



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2019.07.011
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2019.07.011
Chinese Journal of General Surgery, 2019, 28(7):848-856.

· 基础研究 ·

长链非编码 RNA MIF-AS1 在肝癌中表达及其与 上皮 - 间充质转化的关系

胡走肖, 郑小林

(华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院 肝胆胰外科, 湖北 武汉 430014)

摘要

目的: 探讨长链非编码 RNA MIF-AS1 (lncRNA MIF-AS1) 在肝癌中的表达及意义。

方法: 采用 qRT-PCR 法检测 lncRNA MIF-AS1 在 94 例肝癌及其癌旁组织, 以及在不同肝癌细胞株与正常肝细胞中的表达, 分析其表达水平与临床病理参数及预后的关系。将肝癌细胞分别转染 lncRNA MIF-AS1 干扰序列 (沉默组)、lncRNA MIF-AS1 模拟物 (过表达组)、阴性对照组序列 (对照组) 后, 观察肝癌细胞增殖和侵袭能力的变化, 以及上皮 - 间充质转化 (EMT) 相关分子蛋白表达的变化。

结果: lncRNA MIF-AS1 在肝癌组织中表达量明显高于癌旁组织, 在不同肝癌细胞系中表达量均明显高于正常肝细胞 (均 $P < 0.05$)。lncRNA MIF-AS1 的表达水平与患者血清 AFP 水平、肿瘤大小、门静脉微癌栓、TNM 分期明显有关 (均 $P < 0.05$)。lncRNA MIF-AS1 高表达患者术后无瘤生存率及总生存率均明显低于 lncRNA MIF-AS1 低表达患者 (均 $P < 0.05$)；lncRNA MIF-AS1 表达是患者无瘤生存率与总生存率的独立危险因素 (均 $P < 0.05$)。细胞实验显示, 与对照组比较, 沉默组细胞的增殖与侵袭能力明显降低, 上皮表型分子 E- 钙黏附蛋白表达升高, 间质表型分子 N- 钙黏附蛋白及波形蛋白表达降低 (均 $P < 0.05$)；过表达组细胞的增殖与侵袭能力明显增强, E- 钙黏附蛋白表达降低, N- 钙黏附蛋白及波形蛋白表达降低 (均 $P < 0.05$)。

结论: lncRNA MIF-AS1 在肝癌中表达升高, 其表达水平与肝癌患者恶性临床病理特征及不良预后密切相关, 其作用机制可能通过促进 EMT 过程有关。

关键词

癌, 肝细胞; RNA, 长链非编码; 上皮 - 间质转化

中图分类号: R735.7

Expression of long non-coding RNA MIF-AS1 in hepatocellular carcinoma and its association with epithelial-mesenchymal transition

HU Zouxiao, ZHENG Xiaolin

(Department of Hepatopancreatobiliary Surgery, the Central Hospital of Wuhan, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430014, China)

Abstract

Objective: To investigate the expression of long non-coding RNA MIF-AS1 (lncRNA MIF-AS1) in hepatocellular carcinoma (HCC) and its significance.

收稿日期: 2019-05-16; 修订日期: 2019-06-21。

作者简介: 胡走肖, 华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院主治医师, 主要从事肝癌基础与临床方面的研究。

通信作者: 郑小林, Email: xiaolingzheng999@sina.com

Methods: The expressions of lncRNA MIF-AS1 in 94 paired specimens of HCC and adjacent tissue, and in different types of HCC cell lines and normal hepatic cells were detected by qRT-PCR. The relations of lncRNA MIF-AS1 expression with the clinicopathologic variables and prognosis of the patients were analyzed. The HCC cells were transfected with lncRNA MIF-AS1 interference sequences (silence group), lncRNA MIF-AS1 mimics (overexpression group) or negative control sequences (control group) respectively, and then, the changes in proliferative and invasion abilities as well as the protein expressions of epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related molecules were examined.

Results: The lncRNA MIF-AS1 expression in HCC tissue was significantly higher than that in adjacent tissue, and in each studied HCC cell lines was significantly higher than that in normal hepatic cells (all $P < 0.05$). The lncRNA MIF-AS1 expression was significantly associated with the serum AFP level, tumor size, portal vein microthrombus and TNM stage (all $P < 0.05$). The tumor-free survival and overall survival rates in patients with high lncRNA MIF-AS1 expression were significantly lower than those with low lncRNA MIF-AS1 expression (both $P < 0.05$). The lncRNA MIF-AS1 expression was an independent risk factor for both tumor-free survival and overall survival rates of the patients (both $P < 0.05$). Results of cell experiment showed that compared with control group, the proliferative and invasion abilities were significantly reduced, and the protein expression of the epithelial phenotype molecule E-cadherin expression was increased, while the expressions of the mesenchymal phenotype molecules N-cadherin and vimentin were decreased in silence group (all $P < 0.05$); the proliferative and invasion abilities were significantly enhanced, and the protein expression of E-cadherin expression was decreased, while the expressions of N-cadherin and vimentin were increased in overexpression group (all $P < 0.05$).

Conclusion: The expression of lncRNAMIF-AS1 is up-regulated in HCC, and its expression level is closely related to malignant clinicopathologic features and poor prognosis of the HCC patients. The action mechanism of lncRNAMIF-AS1 may probably be related to its promoting EMT process.

Key words

Carcinoma, Hepatocellular; RNA, Long Noncoding; Epithelial-Mesenchymal Transition

CLC number: R735.7

肝细胞癌(HCC,以下简称肝癌)具有复发率高和预后差的特点^[1],手术切除被认为是最有效的治疗方法,但手术也易于促进肿瘤的微转移^[2]。研究肝癌潜在的分子机制对寻找肝癌治疗靶点和指导治疗具有重要价值^[3]。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一类长度在200个核苷酸且没有蛋白质编码功能的RNA,其可通过染色质修饰、转录和转录后调节来影响细胞生物学功能^[4],参与多种肿瘤的发生和进展^[5]。lncRNA MIF-AS1是最新发现的lncRNA,其在胃癌组织中表达上调且与患者不良预后相关^[6]。lncRNA MIF-AS1在肝癌中的表达及其功能尚无研究报道。本研究采用实时荧光定量PCR检测94例肝癌患者癌组织中lncRNA MIF-AS1表达,分析其与临床病理参数及预后关系,并在细胞系中探讨lncRNA MIF-AS1对肝癌细胞增殖和侵袭能力的影响及机制。

1 材料与方法

1.1 临床标本

收集2014年1月—2015年1月间于华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院肝胆外科行肝癌切除术患者组织标本94例。纳入标准:(1)术前未进行任何放化疗、肝动脉栓塞化疗、射频消融治疗或免疫治疗;(2)术后病理学确诊为肝癌;(3)切缘无癌残留;(4)临床及随访资料完整。排除标准:(1)患者除肝癌外存在其他部位肿瘤;(2)缺乏随访资料或随访资料不完整者;(3)病理组织标本不符合研究的患者。手术切除的肝癌病理组织需完整包括癌组织及相应癌旁组织,癌旁组织距肿瘤边缘至少2 cm以上且病理证实无癌细胞残余,将符合条件的病理标本存于-80℃冰箱中备用。

1.2 临床资料收集和随访

收集患者年龄、性别、病理类型、肿瘤大小和血清甲胎蛋白(AFP)等信息;术后随访采用

定期门诊复诊和电话随访进行。随访内容包括：术后疾病进展情况（进展、复发或死亡）、影像学检查变化、血清AFP水平、肝功能等。患者诊断复发定义如下：术后经两种影像学检查证实存在肝癌特征性的占位病变，或一种影像学检查提示存在肝癌特征性占位病变，同时伴有AFP持续性增高^[7]。术后无瘤生存时间为手术日至确诊复发或末次随访之间的时间间隔，术后总生存时间为手术治疗日起至死亡之间时间，随访截至时间为2019年1月，最长随访时间5年。

1.3 主要试剂及仪器

RNAiso plus (9109)、逆转录试剂盒 (RR047A) 及qRT-PCR试剂盒 (RR420) 均购自日本Takara公司；Transwell小室、基质胶Matrigel (BD)；ThermoND2000C超微量分光光度计 (Thermo)、GeneAmp PCR system 9700扩增仪 (PerkinElmer)、LightCycler[®]480 II System (Roche)。EMT相关抗体（抗波形蛋白、抗N-钙黏附蛋白和抗E-钙黏附蛋白）购自美国Abcam公司。lncRNA MIF-AS1干扰序列、lncRNA MIF-AS1模拟物及阴性对照序列由广州锐博生物科技有限公司合成。lncRNA MIF-AS1干扰序列：5'-GGT GGT TGA AAG GAA TCC T-3'；阴性对照序列：5'-CCT AAG GTT AAG TCG CCC TC-3'；lncRNA MIF-AS1模拟物正向：5'-CGU GUA UUU GAC AAG CUG AGU U-3'，反向：5'-CUC AGC UUG UCA AAU ACA CGU U-3'。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 人肝癌细胞株 (QGY-7703、BEL-7404、MHCC-LM3、SK-hep1 和 HepG2) 及人肝细胞系 (L02) 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中，将上述细胞株置于 37 °C、5%CO₂ 温育箱中，取处于对数生长期且生长良好细胞用于实验。

1.4.2 细胞转染及分组 取对数生长期的 QGY-7703 细胞接种于 6 孔板 (5 × 10⁵/孔) 中待生长至汇合度为 70%~80% 时，分成：沉默组、过表达组和对照组，遵照 Lipofectamine3000 说明书要求分别转染 lncRNA MIF-AS1 干扰序列、lncRNA MIF-AS1 模拟物及阴性对照序列，转染后 12 h 采用 qRT-PCR 检测 lncRNA MIF-AS1 表达以确定转染效率。

1.4.3 CCK-8 实验 肝癌细胞株 (QGY-7703) 转染后 24 h，接种于 96 孔板中 (5 × 10³/孔)，分

别在 0、24、48、72 h 后加入 CCK-8 (10 μL/孔)，避光培养 2 h，用酶联免疫检测仪检测 450 nm 波长处的吸光度，吸光度值为纵坐标，处理时间为横坐标，绘制细胞生长曲线。

1.4.4 Transwell 试验 肝癌细胞株 (QGY-7703) 转染 24 h 后，采用胰酶消化细胞并离心弃上清，用无血清的 DMEM 培养基重悬细胞，按照 1:8 比例稀释 50 mg/L 的 Matrigel 后，加 50 μL 稀释后的 Matrigel 包被 Transwell 小室底部膜，将 1 × 10⁵/100 μL 细胞悬液接种到上室，下室加 500 μL 含 10% FBS 的 DMEM 培养液，48 h 后取出小室，弃上室培养基，用棉签拭掉上室的细胞，4% 多聚甲醛固定细胞 15 min，结晶紫染色 10 min，PBS 漂洗 3 次，镜检穿出小室的细胞数目。

1.4.5 总 RNA 提取及逆转录反应 取适量肿瘤组织至 1 mL RNAiso plus 中研磨充分后加 200 μL 氯仿剧烈震荡 15 s，室温静置 10 min，4 °C 离心 (12 000 r/min, 15 min)；取上清并按等体积加入异丙醇，颠倒混匀，4 °C 离心后收集沉淀；加 1 mL 75% 乙醇洗涤后晾干；加 DEPC 水溶解至适宜浓度后采用分光光度计测量总 RNA 浓度，A_{260/280} 在 1.8~2.0 之间为合格样品。按 Takara 公司逆转录试剂盒 RR036A 说明书所述加入试剂，使用 SureCycler 8800 PCR 仪 (Agilent Technologie) 行逆转录反应，逆转录成的 cDNA，-20 °C 保存备用。

1.4.6 qRT-PCR lncRNA MIF-AS1 引物序列由上海生工生物工程股份有限公司合成。lncRNA MIF-AS1 上游引物：ACA TCG GCA TGA TGG CAG AA；下游引物：TCA CAA AAG GCG GGA CCA C；GAPDH 为内参，上游引物：GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT；下游引物：CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG。实时荧光定量 PCR 的反应条件如下：预变性 95 °C 30 s，之后 40 个循环 (95 °C 5 s、65 °C 30 s、95 °C 5 s)。结果分析采用 2^{-ΔΔCT} 法行基因表达相对定量分析。

1.4.7 Western blot 使用 RIPA 缓冲液提取 3 组细胞总蛋白质，使用 BCA 蛋白质测定试剂盒定量蛋白质含量。用 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶分离 3 组的蛋白质样品 (30 μg)，并转移到 PDVF 膜。用 Tris 缓冲盐水中的 5% 脱脂牛奶封闭膜，并与抗波形蛋白，抗 N-钙黏附蛋白，抗 E-钙黏附蛋白孵育并在 4 °C 过夜，然后二抗 37 °C 孵育 2 h。使用化学发光液 (ECL) 显现印迹，采用 GAPDH 为上样对照。

1.5 统计学处理

采用IBM SPSS20.0软件行统计学分析。两组之间比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析,采用 χ^2 检验分析肝癌组织中lncRNA MIF-AS1表达与临床病理参数的相关性。采用Kaplan-Meier法绘制生存曲线,并通过Log-rank检验比较lncRNA MIF-AS1高表达及低表达组患者术后生存率差异。采用Cox比例风险模型分析影响患者预后的独立危险因素, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA MIF-AS1在肝癌组织和肝细胞系中表达上调

qRT-PCR结果示:癌组织中lncRNA MIF-AS1表达明显高于正常癌旁组织($P<0.001$)(图1A);5种肝癌细胞株中lncRNA MIF-AS1表达水平均明显高于正常肝细胞株(L02)(均 $P<0.001$)(图1B)。

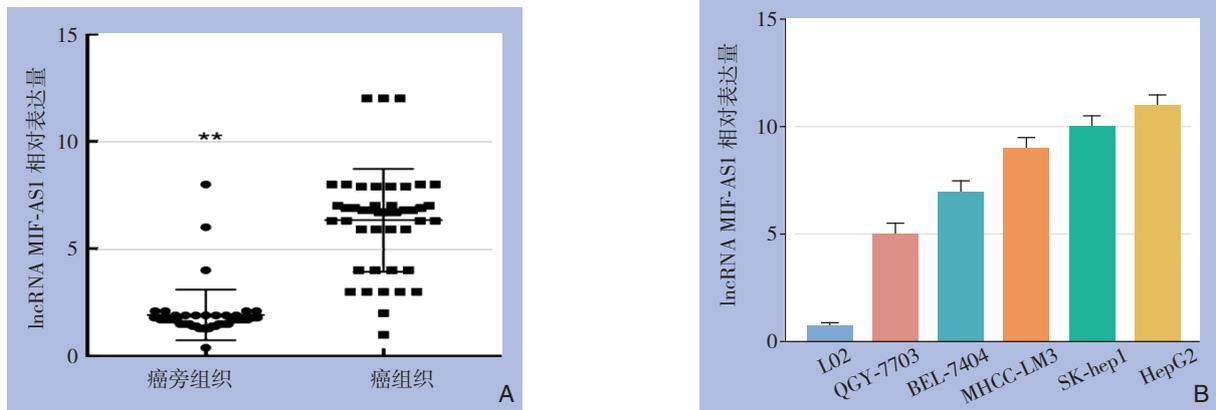


图1 lncRNA MIF-AS1在肝癌中的表达 A: 肝癌组织和癌旁组织; B: 肝细胞株与正常肝细胞

Figure 1 Expression of lncRNA MIF-AS1 in HCC A: HCC tissue and tumor adjacent tissue; B: HCC cell lines and normal hepatic cells

2.2 lncRNA MIF-AS1表达与患者临床病理参数之间的关系

根据肝癌组织中lncRNA MIF-AS1表达量的中位数将所有病例分为高表达组和低表达组,其中高表达组47例,低表达组47例。lncRNA MIF-AS1

的表达水平与患者AFP水平($P=0.012$)、肿瘤大小($P=0.006$)、门静脉微癌栓($P=0.011$)、TNM分期($P=0.030$)明显有关,而与性别、年龄、肝硬化、组织分化、肿瘤数量、包膜无明显关系(均 $P>0.05$)(表1)。

表1 lncRNA MIF-AS1表达与患者临床病理参数的关系[n(%)]

Table 1 Association between lncRNA MIF-AS1 expression and clinicopathologic parameters of the patients [n(%)]

参数	高表达 (n=47)	低表达 (n=47)	P	参数	高表达 (n=47)	低表达 (n=47)	P
性别				肿瘤大小 (cm)			
男	38 (80.9)	24 (51.1)	0.207	≤ 3	19 (40.4)	9 (19.1)	0.006
女	9 (19.1)	23 (48.9)		> 3	28 (59.6)	38 (80.9)	
年龄 (岁)				肿瘤包膜			
< 60	35 (74.5)	35 (74.5)	1.000	有	29 (61.7)	31 (66.0)	0.619
≥ 60	12 (25.5)	12 (25.5)		无	18 (38.3)	16 (34.0)	
AFP (μg/L)				肿瘤分化			
< 400	32 (68.1)	23 (48.9)	0.012	高中	27 (57.4)	33 (70.2)	0.295
≥ 400	15 (31.9)	24 (51.1)		低	20 (42.6)	14 (29.8)	
肝硬化				门静脉微癌栓			
有	34 (72.3)	35 (74.5)	0.772	阳性	19 (40.4)	30 (63.8)	0.011
无	13 (27.7)	12 (25.5)		阴性	28 (59.6)	17 (36.2)	
肿瘤数目				TNM分期			
1	35 (74.5)	35 (74.5)	1.000	I+II	36 (76.6)	27 (57.4)	0.030
> 1	12 (25.5)	12 (25.5)		III+IV	11 (23.4)	20 (42.6)	

2.3 lncRNA MIF-AS1 表达水平与肝癌患者预后的关系

Kaplan-Meier生存分析示，lncRNA MIF-AS1 高表达组术后无瘤生存率明显低于lncRNA MIF-

AS1低表达组 ($P<0.001$) (图2A)；lncRNA MIF-AS1高表达组术后总生存率明显低于lncRNA MIF-AS1低表达组 ($P<0.001$) (图2B)。

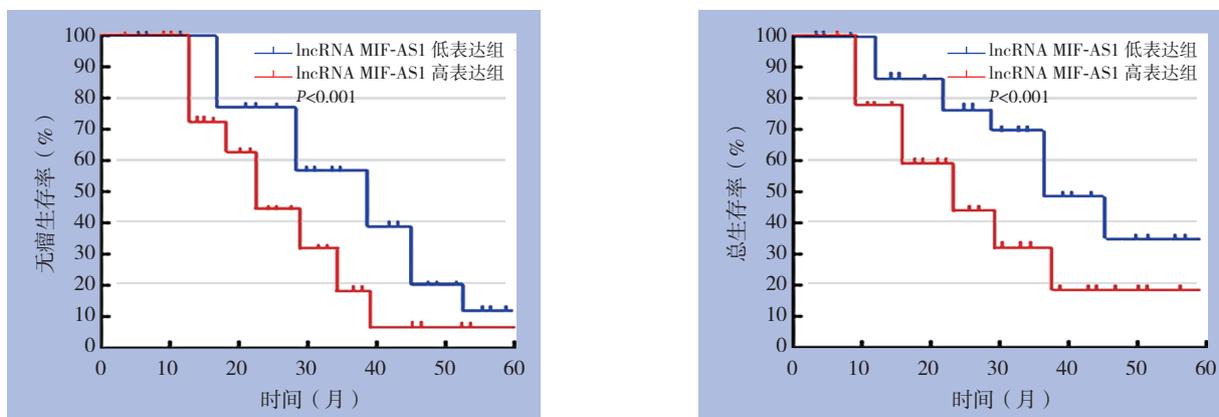


图 2 lncRNA MIF-AS1 高表达组和低表达组术后无瘤生存率和总生存率比较

Figure 2 Disease-free survival and Overall survival curve of lncRNA MIF-AS1 high expression group and low expression group

2.4 肝癌术后无瘤生存率和总生存率的危险因素分析

单因素分析显示：肿瘤大小 ($P=0.001$)、肿瘤数目 ($P=0.023$)、门静脉微癌栓 ($P<0.001$)、分化程度 ($P=0.001$) 及 lncRNA MIF-AS1 表达 ($P<0.001$) 与患者无瘤生存率明显有关；多因素分析示：肿瘤数目 ($P=0.01$)、门静脉微癌栓 ($P=0.006$)、分化程度 ($P=0.037$) 及 lncRNA MIF-AS1 表达 ($P=0.001$) 为影响患者

无瘤生存率的独立危险因素 (表 2)。Cox 单因素回归分析显示：有无门静脉微癌栓 ($P=0.012$)、病理分化程度 ($P=0.013$) 及 lncRNA MIF-AS1 的相对表达水平 ($P<0.001$) 与患者总生存率明显有关，多因素回归分析显示：门静脉微癌栓 ($P=0.043$)、病理分化程度 ($P=0.027$) 及 lncRNA MIF-AS1 相对表达水平 ($P=0.001$) 为患者总生存率的独立预后因素 (表 3)。

表 2 无瘤生存率的影响因素分析 ($n=94$)

Table 2 Univariate and multivariate analysis of influencing recurrence-free survival of the patients ($n=94$)

变量	HR	95% CI	P
单因素分析			
年龄 (<60 vs. >60 岁)	1.433	0.721~2.847	0.305
性别 (男 vs. 女)	0.744	0.335~1.653	0.468
AFP (≥ 400 vs. <400)	1.181	0.706~1.974	0.526
肝硬化 (有 vs. 无)	1.259	0.667~2.377	0.477
肿瘤包膜 (有 vs. 无)	0.897	0.509~1.580	0.706
肿瘤大小 (≥ 3 vs. <3 cm)	3.913	1.564~9.794	0.001
肿瘤数目 (多 vs. 单)	2.155	1.176~3.984	0.023
门静脉微癌栓 (有 vs. 无)	3.075	1.778~5.320	<0.001
分化程度 (高中 vs. 低)	0.472	0.306~0.728	0.001
lncRNA MIF-AS1 表达 (高 vs. 低)	4.651	2.318~9.325	<0.001
多因素分析			
肿瘤大小 (≥ 3 vs. <3 cm)	3.293	0.745~14.561	0.116
肿瘤数目 (多 vs. 单)	4.335	1.591~11.813	0.001
门静脉微癌栓 (有 vs. 无)	3.662	1.422~9.431	0.006
分化程度 (高中 vs. 低)	0.549	0.304~0.991	0.037
lncRNA MIF-AS1 表达 (高 vs. 低)	6.244	3.127~10.683	0.001

表 3 影响患者总生存率的单因素和多因素分析 ($n=94$)

Table 3 Univariate and multivariate analysis of influencing overall survival of the patients ($n=94$)

变量	HR	95% CI	P
单因素分析			
年龄 (<60 vs. >60 岁)	2.433	1.721~3.867	0.456
性别 (男 vs. 女)	1.744	0.935~1.953	0.309
AFP (≥ 400 vs. <400)	2.188	0.456~4.974	0.526
肝硬化 (有 vs. 无)	2.287	1.656~2.900	0.389
肿瘤包膜 (有 vs. 无)	0.697	0.409~4.580	0.345
肿瘤大小 (≥ 3 vs. <3 cm)	5.913	4.545~12.794	0.063
肿瘤数目 (多 vs. 单)	3.443	1.134~5.984	0.073
门静脉微癌栓 (有 vs. 无)	7.075	4.778~12.320	0.012
分化程度 (高中 vs. 低)	0.472	0.306~0.728	0.001
lncRNA MIF-AS1 表达 (高 vs. 低)	1.215	1.098~4.478	<0.001
多因素分析			
门静脉微癌栓 (有 vs. 无)	5.662	4.422~12.477	0.043
分化程度 (低 vs. 高中)	1.509	0.904~1.991	0.027
lncRNA MIF-AS1 表达 (高 vs. 低)	3.485	2.127~6.683	0.001

2.5 lncRNA MIF-AS1 调节肝癌增殖

qRT-PCR结果显示,与对照组比较,过表达组lncRNA MIF-AS1相对表达明显升高,沉默组lncRNA MIF-AS1相对表达量明显降低(均

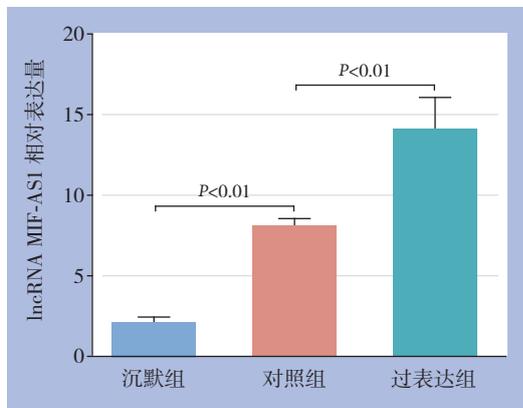


图3 转染效果检测

Figure 3 Transfection effect measurement

$P<0.01$) (图3),提示转染成功。转染24、48及72 h后,与对照组比较,过表达组A450 nm值明显升高,沉默组A450 nm值明显降低(均 $P<0.01$) (图4)。

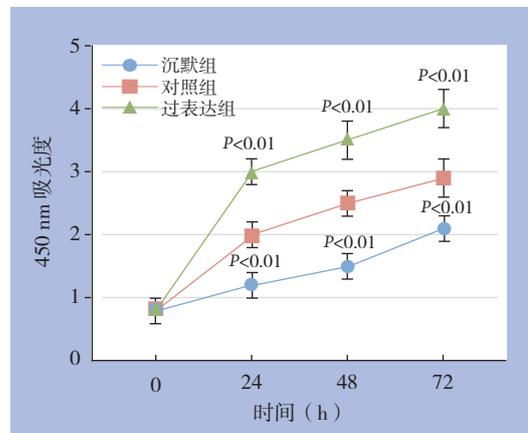


图4 lncRNA MIF-AS1 表达对肝癌细胞增殖能力的影响

Figure 4 Effect of lncRNA MIF-AS1 on the proliferation of HCC cells

2.6 lncRNA MIF-AS1 调节肝癌侵袭

与对照组比较,过表达组细胞侵袭数目明

显增多,而沉默组细胞侵袭数目明显减少(均 $P<0.01$) (图5)。

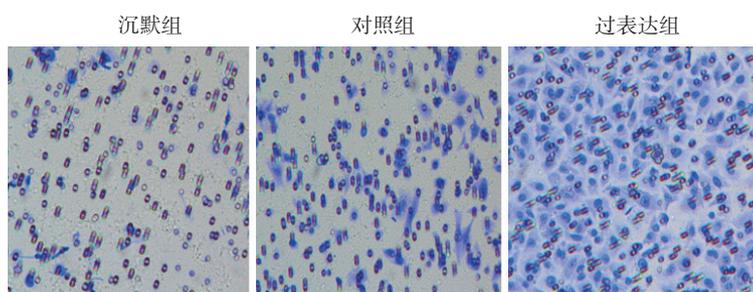
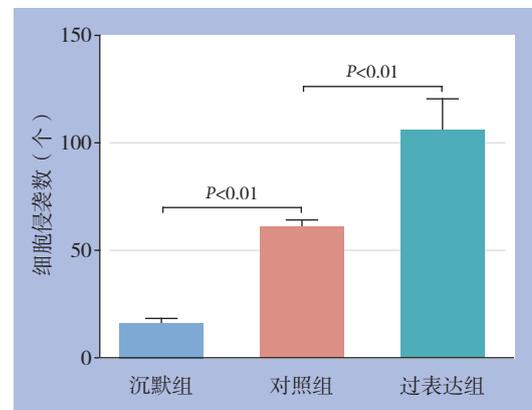


图5 lncRNA MIF-AS1 表达对肝癌细胞侵袭的影响

Figure 5 Effect of lncRNA MIF-AS1 expression on invasion of HCC cells



2.7 lncRNA MIF-AS1 表达与肝癌细胞 EMT 相关分子的关系

Western blot结果显示:与对照组比较,沉默组E-钙黏附蛋白表达量明显升高、N-钙黏附蛋白

与波形蛋白蛋白表达量明显降低(均 $P<0.05$);过表达组E-钙黏附蛋白表达量明显降低,N-钙黏附蛋白与波形蛋白蛋白表达量明显升高(均 $P<0.05$) (图6)。

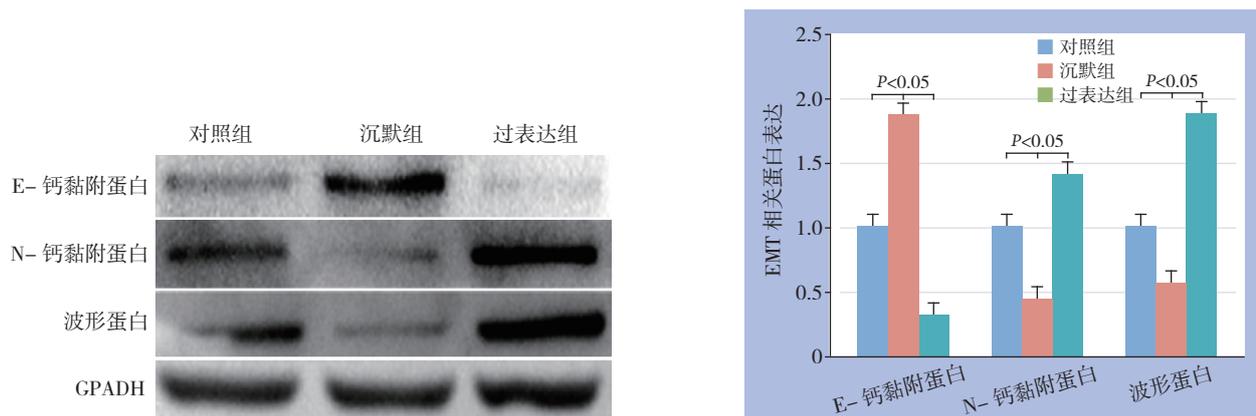


图 6 lncRNA MIF-AS1 表达对肝癌细胞 EMT 相关分子的影响

Figure 6 Influence of lncRNA MIF-AS1 expression on EMT-related molecules in HCC cells

3 讨论

肝癌是常见的消化道恶性肿瘤之一，发病率在所有肿瘤中居第5位，在肿瘤相关死亡中排第2位^[8-10]。我国每年约有38.3万人死于肝癌，严重危害国人健康，深入研究肝癌发病机制对肝癌治疗尤为重要^[11-12]。lncRNA是一类长度大于200 nt无蛋白质编码功能的RNA分子。近年来研究发现其在肿瘤进展、复发、转移和耐药方面发挥重要作用^[13-14]。lncRNA可在肝癌患者的肿瘤组织中异常表达，并可能预测肝癌患者的预后，为治疗肝癌新的潜在分子靶点^[15-17]。

lncRNA MIF-AS1定位于1p36染色体上，是最新发现的lncRNA分子^[18]。本研究检测lncRNA MIF-AS1在肝癌组织中的表达水平，发现癌组织中lncRNA MIF-AS1的表达水平显著高于癌旁组织，同时发现不同肝癌细胞株中lncRNA MIF-AS1的表达水平也显著高于正常肝细胞株，上述结果显示肝癌癌组织和细胞株中lncRNA MIF-AS1的表达均上调。这与在胃癌^[6]及乳腺癌^[18]中的报道一致。本研究发现肝癌癌组织中lncRNA MIF-AS1的表达水平与AFP、肿瘤大小、门静脉微癌栓、TNM分期显著相关；lncRNA MIF-AS1高表达组患者无瘤生存率和总生存率均较低表达组患者显著性降低，Cox回归分析示lncRNA MIF-AS1的表达水平是影响肝癌患者术后无瘤生存率和总生存率的独立危险因素；上述结果提示lncRNA MIF-AS1的表达水平是与肝癌疾病严重状态相关且可预测肝癌预后的分子标志物。

本研究采用特异性靶向干扰RNA转染肝癌细

胞株后导致lncRNA MIF-AS1功能丧失和获得实验发现敲低lncRNA MIF-AS1表达可显著抑制肝癌细胞增殖、迁移和侵袭能力；反之，lncRNA MIF-AS1过表达可显著增强肝癌细胞增殖、迁移和侵袭能力，提示lncRNA MIF-AS1可能在肝癌发挥致癌基因的作用。本研究结果与文献报道lncRNA MIF-AS1在胃癌及乳腺癌中发挥致癌基因作用类似。在胃癌中，作者证实lncRNA MIF-AS1能通过lncMIF-AS1/miR-212-5p/NDUFA4信号途径促进胃癌增殖，并抑制凋亡^[6]。在乳腺癌中，lncRNA MIF-AS1高表达，并可通过靶向结合miR-1249-3p，调控Homeobox B8的表达。沉默lncRNA MIF-AS1表达可抑制乳腺癌细胞增殖、克隆形成和迁移，抑制EMT过程^[18]。

Western blot结果显示，lncRNA MIF-AS1过表达可导致肝癌细胞中代表间质的N-钙黏附蛋白和波形蛋白表达增加，而代表上皮表型的E-钙黏附蛋白表达降低，反之亦然，结果提示lncRNA MIF-AS1参与肝癌细胞上皮-间充质转化（epithelial-to-mesenchymal transition, EMT）过程调节。EMT是肿瘤细胞获得迁移和侵袭能力的基础，主要特征是上皮标志物E-钙黏附蛋白表达下调、间质标志物N-钙黏附蛋白和波形蛋白等表达上调，致使细胞间链接丧失、黏附能力减弱，细胞迁移和侵袭能力增强^[19-21]。研究^[22-24]表明众多lncRNA可通过调控EMT相关转录因子的表达影响癌症的EMT进程，lncRNA NRON在肝癌组织中表达下调并通过调节EMT过程，体外抑制肝癌细胞迁移和侵袭^[25]。本研究中lncRNA MIF-AS1过表达后促进EMT过程，肝癌细胞侵袭能力显著增强，

提示lncRNA MIF-AS1在肝癌中可通过促进EMT进程而增强肝癌细胞的侵袭能力,从而影响肝癌的发生发展,也可能是导致lncRNA MIF-AS1高表达水平的患者具有不良预后的原因之一。尽管如此,lncRNA MIF-AS1调节EMT过程的潜在靶分子和在动物体内的机制尚需要进一步研究。

综上所述,肝癌组织中lncRNA MIF-AS1的表达上调,其表达水平与肝癌预后相关,是肝癌预后独立危险因素。lncRNA MIF-AS1可能发挥致癌基因作用而调节肝癌侵袭能力和促进EMT进程。

参考文献

- 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. doi: 10.3322/caac.21492.
- Suh SW, Choi YS. Influence of liver fibrosis on prognosis after surgical resection for resectable single hepatocellular carcinoma[J]. *ANZ J Surg*, 2019, 89(3):211–215. doi: 10.1111/ans.14732.
- Yu JJ, Xiao W, Dong SL, et al. Effect of surgical liver resection on circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1):835. doi: 10.1186/s12885-018-4744-4.
- Schmitt AM, Chang HY. Long noncoding RNAs in cancer pathways[J]. *Cancer Cell*, 2016, 29(4):452–463. doi: 10.1016/j.ccell.2016.03.010.
- Ye H, Liu K, Qian K. Overexpression of long noncoding RNA HOTTIP promotes tumor invasion and predicts poor prognosis in gastric cancer[J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9:2081–2088. doi: 10.2147/OTT.S95414.
- Li L, Li Y, Huang Y, et al. Long non-coding RNA MIF-AS1 promotes gastric cancer cell proliferation and reduces apoptosis to upregulate NDUFA4[J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(12):3714–3725. doi: 10.1111/cas.13801.
- 戴朝六, 贾昌俊. 肝细胞癌规范诊治流程评价[J]. *中国实用外科杂志*, 2014, 34(8):690–695. doi:10.7504/CJPS.ISSN1005-2208.2014.08.05.
Dai CL, Jia CJ. Algorithm of diagnosis and multidisciplinary treatment for hepatocellular carcinoma[J]. *Chinese Journal of Practical Surgery*, 2014, 34(8):690–695. doi:10.7504/CJPS.ISSN1005-2208.2014.08.05.
- 陈世发, 赵礼金. 肝癌发生发展机制的研究进展及其治疗现状[J]. *中国普通外科杂志*, 2018, 27(7):910–923. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.07.016.
Chen SF, Zhao LJ. Research progress on mechanisms for occurrence of liver cancer and its treatment status[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2018, 27(7):910–923. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.07.016.
- 陶一明, 王志明. 欧洲肝脏研究学会肝细胞癌临床实践指南(2018)更新要点解读[J]. *中国普通外科杂志*, 2018, 27(7):813–817. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.07.003.
Tao YM, Wang ZM. Interpretation of essential points of the updates of EASL clinical practice guidelines for management of hepatocellular carcinoma (2018)[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2018, 27(7):813–817. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.07.003.
- 葵卫东, 刘文斌. 《肝细胞癌合并门静脉癌栓多学科诊治中国专家共识(2016年版)》解读[J]. *中国普通外科杂志*, 2017, 26(7):815–820. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.07.001.
Jia WD, Liu WB. Interpretation of Chinese Expert Consensus on Multidisciplinary Diagnosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma with Portal Vein Tumor Thrombus (2016 edition) [J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2017, 26(7):815–820. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.07.001.
- Omata M, Cheng AL, Kokudo N, et al. Asia-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatocellular carcinoma: a 2017 update[J]. *Hepatol Int*, 2017, 11(4):317–370. doi: 10.1007/s12072-017-9799-9.
- Balogh J, Victor D 3rd, Asham EH, et al. Hepatocellular carcinoma: a review[J]. *J Hepatocell Carcinoma*, 2016, 3:41–53. doi: 10.2147/JHC.S61146.
- Fang Y, Fullwood MJ. Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer[J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2016, 14(1):42–54. doi: 10.1016/j.gpb.2015.09.006.
- 陈伟业, 邢宏松, 江帆, 等. 长链非编码RNA HOST2对胰腺癌细胞增殖迁移和侵袭的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2019, 28(3):285–291. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2019.03.006.
Chen WY, Xing HS, Jiang F, et al. Effects of long non-coding RNA HOST2 on proliferation, migration and invasion in pancreatic cancer cells[J]. *Chinese Journal of General Surger*, 2019, 28(3):285–291. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2019.03.006.
- Yang Y, Chen L, Gu J, et al. Recurrently deregulated lncRNAs in hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Commun*, 2017, 8:14421. doi: 10.1038/ncomms14421.
- Yang X, Xie X, Xiao YF, et al. The emergence of long non-coding RNAs in the tumorigenesis of hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2015, 360(2):119–124. doi: 10.1016/j.canlet.2015.02.035.
- Li C, Chen J, Zhang K, et al. Progress and prospects of long noncoding RNAs (lncRNAs) in hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(2):423–434. doi: 10.1159/000430109.
- Ding J, Wu W, Yang J, et al. Long non-coding RNA MIF-AS1 promotes breast cancer cell proliferation, migration and EMT process through regulating miR-1249-3p/HOXB8 axis[J]. *Pathol*

- Res Pract, 2019, 215(7):152376. doi: 10.1016/j.prp.2019.03.005.
- [19] Brabletz T, Kalluri R, Nieto MA, et al. EMT in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2018, 18(2):128–134. doi: 10.1038/nrc.2017.118.
- [20] Zaravinos A. The regulatory role of microRNAs in EMT and cancer[J]. J Oncol, 2015, 2015:865816. doi: 10.1155/2015/865816.
- [21] Peng Y, Leng W, Duan S, et al. Long noncoding RNA BLACAT1 is overexpressed in hepatocellular carcinoma and its downregulation suppressed cancer cell development through endogenously competing against hsa-miR-485–5p[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 116:109027. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109027.
- [22] Yang J, Wu W, Wu M, et al. Long noncoding RNA ADPGK-AS1 promotes cell proliferation, migration, and EMT process through regulating miR-3196/OTX1 axis in breast cancer[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2019, doi: 10.1007/s11626–019–00372–1. [Epub ahead of print]
- [23] Chen QF, Hu CF, Sun K, et al. LncRNA NR027113 promotes malignant progression of gastric carcinoma via EMT signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(11):4746–4755. doi: 10.26355/eurrev_201906_18056.
- [24] Sun X, Huang T, Liu Z, et al. LncRNA SNHG7 contributes to tumorigenesis and progression in breast cancer by interacting with miR-34a through EMT initiation and the Notch-1 pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2019, 856:172407. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.172407.
- [25] Yao Z, Xiong Z, Li R, et al. Long non-coding RNA NRON is downregulated in HCC and suppresses tumour cell proliferation and metastasis[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 104:102–109. doi: 10.1016/j.biopha.2018.05.006.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 胡走肖, 郑小林. 长链非编码RNA MIF-AS1在肝癌中表达及其与上皮-间充质转化的关系[J]. 中国普通外科杂志, 2019, 28(7):848–856. doi:10.7659/j.issn.1005–6947.2019.07.011

Cite this article as: Hu ZX, Zheng XL. Expression of long non-coding RNA MIF-AS1 in hepatocellular carcinoma and its association with epithelial–mesenchymal transition[J]. Chin J Gen Surg, 2019, 28(7):848–856. doi:10.7659/j.issn.1005–6947.2019.07.011

欢迎订阅《中国普通外科杂志》

《中国普通外科杂志》是国内外公开发行的国家级期刊 (ISSN1005–6947/CN43–1213/R), 面向广大从事临床、教学、科研的普外及相关领域工作者, 以实用性为主, 及时报道普通外科领域的新进展、新观点、新技术、新成果、实用性临床研究及临床经验, 是国内普外学科的权威刊物之一。办刊宗旨是: 传递学术信息, 加强相互交流; 提高学术水平, 促进学科发展; 注重临床研究, 服务临床实践。

本刊由国家教育部主管, 中南大学主办, 中南大学湘雅医院承办。主编中南大学湘雅医院王志明教授, 顾问由中国科学院及工程院院士汤钊猷、吴孟超、吴咸中、汪忠镐、郑树森、黄洁夫、黎介寿、赵玉沛、夏家辉、夏穗生等多位国内外著名普通外科专家担任, 编辑委员会由百余名国内外普通外科资深专家学者和三百余名中青年编委组成。开设栏目有述评、专题研究、基础研究、临床研究、简要论著、临床报道、文献综述、误诊误治与分析、手术经验与技巧、国内外学术动态, 病案报告。本刊已被多个国内外重要检索系统和大型数据库收录, 如: 美国化学文摘 (CA), 俄罗斯文摘 (AJ), 日本科学技术振兴集团 (中国) 数据库 (JSTChina), 中国科学引文数据库 (CSCD), 中文核心期刊 (中文核心期刊要目总览), 中国科技论文与引文数据库 (中国科技论文统计源期刊), 中国核心学术期刊 (RCCSE), 中国学术期刊综合评价数据库, 中国期刊网全文数据库 (CNKI), 中文科技期刊数据库, 中文生物医学期刊文献数据库 (CMCC), 万方数据–数字化期刊群, 中国生物医学期刊光盘版等, 期刊总被引频次、影响因子及综合评分已稳居同类期刊前列。在科技期刊评优评奖活动中多次获奖; 特别是 2017 年 10 月获“第 4 届中国精品科技期刊”, 其标志着《中国普通外科杂志》学术水平和杂志影响力均处于我国科技期刊的第一方阵。

本刊已全面采用远程投稿、审稿、采编系统, 出版周期短, 时效性强。欢迎订阅、赐稿。

《中国普通外科杂志》为月刊, 国际标准开本 (A4 幅面), 每期 128 页, 每月 15 日出版。内芯采用彩色印刷, 封面美观大方。定价 25.0 元 / 册, 全年 300 元。国内邮发代号: 42–121; 国际代码: M–6436。编辑部可办理邮购。

本刊编辑部全体人员, 向长期以来关心、支持、订阅本刊的广大作者、读者致以诚挚的谢意!

编辑部地址: 湖南省长沙市湘雅路 87 号 (湘雅医院内) 邮政编码: 410008

电话 (传真): 0731–84327400 网址: <http://www.zp wz.net>

Email: pw84327400@vip.126.com; pw4327400@126.com

中国普通外科杂志编辑部