

·临床研究·

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2021.04.009

环状RNA FBXO11靶向miR-376a-3p/SNRPB轴调控胃癌SNU-1细胞的增殖与凋亡

孟德峰, 李长仔, 吴春涛(华北理工大学附属医院 肿瘤外科, 河北 唐山 063000)

[摘要] **目的:**探讨环状RNA FBXO11(circFBXO11)调控miR-376a-3p/小核糖核蛋白多肽B基因(SNRPB)轴对胃癌细胞增殖与凋亡的影响。**方法:**选取2018年1月至2019年1月华北理工大学附属医院肿瘤外科30例手术切除的胃癌患者的癌和癌旁组织标本,免疫组化染色法检测胃癌组织中SNRPB蛋白阳性表达率,qPCR法检测胃癌组织、胃癌细胞系SNU-1、AGS及HS-746T和胃黏膜细胞GES1中circFBXO11、miR-376a-3p和SNRPB mRNA的表达水平。用双荧光素酶报告基因实验验证circFBXO11与miR-376a-3p、miR-376a-3p与SNRPB之间的靶向关系。将si-NC、si-circFBXO11、miR-NC、miR-376a-3p、si-SNRPB、si-circFBXO11+anti-miR-NC、si-circFBXO11+anti-miR-376a-3p、si-circFBXO11+pcDNA-NC、si-circFBXO11+pcDNA-SNRPB等分别转染进SNU-1细胞,用CCK-8法、流式细胞术以及WB法分别检测细胞的增殖活力、凋亡率以及SNRPB、cyclin D1和C-caspase-3蛋白的表达水平。**结果:**与癌旁组织比较,胃癌组织中circFBXO11表达水平显著升高、SNRPB蛋白阳性率升高、miR-376a-3p表达显著降低(均 $P<0.01$);与GES1细胞比较,胃癌细胞中circFBXO11和SNRPB表达水平显著升高、miR-376a-3p表达水平显著降低(均 $P<0.01$)。circFBXO11靶向负调控miR-376a-3p表达,miR-376a-3p靶向负调控SNRPB表达。抑制circFBXO11表达或过表达miR-376a-3p或抑制SNRPB表达后,SNU-1细胞的增殖活力降低、凋亡率升高(均 $P<0.01$)。抑制miR-376a-3p表达可部分逆转抑制circFBXO11对SNU-1细胞增殖和凋亡的作用(均 $P<0.01$)。过表达SNRPB可部分逆转抑制circFBXO11对SNU-1细胞增殖和凋亡的影响(均 $P<0.01$)。**结论:**胃癌组织中circFBXO11呈高表达,抑制circFBXO11表达可抑制胃癌细胞增殖并诱导细胞凋亡,其机制与调控miR-376a-3p/SNRPB通路相关。

[关键词] 环状RNA FBXO11;miR-376a-3p;小核糖核蛋白多肽B基因;胃癌;SNU-1细胞;增殖;凋亡

[中图分类号] R735.2; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)04-0370-08

Circular RNA FBXO11 regulates the proliferation and apoptosis of gastric cancer SNU-1 cells through targeting miR-376a-3p/SNRPB axis

MENG Defeng, LI Changzai, WU Chuntao (Department of Oncosurgery, the Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of circular RNA FBXO11 (circFBXO11) regulating the miR-376a-3p/SNRPB (small nuclear ribonucleoprotein polypeptides B gene) axis on the proliferation and apoptosis of gastric cancer SNU-1 cells. **Methods:** Cancer and para-cancerous tissue samples from 30 patients with gastric cancer who underwent surgical resection were surgically resected in the Department of Oncosurgery, the Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology from January 2018 to January 2019 were collected. The positive expression rate of SNRPB protein in gastric cancer tissues was detected by Immunohistochemical staining. The expression levels of circFBXO11, miR-376a-3p and SNRPB mRNA in gastric cancer tissues, gastric cancer cell lines (SNU-1, AGS and HS-746T) and gastric mucosal cell line GES1 were detected by qPCR. Dual luciferase reporter gene assay was used to determine the relationship between circFBXO11 and miR-376a-3p as well as between miR-376a-3p and SNRPB. The si-NC, si-circFBXO11, miR-NC, miR-376a-3p, si-SNRPB, si-circFBXO11+anti-miR-NC, si-circFBXO11+anti-miR-376a-3p, si-circFBXO11+pcDNA-NC, si-circFBXO11+pcDNA-SNRPB were transfected into gastric cancer SNU-1 cells, respectively. CCK-8 assay, Flow cytometry and WB assay were used to detect cell proliferation activity, apoptosis rate and protein expressions of SNRPB, cyclin D1 and C-caspase-3, respectively. **Results:** Compared with para-cancerous tissues, the expression level of circFBXO11 and the positive rate of SNRPB protein in gastric cancer tissues were significantly increased (all $P<0.01$), while the expression of miR-376a-3p was significantly decreased ($P<0.01$). Compared with GES1 cells, the expressions of circFBXO11 and SNRPB were significantly increased, while the expression of miR-376a-3p was significantly decreased (all $P<0.01$) in gastric cancer cells. circFBXO11

[作者简介] 孟德峰(1978-),男,硕士,主治医师,主要从事肿瘤的综合治疗研究,E-mail:mengdf08@163.com

[通信作者] 吴春涛(WU Chuntao, corresponding author),硕士,主任医师,硕士生导师,主要从事肿瘤的综合治疗研究,E-mail:568060@qq.com

negatively regulated miR-376a-3p expression, and miR-376a-3p negatively regulated SNRPB expression. After inhibiting the expression of circFBXO11 or over-expressing miR-376a-3p or suppressing the expression of SNRPB, the proliferation viability of SNU-1 cells was decreased, and the apoptosis rate was increased ($P<0.01$). Either inhibiting miR-376a-3p or over-expressing SNRPB could partially reverse the effect of circFBXO11 suppression on proliferation and apoptosis of SNU-1 cells (all $P<0.01$). **Conclusion:** circFBXO11 is highly expressed in gastric cancer tissues. Inhibiting circFBXO11 inhibits the proliferation and induces apoptosis of gastric cancer cells, and the mechanism is related to the regulation of miR-376A-3p/SNRPB pathway.

[Key words] circFBXO11; miR-376a-3p; small nuclear ribonucleoprotein polypeptides B gene (SNRPB); gastric cancer; SNU-1 cell; proliferation; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(4): 370-377. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2021.04.009]

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一。中国胃癌病死率高居肿瘤相关病死亡中的第二位^[1]。由于缺乏典型症状,多数胃癌患者确诊时已处于疾病晚期,5年OS率低于30%^[2]。因此,深入研究胃癌发生分子机制,寻找有效治疗靶点对临床胃癌诊疗意义重大。环状RNA(circular RNA, circRNA)是一种在真核生物中广泛存在的非编码RNA,与lncRNA和miRNA不同, circRNA是一种特殊的闭环结构,在哺乳动物细胞中具有较高的稳定性和序列保守性,因其在转录后水平的特殊作用已成为人类疾病的研究热点^[3]。circRNA FBXO11(circFBXO11)是近年发现的circRNA,其高表达与肝癌患者的预后不良有关,并促进肝癌细胞增殖、周期进展和奥沙利铂耐药^[4]。然而, circFBXO11在胃癌进展中的作用尚不清楚。生物信息学分析显示, circFBXO11与miR-376a-3p、miR-376a-3p与小核糖核蛋白多肽B基因(small nuclear ribonucleoprotein polypeptides B gene, SNRPB)之间存在潜在靶向关系^[5-6]。miR-376a-3p、SNRPB与结肠癌、宫颈癌的进展有关,但其在胃癌进展中作用尚未可知。本研究通过探讨circFBXO11、miR-376a-3p、SNRPB对胃癌SNU-1细胞增殖和凋亡的影响,揭示circFBXO11/miR-376a-3p/SNRPB轴在胃癌进展中的作用,以期为基于circRNA的胃癌治疗提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 组织标本、细胞系及主要试剂

收集2018年1月至2019年1月华北理工大学附属医院肿瘤外科手术切除的30例胃癌及相应的癌旁组织标本(距离肿瘤边缘5 cm正常组织),所有组织标本切取后立即放入液氮罐中,然后置于-80℃冰箱保存。患者术前均未接受化疗或放疗,术前均告知并签署知情同意书。

胃癌细胞系SNU-1、AGS和HS-746T及人胃黏膜细胞GES1购于武汉普诺赛生命科技公司。

RPMI 1640培养基、DMEM培养基、胎牛血清、青链霉素、TRIzol试剂购于北京索莱宝生物公司,

cDNA合成试剂盒、miRNA逆转录试剂盒、SYBR Green Master Mix购于北京天根生化科技公司,小干扰RNA(si-RNA)、miRNA模拟物(mimics)与抑制物(inhibitor)、过表达载体由上海生工公司提供,CCK-8检测试剂盒购于南京贝斯特生物技术有限公司,Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒购于北京百奥莱博生物科技公司,兔抗SNRPB抗体购于Proteintech公司,兔抗cyclin D1、cleaved-caspase-3(C-caspase-3)、 β -actin抗体和HRP标记的山羊抗兔IgG购于Abcam公司。

1.2 免疫组化染色法检测胃癌组织中SNRPB蛋白的表达水平

按照免疫组化染色试剂盒说明书进行实验。4 μ m厚的组织切片经二甲苯、梯度乙醇脱蜡、脱水后用H₂O₂溶液浸泡15 min,置于柠檬酸盐缓冲液中加热10 min,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗切片3次,甩干后滴加0.25%牛血清蛋白室温孵育40 min。后加入兔抗人SNRPB抗体(1:100)4℃孵育12 h。复温90 min、PBS清洗后加入山羊抗兔二抗(1:1 000)37℃下孵育20 min,DAB显色,苏木精复染1 min,冲洗、脱水后二甲苯透明、风干后封片。光学显微镜($\times 400$)下观察并采集图像。细胞核中出现棕黄色或褐色颗粒为阳性细胞。染色结果根据阳性细胞数和染色强度进行评价。染色强度计分:无色为0分、淡黄色为1分、棕黄色为2分、褐色及黑色为3分;阳性细胞数计分:<10%为1分, $\geq 10\%$ 且<50%为2分, $\geq 50\%$ 且<75%为3分, $\geq 75\%$ 为4分。染色强度积分与阳性细胞数目积分的乘积<3分为阴性(-)、 ≥ 3 分阳性(+).

1.3 细胞培养、转染与分组

细胞培养:GES1、SNU-1、AGS细胞采用RPMI 1640培养基,HS-746T细胞采用DMEM培养基在含有5% CO₂、37℃恒温细胞培养箱中培养。所有培养基均添加10%胎牛血清和1%青链霉素双抗。每周换液3次,当细胞汇合度达80%时,按照1:3比例传代。

细胞转染:取 2×10^5 个对数期SNU-1细胞接种到6孔板,细胞汇合度约为50%时采用脂质体转染法进

行细胞转染。用 100 μ l 无血清培养基稀释 50 pmol/L 待转染物, 用 100 μ l 无血清培养基稀释 4 μ l Lipofectamine™ 2000, 室温孵育 5 min。将两者轻轻混合, 室温孵育 20 min。用不含血清培养液洗涤细胞 2 次, 加入 1 ml 不含血清的培养液。将混合物滴加培养液中培养 6 h 后, 更换为含血清培养液, 转染 48 h 后 qPCR 或 WB 法检测转染效果, 合格后进行后续实验。

实验分组: 根据转染序列不同分为 si-NC 组、si-circFBXO11 组、miR-NC 组、miR-376a-3p 组、si-SNRPB 组、si-circFBXO11+anti-miR-NC 组、si-circFBXO11+anti-miR-376a-3p 组、si-circFBXO11+pcDNA-NC 组、si-circFBXO11+pcDNA-SNRPB 组。

1.4 qPCR 法检测胃癌组织及细胞中 circFBXO11、miR-376a-3p 和 SNRPB mRNA 的表达

用 TRIzol 试剂提取胃癌组织和细胞中的总 RNA, 紫外分光光度法测定 RNA 浓度和纯度。为检测 circFBXO11、SNRPB mRNA 表达水平, 用 cDNA 合成试剂盒进行逆转录反应; 为检测 miR-376a-3p 表达水平, 用 miRNA 逆转录试剂盒进行逆转录反应, 然后利用 SYBR Green Master Mix 进行 qPCR 扩增。 β -actin 为 circFBXO11 和 SNRPB 内参基因, U6 为 miR-376a-3p 内参基因。引物序列: circFBXO11 F 为 5'-GGACGTGATGTTGGTGTGTTC-3', R 为 5'-GCATC TTCAGAGCCTTCCAT-3'; SNRPB F 为 5'-CCGGAT CTTTATTGGCACCT-3', R 为 3'-AGGACTCGCTTC TCTTCCCT-3'; β -actin F 为 5'-CTCCATCCTGGCCT CGCTGT-3', R 为 3'-GCTGTCACCTTACCGTTCC-3'; miR-376a-3p F 为 5'-TGACCTAAAAGGAG-3', R 为 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'; U6 F 为 5'-CTCG CTTCGGCAGCACA-3', R 为 5'-AACGCTTACGAA TTTGCG-3'。以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 circFBXO11、miR-376a-3p、SNRPB mRNA 的相对表达水平。

1.5 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-376a-3p 与 circFBXO11、SNRPB 的靶向关系

将含有 miR-376a-3p 结合位点的野生型 (WT) 或突变型 (MUT) circFBXO11、SNRPB-3'-UTR 克隆到 pGL2 荧光素酶报告载体中, 构建成 WT-circFBXO11、MUT-circFBXO11、WT-SNRPB、MUT-SNRPB 报告质粒。利用 Lipofectamine™ 2000 将上述报告质粒分别与 miR-376a-3p mimics、miR-NC 共转染 SNU-1 细胞, 孵育 48 h 后用双荧光素酶报告基因测定系统检测各组细胞的相对荧光素酶活性。

1.6 CCK-8 法检测 SNU-1 细胞的增殖活力

取各组密度为 2×10^3 的转染细胞接种到 96 孔板, 每组设置 3 个复孔。培养 48 h 后, 向每孔内添加 10 μ l CCK-8 试剂, 培养箱中继续孵育 2 h。酶标仪测定波

长在 450 nm 处的光密度 (D) 值。

1.7 流式细胞术检测 SNU-1 细胞的凋亡率

收集各转染组细胞, 用预冷的 PBS 洗涤 2 次, 用 500 μ l 结合缓冲液重悬细胞, 随后依次加入 5 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l PI, 混匀后避光反应 15 min 后, 1 h 内上流式细胞仪检测细胞的凋亡水平。

1.8 WB 法检测 SNU-1 细胞中 SNRPB、cyclin D1 和 C-caspase-3 蛋白的表达

用放射免疫沉淀测定裂解液提取各组细胞的总蛋白, 测定蛋白浓度后, 取等量蛋白样品进行 SDS-PAGE、转膜, 5% 脱脂奶粉室温下封闭膜 2 h 后, 分别加入兔抗 SNRPB (1:1 000)、cyclin D1 (1:1 500) 和 C-caspase-3 (1:1 000) 抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日, 用 HRP 标记的山羊抗兔二抗 (1:2 000) 室温孵育 1 h 后, 用 ECL 化学发光液显色, 拍照记录。以 β -actin 为内参, 用 ImageJ 图像分析软件分析目的蛋白的灰度值。

1.9 统计学处理

qPCR 法、CCK-8 法、流式细胞术、WB 法等实验每组均重复 3 次。采用 SPSS 20.0 统计学软件对实验数据进行统计分析。正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间差异比较采用 t 检验, 多组间差异比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SNRPB 蛋白在胃癌组织中高表达

免疫组化染色结果 (图 1) 显示, SNRPB 蛋白主要在细胞核中表达, 胃癌组织中 SNRPB 蛋白阳性率明显高于癌旁组织 [(53.8 $\pm$ 3.12)% vs (10.25 $\pm$ 1.52)%, $t=68.730$, $P < 0.01$]。

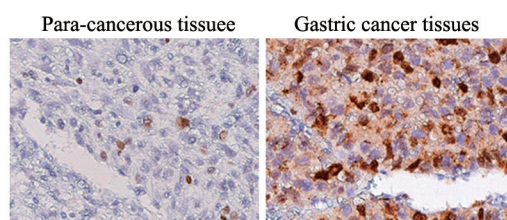


图 1 SNRPB 蛋白在胃癌组织与癌旁组织中的表达 (免疫组化染色, $\times 400$)

Fig.1 Expression of SNRPB protein in gastric cancer and para-cancerous tissues (Immunohistochemical staining, $\times 400$)

2.2 胃癌组织中 circFBXO11 及 SNRPB mRNA 高表达、miR-376a-3p 低表达

qPCR 法检测结果显示, 与癌旁组织比较, 胃癌组织中 circFBXO11 表达水平显著升高 (4.13 ± 0.37 vs 1.00 ± 0.09 , $t=24.659$, $P < 0.01$), miR-376a-3p 表达水平

显著下调 (0.38 ± 0.01 vs 1.00 ± 0.06 , $t=55.828$, $P<0.01$), SNRPB mRNA 表达水平显著升高 (2.46 ± 0.12 vs 1.00 ± 0.07 , $t=57.562$, $P<0.01$)。

2.3 胃癌细胞中 circFBXO11、miR-376a-3p、SNRPB 的表达情况

qPCR 法和 WB 法检测结果 (表 1, 图 2) 显示, 与 GES1 细胞比较, 胃癌 SNU-1、AGS、HS-746T 细胞中 circFBXO11、SNRPB mRNA 和蛋白的表达水平显著升高 (均 $P<0.01$), miR-376a-3p 的表达水平显著降低 (均 $P<0.01$)。

表 1 胃癌细胞中 circFBXO11、miR-376a-3p、SNRPB 的表达情况

Tab.1 The expressions of circFBXO11, miR-376a-3p and SNRPB in gastric cancer cells

Group	circFBXO11	miR-376a-3p	SNRPB mRNA	SNRPB protein
GES1	1.00±0.11	1.00±0.07	1.00±0.12	0.40±0.03
SNU-1	3.08±0.27**	0.40±0.04**	2.89±0.19**	0.92±0.07**
AGS	2.42±0.15**	0.45±0.05**	2.43±0.22**	0.80±0.08**
HS-746T	2.04±0.20**	0.41±0.03**	2.14±0.20**	0.73±0.06**
<i>F</i>	184.800	307.515	167.922	112.918
<i>P</i>	0.001	0.001	0.001	0.001

** $P<0.01$ vs GES1 cells

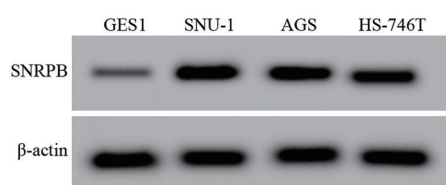


图 2 胃癌细胞中 SNRPB 蛋白的表达

Fig.2 Expression of SNRPB protein in gastric cancer cells

2.4 circFBXO11 靶向 miR-376a-3p、miR-376a-3p 靶向 SNRPB

Starbase 在线分析结果 (图 3) 显示, miR-376a-3p 与 circFBXO11、SNRPB-3'-UTR 区域存在互补结合位点。

双荧光素酶报告基因实验显示, 与 miR-NC 和 WT-circFBXO11 共转染组比较, miR-376a-3p mimics 和 WT-circFBXO11 共转染组 SNU-1 细胞的荧光素酶活性显著降低 (0.42 ± 0.04 vs 1.00 ± 0.09 , $t=17.667$, $P<0.01$); 与 miR-NC 和 MUT-circFBXO11 共转染组比较, miR-376a-3p mimics 和 MUT-circFBXO11 共转染组 SNU-1 细胞的荧光素酶活性无明显变化 ($P>0.05$)。与 miR-NC 和 WT-SNRPB 共转染组比较, miR-376a-3p mimics 和 WT-SNRPB 共转染组 SNU-1 细胞的荧光素酶活性显著降低 (0.37 ± 0.02 vs 1.00 ± 0.10 , $t=18.533$, $P<0.01$); 与 miR-NC 和 MUT-SNRPB 共转染组比较, miR-376a-3p mimics 和 MUT-SNRPB 共转染组 SNU-1 细胞的荧光素酶活性无明显变化 ($P>0.05$)。

2.5 抑制 circFBXO11 表达抑制 SNU-1 细胞增殖、诱导凋亡并影响 miR-376a-3p 和 SNRPB 的表达

qPCR 法、WB 法、CCK-8 法和流式细胞术检测结

果 (表 2, 图 4) 显示, 与 si-NC 组比较, si-circFBXO11 组 SNU-1 细胞中 circFBXO11、cyclin D1 和 SNRPB 的表达水平显著降低 (均 $P<0.01$), C-caspase-3 和 miR-376a-3p 的表达水平显著升高 (均 $P<0.01$); 细胞增殖活力显著降低 ($P<0.01$), 细胞凋亡率显著升高 ($P<0.01$)。

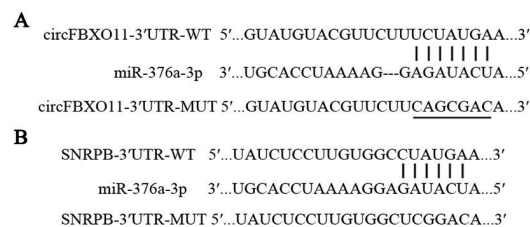


图 3 circFBXO11 靶向 miR-376a-3p (A)、miR-376a-3p 靶向 SNRPB (B)

Fig.3 circFBXO11 targets miR-376a-3p (A) and miR-376a-3p targets SNRPB (B)

2.6 过表达 miR-376a-3p 抑制 SNU-1 细胞的增殖、SNRPB 表达并诱导凋亡

qPCR 法、WB、CCK-8 法和流式细胞术检测结果 (表 3, 图 5) 显示, 与 miR-NC 组比较, miR-376a-3p 组 SNU-1 细胞中 miR-376a-3p、C-caspase-3 的表达水平显著升高 (均 $P<0.01$), cyclin D1 和 SNRPB 的表达水平显著降低 (均 $P<0.01$); 细胞增殖活力显著降低 ($P<0.01$), 细胞凋亡率显著升高 ($P<0.01$)。

2.7 抑制 SNRPB 表达降低 SNU-1 细胞的增殖活力并诱导凋亡

CCK-8 法、流式细胞术和 WB 法检测结果显示, 与 si-NC 组比较, si-SNRPB 组 SNU-1 细胞增殖活力

显著降低(0.471 ± 0.05 vs 0.726 ± 0.07 , $t=8.893$, $P<0.01$); 细胞凋亡率显著升高 [$(18.24 \pm 1.52)\%$ vs $(6.40 \pm 0.61)\%$, $t=21.687$, $P<0.01$; 图 6A]; si-SNRPB 组细胞中 SNRPB、cyclin D1 的表达水平显著降低 (0.30 ± 0.03

vs 0.86 ± 0.07 , 0.46 ± 0.04 vs 0.98 ± 0.08 , $t=22.059$, 17.441 , 均 $P<0.01$), C-caspase-3 表达水平显著升高 (0.72 ± 0.06 vs 0.32 ± 0.02 , $t=18.974$, $P<0.01$; 图 6B)。

表 2 敲减 circFBXO11 后 SNU-1 细胞中 circFBXO11、miR-376a-3p、SNRPB、cyclin D1 和 C-caspase-3 表达及增殖与凋亡的影响
Tab.2 Effects of circFBXO11 knockdown on the expressions of circFBXO11, miR-376a-3p, SNRPB, cyclin D1 and C-caspase-3, as well as proliferation and apoptosis of SNU-1 cells

Group	circFBXO11	miR-376a-3p	SNRPB	Cyclin D1	C-caspase-3	Proliferation	Apoptosis (%)
si-NC	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.13	0.90 ± 0.08	0.95 ± 0.11	0.36 ± 0.03	0.725 ± 0.11	6.48 ± 0.61
si-circFBXO11	0.42 ± 0.03	3.04 ± 0.27	0.32 ± 0.03	0.42 ± 0.03	0.78 ± 0.08	0.411 ± 0.06	22.17 ± 2.04
<i>t</i>	18.341	20.423	20.365	13.945	14.747	7.518	22.106
<i>P</i>	0.001	0.001	0.001	0.000	0.001	0.001	0.001

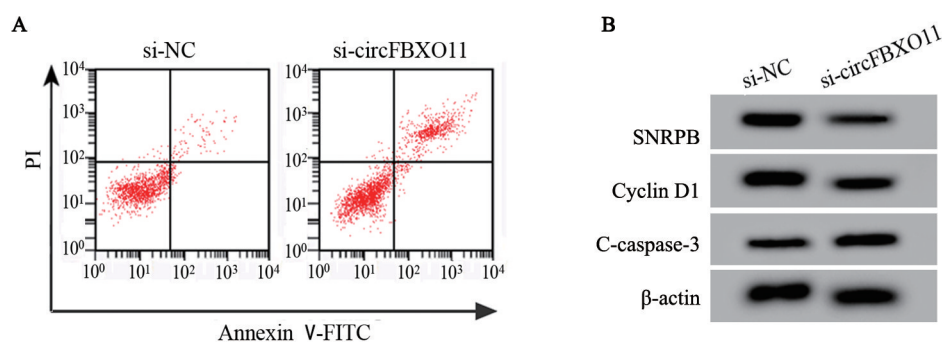


图 4 抑制 circFBXO11 表达对 SNU-1 细胞凋亡(A)和 SNRPB、C-caspase-3、cyclin D1 表达(B)的影响

Fig.4 Effects of circFBXO11 knockdown on apoptosis (A) and expressions of SNRPB, C-caspase-3 and cyclin D1 (B) in SYN-1 cells

表 3 过表达 miR-376a-3p 对 SNU-1 细胞 miR-376a-3p、SNRPB、cyclin D1、C-caspase-3 表达和增殖与凋亡的影响
Tab.3 Effects of miR-376a-3p over-expression on the expressions of miR-376a-3p, SNRPB, cyclin D1 and C-caspase-3, as well as proliferation and apoptosis of SNU-1 cells

Group	miR-376a-3p	SNRPB	Cyclin D1	C-caspase-3	Proliferation	Apoptosis (%)
miR-NC	1.00 ± 0.11	0.88 ± 0.07	0.97 ± 0.10	0.34 ± 0.03	0.731 ± 0.08	6.54 ± 0.53
miR-376a-3p	3.28 ± 0.21	0.40 ± 0.04	0.46 ± 0.05	0.83 ± 0.07	0.438 ± 0.04	27.08 ± 2.43
<i>t</i>	28.853	17.861	13.685	19.302	9.828	24.776
<i>P</i>	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

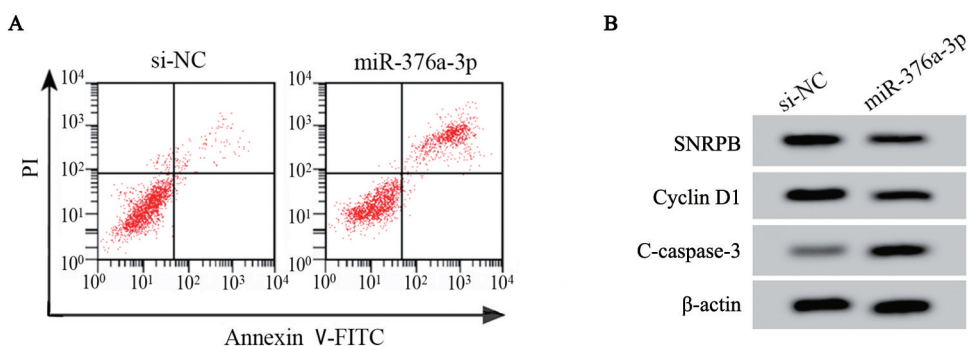


图 5 过表达 miR-376a-3p 对 SNU-1 细胞凋亡(A)及 SNRPB、C-caspase-3 和 cyclin D1(B)表达的影响

Fig.5 Effects of miR-376a-3p over-expression on apoptosis (A) and expressions of SNRPB, C-caspase-3 and cyclin D1 (B) in SNU-1 cells

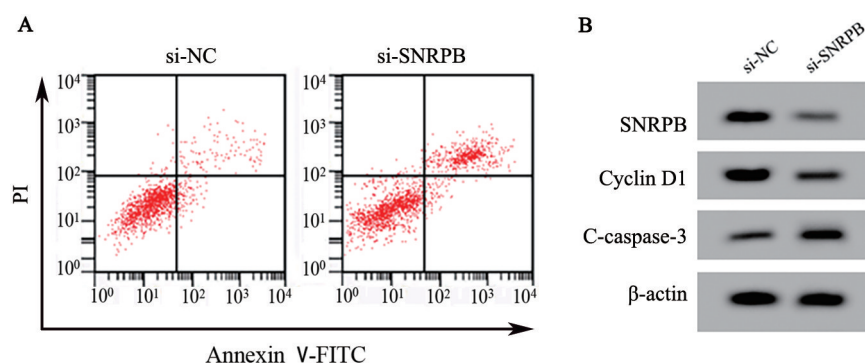


图6 敲减SNRPB表达对SNU-1细胞凋亡(A)和SNRPB、cyclin D1和C-caspase-3蛋白表达(B)的影响

Fig.6 Effects of SNRPB knockdown on apoptosis (A) and expressions of SNRPB, cyclin D1 and C-caspase-3 (B) in SNU-1 cells

2.8 抑制miR-376a-3p表达可以逆转抑制circFBXO11表达对SNU-1细胞增殖和凋亡的影响

CCK-8法、流式细胞术、qPCR法和WB法检测结果显示,与si-circFBXO11+anti-miR-NC组比较,si-circFBXO11+anti-miR-376a-3p组SNU-1细胞增殖活力显著增强(0.638 ± 0.05 vs 0.417 ± 0.06 , $t=8.489$,

$P<0.01$);细胞凋亡率显著降低[(9.37 ± 0.73)% vs (23.04 ± 2.07)%, $t=18.684$, $P<0.01$;图7A];细胞中miR-376a-3p、C-caspase-3表达水平显著降低(0.45 ± 0.04 vs 1.00 ± 0.12 , 0.45 ± 0.04 vs 0.76 ± 0.06 , $t=13.044$, 12.897 , 均 $P<0.01$), cyclin D1表达水平显著升高(0.84 ± 0.07 vs 0.40 ± 0.03 , $t=17.332$, $P<0.01$;图7B)。

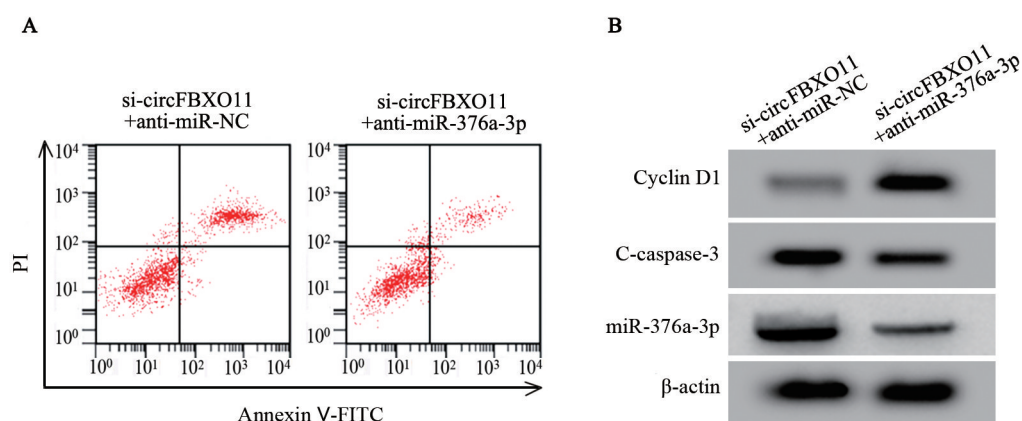


图7 抑制miR-376a-3p表达对SNU-1细胞凋亡(A)及C-caspase-3和cyclin D1(B)表达的影响

Fig.7 Effects of inhibiting miR-376a-3p expression on apoptosis (A) and expressions of C-caspase-3 and cyclin D1 (B) in SNU-1 cells

2.9 过表达SNRPB可以逆转抑制circFBXO11表达对于SNU-1细胞增殖和凋亡的作用

WB法、CCK-8法和流式细胞术检测结果显示,与si-circFBXO11+pcDNA-NC组比较,si-circFBXO11+pcDNA-SNRPB组SNU-1细胞增殖活力显著增强(0.730 ± 0.05 vs 0.409 ± 0.03 , $t=16.515$, $P<0.01$);细胞凋亡率显著降低[(6.34 ± 0.57)% vs (22.88 ± 1.98)%, $t=23.981$, $P<0.01$;图8A];细胞中SNRPB、cyclin D1表达水平显著升高(0.86 ± 0.08 vs 0.34 ± 0.02 , 0.90 ± 0.09 vs 0.38 ± 0.03 , $t=18.918$, 16.444 , 均 $P<0.01$), C-caspase-3表达水平显著降低(0.34 ± 0.02 vs 0.77 ± 0.07 , $t=17.720$, $P<0.05$;图8B)。

3 讨论

circRNA作为非编码RNA家族的重要组成部分

分,近年来引起了人们极大的兴趣。研究显示, circRNA具有共价闭环结构,不易被RNA外切酶降解^[7];其稳定性、进化保守性、组织特异性使其在调控基因转录中具有多种潜在功能,是胃癌诊断的潜在生物标志物。例如,胃癌中circ_0066444高表达与淋巴结转移呈正相关^[8];Hsa_circ_0023642可通过调节胃癌细胞的EMT来增强癌细胞的侵袭和转移^[9]。circRNA丝氨酸蛋白酶抑制剂亚家族E2 (serine protease inhibitor subfamily E2, SERPINE2)在胃癌中表达上调,其通过抑制miR-375增加酪氨酸3/色氨酸5-单加氧酶激活蛋白基因表达促进肿瘤细胞增殖、细胞周期进展,抑制细胞凋亡,敲减circSERPINE2可抑制体内实体瘤的生长^[10]。本研究探讨circFBXO11在胃癌中的功能发现,胃癌组织和细胞中circFBXO11

表达显著增加,抑制 circFBXO11 表达后胃癌 SNU-1 细胞增殖活力、cyclin D1 表达水平显著降低,细胞凋亡率升高及凋亡执行蛋白 C-caspase-3 表达水平显著

升高,提示抑制 circFBXO11 表达可抑制胃癌细胞增殖并诱导细胞凋亡。

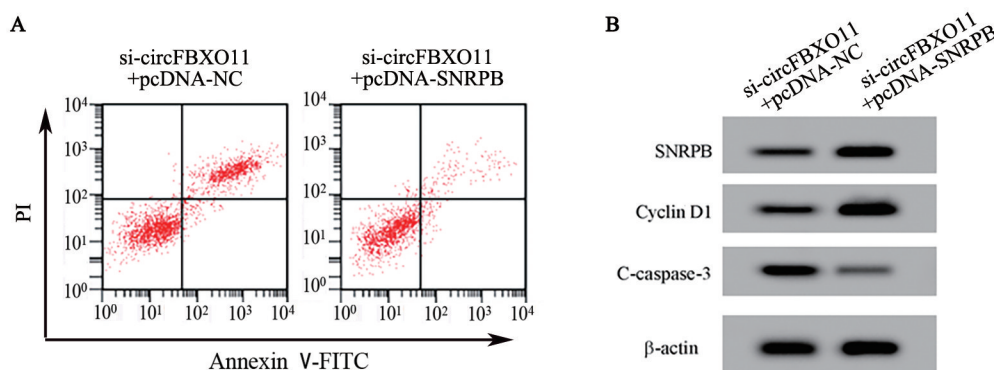


图8 过表达 SNRPB 对 SNU-1 细胞凋亡(A)及 SNRPB、C-caspase-3 和 cyclin D1(B)表达的影响

Fig.8 Effects of SNRPB over-expression on apoptosis (A) and expressions of SNRPB, C-caspase-3 and cyclin D1 (B) in SNU-1 cells

研究^[11-12]显示, circRNA 通过海绵化 miRNA 间接调控靶 mRNA 表达是其参与肿瘤进展的重要机制。例如, circRNA_104433 直接与 miR-497-5p 结合上调细胞分裂周期因子 25A 的表达, 促进胃癌细胞增殖^[13]。circFBXO11 通过 miR-605/FOXO3/ABCB1 轴调控肝癌进展和奥沙利铂耐药^[4]。本研究中 miR-376a-3p 被证实为 circFBXO11 的靶基因, 且 circFBXO11 对 miR-376a-3p 存在负调控作用。miR-376a-3p 在人类冠状动脉疾病、肿瘤中发挥作用^[14-15]。miR-376a-3p 在骨肉瘤中低表达, 过表达 miR-376a-3p 可显著降低骨肉瘤细胞的增殖及集落形成能力^[16]。miR-376a-3p 在骨巨细胞瘤中亦表达下调, 过表达 miR-376a-3p 可降低异种移植肿瘤发生率及肿瘤体积^[17]。与上述研究结果类似, 本研究发现胃癌细胞中 miR-376a-3p 低表达, 过表达 miR-376a-3p 可抑制 SNU-1 细胞的增殖活力和 cyclin D1 表达, 促进 C-caspase-3 表达和细胞凋亡。SHEN 等^[18]研究证实, miR-376a-3p 可逆转 lncRNA titin 反义 RNA 1 (TTN-AS1) 诱导的子宫内膜癌细胞的迁移和侵袭, 进一步证实 miR-376a-3p 的抑癌作用。过表达 miR-376a-3p 与抑制 circFBXO11 的抗肿瘤作用一致, 且抑制 miR-376a-3p 表达能够部分逆转抑制 circFBXO11 对 SNU-1 细胞增殖活力和凋亡的影响, 提示 circFBXO11 可能通过调控 miR-376a-3p 在胃癌中发挥作用。

SNRPB 基因是剪接体内小核核糖核蛋白的核心组分, 其在前体 mRNA 剪接中起着重要作用。有研究^[19-20]显示, SNRPB 异常表达与肿瘤发生密切联系。本研究发现, 胃癌细胞中 SNRPB 表达以及胃癌组织中 SNRPB 蛋白阳性率增加, 抑制 SNRPB 表达可降低 SNU-1 细胞增殖并促进细胞凋亡, 表明 SNRPB 在胃

癌中也具有致癌作用。与本研究结论类似, 宫颈癌、胶质细胞瘤中 SNRPB 表达增加, 抑制 SNRPB 表达可显著降低宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 诱导胶质细胞瘤细胞凋亡^[6,21]。本研究证实, SNRPB 为 miR-376a-3p 的靶基因, miR-376a-3p 对 SNRPB 具有负性调控作用, circFBXO11 对 SNRPB 具有正性调控作用。过表达 SNRPB 还可逆转抑制 circFBXO11 表达对 SNU-1 细胞增殖和凋亡的影响。研究结果提示, 干扰 circFBXO11 表达对胃癌细胞的增殖抑制和凋亡促进作用可能是通过 miR-376a-3p/SNRPB 途径实现的。

综上所述, circFBXO11 在胃癌组织和细胞中高表达, 干扰 circFBXO11 表达可抑制胃癌细胞的增殖并诱导细胞凋亡, 其机制可能与调控 miR-376a-3p/SNRPB 通路有关。因此, circFBXO11/miR-376a-3p/SNRPB 分子轴有望成为胃癌临床治疗的新靶点。

[参考文献]

- [1] 常敏, 张久聪, 周琴, 等. 胃癌流行病学研究进展[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2017, 26(9): 966-969. DOI:10.3969/j.issn.1006-5709.2017.09.002.
- [2] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.
- [3] MENG S J, ZHOU H C, FENG Z Y, et al. CircRNA: functions and properties of a novel potential biomarker for cancer[J/OL]. Mol Cancer, 2017, 16(1): 94[2020-10-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5440908/>. DOI:10.1186/s12943-017-0663-2.
- [4] LI J, QIN X P, WU R S, et al. Circular RNA circFBXO11 modulates hepatocellular carcinoma progress and oxaliplatin resistance through miR-605/FOXO3/ABCB1 axis[J/OL]. J Cell Mol Med, 2020, 24(9): 5152-5161[2020-10-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7440908/>.

- gov/pmc/articles/PMC7205830/. DOI:10.1111/jcmm.15162.
- [5] WANG Y H, JIANG F, XIONG Y, et al. LncRNA TTN-AS1 sponges miR-376a-3p to promote colorectal cancer progression via upregulating KLF15[J]. *Life Sci*, 2020, 244: 116936. DOI:10.1016/j.lfs.2019.116936.
- [6] ZHU L, ZHANG X Z, SUN Z Q. SNRPB promotes cervical cancer progression through repressing p53 expression[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 125: 109948. DOI:10.1016/j.biopha.2020.109948.
- [7] HAN B, CHAO J, YAO H H. Circular RNA and its mechanisms in disease: From the bench to the clinic[J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 187: 31-44. DOI:10.1016/j.pharmthera.2018.01.010.
- [8] RONG D W, DONG C X, FU K, et al. Upregulation of circ_0066444 promotes the proliferation, invasion, and migration of gastric cancer cells[J/OL]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 2753-2761[2020-10-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5955026/>. DOI: 10.2147/OTT.S156516.
- [9] ZHOU L H, YANG Y C, ZHANG R Y, et al. CircRNA_0023642 promotes migration and invasion of gastric cancer cells by regulating EMT[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(8): 2297-2303. DOI:10.26355/eurrev_201804_14818.
- [10] LIU J N, SONG S Z, LIN S, et al. CircSERPINE2 promotes the development of gastric carcinoma by sponging miR-375 and modulating YWHAZ[J/OL]. *Cell Prolif*, 2019, 52(4): e12648[2020-10-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6668981/>. DOI:10.1111/cpr.12648.
- [11] YANG G D, ZHANG Y J, YANG J Y. Identification of potentially functional circRNA-miRNA-mRNA regulatory network in gastric carcinoma using bioinformatics analysis[J/OL]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 8777-8796[2020-10-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6880644/>. DOI:10.12659/MSM.916902.
- [12] 董江萌, 王勇, 齐义新, 等. circRNA_001569 通过 miR-145/HBXIP 轴影响乳腺癌细胞的恶性生物学行为[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2020, 27(11): 28-36. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.11.004.
- [13] WEI W Y, MO X W, YAN L H, et al. Circular RNA profiling reveals that circRNA_104433 regulates cell growth by targeting miR-497-5p in gastric cancer[J/OL]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 15-30[2020-10-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6954096/>. DOI:10.2147/CMAR.S219307.
- [14] DU L, XU Z M, WANG X H, et al. Integrated bioinformatics analysis identifies microRNA-376a-3p as a new microRNA biomarker in patient with coronary artery disease[J/OL]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(2): 633-648[2020-10-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7061823/>.
- [15] 李元滨, 林丽珠, 关洁珊, 等. 中西医联合治疗对晚期 NSCLC miRNA 表达谱的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36(9): 1076-1081. DOI:10.7661/CJIM.2016.09.1076.
- [16] FELLEBERG J, LEHNER B, SAEHR H, et al. Tumor suppressor function of miR-127-3p and miR-376a-3p in osteosarcoma cells[J/OL]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(12): E2019[2020-10-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6966509/>. DOI: 10.3390/cancers11122019.
- [17] HERR I, SÄHR H, ZHAO Z F, et al. MiR-127 and miR-376a act as tumor suppressors by in vivo targeting of COA1 and PDIA6 in giant cell tumor of bone[J]. *Cancer Lett*, 2017, 409: 49-55. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.08.029.
- [18] SHEN L D, WU Y Y, LI A L, et al. LncRNA TTN-AS1 promotes endometrial cancer by sponging miR-376a-3p[J/OL]. *Oncol Rep*, 2020, 44(4): 1343-1354[2020-10-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7448418/>. DOI:10.3892/or.2020.7691.
- [19] TAY Y L. Mutations within the spliceosomal gene SNRPB affect its auto-regulation and are causative for classic cerebro-costomandibular syndrome[J]. *Clin Genet*, 2015, 87(1): 32-33. DOI: 10.1111/cge.12495.
- [20] LIU N L, WU Z Y, CHEN A X, et al. SNRPB promotes the tumorigenic potential of NSCLC in part by regulating RAB26[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(9): 667[2020-10-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6739327/>. DOI:10.1038/s41419-019-1929-y.
- [21] CORREA B R, DE ARAUJO P R, QIAO M, et al. Functional genomics analyses of RNA-binding proteins reveal the splicing regulator SNRPB as an oncogenic candidate in glioblastoma[J/OL]. *Genome Biol*, 2016, 17(1): 125[2020-10-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4901439/>. DOI:10.1186/s13059-016-0990-4.

[收稿日期] 2020-10-16

[修回日期] 2021-03-02

[本文编辑] 党瑞山