

## A COMPREHENSIVE GENOME-WIDE ANALYSIS OF LNCRNA EXPRESSION PROFILE DURING HEPATIC CARCINOMA CELL PROLIFERATION PROMOTED BY PHOSPHOLIPASE C $\gamma$ 2

X. CHEN\*, Q. LV, Y. LIU

Animal Science and Technology School, Henan University of Science and Technology, 263# Kaiyuan Avenue, Luoyang 471023, China

\*E-mail: cxguang1015@126.com

*Phospholipase C $\gamma$ 2 has a promotive effect on hepatic carcinoma development. Meanwhile, lncRNAs play a critical role in the pathology. Therefore, to determine whether phospholipase C $\gamma$ 2 could enhance HCC cell proliferation by regulating lncRNA transcription, hepatic carcinoma cells RH35 were infected with Ad-phospholipase C $\gamma$ 2 constructed previously, followed by lncRNA sequencing by high-throughput technology. Differently expressed lncRNAs (DElncRNAs) and their target genes were identified according to strict criteria. GO and KEGG, Reactome pathway analyses were performed to analyze biological processes and the related pathways of DElncRNAs. lncRNA/mRNA coexpression pairs were screened according to expression profiling combined with bioinformatics analysis. The results showed that 231 DElncRNAs were identified in Ad-phospholipase C $\gamma$ 2-overexpressing cells compared to control, containing 60 up- and 171 down-regulated ones. Target genes prediction analysis showed that 61 cis- and 30 trans-acting DElncRNAs were matched to 55 and 26 targets, respectively. Coexpression analysis found 33 lncRNA/mRNA coexpression pairs including 24 pairs in cis. GO analysis showed that these cis-mode lncRNA/mRNA pairs were involved in cytoskeleton organization, cell adhesion, and multiple signaling pathways related to apoptosis, proliferation, and metastasis. Collectively, phospholipase C $\gamma$ 2 caused significant alterations in the expression of many lncRNAs in liver cancer cells, providing valuable insight into the precise mechanism of phospholipase C $\gamma$ 2-promoting liver cancer cell growth.*

**Key words:** phospholipase C $\gamma$ 2; hepatic carcinoma; lncRNA transcriptome; bioinformatic analysis.

КОМПЛЕКСНИЙ ПОВНОГЕНОМНИЙ АНАЛІЗ ПРОФІЛЮ ЕКСПРЕСІЇ днРНК ПІД ЧАС ПРОЛІФЕРАЦІЇ КЛІТИН ГЕПАТОКАРЦИНОМИ, ПРИШВИДШЕНОЇ ФОСФОЛІПАЗОЮ C $\gamma$ 2

Фосфоліпаза C $\gamma$ 2 пришвидшує розвиток гепатокарциноми, а довгі некодуєчі РНК (днРНК) відіграють

© ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ НАН УКРАЇНИ, 2023

важливу роль в цій патології. Для визначення можливого збільшення рівня проліферації клітин гепатокарциноми, викликаного фосфоліпазою C $\gamma$ 2 через регуляцію транскрипції днРНК, клітини гепатокарциноми RH35 інфікували раніше розробленою Ad-фосфоліпазою C $\gamma$ 2, після чого провели секвенування днРНК за допомогою високошвидкісної технології. Визначення диференціально експресованих днРНК (ДЕднРНК) та їхніх цільових генів проходило за суворими критеріями. Аналіз біологічних процесів і відповідних шляхів ДЕднРНК було проведено за допомогою методів генної онтології (GO) і KEGG, аналізу шляхів на базі Reactome. Скринінг пар коекспресії днРНК/мРНК здійснювали відповідно до профілювання експресії у поєднанні з біоінформатичним аналізом. Результати продемонстрували, що 231 ДЕднРНК було ідентифіковано в надмірно експресуючих C $\gamma$ 2 клітинах в Ad-фосфоліпазі порівняно з контролем, що містить 60 позитивно регульованих і 171 негативно регульованих клітин. Прогностичний аналіз цільових генів показав, що 61 цис- і 30 транс-діючих ДЕднРНК відповідали 55 і 26 цільовим генам відповідно. Аналіз коекспресії виявив 33 пар коекспресії днРНК/мРНК, зокрема 24 пари в цис. Аналіз генної онтології продемонстрував, що ці пари днРНК/мРНК у цис-режимі були залучені до організації цитоскелету, адгезії клітин і множинних сигнальних шляхів, що стосувалися апоптозу, проліферації та метастазів. Загалом фосфоліпаза C $\gamma$ 2 спричинила значні зміни в експресії багатьох днРНК у клітинах раку печінки, і такі цінні дані сприяють кращому усвідомленню точного механізму, за допомогою якого фосфоліпаза C $\gamma$ 2 пришвидшує ріст клітин раку печінки.

**Ключові слова:** фосфоліпаза C $\gamma$ 2, гепатокарцинома, транскриптом днРНК, біоінформатичний аналіз.

### REFERENCES

- Alzayady KJ, Wang L, Chandrasekhar R, Wagner LE 2<sup>nd</sup>, Van Petegem F, Yule DI (2016) Defining the stoichiometry of inositol 1,4,5-trisphosphate binding required to initiate Ca<sup>2+</sup> release. *Sci Signal* 9(422):ra35.
- Arab K, Park YJ, Lindroth AM, Schäfer A, Oakes C, Weichenhan D, Lukanova A, Lundin E, Risch A, Meister M, Dienemann H, Dyckhoff G, Herold-Mende C, Grummt I, Niehrs C, Plass C (2014) Long noncoding RNA TARID directs demethylation and activation of the tumor suppressor TCF21 via GADD45A. *Mol Cell* 55(4):604–614.
- Bettermann K, Mehta AK, Hofer EM, Wohlrab C, Golob-Schwarzl N, Svendova V, Schimek MG, Stumptner C, Thüringer A, Speicher MR, Lackner

- C, Zatloukal K, Denk H, Haybaeck J (2016) Keratin 18-deficiency results in steatohepatitis and liver tumors in old mice: A model of steatohepatitis-associated liver carcinogenesis. *Oncotarget* 7(45):73309–73322.
- Carlsten JO, Zhu X, Lypez MD, Samuelsson T, Gustafsson CM (2016) Loss of the Mediator subunit Med20 affects transcription of tRNA and other non-coding RNA genes in fission yeast. *Biochim Biophys Acta* 1859(2):339–347.
- Durso DF, Bacalini MG, do Valle HF, Pirazzini C, Bonafé M, Castellani G, Faria AM, Franceschi C, Garagnani P, Nardini C (2017) Aberrant methylation patterns in colorectal cancer: a meta-analysis. *Oncotarget* 8(8):12820–12830.
- El Khodiry A, Afify M, El Tayebi HM (2018) Behind the curtain of non-coding RNAs; long non-coding RNAs regulating hepatocarcinogenesis. *World J Gastroenterol* 24(5):549–572.
- Feng L, Reynisdýttir I, Reynisson J (2012) The effect of PLC- $\gamma$ 2 inhibitors on the growth of human tumour cells. *Eur J Med Chem* 54:463–469.
- Ganegoda GU, Li M, Wang W, Feng Q (2015) Heterogeneous network model to infer human disease-long intergenic non-coding RNA associations. *IEEE Trans Nanobioscience* 14(2):175–183.
- Gao M, Zhong A, Patel N, Alur C, Vyas D (2017) High throughput RNA sequencing utility for diagnosis and prognosis in colon diseases. *World J Gastroenterol* 23(16):2819–2825.
- Gong C, Li Z, Ramanujan K, Clay I, Clay I, Zhang Y, Lemire-Brachat S, Glass DJ (2015) A long non-coding RNA, *LncMyoD*, regulates skeletal muscle differentiation by blocking IMP2-mediated mRNA translation. *Dev Cell* 34(2):181–191.
- Hu L, Ye H, Huang G, Luo F, Liu Y, Liu Y, Yang X, Shen J, Liu Q, Zhang J (2016) Long noncoding RNA *GAS5* suppresses the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells via miR-21. *Tumour Biol* 37(2):2691–2702.
- Huynh MQ, Goßmann J, Gattenlöhner S, Klapper W, Wacker HH, Ramaswamy A, Bittner A, Kaiser U, Neubauer A (2015) Expression and pro-survival function of phospholipase  $C\gamma 2$  in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 56(4):1088–1095.
- Kashi K, Henderson L, Bonetti A, Carninci P (2016) Discovery and functional analysis of lncRNAs: Methodologies to investigate an uncharacterized transcriptome. *Biochim Biophys Acta* 1859(1):3–15.
- Lattanzio R, Piantelli M, Falasca M (2013) Role of phospholipase C in cell invasion and metastasis. *Adv Biol Regul* 53(3):309–318.
- Lebherz-Eichinger D, Krenn CG, Roth GA (2013) Keratin 18 and heat-shock protein in chronic kidney disease. *Adv Clin Chem* 62:123–149.
- Li SP, Xu HX, Yu Y, He JD, Wang Z, Xu YJ, Wang CY, Zhang HM, Zhang RX, Zhang JJ, Yao Z, Shen ZY (2016) *LncRNA HULC* enhances epithelial-mesenchymal transition to promote tumorigenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma via the miR-200a-3p/*ZEB1* signaling pathway. *Oncotarget* 7(27):42431–42446.
- Li WH, Zhou ZJ, Huang TH, Guo K, Chen W, Wang Y, Zhang H, Song YC, Chang DM (2016) Detection of *OSR2*, *VAV3*, and *PPFIA3* Methylation in the Serum of Patients with Gastric Cancer. *Dis Markers* 2016:5780538.
- Li Y, Ren M, Zhao Y, Lu X, Wang M, Hu J, Lu G, He S (2017) MicroRNA-26a inhibits proliferation and metastasis of human hepatocellular carcinoma by regulating *DNMT3B-MEG3* axis. *Oncol Rep* 37(6):3527–3535.
- Lin HY, Glinsky GV, Mousa SA, Davis PJ (2015) Thyroid hormone and anti-apoptosis in tumor cells. *Oncotarget* 6(17):14735–14743.
- Luo K, Li Y, Yin Y, Li L, Wu C, Chen Y, Nowsheen S, Hu Q, Zhang L, Lou Z, Yuan J (2017) *USP49* negatively regulates tumorigenesis and chemoresistance through *FKBP51-AKT* signaling. *EMBO J* 36(10):1434–1446.
- Ogasawara S, Komuta M, Nakashima O, Akiba J, Tsuneoka M, Yano H (2010) Accelerated expression of a *Myc* target gene *Mina53* in aggressive hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 40(3):330–336.
- Pertea M, Pertea GM, Antonescu CM, Chang TC, Mendell JT, Salzberg SL (2015) StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat Biotechnol* 33:290–295.
- Poss ZC, Ebmeier CC, Taatjes DJ (2013) The Mediator complex and transcription regulation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 48(6):575–608.
- Qin H, Lu S, Thangaraju M, Cowell JK (2019) *Waf3* deficiency reveals involvement in metastasis in a mouse model of breast cancer. *Am J Pathol* 189:2450–2458.
- Quinn JJ, Chang HY (2016) Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat Rev Genet* 17(1):47–62.
- Reynisson J, Jaiswal JK, Barker D, D’mello SA, Denny WA, Baguley BC, Leung EY (2016) Evidence that phospholipase C is involved in the antitumour action of NSC768313, a new thieno(2,3-b)pyridine derivative. *Cancer Cell Int* 16:18.
- Sahu A, Singhal U, Chinnaiyan AM (2015) Long non-coding RNAs in cancer: from function to translation. *Trends in Cancer* 1(2):93–109.
- Shi Y, Song Q, Yu S, Hu D, Zhuang X (2015) Microvascular invasion in hepatocellular carcinoma overexpression promotes cell proliferation and inhi-

- bits cell apoptosis of hepatocellular carcinoma via inhibiting miR-199a expression. *Oncotargets Ther* 8:2303–2310.
- Sui J, Yang X, Qi W, Guo K, Gao Z, Wang L, Sun D (2017) Long Non-Coding RNA Linc-USP16 Functions As a Tumour Suppressor in Hepatocellular Carcinoma by Regulating PTEN Expression. *Cell Physiol Biochem* 44(3):1188–1198.
- Sun Y, Gao X, Wu P, Wink M, Li J, Dian L, Liang Z (2019) Jatrorrhizine inhibits mammary carcinoma cells by targeting TNIK mediated Wnt/ $\beta$ -catenin signalling and epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Phytomedicine* 63:153015.
- Tang L, Liang Y, Xie H, Yang X, Zheng G (2020) Long non-coding RNAs in cutaneous biology and proliferative skin diseases: Advances and perspectives. *Cell Prolif* 53:e12698.
- Teng Y, Pi W, Wang Y, Cowell JK (2016) WASF3 provides the conduit to facilitate invasion and metastasis in breast cancer cells through HER2/HER3 signaling. *Oncogene* 35:4633–4640.
- Vasuri F, Visani M, Acquaviva G, Brand T, Fiorentino M, Pession A, Tallini G, D’Errico A, de Biase D (2018) Role of microRNAs in the main molecular pathways of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 24(25):2647–2660.
- Vodopiutz J, Schmook MT, Konstantopoulou V, Plecko B, Greber-Platzer S, Creus M, Seidl R, Janecke AR (2015) MED20 mutation associated with infantile basal ganglia degeneration and brain atrophy. *Eur J Pediatr* 174(1):113–118.
- Wang F, Yuan JH, Wang SB, Yang F, Yuan SX, Ye C, Yang N, Zhou WP, Li WL, Li W, Sun SH (2014) Oncofetal long noncoding RNA PVT1 promotes proliferation and stem cell-like property of hepatocellular carcinoma cells by stabilizing NOP2. *Hepatology* 60:1278–1290.
- Wege H, Li J, Itrich H (2019) Treatment Lines in Hepatocellular Carcinoma. *Visc Med* 35(4):266–272.
- Wu SX, Zhang JR, Liu BH, Huang YJ, Li SP, Wen HS, Zhang MZ, Li JF, Li Y, He F (2020) Identification and Characterization of lncRNAs Related to the Muscle Growth and Development of Japanese Floounder (*Paralichthys olivaceus*). *Front Genet* 11:1034.
- Yang F, Huo XS, Yuan SX, Zhang L, Zhou WP, Wang F, Sun SH (2013) Repression of the long noncoding RNA-LET by histone deacetylase 3 contributes to hypoxia-mediated metastasis. *Molecular Cell* 49(6):1083–1096.
- Yao M, Yao DF, Bian YZ, Zhang CG, Qiu LW, Wu W, Sai WL, Yang JL, Zhang HJ (2011) Oncofetal antigen glypican-3 as a promising early diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 10(3):289–294.
- Ye J, Tan L, Fu Y, Xu H, Wen L, Deng Y, Liu K (2019) LncRNA SNHG15 promotes hepatocellular carcinoma progression by sponging miR-141-3p. *J Cell Biochem* 120(12):19775–19783.
- Yuan JH, Yang F, Wang F, Ma JZ, Guo YJ, Tao QF, Liu F, Pan W, Wang TT, Zhou CC, Wang SB, Wang YZ, Yang Y, Yang N, Zhou WP, Yang GS, Sun SH (2014) A long noncoding RNA activated by TGF- $\beta$  promotes the invasion-metastasis cascade in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 25(5):666–681.
- Yuan SX (2012) Long noncoding RNA associated with microvascular invasion in hepatocellular carcinoma promotes angiogenesis and serves as a predictor for hepatocellular carcinoma patients’ poor recurrence-free survival after hepatectomy *Hepatology* 56(6):2231–2241.
- Zhang G, Duan A, Zhang J, He C (2017) Genome-wide analysis of long non-coding RNAs at the mature stage of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* Linn) fruit. *Gene* 596:130–136.
- Zhu J, Liu S, Ye F, Shen Y, Tie Y, Zhu J, Wei L, Jin Y, Fu H, Wu Y, Zheng X (2015) Long Noncoding RNA MEG3 Interacts with p53 Protein and Regulates Partial p53 Target Genes in Hepatoma Cells. *PLoS One* 10(10):e0139790.

Received December 25, 2021

Received January 04, 2021

Accepted March 18, 2023