

# 长链非编码 RNA-Linc00152 与肝细胞癌的临床病理特征关系

刘杰 华学锋 吕嘉贤 符荣党 李宁 陈湖岸 邱春辉 赵辉 陆敏强

**【摘要】 目的** 筛选出在肝细胞癌组织中差异表达的长链非编码 RNA(LncRNA), 研究其表达水平与肝细胞癌临床病理特征的相关性。**方法** 收集 40 对肝细胞癌与配对的正常肝组织标本, 使用基因芯片结合权威数据库筛选出在肝细胞癌组织中差异表达的 LncRNA, 预试验确定作为研究目标的 LncRNA, 使用实时荧光定量 PCR 研究目标 LncRNA 在肝细胞癌组织中的表达情况, 并分析其表达与肝细胞癌临床病理特征的相关性。**结果** 选取基因芯片中差异表达倍数最明显的 10 个候选 LncRNA 进行预试验, 确定 Linc00152 作为研究目标。85% (34/40) 的肝细胞癌组织中 Linc00152 相对表达量高于配对正常肝组织。肝细胞癌低分化者的 Linc00152 低表达者比例高于中分化者 ( $P < 0.017$ ), 有血管侵犯者的 Linc00152 低表达者比例高于无血管侵犯者 ( $P < 0.05$ )。**结论** LncRNA-Linc00152 在肝细胞癌组织中表达升高, 且和肝细胞癌的病理解剖分级和血管侵犯相关。

**【关键词】** 长链非编码核糖核酸; 肝细胞癌; Linc00152

**Correlation between long non-coding RNA-Linc00152 and clinicopathological feature of hepatocellular carcinoma** Liu Jie, Hua Xuefeng, Lyu Jiaxian, Fu Rongdang, Li Ning, Chen Huan, Qiu Chunhui, Zhao Hui, Lu Minqiang. Department of Liver Surgery, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China

Corresponding author, Lu Minqiang, E-mail: larrylmq@hotmail.com

**【Abstract】 Objective** To screen the long non-coding RNA (LncRNA) differentially expressed in the hepatocellular carcinoma tissues and analyze the correlation between the expression level of LncRNA and clinicopathological feature of hepatocellular carcinoma. **Methods** Forty pairs of hepatocellular carcinoma and matched liver normal tissue specimens were collected. Gene microarray combined with official databases to screen the LncRNA differentially expressed in hepatocellular carcinoma tissues. In preliminary experiment, the target LncRNA was determined. Fluorescent quantitative RT-PCR was adopted to quantitatively measure the expression level of target LncRNA in hepatocellular carcinoma tissues and analyze the correlation between the expression level of LncRNA and clinicopathological characteristics of hepatocellular carcinoma. **Results** Ten candidate LncRNAs which were the most differentially expressed detected by gene microarray were chosen for preliminary experiment. Linc00152 was determined as the target LncRNA. The relative expression levels of Linc00152 in 85% (34/40) of hepatocellular carcinoma tissues were up-regulated compared with those in matched liver normal tissues. The percentage of low expression level of Linc00152 in poorly-differentiated hepatocellular carcinoma tissues was significantly higher than that in middle-differentiated counterparts ( $P < 0.017$ ). The proportion of low expression level of Linc00152 in tissues with vascular invasion was considerably higher compared with that in those without vascular invasion ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** The expression level of LncRNA-Linc00152 is up-regulated in hepatocellular carcinoma tissues. It is associated with the pathological grading of hepatocellular carcinoma and vascular invasion.

**【Key words】** Long noncoding RNA; Hepatocellular carcinoma; Linc00152

DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2017.09.007

基金项目: 国家自然科学基金 (81170450, 81400679); 广东省基础与应用基础研究专项基金 (2014A030310067)

作者单位: 510630 广州, 中山大学附属第三医院肝脏外科 (刘杰, 赵辉, 邱春辉, 陈湖岸, 陆敏强); 510180 广州, 广州市第一人民医院 (华学锋, 李宁); 510080 广州, 中山大学附属第一医院 (吕嘉贤); 528000 佛山, 佛山市第一人民医院 (符荣党)

通讯作者, 陆敏强, E-mail: larrylmq@hotmail.com

肝细胞癌的致病因素较多,发病率和病死率均在恶性肿瘤中排名靠前<sup>[1]</sup>。近年来,肝细胞癌的诊断和治疗有了很大发展,但总体上肝细胞癌的预后仍不理想,5 年生存率不足 15%。针对肝细胞癌发生、发展的机制,寻找相关的基因作为肝细胞癌筛查的生物标记物或者治疗的靶点是临床研究热点。长链非编码 RNA(LncRNA)是长度大于 200 个核苷酸的非编码 RNA<sup>[2]</sup>。在多个生物学阶段,如表观遗传、转录调控、转录后修饰以及细胞间信号传导中发挥了重要作用<sup>[3]</sup>。LncRNA 与各种疾病的发生、发展亦有着密切联系<sup>[4]</sup>。LncRNA 与肝细胞癌的关系是目前广泛关注的研究热点,例如肝细胞癌高表达基因是首先发现在肝细胞癌中表达上升的 LncRNA<sup>[5]</sup>。HBV X 蛋白可以明显提高 HULC 的表达,从而下调抑癌基因 p18 的表达来促进 HCC 细胞的增殖<sup>[6]</sup>。LncRNA 对肝细胞癌发生、发展作用的研究才刚起步,为此本研究筛选在肝细胞癌组织中差异表达的 LncRNA,研究其表达水平与肝细胞癌临床病理特征的相关性,现报告如下。

## 材料与方法

### 一、标本来源

肝细胞癌组织及与其配对的正常肝组织标本来源于 2013 年 3 月至 2015 年 8 月在中山大学附属第三医院肝脏外科一区行肝脏切除术的患者。入组标准为:①术前临床诊断为肝细胞癌并进行肝脏切除术;②肝脏切除术未进行经导管动脉化学栓塞(TACE)、射频消融或者靶向治疗等处理;③术后病理证实为肝细胞癌;④患者签署知情同意书。最终从 91 对标本中筛选出符合条件的 40 对标本进行后续研究。40 例患者中,男 35 例、女 5 例,年龄 <50 岁 18 例、≥50 岁 22 例,合并肝炎 35 例、肝硬化 28 例,低分化 11 例、中分化 16 例、高分化 13 例,肿瘤平均直径 <5 cm 26 例、≥5 cm 14 例,单发 30 例、多发 10 例,病灶侵犯血管 12 例。

### 二、试验材料

#### 1. 主要仪器

包括:SORVALL RT1 台式离心机(Thermo Scientific,美国),PCR 仪(Roche,美国),实时定量 PCR 仪(Roche,美国),UV-1206 紫外分光光度计(Shimodzu,日本)。

#### 2. 主要试剂

包括:pH 7.4 磷酸盐缓冲液(PBS, Gibco, 美国),Trizol RNA 抽提试剂(Life Technologies, 美

国),RNA 保护液(OMEGA, 美国),SYBR<sup>®</sup> Green PCR 预混液(Roche, 美国),去除基因组污染实时逆转录试剂盒(Takara, 日本),焦碳酸二乙酯(DEPC)水(Sigma, 美国),含 EB 的 RNA 载样缓冲液(Takara, 日本)。

### 三、方 法

#### 1. 肝细胞癌及配对正常肝组织标本的收集

在肝脏肿物切除后 10 min 内,在无菌的条件下取约 2 cm × 2 cm × 2 cm 大小的肝细胞癌组织数块,在距肿物 2 cm 以外取正常配对肝组织,标本立即使用 RNA 保护液浸泡于冻存管中,放入液氮罐中长期保存备用。

#### 2. 组织 RNA 的提取

使用 Trizol 法提取组织标本 RNA,按试剂盒说明书步骤操作,提取后使用紫外分光光度计测定 RNA 浓度,并鉴定纯度。RNA 提取成功后使用琼脂糖凝胶电泳进行完整度鉴定

#### 3. LncRNA 芯片杂交分析

从上述肝细胞癌患者中随机挑选 3 例,取肝细胞癌组织及其配对正常肝组织标本,分离提纯 RNA 后,交由上海康成公司行 LncRNA 基因芯片杂交分析。

#### 4. 基因表达水平的检测

将 RNA 按试剂盒说明书步骤逆转录为模板 DNA,然后进行实时 PCR 扩增,具体反应体系如下:SYBR<sup>®</sup> Green PCR 预混液 10 μl、正向引物 1.0 μl、反向引物 1.0 μl、模板 DNA 1.0 μl、无酶水 8.0 μl,总体积 20 μl。反应条件如下:94℃ 2 min,94℃ 20 s、58℃ 20 s 共 40 个循环,72℃ 20 s。融解曲线分析:温度 62 ~ 95℃。每份样本重复 3 次。2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算荧光强度阈值(Ct 值),以 GAPDH 作为内参,计算样品基因相对表达量。

#### 5. Linc00152 的相对表达量与临床病理特征间的关系分析

将 40 例肝细胞癌组织按 Linc00152 的相对表达量从低至高排序,前 20 例纳入低表达组、后 20 例纳入高表达组,分析不同临床病理特征者的 Linc00152 表达情况。

### 四、统计学处理

使用 SPSS 13.0 进行统计分析。Linc00152 的表达情况以  $\bar{x} \pm s$  表示,肝细胞癌组织与正常肝组织比较采用配对 *t* 检验。使用 Graphpad Prism 5 绘制柱状图。肝细胞癌临床病理资料用百分率表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验。总体比较 *P* < 0.05 为差异

有统计学意义，多重比较采用 Bonferroni 法校正检验水准。

结 果

一、组织样本 RNA 的完整性鉴定

在凝胶成像系统中观察，大部分被测样本均能呈现明确的 28 S 和 18 S 条带，说明提取到的 RNA 具有良好的完整性，见图 1。选择紫外分光光度计 OD<sub>260/280</sub> 为 1.8 ~ 2.0 的 RNA 样本进行后续试验。

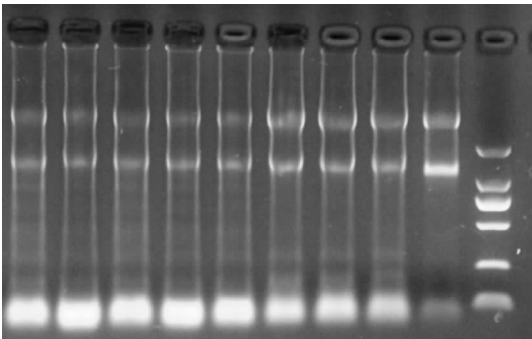


图 1 组织样本的 RNA 凝胶电泳图

二、Linc00152 的筛选

使用基因芯片结合 Ensembl 等权威数据库，取得 33 045 个 LncRNA 的差异表达谱（数据已上传至 GEO 数据库，编号：GSE64633）。以  $P$  值  $<0.05$ 、差异表达倍数  $>2.0$  或  $<0.5$  为标准筛选出 75 个候选 LncRNA。使用 30 对组织标本进行预试验，对 AC007009.1、Linc00152、LOC149086、CCAT2 等候选 LncRNA 进行检测，比较其在肝细胞癌组织和配对正常肝组织中的表达情况，排除 CCAT2 ( $P = 0.1175$ )，LOC149086 ( $P = 0.5526$ ) 等表达差异无统计学意义的 LncRNA，选择表达差异有统计学意义的 Linc00152 为研究对象 ( $P < 0.05$ )。然后利用数据库找到 Linc00152 的全长序列，Linc00152 位于 2 号染色体，长度 483 bp。

三、Linc00152 在肝细胞癌组织中的表达情况

40 对肝细胞癌组织和配对正常肝组织中，85% (34/40) 的样本 Linc00152 在肝细胞癌组织中较配对正常肝组织表达上调，见图 2。

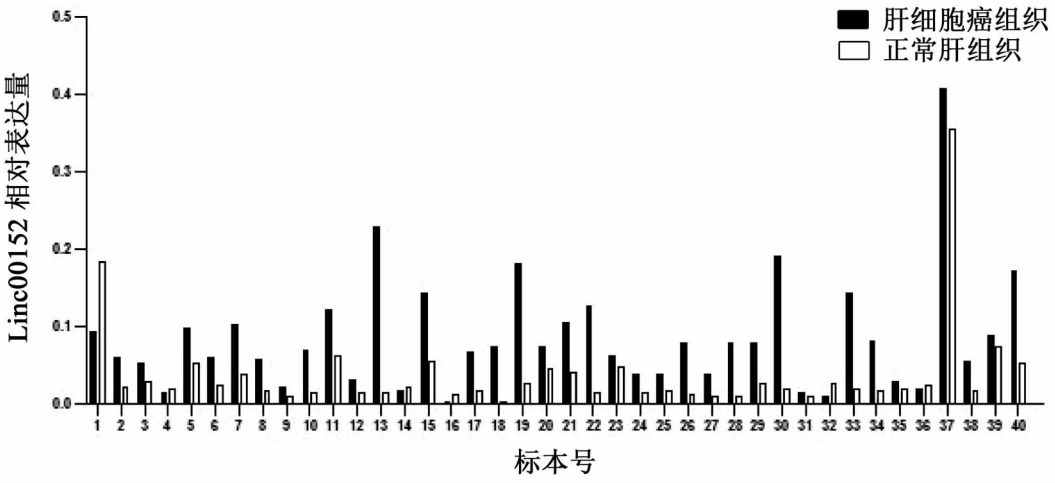


图 2 Linc00152 在肝细胞癌组织与正常肝组织中的表达情况

四、不同临床病理特征者的 Linc00152 表达情况

肝细胞癌低分化者的 Linc00152 低表达者比例高于中分化者 ( $P < 0.017$ )，有血管侵犯者的 Linc00152 低表达者比例高于无血管侵犯者 ( $P < 0.05$ )，见表 1。

讨 论

肝细胞癌是一种高病死率的原发性肝癌。血液中甲胎蛋白作为常用的肝细胞癌筛查手段，其特异

度和灵敏度不能令人满意，即使其异质体甲胎蛋白 -L3 也无法取得良好效果<sup>[11]</sup>。而循环核苷酸作为肿瘤标志物进行筛查具有廉价、便捷和无创的优点，使用 LncRNA 作为肿瘤标志物的研究正在开展中。例如，通过采集患者尿液中的 LncRNA-PCA3 进行前列腺癌的筛查，比目前常规筛查所使用的 PSA3 具有更高的灵敏度和特异度<sup>[12]</sup>。血浆 LncRNA-IN-STP1 的表达水平检测，可作为甲胎蛋白的补充，提高对肝细胞癌筛查的特异度和灵敏度<sup>[13]</sup>。

表 1	不同临床病理特征者的 Linc00152 表达情况比较			例（%）	
临床病理特征	例数	Linc00152 相对表达量		$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值
		低表达	高表达		
性别				2. 057	0. 151
男	35	16（46）	19（54）		
女	5	4（80）	1（20）		
年龄				1. 616	0. 204
<50 岁	18	7（39）	11（61）		
≥50 岁	22	13（59）	9（41）		
乙型病毒性肝炎				1. 833	0. 169
无	5	1（20）	4（80）		
有	35	18（53）	16（47）		
肝硬化				0. 125	0. 723
无	12	5（46）	6（55）		
有	28	15（52）	14（48）		
HBV DNA				0. 404	0. 525
<100 copies/ml	18	10（56）	8（44）		
≥100 copies /ml	22	10（46）	12（55）		
甲胎蛋白				0	1. 000
<20 μg/L	20	10（50）	10（50）		
≥20 μg/L	20	10（50）	10（50）		
分化				6. 965	0. 031
低	11	8（73）	3（27）		
中	16	4（25） <sup>a</sup>	12（75）		
高	13	8（62）	5（39）		
肿瘤大小				2. 667	0. 103
<5 cm	26	10（40）	15（60）		
≥5 cm	14	10（67）	5（33）		
肿瘤数目				0	1. 000
1 个	30	15（50）	15（50）		
>1 个	10	5（50）	5（50）		
血管侵犯				7. 619	0. 006
无	28	10（36）	18（64）		
有	12	10（83）	2（17）		

注：与低分化者比较,<sup>a</sup>*P*<0. 017

Linc00152 与胃癌、肺癌和直肠癌等的相关性及可能的作用机制,已经有了相关报道。Linc00152 在胃癌组织中高表达,与胃癌病理分级等临床特征相关,通过与果蝇 zeste 基因增强子的

人类同源物 2（EZH2）结合抑制 p15 和 p21 促进胃癌细胞系的生长,推测其可能促进胃癌的发展<sup>[7-8]</sup>。在肺腺癌中,Linc00152 与 EZH2 相互作用可以抑制 IL-24 的表达促进肺腺癌的发展<sup>[9]</sup>。针对

直肠癌的研究则显示, miR-376c-3p 可以抑制 Linc00152 的表达, 使结直肠癌细胞活力下降, 凋亡增加<sup>[10]</sup>。上述研究提示, Linc00152 对多种恶性肿瘤具有促进作用。而且, 血浆中的 Linc00152 是胃癌的独立风险因子, 是胃癌筛查的潜在生物标志物<sup>[14]</sup>。本研究显示, Linc00152 在肝细胞癌组织中相对表达量高于正常肝组织, 其低表达倾向出现在低分化和有血管侵犯的患者中, 提示 Linc00152 可能与肝细胞癌的预后有关。由于所收集标本的随访时间未超过 3 年, 故未作相关的生存分析, 笔者将在时间足够后进行分析。目前笔者正在进行细胞功能试验探索 Linc00152 对肝细胞癌的作用, 并将进行后续报道。

# 参 考 文 献

- [1] Bosetti C, Turati F, La Vecchia C. Hepatocellular carcinoma epidemiology. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2014, 28 (5): 753-770.
- [2] Batista PJ, Chang HY. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease. *Cell*, 2013, 152 (6): 1298-1307.
- [3] Kaikkonen MU, Lam MT, Glass CK. Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovasc Res*, 2011, 90 (3): 430-440.
- [4] Li J, Xuan Z, Liu C. Long non-coding RNAs and complex human diseases. *Int J Mol Sci*, 2013, 14 (9): 18790-18808.
- [5] Panzitt K, Tschernatsch MM, Guelly C, Moustafa T, Stradner M, Strohmaier HM, Buck CR, Denk H, Schroeder R, Trauner M, Zatloukal K. Characterization of HULC, a novel gene with striking up-regulation in hepatocellular carcinoma, as noncoding RNA. *Gastroenterology*, 2007, 132 (1): 330-342.
- [6] Du Y, Kong G, You X, Zhang S, Zhang T, Gao Y, Ye L, Zhang X. Elevation of highly up-regulated in liver cancer (HULC) by hepatitis B virus X protein promotes hepatoma cell proliferation via down-regulating p18. *J Biol Chem*, 2012, 287

- (31): 26302-26311.
- [7] Zhou J, Zhi X, Wang L, Wang W, Li Z, Tang J, Wang J, Zhang Q, Xu Z. Linc00152 promotes proliferation in gastric cancer through the EGFR-dependent pathway. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015, 34: 135.
- [8] Chen WM, Huang MD, Sun DP, Kong R, Xu TP, Xia R, Zhang EB, Shu YQ. Long intergenic non-coding RNA 00152 promotes tumor cell cycle progression by binding to EZH2 and repressing p15 and p21 in gastric cancer. *Oncotarget*, 2016, 7 (9): 9773-9787.
- [9] Chen QN, Chen X, Chen ZY, Nie FQ, Wei CC, Ma HW, Wan L, Yan S, Ren SN, Wang ZX. Long intergenic non-coding RNA 00152 promotes lung adenocarcinoma proliferation via interacting with EZH2 and repressing IL24 expression. *Mol Cancer*, 2017, 16 (1): 17.
- [10] Zhang YH, Fu J, Zhang ZJ, Ge CC, Yi Y. LncRNA-LINC00152 down-regulated by miR-376c-3p restricts viability and promotes apoptosis of colorectal cancer cells. *Am J Transl Res*, 2016, 8 (12): 5286-5297.
- [11] 陈敏, 王永忠, 杭双荣, 申红玉, 濮翔科. 甲胎蛋白异质体 3 对肝细胞癌的预测作用. *新医学*, 2009, 40 (8): 514-515.
- [12] Lee GL, Dobi A, Srivastava S. Prostate cancer: diagnostic performance of the PCA3 urine test. *Nat Rev Urol*, 2011, 8 (3): 123-124.
- [13] Lui KY, Peng HR, Lin JR, Qiu CH, Chen HA, Fu RD, Cai CJ, Lu MQ. Pseudogene integrator complex subunit 6 pseudogene 1 (INTS6P1) as a novel plasma-based biomarker for hepatocellular carcinoma screening. *Tumour Biol*, 2016, 37 (1): 1253-1260.
- [14] Yang T, Zeng H, Chen W, Zheng R, Zhang Y, Li Z, Qi J, Wang M, Chen T, Lou J, Lu L, Zhou T, Dai S, Cai M, You W, Pan K. *Helicobacter pylori* infection, H19 and LINC00152 expression in serum and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Cancer Epidemiol*, 2016, 44: 147-153.

(收稿日期: 2017-05-31)

(本文编辑: 林燕薇)