

创新团队成果专栏

低氧诱导的长链非编码RNA 68在肝癌中的功能及其作用机制

谭 露¹, 沈少明², 何 平³

1. 上海交通大学基础医学院病理生理学系, 上海 200025; 2. 上海交通大学医学院附属仁济医院衰老与组织修复研究院, 上海 200240; 3. 上海交通大学医学院附属仁济医院上海市肿瘤研究所, 上海 200240

[摘要] **目的**·探究肝癌细胞系中受低氧诱导的长链非编码RNA 68 (hypoxia-induced long non-coding RNA 68, HILRNA68) 的功能以及其相关机制。**方法**·利用长链非编码RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 芯片研究低氧 (hypoxia) 与常氧 (normoxia) 分别处理 12 h 的肝癌细胞系 SMMC-7721 中表达变化的 lncRNA, 通过 R 语言 DEseq2 程序包分析低氧下表达显著变化的 lncRNA, 并利用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 验证差异 lncRNA。通过短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 稳定敲除细胞内的低氧诱导因子 (hypoxia inducible factors, HIFs) 用以研究低氧下 HILRNA68 转录是否受 HIFs 的调控。通过细胞核浆分离, 结合 qRT-PCR 检测以及 RNA 荧光原位杂交技术 (RNA fluorescence *in situ* hybridization, RNA-FISH) 实验研究 HILRNA68 的亚细胞定位。通过小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 分别在 SMMC-7721 和 MHCC-97H 细胞中敲低 HILRNA68 以研究其在低氧下的细胞功能。通过细胞生长计数实验以及 Transwell 细胞侵袭实验分别探究低氧下 HILRNA68 对肝癌细胞的生长增殖以及侵袭转移能力的影响。此外, 通过双荧光素酶报告基因实验研究敲低 HILRNA68 后是否抑制 *HIF1 α* 的转录活性。**结果**·通过对 lncRNA 芯片的结果进行差异基因分析, 共得到 247 个升高和 17 个降低的 lncRNA [定义为倍数变化 (fold change) ≥ 4 , 伪发现率 (false discovery rate, FDR) ≤ 0.05]。在差异基因中发现 HILRNA68 在多个经低氧处理的细胞系中均稳定升高约 10 倍。低氧下敲低 *HIF1 α* 、*HIF2 α* 、*HIF1 β* 均显著抑制 HILRNA68 的升高 (均 $P < 0.05$), 荧光素酶报告基因实验表明其转录受到 HIFs 的调控。亚细胞定位研究表明 HILRNA68 主要定位于细胞核。细胞功能实验结果表明敲低 HILRNA68 显著抑制肝癌细胞 SMMC-7721 与 MHCC-97H 在低氧下的增殖以及侵袭能力 (均 $P < 0.05$)。机制研究表明, 敲低 HILRNA68 显著抑制低氧下 *HIF1 α* 的转录活性 ($P < 0.05$); *HIF1 α* 靶基因在低氧下的升高在敲低 HILRNA68 后被显著抑制 ($P < 0.05$)。**结论**·研究鉴定出一批低氧下表达显著变化的 lncRNA, 并功能注释了其中升高的 HILRNA68。HILRNA68 受 HIFs 调控而升高, 升高后促进细胞低氧下的增殖以及侵袭转移能力; 机制上, HILRNA68 低氧下表达升高后促进 *HIF1 α* 的转录活性。

[关键词] 低氧; 低氧诱导因子; 长链非编码RNA; 细胞增殖; 细胞侵袭; TCONS_00027424**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2024.06.005 **[中图分类号]** R735.7 **[文献标志码]** A

Function and mechanism study of hypoxia-induced long non-coding RNA 68 in hepatocellular carcinoma

TAN Lu¹, SHEN Shaoming², HE Ping³

1. Department of Pathophysiology, Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medical Sciences, Shanghai 200025, China; 2. Institute of Aging and Tissue Repair, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200240, China; 3. Shanghai Cancer Institute, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200240, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the biological roles and associated mechanisms of the hypoxia-induced long non-coding RNA 68 (HILRNA68) in hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines. **Methods**·Long non-coding RNA (lncRNA) microarray analysis was conducted to study the differential expression of lncRNAs in the HCC cell lines cultured under hypoxia treatment and normoxia treatment separately for 12 h, and DEseq2 R package was used for the analysis of differentially expressed lncRNAs. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to determine the differential lncRNAs. Short hairpin RNAs (shRNAs)

[基金项目] 国家自然科学基金 (82103233); 上海市高水平地方高校创新团队 (SHSMU-ZDCX20211800)。**[作者简介]** 谭 露 (1998—), 女, 硕士生; 电子邮箱: tanlu98@sjtu.edu.cn。**[通信作者]** 何 平, 电子邮箱: phe@shsci.org。**[Funding Information]** National Natural Science Foundation of China (82103233); Innovative Research Team of High-Level Local Universities in Shanghai (SHSMU-ZDCX20211800)。**[Corresponding Author]** HE Ping, E-mail: phe@shsci.org。

were used to knock down hypoxia-inducible factors (HIFs) to investigate whether HILRNA68 transcription was regulated by HIFs under hypoxia. Nucleus-cytoplasmic isolation combined with qRT-PCR and RNA fluorescence *in situ* hybridization (RNA-FISH) experiments were used to investigate the subcellular localization of HILRNA68. HILRNA68 was knocked down in SMMC-7721 and MHCC-97H cells by small interfering RNA (siRNA) to investigate its cellular function under hypoxia. The impact of HILRNA68 on the cell proliferation and invasion capabilities of HCC cells under hypoxia was examined by cell counting and Transwell assays. Dual-luciferase reporter assay was employed to identify how HILRNA68 regulated the transcriptional activity of HIFs under hypoxia. **Results** By differential expression analysis of lncRNAs, a total of 247 and 17 significantly (defined as fold change \geq 4, FDR \leq 0.05) up- and down-regulated lncRNAs, respectively, were identified. Among these differentially expressed genes, lncRNA HILRNA68 was up-regulated about 10-fold in multiple HCC cell lines when cultured under hypoxia for 12 h. Knockdown of *HIF1 α* , *HIF2 α* , and *HIF1 β* significantly suppressed (all $P<0.05$) the upregulation of HILRNA68 under hypoxia. Luciferase reporter assay suggested that the transcription of HILRNA68 was regulated by HIFs. Subcellular localization studies revealed that HILRNA68 was mainly localized in the nucleus. Biological function experiments showed that silencing of HILRNA68 significantly inhibited the proliferation and invasion of HCC cells under hypoxia (all $P<0.05$). Mechanistic studies demonstrated that knock-down of HILRNA68 significantly suppressed the transcriptional activity of *HIF1 α* under hypoxia ($P<0.05$) and the up-regulation of these canonical HIFs targets under hypoxia was also significantly inhibited after HILRNA68 knockdown ($P<0.05$). **Conclusion** The current study identifies a series of differential hypoxia-regulated lncRNAs and functionally annotates the upregulated HILRNA68. HILRNA68 is directly up-regulated by HIFs which promotes cell proliferation and invasion under hypoxia. Mechanistically, the upregulation of HILRNA68 under hypoxia enhances the transcriptional activity of *HIF1 α* .

[Key words] hypoxia; hypoxia inducible factor (HIF); long non-coding RNA (lncRNA); cell proliferation; cell invasion; TCONS_00027424

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是原发性肝癌的主要亚型, 占所有肝癌病例的 90% 以上^[1]。据统计, 全球每年约有 80 万新发 HCC 病例, 约 70 万的 HCC 死亡病例, 因此 HCC 在全球最常见的癌症中排名第 6 位, 且由其导致的死亡在癌症导致的死亡中排第 4 位^[2]。由于 HCC 具有生长速度快、转移率高、容易发生治疗抵抗以及易复发等特点, 使得 HCC 患者的长期生存率仍然不理想^[3]。因此, 迫切需要全面阐明 HCC 的分子机制并开发新的治疗策略, 以提高 HCC 治疗的有效性。

包括 HCC 在内的实体瘤中, 由于肿瘤细胞快速生长而血管新生速度又无法及时匹配, 肿瘤细胞通常处于低氧状态^[4-5]。低氧微环境与肿瘤转移和不良预后密切相关, 是许多实体瘤恶性进展和侵袭性转移的促进因素^[6]。低氧诱导因子 1 (hypoxia inducible factor 1, HIF1) 是一个由 α -和 β -亚基组成的异二聚体, 是细胞适应低氧环境至关重要的调节因子。在缺氧条件下, HIF1 α 快速累积并被转运至细胞核, 与 HIF1 β 形成一个稳定的 HIF1 复合物, 特异性结合到 HIF1 靶基因的启动子区域的低氧反应元件 (hypoxia response element, HRE) A/GCGTG 上, 进而诱导靶基因转录^[7]。HIF1 靶基因编码的蛋白参与肿瘤发生的多个方面, 包括葡萄糖和能量代谢、增殖、血管生成、侵袭和转移等。HIF1 通路的激活与 HCC 在内的恶性肿瘤的侵袭性和不良临床预后密切相关^[8]。

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是细胞内一类长度大于 200 个核苷酸 (nt) 且不编码蛋白的 RNA^[9]。研究^[10-11]表明, lncRNA 主要通过细胞大分子 (如染色质 DNA、蛋白质和 RNA) 的相互作用发挥功能。迄今为止, 已有大量与癌症相关的 lncRNA 被报道能够调节肿瘤的生长、侵袭和转移, 并被认为是癌症的潜在替代性生物标志物和治疗靶点^[12-13]。虽然 lncRNA 在肿瘤中的功能与机制已有较多报道, 但目前仍有大量 lncRNA 的功能未被注释。本研究通过大规模筛选发现此前尚未被报道的低氧诱导的 lncRNA 68 (hypoxia induced lncRNA 68, HILRNA68; 基因名为 TCONS_00027424, 位于人类第 19 号染色体: 55 524 358~55 526 406) 在低氧下的多株 HCC 细胞系中表达水平显著升高, 并通过细胞生长计数实验、双荧光素酶报告基因实验等方法, 明确 HILRNA68 在低氧下的功能和相关机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞系与质粒 人肝癌细胞 SMMC-7721、PLC/PRF/5、MHCC-97H、MHCC-97L、Bel-7402, 人胚肾 293T (HEK-293T) 细胞, 均购自中国科学院细胞库。pGL3-basic 质粒、pCAG-dR8.9 包装质粒、pMDG (VSV-G) 包膜蛋白质质粒均来自 Addgene 全球质粒共享信息库。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清 (Sigma, 德国), TRIzol (Invitrogen, 美国), 反转录随机引物 (TaKaTa, 日本), M-MLV 反转录酶 (Promega, 德国), SYBRTM Green PCR 预混液 (Applied Biosystems, 美国), 硝酸纤维素膜 (Bio-Rad, 德国)。HIF1 α 鼠单克隆抗体 (货号 610958; BD, 美国), HIF1 β 兔单克隆抗体 (货号 NB100-110)、HIF2 α 兔单克隆抗体 (货号 NB100-122)、丙酮酸脱氢酶激酶 1 (pyruvate dehydrogenase kinase 1, PDK1) 兔单克隆抗体 (货号 MAB864) (Novus, 美国), β -actin 兔单克隆抗体 (货号 GB15003; 武汉赛维尔生物科技有限公司, 中国)。辣根过氧化物酶标记的二抗 (Cell Signaling Technology, 美国), ECL 化学发光试剂盒 (Merck Millipore, 德国), 荧光素酶检测试剂盒 (Promega, 美国), Transwell 细胞培养小室 (Corning, 美国), RNA 探针 (广州锐博公司, 中国), 4% 多聚甲醛、磷酸盐缓冲液 (上海碧云天生物技术有限公司, 中国)。

1.1.3 主要仪器 生物安全柜、CO₂ 细胞培养箱来自美国 Thermo 公司, qPCR 仪来自美国 Applied Biosystems 公司, 荧光显微镜和 Leica TCS Sp8STED 共聚焦显微镜来自德国 Leica 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养与低氧处理细胞 细胞培养使用添加 10% 胎牛血清的高糖培养基, 培养在细胞培养箱 (37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂) 中。使用 6 孔板进行培养, 每孔种入 3 \times 10⁵ 个细胞。细胞贴壁后放入低氧培养箱 (1%O₂, 5%CO₂, 37 $^{\circ}$ C) 培养, 按照实验需求确定低氧培养时间。

表 1 qRT-PCR 引物序列
Tab 1 Primer sequences for qRT-PCR

Primer	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
HILRNA44	GGAACGAACTCTGCGTGTG	AGGAGCGCACTTCTCATTC
HILRNA68	AAGCGGAGCCTGAAGATGTG	CCAACCCGGCTGCTACTTTAT
GLUT1	CTGTCGTGTCGCTGTTGTG	AAAGATGGCCACGATGCTCA
PDK1	CTGGCTGTGGCTTCTCTAGC	CCGAAGTCCAGGAAGTCTT
PGK1	TGTGGTCCTGAAAGCAGCAA	AGTTGACTTAGGGGCTGTGC
BNIP3L	GGACTCGGCTTGTTGTGTTG	TCGACTAGGTGGGACGACAT
VEGF	TAAGTCCTGGAGCGTTCCCT	ACGCGAGTCTGTGTTTTTGC
18S rRNA	GTAACCCGTGAACCCATT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG

Note: GLUT1—glucose transporter 1; PGK1—phosphoglycerate kinase 1; BNIP3L—BCL2 interacting protein 3 like; VEGF—vascular endothelial growth factor.

1.2.5 短发夹 RNA 稳转敲除细胞系构建 构建带有特定短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 片段

1.2.2 LncRNA 芯片检测 收集肝癌细胞系 SMMC-7721 分别经常氧 (normoxia)、低氧 (hypoxia) 处理 12 h 的 3 批 RNA 样本, 进行 lncRNA 芯片检测。将芯片检测结果通过 R 语言 DEseq2 程序包进行分析, 筛选低氧下表达变化的 lncRNA。

1.2.3 蛋白质印迹法 细胞样品用添加溴酚蓝的 1 \times SDS 细胞裂解液裂解。将细胞样品在 105 $^{\circ}$ C 下加热 20 min, 获得蛋白样品。采用蛋白质印迹法 (Western blotting) 进行实验。将蛋白样品用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分离, 将凝胶上的蛋白转移到硝酸纤维素膜。用 1 \times 磷酸盐缓冲液配置 5% 脱脂牛奶, 室温封闭 1 h。按实验需要孵育一抗 (稀释比例为 1 : 1 000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日孵育辣根过氧化物酶标记的二抗 (稀释比例为 1 : 2 000), 室温孵育 1 h。使用辣根过氧化物酶底物试剂盒进行显影。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 用 TRIzol 裂解细胞, 每毫升 TRIzol 加入 267 μ L 三氯甲烷, 离心后将含有 RNA 的上清液转移到新的 EP 管中, 并加入等量异丙醇, 抽提 mRNA。定容后将 RNA 反转录为互补 DNA (complementary DNA, cDNA)。将 cDNA、2 \times SYBR、上游引物、下游引物和无菌水充分混合, 加入 384 孔板中。每组设置 3 个复孔, 开始实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测。按照反应程序进行扩增: 95 $^{\circ}$ C, 30 s; 95 $^{\circ}$ C, 5 s; 60 $^{\circ}$ C, 20 s; 72 $^{\circ}$ C, 30 s; 60 $^{\circ}$ C, 1 min。进行 40 次循环。使用 2^{- $\Delta\Delta$ C_T} 方法分析目的基因的表达量。引物序列见表 1。

的敲除质粒。将生长密度大约 80% 的 HEK-293T 细胞用于慢病毒包装。取用灭菌的 1.5 mL EP 管, 加入

24 μL 聚乙烯亚胺 (polyethylenimine, PEI) 和 400 μL 的 Opti-MEM 减血清培养基, 振荡混匀后室温静置 5 min。将 pCAG-dR8.9 包装质粒 (4 μg)、pMDG (VSV-G) 包膜蛋白质粒 (2 μg) 和目的质粒 (6 μg) 加入 1.5 mL EP 管中, 加入 400 μL 的 Opti-MEM 减血清培养基, 充分混匀后静置 5 min。向质粒悬液中加入 424 μL 静置后的 PEI 悬液。振荡混匀后, 室温静置 15 min, 缓慢均匀滴加到预先准备好的 HEK-293T 细胞的培养皿中, 在细胞培养箱中继续培养。24 h 后更换新鲜完全培养基。收集 24 h 和 48 h 的病毒液。将病毒液加入 SMMC-7721 和 PLC/PRF/5 的细胞培养皿中。培养 48 h 后加入嘌呤霉素筛选阳性细胞。检测 HILRNA68 的转录水平。成功构建的敲除细胞系用于后续实验。靶向序列见表 2。

表 2 shRNA 靶向序列

Tab 2 shRNA targeting sequences

shRNA	Sequence (5'→3')
shHIF1 α #1	CCGCTGGAGACACAATCATAT
shHIF1 α #2	GTGATGAAAGAATTACCGAAT
shHIF1 β #1	GGCTCAAGGAGATCGTTTATT
shHIF1 β #2	GCCTACACTCTCCAACACAAT
shHIF2 α	CAGTACCCAGACGGATTTCAA

1.2.6 小干扰 RNA 转染实验 设计合成小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)。将细胞培养至生长密度为 70%, 用转染试剂 Jet-PRIME 将 siRNA 转染到细胞中。转染后对细胞进行恢复培养。48 h 后在转录水平进行敲除效率检测。靶向序列见表 3。

表 3 siRNA 靶向序列

Tab 3 siRNA targeting sequences

siRNA	Sequence (5'→3')
siNC	TTGTTACTCGCTCACATTTAA
si#1	CGTACCTGGCCTTAGTAATTT
si#2	GAGCCTGAAGATGTGATTAATA

Note: siNC—siRNA negative control.

1.2.7 细胞生长计数实验 将 HILRNA68 敲低细胞及对照细胞分别种植在 6 孔板中, 每孔 2×10^5 个细胞。次日起连续 4 d 检测细胞数量并统计分析。

1.2.8 Transwell 细胞侵袭实验 将基质胶在冰上融化, 用 10 倍体积的 DMEM 高糖培养基稀释基质胶。取 100 μL 稀释后的基质胶加入 Transwell 的上室中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 2 h, 待基质胶凝固后备用。取 5×10^4 个 HILRNA68 敲低细胞及其对照细胞, 分别用 200 μL 不含胎牛血清的培养基重悬细胞, 加入

Transwell 小室的上室。下室加入 500 μL 含 10% 胎牛血清的培养基, 培养 24 h。用 4% 多聚甲醛固定细胞, 0.1% 结晶紫染色 10 min, 将两室隔膜上室一侧的细胞擦净。用去离子水洗去浮色, 使用扫描仪扫描细胞图像。使用 ImageJ 软件统计细胞数量。

1.2.9 双荧光素酶报告基因实验 将 HILRNA68 的启动子区 (-2 000 nt~0) 构建到萤火虫荧光素酶 (firefly luciferase) 报告基因 pGL3-basic 质粒中。取 HILRNA68 敲除 (敲除组) 及其对照细胞系 (空载组), 共转染含有萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶 (renilla luciferase) 的双荧光素酶质粒, 培养 24 h 后收集样品。加入裂解液, 室温裂解细胞 15 min。向 40 μL 的荧光素酶检测试剂 II (luciferase assay reagent II) 中加入 10 μL 细胞裂解液, 吹打混匀后, 检测读数, 即为萤火虫荧光素酶的活性。加入 40 μL Stop&Glo 试剂, 再次读数, 即为海肾荧光素酶的活性。计算每管萤火虫荧光素酶/海肾荧光素酶活性的比值 (Luc/Ren)。再将空载组的比值定为单位 1, 即可得到敲除组相对于空载组的荧光素酶活性, 也就是该敲除组基因转录的调控活性。

1.2.10 细胞核浆分离实验 用低渗缓冲液重悬 4×10^7 个细胞, 在冰上静置 10 min, 用匀浆器匀浆, 垂直匀浆 40 次。将匀浆后的液体转移到干净离心管中, 1 000 $\times g$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 乳白色沉淀为细胞核成分, 上清液为细胞浆成分。

1.2.11 RNA 荧光原位杂交技术实验 用 4% 多聚甲醛固定细胞 10 min, 洗去多余的固定液, 加入 1 mL 预冷的通透液, 透化 5 min 后行 RNA 荧光原位杂交技术 (RNA fluorescence *in situ* hybridization, RNA-FISH) 实验。在切片背面圈定原位杂交的范围, 用预杂交液封闭 20 min, 将切片置于避光湿盒中, 吸取杂交液充分覆盖切片, 杂交 1 h。用洗液洗去多余的杂交液。加入荧光染料 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染色, 避光孵育 5 min, 洗去多余的 DAPI 染料。加入含有防荧光淬灭剂的封片剂, 用盖玻片盖好后封片。在激光共聚焦荧光显微镜下观察, 进行图像采集。

1.3 统计学分析

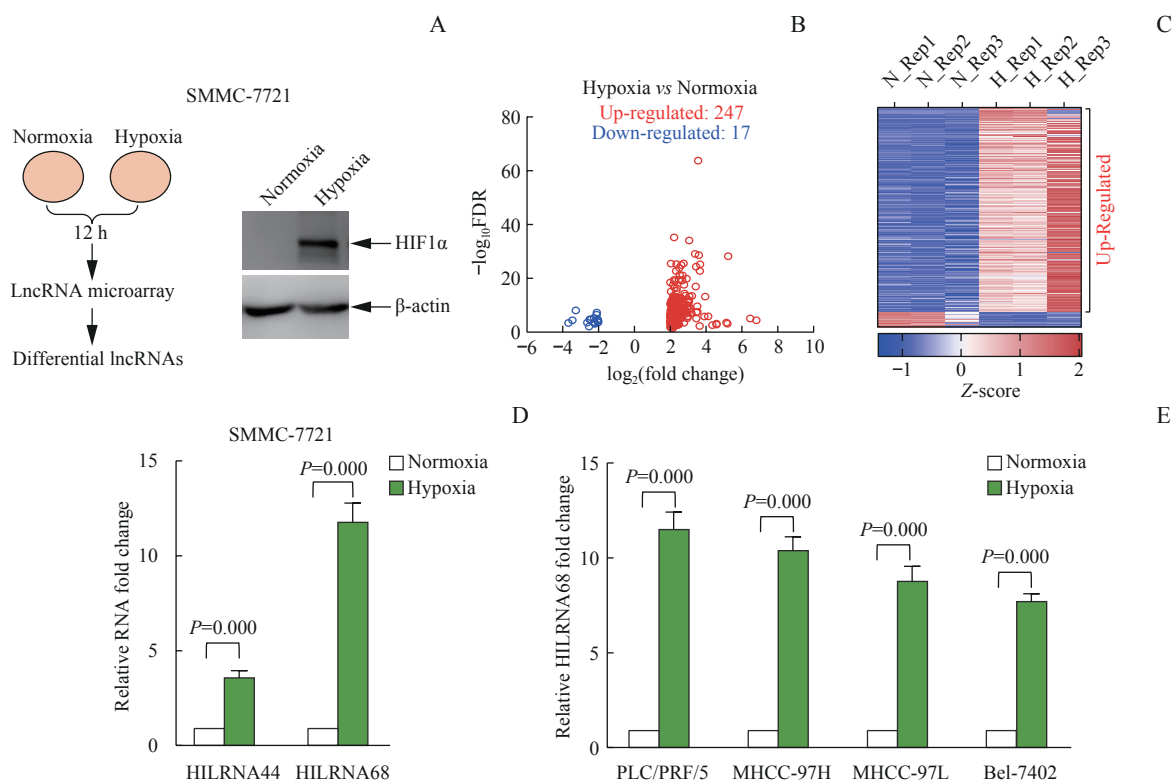
数据采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学分析。组内比较采用多重独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 低氧下 HILRNA68 在肝癌细胞中表达显著升高

为寻找肝癌细胞中受低氧调控且有功能的 lncRNA, 本研究通过 lncRNA 芯片检测筛选低氧调控的 lncRNA (图 1A)。根据芯片结果, 首先排除低丰度 RNA (6 个样本中表达总和 < 180), 然后定义低氧组相较常氧对照组倍数变化 (fold change) ≥ 4 , 伪发现率 (false discovery rate, FDR) ≤ 0.05 为低氧下表达显著变化的 lncRNA。据此我们分别得到显著升高和降低的 lncRNA 247 个和 17 个 (图 1B、1C)。在 SMMC-7721 细胞中通过 qRT-PCR 验证, 我们发现 HILRNA44 (基因名为 uc003xew.3, 位于人类第 8 号染色体: 26 236 777~26 240 469) 和 HILRNA68 (分别为芯片检测结果中升高水平位于第 44 和第 68 位)

在低氧下均显著升高 (均 $P=0.000$), 尤其是 HILRNA68 的表达量升高达到 10 倍以上 (图 1D)。考虑到 HILRNA68 在低氧下表达量升高倍数大、表达丰度高更便于后续研究, 因而本研究重点关注其在肝癌细胞中的功能及其相关机制。根据 UCSC (University of California, Santa Cruz Genome Browser Database) 数据库的收录, HILRNA68 在白细胞, 以及肾上腺、睾丸、脑等组织中表达较高, 而在肝脏中表达较低。这提示, HILRNA68 在正常肝脏中的表达较低, 而当发生肿瘤后可能由于低氧微环境的出现而升高。随后, 在 PLC/PRF/5、MHCC-97H、MHCC-97L、Bel-7402 等多株肝癌细胞系中验证其低氧下的表达变化, 更充分证明了 HILRNA68 在低氧下的显著升高 (均 $P<0.05$, 图 1E) 在肝癌细胞中是普遍存在的, 这初步提示其可能对肝癌细胞适应低氧微环境的过程中发挥重要功能。



Note: A. lncRNA microarray of SMMC-7721 exposed to hypoxia for 12 h. B. Differential lncRNA analysis of SMMC-7721 under hypoxia and normoxia. Red: up-regulated lncRNA; blue: down-regulated lncRNA. Fold change ≥ 4 , FDR ≤ 0.05 . C. Heatmap analysis of the indicated differentially expressed genes (DEGs), with data normalized using Z-score methods. N—normoxia; H—hypoxia. D. qRT-PCR analysis of indicated lncRNA in SMMC-7721 cells under normoxia and hypoxia. E. qRT-PCR analysis of HILRNA68 in human HCC cell lines (PLC/PRF/5, MHCC-97H, MHCC-97L, and Bel-7402) under normoxia and hypoxia.

图1 低氧下 HILRNA68 在肝癌细胞中表达显著升高

Fig 1 HILRNA68 was up-regulated in HCC cells under hypoxia

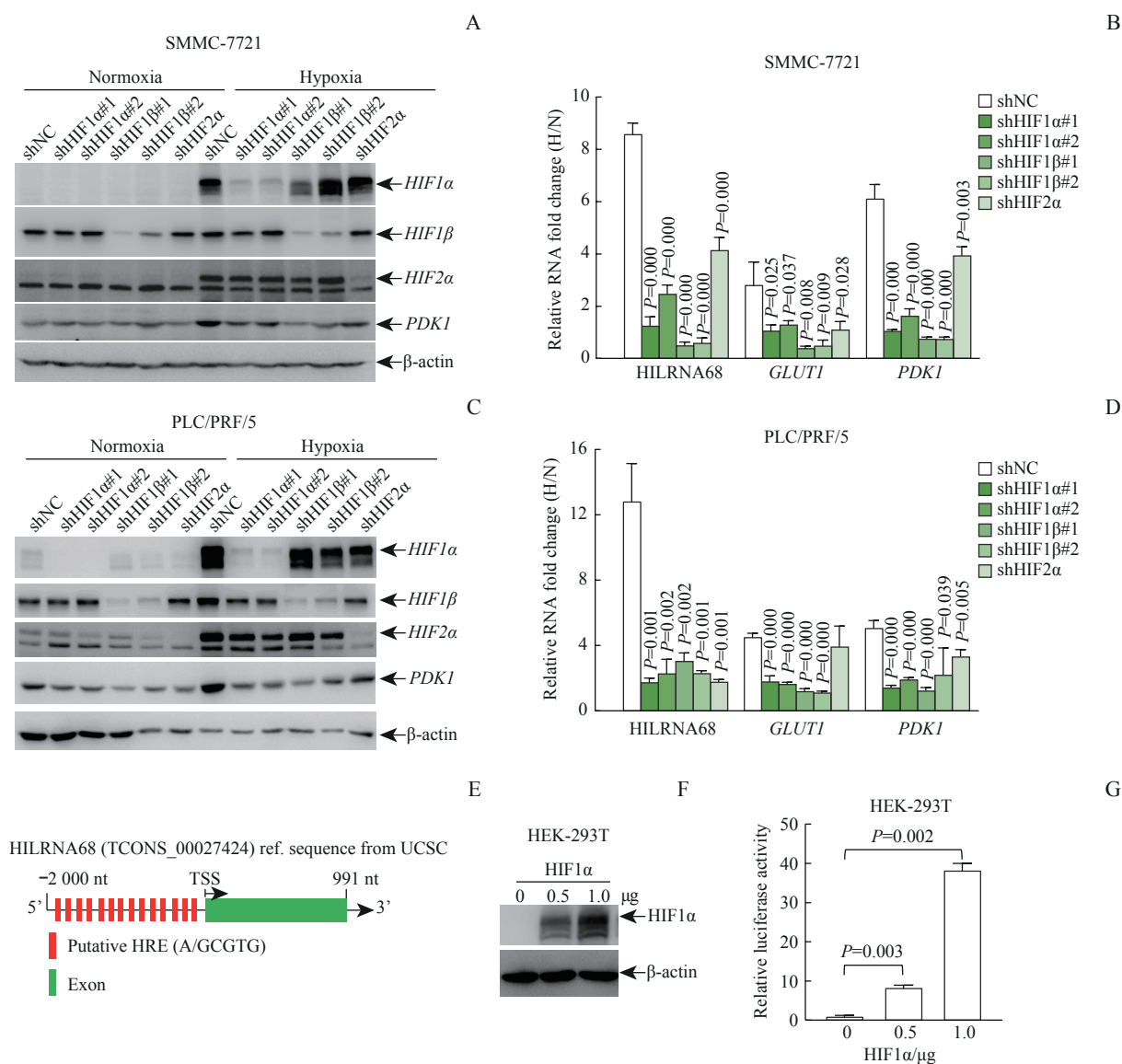
2.2 低氧下 HILRNA68 在肝癌细胞中的表达受低氧诱导因子调控

为研究 HILRNA68 在低氧下表达升高的分子机

制, 考虑到低氧诱导因子 (hypoxia inducible factors, HIFs) 是细胞适应低氧环境至关重要的转录因子, 本研究在 SMMC-7721 (图 2A) 以及 PLC/PRF/5 (图

2C) 2株细胞中通过shRNA敲低了HIF1 α 、HIF1 β 以及HIF2 α 。通过将以上稳转细胞低氧处理并收集RNA进行qRT-PCR检测,发现HILRNA68与HIFs经典的靶基因葡萄糖转运蛋白1 (glucose transporter 1, GLUT1) 以及PDK1^[7]类似,在SMMC-7721 (图2B) 以及PLC/PRF/5 (图2D) 2株细胞中敲低HIF1 α 、HIF1 β 以及HIF2 α 后其低氧下的升高均被显著抑制 (均 $P < 0.05$)。以上结果提示低氧环境下HILRNA68的转录受HIFs调控。接下来为进一步明确HILRNA68是否为

HIFs的靶基因,通过检测HILRNA68的启动子区,发现其-2 000 nt~0区共有14个潜在的HRE (图2E),这提示HILRNA68可能是HIFs的靶基因。随后,将HILRNA68的启动子区序列插入报告基因载体并通过与HIF1 α 的过表达载体共转后进行双荧光素酶报告基因实验 (图2F、G),结果提示,HILRNA68的启动子区的报告基因活性随着HIF1 α 的表达升高而增强 (图2G),这说明低氧环境下HIF1 α 可能直接结合在HILRNA68的启动子区并启动其表达。



Note: A. Western blotting analysis of SMMC-7721 cells indicated the knockdown efficiency of HIF1 α /HIF2 α /HIF1 β . B. qRT-PCR analysis of indicated RNAs of SMMC-7721 cells with or without knockdown HIF1 α /HIF2 α /HIF1 β under hypoxia. The P values indicate the differences between each group and the control group (shNC). C. Western blotting analysis of PLC/PRF/5 cells indicated the knockdown efficiency of HIF1 α /HIF2 α /HIF1 β . D. qRT-PCR analysis of indicated RNA of PLC/PRF/5 cells with or without knockdown HIF1 α /HIF2 α /HIF1 β under hypoxia. The P values indicate the differences between each group and the control group (shNC). E. Reference sequence diagram of HILRNA68. TSS—transcription start site. F. Western blotting analysis of HEK-293T cells transfected with HIF1 α over-expression plasmid. G. Dual-luciferase assay results of HEK-293T transfected with HIF1 α over-expression plasmid. H/N—hypoxia/normoxia.

图2 低氧下HILRNA68在肝癌细胞中的表达受HIFs调控

Fig 2 Expression of HILRNA68 in HCC under hypoxia was regulated by HIFs

2.3 HILRNA68主要定位于细胞核

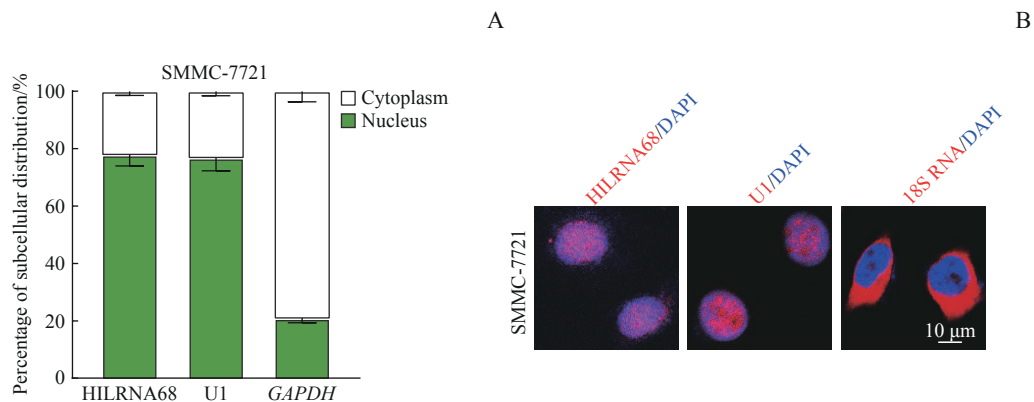
截至目前, HILRNA68 仍无任何相关报道。为明确其非编码潜能, 我们通过 CPC (Coding Potential Calculator) 在线工具 (<https://cpc2.gao-lab.org/index.php>) 明确了其与经典 lncRNA *XIST*^[14] 一致, 不具备编码蛋白的潜力 (表3)。考虑到 lncRNA 的亚细胞定位与其细胞功能相关, 通过核浆分离, 我们发现 HILRNA68 主要定位于细胞核 (图3A)。RNA-FISH 实验结果 (图3B) 显示 HILRNA68 与细胞核的

U1 (定位于细胞核) 具有相似的定位, 佐证了 HILRNA68 主要定位于细胞核。

表3 HILRNA68的编码潜力分析

Tab 3 Coding potential analysis of HILRNA68

RNA	Coding probability	Label
HILRNA68	0.009 4	Noncoding
<i>HIF1α</i>	1.000 0	Coding
<i>XIST</i>	0.219 1	Noncoding



Note: A. Histogram about subcellular distribution of indicated RNAs in SMMC-7721 cells. U1 as a nucleus marker, GAPDH as a cytoplasm marker. B. Fluorescence of RNA-FISH results of SMMC-7721 hybridized with HILRNA68. DAPI indicates nucleus.

图3 HILRNA68主要定位于细胞核

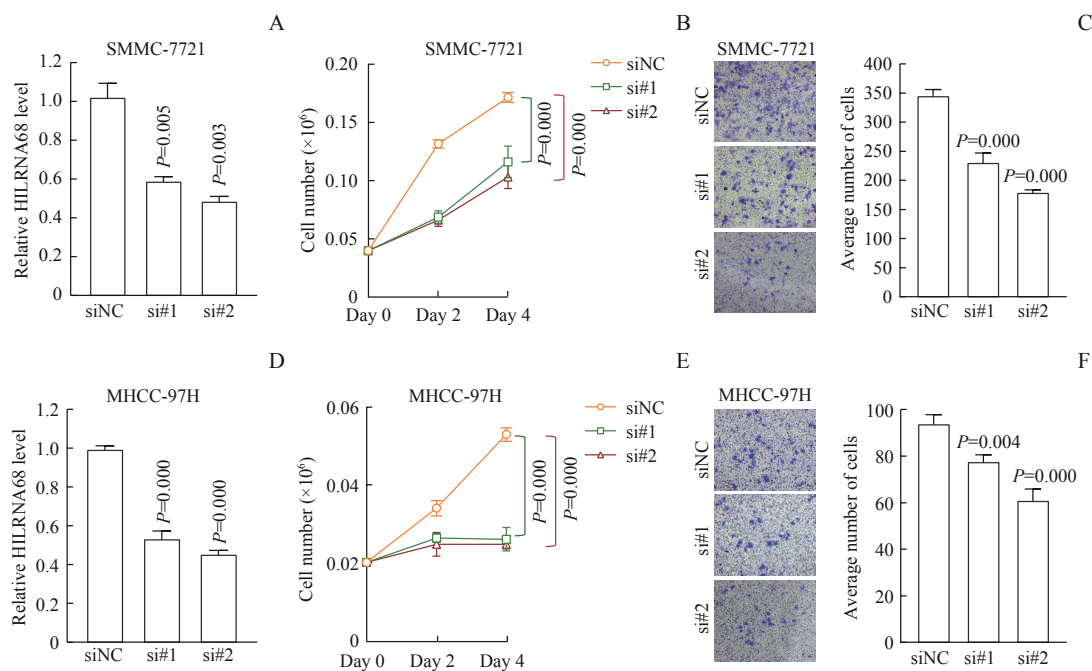
Fig 3 HILRNA68 was mainly located in the nucleus

2.4 HILRNA68低氧下促进肝癌细胞的生长增殖与侵袭转移

为研究 HILRNA68 在低氧下的功能, 我们设计了 2 个针对其的 siRNA si#1 与 si#2, 并在 SMMC-7721 (图4A) 与 MHCC-97H (图4D) 2 株细胞中对其进行敲低, 发现 2 个 siRNA 尤其是 si#2, 均能抑制其表达 50% 以上 (图4A、D)。首先, 进行低氧下细胞生长计数实验, 结果提示, 敲低 HILRNA68 后显著抑制 SMMC-7721 (图4B) 与 MHCC-97H (图4E) 在低氧下的增殖 (均 $P=0.000$)。考虑到低氧条件下, 肿瘤细胞会发生上皮间质转化进而侵袭能力增强^[15], 我们还开展了基质胶包被的 Transwell 细胞侵袭实验, 用以研究 HILRNA68 是否参与调控肿瘤细胞的侵袭转移能力。通过实验发现, 敲低 HILRNA68 后, SMMC-7721 (图4C) 与 MHCC-97H (图4F) 低氧下的侵袭转移能力均显著降低 (均 $P<0.05$)。以上结果说明, 低氧下 HILRNA68 的升高会增强肝癌细胞低氧下的增殖与侵袭转移能力。

2.5 HILRNA68调控 HIFs 的转录活性

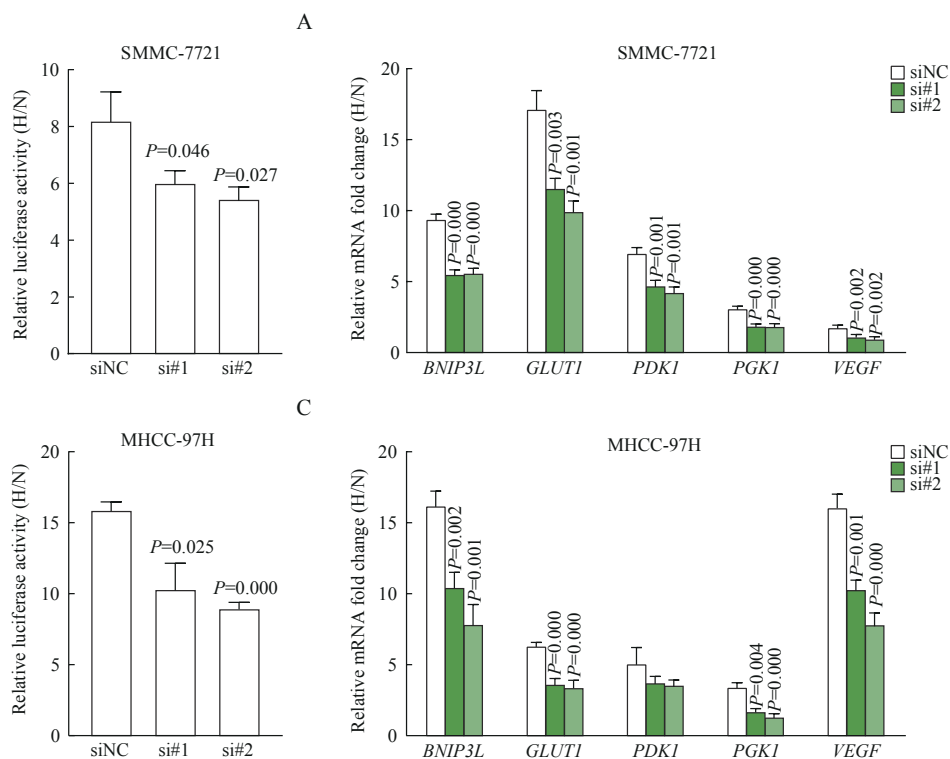
HIF1 是细胞适应低氧微环境至关重要的转录因子, 其调控肿瘤细胞低氧下的细胞增殖与侵袭转移能力。为研究 HILRNA68 在低氧下抑制细胞增殖与侵袭转移的分子机制, 我们首先探究敲低 HILRNA68 是否会抑制低氧下 HIF1 α 的转录活性。通过构建经典的 HRE 到报告基因载体, 并进行双荧光素酶报告基因实验, 我们发现, 在 SMMC-7721 (图5A) 与 MHCC-97H (图5C) 细胞中 HILRNA68 敲低后, HRE 低氧下的报告基因活性相较于对照组被显著抑制 (均 $P<0.05$), 这提示 HILRNA68 的敲低抑制了低氧下 HIF1 α 的转录活性。为进一步证明以上结果, 通过 qRT-PCR 检测 SMMC-7721 (图5B) 与 MHCC-97H (图5D) 敲低 HILRNA68 后 HIFs 靶基因的升高, 发现这些经典的靶基因如 *BNIP3L*、*GLUT1*、*PDK1*、*PGK1*、*VEGF* 等^[15] 低氧下的升高均在一定程度上被抑制 (图5B、D)。以上结果说明, HILRNA68 低氧下升高后参与促进 HIFs 的转录活性, 帮助细胞适应低氧微环境。



Note: A. qRT-PCR analysis of HILRNA68 knockdown efficiency in SMMC-7721. B. Cell proliferation results of SMMC-7721 cells with or without HILRNA68 knock-down. C. Histogram of Transwell cell invasion analysis of SMMC-7721 cells with or without HILRNA68 knock-down. D. qRT-PCR analysis of HILRNA68 knockdown efficiency in MHCC-97H. E. Cell proliferation results of MHCC-97H cells with or without HILRNA68 knock-down. F. Histogram of Transwell cell invasion analysis results of MHCC-97H cells with or without HILRNA68 knock-down. The P value indicates the differences between each group and the control group (siNC).

图4 HILRNA68低氧下抑制肝癌细胞的生长增殖与侵袭转移

Fig 4 HILRNA68 inhibited the tumor proliferation, invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma cells under hypoxia



Note: A. Luciferase activity of SMMC-7721 cells with or without HILRNA68 knock-down under hypoxia. B. qRT-PCR analysis of indicated mRNAs in SMMC-7721 under hypoxia. C. Luciferase activity of MHCC-97H cells with or without HILRNA68 knock-down under hypoxia. D. qRT-PCR analysis of indicated mRNAs in MHCC-97H cells under hypoxia. The P values indicate the differences between each group and the control group (siNC).

图5 HILRNA68调控HIFs的转录活性

Fig 5 HILRNA68 regulated the transcriptional activity of HIFs

3 讨论

本研究中,我们通过 lncRNA 芯片寻找肝癌细胞中受低氧调控的 lncRNA,并鉴定出目前尚未被报道的 HILRNA68。深入研究发现, HILRNA68 为 HIFs 的靶基因并促进低氧下细胞的生长增殖与侵袭转移;机制研究结果提示 HILRNA68 调控 HIFs 的转录活性。

肿瘤细胞,尤其是实体瘤细胞,具备快速且不受约束的增殖能力从而导致血管系统供应不足,因此其倾向于处于低氧的肿瘤微环境中^[16]。低氧下, HIF1 α 快速累积并与 HIF1 β 结合形成异二聚体^[17],进而调控具有不同功能的靶基因的表达以帮助细胞适应低氧微环境,如 *GLUT1*、*HK2* (hexokinase 2)、*LDHA* (lactate dehydrogenase A)、*PDK1*、*PGK1* 等靶基因调节细胞的能量代谢过程^[18]; *VEGF* 等促进血管新生^[19]。本研究通过 lncRNA 芯片的大规模筛选,在肝癌细胞系中鉴定出一批在低氧下表达显著变化的 lncRNA。其中 lncRNA HILRNA68 更是在多株细胞系中低氧下升高约 10 倍;调控机制研究发现其启动子区有 14 个 HRE (A/GCGTG),并进一步证明 HIF1 α 直接调控其表达。据此我们认为 HILRNA68 是一个新的 HIF1 α 的靶基因。此外,我们注意到,在敲低 *HIF2 α* 后, HILRNA68 低氧下的表达升高同样被抑制,提示 HILRNA68 不仅是 HIF1 α 的靶基因,同时也直接受 HIF2 α 调控。

据报道,非编码 RNA 约占真核细胞转录组的 90%,而这其中 lncRNA 有近 7 万个^[20]。截至目前被功能注释的 lncRNA 仍然很少。迄今为止 HILRNA68 尚无文献报道。本研究除率先证明其直接受 HIFs 调控外,还通过 siRNA 敲低后的细胞功能实验证明其在低氧下的升高参与调控肝癌细胞低氧下的生长增殖与侵袭转移。考虑到低氧下 HIFs 调控的靶基因调控细胞在低氧下的增殖与侵袭能力,我们在随后的机制研究中通过双荧光素酶报告基因实验证明 HILRNA68 低氧下升高后可增强 HIFs 的转录活性。靶基因检测表明,低氧下敲低 HILRNA68 后显著抑制 HIFs 的靶基因如 *GLUT1*、*PGK1*、*VEGF* 等的升高。根据以上结果,我们初步推测低氧下肝癌细胞内 HIFs 与 HILRNA68 之间存在正反馈调节——低氧下 HIFs 转录激活 HILRNA68 的表达,而升高的 HILRNA68 进一步增强 HIFs 的转录活性,最终促进肝癌细胞的生长增殖与侵袭转移。HILRNA68 调控 HIFs 转录活性

的具体机制目前尚不明确。低氧下 lncRNA 调控 HIFs 的转录活性的机制研究已有相关报道^[21-25]。如低氧下 lncRNA *HIFAL* 通过促进 *HIF1 α* 的 mRNA 表达从而增强其转录活性^[24]; lncRNA *HABON* 通过与 HIF1 α 的结合并促进其降解,通过减少 HIF1 α 低氧下的累积而抑制其活性^[22]。这些报道提示 HILRNA68 可能通过增强 HIFs 的 mRNA 表达或者蛋白质稳定性进而增强其转录活性。据此,后续研究拟通过在敲除 HILRNA68 的细胞中检测 HIFs 的 mRNA 以及蛋白质水平,明确 HILRNA68 是否通过调节 HIFs 的表达量而调控其转录活性。也有研究报道,低氧下 lncRNA 调控 HIFs 蛋白质翻译后修饰从而增强其转录活性,例如 lincRNA-p21 通过破坏希佩尔林道蛋白 (von Hippel-Lindau, VHL) 与 HIF1 α 相互作用来稳定 HIF1 α ^[26]。我们猜测 HILRNA68 也有可能通过影响 HIFs 蛋白质翻译后修饰的方式调控其转录活性。目前,抑制 HIF1 α 功能的药物已经在临床应用,例如硼替佐米和葱环类药物。由于 HIF 信号通路影响广泛,药物不良反应严重。低氧下, HILRNA68 被 HIFs 诱导表达,又能正反馈增强 HIFs 的转录活性,通过靶向降解 HILRNA68,可以破坏 HIFs 信号的放大效应。靶向药物的研发中,通常用小分子或抗体靶向蛋白靶点,但受限于蛋白结构复杂,无法找到合适的结合位点,存在成药困难的问题。RNA 靶向药物则不存在这类问题,因此针对 HILRNA68 设计反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotides, ASO),靶向降解实体瘤的 HILRNA68 对癌症治疗具有潜在价值。

低氧下肿瘤细胞中 HIFs 与 HILRNA68 之间的正反馈调节,最终促进了肿瘤细胞的生长增殖和侵袭转移。在肿瘤的发展进程中,正反馈调控模式具有重要作用。它通过形成自我增强的循环,加速肿瘤的发生和进展。PI3K/AKT 信号通路、Wnt/ β -catenin 信号通路和 Notch 信号通路都是能够形成正反馈回路的肿瘤信号通路,能促进细胞增殖和肿瘤生长。肿瘤细胞释放的一些生长因子和细胞因子可以促进血管新生,形成肿瘤血管网,从而为肿瘤提供充足的营养,进一步促进肿瘤的生长和转移。正反馈调控模式在肿瘤发展中的重要作用体现在促进肿瘤生长增殖、血管新生、抑制凋亡和抗药性产生等方面,深入研究正反馈调控在肿瘤发展中的作用机制,有助于寻找新的治疗策略和靶点,提高肿瘤治疗效果。

在研究中,我们使用 shRNA 敲低 HIFs,获得

HIFLRNA68与HIF1 α 调控关系以及HILRNA68相关功能的结论。为了更真实全面地说明HILRNA68在低氧环境下发挥的功能,我们需要针对HILRNA68的基因组序列设计sgRNA,在基因组上实现敲除,再通过功能回复实验补充缺失的基因,明确细胞的功能是否恢复正常。我们的研究结论是基于肝癌细胞的体外培养实验得出的。然而,生物体内的肿瘤微环境复杂,调控肿瘤生长的机制多种多样。因此,尽管我们观察到HILRNA68在体外实验中受HIFs调控并参与正反馈调节,但在生物体内发挥的功能是否与体外实验一致仍然存在不确定性。因此,为了进一步验证我们的研究结论,我们需要进行更多的动物实验。低氧环境是实体瘤中常见的肿瘤微环境之一。我们的研究揭示了肝癌中HILRNA68与HIFs的相关机制,这种机制在肝癌以外的实体瘤中是否具有类似的作用需要更多的研究结果佐证。

综上所述,对HILRNA68与HIFs调控模式的深入研究,不仅有助于我们更好地理解肝癌的发生发展机制,还为未来开发针对HIFs和HILRNA68的治疗

策略提出了重要的理论依据。HILRNA68作为HIFs的靶基因通过增强HIFs的转录活性促进肝癌细胞的增殖和侵袭,这一发现为肝癌的治疗和预防提供了新的思路 and 方向,为肝癌患者的治疗带来更多希望。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明本研究不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

作者贡献/Authors' Contributions

谭露负责大部分生物学实验操作、论文撰写,何平负责整体课题设计、结果分析以及论文撰写,沈少明参与课题讨论与指导。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

TAN Lu performed the majority of biological experiments and wrote the paper. HE Ping designed the project and was responsible for result analysis and paper writing. SHEN Shaoming participated in project discussions. All authors have read the final manuscript and agreed to the submission.

• Received: 2024-02-26

• Accepted: 2024-03-15

• Published online: 2024-06-28

参 考 文 献

- [1] VOGEL A, MEYER T, SAPISOCHIN G, et al. Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2022, 400(10360): 1345-1362.
- [2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [3] CHIDAMBARANATHAN-REGHUPATY S, FISHER P B, SARKAR D. Hepatocellular carcinoma (HCC): epidemiology, etiology and molecular classification[J]. *Adv Cancer Res*, 2021, 149: 1-61.
- [4] JING X M, YANG F M, SHAO C C, et al. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 157.
- [5] BAO M H R, WONG C C L. Hypoxia, metabolic reprogramming, and drug resistance in liver cancer[J]. *Cells*, 2021, 10(7): 1715.
- [6] CHEN Z, HAN F F, DU Y, et al. Hypoxic microenvironment in cancer: molecular mechanisms and therapeutic interventions[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 70.
- [7] INFANTINO V, SANTARSIERO A, CONVERTINI P, et al. Cancer cell metabolism in hypoxia: role of HIF-1 as key regulator and therapeutic target[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 5703.
- [8] YUEN V W H, WONG C C L. Hypoxia-inducible factors and innate immunity in liver cancer[J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(10): 5052-5062.
- [9] BHAN A, SOLEIMANI M, MANDAL S S. Long noncoding RNA and cancer: a new paradigm[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(15): 3965-3981.
- [10] ALI T, GROTE P. Beyond the RNA-dependent function of lncRNA genes[J]. *Elife*, 2020, 9: e60583.
- [11] SCHMITZ S U, GROTE P, HERRMANN B G. Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(13): 2491-2509.
- [12] MCCABE E M, RASMUSSEN T P. lncRNA involvement in cancer stem cell function and epithelial-mesenchymal transitions[J]. *Semin Cancer Biol*, 2021, 75: 38-48.
- [13] HUANG Z, ZHOU J K, PENG Y, et al. The role of long noncoding RNAs in hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 77.
- [14] BOEREN J, GRIBNAU J. Xist-mediated chromatin changes that establish silencing of an entire X chromosome in mammals[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2021, 70: 44-50.
- [15] TIRPE A A, GULEI D, CIORTEA S M, et al. Hypoxia: overview on hypoxia-mediated mechanisms with a focus on the role of HIF genes[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(24): 6140.
- [16] PAREDES F, WILLIAMS H C, SAN MARTIN A. Metabolic adaptation in hypoxia and cancer[J]. *Cancer Lett*, 2021, 502: 133-142.
- [17] DZHALILOVA D S, MAKAROVA O V. HIF-dependent mechanisms of relationship between hypoxia tolerance and tumor development[J]. *Biochemistry*, 2021, 86(10): 1163-1180.
- [18] TAYLOR C T, SCHOLZ C C. The effect of HIF on metabolism and immunity[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2022, 18(9): 573-587.
- [19] MANUELLI V, PECORARI C, FILOMENI G, et al. Regulation of redox signaling in HIF-1-dependent tumor angiogenesis[J]. *FEBS J*, 2022, 289(18): 5413-5425.
- [20] XUE Y C, CHEN R S, QU L H, et al. Noncoding RNA: from dark matter to bright star[J]. *Sci China Life Sci*, 2020, 63(4): 463-468.
- [21] XU F Y, HUANG M Q, CHEN Q Y, et al. lncRNA HIF1A-AS1 promotes gemcitabine resistance of pancreatic cancer by enhancing glycolysis through modulating the AKT/YB1/HIF1 α pathway[J]. *Cancer Res*, 2021, 81(22): 5678-5691.
- [22] MA C N, WO L L, WANG D F, et al. Hypoxia activated long non-coding RNA HABON regulates the growth and proliferation of hepatocarcinoma cells by binding to and antagonizing HIF-1 α [J].



- RNA Biol, 2021, 18(11): 1791-1806.
- [23] YANG K X, ZHANG W Y, ZHONG L H, et al. Long non-coding RNA HIF1A-As2 and MYC form a double-positive feedback loop to promote cell proliferation and metastasis in KRAS-driven non-small cell lung cancer[J]. Cell Death Differ, 2023, 30(6): 1533-1549.
- [24] ZHENG F, CHEN J N, ZHANG X Q, et al. The HIF-1 α antisense long non-coding RNA drives a positive feedback loop of HIF-1 α mediated transactivation and glycolysis[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 1341.
- [25] WANG Y, CHEN W Y, LIAN J Y, et al. The lncRNA PVT1 regulates nasopharyngeal carcinoma cell proliferation via activating the KAT2A acetyltransferase and stabilizing HIF-1 α [J]. Cell Death Differ, 2020, 27(2): 695-710.
- [26] YANG F, ZHANG H F, MEI Y D, et al. Reciprocal regulation of HIF-1 α and lincRNA-p21 modulates the Warburg effect[J]. Mol Cell, 2014, 53(1): 88-100.

[本文编辑] 包 玲

学术快讯

上海交通大学医学院附属第六人民医院消化内镜中心联合发表 人工智能辅助超声内镜诊断胃肠道黏膜下肿瘤的研究成果

2024年5月24日,上海交通大学医学院附属第六人民医院消化内镜中心宛新建教授团队联合东华大学机械工程学院、上海交通大学生物医学工程学院和国内多家临床中心,在《柳叶刀》(*The Lancet*)旗下杂志*eClinicalMedicine*在线发表题目为*Efficacy of real-time artificial intelligence-aid endoscopic ultrasonography diagnostic system in discriminating gastrointestinal stromal tumors and leiomyomas: a multicenter diagnostic study*的原创性临床论著文章。

该研究涵盖870例胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumor, GIST)或平滑肌瘤患者的超声图像,通过3个不同的评估阶段对人工智能(artificial intelligence, AI)系统进行严格的训练和测试。研究结果显示,AI系统在内部验证和外部评估中的诊断准确率分别达93.1%和91.7%,远高于传统方法的诊断准确率。在实际应用中,AI辅助超声内镜(endoscopic ultrasonography, EUS)诊断系统在临床评估中同样表现出色,其诊断GIST和平滑肌瘤的AUC值分别为0.865和0.864,显著优于经验丰富的内镜医师。实时AI辅助的EUS诊断系统不仅能够帮助内镜医师在临床实践中快速准确地区分不同类型的黏膜下肿瘤,还能够促进更有效的诊断和治疗决策。