 确认了 miR-129-5p 模拟物及其抑制剂的转染效率($P<0.05$,图 4A),并利用 MTT、集落形成、Transwell、划痕愈合实验,评估了 miR-129-5p 对 HCC 的细胞活性、增殖、迁移及侵袭中的影响。我们发现肝癌细胞在转染 miR-129-5p 模拟物之后,HCC 的细胞活性、增殖、迁移、侵袭都出现了下降,而这些能力在转染了 miR-129-5p 抑制剂之后都出现了上升($P<0.05$,图 4B~E)。接下来,通过展开挽救实验,验证 LncRNA SNHG12 是否在肝癌细胞中通过 miR-129-5p 发挥自己的生物学功能。我们发现 miR-129-5p 能够阻遏 LncRNA SNHG12 对肝癌细胞活性、增殖、迁移、侵袭的促进作用($P<0.05$,图 5A~D)。因此,我们认为 LncRNA SNHG12 可通过调控 miR-129-5p 来促进肝癌细胞的活性、增殖、迁移与侵袭。

2.5 LncRNA SNHG12 通过 miR-129-5p 调控 GTPBP4 的表达

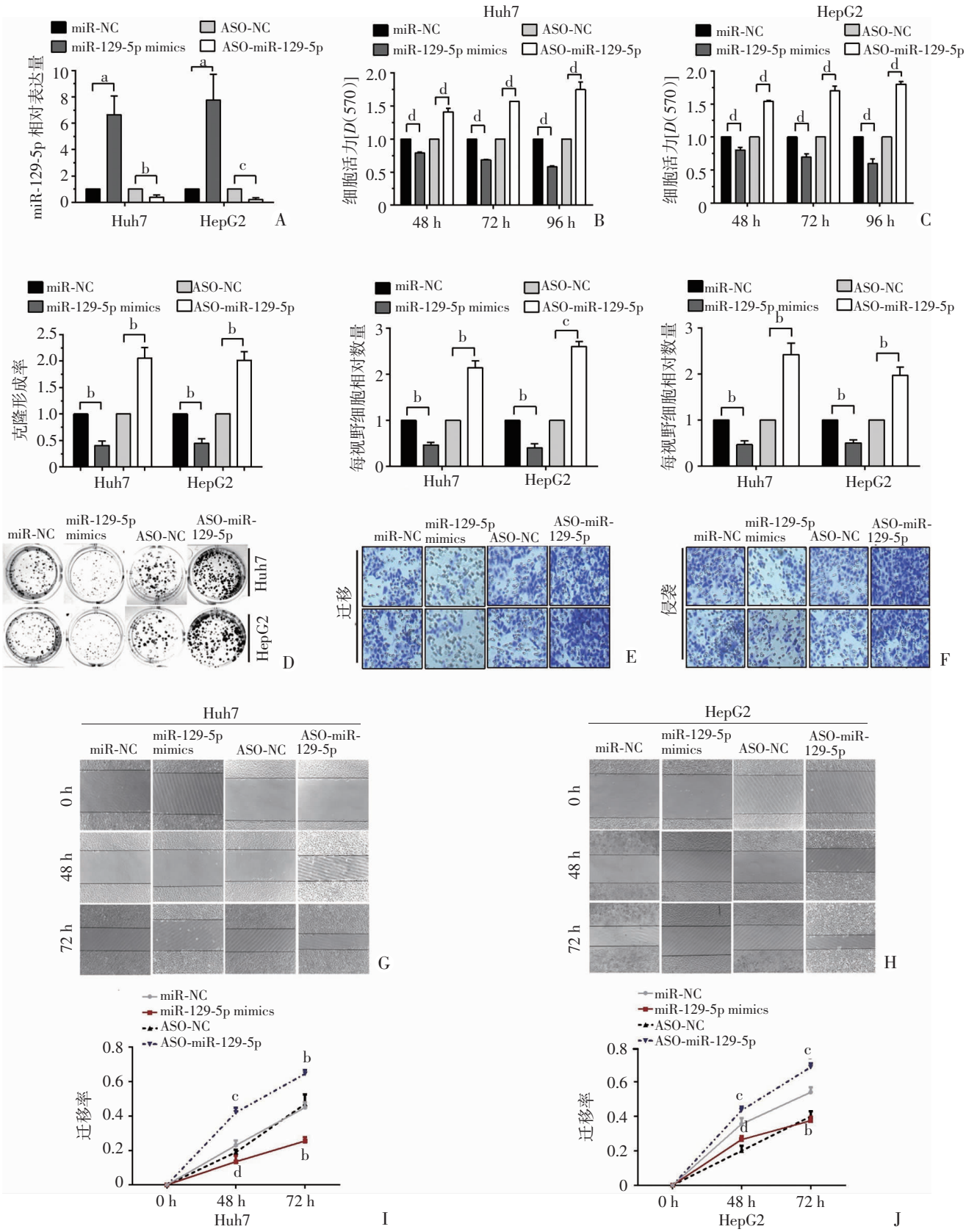
为了研究 miR-129-5p 在 HCC 中的作用机制,我们使用在线软件程序 starBase v3.0(http://starbase.sysu.edu.cn/)来预测 miR-129-5p 靶向目标,发现 GTPBP4 是 miR-129-5p 的潜在下游靶标(图 6A)。我们通过荧光素酶报告基因实验,发现 miR-129-5p 能够与 GTPBP4 的野生型 3′-UTR 结合,但不能够与 GTPBP4 变异型 3′-UTR 结合($P<0.05$,图 6B)。我们发现 miR-129-5p 模拟物的转染能够导致内源性 GTPBP4 mRNA 和蛋白质水平的下降($P<0.05$,图 6C、6D)。相反,我们发现 miR-129-5p 抑制剂的转染会导致内源性 GTPBP4 mRNA 和蛋白质水平的上调($P<0.05$,图 6C、6D)。Western blot 分析结果显示,HCC 组织中的 GTPBP4 蛋白质水平显著高于相邻正常组织($P<0.05$,图 6E)。此外,我们还通过免疫组织化学(IHC)发现 GTPBP4 在 HCC 组织中的表达水平要明显高于正常肝脏组织($P<0.05$,图 6F)。而且,我们发现相比于非肿瘤组织,90 个成对 HCC 组织中的 GTPBP4 mRNA 水平被上调($P<0.05$,图 6G),并且,这些组织中的 GTPBP4 mRNA 水平表现出与 miR-129-5p 存在负相关性($P<0.05$,图 6H)。为了验证 LncRNA SNHG12 表达敲除是否通过靶向作用于 miR-129-5p 来限制 GTPBP4 的表达,我们发现 GTPBP4 表达水平在 LncRNA SNHG12 敲除后显著降低,但是在转染 miR-129-5p 抑制剂后,至少部分恢复了 GTPBP4 的表达水平($P<0.05$,图 6I)。相反,我们发现 miR-129-5p 过表达能够阻遏肝癌细胞中外源性 LncRNA SNHG12 诱导的 GTPBP4 表达($P<0.05$,图 6J)。因此总的来说,我们认为 LncRNA SNHG12 可能通过与 miR-129-5p 实现竞争性结合,从而实现对 GTPBP4 表达的调控。

2.6 GTPBP4 对肝癌细胞增殖与侵袭的影响

为了确定 GTPBP4 表达对肝癌细胞的影响,我们构建了 GTPBP4 过表达和敲除质粒,并通过 RT-qPCR 来确认其效力($P<0.05$,图 7A)。接下来,通过 MTT 实验来评估 GTPBP4 对肝癌细胞活性的影响。我们发现 Huh7 和 HepG2 细胞的活性在外源性 GTPBP4 过表达之后被提高,而且该活性在 GTPBP4 敲除之后受到了抑制($P<0.05$,图 7B)。在集落形成实验、Transwell 实验、划痕愈合实验中也观察到了类似的趋势,表明 HCC 的细胞活性、增殖、迁移、侵袭力在 GTPBP4 过表达后得到了增强,相反,在 GTPBP4 沉默后受到了抑制($P<0.05$,图 7C-E)。这些数据表明 GTPBP4 可能在肝癌细胞中充当了致癌因子。

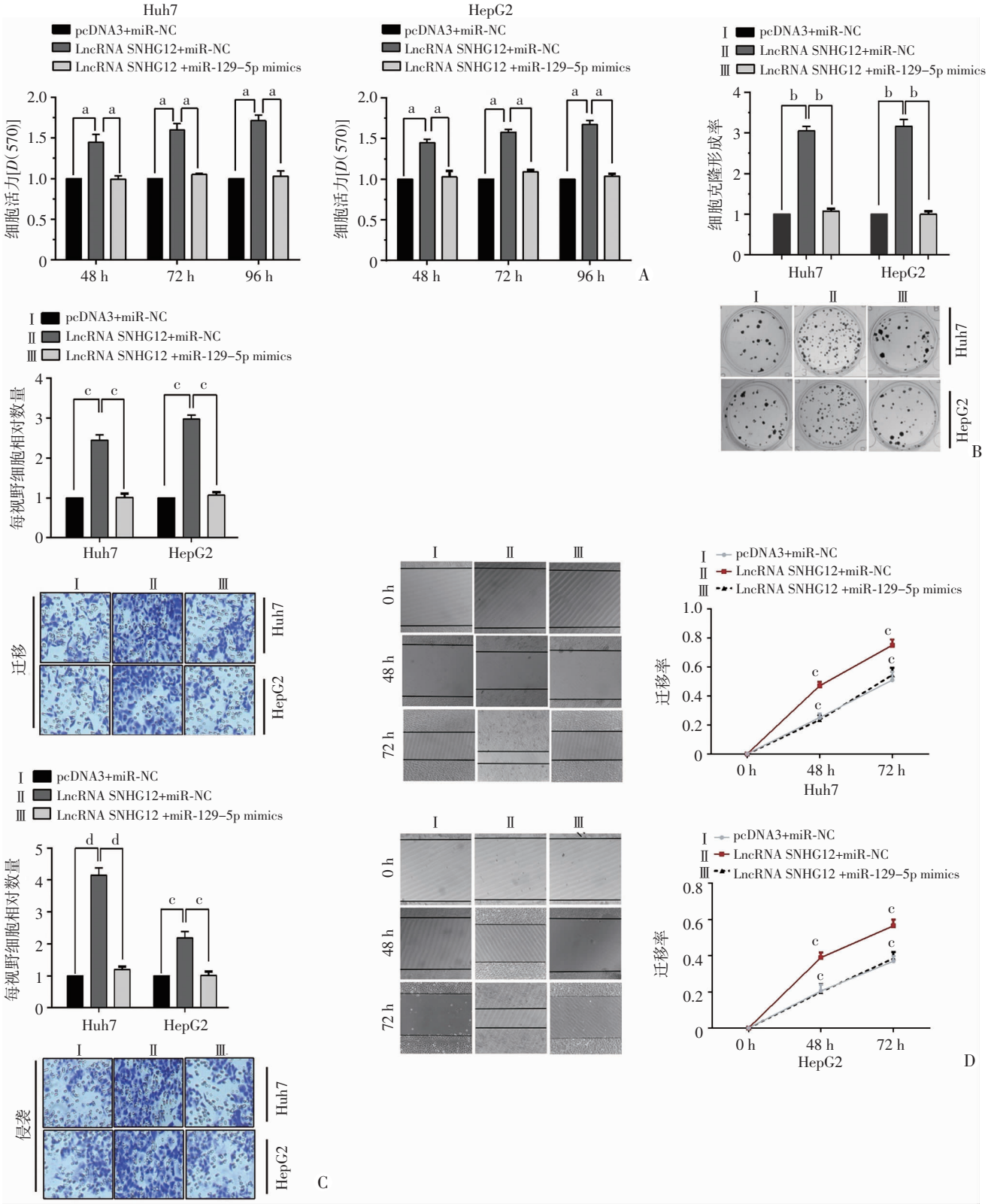
2.7 LncRNA SNHG12 在体内对 miR-129-5p 和 GTPBP4 的表达以及 HCC 生长的影响

为了确认 LncRNA SNHG12 在体内对 HCC 发展的影响,将 Huh7 细胞稳定转染上 pSilencer-shR-LncRNA SNHG12 或对照载体,注射到裸鼠的皮下。与对照组相比,在 LncRNA SNHG12 下调的 Huh7 异种移植物中,肿瘤大小与重量显著下降($P<0.05$,图 8A~C)。此外,我们通过 RT-qPCR 发现 shR-LncRNA SNHG12 组内,LncRNA SNHG12 和 GTPBP4 的表达水平下降,而 miR-129-5p 的表达水平上升($P<0.05$,图 8D)。后续 Western blot 分析显示在 shR-LncRNA SNHG12 组中,GTPBP4、Survivin 蛋白的表达水平显著低于对照组,而 shR-LncRNA SNHG12 中的 E-钙黏蛋白的表达水平显著提高($P<0.05$,图 8E)。在 shR-LncRNA SNHG12 组的 IHC 染色实验中也观察到了类似的趋势($P<0.05$,图 8F)。由此我们认为,在体内,LncRNA SNHG12 也可能通过与 miR-129-5p 的竞争性结合,以抵抗 miR-129-5p 对 GTPBP4 表达的抑制作用。



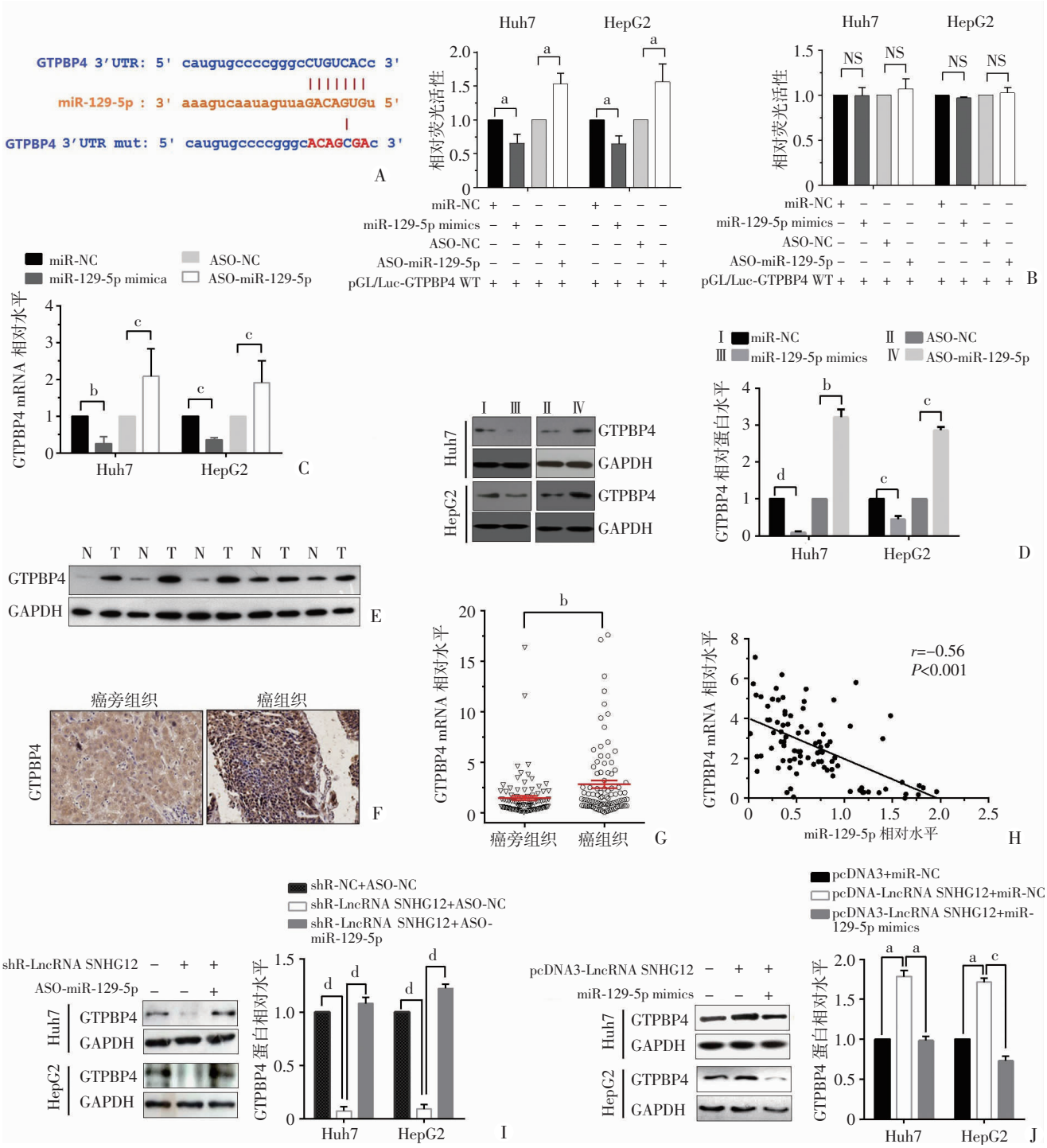
A:RT-qPCR 检测 miR-129-5p 的表达水平;B~D:MTT 法和集落形成实验检测细胞活力和增殖能力;E~J:Transwell 实验和划痕实验分别评价细胞侵袭和迁移(×100) a:$P<0.0001$;b:$P<0.01$;c:$P<0.001$;d:$P<0.05$

图 4 miR-129-5p 抑制肝癌细胞的增殖与侵袭



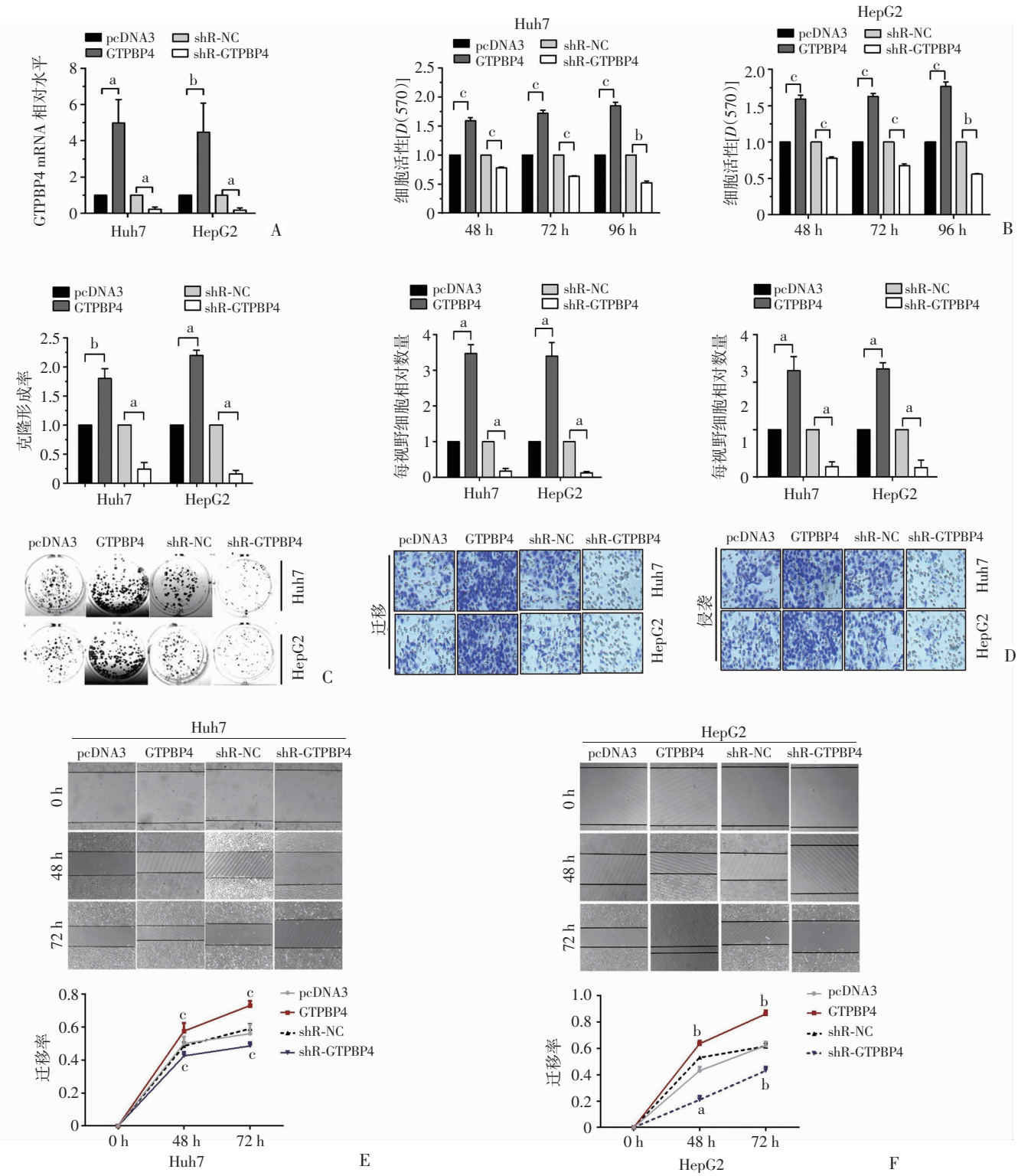
A、B:MTT 和集落形成实验分别评估肝癌细胞的活性与增殖能力;C、D:Transwell 和划痕愈合实验分别评估 HCC 的细胞侵袭与迁移(×100) a :$P<0.05$; b: $P<0.001$;c :$P<0.01$;d: $P<0.0001$

图 5 miR-129-5p 可部分阻遏由 LncRNA SNHG12 所诱导的肝癌细胞的恶性行为



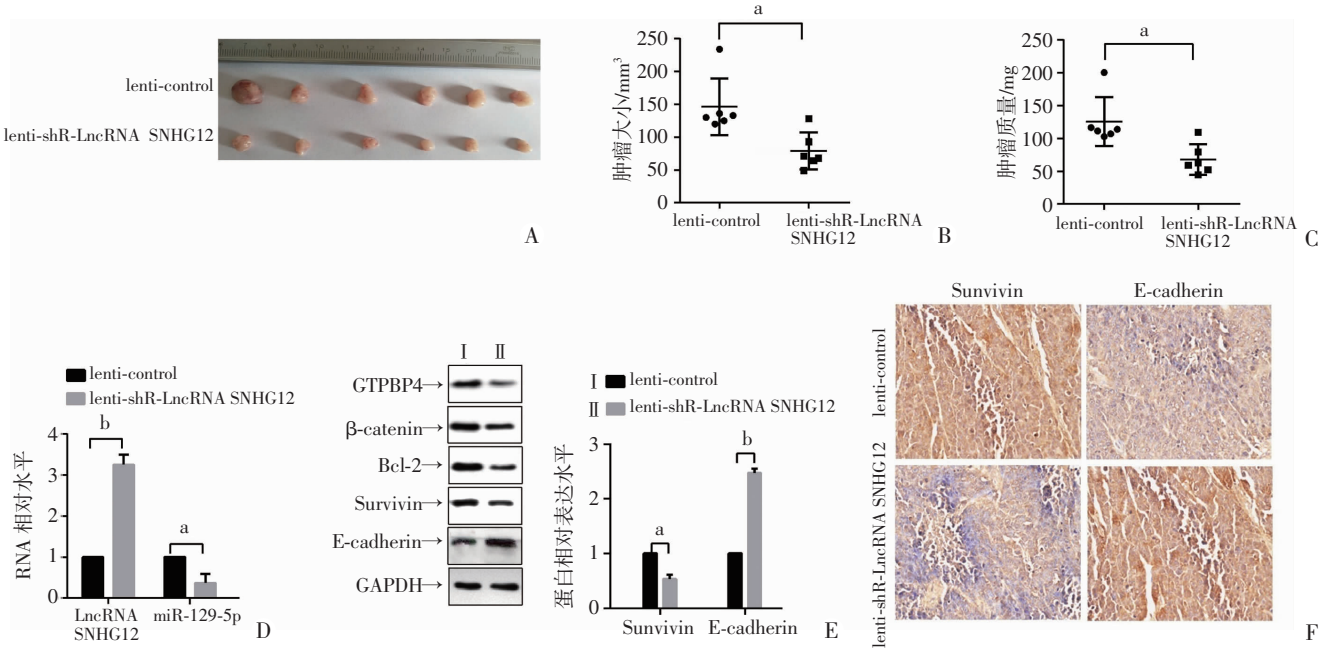
A:TargetScan 7.1 预测 GTPBP4 的 3′UTR 中 miR-129-5p 靶向序列。miR-129-5p 的野生型(wt)靶向序列和包含了 6 个改造后核苷酸(GTPBP4 3′UTR-变异)的变异型(mut)。;B:荧光素酶实验检测验证 GTPBP4 是 miR-129-5p 的一个靶向目标;C:RT-qPCR 检测 miR-129-5p 模拟物影响内源性 GTPBP4 mRNA 的水平;D:Western blot 检测 miR-129-5p 模拟物影响内源性 GTPBP4 的蛋白水平;E:Western blot 检测 10 对 HCC 和相邻正常组织中的 GTPBP4 表达;F:IHC 分析 HCC 和邻近正常组织中 GTPBP4 的表达(×200);G:RT-qPCR 测定 90 对 HCC 和正常相邻组织中的 GTPBP4 mRNA 水平;H:GTPBP4 mRNA 和 miR-129-5p 表达水平之间的相关分析;I:Western blot 检测肝癌细胞中的 GTPBP4 表达;J:Western blot 检测共转染 miR-129-5p 模拟物抵消了 LncRNA SNHG12 在肝癌细胞诱导的 GTPBP4 上调作用 a:$P<0.05$;b:$P<0.001$;c:$P<0.01$;d:$P<0.0001$,NS:差异无统计学意义

图 6 LncRNA SNHG12 通过 miR-129-5p 促进肝癌细胞中 GTPBP4 的表达



A:RT-qPCR 检测肝癌细胞中的 GTPBP4 过表达以及敲除效应;B、C:MTT 和集落形成实验分别检测细胞活性与增殖能力;D~F:Transwell 和划痕愈合实验分别评估肝癌细胞的侵袭与迁移(×100) a: $P<0.001$;b: $P<0.01$; c: $P<0.05$

图 7 GTPBP4 促进 HCC 的细胞增殖与侵袭



A~C:LncRNA SNHG12 下调抑制 HCC 肿瘤生长;D:RT-qPCR 检测异种移植肿瘤中 LncRNA SNHG12、miR-129-5p 的表达;E、F:Western blot 和 IHC 实验检测异种移植肿瘤中 GTPBP4、Survivin 蛋白、E-钙黏蛋白的蛋白表达水平(×200)
a: $P<0.01$; b: $P<0.001$

图 8 LncRNA SNHG12 通过 miR-129-5p/GTPBP4 促进体内 HCC 生长

3 讨论

LncRNA 通常以转录或转录后方式调节关键基因的表达,包括致癌基因和肿瘤抑制基因,进而发挥生物学作用[10]。其可能充当竞争性内源 RNA(competing endogenous RNA,ceRNA)来海绵化(sponging)microRNA(miRNA),从而影响 miRNA 的靶向基因表达[11]。本研究我们对 HCC 进展中 LncRNA SNHG12 所起的作用展开了研究。发现 LncRNA SNHG12 的表达在原发性 HCC 组织和肝癌细胞系中表达上调,这与 TCGA 以及 RNA 测序数据分析的结果一致[8-9]。我们发现 LncRNA SNHG12 充当了致癌的 LncRNA,其可促进肝癌细胞活性、增殖、迁移与侵袭。机制上,我们发现 LncRNA SNHG12 可作为一种分子海绵,与 miR-129-5p 竞争性结合,从而缓解 miR-129-5p 对 GTPBP4 表达的抑制作用,最终促进 HCC 的进展。

最近报道表明 LncRNA SNHG12 在癌症发生、发展的调控中扮演了重要的角色。例如,WANG 等[7]发现 LncRNA SNHG12 在宫颈癌中被上调,LncRNA SNHG12 默化能够抑制膀胱癌细胞的增殖与迁移,并诱导细胞周期停滞与凋亡。LI 等[5]报道称 LncRNA SNHG12 在胰腺癌中上调,它能够促进癌症细胞的生长与吉西他滨耐药,与 miR-188-3p 竞争性结合以及诱导 BRD4 能够机械地介导这一作用。此外,WANG 等[12]发现 LncRNA SNHG12 作为一种致癌 LncRNA,能够激活非小细胞肺癌(NSCLC)中的 JAK-STAT3 信号通道,促进细胞增殖,抑制细胞凋亡。LIU 等[6]报道称 LncRNA SNHG12 的上调与肾癌患者的整体生存率不高有关。尽管 TCGA 和 RNA 测序数据已经表明 LncRNA SNHG12 在 HCC 中被上调[8-9],但是至今还没有详细的实验数据来阐明 LncRNA SNHG12 在 HCC 发生中的作用机制。

通过对作为连接载体的 miR-129-5p 展开生物信息学分析,发现它能够靶向作用于 LncRNA SNHG12 和 GTPBP4 的 3′-UTR。报道称 miR-129-5p 可能通过靶向作用于 Survivin 蛋白来抑制肝癌细胞的增殖[13]。LI 等[14]发现 miR-129-5p 可能通过激活 TGF-β/Smad 信号通道来促进 HCC 的转移。TAO 等[15]发现 miR-129-5p 可能通过靶向作用于 UBE3C 来抑制 HCC 的转移和上皮间充质转化。ZHANG 等[16]指出,miR-129-5p 靶向作用于 FZD7/Wnt 信号通道,抑制肝癌细胞的生长。我们研究发现,miR-129-5p 可能充当肿瘤抑制因子,抑制 HCC 的细胞活性、增殖、迁移及侵袭。

GTPBP4 在胃癌、结直肠癌中表达显著上调,与肿瘤侵袭转移相关[17-18]。乳腺癌 GTPBP4 表达量高者的生存期较短[19]。在本研究中,我们发现 GTPBP4 在

HCC 组织中表达上调,并在肝癌细胞中发挥了致瘤的作用。

综上,我们发现 LncRNA SNHG12 在 HCC 作为一种致癌基因可与 miR-129-5p 的竞争性结合,从而充当分子海绵,阻遏 miR-129-5p 对促肝癌基因 GTPBP4 表达的抑制作用。我们的研究结果为理解肝癌中 LncRNA SNHG12 的致瘤作用机制提供了实验基础,将可能有助于确认新的 HCC 生物标记以及潜在的靶向疗法目标。

参考文献:

[1] 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. DOI: 10.3322/caac.21660.

[2] PINATO D J, GUERRA N, FESSAS P, *et al*. Immune-based therapies for hepatocellular carcinoma[J]. Oncogene, 2020, 39(18):3620-3637. DOI: 10.1038/s41388-020-1249-9.

[3] GOODALL G J, WICKRAMASINGHE V O. RNA in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2021,21(1):22-36. DOI: 10.1038/s41568-020-00306-0.

[4] HUANG Z, ZHOU J K, 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.

[5] LI Z R, YANG Q, ZHOU T,*et al*. Prognostic value of long noncoding RNA SNHG12 in various carcinomas: A meta-analysis[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 8847401. DOI: 10.1155/2020/8847401. eCollection 2020.

[6] LIU Y, CHENG G, HUANG Z, *et al*. Long noncoding RNA SNHG12 promotes tumour progression and sunitinib resistance by upregulating CDCA3 in renal cell carcinoma[J]. Cell Death Dis, 2020, 8; 11(7): 515. DOI: 10.1038/s41419-020-2713-8.

[7] WANG C, SHAO S, DENG L,*et al*. LncRNA SNHG12 regulates the radiosensitivity of cervical cancer through the miR-148a/CDK1 pathway[J]. Cancer Cell Int, 2020, 20(1): 554. DOI: 10.1186/s12935-020-01654-5.

[8] ZHANG C, REN X, ZHANG W, *et al*. Prognostic and clinical significance of long non-coding RNA SNHG12 expression in various cancers[J]. Bioengineered, 2020, 11(1): 1112-1123. DOI: 10.1080/21655979.2020.1831361.

[9] ZHANG J J, LOU W Y. A key mRNA-miRNA-lncRNA competing endogenous RNA triple sub-network linked to diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. Front Oncol, 2020, 10: 340. DOI:10.3389/fonc.2020.00340.

[10] PANNI S, LOVERING R C, PORRAS P, *et al*. Non-coding RNA regulatory networks[J]. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech, 2020, 1863(6): 194417. DOI: 10.1016/j.bbagrm.2019.194417.

[11] ZHAO Z, SUN W, GUO Z, *et al*. Mechanisms of lncRNA/microRNA interactions in angiogenesis[J]. Life Sci, 2020, 254: 116900. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.116900.

[12] WANG P , CHEN D, MA H, *et al*. LncRNA SNHG12 contributes to multidrug resistance through activating the MAPK/Slug pathway by sponging miR-181a in non-small cell lung cancer[J]. Oncotarget, 2017, 8(48): 84086-84101. DOI: 10.18632/oncotarget.20475.

[13] LIU Z, SUN J, WANG X,*et al*. MicroRNA-129-5p promotes proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma by regulating the BMP2 gene[J]. Exp Ther Med, 2021, 21(3): 257. DOI: 10.3892/etm.2021.9688.

[14] LI Z, LU J, ZENG G,*et al*. MiR-129-5p inhibits liver cancer growth by targeting calcium calmodulin-dependent protein kinase IV (CAMK4)[J]. Cell Death Dis, 2019 ,10(11): 789. DOI: 10.1038/s41419-019-1923-4.

[15] TAO J, LIU Z, WANG Y, *et al*. MiR-129-5p inhibits metastasis and epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma by targeting UBE3C[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 93: 420-428. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.06.070.

[16] ZHANG X, XU S, HU C,*et al*. LncRNA ST8SIA6-AS1 promotes hepatocellular carcinoma progression by regulating MAGEA3 and DCAF4L2 expression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 533(4): 1039-1047. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.09.115.

[17] LI L, PANG X, ZHU Z, *et al*. GTPBP4 Promotes Gastric Cancer Progression via Regulating P53 Activity[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 45(2): 667-676. DOI: 10.1159/000487160.

[18] YU H, JIN S, ZHANG N, *et al*. Up-regulation of GTPBP4 in colorectal carcinoma is responsible for tumor metastasis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 480(1):48-54. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.10.010.

[19] LUNARDI A, DI MININ G, PROVERO P, *et al*. A genome-scale protein interaction profile of Drosophila p53 uncovers additional nodes of the human p53 network[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(14): 6322-6327. DOI: 10.1073/pnas.1002447107.

(**收稿**:2021-01-18;**修回**:2021-05-06)

(编辑 邓强庭)