

长链非编码RNA HULC沉默表达对人脑胶质母细胞瘤细胞SHG44增殖和凋亡的影响

李倩¹, 尹恬恬¹, 胡宇辰¹, 吴景², 张敏², 何杰^{1,2}

(1.安徽医科大学附属医院/中国科学技术大学附属第一医院,安徽合肥 230031;

2.中国科学技术大学附属第一医院西区/安徽省肿瘤医院,安徽合肥 230031)

摘要:【目的】探讨长链非编码RNA肝癌高表达转录本(LncRNA HULC)沉默表达对人脑胶质母细胞瘤细胞株SHG44增殖和凋亡的影响。【方法】实时荧光定量PCR(qRT-PCR)验证HULC沉默表达组(HULC-siRNA)及其阴性对照组(NC组)HULC的表达水平。CCK8增殖实验和平板克隆形成实验检测瘤细胞的增殖能力。细胞周期和细胞凋亡实验检测瘤细胞的周期分布及凋亡能力。【结果】qRT-PCR证实HULC-siRNA组较NC组的HULC表达量显著降低($P=0.003$)。CCK8增殖实验显示HULC-siRNA组较NC组细胞增殖率显著降低(第2天 $P=0.003$;第3天 $P=0.005$;第4天 $P=0.009$)。平板克隆形成实验显示NC组和HULC-siRNA组的克隆形成率分别为 $(34.11 \pm 1.24)\%$, $(14.44 \pm 0.87)\%$,沉默表达HULC后细胞克隆形成率显著降低($P<0.001$)。细胞周期实验显示NC组和HULC-siRNA组的细胞数分别为G1期 (36.89 ± 4.09) 、S期 (46.95 ± 2.49) ,S期 (36.89 ± 2.13) ,沉默表达HULC后细胞周期明显被阻滞在G1/S期(G1期 $P=0.023$,S期 $P=0.038$)。细胞凋亡实验显示NC组和HULC-siRNA组的早期凋亡率分别为 $(2.57 \pm 0.22)\%$, $(7.063 \pm 0.71)\%$,沉默表达HULC后细胞早期凋亡率显著增加($P=0.004$)。【结论】LncRNA HULC沉默表达后可抑制胶质母细胞瘤细胞的增殖,促进其凋亡。

关键词:胶质母细胞瘤;LncRNA HULC;增殖;凋亡

中图分类号:R739.41

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2019)01-0031-06

Effects of Silencing Expression of Long Non-Coding RNA HULC on Proliferation and Apoptosis of Human Glioblastoma Cell SHG44

LI Qian¹, YIN Tian-tian¹, HU Yu-chen¹, WU Jing², ZHANG Min², HE Jie^{1,2}

(1.The Provincial Hospital of Anhui Medical University/The First Affiliated Hospital of University of Science & Technology of China, Hefei 230001, China; 2.West District, the First Affiliated Hospital of University of Science & Technology of China/Anhui Provincial Cancer Hospital, Hefei 230031, China)

Corresponding to: HE Jie, E-mail: hejie2005g@sina.com

Abstract: 【Objective】 To explore the effects of long-chain non-coding RNA highly up-regulated in liver cancer (LncRNA HULC) silencing expression on proliferation and apoptosis of human glioblastoma cell line SHG44. 【Methods】 Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) was used to verify the expression level of HULC in HULC silent expression group (HULC-siRNA) and negative control group (NC group). CCK8 proliferation assay and plate colony formation assay were used to detect the proliferation of glioblastoma cells. Cell cycle and apoptosis assays were used to detect the cell cycle distribution and apoptosis of glioblastoma cells. 【Results】 qRT-PCR confirmed that HULC-siRNA group had significantly lower expression of HULC than NC group ($P=0.003$). CCK8 proliferation experiment showed that the proliferation rate of HULC-siRNA group was significantly lower than that of NC group on the second, third and fourth days of experiment (Day 2, $P=0.003$; Day 3, $P=0.005$; Day 4, $P=0.009$). Plate colony formation assay showed the cloning rates in the NC and HULC-siRNA groups were $(34.11 \pm 1.24)\%$ and $(14.44 \pm 0.87)\%$, and it

收稿日期:2018-08-30

基金项目:国家自然科学基金(81272800)

作者简介:李倩,硕士研究生,E-mail:liqian2017twins@163.com;何杰,通信作者,教授,博士生导师,E-mail:hejie2005g@sina.com

showed that the cell clone formation rate was clearly decreased after silenced expression of HULC ($P < 0.001$). The cell cycle assay showed that the numbers of cells in NC group and HULC-siRNA group were G1 phase (36.89 ± 4.09 , 51.74 ± 0.68) and S phase (46.95 ± 2.49 , 36.89 ± 2.13), and it showed that the cell cycle was blocked in G1/S phase after silencing HULC expression (G1 phase, $P=0.023$, S phase, $P=0.038$). Apoptosis experiment showed that the early apoptotic rates of NC group and HULC-siRNA group were (2.57 ± 0.22)% and (7.063 ± 0.71)%, and it showed that the early apoptotic rate of the cells was significantly increased after silencing HULC expression ($P=0.004$). 【Conclusion】 Silencing of LncRNA HULC can inhibit the proliferation of glioblastoma cells and promote their apoptosis.

Key words: glioblastoma; LncRNA HULC; proliferation; apoptosis

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2019, 40(1): 31-36]

胶质瘤是大脑中最常见的原发性肿瘤,而胶质母细胞瘤是其恶性度最高的组织学类型。胶质母细胞瘤细胞自身较强的增殖能力和侵袭性是其成功治疗的主要障碍。目前临床采用手术、放疗、化疗和生物治疗等综合治疗手段,但患者生存期改善不明显,预后仍很差,中位生存期14月左右^[1]。目前研究认为,寻求特异性针对胶质母细胞瘤增殖和侵袭机制的治疗方案,将有可能遏制肿瘤的生长。近年相关研究发现,LncRNA在多种肿瘤中存在显著的表达改变,参与肿瘤细胞增殖、凋亡、侵袭转移、自噬及化疗敏感性等生物学行为的调节,在肿瘤的发生进展中发挥重要作用^[2],有可能成为在胶质母细胞瘤侵袭、预后的分子标记物,将为临床肿瘤的靶向治疗提供依据。肝癌高表达转录本 (highly up-regulated in liver cancer, HULC) 是LncRNA的一种,被发现在多种恶性肿瘤中表达上调^[3-4],但在胶质母细胞瘤中表达状况的报道甚少。本研究为了证实HULC在胶质母细胞瘤细胞中的表达及对胶质母细胞瘤生长的影响,以沉默表达HULC的胶质母细胞瘤细胞株SHG44为研究对象,采用CCK8、平板克隆、细胞周期及细胞凋亡等实验探讨LncRNA HULC沉默表达对胶质母细胞瘤细胞株SHG44增殖和凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂

人脑胶质母细胞瘤细胞株SHG44(中国典型培养物保藏中心,中国),胎牛血清和DMEM培养基(Thermo Fisher Scientific,美国),NC、HULC-siRNA(上海吉玛制药技术有限公司,中国),细胞

增殖毒性检测试剂盒(合肥新恩源生物技术有限公司,中国),吉姆萨染液(合肥新恩源生物技术有限公司,中国),Annexin V-488凋亡试剂盒(Thermo Fisher Scientific,美国),总RNA提取试剂盒(QIAGEN,德国),cDNA逆转录试剂盒(Thermo Fisher Scientific,美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 细胞用含100 mL/L胎牛血清的DMEM高糖培养基,置于37℃,50 mL/L CO₂恒温培养箱中培养,取对数生长期SHG44细胞,通过针对基因HULC的慢病毒干扰载体构建、慢病毒包装、病毒侵染、致死浓度及稳筛株构建,获得稳定转染的实验组细胞株,即转染HULC抑制剂的SHG44细胞为HULC干扰组(HULC-siRNA),转染HULC抑制剂空白载体SHG44细胞为HULC干扰组的阴性对照组(NC),将实验组细胞置于37℃,50 mL/L CO₂恒温细胞培养箱中培养48 h后传代收集对数生长期细胞进行相应检测。

1.2.2 qRT-PCR实验 消化收集细胞,按照总RNA提取试剂盒说明书提取总RNA,然后按照cDNA逆转录试剂盒说明书制备cDNA反应程序:42℃ 30 min;85℃ 10 min。再运行qRT-PCR反应程序:95℃,变性3 min,40个扩增循环(95℃ 12 s, 62℃ 40 s)。HULC引物上游序列:5'-TCAACCTCCAGAACTGTGATCC-3',下游序列:5'-TGCTTGATGCTTTGGTCTGTT-3'。以ACTB为内参,ACTB引物上游序列:5'-CGTGGACATCCG CAAAGA-3',下游序列:5'-GAAGGTGGACAG CGAGGC-3'。以2^{-ΔΔCt}计算HULC mRNA的相对表达量。实验重复三次,并用GraphPad Prism 5软件分析结果。

1.2.3 CCK8 增殖实验 消化收集对数生长期的各组细胞,离心重悬后计数,调整浓度约 2.0×10^4 细胞/mL;准备4块96孔板,向每孔加入100 μ L 细胞悬液(每孔含2 000个细胞),每组细胞设6个复孔;在细胞样本孔周围一圈每孔加入200 μ L PBS 溶液,置于37 $^{\circ}$ C,50 mL/L CO₂恒温细胞培养箱培养。次日,待细胞贴壁后取出第一块96孔板,弃去原培养基,每孔加入100 μ L 100 mL/L CCK8液(将CCK8母液用完全培养基做10倍稀释使用),置培养箱中孵育2 h后上酶标仪检测450 nm处的吸光度值(OD值),此为24 h OD值,其余各板每孔补加完全培养基100 μ L,并依次在48 h、72 h和96 h以同样的方法检测相应的OD值。实验重复三次,并用GraphPad Prism 5制作各组细胞上述四个时间点的生长曲线。

1.2.4 平板克隆形成实验 消化收集对数生长期的各组细胞,离心重悬后计数,以每孔300个细胞接种6孔板,每组细胞设3个复孔;每3~5 d换液,约10~12 d终止培养,40 mL/L多聚甲醛溶液固定30 min,吉姆萨染液染色8 min,清水洗去染液后晾干,显微镜下计数大于50个细胞的克隆数。克隆形成率(%) = 克隆数/实际接种细胞数 $\times 100\%$ 。实验重复3次,并用GraphPad Prism 5软件分析结果。

1.2.5 细胞周期实验 消化收集对数生长期的各组细胞,用预冷的PBS漂洗2次,加入500 μ L PBS重悬后缓慢加入到5 mL 700 mL/L预冷乙醇中,于4 $^{\circ}$ C固定过夜;次日取出固定后的细胞,以1000 r/min($r=6$ cm)的速度离心3 min,弃去上清,用PBS轻柔漂洗1次,并用500 μ L PBS重悬细胞,然后加入10 μ L RNase A(10 mg/mL),轻柔混匀后置于37 $^{\circ}$ C温箱孵育30 min,取出细胞并加入5 μ L PI(100 μ g/mL)染液,室温避光孵育15 min,立即进行流式细胞仪检测细胞周期分布情况。实验重复3次,并用FlowJo 7.6.1和GraphPad Prism 5软件分析结果。

1.2.6 细胞凋亡实验 用不含EDTA的胰酶消化、离心收集各组细胞,调整细胞终浓度为 1×10^6 /mL,预冷PBS漂洗2次,向细胞中加入100 μ L 钙离子缓冲液轻柔吹打混匀制成单细胞悬液,先后加入5 μ L Annexin V-488染液和5 μ L PI染液,注意设置Annexin V-488和PI单染组和无染液的空白对照组,轻柔混匀,室温避光孵育15 min,再加入500 μ L 钙离子缓冲液重悬细胞,轻柔混匀后立

即进行流式细胞仪检测细胞早期凋亡率。实验重复3次,用FlowJo 7.6.1和GraphPad Prism 5软件分析结果。

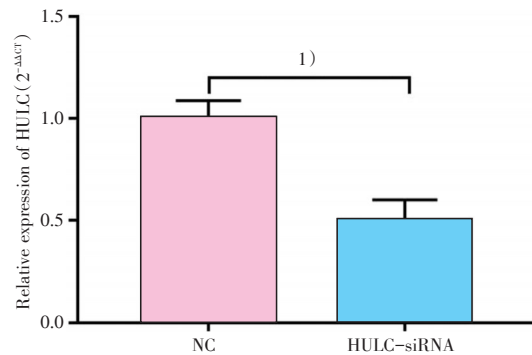
1.3 统计学分析

数据以均数 \pm 标准差表示,采用SPSS 22.0统计软件分析数据,两组均数比较采用两独立样本均数的 t 检验, $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HULC沉默表达效果鉴定

将HULC抑制剂(HULC-siRNA组)及抑制剂空白载体(NC组)转染SHG44细胞后,采用qRT-PCR检测HULC的表达,与NC组相比,转染HULC-siRNA组的HULC表达水平显著减少(图1),差异有统计学意义($t=6.616, P=0.003$),说明实验组细胞建立成功。



Real-time RT-PCR revealed that the expression level of SHG44 cells transfected with HULC inhibitor is lower than Negative Control (NC) group (mean \pm SD, $n=3$), 1) $P < 0.01$ vs NC ($t=6.616, P=0.003$). HULC-siRNA, HULC inhibitor transfection group.

图1 SHG44细胞的HULC沉默表达稳转细胞系表达水平验证

Fig.1 Verification of expression levels of HULC-silenced stably transfected cell lines in SHG44 cells

2.2 沉默表达HULC抑制SHG44增殖、促进其凋亡

CCK8增殖实验显示实验第2、3、4天HULC-siRNA组细胞OD450值明显低于NC组(图2A);平板克隆形成实验显示NC组和HULC-siRNA组的克隆形成率分别为(34.11 ± 1.24)%和(14.44 ± 0.87)%,沉默表达HULC细胞克隆形成率显著降低(图2B);细胞周期实验显示NC组和HULC-siRNA组的细胞数分别为:G1期(36.89 ± 4.09 、

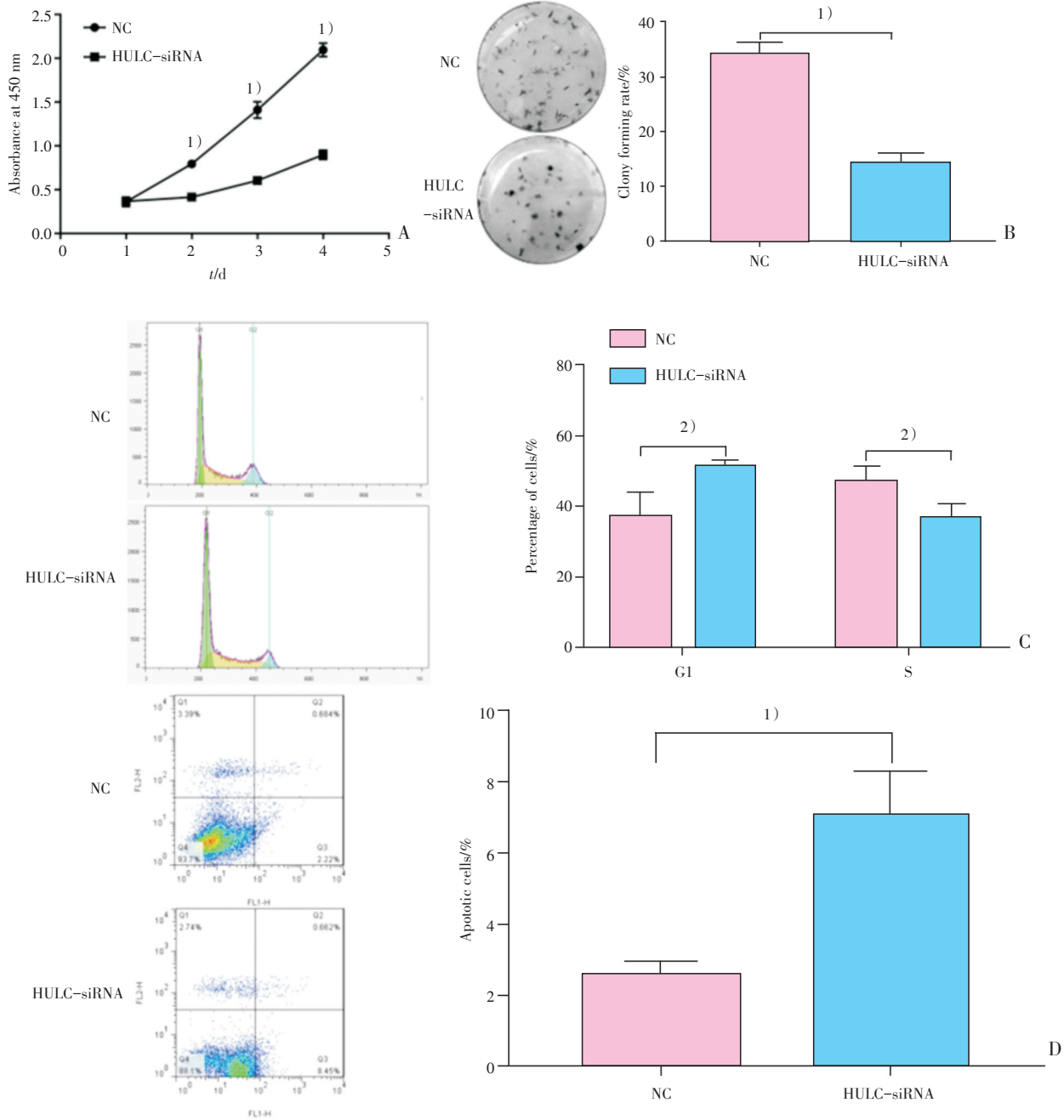
51.74 ± 0.68), S期(46.95 ± 2.49、36.89 ± 2.13), 沉默表达 HULC 细胞周期被阻滞 G1/S期(图 2C); 细胞凋亡实验显示 NC 组和 HULC-siRNA 组的早期凋亡率分别为(2.57 ± 0.22)%和(7.06 ± 0.71)%, 沉默表达 HULC 细胞早期凋亡率显著增加(图 2D)。上述实验差异均具有统计学意义(图 2A: 第 2 天: $t=6.616$, $P=0.003$, 第 3 天: $t=19.93$, $P=0.005$, 第 4 天: $t=31.41$, $P=0.009$; 图 2B: $t=13.01$, $P<0.001$; 图 2C: G1 期 $t=3.577$, $P=0.023$, S 期 $t=3.063$, $P=0.038$; 图 2D: $t=6.045$, $P=0.004$), 说明 HULC 沉默表达后可抑制胶质母细胞瘤细胞的增殖、阻滞细胞周期进展并促进其凋亡。

3 讨论

LncRNA 是长度超过 200 个核苷酸的非编码调控 RNA, 主要通过与其他分子(如蛋白质, DNA, RNA 和金属离子)相互作用以形成适当的三级结构来发挥生物学功能。LncRNA 影响各种生物学过程的基本分子机制, 包括染色质组织、表观遗传调控、基因转录和翻译、RNA 转换和基因组防御等^[5-7]。目前很多 LncRNA 被证实在多种肿瘤中存在显著的表达改变, 并参与肿瘤细胞增殖、凋亡、侵袭转移、自噬及化疗敏感性等恶性生物学行为的调节。LncRNA HULC 位于人类基因组 6p24.3, 于 2007 年通过芯片筛查在肝癌中发现并命名^[3]。但随后被大量文献陆续报道在胃癌、结直肠癌、胰腺癌、骨肉瘤、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)等肿瘤中均有特异性高表达。文献指出, HULC 不仅在上述肿瘤的组织 and 细胞系中表达水平升高, 而且与肿瘤大小、淋巴结转移、远处转移、患者预后及生存期等都呈显著正相关^[3-4, 8-11]。如 Jin 等^[12]发现 HULC 在胃癌血清中的过表达与肿瘤大小、淋巴结转移、远处转移、TNM 分期和幽门螺杆菌感染有关。Peng 等^[8]使用 qRT-PCR 发现 HULC 在 DLBCL 组织和细胞系中均显著过表达, 且与 DLBCL 的 Ann Arbor 分期、B 症状(发热、盗汗、体质量减轻)、CHOP 方案治疗、利妥昔单抗治疗和国际预后指数(IPI)等密切相关。同时, 有学者还指出, HULC 的敲低可抑制肿瘤细胞的致瘤性^[11]。如 Uzan 等^[10]研究发现 HULC 在骨肉瘤(OS)组织和细胞系中与正常对照相比显著上调, 他们通过用小干扰 RNA 抑制 HULC 的

表达进行功能实验, 显示细胞的增殖、迁移和侵袭能力都明显受抑制。但 HULC 在胶质母细胞瘤中的表达情况目前报道甚少, 我们课题组前期实验通过 qRT-PCR 发现人脑胶质母细胞瘤组织中 HULC 的表达水平明显高于瘤旁组织, 胶质母细胞瘤细胞中 HULC 高表达, 并应用胶质母细胞瘤细胞株 U87 进行细胞功能实验得出 HULC 过表达促进细胞增殖、迁移和侵袭能力的结论^[11]。本实验通过向胶质母细胞瘤细胞 SHG44 中转染 HULC 抑制剂并以 qRT-PCR 验证其表达被沉默, 行功能实验发现 SHG44 细胞的生长和增殖受到抑制, 显示 HULC 扮演着促癌基因的角色, 促进癌细胞的增殖、侵袭和转移, 抑制癌细胞凋亡。

众所周知, 肿瘤是一种多基因疾病, 其特征在于细胞生长的不受控制、细胞周期的失调以及对细胞凋亡的抵抗性。肿瘤细胞的命运取决于某些关键分子的表达, 包括肿瘤抑制因子, 致癌基因以及细胞周期调节因子等。HULC 作为促癌基因已在多种类型肿瘤中得到证实, 对于其机制的研究在多种类型肿瘤中也具有多样性。如在鼻咽癌中有学者发现沉默 HULC 表达后癌细胞周期被阻滞在 G1 期并促进细胞凋亡^[13], 机制是 HULC 的敲低触发了 p53 的活化并诱导了 p21 的基因表达, p53 和 p21 的表达被激活后引发了鼻咽癌细胞的细胞周期停滞和细胞凋亡, 指出沉默 HULC 表达后可通过激活 p53-p21 途径显著抑制鼻咽癌细胞的增殖能力。Li 等^[14]等研究发现 HULC 和 YB-1 的亚细胞共定位, YB-1 是被认为是一种癌蛋白, 调节多种增殖途径, 超越细胞周期检查点, 并促进基因组不稳定性、血管生成和转移。所以他们指出 HULC 在肝癌中的促癌机制是与 YB-1 蛋白特异性结合并通过细胞外信号调节激酶(ERK)加速其磷酸化, 导致 YB-1 从 YB1-mRNA 复合物中释放并促进沉默 mRNA 的翻译包括细胞周期蛋白 D1、细胞周期蛋白 E1 和基质金属蛋白酶 3(MMP3)。此外, 他们的研究还显示 HULC 可抑制顺铂诱导的细胞凋亡。目前在 HULC 对胶质母细胞瘤方面的机制研究也有报道, 有学者认为 HULC 通过调节作为 Skp-1/2 靶标的细胞周期蛋白 A/D1/E、p-Rb、c-Myc、CDK2/4 和 p16/p21/27 的表达来诱导肿瘤增殖、迁移和细胞周期进展, 以及通过调节 Bcl-2/Bax 和 caspase-3/8 的表达来诱导肿瘤失巢凋亡抵抗抑制细胞凋亡^[15]。本实验发现沉默表达



A: The proliferation rate of the cells was determined by measuring the absorbance excitation at 450 nm and the emission at 600 nm using a spectrophotometer. Significant inhibition of cell growth was observed in cells with silenced HULC expression compared to cells transfected with control. Mean \pm SD, $n=6$, 1) $P < 0.01$ vs NC (Day 2, $t=6.616$, $P=0.003$; Day 3, $t=19.93$, $P=0.005$; Day 4, $t=31.41$, $P=0.009$). B: Cell growth of U87 cells after transfection of HULC inhibitor or Negative Control (NC) was analyzed by colony formation assay; Clonies with more than 50 cells were counted in each well, Mean \pm SD, $n=3$, 1) $P < 0.01$ vs NC ($t=13.01$, $P < 0.001$); C: Flowcytometry results showed that the percentage of SHG44 cells transfected with HULC-siRNA in the G0-G1 phase is higher than the control group, which paralleled with decrease in the S phase, Mean \pm SD, $n=3$, 2) $P < 0.05$ vs NC (G1 stage $t=3.577$, $P=0.023$, S stage $t=3.063$, $P=0.038$). D: Flow-cytometry pictures of cell apoptosis (lower right quadrant, one of the three separate results was showed); Percentage of two groups in early stage apoptosis. Flowcytometry showed that the percentage of HULC inhibitor transfected SHG44 cells in early stage apoptosis is higher than that of Negative Control (NC) group, Mean \pm SD, $n=3$, 1) $P < 0.01$ vs NC ($t=6.045$, $P=0.004$). HULC-siRNA, HULC inhibitor transfection group.

图2 不同处理组 SHG44 细胞的增殖、周期分布及凋亡情况

Fig.2 Proliferation, cycle distribution and apoptosis of SHG44 cells in different treatment groups

HULC后SHG44的G1期明显延长,阻断了有丝分裂中的细胞,表明HULC通过促进G1/S转换增强细胞增殖,另外沉默表达HULC后SHG44细胞早期凋亡率升高,表明HULC促进细胞凋亡。我们认为HULC可能通过调控PI3K/AKT信号通路阻断细胞周期G1/S期并诱导失巢凋亡,从而影响胶质母细胞瘤细胞生物学行为,有待下一步机制实验验证。

综上所述,本实验对HULC的初步了解提示HULC在胶质瘤的发展中起着重要的作用,可能是会作为肿瘤的治疗靶点和预后标志物,为广大临床肿瘤患者的诊治带来福音,但目前研究尚浅。后期我们将进一步进行体内、体外研究,探讨HULC对胶质瘤生物学行为的调控机制,为胶质母细胞瘤的临床治疗提供理论依据。

参考文献

- [1] Henker C, Kriesen T, Glass A, et al. Volumetric quantification of glioblastoma: experiences with different measurement techniques and impact on survival [J]. *J Neurooncol*, 2017, 135 (2): 391-402.
- [2] Sanchez-Elsner T, Gou D, Kremmer E, et al. Noncoding RNAs of trithorax response elements recruit Drosophila Ash1 to ultrathorax [J]. *Science*, 2006, 311(5764): 1118-1123.
- [3] Panzitt K, Tschernatsch MM, Guelly C, et al. Characterization of HULC, a novel gene with striking up-regulation in hepatocellular carcinoma, as noncoding RNA [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(1): 330-342.
- [4] Shaker OG, Senousy MA, Elbaz EM. Association of rs6983267 at 8q24, HULC rs7763881 polymorphisms and serum lncRNAs CCAT2 and HULC with colorectal cancer in Egyptian patients [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 16246-16346.
- [5] Sanchez-Elsner T, Gou D, Kremmer E, et al. Noncoding RNAs of trithorax response elements recruit Drosophila Ash1 to ultrathorax [J]. *Science*, 2006, 311(5764): 1118-1123.
- [6] Zhang F, Zhang L, Zhang C. Long noncoding RNAs and tumorigenesis: genetic associations, molecular mechanisms, and therapeutic strategies [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(1): 163-175.
- [7] Li T, Mo X, Fu L, et al. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs on gastric cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(8): 8601-8612.
- [8] Peng W, Wu J, Feng J. Long noncoding RNA HULC predicts poor clinical outcome and represents pro-oncogenic activity in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 79: 188-193.
- [9] Yang XJ, Huang CQ, Peng CW, et al. Long noncoding RNA HULC promotes colorectal carcinoma progression through epigenetically repressing NKD2 expression [J]. *Gene*, 2016, 592 (1): 172-178.
- [10] Uzan VR, Lengert Av, Boldrini E, et al. High expression of HULC is associated with poor prognosis in osteosarcoma patients [J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0156774.
- [11] Yan H, Tian R, Zhang M, et al. High expression of long noncoding RNA HULC is a poor predictor of prognosis and regulates cell proliferation in glioma [J]. *Oncotarg Ther*, 2017, 10: 113-120.
- [12] Jin C, Shi W, Wang F, et al. Long non-coding RNA HULC as a novel serum biomarker for diagnosis and prognosis prediction of gastric cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(32): 51763-51772.
- [13] Jiang X, Liu W. Long noncoding rna highly upregulated in liver cancer activates p53-p21 pathway and promotes nasopharyngeal carcinoma cell growth [J]. *DNA Cell Biol*, 2017, 36 (7): 596-602.
- [14] Li D, Liu X, et al. Long noncoding RNA HULC modulates the phosphorylation of YB-1 through serving as a scaffold of extracellular signal-regulated kinase and YB-1 to enhance hepatocarcinogenesis [J]. *Hepatology*, 2017, 65 (5): 1612-1627.
- [15] Zhu Y, Zhang X, Qi L, et al. HULC long noncoding RNA silencing suppresses angiogenesis by regulating ESM-1 via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in human gliomas [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (12): 14429-14440.

(编辑 孙慧兰)