

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2022.05.009

· 临床研究 ·

lncRNA ZFAS1 通过 miR-588/HMGA2 轴促进肝癌 HepG2 细胞的增殖、侵袭和迁移

韩建涛, 谢兴旺(武汉市第三医院首义院区 肝胆胰外科, 武汉 湖北 430060)

[摘要] **目的:** 探讨长链非编码 RNA 锌指结构反义转录本 1(lncRNA ZFAS1) 调控 miR-588/高迁移率蛋白 A2(HMGA2) 轴对肝癌 HepG2 细胞增殖、侵袭、迁移的影响。**方法:** qPCR、WB 法检测 80 例肝癌组织及对应癌旁组织(2018 年 1 月至 2019 年 12 月在武汉第三医院首义院区手术切除标本) 及人正常肝 LO2 细胞和肝癌 HepG2、Huh7、HCCLM3 细胞中 ZFAS1、miR-588 及 HMGA2 表达水平; 采用 Kaplan-Meier 进行患者生存曲线分析。将 HepG2 细胞分为空白组、si-NC 组、si-ZFAS1 组、si-ZFAS1+inhibitor NC 组、si-ZFAS1+miR-588 inhibitor 组; qPCR 检测各组 HepG2 细胞中 ZFAS1、miR-588 表达水平, WB 法检测各组 HepG2 细胞中 HMGA2 蛋白表达; CCK-8 法、Transwell 和划痕实验分别检测各组 HepG2 细胞的增殖、侵袭和迁移能力; 双荧光素酶报告基因实验分别验证 ZFAS1 和 miR-588、miR-588 和 HMGA2 的靶向关系。用 HepG2 细胞移植瘤裸鼠模型检测敲减 ZFAS1 或/和 miR-588 对移植瘤生长的影响。**结果:** 在肝癌组织和肝癌细胞中, ZFAS1、HMGA2 呈高表达, miR-588 呈低表达(均 $P<0.05$); ZFAS1 低表达患者 2 年生存率高于高表达组($P<0.05$); 与空白组比较, si-ZFAS1 组 ZFAS1、HMGA2 表达水平显著降低, miR-588 表达水平显著升高(均 $P<0.05$)。与 si-ZFAS1 组比较, si-ZFAS1+miR-588 inhibitor 组中 ZFAS1 表达水平无显著变化($P>0.05$), HMGA2 表达水平显著升高、miR-588 表达水平显著降低($P<0.05$); 敲减 ZFAS1 可抑制 HepG2 细胞的增殖、侵袭和迁移能力, 并抑制裸鼠体内移植瘤的生长(均 $P<0.05$); ZFAS1 靶向 miR-588 并抑制后者的表达, miR-588 靶向 HMGA2 并抑制后者的表达; 同时抑制 ZFAS1 和 miR-588 表达可逆转敲减 ZFAS1 对 HepG2 细胞增殖、侵袭与迁移能力及体内移植瘤生长的抑制作用(均 $P<0.05$)。**结论:** 敲减 ZFAS1 可通过促进 miR-588 表达来下调 HMGA2 表达, 进而抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖、侵袭与迁移能力。

[关键词] 长链非编码 RNA 锌指结构反义转录本 1; miR-588; 高迁移率蛋白 A2; 肝癌; 增殖; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R735.7; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)05-0449-07

lncRNA ZFAS1 promotes the proliferation, invasion, and migration of liver cancer HepG2 cells through the miR-588/HMGA2 axis

HAN Jiantao, XIE Xingwang (Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Shouyi Campus, Wuhan Third Hospital, Wuhan 430060, Hubei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of long non-coding RNA zinc finger antisense 1 (lncRNA ZFAS1) on the proliferation, invasion, and migration of liver cancer cells by regulating the miR-588/high mobility group AT-hook protein 2 (HMGA2) axis. **Methods:** Real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) and western blot were performed to measure the expression levels of ZFAS1, miR-588 and HMGA2 in 80 pairs of liver cancer tissues and corresponding para-cancerous tissues (the tissue sample were collected from Shouyi Campus, Wuhan Third Hospital during Jan. 2018 and Dec. 2019), human normal liver cell line (LO2) and liver cancer cell lines (HepG2, Huh7, HCCLM3). The survival of patients was analyzed using the Kaplan-Meier survival curve. HepG2 cells were divided into blank group, si-NC group, si-ZFAS1 group, si-ZFAS1+inhibitor NC group, and si-ZFAS1+miR-588 inhibitor group. qPCR was performed to measure the expression of ZFAS1 and miR-588 in HepG2 cells of each group, and Western blot was performed to measure the expression of HMGA2 protein in the cells. CCK-8 method, Transwell, and scratch test were performed to measure the proliferation, invasion, and migration of HepG2 cells. Dual-luciferase reporter gene experiment was performed to verify the targeting relationship between ZFAS1 and miR-588 as well as between miR-588 and HMGA2. A HepG2 cell transplanted tumor model was established in nude mice to examine the effect of silencing ZFAS1 or/and miR-588 on the growth of transplanted tumors. **Results:** ZFAS1 and HMGA2 were highly expressed while miR-588 was lowly expressed in liver cancer tissues and liver cancer cells (all $P<0.05$). The 2-year survival rate of patients with low ZFAS1 expression was higher than that in the high expression group ($P<0.05$). Compared with the blank group, the relative expression of ZFAS1 and HMGA2 protein in the si-ZFAS1 group was significantly

[基金项目] 武汉市卫生和计划生育委员会科研项目资助(No.WX18Q17)

[作者简介] 韩建涛(1981—), 男, 本科, 副主任医师, 主要从事肝胆胰外科的工作, E-mail: hjt1981h@163.com

[通信作者] 谢兴旺, E-mail: 3730214307@qq.com

reduced, and the relative expression of miR-588 was significantly increased (all $P < 0.05$); compared with the si-ZFAS1 group, the relative expression of ZFAS1 in the si-ZFAS1+miR-588 inhibitor group did not change significantly ($P > 0.05$), however, the relative expression of HMGA2 protein was significantly increased, and the relative expression of miR-588 was significantly reduced ($P < 0.05$). Silencing ZFAS1 was able to inhibit the proliferation, invasion, and migration of HepG2 cells and inhibit the growth of transplanted tumors in nude mice (all $P < 0.05$). ZFAS1 targeted and down-regulated the expression of miR-588, while miR-588 targeted and down-regulated the expression of HMGA2. Simultaneous inhibition of miR-588 expression could reverse the inhibitory effects of silencing ZFAS1 on the proliferation, invasion, and migration of HepG2 cells and the growth of transplanted tumors in nude mice (all $P < 0.05$).

Conclusion: Silencing ZFAS1 may down-regulate the expression of HMGA2 by promoting the expression of miR-588, thereby inhibiting the proliferation, invasion, and migration of liver cancer HepG2 cells.

[Key words] long non-coding RNA zinc finger antisense 1 (lncRNA ZFAS1); miR-588; high-mobility group AT-hook protein 2 (HMGA2); liver cancer; proliferation; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(5): 449-455. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.05.009]

肝癌是世界范围内的主要癌症之一,近年来发病率不断增加^[1]。尽管在手术治疗方面取得了进展,但该病复发、转移率高,预后差,因此治愈率仍然较低^[2]。为了有效预防肝癌的复发和转移,提高患者的治愈率,需要更好地了解肝癌发生发展的分子机制。大量证据表明长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 通过调节基因表达在许多细胞生理病理过程中发挥着重要作用^[3]。锌指结构反义转录本 1 (zinc finger antisense 1, ZFAS1) 作为一种 lncRNA, 在肝癌组织中高表达, 敲减 ZFAS1 可抑制肝癌细胞增殖^[4]; 敲减 ZFAS1 可通过上调 miR-1271-5p 表达同时下调己糖激酶 2 表达来抑制胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭^[5]。而 ZFAS1 通过海绵化 miRNA 来调控肝癌细胞增殖、迁移、侵袭的研究鲜有报道。本研究通过生物信息学分析发现, ZFAS1 与 miR-588、miR-588 与高迁移率蛋白 A2 (high-mobility group AT-hook2, HMGA2) 之间都存在结合位点。有研究^[6]显示, 抑制 miR-588 表达可促进肝癌细胞增殖; HMGA2 敲除可降低肝癌细胞 HepG2 的侵袭与转移能力^[7]。ZFAS1 能否通过调控 miR-588/HMGA2 轴影响肝癌细胞增殖、侵袭、迁移尚不明确。因此, 本研究主要探究 ZFAS1 通过 miR-588/HMGA2 轴对肝癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响及其分子机制。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集 2018 年 1 月至 2019 年 12 月在本院接受手术治疗的 80 例肝癌患者的肝癌组织以及距离癌组织约 4 cm 的癌旁组织。所有患者术前均未接受过化疗、放疗或靶向治疗, 并签署了知情同意书。对本研究中的 80 例肝癌患者进行为期 2 年的随访, 截止时间为 2021 年 12 月, 以电话或复查形式记录患者预后生存情况。本研究方案得到医院伦理委员会的批准 (批准号: 20171259)。

人正常肝 LO2 细胞及肝癌 HepG2、Huh7、HCCLM3 细胞均购自中国科学院上海细胞库。25 只 4 周龄、雄性 BALB/c 裸鼠购自长春祈健生物制品有限公司, 实验动物合格证号: [SYXK(吉)2020-0015]。所有动物实验遵循 3R 原则, 该动物实验研究方案得到本院动物伦理委员会的批准。

1.2 主要试剂

ZFAS1 小干扰 RNA (si-ZFAS1) 及其阴性对照 (si-NC)、miR-588 模拟物 (miR-588 mimic) 及其阴性对照 (miR-NC)、miR-588 抑制物 (miR-588 inhibitor) 及其阴性对照 (inhibitor NC) 均购自武汉华联科生物技术有限公司。胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (货号: S8056-00/01/05) 购自广州蕊特生物科技有限公司, DMEM 培养基 (货号: PM150210) 购自武汉益普生物科技有限公司, Lipofectamine™2000 转染试剂 (货号: 11668019) 购自上海恒斐生物科技有限公司, CCK-8 试剂盒 (货号: FY600001) 购自弗元(上海)生物科技有限公司, PrimeScript RT Master Mix (货号: RR036A-1) 购自北京麦瑞博生物科技有限公司, TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (货号: 4366596) 购自上海慧颖生物科技有限公司, SYBR Premix Ex Taq (货号: DRR041A) 购自北京智杰方远科技有限公司, 兔源 HMGA2 (货号: ab207301)、 β -actin (货号: ab8226) 一抗及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (货号: ab6721) 均购自美国 Abcam 公司。

1.3 细胞培养及转染

将 LO2、HepG2、Huh7、HCCLM3 细胞置于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中培养。取对数生长期的 HepG2 细胞, 分为空白组 (未转染的 HepG2 细胞)、si-NC 组 (si-NC 转染 HepG2 细胞)、si-ZFAS1 组 (si-ZFAS1 转染 HepG2 细胞)、si-ZFAS1+inhibitor NC 组 (si-ZFAS1 和 inhibitor NC 共转染 HepG2 细胞)、si-ZFAS1+miR-588 inhibitor 组 (si-ZFAS1 和 miR-588 inhibitor 共转染 HepG2 细胞), 利用 Lipofectamine™2000 转染试剂进行转染, 转

染 48 h 后, 收集细胞进行后续实验。

1.4 qPCR 检测肝癌组织及细胞中 ZFAS1、miR-588 的表达

使用 TRIzol 试剂从组织和转染前后的细胞中提取总 RNA, 利用 PrimeScript RT Master Mix 将总 RNA 逆转录为 cDNA (用于 ZFAS1 检测), 根据 SYBR Premix Ex Taq 说明书进行 qPCR, 以 GAPDH 为内参基因, 通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 ZFAS1 的表达水平。利用 TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit 将总 RNA 逆转录为 cDNA (用于 miR-588 的检测), 使用 SYBR Premix

Ex Taq 进行 qPCR, 以 U6 为内参基因, miR-588 的表达水平通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算。引物序列见表 1。

1.5 WB 法检测肝癌组织及细胞中 HMGA2 的表达

利用 RIPA 裂解缓冲液裂解组织或转染后的细胞并提取总蛋白, 经电泳、转膜、封闭后, 加入一抗 HMGA2 (1:2 000)、 β -actin (1:1 000) 抗体在 4 °C 下处理过夜。用 TBST 洗涤 3 次, 加入辣根过氧化物酶偶联的二抗 (1:2 000) 室温处理 1 h。TBST 洗涤后, 化学发光法进行显影, 使用 Image J 软件量化蛋白条带灰度值并计算目的蛋白相对表达量。

表 1 ZFAS1、miR-588、U6、GAPDH 基因的引物序列

基因名称	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
GAPDH	TGACGTGCCGCTGGAGAAC	CCGGCATCGAAGGTGGAAGAG
ZFAS1	GCGAAAGCCATCTTTGGTTA	GGGCAGGACAATAGCGTATG
U6	CTCGCTTCGGCAGCACAA	AACGCTTCACGAATTTGCGT
miR-588	GGGUUG GCCACAAUGGGU	GTCGTATCCAGTGC GTT

1.6 CCK-8 法检测 HepG2 细胞的增殖能力

将转染后的细胞以 5×10^3 个/孔接种在 96 孔板中, 在 37 °C、5% CO₂、含 10% FBS 的 DMEM 培养基中培养 48 h。然后向每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 继续培养 1 h。使用酶标仪在 450 nm 波长处测量光密度 (D) 值。

1.7 Transwell 实验检测 HepG2 细胞的侵袭能力

用无 FBS 的 DMEM 培养液将转染后的细胞稀释, 将 200 μ L 细胞悬液 (含 5×10^4 个细胞) 加入到人工基膜包被的 Transwell 上室中, 再向下室加入 800 μ L 含 20% FBS 的 DMEM 培养液。48 h 后, 用棉签除去留在上室表面膜上的 HepG2 细胞, 将细胞用 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, 0.1% 结晶紫在室温下染色 15 min。在光学显微镜下 ($\times 200$) 随机选取 5 个视野进行观察、计数并拍照。

1.8 划痕愈合实验检测 HepG2 细胞迁移能力

将细胞以 2×10^5 个/孔接种至 6 孔板中。当细胞生长到 80%~90% 汇合度时, 用 200 μ L 移液器吸头垂直于孔底部进行划痕, 保证每个孔中的划痕基本一致。用 PBS 洗涤 2 次后, 将细胞在无 FBS 的 DMEM 培养基中培养。利用显微镜观察 0、48 h 时的划痕宽度。划痕愈合率 = $(1 - 48 \text{ h 划痕宽度} / 0 \text{ h 划痕宽度}) \times 100\%$ 。

1.9 双荧光素酶报告基因实验验证 ZFAS1 与 miR-588 及 miR-588 与 HMGA2 的靶向关系

分别构建 ZFAS1 野生型质粒 (ZFAS1-WT) 和突变型质粒 (ZFAS1-MUT), 利用 Lipofectamine™2000 转染试剂盒将 ZFAS1-WT 和 ZFAS1-MUT 分别与 miR-NC 或 miR-588 mimic 共转染 HepG2 细胞, 转染

48 h 后, 使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测荧光素酶活性。分别构建 HMGA2 野生型质粒 (HMGA2-WT) 和突变型质粒 (HMGA2-MUT), 利用 Lipofectamine™2000 转染试剂将 HMGA2-WT 和 HMGA2-MUT 分别与 miR-NC 或 miR-588 mimic 共转染 HepG2 细胞 48 h 后, 通过双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测荧光素酶活性。

1.10 裸鼠体内 HepG2 细胞移植瘤实验

按随机数字表法, 将 BALB/c 裸鼠随机分为 5 组, 每组 5 只。收集 1.3 中的各组转染后细胞, 分别将各组细胞 (2×10^6 个) 注射到裸鼠右侧腋窝皮下, 并命名为裸鼠空白组、裸鼠 si-NC 组、裸鼠 si-ZFAS1 组、裸鼠 si-ZFAS1+inhibitor NC 组、裸鼠 si-ZFAS1+miR-588 inhibitor 组。注射 20 d 后, 采用颈椎脱臼法处死小鼠, 分离肿瘤并称重肿瘤质量。

1.11 统计学处理

以上所有实验均独立重复 3 次。利用 SPSS17.0 软件进行统计分析, 符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, t 检验用于两组之间的比较, 单因素方差分析用于多组间的比较, 进一步两组间的比较采用 SNK- q 检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 在肝癌组织和细胞中 ZFAS1、HMGA2 呈高表达, miR-588 呈低表达

qPCR 和 WB 法结果 (图 1) 显示, 与癌旁组织比较, 肝癌组织中 ZFAS1、HMGA2 呈高表达, miR-588 呈低表达 (图 1A-C, 均 $P < 0.05$); 与 LO2 细胞比较,

HepG2、Huh7、HCCLM3细胞中ZFAS1、HMGA2表达呈高水平,miR-588表达呈低水平,且HepG2细胞中ZFAS1、HMGA2表达水平最高、miR-588表达水平最低(图1D-F,均 $P<0.05$),因此,后续以HepG2细胞为研究对象。

2.2 ZFAS1高表达的肝癌患者的2年生存率较低

ZFAS1表达与肝癌患者生存时间的关系如图3

所示,经过2年随访后,80例患者60例生存、20例死亡,生存率为75.00%。根据ZFAS1表达水平的中位数(2.37)进行ZFAS1低表达与高表达分组,ZFAS1高表达组生存率为62.50%(25/40),低表达组生存率为87.50%(35/40),两组比较Log-Rank值为7.560, $P=0.006$ 。以上结果说明ZFAS1高表达肝癌患者的2年生存率低。

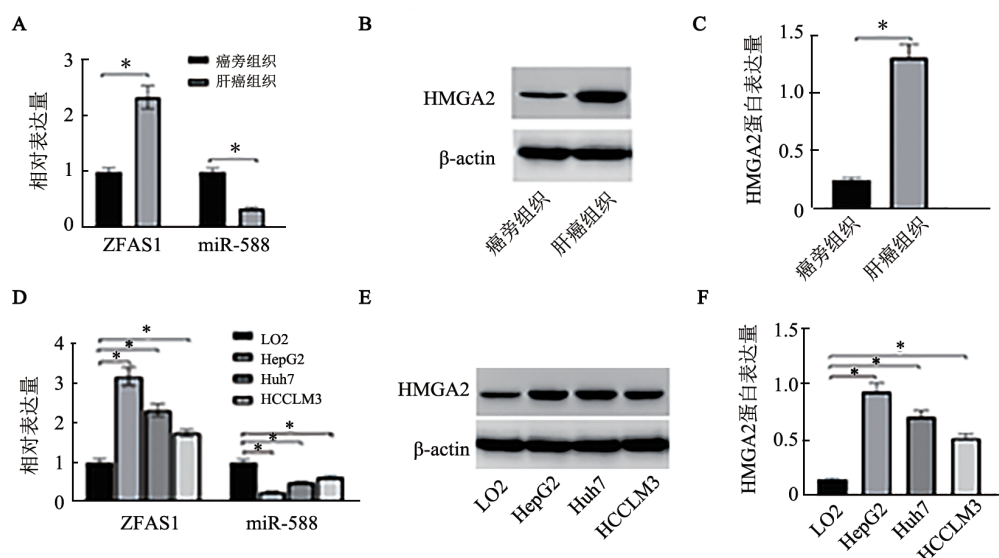


图1 ZFAS1、miR-588、HMGA2在肝癌组织和癌旁组织(A-C)及正常肝细胞和肝癌细胞(D-F)中的表达

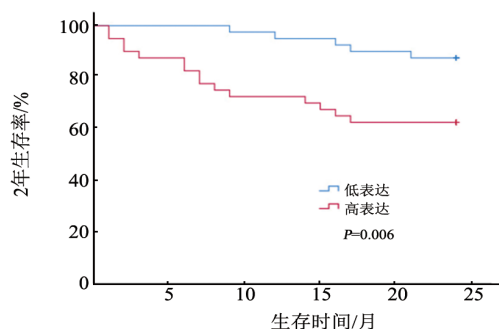


图2 ZFAS1表达与肝癌患者预后生存的关系

2.3 ZFAS1与mi-588及mi-588与HMGA2间分别存在靶向关系

利用LncBase Predicted v.2网预测发现ZFAS1与miR-588存在结合位点(图3A)。双荧光素酶报告基因检测结果显示,与miR-NC和ZFAS1-WT共转染组比较,miR-588 mimic和ZFAS1-WT共转染组(0.42 ± 0.03 vs 1.02 ± 0.08)的荧光素酶活性显著降低($P<0.05$);与miR-NC和ZFAS1-MUT共转染组比较,miR-588 mimic和ZFAS1-MUT共转染组(0.99 ± 0.08 vs 1.03 ± 0.12)荧光素酶活性差异无统计学意义($P>0.05$)。以上结果说明ZFAS1的3' UTR存在miR-588的结合位点。

利用Starbase网预测发现miR-588与HMGA2存在结合位点(图3B)。双荧光素酶报告基因检测结果显示,与miR-NC和HMGA2-WT共转染组比较,miR-588 mimic和HMGA2-WT共转染组(0.39 ± 0.04 vs 1.01 ± 0.12)的荧光素酶活性显著降低($P<0.05$);与miR-NC和HMGA2-MUT共转染组比较,miR-588 mimic和HMGA2-MUT共转染组(1.04 ± 0.15 vs 1.02 ± 0.13)荧光素酶活性差异无统计学意义($P>0.05$)。以上结果说明HMGA2的3' UTR存在miR-588的结合位点。

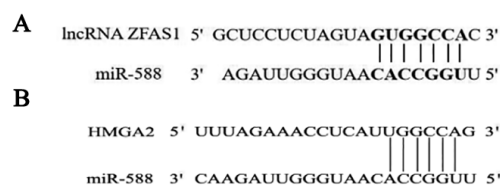


图3 LncBase Predicted v.2(A)和Starbase(B)预测ZFAS1与miR-588(A)和miR-588与HMGA2(B)之间的结合位点

2.4 HepG2细胞中ZFAS1负调控miR-588表达、而miR-588负调控HMGA2表达

qPCR和WB法结果(图4)显示,与空白组、si-NC组比较,si-ZFAS1组HepG2细胞中ZFAS1、HMGA2

表达量显著降低, miR-588 表达量显著升高(图 4A, 均 $P<0.05$); 与 si-ZFAS1+inhibitor NC 组比较, si-ZFAS1+miR-588 inhibitor 组 HepG2 细胞中 ZFAS1 表达量无显著变化($P>0.05$), HMGA2 蛋白表达量显著升高, miR-588 表达量显著降低(图 4B、C, 均 $P<0.05$)。以上结果说明, 在 HepG2 细胞中 ZFAS1 可靶向且负调控 miR-588 表达、而 miR-588 又负调控 HMGA2 表达。

2.5 ZFAS1 通过靶向 miR-588 影响 HepG2 细胞增殖、侵袭和迁移能力

CCK-8 法(图 5A)、Transwell 小室(图 5B)和划痕

愈合(图 5C)实验结果显示, 与空白组、si-NC 组比较, si-ZFAS1 组 HepG2 细胞的增殖能力、侵袭细胞数、划痕愈合率均显著降低(均 $P<0.05$); 与 si-ZFAS1 组、si-ZFAS1+inhibitor NC 组比较, si-ZFAS1+miR-588 inhibitor 组 HepG2 细胞的增殖能力、侵袭细胞数、划痕愈合率均显著升高(均 $P<0.05$)。以上结果说明敲减 ZFAS1 表达可抑制 HepG2 细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 如同时抑制 miR-588, ZFAS1 则能逆转敲减 ZFAS1 对 HepG 细胞增殖、迁移和侵袭能力的抑制作用。

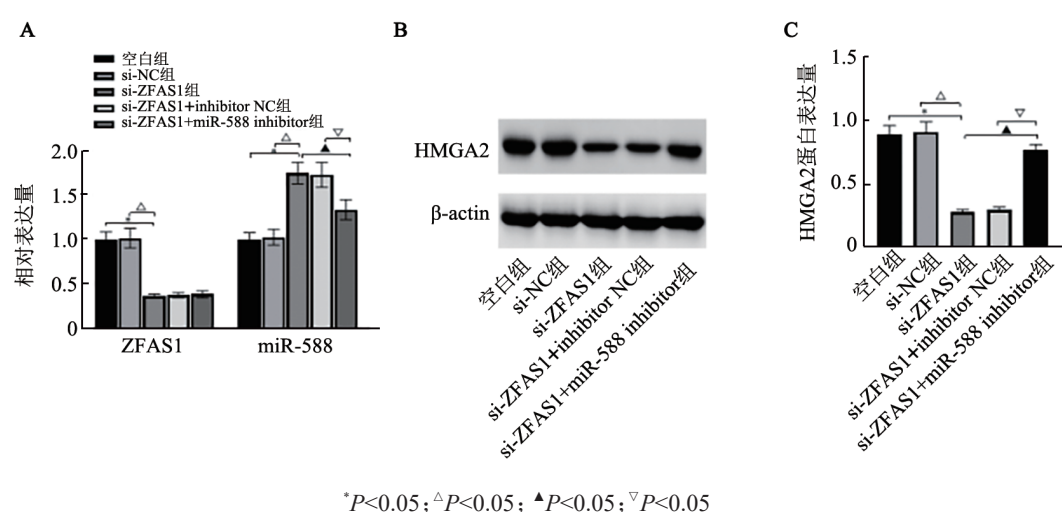


图4 ZFAS1通过靶向miR-588(A)调控HMGA2表达(B)

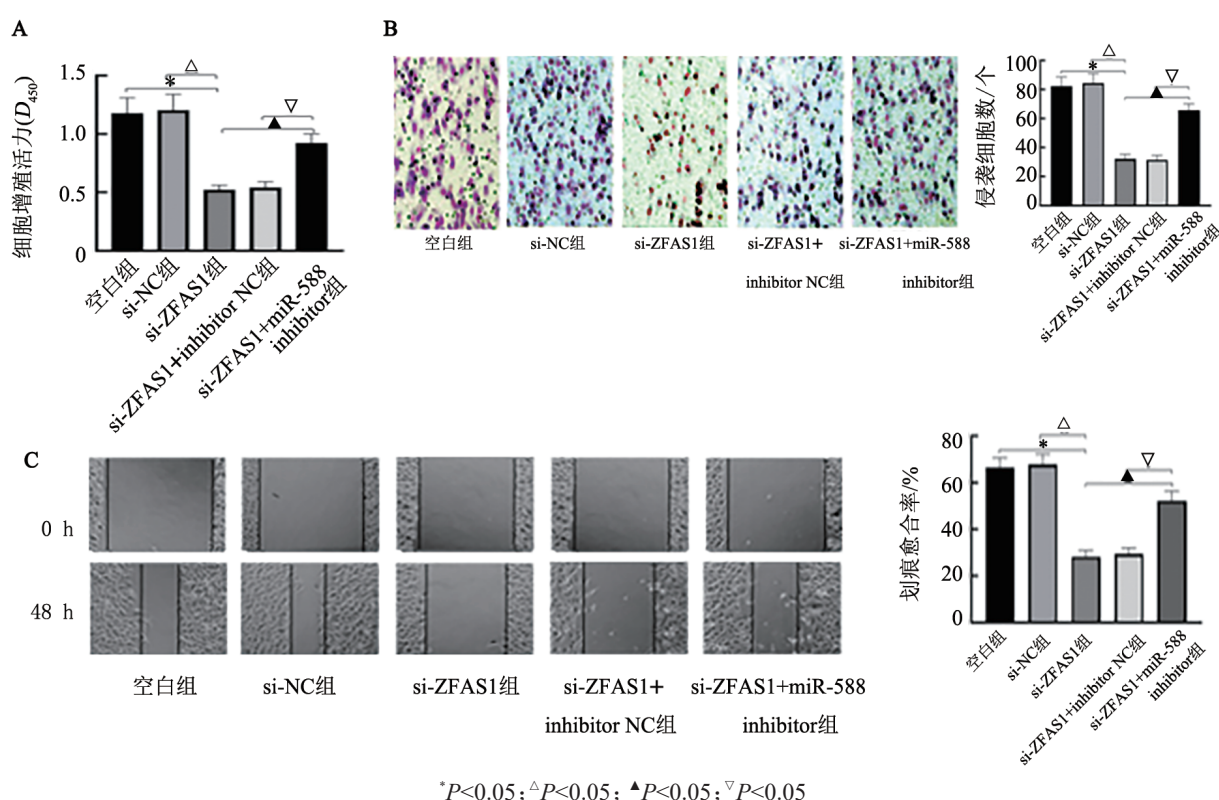
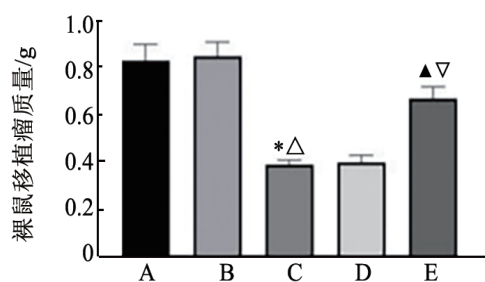


图5 ZFAS1通过靶向miR-588影响HepG2细胞增殖(A)、侵袭(B, $\times 200$)和迁移能力(C, $\times 100$)

2.6 ZFAS1 通过靶向 miR-588 影响体内 HepG2 细胞移植瘤的生长

裸鼠体内移植瘤实验结果(图6)显示,与裸鼠空白组、裸鼠 si-NC 组比较,裸鼠 si-ZFAS1 组体内移植瘤质量显著降低($P<0.05$);与裸鼠 si-ZFAS1 组、裸鼠 si-ZFAS1+inhibitor NC 组比较,裸鼠 si-ZFAS1+miR-588 inhibitor 组体内移植瘤质量显著升高($P<0.05$)。以上结果说明 ZFAS1 通过靶向 miR-588 表达影响裸鼠体内移植瘤生长。



* $P<0.05$; Δ $P<0.05$; ▲ $P<0.05$; ▽ $P<0.05$

A: 裸鼠空白组; B: 裸鼠 si-NC 组; C: 裸鼠 si-ZFAS1 组;
D: 裸鼠 si-ZFAS1+inhibitor NC 组; E: 裸鼠 si-ZFAS1+
miR-588 inhibitor 组

图6 ZFAS1 基因通过靶向 miR-588 影响体内
HepG2 细胞移植瘤的生长

3 讨论

越来越多的研究表明, lncRNA 在癌症的发生发展中起着关键作用, 其参与多种生物学功能, 如细胞增殖、凋亡和转移等^[8]。ZFAS1 是一种从锌指 NFX1 型反义方向转录的新型 lncRNA, 位于染色体 20q13.13 上^[9]。最近研究^[10]报道, 敲减 ZFAS1 可抑制鼻咽癌细胞的增殖, 诱导细胞凋亡。ZFAS1 在食管癌组织中高表达, 并促进食管癌细胞增殖、迁移的能力^[11]; ZFAS1 在肝癌患者血浆中高表达, 其可作为诊断肝癌的生物标志物^[12]; 敲减 ZFAS1 能够抑制非小细胞肺癌细胞的增殖、侵袭能力^[13]。本研究结果显示, ZFAS1 在肝癌组织和肝癌 HepG2、Huh7、HCCLM3 细胞中高表达, 且在 HepG2 细胞中的表达量最高; ZFAS1 低表达患者 2 年生存率高于高表达组。敲减 ZFAS1 可抑制 HepG2 细胞增殖、侵袭与迁移, 且抑制裸鼠体内移植瘤的生长。这与以往研究结果一致, 表明 ZFAS1 可影响肿瘤细胞的增殖、侵袭与迁移, 提示 ZFAS1 在肝癌中发挥着促癌的作用。

lncRNA 作为竞争性内源性 RNA, 可以通过海绵化 miRNA 调控基因表达, 进而调控肿瘤的进展^[14]。如 ZFAS1 通过海绵化 miR-3924 促进胰腺癌转移^[15];

上调 ZFAS1 可通过海绵化 miR-1271-5p 和上调成纤维细胞生长因子受体底物 2 促进肺腺癌细胞增殖、迁移和侵袭^[16]。以往研究报道, miR-588 在多种人类癌症中异常表达, 如 miR-588 在肺癌细胞中低表达, 抑制其表达可促进肺癌细胞增殖、迁移、侵袭^[17]; miR-588 在胃癌组织中低表达, 过表达 miR-588 可抑制胃癌细胞迁移、侵袭^[18]。本研究结果显示, 敲减 ZFAS1 后 miR-588 的表达量显著升高, 提示敲减 ZFAS1 可能通过上调 miR-588 来抑制 HepG2 细胞增殖、侵袭与迁移。本研究进一步利用 miR-588 抑制剂 miR-588 inhibitor 进行干预, 结果发现, miR-588 inhibitor 能逆转敲减 ZFAS1 对 HepG2 细胞增殖、侵袭与迁移的抑制作用, 同时还减弱敲减 ZFAS1 对裸鼠体内移植瘤生长的抑制作用; 同时双荧光素酶报告基因实验也证实 ZFAS1 可靶向调控 miR-588 的表达, 以上结果表明, 敲减 ZFAS1 可能通过上调 miR-588 来抑制肝癌 HepG2 细胞增殖、侵袭与迁移。

为了进一步探究 miR-588 调节肝癌细胞增殖、侵袭与迁移的机制, 本研究利用 Starbase 网址预测显示 miR-588 与 HMGA2 存在结合位点。HMGA2 基因是染色质重塑家族成员, 已被确定为许多恶性肿瘤中的致癌基因^[19]。相关研究^[20]显示, miRNA-9 通过靶向抑制 HMGA2 对肝癌进展发挥抗肿瘤作用; HMGA2 在肝癌中高表达, 其高表达水平与患者预后不良显著相关^[21]。本研究结果显示, HMGA2 在肝癌组织和细胞中高表达, 敲减 ZFAS1 后, miR-588 表达量升高、HMGA2 蛋白表达降低, 在敲减 ZFAS1 的基础上再加入 miR-588 inhibitor 进行干预发现, miR-588 表达量降低而 HMGA2 蛋白表达升高; 同时双荧光素酶报告基因实验证实了 miR-588 可靶向调控 HMGA2 的表达, 提示敲减 ZFAS1 可能通过调控 miR-588/HMGA2 轴来抑制肝癌 HepG2 细胞增殖、侵袭与迁移。

综上所述, ZFAS1 在肝癌组织和肝癌细胞中高表达, 敲减 ZFAS1 可能通过促进 miR-588 表达来下调 HMGA2 表达, 进而抑制肝癌细胞增殖、侵袭与迁移。本研究结果可能为开发新的肝癌靶向治疗方案提供新的实验依据。

[参考文献]

- [1] GAO S, ZHU D J, ZHU J, *et al.* miR-18a-5p targets FBP1 to promote proliferation, migration, and invasion of liver cancer cells and inhibit cell apoptosis[J/OL]. *Comput Math Methods Med*, 2021, 2021: 3334065[2021-12-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34221105/>. DOI:10.1155/2021/3334065.
- [2] 曹斌, 花姜酮. 调控 miR-490-3p/Bcl-w 诱导肝癌细胞凋亡和抑制细胞迁移、侵袭的机制[J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(23): 5335-5340. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2021.23.042.

- [3] JI D L, ZHONG X Y, JIANG X M, *et al.* The role of long non-coding RNA AFAP1-AS1 in human malignant tumors[J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(10): 1524-1531. DOI:10.1016/j.prp.2018.08.014.
- [4] ZHOU H L, ZHOU Y F, FENG Z T. Long noncoding RNA ZFAS1 promotes hepatocellular carcinoma proliferation by epigenetically repressing miR-193a-3p[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(22): 9840-9847. DOI:10.26355/eurrev_201911_19547.
- [5] ZHANG B, CHEN J, CUI M, *et al.* lncRNA ZFAS1/miR-1271-5p/HK2 promotes glioma development through regulating proliferation, migration, invasion and apoptosis[J]. *Neurochem Res*, 2020, 45(12): 2828-2839. DOI:10.1007/s11064-020-03131-x.
- [6] LIU Z K, MO H Y, SUN L K, *et al.* Long noncoding RNA PICSAR/miR-588/EIF6 axis regulates tumorigenesis of hepatocellular carcinoma by activating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(11): 4118-4128. DOI:10.1111/cas.14631.
- [7] 徐涛, 顾鹏, 陈傍柱, 等. 利用CRISP R/Cas9系统构建HMGA2敲除肝癌细胞株及其功能鉴定[J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(12): 23-29. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2020.12.004.
- [8] SUN L K, WANG L, CHEN T X, *et al.* lncRNA RUNX1-IT1 which is downregulated by hypoxia-driven histone deacetylase 3 represses proliferation and cancer stem-like properties in hepatocellular carcinoma cells[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2): 95[2021-12-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32024815/>. DOI: 10.1038/s41419-020-2274-x.
- [9] HE A B, HE S M, LI X S, *et al.* ZFAS1: a novel vital oncogenic lncRNA in multiple human cancers[J/OL]. *Cell Prolif*, 2019, 52(1): e12513[2021-12-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30288832/>. DOI:10.1111/cpr.12513.
- [10] 刘爽, 马文成, 王伟. 敲减lncRNA ZFAS1通过miR-135a抑制鼻咽癌细胞增殖、诱导凋亡[J]. *现代肿瘤医学*, 2021, 29(13): 2239-2243. DOI:10.3969/j.issn.1672-4992.2021.13.007.
- [11] 张千, 朱亚宁, 周武碧. 长链非编码RNA ZFAS1在食管癌中的表达及作用机制研究[J]. *转化医学杂志*, 2020, 9(6): 326-330, 350. DOI:10.3969/j.issn.2095-3097.2020.06.002.
- [12] LUO P, LIANG C Z, ZHANG X W, *et al.* Identification of long non-coding RNA ZFAS1 as a novel biomarker for diagnosis of HCC[J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(4): BSR20171359 [2021-12-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29559565/>. DOI:10.1042/BSR20171359.
- [13] ZENG Z L, ZHAO G F, RAO C Z, *et al.* Knockdown of lncRNA ZFAS1-suppressed non-small cell lung cancer progression via targeting the miR-150-5p/HMGA2 signaling[J/OL]. *J Cell Biochem*, 2019: 2019Nov6 [2021-12-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31692094/>. DOI:10.1002/jcb.29542.
- [14] LIU Z K, WANG Y F, WANG L, *et al.* Long non-coding RNA AGAP2-AS1, functioning as a competitive endogenous RNA, upregulates ANXA11 expression by sponging miR-16-5p and promotes proliferation and metastasis in hepatocellular carcinoma [J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 194 [2021-12-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31088485/>. DOI: 10.1186/s13046-019-1188-x.
- [15] LIU J Y, ZHU Y Q, GE C L. lncRNA ZFAS1 promotes pancreatic adenocarcinoma metastasis via the RHOA/ROCK2 pathway by sponging miR-3924[J/OL]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20: 249 [2021-12-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32550827/>. DOI: 10.1186/s12935-020-01322-8.
- [16] FAN G, JIAO J, SHEN F, *et al.* Upregulation of lncRNA ZFAS1 promotes lung adenocarcinoma progression by sponging miR-1271-5p and upregulating FRS2[J]. *Thorac Cancer*, 2020, 11(8): 2178-2187. DOI:10.1111/1759-7714.13525.
- [17] 徐红艳, 楚晓飞, 葛茂功, 等. miR497HG靶向miR-588调控肺癌细胞增殖、迁移侵袭和凋亡的机制研究[J]. *临床肺科杂志*, 2020, 25(3): 393-398. DOI:10.3969/j.issn.1009-6663.2020.03.017.
- [18] ZHOU X R, XU M L, GUO Y H, *et al.* MicroRNA-588 regulates invasion, migration and epithelial-mesenchymal transition via targeting EIF5A2 pathway in gastric cancer[J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10: 5187-5197. DOI:10.2147/CMAR.S176954.
- [19] CHEN X X, ZENG K X, XU M, *et al.* P53-induced miR-1249 inhibits tumor growth, metastasis, and angiogenesis by targeting VEGFA and HMGA2[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(2): 131 [2021-12-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30755600/>. DOI: 10.1038/s41419-018-1188-3.
- [20] XU X G, ZOU H B, LUO L Y, *et al.* MicroRNA-9 exerts antitumor effects on hepatocellular carcinoma progression by targeting HMGA2[J]. *FEBS Open Bio*, 2019, 9(10): 1784-1797. DOI: 10.1002/2211-5463.12716.
- [21] ZHAO Y C, JIAO Y, LI Y Q, *et al.* Elevated high mobility group A2 expression in liver cancer predicts poor patient survival[J]. *Rev Esp Enferm Dig*, 2020, 112(1): 27-33. DOI: 10.17235/reed.2019.6365/2019.

[收稿日期] 2022-03-01

[修回日期] 2022-04-25

[本文编辑] 向正华