



开放科学标识码
(OSID)

长链非编码RNA FGD5-AS1 通过 miR-542-3p/ GTPBP4 对肝癌细胞放射敏感性的影响

陈新¹, 章诺贝^{2*}

(1. 南昌大学 第二附属医院 核医学科, 江西 南昌 330000;

2. 南昌大学 第二附属医院 消化内科, 江西 南昌 330000)

[摘要] 目的: 探讨长链非编码RNA FGD5-AS1 (lncRNA FGD5-AS1) 对肝癌细胞放射敏感性的影响及其分子机制. 方法: 运用 qRT-PCR 检测 FGD5-AS1、miR-542-3p 和 GTPBP4 在肝癌组织和肝癌细胞系中的表达情况; 采用克隆形成实验和流式细胞仪分析 FGD5-AS1 和 GTPBP4 表达变化对肝癌细胞系放射敏感性的影响. 利用基因沉默、qRT-PCR 和 Western blot 检测 FGD5-AS1 对 miR-542-3p 及其靶基因 GTPBP4 表达的影响, 并运用荧光素酶报告实验分析 lncRNA FGD5-AS1 对 miR-542-3p/GTPBP4 表达的调控作用. 结果: FGD5-AS1 和 GTPBP4 在肝癌组织和肝癌细胞系中表达上调, miR-542-3p 在肝癌组织和肝癌细胞系中表达下调. 沉默 FGD5-AS1 可增强肝癌细胞 Huh7 和 PLC5 的放射敏感性. 沉默 GTPBP4 可以抑制 Huh7 和 PLC5 细胞的克隆形成, 促进 Huh7 和 PLC5 细胞的凋亡, 增强 Huh7 和 PLC5 细胞的放射敏感性. GTPBP4 是 miR-542-3p 的下游靶基因, miR-542-3p 可以负向调控 GTPBP4 的表达水平; 而 FGD5-AS1 可负向调控 miR-542-3p 的表达, 并正向调控 GTPBP4 的表达水平; FGD5-AS1 对 HCC 细胞放射敏感性的影响又依赖于 miR-542-3p. 结论: FGD5-AS1 作为 miR-542-3p 的“分子海绵”竞争性上调 GTPBP4 的表达进而影响肝癌细胞的放射敏感性.

[关键词] 肝细胞癌; 长链非编码RNA FGD5-AS1; 放射敏感性; miRNA-542-3p; GTPBP4

[中图分类号] R735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2021)02-0152-12

doi:10.11778/j.jdxh.2021.02.006

The research on lncRNA FGD5-AS1 influences radiosensitivity of hepatoma cells by modulating the expression of miR-542-3p/GTPBP4

CHEN Xin¹, ZHANG Nuobei^{2*}

(1. Department of Nuclear Medicine, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China;

2. Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role and molecular mechanism of the influence of lncRNA FGD5-AS1 on radiosensitivity of hepatocellular carcinoma. **Methods:** qRT-PCR was used to detect the expression of FGD5-AS1, miR-542-3p and GTPBP4 in hepatocarcinoma and hepatoma cell lines. The

[收稿日期] 2020-07-04

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81760427); 江西省自然科学基金项目(20202BABL206094; 20202BABL216037); 江西省卫生健康委科技计划项目(20201037; 202110042)

[作者简介] 陈新(1984-), 女, 主治医师, 研究方向: 肿瘤核医学及分子影像学研究, E-mail: 13870979404@163.com

通信作者: 章诺贝, 男, 副主任医师, 副教授, 研究方向: 消化系统肿瘤基因治疗研究, E-mail: znbiex@163.com

effects of FGD5-AS1 and GTPBP4 expression changes on the radiosensitivity of HCC cell lines were analyzed by colony formation assay and flow cytometry. The effects of FGD5-AS1 on the expression of miR-542-3p and its target gene GTPBP4 were detected by luciferase reporter assay, gene silencing, qRT-PCR and Western blot. Analysis of the regulatory effect of lncRNA FGD5-AS1 on the expression of miR-542-3p/GTPBP4 through the luciferase report experiment. **Results:** FGD5-AS1 and GTPBP4 were up-regulated in hepatocarcinoma and hepatoma cell lines, and miR-542-3p was down-regulated in hepatocarcinoma and hepatoma cell lines. Silencing FGD5-AS1 also enhanced the radiosensitivity of Huh7 and PLC5 cells. Silencing GTPBP4 inhibited the clonal formation of Huh7 and PLC5 cells, promoted the apoptosis of Huh7 and PLC5 cells, and enhanced the radiosensitivity of Huh7 and PLC5 cells. GTPBP4 is a target gene of miR-542-3p, and miR-542-3p can negatively regulate the mRNA and protein expression levels of GTPBP4. However, FGD5-AS1 can negatively regulate the expression level of miR-542-3p, and positively regulate the expression level of GTPBP4. The role of FGD5-AS1 in the radiosensitivity is dependent on miR-542-3p. **Conclusion:** FGD5-AS1 can be used as a ‘molecular sponge’ of miR-542-3p to competitively up-regulate the expression of GTPBP4 and thus affect the radiosensitivity of HCC cells.

[**Key words**] hepatocellular carcinoma; lncRNA FGD5-AS1; radiosensitivity; miRNA-542-3p; GTPBP4

原发性肝癌(hepatocellular carcinoma,HCC),是世界上第6大最常见的恶性肿瘤,其死亡率居全球癌症死亡率第3位^[1-2].目前,放疗是治疗HCC常用的方法之一.然而,放射抗性的发生和发展已经成为治疗肝癌的主要临床障碍^[3].因此,提高肝癌细胞的对放射的敏感性是提升放疗效果的有效途径.

多项研究表明,长链非编码RNA(long non-coding RNA,lncRNA)在调控肿瘤细胞的对放射的敏感性中起着至关重要的作用^[4-5].lncRNA SNHG1在胶质瘤组织中的表达水平明显高于正常组织,沉默SNHG18可以通过抑制信号素5A,提高胶质瘤细胞的放射敏感性^[6].lncRNA OIP5-AS1在耐辐射的结肠癌细胞中表达下调,沉默OIP5-AS1通过调控miR-369-3p/DYRK1A的表达以增强结肠癌细胞LoVo细胞活性,抑制放射诱导的LoVo细胞凋亡^[7].研究发现,lncRNA FGD5-AS1可促进结直肠癌细胞的增殖、迁移及侵袭^[8],但其在肿瘤放射敏感性中的作用至今仍不清楚.

miRNA是一类长度约为22个核苷酸的单链非编码RNA,可在转录水平及转录后水平上调节

基因的表达,从而参与多种生物学过程的调控^[9].研究发现,miRNA在调节癌细胞的放射敏感性中起关键作用^[10].沉默miR-21可以通过抑制PI3K/Akt信号通路,增强胶质瘤细胞放射敏感性^[11].沉默miR-214可以通过上调p38MAPK的表达,以增强非小细胞肺癌细胞的放射敏感性^[12].过表达miR-133a可通过抑制表皮生长因子受体的表达从而增强食管癌细胞的放射敏感性^[13].研究发现,miR-542-3p可抑制卵巢癌细胞的增殖与侵袭,但在肿瘤放射敏感性中的作用至今仍不清楚^[14].本研究探究了lncRNA FGD5-AS1、miR-542-3p及其下游靶基因在HCC组织和细胞中的表达以及在调控HCC放射敏感性中的作用机制.

1 材料与方法

1.1 研究对象

本研究经南昌大学第二附属医院伦理委员会批准通过,并获得所有患者的知情同意书.21对HCC组织和癌旁组织取自南昌大学第二附属医院的肝癌手术患者.所有患者经组织病理学确诊

为肝癌,且术前未接受任何辅助治疗. 样品储存在-80℃冰箱中.

1.2 细胞培养及辐射

人肝细胞(LO2)和肝癌细胞系(Huh7、SMMC-7721、PLC5 和 Bel-7402)来自中国科学院上海细胞库. LO2、SMMC-7721 和 Bel-7402 细胞在含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基(美国 Solarbio 公司)中培养. Huh7 和 PLC5 细胞在含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基(美国 Solarbio 公司)中培养. 将细胞置于体积分数 5% 的 CO₂、37℃条件下培养. 用 X 射线发生器(剂量率 2 Gy/min)对细胞照射,Huh7 和 PLC5 细胞给予 0、2、4、6 或 8 Gy 辐射剂量照射.

1.3 细胞转染

上海吉玛公司构建质粒 sh-GTPBP4、si-FGD5-AS1、miR-542-3p、anta-miR-542-3p 及相应对照质粒. 使用 PCR 扩增 FGD5-AS1 的全长序列并克隆到 pcDNA-3.1 载体中,构建 pcDNA-FGD5-AS1 质粒用于过表达 FGD5-AS1. 采用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司)将 sh-GTPBP4、si-FGD5-AS1、miR-542-3p、anta-miR-542-3p、sh-NC、si-NC、miR-NC、anta-NC、pcDNA-FGD5-AS1 和 pcDNA 质粒分别转染至 Huh7 和 PLC5 细胞中,转染后 48 h 收集细胞进行下一步实验. 本研究中所用的 shRNA GTPBP4、siRNA FGD5-AS1 和 anta-miR-542-3p 的序列见表 1.

表 1 实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)引物序列
Table 1 Primer sequence of qRT-PCR

引物名称	序列	扩增片段长度/bp
sh-GTPBP4	5'-TGATGTGCGACAGACTCTCAAGTGAATA-3'	29
si-FGD5-AS1	5'-GGAGGAGUCAGGAGGAAUAAU-3'	21
anta-miR-542-3p	5'-UUCAGUUAUCACAGUACUGUA-3'	21

1.4 实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)

根据试剂说明书,使用 TRIzol 试剂(美国 Invitrogen 公司)从组织和细胞中分离总 RNA. 使用 PrimeScript™ RT 试剂盒(美国 Takara 公司)将总 RNA 反转录合成 cDNA. 在序列检测系统(ABI Prism 7700;美国 ABI 公司)上使用 PrimeScript™ RT reagent kit(日本 Takara 公司)检测基因的表达

水平. 通过 TaqMan miRNA assay 试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)分析 miR-542-3p 在组织和细胞中的表达水平. 使用 β-actin 作为 FGD5-AS1 和 GTPBP4 的内参基因,U6 作为 miR-542-3p 的内参基因,采用 2^{-ΔΔCt}法检测 FGD5-AS1、miR-542-3p 和 GTPBP4 的相对表达水平. 本研究所用的引物序列见表 2.

表 2 RT-PCR 引物序列
Table 2 Primer sequence of RT-PCR

引物序列	序列	
	上游引物	下游引物
FGD5-AS1	5'-CTAGAGGCTCGCATTGTGTG-3'	5'-GCCCCACACGAAACCTAT-3'
miR-542-3p	5'-UACAGUACUGUGAUAACUGAA-3'	5'-CAGUUAUCACAGUACUGUAUU-3'
GTPBP4	5'-CGATCGGCCTGTAATTGG-3'	5'-TTGTCCAGAAACAGGCCTCA-3'
β-actin	5'-TGAAGATCAAGATCATTGCTCCTC-3'	5'-CAACTAAGTCATAGTCCGCCTAGA-3'
U6	5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'	5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'

1.5 蛋白质印迹分析

使用含有蛋白抑制剂的 RIPA buffer(美国

Solarbio 公司)提取 Huh7 和 PLC5 细胞的总蛋白. 使用 Enhanced BCA Protein Assay Kit(上海

Beyotime 公司)检测蛋白表达.取 30 μg 蛋白样品以质量分数 14% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,分离的蛋白转移到聚偏氟乙烯膜上.使用质量分数 5%脱脂奶粉封闭后,将聚偏氟乙烯膜浸泡在一抗 GTPBP4 ($V_{\text{抗体}}:V_{\text{抗体稀释液}}=1:1\,000$,英国 Abcam 公司)和抗 β -actin($V_{\text{抗体}}:V_{\text{抗体稀释液}}=1:1\,000$,美国 Boster 公司)稀释液二抗稀释液($V_{\text{抗体}}:V_{\text{抗体稀释液}}=1:2\,000$,美国 Boster 公司)中,室温孵育 1 h;洗膜液洗膜后使用 BeyoECL Plus(上海 Beyotime 公司)试剂盒显色,以 β -actin 作为内参基因,实验重复 3 次,ImageJ(美国 NIH Image 公司)软件分析蛋白条带灰度值.

1.6 克隆形成试验

转染后,分别给予 Huh7 和 PLC5 细胞 0、2、4、6 和 8 Gy 的辐射照射.细胞培养 5 d 后,用甲醇固定 15 min,并在室温条件下使用结晶紫(美国 Solarbio 公司)染色 20 min,在倒置显微镜下观察细胞克隆数(>50 个细胞/克隆),放射细胞存活曲线计算如下:存活分数=处理组集落形成率/对照组集落形成率.

1.7 流式细胞仪分析

Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(美国 Sigma-Aldrich 公司)分析 Huh7 和 PLC5 细胞的凋亡.转染后,给予 Huh7 和 PLC5 细胞 0、6 Gy 剂量照射,细胞离心后悬浮于 $1\times$ Annexin V Binding buffer(500 μL).Annexin V-FITC(5 μL)在黑暗条件下处理细胞 5 min.流式细胞仪分析细胞的凋亡情况.

1.8 荧光素酶报告试验

扩增野生型和突变型的 GTPBP4 3'UTR 区的碱基序列(包含 miR-542-3p 位点),并将其分别克隆到荧光素酶报告载体(pmiR-RB-Report)中构建 pmir-GTPBP4-WT 和 pmir-GTPBP4-MUT 载体.同样将野生型和突变型的 FGD5-AS1 3'UTR 区的碱基序列克隆到荧光素酶报告载体(pmiR-RB-Report)中构建 pmir-FGD5-AS1-WT 和 pmir-FGD5-AS1-MUT 载体.将荧光素酶报告载体和 miR-542-3p、anta-miR-542-3p、miR-NC 和 anta-NC 共转染人 Huh7 细胞.转染 48 h 后,用荧光素酶测

定试剂盒(美国 Pharmingen 公司)检测细胞内荧光素酶的相对活性.

1.9 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析.结果以均值±标准差表示,用 student's *t* test 分析两组组间的差异.多组组间差异采用单因素方差分析以及 Tukey's post hoc 进行检验.以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

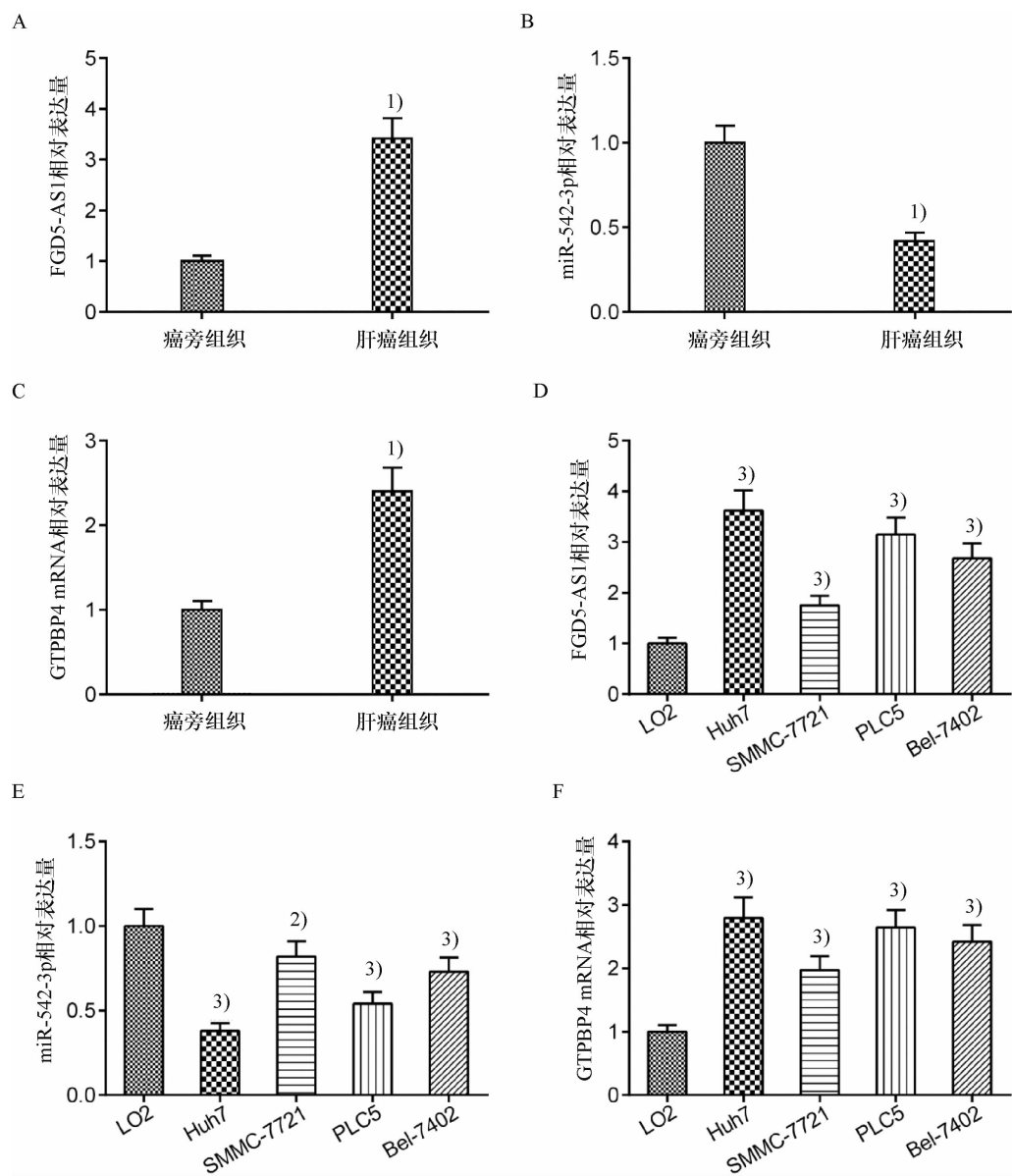
2 结果

2.1 FGD5-AS1、miR-542-3p 和 GTPBP4 在 HCC 组织和细胞中的表达

FGD5-AS1 和 GTPBP4 的 mRNA 表达水平在肝癌组织中升高($P<0.01$,图 1A、1C).相反,miR-542-3p 在 HCC 组织中的表达水平明显低于癌旁组织($P<0.01$,图 1B).此外,与人肝细胞(LO2)相比,FGD5-AS1 和 GTPBP4 的 mRNA 表达水平在 HCC 细胞系显著升高,miR-542-3p 表达水平显著降低(图 1D-1F).由此可见,在 HCC 组织和细胞中,FGD5-AS1 和 GTPBP4 表达上调,miR-542-3p 表达下调.

2.2 下调 GTPBP4 可增强 HCC 细胞对放射的敏感性

为探讨 GTPBP4 在 HCC 细胞放射敏感性中的作用,通过向 HCC 细胞(Huh7 和 PLC5)中转染 sh-GTPBP4、sh-NC 降低 HCC 细胞中 GTPBP4 的表达水平.qRT-PCR 和 Western blot 检测分析发现,与 sh-NC 组相比,sh-GTPBP4 组中 GTPBP4 的 mRNA 和蛋白水平明显降低(图 2A-2D).采用克隆形成实验和流式细胞仪分析了沉默 GTPBP4 对 HCC 细胞系放射敏感性的影响.用 sh-GTPBP4 或 sh-NC 转染 Huh7 和 PLC5 细胞,分别给予 0、2、4、6 和 8Gy 的剂量照射.结果表明,沉默 GTPBP4 对 Huh7 和 PLC5 细胞的克隆形成能力具有放射剂量依赖性的抑制作用(图 2E、2F).在没有或存在放射线照射(6Gy)的情况下,敲除 GTPBP4 促进了 Huh7 和 PLC5 细胞的凋亡(图 2G、2H).这些结果表明 GTPBP4 的下调可以增强 HCC 细胞的放射敏感性.



1) 与癌旁组织比较, $P < 0.01$; 2) 与人肝细胞比较, $P < 0.05$; 3) 与人肝细胞比较, $P < 0.01$.
1) Compared with normal tissues, $P < 0.01$; 2) Compared with human hepatocyte cells, $P < 0.05$; 3) Compared with human hepatocyte cells, $P < 0.01$
qRT-PCR 分析 HCC 组织中 (A) FGD5-AS1、(B) miR-542-3p 和 (C) GTPBP4 的表达水平. qRT-PCR 分析 HCC 细胞 (Huh7、SMMC-7721、PLC5 和 Bel-7402) 中 (D) FGD5-AS1、(E) miR-542-3p 和 (F) GTPBP4 的表达水平
qRT-PCR analysis of (A) FGD5-AS1, (B) miR-542-3p, and (C) GTPBP4 mRNA expression in HCC tissues. qRT-PCR analysis of (D) FGD5-AS1, (E) miR-542-3p, and (F) GTPBP4 mRNA expression in HCC cell lines (Huh7, SMMC-7721, PLC5, and Bel-7402).

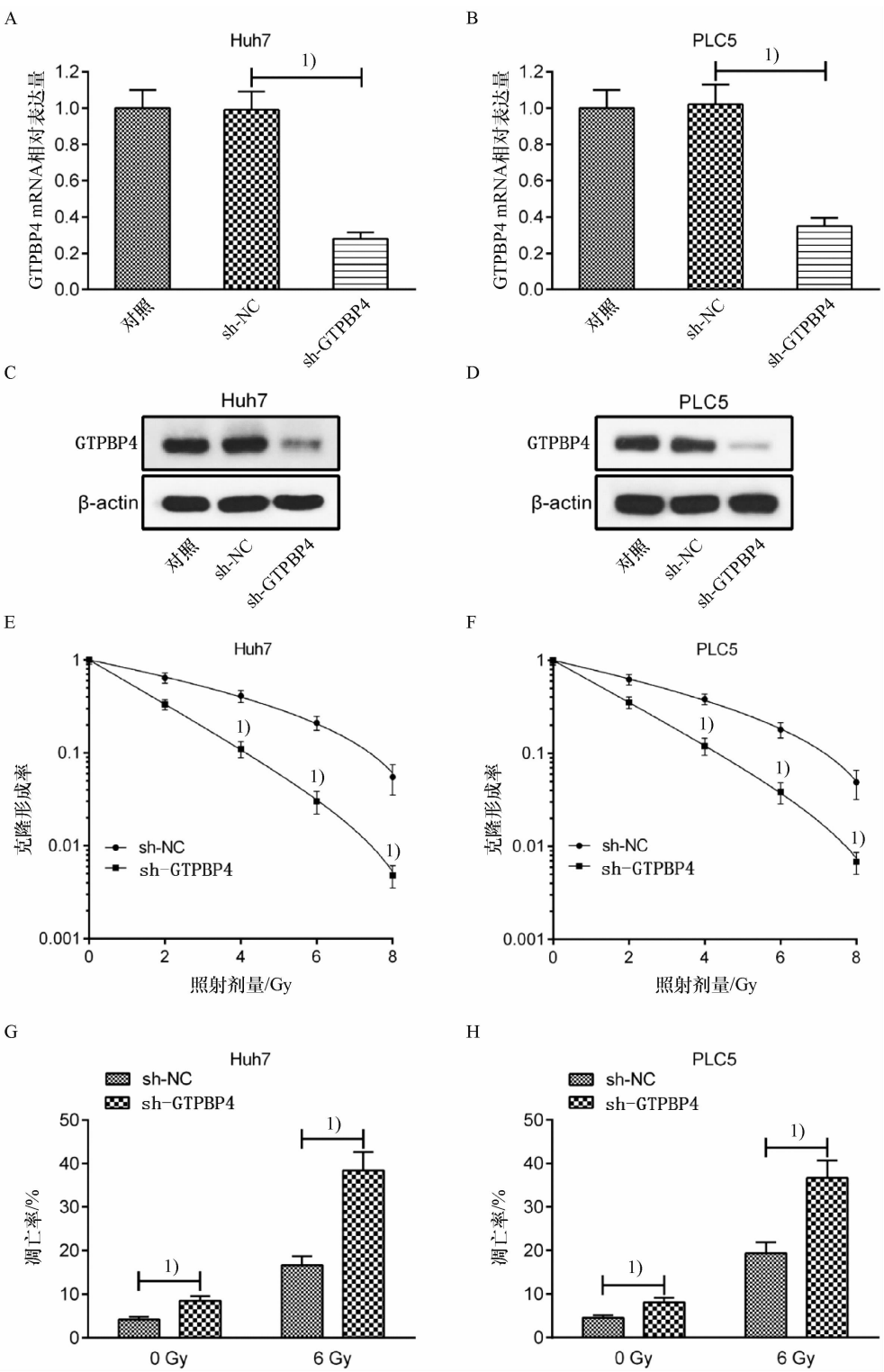
图 1 FGD5-AS1、miR-542-3p 和 GTPBP4 在 HCC 组织和细胞中的表达变化

Fig.1 Expression of FGD5-AS1, miR-542-3p, and GTPBP4 in HCC tissues and cell lines

2.3 下调 FGD5-AS1 可提高 HCC 细胞对放射的敏感性

与 sh-NC 组相比, sh-FGD5-AS1 组 Huh7 和 PLC5 细胞中 FGD5-AS1 的表达显著降低 (图 3A、3B). 转染后, 给予 Huh7 和 PLC5 细胞 0、2、4、6 和 8 Gy 的剂量照射. 克隆形成试验结果表明, 射线

照射后, FGD5-AS1 下调可显著降低 Huh7 和 PLC5 细胞的克隆形成能力 (图 3C、3D). 在没有或存在放射线照射 (6 Gy) 的情况下, FGD5-AS1 的下调可以促进 Huh7 和 PLC5 细胞的凋亡 (图 3E、3F). 由此可见, FGD5-AS1 下调可增强 HCC 细胞对放射的敏感性.



1) 与 sh-NC 组比较, $P < 0.01$.

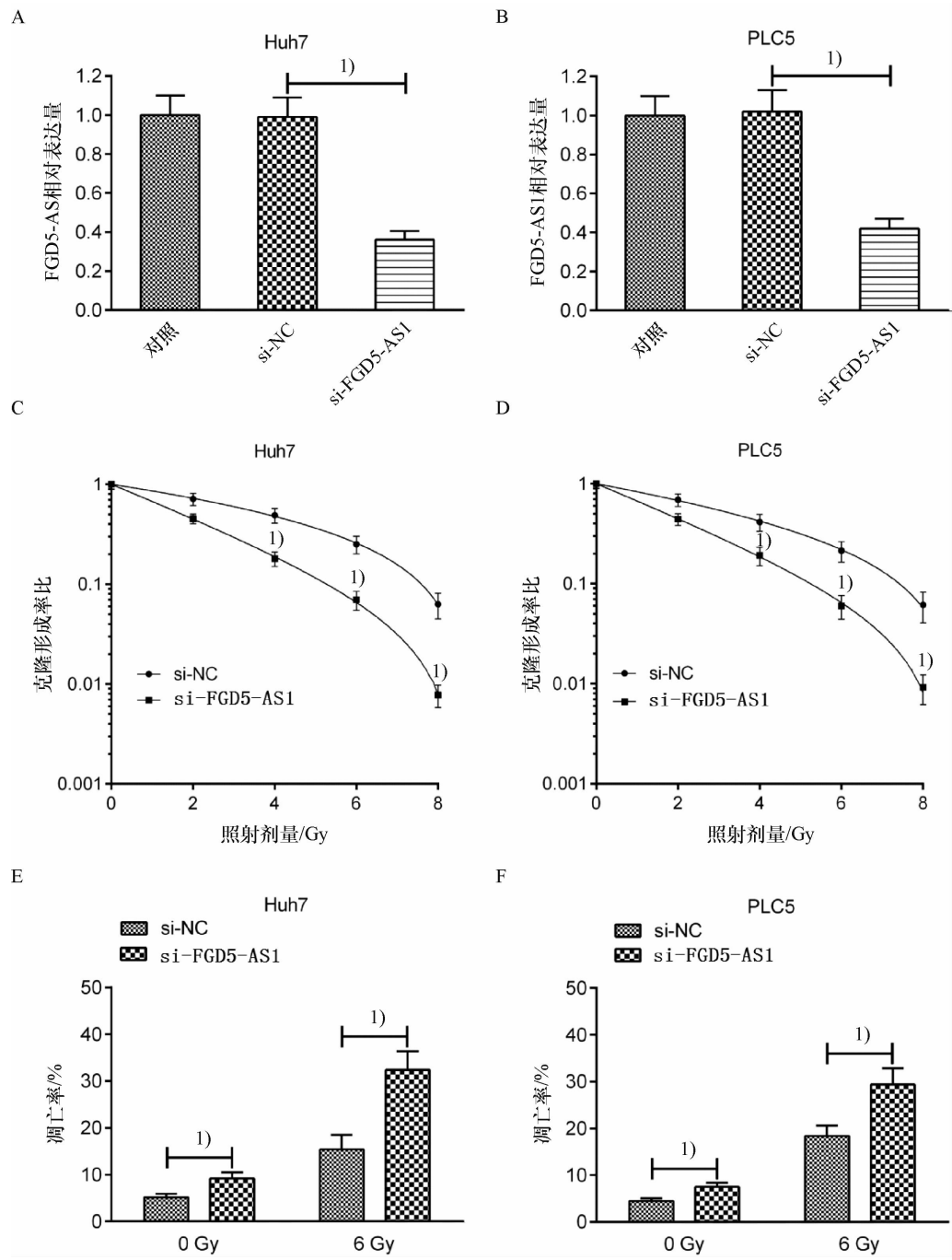
1) Compared with sh-NC, $P < 0.01$.

A-D; GTPBP4 的 mRNA 和蛋白水平. E、F: Huh7 和 PLC5 细胞的克隆形成能力. G、H; sh-GTPBP4 转染后的 Huh7 和 PLC5 细胞的凋亡情况.

A-D; the mRNA and protein levels of GTPBP4. E、F; The effect of GTPBP4 on the sensitivity of HCC cell lines. G、H; The effect of GTPBP4 on the sensitivity of HCC cell lines.

图 2 下调 GTPBP4 对 HCC 细胞放射敏感性的影响

Fig. 2 The effect of down-regulation of GTPBP4 on the radiosensitivity of HCC cells



1) 与 sh-NC 组比较, $P < 0.01$

1) Compared with sh-NC, $P < 0.01$.

A、B: 用 sh-FGD5-AS1 转染 Huh7 和 PLC5 细胞后 FGD5-AS1 的表达水平; C、D: Huh7 和 PLC5 细胞的克隆形成能力; E、F: Huh7 和 PLC5 细胞 sh-FGD5-AS1 转染后的凋亡情况

A、B: Huh7 and PLC5 cells were transfected with sh-FGD5-AS1, and the expression of FGD5-AS1; C、D: The survival fractions of Huh7 and PLC5 cells; E、F: The apoptosis of Huh7 and PLC5 cells which were transfected with sh-FGD5-AS1

图 3 下调 FGD5-AS1 对 HCC 细胞放射敏感性的影响

Fig. 3 The effect of FGD5-AS1 down-regulation on the radiosensitivity of HCC cells

2.4 miR-542-3p 靶向 GTPBP4 并抑制 HCC GTPBP4 的表达

使用 Starbase v 2.0 (<http://starbase.sysu.edu.cn/>) 分析预测 GTPBP4 的 3'UTR 包含一个 miR-542-3p 结合位点(图 4A). 为了证实 GTPBP4 是否是 miR-542-3p 的靶基因, 将 GTPBP4-WT-3'

edu. cn/) 分析预测 GTPBP4 的 3'UTR 包含一个 miR-542-3p 结合位点(图 4A). 为了证实 GTPBP4 是否是 miR-542-3p 的靶基因, 将 GTPBP4-WT-3'

UTR 质粒、GTPBP4-MUT-3'UTR 质粒与 miR-542-3p、miR-NC 共转染到 Huh7 细胞中. 转染 48 h 后, miR-542-3p 可显著降低 pmiR-GTPBP4-WT 载体的荧光活性. 然而, 含有 pmiR-GTPBP4-MUT 载体的荧光活性不受 miR-542-3p 的影响(图 4B). 此外,

与 miR-NC 组相比, miR-542-3p 上调可显著降低 GTPBP4 的 mRNA 和蛋白水平, 而转染 anta-miR-542-3p 则可显著上调 GTPBP4 的 mRNA 和蛋白水平(图 4C、4D). 这些结果表明 miR-542-3p 靶向 GTPBP4, 并抑制 GTPBP4 在 HCC 细胞中的表达.

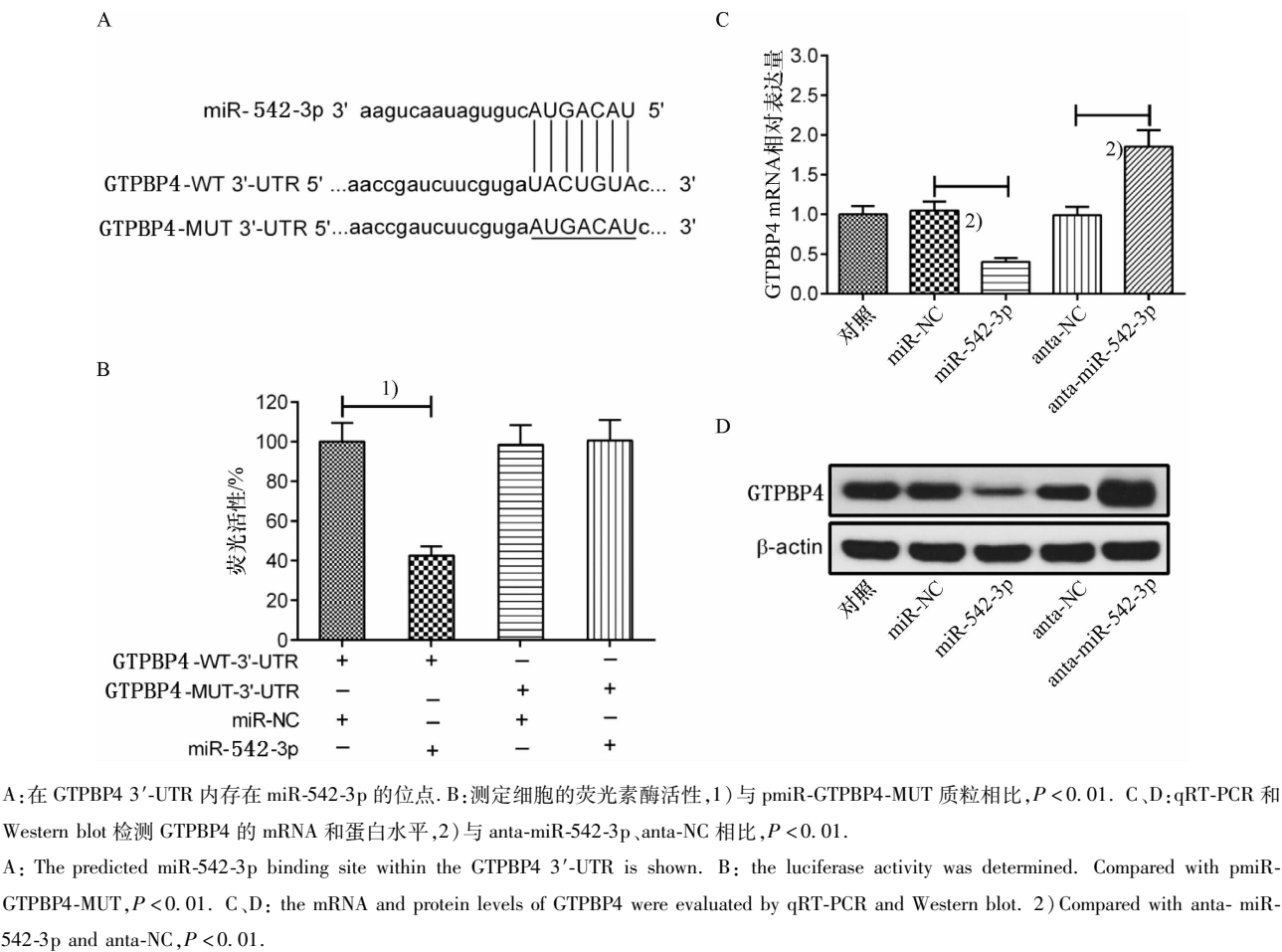


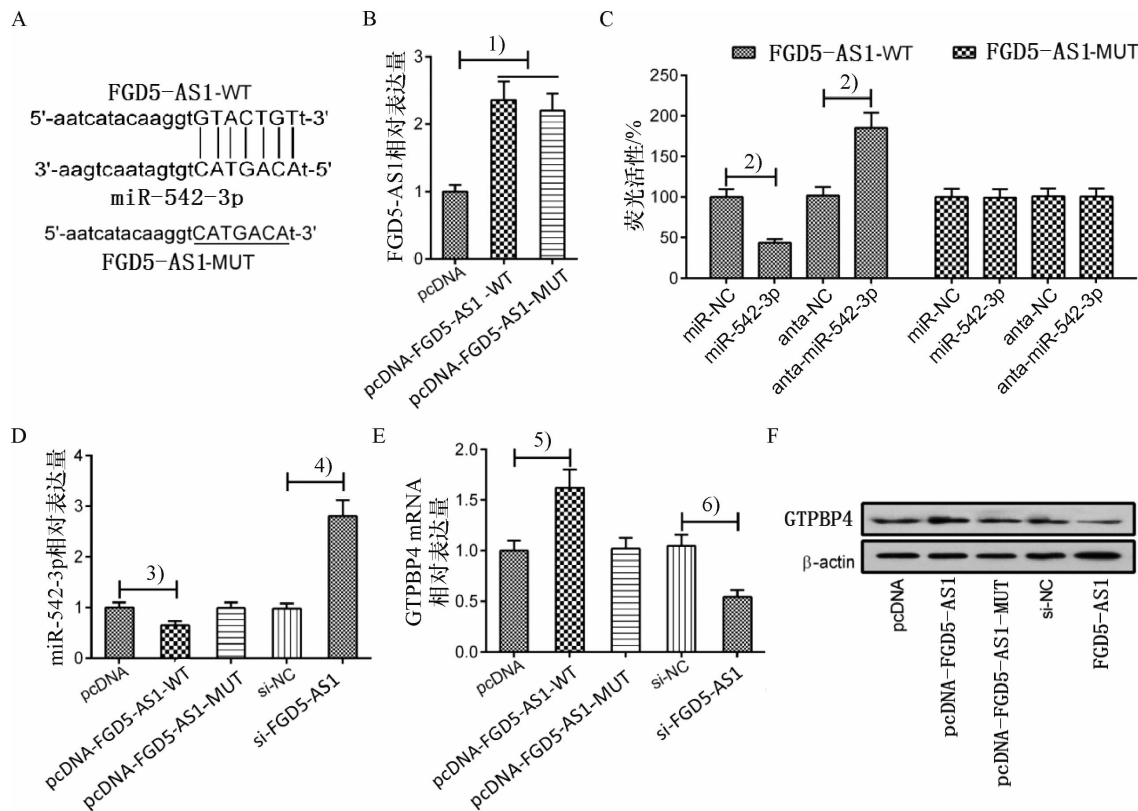
图 4 miR-542-3p 直接靶向 GTPBP4 对 HCC 细胞中 GTPBP4 表达的影响
Fig. 4 The effect of miR-542-3p directly targeting GTPBP4 on the expression of GTPBP4 in HCC cells

2.5 FGD5-AS1 作为 miR-542-3p 的“分子海绵”竞争性促进 GTPBP4 在 HCC 中的表达

使用 Starbase v2.0 (<http://starbase.sysu.edu.cn/>) 预测 FGD5-AS1 基因序列上存在 miR-542-3p 的结合位点(图 5A). 转染 FGD5-AS1 的 Huh7 细胞中 FGD5-AS1 的表达水平明显高于转染 pcDNA 的 Huh7 细胞中 FGD5-AS1 的表达水平(图 5B). 将 pmiR-FGD5-AS1-WT、pmiR-FGD5-AS1-MUT 与 miR-542-3p、miR-NC、anta-miR-542-3p、anta-NC 共转染 Huh7 细胞. Huh7 细胞的 FGD5-AS1-WT 的荧光素酶活性在转染 miR-542-3p 后减弱, 而在转染 anta-miR-542-3p 后增强, 但

miR-542-3p、miR-NC、anta-miR-542-3p、anta-NC 对 pmiR-FGD5-AS1-MUT 荧光素酶活性无明显影响(图 5C). 使用 pcDNA-FGD5-AS1-WT、pcDNA-FGD5-AS1-MUT、pcDNA、si-FGD5-AS1 或 si-NC 转染 Huh7 细胞, 通过 qRT-PCR 检测 miR-542-3p 的表达变化. 结果表明野生型 FGD5-AS1 的过表达可显著降低 miR-542-3p 的表达水平, 而野生型 FGD5-AS1 的表达沉默可显著升高 miR-542-3p 的表达水平(图 5D). 野生型 FGD5-AS1 上调可促进 GTPBP4 mRNA 和蛋白质水平升高, 而沉默野生型 FGD5-AS1 则可以导致 GTPBP4 mRNA 和蛋白质水平降低. 突变型 FGD5-AS1 的上调对 GTPBP4

mRNA 和蛋白质水平没有影响(图 5E、5F). 由此可见,FGD5-AS1 可作为 miR-542-3p 的“分子海绵”竞争性上调 Huh7 细胞中 GTPBP4 的表达.



A:在 FGD5-AS1 的 3'-UTR 内存在 miR-542-3p 的位点. B;qRT-PCR 检测 FGD5-AS1 表达水平,1) 与 FGD5-AS1-MUT 相比较, $P < 0.01$. C:FGD5-AS1-WT 荧光素酶活性,2) 与 FGD5-AS1-WT 和 anta-miR-542-3p 共转染相比较, $P < 0.01$. D;qRT-PCR 检测 miR-542-3p 的表达水平,3) 与 pcDNA 相比较, $P < 0.01$;qRT-PCR 检测 miR-542-3p 的表达水平,4) 与 si-NC 组相比较, $P < 0.01$. E、F;qRT-PCR 和 Western blot 检测 GTPBP4 的 mRNA 和蛋白表达水平,5) 与 pcDNA 相比较, $P < 0.01$;qRT-PCR 和 Western blot 检测 GTPBP4 的 mRNA 和蛋白表达水平,6) 与 si-NC 组相比较, $P < 0.01$.

A;The predicted binding sites of FGD5-AS1 and miR-542-3p is shown. B;the FGD5-AS1 expression level was confirmed by qRT-PCR 1) Compared with pcDNA- FGD5-AS1-MUT, $P < 0.01$. C; the luciferase activity of FGD5-AS1-WT was measured 2) Compared with the cells were co-transfected with FGD5-AS1-WT and anta- miR-542-3p, $P < 0.01$ D; the expression of miR-542-3p was examined by qRT-PCR 3) Compared with pcDNA, $P < 0.01$. the expression of miR-542-3p was examined by qRT-PCR 4) Compared with si-NC, $P < 0.01$. E、F; the mRNA and protein expression levels of GTPBP4 were determined by qRT-PCR and Western blot 5) Compared with pcDNA, $P < 0.01$. the mRNA and protein expression levels of GTPBP4 were determined by qRT-PCR and Western blot 6) Compared with si-NC, $P < 0.01$.

图 5 FGD5-AS1 作为 miR-542-3p 的“分子海绵”对 GTPBP4 在 HCC 细胞中表达的影响

Fig.5 The effect of FGD5-AS1 as a “molecular sponge” of miR-542-3p on the expression of GTPBP4 in HCC cells

2.6 FGD5-AS1 依赖于 miR-542-3p 影响 HCC 细胞对放射的敏感性

为了进一步探讨 FGD5-AS1 在影响 HCC 细胞放射敏感性中的作用机制,在 HuH7 和 PLC5 细胞中进行了恢复实验. 将 si-FGD5-AS1、si-NC 和 anta-miR-542-3p、anta-NC 共转染 HuH7 和 PLC5 细胞后进行放射线照射. 克隆形成实验结果表明, 下调 miR-542-3p 可以减轻 si-FGD5-AS1 对 HuH7

和 PCL5 细胞的克隆形成能力的抑制作用(图 6A、6B). 此外,共转染 si-FGD5-AS1 和 anta-miR-542-3p 的 HuH7 和 PCL5 细胞的凋亡细胞百分比明显低于共转染 si-FGD5-AS1 和 anta-NC 的 HuH7 和 PCL5 细胞的凋亡细胞百分比(图 6C、6D). 由此可见,FGD5-AS1 对 HCC 细胞放射敏感性的影响依赖于 miR-542-3p.

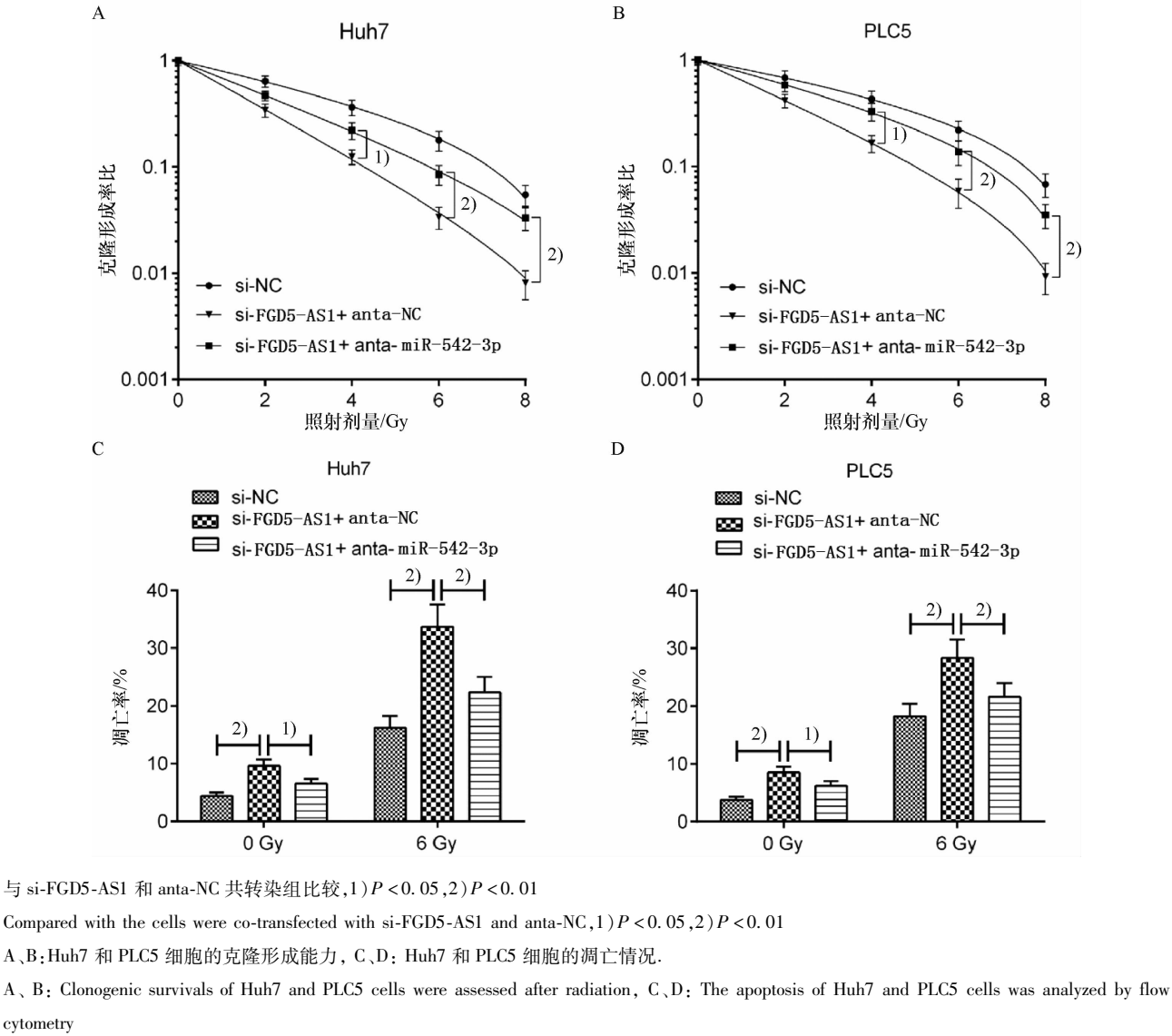


图6 FGD5-AS1 对 HCC 细胞放射敏感性的影响依赖于 miR-542-3p

Fig. 6 The role of FGD5-AS1 in the radiosensitivity is dependent on miR-542-3p

3 讨论

lncRNA FGD5-AS1 位于染色体 11q13.1 上, 可以作为 miRNA 的“分子海绵”调控基因的表达. 研究表明, FGD5-AS1 参与多种癌症的发展, 例如乳腺癌、前列腺癌、非小细胞肺癌和胃癌^[8,15-16]. 有研究发现, FGD5-AS1 在乳头状甲状腺癌组织中的表达水平明显高于正常组织^[17]. 沉默 FGD5-AS1 可以上调 miR-106b-3p 的表达, 抑制 ATAD2 的表达, 进而抑制 K1 和 TPC1 细胞的增殖、迁移和侵袭, 诱导 K1 和 TPC1 细胞凋亡^[18]. 近年来, 多项研究证明, FGD5-AS1 在肿瘤细胞辐射抗性的发生发展中

起着重要作用. 沉默 FGD5-AS1 可以通过下调 Bcl-2 表达, 上调 caspase-3 的表达, 降低鼻咽癌细胞的克隆形成能力, 诱导细胞凋亡, 增强细胞对辐射的敏感性. 此外, 沉默 FGD5-AS1 可以通过调控 miR-204/ZEB1 的表达, 逆转上皮-间质转化表型, 增强鼻咽癌细胞的放射敏感性^[19]. 然而, FGD5-AS1 在 HCC 细胞放射敏感性中的作用尚不清楚. 在本研究中, FGD5-AS1 在 HCC 组织和细胞中表达上调. 此外, 下调 FGD5-AS1 可以降低 Huh7 和 PLC5 细胞的克隆形成能力, 诱导细胞凋亡, 增强肝癌细胞的放射敏感性.

近年来, 多项研究发现 miR-542-3p 在人类癌症的发展中起着重要的调节作用^[20-21]. miR-542-

3p 在胶质瘤组织和细胞中表达下调,且其表达水平与胶质瘤患者的肿瘤分级和预后不良呈负相关^[22]. 过表达 miR-542-3p 可以通过靶向 MALAT-1 抑制 PI3K/Akt 信号通路,进而抑制非小细胞肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[23]. 此外,在腺样囊性癌中,过表达 miR-542-3p 可以抑制 Pim-1 的表达,进而抑制 SACC-83 和 SACC-LM 细胞的增殖和侵袭,诱导细胞凋亡,增强细胞对顺铂的敏感性^[24]. 在本研究中,miR-542-3p 在肝癌组织和细胞中表达下调. FGD5-AS1 的过表达可显著降低 miR-542-3p 的表达水平,而 FGD5-AS1 表达沉默则可显著升高 miR-542-3p 的表达水平. 下调 miR-542-3p 又可以减弱 FGD5-AS1 沉默对肝癌细胞放射敏感性的增强作用,此提示 FGD5-AS1 对 HCC 细胞放射敏感性的影响作用依赖于 miR-542-3p.

GTPBP4 是一种属于 Ser/Thr 蛋白激酶家族的酪氨酸激酶,是细胞周期的重要调节因子,可通过抑制细胞进入有丝分裂来调节细胞大小^[25]. 学者认为 GTPBP4 是一个潜在的恶性肿瘤治疗靶点^[26]. GTPBP4 抑制剂 AZD1775 可以减轻由辐射诱导的肝癌细胞 G2 的阻滞,并增强 Hep3B、Huh7 和 HepG2 细胞对辐射的敏感性^[25]. 此外, AZD1775 治疗可以抑制同源重组修复活性,上调 γ -H2AX 的表达,进而增强奥拉帕利介导胰腺癌细胞对辐射的增敏作用^[27]. 在本研究中, GTPBP4 在 HCC 组织及细胞中表达上调,沉默 GTPBP4 可以降低 Huh7 和 PLC5 细胞的克隆形成能力,诱导细胞凋亡,增强肝癌细胞的放射敏感性. 荧光素酶报告实验发现, GTPBP4 是 miR-542-3p 的靶基因,上调 miR-542-3p 可明显降低 GTPBP4 的 mRNA 和蛋白水平,而转染 anta-miR-542-3p 可明显升高 GTPBP4 的 mRNA 和蛋白水平, miR-542-3p 可靶向抑制 GTPBP4 的表达.

FGD5-AS1 上调可以促进 GTPBP4 mRNA 和蛋白质水平升高,而沉默 FGD5-AS1 则可以导致 GTPBP4 mRNA 和蛋白质水平降低. FGD5-AS1 可作为 miR-542-3p 的“分子海绵”竞争性上调 GTPBP4 的表达进而影响肝癌细胞的放射敏感性的结论.

本研究证实 FGD5-AS1 和 GTPBP4 在肝癌组织和细胞中表达上调,而 miR-542-3p 在肝癌组织

和细胞中表达下调. 功能分析发现 FGD5-AS1 沉默可以通过调节 miR-542-3p/GTPBP4 轴增强肝癌细胞的放射敏感性. 本研究表明靶向 FGD5-AS1 可能成为肝癌放射治疗的新靶点.

[参考文献]

- [1] VILLANUEVA A. Hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med, 2019, 380(15): 1450 - 1462.
- [2] FORNER A, REIG M, BRUIX J. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet, 2018, 391(10127): 1301 - 1314.
- [3] YANG Q, XIE B, TANG H, et al. Minichromosome maintenance 3 promotes hepatocellular carcinoma radioresistance by activating the NF- κ B pathway[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 263.
- [4] KONDO Y, SHINJO K, KATSUSHIMA K. Long non-coding RNAs as an epigenetic regulator in human cancers[J]. Cancer Sci, 2017, 108(10): 1927 - 1933.
- [5] FANALE D, CASTIGLIA M, BAZAN V, et al. Involvement of non-coding RNAs in chemo- and radioresistance of colorectal cancer[J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 937: 207 - 228. DOI:10.1007/978-3-319-42059-2_11.
- [6] HUANG L J, SHEN Y, BAI J, et al. High expression levels of long noncoding RNA small nucleolar RNA host gene 18 and semaphorin 5A indicate poor prognosis in multiple myeloma[J]. Acta Haematol, 2020, 143(3): 279 - 288.
- [7] ZOU Y, YAO S, CHEN X, et al. LncRNA OIP5-AS1 regulates radioresistance by targeting DYRK1A through miR-369-3p in colorectal cancer cells[J]. Eur J Cell Biol, 2018, 97(5): 369 - 378.
- [8] 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 - 585.
- [9] MOLLAEI H, SAFARALIZADEH R, ROSTAMI Z. MicroRNA replacement therapy in cancer[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(8): 12369 - 12384.
- [10] WANG F, MAO A, TANG J, et al. microRNA-16-5p enhances radiosensitivity through modulating Cyclin D1/E1-pRb-E2F1 pathway in prostate cancer cells[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(8): 13182 - 13190.
- [11] PUCETTI M V, ADAMS C M, DAN T D, et al. MicroRNA-21 is required for hematopoietic cell viability after radiation exposure[J]. Int J Radiat Oncol Biol

- Phys, 2019,104(5):1165 – 1174.
- [12] SALIM H, AKBAR N S, ZONG D, et al. miRNA-214 modulates radiotherapy response of non-small cell lung cancer cells through regulation of p38MAPK, apoptosis and senescence[J]. Br J Cancer, 2012,107(8):1361 – 1373.
- [13] WANG X, ZHU W, ZHAO X, et al. miR-133a enhances the sensitivity of Hep-2 cells and vincristine-resistant Hep-2v cells to cisplatin by downregulating ATP7B expression[J]. Int J Mol Med, 2016,37(6):1636 – 1642.
- [14] LI J, SHAO W, FENG H. MiR-542-3p, a microRNA targeting CDK14, suppresses cell proliferation, invasiveness, and tumorigenesis of epithelial ovarian cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2019,110: 850 – 856. DOI:10.1016/j.biopha.2018.11.104.
- [15] CHEN H, LAN Z, LI Q, et al. Abnormal expression of long noncoding RNA FGD5-AS1 affects the development of periodontitis through regulating miR-142-3p/SOCS6/NF-κB pathway[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019,47(1):2098 – 2106.
- [16] ZHANG X Q, SONG L H, FENG S J, et al. LncRNA FGD5-AS1 acts as a competing endogenous RNA for miRNA-223 to lessen oxygen-glucose deprivation and simulated reperfusion (OGD/R)-induced neurons injury[J]. Folia Neuropathol, 2019,57(4):357 – 365.
- [17] LIU L, ZHAN Y, HUANG Y, et al. LncRNA FGD5-AS1 can be predicted as therapeutic target in oral cancer[J]. J Oral Pathol Med, 2020,49(3):243 – 252.
- [18] GAO J, ZHANG Z, SU H, et al. Long noncoding RNA FGD5-AS1 Acts as a competing endogenous RNA on microRNA-383 to enhance the malignant characteristics of esophageal squamous cell carcinoma by increasing SPI expression[J]. Cancer Manag Res, 2020,12:2265 – 2278. DOI:10.2147/CMAR.S236576.
- [19] LEI Y, SHI Y, DUAN J, et al. Identification of alternative splicing and lncRNA genes in pathogenesis of small cell lung cancer based on their RNA sequencing[J]. Adv Clin Exp Med, 2019,28(8):1043 – 1050.
- [20] WANG X P, YAO J, GUAN J, et al. MicroRNA-542-3p functions as a tumor suppressor via directly targeting survivin in hepatocellular carcinoma, Biomed [J]. Pharmacother, 2018,99: 817 – 824. DOI:10.1016/j.biopha.2018.01.131.
- [21] ZHANG T, LIU W, MENG W, et al. Downregulation of miR-542-3p promotes cancer metastasis. through activating TGF-beta/Smad signaling in hepatocellular carcinoma[J]. Onco Targets Ther, 2018,11:1929 – 1939. DOI:10.2147/OTT.S154416.
- [22] WU W, DANG S, FENG Q, et al, MicroRNA-542-3p inhibits the growth of hepatocellular carcinoma cells by targeting FZD7/Wnt signaling pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017,482(1):100 – 105.
- [23] TAO J, LIU Z, WANG Y, et al. MiR-542-3p inhibits metastasis and epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma by targeting UBE3C, Biomed [J]. Pharmacother, 2017,93: 420 – 428. DOI:10.1016/j.biopha.2017.06.070.
- [24] ZHANG X, ZHU Y, ZHANG C, et al. miR-542-3p prevents ovariectomy-induced osteoporosis in rats via targeting SFRP1[J]. J Cell Physiol, 2018,233(9):6798 – 6806.
- [25] LI L, PANG X, ZHU Z, et al. GTPBP4 promotes gastric cancer progression via regulating P53 activity[J]. Cell Physiol Biochem, 2018,45(2):667 – 676.
- [26] 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 – 93997.
- [27] YU H, JIN S. ZHANG N, et al. Up-regulation of GTPBP4 in colorectal carcinoma is responsible for tumor metastasis[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016,480(1):48 – 54.

[责任编辑:丛敏]