



· 论 著 ·

长链非编码RNA LINC00601调控肝细胞癌奥沙利铂耐药的分子机制研究

胡可舒^{1, 2}, 刘文凤^{1, 2}, 张 锋^{1, 2}, 权 冰^{1, 2}, 殷 欣^{1, 2}

1. 复旦大学附属中山医院肝肿瘤内科, 上海 200032;
2. 复旦大学附属中山医院肝癌研究所, 上海 200032

[摘要] 背景与目的: 肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 仍是当今中国乃至全世界的高发肿瘤之一, 大部分HCC患者确诊时处于中晚期, 对化疗耐药或介入治疗抵抗是影响此类患者生存预后的重要因素, 但其中涉及的具体分子机制尚未完全明确。我们的前期研究发现长链非编码RNA LINC00601在奥沙利铂耐药的HCC细胞中高表达。本研究旨在探索LINC00601调控HCC细胞对奥沙利铂化疗耐药的作用及其机制, 为临床筛选适宜接受奥沙利铂化疗的HCC患者并为中晚期HCC患者的治疗提供新的靶点和理论依据。**方法:** 利用体外长期低剂量奥沙利铂刺激人HCC细胞株MHCC-97H和Hep-3B, 建立奥沙利铂耐药细胞株97H-OXR和3B-OXR。采用实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR) 检测奥沙利铂耐药细胞株中LINC00601的表达情况。进一步采用细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 实验检测LINC00601基因沉默或过表达对HCC细胞奥沙利铂化疗耐药的影响。通过流式细胞术和蛋白质印迹法 (Western blot) 检测细胞凋亡情况的变化。最后采用Western blot和免疫荧光染色检测生长阻滞和DNA损伤诱导蛋白45 α (growth arrest and DNA damage-inducible protein 45 α , GADD45A) 的核转位, 并通过RNA pull-down实验和RNA免疫共沉淀 (RNA immunoprecipitation, RIP) 实验验证LINC00601和GADD45A的结合。**结果:** 与对照组细胞相比, 奥沙利铂耐药细胞株中LINC00601的表达水平显著升高。奥沙利铂耐药细胞及过表达LINC00601的MHCC-97H细胞对奥沙利铂体外刺激的敏感性显著下降; 相反, 下调耐药细胞中LINC00601的表达后, 其对于奥沙利铂体外刺激的敏感性明显提高。同时, 在奥沙利铂的处理下, 高表达LINC00601的HCC细胞株的凋亡水平被明显抑制, 且与不同细胞株对奥沙利铂体外处理的敏感性水平相一致。此外, LINC00601的过表达使GADD45A的核转位水平降低, 细胞核中GADD45A的表达下降。进一步研究发现LINC00601与GADD45A可以相互结合。**结论:** LINC00601可能通过调控GADD45A的核转位, 进而抑制奥沙利铂处理后的细胞凋亡, 导致HCC奥沙利铂耐药。

[关键词] 肝细胞癌; 长链非编码RNA; 奥沙利铂; 化疗耐药

中图分类号: R735.7 文献标志码: A DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2023.01.003

Mechanism of LINC00601 in regulating sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to oxaliplatin chemotherapy HU Keshu^{1, 2}, LIU Wenfeng^{1, 2}, ZHANG Feng^{1, 2}, QUAN Bing^{1, 2}, YIN Xin^{1, 2} (1. Department of Liver Oncology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. Liver Cancer Institute, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: YIN Xin, E-mail: yin.xin@zs-hospital.sh.cn.

[Abstract] **Background and purpose:** Hepatocellular carcinoma (HCC) is still one of the most prevalent malignancies in China and throughout the world, while most of these patients are in intermediate or advanced stage when diagnosed. The resistance of advanced HCC to chemotherapy or interventional therapy is one of the crucial factors significantly limiting the survival and prognosis of patients. However, the molecular mechanisms involved have not been fully clarified. We previously found that the long non-coding RNA LINC00601 was highly expressed in oxaliplatin resistant HCC cells. This study aimed to explore the role and

基金项目: 国家自然科学基金 (81672331)。

第一作者: 胡可舒 (ORCID: 0000-0003-4576-3688), 硕士。

通信作者: 殷欣 (ORCID: 0000-0002-9892-7845), 博士, 副主任医师, E-mail: yin.xin@zs-hospital.sh.cn。

specific mechanism of LINC00601 in regulating the sensitivity of HCC cells to oxaliplatin chemotherapy, to provide a novel target to identify proper candidates for oxaliplatin chemotherapy, and the theoretical basis for the treatment of patients with advanced HCC. **Methods:** Human HCC cell line MHCC-97H and Hep-3B were induced to establish oxaliplatin resistant cell lines 97H-OXR and 3B-OXR by long-term low-dose oxaliplatin treatment *in vitro*. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RTFQ-PCR) was used to detect the expression of LINC00601 in cell lines. Cell counting kit-8 (CCK-8) assay was performed to detect the effect of LINC00601 gene silencing or overexpression on the sensitivity of HCC cells to oxaliplatin treatment. Flow cytometry and Western blot experiments were conducted to detect the alteration of cell apoptosis. Finally, Western blot and immunofluorescence staining were applied to explore the nuclear translocation of growth arrest and DNA damage-inducible protein 45 α (GADD45A), and RNA pull-down together with RNA immunoprecipitation (RIP) experiments were carried out to validate the combination of LINC00601 and GADD45A. **Results:** Compared with the control cells, LINC00601 expression level was significantly increased in oxaliplatin resistant cells. Both induced-oxaliplatin-resistant cells and LINC00601-overexpressed MHCC-97H cells were observed to be less sensitive to oxaliplatin administration. On the contrary, the down-regulation of LINC00601 expression in oxaliplatin resistant cells significantly increased the sensitivity to oxaliplatin treatment. Meanwhile, upregulated expression of LINC00601 inhibited the apoptosis level of HCC cell lines after oxaliplatin treatment, which was consistent with the sensitivity levels of different cell lines to oxaliplatin as above. In addition, the overexpression of LINC00601 reduced the nuclear translocation of GADD45A and the expression of GADD45A in the nucleus. Furthermore, the combination of LINC00601 and GADD45A was observed. **Conclusion:** LINC00601 might regulate the apoptotic progress of cells after oxaliplatin chemotherapy by interfering with the nuclear translocation of GADD45A, which eventually lead to the resistance to oxaliplatin.

[**Key words**] Hepatocellular carcinoma; Long non-coding RNA; Oxaliplatin; Chemotherapy resistance

中国是当今世界上肝癌发病人数最多的国家, 其中绝大多数的病理学类型为肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) [1]。本课题组前期的回顾性临床研究 [2] 发现, 近半数中晚期HCC患者在接受反复的肝动脉化疗栓塞术 (transcatheter arterial chemoembolization, TACE) 治疗后, 表现为化疗耐药和介入治疗抵抗, 严重影响此类患者的预后, 但其中的具体机制仍不清楚。奥沙利铂是目前HCC患者使用较广泛的化疗药物之一 [3], 本研究旨在探索HCC发生奥沙利铂耐药的分子机制, 为HCC的临床治疗决策提供新的理论依据和治疗靶点。

长链非编码RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是长度不少于200个核苷酸且不具有编码蛋白质功能的一类基因转录RNA产物 [4]。近年来, lncRNA在包括HCC在内的多种肿瘤的发生、发展过程中的作用被逐渐揭示。本课题组于2017年在奥沙利铂耐药HCC细胞系中鉴定到了表达显著上调的LINC00601基因 [5]。后期多项研究发现, LINC00601在食管癌 [6] 和高恶性程度的胶质瘤 [7] 中表达上调, 且与肿瘤患者预后不良相关。2020年, Wang等 [8] 研究发现, 相较于

癌旁组织, LINC00601在HCC组织中表达显著上调, 并且LINC00601通过激活丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号转导通路促进HCC的发展。尽管LINC00601在HCC奥沙利铂耐药细胞中高表达, 但其诱导奥沙利铂耐药的机制仍不明确。

奥沙利铂属于铂类抗肿瘤药物, 在进入细胞后引起DNA交联形成和DNA损伤, 干扰细胞的DNA、RNA及蛋白质合成, 最终导致细胞死亡 [9]。生长阻滞和DNA损伤诱导蛋白45 (growth arrest and DNA damage-inducible protein 45, GADD45) 基因家族在DNA修复、细胞周期调控、基因毒性应激反应等多种生物学过程中发挥重要的调节作用 [10]。GADD45家族中的 α 蛋白GADD45A定位在细胞核中, 既往研究 [11] 表明, 在非小细胞肺癌中, GADD45A的表达降低会减少肿瘤细胞的凋亡, 从而促进肿瘤细胞对顺铂的耐药, 由此推测GADD45A可能也参与调控HCC对奥沙利铂的化疗耐药。因此, 本研究将进一步探索LINC00601的编码基因及GADD45A基因对于HCC奥沙利铂化疗耐药的影响及其分子机制。

1 材料和方法

1.1 细胞、试剂及仪器

人HCC细胞株MHCC-97H (97H) 细胞由复旦大学附属中山医院肝癌研究所建立和储存, 人HCC细胞株Hep-3B (3B) 细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。97H细胞培养所需的DMEM培养基和3B细胞培养所需的MEM培养基均购自浙江吉诺赛百尔生物科技有限公司, 胎牛血清购自上海博升生物科技有限公司, 奥沙利铂购自江苏恒瑞医药股份有限公司, 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 购自上海碧云天生物技术有限公司, 实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR) 试剂盒购自苏州英泽生物医药科技有限公司, PCR相关引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, LINC00601过表达慢病毒、靶向LINC00601的小干扰RNA及Cy3荧光标记的探针购自吉满生物科技 (上海) 有限公司, 转染试剂Lipofectamine™3000购自美国Thermo Fisher Scientific公司, Annexin V-异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) /碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 凋亡染色试剂盒购自美国BD Bioscience公司, 兔抗人Cleaved-caspase-3抗体 (Cat. ab32042)、兔抗人GADD45A抗体 (Cat. ab180768)、羊抗兔二抗 (Cat. ab205718)、羊抗兔AF555荧光二抗 (Cat. ab150078) 均购自英国Abcam公司, 鼠抗人 β -actin抗体 (Cat. AA128)、鼠抗人Histone3抗体 (Cat. AF0009)、细胞核蛋白与细胞质蛋白抽提试剂盒、4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 试剂均购自上海碧云天生物技术有限公司, 羊抗鼠二抗 (Cat. ARG65350) 购自中国台湾省Arigo公司。RNA pull-down实验及RNA免疫共沉淀 (RNA immunoprecipitation, RIP) 实验试剂盒均购自广西艾西龙生物科技有限责任公司。

PCR仪及反转录仪、酶标仪均购自美国

Thermo Fisher Scientific公司, 荧光显微镜购自日本Olympus公司, 流式细胞仪购自美国BD Bioscience公司, 化学发光成像仪购自上海天能科技有限公司。

1.2 细胞培养

97H细胞系使用添加10%胎牛血清、1%青霉素/链霉素/两性霉素B的DMEM培养基, 3B细胞系使用添加10%胎牛血清、1%青霉素/链霉素/两性霉素B的MEM培养基, 均在37 °C、CO₂体积分数为5%的条件下培养, 细胞密度达到90%以上后1:2至1:3传代。

1.3 奥沙利铂耐药细胞株的建立

向HCC细胞的培养体系中添加终浓度为1 μ mol/L的奥沙利铂进行同上所述的细胞培养, 持续培养、传代2个月后检测细胞对奥沙利铂的半数抑制浓度 (half inhibition concentration, IC₅₀) 较普通培养的HCC细胞明显升高, 提示成功诱导建立奥沙利铂继发耐药细胞株97H-OXR和3B-OXR。

1.4 CCK-8实验

将细胞以5 000个/孔的密度接种到96孔板中, 在37 °C、CO₂体积分数为5%的培养箱中放置过夜待其贴壁, 第2天向每孔中加入奥沙利铂溶液使孔中奥沙利铂终浓度分别为0、1、2、3、5、10、15、20、30和40 μ mol/L, 置于培养箱中培养48 h后, 将上清液替换为1:10配置的CCK-8试剂: 完全培养基混合溶液110 μ L, 在培养箱中放置2 h后用酶标仪检测450 nm波长处的吸光度 (*D*), 绘制IC₅₀曲线。实验重复3次。

1.5 RTFQ-PCR实验

按照RNA提取试剂盒、反转录试剂盒及PCR试剂盒中的说明提取细胞总RNA、反转录cDNA并进行RTFQ-PCR检测。PCR条件为: 热启动酶活化95 °C 5 min; PCR扩增95 °C 10 s, 60 °C 30 s共40个循环; 溶解曲线检测95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 30 s, 60 °C 15 s。 β -actin上游引物序列为5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3', 下游引物序列为5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'; LINC00601上游引物序列为5'-AAACCTTAATTGCCAATGTGA-3', 下游引物序列为5'-GCACCTCTTTTGTAAGGAC-3'。实验重复3次。

1.6 细胞转染

将细胞以 4×10^5 个/孔的密度接种于6孔板中, 当细胞生长至30%~40%密度时开始转染。吸去孔中培养基, 无菌 $1 \times$ 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate-buffered saline, PBS) 洗涤2次, 向每孔培养基中加入聚凝胺 $1 \mu\text{L}$ 以增加病毒转染效率。加入过表达LINC00601基因的慢病毒悬液使每孔中病毒的感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为10, 混匀后将板置入培养箱中转染48 h。48 h后更换新鲜培养液, 在培养液中加入 $10 \mu\text{mol/L}$ 终浓度嘌呤霉素, 混匀后放入培养箱48 h筛选过表达LINC00601的稳定株97H-LNC和3B-LNC。小干扰RNA的转染准备同上, 按6孔板每孔2 mL体系分两Eppendorf试管配制转染体系如下: Opti-MEM培养液 $125 \mu\text{L}$ +LipofectamineTM3000 $7.5 \mu\text{L}$, Opti-MEM培养液 $125 \mu\text{L}$ +LINC00601 siRNA ($20 \mu\text{mol/L}$) $10 \mu\text{L}$, 两管混匀后室温静置15~30 min后加入孔中, 摇匀后放入培养箱中转染48 h。

1.7 流式细胞术

使用无乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 的胰酶溶液消化细胞, $1\ 000 \text{ r/min}$ 离心5 min收集细胞。弃上清液后使用预冷的PBS洗涤细胞, 按试剂盒说明使用Annexin V-FITC和PI对细胞进行染色, 室温避光温育15 min, 染色结束后上机检测。实验重复3次。

1.8 蛋白质印迹法 (Western blot)

使用RIPA裂解液提取细胞总蛋白或按细胞核蛋白和细胞质蛋白抽提试剂盒说明分别抽提细胞核蛋白和细胞质蛋白, 使用二辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量试剂盒进行蛋白浓度定量。按照说明书配制10%的分离胶和浓缩胶进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 80 V 电泳1 h、 120 V 至电泳结束, 湿转法 300 mA 转膜1 h, 取出膜后使用快速封闭液室温封闭15 min。将一抗按照说明书比例稀释后与膜 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 温育过夜, 第2天用含有吐温-20三乙醇胺缓冲盐溶液 (tris-buffered

saline with Tween-20, TBST) 洗膜3次, 每次10 min; 二抗按照说明书比例稀释后室温温育1 h, TBST洗膜3次, 每次10 min, 然后使用电化学发光 (electrochemical luminescence, ECL) 试剂盒及化学发光成像仪成像。实验重复3次。

1.9 细胞免疫荧光

细胞以 5×10^4 个/孔的密度接种于12孔板中, 待细胞贴壁后使用4%多聚甲醛溶液固定并用破膜液破膜, 使用稀释后的一抗或Cy3荧光标记的LINC00601探针 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 温育过夜, 第2天用含吐温-20磷酸缓冲盐溶液 (phosphate-buffered saline with Tween-20, PBST) 洗3次, 每次5 min, 如使用一抗则使用AF555荧光标记的对应二抗室温避光温育1 h后再用PBST洗3次, 每次5 min。每孔加入 $200 \mu\text{L}$ DAPI染色液室温避光染色10 min, PBST洗3次后加入 $200 \mu\text{L}$ PBS, 在荧光显微镜下观察成像。实验重复3次。

1.10 RNA pull-down实验

取 $30 \mu\text{L}$ 生物素标记的RNA探针及空白对照探针置于 $90 \text{ }^\circ\text{C}$ 中水浴2 min, 后转移冰浴2 min。加入 $50 \mu\text{L}$ 预冷的RNA结构缓冲液和 $20 \mu\text{L}$ 焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate, DEPC) 水, 室温静置20 min。取 $40 \mu\text{L}$ 磁珠, 1 mL TES洗涤后, 在磁珠中加入RNA探针和 $100 \mu\text{L}$ $2 \times$ TES, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 旋转温育30 min, 置于磁力架上去除上清液, 然后加入 $500 \mu\text{L}$ TES洗涤磁珠。制备蛋白样品后, 取 $100 \mu\text{L}$ 作input, 然后在蛋白样品中加入 $10 \mu\text{L}$ DNase, $5 \mu\text{L}$ DNase salt stock, 室温温育1 h。加入 $40 \mu\text{L}$ 琼脂糖微球, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 旋转温育30 min; $4\ 000 \times g$ 离心 $\times 1 \text{ min}$, 取上清液分至两个Eppendorf试管中。分别将磁珠探针与蛋白样品混合, 加入 0.5 mL RIP缓冲液、 $5 \mu\text{L}$ RNase抑制剂、 $5 \mu\text{L}$ EDTA、 $2.5 \mu\text{L}$ 乙二醇双(2-氨基乙醚) 四乙酸 (ethylene glycol bis (2-aminoethyl ether) tetraacetic acid, EGTA) 和 $5 \mu\text{L}$ poly (dI-dC), 室温旋转2 h。去除上清液后按说明书配制洗涤液, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 洗涤4次, 去上清液; 加入 $30 \mu\text{L}$ Urea CHAPS缓冲液及 $0.3 \mu\text{L}$ 二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 温育洗脱2 h后在磁力架上收集上清液。产物用于后续实验。

1.11 RIP实验

消化收集细胞后按说明书配制裂解液1和2, 裂解后在4 ℃下以16 000×g离心10 min, 转移上清液至无酶Eppendorf试管中。按每样品准备28 μL蛋白A/G磁珠, 洗涤磁珠2次。加入初始体积的裂解液3, 将按上述方法制得的裂解液分为IP组、IgG组和Input组, 加入实验抗体或IgG阴性对照抗体和磁珠, 4 ℃垂直混匀4 h后收集磁珠。

配制洗涤液1和2, 4 ℃洗涤5 min, 收集磁珠。加入洗脱液重悬, 55 ℃温育30 min洗脱RNA, 收集上清液。提取RNA并按1.5中的方法进行RNA的反转录及PCR。制取琼脂糖凝胶, 取10 μL PCR产物, 加入2 μL 6×上样染料和5 μL DL500 DNA标记物, 80 V电泳40 min后用凝胶成像系统观察、拍照。

1.12 统计学处理

采用GraphPad Prism软件进行统计、绘图。

样本间的假设检验采用*t*检验, 多样本间的两两比较采用Bonferroni校正, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 奥沙利铂耐药细胞株对奥沙利铂的敏感性显著降低

对所建立的奥沙利铂继发耐药HCC细胞株97H-OXR和3B-OXR进行了CCK-8实验的验证, 结果显示, 经不同浓度的奥沙利铂体外处理48 h后, 奥沙利铂耐药细胞较对照细胞的增殖活性显著提高, 其 IC_{50} 显著高于对照细胞(图1), 提示此法诱导建立的奥沙利铂继发耐药细胞株成功。进一步通过RTFQ-PCR实验也再次证实了97H-OXR和3B-OXR细胞中LINC00601 mRNA的表达水平较97H和3B细胞显著提高(图1)。

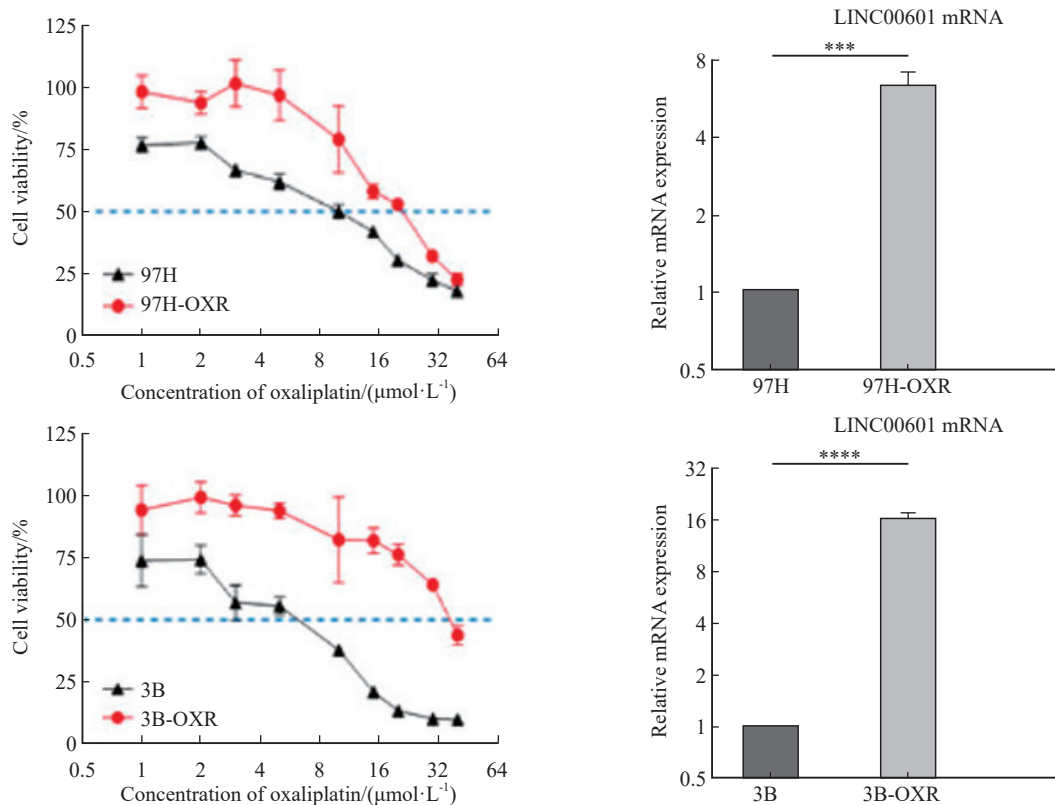


图1 奥沙利铂耐药细胞株97H-OXR和3B-OXR LINC00601的表达变化

Fig. 1 Oxaliplatin resistant cell line 97H-OXR and 3B-OXR, and the change of the LINC00601 expression

The 97H-OXR and 3B-OXR cells were less sensitive to oxaliplatin treatment and their LINC00601 expression level was significantly increased. ***: $P < 0.001$, compared with 97H; ****: $P < 0.0001$, compared with 3B.

2.2 LINC00601表达对HCC细胞奥沙利铂耐药性的影响

为进一步验证LINC00601在HCC细胞中对奥沙利铂敏感性的影响, 我们使用慢病毒转染97H细胞, 构建过表达LINC00601的97H细胞(97H-LNC), 同时利用靶向LINC00601 mRNA的小干扰RNA对97H-OXR中LINC00601的表达水平进行敲低(97H-OXR-siLNC), 其RTFQ-PCR验证的结果见图2A。与此同时, 我们分别

将两组细胞进行了不同浓度奥沙利铂处理后的CCK-8实验, 结果发现, 过表达LINC00601能够显著地提高97H细胞对于奥沙利铂的耐受性(图2B); 然而, 当97H-OXR细胞中LINC00601的表达被下调后, 其细胞的奥沙利铂敏感性显著恢复(图2C)。同时, 我们在3B-OXR细胞中敲减了LINC00601的表达, 也得到了一致结果(图2D、2E)。上述结果提示LINC00601可能对奥沙利铂耐药性的调控具有重要意义。

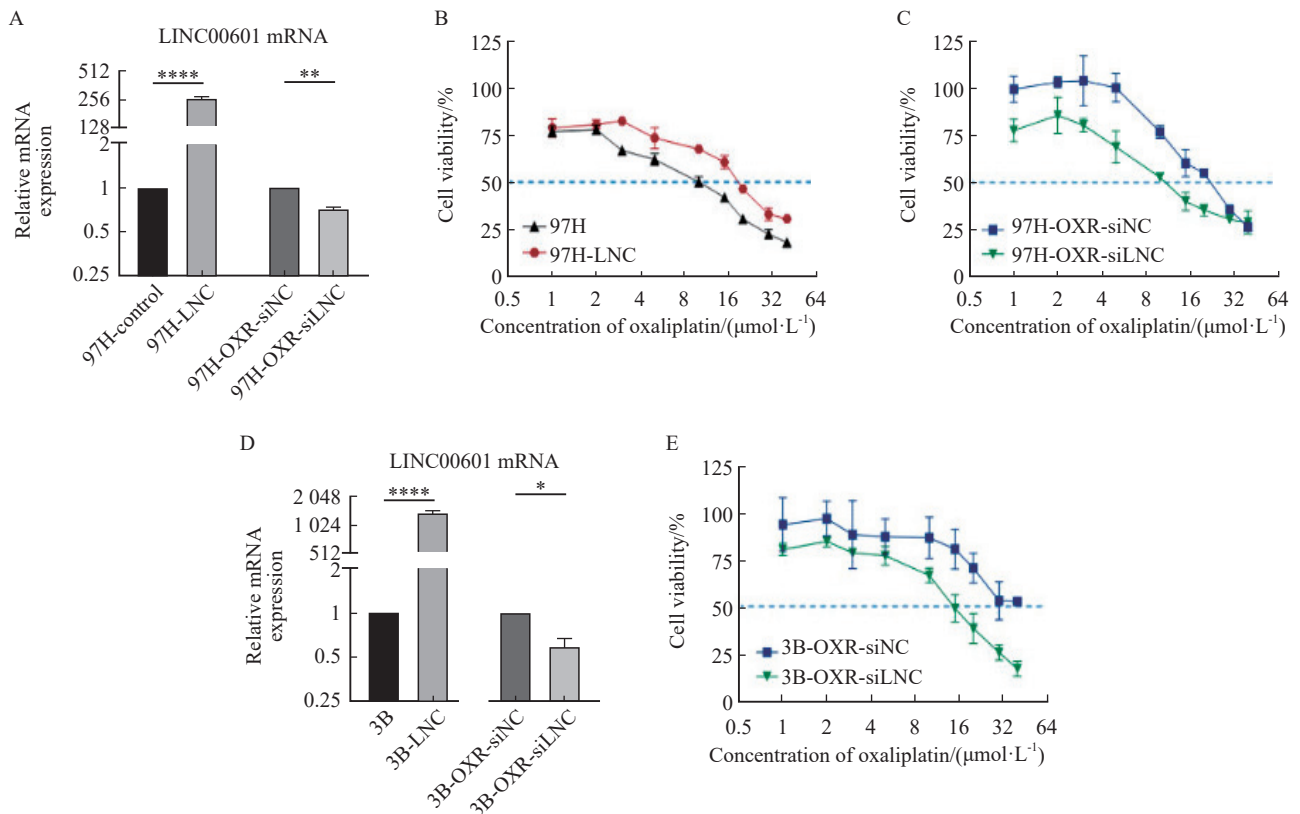


图2 LINC00601表达改变对HCC细胞奥沙利铂耐药性的影响

Fig. 2 The effect of LINC00601 expression on the sensitivity to oxaliplatin of HCC cells

A: The mRNA levels of LINC00601 in 97H-LNC and 97H-OXR-siLNC cells were validated by RTFQ-PCR. B: LINC00601 overexpression led to oxaliplatin resistance in 97H cells. C: LINC00601 knockdown resulted in the restore of sensitivity to oxaliplatin in 97H-OXR cells. D: The mRNA levels of LINC00601 in 3B-LNC and 3B-OXR-siLNC cells were validated by RTFQ-PCR. E: The sensitivity to oxaliplatin in 3B-OXR cells was reserved when LINC00601 was downregulated. *: $P < 0.05$, compared with 3B-OXR-siNC; **: $P < 0.01$, compared with 97H-OXR-siNC; ****: $P < 0.0001$, compared with 97H-control or 3B.

2.3 LINC00601表达改变对HCC细胞奥沙利铂处理后凋亡水平的影响

进一步使用流式细胞术观察奥沙利铂处理后HCC细胞发生凋亡的改变。结果显示, 当使用100 $\mu\text{mol/L}$ 高浓度的奥沙利铂分别处理对照组、耐药组和敲减LINC00601后的耐药组细胞24 h后,

97H、3B、97H-OXR-siLNC和3B-OXR-siLNC细胞发生凋亡的比例显著上升, 而97H-OXR和3B-OXR这两株耐药细胞中的凋亡水平却并无明显变化(图3), 这与以上发现这几株细胞对奥沙利铂的敏感性相一致, 提示LINC00601的表达水平与细胞凋亡水平呈负相关。

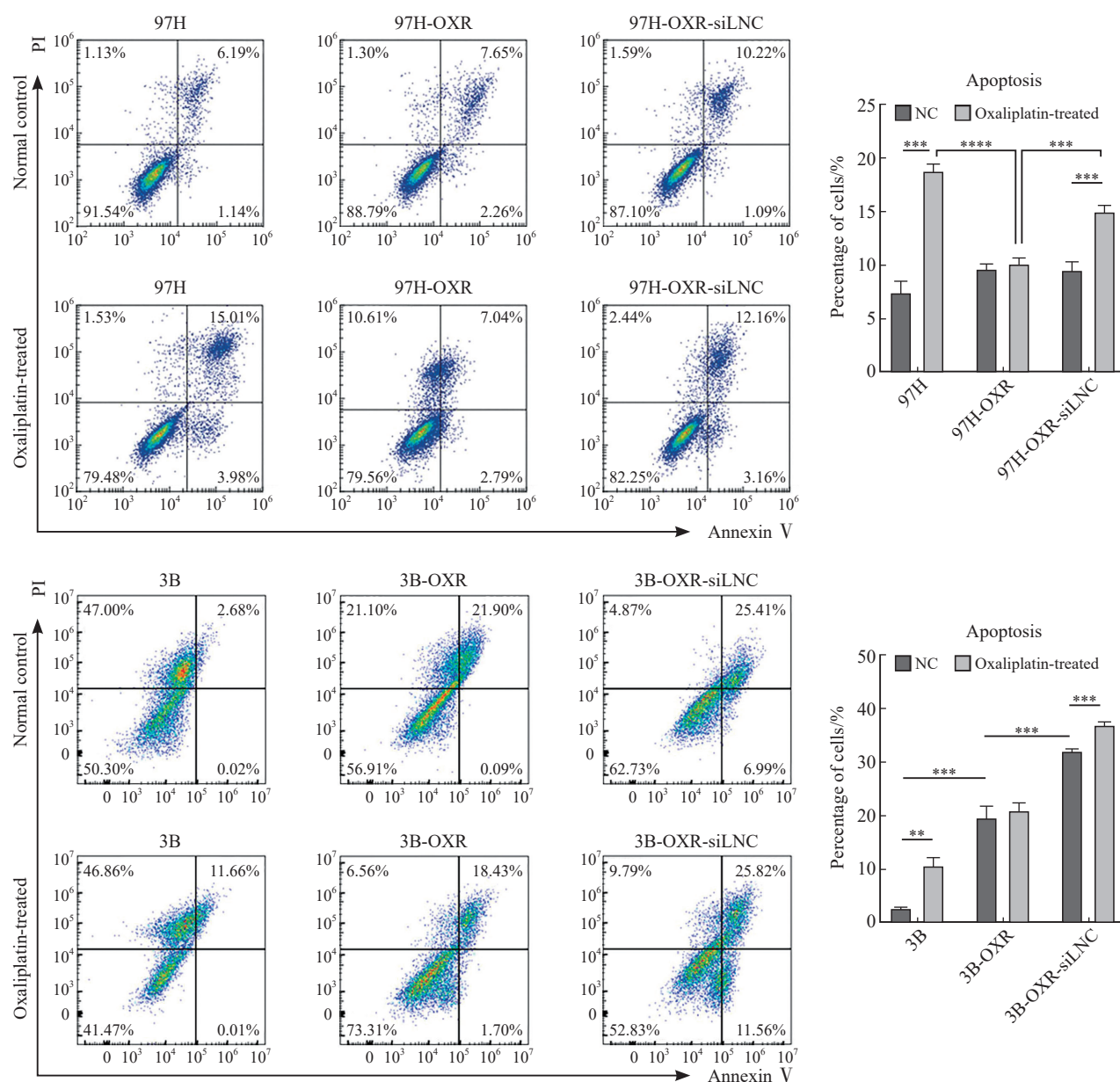


图3 LINC00601对奥沙利铂处理后HCC细胞凋亡水平的影响

Fig. 3 The impact of LINC00601 on the apoptotic level of HCC cells after oxaliplatin treatment

Oxaliplatin treatment induced significant apoptosis in non-oxaliplatin-resistant cells, however it had few influence on the apoptotic level of oxaliplatin-resistant cells. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

2.4 LINC00601表达改变对HCC细胞奥沙利铂处理后caspase 3蛋白活化水平的影响

Caspase 3蛋白活化是发动细胞凋亡的关键步骤之一，因此我们进一步地通过Western blot对caspase 3的活化水平进行探究。结果显示，活化的caspase 3切割体蛋白表达量表现出奥沙利铂剂量依赖的相关性（图4），且各株细胞中caspase 3的活化程度与上述流式细胞术测得的凋亡程度相

一致。综上，LINC00601可能通过调控caspase 3蛋白的活化，从而抑制HCC细胞的凋亡，进而影响其对奥沙利铂的敏感性。

2.5 LINC00601在细胞中的定位及对GADD45A表达的调控

为能够进一步探索LINC00601在细胞中发挥的生物学功能，我们首先通过Cy3红色荧光标记的LINC00601探针对其在细胞中的定位进行观

察。荧光显微镜观察结果显示, LINC00601绝大部分定位于HCC细胞的细胞质中(图5A)。通过RTFQ-PCR实验发现, *GADD45A*基因的mRNA水平在高表达LINC00601的97H-LNC和3B-LNC细胞中均显著下降(图5B、5D); 然而Western blot实验结果却显示, *GADD45A*的表达量却与mRNA

水平并不一致(图5C、5E), 提示可能还有其他因素参与调控*GADD45A*相关信号转导通路。

2.6 LINC00601对*GADD45A*核转位的影响

考虑到*GADD45A*是一种主要定位于细胞核中的蛋白, 而我们发现LINC00601主要位于细胞质中, 我们推测LINC00601可能通过

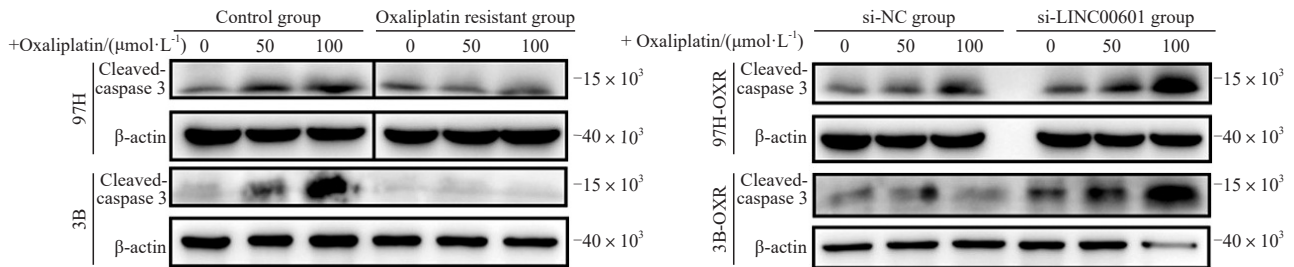


图4 LINC00601对奥沙利铂处理后caspase 3蛋白激活的影响

Fig. 4 The impact of LINC00601 on the activation of caspase 3 protein

HCC cells demonstrated upregulated caspase 3 activation level in an oxaliplatin dose-dependent manner. Control cells and OXR-siLNC cells showed significant caspase 3 activation after oxaliplatin treatment, while oxaliplatin-resistant cells had moderate changes of caspase 3 cleavage.

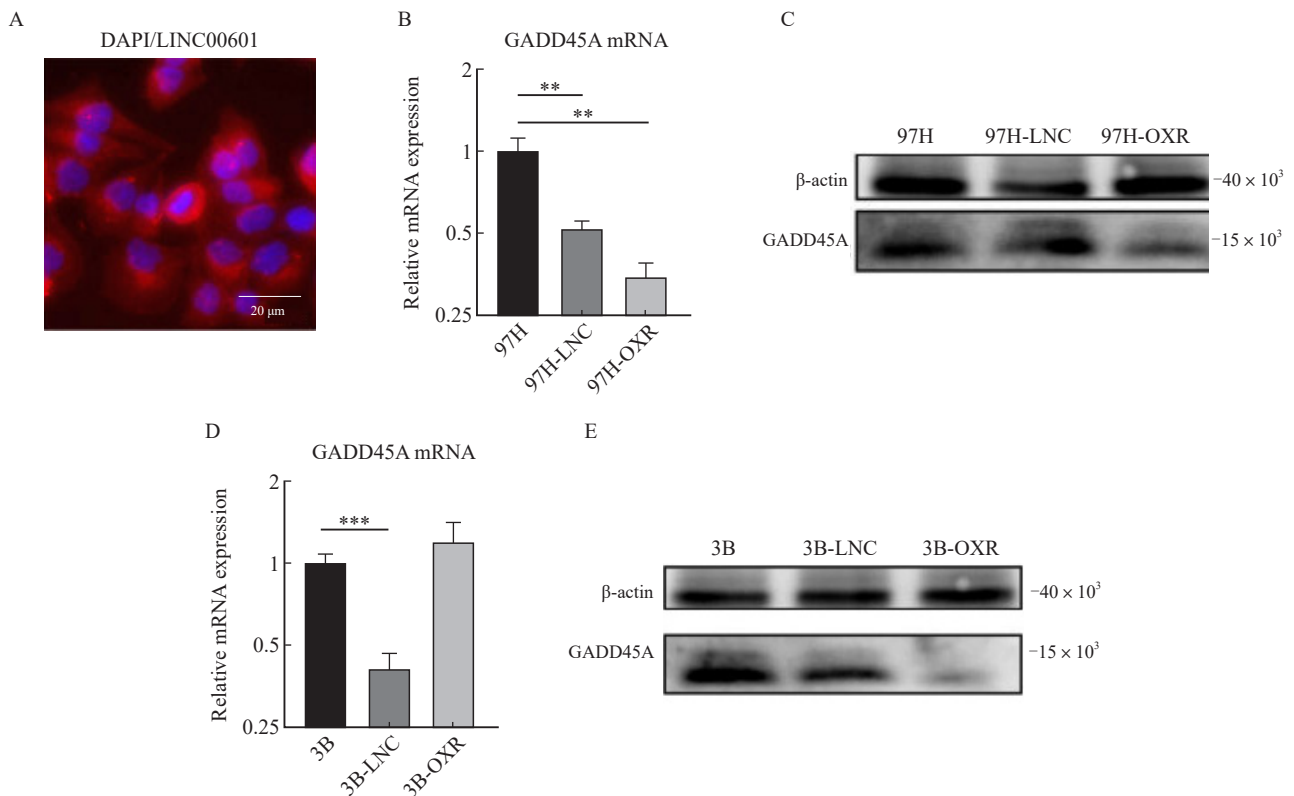


图5 LINC00601在HCC细胞中的定位及对*GADD45A*基因表达的影响

Fig. 5 The location of LINC00601 in the HCC cells and its impacts on the expression of *GADD45A* gene

A: LINC00601 was found mainly located in the cytoplasm of HCC cells; B: RTFQ-PCR demonstrated that *GADD45A* mRNA level was downregulated in 97H-LNC cells; C: *GADD45A* level in different 97H cell lines; D: *GADD45A* mRNA level was illustrated by RTFQ-PCR in 3B cell lines; E: Western blot analysis was established to show the *GADD45A* expression level in different 3B cell lines. **: $P < 0.01$, compared with 97H; ***: $P < 0.001$, compared with 3B.

调控GADD45A的核转位过程，从而起到调控GADD45A功能的作用。我们首先使用细胞免疫荧光染色观察了不同细胞中GADD45A的分布情况。结果显示，在97H-OXR、97H-LNC、3B-OXR和3B-LNC这几株高表达LINC00601细胞的细胞质中观察到了显著的GADD45A富集，而在LINC00601相对低表达的对照组和OXR-siLNC细胞的细胞质中GADD45A分布较少（图6A，红色荧光）。为进一步验证这一结论，我们分别抽提了不同细胞的细胞核/细胞质蛋白，并进行了Western blot实验。结果显示，97H-OXR和97H-LNC细胞质中GADD45A的表达量显著增加，而在97H和97H-OXR-siLNC细胞核中观察到了更为显著的GADD45A富集（图6B）。我们也

在3B细胞系的对应细胞株中观察到了相同结果（图6B）。上述结果提示LINC00601的高表达对GADD45A的核转位起到了负调控的作用。

2.7 LINC00601对GADD45A调控机制的探索

为进一步探索LINC00601对GADD45A核转位的调控机制，我们进一步通过RNA pull-down和RIP实验观察LINC00601是否与GADD45A存在结合。通过LINC00601的RNA pull-down结果显示，结合的蛋白中存在GADD45A（图7A）。另一方面，我们使用GADD45A抗体进行免疫共沉淀，通过RTFQ-PCR和琼脂糖凝胶电泳，在产物中发现了LINC00601 mRNA的富集（图7B）。上述结果提示LINC00601能够与GADD45A结合，从而发挥对后者的调控作用。

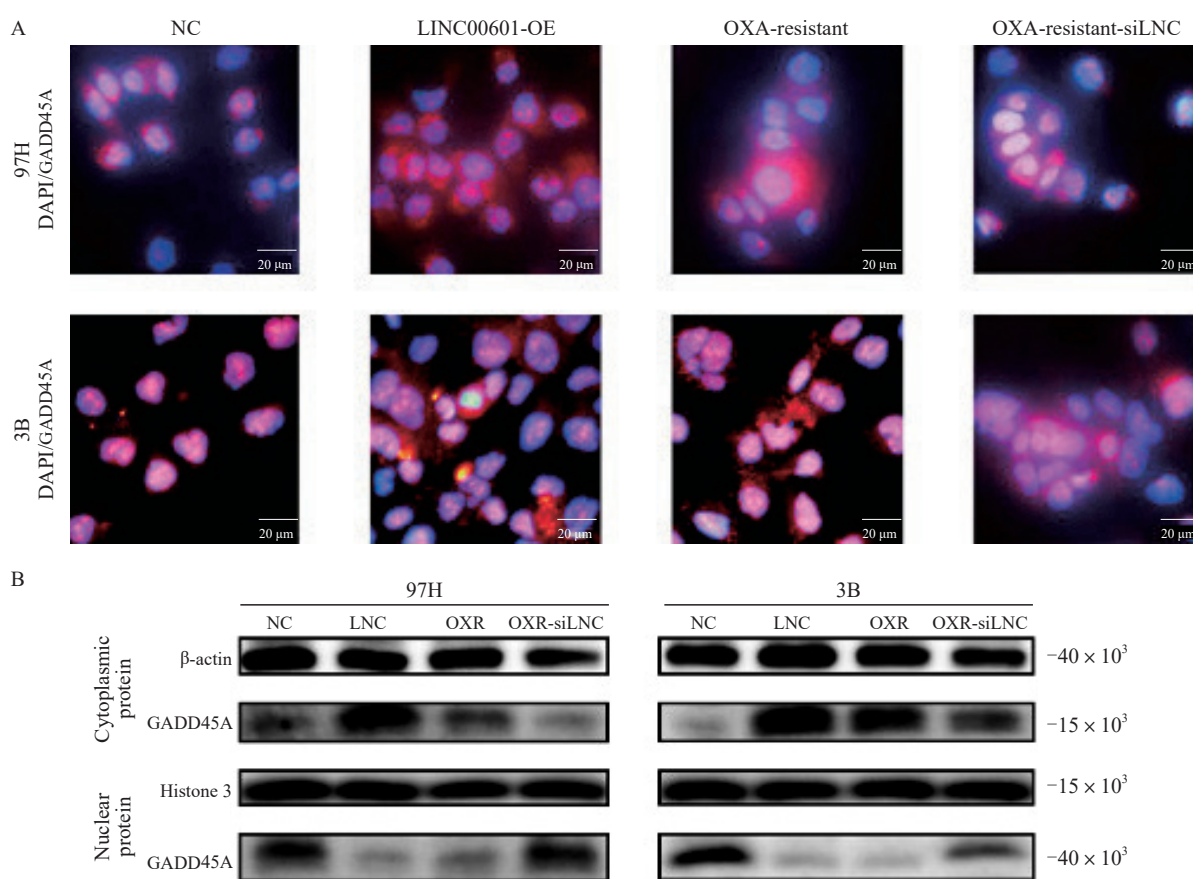


图6 LINC00601影响GADD45A的核转位

Fig. 6 The nuclear translocation process of GADD45A was interfered with LINC00601 expression

A: GADD45A was marked by red fluorescence and was enriched in the cytoplasm of LINC00601 overexpression cells and oxaliplatin resistant cells, while its cytoplasm location was attenuated in control cells and oxaliplatin-resistant-siLNC cells. B: The location changes of GADD45A were further confirmed by Western blot.

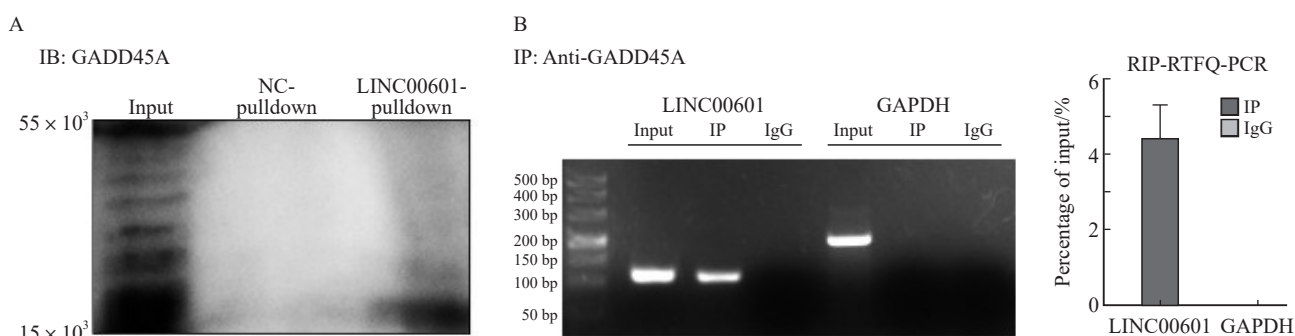


图7 LINC00601与GADD45A的结合

Fig. 7 LINC00601 might bind to GADD45A

LINC00601 RNA pull-down and RNA immunoprecipitation experiments demonstrated that LINC00601 mRNA could combine to GADD45A. A: LINC00601 RNA-pulldown revealed the combination between LINC00601 and GADD45A protein; B: LINC00601 expression was enriched in the RNA immunoprecipitation by anti-GADD45A.

3 讨 论

对于中晚期HCC患者,以奥沙利铂为基础的HCC局部治疗如TACE^[12]或肝动脉灌注化疗^[13]是目前临床主要的治疗策略,但治疗带来的生存获益尚未达到令人满意的程度。HCC细胞对于以奥沙利铂为基础的化疗或介入治疗抵抗是临床尚未解决的瓶颈问题。近年来,对奥沙利铂耐药机制的研究涉及药物在细胞内的运输、解毒、DNA损伤反应与修复、细胞死亡和表观遗传学机制^[14]等多个方面。对细胞这些功能的深入探索和挖掘有助于进一步推动奥沙利铂和其他铂类化疗药物在临床上的实践应用。

LncRNA虽然不编码、翻译成蛋白质,但近年来研究^[4]显示,LncRNA可以靶向mRNA、miRNA、cirRNA或蛋白,通过调控表观遗传学、转录及转录后调控等途径影响细胞内的信号转导通路,发挥不同的生物学功能。既往有研究^[15]鉴定出了74种与HCC相关的lncRNA,近年来亦不断发现新的lncRNA参与调控HCC的化疗耐药^[16-20]。在食管鳞状细胞癌和高恶性程度胶质瘤中,LINC00601与多种分子联合可以作为不良预后指标^[6-7]。也有研究^[8]报道,LINC00601在HCC组织中表达增加,并通过激活细胞的MAPK信号转导通路参与HCC的发生、发展。为进一步验证LINC00601在奥沙利铂化疗耐药的HCC中的作用,我们进行了一系列体外实

验,结果表明,LINC00601在HCC细胞中的高表达能够调控GADD45A的核转位,抑制HCC细胞凋亡,进而导致HCC细胞对于奥沙利铂耐药。

*GADD45A*基因是p53和MAPK信号转导通路的关键组成部分,可能诱导细胞周期阻滞^[21]、DNA修复和细胞凋亡^[22],其主要在细胞核中发挥生物学功能。*GADD45A*作为P53基因下游分子,被视为促进细胞凋亡的重要基因之一^[23]。近期有研究^[24]证实,下调GADD45A的表达可以显著抑制caspase 3蛋白的激活,抑制细胞凋亡的发生;而另一方面,过表达GADD45A可以直接改善HCC细胞对奥沙利铂的耐药,其具体机制是通过抑制AKT信号转导通路并参与调控凋亡相关蛋白Bax和Bcl-2的表达^[25]。以上实验探索的均是GADD45A表达水平对于凋亡或耐药性的调控,然而我们在实验中首次发现,LINC00601能与GADD45A结合,通过非表达水平负调控GADD45A翻译后的核转位,从而干扰GADD45A在细胞核中的正常定位和功能,最终导致奥沙利铂耐药性的产生。这提示我们GADD45A存在表达水平以外的调控机制和信号转导通路,然而,LINC00601调控或修饰GADD45A更深入的分子机制有待于进一步探索。

综上所述,我们发现了在奥沙利铂耐药细胞中高度表达的LINC00601基因,其可以抑制DNA修复蛋白GADD45A的核转位,干扰GADD45A在细胞核内的功能,从而减少奥沙利铂诱导的细胞凋亡,最终导致奥沙利铂化疗耐药。进一步深入

研究靶向LINC00601/GADD45A信号转导通路的药物,有望为克服HCC奥沙利铂耐药提供新的临床治疗策略。

利益冲突声明: 所有作者均声明不存在利益冲突。

[参 考 文 献]

- [1] 丁惠国,屠红,曲春枫,等.原发性肝癌的分层筛查与监测指南(2020版)[J].临床肝胆病杂志,2021,37(2):286-295.
DING H G, TU H, QU C F, et al. Guideline for stratified screening and surveillance of primary liver cancer (2020 edition) [J]. J Clin Hepatol, 2021, 37(2): 286-295.
- [2] HU K S, LU S X, LI M, et al. A novel pre-treatment model predicting risk of developing refractoriness to transarterial chemoembolization in unresectable hepatocellular carcinoma [J]. J Cancer, 2020, 11(15): 4589-4596.
- [3] XIE D Y, REN Z G, ZHOU J, et al. 2019 Chinese clinical guidelines for the management of hepatocellular carcinoma: updates and insights [J]. Hepatobiliary Surg Nutr, 2020, 9(4): 452-463.
- [4] SCHMITZ S U, GROTE P, HERRMANN B G. Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease [J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73(13): 2491-2509.
- [5] YIN X, ZHENG S S, ZHANG L, et al. Identification of long noncoding RNA expression profile in oxaliplatin-resistant hepatocellular carcinoma cells [J]. Gene, 2017, 596: 53-88.
- [6] SHI X B, LI Y, SUN Y C, et al. Genome-wide analysis of lncRNAs, miRNAs, and mRNAs forming a prognostic scoring system in esophageal squamous cell carcinoma [J]. PeerJ, 2020, 8: e8368.
- [7] HE Y K, YE Y F, TIAN W, et al. A novel lncRNA panel related to ferroptosis, tumor progression, and microenvironment is a robust prognostic indicator for glioma patients [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 788451.
- [8] WANG Y C, HU B H, ZHANG W W, et al. Linc00601 upregulation promotes hepatocellular carcinoma development by activating MAPK signaling pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(11): 6039-6045.
- [9] RIDDELL I A. Cisplatin and oxaliplatin: our current understanding of their actions [J]. Met Ions Life Sci, 2018, 18: /books/9783110470734/9783110470734-007/9783110470734-007.xml.
- [10] 曹宇,倪娟,曹能,等. Gadd45蛋白家族在肿瘤发生、发展中的作用[J].肿瘤防治研究,2019,46(3):271-274.
CAO Y, NI J, CAO N, et al. Role of Gadd45 protein family in tumorigenesis and development [J]. Cancer Res Prev Treat, 2019, 46(3): 271-274.
- [11] FENG X M, LIU H, ZHANG Z J, et al. Annexin A2 contributes to cisplatin resistance by activation of JNK-p53 pathway in non-small cell lung cancer cells [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2017, 36(1): 123.
- [12] LI J H, XIE X Y, ZHANG L, et al. Oxaliplatin and 5-fluorouracil hepatic infusion with lipiodolized chemoembolization in large hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(13): 3970-3977.
- [13] GAO S, ZHANG P J, GUO J H, et al. Chemoembolization alone vs combined chemoembolization and hepatic arterial infusion chemotherapy in inoperable hepatocellular carcinoma patients [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(36): 10443-10452.
- [14] MARTINEZ-BALIBREA E, MARTINEZ-CARDÚS A, GINÉS A, et al. Tumor-related molecular mechanisms of oxaliplatin resistance [J]. Mol Cancer Ther, 2015, 14(8): 1767-1776.
- [15] LIM L J, WONG S Y S, HUANG F Y, et al. Roles and regulation of long noncoding RNAs in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Res, 2019, 79(20): 5131-5139.
- [16] HUANG H, CHEN J, DING C M, et al. LncRNA NR2F1-AS1 regulates hepatocellular carcinoma oxaliplatin resistance by targeting ABCC1 via miR-363 [J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(6): 3238-3245.
- [17] HU H Q, YANG L, LI L J, et al. Long non-coding RNA KCNQ10T1 modulates oxaliplatin resistance in hepatocellular carcinoma through miR-7-5p/ABCC1 axis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 503(4): 2400-2406.
- [18] DONG S B, FU Y, YANG K B, et al. Linc01559 served as a potential oncogene and promoted resistance of hepatocellular carcinoma to oxaliplatin by directly sponging miR-6783-3p [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2021, 21(2): 278-286.
- [19] HUANG G L, LI L, LIANG C Y, et al. Upregulated UCA1 contributes to oxaliplatin resistance of hepatocellular carcinoma through inhibition of miR-138-5p and activation of AKT/mTOR signaling pathway [J]. Pharmacol Res Perspect, 2021, 9(1): e00720.
- [20] XIONG H, NI Z, HE J, et al. LncRNA HULC triggers autophagy via stabilizing Sirt1 and attenuates the chemosensitivity of HCC cells [J]. Oncogene, 2017, 36(25): 3528-3540.
- [21] ZHU N, SHAO Y, XU L, et al. Gadd45-alpha and Gadd45-gamma utilize p38 and JNK signaling pathways to induce cell cycle G₂/M arrest in Hep-G2 hepatoma cells [J]. Mol Biol Rep, 2009, 36(8): 2075-2085.
- [22] TONG T, JI J F, JIN S Q, et al. Gadd45a expression induces Bim dissociation from the cytoskeleton and translocation to mitochondria [J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(11): 4488-4500.
- [23] DU K G, LU F, XIE C Z, et al. Toxoplasma gondii infection induces cell apoptosis via multiple pathways revealed by transcriptome analysis [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2022, 23(4): 315-327.
- [24] JANG H J, YANG J H, HONG E, et al. Chelidone induces apoptosis via GADD45a-p53 regulation in human pancreatic cancer cells [J]. Integr Cancer Ther, 2021, 20: 15347354211006191.
- [25] WANG X, ZOU F, ZHONG J T, et al. Secretory clusterin mediates oxaliplatin resistance via the Gadd45a/PI3K/Akt signaling pathway in hepatocellular carcinoma [J]. J Cancer, 2018, 9(8): 1403-1413.

(收稿日期: 2022-09-08 修回日期: 2022-10-08)