

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2023.02.005

肿瘤防治专题

干扰 lncRNA ROR1-AS1 通过调节 miR-504 抑制人肝癌细胞株增殖、迁移和侵袭的研究

乌吉斯古楞, 张文华, 张彤

基金项目: 内蒙古自治区教育厅自然科学重点项目(NJZZ22654)

作者单位: 010050 呼和浩特, 内蒙古医科大学附属医院肝胆外科

通信作者: 张文华, E-mail: zhangwenhua985@126.com

【摘要】目的 分析长链非编码 RNA 酪氨酸蛋白激酶跨膜受体 1 反义 RNA 1 (lncRNA ROR1-AS1) 通过靶向微小 RNA-504 (miR-504) 对肝癌细胞 MHCC97H 增殖、迁移和侵袭的影响。**方法** 收集 2019 年 6 月—2021 年 5 月于内蒙古医科大学附属医院肝胆外科收治肝癌患者 32 例的癌组织及癌旁组织。肝癌细胞 MHCC97H 分为 si-ROR1-AS1 组、si-NC 组、miR-504 mimics 组、miR-NC 组、si-ROR1-AS1 + anti-miR-504 组及 si-ROR1-AS1 + anti-miR-NC 组, 并进行相应质粒转染。qRT-PCR 法检测组织样本及细胞中 ROR1-AS1、miR-504 的表达; 克隆形成实验和 MTT 法检测细胞增殖; Transwell 检测细胞迁移、侵袭; Western-blot 法检测细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1A (p21)、基质金属蛋白酶 2 (MMP-2)、MMP-9 及上皮型钙黏附素 (E-cadherin) 水平; 双荧光素酶报告实验检测 ROR1-AS1 与 miR-504 的调控关系。**结果** 肝癌患者癌组织中 ROR1-AS1 水平高于癌旁组织, miR-504 水平低于癌旁组织 ($t = 11.544, 10.905, P$ 均 < 0.001)。与 si-NC 组比较, si-ROR1-AS1 组 MHCC97H 细胞克隆形成数、细胞存活率、迁移细胞数、侵袭细胞数及 MMP-2、MMP-9 水平降低 ($t = 8.978, 9.647, 8.444, 13.282, 10.026, 12.006, P$ 均 < 0.001), miR-504、p21、E-cadherin 水平上升 ($t = 10.527, 9.722, 12.901, P$ 均 < 0.001)。与 miR-NC 组比较, miR-504 mimics 组 MHCC97H 细胞克隆形成数、细胞存活率、迁移细胞数、侵袭细胞数及 MMP-2、MMP-9 水平降低 ($t = 8.831, 9.680, 8.187, 12.480, 10.026, 10.954, P$ 均 < 0.001), p21、E-cadherin 蛋白水平升高 ($t = 9.418, 12.614, P$ 均 < 0.001)。双荧光素酶报告实验显示, ROR1-AS1 可靶向调控 miR-504。与 si-ROR1-AS1 + anti-miR-NC 组比较, si-ROR1-AS1 + anti-miR-504 组细胞克隆形成数、细胞存活率、迁移细胞数、侵袭细胞数及 MMP-2、MMP-9 水平升高 ($t = 7.064, 7.012, 6.746, 10.222, 7.213, 7.982, P$ 均 < 0.001), p21、E-cadherin 蛋白水平下降 ($t = 4.841, 7.120, P$ 均 < 0.001)。**结论** 干扰 ROR1-AS1 表达可抑制肝癌 MHCC97H 细胞的增殖、迁移及侵袭, 其具体机制可能与靶向作用 miR-504 水平有关。

【关键词】 肝癌; 长链非编码 RNA 酪氨酸蛋白激酶跨膜受体 1 反义 RNA 1; 微小 RNA-504; 增殖; 迁移; 侵袭; 作用机制

【中图分类号】 R735.7

【文献标识码】 A

Inhibition of proliferation, migration and invasion of human hepatoma cell lines by interfering with lncRNA ROR1-AS1 by regulating miR-504 Wu Jisiguleng, Zhang Wenhua, Zhang Tong. *Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Inner Mongolia, Hohhot 010050, China*

Corresponding author: Zhang Wenhua, E-mail: zhangwenhua985@126.com

Funding program: Key Project of Natural Science of the Education Department of the Inner Mongolia Autonomous Region (NJZZ22654)

【Abstract】 Objective To analyze the effect of antisense RNA 1 (lncRNA ROR1-AS1) targeting microRNA-504 (miR-504) on the proliferation, migration and invasion of human hepatoma cell line MHCC97H by long chain non-coding RNA tyrosine protein kinase transmembrane receptor 1. **Methods** The cancer tissues and adjacent tissues of 32 patients with liver cancer were collected from the Department of Hepatobiliary Surgery of the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University from June 2019 to May 2021. MHCC97H cells were divided into si-ROR1-AS1 group, si-NC group, miR-504 mimics group, miR-NC group, si-ROR1-AS1 + anti-miR-504 group and si-ROR1-AS1 + anti-miR-NC group, and the corresponding plasmids were transfected. The expression of ROR1-AS1 and miR-504 in tissue samples and cells was detected by qRT-PCR. Cell proliferation was detected by clonogenic assay and MTT assay. Transwell detected cell migration and inva-

sion. The levels of cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), MMP-9 and E-cadherin were detected by Western-blot method. The regulatory relationship between ROR1-AS1 and miR-504 was detected by double luciferase report experiment. **Results** The level of ROR1-AS1 in cancer tissue of patients with liver cancer was higher than that in paracancerous tissue, and the level of miR-504 was lower than that in paracancerous tissue ($t = 11.544, 10.905, P < 0.001$). Compared with si-NC group, the number of MHCC97H cell clones, cell survival rate, number of migrating cells, number of invasive cells, and levels of MMP-2 and MMP-9 in si-ROR1-AS1 group decreased ($t = 8.978, 9.647, 8.444, 13.282, 10.026, 12.006, P < 0.001$), and the levels of miR-504, p21, E-cadherin increased ($t = 10.527, 9.722, 12.901, P < 0.001$). Compared with the miR-NC group, the number of MHCC97H cell clones, cell survival rate, number of migrating cells, number of invasive cells and the level of MMP-2 and MMP-9 in the miR-504 mimics group decreased ($t = 8.831, 9.680, 8.187, 12.480, 10.026, 10.954, P < 0.001$), and the level of p21 and E-cadherin protein increased ($t = 9.418, 12.614, P < 0.001$). The double luciferase report experiment showed that ROR1-AS1 could target the regulation of miR-504. Compared with si-ROR1-AS1 + anti-miR-NC group, si-ROR1-AS1 + anti-miR-504 group increased the number of cell clones, cell survival rate, number of migrating cells, number of invasive cells, and levels of MMP-2 and MMP-9 ($t = 7.064, 7.012, 6.746, 10.222, 7.213, 7.982, P < 0.001$), while p21 and E-cadherin protein levels decreased ($t = 4.841, 7.120, P < 0.001$). **Conclusion** Interference with the expression of ROR1-AS1 can inhibit the proliferation, migration and invasion of hepatoma MHCC97H cells. The specific mechanism may be related to the targeted miR-504 level.

【Key words】 Liver cancer; Long non-coding RNA ROR1-AS1; microRNA-504; Proliferation; Migration; Invasion; Mechanism

肝癌是全球范围内最常见的致命恶性肿瘤,发病率逐年增加,在发展中国家发病率较高^[1-2]。探究肝癌的发病机制,并寻找分子靶向药物已成为当前的研究热点。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 可在肝脏微环境和慢性肝脏疾病的调节中发挥关键作用,能够调节免疫反应、肝脏再生和氧化还原信号,lncRNA 失调可导致慢性肝炎、肝脏增生和氧化应激,最终导致肝癌的发生和进展^[3]。长链非编码 RNA 酪氨酸蛋白激酶跨膜受体 1 反义 RNA 1 (tyrosine protein kinase transmembrane receptor 1 antisense RNA 1, ROR1-AS1) 在肝细胞癌中表达上调,且与患者临床分期、T 分期及 N 分期有关,ROR1-AS1 高表达与不良预后有关^[4]。但 ROR1-AS1 对肝癌细胞增殖、迁移、侵袭的调控机制尚不清晰。微小 RNA-504 (microRNA-504, miR-504) 在肝细胞癌组织和细胞系中下调,miR-504 通过介导 FZD7/Wnt/ β -catenin 通路在肝癌中发挥抑癌作用^[5]。基于上述研究推测 ROR1-AS1 可能通过靶向 miR-504 参与肝癌疾病进展,本研究对此展开探讨,报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 (1) 组织标本: 选取 2019 年 6 月—2021 年 5 月于内蒙古医科大学附属医院肝胆外科收治肝癌患者 32 例,患者均无放、化疗史。术中收集患者癌组织及癌旁组织(距手术切缘 ≥ 3 cm,病理检测证实无癌细胞)标本。本项研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》,且经医院伦理委员会审核、批准(20190711),患者及家属知情同意并签署知情同意

书。(2) 细胞系及试剂: 人肝细胞癌 MHCC97H 细胞株(中国科学院上海细胞生物学研究所); si-NC、si-ROR1-AS1、miR-NC、miR-504 mimics、anti-miR-NC 及 anti-miR-504 质粒均由上海吉玛制药技术有限公司提供;三磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1A (p21)、基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP-2)、MMP-9、上皮型钙黏附素(E-cadherin) 兔单克隆抗体及 Luciferase Reporter Assay 底物试剂盒均由英国 Abcam 公司提供; LipofectamineTM2000 试剂盒、Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司); 逆转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司)。(3) 仪器设备: 显微镜(GMM-900, 上海光密仪器有限公司); 酶标仪(SpectraMax iD5, 上海美谷分子仪器有限公司)。

1.2 实验方法 采用 RPMI 1640 培养基(含 10% 胎牛血清), 在 97% 湿度、5% CO₂、37℃ 环境下培养 MHCC97H 细胞。培养基每 2 ~ 3 d 更换 1 次, 当细胞汇合度至 80% ~ 90% 时, 胰蛋白酶消化后传代。将对数期 MHCC97H 细胞接种于 6 孔板, 密度调整至 1×10^5 个/孔, 细胞汇合度达 60% 时, 分别将 si-ROR1-AS1、si-NC、miR-504 mimics、miR-NC、si-ROR1-AS1 和 anti-miR-504、si-ROR1-AS1 和 anti-miR-NC 转染至 MHCC97H 细胞, 记为 si-ROR1-AS1 组、si-NC 组、miR-504 mimics 组、miR-NC 组、si-ROR1-AS1 + anti-miR-504 组及 si-ROR1-AS1 + anti-miR-NC 组, 采用 LipofectamineTM2000 试剂盒进行转染。24 h 后更换培养基, 继续培养 24 h, 收集细胞备用。

1.3 观测指标与方法

1.3.1 qRT-PCR 检测 ROR1-AS1、miR-504 表达:将患者癌组织、癌旁组织标本移植于液氮预冷的研钵体中,研磨成粉末状,并收集人肝细胞癌 MHCC97H 细胞,经 PBS 清洗后,分别加入 TRIzol 试剂 1 ml,然后上下翻动细胞、组织粉末,以保证混合均匀后,静置 10 min,使核酸蛋白复合物完全分离。分别再加入氯仿、异丙醇,翻动混匀后静置 5 min,离心吸取上清液于 EP 管中,留取 RNA 沉淀,最后提取 MHCC97H 细胞及患者癌组织、癌旁组织样本中总 RNA,并检测其纯度和浓度,然后按逆转录试剂盒说明书操作合成 cDNA,并采用荧光定量 PCR 试剂盒和 PCR 仪进行 PCR 反应,反应体系:cDNA 1 μl、SYBR Green Mix 10 μl、上下游引物各 0.5 μl、ddH₂O 8 μl。反应条件:95℃ 10 min、95℃ 15 s、58℃ 30 s、72℃ 30 s,共计 30 个循环。于荧光定量 PCR 仪上扩展,2^{-ΔΔCt}法计算 ROR1-AS1、miR-504 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 ROR1-AS1、miR-504 及相应内参 GAPDH、U6 的引物序列
Tab.1 Primer sequence of ROR1-AS1, miR-504 and corresponding internal reference GAPDH, U6

基因	上游引物	下游引物
ROR1-AS1	5'-CTGACGAAACTCTGGA- ACTC-3'	5'-GTCTGATTGCTAGCT- TGGATC-3'
miR-504	5'-GCTGCTGTTGGGAGACC- 3'	5'-GCCCTCTGTATGGGA- AAC-3'
GAPDH	5'-CCAAAATCAGATGGGG- CAATGCTGG-3'	5'-TGATGGCATGGACTG- TGTCATTCA-3'
U6	5'-CTCGCTTCGGCAGCACA- TA-3'	5'-ACGCTTCACGAATTTG- CGT-3'

1.3.2 细胞克隆形成实验:将转染相应质粒后的各组 MHCC97H 细胞接种于 6 孔板(5 000 个/孔),培养基每 2 d 更换 1 次。培养 14 d 后,甲醛固定 30 min,结晶紫染色 1 h 并风干。于显微镜下观察并记录细胞克隆数。

1.3.3 MTT 法检测细胞增殖:将转染相应质粒后的各组 MHCC97H 细胞接种于 96 孔板(2.5 × 10⁴ 个/孔),培养 24 h,加入 MTT(5 g/L)20 μl,孵育 4 h,加入二甲亚砜 150 μl,低速震荡,于酶标仪 490 nm 处测定吸光度值(A),计算细胞存活率 = A_{实验组}/A_{对照组} × 100%。

1.3.4 Transwell 检测细胞迁移、侵袭:向各组细胞中加入 RPMI 1640 培养基(不含胎牛血清),并调整细胞浓度为 5 × 10⁴ 个/ml。迁移实验:取上述细胞悬液 100 μl 加入 Transwell 小室上室中,RPMI 1640 培养基(含 10% 胎牛血清)500 μl 加入下室。培养 48 h,经多聚甲

醛固定、结晶紫染色后,倒置显微镜下观察、计数。侵袭实验:采用 RPMI 1640 培养基稀释预冷的 Matrigel 基质胶(8:1),并铺于 Transwell 上室,晾干后加入上述细胞悬液 100 μl。后续步骤与迁移实验相同。

1.3.5 Western-blot 法检测 MMP-2、MMP-9、p21 及 E-cadherin 蛋白表达:RIPA 试剂提取细胞总蛋白,二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)法测定蛋白浓度。将蛋白煮沸使其变性,行聚丙烯酰胺凝胶电泳,各泳道上样量为 30 μg。蛋白分离后,移至聚偏(二)氟乙烯(PVDF)膜,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,洗膜,分别置于 MMP-2、MMP-9、p21、E-cadherin 抗体孵育液中,4℃ 过夜。再加入二抗孵育液,37℃ 孵育 2 h。ECL 显影,Quantity One 凝胶软件分析结果。

1.3.6 双荧光素酶报告实验验证 ROR1-AS1 与 miR-504 的靶向关系:Starbase 数据库预测 ROR1-AS1、miR-504 是否存在结合位点。根据 ROR1-AS1、miR-504 结合区域序列,构建 ROR1-AS1 野生型(WT)及突变型(MUT)质粒,并分别转染 miR-504 mimics、miR-NC,培养 48 h 后,检测荧光素酶活性。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 23.0 软件分析数据。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较行 SNK-*q* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

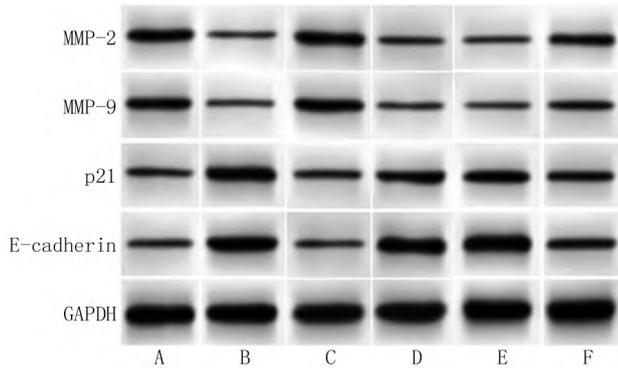
2.1 肝癌组织与癌旁组织 ROR1-AS1、miR-504 的表达比较 肝癌患者癌组织中 ROR1-AS1 水平高于癌旁组织(*P* < 0.01),miR-504 水平低于癌旁组织(*P* < 0.01),见表 2。

表 2 肝癌组织及癌旁组织中 ROR1-AS1、miR-504 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Expression of ROR1-AS1 and miR-504 in hepatocellular carcinoma and paracancerous tissues Comparison

组 织	<i>n</i>	ROR1-AS1	miR-504
癌旁组织	32	1.02 ± 0.06	0.98 ± 0.05
肝癌组织	32	2.74 ± 0.36	0.56 ± 0.08
<i>t</i> 值		11.544	10.905
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

2.2 抑制 ROR1-AS1 对 MHCC97H 细胞增殖、迁移、侵袭及蛋白的影响 与 si-NC 组比较,si-ROR1-AS1 组 ROR1-AS1 水平、克隆形成数、细胞存活率、迁移细胞数、侵袭细胞数、MMP-2、MMP-9 蛋白水平下降(*P* < 0.01),miR-504、p21 蛋白、E-cadherin 蛋白水平升高(*P* < 0.01),见图 1、2,表 3、4。



注:A. si-NC 组;B. si-ROR1-AS1 组;C. miR-NC 组;D. miR-504 mimics 组;E. si-ROR1-AS1 + anti-miR-NC 组;F. si-ROR1-AS1 + anti-miR-504 组
图 2 各组 MHCC97H 细胞中 MMP-2、MMP-9、p21、E-cadherin 表达情况比较

Fig. 2 Comparison of MMP-2, MMP-9, p21, E-cadherin expression in MHCC97H cells in each group

2.3 过表达 miR-504 对 MHCC97H 细胞增殖、迁移、侵袭的影响 与 miR-NC 组比较, miR-504 mimics 组

表 4 抑制 ROR1-AS1 对 MHCC97H 细胞增殖、迁移、侵袭相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Inhibition of ROR1-AS1 on MHCC97H cell proliferation, migration and invasion-related protein expression

组别	n	MMP-2	MMP-9	p21	E-cadherin
si-NC 组	6	0.65 ± 0.07	0.58 ± 0.06	0.36 ± 0.04	0.28 ± 0.03
si-ROR1-AS1 组	6	0.32 ± 0.04	0.27 ± 0.02	0.68 ± 0.07	0.73 ± 0.08
t 值		10.026	12.006	9.722	12.901
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

MHCC97H 细胞的克隆形成数、细胞存活率、迁移细胞数、侵袭细胞数、MMP-2、MMP-9 蛋白水平降低 ($P < 0.01$), miR-504、p21 蛋白、E-cadherin 蛋白水平增高 ($P < 0.01$), 见图 1、2、表 5。

2.4 ROR1-AS1 靶向调控 miR-504 表达 Starbase 数据库预测, ROR1-AS1 与 miR-504 存在互补序列, 见图 3。双荧光素酶报告结果显示, 与共转染 WT-ROR1-AS1 和 miR-NC 比较, 共转染 WT-ROR1-AS1 和 miR-504 mimics 的荧光素酶活性降低 ($P < 0.01$), 见表 6。

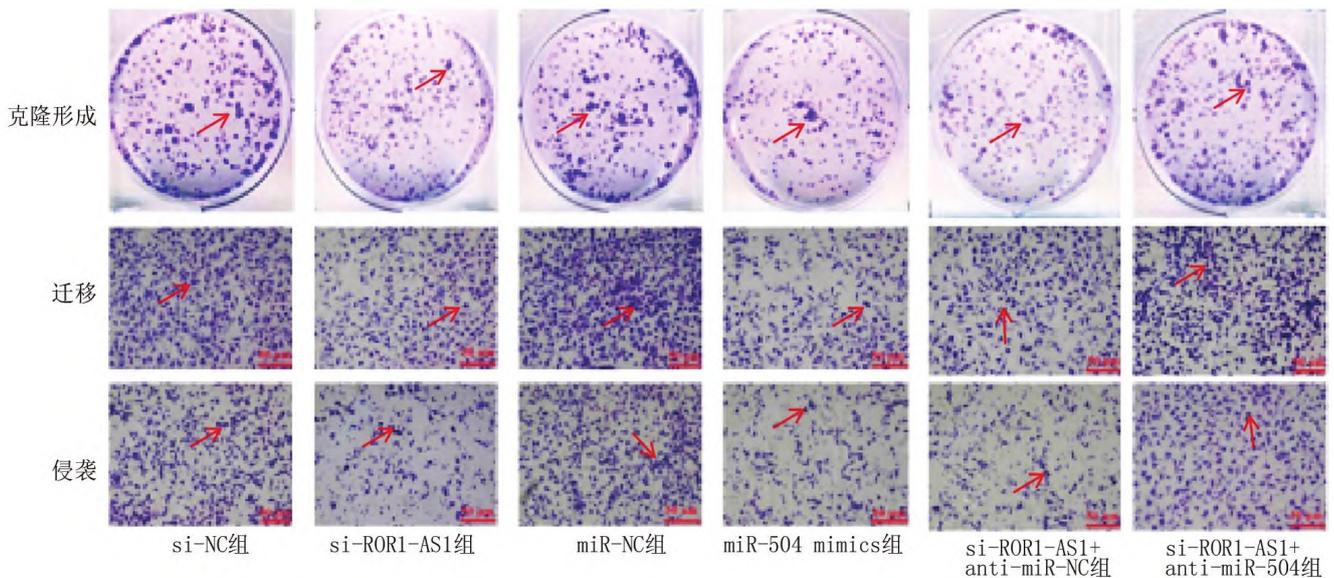


图 1 各组 MHCC97H 细胞克隆形成、迁移、侵袭情况比较(结晶紫染色, ×200)

Fig. 1 Comparison of the formation, migration and invasion of MHCC97H cells in each group (crystal violet staining, ×200)

表 3 抑制 ROR1-AS1 对 MHCC97H 细胞增殖、迁移、侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Inhibition of the effect of ROR1-AS1 on the proliferation, migration and invasion of MHCC97H cells

组别	n	ROR1-AS1	miR-504	克隆形成数(个)	细胞存活率(%)	迁移细胞数(个)	侵袭细胞数(个)
si-NC 组	6	1.01 ± 0.08	1.03 ± 0.07	157 ± 14	100.72 ± 9.83	228 ± 21	176 ± 16
si-ROR1-AS1 组	6	0.42 ± 0.05	1.86 ± 0.18	96 ± 9	55.28 ± 6.04	141 ± 14	79 ± 8
t 值		15.319	10.527	8.978	9.647	8.444	13.282
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

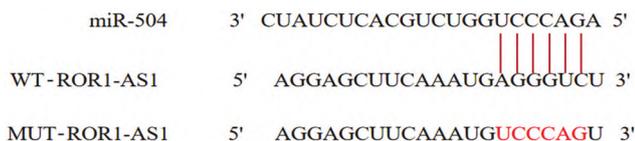


图 3 ROR1-AS1 与 miR-504 的靶向序列预测

Fig. 3 Target sequence prediction of ROR1-AS1 and miR-504

表 6 2 组细胞荧光素酶活性比较

Tab. 6 Comparison of cell luciferase activity between two groups

组别	n	WT-ROR1-AS1	MUT-ROR1-AS1
miR-NC	6	1.03 ± 0.06	1.05 ± 0.08
miR-504 mimics	6	0.64 ± 0.05	1.02 ± 0.07
t 值		12.231	0.691
P 值		<0.001	0.505

2.5 干扰 miR-504 表达逆转 ROR1-AS1 对 MHCC97H 细胞增殖、迁移、侵袭及相关蛋白表达的作用 与 si-ROR1-AS1 + anti-miR-NC 组比较, si-ROR1-AS1 + anti-miR-504 组细胞克隆形成数、细胞存活率、迁移细胞数、侵袭细胞数及 MMP-2、MMP-9 水平升高 ($P < 0.01$), miR-504、p21 蛋白、E-cadherin 蛋白水平下降 ($P < 0.01$), 见图 1、2, 表 7。

3 讨论

肝癌中异常表达的 lncRNA 对 miRNA、mRNA 和蛋白质发挥多效作用, 通过改变 miRNA、mRNA 的表达和稳定性, 以及影响蛋白质表达、结构、降解或与转录调节因子的相互作用来影响多种癌症表型^[6]。因

此, 探究 lncRNA 在肝癌中的分子机制, 可为肝癌的靶向治疗提供新的方向。ROR1-AS1 是近年来发现的 lncRNA, 主要位于细胞核中, 可能参与基因转录的表观遗传调控过程, 首次在套细胞淋巴瘤中被发现, 可通过与 EZH2 和 SUZ12 相互作用发挥致癌作用^[7]。Wang 等^[8]研究发现, ROR1-AS1 在结肠癌组织或细胞系中均高表达, 具有增强细胞增殖、加速细胞周期、抑制细胞凋亡的作用, 可能通过与 EZH2 结合下调 DUSP5 影响结肠癌的发生发展。本研究结果显示, ROR1-AS1 在肝癌组织中表达增高, 提示 ROR1-AS1 在肝癌进展中可能起促进作用。此外, 干扰 ROR1-AS1 表达后, MHCC97H 细胞的克隆形成数、细胞存活率、迁移及侵袭细胞数降低, 提示干扰 ROR1-AS1 表达可抑制肝癌细胞增殖、迁移和侵袭。MMP-2、MMP-9 可参与细胞外基质、基底膜降解过程, 对细胞迁移、侵袭具有促进作用^[9]。p21 能够参与调控细胞周期, 发挥肿瘤抑制作用, 其高表达可抑制细胞增殖^[10]。E-cadherin 表达下降可降低细胞间的黏附作用, 从而导致细胞脱落、迁移^[11]。本研究结果显示, 与 si-NC 组比较, si-ROR1-AS1 组 MMP-2、MMP-9 蛋白水平下降, p21、E-cadherin 蛋白水平升高, 提示干扰 ROR1-AS1 表达可能通过调控 MMP-2、MMP-9、p21、E-cadherin 蛋白水平从而抑制肝癌细胞增殖、迁移、侵袭。

lncRNA 可充当 miRNA“海绵”, 抑制 miRNA 表达, 并通过转录因子或修饰酶复合物调节基因转录^[12-15]。通过搜索 Starbase 数据库发现, miR-504 可

表 5 过表达 miR-504 对 MHCC97H 细胞增殖、迁移、侵袭及相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 5 Effect of overexpression of miR-504 on MHCC97H cell proliferation, migration, invasion and related proteins

组别	n	miR-504	克隆形成数 (个)	细胞存活率 (%)	迁移细胞数 (个)	侵袭细胞数 (个)	MMP-2	MMP-9	p21	E-cadherin
miR-NC 组	6	0.99 ± 0.04	155 ± 14	99.85 ± 10.12	231 ± 22	181 ± 17	0.68 ± 0.07	0.61 ± 0.06	0.34 ± 0.04	0.27 ± 0.03
miR-504 mimics 组	6	2.53 ± 0.34	95 ± 9	52.93 ± 6.21	142 ± 15	83 ± 9	0.35 ± 0.04	0.31 ± 0.03	0.65 ± 0.07	0.71 ± 0.08
t 值		11.019	8.831	9.680	8.187	12.480	10.026	10.954	9.418	12.614
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表 7 干扰 miR-504 表达逆转 ROR1-AS1 对 MHCC97H 细胞增殖、迁移、侵袭及相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 7 Interference with miR-504 expression Reverses the effect of ROR1-AS1 on MHCC97H cell proliferation, migration, invasion and related protein expression

组别	n	miR-504	克隆形成数 (个)	细胞存活率 (%)	迁移细胞数 (个)	侵袭细胞数 (个)	MMP-2	MMP-9	p21	E-cadherin
si-ROR1-AS1 + anti-miR-NC 组	6	2.21 ± 0.29	94 ± 9	56.37 ± 6.45	142 ± 14	81 ± 9	0.33 ± 0.05	0.28 ± 0.03	0.66 ± 0.07	0.71 ± 0.08
si-ROR1-AS1 + anti-miR-504 组	6	1.38 ± 0.17	142 ± 14	88.63 ± 9.24	207 ± 19	154 ± 15	0.56 ± 0.06	0.47 ± 0.05	0.49 ± 0.05	0.45 ± 0.04
t 值		6.048	7.064	7.012	6.746	10.222	7.213	7.982	4.841	7.120
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

能是 ROR1-AS1 的靶基因。此外, ROR1-AS1 过表达可诱导骨肉瘤 MG-63 细胞迁移, 促进 N-钙黏蛋白和波形蛋白的表达, 抑制 E-钙黏蛋白的表达。双荧光素酶测定证明, ROR1-AS1 与 miR-504 存在靶向关系, ROR1-AS1 过表达可抑制 MG-63 细胞中 miR-504 的表达, miR-504 过表达可消除 ROR1-AS1 对骨肉瘤细胞迁移和增殖的部分影响^[16]。本研究亦通过双荧光素酶实验验证, miR-504 是 ROR1-AS1 的靶基因。miR-504 在胃癌组织中高表达, 可通过靶向 RBM4 促进胃癌细胞增殖、抑制细胞凋亡^[17]; miR-504 过表达可抑制胶质母细胞瘤细胞的迁移、侵袭、上皮间质转化等恶性行为, miR-504 低表达与患者间充质亚型转变及较差的生存期有关^[18]。以上研究显示, miR-504 可在多种恶性肿瘤中发挥不同作用。本研究结果显示, 肝癌组织中 miR-504 表达下调, 提示 miR-504 在肝癌中发挥抑癌作用。同时, 过表达 miR-504 可抑制肝癌细胞增殖、迁移、侵袭能力, 并下调 MMP-2、MMP-9 蛋白表达, 上调 p21、E-cadherin 蛋白表达, 再次证明 miR-504 的抗肝癌作用, 且这种抗癌作用可能与调控相关蛋白表达有关。此外, 沉默 ROR1-AS1 可导致 miR-504 表达升高, 而抑制 miR-504 表达可减弱沉默 ROR1-AS1 对 MHCC97H 细胞增殖、迁移、侵袭的影响, 进一步证实 miR-504 是 ROR1-AS1 的靶基因。

综上所述, ROR1-AS1 在肝癌组织中表达上调, 抑制 ROR1-AS1 表达可能通过靶向 miR-504 抑制肝癌 MHCC97H 细胞的增殖、迁移及侵袭。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

乌吉斯古楞: 课题实验设计, 实施研究过程, 论文审核; 张文华: 分析实验数据, 论文撰写; 张彤: 论文终审, 论文撰写

参考文献

[1] Yuen VW, Wong CC. Hypoxia-inducible factors and innate immunity in liver cancer[J]. J Clin Invest, 2020, 130(10): 5052-5062. DOI: 10.1172/JCI137553.

[2] 吴娜, 王东, 李京敏, 等. 羟基红花黄色素 A 抑制人肝癌细胞系 Huh7 发生上皮-间质转化[J]. 基础医学与临床, 2021, 41(10): 1423-1427. DOI: 10.3969/j.issn.1001-6325.2021.10.005.

[3] Huang Z, Zhou JK, Peng Y, et al. The role of long noncoding RNAs in hepatocellular carcinoma[J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 77-94. DOI: 10.1186/s12943-020-01188-4.

[4] Zhang Z, Wang S, Yang F, et al. LncRNA ROR1AS1 high expression and its prognostic significance in liver cancer[J]. Oncol Rep, 2020, 43(1): 55-74. DOI: 10.3892/or.2019.7398.

[5] Quan H, Li B, Yang J. MicroRNA-504 functions as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma through inhibiting Frizzled-7-mediated-Wnt/ β -catenin signaling[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 107

(1): 754-762. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.07.150.

[6] Lim LJ, Wong SYS, Huang F, et al. Roles and regulation of long non-coding RNAs in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 2019, 79(20): 5131-5139. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-19-0255.

[7] Hu G, Gupta SK, Troska TP, et al. Long non-coding RNA profile in mantle cell lymphoma identifies a functional lncRNA ROR1-AS1 associated with EZH2/PRC2 complex[J]. Oncotarget, 2017, 8(46): 80223-80234. DOI: 10.18632/oncotarget.17956.

[8] Wang XY, Jian X, Sun BQ, et al. LncRNA ROR1-AS1 promotes colon cancer cell proliferation by suppressing the expression of DUSP5/CDKN1A[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(3): 1116-1125. DOI: 10.26355/eurrev_202002_20162.

[9] 张萌, 张向东, 夏永欣, 等. 钙周期素结合蛋白促进胃癌细胞迁移侵袭和 MMP-2、MMP-9、p-ERK1/2、p-AKT 水平上调[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2019, 28(2): 134-141. DOI: 10.16705/j.cnki.1004-1850.2019.02.006.

[10] 符梁, 梁爱玲, 刘勇军. P21 参与肺癌耐药的研究进展[J]. 中国肺癌杂志, 2020, 23(7): 597-602. DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2020.101.16.

[11] Na TY, Schecterson L, Mendonsa AM, et al. The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2020, 117(11): 5931-5937. DOI: 10.1073/pnas.1918167117.

[12] Xu M, Chen X, Lin K, et al. The long noncoding RNA SNHG1 regulates colorectal cancer cell growth through interactions with EZH2 and miR-154-5p[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 141-156. DOI: 10.1186/s12943-018-0894-X.

[13] 王斐斐, 何婷, 李炜, 等. 长链非编码 RNA TPT1-AS1 促进肝癌细胞增殖、迁移、侵袭的作用研究[J]. 疑难病杂志, 2022, 21(1): 24-30. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2022.01.005.

[14] 李品青, 徐春阳, 薛晨祺, 等. 肝细胞癌组织中 lncRNA-SOX2OT、miR-122-5p 表达及与病理参数和预后的关系[J]. 疑难病杂志, 2022, 21(12): 1277-1282. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2022.12.010.

[15] 岳成旭, 王文锐, 杨清玲, 等. LncRNA SNHG15 通过调控 miRNA-451a 促进乳腺癌细胞的上皮间质转化研究[J]. 蚌埠医学院学报, 2022, 47(4): 421-425. DOI: 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2022.04.001.

[16] Wu X, Yan L, Liu Y, et al. LncRNA ROR1-AS1 accelerates osteosarcoma invasion and proliferation through modulating miR-504[J]. Aging (Albany NY), 2020, 13(1): 219-227. DOI: 10.18632/aging.103498.

[17] Zhang Y, Yong H, Fu J, et al. miR-504 promoted gastric cancer cell proliferation and inhibited cell apoptosis by targeting RBM4[J]. J Immunol Res, 2021, 2021: 5555950-5555958. DOI: 10.1155/2021/5555950.

[18] Liu Q, Guan Y, Li Z, et al. miR-504 suppresses mesenchymal phenotype of glioblastoma by directly targeting the FZD7-mediated Wnt- β -catenin pathway[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 358-375. DOI: 10.1186/s13046-019-1370-1.

(收稿日期: 2022 - 10 - 20)