

乙型肝炎病毒上调的 lnc-HUR1 抑制肝癌细胞凋亡

陈永臣^{2#}, 温金燕^{1,2#}, 祁丹丹², 童晓梅², 刘宁宁², 叶昕²

1 安徽大学 物质科学与信息技术学院, 安徽 合肥 230601

2 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

陈永臣, 温金燕, 祁丹丹, 童晓梅, 刘宁宁, 叶昕. 乙型肝炎病毒上调的 lnc-HUR1 抑制肝癌细胞凋亡. 生物工程学报, 2022, 38(9): 3501-3514.

CHEN YC, WEN JY, QI DD, TONG XM, LIU NN, YE X. HBV-upregulated Lnc-HUR1 inhibits the apoptosis of liver cancer cells. Chin J Biotech, 2022, 38(9): 3501-3514.

摘要: lnc-HUR1 是乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 上调的长链非编码 RNA, 具有促进肝癌细胞增殖和促进肝癌发生发展的功能。为探究 lnc-HUR1 对肝癌细胞凋亡的影响, 通过免疫印迹、实时荧光定量 PCR、双荧光素酶报告基因、免疫共沉淀、流式细胞术等实验方法, 检测 lnc-HUR1 对肝癌细胞凋亡的影响。转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、五氟尿嘧啶和星孢菌素诱导肝癌细胞凋亡的实验结果显示, 过表达 lnc-HUR1 能够显著降低 caspase3/7 的活性以及 PARP-1 的剪切, 而敲低 lnc-HUR1 则能够显著增加 caspase3/7 的活性, 促进 PARP-1 的剪切; Annexin-V 和 PI 联合染色实验也表明过表达 lnc-HUR1 能够抑制细胞凋亡, 敲低 lnc-HUR1 能够促进细胞的凋亡。同时过表达 lnc-HUR1 能够在 RNA 水平和蛋白水平上调凋亡抑制因子 Bcl-2 (B cell lymphoma-2)、下调促凋亡因子 BAX (B cell lymphoma-2-associated x), 从而抑制细胞的凋亡。在 CCL4 诱导的小鼠急性肝损伤模型中, lnc-HUR1 转基因小鼠肝组织中 Bcl-2 的表达高于对照小鼠。染色质免疫共沉淀 (chromatin immunoprecipitation, ChIP) 实验也证实 lnc-HUR1 能够降低 p53 在 Bcl-2 和 BAX 启动子区的富集。以上结果说明, lnc-HUR1 通过促进凋亡抑制因子 Bcl-2 及抑制凋亡促进因子 BAX 的表达抑制肝癌细胞的凋亡。进一步的实验表明, 在 HCT116 细胞中 lnc-HUR1 能够调控 Bcl-2 和 BAX 的转录, 而在 HCT116 p53^{-/-} 细胞中, lnc-HUR1 对 Bcl-2 和 BAX 的表达没有影响, 说明 lnc-HUR1 对肝癌细胞凋亡的抑制作用依赖于 p53 的活性。综上所述, HBV 上调的 lnc-HUR1 具有抑制肝癌细胞凋亡的作用, lnc-HUR1 通过抑制 p53 转录活性, 上调凋亡抑制因子 Bcl-2、抑制凋亡促进因子 BAX 的转录, 从而抑制细胞凋亡。上述结果提示 lnc-HUR1 在 HBV 相

Received: February 11, 2022 Accepted: April 14, 2022

Supported by: Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (XDB29010000); National Natural Science Foundation of China (31900143)

#These authors contributed equally to this study

Corresponding author: YE Xin. E-mail: yex@im.ac.cn

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项 (XDB29010000); 国家自然科学基金 (31900143)

关肝癌发生发展中发挥重要作用。

关键词：乙型肝炎病毒；肝癌；长链非编码 RNA lnc-HUR1；凋亡

HBV-upregulated Lnc-HUR1 inhibits the apoptosis of liver cancer cells

CHEN Yongchen^{2#}, WEN Jinyan^{1,2#}, QI Dandan², TONG Xiaomei², LIU Ningning², YE Xin²

1 Institutes of Physical Science and Information Technology, Anhui University, Hefei 230601, Anhui, China

2 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: Lnc-HUR1 is an HBV-related long non-coding RNA, which can promote the proliferation of hepatoma cells and the occurrence and development of liver cancer. In this study we explored the effect of lnc-HUR1 on the apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by taking the approach of immunoblotting, quantitative real time PCR, luciferase reporter assay, chromatin immunoprecipitation (ChIP) and flow cytometry. We found that overexpression of lnc-HUR1 significantly reduced the activity of caspase3/7 and the cleavage of PARP-1, while knocking down of lnc-HUR1 significantly increased the activity of caspase3/7 and promoted the cleavage of PARP-1 in HepG2 cells treated with TGF- β , pentafluorouracil or staurosporine. Consistently, the data from Annexin-V/PI staining showed that overexpression of lnc-HUR1 inhibited apoptosis, while knockdown of lnc-HUR1 promoted apoptosis. Moreover, overexpression of lnc-HUR1 up-regulated the apoptosis inhibitor Bcl-2 and down-regulated the pro-apoptotic factor BAX at both RNA and protein levels. In the CCL4-induced acute liver injury mice model, the expression of Bcl-2 in the liver tissue of lnc-HUR1 transgenic mice was higher than that of the control mice. The data from ChIP assay indicated that lnc-HUR1 reduced the enrichment of p53 on Bcl-2 and BAX promoters. All these results indicated that lnc-HUR1 inhibited the apoptosis by promoting the expression of apoptosis inhibitor Bcl-2 and inhibiting the expression of apoptosis promoting factor BAX. Further studies showed that lnc-HUR1 regulated the transcription of Bcl-2 and BAX in HCT116 cells, but had no effect on the expression of Bcl-2 and BAX in HCT116 p53^{-/-} cells, indicating that lnc-HUR1 regulates the transcription of Bcl-2 and BAX dependent upon the activity of p53. In conclusion, HBV upregulated lnc-HUR1 can inhibit the apoptosis of hepatoma cells. Lnc-HUR1 inhibits apoptosis by inhibiting the transcriptional activity of p53. These results suggest that lnc-HUR1 plays an important role in the occurrence and development of HBV-related hepatocellular carcinoma.

Keywords: HBV; liver cancer; lnc-HUR1; apoptosis

原发性肝癌是全球第六大最常见的癌症，也是全球第三大癌症死亡原因，2020 年全球新

增肝癌病例约 90.6 万例，死亡约 83 万人^[1]。其中肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)

患者约占原发性肝癌患者数量的 90%，HCC 是肝癌的主要形式^[2]。导致形成 HCC 的因素有很多，包括肝炎病毒感染、酒精肝脏疾病、酒精性脂肪肝和非酒精性脂肪肝等。HCC 的形成过程包含炎症和肝硬化，最后形成肿瘤^[3]，但并不是所有的 HCC 患者都需要经历这几个阶段，就肝硬化和 HCC 的关系而言，形成 80%–90% 的肝硬化患者会形成 HCC，HCC 患者中 2%–4% 是肝硬化患者^[4]。导致肝癌的主要因素因地域差异而不同，例如在中国和韩国，肝癌的发生主要是由于 HBV 的持续感染和黄曲霉素的污染；在日本和意大利肝癌的发生主要和丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 的持续感染有关^[5]。HBV 感染和 HCV 感染分别占全球肝癌死亡人数的 56% 和 20%^[6]，在全球范围内，HCC 患者的死亡率以每年 2%–3% 的速率在逐年上升，这和其他癌症的情况是相反的，例如乳腺癌、前列腺癌和肺癌等^[7]，消除病毒性肝炎是预防肝癌的关键策略。乙型肝炎病毒感染是一个主要的全球健康问题，据数据统计，目前为止，全球约 30 亿人感染 HBV，其中约有 2.4 亿是慢性乙肝患者，每年因为乙型肝炎病毒死去的人数约达 90 万^[8]。值得注意的是，全球超过一半的 HCC 患者是因为感染了 HBV 而引起的^[9]，HBV 可以通过直接或者间接的方式促进肝癌的发生，直接的致癌作用包括将病毒基因组整合进宿主基因组中，使宿主染色体不稳定以及产生大量的突变^[10]，及 HBV X 蛋白 (HBx) 与宿主因子相互作用，HBx 可以通过促进 HCC 细胞中的上皮间质转化进而促进 HCC 细胞侵袭和转移^[11]；HBx 通过上调 HCC 细胞中的 NAD 依赖性去乙酰化酶 (sirtuin-1, SIRT1) 蛋白进而促进 HCC 的肿瘤生成^[12]；HBx 可通过抑制 miR-129-5p 的功能进而促进表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 表达，

提高细胞增殖速率^[13]；HBx 与宿主细胞的淋巴细胞性白血病中缺失的长链非编码 RNA (deleted in lymphocytic leukemia long noncoding RNA, DLEU LncRNA) 结合进而维持 cccDNA 以及宿主癌症相关基因的转录^[14]；HBx 通过抑制 microRNA-145a-5p 促进小鼠肝癌发生^[15]；HBx 介导不育 α 基序结构域和组氨酸-天冬氨酸结构域蛋白质 1 (sterile alpha motif domain and histidine-aspartate domain-containing protein 1, SAMHD1) 降解并通过 Akt/p27 通路促进肝癌细胞增殖^[16]；HBV 的间接作用包括 HBV 病毒感染引起的慢性炎症、氧化应激等，促使肝脏遗传变异和表观遗传变异的积累，导致慢性肝炎、肝纤维化、肝硬化等肝损伤，最终导致肿瘤的发生和发展^[17]。

长链非编码序列 (lncRNA) 是指核苷酸长度超过 200 bp 且不具备编码功能的 RNA。研究表明 lncRNA 与肝癌、乳腺癌、肺癌等多种固体肿瘤的发生发展相关。例如 lncRNA MCM3AP 反义 RNA1 (MCM3AP antisense RNA 1, MCM3AP-AS1) 通过与 miR-194-5p 结合作为竞争内源性 RNA (competing endogenous RNAs, ceRNA) 发挥作用，进一步促进 miR-194-5p 的靶标基因叉头框蛋白 A1 (forkhead box A1, FOXA1) 表达，进而促进 HCC 细胞的增殖^[18]；lncRNA 00152 通过激活 Janus 激酶/信号转导和转录活化蛋白 3 (Janus kinase/signal transducers and activator of transcription, JAK2/STAT3) 信号通路促进 HCC 发生发展^[19]；lnc NBR2 通过细胞外调控蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinase, ERK) 和 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 信号通路抑制 Beclin 1 依赖的细胞凋亡，进而抑制细胞凋亡引起的 HCC 细胞增殖^[20]。通过 RNA 深度测序分析，我们鉴定了一条 HBV 上调的长链非编码 RNA

lnc-HUR1, lnc-HUR1 可以通过抑制 p53 转录活性促进肝癌细胞的增殖, 在肝癌的发生发展过程中具有重要的作用。本研究进一步探究了 lnc-HUR1 对肝癌细胞凋亡的影响及其分子机制。通过检测 caspase3/7 活性, 聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶-1 (poly(ADP-ribose)polymerase-1, PARP-1) 剪切水平以及细胞凋亡水平, 我们发现 lnc-HUR1 可以抑制肝癌细胞的凋亡, 进一步的细胞及动物实验数据显示 lnc-HUR1 可以调控凋亡相关因子 Bcl-2 和 BAX 的转录且这一过程依赖 p53 的转录活性。总之, 我们发现 HBV 上调的长链非编码 RNA lnc-HUR1 通过 p53 依赖的方式调控凋亡抑制因子 Bcl-2 和促凋亡因子 BAX 的转录, 抑制肝癌细胞的凋亡。

1 材料与方法

1.1 材料

感受态细胞 Trans 5 α 购自北京全式金生物技术股份有限公司。质粒来自实验室保存库。anti-p53 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology, anti-human poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) 抗体、anti-Bcl2 抗体、anti-BAX 抗体购自 Cell Signaling Technology, anti-actin 抗体购自天津三箭生物技术股份有限公司, anti-tubulin 抗体购自博奥瑞京 (北京)。细胞株均为实验室保存。lnc-HUR1 肝特异性转基因小鼠委托中国医学科学院医学实验动物研究所构建。TRIzol 购自 Invitrogen 公司; Protease Cocktail Inhibitor 购自 Roche 公司; RNase Inhibitor 购自英潍捷基 (上海) 有限公司; Luciferase Assay 试剂盒和 Caspase-Glo¹[®] 3/7 Assay 购自 Promega 公司; PAN 胎牛血清购自 Biotech 公司; 杜尔伯科改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modification of Eagle's medium Dulbecco, DMEM) 培养基购自

Life Technologies; 脂质体转染试剂购自上海翊圣生物科技有限公司; Hieff[®] qPCR SYBR[®] Green Master Mix 购自翊圣生物科技 (上海) 股份有限公司; 逆转录试剂盒购自北京全式金生物技术股份有限公司; 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB) 显色液、ChIP Assay Kit 购自上海碧云天生物技术有限公司; 二辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量测定试剂盒购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; 质粒提取试剂盒购自天根生化科技 (北京)。

1.2 实验方法

1.2.1 lnc-HUR1 稳定细胞系的构建

从美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 获得 lnc-HUR1 序列, 设计引物从互补脱氧核糖核酸 (complementary DNA, cDNA) 文库中扩增出全长 lnc-HUR1, 并将其构建到 pcDNA3.1 载体, 命名为 pCMV-lnc-HUR1 质粒。将质粒 pCMV-lnc-HUR1 及对照质粒 pcDNA3.1 转染 HepG2 细胞, 用 800 μ g/mL 遗传霉素 (geneticin, G418) 筛选, 获得稳定过表达 lnc-HUR1 的细胞系 (HepG2-lnc-HUR1) 和对照细胞 (HepG2-3.1)。根据 lnc-HUR1 的序列, 我们用 Thermo shRNA 预测网站设计靶向 lnc-HUR1 的 shRNA, (HUR1-shRNA#1 靶向 HUR1 的 nt 507-524 序列, HUR1-shRNA#2 靶向 HUR1 的 nt 277-298 序列), 并连接至 PSI-HI-GFP 质粒中, 构建 HUR1-shRNA#1 和 HUR1-shRNA#2 质粒。包装靶向 lnc-HUR1 的 shRNA 慢病毒及对照病毒, 感染 HepG2 细胞。用流式细胞仪分选出 GFP 阳性细胞, 获得 lnc-HUR1 稳定敲低细胞系 (HepG2-HUR1-shRNA#1, HepG2-HUR1-shRNA#2) 及对照细胞系 (HepG2-NC)。

1.2.2 实时荧光定量 PCR

实验过程中细胞用 TRIzol (Life Technologies, 350301) 裂解, 提取总 RNA, 并通过 cDNA 反转录试剂盒 (北京全式金生物技术股份有限公司, #N11213) 获得 cDNA 文库, 按照 Hieff[®] qPCR SYBR Green Master Mix (Low Rox Pius) (翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司, H1125100) 进行实时荧光定量 PCR。所用引物见表 1。

1.2.3 双荧光素酶活性检测

前一天用 293T 细胞铺 24 孔板, 第 2 天细胞长至 60%–80% 密度后转染 PGL4-Bax promoter-luciferase 或 PGL4-Bcl-2 promoter-luciferase 和 renill 质粒, 海肾荧光素 (Renilla) 为内参。转染 36 h 后吸弃上清, 用磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 清洗; 每孔加入 100 μ L 细胞裂解液, 放置在摇床上室温裂解 20 min; 将裂解液转入到 EP 管中, 离心后, 分别吸取 10 μ L 上清加入到 96 孔酶标板中; 在荧光测定仪上测定双荧光素酶活性及 Renilla 数值, 以 Renilla 为内参计算荧光素酶活性。

1.2.4 Western blotting 分析

在细胞样品中加入细胞裂解液, 置于冰上裂解 20 min; 对于小鼠肝组织, 液氮研磨, 放置冰上裂解 20 min。4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 使用 BCA 蛋白定量试剂盒 (鼎国昌盛, B1700150) 进行蛋白定量。取等量蛋白样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (dodecyl sulfate sodium salt (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)。80 V 进行浓缩胶电泳, 样品浓缩后在 120 V 进行分离胶电泳。之后进行蛋白转膜, 封闭, 一抗孵育和二抗孵育。最后使用 TMB 试剂显色。

1.2.5 染色质免疫共沉淀实验 (ChIP assay)

染色质免疫共沉淀实验使用标准实验方法进行, 主要实验步骤如下, 细胞用甲醛固定后用裂解液裂解, 裂解后的细胞用超声破碎仪将 DNA 打断至 200–1 000 bp 的合适片段, 并与 anti-p53 抗体或对照 IgG 孵育, 然后与蛋白 A 磁珠共孵育, 富集获得的 DNA 用于实时定量 PCR 实验。Bcl 启动子引物以及 Bax 启动子引物如表 1。

表 1 RT-PCR 及启动子引物

Table 1 Primers for RT-PCR and promoters

Primer name	Primer sequences (5'→3')	Size (bp)
lnc-HUR1	F TCGGAACATAGGGAGCAAACG	21
	R AGACCAGTGTACA AAGGGATAGG	23
Bcl-2 (human)	F GGTGGGGTTCATGTGTGTGG	19
	R CGGTTCAGGTACTIONCAGTCATCC	22
Bcl-2 (mouse)	F ATGCCTTTGTGGACTIONTATGGC	23
	R GGTATGCACCCAGAGTGATGC	21
BAX (human)	F CCCGAGAGGTCTTTTTCCGAG	21
	R CCAGCCCATGATGGTTCTGAT	21
BAX (mouse)	F TGAAGACAGGGCCTTTTTG	20
	R AATTCGCCGAGACACTCG	19
Bcl Promoter	F AAAGAGCTGGATTATAACTA	20
	R CTTGCGCCATCCTCCCCGAAAA	23
Bax Promoter	F GTCACTGAAGC GACTGATGT	20
	R CTCTTCCAGATGGTGAGTGAG	22

1.2.6 Annexin X 和 PI 联合染色检测细胞凋亡

细胞使用胰酶消化后, 室温 1 000 r/min 离心 5 min; 用预冷的 PBS 洗涤细胞, 1 000 r/min 离心 5 min, 吸弃 PBS; 加入 300 μ L 的 1 \times 结合缓冲液悬浮细胞; 加入 5 μ L 的膜联蛋白 V 标记, 避光, 室温孵育 15 min; 加入 5 μ L 的碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染色; 加 200 μ L 的 1 \times 结合缓冲液, 使用流式细胞仪分析凋亡情况。

1.2.7 Caspase 3/7 活性检测

Caspase3/7 检测试剂提前解冻, 按说明书配制 caspase3/7 检测缓冲液; 在 96 孔板中, 加入一定量诱导凋亡药物, 在细胞培养箱中孵育 4–6 h, 诱导细胞凋亡; 每孔加入 100 μ L caspase3/7 检测缓冲液, 摇匀, 避光, 室温孵育 1 h; 使用 Promega 荧光仪进行检测。

1.2.8 CCL4 诱导急性肝损伤

准备 8 周龄大的雄性野生型小鼠或者 lnc-HUR1 转基因小鼠; 将 CCL4 与矿物油按 1:1 的比例配制成注射液, 采用腹腔注射, 注射量为 2.4 μ L/g, 对照组腹腔注射矿物油; 24 h 后处死小鼠, 取出肝组织, 提取 RNA 和蛋白质, 用于反转录合成 cDNA 和 Western blotting。实验设计符合中国科学院微生物研究所动物实验与人类生物医学研究伦理审查办法, 批准单位为中国科学院微生物研究所伦理委员会, 批准号为 APZMCAS2019009。

1.2.9 BCA 蛋白浓度测定

按说明书将 50 体积试剂 A 和 1 体积试剂 B 的比例配制适量 BCA 工作液, 充分混匀; 将蛋白标准样品按 0、1、2、4、6、8、10 μ L 加入到 96 孔板中, 加双蒸水补足到 10 μ L; 取 10 μ L 待测样品加入 96 孔板中, 每个测定做 2–3 个平行; 向待测样品孔和蛋白标准品孔加入 200 μ L BCA 工作液, 混匀; 37 $^{\circ}$ C 恒温孵育 30 min; 酶标仪 562 nm 波长处测定吸光度; 制作标准曲

线, 从标准曲线中计算样品浓度。

1.2.10 数据处理

统计分析采用配对 *t* 检验。使用 GraphPad Prism 5.0 版软件进行分析, 统计显著性用星号表示 (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$)。

2 结果与分析

2.1 Lnc-HUR1 具有抑制肝癌细胞凋亡的作用

2.1.1 Lnc-HUR1 能够抑制 caspase3/7 的活性

为了分析 lnc-HUR1 是否具有抑制细胞凋亡的功能, 将 pCMV-lnc-HUR1 质粒及对照 pcDNA3.1 空载体质粒转染至 HepG2 细胞中, 并用 G418 筛选, 构建 HepG2 过表达细胞系 HepG2-lnc-HUR1 及过表达对照细胞 HepG2-3.1; 用携带靶向 lnc-HUR1 的 shRNA (#1, #2) 及对照 shRNA (不靶向细胞内任何基因的 random 序列) 感染 HepG2 细胞, 构建 HepG2 敲低

细胞系 (HepG2-HUR1-shRNA#1, HepG2-HUR1-shRNA#2) 及敲低对照细胞 (HepG2-NC)。首先以 HepG2-3.1 为对照检测 HepG2-lnc-HUR1 的过表达效果 (图 1A 左), 以 HepG2-NC 为对照检测 HepG2-HUR1-shRNA#1 和 HepG2-HUR1-shRNA#2 的敲低效果 (图 1B)。分别使用 TGF- β 、五氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU) 和星孢菌素 (staurosporine) 处理过表达 lnc-HUR1 的稳定细胞系 HepG-lnc-HUR1 和对照细胞系 HepG2-3.1 6 h, 加入 caspase3/7 检测缓冲液, 避光室温孵育 1 h, 检测荧光值, 并以细胞 HepG2-3.1 为对照归一化。结果表明, 与对照组相比 (图 1A), 过表达 lnc-HUR1 能够显著降低 TGF- β 、五氟尿嘧啶和星孢菌素引起的 caspase3/7 活性的升高, 说明过表达 lnc-HUR1 能够抑制 TGF- β 、五氟尿嘧啶和星孢菌素引起的细胞凋亡; 相反, 在相同药物的处理条件下, 敲低 lnc-HUR1 与对照组

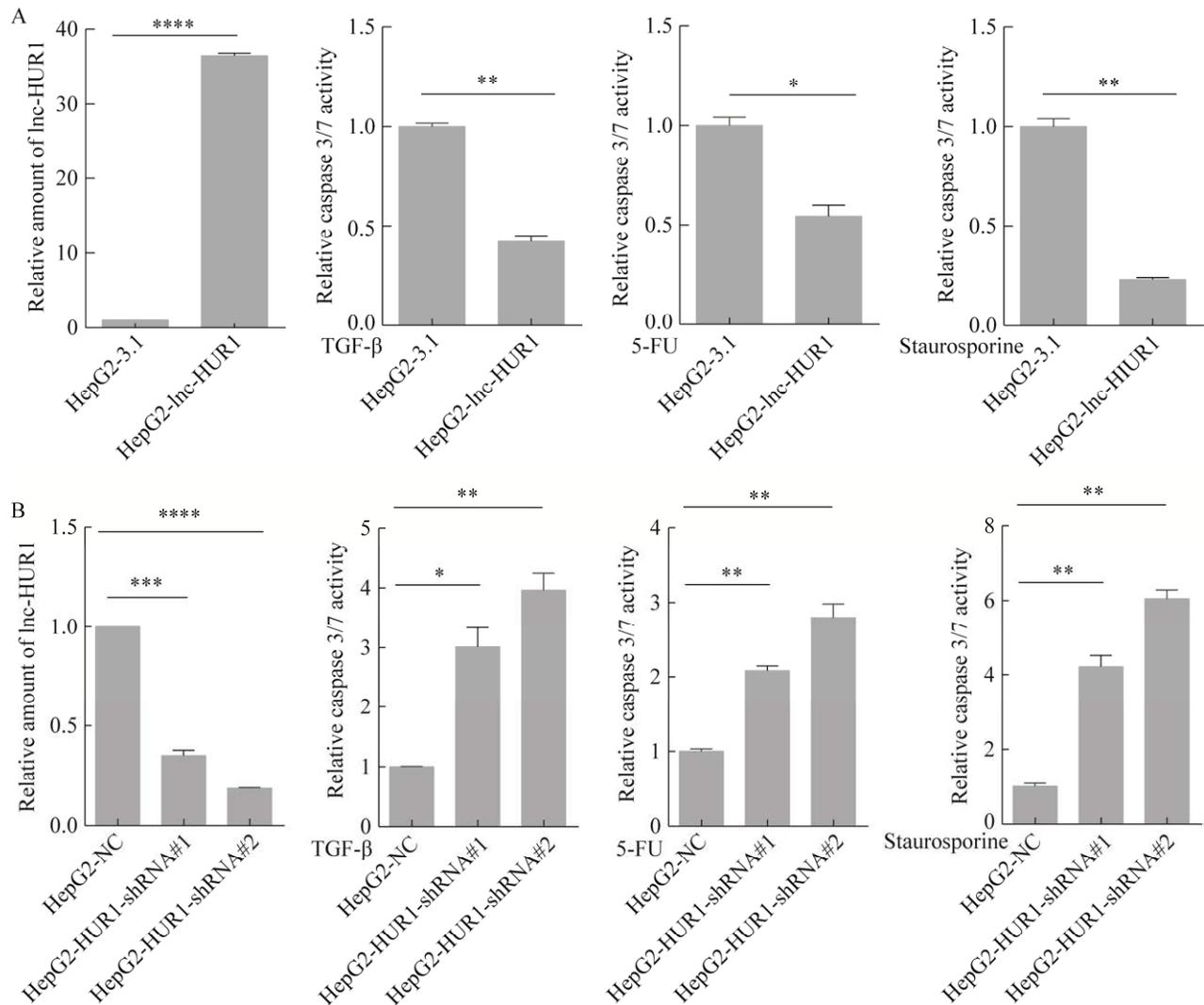


图1 Lnc-HUR1 抑制 HepG2 细胞 caspase3/7 活性

Figure1 Lnc-HUR1 inhibits caspase3/7 activity in HepG2 cells HepG2-3.1 and HepG2-lnc-HUR1 cells (A) or HepG2-NC HepG2-HUR1-shRNA#1 and HepG2-HUR1-shRNA#2 (B) were treated with TGF-β (10 ng/mL), 5-FU (40 mg/mL) or staurosporine (1 mmol/L) for 6 hours. The cell lysates were harvested for caspase3/7 activity assay. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

相比显示更高的 caspase3/7 的活性,说明敲低 lnc-HUR1 后促进 TGF-β、五氟尿嘧啶和星孢菌素引起的细胞凋亡(图 1B)。以上结果表明 lnc-HUR1 能够抑制 caspase3/7 的活性,对促凋亡药物产生的凋亡效果起抑制作用。

2.1.2 Lnc-HUR1 抑制细胞内 PARP-1 的剪切

用 TGF-β (终浓度为 10 ng/mL) 处理

HepG2-3.1、HepG2-lnc-HUR1 和 HepG2-NC、HepG2-HUR1-shRNA#1 及 HepG2-HUR1-shRNA#2 细胞,诱导细胞凋亡,对照组不做处理。6 h 后收样,Western blotting 检测 PARP-1 的剪切情况。结果显示(图 2A),HepG2-3.1 和 HepG2-lnc-HUR1 在没有使用 TGF-β 处理的情况下,细胞内 PARP-1 基本都没有被剪切;在使用 TGF-β

处理的情况下, HepG2-3.1、HepG2-lnc-HUR1 细胞均出现 PARP-1 剪切带, 但 HepG2-lnc-HUR1 中 PARP-1 的剪切带比 HepG2 细胞中剪切带要弱, 说明过表达 lnc-HUR1 能够抑制 TGF- β 引起的 PARP-1 的剪切, 抑制细胞的凋亡。在敲低 lnc-HUR1 的稳定细胞系中 (图 2B), 在没有使用 TGF- β 处理的情况下, HepG2-HUR1-shRNA#1 和 HepG2-HUR1-shRNA#2 中已经出现了微弱的 PARP-1 剪切带, 推测可能是 lnc-HUR1 的敲低引起了细胞本身启动了凋亡程序, 增加了 PARP-1 的剪切; 在 TGF- β 处理的情况下 HepG2-NC、HepG2-HUR1-shRNA#1 和 HepG2-HUR1-shRNA#2 均出现了 PARP-1 的剪切带, 但是敲低 lnc-HUR1 的细胞中 PARP-1 的剪切带比对照细胞要更明显, 说明 lnc-HUR1 能够促进细胞内 PARP-1 的剪切和细胞的凋亡。

2.1.3 Annexin V 和 PI 联合染色显示 Lnc-HUR1 抑制细胞凋亡

为了进一步验证 lnc-HUR1 能够抑制细胞凋亡, 使用 Annexin V 和 PI 联合染色, 再利用流式细胞仪检测 Annexin V 阳性细胞比率。结果显示 (图 3A), 不使用 TGF- β 处理的情况下,

HepG2-3.1 细胞和 HepG2-lnc-HUR1 细胞的凋亡情况没有显著性差异; 当在 TGF- β 处理的条件下, HepG2-lnc-HUR1 细胞的 Annexin V 阳性细胞率显著低于 HepG2-3.1 细胞。另外一组实验在没有使用 TGF- β 处理的情况下 (图 3B), HepG2-NC、HepG2-HUR1-shRNA#1 和 HepG2-HUR1-shRNA#2 Annexin V 的阳性细胞率没有显著性差异; 在 TGF- β 处理的条件下, HepG2-HUR1-shRNA#1 和 HepG2-HUR1-shRNA#2 的 Annexin V 阳性细胞率显著高于对照组 HepG2-NC 的 Annexin V 的阳性率。提示 lnc-HUR1 在细胞内能够通过抑制 caspase3/7 的活性, 进而抑制 caspase3/7 对 PARP-1 的剪切, 从而抑制细胞的凋亡。

2.2 Lnc-HUR1 调控 Bcl-2 家族蛋白的表达

2.2.1 Lnc-HUR1 在体外促进 Bcl-2 的表达并抑制 BAX 的表达

将过表达 lnc-HUR1 的稳定细胞 HepG2-lnc-HUR1 及其对照细胞 HepG-3.1、敲低 lnc-HUR1 的稳定细胞 (HepG2-HUR1-shRNA#1 and HepG2-HUR1-shRNA#2) 及其对照细胞 (HepG2-NC) 收样后, 进行 RT-PCR 检测细胞中

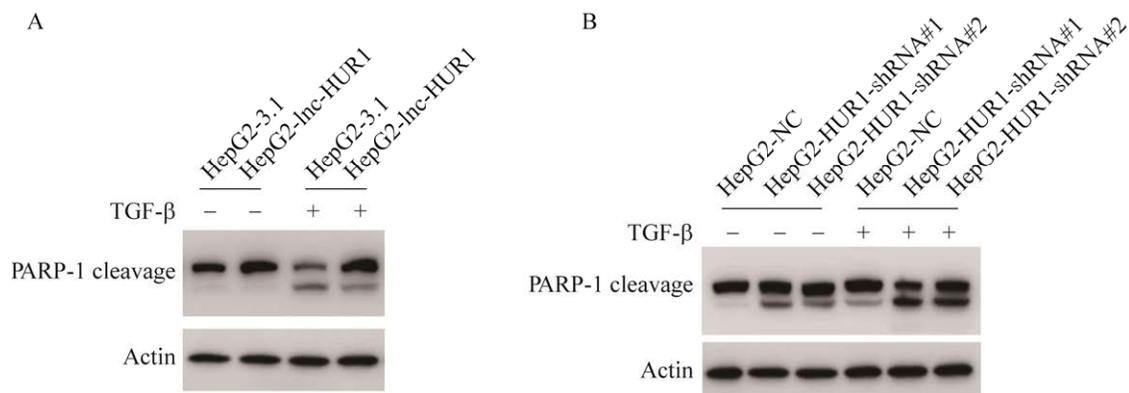


图 2 Lnc-HUR1 抑制 PARP-1 的剪切

Figure 2 Lnc-HUR1 inhibits PARP-1 cleavage in HepG2 cells. HepG2-3.1 and HepG2-lnc-HUR1 cells (A) or HepG2-NC, HepG2-HUR1-shRNA#1 and HepG2-HUR1-shRNA#2 (B) were treated with TGF- β (10 ng/mL) for 6 hours. The cell lysates were harvested and subjected to immunoblotting with PARP-1 antibody, and with actin as an internal control.

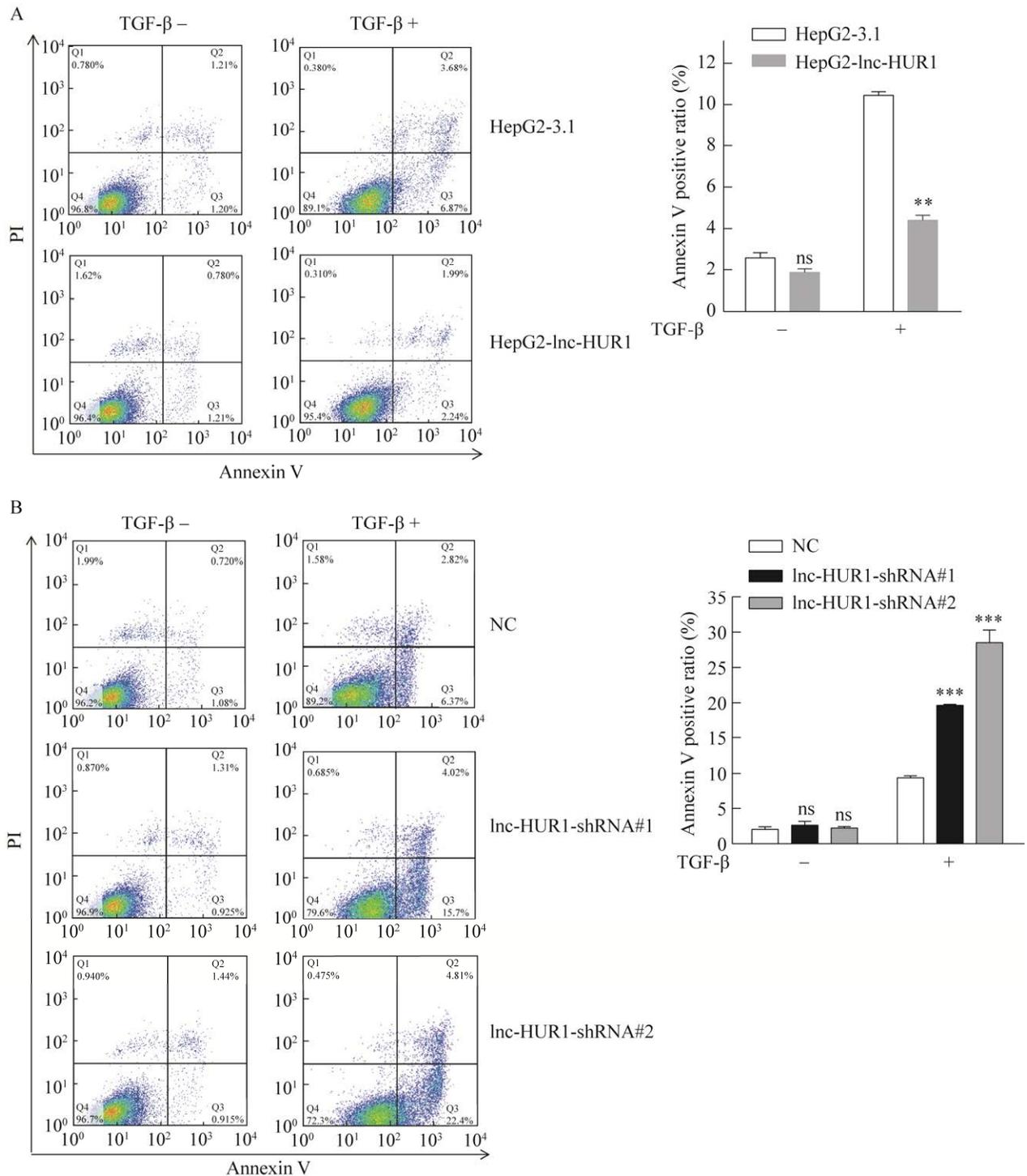


图 3 *lnc-HUR1* 抑制 TGF- β 诱导的细胞凋亡

Figure 3 *lnc-HUR1* inhibits cell apoptosis induced by TGF- β . HepG2-3.1 and HepG2-*lnc-HUR1* cells (A) or HepG2-NC, HepG2-*HUR1*-shRNA#1 and HepG2-*HUR1*-shRNA#2 cells (B) were treated with TGF- β (10 ng/mL) for 6 hours. Then cells were stained with Annexin V and PI, and subjected to flow cytometry (left panels). The Annexin V positive cells were calculated (right panels). ns: no significance.

Bcl-2 及 BAX 的 mRNA 水平和 Western blotting 检测 Bcl-2 及 BAX 的蛋白水平。结果显示 (图 4A), 与对照相比, 过表达 lnc-HUR1 会促进 Bcl-2 的表达, 抑制 BAX 的表达; 相反地 (图 4B), 敲低 lnc-HUR1 会抑制 Bcl-2 的表达, 促进 BAX 的表

达。提示 lnc-HUR1 在细胞水平能够调节 Bcl-2 及 BAX 的表达水平进而影响细胞的凋亡。

2.2.2 Lnc-HUR1 在体内促进 Bcl-2 的表达

为进一步研究 lnc-HUR1 在体内对 Bcl-2 表达的调控作用, 腹腔注射野生型和 lnc-HUR1

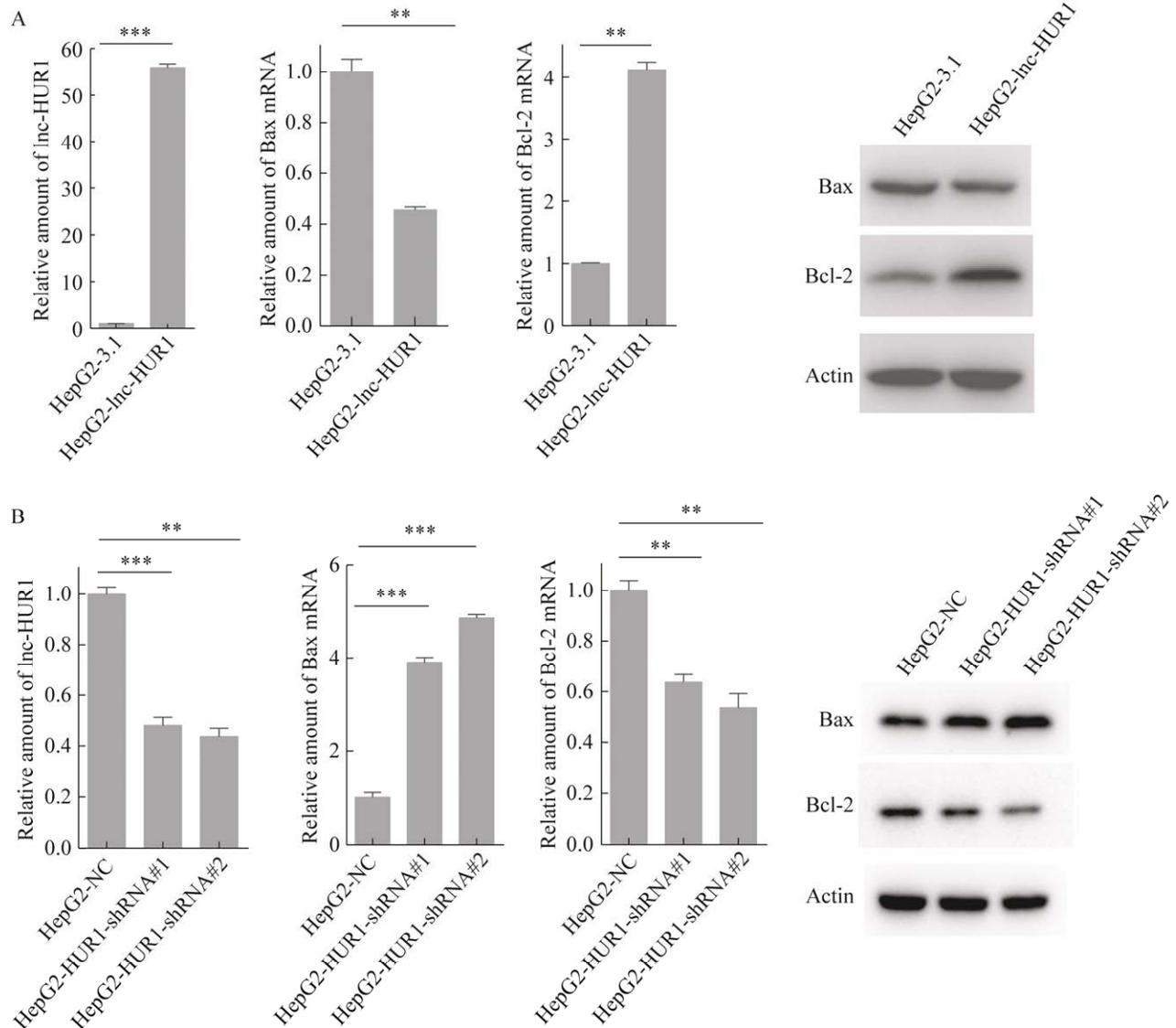


图 4 Lnc-HUR1 促进 Bcl-2 的表达和抑制 BAX 的表达

Figure 4 Lnc-HUR1 promotes the expression of Bcl-2 and inhibits the expression of BAX. HepG2-3.1 and HepG2-lnc-HUR1 cells (A) or HepG2-NC, HepG2-HUR1-shRNA#1 and HepG2-HUR1-shRNA#2 cells (B) were harvest, and the total RNA were extracted and subjected to by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) for the mRNA level of lnc-HUR1, Bax and Bcl-2 (left panels). The total cell lysates were collected for immunoblotting with indicated antibodies (right panels).

肝特异性转基因小鼠 CCL4 与矿物油的混合物 (CCL4 : MO=1 : 1, 用量为 2.4 μ L/g), 24 h 后收小鼠肝组织, 利用 Western blotting 检测 Bcl-2 的蛋白表达。结果显示 (图 5), 与野生型相比, lnc-HUR1 转基因小鼠肝组织表达更高水平的 Bcl-2。提示在体内 lnc-HUR1 促进了 Bcl-2 表达。

2.3 Lnc-HUR1 抑制 p53 对 Bcl-2 和 Bax 的转录调控

为了验证 Lnc-HUR1 是否通过 p53 调控 Bcl-2 和 BAX 的表达, 将质粒 pcDNA3.1 及 pCMV-lnc-HUR1 转染至 HCT116 细胞及敲除 p53 的 HCT116 细胞 (HCT116-p53^{-/-}), 之后进行 RT-PCR 检测细胞 Bcl-2 及 BAX 的 mRNA 表达 (图 6A)。结果显示 p53 参与 lnc-HUR1 对 Bcl-2 和 BAX 表达的调控。为了进一步确定 p53 在 lnc-HUR1 调控 Bcl-2 家族蛋白表达中的作用, 在 p53 存在或者不存在条件下, 在 293T 细胞中转染 BAX 和 Bcl-2 荧光素酶报告基因质粒和海肾荧光素酶基因质粒, 再转染不同剂量的 lnc-HUR1。24 h 后收样, 检测荧光值。结果显示 (图 6B), 单独转染 p53 的条件下, 能够促进 BAX 启动子抑制 Bcl-2 启动子; 在转染 p53 的情况下同时转染 lnc-HUR1, lnc-HUR1 能够抑制

BAX 的启动子, 促进 Bcl-2 的启动子, lnc-HUR1 剂量越高, 对 p53 调控 Bcl-2 和 Bax 转录的抑制效果越好。以上结果说明 lnc-HUR1 通过 p53 调控 Bcl-2 和 BAX 的表达。接下来通过染色质免疫共沉淀 (chromatin immunoprecipitation, ChIP) 探究 lnc-HUR1 影响 p53 作为转录因子对 Bcl-2 和 BAX 的转录调控。分别使用 IgG 和抗 p53 抗体进行免疫共沉淀, 纯化 DNA 后进行实时荧光定量 PCR 检测 BAX 和 Bcl-2 启动子区 DNA 的量。结果显示 (图 6C), lnc-HUR1 能够影响 p53 在 BAX 和 Bcl-2 启动子区的富集, 从而抑制 BAX 的转录, 促进 Bcl-2 的转录。综上所述, lnc-HUR1 能够通过 p53 调节 Bcl-2 和 BAX 的表达, Bcl-2 和 Bax 水平的变化可以影响线粒体外膜的通透性, 从而调控 caspase 级联反应抑制细胞凋亡。

3 讨论

乙型肝炎病毒 HBV 是一种小包膜 DNA 病毒, 属于肝炎病毒科。病毒基因组包含 3.2 kb, 有 4 个开放阅读框: 编码外膜蛋白的 S 基因区、编码核衣壳蛋白的 C 基因区、编码 P 蛋白的 P 基因区及编码 X 蛋白的 X 基因区^[21]。宿主细

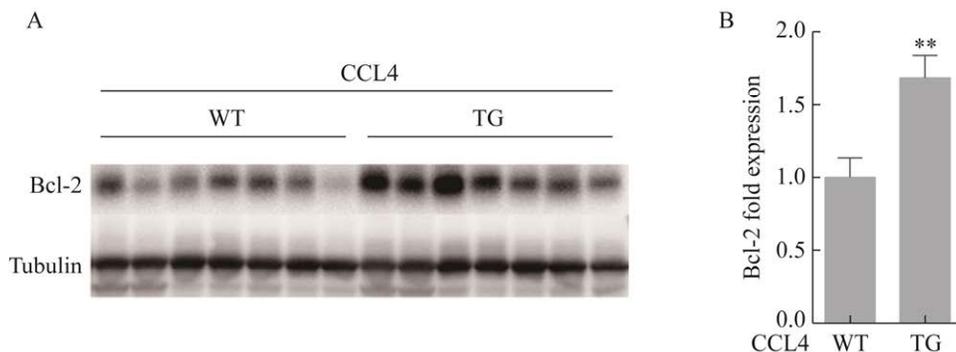


图 5 Lnc-HUR1 能在体内促进 Bcl-2 的表达

Figure 5 Lnc-HUR1 promotes the expression of Bcl-2 *in vivo*. The wild type and lnc-HUR1 transgenic mice were treated with CCL4 (1.2 mL/kg) for 24 hours, then the mice were sacrificed. The lysates of liver tissues were prepared for immunoblotting with Bcl-2 antibody or Tubulin antibody as an internal control (A). The density of Bcl-2 in (A) was quantified (B).

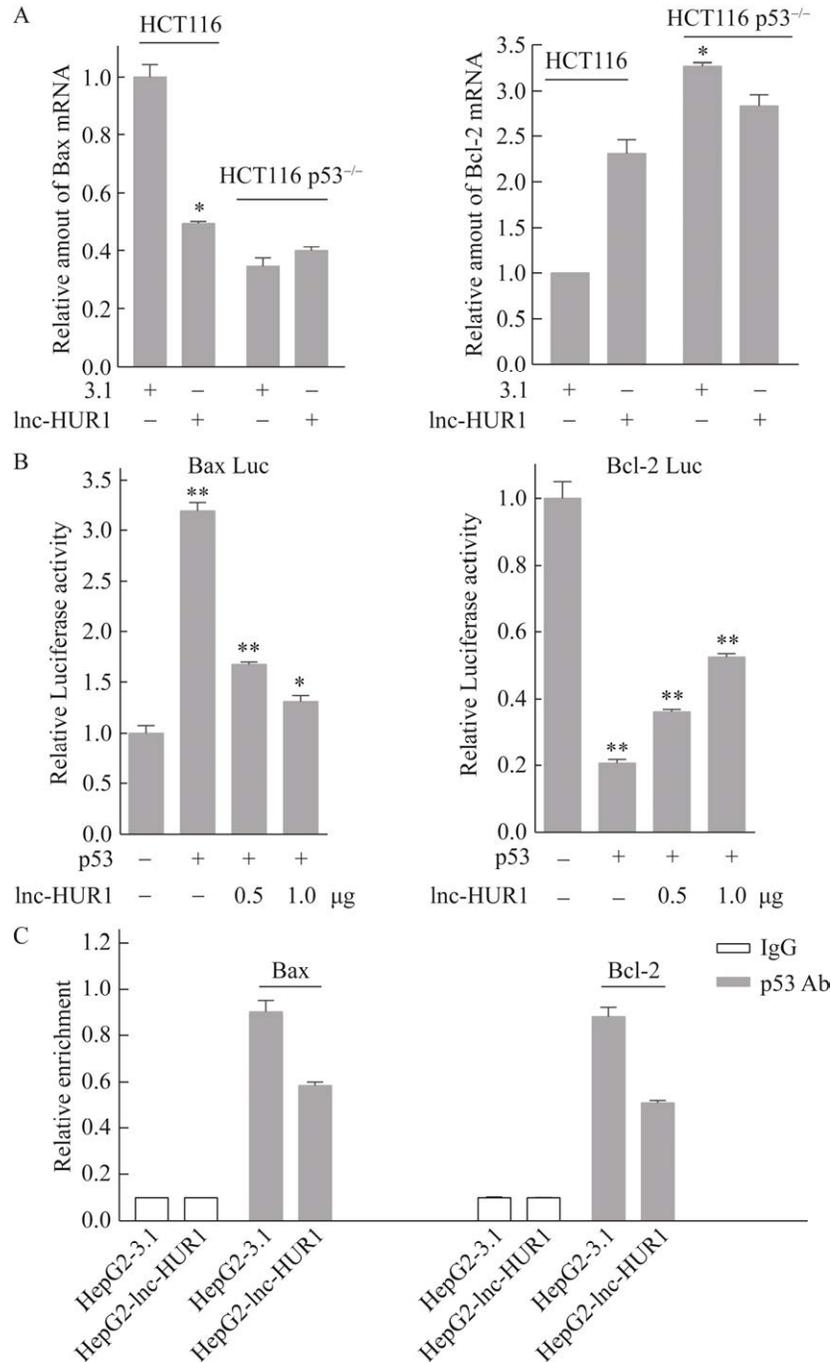


图 6 Lnc-HUR1 对 Bcl-2 和 Bax 的转录调控依赖于 p53

Figure 6 Lnc-HUR1 regulates the transcription of Bcl-2 and Bax dependent upon p53. (A) pCMV-3.1-lnc-HUR1 (lnc-HUR1) and pCMV-3.1 (3.1) were transfected into HCT116 or HCT116 p53^{-/-} cells. The cells were harvest and total RNA were extracted for qRT-PCR. (B) pCMV-3.1-lnc-HUR1 (lnc-HUR1), pCMV-p53 and pGL4-Bax-Luciferase (left) or pGL4-Bcl-2-luciferase (right) were co-transfected into 293T cells for 24 hours. The cell lysates were harvested and subjected to luciferase assay. (C) HepG2-3.1 and HepG2-lnc-HUR1 cells were fixed with formaldehyde, and the chromatin were sonicated and subjected to chromatin immunoprecipitation with p53 antibody or IgG as control. The enrichment of p53 on Bax and Bcl-2 promoter were detected by qRT-PCR.

胞感染乙肝病毒后,细胞内的 lncRNA 的表达谱也会发生改变^[22],这些表达差异的 lncRNA 与 HBV 相关。为了鉴定这些与 HBV 相关的长链非编码 RNA,通过 RNA 深度测序技术 (RNA deep sequencing) 分析比较了 HepG2 和 HBV 转基因细胞系 HepG2-4D14 细胞系中 lncRNA 的表达差异,选取了在 HepG2-4D14 细胞中上调表达倍数最高的一条命名为 lnc-HUR1。实验室前期的结果表明,lnc-HUR1 在肝癌患者癌组织中显著上调,能够促进细胞的增殖和肿瘤的形成^[23]。LncRNA 在肿瘤细胞的增殖和凋亡方面发挥重要的调节作用,在报道的大多数能促进肿瘤细胞增殖的 lncRNA 中都能减少细胞的凋亡^[24]。在 lnc-HUR1 抑制肝癌细胞凋亡的研究中,本研究以课题组先前的研究结果作为基础展开工作,进一步阐释了 lnc-HUR1 作为促癌基因抑制细胞凋亡的分子机制,更加完全展现 lnc-HUR1 的功能。本研究证明,lnc-HUR1 能够通过抑制 p53 活性,进而促进 Bcl-2 的表达抑制 BAX 的表达,从而抑制细胞的凋亡。其中,lnc-HUR1 对 p53 活性的抑制作用还需要进一步的探究。此外,lnc-HUR1 作为促癌基因对肝癌细胞的转移和浸润是否有促进作用也需要进一步的探究。在 CCL4 诱导急性肝损伤模型中,lnc-HUR1 转基因小鼠的肝组织表达更高水平的 Bcl-2,初步显示了 lnc-HUR1 在体内抑制细胞凋亡的作用,是否引起 caspase 活性的改变还需要进一步的验证。由于小鼠之间存在个体差异,lnc-HUR1 转基因小鼠肝组织中 Bcl-2 的表达水平高低不均,在转基因小鼠肝组织中在 CCL4 处理条件下能否更好抑制 BAX 的蛋白水平还需要进一步验证。另外,lnc-HUR1 能显著上调 Bcl-2 的表达水平,无论是在细胞水平还是在小鼠水平,Bcl-2 的转录也受到 NF- κ B 的影响^[25-26],且 NF- κ B 与 p53 之间存在相互负调

控的关系^[27],本研究探索 lnc-HUR1 能否通过直接或间接作用影响其他信号通路如 NF- κ B 信号通路抑制细胞的凋亡。

4 结论

本研究证明过表达 lnc-HUR1 的细胞系能够促进 Bcl-2 表达抑制 BAX 的表达,通过抑制内源性凋亡途径,抑制 caspase3/7 的激活,从而抑制了 PARP-1 的剪切,抑制细胞凋亡的发生;相反,在敲低 lnc-HUR1 的稳定细胞系中能够抑制 Bcl-2 的表达促进 BAX 的表达,促进了 caspase 级联和 caspase3/7 激活,从而促进了 PARP-1 的剪切,促进细胞的凋亡。为了探究 lnc-HUR1 抑制凋亡的具体机制,根据课题组已发表的研究结果作为基础,本研究在敲除 p53 的 HCT116 中转染 cCMV-lnc-HUR1,结果显示在敲除 p53 的 HCT116 细胞中过表达 lnc-HUR1、Bcl-2 及 BAX 其 mRNA 水平与对照组没有差别,说明 lnc-HUR1 通过 p53 调节 Bcl-2 和 BAX 的表达;双荧光素酶活性检测实验证明 lnc-HUR1 能够抑制 p53 对 Bcl-2 和 BAX 的转录调节;染色质免疫共沉淀实验证明 lnc-HUR1 能够抑制 p53 在 Bcl-2 和 BAX 启动子区的富集,从而调节 Bcl-2 和 BAX 的表达。综上所述,lnc-HUR1 能够通过抑制 p53 的活性,促进 Bcl-2 的表达抑制 BAX 的表达,从而抑制细胞的凋亡。

REFERENCES

- [1] Yabroff KR, Mariotto A, Tangka F, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, part 2: patient economic burden associated with cancer care. *J Natl Cancer Inst*, 2021; 2021Oct26:djab192.
- [2] 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. *CA A Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [3] Kulik L, El-Serag HB. Epidemiology and management

- of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2019, 156(2): 477-491.e1.
- [4] Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American Association for the study of liver diseases. *Hepatology*, 2018, 67(1): 328-357.
- [5] Chimed T, Sandagdorj T, Znaor A, et al. Cancer incidence and cancer control in Mongolia: results from the National Cancer Registry 2008-12. *Int J Cancer*, 2017, 140(2): 302-309.
- [6] Vaccarella S, Franceschi S, Bray F, et al. Worldwide thyroid-cancer epidemic? The increasing impact of overdiagnosis. *N Engl J Med*, 2016, 375(7): 614-617.
- [7] Iñarrairaegui M, Melero I, Sangro B. Immunotherapy of hepatocellular carcinoma: facts and hopes. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(7): 1518-1524.
- [8] Datta S, Chatterjee S, Veer V, et al. Molecular biology of the hepatitis B virus for clinicians. *J Clin Exp Hepatol*, 2012, 2(4): 353-365.
- [9] Katherine AM, Jessica LP, Hashem BE. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2021, 73Suppl 1 (suppl 1): 4-13.
- [10] Hoshida S, Nishida M, Yamashita N, et al. Heme oxygenase-1 expression and its relation to oxidative stress during primary culture of cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 1996, 28(9): 1845-1855.
- [11] Yang SZ, Liu YF, Feng XB, et al. HB_x acts as an oncogene and promotes the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma both *in vivo* and *vitro*. *Dig Liver Dis*, 2021, 53(3): 360-366.
- [12] Wang Q, Cheng ST, Chen J. HB_x mediated increase of SIRT1 contributes to HBV-related hepatocellular carcinoma tumorigenesis. *Int J Med Sci*, 2020, 17(12): 1783-1794.
- [13] Ochi M, Otsuka M, Maruyama R, et al. HB_x increases EGFR expression by inhibiting miR129-5p function. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 529(2): 198-203.
- [14] Salerno D, Chiodo L, Alfano V, et al. Hepatitis B protein HB_x binds the DLEU2 lncRNA to sustain cccDNA and host cancer-related gene transcription. *Gut*, 2020, 69(11): 2016-2024.
- [15] 杜彬, 周梦瑶, 毋楠, 等. HB_x 通过抑制 microRNA-145a-5p 促进小鼠肝癌发生. *第三军医大学学报*, 2021, 43(18): 1751-1761.
- Du B, Zhou MY, Wu N, et al. HB_x promotes liver tumor in mice by inhibiting microRNA-145a-5p. *J Third Mil Med Univ*, 2021, 43(18): 1751-1761 (in Chinese).
- [16] 郑小川, 皮思蝶, 胡源. HB_x 介导 SAMHD1 降解并通过 Akt/p27 通路促进肝癌细胞增殖的机制研究. *第三军医大学学报*, 2021, 43(10): 900-907.
- Zheng XC, Pi SD, Hu Y. Mechanism of hepatitis B virus X mediating SAMHD1 degradation to promote proliferation of hepatoma cells through Akt/p27 pathway. *J Third Mil Med Univ*, 2021, 43(10): 900-907 (in Chinese).
- [17] Xu WQ, Yu J, Wong VWS. Mechanism and prediction of HCC development in HBV infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2017, 31(3): 291-298.
- [18] Wang YF, Yang L, Chen TX, et al. A novel lncRNA MCM3AP-AS1 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by targeting miR-194-5p/FOXA1 axis. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 28.
- [19] Li SJ, Sui MH, Sun ZX, et al. LncRNA 00152 promotes the development of hepatocellular carcinoma by activating JAK2/STAT3 pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(3): 1038-1046.
- [20] Sheng JQ, Wang MR, Fang D, et al. LncRNA NBR2 inhibits tumorigenesis by regulating autophagy in hepatocellular carcinoma. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133: 111023.
- [21] Seeger C, Mason WS. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology*, 2015, 479/480: 672-686.
- [22] Ouyang J, Zhu XM, Chen YH, et al. NRAV, a long noncoding RNA, modulates antiviral responses through suppression of interferon-stimulated gene transcription. *Cell Host Microbe*, 2014, 16(5): 616-626.
- [23] Liu NN, Liu Q, Yang XH, et al. Hepatitis B virus-upregulated LNC-HUR1 promotes cell proliferation and tumorigenesis by blocking p53 activity. *Hepatology*, 2018, 68(6): 2130-2144.
- [24] Merdrignac A, Papoutsoglou P, Coulouarn C. Long noncoding RNAs in cholangiocarcinoma. *Hepatology*, 2021, 73(3): 1213-1226.
- [25] Heckman CA, Mehew JW, Boxer LM. NF-kappaB activates Bcl-2 expression in t(14;18) lymphoma cells. *Oncogene*, 2002, 21(24): 3898-3908.
- [26] Catz SD, Johnson JL. Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer. *Oncogene*, 2001, 20(50): 7342-7351.
- [27] Gudkov AV, Gurova KV, Komarova EA. Inflammation and p53: a tale of two stresses. *Genes Cancer*, 2011, 2(4): 503-516.

(本文责编 陈宏宇)