

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; GTPBP4

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^[1]。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^[2]。

近年来,越来越多的证据^[3]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

提供了新的治疗靶点。有研究^[4]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^[5]。此外,LncRNA-LET 可抑制肝癌的侵袭和腹腔转移^[6]。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^[7];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 °C 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 L02。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 °C、5% CO₂ 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-AS1 shRNA (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: GGATGTGCACAGTGATCAAGA; si-NC: 5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-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

2021-10-20 接收

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¹ 消化科、² 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

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 μ l 小管的管尖部分造成划痕。通过 1 $\times$ 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 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(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 PierceTM 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 PrimeScriptTM 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'-GTCAGTCTTCGGTGTCTGC-3', (R) 5'-CAGTCAGGTGTTGCTCGTGAG-3'; miR-873-5p, (F) 5'-GCAGGAAGTTGTGAGTCTCC-3', (R) 5'-CTTGAACACTCAGAGGAAGG-3'; GTPBP4, (F) 5'-GTTGCTAAAGATTATGTGCGACTG-3', (R) 5'-CAAACGGGATAAATGCTGACG-3'; GAPDH, (F) 5'-TATGATGATATCAAGAGGCTAGT-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 $^{\circ}$ C 孵育过夜,其后与 HRP 偶联的二抗(1:5 000 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 $\bar{x} \pm s$ 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 ANOVA 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)。

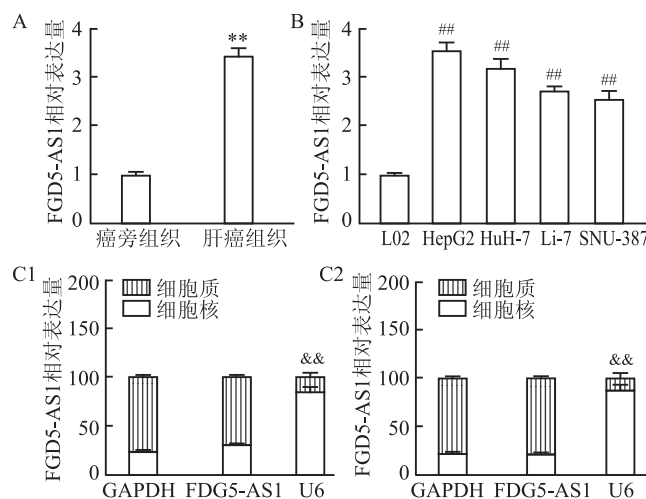


图 1 FGD5-AS1 在 HCC 组织和细胞中的表达

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: ## $P < 0.01$; 与 FGD5-AS1 比较: && $P < 0.01$

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 种凋亡标志物 (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。

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

通过搜索在线生物信息学数据库来预测 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, 萤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

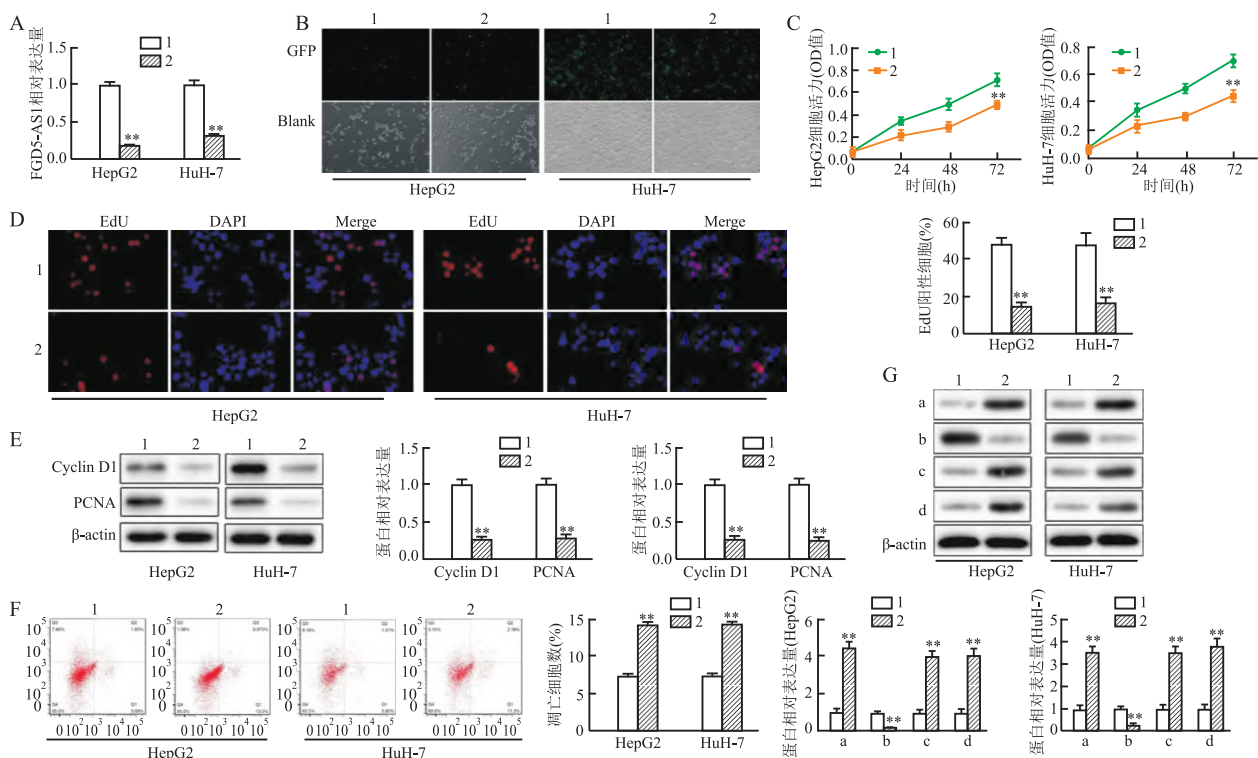


图 2 下调 FGD5-AS1 对 HCC 细胞增殖及凋亡的影响

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 $\times 100$; C: CCK-8 测定结果; D: EdU 分析图像 $\times 100$; 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。

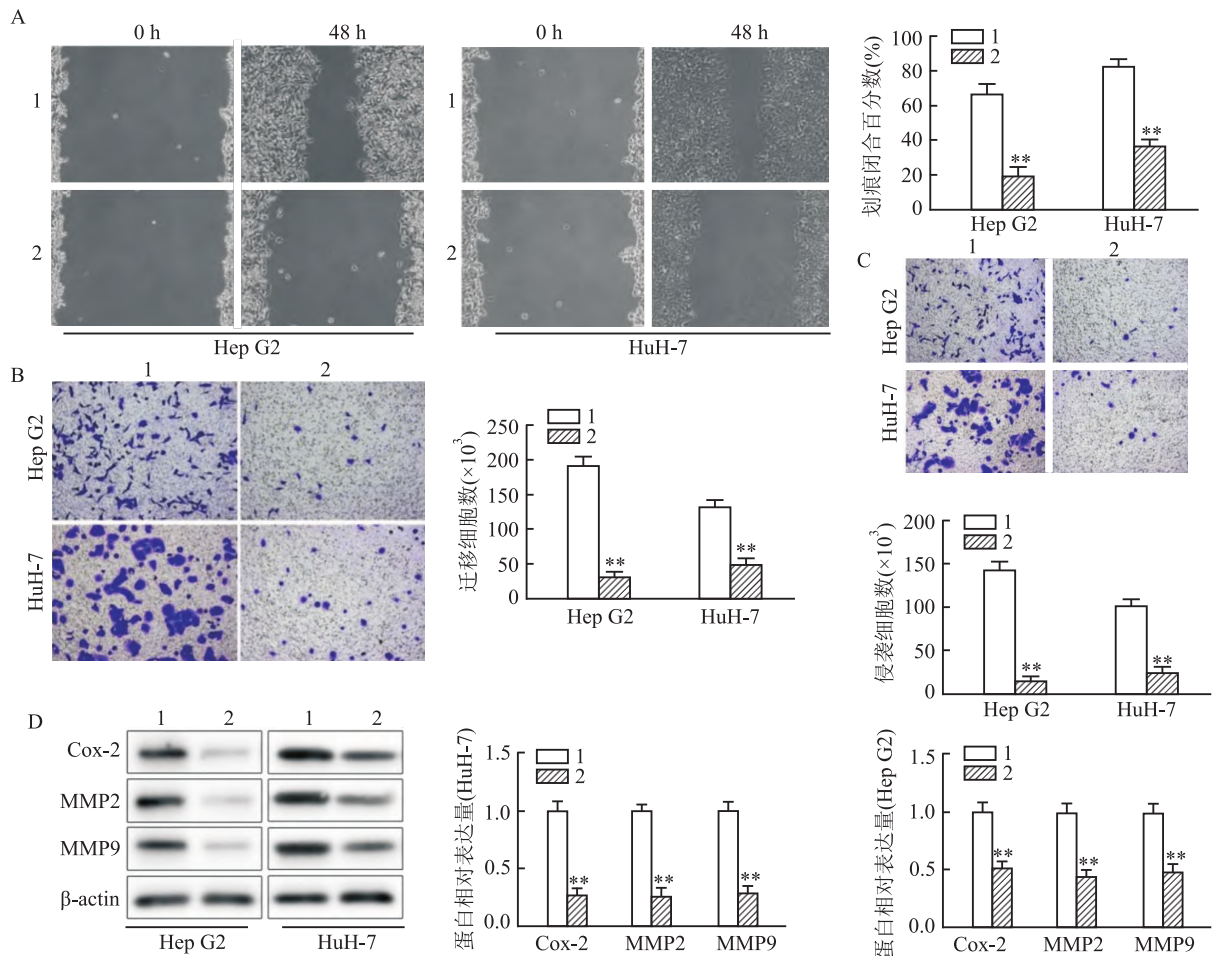


图3 下调 FGD5-AS1 对 HCC 细胞的迁移和侵袭的影响

A:细胞划痕实验 $\times 100$;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 $\times 100$;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 $\times 100$;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: ** $P < 0.01$

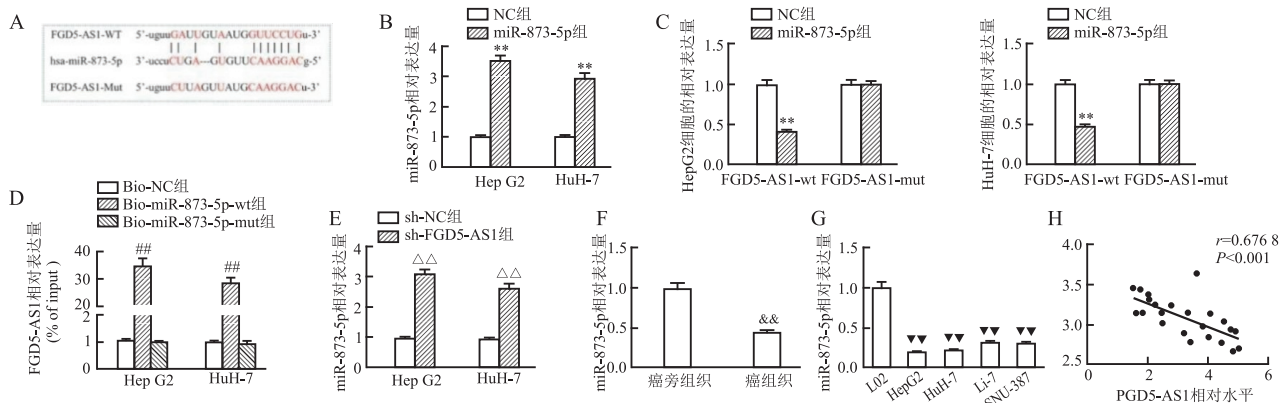


图4 FGD5-AS1 在 HCC 细胞中靶向 miR-873-5p 情况

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 之间的相关性分析;与 NC 组比较: ** $P < 0.01$;与 Bio - NC 组比较: ## $P < 0.01$;与 sh-NC 组比较: $\Delta\Delta$ $P < 0.01$;与癌旁组织比较: && $P < 0.01$;G:与 L02 细胞系比较: $\nabla\nabla$ $P < 0.01$

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 GTPBP4 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 RT-qPCR 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 GTPBP4 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^[8-12]。本研究显示,lncRNA FGD5-AS1 在 HCC 组织中的表达明显高于相

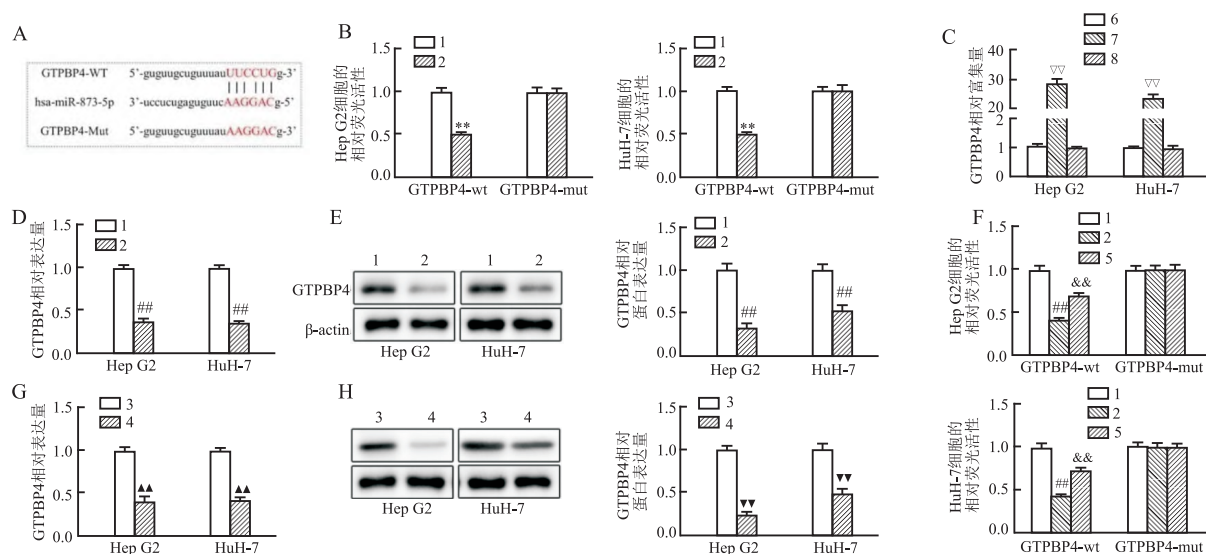


图 5 FGD5-AS1 与 miR-873-5p 竞争性结合对 GTPBP4 的影响

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; 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-wt 组; 8: miR-873-5p-mut 组; 与 GTPBP4-mut 比较: ** $P < 0.01$; 与 Bio-NC 组比较: $\nabla \nabla P < 0.01$; 与 NC mimic 组比较: $\# P < 0.01$; 与 miR-873-5p mimic 组比较: $\&\& P < 0.01$; 与 sh-NC 组比较: $\blacktriangledown \blacktriangledown P < 0.01$

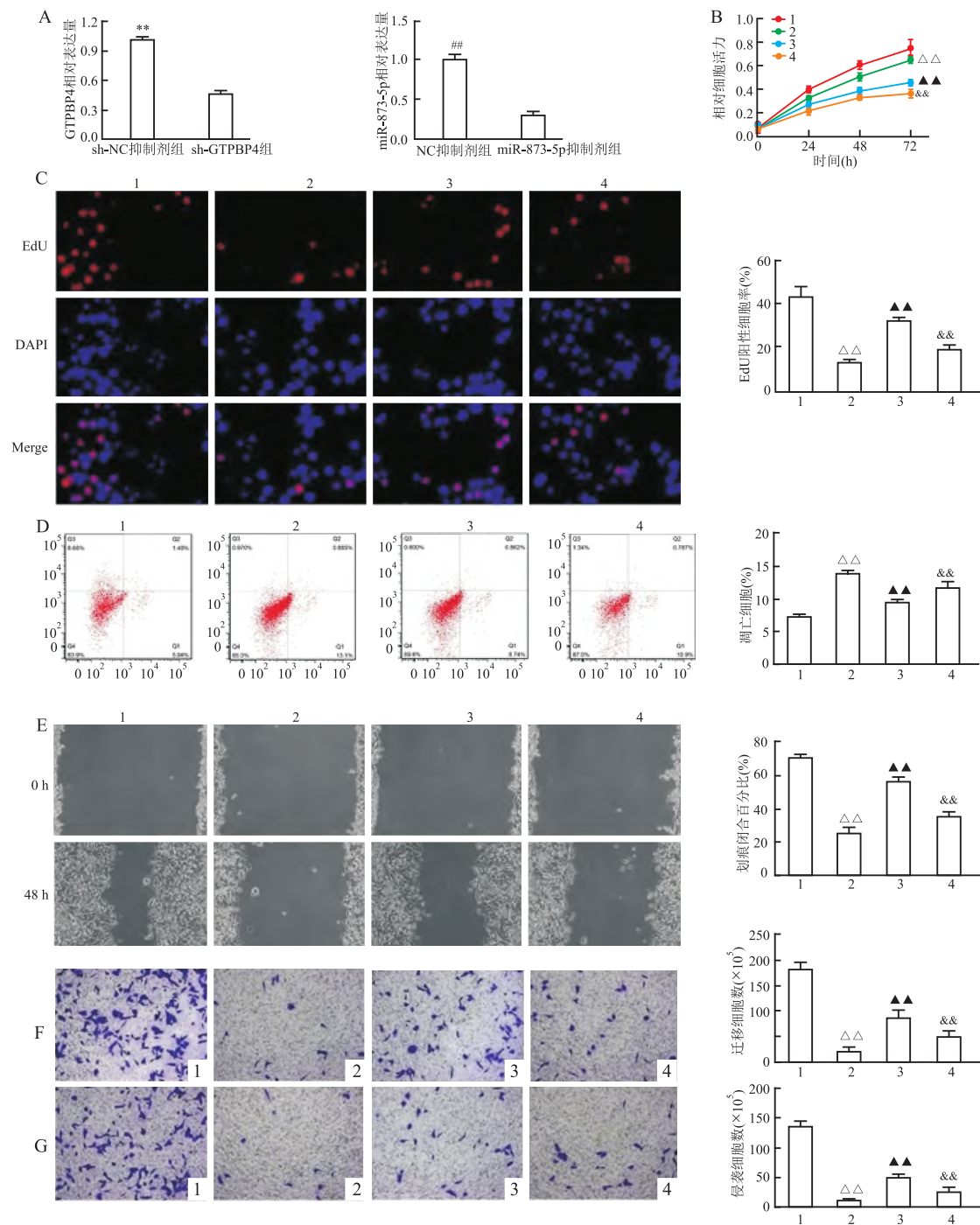


图6 FGD5-AS1/miR-873-5p/GTPBP4轴在HCC中的作用

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-GTPBP4组比较: ** $P < 0.01$; 与miR-873-5p抑制剂组比较: ## $P < 0.01$; 与sh-FGD5-AS1 + NC抑制剂组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与FGD5-AS1 + miR-873-5p抑制剂组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与FGD5-AS1 + miR-873-5p抑制剂 + sh-GTPBP4组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

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^[13]。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, GTPBP4 已被报道可促进包括 HCC 在内的多种癌症的进展^[14-15]。然而,在 HCC 中 miR-873-5p 和 GTPBP4 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, lncRNA 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

- [1] 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.
- [2] Llovet J M, Bustamante J, Castells A, et al. Natural history of untreated nonsurgical hepatocellular carcinoma: rationale for the design and evaluation of therapeutic trials[J]. *Hepatology*, 1999, 29(1):62-7.
- [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.
- [4] 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.
- [5] 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 non-coding RNA-LET by histone deacetylase 3 contributes to hypoxia-mediated 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 Nuobei¹, Huang Shen'an¹, Shen Hao¹, Chen Xin²

(¹Dept of Gastroenterology, ²Dept 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:2022-1-20 15:55 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)共载体体系,以协同递送肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(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 10 h 内释放 57.8%的 VPF,45 h 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(IC₅₀)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^[2]。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^[3]。Hiemer et al^[4]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^[5]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-

2021-10-25 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

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