

LncRNA-HULC靶向miR-597/Rab23分子轴影响 肝癌细胞生物学特性的机制研究

王鑫澳 代扬 刘君瑞 董钦鹏 刘家铭 吴玉昊 李恒平*

(湖北医药学院附属襄阳市第一人民医院普外科, 襄阳 441100)

摘要 该文旨在探讨长链非编码RNA(LncRNA)-肝癌高表达基因(HULC)靶向微小RNA-597(miR-597)/Ras相关蛋白23(Rab23)分子轴影响肝细胞癌(HCC)细胞生物学特性的机制。以湖北医药学院附属襄阳市第一人民医院就诊的罹患HCC的76例患者为研究对象, qRT-PCR检测HCC患者组织中LncRNA-HULC、miR-597及Rab23表达水平; 并分析上述基因的表达水平与HCC的临床相关性; 生物信息学方法和双荧光素酶报告实验分析LncRNA-HULC、miR-597、Rab23信号轴的相互作用机制。以HCC细胞HepG2为研究对象, 将其分为si-NC组、si-HULC组、si-HULC+anti-NC组、si-HULC+anti-miR-597组, 分别采用CCK8、Transwell实验、流式细胞仪检测各组HepG2细胞的增殖、迁移、侵袭和凋亡情况; 采用Western blot检测HepG2细胞中Ki67、Caspase-3、Caspase-9、Rab23蛋白的表达情况。结果发现, HCC组织中LncRNA-HULC、Rab23的表达水平高于癌旁组织, miR-597的表达水平低于癌旁组织($P<0.05$), 且其表达情况与患者的TNM分期、分化程度等临床病理特征相关($P<0.05$)。LncRNA-HULC靶向负调控miR-597, miR-597靶向负调控Rab23。si-HULC组LncRNA-HULC、Rab23 mRNA、增殖率、迁移数、侵袭数、Ki67蛋白、Rab23蛋白的表达水平低于si-NC组, miR-597、凋亡率、Caspase-3蛋白、Caspase-9蛋白的表达水平高于si-NC组($P<0.05$); 与si-HULC组、si-HULC+anti-NC组比较, si-HULC+anti-miR-597组中miR-597、凋亡率、Caspase-3蛋白、Caspase-9蛋白表达水平降低($P<0.05$), Rab23 mRNA、增殖率、迁移数、侵袭数、Ki67蛋白、Rab23蛋白表达水平升高($P<0.05$)。沉默LncRNA-HULC可能抑制肝癌细胞生物学特性, 其机制可能是通过靶向miR-597/Rab23分子轴实现的。

关键词 长链非编码RNA; 肝癌高表达基因; 微小RNA-597; Ras相关蛋白23; 肝癌; 生物学特性

Mechanism of LncRNA-HULC in Affecting the Biological Characteristics of Liver Cancer Cells by Targeting the miR-597/Rab23 Molecular Axis

WANG Xinao, DAI Yang, LIU Junrui, DONG Qinpeng, LIU Jiaming, WU Yuhao, LI Hengping*

(Department of General Surgery, the First People's Hospital of Xiangyang, Hubei University of Medicine, Xiangyang 441100, China)

Abstract The aim of this study is to investigate the mechanism by which LncRNA (long non-coding RNA)-HULC (highly up-regulated in liver cancer) affects the biological characteristics of HCC (hepatocellular carcinoma) cells by targeting miR-597 (microRNA-597)/Rab23 (Ras related protein 23) molecular axis. A total of 76 patients with HCC who were admitted to the First People's Hospital of Xiangyang, Hubei University of Medicine as the study subjects. QRT-PCR was applied to detect the expression levels of LncRNA-HULC, miR-597, and Rab23 in HCC patient tissues, and the expression of the aforementioned genes was analyzed for their clinical correlation with

收稿日期: 2024-03-15

接受日期: 2024-05-29

*通信作者: Tel: 13972097186, E-mail: h73cgp@163.com

Received: March 15, 2024

Accepted: May 29, 2024

*Corresponding author. Tel: +86-13972097186, E-mail: h73cgp@163.com

liver cancer. Bioinformatics methods and dual luciferase reporter experiments were applied to analyze the interaction mechanisms of LncRNA-HULC, miR-597, and Rab23 signaling axes. HepG2 HCC cells were studied and separated into si-NC group, si-HULC group, si-HULC+anti-NC group, and si-HULC+anti-miR-597 group. CCK8, Transwell assay, and flow cytometry were applied to detect the proliferation, migration, invasion, and apoptosis of HepG2 cells in each group. Western blot was applied to detect the expression of Ki67, Caspase-3, Caspase-9, and Rab23 proteins in HepG2 cells. The expression of LncRNA-HULC and Rab23 in HCC tissue was higher than that in adjacent tissues, while the expression of miR-597 was lower than that in adjacent tissues ($P<0.05$), and their expression was correlated with clinical and pathological features such as TNM stage and differentiation degree of patients ($P<0.05$). LncRNA-HULC targeted and negatively regulated miR-597, while miR-597 targeted and negatively regulated Rab23. The LncRNA-HULC, *Rab23* mRNA, proliferation rate, migration number, invasion number, and the expression levels of Ki67 protein and Rab23 protein in the si-HULC group were lower than those in the si-NC group, and the miR-597, apoptosis rate, and the expression levels of Caspase-3 protein and Caspase-9 protein were higher than those in the si-NC group ($P<0.05$). Compared with the si-HULC group and si-HULC+anti-NC group, the miR-597 mRNA, apoptosis rate, and the expression levels of Caspase-3 protein and Caspase-9 protein in the si-HULC+anti-miR-597 group were lower ($P<0.05$), the *Rab23* mRNA, proliferation rate, migration number, invasion number, and the expression levels of Ki67 protein and Rab23 protein were higher ($P<0.05$). In summary, silencing LncRNA-HULC may inhibit the biology of liver cancer cells, which may be achieved by targeting the miR-597/Rab23 molecular axis.

Keywords long non coding RNA; highly up-regulated in liver cancer; micro RNA-597; Ras related protein 23; liver cancer; biological characteristics

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是肝脏恶性肿瘤的主要形式,在慢性肝病患者中患病率最高,其发病率在过去30年中呈上升的趋势,预计到2025年有100万人罹患肝癌^[1]。原发HCC的5年生存率为32.6%,而局部性和转移性HCC的5年生存率分别为10.8%和2.4%^[2]。因此,充分阐明HCC的发病机制,对治疗方法的确定和预后的改善具有重要意义。长链非编码RNA(long non coding RNA, LncRNA)、微小RNA(microRNA, miRNA)同是表观遗传调节因子,属于非编码RNA,负责多种细胞信号通路的调节,在肿瘤的治疗和预后中发挥重要作用^[3]。肝癌高表达基因(highly up-regulated in liver cancer, *HULC*)在2007年首次被报道其于HCC中显著上调,随后研究证实其在胰腺癌、结肠癌、膀胱癌等多种肿瘤中高表达,进而加剧肿瘤发展^[4]。相关研究表明,miR-597在HCC中的下调与HCC的恶性生物学行为有关^[5]。Ras相关蛋白23(Ras related protein 23, *Rab23*)存在于脑、肝、卵巢等组织中,参与各种生理病理过程,相关研究发现肝组织*Rab23* mRNA和蛋白低表达的HCC患者较*Rab23*高表达的HCC患者有更好的生存趋势,在HCC细胞系中敲低*Rab23*可抑制HCC的疾病进展^[6]。本研究前期通过Starbase网站发现LncRNA-HULC与miR-597、

miR-597与*Rab23*之间存在结合位点,推测LncRNA-HULC可能靶向miR-597/*Rab23*分子轴影响HCC的发展。因此,本研究探讨LncRNA-HULC对HCC细胞生物学行为和miR-597/*Rab23*分子轴的影响,为HCC的靶向治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 HCC癌组织样本收集

回顾性选取2022年1月~2023年6月在湖北医药学院附属襄阳市第一人民医院手术的76例HCC患者癌组织和癌旁组织作为研究对象。所纳入标准:(1)符合HCC诊断标准^[7];(2)术中成功获取HCC及癌旁组织标本并保存完整。排除标准:(1)肝脏手术史患者;(2)其他部位恶性肿瘤;(3)病例资料不完整者;(4)自身免疫性疾病者。本研究经湖北医药学院附属襄阳市第一人民医院医学伦理委员会批准(第XYYYE20230082号)。收集所有HCC患者年龄、性别、肿瘤直径、TNM分期、分化程度等临床基本资料。

1.2 主要试剂与仪器

HCC细胞HepG2(orb413151)购自武汉博欧特生物科技有限公司;Trizol试剂、逆转录试剂盒、荧光定量PCR试剂盒(abs60154、abs60267、abs60305)购

自爱必信生物科技有限公司; 细胞增殖-毒性检测试剂盒(CK04-500T)购自北京博雷德生物科技有限公司; 细胞凋亡试剂盒(CM001-25D)购自武汉青木生物技术有限公司; si-HULC(439077)购自美国Thermo Fisher Scientific公司; anti-miR-597(CIH2069)购自广州威佳科技有限公司; HRP、Ki67、Caspase-3、Caspase-9、Rab23、GAPDH(ab6734、ab92742、ab184787、ab32539、ab192420、ab59164)购自英国Abcam公司; 全自动多功能酶标仪(TMR-100)购自上海净信实业发展有限公司; 实时荧光定量PCR仪(ABI 7500)购自美国ABI公司; 基因引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 qRT-PCR法检测LncRNA-HULC、miR-597、Rab23的表达情况 使用Trizol试剂从HCC癌组织和癌旁组织中分离提取总RNA, 根据逆转录试剂盒合成cDNA, 进行实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR)。LncRNA-HULC(ID: NC_000006.12)、Rab23(ID: NC_000006.12)以GAPDH(ID: NC_000012.12)作为内参, miR-597(ID: NC_000008.11)以U6(ID: NC_000015.10)作为内参, 根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算LncRNA-HULC、miR-597、Rab23的相对表达量。引物序列见表1。

1.3.2 双荧光素酶报告基因实验 构建miR-597靶向序列的HULC野生型报告载体(HULC-WT)和结合位点突变载体(HULC-MUT), 将Rab23野生型报告载体(Rab23-WT)和结合位点突变载体(Rab23-MUT)克隆至pMIR-REPORT载体上, 然后分别与miR-597 mimic或mimic-NC一起被转染到HepG2细胞中, 24 h后检测荧光素酶活性。

1.3.3 细胞转染 将HepG2细胞随机分为si-NC组、si-HULC组、si-HULC+anti-NC组、si-HULC+anti-

miR-597组, 每组设置6个复孔, 按1.3.1方法检测各组HepG2细胞中LncRNA-HULC、miR-597、Rab23的表达情况。

1.3.4 CCK8检测HepG2细胞的迁移和侵袭情况 将HepG2细胞以 2.0×10^3 个/孔的密度接种于96孔板中, 在37 °C下分别孵育24、48、72 h, 然后每孔加入10 μ L CCK8溶液, 37 °C孵育2 h, 然后在450 nm处测量吸光度(D_{450})值。

1.3.5 Transwell实验检测HepG2细胞的迁移和侵袭情况 迁移实验: 将转染后的HepG2细胞重悬于无血清培养基中, 调整浓度为 1×10^4 个/100 μ L并将其接种于24-Transwell无包膜板的上室, 进行迁移实验, 在下室中加入700 μ L含10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的生长培养基作为趋化剂, 在37 °C培养箱中孵育24 h后, 在室温下用0.1%结晶紫染色10 min。在显微镜下拍摄代表性视野并计算迁移数。侵袭实验: 上室含matrigel涂层, 其余操作同迁移实验。

1.3.6 流式细胞仪检测HepG2细胞的凋亡 取200 μ L的 2×10^6 个HepG2细胞重悬液与凋亡缓冲液混合, 加入Annexin V-AP(5 μ L)和PI (5 μ L), 室温避光染色15 min, 再用800 μ L的凋亡缓冲液重悬细胞, 调整终体积为1 mL, 取200 μ L细胞悬液转移至96孔板, 流式细胞仪检测HepG2细胞的凋亡率。

1.3.7 Western blot检测HepG2细胞中Ki67、Caspase-3、Caspase-9、Rab23蛋白的表达情况 用SDS-PAGE分离HepG2细胞蛋白并转移到PVDF膜, 将一抗[Ki67(1:5 000)、Caspase-3(1:2 000)、Caspase-9(1:1 000)、Rab23(1:1 000)]与膜在4 °C孵育过夜。然后, 与二抗(1:1 000)室温孵育2 h, 通过增强化学发光产生印迹。以GAPDH(1:2 000)作为内参。使用ImageJ测量条带强度进行定量比较。

1.4 统计与分析

所有数据均采用SPSS 25.0软件进行分析, 计量

表1 qRT-PCR引物序列
Table 1 qRT-PCR primer sequence

基因 Gene	上游引物(5'→3') Forward primer (5'→3')	下游引物(5'→3') Reverse primer (5'→3')
LncRNA-HULC	CTG GCA ATA AAC TAA GCA	CAA CAT AAT TCA GGG AGAA
miR-597	ACA CTC CAG CTG GG	TGG TGT CGT GGA GTC G
Rab23	GAA AGT GCT TCG AAA GCG A	TCG CCG AAG TAC TTG TGG C
U6	GCT GGA CTC TAG GGT GCA AG	GAG CAT ACC AGG TGG TAG TAG
GAPDH	GAA GGT GAA GGT CGG AGT CA	AAT GAA GGG GTC ATT GAT GG

资料(LncRNA-HULC、miR-597表达等)以($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间比较行 t 检验, 多组间比较行单因素方差分析, 进一步两两比较行 SNK- q 检验; 计数资料(TNM 分期、分化程度等)以 $n(\%)$ 表示, 组间比较行 χ^2 检验; $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HCC组织和癌旁组织中LncRNA-HULC、miR-597、Rab23的表达情况

HCC组织 LncRNA-HULC、Rab23 表达水平高于癌旁组织, miR-597 表达水平低于癌旁组织 ($P < 0.05$) (表2)。

2.2 HCC组织中LncRNA-HULC、miR-597、Rab23表达与临床病理特征的关系

以HCC组织LncRNA-HULC、miR-597、Rab23

表达的平均值2.18、0.55、1.69为界限, 将HCC患者分为LncRNA-HULC高表达组40例, miR-597高表达组37例, Rab23高表达组38例。LncRNA-HULC及Rab23 mRNA高表达率患者中III+IV患者显著多于I+II患者, 分化程度为低+中患者显著高于高分化患者 ($P < 0.05$); Rab23高表达率患者中III+IV患者显著低于I+II患者, 分化程度为低+中患者显著低于高分化患者 ($P < 0.05$) (表3)。

2.3 双荧光素酶报告实验检测LncRNA-HULC靶向miR-597/Rab23分子轴

Starbase网站预测显示, LncRNA-HULC与miR-597、miR-597和Rab23有靶向结合位点(表4和5)。在转染HULC-WT的细胞中, miR-597 mimic的荧光素酶活性降低 ($P < 0.05$); 在转染Rab23-WT的细胞中, miR-597 mimic的荧光素酶活性降低

表2 LncRNA-HULC、miR-597、Rab23在组织中的表达情况
Table 2 Expressions of LncRNA-HULC, miR-597 and Rab23 in tissues

组织 Tissue	LncRNA-HULC	miR-597	Rab23
Adjacent	0.99±0.29	1.02±0.17	1.00±0.33
HCC	2.18±0.32 ^a	0.55±0.15 ^a	1.69±0.35 ^a

$\bar{x} \pm s$; $n=76$; ^a $P < 0.05$, 与癌旁组织比较。

$\bar{x} \pm s$; $n=76$; ^a $P < 0.05$ compared with adjacent tissue.

表3 HCC组织中LncRNA-HULC、miR-597、Rab23表达与临床病理特征的关系

Table 3 Relationship between expressions of LncRNA-HULC, miR-597, Rab23 and clinicopathological features in HCC tissues

临床病理特征 Clinicopathologic feature	例数 n	LncRNA-HULC高表达 ($n=40$) High expression of LncRNA-HULC ($n=40$)	χ^2	P	miR-597高表达 ($n=37$) High expression of miR-597 ($n=37$)	χ^2	P	Rab23高表达 ($n=38$) High expression of Rab23 ($n=38$)	χ^2	P
Age (years)										
<55	34	16 (47.06%)	0.766	0.381	20 (58.82%)	2.532	0.112	14 (41.18%)	1.916	0.166
≥55	42	24 (57.14%)			17 (40.48%)			24 (57.14%)		
Gender										
Male	44	26 (59.09%)	1.749	0.186	18 (40.91%)	2.529	0.112	23 (52.27%)	0.216	0.642
Female	32	14 (43.75%)			19 (59.38%)			15 (46.88%)		
Diameter of tumor (cm)										
<5	47	21 (44.68%)	3.123	0.077	25 (53.19%)	1.002	0.317	20 (42.55%)	2.732	0.098
≥5	29	19 (65.52%)			12 (41.38%)			18 (62.07%)		
TNM										
I+II	40	15 (37.50%)	7.755	0.005	27 (67.50%)	11.967	0.001	12 (30.00%)	13.511	0.000
III+IV	36	25 (69.44%)			10 (27.78%)			26 (72.11%)		
Differentiated degree										
High	39	13 (33.33%)	11.967	0.001	26 (66.67%)	10.369	0.001	13 (33.33%)	8.901	0.003
Low+middle	37	27 (72.97%)			11 (29.73%)			25 (67.57%)		

$n=76$.

($P<0.05$)(表6)。

2.4 沉默LncRNA-HULC对HepG2细胞中LncRNA-HULC、miR-597、Rab23表达的影响

si-HULC组 LncRNA-HULC、Rab23表达水平低于 si-NC组, miR-597表达水平高于 si-NC组, ($P<0.05$); 与 si-HULC组、si-HULC+anti-NC组相比, si-HULC+anti-miR-597组中 miR-597表达水平降低 ($P<0.05$), Rab23表达水平升高 ($P<0.05$)(表7)。这表明沉默 LncRNA-HULC和抑制 miR-597载体转染成功。

2.5 LncRNA-HULC靶向miR-597/Rab23分子轴对HepG2细胞增殖的影响

si-HULC组的增殖率低于 si-NC组 ($P<0.05$); 与 si-HULC组、si-HULC+anti-NC组比较, si-HULC+anti-miR-597组增殖率升高 ($P<0.05$)(表8)。这表明沉默 LncRNA-HULC可以抑制 HepG2细胞的增殖, 而抑制 miR-597则可以逆转其沉默 LncRNA-HULC的抑制作用。

2.6 LncRNA-HULC靶向miR-597/Rab23分子轴对HepG2细胞迁移和侵袭的影响

si-HULC组的迁移数、侵袭数低于 si-NC组

表4 LncRNA-HULC与miR-597的结合位点
Table 4 Binding sites of LncRNA-HULC and miR-597

基因 Gene	序列 Sequence
LncRNA-HULC	aac acg acg agc aca uUC CG UCU g
miR-597	aua aac gua ggg guc AGG ACC Au

大写代表结合位点。
Uppercase represents the binding site.

表5 miR-597与Rab23的结合位点
Table 5 Binding sites of miR-597 and Rab23

基因 Gene	序列 Sequence
Rab23	uaa aaa uac aug uua AGA ACC Aa
miR-597	ugc gaa cuc ggu guu cUC UUG Gu

大写代表结合位点。
Uppercase represents the binding site.

表6 荧光素酶活性比较
Table 6 Comparison of luciferase activities

组别 Group	HULC-WT	HULC-MUT	Rab23-WT	Rab23-MUT
mimic-NC	1.03±0.12	1.00±0.33	0.98±0.15	1.01±0.31
miR-597 mimic	0.28±0.09 ^a	1.02±0.34	0.42±0.013 ^a	1.04±0.35

$\bar{x}\pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$, 与mimic-NC组比较。
 $\bar{x}\pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$ compared with mimic-NC group.

表7 各组HepG2细胞中LncRNA-HULC、miR-597、Rab23表达比较
Table 7 Comparison of LncRNA-HULC, miR-597 and Rab23 expression in HepG2 cells of all groups

组别 Group	LncRNA-HULC	miR-597	Rab23
si-NC	1.00±0.17	1.01±0.33	0.99±0.22
si-HULC	0.46±0.15 ^a	1.98±0.38 ^a	0.55±0.18 ^a
si-HULC+anti-NC	0.44±0.14	1.96±0.38	0.53±0.17
si-HULC+anti-miR-597	0.43±0.14	1.13±0.35 ^{bc}	0.84±0.20 ^{bc}

$\bar{x}\pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$, 与si-NC组比较; ^b $P<0.05$, 与si-HULC组比较; ^c $P<0.05$, 与si-HULC+anti-NC组比较。
 $\bar{x}\pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$ compared with si-NC group; ^b $P<0.05$ compared with si-HULC group; ^c $P<0.05$ compared with si-HULC+anti-NC group.

表8 LncRNA-HULC靶向miR-597/Rab23分子轴对HepG2细胞增殖的影响

Table 8 Effects of LncRNA-HULC targeting miR-597/Rab23 molecular axis on proliferation of HepG2 cells

组别 Group	D_{450}		
	24 h	48 h	72 h
si-NC	1.17±0.16	1.29±0.18	1.41±0.25
si-HULC	0.43±0.13 ^a	0.56±0.16 ^a	0.68±0.22 ^a
si-HULC+anti-NC	0.41±0.13	0.54±0.16	0.67±0.22
si-HULC+anti-miR-597	0.96±0.15 ^{bc}	1.07±0.17 ^{bc}	1.23±0.24 ^{bc}

$\bar{x} \pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$, 与si-NC组比较; ^b $P<0.05$, 与si-HULC组比较; ^c $P<0.05$, 与si-HULC+anti-NC组比较。

$\bar{x} \pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$ compared with si-NC group; ^b $P<0.05$ compared with si-HULC group; ^c $P<0.05$ compared with si-HULC+anti-NC group.

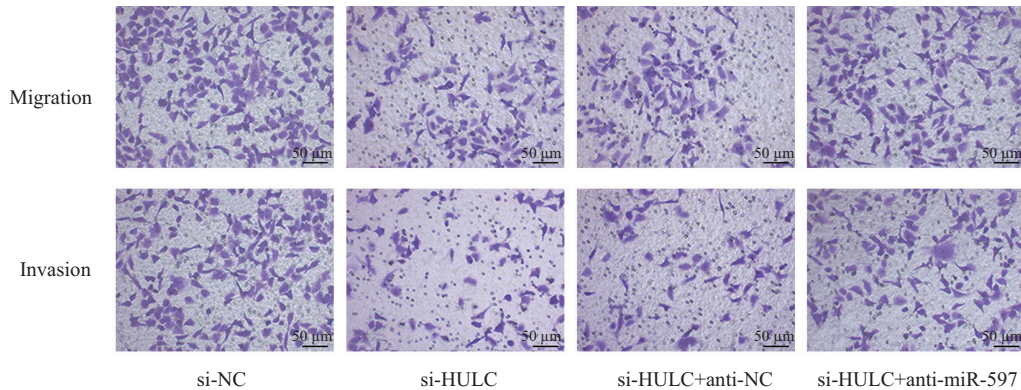


图1 Transwell实验检测HepG2细胞的迁移和侵袭情况

Fig.1 Migration and invasion of HepG2 cells were detected by Transwell assay

表9 LncRNA-HULC靶向miR-597/Rab23分子轴对HepG2细胞迁移和侵袭的影响

Table 9 Effects of LncRNA-HULC targeting miR-597/Rab23 molecular axis on migration and invasion of HepG2 cells

组别 Group	迁移数 Migration number	侵袭数 Invasion number
si-NC	141.65±14.86	128.75±12.93
si-HULC	88.79±12.63 ^a	65.82±10.36 ^a
si-HULC+anti-NC	87.41±12.48	64.33±10.17
si-HULC+anti-miR-597	118.74±13.75 ^{bc}	102.51±11.74 ^{bc}

$\bar{x} \pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$, 与si-NC组比较; ^b $P<0.05$, 与si-HULC组比较; ^c $P<0.05$, 与si-HULC+anti-NC组比较。

$\bar{x} \pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$ compared with si-NC group; ^b $P<0.05$ compared with si-HULC group; ^c $P<0.05$ compared with si-HULC+anti-NC group.

($P<0.05$); 与 si-HULC组、si-HULC+anti-NC组比较, si-HULC+anti-miR-597组迁移数、侵袭数升高($P<0.05$)(图1和表9)。这表明沉默LncRNA-HULC可以抑制HepG2细胞的迁移和侵袭, 而抑制miR-597则可以逆转沉默LncRNA-HULC对迁移和侵袭的抑制作用。

2.7 LncRNA-HULC靶向miR-597/Rab23分子轴对HepG2细胞凋亡的影响

si-HULC组凋亡率高于si-NC组($P<0.05$); 与 si-HULC组、si-HULC+anti-NC组比较, si-HULC+anti-miR-597组凋亡率降低($P<0.05$)(图2和表10)。这表明沉默LncRNA-HULC可以促进HepG2细胞的凋亡,

而抑制miR-597则抑制细胞的凋亡。

2.8 各组HepG2细胞Ki67、Caspase-3、Caspase-9、Rab23蛋白表达水平比较

si-HULC组 Ki67、Rab23蛋白表达水平低于 si-NC组, Caspase-3、Caspase-9表达水平高于 si-NC组($P<0.05$); 与 si-HULC组、si-HULC+anti-NC组比较, si-HULC+anti-miR-597组中 Ki67、Rab23蛋白表达水平升高, Caspase-3、Caspase-9表达水平降低($P<0.05$)(图3和表11)。

3 讨论

HCC的发生和进展涉及慢性病毒性肝炎、非

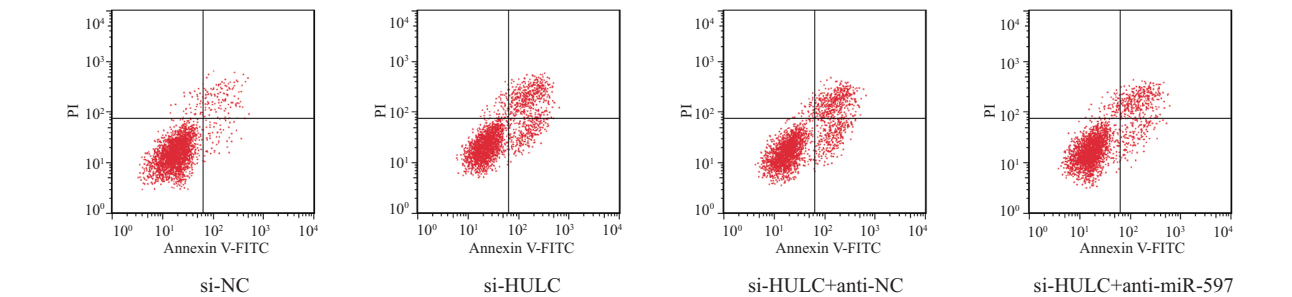


图2 流式细胞仪检测HepG2细胞的凋亡率

Fig.2 Apoptosis rate of HepG2 cells was detected by flow cytometry

表10 LncRNA-HULC靶向miR-597/Rab23分子轴对HepG2细胞凋亡的影响	
Table 10 Effects of LncRNA-HULC targeting miR-597/Rab23 molecular axis on apoptosis of HepG2 cells	
组别 Group	凋亡率/% Apoptosis rate /%
si-NC	1.97±0.63
si-HULC	35.68±3.72 ^a
si-HULC+anti-NC	33.72±3.69
si-HULC+anti-miR-597	18.95±2.85 ^{bc}

$\bar{x}\pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$, 与si-NC组比较; ^b $P<0.05$, 与si-HULC组比较; ^c $P<0.05$, 与si-HULC+anti-NC组比较。
 $\bar{x}\pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$ compared with si-NC group; ^b $P<0.05$ compared with si-HULC group; ^c $P<0.05$ compared with si-HULC+anti-NC group.

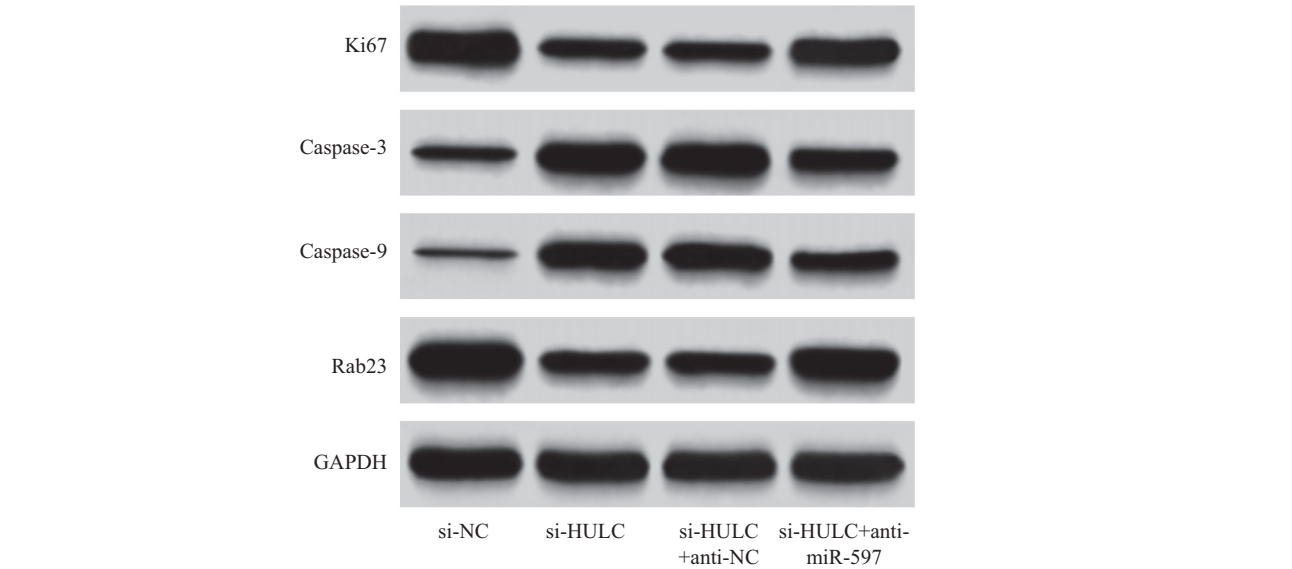


图3 Western blot检测HepG2细胞中Ki67、Caspase-3、Caspase-9、Rab23蛋白表达情况

Fig.3 Western blot analysis of Ki67, Caspase-3, Caspase-9 and Rab23 protein expression in HepG2 cells

表11 各组HepG2细胞中Ki67、Caspase-3、Caspase-9、Rab23蛋白表达比较				
Table 11 Comparison of Ki67, Caspase-3, Caspase-9 and Rab23 protein expressions in HepG2 cells of each group				
组别 Group	Ki67	Caspase-3	Caspase-9	Rab23
si-NC	1.28±0.18	0.32±0.10	0.24±0.08	1.36±0.27
si-HULC	0.57±0.14 ^a	1.18±0.15 ^a	1.07±0.12 ^a	0.72±0.23 ^a
si-HULC+anti-NC	0.54±0.13	1.16±0.14	1.05±0.12	0.68±0.22
si-HULC+anti-miR-597	0.96±0.17 ^{bc}	0.62±0.13 ^{bc}	0.54±0.10 ^{bc}	1.15±0.25 ^{bc}

$\bar{x}\pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$, 与si-NC组比较; ^b $P<0.05$, 与si-HULC组比较; ^c $P<0.05$, 与si-HULC+anti-NC组比较。
 $\bar{x}\pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$ compared with si-NC group; ^b $P<0.05$ compared with si-HULC group; ^c $P<0.05$ compared with si-HULC+anti-NC group.

病毒性肝炎、长期饮酒、某些疾病状态、食用受毒素污染的主食等若干危险因素,在亚洲,慢性乙型肝炎病毒感染是HCC的主要病因^[8]。由于HCC发病隐匿且缺乏特异性早期标志物,HCC的早期诊断和有效治疗仍然是一个挑战,大多数患者无症状,临床表现出现在疾病晚期,导致患者的预后较差^[9]。因此,确定可能涉及HCC进展的分子机制,以找到替代治疗策略至关重要。

miRNA长约22个核苷酸,lncRNA长度是miRNA的8~10倍,两者均可作为调节因子,通过调控基因的表达来控制生物学过程,lncRNA还可以作为miRNA海绵,从而抑制miRNA对mRNA的调控^[10]。据报道,上调LncRNA-HULC在体外和体内可促进HCC细胞的恶性生物学行为,并可通过靶向miRNA和mRNA来调节下游基因表达^[11]。YAN等^[12]发现,HepG2细胞株LncRNA-HULC表达水平明显升高,LncRNA-HULC通过miR-377-5p/HIF-1 α 通路,促进细胞的增殖和侵袭。董勇等^[13]发现,肿瘤相关巨噬细胞外泌体LncRNA-HULC通过激活Wnt信号通路,促进HCC细胞的侵袭和转移。GUAN等^[14]发现,下调LncRNA-HULC通过靶向miR-3200-5p/ATF4轴诱导肝癌细胞铁死亡和氧化应激,从而调控肝癌的发展。相关研究表明,miR-597-3p是一种抑癌基因。LI等^[15]发现,LncRNA LBX2-AS1通过靶向miR-597-3p上调BRD4的表达,促进骨肉瘤的生长并抑制其对JQ-1的敏感性。王媛等^[16]发现,下调miR-597-5p能逆转LINC00941低表达对神经胶质瘤细胞恶性生物学的影响。HU等^[5]发现,LncRNA GSTM3TV2通过miR-597/FOSL2轴促进HCC的细胞增殖和侵袭。相关研究表明,Ki67、Caspase-3、Caspase-9与HCC细胞的增殖、凋亡相关^[17]。本研究发现HCC组织LncRNA-HULC、Rab23高表达,miR-597低表达,且与患者的TNM分期、分化程度等临床病理特征相关,提示LncRNA-HULC、miR-597、Rab23可能在HCC患者中发挥重要作用,影响患者的临床特征。进一步通过Starbase网站发现LncRNA-HULC与miR-597之间存在结合位点,并通过双荧光素酶报告实验进一步验证,发现沉默LncRNA-HULC可以抑制HCC的细胞增殖、迁移、侵袭,促进细胞的凋亡,而沉默miR-597则能逆转LncRNA-HULC低表达对HCC细胞恶性生物学的表现。

Rab23在核内体膜运输中发挥重要作用,也是一

种致癌基因,在正常和癌症组织中的表达受到遗传和表观遗传因素的影响^[18]。WEI等^[19]发现,miR-367-3p能够通过靶向Rab23基因抑制Hedgehog通路,从而抑制前列腺癌细胞的增殖、侵袭/转移。LI等^[20]发现,过表达miR-362-3p可以抑制Rab23的表达,从而抑制HCC细胞在体内的生长和增殖。WEN等^[21]发现,miR-597-3p可靶向抑制Rab23的表达,降低甲状腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移水平。本研究通过生物信息学发现并经双荧光素酶报告实验验证miR-597与Rab23之间存在结合位点,沉默LncRNA-HULC导致miR-597表达水平升高,Rab23表达水平降低,推测LncRNA-HULC可能通过靶向miR-597/Rab23分子轴调控HCC恶性细胞生物学行为。

综上所述,沉默LncRNA-HULC可能抑制肝癌细胞生物学,其机制可能是通过靶向miR-597/Rab23分子轴实现的。然而,本研究存在只选了一个细胞系,只在细胞水平上验证了抑制LncRNA-HULC/miR-597/Rab23相关通路对HepG2细胞生物学的影响等问题,后续会增加细胞系,重新设计实验在体内水平上进一步证实。

参考文献 (References)

- [1] RENNE S L, SARCOGNATO S, SACCHI D, et al. Hepatocellular carcinoma: a clinical and pathological overview [J]. *Pathologica*, 2021, 113(3): 203-17.
- [2] AJOOLABADY A, TANG D, KROEMER G, et al. Ferroptosis in hepatocellular carcinoma: mechanisms and targeted therapy[J]. *Br J Cancer*, 2023, 128(2): 190-205.
- [3] LI D, WANG R, WU N, et al. LncRNA HULC as a potential predictor of prognosis and clinicopathological features in patients with digestive system tumors: a meta-analysis [J]. *Aging*, 2022, 14(4): 1797-811.
- [4] KITABAYASHI J, SHIRASAKI T, SHIMAKAMI T, et al. Up-regulation of the long noncoding RNA HULC by hepatitis C virus and its regulation of viral replication [J]. *J Infect Dis*, 2022, 226(3): 407-19.
- [5] HU Y, QIU W, KONG Z, et al. LncRNA GSTM3TV2 promotes cell proliferation and invasion via miR-597/FOSL2 axis in hepatocellular carcinoma [J]. *Biomed Res Int*, 2021, 1(1): 3445970-9.
- [6] LIU S J, ZANG Y W, HUANG C J, et al. Downregulation of Rab23 inhibits hepatocellular carcinoma by repressing SHH signaling pathway [J]. *Cancer Rep*, 2023, 1(1): 1921-30.
- [7] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政医管局. 原发性肝癌诊疗规范(2019年版)[J]. 临床肝胆病杂志(BUREAU OF MEDICAL ADMINISTRATION, NATIONAL HEALTH COMMISSION OF THE PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA. Guidelines for diagnosis and treatment of primary liver cancer in China (2019 edition) [J]. *J Clin Hepatol*, 2020, 36(2): 277-92.
- [8] OGUNWOBI O O, HARRICHARRAN T, HUAMAN J, et al.

- Mechanisms of hepatocellular carcinoma progression [J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(19): 2279-93.
- [9] WANG H, LU Z, ZHAO X. Tumorigenesis, diagnosis, and therapeutic potential of exosomes in liver cancer [J]. J Hematol Oncol, 2019, 12(1): 133-53.
- [10] GABER D A, SHAKER O, YOUNIS A T, et al. LncRNA HULC and miR-122 expression pattern in HCC-Related HCV egyptian patients [J]. Genes, 2022, 13(9): 1669-82.
- [11] WANG C, LI Y, YAN S, et al. Interactome analysis reveals that lncRNA HULC promotes aerobic glycolysis through LDHA and PKM2 [J]. Nat CoHCCun, 2020, 11(1): 3162-76.
- [12] YAN C, WEI S, HAN D, et al. LncRNA HULC shRNA disinhibits miR-377-5p to suppress the growth and invasion of hepatocellular carcinoma *in vitro* and hepatocarcinogenesis *in vivo* [J]. Ann Transl Med, 2020, 8(20): 1294-306.
- [13] 董勇, 徐菱遥, 华静, 等. 巨噬细胞外泌体lncRNA HULC对肝癌细胞迁移、侵袭和转移的影响及其机制[J]. 吉林大学学报(DONG Y, XU L Y, HUA J, et al. Effect of macrophage exosomal lncRNA HULC on migration, invasion, and metastasis of hepatocellular carcinoma cells and its mechanism [J]. Journal of Jilin University), 2023, 49(5): 1217-26.
- [14] GUAN L, WANG F, WANG M, et al. Downregulation of HULC induces ferroptosis in hepatocellular carcinoma via targeting of the miR-3200-5p/ATF4 axis [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 1(1): 9613095-112.
- [15] LI J, YUAN X, MA C, et al. LncRNA LBX2-AS1 impacts osteosarcoma sensitivity to JQ-1 by sequestering miR-597-3p away from BRD4 [J]. Front Oncol, 2023, 13(1): 1139588-97.
- [16] 王媛, 洪军, 王树伟, 等. LncRNA LINC00941/miR-597-5p/ARHGEF4分子轴促进神经胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭的机制[J]. 中国老年学杂志(WANG Y, HONG J, WANG S W, et al. The molecular axis of LncRNA LINC00941/miR-597-5p/ARHGEF4 promotes the proliferation, migration and invasion of glioma cells [J]. Chinese Journal of Gerontology), 2022, 42(21): 5303-8.
- [17] LU Y, ZHANG S, ZHU X, et al. Aidi injection enhances the anti-tumor impact of doxorubicin in H22 tumor-containing mice [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 303(1): 115968.
- [18] ZHAO T, HAN D, MENG H. Rab23 contributes to the progression of colorectal cancer via protein kinase B and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways [J]. Oncol Lett, 2019, 18(2): 1793-9.
- [19] WEI X, JIANG Y, YANG G, et al. MicroRNA-367-3p directly targets RAB23 and inhibits proliferation, migration and invasion of bladder cancer cells and increases cisplatin sensitivity [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2023, 149(20): 17807-21.
- [20] LI Z, HU Y, ZENG Q, et al. Circular RNA MYLK promotes hepatocellular carcinoma progression by increasing Rab23 expression by sponging miR-362-3p[J]. Cancer Cell Int, 2019, 19(1): 211-21.
- [21] WEN H L, XU Z M, LIN S Y, et al. miR-597-3p inhibits invasion and migration of thyroid carcinoma SW579 cells by targeting RAB23 [J]. Endokrynol Pol, 2021, 72(1): 22-8.