

LncRNA-ZMIZ1-AS1 在肝癌细胞恶性表型中的作用机制研究

陈果¹, 唐浩¹, 毛春虎², 伍刚^{1,3}

1. 西南医科大学临床医学院, 四川 泸州 646000; 2. 首都医科大学附属北京安贞医院南充医院, 四川 南充 637000;
3. 四川省医学科学院·四川省人民医院(电子科技大学附属医院)肝胆胰外科, 四川 成都 610072

【摘要】目的 探讨 LncRNA-ZMIZ1-AS1 在原发性肝癌(HCC)中调控细胞生长、侵袭及生物学行为的具体作用机制。**方法** 本研究通过生物信息学分析结合 GEO 和 TCGA 数据, 分析 LncRNA-ZMIZ1-AS1 与 HCC 临床预后的关系。利用实时 PCR、蛋白质印迹等分子生物学实验, 以及细胞活力分析、流式细胞术等技术, 探讨敲低 LncRNA-ZMIZ1-AS1 对 HCC 细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响。**结果** LncRNA-ZMIZ1-AS1 在 HCC 患者中高表达, 且与性别、临床分期等病理特征显著相关。敲低 LncRNA-ZMIZ1-AS1 显著抑制 HCC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 并增加细胞凋亡率。此外, GSEA 分析表明, LncRNA-ZMIZ1-AS1 的高表达可能与 NOTCH 信号通路相关联。**结论** LncRNA-ZMIZ1-AS1 在 HCC 中的高表达可能通过调控 NOTCH 等信号通路, 促进肿瘤细胞的恶性表型。其在 HCC 中的表达具有潜在的生物标志物意义, 为进一步研究其在肝癌中的分子机制及其在临床中的应用潜力提供了理论依据。

【关键词】 肝癌; LncRNA-ZMIZ1-AS1; PTBP1

【中图分类号】 R34

【文献标志码】 A

【文章编号】 1672-6170(2025)02-0042-10

Study on the action mechanism of LncRNA-ZMIZ1-AS1 in the malignant phenotype of hepatocellular carcinoma CHEN Guo¹, TANG Hao¹, MAO Chun-hu², WU Gang^{3,4} 1. School of Clinical Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2. Nanchong Hospital of Beijing Anzhen Hospital CMU, Nanchong 637000, China; 3. Department of Hepatopancreatobiliary Surgery, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital (Affiliated Hospital of University of Electronic Science and Technology of China), Chengdu 610072, China

【Corresponding author】 WU Gang

【Abstract】Objective To investigate the specific mechanisms of long non-coding RNA ZMIZ1-AS1 (LncRNA-ZMIZ1-AS1) regulating cell growth, invasion and biological behavior in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** This study used bioinformatics analysis combined with GEO and TCGA data to analyze the relationship between LncRNA-ZMIZ1-AS1 and the clinical prognosis of HCC patients. Molecular biology experiments such as real-time PCR and Western blotting as well as cell viability analysis, flow cytometry and other technologies were used to explore the effects of knocking down LncRNA-ZMIZ1-AS1 on HCC cell proliferation, migration, invasion and apoptosis. **Results** LncRNA-ZMIZ1-AS1 was highly expressed in HCC patients. It was significantly associated with clinical characteristics such as gender and clinical stage. Knockdown of LncRNA-ZMIZ1-AS1 notably inhibited HCC cell proliferation, migration and invasion. It also increased apoptosis rates. Additionally, GSEA analysis showed a potential association between high LncRNA-ZMIZ1-AS1 expression and the NOTCH signaling pathway. **Conclusions** The high expression of LncRNA-ZMIZ1-AS1 in HCC likely promotes malignant phenotypes by regulating signaling pathways such as NOTCH. This finding underscores its potential as a biomarker for HCC. It provides a theoretical basis for further research on its molecular mechanisms and clinical applications in liver cancer.

【Key words】 Hepatocellular carcinoma; LncRNA-ZMIZ1-AS1; PTBP1

原发性肝癌是最常见的致死性肿瘤之一, 其发病率和死亡率均位居肿瘤前列, 其中肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见的类型。尽管肝脏外科技术发展迅速, 但肝癌远期疗效并不理想, 肿瘤复发和转移在临床上很常见, 患者 5 年生存率极其低下, 每年全世界超过 70 万例肝癌患者死亡^[1]。临床上只有 20% 左右的新发肝癌患者符合

根治性手术切除标准, 然而 70% 的患者术后会复发, 30% 的患者术后 5 年内因肝癌死亡^[2-4]。准确的预后评估在治疗中起着至关重要的作用 HCC 患者的决策。故亟需寻找新的生物标志物预测 HCC 预后并揭示 HCC 的靶点。非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA) 是不编码蛋白质的 RNA 分子, 这些 RNA 在细胞的基因调控、细胞分化、发育等生物过程中发挥了至关重要的作用。非编码 RNA 可以细分为多种类型, 包括小分子非编码 RNA (如 miRNA 和 siRNA)、长链非编码 RNA (lncRNA) 以及环状 RNA (circRNA)^[5-7]。非编码 RNA 通过多种机制影响基因表达。例如, 小分子非编码 RNA 通常通过与

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81302161); 四川省科技厅重点项目 (编号: 2020YJ0450); 四川省卫生健康委员会项目 (编号: 150215)

【通讯作者】 伍刚

mRNA 的 3' 非翻译区域结合来抑制其表达,从而在转录后水平上调基因表达。而长链非编码 RNA (lncRNA) 则通过提供结构支持、作为分子“海绵”吸附其他小分子 RNA,或直接与蛋白质发生相互作用来调控基因的转录过程^[8,9]。现有一些研究发现 lncRNA-ZMIZ1-AS1 在多种肿瘤中起这促癌作用^[10,11],然而,目前尚未见关于 lncRNA-ZMIZ1-AS1 在肝细胞癌中的研究报道,因此进一步探索和验证 lncRNA-ZMIZ1-AS1 在此类癌症中的潜在作用是必要的。

1 资料与方法

1.1 一般资料 于 2024 年 3 月从基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库下载原发性肝癌(HCC)的基因表达数据及相应的临床信息,从 GEO 下载 GSE17548 和 GSE45436 的基因表达谱。GSE17548 和 GSE45436 的基因表达谱和微阵列处理由 Yildiz^[12]和 Melis 等^[13]报告。基于 TCGA 与 GEO 数据队列,使用 R 语言进行皮尔逊相关分析,以评估 m6A 修饰调控因子与 lncRNA-ZMIZ1-AS1 的表达相关性。此外,将 lncRNA-ZMIZ1-AS1 分为高表达组和低表达组,分析 m6A 修饰调控因子的表达水平。

1.2 方法

1.2.1 功能富集分析 使用基因集富集分析(GSEA)对 lncRNA-ZMIZ1-AS1 高表达组和低表达组进行 KEGG 富集分析。将这两组 lncRNA-ZMIZ1-AS1 上传至 GSEA 的分子特征数据库中进行基因集分析,假发现率(FDR)q 值设定为 <0.05,报告前七个富集的经典信号通路。

1.2.2 细胞培养和转染 HepG2 细胞由美国典型培养物收藏中心(ATCC)提供,培养于含 10% 胎牛血清的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(Invitrogen Life Technologies),在含 5% CO₂ 的湿润培养箱中于 37℃ 下孵育。所有细胞系均常规监测支原体且结果为阴性。从上海吉凯基因化学有限公司购买 HBx 过表达慢病毒载体,并使用 HitransG 病毒感染试剂盒感染 HepG2 细胞。此外,从上海吉凯基因化学有限公司购买 CAS9 Easy 慢病毒(KO 单载体)质粒,利用 Lipofectamine TM2000 转染试剂将质粒转染至已验证且稳定转染 HBx 的 HepG2 细胞中,以沉默 lncRNA-ZMIZ1-AS1。转染步骤按照试剂说明书进行。

1.2.3 RNA 提取和实时 PCR(RT-PCR) 利用 Molpure[®]细胞/组织总 RNA 提取试剂盒(YEASEN Co. Ltd.)从细胞中提取 RNA,使用 PrimeScript[™] RT 试剂盒(TaKaRa)合成 cDNA,并储存在 -20℃ 备

用。实时聚合酶链反应(实时 PCR)分析使用 TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II(Tli RNaseH Plus)试剂盒(TaKaRa),每个样品重复三次。内参基因为 GAPDH。

1.2.4 蛋白质印迹 总蛋白利用 10% SDS-PAGE 分离后转移到 PVDF 膜上。用 PBS 洗涤膜后,用 5% 脱脂奶粉封闭,并按制造商推荐的稀释比例在 4℃ 下孵育一夜。接着,在室温下用二抗孵育 2 小时。使用增强化学发光试剂盒(武汉 Servicebio 科技有限公司)识别免疫反应带。使用 Tanon 荧光图像分析系统软件 V2.0 曝光蛋白带,结果由 Gel Pro 分析器 4 软件扫描并表示为目标蛋白的积分光密度(IOD)。主要抗体包括:抗 HBx(1:1000, ab309352, Abcam, 英国剑桥)、抗 PTBP1(1:5000, 67462-1-Ig, Proteintech)、抗 ZMIZ1(1:1000, 862123, Zenbio)和抗 GAPDH(1:1000, GB11002, Servicebio, 中国武汉)。GAPDH 作为内参蛋白使用。

1.2.5 微阵列分析 人类 m6A 表观转录组微阵列和 mRNA 微阵列分析由 Arraystar 公司(美国马里兰州罗克维尔)进行。总 RNA 使用抗 N6-甲基腺苷(m6A)抗体进行免疫沉淀,免疫沉淀磁珠的洗脱液称为“IP”,回收的上清液称为“Sup”。“IP”和“Sup”RNA 分别使用 Cy5 和 Cy3 进行标记。合并后,将其杂交到 Arraystar 人类 m6A 表观转录组微阵列(8×60K Arraystar)上,最后通过 Agilent 扫描仪 G2505C 扫描阵列信号。

1.2.6 MeRIP-qPCR 将 1~3 μg 总 RNA 和 m6A 控制混合物加入到含有 2 μg 抗 m6A 兔多克隆抗体(Synaptic Systems)的 300 μl 1IP 缓冲液(50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% NP40, 40 U/μL RNase 抑制剂)中。每个样品使用 20 μl Dynabeads[™] M-280 羊抗兔 IgG 悬浮液,在 4℃ 下用新鲜制备的 0.5% BSA 封闭 2 小时,用 300 μl 1IP 缓冲液洗涤三次后重新悬浮于上述的 RNA 抗体混合物中。混合物在 4℃ 下头尾旋转孵育 2 小时。用 200 μl 洗脱缓冲液在 50℃ 下洗脱富集的 RNA 1 小时,随后进行 qRT-PCR 检测。

1.2.7 Transwell 迁移与侵袭实验 为了评估细胞的迁移和侵袭能力,将 HepG2 细胞饥饿培养 24 小时。使用 1:8 稀释的 Matrigel 涂覆 8 μm 孔径的 Transwell 滤膜底部(细胞迁移实验中不进行此步骤)。将稀释后的单细胞悬液(1×10⁵; 200 μl)加入 Transwell 上室,加入含 15% FBS 的培养基(600 μl)于下室。细胞在 37℃ 下孵育 24 小时后,用 3.7% 甲醛固定 15 分钟, PBS 洗涤后用结晶紫染色 10 分钟。随后擦除上室中的未迁移/侵袭细胞,统计三

个独立实验中侵袭或迁移细胞的数量。

1.2.8 细胞活力分析 根据说明使用 Cell Counting Kit-8 试剂盒 (Biosharp) 评估细胞增殖情况,通过测定 24、48 和 72 小时的吸光度值 (OD) 绘制细胞生长曲线。

1.2.9 流式细胞术分析细胞凋亡与细胞周期 利用 Annexin V-APC 凋亡检测试剂盒 (南京凯基生物技术有限公司) 根据制造商协议检测 LncRNA-ZMIZ1-AS1 对 HepG2 细胞凋亡的影响。将细胞 (5×10^5 细胞/毫升) 收集后在室温下用 7-氨基放线菌素 D 和 Annexin V/APC 双染色 15 分钟,随后利用 Cyt-oflex 流式细胞仪 (贝克曼库尔特公司,美国布雷亚) 和 CytExpert 软件分析各组的凋亡细胞。将漂浮和贴壁细胞收集、合并,用磷酸盐缓冲液洗涤一次,并在 70% 乙醇中固定过夜。通过细胞周期检测试剂盒 (KGA512;凯基生物技术有限公司,南京,中国) 检测 DNA 含量,使用 CytOflex 流式细胞仪和 CytExpert 软件分析。

1.3 统计学方法 数据分析使用 SPSS 23.0 统计学软件和 GraphPad 软件。组间数据比较采用双尾未配对或配对 *t* 检验进行分析。通过卡方检验或 Fisher 精确检验进行评估 LncRNA-ZMIZ1-AS1 表达

水平和患者临床病理特征。Kaplan-Meier 曲线用于描述生存函数,Log-rank 检验用于评估不同组之间的显著性差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LncRNA-ZMIZ1-AS1 与肝癌患者临床预后相关性分析 通过过表达慢病毒载体构建了 HBx 稳定转染的 HepG2 肝癌细胞系 (HepG2-HBx),并使用 WB 技术验证了 HBx 的表达 (图 1)。此外,通过 m6A 表观转录组芯片检测 HBx 稳定转染 HepG2 肝癌细胞系中的非编码 RNA 变化。生物信息学分析结合 GEO 和 TCGA 数据库结果表明,LncRNA-ZMIZ1-AS1 在肝癌细胞系中高表达,且与临床特征显著相关,见表 1。此外,m6A 表观转录组芯片结果显示,LncRNA-ZMIZ1-AS1 在 HBx 过表达细胞系中 m6A 修饰水平显著升高,与未转染 HBx 的肝癌细胞相比,表现出较高表达 (图 2)。进一步分析发现,LncRNA-ZMIZ1-AS1 的表达与 m6A 的阅读器蛋白 (包括 Reader、Writer 和 Eraser) 水平相关。同时,我们观察到 LncRNA-ZMIZ1-AS1 表达水平与免疫浸润之间的关系 (图 3)。基于作者课题组的早期 HepG2 实验结果^[14],选择 LncRNA-ZMIZ1-AS1 进行进一步实验。

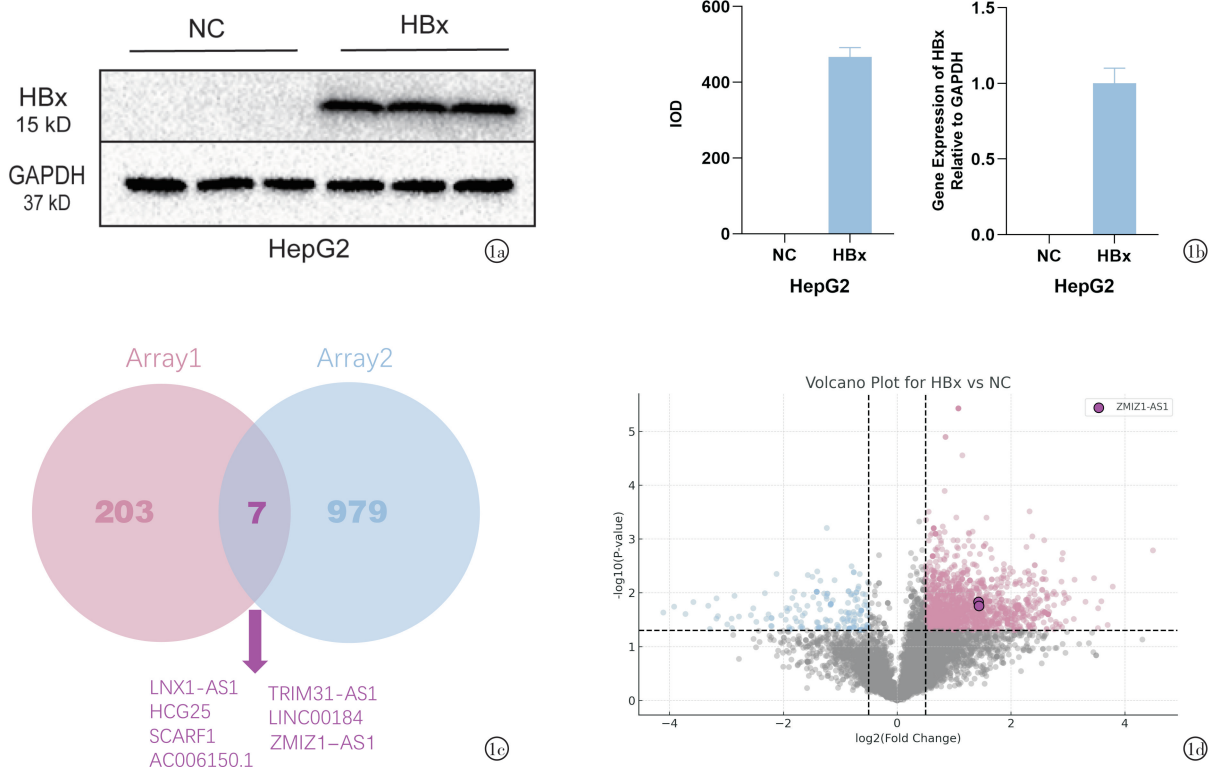


图 1 HBx 稳定转染细胞系的构建及 LncRNA-ZMIZ1-AS1 的筛选 a-b:WB 实验检测 HepG2 细胞系中 HBx 的表达水平,结果显示 HBx 在稳转组中的显著表达;c:通过 Venn 图展示了两个芯片的交集,包括 LncRNA-ZMIZ1-AS1、HCG25、TRIM31-AS1、LINC00184、SCARF1、AC006150.1 等候选基因;d:火山图展示了 m6A 表观转录组芯片的差异表达情况。

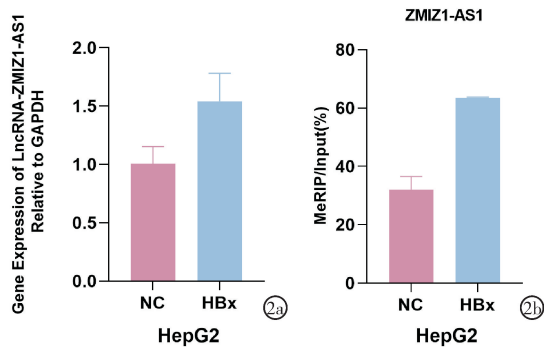


图2 HBx 稳定转染肝癌细胞中 lncRNA-ZMIZ1-AS1 的表达量和 m6A 修饰水平 a: 数据显示在 HepG2-HBx 细胞中 lncRNA-ZMIZ1-AS1 的高表达; b: 在 HepG2-HBx 细胞中 lncRNA-ZMIZ1-AS1 的 m6A 修饰水平显著升高。

2.2 敲低 lncRNA-ZMIZ1-AS1 抑制肝癌细胞活力、增殖、迁移与侵袭以及对细胞周期和凋亡的影响 针对 ZMIZ1-AS1 设计合成了三条 sgRNA 和一条阴性对照,并构建了 sgRNA 载体,通过质粒瞬时转染敲低 ZMIZ1-AS1 表达水平(图 4a)。利用 qRT-PCR 检测 HepG2-HBx 稳定转染细胞中 lncRNA ZMIZ1-AS1 的干扰效率,并选取干扰效果最好的

sgRNA 用于生物学行为实验。通过 CCK8 实验、Transwell 小室实验及流式细胞技术,从细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡四个方面观察敲低 ZMIZ1-AS1 对肝癌细胞生物学行为的影响。我们选取干扰效果最好的 sgRNA3,通过瞬时转染敲低 HepG2-HBx 稳定转染细胞中 lncRNA ZMIZ1-AS1 的表达水平,构建了空白对照、sgRNA3-ZMIZ1-AS1 及 sgRNA-control 三组。利用 CCK8 实验以验证 lncRNA ZMIZ1-AS1 表达水平对细胞增殖水平的影响。结果显示,三组细胞在 24、48、72 h 后活跃度有显著统计学差异,敲低 ZMIZ1-AS1 显著降低了细胞的增殖水平(图 4b)。通过瞬时转染敲低 lncRNA ZMIZ1-AS1 表达水平,通过 Transwell 迁移与侵袭实验发现 sgRNA-control 组中侵袭基质胶的肝癌细胞数量显著高于 sgRNA3-ZMIZ1-AS1 组,差异有显著的统计学意义 ($P < 0.05$),见图 4c ~ 4e。进一步利用流式细胞技术分析 lncRNA-ZMIZ1-AS1 表达水平的变化对细胞周期和凋亡的影响。实验显示,sgRNA3-ZMIZ1-AS1 组与 sgRNA-control 组之间在细胞周期和凋亡率方面差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 5。

表1 TCGA 数据中 lncRNA-ZMIZ1-AS1 高低表达组的临床特征 [n(%)]

临床特点		高表达	低表达	χ^2	P
年龄	<65 岁	112(32.7)	111(32.5)	0.001	0.972
	≥65 岁	60(17.5)	59(17.3)		
性别	女	67(19.6)	42(12.3)	7.993	0.005
	男	105(30.7)	128(37.4)		
G 分级	G1	19(5.6)	26(7.6)	1.633	0.652
	G2	87(25.4)	81(23.7)		
	G3	59(17.3)	58(17.0)		
	G4	7(2.0)	5(1.5)		
S 分期	S1	76(22.2)	93(27.2)	7.854	0.047
	S2	40(11.7)	43(12.6)		
	S3	52(15.2)	33(9.6)		
	S4	4(1.2)	1(0.3)		
T 分期	T1	77(22.5)	94(27.5)	8.153	0.043
	T2	41(12.0)	44(12.9)		
	T3	49(14.3)	27(7.9)		
	T4	5(1.5)	5(1.5)		
N 分期	N0	134(50.6)	127(47.9)	0.883	0.623
	N1	3(1.1)	1(0.4)		
M 分期	M0	130(51.0)	121(47.5)	0.005	1
	M1	2(0.8)	2(0.8)		

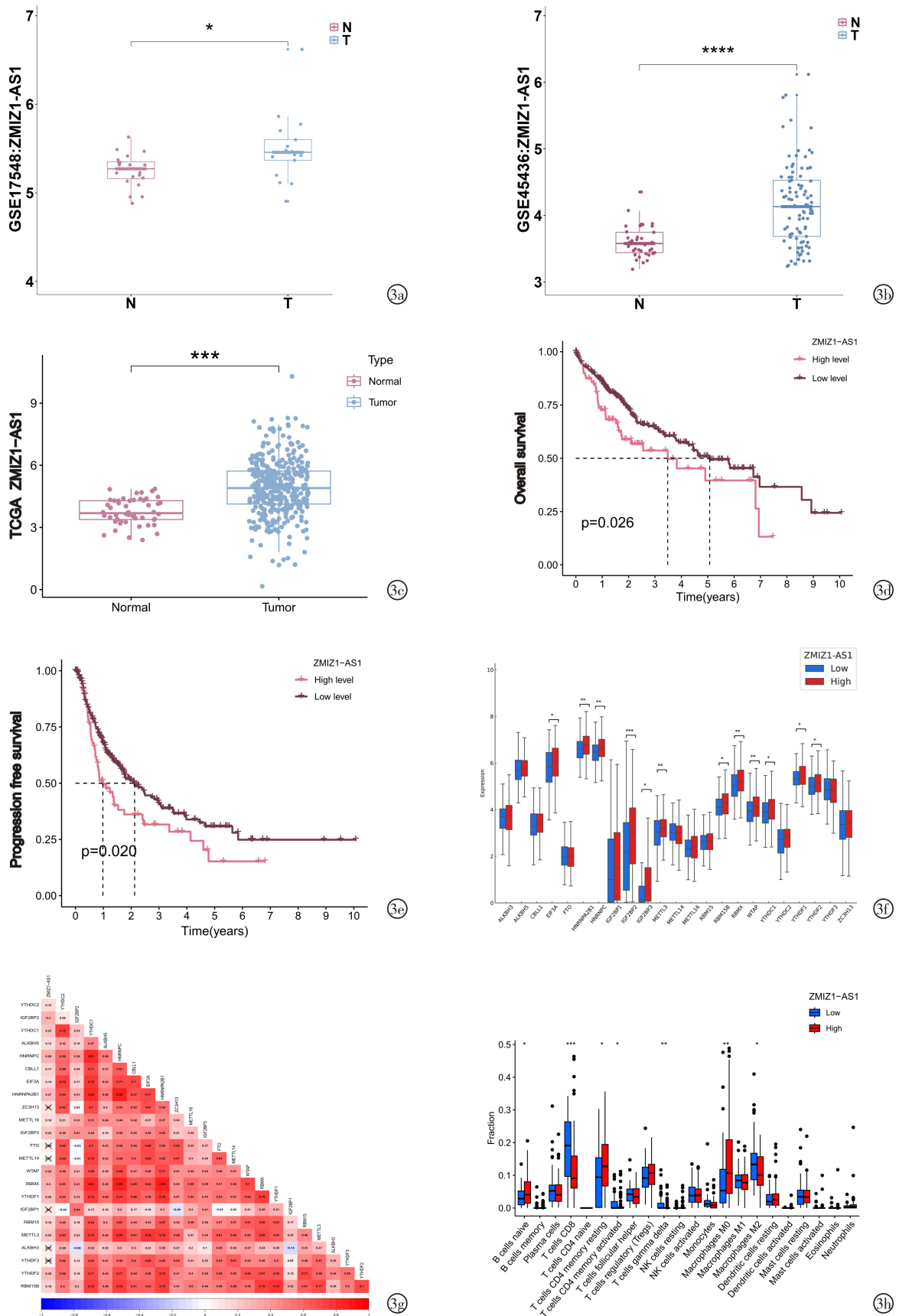


图3 基于 GEO 和 TCGA 数据库的 LncRNA-ZMIZ1-AS1 基因相关性与临床病理特征分析 a: 在 GSE17548 数据库中, HCC 患者 LncRNA-ZMIZ1-AS1 的表达显著高于非肿瘤患者; b: GSE45436 数据库结果显示同样的趋势; c: TCGA 数据库进一步证实 HCC 患者中 LncRNA-ZMIZ1-AS1 的高表达; d ~ e: Kaplan - Meier 曲线显示, LncRNA-ZMIZ1-AS1 高表达患者的总生存期 (OS) 和无进展生存期 (PFS) 均较低表达患者短; f - g: 展示了 LncRNA-ZMIZ1-AS1 高低表达分组中 m6A 相关基因的差异和共表达关系; h: 免疫浸润图显示 LncRNA-ZMIZ1-AS1 表达水平对不同免疫细胞浸润的影响。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

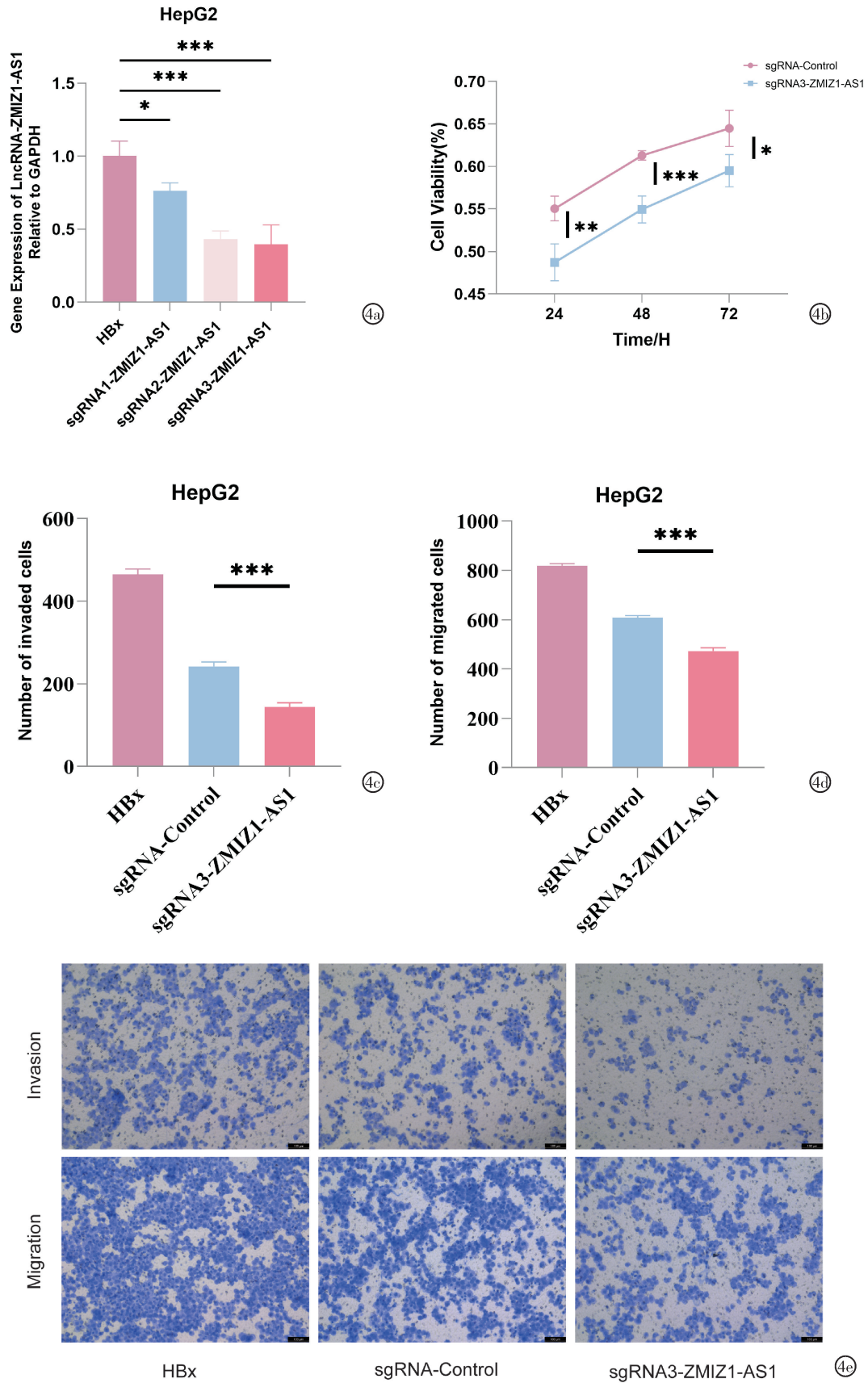


图4 敲低 lncRNA ZMIZ1-AS1 后对细胞活力及侵袭迁移能力的影响 a:合成3条 sgRNA,通过 qRT-PCR 检测 HepG2-HBx 稳转细胞中 lncRNA ZMIZ1-AS1 的干扰效率,筛选出干扰效果最佳的 sgRNA;b:在 CCK8 实验中,敲低 lncRNA ZMIZ1-AS1 后细胞活力在 24 小时,48 小时和 72 小时显著下降;c~e:Transwell 实验结果显示,低表达 ZMIZ1-AS1 可显著降低 HepG2-HBx 稳转细胞的迁移与侵袭能力。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

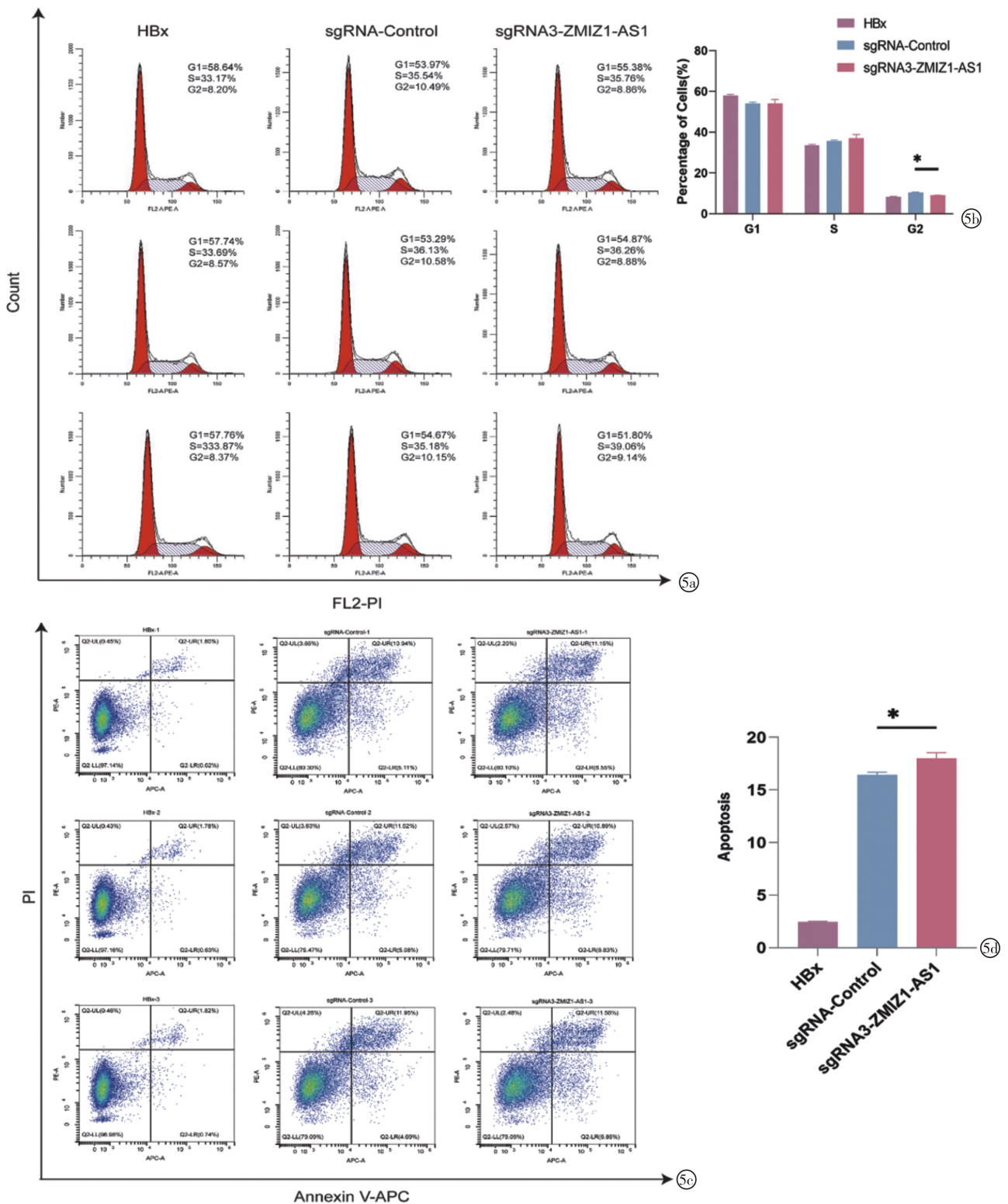


图5 敲低 lncRNA ZMIZ1-AS1 后对细胞周期及凋亡的影响 a ~ b; 细胞周期分析结果表明, 敲低 lncRNA ZMIZ1-AS1 显著减少了 G2 期细胞的比例 ($n=3$); c ~ d; 凋亡实验结果显示, 低表达 ZMIZ1-AS1 显著提高了 HepG2-HBx 稳转肝癌细胞的凋亡率 ($n=3$)。* $P<0.001$

2.3 lncRNA-ZMIZ1-AS1 正向调控 ZMIZ1 的表达 Western blot 结果表明, 敲低 lncRNA-ZMIZ1-AS1 可显著降低 ZMIZ1 的表达水平, 但对 PTBP1 的表达并无显著影响 (图 6)。该结果提示, lncRNA-ZMIZ1-AS1 可能通过与 PTBP1 相互作用来稳定

ZMIZ1 的表达, 从而在肿瘤细胞中促进恶性表型的形成。KEGG 富集分析显示, lncRNA-ZMIZ1-AS1 可能与多条信号通路相关, 包括 NOTCH、ERBB、NEUROTROPHIN、INSULIN、GNRH、VEGF、以及 TOLL LIKE RECEPTOR 信号通路 (图 7)。

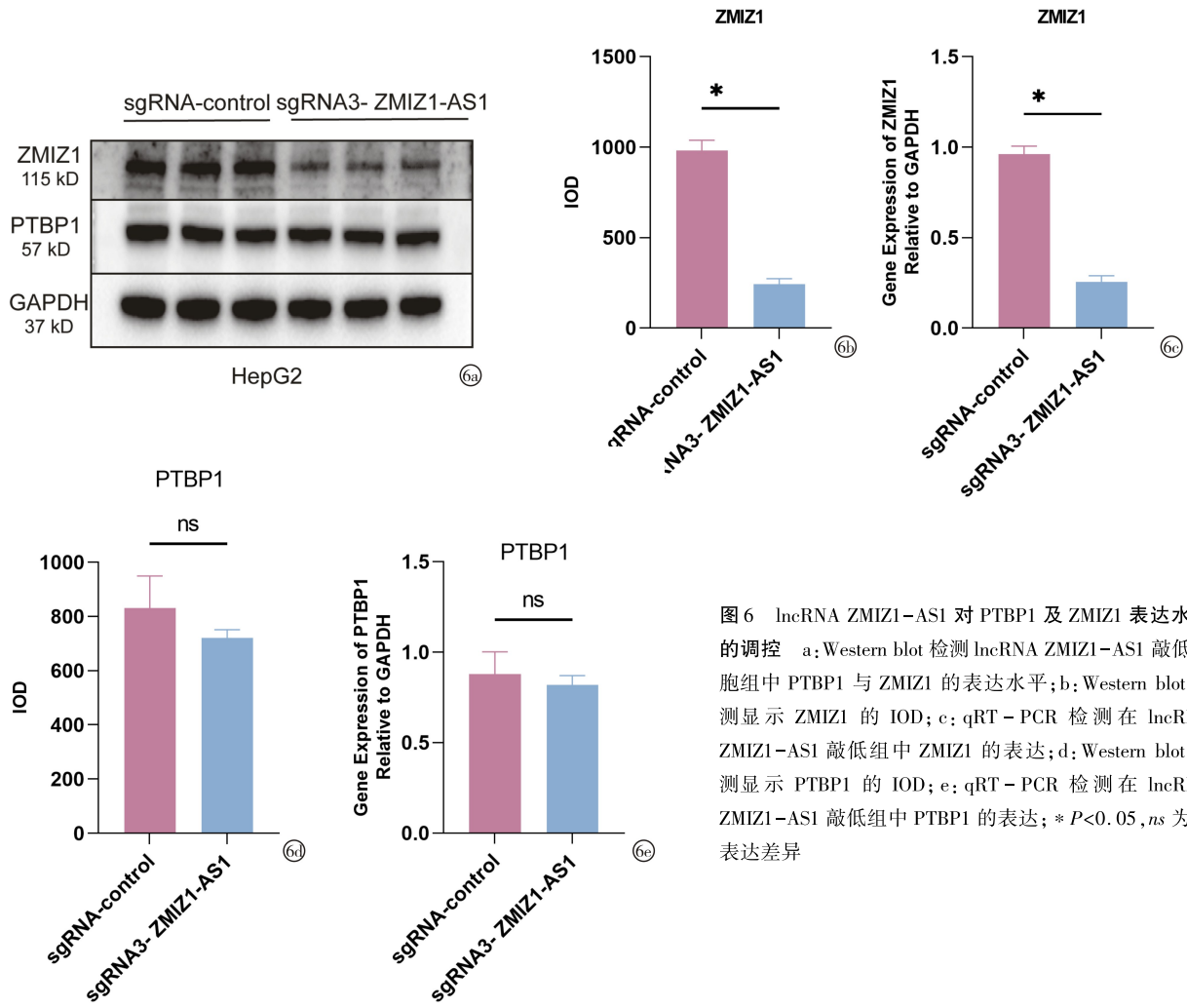
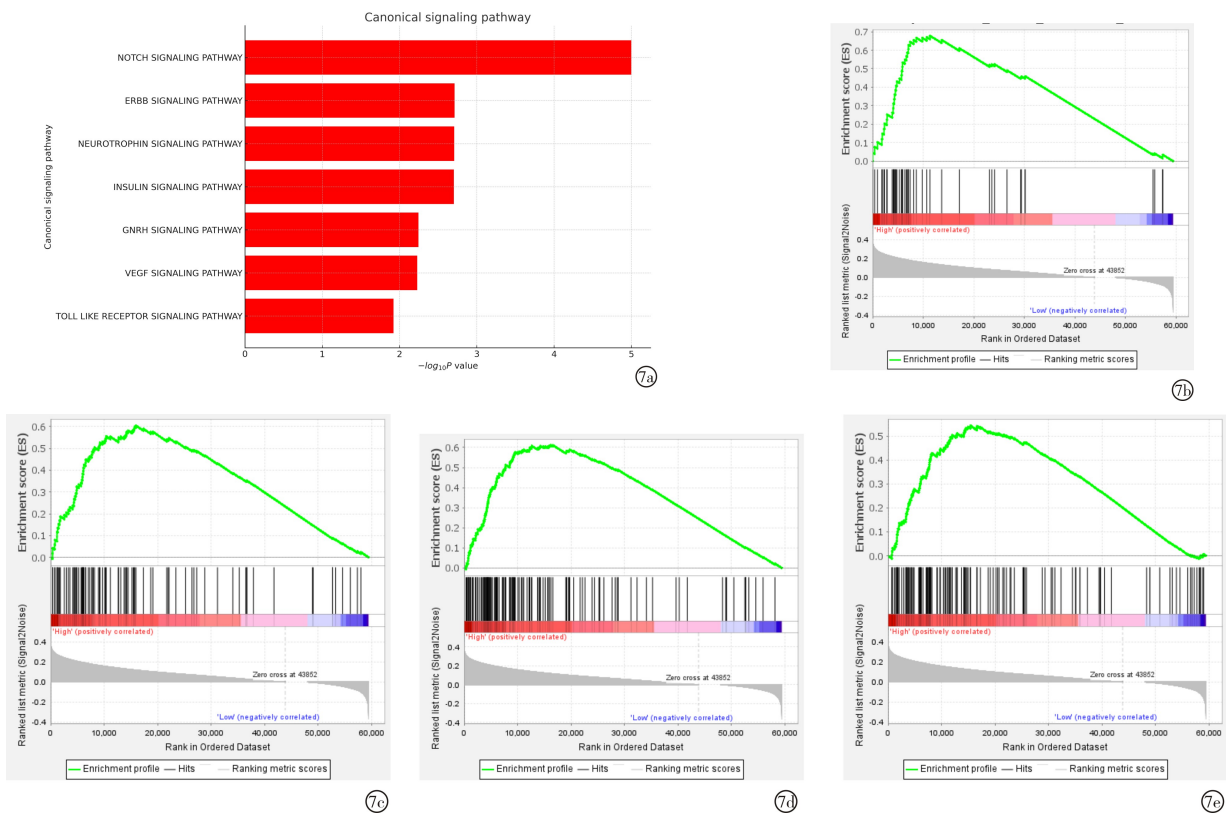


图6 lncRNA ZMIZ1-AS1 对 PTBP1 及 ZMIZ1 表达水平的调控 a; Western blot 检测 lncRNA ZMIZ1-AS1 敲低细胞组中 PTBP1 与 ZMIZ1 的表达水平; b; Western blot 检测显示 ZMIZ1 的 IOD; c; qRT-PCR 检测在 lncRNA ZMIZ1-AS1 敲低组中 ZMIZ1 的表达; d; Western blot 检测显示 PTBP1 的 IOD; e; qRT-PCR 检测在 lncRNA ZMIZ1-AS1 敲低组中 PTBP1 的表达; * $P < 0.05$, ns 为无表达差异



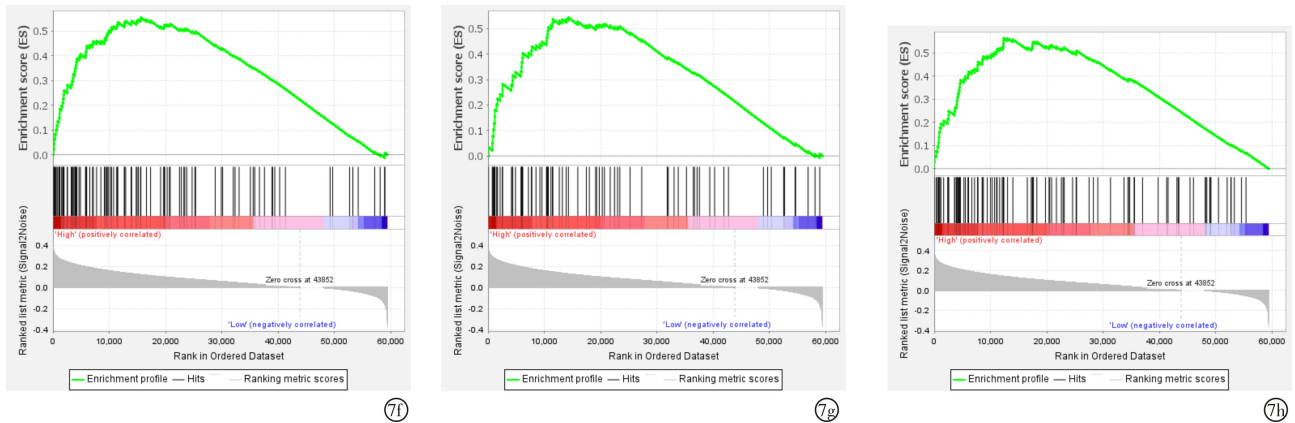


图7 基于 lncRNA ZMIZ1-AS1 共表达基因的富集分析 a: GSEA 基因集富集分析表明, lncRNA ZMIZ1-AS1 的共表达基因在前七个信号通路中显著富集; b: KEGG 富集分析展示了 NOTCH 信号通路的相关性; c: KEGG 富集分析展示了 ERBB 信号通路的相关性; d: KEGG 富集分析展示了 NEUROTROPHIN 信号通路的相关性; e: KEGG 富集分析展示了 INSULIN 信号通路的相关性; f: KEGG 富集分析展示了 GNRH 信号通路的相关性; g: KEGG 富集分析展示了 VEGF 信号通路的相关性; h: KEGG 富集分析展示了 TOLL LIKE RECEPTOR 信号通路的相关性

3 讨论

LncRNA-ZMIZ1-AS1 作为一种长链非编码 RNA, 主要通过和蛋白质、小分子 RNA 或 DNA 进行相互作用来发挥功能。它可能通过影响转录调控、mRNA 的稳定性或蛋白质的翻译过程, 进一步调控基因表达。具体而言, LncRNA-ZMIZ1-AS1 可通过与 RNA 结合蛋白 PTBP1 相互作用, 调控 ZMIZ1 mRNA 的稳定性。ZMIZ1-AS1 通过招募 PTBP1 来维持 ZMIZ1 的表达, 从而促进骨肉瘤细胞的生长、侵袭和迁移, 进一步影响细胞功能和生存状态, 展现了其作为典型 lncRNA 的调控邻近基因表达的功能^[10]。此外, 有研究团队探讨了 lncRNA-ZMIZ1-AS1 在胶质母细胞瘤中的表达及其功能。LncRNA-ZMIZ1-AS1 在胶质母细胞瘤中的表达水平显著升高, 且与肿瘤的恶性表型密切相关。通过敲低 LncRNA-ZMIZ1-AS1 的表达, 观察到肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移能力显著下降, 而凋亡率显著增加。进一步的分子机制研究揭示了 LncRNA-ZMIZ1-AS1 通过与 RNA 结合蛋白 PTBP1 相互作用, 进而影响 PTBP1 与 ZMIZ1 的结合, 从而调控 ZMIZ1 的表达并影响胶质母细胞瘤的恶性表型^[11]。这些发现表明, LncRNA-ZMIZ1-AS1 在骨肉瘤以及在胶质母细胞瘤的病理过程中起到了关键作用。此外在肝细胞癌的研究中, 发现 circZMIZ1 通过调节 miR-15a-5p/KCNJ2 轴来抑制 CD8⁺ T 细胞的抗肿瘤活性, 进而促进肝细胞癌的发展。这提示了 LncRNA-ZMIZ1-AS1 的表达可能与肿瘤的免疫逃逸和免疫治疗的效果密切相关^[15]。JIANG 等^[16] 也发现 circZMIZ1 在人类前列腺癌患者的血浆中的表达高于配对良性前列腺增生患者, 敲低 circZMIZ1 抑制了细胞增殖, 并导致细胞周期停滞在 G1。作者认为 circZMIZ1

可以增加雄激素受体和雄激素受体剪接变体 7 (AR-V7) 的表达导致癌症发生和发展的。

生物信息学分析显示, ZMIZ1-AS1 的高表达与性别、临床分期和肿瘤分期显著相关, 提示其可能作为肝癌进展的潜在生物标志物。m6A 表观转录组分析发现, ZMIZ1-AS1 在 HBx 转染的 HepG2 细胞中显著修饰。通过 m6A 表观转录组芯片分析, 发现 LncRNA-ZMIZ1-AS1 在 HBx 稳定转染的 HepG2 细胞中存在显著的 m6A 修饰, 提示其可能通过 m6A 修饰影响自身的稳定性、转录或翻译效率, 从而在肝癌细胞中发挥重要的生物学作用。近年来, m6A 修饰作为 RNA 的重要修饰形式在癌症中被证实具有关键作用^[17, 18], 而 LncRNA-ZMIZ1-AS1 的 m6A 修饰可能赋予其独特的调控功能, 使其能够与特定蛋白或 RNA 结合, 影响肿瘤的发生和进展。进一步分析还表明, LncRNA-ZMIZ1-AS1 的高表达与 m6A “阅读器”蛋白水平密切相关, 这些蛋白可能通过识别 m6A 标记的 LncRNA-ZMIZ1-AS1 调控其功能。LncRNA-ZMIZ1-AS1 的表达水平正向调控了 ZMIZ1 的表达, 但对 PTBP1 无显著影响^[10]。该结果提示, LncRNA-ZMIZ1-AS1 通过与 PTBP1 的相互作用稳定 ZMIZ1 表达, 进而促进肿瘤细胞的恶性表型。先前研究也指出了 LncRNA-ZMIZ1-AS1 与 PTBP1 的互作机制, 进一步验证了 LncRNA-ZMIZ1-AS1 在调控邻近基因表达中的关键作用。LncRNA-ZMIZ1-AS1 在肝癌中的高表达及其对细胞恶性表型的促进作用表明其有望作为肝癌诊断及治疗的潜在标志物。m6A 修饰或许是 LncRNA-ZMIZ1-AS1 功能调控的重要环节, 深入研究 m6A 修饰与其他信号通路 (如 NOTCH 信号通路) 共同调控 LncRNA-ZMIZ1-AS1 的表达和功能, 为表观遗传在肿瘤中的应用研究提供

新的视角和方向。需要指出的是,本实验在揭示 LncRNA-ZMIZ1-AS1 在肝癌细胞恶性表型调控中的作用方面取得了一定成果,但仍存在一些不足之处。首先,实验未进一步进行详细的信号通路机制研究,例如缺乏对 LncRNA-ZMIZ1-AS1 如何通过特定信号通路(如 NOTCH 或其他肿瘤相关通路)调控肝癌细胞行为的深入实验,这在一定程度上限制了对其分子机制的全面理解。此外,本研究未进行挽救实验,未进一步探讨 LncRNA-ZMIZ1-AS1、PTBP1 与 ZMIZ1 之间的相互作用关系。如果能通过挽救实验确认 LncRNA-ZMIZ1-AS1 敲低后是否可以通过外源表达 PTBP1 或 ZMIZ1 恢复肝癌细胞的部分恶性表型,将能更有力地验证 PTBP1 在这一调控机制中的角色。本实验还未能使用小鼠模型进一步验证 LncRNA-ZMIZ1-AS1 在肝癌进展中的具体作用。体外细胞实验虽然揭示了 LncRNA-ZMIZ1-AS1 对肝癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响,但缺乏体内模型的支持,难以全面反映其在肿瘤微环境中的实际表现和潜在影响。总而言之,本实验初步证明了 LncRNA-ZMIZ1-AS1 在肝癌细胞恶性表型中的重要作用,其高表达能够促进细胞的增殖、迁移和侵袭,提示 LncRNA-ZMIZ1-AS1 可能是肝癌进展的潜在生物标志物。

综上,本研究为 LncRNA-ZMIZ1-AS1 在肝癌中的生物学功能提供了初步证据,奠定了未来深入探讨其调控机制的基础。同时,实验结果支持了 LncRNA-ZMIZ1-AS1 在癌症表观遗传调控中的潜在作用,尤其是在 m6A 修饰和 PTBP1 相互作用方面,具有进一步研究的价值。

【参考文献】

- [1] De Lope CR, Tremosini S, Forner A, et al. Management of HCC [J]. *Journal of hepatology*, 2012, 56(Suppl 1): S75-87.
- [2] Cauchy F, Soubrane O, Belghiti J. Liver resection for HCC: patient's selection and controversial scenarios [J]. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 2014, 28(5): 881-896.
- [3] Thabut D, Kudo M. Treatment of portal hypertension in patients with HCC in the era of Baveno VII [J]. *Journal of hepatology*, 2023, 78(3): 658-662.
- [4] Brown ZJ, Tsilimigras DI, Ruff SM, et al. Management of Hepatocellular Carcinoma: A Review [J]. *JAMA surgery*, 2023, 158(4): 410-420.
- [5] Wang J, Zhu S, Meng N, et al. ncRNA-Encoded Peptides or Proteins and Cancer [J]. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 2019, 27(10): 1718-1725.
- [6] Nemeth K, Bayraktar R, Ferracin M, et al. Non-coding RNAs in disease: from mechanisms to therapeutics [J]. *Nature reviews Genetics*, 2024, 25(3): 211-232.
- [7] Slack FJ, Chinnaiyan AM. The Role of Non-coding RNAs in Oncology [J]. *Cell*, 2019, 179(5): 1033-1055.
- [8] Tan YT, Lin JF, Li T, et al. LncRNA-mediated posttranslational modifications and reprogramming of energy metabolism in cancer [J]. *Cancer Communications (London, England)*, 2021, 41(2): 109-120.
- [9] Bridges MC, Daulagala AC, Kourtidis A. LNCeation: lncRNA localization and function [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2021, 220(2): e202009045.
- [10] Zhou Y, Jin Q, Chang J, et al. Long non-coding RNA ZMIZ1-AS1 promotes osteosarcoma progression by stabilization of ZMIZ1 [J]. *Cell Biology and Toxicology*, 2022, 38(6): 1013-1026.
- [11] 郭桐其. LncRNA ZMIZ1-AS1 对胶质母细胞瘤恶性表型的影响及相关机制的研究[D]. 中国医科大学, 2023.
- [12] Yildiz G, Arslan-Ergul A, Bagislar S, et al. Genome-wide transcriptional reorganization associated with senescence-to-immortality switch during human hepatocellular carcinogenesis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e64016.
- [13] Melis M, Diaz G, Kleiner DE, et al. Viral expression and molecular profiling in liver tissue versus microdissected hepatocytes in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma [J]. *J Transl Med*, 2014, 12: 230.
- [14] Wu G, Yu F, Xiao Z, et al. Hepatitis B virus X protein downregulates expression of the miR-16 family in malignant hepatocytes in vitro [J]. *British Journal of Cancer*, 2011, 105(1): 146-153.
- [15] Li X, Wu A, Wang Y, et al. Knockdown of circZMIZ1 enhances the anti-tumor activity of CD8(+) T cells to alleviate hepatocellular carcinoma [J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2024, 24(1): 27.
- [16] Jiang H, Lv DJ, Song XL, et al. Upregulated circZMIZ1 promotes the proliferation of prostate cancer cells and is a valuable marker in plasma [J]. *Neoplasia*, 2020, 67(1): 68-77.
- [17] An Y, Duan H. The role of m6A RNA methylation in cancer metabolism [J]. *Molecular Cancer*, 2022, 21(1): 14.
- [18] Sun T, Wu R, Ming L. The role of m6A RNA methylation in cancer [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 112: 108613.

(收稿日期:2024-11-03;修回日期:2024-12-06)

(本文编辑:彭羽)