

·实验研究 Experimental research·

体外不完全射频消融后肝癌细胞上皮-间质转化相关长链非编码 RNA 差异表达

曾江正, 蔡兴锐, 黄 芬, 雷俊华, 何志惠, 孙华茂, 卢彦达

【摘要】 目的 研究上皮-间质转化(EMT)相关长链非编码 RNA(LncRNA)在不完全射频消融(RFA)肝细胞癌(HCC)病灶的差异表达谱变化。**方法** 采用 Huh7 细胞 47℃水浴加热,获取体外模拟的不完全 RFA HCC 细胞。镜下及免疫印迹检测 Huh7-H 细胞 EMT 改变,Transwell 检测细胞迁移与侵袭能力,CCK-8 检测细胞增殖能力。采用 LncPath™ Human EMT Array 芯片分析 Huh7-H 和 Huh7 差异表达的 EMT 相关 LncRNA,RT-PCR 验证。**结果** 镜下显示 Huh7-H 呈现 EMT 形态学改变。免疫印迹检测显示 Huh7-H 细胞上皮表型标志分子 E-cadherin 表达降低,间质表型标志分子 N-cadherin、vimentin 表达增加。Transwell 迁移及侵袭实验显示,Huh7-H/Huh7 穿膜细胞数分别为(138.0±11.8)和(61.0±5.2)、(82.7±39.4)和(33.3±7.8),Huh7-H 细胞迁移及侵袭能力明显增强($P<0.05$)。CCK-8 检测显示 Huh7-H 细胞增殖能力明显增强($P<0.05$)。LncPath™ Human EMT Array 芯片筛选出 3 个差异表达 LncRNA($P\leq 0.05$,变化倍数 ≥ 1.5),即 2 条 LncRNA(FUNDC2P4、RPL27P7)下调,1 条 LncRNA(MTND4LP14)上调。RT-PCR 验证 HUH7-H 组 FUNDC2P4、RPL27P7、MTND4LP14 基因表达丰度分别是 HUH-7 组的 0.137、0.869、1.037 倍。临床标本验证 LncRNA FUNDC2P4 在癌旁组织表达高于 HCC 组织,HCC 组织高于 RFA 术后残余 HCC 组织。**结论** 筛选出不完全 RFA 后 HCC 细胞低表达的 EMT 相关 LncRNA FUNDC2P4,为深入探讨该基因功能及分子机制提供了基础。

【关键词】 长链非编码 RNA; 射频消融术; 肝癌; 上皮-间质转化

中图分类号:R735.7 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2017)-09-0823-07

Differential expression profile of EMT-related LncRNAs in hepatocellular carcinoma cells after incomplete radiofrequency ablation in vitro ZENG Jiangzheng, CAI Xingrui, HUANG Fen, LEI Junhua, HE Zhihui, SUN Huamao, LU Yanda. Department of Medical Oncology, First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Cancer Institute of Hainan Medical College, Haikou, Hainan Province 570102, China

Corresponding author: CAI Xingrui, E-mail: 59334462@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the differential expression profile of epithelial mesenchymal transition (EMT) related long chain noncoding RNA (LncRNA) in hepatocellular carcinoma (HCC) cells after incomplete radiofrequency ablation (RFA) in vitro. **Methods** Incomplete RFA was simulated in vitro by using Huh7 cells in water bath at 47℃. EMT change was detected by microscopy and Western blot. Cell invasion and migration were detected by transwell assays. Cell proliferation was determined by cell counting kit-8 (CCK-8) assay. Differential expression profile of EMT-related LncRNAs between Huh7-H and Huh7 were analyzed by LncPath human EMT array, and it was validated by RT-PCR. **Results** Under microscopy, Huh7-H presented characteristic EMT morphological changes. Western blot analysis showed that the expression of E-cadherin in Huh7-H cells was decreased, while the expressions of N-cadherin and Vimentin were increased. Transwell assay test indicated that cell migration and invasion were increased in Huh7-H cell when compared with Huh7 cell (61.0±5.2 vs 138.0±11.8 and 33.3±7.8 vs 82.7±39.4, respectively), the abilities of Huh7-h cell in migration and invasion were evidently strengthened ($P<0.05$). CCK-8 assay showed that the proliferation

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2017.09.013

基金项目: 海南省自然科学基金面上项目(20168307)、海南医学院第一附属医院科研培育基金(HYFYYP201504)

作者单位: 570102 海口 海南医学院第一附属医院肿瘤内科、海南医学院肿瘤研究所

通信作者: 蔡兴锐 E-mail: 59334462@qq.com

ability of Huh 7-H was obviously higher than that Huh 7 ($P < 0.05$). LncPath human EMT array screened out 3 differential expressed LncRNAs ($P \leq 0.05$ and fold changes ≥ 1.5), including two down-regulated LncRNAs (FUND2P4, RPL27P7) and one up-regulated LncRNA (MTND4LP14). RT-PCR validation revealed that the expressions of FUND2P4, RPL27P7 and MTND4LP14 in Huh7-H cells were 0.137, 0.869 and 1.037 times of that in Huh7 cells, respectively. Clinical specimen validation showed that the expression of LncRNA FUND2P4 in peficancerous tissue was higher than that in HCC tissue, and the expression of LncRNA FUND2P4 in HCC tissue was higher than that in the residual HCC tissue after RFA. **Conclusion** EMT-related LncRNA FUND2P4 in HCC cells with low expression after incomplete RFA is successfully screened out, which provides basis for the further investigation of the function and molecular mechanism of this gene. (J Intervent Radiol, 2017, 26: 823-829)

[Key words] long chain noncoding RNA; radiofrequency ablation; hepatocellular carcinoma; epithelial-mesenchymal transition

肝细胞癌(HCC)发病率在世界恶性肿瘤中居第6位,肿瘤相关死亡率第3位^[1]。2015年统计表明60岁前中国男性恶性肿瘤人群中HCC发病率和死亡率居第1位^[2]。由于发病隐匿,仅10%~20%患者有机会接受根治性手术治疗^[3]。射频消融(RFA)已成为无法切除的中晚期HCC主要的局部治疗方法^[4]。然而近年临床研究表明,RFA治疗后高复发率是这项技术尚需解决的难题。相关研究发现,不完全RFA(有残余灶)导致HCC细胞发生上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT),促进HCC复发转移^[5-7]。

长链非编码RNA(LncRNA)是长度在200~100 000 nt且不参与编码蛋白质的RNA分子,在多种层面(表观遗传学调控、转录调控及转录后调控等)上调基因表达水平。越来越多研究表明LncRNA在HCC EMT过程中扮演重要角色^[8-10]。然而目前对LncRNA在RFA不完全HCC细胞侵袭转移过程中的分子机制尚不清楚。本研究采用体外Huh7细胞47℃水浴加热模拟RFA不完全HCC细胞,分析Huh7-H细胞EMT及生物行为学变化;采用LncPath™ Human EMT Array芯片筛选分析Huh7-H、Huh7细胞差异表达的EMT相关LncRNA,为进一步探讨LncRNA通过调控EMT促进不完全RFA后HCC病灶侵袭转移的分子机制提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料包括Huh7细胞(中国科学院上海细胞库),胎牛血清(FBS)(Cat.No.10099-141,美国Gibco公司),高糖培养基DMEM(Cat.No.SH3002201B,美国HyClone公司),青链霉素、磷酸缓冲液(PBS)、细胞计数试剂盒-8(CCK-8,Cat.No.CK04,日本Dojindo

公司),Transwell小室(Cat.No.3422,美国Corning公司),Matrigel™基底膜基质(356234,美国BD医疗公司),E-钙黏蛋白(cadherin)(ab1416,英国Abcam公司),N-cadherin(13116P)、波形蛋白(vimentin)(5741,美国CST公司),增强型化学发光(ECL)-PLUS试剂盒(Cat.No.RPN2232,美国Amersham公司)。选用LncPath™ Human EMT Array芯片(8×15 K,美国ArrayStar公司),芯片检测和分析数据由上海康成生物科技公司完成,内参基因和目的基因引物由上海吉凯基因化学技术公司设计和合成。

1.2 Huh7-H细胞亚系建立

参照文献报道的方法^[5-6],采用水浴加热Huh7细胞体外模拟不完全RFA HCC细胞。Huh7细胞密度达到80%~90%后,47℃水浴加热5 min,37℃、5%CO₂继续培养,存活细胞达到80%时再次47℃水浴加热5 min,按此程序依次加热15、20、25 min。存活细胞即为Huh7-H亚系。镜下观察EMT形态学变化。

1.3 免疫印迹检测EMT分子标记

培养箱中取出细胞,PBS洗涤,加入细胞裂解液,充分裂解后沸水中水浴10 min。各点样孔加入等量蛋白样品进行10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),将蛋白转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,5%脱脂牛奶室温封闭1 h,一抗封膜后室温条件下摇1 h,放入4℃冰箱过夜,PBST洗膜3次,二抗室温下孵育PVDF膜2 h。ECL-PLUS试剂进行显色,行灰度值扫描分析。

1.4 Transwell检测细胞迁移与侵袭能力

Transwell迁移:参照Corning迁移试剂盒说明书。细胞消化重悬计数后,上室加入 2×10^4 细胞,下室中加入700 μl含10%FBS完全培养基,5%CO₂、37℃培养48 h;4%多聚甲醛固定小室20 min,PBS

洗涤小室 3 次,结晶紫染色 5~10 min,中性树脂封片;镜下取 9 个随机视野计数,计算出细胞数后取平均值,统计结果。

Transwell 侵袭:Matrigel 原液和无血清 DMEM 培养基 1:15(0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)比例混合,上室加入 100 μl 凝胶液,成胶后 PBS 洗涤,再加入 2×10^4 细胞,余同 Transwell 迁移实验。

1.5 CCK-8 检测细胞增殖能力

将 Huh7、Huh7-H 细胞制备单细胞悬液,密度调整为 $1 \times 10^5/\text{ml}$;取出 96 孔板,接种 100 μl 密度为 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 细胞悬液,37℃、5%CO₂ 分别培养 24、48、72 h;吸去培养液,每孔加入 100 μl CCK-8 检测工作液,孵育 4 h,酶联免疫监测仪读取 450 nm 处光密度(OD)值,分析数据。

1.6 LncPath™ 芯片分析 LncRNA 差异表达

抽提 Huh7、Huh7-H 细胞总 RNA,并对 RNA 进行质量鉴定,合格 RNA 按照 Flash RNA 标记试剂盒(美国 ArrayStar 公司)标记方法对 RNA 进行扩增、转录生成荧光标记的 cRNA;标记后 cRNA 用 LncPath™ Human EMT Array 芯片杂交;漂洗后用 G2505C 型扫描仪(美国 Agilent 公司)扫描,原始数据分析由 11.0.1.1 版特征提取软件(美国 Agilent 公司)完成。差异 LncRNA 基因标准为表达改变 ≥ 1.5 倍及 $P \leq 0.05$ 。

1.7 RT-PCR 验证 LncRNA 差异表达

提取细胞总 RNA,NanoDrop 2000/2000C 分光光度计(美国 Thermo Fisher 科技公司)分析测定所抽提 RNA 浓度及质量,以 mRNA 作为模板,利用逆转录酶逆转录成 cDNA。FUND2P4 上游引物:5'-CGCAAGACAAGCTCGATGAAAT-3',下游引物:5'-AAACAAAACACCTCCCACAAC-3',256bp;RPL27P7 上游引物:5'-AGAACATTGATGATGGCACCTC-3',下游引物:5'-GAGTACCTTGTGGGCAGTAGAT-3',179bp;MTND4LP14 上游引物:5'-CGATCCCACC-TAATATCATCCC-3',下游引物:5'-CGGCTTCACAGGCAGCAAATAC-3',148bp。内参 GAPDH,上游引物:5'-TGACTTCAACAGCGACACCCA-3',下游引物:5'-CACCCTGTTGCTGTAGCCAAA-3',121 bp。采用凝胶图像分析系统对电泳条带进行密度扫描。相对定量分析 $F=2^{-\Delta\Delta C_t}$, ΔC_t =目的基因 C_t 值-内参基因 C_t 值; $-\Delta\Delta C_t$ =NC 组 ΔC_t 平均值-各样品 ΔC_t 值; $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 反映各样品相对 NC 组样品目的基因的相对表达水平。

1.8 RT-PCR 检测 RFA 术后残余 HCC 组织 LncRNA

FUND2P4

临床上选取 25 例 HCC 患者手术切除病理标本、15 例 HCC 患者 RFA 术后穿刺活检的残余组织(RFA 术后 1 个月增强 CT 评估)病理标本。HCC 手术切除组和 RFA 组在性别、年龄、病理分级、肝硬化、肿瘤大小及数目等临床特征方面均具有可比性($P > 0.05$),见表 1。检测肝癌组织、癌旁组织、RFA 术后残余组织 LncRNA FUND2P4 表达情况。RT-PCR 方法参见上述 1.7。

表 1 HCC 患者临床特征

特征	手术切除组 (n=25)	RFA 组 (n=15)	<i>n</i> <i>P</i> 值
性别			1.000
男	18	11	
女	7	4	
年龄			0.567
≤55 岁	14	7	
>55 岁	11	8	
病理分级			0.514
I+II	11	9	
III+IV	14	6	
肝硬化			0.794
有	16	11	
无	9	4	
AFP			0.914
≤20 $\mu\text{g}/\text{L}$	5	2	
>20 $\mu\text{g}/\text{L}$	20	13	
肿瘤长径/cm			0.251
≤5	12	10	
>5	13	5	
包膜			0.864
有	16	10	
无	9	5	
门静脉癌栓			0.278
有	4	0	
无	21	15	
肿瘤数目			0.433
≤3 枚	18	9	
>3 枚	7	6	
BCLC 分期			0.922
A	20	11	
B+C	5	4	

注:病理分级:Edmondson-Steiner 肝癌 4 级分级;AFP:甲胎蛋白;
BCLC:巴塞罗那临床肝癌分期

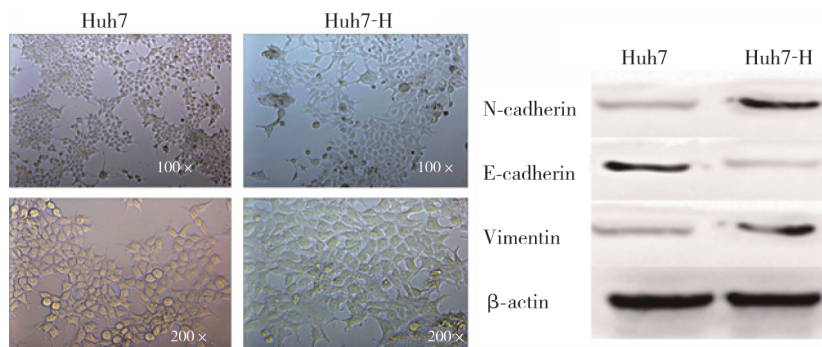
1.9 作图与统计分析

采用 GraphPad Prism 7、Photoshop CS6 软件完成图表制作,IBM SPSS 20.0 软件完成统计学分析。计量资料经探索性分析,均服从正态分布。组间比较用 t 检验,多组比较用 F 检验,计数资料用 χ^2 分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Huh7-H 细胞呈现 EMT 特征性改变

镜下显示 Huh7-H 细胞松散,失去极性,成梭形



免疫印迹检测示 Huh7-H 细胞 E-cadherin 表达降低, N-cadherin、vimentin 表达增加

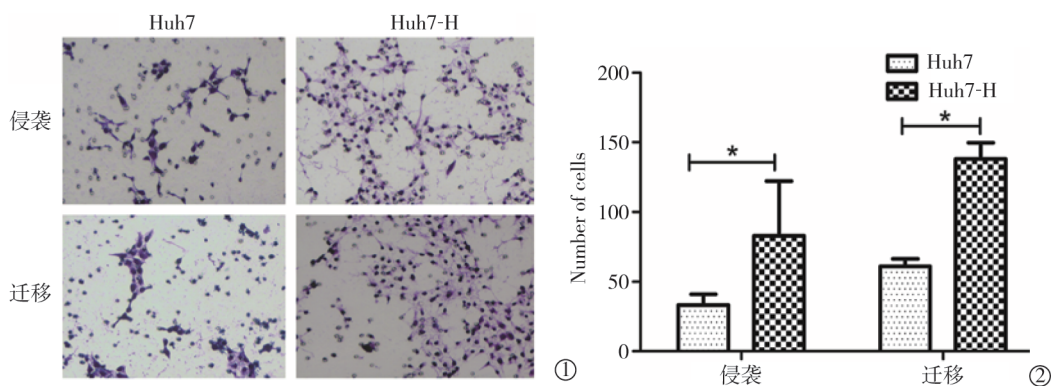
图 1 镜下 Huh7-H 细胞呈现 EMT 特征性改变

2.2 Huh7-H 细胞迁移与侵袭能力增强

Transwell 迁移实验显示, Huh7-H、Huh7 穿膜细胞数分别为 (138.0 ± 11.8) 、 (61.0 ± 5.2) , Huh7-H 细胞迁移能力明显增强, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$);

改变。免疫印迹检测显示 Huh7-H 细胞上皮表型标志分子 E-cadherin 表达降低, 间质表型标志分子 N-cadherin、vimentin 表达增加, 见图 1。

Transwell 侵袭实验显示, Huh7-H、Huh7 穿膜细胞数分别为 (82.7 ± 39.4) 、 (33.3 ± 7.8) , Huh7-H 细胞侵袭能力增强, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2。



①镜下显示; ②统计学分析结果, $*P < 0.05$

图 2 Transwell 检测 Huh7-H 迁移及侵袭能力增强

2.3 Huh7-H 细胞增殖能力增强

CCK-8 增殖实验显示, Huh7-H、Huh7 细胞培养 24、48、72 h 后 OD450 nm 值分别为 (0.326 ± 0.022) 和 (0.180 ± 0.009) 、 (0.565 ± 0.037) 和 (0.396 ± 0.042) 、 (0.865 ± 0.052) 和 (0.630 ± 0.036) , Huh7-H 增殖能力增强, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3。

2.4 Huh7-H、Huh7 差异表达 LncRNA

采用 LncPath™ Human EMT Array 芯片获得 Huh7-H、Huh7 基因表达数据, 聚类分析 Huh7-H、Huh7 差异表达的 LncRNA。筛选出 3 个差异表达 LncRNA ($P \leq 0.05$, 差异表达倍数 ≥ 1.5), 即 2 条 LncRNA 下调——FUND C2P4 (ENST00000441207)、RPL27P7 (ENST00000441321), 1 条 LncRNA 上调——MTND4LP14 (ENST00000429447)。进一步 RT-

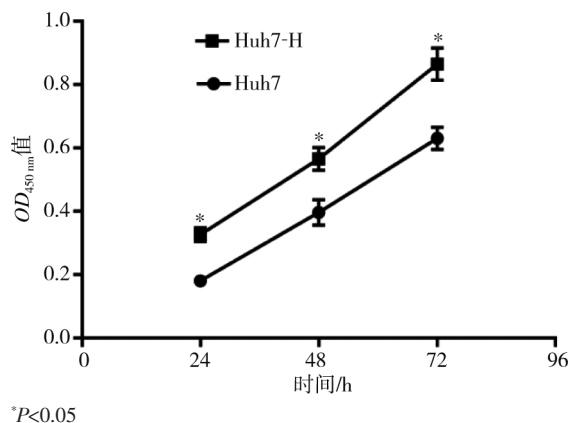
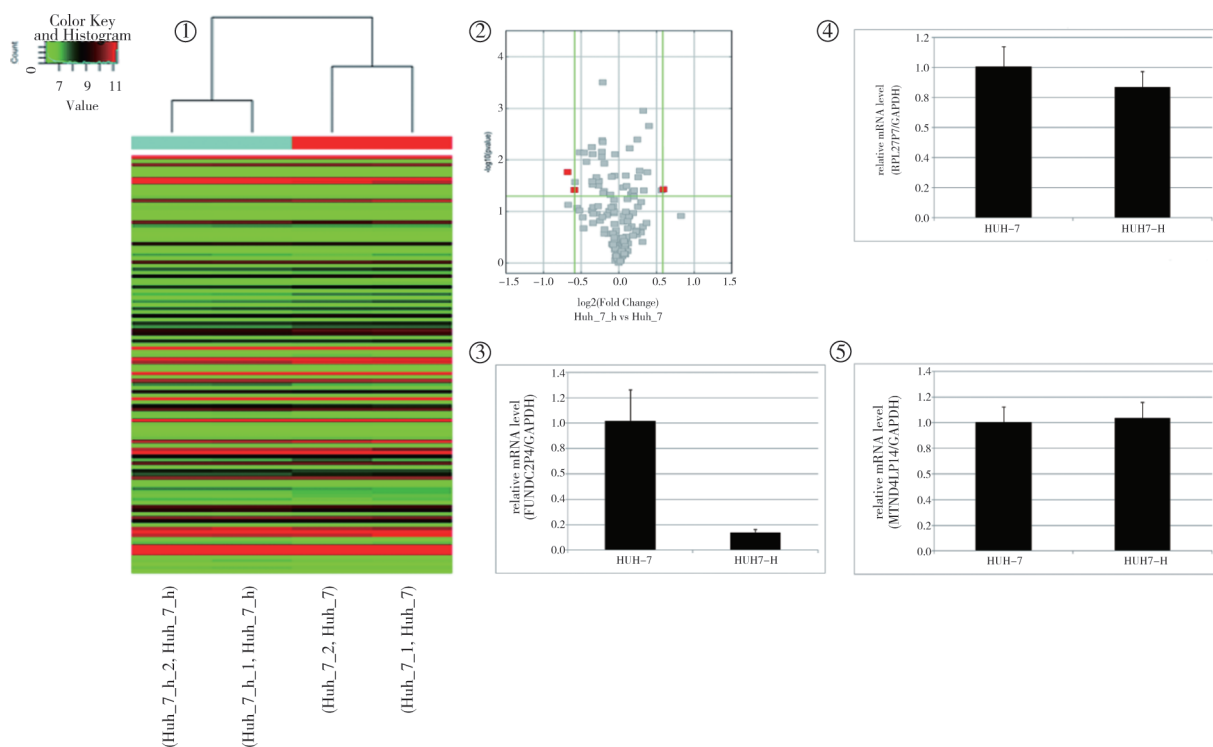


图 3 CCK-8 检测 Huh7-H 增殖能力增强

PCR 检测证实, Huh7-H 组 FUND C2P4、RPL27P7、MTND4LP14 基因表达丰度分别是 Huh7 组的 0.137、

0.869、1.037 倍,见图 4。



①聚类分析示差异表达的 LncRNA; ②火山图显示差异表达的 LncRNA; ③④⑤RT-PCR 检测验证 LncRNA FUNDC2P4、RPL27P7、MTND4LP14 基因表达

图 4 LncPath™ Human EMT Array 芯片检测 Huh7-H、Huh7 差异表达 LncRNA

2.5 RFA 术后残余 HCC 组织 FUNDC2P4 表达变化

RT-PCR 检测显示 LncRNA FUNDC2P4 在癌旁组织表达 (2.393 ± 0.490) 高于 HCC 组织 (0.912 ± 0.313) ($P < 0.05$), HCC 组织高于 RFA 术后残余 HCC 组织 (0.174 ± 0.109) ($P < 0.05$), 见图 5。

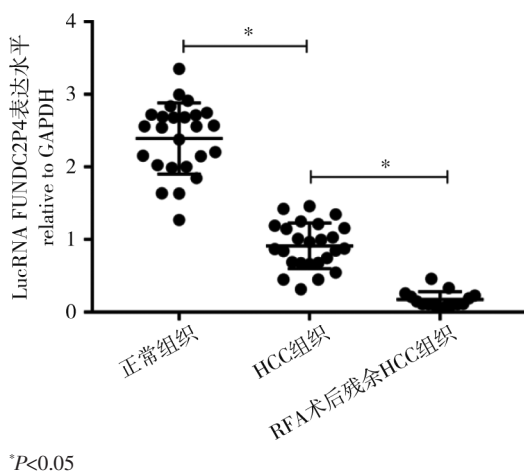


图 5 RT-PCR 检测 LncRNA FUNDC2P4 表达情况

3 讨论

目前 RFA 已成为无法切除的中晚期 HCC 主要的局部治疗方法^[4]。但临床相关研究表明,由于肿瘤

解剖位置(如邻近重要器官、神经、血管等)限制、肿瘤血管造成热沉降、大块肿瘤叠加消融存在低温区等,难以完全消融肿瘤,消融不完全的残余肿瘤组织可加速复发转移^[11-13]。研究发现 RFA 不完全的 HCC 细胞发生 EMT,可促进 HCC 侵袭转移。基础研究采用 5~50℃热诱导 HCC 细胞模拟 RFA 不完全或过渡区,发现不完全 RFA 可使 HCC 细胞出现 EMT 形态学改变,侵袭转移能力增强,上皮表型标志分子如 E-cadherin、细胞角蛋白(cytokeratin,CK)-8, cytokeratin-19 及紧密连接蛋白(claudin)1 表达降低,而间质表型标志分子 N-cadherin、蜗牛同源物 1(果蝇)样蛋白(SNAIL)1、波形蛋白(vimentin)及 Twist 1 表达增加^[5-7]。HCC 细胞过表达增殖细胞核抗原(PCNA)、基质金属蛋白酶(MMP)-9、血管内皮细胞生长因子(VEGF)、低氧诱导因子(HIF)-1 及上皮细胞黏附分子(EpCAM)等,从而快速增殖进展^[14-17];其中不完全 RFA 导致 HCC 细胞 EMT 是肿瘤侵袭转移的关键环节,涉及的信号转导通路包括 ERK1/2、Akt、Wnt/β-catenin、CaMKII/ERK 等^[13-15,17]。

越来越多研究表明 LncRNA 在 HCC EMT 过程中扮演重要角色。在 HCC 中高表达的 LncRNA-ATB 能竞争性结合 miR-200 s,增加 ZEB1/ZEB2 水平,促

进 EMT 和肿瘤细胞侵袭^[8]。LncRNA ZEB1-AS1 直接靶向 ZEB1 表达调控 EMT, 是 HCC 不良预后的生物标志^[9]。LncRNA-AOC4P 为 HCC 的抑癌基因, 可与 vimentin 结合促进其降解, 从而抑制 EMT 减弱 HCC 侵袭转移能力^[10]。肿瘤微环境中 IL-6 能激活 STAT3, 而 STAT3 作为转录激活因子可与 Lnc TCF7 启动子区域结合, 诱导 Lnc TCF7 表达介导 EMT 促进 HCC 侵袭, 但具体调控 EMT 的机制未作进一步研究^[18]。LncRNA-HULC 以 ceRNA 形式通过 miR-200a-3p/ZEB1 信号通路诱导 HCC EMT^[19]。LncRNA-FTX 通过竞争性吸附 miR-374a 抑制 Wnt/ β -catenin 通路, 从而抑制 HCC EMT 及侵袭作用。另外 FTX 能抑制 DNA 复制许可因子 MCM2, 从而抑制 HCC 增殖^[20]。以上研究表明 LncRNA 异常表达与 HCC EMT 和侵袭转移有密切关系。

本中心在海南省较早开展 HCC RFA 治疗, 采用第 3 代优化电极, 包括冷循环电极、子母针伞状多组电极, 取得了较好的临床效果^[21]; 前期进行了相关研究, 发现 HCC RFA 术后复发转移风险与 Treg 及 CEC、VEGF 水平升高密切相关^[22-23]; 相关研究表明肿瘤免疫及血管生成可通过癌细胞 EMT 参与促进残余灶侵袭转移^[24-25]。本研究采用 47℃ 热诱导 Huh7 细胞获得 Huh7-H 体外模拟 RFA 不完全 HCC 细胞, 发现 Huh7-H 出现 EMT 特征性形态学改变, 上皮表型标志分子 E-cadherin 表达降低, 间质表型标志分子 N-cadherin、vimentin 表达增加; Transwell 实验显示 Huh7-H 细胞侵袭和迁移能力增强, CCK-8 增殖试验显示 Huh7-H 细胞增殖能力增强; 所采用的 LncPath™ Human EMT Array 芯片可检测与 EMT 相关的 390 个 LncRNA 表达水平, 相对于 LncRNA 常规芯片, 差异表达的 LncRNA 数目少, 目的性更强, 更容易筛选出目的 LncRNA, 因此利用该芯片获得 Huh7-H 和 Huh7 基因差异表达数据, 通过 RT-PCR 验证, 筛选出 LncRNA FUNDC2P4 作为研究对象进行进一步研究; 临床进一步检测 HCC 癌旁组织、HCC 组织、RFA 术后残余 HCC 组织的 LncRNA FUNDC2P4 表达情况, 发现 LncRNA FUNDC2P4 癌旁组织表达高于 HCC 组织, HCC 组织高于 RFA 术后残余 HCC 组织。

综上, 本研究成功筛选出 RFA 不完全的 HCC 细胞低表达的 EMT 相关 LncRNA FUNDC2P4, 推测该基因可能作为抑癌基因参与调控 EMT, 从而在 HCC RFA 术后复发转移中起着重要作用。然而需要对 LncRNA FUNDC2P4 功能及分子机制, 作进一步

研究。

[参考文献]

- [1] European Association for the Study of the Liver, European Organisation for Research and Treatment of Cancer. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2012, 56: 908-943.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66: 115-132.
- [3] Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet, 2012, 379: 1245-1255.
- [4] Shiina S, Tateishi R, Arano T, et al. Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: 10-year outcome and prognostic factors[J]. Am J Gastroenterol, 2012, 107: 569-577.
- [5] Dong S, Kong J, Kong F, et al. Insufficient radiofrequency ablation promotes epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cells through Akt and ERK signaling pathways[J]. J Transl Med, 2013, 11: 273.
- [6] Yoshida S, Kornek M, Ikenaga N, et al. Sublethal heat treatment promotes epithelial-mesenchymal transition and enhances the malignant potential of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2013, 58: 1667-1680.
- [7] Zhang N, Wang L, Chai ZT, et al. Incomplete radiofrequency ablation enhances invasiveness and metastasis of residual cancer of hepatocellular carcinoma cell HCCLM3 via activating β -catenin signaling[J]. PLoS One, 2014, 9: e115949.
- [8] Yuan JH, Yang F, Wang F, et al. A long noncoding RNA activated by TGF- β promotes the invasion-metastasis cascade in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Cell, 2014, 25: 666-681.
- [9] Li T, Xie J, Shen C, et al. Upregulation of long noncoding RNA ZEB1-AS1 promotes tumor metastasis and predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. Oncogene, 2016, 35: 1575-1584.
- [10] Wang TH, Lin YS, Chen Y, et al. Long non-coding RNA AOC4P suppresses hepatocellular carcinoma metastasis by enhancing vimentin degradation and inhibiting epithelial-mesenchymal transition[J]. Oncotarget, 2015, 6: 23342-23357.
- [11] Teng W, Liu KW, Lin CC, et al. Insufficient ablative margin determined by early computed tomography may predict the recurrence of hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation[J]. Liver Cancer, 2015, 4: 26-38.
- [12] Poch FG, Rieder C, Ballhausen H, et al. The vascular cooling effect in hepatic multipolar radiofrequency ablation leads to incomplete ablation ex vivo[J]. Int J Hyperthermia, 2016, 32: 749-756.
- [13] Zheng XW, Zhao YF, Tang Z, et al. Efficiency and influencing factors of ultrasound-guided radiofrequency ablation as treatment in hepatic malignant tumors[J]. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi, 2016, 24: 69-73.
- [14] Obara K, Matsumoto N, Okamoto M, et al. Insufficient radiofrequency ablation therapy may induce further malignant

- transformation of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatol Int*, 2008, 2: 116-123.
- [15] Ke S, Ding XM, Kong J, et al. Low temperature of radiofrequency ablation at the target sites can facilitate rapid progression of residual hepatic VX2 carcinoma[J]. *J Transl Med*, 2010, 8: 73.
- [16] Yamada S, Utsunomiya T, Morine Y, et al. Expressions of hypoxia-inducible factor-1 and epithelial cell adhesion molecule are linked with aggressive local recurrence of hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation therapy[J]. *Ann Surg Oncol*, 2014, 21: S436-S442.
- [17] Liu Z, Dai H, Jia G, et al. Insufficient radiofrequency ablation promotes human hepatoma SMMC7721 cell proliferation by stimulating vascular endothelial growth factor overexpression[J]. *Oncol Lett*, 2015, 9: 1893-1896.
- [18] Wu J, Zhang J, Shen B, et al. Long noncoding RNA lncTCF7, induced by IL-6/STAT3 transactivation, promotes hepatocellular carcinoma aggressiveness through epithelial-mesenchymal transition[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015, 34: 116.
- [19] Li SP, Xu HX, Yu Y, et al. LncRNA HULC enhances epithelial-mesenchymal transition to promote tumorigenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma via the miR-200a-3p/ZEB1 signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 42431-42446.
- [20] Liu F, Yuan JH, Huang JF, et al. Long noncoding RNA FTX inhibits hepatocellular carcinoma proliferation and metastasis by binding MCM2 and miR-374a[J]. *Oncogene*, 2016, 35: 5422-5434.
- [21] 曾江正, 郝新宝, 张建辉, 等. 冷循环射频消融治疗中晚期肝癌的近期疗效评价[J]. *海南医学院学报*, 2010, 16: 1618-1620.
- [22] 曾江正, 刘光清, 郝新宝, 等. 冷循环射频消融治疗后肝癌患者调节性 T 细胞变化及其对预后的影响[J]. *介入放射学杂志*, 2014, 23: 491-495.
- [23] Wang-Yuan Z, Jiang-Zheng Z, Lu YD, et al. Clinical efficacy of metronomic chemotherapy after cool-tip radiofrequency ablation in the treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Hyperthermia*, 2016, 32: 193-198.
- [24] Xu P, Bailey-Bucktrout S, Xi Y, et al. Innate antiviral host defense attenuates TGF- β function through IRF3-mediated suppression of Smad signaling[J]. *Mol Cell*, 2014, 56: 723-737.
- [25] Fantozzi A, Gruber DC, Pisarsky L, et al. VEGF-mediated angiogenesis links EMT-induced cancer stemness to tumor initiation[J]. *Cancer Res*, 2014, 74: 1566-1575.

(收稿日期:2017-04-18)

(本文编辑:边 皓)