

Linc00176 靶向 miR-338-3/SMO 轴对肝癌细胞增殖和迁移的影响

李 凌, 陈思翰, 朱德东, 石小军, 韦勇宁, 王 哲, 袁登高

(中国科学院大学宁波华美医院北郊院区, 浙江 宁波 315000)

摘要: [目的] 探讨基因间长链非编码 RNA Linc00176 靶向 miR-338-3p/SMO 对肝癌(HCC)细胞增殖和迁移的影响。 [方法] 收集手术切除的肝癌患者的 HCC 组织和癌旁组织标本各 96 例, 采用荧光定量 PCR 检测 Linc00176 和 miR-338-3p 在 HCC 组织和癌旁组织中的表达水平; 构建 shRNA-Control、shRNA-Linc00176、miRNA-Control 和 miR-338-3p 慢病毒肝癌细胞系, 采用生物信息学和双荧光素酶报告基因检测分析 Linc00176 和 miR-338-3p 的靶向关系; 采用 CCK-8 法和异种移植瘤实验检测各组细胞的增殖能力; 采用 Transwell 分析各组细胞的迁移能力; 采用 Western blot 检测各组细胞中 SMO 蛋白的表达水平。 [结果] Linc00176 在 HCC 组织中的 mRNA 相对表达水平(1.94±0.21)显著高于癌旁组织(0.57±0.10); miR-338-3p 在 HCC 组织中的 mRNA 相对表达水平(0.35±0.08)显著低于癌旁组织(1.62±0.15), 差异均有统计学意义(P<0.05)。生物信息学分析显示 Linc00176 可能通过靶向调控 miR-338-3p 的表达, 进一步影响 SMO 蛋白的表达。双荧光素酶报告基因检测显示转染 Linc00176-WT 的 miR-338-3p 细胞(0.33±0.08)的相对荧光素酶活性显著低于 miRNA-Control 组细胞(1.25±0.16), 差异有统计学意义(P<0.05)。CCK-8 和异种移植瘤实验显示 shRNA-Linc00176 和 miR-338-3p 组细胞的增殖活力和成瘤能力与其各自的对照组相比显著下降, 差异均有统计学意义(P<0.05)。Transwell 结果表明与 shRNA-Control 组(134.47±12.29)和 miRNA-Control 组(129.87±13.06)比较, shRNA-Linc00176 组(53.17±8.74)和 miR-338-3p 组(44.61±8.02)细胞的迁移个数均显著下降, 差异有统计学意义(P<0.05)。Western blot 结果显示, shRNA-Linc00176 和 miR-338-3p 组细胞中 SMO 的蛋白表达水平较 shRNA-Control 和 miRNA-Control 组均显著降低, 差异有统计学意义(P<0.05)。 [结论] Linc00176 可能通过靶向调控 miR-338-3p/SMO 的表达促进 HCC 细胞的增殖和迁移。

关键词: Linc00176; 肝肿瘤; miR-338-3p; SMO; 增殖; 迁移

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2019)10-0858-06

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.10.B002

Effect of Linc00176 Targeting MiR-338-3p/SMO Axis on Proliferation and Migration of Hepatoma Cells

LI Ling, CHEN Si-han, ZHU De-dong, SHI Xiao-jun, WEI Yong-ning, WANG Zhe, YUAN Deng-gao

(North Branch Courts in HuaMei Hospital, University of Chinese Academy of Sciences, Ningbo 315000, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of long-chain non-coding RNA Linc00176 targeting miR-338-3p/SMO on the proliferation and migration of hepatocellular carcinoma (HCC) cells. [Methods] Ninety-six specimens of HCC and adjacent tissues from patients with hepatocellular carcinoma were collected. Fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression of Linc00176 and miR-338-3p in HCC and adjacent tissues. The shRNA-Control, shRNA-Linc00176, miRNA-Control and miR-338-3p lentiviral hepatoma cell lines were constructed. The targeting relationship between Linc00176 and miR-338-3p was analyzed by bioinformatics and dual luciferase reporter assay. The proliferation, migration, and the expression of SMO in each group were detected by CCK-8, xenograft tumor experiment and Western blot, respectively. [Results] The mRNA relative expression of Linc00176 in HCC tissues(1.94±0.21) was significantly higher than that in adjacent tissues(0.57±0.10), and the mRNA relative expression of miR-338-3p in HCC tissues(0.35±0.08) was significantly lower than that in adjacent tissues(1.62±0.15) (P<0.05). Bioinformatics showed that Linc00176 may further affect the expression of SMO by targeting miR-338-3p. Dual luciferase reporter assay showed that the relative luciferase activity of miR-338-3p cells (0.33±0.08) transfected with Linc00176-WT was significantly lower than that of miRNA-Control cells (1.25±0.16) (P<0.05). CCK-8 and xenograft tumor experiments showed that the proliferation and tumorigenic ability of shRNA-Linc00176 and miR-338-3p cells were significantly decreased compared with their respective control groups (P<0.05). Transwell showed that compared with shRNA-Control (134.47±12.29) group and miRNA-Control(129.87±13.06) group, the number of migration in shRNA-Linc00176(53.17±8.74) group and miR-338-3p (44.61±8.02) group were decreased significantly (P<0.05). Western blot showed that the expressions of SMO in shRNA-Linc00176 group and miR-338-3p group were significantly lower than those in shRNA-Control group and miRNA-Control group (P<0.05). [Conclusion] Linc00176 may promote proliferation and migration of HCC cells by targeting the miR-338-3p/SMO axis.

Subject words: Linc00176; hepatocellular carcinoma; miR-338-3p; SMO; proliferation; migration

原发性肝癌是全球第二大致死率的恶性肿瘤,其

中肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)约占所有肝癌类型的 90%, 其发病机制复杂, 癌细胞侵袭转移能力强、预后差, 已严重影响到人们的生命健康和生活质量^[1]。因此深入研究 HCC 的发病机制、寻

通信作者: 李凌, 硕士, 副主任医师; 中国科学院大学宁波华美医院北郊院区九楼肝肿瘤科, 浙江省宁波市江北区永丰北路 175 号(315000); E-mail: 1559602943@qq.com

收稿日期: 2019-05-16; 修回日期: 2019-07-05

找有效的治疗靶点对 HCC 的临床诊疗具有重要意义。基因间长链非编码 RNA (large intergenic non-coding RNA, LincRNA) 是指基因间长度大于 200bp 的非编码 RNA 片段,近年来已被证明广泛参与包括肿瘤在内的众多生理病理过程的调控^[2-3]。Linc00176 作为一种新鉴定的 linc RNA,已被证明可通过靶向 miR-9 和 miR-185 等多种 miRNAs 肿瘤抑制因子,进而调控超过 200 个基因的表达,并密切参与食管癌等肿瘤的发生及进展^[4],但尚不明确它是否影响 HCC 的发病、肿瘤进展及其具体作用途径。本研究旨在探究 Linc00176 对 HCC 细胞生物行为学的影响及其可能的作用通路。

1 材料与方法

1.1 一般资料

收集 2015 年 11 月至 2018 年 11 月于我院行手术切除的原发性肝癌患者的肝癌组织及其癌旁组织标本各 96 例。纳入标准:①所有标本经病理学诊断确诊为肝癌组织或癌旁组织;②所有患者术前均未接受过放疗、化疗或免疫治疗等;③所有患者临床资料完整;④排除合并其他恶性肿瘤,严重器官功能受损、糖尿病或精神病患者。其中男性 77 例,女性 19 例;年龄 35~75 岁,平均年龄 51.3±6.9 岁。本研究经我院伦理委员会批准,入选患者均签署知情协议。

1.2 实验材料与试剂

HCC 细胞系 HepG2 购自中科院上海生科院生化细胞所,60 只 SPF 级 Balb/c 裸鼠(18~22g)购自北京维通利华实验动物技术有限公司。动物组织总 RNA 提取试剂盒、Lipofectamine™ 2000 转染试剂购自美国 Thermo Fisher Scientific,逆转录试剂盒、RT-PCR 试剂盒购自日本 Takara 公司。shRNA-Control、shRNA-Linc00176、miRNA-Control 以及 miR-338-3p 慢病毒载体构建和病毒包装均由山东维真生物有限公司完成。Dual-Luciferase® Reporter Assay System 检测试剂盒自美国 Promega 公司,CCK8 细胞增殖试剂盒购自碧云天生物科技有限公司,Transwell 小室购自美国 Corning 公司,SMO 鼠单克隆抗体购自美国 Santa cruz biotechnology 公司。

1.3 RT-PCR

HCC 组织和癌旁组织匀浆后采用动物组织

RNA 提取试剂盒提取组织总 RNA 后,采用逆转录试剂盒进行逆转录反应。根据人源 Linc00176 和 miR-338-3p 的核苷酸序列设计 RT-PCR 引物,Linc00176-F:5'-gccaggtccagaccttc-3',Linc00176-R:5'-gtccaagcagctctctccag-3';miR-338-3p-F:5'-ctccaa-caatctctgggtg-3',miR-338-3p-R:5'-cttcaacaaatcact-gatg-3';以 U6 和 β -Tubulin 为内参,U6-F:5'-gt-gctcgttcggcagcac-3',U6-R:5'-aaaatatggaacgcttcacg-3'; β -Tubulin-F:5'-gcattgacaacgagccctc-3', β -Tubulin-R:5'-ctgtggttcacaggtg-3'。按照 RT-PCR 试剂盒说明制备反应体系,根据以下反应条件进行 RT-PCR 反应:95℃ 预变性 30s;第二阶段:95℃ 变性 30s,55℃ 退火 30s,72℃ 延伸 30s,循环数 40 个。PCR 反应结束后采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析 Linc00176 和 miR-338-3p mRNA 相对表达水平。

1.4 稳定细胞系构建

HCC 细胞系 HepG2 培养至对数生长期后,胰酶消化,接种于 6 孔板中,培养过夜。以细胞:病毒为 1:100 的比例分别向各组细胞中加入 shRNA-Control、shRNA-Linc00176、miRNA-Control 以及 miR-338-3p 慢病毒,感染 3h 后换液。继续培养 12h,换液后再培养 24h,加入终浓度为 1 μ g/ml 的嘌呤霉素以筛选未感染细胞。持续筛选 72h 后,当所剩细胞不再继续死亡且生长状态良好时撤去嘌呤霉素,所剩细胞继续扩大培养。收集 shRNA-Control、shRNA-Linc00176、miRNA-Control 和 miR-338-3p 对数生长期细胞 5×10^6 个并提取细胞总 RNA,采用 RT-PCR 检测各组细胞 Linc00176 和 miR-338-3p 的表达变化。具体操作同上,以 U6 和 β -Tubulin 为内参。

1.5 双荧光素酶报告基因检测

生物信息学网站 (<http://www.targetscan.org/>) 分析显示 Linc00176 是 miR-338-3p 的潜在靶点。采用分子克隆构建野生型 Linc00176 (Linc00176-WT) 和缺失 miR-338-3p 结合区域的突变体 Linc00176 (Linc00176-Mut) 荧光素酶报告载体。分别将 Linc00176-WT、Linc00176-Mut 荧光素酶报告载体转染指数期的 miRNA-Control 和 miR-338-3p 稳定细胞系,48h 后被动裂解液裂解细胞并制备细胞抽提物,采用双荧光素酶报告基因试剂盒检测各组细胞的荧光素酶相对活性。

1.6 CCK-8 细胞增殖检测

shRNA-Control、shRNA-Linc00176、miRNA-Con-

trol 和 miR-338-3p 稳定细胞系生长至对数生长期后,胰酶消化,调整细胞浓度至 5×10^5 个/ml,分别取 100 μ l 接种到 96 孔板中,继续培养 12h 至细胞贴壁。于贴壁后第 0h、24h、48h 和 72 h 向细胞中加入 10 μ l CCK-8 溶液。各组细胞在各时间点均设置 3 个重复孔。孵育 2h 后使用酶标仪检测各孔细胞在 450nm 处的吸光度值。

1.7 Transwell 细胞迁移分析

shRNA-Control、shRNA-Linc00176、miRNA-Control 和 miR-338-3p 细胞生长至对数生长期后,胰酶消化,调整细胞浓度至 1×10^5 个/ml,分别取 100 μ l 细胞悬液接种到 Transwell 孔上室中,下室则加入 500 μ l 完全培养基,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养 24h。PBS 洗涤 1 次,4%多聚甲醛固定 20min。PBS 洗涤 3 次,1%结晶紫染色液孵育 5min。PBS 洗涤 3 次,并用棉球擦拭上室未迁移细胞。室温干燥后于显微镜下观察细胞迁移情况。

1.8 异种移植瘤实验

所有裸鼠在室温 22 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C,湿度 55%~65%的 SPF 级环境中适应性喂养一周后随机分为 4 组。shRNA-Control、shRNA-Linc00176、miRNA-Control 和 miR-338-3p 对数生长期细胞用胰酶消化后,PBS 调整细胞浓度至 5×10^6 个/ml,分别取 100 μ l 细胞悬液接种于裸鼠腋下脂肪垫。继续饲养 4 周,每周定期监测各组小鼠成瘤情况,测量肿瘤长径(L)、短径(W)并计算肿瘤体积。肿瘤体积(V)= $0.5 \times L \times W^2$ 。

1.9 Western blot

计数并收集 shRNA-Control、shRNA-Linc00176、miRNA-Control 和 miR-338-3p 对数生长期细胞 5×10^6 个,500 μ l 细胞裂解液冰上裂解 20min。14 000g 离心 10min,上清加入 1 \times SDS Loading buffer,沸水浴煮沸 10min。SDS-PAGE 电泳、转膜、5% BSA 封闭。加入 5% BSA 稀释的小鼠单克隆 SMO 抗体 (1:500),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBST 洗涤 3 次,5% BSA 稀释的 HRP 标记羊抗鼠二抗 (1:5000) 室温孵育 1h, PBST 洗涤 3 次,ECL 发光液显影。

1.10 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据分析,计量资料采用平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料采用率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Linc00176、miR-338-3p 在 HCC 和癌旁组织中的表达

Linc00176 在癌旁组织和 HCC 组织中的 mRNA 相对表达水平分别为 0.57 ± 0.10 和 1.94 ± 0.21 。与癌旁组织相比,Linc00176 在 HCC 组织中的 mRNA 相对表达水平显著增加,差异有统计学意义($t=2.56$, $P=0.017$),见 Figure 1A。与癌旁组织 (1.62 ± 0.15) 相比,miR-338-3p 在 HCC 组织 (0.35 ± 0.08) 中的 mRNA 相对表达水平显著下降,差异有统计学意义 ($t=3.02$, $P=0.011$),见 Figure 1B。

2.2 Linc00176 和 miR-338-3p 稳定细胞系构建

与 shRNA-Control 组细胞 (1.68 ± 0.19) 比较,shRNA-Linc00176 组细胞 (0.51 ± 0.07) 中 Linc00176 的 mRNA 相对表达水平显著降低,差异有统计学意义 ($t=2.01$, $P=0.020$),见 Figure 2A; 与 miRNA-Control 组细胞 (0.40 ± 0.05) 比较,miR-338-3p 组细胞 (1.33 ± 0.16) 的 miR-338-3p mRNA 相对表达水平明显增加,差异有统计学意义 ($t=2.38$, $P=0.019$),见 Figure 2B。提示 shRNA-Linc00176 和 miR-338-3p 过表达细胞系均构建成功,可用于后续实验。

2.3 miR-338-3p 和 Linc00176 的靶向关系验证

生物信息学在线网站分析发现 miR-338-3p 和 Linc00176 存在 6 个互补碱基,提示 Linc00176 可能是 miR-338-3p 的潜在作用靶点(见 Figure 3A)。双荧光素酶报告基因实验进一步证明在转染 Linc00176-WT 的细胞中,miR-338-3p 过表达细胞 (0.33 ± 0.08) 的相对荧光素酶活性较 miRNA-Control 组细胞 (1.25 ± 0.16) 显著降低,差异有统计学意义 ($t=3.07$, $P=0.004$);而在转染 Linc00176-Mut 的细胞中,miR-338-3p 组细胞 (1.29 ± 0.15) 和 miRNA-Control 组细胞 (1.16 ± 0.14) 的相对荧光素酶活性无明显差异 ($t=0.37$, $P=0.81$),见 Figure 3B。

2.4 Linc00176 对 HCC 细胞增殖的影响

CCK-8 结果显示,与 shRNA-Control 组细胞相比,shRNA-Linc00176 组细胞在 24h、48h、72h 的增殖活力均显著降低,差异均有统计学意义 ($t=2.02$, $P=0.034$; $t=3.59$, $P=0.003$; $t=5.26$, $P < 0.001$),见 Figure 4A。裸鼠异种移植瘤实验进一步证明,shRNA-Linc00176 组细胞在裸鼠体内的瘤体生长速度和瘤

体体积较 shRNA-Control 组细胞明显下降, 差异有统计学意义 ($t=1.87, P=0.040; t=2.21, P=0.029; t=4.14, P=0.001; t=7.01, P<0.001$), 见 Figure 4B。

2.5 miR-338-3p 对 HCC 细胞增殖的影响

CCK-8 结果显示, 与 miRNA-Control 组细胞相比, miR-338-3p 组细胞在各时间点的增殖活力均显著下降, 差异有统计学意义 ($t=1.95, P=0.039; t=3.37, P=0.003; t=5.64, P<0.001$), 见图 Figure 5A。异种移植瘤实验也显示 miR-338-3p 组细胞在裸鼠体内的瘤体生长速度和瘤体体积显著低于 miRNA-Control 组细胞, 差异有统计学意义 ($t=1.84, P=0.040; t=2.30, P=0.025; t=4.36, P=0.001; t=6.47, P<0.001$), 见 Figure 5B。

2.6 Linc00176 和 miR-338-3p 对 HCC 细胞迁移的影响

采用 Transwell 实验进一步检测 Linc00176 下调和 miR-338-3p 上调对 HCC 细胞迁移能力的影响。结果显示, 与 shRNA-Control 组 (134.47 ± 12.29) 和 miRNA-Control 组 (129.87 ± 13.06) 细胞相比, shRNA-Linc00176 组 (53.17 ± 8.74) 和 miR-338-3p 组 (44.61 ± 8.02) 细胞的迁移个数均显著下降, 差异有统计学意义 ($t=2.15, P=0.024; t=2.63, P=0.016$), 见 Figure 6。

2.7 Linc00176 和 miR-338-3p 对 HCC 细胞 SMO 表达的影响

生物信息学显示 SMO 可能是 miR-338-3p 的潜在作用靶点, 见 Figure 7A。已有研究显示在结肠癌中 miR-338-3p 可通过下调靶基因 SMO 的表达抑制肿瘤细胞的侵

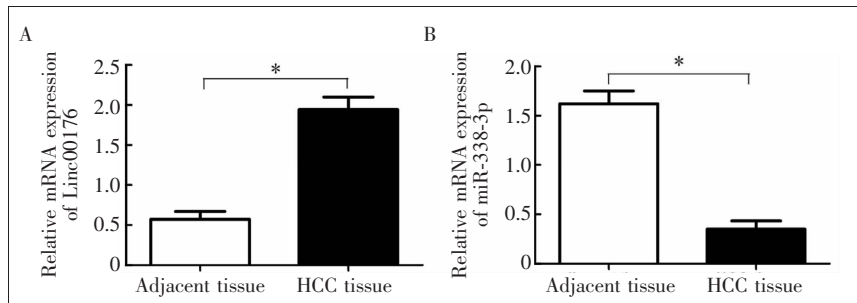


Figure 1 Comparison of Linc00176 and miR-338-3p relative mRNA expression

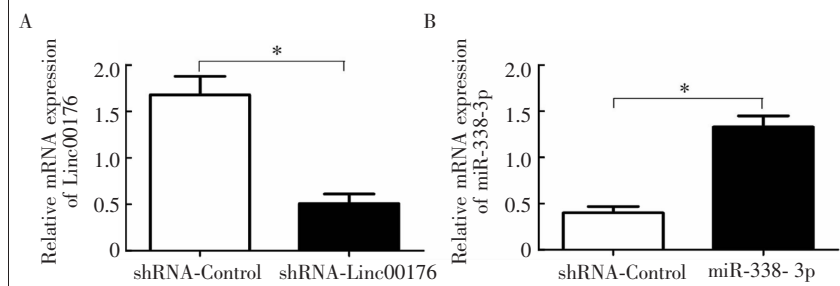


Figure 2 Comparison of Linc00176 and miR-338-3p mRNA expression in stable cell lines

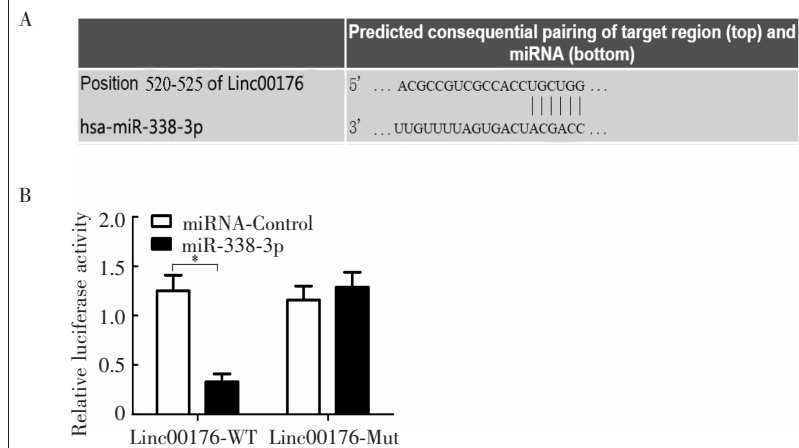


Figure 3 Verification of the targeting relationship between miR-338-3p and Linc00176

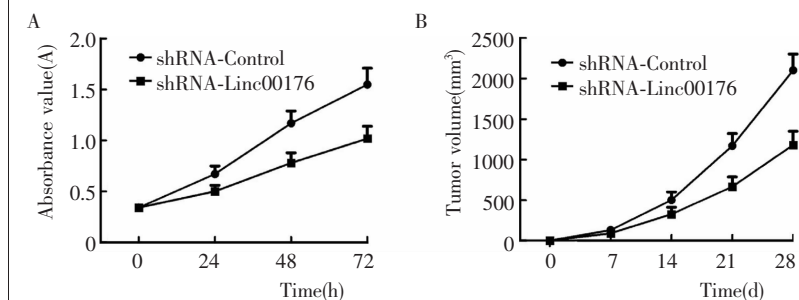


Figure 4 Effect of Linc00176 down-regulation on HCC cell proliferation

衰和迁移。本研究采用 Western blot 进一步分析 SMO 蛋白是否介导了 HCC 细胞中 Linc00176 和 miR-338-3p 对肿瘤细胞增殖和迁移的影响。结果显示, 与 shRNA-Control 和 miRNA-Control 组细胞比较, shRNA-Linc00176 和 miR-338-3p 组中 SMO 的蛋白表达水平均显著降低, 差异有统计学意义 ($t=3.36, P=0.010; t=3.92, P=0.008$), 见 Figure 7B。

3 讨论

LincRNA 主要通过靶向 miRNA 进而调控下游基因的表达, 已被证实多种恶性肿瘤中作为癌基因或致癌基因参与肿瘤进程的调控 [5]。Linc00176 是近几年新鉴定的一个 LincRNA, 关于它在机体生理病理调控中的作用仍知之甚少。有研究显示在 Linc00176 正常肝脏组织或细胞中不表达或低表达, 而在 HCC 中高表达, 并与肿瘤的组织学分级密切相关 [6]。我们的研究也表明与癌旁组织相比, Linc00176 在 HCC 组织中的 mRNA 相对表达水平显著增加, 提示 Linc00176 很可能在 HCC 的发病和进程中起着关键作用, 但其具体作用机制仍不清晰。

microRNA(miRNA)是一类内源性的, 长度约 21~25 个核苷酸的小分子非编码 RNA, 可通过与靶 RNA 的 3' UTR 区结合, 从而诱导靶基因的降解或抑制靶基因的表达, 在调控细胞周期、增殖、分化和凋亡等生物学过程中发挥着重要作用 [7]。近年来的研究表明众多 miRNA 作为癌基因或抑癌基因广泛参与肿瘤的发生和进展 [8]。miR-338-3p 位于多种恶性肿瘤突变“热点”的 17q25 染色体上, 该染色体的突变与肿瘤细胞的迁移、侵袭和远处转移等恶性行为显著相关 [9]。研究发现, miR-338-3p 在非小细

胞肺癌、乳腺癌、前列腺癌、胃癌等多种肿瘤细胞和组织中的表达显著降低 [10-11]。我们的研究显示, miR-338-3p 在 HCC 组织中的 mRNA 相对表达水平较癌旁组织显著降低, 提示 miR-338-3p 可能通过调控其

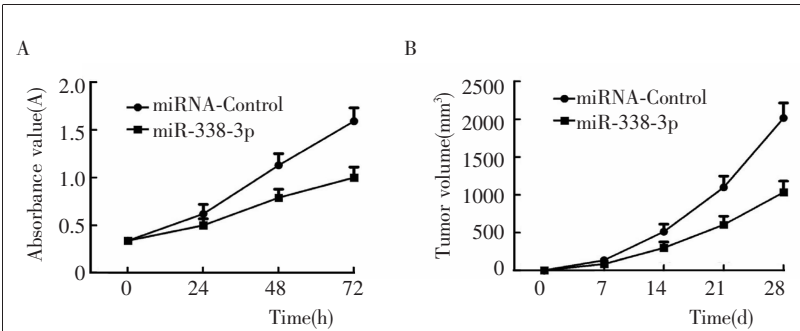


Figure 5 Effect of miR-338-3p overexpression on proliferation of HCC cells

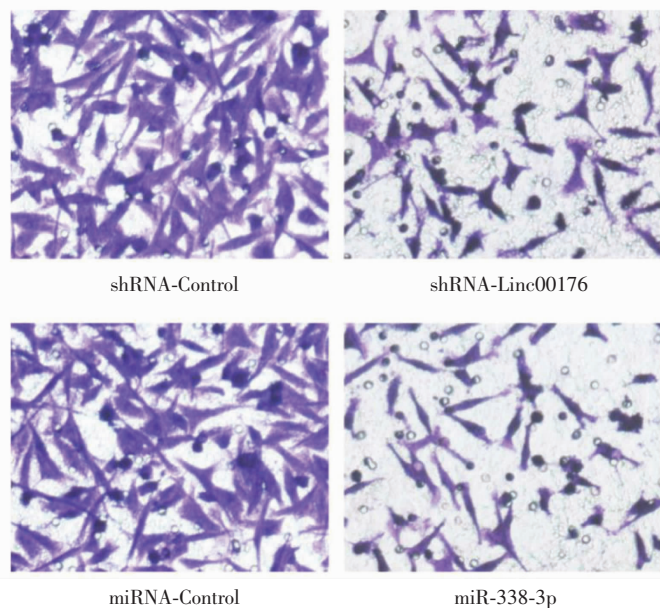


Figure 6 Effect of Linc00176 and miR-338-3p on HCC cell migration

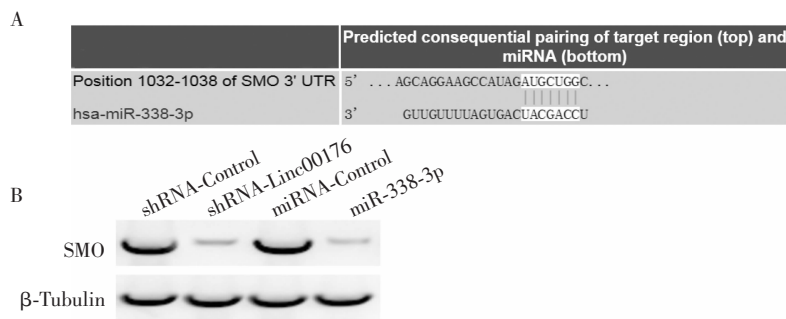


Figure 7 Effect of Linc00176 and miR-338-3p on SMO expression

靶基因的表达抑制 HCC 的恶性进展。

生物信息学分析结果显示 Linc00176 可能是 miR-338-3p 的潜在作用靶点。我们采用双荧光素酶报告基因实验进一步验证 Linc00176 与 miR-338-3p 的靶向关系。结果发现,转染 Linc00176-WT 的 miR-338-3p 组细胞的相对荧光素酶活性显著低于转染 Linc00176-WT 的 miRNA-Control 组细胞,而转染 Linc00176-Mut 的 miRNA-Control 和 miR-338-3p 组细胞的相对荧光素酶活性无显著性差异,表明 Linc00176 可负向调控 miR-338-3p 的表达。

为了进一步分析 Linc00176 和 miR-338-3p 对 HCC 细胞生物行为学的影响,我们采用 CCK-8 法和体内异种移植瘤实验检测 Linc00176 下调及 miR-338-3p 上调后 HCC 细胞增殖的变化。结果显示,Linc00176 敲低或 miR-338-3p 过表达后,HCC 细胞的增殖活力和成瘤能力均显著下降。Transwell 实验也证实 Linc00176 敲低或 miR-338-3p 过表达后 HCC 细胞的迁移能力明显降低。表明 Linc00176 和 miR-338-3p 的异常表达与 HCC 细胞的增殖和迁移密切相关。

Sonic hedgehog(Shh)信号通路是胚胎发育过程中调控细胞增殖和分化的关键信号通路,Smoothed(SMO)蛋白是 Shh 信号通路的核心组成成员,能够将胞外的 Shh 信号转换为胞内的 Gli 信号,从而启动细胞核内基因的转录,激活 Shh 信号通路^[12-13]。Shh 信号通路主要介导人类胚胎时期各类器官的发育,在发育完全或正常组织中不表达或低表达^[14]。近年来大量研究显示 Shh 信号通路在非小细胞肺癌、神经胶质瘤、胃癌、胰腺癌、前列腺癌等多种肿瘤中异常激活^[15-16]。生物信息学分析表明 SMO 是 miR-338-3p 的一个作用靶点。有研究显示 miR-338-3p 在结直肠癌中可靶向下调 SMO 的表达进而抑制肿瘤细胞的恶性行为^[17]。本研究结果发现,Linc00176 敲低或 miR-338-3p 过表达后 HCC 细胞中 SMO 的蛋白表达水平显著下降,细胞增殖和迁移能力降低,提示由 SMO 调控的 Shh 信号通路可能在 Linc00176 和 miR-338-3p 介导的肿瘤细胞行为中起关键作用。

综上所述,Linc00176 可能通过与 SMO 竞争性结合 miR-338-3p,造成 SMO 蛋白表达的上调及 Shh 信号通路的激活,从而诱导 HCC 细胞的增殖、迁移,

促进 HCC 的发生和发展。

参考文献:

- [1] Grandhi MS, Kim AK, Ronnekleiv-Kelly SM, et al. Hepatocellular carcinoma: from diagnosis to treatment [J]. *Surg Oncol*, 2016, 25(2):74-85.
- [2] Deniz E, Erman B. Long noncoding RNA(lincRNA), a new paradigm in gene expression control [J]. *Funct Integr Genomics*, 2017, 17(2-3):135-143.
- [3] Pan Y, Li C, Chen J, et al. The emerging roles of long noncoding RNA ROR (lincRNA-ROR) and its possible mechanisms in human cancers [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(1-2):219-229.
- [4] Fan Q, Liu B. Identification of a RNA-Seq based 8-long non-coding RNA signature predicting survival in esophageal cancer[J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22:5163-5172.
- [5] Chillón I, Pyle AM. Inverted repeat Alu elements in the human lincRNA-p21 adopt a conserved secondary structure that regulates RNA function [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(19):9462-9471.
- [6] Tran DDH, Kessler C, Niehus SE, et al. Myc target gene, long intergenic noncoding RNA, Linc00176 in hepatocellular carcinoma regulates cell cycle and cell survival by titrating tumor suppressor microRNAs [J]. *Oncogene*, 2018, 37(1):75-85.
- [7] Mohr AM, Mott JL. Overview of microRNA biology [J]. *Semin Liver Dis*, 2015, 35(1):3-11.
- [8] Mellis D, Caporali A. MicroRNA-based therapeutics in cardiovascular disease: screening and delivery to the target[J]. *Biochem Soc Trans*, 2018, 46(1):11-21.
- [9] Chun S, Du F, Westmoreland JJ, et al. Thalamic miR-338-3p mediates auditory thalamocortical disruption and its late onset in models of 22q11.2 microdeletion [J]. *Nat Med*, 2017, 23(1):39-48.
- [10] Zhang P, Shao G, Lin X, et al. MiR-338-3p inhibits the growth and invasion of non-small cell lung cancer cells by targeting IRS2[J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(1):53-63.
- [11] Wang Y, Qin H. miR-338-3p targets RAB23 and suppresses tumorigenicity of prostate cancer cells [J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(12):2564-2574.
- [12] Byrne EFX, Sircar R, Miller PS, et al. Structural basis of Smoothed regulation by its extracellular domains[J]. *Nature*, 2016, 535(7613):517-522.
- [13] Huang P, Zheng S, Wierbowski BM, et al. Structural basis of smoothed activation in hedgehog signaling [J]. *Cell*, 2018, 174(2):312-324.
- [14] Huang P, Nedelcu D, Watanabe M, et al. Cellular cholesterol directly activates smoothed in hedgehog signaling [J]. *Cell*, 2016, 166(5):1176-1187.
- [15] Regan JL, Schumacher D, Staudte S, et al. Non-canonical hedgehog signaling is a positive regulator of the WNT pathway and is required for the survival of colon cancer stem cells[J]. *Cell Rep*, 2017, 21(10):2813-2828.
- [16] Hassounah NB, Nunez M, Fordyce C, et al. Inhibition of ciliogenesis promotes hedgehog signaling, tumorigenesis, and metastasis in breast cancer [J]. *Mol Cancer Res*, 2017, 15(10):1421-1430.
- [17] Ou WT, Sun K, Wu CT, et al. MicroRNA-338-3p suppresses invasion and migration of colorectal cancer cells by targeting SMO [J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2013, 23(18):25-30. [区文 ■, 孙凯, 吴承堂, 等. MicroRNA-338-3p 通过下调 SMO 表达抑制结直肠癌细胞的侵袭与迁移[J]. *中国现代医学杂志*, 2013, 23(18):25-30.]