

DOI: 10.16016/j.1000-5404.201708015

HBV⁺肝细胞癌患者 lncRNA-mRNA 共表达网络分析及作用

涂晓丽¹, 文 荃², 闫 军³ (400030 重庆, 重庆市肿瘤研究所/医院/癌症中心药学部¹; 400038 重庆, 第三军医大学大坪医院野战外科研究所癌症中心²; 400038 重庆, 第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所³)

[摘要] **目的** 分析乙型肝炎病毒阳性(HBV⁺)肝细胞癌患者肝组织长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)和信使 RNA(messenger, mRNA)的共表达网络,探讨关键 lncRNA 的作用。**方法** 下载 GEO(GSE54238)lncRNA/mRNA 表达谱芯片数据,通过生物信息数据分析方法获得不同临床进展阶段的肝细胞癌患者与正常人均具有显著差异的肝组织 lncRNA、mRNA 表达谱,并构建被 DNA 元素百科全书数据库(Encyclopedia of DNA Elements, ENCODE)收录的差异 lncRNA-mRNA 共表达网络。继而分析共表达网络中的 mRNA 参与的 GO、KEGG;并分析与核心 lncRNA 高度相关的 mRNA 与患者生存曲线的相关性。**结果** 与 5 个 ENCODE 收录的差异 lncRNA 具有共表达关系的 mRNA 共有 81 个(相关系数 ≥ 0.90)。lncRNA-mRNA 共表达网络中的 mRNA 主要参与的 GO 通路有氧化还原、呼吸电子链传递和脂肪酸代谢过程;KEGG 信号通路主要有脂肪酸降解、过氧化物酶体增殖物激活受体和 β -丙氨酸代谢。与核心 LINC01018(又名 SRHC)、EHHADH-AS1 和 F11-AS1 高度相关的 mRNA SLC2A2、PCK2、EHHADH、F11、FM04 和 NR1I3 与患者生存曲线具有极显著相关性($P < 0.01$)。**结论** LINC01018、EHHADH-AS1、F11-AS1 等 lncRNA 居于 lncRNA-mRNA 共表达网络的核心位置,在 HBV⁺肝细胞癌发生、发展中具有关键作用,有望成为 HBV⁺肝细胞癌新的诊断和预后指标。

[关键词] 肝细胞癌;乙型肝炎病毒;lncRNA-mRNA 共表达网络;LINC01018;EHHADH-AS1

[中图分类号] R181.23; R394.3; R735.7 **[文献标志码]** A

Profiles and functions of lncRNA-mRNA co-expression network in HBV⁺ hepatocellular carcinoma patients

TU Xiaoli¹, WEN Quan², YAN Jun³ (¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chongqing Cancer Institute & Hospital & Cancer Center, Chongqing, 400030; ²Cancer Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042; ³Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the profiles of long non-coding RNA (lncRNA)-messenger RNA (mRNA) co-expression network in the patients with hepatitis B virus positive (HBV⁺) hepatocellular carcinoma (HCC), and explore the potential roles of these key lncRNAs in the development of the disease. **Methods** In the data of lncRNA and mRNA microarray data in GEO (GSE54238), we firstly analyzed lncRNA-mRNA co-expression network of differential expressed lncRNAs[annotated by Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE)] and mRNAs in the patients of cirrhotic liver, early stage HCC and advanced HCC, respectively. Secondly, we performed Gene Ontology (GO) and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of mRNAs in above lncRNA-mRNA co-expression network. Finally, we did the survival curve correlation analysis of mRNAs that highly correlated with these 3 key lncRNAs by using GEO dataset (GSE14520). **Results** There were 81 ($|correlation| \geq 0.9$) mRNAs that

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81372272)

[通信作者] 闫 军, E-mail: yanj843@medmail.com.cn

[优先出版] http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1126.R.20171108.0631.010.html

were highly co-expressed with the 5 ENCODE-annotated lncRNAs. The mRNAs in the lncRNA-mRNA co-expression network which participates in the GO pathways mainly included oxidation reduction, carboxylic acid catabolic process, and fatty acid metabolic process, and those involving KEGG pathways were fatty acid degradation, PPAR signaling pathway, and β -alanine metabolism. The mRNAs (SLC2A2, PCK2, EHHADH, F11, FM04 and NR1H3) that highly co-expressed with the 3 key lncRNAs [LINC01018 (also SRHC), EHHADH-AS1 and F11-AS1] were significantly correlated with the survival curve of HBV⁺ HCC patients ($P < 0.01$). **Conclusion** The 3 key lncRNAs, LINC01018, EHHADH-AS1 and F11-AS1, may play critical roles in the development and progression of HBV⁺ HCC.

[**Key words**] hepatocellular carcinoma; hepatitis B virus; lncRNA-mRNA co-expression network; LINC01018; EHHADH-AS1

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81372272). Corresponding author: YAN Jun, E-mail: yanj843@medmail.com.cn

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界上发病率和病死率都较高的一种恶性肿瘤,是世界范围内肿瘤致死的主要原因之一^[1-2]。资料显示全世界50%以上的新发和死亡肝癌患者均发生在中国,在我国其病死率居第二,而HBV感染是我国肝细胞癌发生的最主要致病因素^[2]。关于HBV引发肝癌的发病机制虽有很多报道,但仍需进一步研究。

长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是长度大于200个核苷酸的非编码RNA^[3-4]。研究表明lncRNA在基因表达剂量补偿效应、表观遗传调控、细胞周期调控和细胞分化调控等众多生命活动中发挥着重要作用^[5-6]。近期研究报道了一些在肝细胞癌发生过程中具有关键作用的lncRNA^[7-11],但是lncRNA在HBV相关肝细胞癌中的作用研究才刚刚开始。最近有报道lncRNA-DANCR在HBV相关肝细胞癌中具有重要作用^[12],但关于HBV相关肝细胞癌进展过程中的关键lncRNA谱及其在肝细胞癌发生中的作用尚未深入分析。本研究通过对GEO(GSE54238)^[12]数据库中HBV感染导致肝硬化、早期肝癌和晚期肝癌的数据进行挖掘,构建lncRNA-mRNA共表达网络,获得该网络中的关键lncRNA。并进一步使用另一GEO数据(GSE14520)^[13]分析与关键lncRNA LINC01018、EHHADH-AS1、F11-AS1共表达的mRNA与肝细胞癌患者生存时间的关联性,进一步明确关键lncRNA在肝细胞癌进展中的作用。

1 材料与方法

1.1 lncRNA和mRNA基因芯片表达谱数据的选择

通过美国国立生物信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)的GEO(Gene Express-

sion Omnibus)数据库,获取2个基因表达谱数据集GSE54238和GSE14520,其中GSE54238^[12]包含10个正常人以及被HBV感染的10个肝硬化、13个早期肝细胞癌和13个晚期肝细胞癌患者的肝组织芯片数据,用于构建lncRNA-mRNA共表达网络、Gene Ontology(GO)和Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)富集分析。GSE14520^[13]选择其中216例HBV阳性的肝癌患者芯片数据用做mRNA生存相关性分析。

1.2 筛选差异基因

使用R语言中的limma包^[14]对数据进行标准化后,将正常组与肝硬化组、早期肝细胞癌组和晚期肝细胞癌组分别比较获得差异表达基因(Differential expressed gene, DEG)。改变倍数在2倍以上($|\text{Fold Change}| \geq 2$)并且校正后P值($\text{FDR} \leq 0.05$)的基因即为差异表达基因。

1.3 lncRNA-mRNA共表达网络构建

选取在肝硬化、早期和晚期肝细胞癌患者均差异表达的非编码RNA(non-coding RNA, ncRNA),并通过对The Encyclopedia of DNA Elements(ENCODE)数据库^[15-16]和Coding-Potential Assessment Tool(CPAT)软件^[17]预测lncRNA编码蛋白潜力,获取经ENCODE注释且无编码能力的lncRNA谱。通过计算经ENCODE注释的lncRNA与mRNA的皮尔森相关系数(Pearson correlation coefficient, PCC),选取相关系数的绝对值($|\text{correlation}|, |\text{cor}| \geq 0.9$, 且 $P < 0.05$ 的lncRNA-mRNA对,构建lncRNA-mRNA共表达网络^[18]。

1.4 统计学方法

使用DAVID 6.8(<https://david.ncifcrf.gov/>)^[19]进行GO富集分析;采用R语言clusterProfiler包进行

KEGG 富集分析^[20]。使用 R 语言 Survival 包行 Kaplan-Meier 法生存分析和 Log-rank 检验^[21]。

2 结果

2.1 差异基因 mRNA 和差异 ncRNA 的鉴定

选取改变倍数 (|Fold Change|) ≥ 2 倍或 ≤ -0.5 倍,校正后 P 值 (FDR) ≤ 0.05 的 mRNA 和 ncRNA 作为差异基因。与健康人相比,肝硬化组有 1 875 个差异 mRNA、524 个差异 ncRNA;早期肝癌患者有 1 758 个差异 mRNA、1 151 个差异 ncRNAs;晚期肝癌患者有 1 940 个差异 mRNA、845 个差异 ncRNAs(图 1)。

2.2 ENCODE 注释 lncRNA 的获取

目前报道的 ncRNA 种类繁多,但大部分 ncRNA 通过 RNA 测序后拼接获得,因此部分 ncRNA 不一定具有 ncRNA 的属性。而经 ENCODE 注释和 CPAT 软件预测的 lncRNA 更为准确和可靠。为探索 lncRNA 在肝硬化、早期肝癌和晚期肝癌这一疾病进展中的作用,我们通过对 ENCODE 数据库,得到 11 个被 ENCODE 注释的差异 lncRNA,并通过 CPAT 工具确定它们均无编码蛋白的能力。其中 2 个 lncRNA 在肝硬化、早期和晚期肝癌中均显著上调,9 个 lncRNA 在肝硬化、早期和晚期肝癌中均显著下调(表 1,FDR ≤ 0.05)。

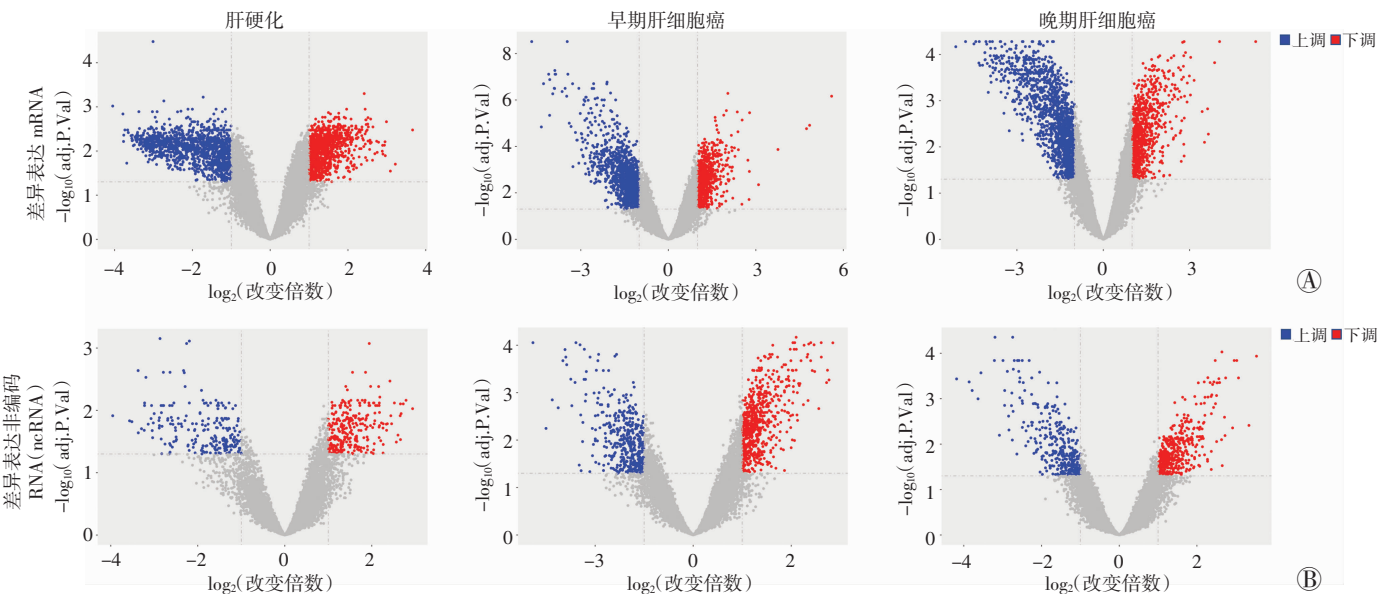


图 1 差异基因 mRNA 和差异 ncRNA 的火山图

表 1 ENCODE 注释的差异表达 lncRNA 及其在肝细胞癌组织中的改变情况

基因名	ENCODE ID	UCSC 或 RefSeq 登录号	表达改变倍数[log ₂]		
			肝硬化	早期肝细胞癌	晚期肝细胞癌
LINC00152	ENST00000409054.1	NR_024373	1.30	1.55	2.19
MAPKAPK5-AS1	ENST00000428207.4	uc001tsy	1.16	1.78	1.96
EHHADH-AS1	ENST00000417720.1	uc003fpe	-2.68	-1.58	-2.73
F11-AS1	ENST00000505103.5	uc003izb	-2.93	-1.73	-2.73
LOC157273	ENST00000520390.1	uc003wsq	-2.91	-2.52	-2.88
FAM99A	ENST00000382167.2	uc009ycz	-3.12	-2.95	-3.21
CPB2-AS1	ENST00000606991.5	uc001vau	-2.41	-2.45	-2.57
HNF4A-AS1	ENST00000452481.1	uc002xlx	-2.34	-1.67	-1.90
A1BG-AS1	ENST00000595302.1	AY927604	-2.89	-1.81	-2.95
LOC100422737	ENST00000436659.5	AJ420564	-2.56	-1.53	-2.15
LINC01018	ENST00000505626.5	uc003jdr	-3.28	-2.08	-3.79
LINC01018	ENST00000505626.5	NR_024424	-2.48	-1.67	-2.95
LINC01018	ENST00000505626.5	uc003jdr	-4.01	-2.58	-3.63

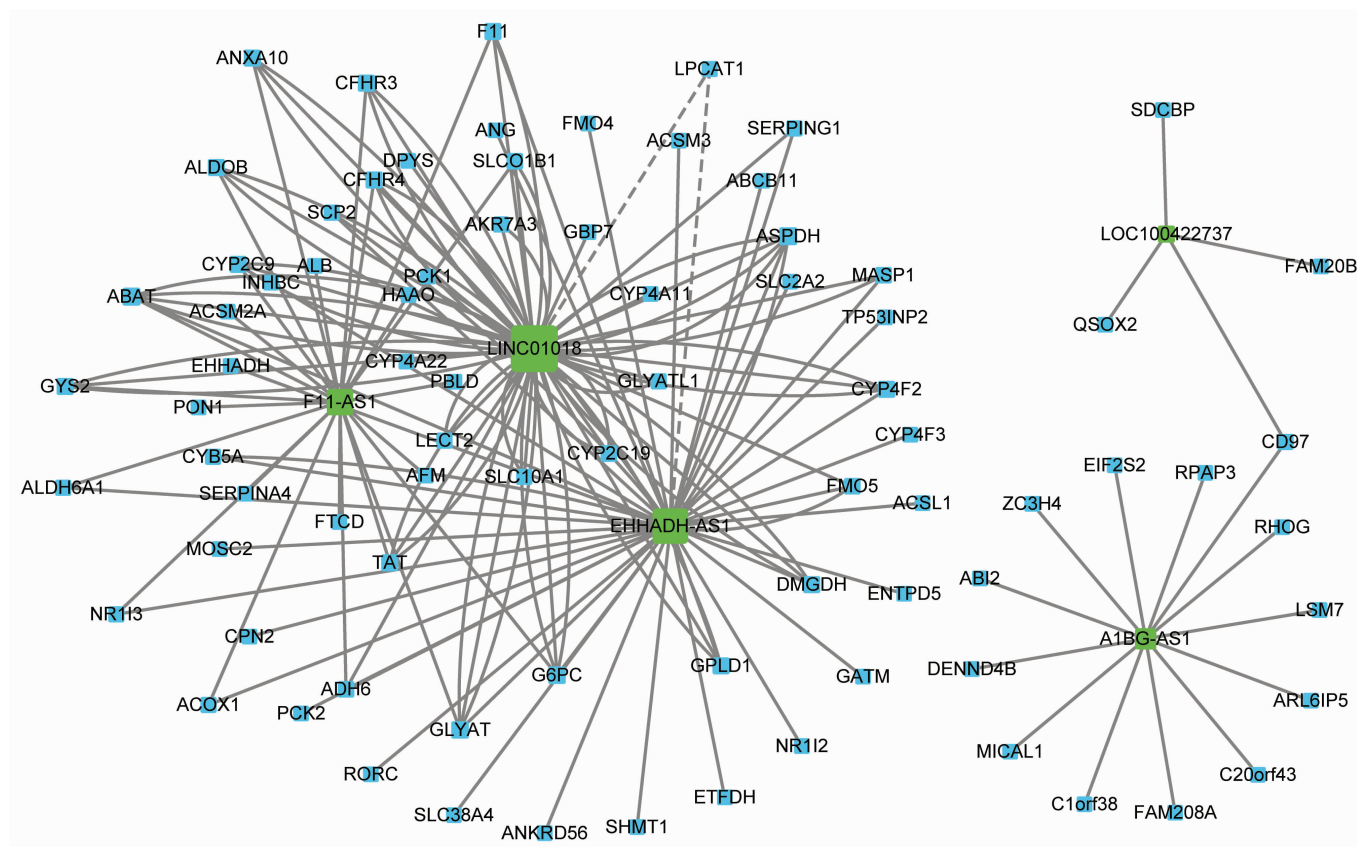
2.3 lncRNA-mRNA 共表达网络分析

通过构建的 lncRNA-mRNA 共表达网络 [lncRNA-mRNA 共表达系数的绝对值 ($|cor|$) ≥ 0.90] 发现有 5 个 ENCODE 数据库注释的 lncRNA (LINC01018、EHHADH-AS1、F11-AS1 和 A1BG-AS1 和 LOC100422737) 与 81 个 mRNA 具有高度的共表达关系。LINC01018、EHHADH-AS1 和 F11-AS1 居于 lncRNA-mRNA 共表达网络的核心位置, 与众多 mRNA 均具有共表达关系, 且相互之间也有共表达关系 (图 2、表 2)。

2.4 lncRNA-mRNA 共表达网络中 mRNA 的 GO、KEGG 分析

GO 分析发现 lncRNA-mRNA 共表达网络中的 mRNA 主要参与氧化还原 (GO:0055114 ~ oxidation

reduction)、呼吸电子链传递 (GO:0009055 ~ electron carrier activity)、辅因子结合 (GO:0048037 ~ cofactor binding)、羧酸分解过程 (GO:0046395 ~ carboxylic acid catabolic process)、脂肪酸代谢过程 (GO:0006631 ~ fatty acid metabolic process) 等 (图 3A)。KEGG 分析发现 lncRNA-mRNA 共表达网络中的 mRNA 主要参与 PPAR 信号转导 (PPAR signaling pathway)、药物代谢-细胞色素 P450 酶 (drug metabolism -cytochrome P450)、脂肪酸降解 (fatty acid degradation)、过氧化物酶体 (peroxisome)、糖酵解和糖异生 (glycolysis/gluconeogenesis) 等 (图 3B)。上述分析说明这 5 个 lncRNA 在从肝硬化到早期肝细胞癌和晚期肝细胞癌的进展过程中可能有重要作用。



绿色矩形方框代表 lncRNA, 蓝色矩形方框代表 mRNA; 直线两端连接的两 mRNA 或 lncRNA 之间具有共表达关系。矩形方框越大, 表明与其有共表达关系的基因越多。共表达系数的绝对值 ($|cor|$) ≥ 0.90 。虚线表示负相关, 实线表示正相关

图 2 lncRNA-mRNA 共表达网络

表2 lncRNA-mRNA 共表达网络

lncRNA	共表达基因(括号内为共表达相关系数)
A1BG-AS1	CD97(0.9)、RPAP3(0.9)、RHOG(0.9)、EIF2S2(0.9)、LSM7(0.91)、ZC3H4(0.91)、ARL6IP5(0.91)、ABI2(0.91)、C20orf43(0.91)、DENND4B(0.91)、FAM208A(0.92)、MICAL1(0.93)、C1orf38(0.93)
EHHADH-AS1	LPCAT1(-0.92)、DMGDH(0.9)、CYP4F3(0.9)、ASPDH(0.9)、ACSL1(0.9)、TP53INP2(0.9)、ENTPD5(0.9)、SLC2A2(0.9)、FMO5(0.9)、GATM(0.9)、ABCB11(0.91)、NR1I2(0.91)、NR1I3(0.91)、ACSM3(0.91)、ALDH6A1(0.91)、ETFDH(0.91)、FMO4(0.91)、ASPDH(0.91)、SHMT1(0.91)、G6PC(0.91)、CYP4F2(0.91)、GLYAT(0.91)、SCP2(0.91)、ANG(0.91)、ANKRD56(0.91)、SERPING1(0.91)、DPYS(0.91)、CYB5A(0.91)、SLC38A4(0.91)、GPLD1(0.91)、SCP2(0.92)、RORC(0.92)、INHBC(0.92)、PCK2(0.92)、MASP1(0.92)、ABAT(0.92)、EHHADH(0.92)、CPN2(0.92)、ACOX1(0.93)、CYB5A(0.93)、FMO5(0.93)、MOSC2(0.94)、F11(0.94)、ADH6(0.94)
F11-AS1	NR1I3(0.9)、PON1(0.9)、ALDH6A1(0.9)、ACOX1(0.9)、CYP2C9(0.9)、GYS2(0.9)、CFHR3(0.9)、ACSM2A(0.91)、SERPINA4(0.91)、ALB(0.91)、FTCD(0.91)、HAAO(0.91)、CFHR4(0.91)、ALDOB(0.92)、ADH6(0.92)、AFM(0.92)、GLYAT(0.92)、ANXA10(0.92)、PBLD(0.93)、G6PC(0.93)、TAT(0.93)、SLC01B1(0.93)、ABAT(0.93)、F11(0.94)
LINC01018	LPCAT1(-0.91)、AKR7A3(0.9)、DMGDH(0.9)、LECT2(0.9)、PCK1(0.9)、SERPING1(0.9)、ASPDH(0.9)、ABAT(0.9)、FMO5(0.9)、CYP4A22(0.9)、ABAT(0.91)、ASPDH(0.91)、ANXA10(0.91)、CYP2C9(0.91)、GBP7(0.91)、ALDOB(0.91)、MASP1(0.91)、GPLD1(0.91)、CYP4F2(0.91)、CFHR3(0.91)、GYS2(0.91)、LECT2(0.91)、CYP2C19(0.91)、CYP4A11(0.91)、SLC01B1(0.91)、GLYATL1(0.92)、CFHR3(0.92)、SLC10A1(0.92)、G6PC(0.92)、SLC01B1(0.92)、CYP4F2(0.92)、DMGDH(0.92)、ADH6(0.92)、ASPDH(0.92)、CFHR4(0.92)、ABAT(0.92)、GLYAT(0.92)、ANXA10(0.92)、CFHR4(0.93)、G6PC(0.93)、ANXA10(0.93)、CYP2C9(0.93)、TAT(0.93)、SLC10A1(0.93)、ALDOB(0.93)、MASP1(0.93)、GPLD1(0.93)、CYP4F2(0.93)、GLYATL1(0.93)、CFHR3(0.93)、GLYAT(0.93)、GYS2(0.93)、ABAT(0.94)、CYP2C19(0.94)、G6PC(0.94)、GYS2(0.94)、CFHR4(0.94)、GLYAT(0.94)、F11(0.94)、TAT(0.94)、F11(0.95)
LOC100422737	CD97(0.9)、FAM20B(0.91)、QSOX2(0.91)、SDCBP(0.92)

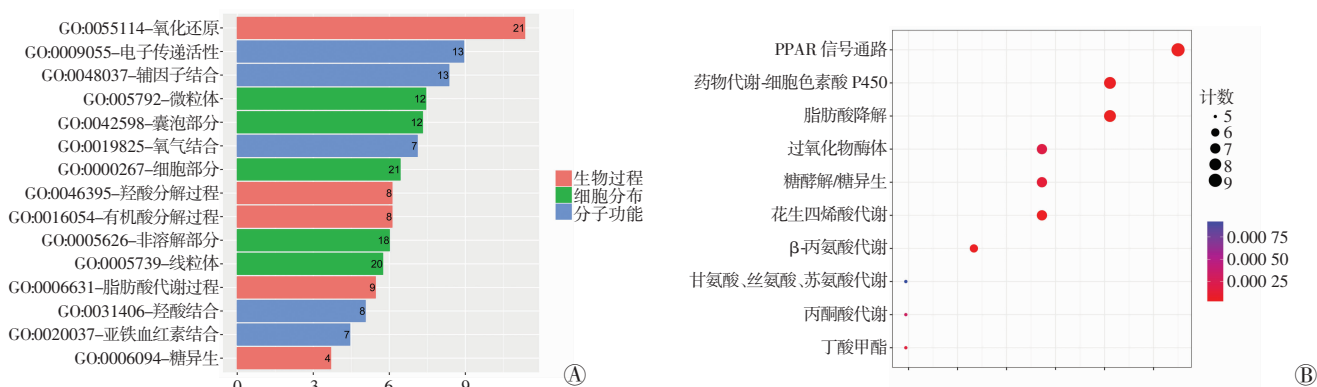


图3 GO分析(A)和KEGG信号通路富集(B)分析

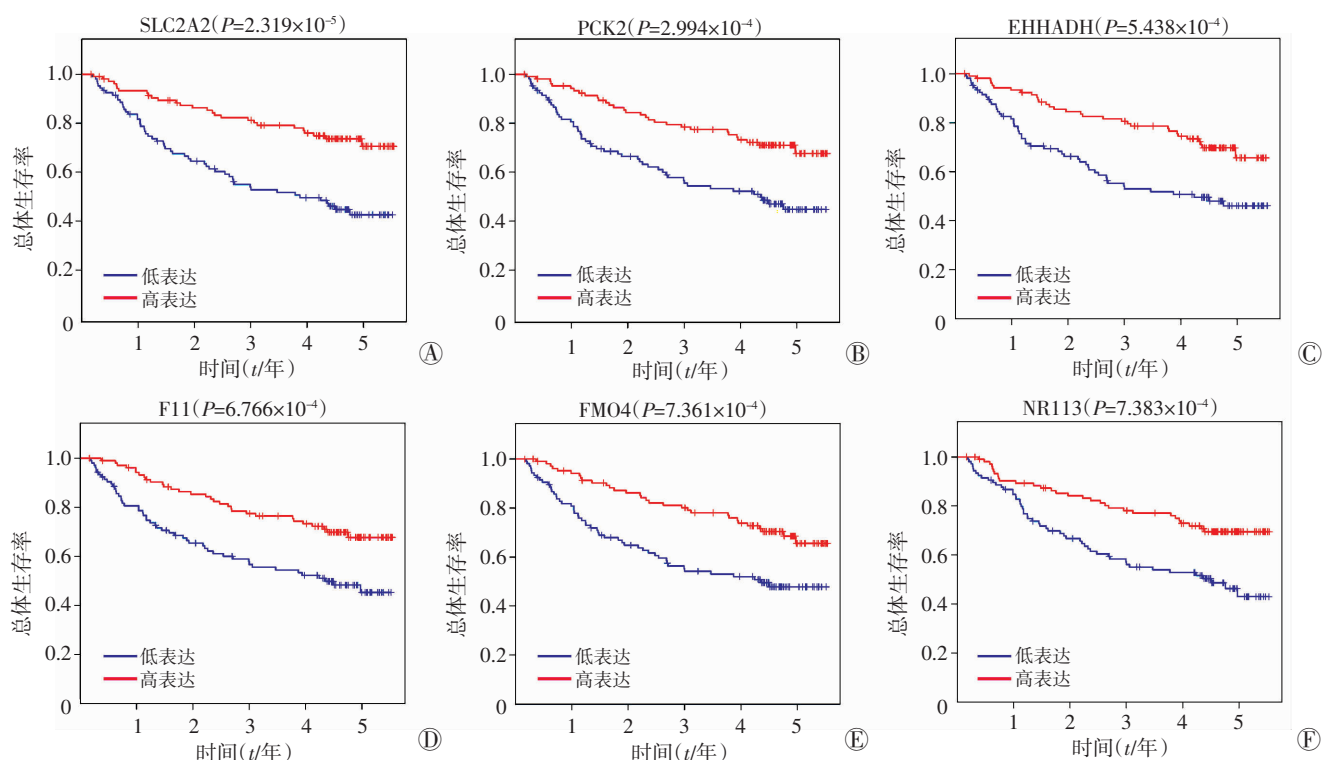
2.5 与关键 lncRNA LINC01018、EHHADH-AS1、F11-AS1 共表达的 mRNA 与肝细胞癌患者生存曲线的相关性

为进一步探讨上述发现的关键 lncRNA 在肝细胞癌发生、发展中的作用,选取 lncRNA-mRNA 共表达网络中最为核心的 3 个 lncRNA (LINC01018、EHHADH-AS1、F11-AS1) 作为研究对象,使用 GEO (GSE14520) 数据,分析与它们具有高相关性的 mRNA 与肝细胞癌患者生存预后的关系。生存曲线分析发现有 15 个共表达的 mRNA 与 HBV 相关肝细胞癌患者生存率具有显著相关性 ($P < 0.05$, 表 3)。其中 6 个 mRNA 与 HBV 相关肝细胞癌患者生存率具有高度相关性,如 SLC2A2、PCK2 (磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 2)、EHHADH (烯酰辅酶 A 水合酶和 3-羟酰辅酶 A 脱氢酶)、F11 (凝血因子 11)、FMO4 (黄素单加氧酶 4)、NR1I3 (雄甾烷 X 受体蛋白) ($P < 0.01$, 图 4)。

表3 关键 lncRNA 关联的 mRNA 与 HBV 相关肝细胞癌患者的生存相关分析

lncRNA	关联基因 mRNA	P^a
EHHADH-AS1	SLC2A2	2.32×10^{-5}
EHHADH-AS1	PCK2	0.0002
EHHADH-AS1	EHHADH	0.0005
EHHADH-AS1, F11-AS1, LINC01018	F11	0.0007
EHHADH-AS1	FMO4	0.0007
F11-AS1, EHHADH-AS1	NR1I3	0.0007
LINC01018	CYP4A11	0.0010
LINC01018, F11-AS1	ALDOB	0.0016
EHHADH-AS1, LINC01018, F11-AS1	G6PC	0.0017
LINC01018	SLC10A1	0.0018
LINC01018, EHHADH-AS1	GPLD1	0.0021
EHHADH-AS1, F11-AS1, LINC01018	GLYAT	0.0028
EHHADH-AS1	CYP4F3	0.0036
EHHADH-AS1	ACSM3	0.0042
F11-AS1, EHHADH-AS1	ACOX1	0.0048

a: Log-rank 检验



A: SLC2A2; B: PCK2; C: EHHADH; D: F11; E: FMO4; F: NR113 数据来自 GEO 数据库 (GSE14520)

图4 核心 lncRNA 相关的 mRNA 与肝细胞癌患者生存曲线的相关性

3 讨论

近年来众多研究表明 HBV 涉及肝细胞的癌变、侵袭及转移,在肝癌的发生和发展过程中具有关键作用^[22]。近期研究报道 lncRNA 在多种肝细胞癌发生过程中具有重要作用^[7-11],且发现 lncRNA 在 HBV 相关肝细胞癌中也具有一定的作用,如 lncRNA-DANCR 增强癌细胞的干细胞特性 (stemness features) 从而加剧肝细胞癌的恶性程度^[12]。我们前期研究发现了多个 lncRNA 以内源性竞争性 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 的方式调控 HBV 相关肝细胞癌发生的关键基因^[23]。

lncRNA 通过调控靶基因 mRNA 的转录、稳定性等多种方式影响其靶基因的表达^[5-6]。lncRNA-mRNA 共表达网络是分析 lncRNA 功能和调控机制的重要方式^[24]。本研究通过深度数据分析呈现了在 HBV 相关肝细胞癌由肝硬化向早期、晚期肝癌进展过程中的差异 lncRNA 表达谱和 lncRNA-mRNA 共表达网络。GO 和 KEGG 分析发现 lncRNA-mRNA 共表达网络中的差异 mRNA 主要影响氧化还原、呼吸电子链传递、辅因子结合、羧酸分解过程、脂肪酸代谢过程等 GO 功能和 PPAR 信号转导、药物代谢-细胞色素 P450 酶、脂肪酸降解、过氧化物酶体、糖酵解和糖异生等

KEGG 信号通路。这进一步说明本研究发现的 lncRNA-mRNA 共表达网络中关键 lncRNA 在 HBV 相关肝细胞癌的发生、发展中具有关键作用,为全面了解和进一步研究 lncRNA 在 HBV 相关肝细胞癌发生、发展中的改变情况和作用提供了新的思路。

我们发现的关键 lncRNA 在肝细胞癌或者其他肿瘤中均有不同程度的报道。如近期研究发现与正常肝组织相比, lnc01018 (SRHC) 在肝癌组织和肝癌细胞系中的表达均出现显著下调。lnc01018 显著抑制肝癌细胞株 SMMC-7721、HCC-LM3 细胞的活力、增殖和克隆形成能力,与我们预测结果^[25]一致。文献报道 F11-AS1 在胰腺导管腺癌的各种细胞系中均表达降低^[26],与我们在 HBV 相关性肝细胞癌中的发现一致,但其作用和功能还有待进一步研究。本研究发现 EHHADH-AS1 可能在肝癌中有重要作用,并预测了其功能。EHHADH-AS1 是 EHHADH 的反义链 lncRNA,而 EHHADH 主要参与代谢相关通路,是转移性肝癌细胞中的一种新的分泌蛋白,可以作为肝癌的独立的预后分子^[27-28]。作为 EHHADH 的反义链 lncRNA, EHHADH-AS1 极有可能参与调控 EHHADH 的表达。因为反义 lncRNA 可通过与邻近基因形成 RNA-RNA 二聚体以提高 mRNA 稳定性,正向调控基因的表达效率^[29-31]。因此未来对 EHHADH-AS1 作用和机制的深入研究,将有望成为一

个全新的 HBV 相关性肝细胞癌诊断和预后标志物。

生存曲线分析可以反映基因的表达与患者预后的关联^[32]。本研究发现与最为关键的 3 个 lncRNA 相关的 mRNA 中, 共有 15 个基因与 HBV 相关肝细胞癌患者的生存率具有显著相关性, 且其中 6 个基因具有高度相关性 ($P < 0.01$)。如 EHHADH 主要参与代谢有关通路, 最近有研究报道它是转移性肝癌细胞中的一种新的分泌蛋白, 可以作为肝癌的独立预后分子^[27-28]。PCK2 主要与有氧糖酵解通路有关, 其低表达对维持肿瘤再生细胞的生长和成瘤至关重要; 过表达 PCK2 后肿瘤再生细胞体外生长受到抑制, 且体内致癌能力减弱^[33], 和我们预测的 PCK2 和代谢通路相关且其高表达有利于患者生存的结果相一致。FMO4 是一种重要的药物相关代谢酶^[34], 其高表达可提高复发性胶质母细胞瘤患者的生存时间^[35], 与我们的预测基本一致。NR1I3 是核受体家族的重要一员, 是外源性和内源性代谢的关键调节器^[36]。有报道发现 NR1I3 的表达可影响抗肿瘤药物的代谢, 有望成为一种新的肿瘤标志物^[37]。SLC2A2 (溶质转运家族 2 成员 2) 是调节细胞对葡萄糖摄取的重要蛋白。有报道发现丙肝病毒感染可抑制 SLC2A2 的表达, 降低细胞对葡萄糖的摄取, 引发糖尿病, 降低患者存活时间^[38], 这与我们在 HBV 相关肝细胞癌的发现类似。进一步证实本研究发现的关键 lncRNA 在 HBV 相关肝细胞癌的发生、发展中具有极其关键的作用。

综上所述, 本研究全面分析了 HBV 相关肝细胞癌进展过程中的关键 lncRNA 谱, 并且发现了一个新的可能在 HBV 相关肝细胞癌进展过程中具有重要作用的 lncRNA EHHADH-AS1。因此进一步研究上述发现的关键 lncRNA 在 HBV 相关肝细胞癌的发生、发展中的作用及机制, 有望为 HBV 相关肝细胞癌的诊断、治疗和预后提供新的分子和潜在的新靶标。

参考文献:

- [1] TORRE L A, SIEGEL R L, WARD E M, *et al.* Global cancer incidence and mortality rates and trends—an update [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2016, 25(1): 16–27. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-15-0578.
- [2] PARKIN D M. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002 [J]. *Int J Cancer*, 2006, 118(12): 3030–3044. DOI: 10.1002/ijc.21731.
- [3] OKAZAKI Y, FURUNO M, KASUKAWA T, *et al.* Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs [J]. *Nature*, 2002, 420(6915): 563–573. DOI: 10.1038/nature01266.
- [4] GUTTMAN M, RINN J L. Modular regulatory principles of large non-coding RNAs [J]. *Nature*, 2012, 482(7385): 339–346. DOI: 10.1038/nature10887.
- [5] TRIPATHI V, SHEN Z, CHAKRABORTY A, *et al.* Long noncoding RNA MALAT1 controls cell cycle progression by regulating the expression of oncogenic transcription factor B-MYB [J]. *PLoS Genet*, 2013, 9(3): e1003368. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003368.
- [6] BATISTA P J, CHANG H Y. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease [J]. *Cell*, 2013, 152(6): 1298–1307. DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.012.
- [7] CHAUHAN R, LAHIRI N. Tissue- and serum-associated biomarkers of hepatocellular carcinoma [J]. *Biomark Cancer*, 2016, 8(Suppl 1): 37–55. DOI: 10.4137/BIC.S34413.
- [8] PARASRAMKA M A, MAJI S, MATSUDA A, *et al.* Long non-coding RNAs as novel targets for therapy in hepatocellular carcinoma [J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 161: 67–78. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2016.03.004.
- [9] HUANG J L, REN T Y, CAO S W, *et al.* HBx-related long non-coding RNA DBH-AS1 promotes cell proliferation and survival by activating MAPK signaling in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(32): 33791–33804. DOI: 10.18632/oncotarget.5667.
- [10] DU Y, KONG G, YOU X, *et al.* Elevation of highly up-regulated in liver cancer (HULC) by hepatitis B virus X protein promotes hepatoma cell proliferation via down-regulating p18 [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(31): 26302–26311. DOI: 10.1074/jbc.M112.342113.
- [11] HUANG J F, GUO Y J, ZHAO C X, *et al.* Hepatitis B virus X protein (HBx)-related long noncoding RNA (lncRNA) down-regulated expression by HBx (Dreh) inhibits hepatocellular carcinoma metastasis by targeting the intermediate filament protein vimentin [J]. *Hepatology*, 2013, 57(5): 1882–1892. DOI: 10.1002/hep.26195.
- [12] YUAN S X, WANG J, YANG F, *et al.* Long noncoding RNA DANCR increases stemness features of hepatocellular carcinoma by derepression of CTNNB1 [J]. *Hepatology*, 2016, 63(2): 499–511. DOI: 10.1002/hep.27893.
- [13] ROESSLER S, JIA H L, BUDHU A, *et al.* A unique metastasis gene signature enables prediction of tumor relapse in early-stage hepatocellular carcinoma patients [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(24): 10202–10212. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2607.
- [14] RITCHIE M E, PHIPSON B, WU D, *et al.* limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(7): e47. DOI: 10.1093/nar/gkv007.
- [15] CONSORTIUM E P. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome [J]. *Nature*, 2012, 489(7414): 57–74. DOI: 10.1038/nature11247.
- [16] XIA T, LIAO Q, JIANG X, *et al.* Long noncoding RNA associated-competing endogenous RNAs in gastric cancer

- [J]. *Sci Rep*, 2014, 4:6088. DOI: 10.1038/srep06088.
- [17] WANG L, PARK H J, DASARI S, *et al.* CPAT: Coding-Potential Assessment Tool using an alignment-free logistic regression model[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(6): e74. DOI: 10.1093/nar/gkt006.
- [18] LIU N, LIU X, ZHOU N, *et al.* Gene expression profiling and bioinformatics analysis of gastric carcinoma[J]. *Exp Mol Pathol*, 2014, 96(3):361–366. DOI: 10.1016/j.yexmp.2014.02.007.
- [19] HUANG DA W, SHERMAN B T, LEMPICKI R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources[J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1):44–57. DOI: 10.1038/nprot.2008.211.
- [20] YU G, WANG L G, HAN Y, *et al.* clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. *OMICS*, 2012, 16(5):284–287. DOI: 10.1089/omi.2011.0118.
- [21] TANG R X, CHEN W J, HE R Q, *et al.* Identification of a RNA-Seq based prognostic signature with five lncRNAs for lung squamous cell carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(31):50761–50773. DOI: 10.18632/oncotarget.17098.
- [22] LUPBERGER J, HILDT E. Hepatitis B virus-induced oncogenesis[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(1):74–81.
- [23] WEN Q, YANG Y, CHEN X, *et al.* Competing endogenous RNA screening based on long noncoding RNA-messenger RNA co-expression profile in HBV-associated hepatocarcinogenesis[J]. *J Tradit Chin Med*, 2017, 37(4):510–521. DOI: 10.1016/s0254-6272(17)60108-0.
- [24] LIU S, MITRA R, ZHAO M M, *et al.* The potential roles of long noncoding RNAs (lncRNA) in glioblastoma development[J]. *Mol Cancer Ther*, 2016, 15(12):2977–2986. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0320.
- [25] ZHENG H, YANG S, YANG Y, *et al.* Epigenetically silenced long noncoding-SRHC promotes proliferation of hepatocellular carcinoma[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2015, 141(7):1195–1203. DOI: 10.1007/s00432-014-1871-4.
- [26] YU X, LIN Y, SUI W, *et al.* Analysis of distinct long non-coding RNA transcriptional fingerprints in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Cancer Med*, 2017, 6(3):673–680. DOI: 10.1002/cam4.1027.
- [27] YU Y, PAN X, DING Y, *et al.* An iTRAQ based quantitative proteomic strategy to explore novel secreted proteins in metastatic hepatocellular carcinoma cell lines[J]. *Analyst*, 2013, 138(16):4505–4511. DOI: 10.1039/c3an00517h.
- [28] CHEN P, WANG F, FENG J, *et al.* Co-expression network analysis identified six hub genes in association with metastasis risk and prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(30):48948–48958. DOI: 10.18632/oncotarget.16896.
- [29] HUANG B, SONG J H, CHENG Y, *et al.* Long non-coding antisense RNA KRT7-AS is activated in gastric cancers and supports cancer cell progression by increasing KRT7 expression[J]. *Oncogene*, 2016, 35(37):4927–4936. DOI: 10.1038/onc.2016.25.
- [30] SUN J, WANG X, FU C, *et al.* Long noncoding RNA FGFR3-AS1 promotes osteosarcoma growth through regulating its natural antisense transcript FGFR3[J]. *Mol Biol Rep*, 2016, 43(5):427–436. DOI: 10.1007/s11033-016-3975-1.
- [31] FAGHIHI M A, MODARRESI F, KHALIL A M, *et al.* Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase[J]. *Nat Med*, 2008, 14(7):723–730. DOI: 10.1038/nm1784.
- [32] GUO H, ZENG W, FENG L, *et al.* Integrated transcriptomic analysis of distance-related field cancerization in rectal cancer patients[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(37):61107–61117. DOI: 10.18632/oncotarget.17864.
- [33] LUO S, LI Y, MA R, *et al.* Downregulation of PCK2 remodels tricarboxylic acid cycle in tumor-repopulating cells of melanoma[J]. *Oncogene*, 2017, 36(25):3609–3617. DOI: 10.1038/onc.2016.520.
- [34] KRUEGER S K, WILLIAMS D E. Mammalian flavin-containing monooxygenases: structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism[J]. *Pharmacol Ther*, 2005, 106(3):357–387. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2005.01.001.
- [35] ERDEM-ERASLAN L, VAN DEN BENT M J, HOOGSTRATE Y, *et al.* Identification of patients with recurrent glioblastoma who may benefit from combined bevacizumab and CCNU therapy: a report from the BELOB trial[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(3):525–534. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0776.
- [36] KONNO Y, NEGISHI M, KODAMA S. The roles of nuclear receptors CAR and PXR in hepatic energy metabolism[J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2008, 23(1):8–13.
- [37] CECCHIN E, DE MATTIA E, TOFFOLI G. Nuclear receptors and drug metabolism for the personalization of cancer therapy[J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2016, 12(3):291–306. DOI: 10.1517/17425255.2016.1141196.
- [38] SHOJI I, DENG L, MATSUI C, *et al.* Hepatitis C virus-induced glucose metabolic disorder[J]. *Uirusu*, 2015, 65(2):263–268. DOI: 10.2222/jsv.65.263.

(收稿:2017-08-03;修回:2017-10-31)

(编辑 汪勤俭)