

· 临床研究 ·

长链非编码 RNA SNHG14 可能通过促进胃癌细胞增殖和转移影响胃癌的进展

渠辉恒,王 宁,陈义钢,陈 烨,夏加增*

南京医科大学附属无锡第二医院普外科,江苏 无锡 214000

[摘要] 目的:研究长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA) SNHG14 在胃癌(gastric cancer, GC)进展中的作用。方法:应用 RT-qPCR 检测 SNHG14 在 68 对胃癌组织和癌旁组织、3 个胃癌细胞系(MGC-803、BGC-823、SGC-7901)和人类正常胃上皮细胞株 GES-1 中的表达量。分析胃癌组织及胃癌细胞株内的 SNHG14 表达水平与临床病理特征的相关性。使用 siRNA 沉默 SNHG14 后观察胃癌细胞株的功能。CCK-8 增殖实验评估 SNHG14 对胃癌细胞增殖的影响,Transwell 实验检测胃癌细胞迁移和侵袭能力。结果:胃癌细胞株和胃癌组织中 SNHG14 的表达量与正常对照相比显著上调。相关分析显示 SNHG14 的表达量与胃癌组织的 TNM 分期($P < 0.05$)、分化程度($P < 0.001$)、肿瘤大小($P < 0.01$)及浸润深度($P < 0.05$)等有显著相关性。通过 siRNA 沉默 SNHG14 的表达后,能够显著抑制胃癌细胞的增殖($P < 0.01$)、迁移($P < 0.01$)和侵袭($P < 0.05$)能力。结论:SNHG14 可能起到促癌作用,通过促进胃癌细胞的增殖和转移来影响胃癌的进展。SNHG14 在治疗和诊断胃癌中具有潜在价值,有可能成为诊断胃癌的新型生物标志物或胃癌生物治疗的候选靶点。

[关键词] 胃癌;长链非编码 RNA;SNHG14;细胞增殖;侵袭;迁移

[中图分类号] R735.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)01-050-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20200110

The role of long non-coding RNA SNHG14 in proliferation, invasion and migration of gastric cancer

QU Huiheng, WANG Ning, CHEN Yigang, CHEN Ye, XIA Jiazeng*

Department of General Surgery, Wuxi No.2 Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi 214000, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of long non-coding RNA (lncRNA) SNHG14 in the progression of gastric cancer (GC). **Methods:** RT-qPCR was used to detect the expression level of SNHG14 in 68 pairs of gastric cancer tissues and adjacent normal tissues, 3 gastric cancer cell lines (MGC-803, BGC-823, SGC-7901) and human normal gastric epithelial cell line GES-1. The correlation between the expression level of SNHG14 and the clinicopathological features in gastric cancer tissues and gastric cancer cell lines was analyzed. The function of gastric cancer cell lines was observed after SNHG14 silencing by siRNA. The effect of SNHG14 on the proliferation of gastric cancer cells was evaluated by means of CCK-8 proliferation assay. Transwell assay was used to detect the migration and invasion of gastric cancer cells. **Results:** The expression level of SNHG14 was significantly up-regulated in the gastric cancer cell lines and gastric cancer tissues compared with normal controls. Result of correlation analysis showed that the expression level of SNHG14 was significantly correlated with the TNM stage ($P < 0.05$), degree of differentiation ($P < 0.001$), tumor size ($P < 0.01$) and depth of invasion ($P < 0.05$) of gastric cancer tissues. The SNHG14 silencing by siRNA significantly inhibited the proliferation ($P < 0.01$), migration ($P < 0.01$) and invasion ($P < 0.05$) of gastric cancer cells. **Conclusion:** SNHG14 may play a role in promoting cancer and affect the progression of gastric cancer by promoting the proliferation and metastasis of gastric cancer cells. SNHG14 bears potential value in the treatment and diagnosis of gastric cancer, and may become a novel biomarker for the diagnosis of gastric cancer or a candidate target in the biotherapy of gastric cancer.

[Key words] gastric cancer; long noncoding RNA; SNHG14; cell proliferation; invasion; migration

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(01):050-055]

[基金项目] 无锡市医学杰出人才培养对象(JCRCPY001)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jiazengxia@yahoo.com

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,现已被确定为全球癌症死亡的第二大原因。尽管在过去几十年中,胃癌的发病率和病死率逐步下降,但是进展期胃癌患者的预后仍然很差^[1-2]。研究已经证实,许多肿瘤相关基因的失调与胃癌发生有关。因此,为了提高胃癌患者的生活质量和生存质量,确定可靠的生物标志物以及新的治疗靶点具有重要意义。

长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNAs)是长度大于200个核苷酸的ncRNAs的亚类,已被证明参与许多生物过程的调控,包括胃癌的发生及发展^[3-6]。SNHG14作为lncRNA已经被报道在透明细胞肾癌中高表达,而且SNHG14被敲除后,通过调节细胞周期和凋亡相关蛋白以及上皮间质转化过程,抑制透明细胞肾癌细胞的增殖、迁移以及侵袭^[7]。而且乳腺癌中lncRNA可以通过H3K27乙酰化调控PABPC1的表达,从而诱导乳腺癌曲妥昔单抗耐药^[8]。胶质瘤中SNHG14可以通过miRNA-92a-3p抑制细胞的增殖与迁移侵袭,促进胶质瘤细胞的凋亡^[9]。我们发现SNHG14在胃癌中的表达量升高,而且相关性分析表明,SNHG14表达量和胃癌患者的临床病理特征具有相关性,所以SNHG14很可能作为一种新的生物标志物用于胃癌的诊断,并成为可供胃癌治疗的生物靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 临床标本的采集和分组

从南京医科大学附属无锡第二医院2014年1月—2016年12月胃癌切除术中收集肿瘤标本及癌旁组织(超过癌组织5 cm以上)68对。本实验中收集的患者标本,术前均未接受放化疗治疗。组织样本经切除后立即放入液氮中,保存于-80℃冰箱中。根据美国癌症联合委员会第7版癌症分期手册确定胃癌患者的临床分期。本实验的标本采集均通过了患者本人同意及南京医科大学附属无锡第二医院伦理委员会批准。

1.1.2 细胞培养和分组

人类胃癌细胞SGC-7901、BGC-823和MGC-803为本实验冻存,该原始细胞株购自中国医学科学院北京协和细胞资源中心。人类正常胃黏膜上皮细胞GES-1来源于无锡市第二人民医院转化中心实验室。细胞培养在含有10%胎牛血清的DMEM培养基中,置于37℃,5%的CO₂体积分数的恒温培养箱中培养。胎牛血清、DMEM培养基以及0.25%胰酶均

购自美国Gibco Thermo Fisher Scientific公司。

1.1.3 主要试剂

RNA提取试剂TRIzol及转染试剂Lipofectamine 2000均购自美国Invitrogen公司。逆转录试剂盒PrimeScript™ RT Master Mix购自大连宝生物技术有限公司,PCR试剂盒QuantiFast SYBR Green PCR Kit购自德国QIAGEN公司。CCK-8试剂盒购自日本同仁公司。Transwell小室购自美国Corning公司。Matrigel基质胶购自美国BD公司。RIPA蛋白裂解液及BCA法蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。ECL发光液购自上海爱必信生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 RNA提取及实时荧光定量PCR

按照TRIzol说明书提取组织及细胞中的总RNA,超微量分光光度计测定RNA的质量和浓度, $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$ 在1.9~2.1之间为合格样品。委托上海赛默飞世尔科技有限公司设计合成lncRNA SNHG14及GAPDH引物,lncRNA SNHG14引物上游5'-GCAACCAGAGCGTGAAGAA-3',下游5'-ACCCGAGCAATGCCAGTA-3'。GAPDH引物上游5'-CATGAGAAGTATGACAACAGCCT-3',下游5'-AGTCCTTCCACGATACCAAGT-3'。以500 ng总RNA为模板,逆转录得到cDNA,然后加入引物进行PCR,以GAPDH为内参基因,计算 ΔC_T 值分析目的基因的相对表达量。

1.2.2 细胞转染及分组

特异性靶向SNHG14的小干扰序列(命名为si-SNHG14)及阴性对照序列(命名为si-NC)均委托上海吉玛生物科技有限公司设计合成。具体序列为si-SNHG14上游5'-GCUGAUUUUAAGGCACUATT-3',下游5'-UAGUGCCUUAAAUAUCAGCTT-3'; si-NC上游5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3',下游5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。依据Lipofectamine 2000说明书,转染前1 d,将适当数量的胃癌细胞接种于6孔板中,培养至次日使细胞融合度为75%~85%。转染前用250 μ L无血清DMEM培养液分别稀释Lipofectamine 2000和si-SNHG14或si-NC,室温静置5 min将两者混合,然后于室温孵育20 min加入6孔板中,培养5 h后更换新的含10%胎牛血清的细胞培养基,继续培养24 h收集细胞并提取总RNA,进行实时荧光定量PCR检测干扰效率。

1.2.3 CCK-8实验

人类胃癌细胞SGC-7901、BGC-823和MGC-803

在转染48 h后用0.25%胰蛋白酶消化离心,然后用含10%胎牛血清的培养基重悬细胞,细胞计数后接种至96孔板中,每孔细胞数约为 5×10^3 个。在37℃、5%CO₂恒温培养箱中培养12、24、48、72 h,在每个时间点各组选取4个复孔,加入10 μL/孔的CCK-8试剂,继续培养2 h后用酶标仪检测各孔在450 nm处的吸光度,以各组吸光度的平均值反映细胞增殖活性。

1.2.4 Transwell 侵袭和迁移实验

选用嵌套在24孔板上的8 μm孔径的Transwell小室进行实验,具体步骤按照说明书操作。取转染24 h后的胃癌细胞用0.25%胰蛋白酶消化后离心,然后用无血清DMEM培养液重悬细胞。做迁移实验时将200 μL细胞悬液均匀加入Transwell小室上层,下层小室中则加600 μL含10%胎牛血清的培养液,放入恒温培养箱中培养12 h。做侵袭实验时先在上层小室中均匀包被Matrigel基质胶,然后同样在上层小室加入200 μL细胞悬液,下层小室中加600 μL含10%胎牛血清的培养液,放入恒温培养箱中培养24 h。培养结束后取出Transwell小室,用PBS清洗2次,再用甲醇室温下固定20 min,然后用0.1%结晶紫染色20 min,染色后取出再用PBS清洗2次,用棉签轻轻拭去上室面残余细胞,并在显微镜下计数下室面细胞并拍照。

1.3 统计学方法

所有数据均采用SPSS19.0统计软件进行分析。定量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用两独立样本 t 检验,胃癌组织中SNHG14的表达水平与临床病理因素的相关性应用Pearson's卡方检验和连续性校正卡方检验进行统计分析,重复试验采用重复测量方差分析(repeat measures ANOVA)。以 $P \leq 0.05$ 表示差异具有统计学意义。所有数据绘图均采用GraphPad Prism 6.0软件完成。

2 结果

2.1 SNHG14在胃癌组织以及胃癌细胞系中高表达

对68对胃癌组织及癌旁组织,采用qRT-PCR的方法检测SNHG14的相对表达量。实验结果如图1所示,SNHG14在胃癌组织中的相对表达量(4.071 ± 0.198)明显高于癌旁组织(2.591 ± 0.214) ($P < 0.01$)。如图2所示在胃癌细胞系MGC-803、BGC-823、SGC-7901中SNHG14相对表达量明显高于正常胃黏膜上皮细胞GES-1,提示SNHG14可能与胃癌组织的发生发展有关。

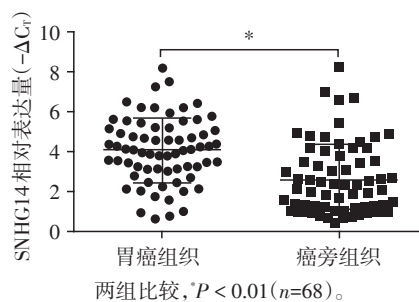


图1 通过qRT-PCR验证SNHG14在胃癌组织与配对癌旁组织中的表达

Figure 1 qRT-PCR validation of SNHG14 expression in GC and adjacent normal tissues

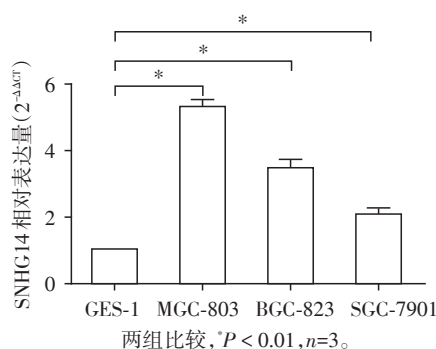


图2 通过qRT-PCR验证SNHG14在胃癌细胞系与GES-1中的表达

Figure 2 qRT-PCR validation of SNHG14 expression in GC cell line and GES-1

2.2 胃癌组织中SNHG14的表达水平与胃癌患者的病理特征存在相关性

通过RT-qPCR检测68对临床胃癌患者的标本,发现SNHG14的表达水平与患者的临床病理特征存在相关性(表1)。统计结果显示,SNHG14的高表达与胃癌患者的肿瘤大小($P=0.004$)、浸润深度($P=0.013$)、TNM分期($P=0.023$)以及分化程度($P=0.001$)有关。与性别、年龄无显著相关($P > 0.05$),提示SNHG14可能参与胃癌的发生及进展过程。

2.3 胃癌细胞转染siRNA后抑制SNHG14的表达

在胃癌细胞转染24 h后提取细胞总RNA进行qRT-PCR,结果显示,与转染si-NC的细胞相比,转染si-SNHG14的细胞中SNHG14的表达明显降低,其中SGC-7901细胞表达水平下降约68%,BGC-823细胞表达水平下降约63%,MGC-803细胞表达水平下降约66%,差异具有统计学意义($P < 0.01$,图3)。说明靶向SNHG14的特异性siRNA能有效干扰其表达。

2.4 下调SNHG14表达后抑制胃癌细胞的增殖

对转染siRNA的胃癌细胞进行CCK-8实验,以检测SNHG14表达下调后对细胞增殖活性的影响。

表1 SNHG14表达水平与68例胃癌患者临床病理特征

Table 1 Clinicopathological characteristics of 68 GC patients according to SNHG14 expression

临床特征	例数	SNHG14表达量[n(%)]		P值
		高表达	低表达	
性别				0.511
男	50	34(68.00)	16(32.00)	
女	18	13(72.22)	5(27.78)	
年龄(岁)				0.651
≤65	38	27(71.05)	11(28.95)	
>65	30	20(66.67)	10(33.33)	
肿瘤大小(cm)				0.004
≤5	32	22(68.75)	10(31.25)	
>5	36	25(69.44)	11(30.56)	
分化程度				0.001
中低分化	42	29(69.05)	13(30.95)	
高分化	26	18(69.23)	8(30.77)	
浸润深度				0.013
T1~T3	22	15(68.18)	7(31.82)	
T4	46	32(69.57)	14(30.43)	
TNM分期				0.023
I~II	25	17(68.00)	8(32.00)	
III~IV	43	30(69.77)	13(30.23)	
远处转移				0.069 ^a
M ₀	64	44(68.75)	20(31.25)	
M ₁	4	3(75.00)	1(25.00)	

a: Fisher确切概率法。

检测结果如图4所示,转染 si-SNHG14 的细胞增殖数量较转染 si-NC 的细胞明显降低,其中 SGC-7901 细胞在转染 48 h 和 72 h 后增殖数量分别下降约 21.01%和 26.84%,MGC-803 细胞在转染 48 h 和 72 h 后增殖数量分别下降约 13.07%和 25.70%,BGC-823 细胞在转染 48 h 和 72 h 后增殖数量分别下降约 11.51%和 22.11%,重复测量方差分析显示差异有统计学意义($P < 0.01$),表明 SNHG14 表达下调后可抑

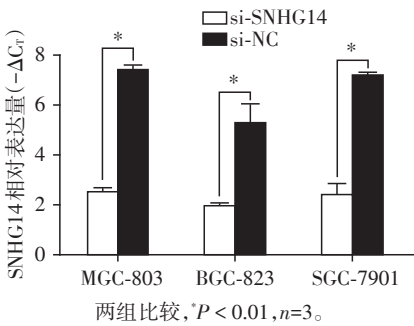
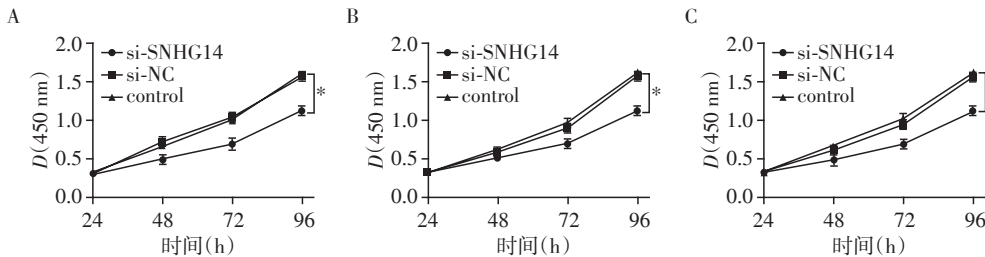


图3 siRNA 下调 SNHG14 在胃癌细胞系内的表达
Figure 3 siRNA down-regulating the expression of SNHG14 in gastric cancer cell lines

制胃癌细胞的增殖活性。
2.5 下调 SNHG14 表达后抑制胃癌细胞的侵袭和迁移能力
采用 Transwell 小室实验验证 SNHG14 表达下调后对胃癌细胞侵袭和迁移能力的影响。实验结果如图 5 所示,与转染 si-NC 相比,转染 si-SNHG14 后进入 Transwell 下室面的细胞数量明显减少,其中 SGC-7901 细胞转染后侵袭数和迁移细胞数分别减少约 50.01%和 48.95%,BGC-823 细胞转染后侵袭数和迁移细胞数分别减少约 55.22%和 49.93%,差异有统计学意义($P < 0.01$),提示 SNHG14 表达下调后,细胞的侵袭和迁移能力受到抑制。

3 讨 论

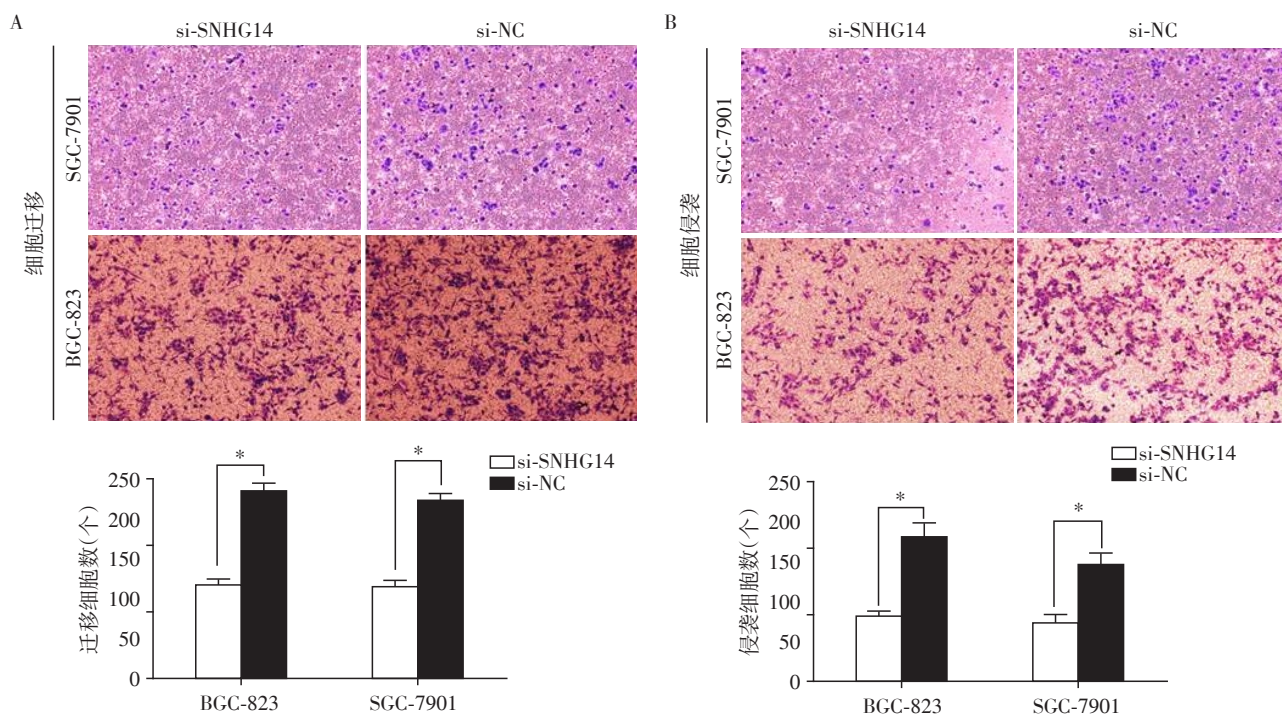
胃癌构成了全世界重大的公共卫生问题和社会负担,2012 年报告了约 951 600 个新发病例和约 723 100 个死亡案例^[1-2]。因此,寻找可靠的早期诊断及替代治疗的新型生物标志物至关重要。本研究证实 SNHG14 在胃癌组织及胃癌细胞株中的表达量高于正常胃组织及 GES-1,而且在胃癌组织中 SNHG14 表达量与胃癌患者的分化程度、TNM 分期、肿瘤大小及淋巴结转移存在正相关。此外,随着 SNHG14 的表达量下降,胃癌细胞的增殖、迁移以及侵



通过酶标仪进行 CCK-8 测定,在用 si-SNHG14 和 si-NC 分别转染 BGC-823(A)、MGC-803(B)和 SGC-7901(C)细胞后,si-SNHG14 组的吸光值较 si-NC 组的吸光值降低,说明敲除 SNHG14 后可以抑制胃癌细胞增殖的作用。两组比较, $^*P < 0.05, n=3$ 。

图4 细胞增殖实验

Figure 4 Cell proliferation activity test



A: 在Transwell 小室迁移实验中, si-SNHG14 组的穿膜细胞数明显低于 si-NC 组($\times 100$); B: 在Transwell 小室侵袭实验中, si-SNHG14 组的侵袭细胞数明显低于 si-NC 组($\times 100$); 两组比较, $P < 0.01$ ($n=3$)。

图5 细胞迁移和侵袭实验

Figure 5 Cell migration and invasion experiments

侵袭能力都随之下降。提示SNHG14可能在胃癌中作为一个促癌基因,与胃癌的发生发展有关。

许多研究表明, lncRNA 在癌症的生物学进展中具有重要作用, 包括细胞周期, 染色质重塑, 以及基因的转录和转录后调控^[10-11]。另外, 在各种癌症中已经报道了许多 lncRNA 的异常表达。促癌基因 MALAT-1 与小细胞肺癌的迁移及预后不良有关^[12]。MALAT-1 在膀胱癌组织中表达量升高, 并且通过激活丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶信号通路, 促进膀胱癌细胞的增殖和迁移^[13]。MALAT-1 在肝癌中高度上调, 在由乙型肝炎病毒 X 蛋白介导的肝细胞癌中上调, 并已被证明通过抑制 p18 增强癌细胞增殖^[14]。还有许多 lncRNA, 包括 H19、胃癌高表达转录物 1、ZXF1、lncRNA-BX357664、lncRNA-TCONS-00020455 及 lncRNA-TCONS-00020457 等, 也被发现在各类癌症中表达失调^[15-19]。本研究结果也表明, SNHG14 具有作为早期胃癌诊断生物标志物的潜力, 也可能成为胃癌患者新型治疗策略的潜在方向。然而, 需要更大样本量来进一步验证并阐明 SNHG14 在胃癌中的分子机制和确切的生物学功能。

[参考文献]

[1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer

statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108

[2] JEMAL A, BRAY F, CENTER M M, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90

[3] AMARAL P P, MATTICK J S. Noncoding RNA in development[J]. Mamm Genome, 2008, 19: 454-492

[4] NAGANO T, FRASER P. No-nonsense functions for long noncoding RNAs[J]. Cell, 2011, 145(2): 178-181

[5] 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

[6] WILUSZ J E, SUNWOO H, SPECTOR D L. Long noncoding RNAs: Functional surprises from the RNA world[J]. Genes Dev, 2009, 23(13): 1494-1504

[7] LIU G, YE Z, ZHAO X, et al. SP1-induced up-regulation of lncRNA SNHG14 as a ceRNA promotes migration and invasion of clear cell renal cell carcinoma by regulating N-WASP[J]. Am J Cancer Res. 2017, 7(12): 2515-2525

[8] DONG H, WANG W, MO S, et al. Long non-coding rna snhg14 induces trastuzumab resistance of breast cancer via regulating pabpc1 expression through h3k27 acetylation[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(10): 4935-4947

[9] WANG Q, TENG Y, WANG R, et al. The long non-coding RNA SNHG14 inhibits cell proliferation and invasion and promotes apoptosis by sponging mir-92a-3p in glioma[J].

Oncotarget,2018,9:12112-12124

[10] MORAN V A, PERERA R J, KHALIL A M. Emerging functional and mechanistic paradigms of mammalian long non-coding RNAs[J]. Nucleic Acids Res,2012,40(14): 6391-6400

[11] CLARK M B, MATTICK J S. Long noncoding RNAs in cell biology[J]. Semin Cell Dev Biol,2011,22(4):366-376

[12] JI P, DIEDERICH S, WANG W, et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer [J]. Oncogene,2003,22(39):8031-8041

[13] WU X S, WANG X A, WU W G, et al. MALAT1 promotes the proliferation and metastasis of gallbladder cancer cells by activating the ERK/MAPK pathway [J]. Cancer Biol Ther,2014,15(6):806-814

[14] DU Y, KONG G, YOU X, et al. Elevation of highly up-regulated in liver cancer(HULC)by hepatitis B virus X protein promotes hepatoma cell proliferation via down-regulating p18 [J]. J Biol Chem, 2012, 287 (31) : 26302-26311

[15] MATOUK I J, DEGROOT N, MEZAN S, et al. The H19 non-coding RNA is essential for human tumor growth [J]. PLoS One,2007,2(9):e845

[16] YANG F, XUE X, ZHENG L, et al. Long non-coding RNA GHET1 promotes gastric carcinoma cell proliferation by increasing c-Myc mRNA stability [J]. FEBS J, 2014, 281 (3):802-813

[17] ZHANG L, ZHOU X F, PAN G F, et al. Enhanced expression of long non-coding RNA ZXF1 promoted the invasion and metastasis in lung adenocarcinoma [J]. Biomed Pharmacother,2014,68(4):401-407

[18] 刘伊扬, 钱 健, 王增军, 等. 长链非编码 RNA BX357664 对肾透明细胞癌细胞上皮间质转化过程的影响[J].南京医科大学学报(自然科学版),2018,38(1):25-30

[19] 刘 玲, 钱潇潇, 鲁一兵, 等. LncRNA TCONS-00020455 及 TCONS-00020457 在甲状腺乳头癌中的表达及意义 [J].南京医科大学学报(自然科学版),2019,39(3): 332-337

[收稿日期] 2018-11-01

(上接第025页)

[19] LETRA A, GHANEH G, ZHAO M, et al. MMP-7 and TIMP-1, new targets in predicting poor wound healing in apical periodontitis [J]. J Endod,2013,39(9):1141-1146

[20] SMITH P C, MARTINEZ C, MARTINEZ J A. Role of fibroblast populations in periodontal wound healing and tissue remodeling [J]. Front Physiol,2019,10:270

[21] PENA O M, PISTOLIC J, RAJ D, et al. Endotoxin tolerance represents a distinctive state of alternative polarization (M2) in human mononuclear cells [J]. J Immunol, 2011,186(12):7243-7254

[22] ZHU X Q, LU W, CHEN Y, et al. Effects of porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide tolerized monocytes on inflammatory responses in neutrophils [J]. PLoS One,2016,11(8):e0161482

[23] LICHTMAN M K, OTERO - VINAS M, FALANGA V. Transforming growth factor beta (TGF - beta) isoforms in wound healing and fibrosis [J]. Wound Repair Regen, 2016,24(2):215-222

[收稿日期] 2019-06-14