

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2020.03.008

· 基础研究 ·

Lin28对肝癌HepG2细胞5-Fu敏感性的影响及其分子机制

陈少坚, 林拥华, 吴友谊, 魏剑锋, 廖政戎(福建医科大学附属第二医院 普外科, 福建 泉州 362000)

[摘要] **目的:** 探讨RNA结合蛋白Lin28对肝癌HepG2细胞5-氟尿嘧啶(5-Fu)敏感性的影响及其机制。**方法:** 应用pcDNA3.1-Lin28或si-Lin28转染HepG2细胞, 采用qPCR及WB法检测转染后HepG2细胞Lin28的表达水平, CCK-8法检测5-Fu作用后转染细胞增殖活性变化并计算5-Fu对细胞作用的 IC_{50} , 流式细胞术检测5-Fu处理后细胞凋亡情况、WB法检测凋亡相关蛋白的表达变化, qPCR法检测转染后耐药相关miRNA(let-7a和let-7b)及肿瘤干细胞标记物(Oct4、Nanog和Sox2)的mRNA表达水平。**结果:** 与空载对照组(HepG2/Vector)相比, HepG2/Lin28组细胞中Lin28 mRNA和蛋白的表达水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 过表达Lin28可显著抑制HepG2细胞对5-Fu作用的敏感性(IC_{50} 明显升高, $P<0.05$)和增强细胞增殖活性、使细胞凋亡率和凋亡相关蛋白caspase-3表达明显降低(均 $P<0.01$)。与阴性对照组(si-control)相比, si-Lin28细胞中Lin28表达水平显著下降($P<0.01$); 敲减Lin28可使细胞增殖活性及5-Fu的 IC_{50} 显著降低(均 $P<0.01$), 凋亡率及凋亡蛋白表达明显增加($P<0.01$)。与HepG2/Vector组比较, HepG2/Lin28细胞中let-7a、let-7b及肿瘤干细胞标记物(Oct4、Nanog和Sox2)的表达水平明显上调(均 $P<0.01$), 而si-Lin28细胞中let-7a、let-7b及Oct4、Nanog、Sox2的表达水平较si-control组明显下调(均 $P<0.01$)。**结论:** Lin28可通过调节miRNAs的表达及肿瘤干细胞的形成从而调节肝癌HepG2细胞对化疗的敏感性, 靶向调节Lin28表达有望成为提高肝癌化疗疗效的手段。

[关键词] 肝细胞癌; HepG2细胞; Lin28; 5-氟尿嘧啶; 化疗敏感性; 肿瘤干细胞; 凋亡

[中图分类号] R735.7; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)03-0261-06

Effect and molecular mechanism of Lin28 on 5-Fu sensitivity of hepatocellular carcinoma HepG2 cells

CHEN Shaojian, LIN Yonghua, WU Youyi, WEI Jianfeng, LIAO Zhengrong (Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 362000, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of RNA binding protein Lin28 on the 5-fluorouracil (5-Fu) sensitivity of HepG2 cells. **Methods:** HepG2 cells were transfected with plasmid pcDNA3.1-Lin28 or si-Lin28 (small interfering RNA of Lin28). qPCR and Western blotting were used to detect the expression of Lin28 in HepG2 cells after transfection. Changes of cell proliferation in transfected cells after 5-Fu treatment was detected by CCK8 assay and the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated. Flow cytometry was used to detect apoptotic rate after 5-Fu treatment and the expression of apoptosis-related protein was assayed by Western blotting. The mRNA expressions of drug-resistant miRNAs (let-7a and let-7b), as well as cancer stem cell markers (Oct4, Nanog and Sox2) after transfection were detected by qPCR. **Results:** As compared to the HepG2/Vector cells, the mRNA and protein expressions of Lin28 were significantly up-regulated in HepG2/Lin28 cells ($P<0.05$ or $P<0.01$). Over-expression of Lin28 significantly suppressed the sensitivity of HepG2 cells to 5-Fu (IC_{50} elevated obviously, $P<0.05$) and significantly increased cell proliferation while decreased apoptotic rate and expression of apoptosis-related protein caspase-3 (all $P<0.01$). As compared to si-control group, expression of Lin28 in HepG2/si-Lin28 cells was significantly down-regulated ($P<0.01$). Lin28 knockdown significantly reduced cell proliferation and IC_{50} of 5-Fu (all $P<0.01$) but increased apoptotic rate and expression of apoptosis-related protein ($P<0.01$). Compared with HepG2/Vector group, expressions of let-7a and let-7b, as well as cancer stem cell markers (Oct4, Nanog and Sox2) were significantly increased in HepG2/Lin28 cells (all $P<0.01$); while these molecules were significantly decreased in HepG2/si-Lin28 cells as comparing to si-control group (all $P<0.01$). **Conclusion:** Lin28 can modulate the chemosensitivity of HepG2 cells by regulating the expression of miRNAs and the formation of cancer stem cells. Targeting Lin28 might be a promising approach to improve the chemotherapy efficacy in HCC.

[Key words] hepatocellular carcinoma (HCC); HepG2 cell; Lin28, 5-fluorouracil (5-Fu); chemosensitivity; cancer stem cell; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(3): 261-266. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.03.008]

[基金项目] 福建省中青年教育科研资助项目(No.JA15193)。Project supported by the Education and Scientific Research Project for Young and Middle-aged Teachers in Fujian Province (No.JA15193)

[作者简介] 陈少坚(1987-), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事肝胆胰及疝与腹壁外科基础与临床研究, E-mail: fjmucs@163.com

[通信作者] 林拥华(LIN Yonghua, corresponding author) 博士, 副主任医师, 主要从事肝癌的基础与临床研究, E-mail: shanny369@163.com

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是亚洲最常见的恶性肿瘤之一,我国肝癌发病率位居全球第一,其主要原因为我国是感染慢性乙型病毒性肝炎的大国^[1]。肝癌的发病隐匿,早期患者多无明显症状,手术切除并不适用于大多数肝癌患者,而经导管动脉化疗栓塞(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)是中晚期肝癌患者治疗的主要手段^[2]。但肝癌对化疗药物的高度耐药性限制了TACE的有效性。因此,探索肝癌细胞的耐药机制,对提高肝癌化疗的疗效、改善患者预后是极其重要且迫切的。

Lin28是一种高度保守的RNA结合蛋白,它可通过抑制肿瘤的miRNA从而促进肿瘤的发生发展。研究结果^[3-5]表明, Lin28的异常表达及激活与多种癌症的预后密切相关,包括乳腺癌、肺癌、结肠癌和肝癌等。有研究^[6-7]显示,高表达的Lin28与人类恶性肿瘤的化疗耐药有关, Lin28高表达的乳腺癌细胞表现出更强的紫杉醇耐药性;而在人胃癌中,过表达Lin28可降低奥沙利铂、多西他赛及氟尿嘧啶多种药物的敏感性,且在局部晚期胃癌患者接受新辅助化疗过程中, Lin28的表达与肿瘤的反应有关。Lin28在肝癌中高表达^[8],但其在肝癌HepG2细胞的药物敏感性中的作用尚不清楚。因此,本研究探讨Lin28对肝癌的化疗敏感性的影响,为阐明肝癌的耐药机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株、主要试剂及仪器

人肝癌细胞HepG2由本实验室保存。DMEM培养基、无血清培养基、OPTI-MEM培养基、胰蛋白酶、青链霉素混合液均购自美国Gibco公司,转染试剂Lipofectamine™ 2000、RNA提取试剂TRIzol购自美国Life Technologies公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,RIPA裂解液、BCA试剂盒、SDS-PAGE试剂盒、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔二抗购自上海碧云天生物技术有限公司,CCK-8试剂盒购自日本Dojind公司,Annexin-V PI凋亡试剂盒购自美国BD生物科学公司,逆转录试剂盒及PCR试剂盒购自大连宝生物公司,PVDF膜购自美国Thermo Fisher Scientific公司,5-氟尿嘧啶购自Sigma-Aldrich公司,兔来源的抗Lin28、Caspase 3抗体购自美国Abcam公司,兔来源的抗GAPDH抗体购自武汉谷歌生物公司,PCR引物、pcDNA3.1-Lin28 siRNA及质粒购自上海生工生物工程股份有限公司,ABI7500 PCR仪购自美国Applied Biosystems公司,酶标仪购自瑞士Tecan公司,流式细胞仪购自美国Thermo Fisher Scientific公司。

1.2 细胞培养与转染

人肝癌细胞株HepG2在常规条件下(高糖DMEM培养液中含有10%胎牛血清、100 U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素,37 °C、5% CO₂)培养至对数生长期时备用。用0.25%胰蛋白酶消化对数生长期的HepG2细胞,按5×10⁵个/孔接种于含10%胎牛血清、不含抗生素的DMEM培养液的6孔板继续培养24 h,当细胞汇合度达70%~80%时,按照Lipofectamine™ 2000试剂说明书的方法进行转染。用OPTI-MEM稀释转染试剂、质粒和siRNA,常温孵育5 min。将50 μl稀释好的转染试剂和50 μl稀释好的质粒、siRNA分别轻轻混匀,常温孵育20 min。然后将转染混合物加至细胞样品中,培养6 h后换新鲜培养基,继续培养48 h后进行后续实验。HepG2细胞转染分组:空载对照组(HepG2/Vector)、Lin28过表达质粒组(HepG2/Lin28),RNA干扰阴性对照组(si-control)、靶向Lin28的干扰RNA组(si-Lin28)。qPCR及WB法检测Lin28 mRNA及蛋白的表达水平,验证转染效率。

1.3 qPCR法检测Lin28、Let-7a、Let-7b及肿瘤干细胞相关标记物的表达水平

用TRIzol法从转染后各组HepG2细胞中提取总RNA,用酶标仪测定RNA纯度及浓度,按照试剂盒说明书进行cDNA的合成和qPCR的扩增。qPCR反应条件:95 °C预变性10 min,按以下程序进行40次循环反应扩增:95 °C变性30 s、60 °C退火30 s、72 °C延伸40 s。每个样本进行3次重复,计算其平均水平。GAPDH作为内源性参照,检测结果用公式2^{-ΔΔCt}法计算mRNA相对表达量。引物序列见表1。

表1 qPCR引物序列
Tab.1 Primer sequences for qPCR

Gene	Primer sequence
Lin28	F:5'-CGGCCAAAAGGAAAGAGCAT-3' R:5'-GTTGGCTTCCCTGTGCACT-3'
Let-7a	F:5'-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU-3' R:5'-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU-3'
Let-7b	F:5'-ATTGCGCCGCTGCCTGTAGAGT-CACCCACC-3' R:5'-GGTGGGCCCCAGAAACAAAACAAAT-CAAGAAC-3'
Oct-4	F:5'-AGCCCTCATTTCACCAGGCC-3' R:5'-TGGGACTCCTCCGGGTTTTG-3'
Nanog	F:5'-GGAGGGTGGAGTATGGTTGG-3' R:5'-TGAGGCAGGAGAATGGCGTG-3'
Sox2	F:5'-ATGTCCAGCACTACCAGAGC-3' R:5'-GTGTGGATGGGATTGGTGTCTC-3'
GAPDH	F:5'-ATTCCACCCATGGCAAATTC-3' R:5'-TGGGATTCATTGATGATAA-3'

1.4 CCK-8 法检测不同 Lin28 表达水平对 HepG2 细胞 5-Fu 敏感性的影响

通过细胞增殖活性反映细胞对 5-Fu 的敏感性, 采用 CCK-8 法检测细胞增殖活性。分别将各组细胞接种于 96 孔板中, 接种细胞密度为 5×10^3 /孔, 37°C 、5% CO_2 中培养, 四组细胞设置调零组(仅含培养基)、空白组(含培养基+细胞)、实验组(培养基+细胞+药物), 每组共设置 3 个复孔。培养箱孵育培养 12 h 后, 分别在各组细胞中加入不同干预物浓度(0、20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$)处理 48 h 后, 每孔加入 10 μl CCK8 试剂, 培养箱内孵育 1 h 后, 于 450 nm 波长处用酶标仪测光密度(D)值, 细胞增殖率=(实验组 D 值-调零孔 D 值)/(空白组 D 值-调零孔 D 值) $\times 100\%$ 。绘制细胞存活率-药物浓度关系曲线图, 同时计算药物 IC_{50} 。

1.5 流式细胞术检测转染后 HepG2 细胞的凋亡情况

将处于对数生长期的四组细胞用胰酶消化后, 以 2×10^5 /孔细胞密度接种于 6 孔板中, 继续培养 24 h, 并加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-Fu 干预 48 h。干预物处理结束后, 用 70% 乙醇固定细胞, 并根据试剂盒说明书操作步骤进行 Annexin V 及碘化丙酸(PI)染色避光孵育 15 min 后, 在 1 h 内用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。实验重复 3 次。

1.6 WB 法检测转染后各组 HepG2 细胞凋亡蛋白 Caspase-3 的表达水平

采用 RIPA 裂解液提取 HepG2/Vector 组、HepG2/Lin28 组、si-control 组、si-Lin28 组细胞蛋白, 根据 SDS-PAGE 试剂盒制定合适浓度的凝胶, 通过电泳分离细胞裂解物。将电泳结束后的凝胶通过电转移到 PVDF 膜。用针对 Lin28、Caspase 3 或 GAPDH 的一抗孵育。GAPDH 用作内参, 蛋白条带通过高敏的化学发光液进行检测, 采用 Image Lab 软件分析目的条带的灰度水平。实验重复 3 次。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行分析。正态分布计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本均数间比较采用 t 检验; 计数数据以百分数表示, 采用 Pearson χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Lin28 过表达显著抑制 HepG2 细胞对 5-Fu 药物的敏感性

为探索 Lin28 对 HepG2 细胞化疗敏感性的影响, 采用质粒转染 HepG2 细胞使 Lin28 过表达, qPCR 法检测结果(图 1A)显示, HepG2/Lin28 组中 Lin28 的 mRNA 的表达明显高于 HepG2/Vector 组 (20.53 ± 1.725 vs 1.0 ± 0.058 , $P < 0.01$); WB 法检测结果(图 1B)显示, HepG2/Lin28 组中 Lin28 的蛋白的表达明显高于 HepG2/Vector 组 (7.71 ± 1.337 vs 0.8 ± 0.225 , $P < 0.01$)。实验结果表明, Lin28 质粒在 HepG2/Lin28 细胞中高效率转染成功过表达, 使 Lin28 在转染后过表达。

用多种不同浓度(0、20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$)的 5-Fu 干预 HepG2/Vector 及 HepG2/Lin28 两组细胞 48 h, 采用 CCK-8 法检测细胞增殖活性, 结果(图 2A)显示, 过表达 Lin28 显著降低 HepG2 对 5-Fu 的敏感性, 其 IC_{50} 明显高于空载组 [(10.63 ± 0.67) vs (5.11 ± 0.14) $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$; 图 2B]。

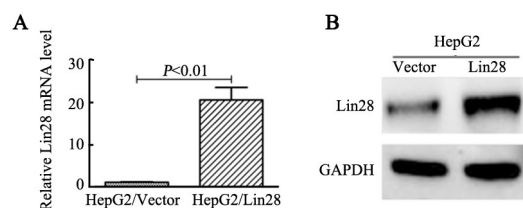


图1 qPCR(A)及WB(B)检测转染后 HepG2 细胞中过表达的 Lin28 水平

Fig.1 Over-expression of Lin28 in transfected HepG2 cells detected by qPCR (A) and WB (B)

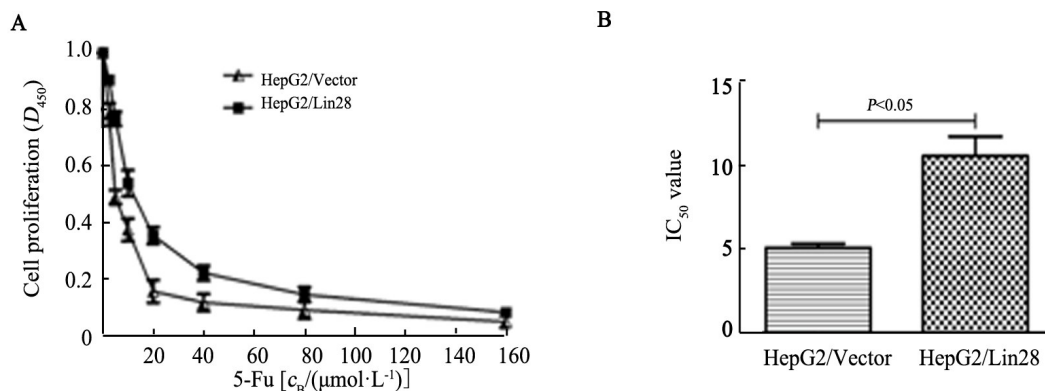


图2 Lin28 过表达可降低 HepG2 细胞对 5-Fu 的敏感性(A)并增加 5-Fu 的 IC_{50} (B)

Fig.2 Over-expression of Lin28 reduced sensitivity (A) of HepG2 to 5-Fu and increased IC_{50} (B) of 5-Fu

2.2 Lin28 过表达可抑制 5-Fu 诱导的 HepG2 细胞凋亡

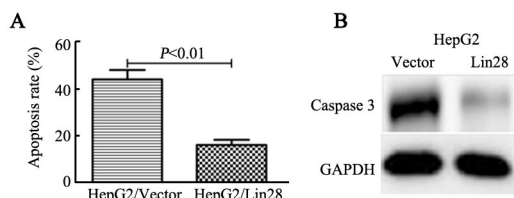
将 HepG2/Vector 及 HepG2/Lin28 细胞置于 10 μmol/L 浓度的 5-Fu 中干预 48 h, 并用 Annexin-V 对处理后的细胞进行染色后, 应用流式细胞术检测 Lin28 过表达对 5-Fu 诱导细胞凋亡的影响。结果(图 3A)显示, Lin28 过表达组的细胞凋亡率明显低于空载组[(15.97±1.257)% vs (44.03±2.291)%], $P<0.01$ 。WB 法检测凋亡相关蛋白的表达, 结果(图 3B)显示, HepG2/Lin28 组凋亡蛋白 Caspase-3 表达水平明显低于 HepG2/Vector 组(0.57±0.172 vs 5.74±1.466, $P<0.01$)。

2.3 敲减 Lin28 能显著促进 HepG2 细胞对 5-Fu 药物敏感性及其诱导其凋亡

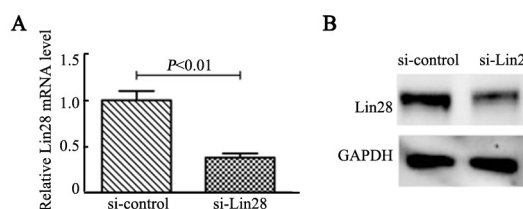
用 siRNA 下调 HepG2 细胞中的 Lin28 表达水平, 应用 qPCR 及 WB 方法检测验证 si-Lin28 在 HepG2 细胞中的下调水平和转染效率(图 4)。qPCR 法检测结果(图 4A)显示, si-Lin28 组中 Lin28 mRNA 的表达显著低于 si-control 组(0.377±0.026 vs 1.0±0.057, $P<0.01$); WB 法检测结果(图 4B)显示, si-Lin28 组中 Lin28 蛋白的表达明显低于 si-control 组(0.377±0.121 vs 3.632±0.836, $P<0.01$)。

用多种不同浓度(0、20、40、80、160 μmol/L)的 5-Fu 干预 si-control 及 si-Lin28 两组细胞 48 h, 采用 CCK-8 法检测细胞活性, 结果(图 5A)显示, 下调 Lin28 显著增加 HepG2 对 5-Fu 的敏感性, 其 IC_{50} 低于 si-control 组[(1.61±0.66) vs (7.62±0.44) μmol/L], $P<0.01$; 图 5B)。用 10 μmol/L 的 5-Fu 干预 si-control 及 si-Lin28 细胞 48 h, 并用 Annexin-V 对处理后的细胞进

行染色后, 应用流式细胞术检测 Lin28 下调对细胞凋亡情况的影响。结果(图 6A)显示, Lin28 下调组的细胞凋亡率明显高于 si-control 组[(37.73±1.660)% vs (15.63±1.041)%], $P<0.01$ 。WB 法检测凋亡蛋白 Caspase3 的表达, 结果显示(图 6B), si-Lin28 组中凋亡蛋白 Caspase3 的表达水平明显高于 si-control 组(3.48±0.81 vs 0.89±0.27, $P<0.05$)。



A: Cell apoptosis rate ; B: Expression of apoptotic protein
图 3 Lin28 过表达抑制 5-Fu 诱导的 HepG2 细胞凋亡
Fig.3 Over-expression of Lin28 inhibited 5-Fu-induced apoptosis in HepG2 cells



A: qPCR(A)及 WB(B)检测转染后 HepG2 细胞中下调的 Lin28 水平
图 4 qPCR(A)及 WB(B)检测转染后 HepG2 细胞中下调的 Lin28 水平
Fig.4 Down-regulated expression of Lin28 in transfected HepG2 cells detected by qPCR(A) and WB(B)

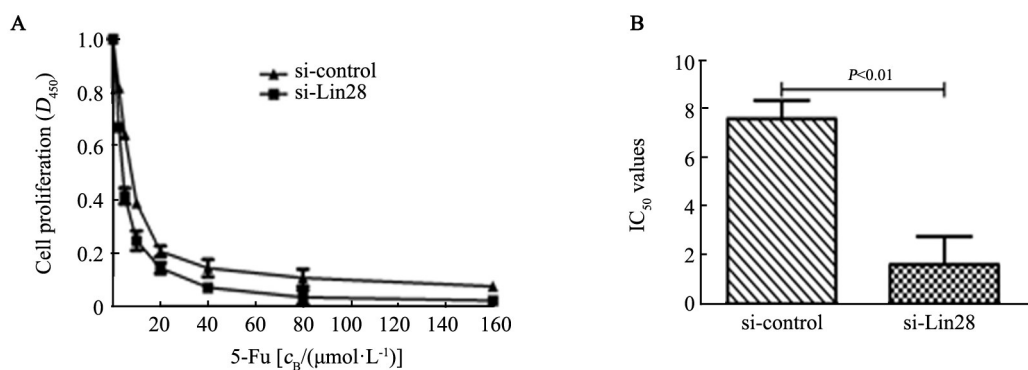


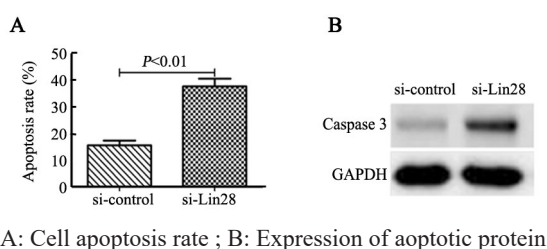
图 5 敲减 Lin28 增加 HepG2 细胞对 5-Fu 的敏感性(A)且降低 5-Fu 的 IC_{50} (B)
Fig.5 Knockdown of Lin28 increased sensitivity (A) of HepG2 to 5-Fu and reduced IC_{50} (B)

2.4 Lin28 影响 HepG2 细胞药物敏感相关分子和肿瘤干细胞相关标记物的表达水平

为探讨 Lin28 影响 HepG2 细胞 5-Fu 的药物敏感性机制, 在过表达或下调 Lin28 细胞中检测与化疗敏感性密切相关的 let-7a 及 let-7b mRNA 表达水平。

qPCR 检测结果(图 7)显示, 相较于 HepG2/Vector 组, HepG2/Lin28 明显降低 let-7a 及 let-7b mRNA 的表达(均 $P<0.01$)。进一步探索 Lin28 对肿瘤干细胞标记物表达水平的影响, qPCR 检测结果(图 8A、B)显示, 过表达 Lin28 能显著增加干细胞标记物 Oct4、Nanog、

Sox2 的表达水平, 而下调 Lin28 则抑制他们的表达 (均 $P < 0.01$)。



A: Cell apoptosis rate ; B: Expression of apoptotic protein

图6 敲减 Lin28 促进 5-Fu 诱导的 HepG2 细胞凋亡

Fig.6 Knockdown of Lin28 promoted 5-Fu-induced apoptosis in HepG2 cells

3 讨论

化疗是癌症的重要治疗方法之一, 不同组织来源的恶性肿瘤对化疗药物的敏感性不尽相同。对于包括肝细胞癌在内的实体肿瘤而言, 由于肿瘤内部药物摄取不足, 且存在多种影响细胞对不同药物反

应的内在因素, 使得肿瘤细胞表现出高度的耐药性。肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 其高度耐药性是引起肝癌患者预后差的重要原因。尽管近年来已经进行了大量的研究, 但肝癌的耐药机制尚未完全阐明。故深入了解肝癌的耐药机制, 对提高肝癌治疗效果和改善患者预后有着极其重要的意义。

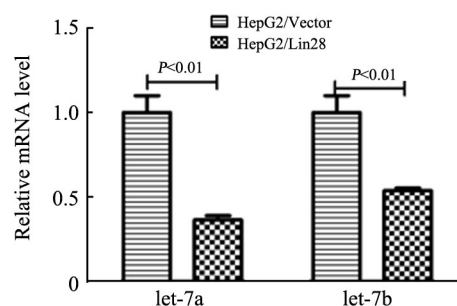


图7 过表达 Lin28 明显降低 let-7a 及 let-7b mRNA 的表达水平

Fig.7 Over-expression of Lin28 significantly reduced the expressions of let-7a and let-7b mRNA

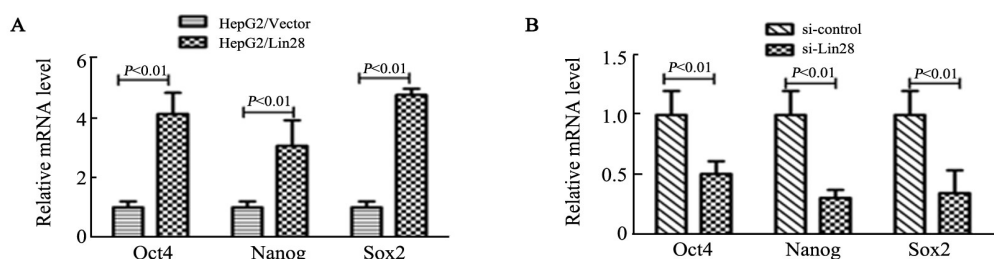


图8 Lin28 对干细胞标记物 Oct4、Nanog、Sox2 表达水平的影响

Fig.8 Effects of Lin28 on the expressions of stem cell markers Oct4, Nanog and Sox2

在既往的研究中发现, 一些基因如 p53、Ras、Raf-1、Bcl-2 及 Survivin 等的表达与化疗耐药有关。肿瘤干细胞在化疗耐药中的影响也越来越受到重视, 部分 miRNA 表达水平的变化被发现与化疗耐药密切相关, 也与肝癌细胞的增殖、侵袭和迁移密切相关^[9]。Lin28 在肝细胞癌中表达水平异常升高, 可促进乙型肝炎病毒感染 HCC 细胞的体外增殖^[10-11], 但尚无研究表明 Lin28 的调控异常与 HCC 的耐药有关。本研究通过质粒转染建立过表达 Lin28 的 HCC 细胞, 检测其对 5-Fu 药物的敏感性及其 IC_{50} 的变化、检测凋亡率及凋亡相关基因的表达变化等, 发现过表达 Lin28 可降低细胞对 5-Fu 的敏感性, 其 IC_{50} 升高, 而凋亡率及凋亡相关蛋白表达则显著下降 (均 $P < 0.01$)。进一步通过下调 Lin28 的表达水平进行反向验证, 证实了 Lin28 对 HepG2 细胞耐药表型的影响。

本研究还探讨了 Lin28 的作用机制。作为 RNA 结合蛋白, Lin28 可通过结合不同类型的 RNA 而发挥

促癌作用, 研究证实 Lin28 与某些 miRNAs 的加工过程有关^[6]。例如, Lin28 可诱导 let-7 前体的末端尿嘧啶化和降解, 通过抑制其体外加工过程而阻断 let-7 的生成, 从而降低成熟的 let-7 家族成员的水平。对于不同 let-7 家族成员而言, Lin28 基因敲除后都有明显的表达上调, 而其他 miRNAs 的水平则保持不变^[12]。这些数据表明, Lin28 可选择性阻止 let-7 家族前体 RNA 的形成过程。据报道^[13], let-7 的下调可促进抗凋亡基因的表达, 从而诱导肿瘤细胞凋亡抵抗, 降低肿瘤细胞对药物的敏感性。Let-7 还可通过抑制下游靶基因 HMGA2 及 K-ras 而影响肿瘤的进展^[14]。在恶性肿瘤中, 特定 let-7 家族中的 miRNA 过表达, 可降低 let-7 的表达水平从而导致化疗耐药^[15]。本研究结果表明, 在过表达 Lin28 的 HepG2 中, let-7a 和 let-7b 的 mRNA 水平显著降低 ($P < 0.01$)。因此, Lin28 可能通过影响 miRNA 的加工而影响 HCC 细胞的化疗敏感性。

Lin28 还是一种众所周知的肿瘤干细胞标记物, 多项研究证明它在诱导多能干细胞及维持肿瘤干细胞中发挥重要的作用, 近年来已逐渐成为热门的研究目标^[16]。在乳腺癌、头颈部肿瘤等多种人类恶性肿瘤中, Lin28 可通过增强肿瘤细胞的干性, 使其自我更新及侵袭能力、化疗耐药等能力增强, 促使肿瘤进展^[17-18]。而在肝细胞癌中, Lin28 作为胚胎源性的循环肿瘤干细胞标记物, 过表达 Lin28 可上调 Oct4、Nanog 和 Sox2 等干细胞标记物, 促进体外干细胞球的形成, 从而引起 HCC 的复发转移^[19]。本研究中发现, 过表达 Lin28 可升高肿瘤干细胞标记物 Oct4、Nanog 和 Sox2 的表达水平 ($P < 0.01$), 而下调 Lin28 时则上述肿瘤干细胞标记物的表达水平明显降低 ($P < 0.05$), 结果提示 Lin28 可通过潜在调节 HCC 干细胞, 从而增强其干细胞特性, 使其产生化疗耐药。

综上, 本研究结果证实了 Lin28 可调节肝癌 HepG2 细胞的化疗敏感性, 而影响 miRNAs 的形成过程及促进肿瘤干细胞特性可能是其作用机制。靶向调控 Lin28 的方式有望成为提高肝癌化疗敏感性的有效手段, 其在体内的作用及机制仍需要进一步的实验验证。

[参考文献]

- [1] NAZARI M, ROSENBLUM J S, TRUMBO S, et al. Hepatitis B-associated hepatocellular carcinoma in a young Haitian man: a review of screening guidelines[J/OL]. *BMJ Case Rep*, 2019, 12(10): pii: e230530[2019-11-05]. <https://casereports.bmj.com/content/12/10/e230530>. DOI: 10.1136/bcr-2019-230530.
- [2] ZHANG Y, TANG B, SONG J, et al. Lnc-PDZD7 contributes to stemness properties and chemosensitivity in hepatocellular carcinoma through EZH2-mediated ATOH8 transcriptional repression[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 92. DOI: 10.1186/s13046-019-1106-2.
- [3] WEST J A, VISWANATHAN S R, YABUUCHI A. A role for Lin28 in primordial germ-cell development and germ-cell malignancy[J]. *Nature*, 2009, 460(7257): 909-913. DOI: 10.1038/nature08210.
- [4] KIM Y J, GO H, WU H G, et al. Immunohistochemical study identifying prognostic biomolecular markers in nasopharyngeal carcinoma treated by radiotherapy[J]. *Head Neck*, 2011, 33(10): 1458-1466. DOI: 10.1002/hed.21611.
- [5] XU C, SHEN J, XIE S. Positive expression of Lin28 is correlated with poor survival in gastric carcinoma[J]. *Med Oncol*, 2013, 30(1): 382. DOI: 10.1007/s12032-012-0382-x.
- [6] LV K, LIU L, WANG L, et al. Lin28 mediates paclitaxel resistance by modulating p21, Rb and Let-7a miRNA in breast cancer cells [J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40008[2019-11-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3392258/>. DOI: 10.1371/journal.pone.004008.
- [7] TENG R, ZHOU J, JIANG Z, et al. The relationship between Lin28 and the chemotherapy response of gastric cancer[J/OL]. *Oncol Targets Ther*, 2013, 6: 1341-1345[2019-11-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3789745/>. DOI: 10.2147/OTT.S45705.
- [8] QIU J L, HUANG P Z, YOU J H, et al. LIN28 expression and prognostic value in hepatocellular carcinoma patients who meet the Milan criteria and undergo hepatectomy[J]. *Chin J Cancer*, 2012, 31(5): 223-232. DOI: 10.5732/CJC.011.10426.
- [9] 陈鹏, 崔锐, 梁鸿飞, 等. miR-195 靶向 TLR4 并阻断 NF- κ B 通路抑制肝癌细胞 HepG2 增殖和转移[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(5): 550-556. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.05.011.
- [10] QIU Z, ZHOU J, ZHANG C, et al. Antiproliferative effect of urolithin A, the ellagic acid-derived colonic metabolite, on hepatocellular carcinoma HepG2.2.15 cells by targeting Lin28a/let-7a axis[J/OL]. *Braz J Med Biol Res*, 2018, 51(7): e7220[2019-10-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5972012/>. DOI: 10.1590/1414.431x2018.7220.
- [11] GUO Y, CHEN Y, ITO H, et al. Identification and characterization of lin-28 homolog B (LIN28B) in human hepatocellular carcinoma [J]. *Gene*, 2006, 384: 51-61. DOI: 10.1016/j.gene.2006.07.011.
- [12] HEO I, JOO C, CHO J, et al. Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor microRNA[J]. *Mol Cell*, 2008, 32: 276-284. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.09.014.
- [13] ZHANG H, ZONG Y, QIU G, et al. Silencing Lin28 promotes apoptosis in colorectal cancer cells by upregulating let-7c targeting of antiapoptotic BCL2L1[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(4): 5143-5149. DOI: 10.3892/mmr.2018.8483.
- [14] TIAN N, HAN Z, LI Z, et al. Lin28/let-7/Bcl-xL pathway: the underlying mechanism of drug resistance in Hep3B cells[J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(3): 1050-1056. DOI: 10.3892/or.2014.3292.
- [15] XU X P, BAO Z Y, LIU Y L, et al. PBX3/MEK/ERK1/2/LIN28/let-7b positive feedback loop enhances mesenchymal phenotype to promote glioblastoma migration and invasion[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 158[2019-11-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6050701/>. DOI: 10.1186/s13046-018-0841-0.
- [16] PENG S, MAIHLE N J, HUANG Y, et al. Pluripotency factors Lin28 and Oct4 identify a subpopulation of stem cell-like cells in ovarian cancer[J]. *Oncogene*, 2010, 29: 2153-2159. DOI: 10.1038/onc.2009.500.
- [17] LI M, CHEN H, WU T. LIN28: A cancer stem cell promoter for immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Oral Oncol*, 2019, 98: 92-95. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2019.09.024.
- [18] PENG F, LI TT, WANG KL, et al. H19/let-7/LIN28 reciprocal negative regulatory circuit promotes breast cancer stem cell maintenance[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(1): e2569[2019-11-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5386357/>. DOI: 10.1038/cddis.2016.438.
- [19] HSU K F, SHEN M R, HUANG Y F, et al. Overexpression of the RNA-binding proteins Lin28B and IGF2BP3 (IMP3) is associated with chemoresistance and poor disease outcome in ovarian cancer [J]. *Br J Cancer*, 2015, 113(3): 414-424. DOI: 10.1038/bjc.2015.254.

[收稿日期] 2019-11-28

[修回日期] 2020-02-23

[本文编辑] 阮芳铭