

长链非编码 RNA SNHG16 对胃癌细胞 AGS 增殖的影响*

刘娟娟^{1**}, 周春欢¹, 赵娟娟², 夏 英³, 韦四喜², 黄 海^{1***}

(1. 贵州医科大学 检验学院, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学附院, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵阳中医学院第一附属医院, 贵州 贵阳 550001)

[摘 要] 目的: 探讨长链非编码 RNA SNHG16 对胃癌细胞 AGS 增殖调控的影响。方法: AGS 细胞分 control 组(正常培养的 AGS 细胞, C 组)、negative control 组(转染 si-NC 序列, NC 组)及 si-SNHG16 组(转染 si-SNHG16 序列, SI 组), 通过 siRNA 干扰技术敲低 lncRNA SNHG16 后, 采用逆转录-实时荧光定量 PCR 法(RT-qPCR)验证 AGS 细胞中 SNHG16 的表达水平, CCK-8 法检测敲低 lncRNA SNHG16 后 AGS 细胞增殖能力的改变, 流式细胞术检测 AGS 细胞周期的改变, Western blot 检测 AGS 细胞周期蛋白 D₁ (cyclinD₁)、周期蛋白依赖性激酶 6 (CDK6) 及细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂家族成员 p21 蛋白表达水平的改变。结果: 敲低 lncRNA SNHG16 后, 与 NC 组相比, SI 组中 lncRNA SNHG16 的表达显著降低($P < 0.01$), 细胞增殖能力受到明显抑制, 细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期, 细胞周期相关蛋白 cyclinD₁ 及 CDK6 表达下调, p21 明显上调(P 均 < 0.01)。结论: 敲低 lncRNA SNHG16 可能通过上调 p21 影响胃癌细胞 AGS 的增殖。

[关键词] 胃肿瘤; 癌; SNHG16; 长链非编码 RNA; 细胞增殖; 细胞周期蛋白

[中图分类号] R735.2 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2018)12-1370-05

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.12.002

Effect of lncRNA SNHG16 on Gastric Cancer Cell AGS Proliferation

LIU Juanjuan¹, ZHOU Chunhuan¹, ZHAO Juanjuan², XIA Ying³, WEI Sixi², HUANG Hai¹

(1. Department of Medical Laboratory Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;

2. Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, 550004, Guizhou, China; 3. The First

Affiliated Hospital of Guiyang University of Chinese, Guiyang 550001, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of long non-coding RNA small nucleolar RNA host gene 16 (lncRNA SNHG16) on gastric cancer cell AGS proliferation. Methods: AGS cell were divided into control group (conventional cultivated AGS cell, group C), negative control group (transfected si-NC sequence, group NC) and si-SNHG16 group (transfected si-SNHG16 sequence, group SI). After knockdown of lncRNA SNHG16 by siRNA interference, the expression level of lncRNA SNHG16 was verified by RT-qPCR, the proliferation ability of AGS cell was evaluated by CCK-8 assay. Cell cycle progression was measured by flow cytometric analysis; Western blot was performed to detect the expression of proteins as cyclinD₁, CDK6 and p21. Results: Compared with NC group, the expression of lncRNA SNHG16 of SI group was significantly decreased ($P < 0.01$) and the cell proliferation ability was remarkably inhibited after knockdown of lncRNA SNHG16. Furthermore, cell cycle was arrested in G₀/G₁ phase. The expressions of cell cycle-related proteins (cyclinD₁, CDK6) were down-regulated and p21 was observably up-regulated ($P < 0.01$). Conclusion: Knockdown of lncRNA SNHG16 may affect the proliferation of gastric cancer cell AGS via up-regulating p21.

[Key words] Gastric neoplasms; carcinoma; SNHG16; long non-coding RNA; cell proliferation; cyclin

*[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(编号:81460364, 81760429); 贵阳市科技计划项目(编号:20161001015)

** 贵州医科大学 2014 级硕士研究生

*** 通信作者 E-mail: huanghai828@gmc.edu.cn

网络出版时间: 2018-11-15 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20181115.2138.028.html>

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, LncRNA) 是指一类长度超过 200 个核苷酸、且不编码蛋白质的内源性 RNA, 可通过表观遗传、转录和转录后水平调节蛋白表达^[1]。研究 LncRNA 在肿瘤中的作用与机制是目前肿瘤研究的难点与热点之一, 已有研究表明, LncRNA 的异常表达与胃癌的发生发展以及预后息息相关^[2-4]。small nucleolar RNA host gene 16 (lncRNA SNHG16) 是位于人类基因组 17 号染色体 17q25.1 上的长链非编码 RNA, 其在乳腺癌、胃癌患者异常增高, 且与肿瘤侵袭迁移以及预后相关^[5-6]。本课题组前期已经发现 lncRNA SNHG16 在胃癌组织和细胞中均高表达^[7], 为进一步发掘其作用机制本研究利用 RNA 干扰技术 (siRNA) 构建 LncRNA SNHG16 干扰模型, 研究其对胃癌细胞增殖影响以及可能的调控机制, 为胃癌治疗提供潜在治疗靶点。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

高分化胃癌细胞 AGS 购于中国科学院细胞库, 胎牛血清购于美国 gibco 公司, LipofectamineTM RNAiMAX、Opti-MEM 低血清培养基购于美国 Invitrogen 公司, 逆转录试剂盒、SYBR[®] Premix Ex TaqTM II 购于日本 TaKaRa 公司, Counting Kit-8 购于日本同仁公司, 细胞周期检测试剂盒购于中国江苏凯基生物公司, BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒购于沈阳万类生物公司, CDK6、cyclinD₁、p21、GAPDH 兔源单克隆抗体购于美国 ABcam 公司, ECL 化学发光试剂盒购于美国 Millipore 公司。实时荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche), 流式细胞仪 (美国 Beckman) 及蛋白分析系统 (美国 BIO-RAD)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及转染 AGS 细胞培养于含 10% 胎牛血清、1% 双抗 (100 U/mL 青霉素和 0.1 g/L 链霉素) 和 1% 谷氨酰胺的 RMPI 1640 完全培养基中, 置 5% CO₂, 37 °C 的恒温温箱中培养; 当细胞处于对数生长期时胰酶消化收集细胞, 用无双抗的完全培养基重悬成单细胞悬液, 以每孔 2×10^5 个接种于 6 孔板中, 待细胞融合度约 60% ~ 70% 时, 进行转染。实验分 control 组 (正常培养的 AGS 细胞, C 组)、negative control 组 (转染 si-NC 序列, NC 组) 及 si-SNHG16 组 (转染 si-SNHG16 序列, SI 组)。

对 NC 组及 SI 组细胞进行转染, NC 组 si-NC 序列 si-NC sense 为 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3', antisense 为 5'-ACGUGACACGUUCGGAG AATT-3'; SI 组 si-SNHG16 序列 si-SNHG16 sense 为 5'-CCCAGUGUUGACUCACCAATT-3', antisense 为 5'-UUGGUGAGUCAACACUGGGTT-3'; 取干扰序列 4.2 μL 加入 opti-MEN250 μL 中得 A 液, 取 LipofectamineTM RNAiMAX 4.2 μL 加入 opti-MEN 250 μL 中的 B 液, 将 A 与 B 轻轻混匀后静置 5 min, 缓慢加入 6 孔板中进行转染。C 组加入 500 μL opti-MEN 作为空白对照, si-RNA 序列由上海吉玛公司设计合成, 转染 si-CY3 序列呈红色荧光。转染 6 h 后用无双抗的完全培养基进行换液, 继续培养细胞到 48 h 用 Trizol 裂解收集细胞, 转入 -80 °C 冰箱冻存, 用于检测干扰效率。

1.2.2 qRT-PCR 验证 LncRNA SNHG16 的干扰效率 提前将 -80 °C 冰箱中的细胞裂解液取出室温融化 10 min, 按生工 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA, OD260/OD280 测定 RNA 的纯度和浓度, 逆转录成 cDNA。采用 SYBR Green II 荧光染料法进行 Realtime-PCR 扩增, 以 HPRT 为内参, 通过 $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ 法计算 SNHG16 的相对表达量, 扩增引物由 Invitrogen 公司合成。SNHG16 sense 为 5'-GT-GTAAGGATCTTCATGATG-3', antisense 为 5'-CATC-GCTGGGAGCTAACAT-3'; HPRT sense 为 5'-CCTG-GCGTCGTGATTAGTGAT-3', antisense 为 5'-AGACG-TTCAGTCCTGTCCATAA-3'。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞增殖 取对数生长期的 AGS 细胞, 以 4 000 个/孔接种于 96 孔板中, 每孔加入 100 μL 无双抗完全培养基。实验分为 C 组、NC 组及 SI 组, 每组设置 5 个复孔, 在转染 24、48、72 h 后采用 CCK-8 法, 用酶标仪测定其吸光度值 (测定波长为 450 nm), 并计算各组细胞增殖抑制率, 实验重复 3 次。

1.2.4 流式细胞术分析细胞周期 实验分组与细胞转染步骤相同, 转染 48 h 后按说明书收集和处理细胞, 上机检测各组细胞周期, 结果用 modfit 软件进行分析, 实验重复 3 次, 每次设 3 组平行重复。

1.2.5 Western Blot 检测细胞周期相关蛋白 收集转染 48 h 后的各组细胞, 加入蛋白 RIPA 强效裂解液, 冰上裂解 30 min, 裂解期间每隔 10 min 混匀震荡 1 次, 4 °C 离心 20 min 后取上清, 用 BCA 蛋白定量试剂盒定量蛋白浓度后, 取 25 μg 总蛋白上样, 10% 十二烷基酸 - 聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 凝

胶电泳 100 min 分离蛋白, 200 mA 电流转 PVDF 膜 90 min(根据分子量大小适当加减时间), 5% 脱脂奶封闭 2 h, 一抗为兔抗人单克隆抗体 CDK6 (1: 20 000)、cyclinD₁ (1: 20 000)、p21 (1: 2 000), 4 ℃ 孵育过夜后, 1 × TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。二抗用羊抗兔 (1: 20 000), 以 GAPDH (1: 20 000) 为内参, 二抗室温孵育 1 h, 1 × TBST 洗涤 3 次, 用 ECL 试剂行化学发光法曝光, 结果用 image-J 图像分析系统测定各条带的灰度值, 计算 cyclinD₁、CDK6、p21 的相对表达量, 实验重复 3 次。

1.3 统计学分析

实验数据应用 SPSS 20.0 软件进行分析, 所有资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组之间比较用

单因素方差分析(方差齐时使用 *LSD*, 方差不齐时使用 *Dunnett's*), $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 转染效率及干扰效率验证

利用 siRNA 构建干扰模型, 转染效率如图 1A、B 所示, 转染效率达 95% 以上; 干扰效率验证如图 1C 所示, 与 NC 组相比, SI 组 *LncRNA SNHG16* 表达水平明显降低 ($P < 0.01$), 干扰效率达到 $(70.3 \pm 6.5)\%$; C 组与 NC 组 *LncRNA SNHG16* 相对表达水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 可进行后续研究。

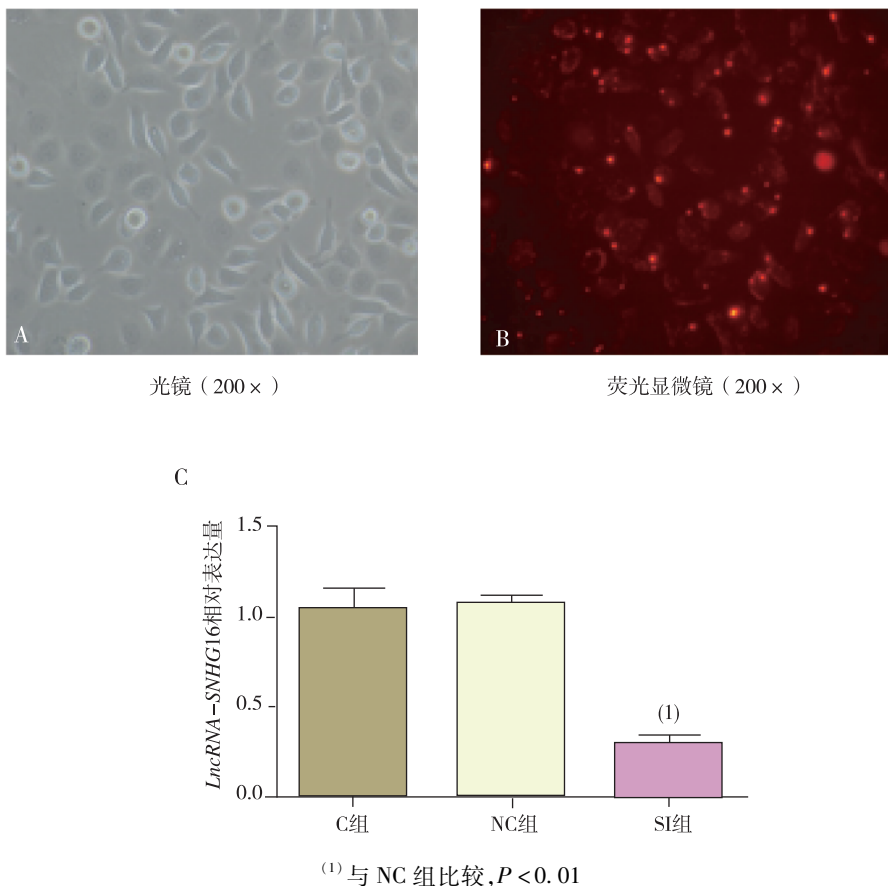


图 1 转染效果及转染后 3 组细胞 *LncRNA SNHG16* 相对表达量

Fig. 1 The relative expression of SNHG16 in each group after transfection and transfected effect

2.2 干扰 *LncRNA SNHG16* 表达后 AGS 增殖能力受到抑制

采用 CCK8 法检测各组 AGS 细胞在不同时间点的增殖情况, 如图 2 所示, 与 NC 组相比, 在转染后 24 h 时 SI 组 AGS 细胞增殖能力无明显改变 ($P > 0.05$), 在转染后 48 h 和 72 h 时, AGS 细胞增殖

能力明显受到抑制 ($P < 0.01$), 各时间点 NC 组与 C 组 AGS 细胞增殖能力比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 干扰 *LncRNA SNHG16* 表达后 AGS 细胞周期阻滞于 G0/G1 期

采用流式细胞术 PI 单染法检测各组 AGS 细

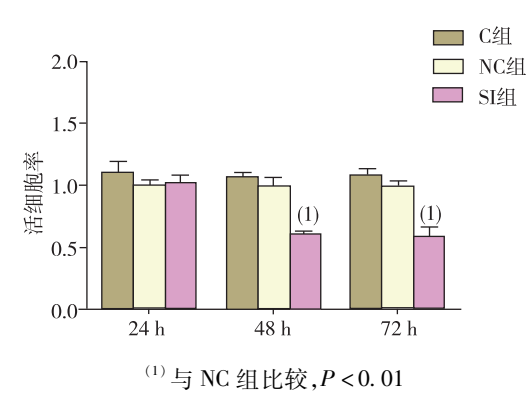


图 2 干扰 LncRNA SNHG16 表达对 AGS 细胞增殖能力的影响(CCK8 法)

Fig.2 Effect of knockdown SNHG16 on the cell proliferation of gastric cancer cell line AGS in each point and each group by CCK8 assay

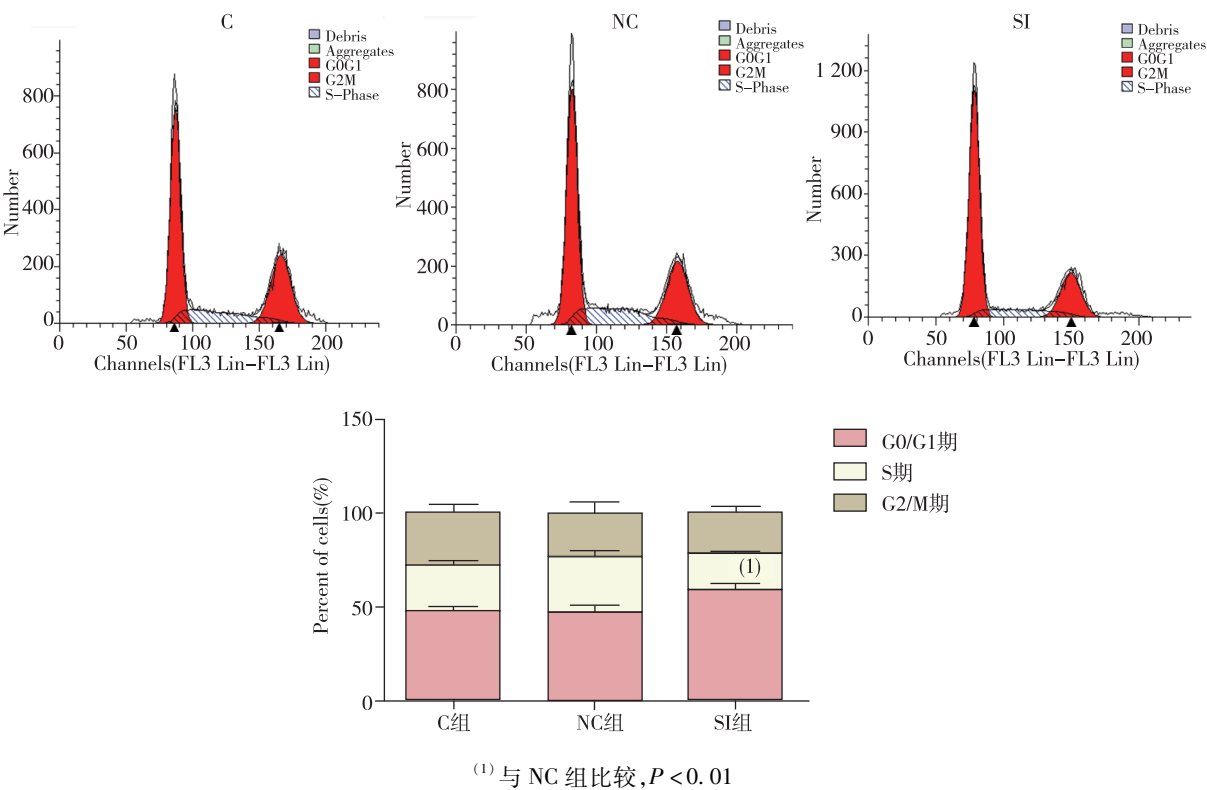


图 3 干扰 LncRNA SNHG16 表达后对 AGS 细胞周期的影响(流式细胞术)

Fig.3 Effect of knockdown SNHG16 on cell cycle of gastric cancer AGS cells by FCM

3 讨论

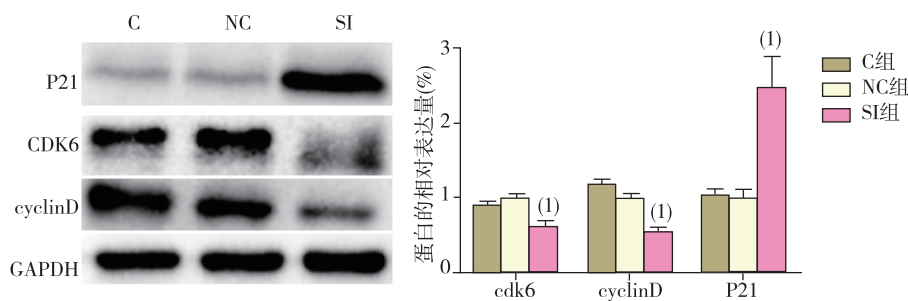
众所周知,细胞增殖与凋亡两者之间的平衡是维持机体稳态的重要因素,其过程受到多种基因的调控,一旦基因表达平衡被打破,将导致疾病甚至

胞周期,如图 3 所示,与 NC 组相比,SI 组 G0/G1 期的 AGS 细胞数量明显上升 ($P < 0.01$), S 期的 AGS 细胞数量明显下降 ($P < 0.01$),细胞阻滞于 G0/G1 期,两组 G2/M 期 AGS 细胞数量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),而 C 组与 NC 组各细胞周期 AGS 细胞数量比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 干扰 LncRNA SNHG16 表达后 CDK6、cyclinD₁ 及 p21 蛋白表达

采用 Western blot 检测转染 48 h 后各组 AGS 细胞蛋白表达水平变化,如图 4 所示。与 NC 组比较, SI 组 CDK6、cyclinD₁ 蛋白的表达水平均明显下降,而 p21 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$); C 组与 NC 组 CDK6、cyclinD₁ 及 p21 蛋白表达水平比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

肿瘤的发生发展。细胞增殖主要受细胞周期调控,是由多种信号通路共同参与的复杂网络调控过程。LncRNA SNHG16 是近期研究 LncRNA 的新兴热点,国内外鲜有报道,目前发现 LncRNA SNHG16 在膀胱癌中高表达且与预后不良有关,可通过下调 p21 促进膀胱癌细胞的增殖^[8],但其在胃癌中的研



⁽¹⁾ 与 NC 组比较, $P < 0.01$; $n = 3$

图 4 干扰 LncRNA SNHG16 表达后对 AGS 细胞中 CDK6、cyclinD₁、p21 蛋白表达的影响 (Western blot)

Fig. 4 The expression of proteins after knocking down SNHG16

究甚少,其作用机制也未研究透彻。

本实验在已知 LncRNA SNHG16 在胃癌组织和细胞中高表达的情况下,敲低其在胃癌细胞 AGS 中的表达,进一步探究其在胃癌细胞增殖调控中的作用。通过将 si-SNHG16 瞬时转染进 AGS 中,荧光显微镜下观察其转染效率,RT-qPCR 验证干扰效率,干扰效率达 60% 以上,认为模型构建成功,可进行后续实验。CCK-8 实验发现下调 LncRNA SNHG16 的表达能抑制 AGS 的增殖,进一步用流式细胞术检测发现敲低 LncRNA SNHG16 后细胞周期被阻滞在 G0/G1 期,Western blot 检测细胞周期相关蛋白 cyclinD₁,细胞周期蛋白依赖性激酶 CDK6 表达下调,细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 p21 显著高表达。

细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDK) 家族和细胞周期素 (cyclin) 是调控细胞周期的关键蛋白,可直接参与细胞周期的调控^[9-10]。CyclinD₁ 是细胞周期的起始因子,是细胞从 G1 期向 S 期的转换的关键因子,其活性降低,会使细胞阻滞在 G0/G1 期^[11-12]。CyclinD₁ 通过与 CDK6 结合形成复合物来控制细胞 G1 期向 S 期进展^[13-14]。p21 是细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂家族中的重要成员,可以抑制各种 cyclin-CDK 复合物,阻滞 CDK 激酶的激活或者降低活化的 CDK 激酶活性,从而发生细胞周期阻滞^[15-16]。本研究结果显示下调 LncRNA SNHG16 后,CDK6 和 cyclinD₁ 明显减少,p21 显著升高,由此推测高表达的 LncRNA SNHG16 会抑制 p21 的表达,促使细胞周期相关蛋白升高,从而缩短细胞周期,促进细胞增殖,进而促进胃癌的发生发展,此研究结果与文献^[8]结果一致。

综上所述,敲低 LncRNA SNHG16 后可能通过

上调 p21 的表达来阻滞细胞周期进程,从而抑制细胞增殖,其作为致癌基因对胃癌细胞增殖调控具有重要的意义,可进一步探讨其作为胃癌治疗的潜在分子靶点的意义。

4 参考文献

- [1] MERCER T R, DINGER M E, MATTICK J S. Long non-coding RNAs: insights into functions[J]. Nat Rev Genet, 2009, 10(3): 155 - 159.
- [2] LI T, MO X, FU L, et al. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs on gastric cancer [J]. Oncotarget, 2016, 7(8): 8601 - 8612.
- [3] LIN X, MAN Y, TIAN X, et al. Increased expression of long noncoding RNA ABHD11-AS1 in gastric cancer and its clinical significance[J]. Medical Oncology, 2014, 31(7): 1 - 5.
- [4] SHAO Y F, MENG Y M, JIANG X M, et al. Gastric juice long noncoding RNA used as a tumor marker for screening gastric cancer[J]. Cancer, 2014, 120(21): 3320 - 3328.
- [5] CAI C, HUO Q, WANG X, et al. SNHG16 contributes to breast cancer cell migration by competitively binding miR-98 with E2F5 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 485(2): 272 - 278.
- [6] LIAN D, AMIN B, DU D, et al. Enhanced expression of the long non-coding RNA SNHG16 contributes to gastric cancer progression and metastasis[J]. Cancer Biomark, 2017, 21(1): 151 - 160.
- [7] 赵娟娟, 韦四喜, 严芝强, 等. 胃癌长链非编码 RNA SNHG16 异常表达及其临床病理意义[J]. 东南大学学报 (医学版), 2017(4): 551 - 554.

(下转第 1385 页)