

LncRNA HOTAIR 通过靶向 DNMT1/PTEN 通路促进肝癌转移

刘涛¹ (通讯作者) 李长虹²

1. 济宁医学院附属医院肝胆外科 山东 济宁 272029

2. 济宁医学院 (临床医学院) 山东 济宁 272067

【摘要】背景: 长链非编码 RNA (Long non-coding RNA, LncRNA) 在肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 的发生发展中发挥重要作用。本研究旨在探讨 HOTAIR 在 HCC 中的表达模式及其调控肿瘤转移的具体机制。方法: 采用 Northern blot 检测临床样本中 HOTAIR 的水平; 通过 Western blot 分析 HOTAIR、DNMTs 与 PTEN 之间的调控关系; 利用划痕试验和 Transwell 实验评估细胞的迁移与侵袭能力。结果: HOTAIR 在肝癌组织中显著高表达。HOTAIR 能够上调 DNMT1 和 DNMT3A 的表达, 进而抑制抑癌基因 PTEN 的水平。过表达 HOTAIR 显著增强了肝细胞的迁移和侵袭能力, 而这一效应可被 DNMT1 的敲低所逆转。回复实验证实, 敲低 DNMT1 可显著逆转 HOTAIR 引起的 PTEN 下调及细胞迁移能力的增强。结论: HOTAIR 通过 DNMT1/PTEN 轴促进肝癌的进展, 可能作为肝癌治疗的潜在靶点。

【关键词】: LncRNA HOTAIR; DNMT1; PTEN; 肝细胞癌

DOI:10.12417/2705-098X.26.12.039

1 前言

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是全球癌症相关死亡的第四大原因, 也是肝硬化患者的主要死因。该疾病预后较差, 全球范围内的死亡率与发病率相当^[1,2], 在东亚、东南亚及非洲等地区发病率尤其突出。HCC 是原发性肝癌最主要的病理类型, 约占总病例数的 75%~85%。在我国, HCC 的发病率高居恶性肿瘤第 4 位, 其死亡率高、侵袭性强且预后极差, 严重威胁国民健康^[3]。流行病学研究显示, 乙型肝炎病毒 (HBV) 感染、丙型肝炎病毒 (HCV) 感染、长期大量饮酒、非酒精性脂肪肝、黄曲霉毒素暴露及遗传易感因素等是肝癌发生的重要危险因素, 其中 HBV 感染是驱动我国 HCC 发生的关键因素, 约 84.4% 的病例归因于 HBV 感染^[4]。临床观察表明, HCC 的发生通常经历慢性肝炎到肝硬化在转变为肝癌的病理演变过程^[5]。

长链非编码 RNA (Long non-coding RNA, LncRNA) 是在整个细胞中发现的超过 200 个核苷酸的转录本, 缺乏蛋白质编码功能, 其功能与 RNA 结合蛋白 (RBP) 和核酸的相互作用密切相关^[6,7]。目前, LncRNA 已被广泛研究, 揭示了具有结构和调节作用的复合物, 可实现基因组织和控制转录^[8]。LncRNA 可以通过其一二级序列和二级结构与核酸和/或蛋白质结合来调节基因表达程序, 从而控制细胞分裂、应激反应、分化、生存和衰老等细胞过程的数量增长^[9,10]。通过影响这些过程, 越来越多的人认识到 LncRNA 对组织和机体的生理有直接的影响器官, 以及越来越多的疾病过程^[11,12]。HOTAIR 在肝细胞癌组织中高表达, 其表达量显著高于癌旁组织和非癌组织, 敲低

HOTAIR 可以抑制肝癌细胞的增殖、迁移、侵袭和自噬功能^[13]。然而, HOTAIR 驱动肝癌演变的具体分子机制, 特别是其在表观遗传调控方面的作用, 仍有待进一步阐明。

DNA 甲基化是由 DNA 甲基转移酶 (DNA Methyltransferase, DNMT) 介导的常见表观修饰, 在调控肿瘤相关基因表达中起着至关重要的作用^[14,15]。已有研究表明, LncRNA 可作为分子支架, 通过招募 DNMT 等修饰酶导致抑癌基因的启动子区高度甲基化, 从而引起基因沉默^[16]。PTEN 作为一种经典的抑癌蛋白, 通过拮抗 PI3K/AKT 通路抑制肿瘤细胞的运动能力, 但在肝癌中常因表观遗传修饰而表达缺失^[17]。

本研究 LncRNA HOTAIR 为研究靶点, 以肝癌临床组织标本与细胞系为研究对象, 采用 Northern blot、Western blot、细胞划痕实验及 Transwell 实验等技术, 检测 HOTAIR 在肝癌组织中的表达水平, 探讨其对肝癌细胞迁移与侵袭能力的调控作用, 深入解析 HOTAIR 通过调控 DNMT1/PTEN 信号轴介导肝癌侵袭转移的分子机制。本研究旨在明确 HOTAIR 在肝癌中的生物学功能及调控机制, 为肝癌的早期诊断、预后评估及靶向治疗提供全新的实验依据与理论支持。

2 材料方法

2.1 临床标本收集

选取我院肝胆外科住院并确诊肝癌患者接受手术切除的肝细胞癌标本。所有患者术前均未接受放疗、化疗或介入治疗。手术过程中, 在完整切除肿瘤组织的同时, 同步采集距离瘤体边缘 2 cm 以上的癌旁正常组织作为对照。标本离体后立即置入无酶冷冻管中, 迅速投入液氮速冻, 随后转入 -80°C 超低温

冰箱长久保存, 以确保 RNA 及蛋白组分的生物活性。本研究方案经我院医学伦理委员会严格审查通过, 所有受试者均在术前签署知情同意书。

2.2 细胞培养与传代

本研究选用的实验细胞系包括人肝癌细胞株 HepG2、Huh7 以及人正常肝上皮细胞株 THLE-2。所有细胞均通过短串联重复序列 (STR) 鉴定, 并确认无支原体污染后用于后续实验。人肝癌 HepG2、Huh7 细胞采用高糖 DMEM 完全培养基进行常规培养, 培养基内添加 10% 胎牛血清与 1% 青链霉素双抗溶液。THLE-2 细胞采用 DMEM 培养基进行培养。所有细胞均置于 37°C、5%CO₂ 的恒温培养箱中。当细胞融合度达到 80%~90% 时, 吸弃旧培养基, 用无菌 PBS 润洗两次, 利用 0.25% 胰蛋白酶进行消化传代, 传代比例为 1:3~1:5。本研究所有实验均选用处于对数生长期的细胞进行。

2.3 细胞转染

构建 HOTAIR 过表达载体 (HOTAIR-OE)、阴性对照 (NC-OE)、HOTAIR 敲低载体 (sh-HOTAIR)、阴性对照 (sh-NC)、DNMT1 过表达载体 (DNMT1-OE) 及 DNMT1 敲低载体 (sh-DNMT1), 均由生物公司合成。体外培养肝癌细胞至对数生长期, 随后接种铺板; 待 6 孔板内细胞汇合度稳定在 60%~70%, 参照 Lipofectamine™3000 操作指南开展细胞转染。培养 6 h 后替换完全培养基, 继续孵育 48~72 h, 收集细胞样本, 采用蛋白质免疫印迹法检测转染效率, 用于后续实验。

2.4 Northern blot 检测临床样本中 HOTAIR 的表达

采用 TRIzol 试剂盒 (Invitrogen) 参照说明书提取组织总 RNA。取 30~50 mg 组织匀浆后, 经氯仿抽提、异丙醇沉淀及 75% 乙醇洗涤, 复溶于 RNase-free 水中。利用 NanoDrop 检测确保 A260/A280 比值处于 1.8~2.1 范围内。制备含 2.2 mol/L 甲醛的 1.2% 琼脂糖变性凝胶。每孔上样 15 μg 变性后的 RNA, 在 1×MOPS 缓冲液中进行电泳。通过紫外透射仪评估 28S 与 18S 核糖体 RNA 的完整性。随后利用向下毛细管虹吸法, 将 RNA 转移至带正电荷的尼龙膜上, 并经 120 mJ/cm² 能量紫外交联固定。膜在 42°C 预杂交液中浸泡 1 h, 随后加入标记的 HOTAIR 特异性单链 cDNA 探针进行杂交。洗膜后采用化学发光法或放射自显影记录信号, 重点分析 2.2 kb 位置的特异性杂交带强度。

2.5 Western Blot 实验

弃掉原有培养基, 采用预冷的 PBS 润洗细胞三遍, 加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 强效裂解液, 冰上充分裂解 30 min。12000 r/min、4°C 离心 15 min, 收集上清液, 通过 BCA 法测定总蛋白含量并统一各组蛋白上样量。取 30 μg 蛋白样品于 10% SDS-PAGE 凝胶中进行电泳分离 (恒压 80V 至 120V), 随后通过湿法转移技术将蛋白转移至 0.22 μm PVDF 膜上。

使用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液室温封闭 1 h, 随后分别加入 PTEN (1:1000)、DNMT1 (1:500)、DNMT3A (1:500) 及 β-actin (1:2000) 的一抗, 置于 4°C 摇床上震荡过夜。次日用 TBST 洗膜 3 次 (每次 10 min), 加入对应的 HRP 偶联二抗室温孵育 1.5 h。经 ECL 化学发光显影液处理后, 利用凝胶成像系统记录蛋白条带强度。

2.6 细胞划痕试验

将待测细胞均匀接种于 6 孔板中, 使其在 24 h 内达到 90% 以上的融合度。使用 200 μL 无菌加样枪头, 沿板底中心线进行垂直刻划, 确保各组划痕宽度尽量一致。用 PBS 轻缓润洗 3 次以去除悬浮的细胞碎片, 更换为含 1% FBS 的低血清培养基以抑制细胞增殖对迁移的影响。分别在 0 h 及 48 h 在倒置相差显微镜下观察同一视野并拍照。利用 ImageJ 软件测量划痕面积, 并计算相对愈合百分比。

2.7 Transwell 迁移及侵袭实验

采用 Transwell 小室评估细胞的运动能力。迁移实验: 将 5×10⁴ 个经无血清培养基悬浮的细胞加入上室, 下室加入含 20% FBS 的完全培养基作为趋化因子; 侵袭实验: 需预先在上室底部包被 Matrigel 胶, 其余步骤同迁移实验。各组细胞孵育 48 h 后, 用甲醇固定穿膜细胞, 并经 0.1% 结晶紫染色, 最后在显微镜下随机选取 5 个高倍视野进行细胞计数并取其平均值。

3 结果

3.1 HOTAIR 在肝细胞癌组织中的表达模式

Northern blot 结果显示, 在 2.2 kb 位置可观察到 HOTAIR 的特异性杂交条带。通过对 12 对临床样本进行检测发现, 与配对的癌旁组织 (adjacent) 相比, HOTAIR 在肝细胞癌组织 (tumor) 中的表达水平普遍显著升高 (图 1), 提示其在肝癌发生发展中具有潜在的促癌作用。

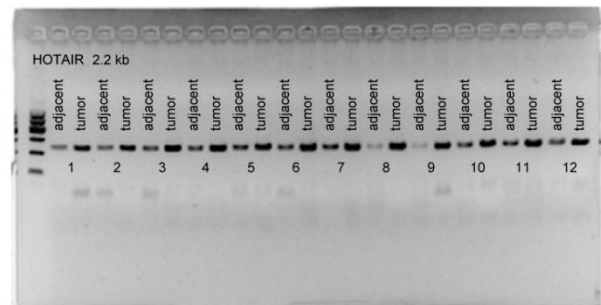


图 1 肝细胞癌组织及对应癌旁组织中 HOTAIR 表达水平的 Northern blot 检测

3.2 HOTAIR 通过 DNMTs 负向调控 PTEN 蛋白表达

本研究分别在 HepG2 和 THLE-2 细胞中进行干预实验并检测蛋白水平 (图 2)。Western blot 结果显示, 在 HepG2 细胞中, 敲低 HOTAIR (sh-HOTAIR) 导致 DNMT1 和 DNMT3A

水平下降，同时抑癌蛋白 PTEN 表达上调；而在 sh-HOTAIR 基础上回补 DNMT1 或 DNMT3A 表达，可显著抑制 PTEN 的回升。在 THLE-2 细胞中，过表达 HOTAIR (HOTAIR-OE) 诱导了 DNMT1 和 DNMT3A 的表达，并伴随 PTEN 水平下调；而通过 sh-DNMT1/3A 干扰 DNMTs 表达，可逆转 HOTAIR 对 PTEN 的抑制作用。以上结果表明，HOTAIR 通过正向调控 DNMTs 水平进而介导 PTEN 的蛋白抑制。

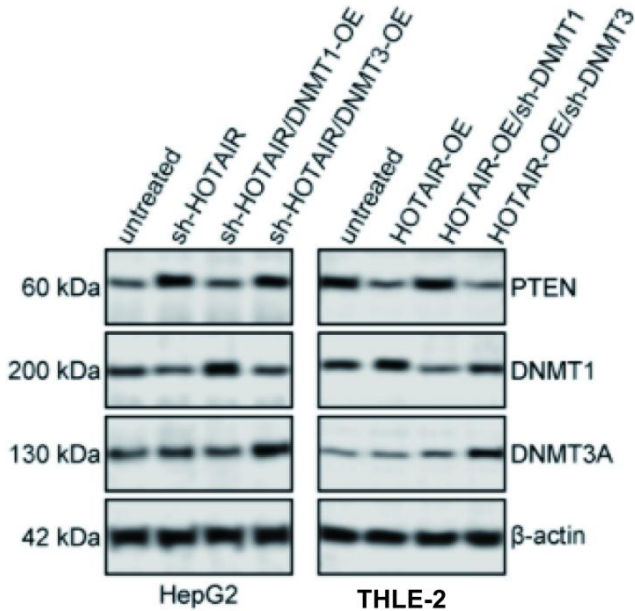


图2 HOTAIR 对 DNMT1 及 PTEN 蛋白表达的调控作用

3.3 HOTAIR 通过 DNMT1 增强肝癌细胞的迁移能力

划痕试验结果显示(图3)，THLE-2 细胞过表达 HOTAIR 后，48 h 内的划痕愈合速度明显加快，而联用 sh-DNMT1 可显著削弱 HOTAIR 对迁移的促进效应。在 HepG2 细胞中，敲低 HOTAIR 显著抑制了细胞迁移，使划痕愈合变慢；而回补 DNMT1 (DNMT1-OE) 则可部分恢复细胞的迁移活性。这说明 HOTAIR 促进细胞迁移的功能高度依赖于 DNMT1。

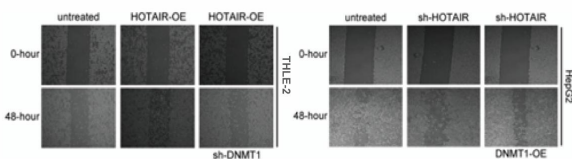


图3 划痕实验。0 h 及 48 h 拍照记录不同处理组细胞划痕愈合情况

3.4 HOTAIR-DNMT1 轴对肝癌细胞侵袭与趋化迁移的影响

Transwell 实验进一步验证了上述结果。在侵袭实验中：THLE-2 细胞过表达 HOTAIR 后穿过 Matrigel 胶的细胞数显著增多，干扰 DNMT1 表达后该效应被显著抵消；在 HepG2 中，

敲低 HOTAIR 显著抑制了细胞侵袭，而回补 DNMT1 可部分挽救其侵袭能力。在迁移实验中：各组细胞穿膜数量的变动趋势与侵袭实验基本一致(图4)。结果证实，HOTAIR 通过 DNMT1 介导的信号轴显著增强了肝癌细胞的体外迁移与侵袭潜力。

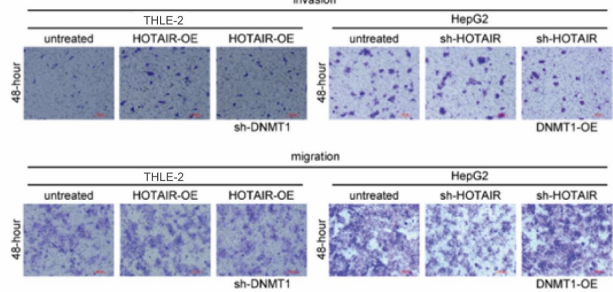


图4 Transwell 实验。上图为侵袭实验，下图为迁移实验，48 h 后染色并计数。

4 讨论

肝细胞癌恶性程度高、侵袭转移能力强，术后复发率居高不下，总体预后较差，其发生发展涉及多基因、多通路的协同调控^[18]。近年来，长链非编码 RNA 介导的表观遗传调控在肿瘤恶性进展中的作用逐渐受到关注，为解析肝癌转移机制提供了新的视角^[19]。本研究通过临床样本检测、体外分子实验与功能实验证实，LncRNA HOTAIR 在肝癌组织中高表达，并通过调控 DNMT1/PTEN 通路促进肝癌细胞迁移与侵袭，为阐明肝癌侵袭转移的表观遗传机制提供了实验依据。

本研究结果显示，HOTAIR 在肝癌组织中的表达水平显著高于配对癌旁组织，提示其在肝癌中可能发挥促癌作用。已有研究证实，HOTAIR 在多种恶性肿瘤中异常高表达，可通过调控基因转录、染色质修饰等方式参与肿瘤增殖、侵袭及转移过程，与肿瘤分期及不良预后密切相关^[20]。本研究结果与已有报道一致，进一步明确 HOTAIR 在肝癌中的异常表达模式，证实其作为促癌基因参与肝癌发生发展，为后续机制研究奠定基础。

本研究发现 HOTAIR 可通过 DNMT1 和 DNMT3A 上调机制，抑制抑癌基因 PTEN 的蛋白水平。DNA 甲基化是肿瘤中常见的表观遗传修饰，DNMT1 作为关键的维持性甲基转移酶，可介导抑癌基因启动子区域高甲基化，导致基因转录沉默^[21]。PTEN 作为经典抑癌基因，通过负调控 PI3K/AKT 通路抑制肿瘤细胞增殖、迁移及侵袭，在肝癌中常因表观修饰而表达下调^[22]。本研究证实，HOTAIR 通过正向调控 DNMT1 介导 PTEN 沉默，且该效应可经回复实验逆转，明确 HOTAIR-DNMT1-PTEN 为肝癌中具有功能意义的调控轴，完善了 lncRNA 介导 DNA 甲基化调控肿瘤转移的理论体系。

细胞功能实验显示，过表达 HOTAIR 可显著增强肝癌细胞的迁移与侵袭能力，敲低 DNMT1 可逆转该效应；敲低 HOTAIR 则明显抑制细胞迁移侵袭，回补 DNMT1 可部分恢复细胞恶性

表型。上述结果提示, HOTAIR 促进肝癌细胞转移的作用依赖于 DNMT1 的表达, 进一步验证 HOTAIR 通过 DNMT1/PTEN 通路发挥生物学功能。结合分子机制可推断, HOTAIR 通过 DNMT1 介导 PTEN 甲基化沉默, 解除对下游通路的抑制, 进而增强肝癌细胞的运动能力与侵袭潜能, 与肿瘤转移的经典调控机制结果一致。

本研究结果具有一定的临床研究意义。HOTAIR 在肝癌组织中特异性高表达, 且与转移表型密切相关, 具备作为肝癌侵袭转移分子标志物的潜在可能。同时, HOTAIR/DNMT1 轴可为肝癌抗转移治疗提供潜在靶点, 现有 DNMT 抑制剂已在临床相关疾病中应用, 本研究为该类药物在肝癌中的应用提供了理论支持。

本研究仍存在临床样本数量较少的局限性。未开展 HOTAIR 表达与患者临床病理特征及预后的相关性分析; 同时未探讨 HOTAIR 的上游调控机制及下游 EMT、PI3K/AKT 通路

活化情况, 完整调控网络仍需完善。

综上, 本研究证实 LncRNA HOTAIR 在肝癌组织中高表达, 通过 DNMT1/PTEN 信号轴促进肝癌细胞迁移与侵袭, 可为阐明肝癌转移的分子机制提供新的理论依据, 也可作为肝癌分子标志物筛选与靶向治疗提供潜在方向。

5 结论

本研究证实, LncRNA HOTAIR 在肝细胞癌组织中呈显著异常高表达状态, 可通过正向调控 DNA 甲基转移酶 DNMT1 的表达, 抑制抑癌基因 PTEN 的蛋白表达, 进而显著增强肝癌细胞的迁移与侵袭能力, 最终促进肝癌的恶性进展。HOTAIR/DNMT1/PTEN 信号轴是调控肝癌侵袭转移的关键分子通路, HOTAIR 有望成为肝癌早期诊断、预后评估的潜在分子标志物, 靶向 HOTAIR/DNMT1 轴的表现遗传干预策略可为肝癌的临床治疗提供全新的思路与方向。

参考文献:

- [1] GANESAN P, KULIK L M. Hepatocellular Carcinoma: New Developments[J]. Clin Liver Dis, 2023, 27(1): 85-102.
- [2] MITTAL S, EL-SERAG H B, SADA Y H, et al. Hepatocellular Carcinoma in the Absence of Cirrhosis in United States Veterans is Associated With Nonalcoholic Fatty Liver Disease[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2016, 14(1): 124-31. e1.
- [3] WANG X, MENG F, MAO J. Progress of natural sesquiterpenoids in the treatment of hepatocellular carcinoma[J]. Front Oncol, 2024, 14: 1445222.
- [4] LIN C L, KAO J H. Natural history of acute and chronic hepatitis B: The role of HBV genotypes and mutants[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2017, 31(3): 249-255.
- [5] CAPASSO M, COSSIGA V, GUARINO M, et al. The Role of Hepatitis Viruses as Drivers of Hepatocarcinogenesis[J]. Cancers (Basel), 2024, 16(8).
- [6] ZHAO Y Q, SHI W W, HE R S, et al. [Expressions and regulatory effects of small nucleolar RNA host gene 14 (SNHG14) in tumors][J]. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi, 2020, 49(8): 866-869.
- [7] GUO Y, GUO D, WANG Y, et al. Advances of Long Non-Coding RNA in Perennial Plants: Development and Stress Responses[J]. Plants (Basel), 2025, 14(21).
- [8] YUAN Y, TANG Y, FANG Z, et al. Long Non-Coding RNAs: Key Regulators of Tumor Epithelial/Mesenchymal Plasticity and Cancer Stemness[J]. Cells, 2025, 14(3).
- [9] AUDAS T E, LEE S. Stressing out over long noncoding RNA[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1859(1): 184-91.
- [10] CHEN Y G, SATPATHY A T, CHANG H Y. Gene regulation in the immune system by long noncoding RNAs[J]. Nat Immunol, 2017, 18(9): 962-972.
- [11] ALVAREZ-DOMINGUEZ J R, LODISH H F. Emerging mechanisms of long noncoding RNA function during normal and malignant hematopoiesis[J]. Blood, 2017, 130(18): 1965-1975.
- [12] BALLARINO M, MORLANDO M, FATICA A, et al. Non-coding RNAs in muscle differentiation and musculoskeletal disease[J]. J Clin Invest, 2016, 126(6): 2021-30.
- [13] GAO J Z, LI J, DU J L, et al. Long non-coding RNA HOTAIR is a marker for hepatocellular carcinoma progression and tumor recurrence[J]. Oncol Lett, 2016, 11(3): 1791-1798.
- [14] REN W, GAO L, SONG J. Structural Basis of DNMT1 and DNMT3A-Mediated DNA Methylation[J]. Genes (Basel), 2018, 9(12).

- [15] QURESHI M Z,SABITALIYEVICH U Y,RABANDIYAROV M,et al.Role of DNA Methyltransferases(DNMTs)in metastasis[J].Cell Mol Biol(Noisy-le-grand),2022,68(1):226-236.
- [16] WANG L,WANG Y,XU L.Overexpression of lncRNA TINCR inhibits cutaneous squamous cell carcinoma cells through promotes methylation of Myc and TERC genes[J].Arch Dermatol Res,2025,317(1):559.
- [17] YANG S M,HU T H,WU J C,et al.Hepatoma-Derived Growth Factor Promotes Liver Carcinogenesis by Inducing Phosphatase and Tensin Homolog Inactivation[J].Lab Invest,2025,105(6):104127.
- [18] PARK J W,CHEN M,COLOMBO M,et al.Global patterns of hepatocellular carcinoma management from diagnosis to death:the BRIDGE Study[J].Liver Int,2015,35(9):2155-66.
- [19] DAI C,QIANJIANG H,FU R,et al.Epigenetic and epitranscriptomic role of lncRNA in carcinogenesis(Review)[J].Int J Oncol,2025,66(4).
- [20] ZHANG Y,YU S,JIANG L,et al.HOTAIR is a promising novel biomarker in patients with thyroid cancer[J].Exp Ther Med,2017,13(5):2274-2278.
- [21] CHRISTMANN M,KAINA B.Epigenetic regulation of DNA repair genes and implications for tumor therapy[J].Mutat Res Rev Mutat Res,2019,780:15-28.
- [22] KOTELEVETS L,TRIFAUULT B,CHASTRE E,et al.Posttranslational Regulation and Conformational Plasticity of PTEN[J].Cold Spring Harb Perspect Med,2020,10(7).