

. 实验研究 .

lncRNA SNHG16对胶质瘤U251细胞增殖、侵袭和迁移的影响

陈 波 云亚滨 杜俊峰 王伟志

【摘要】目的 探讨沉默长链非编码RNA核内小RNA宿主基因16(SNHG16)对胶质瘤U251细胞增殖、侵袭和迁移的影响。**方法** 实时荧光定量PCR检测正常胶质细胞HEB、NHA和胶质瘤细胞A172、U251、U87、SHG-4中SNHG16的表达。用siRNA沉默U251细胞SNHG16的表达,分为NC-siRNA组和SNHG16-siRNA组,CCK-8法检测细胞增殖,Transwell实验检测细胞侵袭,划痕实验检测细胞迁移。**结果** 与正常胶质细胞HEB和NHA比较,胶质瘤细胞A172、U251、U87和SHG-4的SNHG16表达水平明显升高($P<0.05$)。与NC-siRNA组比较,SNHG16-siRNA组细胞增殖能力、细胞侵袭能力和细胞迁移能力均明显降低($P<0.05$)。**结论** SNHG16在胶质瘤细胞中高表达,特异性沉默SNHG16基因可以抑制胶质瘤细胞的增殖、侵袭和迁移能力。**【关键词】** 胶质瘤;U251细胞;长链非编码RNA;核内小RNA宿主基因16;细胞增殖;细胞侵袭;细胞迁移**【文章编号】** 1009-153X(2020)11-0771-03 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

Effect of lncRNA SNHG16 on proliferation, invasion and migration of glioma U251 cells

CHEN Bo, YUN Ya-bin, DU Jun-feng, WANG Wei-zhi. Department of Neurosurgery, Hohhot First Hospital, Hohhot 010000, China

【Abstract】 Objective To explore the effect of long-chain noncoding RNA (lncRNA) small nucleolar RNA host gene 16 (SNHG16) on the proliferation, invasion and migration of glioma U251 cells. **Methods** Real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the SNHG16 expression in normal gliocytes HEB and NHA and in glioma cell lines A172, U251, U87 and SHG-4. The NC-siRNA (NC-siRNA group) and SNHG16-siRNA (SNHG16-siRNA group) were transfected into U251 cells. CCK-8 assay was used to detect the cell proliferation. Transwell test was used to detect the cell invasion. Cell scratch test was used to detect the cell migration. **Results** SNHG16 expression levels of glioma cell lines A172, U251, U87 and SHG-4 were significantly increased compared with normal gliocytes HEB and NHA ($P<0.05$). Compared with NC-siRNA group, the cell abilities of proliferation, invasion and migration were significantly decreased in SNHG16-siRNA group ($P<0.05$). **Conclusion** SNHG16 is highly expressed in glioma cells. SNHG16 gene silencing can inhibit the proliferation, invasion and migration of glioma cells.

【Key words】 Glioma; U251 cell; Long chain noncoding RNA; Small nucleolar RNA host gene 16;

胶质瘤是最常见的原发性脑肿瘤之一,占恶性脑肿瘤的70%以上^[1]。虽然近年来胶质瘤的诊治取得了重大进展,但是总体生存率仍然不高,因此亟需寻找胶质瘤潜在的治疗靶点。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)在表观遗传调控、细胞周期调控和细胞增殖分化调控等中发挥重要作用^[2]。核内小RNA宿主基因16(small nucleolar RNA host gene 16, SNHG16)是最早在神经母细胞瘤中发现的lncRNA。有研究发现,SNHG16在胃癌^[3]、肝细胞癌^[4]和胰腺癌^[5]中高表达,可能发挥促癌基因作用。本文探讨沉默SNHG16基因表达对胶质瘤U251

细胞增殖、侵袭和迁移的影响。

1 材料与方法

- 1.1 细胞培养 取正常胶质细胞HEB和NHA、人神经胶质瘤细胞系A172、U251、U87和SHG-4(中科院上海细胞库)接种于含10%胎牛血清(上海富衡生物科技有限公司)、1%链霉素的DMEM高糖培养基(上海富衡生物科技有限公司)进行培养,当细胞融合度达80%时,进行传代,以1:3传代。取对数生长期且生长状态良好的细胞进行后续实验^[6]。
- 1.2 细胞转染 将U251细胞分为阴性对照组(NC-siRNA组)和沉默组(SNHG16-siRNA组),设置4个复孔。当细胞融合度达80%时,用Lipofectamine 2000(美国Sigma公司)转染NC-siRNA或SNHG16-siRNA(上海吉凯基因科技有限公司合成)。
- 1.3 实时荧光定量PCR检测SNHG16表达 转染48 h

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2020.11.012
作者单位:010000 内蒙古,呼和浩特市第一医院神经外科(陈 波、云亚滨、杜俊峰、王伟志)
通讯作者:王伟志,E-mail:164890480@qq.com

后用 TRIzol 法提取总 RNA(美国 Sigma 公司)。通过反转录获得 cDNA,反应条件为 37 ℃ 15 min,85 ℃ 15 s;反应体系为 2 μl 5×反应混合液、1 μl RNA 和 7 μl H₂O。引物序列:SNHG16 上游 5'-CCGGTTTTC-CAGTTCTTGCA-3',下游 5'-GCCTCACAGGGAAC TTCATG-3'。内参 GAPDH 上游 5'-CAAGGTCATC-CATGACAACCTTTG-3',下游 5'-GTCCACCACCTT-GTTGCTGTAG-3'。以 cDNA 为模板进行 PCR,反应体系为 10 μl SYBR、1 μl cDNA、1 μl 引物和 7 μl H₂O;反应条件为 95 ℃ 10 min、95 ℃ 30 s、60 ℃ 15 s、72 ℃ 20 s(40 个循环),72 ℃ 10 min。用 2^{-ΔΔCt} 法计算相对表达量。

1.4 CCK-8 法检测细胞增殖能力 取对数生长期 U251 细胞,以 1×10⁴ 个/孔密度接种于 96 孔板,每孔 100 μl。待细胞贴壁后,培养 24、48、72、96 h 时加入 10 μl CCK-8 溶液(武汉艾美捷科技有限公司)。用酶标仪检测光密度值(optical density,OD),反映细胞增殖能力。

1.5 Transwell 实验检测细胞侵袭能力 首先在 Transwell 迁移板上室铺基质胶(武汉艾美捷科技有限公司),随后将各组对数生长期细胞接种于 Transwell 小室 24 孔板,以 2×10⁵ 个/ml 密度将细胞加入上室(每孔 100 μl),下室中加入含胎牛血清的培养基(250 μl/孔)。培养 48 h 后取出小室,用棉签拭去微孔膜上室的细胞。用磷酸盐缓冲液冲洗小室的上下两面两遍,随后用多聚甲醛固定黏附于下室微孔膜下面的细胞,再用结晶紫染色 15 min,干燥后在显微镜下观察(400 倍),取 3~5 个视野进行计数。

1.6 划痕实验检测细胞迁移能力 取对数生长期 U251 细胞,接种于 6 孔板中,当细胞融合度达 90% 时用无菌枪头进行划痕处理。吸去原培养基,用磷酸盐缓冲液洗涤 3 次,置于无血清培养基中继续培养。培养 0 h、24 h 用显微镜拍照,细胞迁移率=(0 h 划痕宽度-培养后划痕宽度)/0 h 划痕宽度×100%^[7]。

1.7 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件进行分析;计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 *t* 检验和单因素方差分析;重复测量数据用重复测量方差分析;*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SNHG16 在胶质瘤细胞中的表达 与正常胶质细胞 HEB 和 NHA 比较,胶质瘤细胞 A172、U251、U87 和 SHG-4 的 SNHG16 表达水平明显升高(*P*<0.05),其中 U251 细胞 SNHG16 表达水平最高。见图 1。

2.2 沉默 SNHG16 对 U251 细胞增殖、侵袭和迁移的影响 与 NC-siRNA 组比较,SNHG16-siRNA 组 SNHG16mRNA 表达水平明显降低(*P*<0.05),细胞增殖能力、细胞侵袭能力和细胞迁移能力均明显降低(*P*<0.05)。见图 2。

3 讨论

SNHG16 是近年来发现的一种新 lncRNA,位于染色体 17q25.1,与肿瘤细胞增殖、侵袭、迁移和凋亡密切相关,参与多种肿瘤的发生和发展^[8,9],可能发挥促癌基因的作用。有研究发现,SNHG16 可调控多种 miRNA 信号通路,与肿瘤发生、发展密切相关^[3,5]。SNHG16 可通过 miR-373/表皮生长因子受体轴,进一步激活磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶信号通路,进而促进 LN229 细胞侵袭^[10]。也有研究发现,SNHG16 可以调控 Wnt 信号通路,进而影响肿瘤脂质代谢^[11]。另外,SNHG16 通过下调 DKK3 基因促进癌细胞上皮-间质转化^[12]。朱晓鸿等^[13]发现,SNHG16 能够调控 CDK2 蛋白表达,进而影响肿瘤细胞周期;敲低 SNHG16 可使细胞周期中 S 期被阻滞。免疫炎症损伤也可能是 SNHG16 在癌症中作用的重要机制之一^[14]。本研究采用实时荧光定量 PCR 检测 5 种胶质瘤细胞系 SNHG16 的表达,结果显示,与正常胶质细胞 HEB 和 NHA 比较,胶质瘤细胞 A172、U251、U87 和 SHG-4 的 SNHG16 表达水平明显

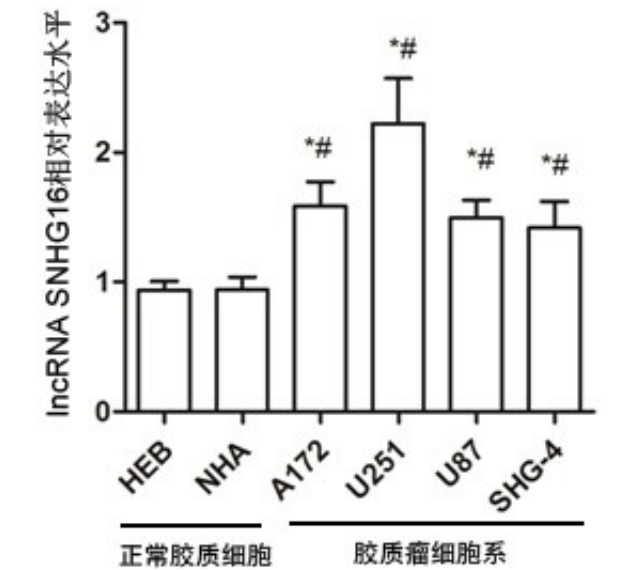


图 1 实时荧光定量 PCR 检测正常胶质细胞和胶质瘤细胞系 lncRNA SNHG16 的表达
与 HEB 比较,**P*<0.05;与 NHA 比较,#*P*<0.05

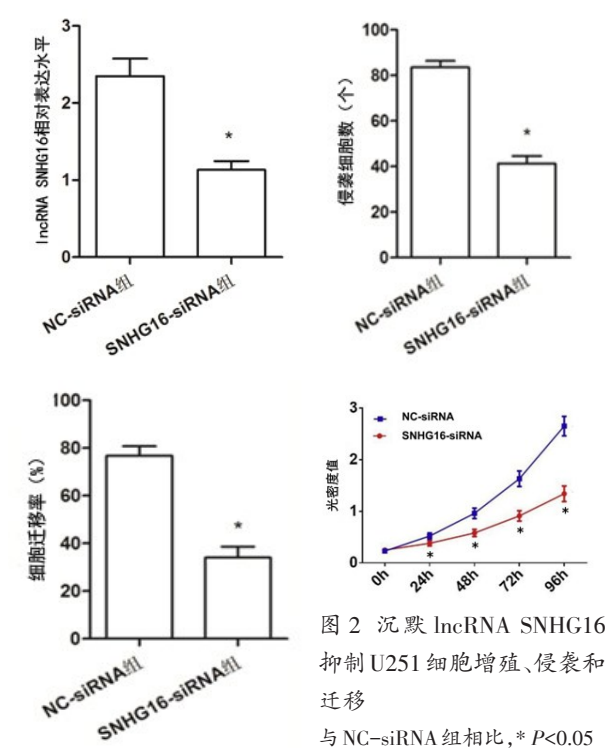


图 2 沉默 lncRNA SNHG16 抑制 U251 细胞增殖、侵袭和迁移
与 NC-siRNA 组相比, * P<0.05

升高,说明SNHG16可能参与了胶质瘤的发生。另外,用siRNA技术特异性沉默U251细胞SNHG16基因,结果显示,沉默SNHG16后胶质瘤细胞的增殖、侵袭和迁移能力下降,提示SNHG16可能与胶质瘤的发生和发展密切相关。

【参考文献】

[1] Gusyatiner O, Hegi ME. Glioma epigenetics: from subclassification to novel treatment options [J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 51: 50-58.

[2] Bhan A, Soleimani M, Mandal SS. Long noncoding RNA and cancer: a new paradigm [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(15): 3965-3981.

[3] Wang X, Kan J, Han J, *et al*. LncRNA SNHG16 functions as an oncogene by sponging miR-135a and promotes JAK2/STAT3 signal pathway in gastric cancer [J]. *J Cancer*, 2019, 10(4): 1013-1022.

[4] Xu F, Zha G, Wu Y, *et al*. Overexpressing lncRNA SNHG16

inhibited HCC proliferation and chemoresistance by functionally sponging hsa-miR-93 [J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 8855-8863.

[5] Liu S, Zhang W, Liu K, *et al*. LncRNA SNHG16 promotes tumor growth of pancreatic cancer by targeting miR-218-5p [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 114: 1-8.

[6] 滕浩,薛一雪,王萍,等. miR-194对人脑胶质瘤U87细胞恶性生物学行为的影响[J]. *中国医科大学学报*, 2018,47(8):673-677.

[7] 付胜楠,张国光,庾珏,等. 小檗碱及其亲脂性衍生物抑制恶性胶质瘤C6细胞的增殖及迁移与侵袭[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2013, 34(4):531-536.

[8] 王嘉新,姜兴明. 肿瘤发生发展中SNHG16的调控作用及机制研究[J]. *现代医学*, 2019,47(3):350-353.

[9] Gong CY, Tang R, Nan W, *et al*. Role of SNHG16 in human cancer [J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 503: 175-180.

[10] Zhou XY, Liu H, Ding ZB, *et al*. LncRNA SNHG16 promotes glioma tumorigenicity through miR-373/EGFR axis by activating PI3K/AKT pathway [J]. *Genomics*, 2020, 112(1): 1021-1029.

[11] Christensen LL, True K, Hamilton MP, *et al*. SNHG16 is regulated by the Wnt pathway in colorectal cancer and affects genes involved in lipid metabolism [J]. *Mol Oncol*, 2016, 10(8): 1266-1282.

[12] Zhou C, Zhao J, Liu J, *et al*. LncRNA SNHG16 promotes epithelial-mesenchymal transition via down-regulation of DKK3 in gastric cancer [J]. *Cancer Biomark*, 2019, 26(4): 393-401.

[13] 朱晓鸿,赵娟娟,刘娟娟,等. 下调SNHG16对胃癌细胞HGC-27细胞周期的影响[J]. *贵州医药*, 2017, 41(12): 1242-1244.

[14] An JH, Chen ZY, Ma QL, *et al*. LncRNA SNHG16 promoted proliferation and inflammatory response of macrophages through miR-17-5p/NF-κB signaling pathway in patients with atherosclerosis [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(19): 8665-8677.

(2020-05-28 收稿, 2020-07-03 修回)