网络出版时间:2022-1-2014:40 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220119.1133.014.html

## LncRNA FGD5-AS1 通过 miR-873-5p/GTPBP4 轴 促进肝细胞癌发展的研究

章诺贝1,黄神安1,沈浩1,陈新2

**摘要 目的** 探讨长链非编码 RNA(lncRNA)FGD5-AS1 对 肝细胞癌(HCC)发展的调控机制。方法 通过 RT-qPCR 检 测 FGD5-AS1 在肝癌组织和肝癌细胞系中的表达水平。采 用 CCK-8、EdU、流式细胞术、细胞划痕实验和 Transwell 实验 检测 FGD5-AS1 对 HCC 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭中的作 用。运用双荧光素酶报告和 RNA 下拉实验探明 FGD5-AS1、 miR-873-5p 和 GTPBP4 之间的相互作用。结果 FGD5-AS1 在肝癌组织和细胞中表达上调。FGD5-AS1 表达下调可抑制 HCC 细胞的增殖、迁移和侵袭,并诱导其凋亡。FGD5-AS1 直接与 miR-873-5p 结合,并竞争性抑制其表达,以提高 HCC 细胞中促癌基因 GTPBP4 的表达水平。FGD5-AS1 的作用是 由 miR-873-5p/GTPBP4 轴介导的。结论 FGD5-AS1 可通 过调控 miR-873-5p/GTPBP4 轴从而促进 HCC 细胞的增殖、 迁移和侵袭,并抑制其凋亡。

关键词 肝细胞癌; LncRNA FGD5-AS1; miR-873-5p; GT-PBP4

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2022)02 - 0240 - 08 doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2022.02.015

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世 界上与癌症相关死亡的主要疾病之一。根据 2018 年《全球癌症统计》,全球已诊断出约 841 000 例新 的肝癌病例,并且全球已有 782 000 人死于肝癌<sup>[1]</sup>。 目前,肝癌外科手术治疗仅在这种疾病的初期有效。 然而,大多数患者的肝癌在诊断明确时已发展到晚 期,放疗和化疗疗效有限。因此,有必要进一步了解 肝癌进展的分子机制,并研发出针对肝癌更有效的 靶向疗法<sup>[2]</sup>。

近年来,越来越多的证据<sup>[3]</sup>表明 LncRNAs 作为 癌症患者诊断和预后的生物学标志物,为癌症治疗

- 基金项目:国家自然科学基金(编号:81760427);江西省自然科学基金(编号:20202BABL206094、20202BABL216037);江西省卫生健康委科技计划(编号:20201037、202110042)
- 作者单位:南昌大学第二附属医院<sup>1</sup> 消化科、<sup>2</sup> 核医学科,南昌 330006
- 作者简介:章诺贝,男,硕士生导师;

陈 新,女,讲师,责任作者,E-mail:znbicx@163.com

提供了新的治疗靶点。有研究<sup>[4]</sup>表明 LncRNA 的异 常表达在肝癌的发生和转移中起着至关重要的作 用,如 MALAT1 与肿瘤转移有关,并可预测肝移植 术后的复发<sup>[5]</sup>。此外,LncRNA-LET 可抑制肝癌的 侵袭和腹腔转移<sup>[6]</sup>。FGD5 反义 RNA 1(FGD5 antisense RNA 1,FGD5-AS1)是一位于染色体 3p25.1 的 新近被确认的 LncRNA。最近,LncRNA FGD5-AS1 初步被确定为肝癌的潜在治疗靶标<sup>[7]</sup>;然而,LncRNA FGD5-AS1 在肝癌发生发展中的调控作用仍 不得而知。

#### 1 材料与方法

**1.1 临床样本** 从在南昌大学第二附属医院接受 手术的 60 例肝癌患者中,获得肿瘤组织和邻近配对 正常组织。收集所有组织样本并在液氮中冷冻,然 后在-80 ℃下保存以备后用。

1.2 细胞培养 从中科院上海细胞库购买了4种 肝癌细胞系,分别为 HepG2、HuH-7、Li-7、SNU-387, 以及正常人肝细胞系 LO2。将细胞系放在补充有 10% 胎牛血清(Invitrogen,美国加利福尼亚州卡尔斯 巴德公司)的 RPMI 1640 培养基(Invitrogen,美国加 利福尼亚州卡尔斯巴德公司)中,并在 37 ℃、5% CO,的条件下培养。

**1.3 细胞转染** 分别用由上海 GenePharma 公司合成的 FGD5-AS1 过表达载体、FGD5-AS1shRNA(sh-FGD5-AS1)、NC shRNA(sh-NC)和 GTPBP4 shRNA(sh-GTPBP4)、NC mimic、miR-873-5p mimic 对 HepG2和 HuH-7细胞系进行转染。sh-FGD5-AS1:5'-GAA CTCAGCGTTGACTATTCT-3'; sh-GTPBP4: GGATGT-GCACAGTGATCAAGA; si-NC: 5'-TTCTCCGAACGT-GTCACGT-3'。根据制造商说明使用 Lipofectamine 2000(Invitrogen,美国加利福尼亚州卡尔斯巴德公司)进行转染。采用 RT-qPCR 和绿色荧光显微镜评估转染效率。

**1.4 CCK-8 和 EdU 分析** 通过 CCK-8 和 EdU 测 定法检测细胞增殖。根据制造商说明(上海 Beyotime 公司),采用 CCK-8 分析,并在 450 nm 处测量

<sup>2021-10-20</sup> 接收

吸光度(optical density,OD)值。同时按照制造商说明,使用 EdU Apollo DNA 体外试剂盒(广州 RIBO-BIO 公司),通过 EdU 分析确定细胞增殖,并在荧光显微镜下观察细胞。

**1.5 细胞划痕实验** 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 50 μl 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。

1.6 Transwell 实验 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 1000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(美国 Sigma-Aldrich 公司) 染色。在 5 个不同的视野(放大 100 倍)中,分别对迁移和侵袭的细胞进行计数。

**1.7 双荧光素酶报告实验** 使用 GTPBP4 野生型 (wt)或突变型(mut)启动子报告子与 FGD5-AS1 或 miR-873-5p 进行重组后转染 HepG2 和 HuH-7 细胞 系。转染 48 h 后,使用双荧光素酶报告检测系统(美 国威斯康星州 Promega 公司)检测荧光素酶活性。

1.8 RNA 下拉实验 将 Pierce<sup>™</sup>磁性 RNA-蛋白质 下拉试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)用 于 RNA 下拉实验。首先将 RNA 结合到磁珠上,以 接收用于蛋白质结合的 RNA。此后,在添加蛋白质 裂解物之前, RNA 结合珠在蛋白质-RNA 结合缓冲 液中被平衡。通过添加适当的缓冲液洗涤珠子,在 磁力架上涡旋后分离。最后,通过 RT-qPCR 分析测 定沉淀物中 RNA 的特异性。

**1.9 RT-qPCR**使用 TRIzol 试剂(美国 Invitrogen 公司)从组织样品和细胞中提取总 RNA。根据制造商协议,使用 PrimeScript<sup>™</sup> RT 试剂盒(日本 Takara 公司)将 RNA 反转录为第一链 cDNA。通过 Fast-Start Universal SYBR Green Master (德国 Roche 公司)对 PCR 定量扩增产物,并标准化为 GAPDH 和 U6。引物: FGD5-AS1, (F) 5'-GTCACTGTTCGGTG GTCTGC-3', (R) 5'-CAGTCAGGTGTTGTCGTGGAG-3'; miR-873-5p, (F) 5'-GCAGGAACTTGTGAGTCTCC-3',(R)5'-CTTGAACACTCAGAGGAAGG-3'; GTPBP4, (F) 5'-GTTGCTAAAGATTATGTGCGACTG-3', (R) 5'-CAAACGGGATAAATGCTGACG-3'; GAPDH, (F) 5'-TATGATGATATCAAGAGGTAGT-3', (R) 5'-TGTA TCCAAACTCATTGTCATAC-3'。

1.10 Western blot 检测 使用含有蛋白酶和磷酸 酶抑制剂的 RIPA 缓冲液(美国 Sigma-Aldrich 公司) 提取总蛋白。根据制造商说明,使用 BCA 蛋白分析 试剂盒(上海)测定蛋白质浓度。通过 SDS-PAGE 分离蛋白质,并将其转移至 PVDF 膜(美国 Millipore 公司),然后与一抗在4℃孵育过夜,其后与 HRP 偶 联的二抗(1:5000 稀释)孵育。用 ECL Western blot 检测试剂(美国 Millipore 公司)对蛋白质进行可 视化。免疫反应带使用 Image J(美国 NIH 公司)进 行定量。

**1.11** 统计学处理 使用 GraphPad Prism 进行统计 分析,数据以 *x* ± *s* 表示,数据至少来自 3 个独立实 验。通过不配对 *t* 检验、单向 ANOVA 和双向 ANO-VA 分析组间差异。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

#### 2 结果

2.1 FGD5-AS1 在肝癌组织和细胞中表达情况 首 先通过 RT-qPCR 检测 FGD5-AS1 在肿瘤组织和相应 癌旁非癌组织中的表达。与癌旁正常肝组织相比, HCC 组织中 FGD5-AS1 的 RNA 表达水平增加(图 1A);与正常肝细胞 L02 相比,4 种 HCC 细胞系 (HepG2、HuH-7、Li-7 和 SNU-387)中 FGD5-AS1 的 RNA 表达水平也均有升高(图 1B)。RT-qPCR 分析 FGD5-AS1 在 HepG2 和 HuH-7 细胞中的亚细胞定位, 结果表明 FGD5-AS1 主要位于细胞质中(图 1C)。





A:RT-qPCR 分析 FGD5-AS1 在非肿瘤组织和 HCC 组织中的 RNA 表达水平;B:RT-qPCR 分析 FGD5-AS1 在四种 HCC 细胞系和 正常人肝细胞系 L02 中的 RNA 表达水平;C:通过 RT-qPCR 分别分 析 HepG2 和 HuH-7 细胞中 FGD5-AS1 的亚细胞定位测定;1: HepG2;2:HuH-7;与癌旁组织比较:\*\*P < 0.01;与正常肝细胞 L02 比较:<sup>##</sup>P < 0.01;与 FGD5-AS1 比较:<sup>&&</sup>P < 0.01 2.2 下调 FGD5-AS1 对 HCC 细胞增殖及凋亡的 影响 用 sh-FGD5-AS1 转染后, FGD5-AS1 在 HepG2 细胞系中的表达水平降低了 70%,在 HuH-7 细胞系中的表达水平降低了 65% (图 2A、B)。 CCK-8 和 EdU 检测表明,下调 FGD5-AS1 可抑制 HepG2 和 HuH-7 细胞系的增殖能力(图 2C、D)。 Western blot 实验表明,下调 FGD5-AS1 可使增殖相 关标志物 PCNA 和 CyclinD1 表达蛋白水平降低(图 2E)。流式细胞仪检测 FGD5-AS1 对细胞凋亡, FGD5-AS1 的下调使膜联蛋白 V(Annexin V)阳性细 胞的百分比在 HepG2 细胞中从 8% 增至 24%, 在 HuH-7 细胞中从 7% 增至 20% (图 2F)。为了进一 步证实 FGD5-AS1 对肝癌细胞凋亡的影响,采用 Western blot 检测了4种调亡标志物(Bax、Bcl-2、 cleaved caspase-3 和 cleaved caspase-9)的蛋白水平。 如图 2G 所示,在 HepG2 和 HuH-7 细胞系中, FGD5-AS1 的表达沉默降低了 Bcl-2 的表达水平, 而同时 增加了 Bax、cleaved caspase-3 (abcam、ab2302) 和 cleaved caspase-9 (abcam、ab2324)的表达水平。

**2.3 FGD5-AS1**下调对 HCC 细胞的迁移和侵袭的影响 细胞划痕和 Transwell 实验表明下调

FGD5-AS1 可以抑制 HCC 细胞迁移和侵袭(图 3A ~ C)。在分子水平上检测迁移/侵袭相关的蛋白 Cox-2、MMP2 和 MMP9 的表达水平变化,结果表明 sh-FGD5-AS1 组 Cox-2、MMP2 和 MMP9 的蛋白表达水 平低于 sh-NC 组(图 3D)。以上实验结果显示,下调 FGD5-AS1 可抑制 HCC 细胞的迁移和侵袭。

FGD5-AS1 在 HCC 细胞中靶向 miR-873-5p 2.4 通过搜索在线生物信息学数据库来预测 情况 miR-873-5p 是 FGD5-AS1 的潜在下游靶标(图 4A)。 使用 miR-873-5p mimic 实现 miR-873-5p 过表达,并 且通过 RT-qPCR 分析验证了转染效率(图 4B)。基 因分析表明,将 miR-873-5p mimic 转染到 HCC 细胞 中可抑制带有 miR-873-5p 结合位点的 FGD5-AS1 序列的萤光素酶报告基因的活性。在 FGD5-AS1 中 的 miR-873-5p 的预测结合位点发生突变后,荧光素 酶活性的变化被消除(图 4C)。此外, RNA 下拉试 验进一步证实 FGD5-AS1 确实与 HCC 细胞中的 miR-873-5p 结合(图 4D)。此外, RT-qPCR 分析显 示,HepG2和HuH-7细胞中的FGD5-AS1沉默后, miR-873-5p的表达水平升高(图4E)。与非肿瘤组 织和正常人肝细胞系L02相比,在肿瘤组织和HCC



图 2 下调 FGD5-AS1 对 HCC 细胞增殖及凋亡的影响

A:sh-NC 或 sh-FGD5-AS1 转染 HepG2 和 HuH-7 细胞后 RT-qPCR 检测;B:绿色荧光显微镜进行验证转染效率 ×100;C:CCK-8 测定结果; D:EdU 分析图像 ×100;E:PCNA 和 CyclinD1 蛋白水平;F:FGD5-AS1 对细胞凋亡率的影响;G:对 Bax、Bcl-2、cleaved caspase-3 和 cleaved caspase-9 蛋白质水平的 Western blot 分析;1:sh-NC 组;2:sh-FGD5-AS1 组;a:Bax;b:Bcl-2;c:Caspase-3;d:Caspase-9;与 sh-NC 组比较:\*\*P < 0.01 细胞系中, miR-873-5p 表达水平显著降低(图 4F、 4G)。Pearson 的相关性分析表明, miR-873-5p 与 FGD5-AS1 呈负相关(图 4H)。这些数据为 FGD5-AS1 可海绵化 miR-873-5p 提供了证据。





A:细胞划痕实验 ×100;B:通过 Transwell 实验确定由 FGD5-AS1 shRNA 转染的 HepG2 和 HuH-7 细胞的迁移细胞数 ×100;C:通过 Transwell 实验确定由 FGD5-AS1 shRNA 转染的 HepG2 和 HuH-7 细胞的侵袭细胞数 ×100;D:Cox-2、MMP2 和 MMP9 表达水平的 Western blot 分析; 1:sh-NC 组;2:sh-FGD5-AS1 组;与 sh-NC 组比较:\*\*P<0.01



图 4 FGD5-AS1 在 HCC 细胞中靶向 miR-873-5p 情况

A:miR-873-5p 与 FGD5-AS1 之间的结合位点;B:HepG2 和 HuH-7 细胞中 miR-873-5p 的表达水平;C:在 FGD5-AS1 中的 miR-873-5p 的 预测结合位点发生突变后,荧光素酶活性的变化;D:RNA 下拉测定;E:HCC 细胞中 miR-873-5p 的表达;F:miR-873-5p 在 HCC 组织的表达水平;G:miR-873-5p 在肝癌细胞系中的表达水平;H:FGD5-AS1 与 miR-873-5p 之间的相关分析;与 NC 组比较:\*\* P < 0.01;与 Bio – NC 组比较:<sup>##</sup>P < 0.01;与 sh-NC 组比较:<sup>△△</sup>P < 0.01;与癌旁组织比较:<sup>&&</sup>P < 0.01;G:与 L02 细胞系比较:  $\forall P < 0.01$ 

### 2.5 FGD5-AS1 通过与 miR-873-5p 竞争性结合对

**GTPBP4**的影响 使用 Starbase v2.0(http://starbase.sysu.edu.cn/)分析表明 GTPBP4 是 miR-873-5p 的下游靶基因,存在潜在的结合序列(图 5A)。 双荧光素酶报告实验表明,miR-873-5p 可抑制野生型 GTPBP4-WT 的荧光素酶活性(图 5B)。RNA 下拉实验同样表明,GTPBP4 仅被 Bio-miR-873-5p-wt 下拉,进一步验证了 GTPBP4 与 miR-873-5p 的相互作用(图 5C)。通过 RT-qPCR 和 Western blot 分析表明:miR-873-5p 过表达可导致 GTPBP4 mRNA 和蛋白质水平明显下降,证实了 GTPBP4 是 miR-873-5p 的靶标(图 5D、E);miR-873-5p 对 GTPBP4 荧光素酶活性的抑制作用可被 GTPBP4 的过表达所部分抵消(图 5F); FGD5-AS1 的表达下调可降低 GT-PBP4 的 mRNA 和蛋白表达水平(图 5G、H)。

**2.6 FGD5-AS1/miR-873-5p/GTPBP4 轴在 HCC** 中的作用 为了进一步研究 FGD5-AS1/miR-873-5p/GTPBP4 轴对 HCC 的影响,课题组首先通过 RTqPCR 证实了 HepG2 细胞系的转染效率(图 6A)。 CCK-8 和 EdU 实验显示 miR-873-5p 抑制剂可使 FGD5-AS1 沉默引起的 HepG2 细胞增殖减少的效应 增强,而此效应又可由 GTPBP4 的敲低所阻遏(图 6B、C)。流式细胞术分析细胞凋亡显示 miR-873-5p 抑制剂可消除 FGD5-AS1 下调对细胞凋亡的影响, 且当 GTPBP4 沉默后,细胞凋亡得以恢复(图 6D)。 细胞划痕和 Transwell 实验分析表明,miR-873-5p 抑 制剂可增强 FGD5-AS1 下调对细胞的迁移和侵袭的 抑制效应,而此效应又可通过抑制 GTPBP4 表达来 恢复(图 6E、F、G)。上述结果表明 FGD5-AS1 可通 过 miR-873-5p/GTPBP4 轴影响 HCC 细胞的生物学 行为。

#### 3 讨论

本研究表明 lncRNA FGD5-AS1 在 HCC 组织和 细胞中高表达, lncRNA FGD5-AS1 竞争性地抑制 miR-873-5p 的表达,从而增强了 HCC 细胞中 GT-PBP4 的表达水平。以上研究结果提示, lncRNA FGD5-AS1 在促进 HCC 进程中发挥了推进作用,其可能作为 HCC 的一种新的治疗靶标。

lncRNA FGD5-AS1 已被确定为包括肝癌在内的多种癌症的潜在致癌基因<sup>[8-12]</sup>。本研究显示, ln-cRNA FGD5-AS1 在 HCC 组织中的表达明显高于相



图 5 FGD5-AS1 与 miR-873-5p 竞争性结合对 GTPBP4 的影响

A:GTPBP4 的 3'-UTR 中 miR-873-5p 的潜在结合序列;B:由 GTPBP4-WT 以及 miR-873-5p mimic 或 NC mimic 的 3'-UTR 所共转染的 HepG2 和 HuH-7 细胞的荧光素酶信号的比率;C:RNA 下拉实验;D:mimic 转染的 HepG2 和 HuH-7 细胞中 GTPBP4 的 mRNA 水平;E:NC mimic 或 miR-873-5p mimic 转染的 HepG2 和 HuH-7 细胞中 GTPBP4 的蛋白水平;F:荧光素酶报告基因测定;G:RT-qPCR 检测在转染 sh-NC 或 sh-FGD5-AS1 的 HepG2 和 HuH-7 细胞中 GTPBP4 的表达水平;H:Western blot 检测在转染 sh-NC 或 sh-FGD5-AS1 的 HepG2 和 HuH-7 细胞中 GTPBP4 的表达水平;H:Western blot 检测在转染 sh-NC 或 sh-FGD5-AS1 的 HepG2 和 HuH-7 细胞中 GTPBP4 的表达水平;1:NC mimic 组;2:miR-873-5p mimic 组;3:sh-NC 组;4:sh-FGD5 – AS1 组;5:miR-873-5p mimic + FGD5-AS1 组;6:Bio-NC 组; 7:miR-873-5p-mt 组;8:miR-873-5p-mt 组;与 GTPBP4-mut 比较:\*\* P < 0.01;与 Bio-NC 组比较: $\nabla P < 0.01$ ;与 NC mimic 组比较:##P < 0.01;与 miR-873-5p mimic 组比较:##P < 0.01;与 mimic 组比较:##P < 0.01;与 miR-873-5p mimic 组比较:##P < 0.01;与 minc 组比较:##P < 0.01



#### 图 6 FGD5-AS1/miR-873-5p/GTPBP4 轴在 HCC 中的作用

A:HepG2 细胞系的 GTPBP4 和 miR-873-5p 的表达水平;B:CCK-8 测定曲线;C:EdU 分析图像;D:流式细胞术检测细胞凋亡率;E:细胞划 痕观察细胞的迁移能力变化 ×100;F:Transwell 实验分析迁移能力变化 ×100;G:Transwell 实验分析侵袭能力变化 ×100;1:Sh-NC + NC 抑制 剂组;2:sh-FGD5-AS1 + NC 抑制剂组;3:sh-FGD5-AS1 + miR-873-5p 抑制剂组;4:sh-FGD5-AS1 + miR-873-5p 抑制剂 + sh-GTPBP4 组;与 sh-GT-PBP4 组比较: \*\* P < 0.01;与 miR-873-5p 抑制剂组比较: <sup>##</sup>P < 0.01;与 sh-FGD5vAS1 + NC 抑制剂组比较: <sup>△</sup>P < 0.01;与 FGD5-AS1 + miR-873-5p 抑制剂组比较: <sup>#\*</sup>P < 0.01;与 FGD5-AS1 + miR-873-5p 抑制剂组比较: <sup>\*\*</sup>P < 0.01;与 FGD5-AS1 + miR-873-5p 抑制剂组比较: <sup>\*\*</sup>P < 0.01;与 FGD5-AS1 + miR-873-5p 抑制剂

应的非肿瘤组织, lncRNA FGD5-AS1 的表达下调可 抑制 HCC 细胞的恶性表型,包括增殖、迁移和侵袭, 结果表明 lncRNA FGD5-AS1 在 HCC 的发展中发挥 着至关重要的促进作用。

该研究表明 lncRNA FGD5-AS1 主要在 HCC 细胞质中表达,生物信息学分析显示 miR-873-5p 具有

与 lncRNA FGD5-AS1 互补的序列。根据先前的研究报道, miR-873-5p 在多种癌症中均具有抑癌作用<sup>[13]</sup>。因此, 可推测 lncRNA FGD5-AS1 可通过与 miR-873-5p 相互作用从而发挥其致癌作用。本研究结果表明, lncRNA FGD5-AS1 可负性调控 miR-873-5p。此外, 生物信息学分析表明, GTPBP4 可能是 miR-873-5p 的下游靶标。在最近的研究中, GT-PBP4 已被报道可促进包括 HCC 在内的多种癌症的 进展<sup>[14-15]</sup>。然而, 在 HCC 中 miR-873-5p 和 GT-PBP4 的关系尚不清楚。在本研究中, 通过荧光素酶报告实验和 RNA 下拉实验, 证实了 GTPBP4 是 miR-873-5p 的直接靶标。此外, 拯救分析结果表明, ln-cRNA FGD5-AS1 可通过 miR-873-5p/GTPBP4 轴促 进 HCC 的发展, 但是, 需要更多的体内实验来进一步证实研究结果。

该研究为 lncRNA FGD5-AS1 在 HCC 进展中发 挥重要作用提供了理论依据。此外, lncRNA FGD5-AS1/miR-873-5p/GTPBP4 轴为肝癌的分子基础研 究预示了新视角,并为开发新的 HCC 诊断和治疗策 略提供了新的前景。

#### 参考文献

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68 (6):394-424.
- [3] Luo D, Deng B, Weng M, et al. A prognostic 4-lncRNA expression signature for lung squamous cell carcinoma [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2018, 46(6):1207-14.
- Liu Y R, Tang R X, Huang W T, et al. Long noncoding RNAs in hepatocellular carcinoma: novel insights into their mechanism[J].
   World J Hepatol, 2015, 7(28):2781 -91.
- $\left[\,5\,\right]$   $\,$  Lai M C , 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): 1810-6.

- [6] Yang F, Huo X S, Yuan S X, et al. Repression of the long noncoding RNA-LET by histone deacetylase 3 contributes to hypoxiamediated metastasis [J]. Molecular cell, 2013,49(6):1083 – 96.
- [7] Li D, Jiang X, Zhang X, et al. Long noncoding RNA FGD5-AS1 promotes colorectal cancer cell proliferation, migration, and invasion through upregulating CDCA7 via sponging miR-302e[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2019,55(8):577-85.
- [8] Xiao J, Lv Y, Jin F, et al. LncRNA HANR promotes tumorigenesis and increase of chemoresistance in hepatocellular carcinoma
  [J]. Cell Physiol Biochem, 2017,43(5):1926-38.
- [9] Ni W, Zhang Y, Zhan Z, et al. A novel lncRNA uc. 134 represses hepatocellular carcinoma progression by inhibiting CUL4A-mediated ubiquitination of LATS1 [J]. J Hematol Oncol, 2017, 10 (1):91.
- [10] 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):666-81.
- [11] Zhu H, Lu J, Zhao H, et al. Functional long noncoding RNAs (lncRNAs) in clear cell kidney carcinoma revealed by reconstruction and comprehensive analysis of the lncRNA-miRNA-mRNA regulatory network[J]. Med Sci Monit,2018,24: 8250-63.
- [12] Li D, Jiang X, Zhang X, et al. Long noncoding RNA FGD5-AS1 promotes colorectal cancer cell proliferation, migration, and invasion through upregulating CDCA7 via sponging miR-302e[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2019,55(8):577-85.
- [13] Zhu Y, Zhang X, Qi M, et al. miR-873-5p inhibits the progression of colon cancer via repression of tumor suppressor candidate 3/AKT signaling[J]. J Gastroen Hepatol, 2019, 34(12):2126 – 34.
- [14] Yu H, Jin S. Zhang N, et al. Up-regulation of GTPBP4 in colorectal carcinoma is responsible for tumor metastasis [J]. Biochem Bioph Res Co,2016,480(1):48-54.
- [15] Liu W B, Jia W D, Ma J L, et al. Knockdown of GTPBP4 inhibits cell growth and survival in human hepatocellular carcinoma and its prognostic significance [J]. Oncotarget, 2017,8(55):93984 – 97.

# The research of LncRNA FGD5-AS1 promotes hepatocellular carcinoma progression through miR-873-5p/GTPBP4 axis

Zhang Nuobei<sup>1</sup>, Huang Shen'an<sup>1</sup>, Shen Hao<sup>1</sup>, Chen Xin<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Dept of Gastroenterology,<sup>2</sup>Dept of Nuclear Medicine, The Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006)

Abstract *Objective* To explore the regulatory mechanism of the long noncoding FGD5-AS1 (LncRNA FGD5-AS1) on hepatocellular carcinoma(HCC) progression. *Methods* The expression level of FGD5-AS1 was measured

网络出版时间:2022-1-2015:55 网络出版地址:https://kns. cnki. net/kcms/detail/34.1065. R. 20220119.1134.015. html

## 细胞外囊泡协同递送维替泊芬/TRAIL 诱导口腔鳞癌 细胞凋亡及增殖抑制实验研究

王文晶,李昆珊,刘铁军,刘 昕,仇永乐

摘要 目的 制备细胞外囊泡(EVs)共载体系,以协同递送 肿瘤坏死因子相关调亡诱导配体(TRAIL)/维替泊芬(VPF) 组合用于诱导口腔鳞癌细胞凋亡及增殖抑制。方法 通过 超速离心、过滤法分离纯化 TRAIL/VPF 共载 EVs(MSCT-EVs/VPF)。通过 BCA 法检测 CD63、CD9 和 TRAIL 表达,确 认 EVs 来源。用高效液相法检测 VPF 载药量,绘制体外释 放曲线。使用 MTT 法检测细胞毒性和半数抑制浓度 (IC50)。通过流式细胞仪检测细胞凋亡,最后 Western blot 被用于检测 MSCT-EVs/VPF 对 SCC25 细胞中凋亡相关蛋白 和 YAP 表达的影响。结果 MSCT-EVs/VPF 颗粒圆整,分 散性良好,直径约为100 nm;纳米体系载药量为(15.43 ± 0.44)%,在10h内释放57.8%的VPF,45h释放约82.5%; MSCT-EVs 和 VPF 均可抑制 SCC25 肿瘤细胞生长,呈剂量依 赖性, MSCT-EVs 和 VPF 的质量比(wt%)在10:1~5:1的 比例范围内显示出最佳抑制效果;在100:5~100:15 (wt%)比例下,MSCT-EVs/VPF的半抑制浓度(ICso)低于游 离 MSCT-EVs + 游离 VPF 组(P < 0.05),显示出更高效的抑 制作用。MSCT-EVs/VPF 对鳞癌细胞的高效抑制作用部分 源自对 Caspase-3、Bax、Bcl-2、mTOR、p-mTOR 和 YAP 的调 控。结论 通过 EVs 递送固定比例的 TRAIL/VPF, 对口腔 鳞癌细胞展现出高效抑制作用,为多药耐药肿瘤的治疗提供

了新思路。

关键词 维替泊芬;细胞外囊泡;肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体;口腔鳞状细胞癌

中图分类号 R 979.1

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2022)02 - 0247 - 07 doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2022.02.016

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)是肿瘤坏死因子超 家族成员之一[1],能通过抑制肿瘤增殖和促进肿瘤 凋亡在多种癌症治疗过程中发挥作用,曾被认为是 极具前景的选择<sup>[2]</sup>。然而,恶性肿瘤对 TRAIL 诱导 细胞凋亡的耐药性阻碍了其应用拓展。Yes 激酶相 关蛋白(yes-associated protein, YAP)的活化及过表 达与多种肿瘤细胞耐药性相关。如黑色素瘤细胞对 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶抑制剂的耐药性源自激动 蛋白对 YAP/转录联合激活因子通路的重塑活化, 卵巢癌细胞对紫杉醇的耐药性涉及到 YAP 的过表 达。近期基因组分析显示 YAP 在口腔鳞状细胞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC)中过表达<sup>[3]</sup>。 Hiemer et al<sup>[4]</sup>证明 YAP 的核积聚可促进口腔鳞癌 细胞的增殖和迁移。Kim et al<sup>[5]</sup>研究表明, YAP 能 有效的抑制 MCF10A 细胞中 TRAIL 表达。故推测 通过 YAP 抑制剂维替泊芬(verteporfin, VPF) 有望 提高 OSCC 细胞对 TRAIL 的敏感性。该研究为改善 口腔鳞癌细胞对 TRAIL 作用的耐药性,制备协同递 送TRAIL/VPF 的细胞外囊泡(TNF-related apoptosis-

in tumor tissues and cell lines by RT-qPCR. CCK-8, EdU, flow cytometry, wound healing and transwell chamber assays were performed to investigate the role of FGD5-AS1 in HCC cell proliferation, apoptosis, migration and invasion *in vitro*. At the molecular level, dual luciferase reporter and RNA pull down assays were performed to identify the interaction among FGD5-AS1, miR-873-5p and GTPBP4. *Results* FGD5-AS1 was upregulated in HCC tissues and cells. Moreover, FGD5-AS1 knockdown suppressed HCC cell proliferation, migration and invasion, and induced apoptosis *in vitro*. Mechanistically, FGD5-AS1 directly bound to miR-873-5p and competitively inhibit its expression to increase the expression level of GTPBP4 in HCC cells. Finally, our findings indicated that the role of FGD5-AS1 was mediated by miR-873-5p GTPBP4 axis. *Conclusion* FGD5-AS1 promotes the proliferation, migration and invasion of HCC cells and inhibits apoptosis by regulating the miR-873-5p/GTPBP4 axis. *Key words* hepatocellular carcinoma; LncRNA FGD5-AS1; miR-873-5p; GTPBP4

<sup>2021 - 10 - 25</sup> 接收 基金项目:国家癌症中心攀登基金(编号:NCC201803B006);河北省 医学科学研究课题计划(编号:20200102) 作者单位:河北医科大学第四医院口腔科,石家庄 050000 作者简介:王文晶,女,主管护师; 仇永乐,男,博士,副主任医师;责任作者,E-mail: chouyongle123@163.com