

lncRNA SNHG1 对卵巢癌增殖的影响及其机制*

宋洋, 杨艳, 任芳

(中国医科大学附属盛京医院, 辽宁 沈阳 110000)

[摘要] 目的: 探讨 *lncRNA SNHG1* 在卵巢癌组织中的表达及其对卵巢癌细胞增殖的影响。方法: 采用 Real-time PCR 检测 22 对卵巢癌组织、癌旁组织以及 5 株卵巢癌细胞株中 *lncRNA SNHG1* 的表达, 选择两株 *lncRNA SNHG1* 表达最高的细胞瞬时转染 NC siRNA (NC siRNA 组) 或者 *lncRNA SNHG1* siRNA (*lncRNA SNHG1* siRNA 组); 实验设置对照组, 采用 CCK-8 检测各组细胞的增殖情况, 双荧光素酶检测 *lncRNA SNHG1* 对 miR-199a-3p 的调控作用。结果: Real-time PCR 结果显示, *lncRNA SNHG1* 在卵巢癌组织中的表达水平显著高于癌旁组织, OV-90、CaOV3 细胞株 *lncRNA SNHG1* 的表达水平明显高于其他卵巢癌细胞株, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 NC siRNA 组比较, *lncRNA SNHG1* siRNA 组细胞 *lncRNA SNHG1* 的表达水平显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); CCK-8 结果显示在 OV-90 和 CaOV3 细胞株中下调 *lncRNA SNHG1* 均显著抑制了细胞的增殖 ($P < 0.05$); 双荧光素酶结果显示野生型 *lncRNA SNHG1* 和 miR-199a-3p mimic 共转染细胞显著降低了双荧光素酶的活性, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: *lncRNA SNHG1* 与卵巢癌的进展密切相关, *lncRNA SNHG1* 有望成为治疗和预防卵巢癌的潜在靶点。

[关键词] 卵巢肿瘤; 癌; *lncRNA SNHG1*; 增殖; RNA 干扰; 转染

[中图分类号] R737.31 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)05-0536-05

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.05.008

Studies on the Effect of *lncRNA SNHG1* on Ovarian Cancer Cell Proliferation and Its Mechanism

SONG Yang, YANG Yan, REN Fang

(Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang 110000, Liaoning, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the expression of *lncRNA SNHG1* in ovarian cancer tissue and investigate its effect on the proliferation of ovarian cancer cells. **Methods:** The expression of *lncRNA SNHG1* in 22 pairs of ovarian cancer tissue and the adjacent tissue were determined by real-time PCR; the expression of *lncRNA SNHG1* in 5 ovarian cancer cell lines was also detected. Two cell strains with the highest expression of *lncRNA SNHG1* were selected for transient transfection of NC siRNA or *lncRNA SNHG1* siRNA. Cell proliferation activities were examined by CCK-8 assay. Dual-Luciferase reporter assay was also used to exam whether *lncRNA SNHG1* has the microRNA response elements of miR-199a-3p. The control group, NC siRNA group and *lncRNA SNHG1* siRNA group were set up, and proliferation of the cells in each group was detected by CCK-8. Regulation of *lncRNA SNHG1* on miR-199a-3p was detected by Dual-Luciferase. **Result:** Results of Real-time PCR showed that the expression level of *lncRNA SNHG1* in ovarian cancer tissue was significantly higher than that of the cancer-adjacent tissue ($P < 0.05$). The expression levels of *lncRNA SNHG1* in OV-90 and CaOV3 cell strains were significantly higher than those in other ovarian cancer cell strains ($P < 0.05$). Compared with the NC siRNA group, the expression level of *lncRNA SNHG1* in *lncRNA SNHG1* siRNA group significant decreased ($P < 0.05$). The results of CCK-8 showed that down-regulation of *lncRNA SNHG1* in both

*[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81501235)

网络出版时间: 2019-05-28 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190528.0228.008.html>

OV-90 and CaOV3 cell strains significantly inhibited cell proliferation ($P < 0.05$). Dual-Luciferase reporter assay showed that co-transfection with wild type *lncRNA SNHG1* and miR-199a-3p mimic significantly reduced the activity of luciferase, and differences were statistically significant ($P < 0.05$).

Conclusions: *lncRNA SNHG1* is closely related to the development of ovarian cancer, *lncRNA SNHG1* may be a novel target in the prevention and treatment of ovarian cancer.

[**Key words**] ovarian cancer; carcinoma; *lncRNA SNHG1*; proliferation; RNA interference; transfection

卵巢癌是女性癌症死亡的第 5 大原因,也是世界上致死率最高的妇科肿瘤^[1]。因卵巢癌发病较为隐匿,就诊时有超过 60% 的患者已发展到晚期。尽管对卵巢癌用肿瘤切除手术配合铂类或紫杉烷类化疗药物进行积极治疗,但其 5 年生存率仍然只有 40%^[2]。人类基因组序列数据显示,只有 2% 的基因编码了蛋白质,因此大多数转录产物都被认为是非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA), 其中长度 >200 个碱基的 ncRNA 被称为长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA)^[3]。lncRNA 已被证明与多种人类疾病以及肿瘤的发生发展密切相关,这其中也包括卵巢癌^[4]。研究发现 *lncRNA SNHG1* 能够促进肺癌^[5]、肝癌^[6] 以及胃癌^[7] 等的恶性发展,但对卵巢癌的作用还未见报道。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床样本 收集 2014 年 5 月~2018 年 10 月进行手术的上皮性卵巢癌以及癌旁组织 22 对 (患者在手术前未经放化疗治疗)。组织标本取材后迅速置于 -80 ℃ 超低温冰箱中保存。

1.1.2 细胞株 人卵巢癌细胞 SK-OV-3、OV-90、TOV-112D、HO-8910 购自上海中乔新舟生物科技有限公司,CAOV3 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。SK-OV-3 细胞和 HO-8910 细胞培养于含有双抗以及 15% 胎牛血清的 PRMI-1640 培养液中,其余细胞均培养于 42.5% MCDB105 (含 1.5 g/L 碳酸氢钠) 及 42.5% M199 (含 2.2 g/L 碳酸氢钠) 培养液中,同时加入 15% 胎牛血清以及 1% 的双抗。细胞置于含有 5% CO₂ 的 37 ℃ 培养箱中培养,常规消化传代,选用对数生长期的细胞进行实验。

1.1.3 主要试剂 细胞培养液以及胎牛血清均购自 Gibco,NC siRNA、*lncRNA SNHG1* siRNA 及 NC mimic 和 miR-199a-3p mimic 委托上海吉玛基因合

成,Lipofectamine 2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司,TRLzol 试剂以及 TIANSeq M-MLV 反转录酶购自百泰克生物技术有限公司,SYBR Green qPCR Mix 购自 TOYOBO 公司,CCK-8 检测试剂购自日本同仁公司,pMIR-reporter 荧光素酶载体购自美国 Ambion 公司,双荧光素酶检测试剂盒购自 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 Real-time PCR 采用 TRLzol 试剂提取总 RNA 并通过 TIANSeq M-MLV 反转录成 cDNA,实验过程均严格按照试剂盒说明书进行操作。采用 SYBR Green qPCR Mix 进行 Real-time PCR 反应,反应条件为 95 ℃ 10 min,95 ℃ 10 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 10 s,35 个循环后检测其溶解曲线并分析样本 Ct 值。以 GAPDH 为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 mRNA 的相对表达量。*SNHG1* 的正向引物为 5'-AGGCTGAAGTTACAGGTC-3',反向引物为 5'-TTG-GCTCCCAGTGTCTTA-3';GAPDH 正向引物为 5'-GTCAACGGATTGTTGCTGTATT-3',反向引物为 5'-AGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3'。

1.2.2 细胞转染 将对数生长期的细胞接种于 6 孔板中,待细胞增长到 70% 融合时采用 Lipofectamine 2 000 转染试剂进行细胞转染,按照试剂盒说明书操作。实验设置对照组、NC siRNA 转染组和 *SNHG1* siRNA 转染组。*SNHG1* siRNA 的序列为 5'-CAGCAGTTGAGGGTTTCTGTGTAT-3',将此序列打乱后经分析不干扰任何基因表达的序列作为 NC siRNA 序列。

1.2.3 CCK-8 实验 按照 1.0 × 10³ 个细胞每孔的密度将细胞接种至 96 孔板。分别于细胞转染后的 0、24、48、72 及 96 h 时加入 10 μL 的 CCK-8 试剂,2 h 后于酶标仪上测量 OD₄₅₀ 值。

1.2.4 双荧光素酶检测 分别将含有 *SNHG1* 野生型序列 (5'-TGACCACTTTCGTAACTACTGA-3') 的质粒 WT-*SNHG1* 和突变型序列 (5'-TGACCACTTTCGTAACGATGACA-3') 的质粒 MUT-*SNHG1*

与 miR-199a-3p mimic 或 NC mimic 共转染至 293T 细胞内,24 h 后采用双荧光素酶检测试剂检测各组的荧光强度。以荧光素酶 pGL-3.0 为内参,分析各组的荧光素酶的活性。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行数据分析。用 t 检验进行两组间的差异比较、单因素方差分析进行 3 组间的差异比较, $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

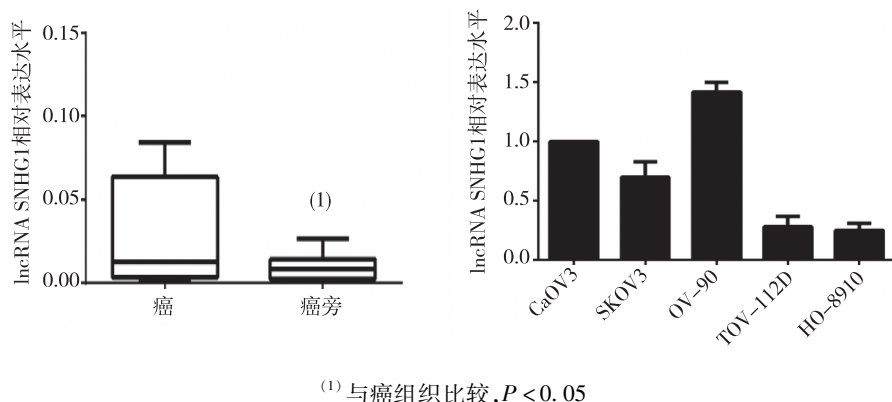
2.1 *LncRNA SNHG1* 在卵巢癌、癌旁组织以及卵巢癌细胞株中的表达

Real-time PCR 结果表明(图 1),卵巢癌组织

lncRNA SNHG1 表达水平高于癌旁组织[(0.038 ± 0.057) vs (0.010 ± 0.007)],差异具有统计学意义($P < 0.05$)。卵巢癌细胞株 CaOV3 和 OV-90 中 *lncRNA SNHG1* 的表达水平最高(图 1),因此选择这两株细胞用于后续研究。

2.2 siRNA 下调癌细胞株的 *lncRNA SNHG1* 表达

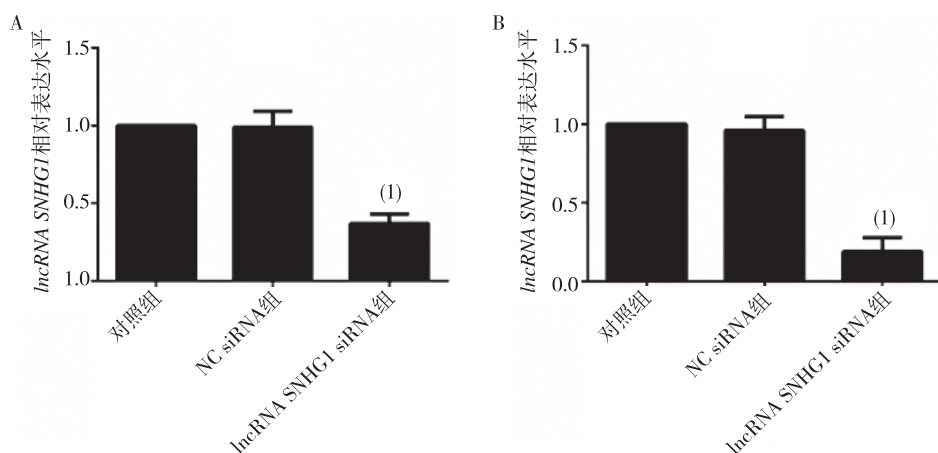
如图 2 所示,OV-90 细胞中 SNHG1 siRNA 组与 NC siRNA 组比较,*lncRNA SNHG1* 的表达水平分别为 (0.37 ± 0.06) 和 (0.99 ± 0.10) ,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);CaOV3 细胞中 SNHG1 siRNA 组和 NC siRNA 组 *lncRNA SNHG1* 的表达水平分别为 (0.19 ± 0.09) 和 (0.96 ± 0.09) ,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明 SNHG1 siRNA 有效下调了两株细胞中 *lncRNA SNHG1* 的表达,而转染 NC siRNA 未影响 *lncRNA SNHG1* 的表达。



(¹)与癌组织比较, $P < 0.05$

图 1 卵巢癌组织、癌旁组织及癌细胞株中 *lncRNA SNHG1* 的表达

Fig. 1 Expression of *lncRNA SNHG1* in ovarian cancer tissue, the adjancet tissues and cancer cell strains



注:A 为 OV-90,B 为 CaOV3;(¹)与 NC siRNA 组比较, $P < 0.05$

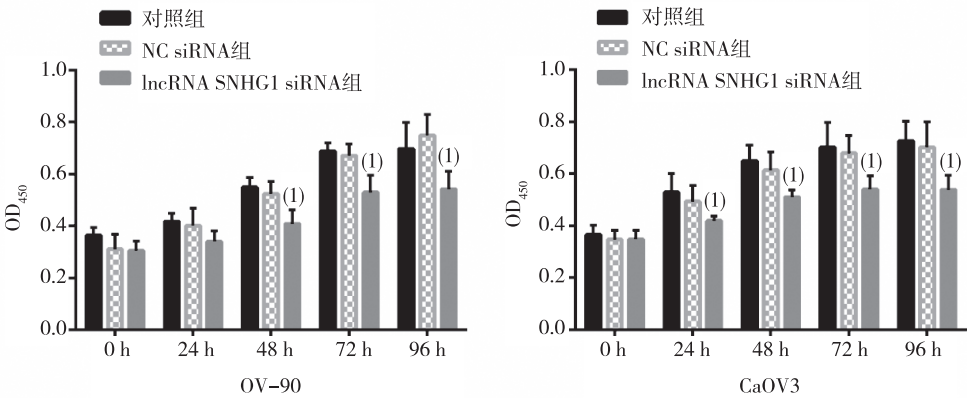
图 2 转染 siRNA 后 OV-90 及 CaOV3 卵巢癌细胞株中 *lncRNA SNHG1* 的表达

Fig. 2 Expression of *lncRNA SNHG1* after transfection with siRNA

2.3 下调 *lncRNA SNHG1* 对卵巢癌细胞增殖的影响

如图 3 所示,与 NC siRNA 转染组比较,转染 *SNHG1* siRNA 48 h 时,OV-90 细胞的增殖能力显

著降低($P < 0.05$),而 CaOV3 细胞在 *SNHG1* siRNA 转染 24 h 后细胞增殖能力显著降低($P < 0.05$)。此结果表明下调 *lncRNA SNHG1* 能够抑制卵巢癌细胞的增殖。



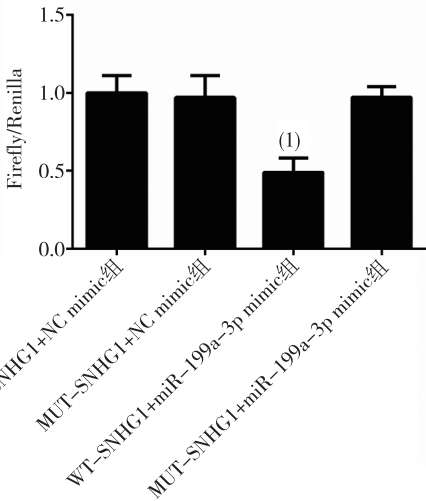
(1) 与 NC siRNA 组比较, $P < 0.05$

图 3 下调 *lncRNA SNHG1* 对细胞增殖的影响

Fig. 3 Effects of down-regulation of *lncRNA SNHG1* on cell proliferation

2.4 *lncRNA SNHG1* 对 miR-199a-3p 的调控作用

双荧光素酶结果显示,野生型 *SNHG1* 与 miR-199a-3p mimic 共转染能够显著降低双荧光素酶的活性,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。而将 *SNHG1* 与 miR-199a-3p 的结合序列突变的突变型 *SNHG1* 与 miR-199a-3p mimic 共转染则不影响双荧光素酶的活性,差异具有统计学意义($P > 0.05$)。见图 4。此结果表明 *lncRNA SNHG1* 能够通过 miR-199a-3p 特异性结合序列吸附 miR-199a-3p、进而调控其表达。



(1) 与 MUT-SNHG1 + miR-199a-3p mimic 组比较, $P < 0.05$

图 4 *lncRNA SNHG1* 对 miR-199a-3p 的调控作用

Fig. 4 Regulatory effects of *lncRNA SNHG1* on miR-199a-3p

3 讨论

现已证明许多 *lncRNA* 在肿瘤的发生发展中发挥了重要作用,*lncRNA* 表达的异常也已被作为多种肿瘤的预后标志物,如 *lncRNA AFAP1-AS1*^[8]、*lncRNA UCA1*^[9]等。*lncRNA SNHG1* 位于 11 号染色体,在多种肿瘤组织中异常高表达并且能够促进肺癌^[5]、肝癌^[6]、胃癌^[7]、食管癌^[10]以及前列腺癌^[11]细胞的增殖,并且与这些肿瘤的不良预后密切相关。然而 *lncRNA SNHG1* 在卵巢癌中的作用还未见报道。本研究分析了 22 对卵巢癌及癌旁组织,结果发现 *lncRNA SNHG1* 在卵巢癌中的表达水平显著高于癌旁组织,因此本研究推测 *lncRNA SNHG1* 在卵巢癌的发展中也发挥了重要作用。

众所周知,异常增殖是肿瘤细胞的标志之一,

抑制肿瘤细胞的增殖是抗肿瘤研究的关键所在^[12-14]。前人研究发现下调 *lncRNA SNHG1* 能够抑制胃癌细胞的增殖、克隆形成以及细胞周期转换^[7]。在肺癌细胞中下调 *lncRNA SNHG1* 不仅能够抑制肺癌细胞的增殖还能够诱导其凋亡^[5]。类似的作用在其他肿瘤细胞中也多次被证明^[15-17]。本研究在已明确 *lncRNA SNHG1* 在卵巢癌组织中高表达的情况下,在两株 *lncRNA SNHG1* 表达最高的卵巢癌细胞中下调了 *lncRNA SNHG1* 的水平,

Real-time PCR 结果显示干扰效率均在 60% 以上, 可以进行后续研究。本研究的 CCK-8 结果显示下调 *lncRNA SNHG1* 后细胞的增殖能力显著受到抑制, 表明 *lncRNA SNHG1* 参与了卵巢癌细胞的增殖, 并且 *lncRNA SNHG1* 具有作为抗卵巢癌治疗靶点的潜力。越来越多的证据表明, *lncRNA* 参与了许多重要的生物学过程, 例如细胞信号调节、基因印迹、染色质修饰、转录激活、转录后调节以及蛋白功能调控等^[18]。自 2011 年 Salmena 等^[19] 提出竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 的假说后, 人们对 *lncRNA* 作用机制又有了新的认识。ceRNA 假说中指出 *lncRNA* 可以通过 miRNA 反应元件 (microRNA response elements, MRE) 结合 miRNA, 发挥类似海绵的作用吸附 miRNA 进而调控 miRNA 的表达。这种作用机制已经在多种肿瘤细胞中被反复证明^[20-22]。本研究通过生物信息学分析发现 *lncRNA SNHG1* 上包含有 miR-199a-3p 的 MRE, 而双荧光素酶检测发现, 野生型 *SNHG1* 和 miR-199a-3p mimic 共转染工具细胞 293T 确实能够显著降低荧光素酶的活性, 而突变型 *SNHG1* 载体与 miR-199a-3p mimic 共转染则对荧光素酶的活性没有影响, 因此, *lncRNA SNHG1* 确实能够通过 MRE 结合 miR-199a-3p。Yasuto 等^[23] 通过 miRNA 芯片分析发现 miR-199a-3p 在卵巢癌细胞中表达显著降低。在卵巢癌细胞中过表达 miR-199a-3p 能够抑制卵巢癌细胞的增殖、侵袭、黏附, 抑制卵巢癌细胞异种移植瘤的体内生长并且阻碍促肿瘤信号通路 c-Met、ERK 以及 AKT 的激活^[23]。因此本研究推测下调 *lncRNA SNHG1* 可能通过释放 miR-199a-3p 而发挥了抑制卵巢癌细胞增殖的作用。

综上, 本研究结果表明 *lncRNA SNHG1* 与卵巢癌的进展密切相关, 可作为卵巢癌预后的指示分子。此外, 下调 *lncRNA SNHG1* 能够抑制卵巢癌细胞的增殖, 因此, *lncRNA SNHG1* 有望成为治疗和预防卵巢癌的潜在靶点。

4 参考文献

- [1] 雷雨, 于娇, 何莉, 等. 靶向测序技术对铂类耐药卵巢癌多基因检测分析[J]. 贵州医科大学学报, 2017 (7): 61-64; 69.
- [2] MILLER K D, SIEGEL R L, LIN C C, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016 [J]. Ca A Cancer Journal for Clinicians, 2016, 66(4): 271-289.
- [3] 洪陈亮. 长链非编码 RNA [J]. 中南医学科学杂志, 2016, (5): 598-598.
- [4] 张双玲, 江高峰, 吴磊, 等. 长链非编码 RNA 在卵巢癌研究中的进展 [J]. 公共卫生与预防医学, 2014, 25 (2): 71-73.
- [5] CUI Y, ZHANG F, ZHU C, et al. Upregulated *lncRNA SNHG1* contributes to progression of non-small cell lung cancer through inhibition of miR-101-3p and activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Oncotarget, 2017, 8(11): 17785-17794.
- [6] ZHANG H, ZHOU D, YING M, et al. Expression of long non-coding RNA (*lncRNA*) small nucleolar RNA host gene 1 (*SNHG1*) exacerbates hepatocellular carcinoma through suppressing miR-195 [J]. Medical Science Monitor International Medical Journal of Experimental & Clinical Research, 2016, 22: 4820-4829.
- [7] HU Y, MA Z, HE Y, et al. *lncRNA-SNHG1* contributes to gastric cancer cell proliferation by regulating DNMT1 [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 491(4): 926-931.
- [8] 张莉, 伍靖, 李晓宇. 长链非编码 RNA AFAP1-AS1 对人舌癌细胞增殖的影响 [J]. 贵州医科大学学报, 2017, 42(8): 902-905.
- [9] 王帆, 周骥平, 谢小娟, 等. *lncRNA UCA1* 对卵巢癌细胞侵袭及迁移的影响及机制 [J]. 现代肿瘤医学, 2015(1): 1-4.
- [10] YAN Y, FAN Q, WANG L, et al. *lncRNA Snhg1*, a non-degradable sponge for miR-338, promotes expression of proto-oncogene *CST3* in primary esophageal cancer cells [J]. Oncotarget, 2017, 8(22): 35750-35760.
- [11] LI J, ZHANG Z, XIONG L, et al. *SNHG1 lncRNA* negatively regulates miR-199a-3p to enhance CDK7 expression and promote cell proliferation in prostate cancer [J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2017, 487(1): 146-152.
- [12] 李瑞萍, 胡雪梅, 吕银凤, 等. 苦参碱对人卵巢癌细胞增殖的影响及其机制 [J]. 西安交通大学学报 (医学版), 2010, 31(5): 621-624.
- [13] 杨大磊, 毕芳芳, 于大海. TNFAIP8 在卵巢癌中的表达及其对卵巢癌细胞增殖的影响 [J]. 中国医科大学学报, 2016, 45(6): 526-530.
- [14] miRNA-22 在卵巢癌组织的表达及其对卵巢癌细胞增殖、迁移与侵袭的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(12): 2251-2255.
- [15] ZHAO Y, QIN Z S, FENG Y, et al. Long non-coding RNA (*lncRNA*) small nucleolar RNA host gene 1 (*SNHG1*) promote cell proliferation in colorectal cancer by affecting P53 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(4): 976-984.
- [16] LIU Y, YANG Y, LI L, et al. *lncRNA SNHG1* enhances cell proliferation, migration and invasion in cervical cancer [J]. Biochemistry & Cell Biology, 2018, 96 (1): 188.

(下转第 567 页)