

网络出版时间:2023-09-11 14:41:06 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20230908.1632.001

LncRNA SNHG16 通过调控 miR-195-5p/MYB 促进胃癌细胞增殖及迁移

康娟¹, 贺娇², 任伟宏²

摘要 目的 探讨 lncRNA SNHG16(SNHG16)对胃癌细胞增殖、迁移的影响及其分子调控机制。方法 基于在线数据库检索 SNHG16 在胃癌组织中的表达情况并筛选 SNHG16 的下游靶基因。通过生物信息学方法分析、双荧光素酶报告基因实验验证 SNHG16 与 miR-195-5p 间相互作用关系。实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 SNHG16、miR-195-5p 和 MYB 在胃癌细胞(HGC-27、MKN-28)中的表达情况;敲低 SNHG16 检测 miR-195-5p 或 MYB 表达;过表达 miR-195-5p 检测 MYB 表达;蛋白质印迹分析(Western blot)检测各组中 MYB 的蛋白表达水平。敲低 SNHG16 或过表达 miR-195-5p,通过细胞增殖及划痕实验分别检测胃癌细胞(HGC-27、MKN-28)增殖及迁移能力。结果 LncRNA SNHG16 在胃癌组织及胃癌细胞(HGC-27、MKN-28、MKN-45、NCI-N87)中表达升高。双荧光素酶报告基因实验结果显示,将 psi-CHECK2-SNHG16-WT 和 miR-195-5p mimic 同时转染进 HGC-27 中,显著抑制了 HGC-27 细胞的荧光素酶活性。qRT-PCR 及 WB 实验结果显示:敲低 HGC-27、MKN-28 细胞中 SNHG16 可上调 miR-195-5p 并抑制 MYB 在转录及翻译水平的表达;过表达 HGC-27、MKN-28 细胞中 miR-195-5p 可抑

制 MYB 表达。CCK8 增殖实验及细胞划痕实验结果表明:敲低 SNHG16 或过表达 miR-195-5p 均可抑制 HGC-27、MKN-28 细胞的增殖和迁移。结论 LncRNA SNHG16 可通过 miR-195-5p 调节 MYB 在胃癌细胞中的表达,SNHG16 高表达可促进胃癌细胞增殖和迁移。

关键词 lncRNA SNHG16; miR-195-5p/MYB; 胃癌细胞; 增殖; 迁移

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)09-1564-09
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.09.021

胃癌(7.7%)位居全球恶性肿瘤致死率排名第四位^[1],早期诊断和治疗是有效防治胃癌的关键,因此,寻找灵敏度、特异度高的分子标记物对胃癌早期诊断及筛选潜在治疗靶点具有积极影响^[2]。长非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一类转录本长度大于 200 核苷酸(nt),无法编码蛋白的单链 RNA,在肿瘤发生发展过程中发挥重要作用^[3]。小核内 RNA 宿主基因(SNHG16)是位于 17q25.1 上的促癌 lncRNA,2009 年初次报道,SNHG16 在侵袭性神经母细胞瘤中高度表达,并与患者的生存预后相关^[4]。近期研究表明,SNHG16 在多种人类恶性肿瘤中异常表达且参与肿瘤发生发展,其中,SNHG16 在胃癌组织及胃癌患者血浆中的表达升高,其高表达与肿瘤体积、远处转移及 TNM 分期等显著相关,这说明 SNHG16 可能是胃癌的一

2023-08-02 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82174146);河南省科技攻关项目(编号:212102310639)

作者单位:¹ 河南中医药大学第一临床医学院,郑州 450046;

² 河南中医药大学第一附属医院检验科,郑州 450000

作者简介:康娟,女,硕士研究生;

任伟宏,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: ren_weihong@163.com

blot was used to determine the protein level of NLRP3, ASC, Caspase-1, GSDMD, IL-1 β and IL-18. **Results** CCK-8 assay showed that cell viability decreased in CSE group ($P < 0.001$), LDH leakage rate ($P < 0.001$) and ROS ($P < 0.001$) production increased. Compared to the CSE group, cell viability increased ($P < 0.001$), LDH leakage rate ($P < 0.01$) and ROS ($P < 0.001$) production decreased in CSE + MCC950 group. The number of PI staining cells in CSE group was more than that in control group and CSE + MCC950 group, but staining cells in CSE + MCC950 group was less than that in CSE group. RT-qPCR and Western blot results showed that the expression levels of NLRP3, ASC, Caspase-1, GSDMD, IL-1 β and IL-18 increased in CSE group but decreased in CSE + MCC950 group. **Conclusion** The oxidative stress and inflammation of sertoli/spermatogenic induced by cigarette smoke may be related to the activation of ROS/NLRP3 signaling pathway.

Key words cigarette smoke; NLRP3; ROS; pyroptosis; sertoli/spermatogenic cells

个潜在肿瘤标志物^[5-7]。SNHG16 作为 ceRNA, 通过与 miRNA 反应元件结合, 参与调控相关基因的表达。研究发现, 结直肠癌、肝癌细胞中 SNHG16 可通过调控 miR-195-5p 影响靶基因的表达, 并参与肿瘤细胞增殖、转移、凋亡和血管生成等生物学过程^[8-9]。然而, SNHG16 和 miR-195-5p 在胃癌增殖、迁移过程中是否存在调控关系, 尚无定论。现探讨 SNHG16 和 miR-195-5p 对胃癌 HGC-27、MKN-28 细胞增殖、迁移能力的影响及分子机制, 为胃癌的基础研究和临床诊断、治疗提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 实验材料 实验所用胃癌细胞系 (HGC-27、MKN-28、MKN-45、NCI-N87) 和正常胃黏膜细胞系 (GES-1) 均采购于北京北纳生物有限公司。双荧光素酶报告基因载体 psiCHECK-2 (野生型 WT-SNHG16 和突变型 MUT-SNHG16) 购于苏州金唯智生物技术公司; si-NC 和 si-SNHG16、mimic-NC 和 miR-195-5p-mimic (miR-195-5p), PCR 引物均采购于上海生物工程有限公司。MYB 抗体购自美国赛默飞世尔科技公司, GAPDH 抗体及二抗购自美国 proteintech 公司。Lipo8000™ 转染试剂采购于上海碧云天生物技术有限公司; q-PCR 相关试剂盒均采购于北京康为世纪生物有限公司。CCK-8 试剂盒采购于日本同仁科技生物公司。WB 相关试剂、RPMI-1640 基础培养基、胰蛋白酶、双荧光素酶报告基因试剂盒等均采购于北京索莱宝科技有限公司; opti-MEM 基础培养基采购于美国 Gibco 公司; 胎牛血清 (FBS) 采购于澳洲 CLARK 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 生物信息学分析 登录 TCGA 数据库的官方网站, 进入 “Access TCGA Data” 版块, 获取 Stomach adenocarcinoma (STAD) (包含 373 例胃癌组织样本和 32 例癌旁正常组织) 相关的 RNA 测序数据, 选取数据集中 01A 的癌症组命名为 tumor, 11A 的癌旁正常组织命名为 normal, 行进一步分析; 在 GEPIA 2 数据库中检索 SNHG16 在胃癌组织中的相对表达情况; 通过 Kaplan-Meier Plotter 数据库挖掘 SNHG16 的表达数据, 筛选条件为: Cancer type = gastric cancer; Gene symbol = SNHG16; Affymetrix ID = 224601-at; Split patients by = Auto select best cutoff。

基于 starbase 3.0、DIANA 数据库预测 lncRNA SNHG16 的靶向 miRNA; 同时基于 R 语言软件 edgeR 包、limma 包对 TCGA STAD 数据库中 miRNA

read count 原始数据做标准化处理, 按照 $\log_2\text{foldChange} < -1$ 且 $P < 0.05$ 的条件筛选出差异分析中表达下调的 miRNA 与数据库预测的 miRNA 做交集后得出候选 miRNA。同时, 在 starbase 数据库 “Pan-Cancer analysis” 模块中检索 “STAD” 探究前面查询到的 miRNA 与 SNHG16 之间的相关性; 在 “miRNA-lncRNA” 模块中, 检索 SNHG16 与前面检索到的 miRNA, 预测各 miRNA 与 SNHG16 间的潜在结合位点。

以 starbase 数据库为基础, 在 “Predicted Program” 界面使用 4 个数据库 (microT、miRanda、PicTar 及 TargetScan) 预测可与 miR-195-5p 结合的 mRNA 并取交集; 基于 TCGA-STAD 及 GEO 数据库中 GPL570 数据集通过 R 语言 limma 包, 以 $\log_2\text{foldChange} > 2$ 且 $P < 0.05$ 为条件, 筛选出表达上调的 mRNA 与预测的 mRNA 做交集后得出候选的 mRNA。同时, 在 starbase 数据库 “Pan-Cancer analysis” 模块中检索 “STAD” 探究前面查询到的 mRNA 与 miR-195-5p 之间的相关性。在 “miRNA-mRNA” 模块中, 检索 miR-195-5p 与前面检索到的 mRNA, 预测与 mRNA 间的潜在结合位点。

1.2.2 细胞培养及转染 GES-1、HGC-27 分别用含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基和含 20% FBS 的 RPMI-1640 完全培养基进行培养; MKN-28、MKN-45 和 NCI-N87 均使用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基进行培养。所有实验细胞均放置 37℃、95% 湿度、含 5% CO₂ 的恒温细胞培养箱中进行培养。当胃癌细胞 HGC-27 和 MKN-28 的细胞密度达到 70%~80% 时, 按照 lipo8000™ 试剂说明书进行细胞转染。转染结束后, 将细胞置于细胞培养箱中继续培养, 2 d 后收集细胞进行后续实验。

1.2.3 定量逆转录聚合酶链反应 (qRT-PCR) 使用 TRIzol 提取对数生长期细胞的总 RNA, 检测 RNA 浓度、纯度合格后进行逆转录; 使用逆转录试剂盒 (ReverTra Ace qPCR RT Kit) 将 1 000 ng RNA 逆转录成 cDNA; 最后用 qRT-PCR 扩增试剂盒检测 SNHG16、miRNA、MYB 的表达。引物序列见表 1。在 Real-Time 7500 定量 PCR 仪上, 设置 qRT-PCR 反应条件: 50℃ 3 min, 95℃、3 min; 95℃、30 s, 60℃、30 s, 72℃、30 s, 合计 43 个循环。溶解曲线条件: 95℃、15 s, 60℃、1 min, 95℃、30 s, 60℃、15 s。用 2^{-ΔΔCt} 法计算 SNHG16、miRNA、MYB 的相对表达。所有测定重复 3 次。

1.2.4 细胞增殖试验 转染 si-NC、si-SNHG16 或

表1 引物名称及序列

引物名称	引物序列(5'-3')
SNHG16	F : TGCTGTTTCGTTTCTGCTGACTGAG R : GCAAGAGACTTCCTGAGGCACATC
GADPH	F : CTCTCTGCTCCTCTGTTTCGAC R : TGAGCGATGTGGCTCGGCT
hsa-miR-30a-5p	F : CCTGTAAACATCCTCGACTGGAAG
hsa-miR-195-5p	F : CGCTAGCAGCACAGAAATATTGGC
hsa-miR-497-5p	F : CAGCAGCACACTGTGCTTTGT
hsa-miR-140-5p	F : CGCAGTGGTTTTACCTATGCTAG
U6	F : CCGAGAGAAGATTAGCATGGCCCTC
MYB	F : CCATTGCCGACCACACCAGAC R : TTCTTCAGGTAGGAGCCAGGATC
si-NC	Sense : UUCUCCGAACGUGUCACGUTT Antisense : ACGUGACACGUUCGAGAATT
si-SNHG16	Sense : UGGAAGAGCCUAAAGAGGAATT Antisense : UUCUCCUAGGCUUCCATT
hsa-miR-195-5p-mimic	Sense : UAGCAGCACAGAAAUUUGGC
mimic NC	Sense : UUGUACUACAAAAGUACUG

mimic-NC、miR-195-5p-mimic 24 h 后,收集对数生长期细胞将其接种于 96 孔板(4 000 个细胞/孔)中。在接种细胞后的 0、24、48 h,每孔加所用培养基 10% 体积的 CCK-8 试剂,于 37 ℃、含 5% CO₂、95% 湿度的恒温细胞培养箱中避光孵育 3 h,用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度,通过细胞裂解物的光密度计算细胞活力。所有测定重复 3 次。

1.2.5 伤口愈合试验 取转染 si-NC、si-SNHG16 或 mimic-NC、miR-195-5p-mimic 后生长融合度达 85% 以上的胃癌细胞,用 10 μl 枪头垂直于板底缓慢且用力均匀地进行划痕,PBS 液冲洗 2 次,加入培养基继续培养;分别在培养 0 h、24 h、40 倍光镜下选择划痕区 3 个以上视野进行拍照,镜下测量划痕宽度。细胞迁移率 = [(0 - 24 h) 划痕宽度/0 h 划痕宽度] × 100%。

1.2.6 双荧光素酶报告物测定 将由苏州金唯智生物构建并合成的荧光报告载体质粒 psiCHECK2-SNHG16-WT 和 psiCHECK2-SNHG16-MUT 分别与 mimic-NC、miR-195-5p-mimic 共转染至 HGC-27 细胞。转染 36 h 后,取对数生长期细胞,弃原有培养基,加入适量细胞裂解液对胃癌细胞 HGC-27 进行裂解,取 20 μl 细胞混悬液与 100 μl 已稀释的萤火虫荧光素酶加入 96 孔板中,振荡混匀后测得萤火虫荧光素酶活性;加入 100 μl 已稀释的海肾荧光素酶,振荡混匀后测得海肾荧光素酶活性。psiCHECK2 载体以萤火虫荧光素酶活性为内参,psiCHECK2-SNHG16-WT 和 psiCHECK2-SNHG16-MUT 的表达为对照,观察 miR-195-5p 对 SNHG16 表达的

影响。根据双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书,测定 HGC-27 细胞的海肾荧光素酶活性和萤火虫荧光素酶活性,两者的比值即相对荧光素酶活性,所有测定重复 3 次。

1.2.7 蛋白质印迹分析 (Western blot) 用高效 RIPA 裂解液从细胞中提取总蛋白,离心后收集上清,使用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。取适量变性后的蛋白质,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离,电转目标蛋白至 PVDF 膜上。于室温,用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,用 PBS 漂洗两次,随后与一抗抗 MYB (1 : 2 000)、抗 GAPDH (1 : 10 000),于 4 ℃ 过夜孵育。用 1 × TBST 漂洗 PVDF 膜 3 次,然后与 HRP 标记的山羊抗兔二抗 IgG (1 : 10 000) 于室温孵育 1 h,再用 1 × TBST 漂洗 PVDF 膜 3 次,随后经 ECL 试剂反应后,在扫膜仪上进行显影曝光。通过 Image J 软件对蛋白条带进行定量分析。

1.3 统计学处理 运用 GraphPad Prism 8 软件进行图形绘制和统计学分析,各组实验数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 。通过独立样本 *t* 检验评估两组之间差异的显著性,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SNHG16 在胃癌中高表达 通过分析比较 SNHG16 在 TCGA STAD 数据库及 GEPIA 数据库中的相对表达量,结果显示,SNHG16 在胃癌组织中表达升高(图 1A-C);通过检索 KM 数据库中 SNHG16 与胃癌患者的预后关系发现:高表达 SNHG16 胃癌患者生存时间明显少于低表达 SNHG16 的胃癌患者,差异有统计学意义(*P* < 0.001,图 1D)。进一步用 qRT-PCR 技术检测 SNHG16 在人胃黏膜上皮细胞 GES-1 及胃癌细胞系(HGC-27、MKN-28、MKN-45 和 NCI-N87)中的表达,结果显示,与 GES-1 相比,胃癌细胞中 SNHG16 的表达均显著升高(*P*_{HGC-27} = 0.007 8; *P*_{MKN-28} = 0.009 1; *P*_{MKN-45} = 0.017 5; *P*_{NCI-N87} = 0.0246,图 1E)。

2.2 SNHG16 对胃癌细胞增殖、迁移能力的影响 转染 si-SNHG16 后 48 h 通过 qRT-PCR 技术检测 siRNA 的干扰效率,结果显示,si-SNHG16 在胃癌细胞 HGC-27、MKN-28 中干扰效果显著(*P*_{HGC-27} = 0.034 8; *P*_{MKN-28} = 0.005 8)。通过细胞增殖实验发现,转染 si-SNHG16 后 HGC-27 在 24、48 h 细胞活力分别为 si-NC 组细胞活力的 63.2% 和 58.0% (*P*_{HGC-27} 24 h = 0.008 5; *P*_{HGC-27} 48 h = 0.000 9); MKN-28 在 24、48 h 细胞活力分别为 si-NC 组细胞

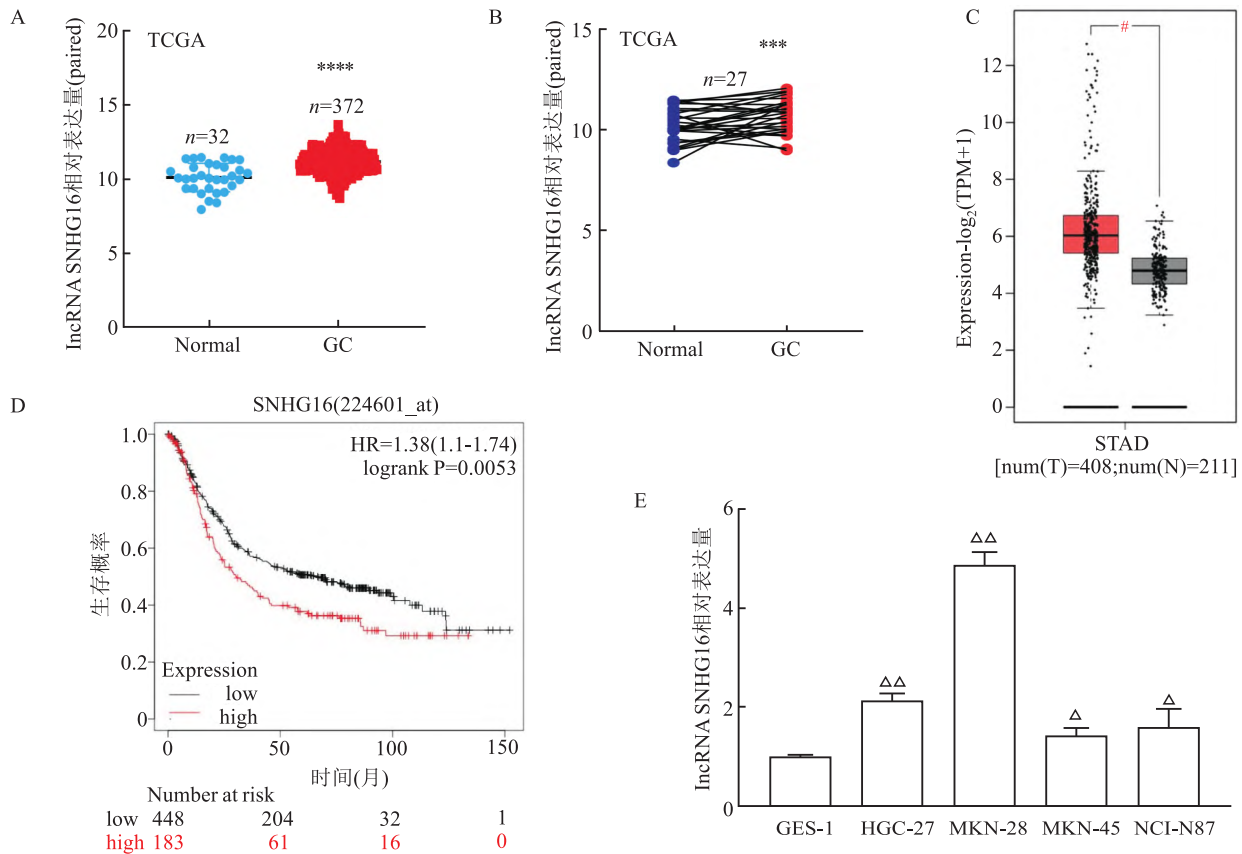


图1 SNHG16在胃癌组织及不同胃癌细胞系中的表达

A:TCGA STAD 数据库中 32 例正常组织和 372 例胃癌组织的 SNHG16 表达情况;与正常组织比较:**** $P < 0.0001$;B:TCGA STAD 数据库中 27 例正常组织和 27 例胃癌组织的 SNHG16 表达情况;与正常组织比较:*** $P < 0.001$;C: GEPIA 数据库中 SNHG16 表达情况;与胃癌组织比较:# $P < 0.05$;D:SNHG16 与胃癌患者总生存期间的关系;E: SNHG16 在胃癌细胞系中的表达;与 GES-1 比较:△ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$

活力的 56.5% 和 56.4% ($P_{MKN-28} 24 h = 0.0008$; $P_{MKN-28} 48 h = 0.0006$)。通过细胞划痕实验发现,与 si-NC 组相比,si-SNHG16 组的细胞迁移率明显降低 (HGC-27: $(79.0 \pm 1.3)\%$ vs $(44.6 \pm 4.0)\%$, $P = 0.0117$; MKN-28: $(28.3 \pm 0.8)\%$ vs $(12.5 \pm 0.9)\%$, $P = 0.0058$)。上述实验结果表明,在 HGC-27 和 MKN-28 细胞中下调 SNHG16 表达后,胃癌细胞的增殖、迁移能力降低,差异具有统计学意义 (图 2)。

2.3 SNHG16 的靶基因 miRNA 的筛选及验证

通过生信分析发现在胃癌中与 SNHG16 相关的下调的 miRNA 有 6 个:hsa-miR-30a-5p、hsa-miR-23b-3p、hsa-miR-195-5p、hsa-miR-497-5p、hsa-miR-205-5p、hsa-miR-140-5p。并在 starbase 数据库中,对上述 miRNA 与 SNHG16 在胃癌中表达水平的相关性进行分析见表 2。随后通过 qRT-PCR 技术检测,敲低 SNHG16 后,检测各 miRNA 的表达水平变化,结果显示,与 si-NC 组相比,仅 miR-195-5p 在胃癌细胞

HGC-27、MKN-28 中表达升高 (均 $P < 0.05$,图 3A1、A2);并通过 qRT-PCR 技术验证 miR-195-5p 在胃癌细胞中的表达情况,结果显示,miR-195-5p 在胃癌细胞中表达下调 ($P_{HGC-27} = 0.0043$; $P_{MKN-28} = 0.0291$,图 3B)。同时,在 starbase 数据库中预测 miR-195-5p 与 SNHG16 的结合位点 (图 3C)。双荧光素酶报告基因实验结果显示,与 mimic-NC + SNHG16-WT 组比较,miR-195-5p mimic + SNHG16-WT 组细胞荧光素相对活性显著降低 ($P = 0.0156$,图 3D);而

表2 miRNA 与 SNHG16 在胃癌中表达水平的相关性分析(r)

基因名	相关系数(r)	P 值
hsa-miR-205-5p	0.072	1.63×10^{-1ns}
hsa-miR-23b-3p	-0.074	7.07×10^{-2ns}
hsa-miR-30a-5p	-0.173	8.08×10^{-4}
hsa-miR-195-5p	-0.370	1.77×10^{-13}
hsa-miR-497-5p	-0.254	6.65×10^{-7}
hsa-miR-140-5p	-0.215	2.98×10^{-5}

注:1,相关系数(r)正数为正相关;负数为负相关。2,ns 表示与胃癌组织中的 SNHG16 的表达情况比较,miRNA 对应的表达差异无统计学意义。

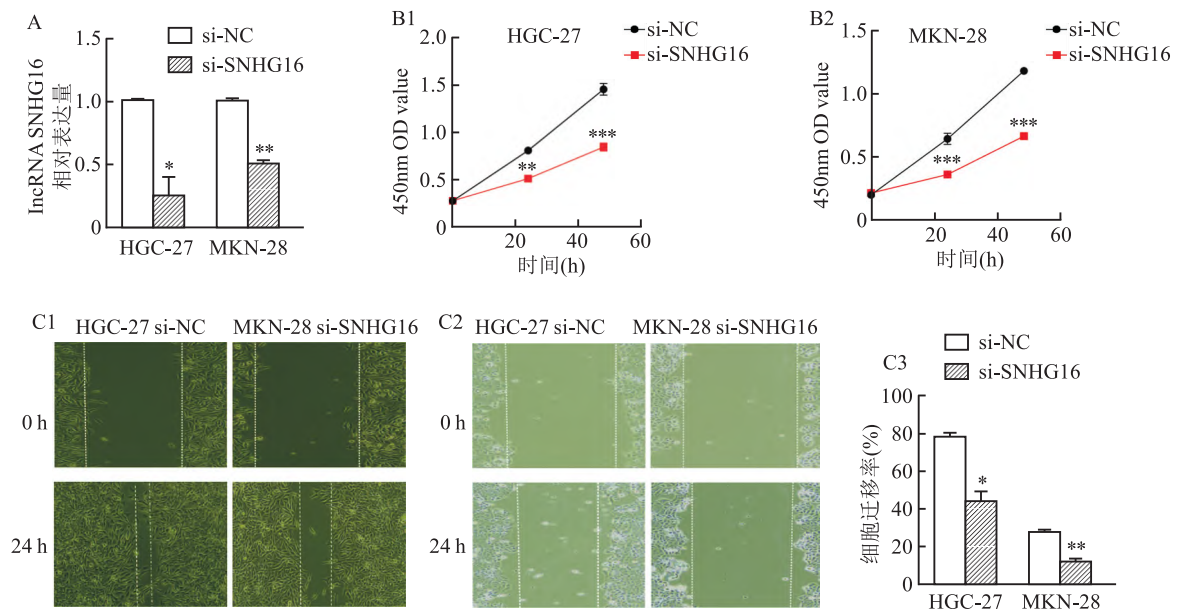


图2 SNHG16在胃癌细胞中的干扰效率及SNHG16对胃癌细胞增殖、迁移能力的影响

A: qRT-PCR 检测 si-SNHG16 在 HGC-27、MKN-28 细胞中的干扰效率; B1: 下调 SNHG16 表达抑制胃癌细胞 HGC-27 的增殖; B2: 下调 SNHG16 表达抑制胃癌细胞 MKN-28 的增殖; C1: 下调 SNHG16 表达抑制 HGC-27 细胞的迁移 $\times 40$; C2: 下调 SNHG16 表达抑制 MKN-28 细胞的迁移 $\times 40$; C3: HGC-27 和 MKN-28 细胞迁移能力的统计学分析; 与 si-NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

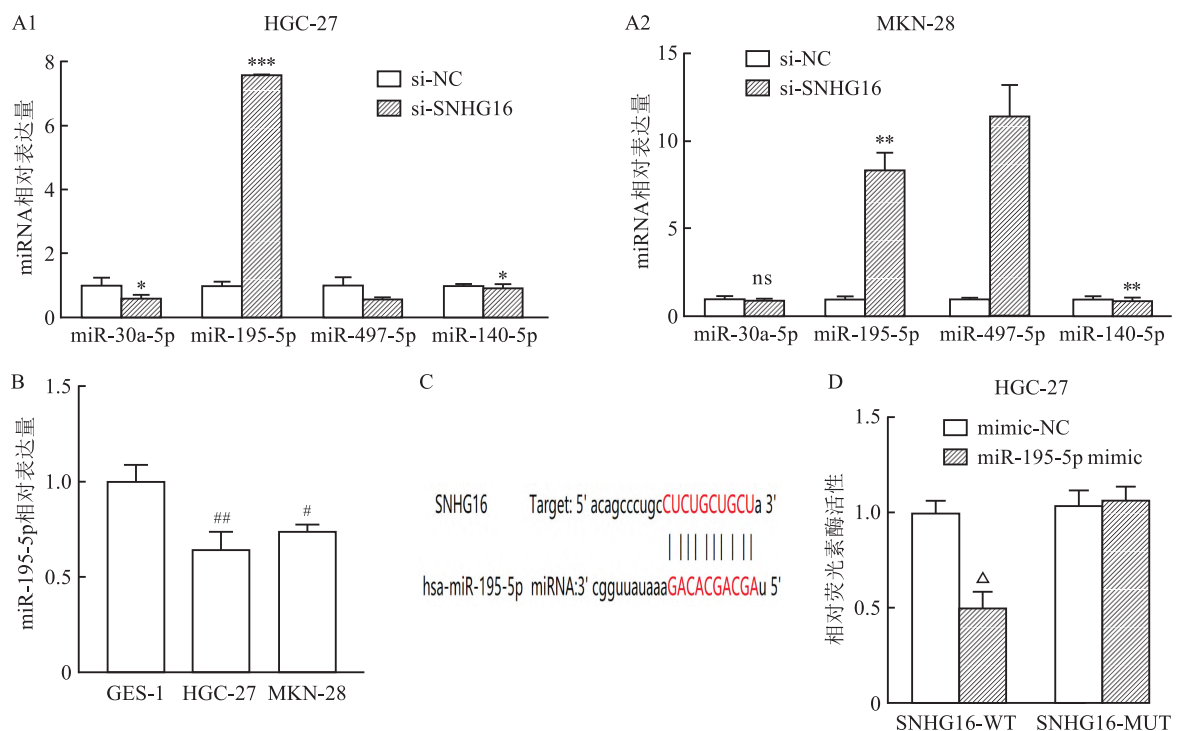


图3 SNHG16与miR-195-5p间的靶向关系

A1: 在 HGC-27 细胞中, 敲低 SNHG16 后各 miRNA 的表达情况; A2: 在 MKN-28 细胞中, 敲低 SNHG16 后各 miRNA 的表达情况; B: miR-195-5p 在 HGC-27、MKN-28 中的表达; C: Starbase 数据库中 SNHG16 与 miR-195-5p 互补的核苷酸序列; D: 各组荧光素酶相对活性的比较; 与 si-NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 GES-1 比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 miR-NC + SNHG16-Wt 比较: $\Delta P < 0.05$

mimic-NC + SNHG16-MUT 组和 miR-195-5p mimic + SNHG16-MUT 组细胞荧光素酶相对活性无明显差

异($P > 0.05$)。

2.4 miR-195-5p 对胃癌细胞增殖、迁移能力的影响

响 通过 qRT-PCR 检测细胞内 miR-195-5p mimic 的转染效率,结果显示:与 mimic-NC 组相比,mimic 组的 miR-195-5p 的表达量明显上调 ($P_{HGC-27} = 0.0015$; $P_{MKN-28} = 0.0031$)。CCK-8 增殖实验结果显示,HGC-27 在转染 mimic 24,48 h 细胞活力分别为 mimic-NC 组的 63.6% 和 61.8% ($P_{HGC-27} 24 h = 0.0058$; $P_{HGC-27} 48 h = 0.0003$);MKN-28 在 24,48 h 细胞活力分别为 mimic-NC 组的 54.1% 和 51.7% ($P_{MKN-28} 24 h = 0.0021$; $P_{MKN-28} 48 h = 0.0002$)。细胞划痕实验显示,与 mimic-NC 组相比,mimics 组的细胞迁移率明显降低 (HGC-27: $(69.19 \pm 3.39)\%$ vs $(50.55 \pm 3.12)\%$, $P = 0.0463$; MKN-28: $(26.64 \pm 1.75)\%$ vs $(13.99 \pm 5.24)\%$, $P = 0.0411$)。结果表明,在 HGC-27 和 MKN-28 细胞中过表达 miR-195-5p 后,胃癌细胞的增殖、迁移能力降低,差异有统计学意义(图 4)。

2.5 miR-195-5p 下游靶基因的筛选及验证 通过分析 starbase 等数据库预测出 MYB 为 miR-195-5p 的靶基因,miR-195-5p 及 MYB 的表达在胃癌组织中呈负相关趋势 ($r = -0.183$, $P = 3.84 \times 10^{-4}$);并在 starbase 数据库中筛选 MYB-3'UTR 与 miR-195-5p

结合位点,通过 qRT-PCR 及 WB 技术检测 MYB 在胃癌细胞中表达上调,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$),见图 5。

2.6 敲低 SNHG16 或过表达 miR-195-5p 对 MYB 表达的影响 与 si-NC 组相比,si-SNHG16 组胃癌细胞 MYB 的表达水平显著降低,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与 mimic-NC 组相比,miR-195-5p-mimic 组胃癌细胞 MYB 的表达水平同样降低,差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$),见图 6。

3 讨论

胃癌的发生发展涉及多因素、多基因,其病因及发病机制尚不明确,使得胃癌总体疗效并不理想^[2]。因此,从多角度、不同层面开展胃癌基础研究,深入阐明胃癌发病机制,寻找灵敏度、特异度高的分子标记物作用于胃癌早期诊断、识别早期胃癌及筛选潜在治疗靶点,对胃癌的诊断和治疗有积极影响。

研究^[5-6]表明 lncRNA 可参与表观遗传基因调控和多种肿瘤的发生发展从而影响肿瘤患者的生存及预后,SNHG16 在食管癌、肝癌等肿瘤中均发挥促

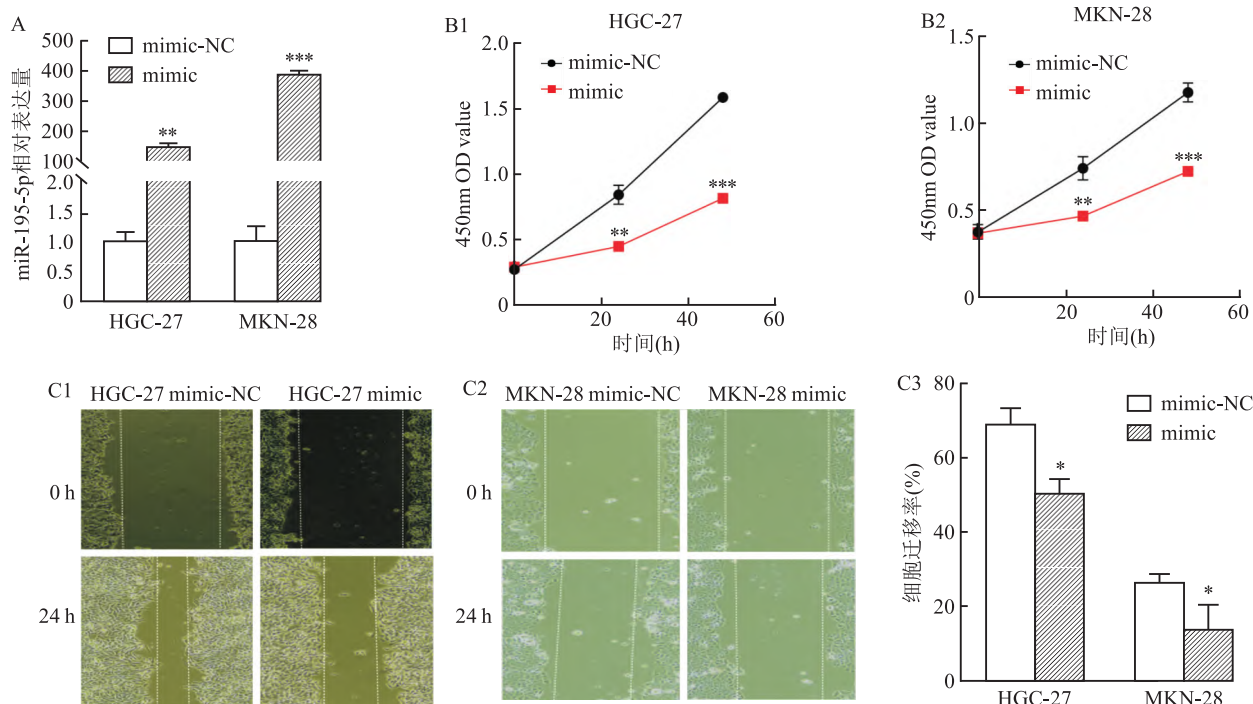


图4 miR-195-5p 对胃癌细胞增殖、迁移能力的影响

A: miR-195-5p mimic 的转染效率; B1: 过表达 miR-195-5p 抑制 HGC-27 的增殖; B2: 过表达 miR-195-5p 抑制 MKN-28 的增殖; C1: 过表达 miR-195-5p 抑制 HGC-27 细胞的迁移 $\times 40$; C2: 过表达 miR-195-5p 抑制 MKN-28 细胞的迁移 $\times 40$; C3: HGC-27 和 MKN-28 细胞迁移能力的统计学分析; 与 mimic-NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

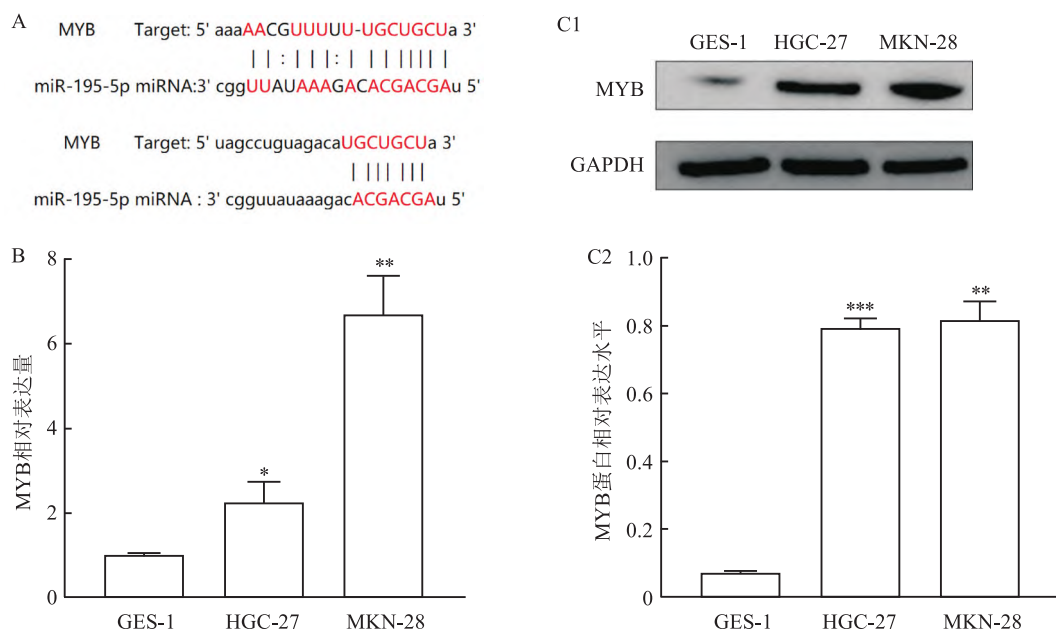


图5 miR-195-5p的靶基因MYB在不同胃癌细胞系中的表达

A: Starbase 数据库预测 miR-195-5p 与 MYB 结合位点; B: qRT-PCR 检测 MYB 在 HGC-27、MKN-28 中的表达; C1: MYB 蛋白表达; C2: MYB 蛋白表达分析统计结果; 与 GES-1 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

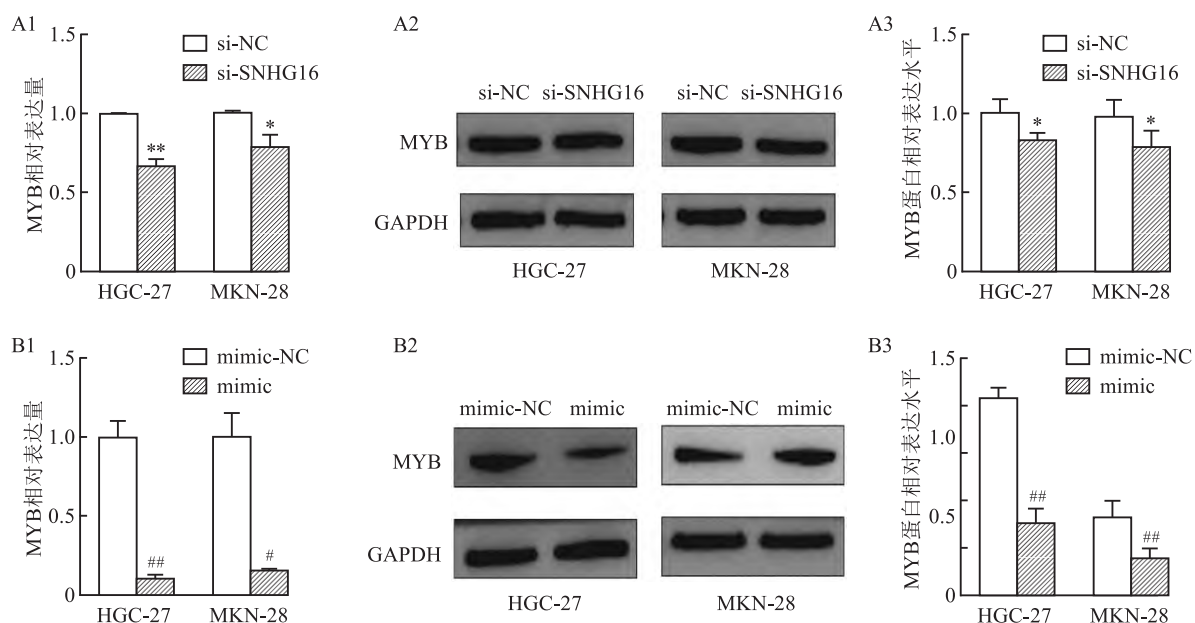


图6 敲低 SNHG16 或过表达 miR-195-5p 对 MYB 表达水平的影响

A1: qRT-PCR 检测敲低 SNHG16 对胃癌细胞中 MYB 表达水平的影响; A2: 敲低 SNHG16 后 MYB 蛋白表达; A3: 敲低 SNHG16 后 MYB 蛋白表达分析统计结果; B1: qRT-PCR 检测过表达 miR-195-5p 对胃癌细胞中 MYB 表达水平的影响; B2: 过表达 miR-195-5p 后 MYB 蛋白表达; B3: 过表达 miR-195-5p 后 MYB 蛋白表达分析统计结果; 与 Si-NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 mimic-NC 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

癌作用。本实验首先发现 SNHG16 在胃癌组织及胃癌细胞 HGC-27、MKN-28、MKN-45、NCI-N87 中表达升高,这一结果与其他肿瘤的研究结果相同,说明 SNHG16 的异常表达可能与胃癌的发展进程相关。

后续实验表明,敲低 SNHG16 后,胃癌细胞(HGC-27、MKN-28)的增殖、迁移能力均降低,进一步说明 SNHG16 在胃癌细胞(HGC-27、MKN-28)中发挥促癌作用。

研究^[10]表明,SNHG16 可作为 miRNA 海绵调节转录后调控,例如,SNHG16 可通过调节 miR-302b-3p 的表达,间接上调 miR-302b-3p 靶标 SLC2A4 的表达水平,从而促进胰腺癌细胞(PC)的增殖,迁移和侵袭,抑制凋亡;在 Weng et al^[11] 研究中发现,SNHG16 可通过吸附 miR-373-3p,而 miR-373-3p 靶向 TGF- β -R2,从而激活前列腺癌中的 TGF- β R2/SMAD 信号通路,促进前列腺癌细胞的增殖、迁移。本实验发现 SNHG16 可通过调节 miR-195-5p 在胃癌中发挥作用。本实验首先基于生信分析软件及在线数据库预测 SNHG16 的靶基因 miR-195-5p 及 SNHG16 与 miR-195-5p 的结合位点;进一步通过双荧光素酶基因实验验证 SNHG16、miR-195-5p 间具有靶向关系。

研究^[12-13]表明,miR-195-5p 在肿瘤中发挥抑癌作用。在肺癌细胞中,miR-195-5p 通过靶向 TrxR2 发挥肿瘤抑制作用;在胃癌细胞中,miR-195 可逆转过表达 hsa_circ_006100 引起的 MGC-803 和 AGS 细胞活力和增殖、迁移和侵袭的能力增强,抑制 miR-195-5p 的表达可以恢复 miR-195 和 BCL-2 表达,并改变体内 EMT 表型。这与该实验结果一致。本实验发现 miR-195-5p 在胃癌细胞(HGC-27、MKN-28)中表达明显下调;过表达 miR-195-5p 后,胃癌细胞增殖、迁移能力均减弱,这表明过表达 miR-195-5p 可模拟敲低 SNHG16 的作用,在胃癌细胞增殖、迁移过程中发挥抑制作用。

为进一步研究 miR-195-5p 的下游靶基因,基于生物信息学预测出的 miR-195-5p 的靶基因 MYB 及 miR-195-5p 与 MYB 的 3' UTR 存在结合位点。MYB 作为一种转录因子,主要通过蛋白-蛋白相互作用等方式在肿瘤的发生发展过程中发挥致癌作用^[14]。本实验经 qRT-PCR 及 WB 技术发现,MYB 在胃癌细胞中表达上调;沉默 SNHG16 或过表达 miR-195-5p 均可抑制 HGC-27、MKN-28 细胞中 MYB 的表达。此实验可推论 lncRNA SNHG16、miR-195-5p 或可通过影响 MYB 的表达从而调控胃癌的恶性进展,为进一步丰富 lncRNA 介导 ceRNA 的机制网络以及寻找胃癌治疗的潜在靶点奠定了实验基础。

参考文献

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71

- (3): 209-49.
- [2] Smyth E C, Nilsson M, Grabsch H I, et al. Gastric cancer[J]. Lancet, 2020, 396(10251): 635-48.
- [3] Fox M D, Xiao L, Zhang M, et al. Plasmacytoid urothelial carcinoma of the urinary bladder: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis of 49 cases[J]. Am J Clin Pathol, 2017, 147(5): 500-6.
- [4] Yu M, Ohira M, Li Y, et al. high expression of ncRAN, a novel non-coding RNA mapped to chromosome 17q25.1, is associated with poor prognosis in neuroblastoma[J]. Int J Oncol, 2009, 34(4): 931-8.
- [5] Han G H, Lu K J, Wang P, et al. LncRNA SNHG16 predicts poor prognosis in ESCC and promotes cell proliferation and invasion by regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(12): 3795-803.
- [6] Zhang Q J, Li D Z, Lin B Y, et al. SNHG16 promotes hepatocellular carcinoma development via activating ECM receptor interaction pathway[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2022, 21(1): 41-9.
- [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, 36(4): 551-4.
- [8] Xiang Z, Huang G, Wu H, et al. SNHG16 upregulation-induced positive feedback loop with YAP1/TEAD1 complex in Colorectal Cancer cell lines facilitates liver metastasis of colorectal cancer by modulating CTCs epithelial-mesenchymal transition[J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(14): 5291-308.
- [9] Xie X, Xu X, Sun C, et al. Long intergenic noncoding RNA SNHG16 interacts with miR-195 to promote proliferation, invasion and tumorigenesis in hepatocellular carcinoma[J]. Exp Cell Res, 2019, 383(1): 111501.
- [10] Xu H, Miao X, Li X, et al. LncRNA SNHG16 contributes to tumor progression via the miR-302b-3p/SLC2A4 axis in pancreatic adenocarcinoma[J]. Cancer Cell Int, 2021, 21(1): 51.
- [11] Weng W, Liu C, Li G, et al. Long non-coding RNA SNHG16 functions as a tumor activator by sponging miR-373-3p to regulate the TGF- β -R2/SMAD pathway in prostate cancer[J]. Mol Med Rep, 2021, 24(6): 843.
- [12] Bu L, Tian Y, Wen H, et al. miR-195-5p exerts tumor-suppressive functions in human lung cancer cells through targeting TrxR2[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2021, 53(2): 189-200.
- [13] Liang M, Huang G, Liu Z, et al. Elevated levels of hsa_circ_006100 in gastric cancer promote cell growth and metastasis via miR-195/GPRC5A signalling[J]. Cell Prolif, 2019, 52(5): e12661.
- [14] Mitra P. Transcription regulation of MYB: a potential and novel therapeutic target in cancer[J]. Ann Transl Med, 2018, 6(22): 443.

(下转第 1579 页)

99.99% , 99.74% and 99.86% , respectively. Before washing, the total number of fungi in the washing machine ranged from 8.5 to 9.45×10^3 CFU/cm². After washing, the total number of fungi in the washing machine ranged from 0 to 49.22 CFU/cm². The fungal clearance rates of the outer wall of the inner cylinder, filter screen, seal ring, washing water and detergent drawer box were 99.36% , 99.74% , 99.76% , 99.51% and 99.64% , respectively. Before washing, the coliforms in the washing machine ranged from 0 to 4.6×10^4 MPN/100 ml. After washing, the number of coliform bacteria was close to 0 . Before washing, the average detection rate of *Salmonella* in the washing machine was 5.33% , the average detection rate of *Shigella* was 2.67% , and no *Candida albicans* was detected. After washing, *Salmonella*, *Shigella* and *Candida albicans* were not detected. **Conclusion** There are a large number of bacteria and fungi in the household washing machine before cleaning, and there are *Salmonella* and *Shigella* contamination. After professional cleaning, the hygiene condition of the washing machine is significantly improved.

Key words washing machine; current health status; microbial contamination; cleaning effect

(上接第 1571 页)

The mechanism of long non-coding RNA SNHG16 regulating the expression of miR-195-5p to promote the proliferation and migration of gastric cancer cells

Kang Juan¹, He Jiao², Ren Weihong²

(¹Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046;

²The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000)

Abstract Objective To investigate the effect of lncRNA SNHG16 (SNHG16) on the proliferation and migration of gastric cancer cells and its molecular regulatory mechanism. **Methods** The expression of SNHG16 in gastric cancer tissue was retrieved based on online database and the downstream target gene of SNHG16 was screened. The interaction between SNHG16 and miR-195-5p was verified by bioinformatics analysis and double luciferase reporter gene experiment. The expression of SNHG16, miR-195-5p and MYB in gastric cancer cells (HGC-27, MKN-28) was detected by real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR); SNHG16 was knocked down to detect the expression of miR-195-5p or MYB; The expression of MYB was detected by overexpression of miR-195-5p; Western blot analysis was used to detect the protein expression level of MYB in each group. Knock down SNHG16 or overexpress miR-195-5p, and the proliferation and migration ability of gastric cancer cells (HGC-27, MKN-28) were detected through cell proliferation and scratch test. **Results** The expression of lncRNA SNHG16 increased in gastric cancer tissues and gastric cancer cells (HGC-27, MKN-28, MKN-45, NCI-N87). The results of double luciferase reporter gene experiment showed that psiCHECK2-SNHG16-WT and miR-195-5p mimic were transfected into HGC-27 at the same time, significantly inhibiting the luciferase activity of HGC-27 cells. The results of qRT PCR and WB experiments showed that knocking down SNHG16 in HGC-27 and MKN-28 cells upregulated miR-195-5p and inhibited the expression of MYB at the transcription and translation levels; Overexpression of miR-195-5p in HGC-27 and MKN-28 cells inhibited MYB expression. The results of CCK8 proliferation test and cell scratch test showed that knocking down SNHG16 or overexpressing miR-195-5p could inhibit the proliferation and migration of HGC-27 and MKN-28 cells. **Conclusion** lncRNA SNHG16 can regulate the expression of MYB in gastric cancer cells through miR-195-5p, and the high expression of SNHG16 can promote the proliferation and migration of gastric cancer cells.

Key words lncRNA SNHG16; miR-195-5p/MYB; gastric cancer cell; proliferation; migration