

·论 著·

长链非编码 RNA SNHG1 对替莫唑胺诱导脑胶质瘤细胞血管生成能力的研究

毛丹丹 吕尧 揭国庆 戴伟氏 黄强

[摘要] 目的 探讨长链非编码 RNA(lncRNA)SNHG1 对替莫唑胺诱导的脑胶质瘤细胞血管生成能力的影响。方法 将人的脑胶质瘤细胞 U251 分为 si-SNHG1 组(转染 si-SNHG1)、si-SNHG1NC 组(转染 si-SNHG1NC)和空白对照组,三组均经替莫唑胺处理。检测人脑胶质瘤细胞 U251、正常脑胶质细胞中 SNHG1 的表达。CCK8 实验检测细胞的增殖能力,Transwell 检测细胞的迁移侵袭能力,小管形成实验检测人脐静脉内皮细胞小管形成能力,ELISA 检测各组血管内皮生长因子(VEGF)的表达。结果 SNHG1 在正常脑胶质细胞和组织中的表达明显低于脑胶质瘤细胞 U251 和组织(t 分别=2.24、2.46, P 均 <0.05)。si-SNHG1 组在 48 h 和 72 h 时细胞的增殖能力较 si-SNHG1NC 组和空白对照组低(t 分别=17.29、16.86; 8.20、11.60, P 均 <0.05)。si-SNHG1 组细胞的迁移和侵袭能力较空白对照组和 si-SNHG1NC 组下降。si-SNHG1 组的小管形成能力高于 si-SNHG1NC 组和空白对照组。VEGF 在 si-SNHG1 组中的表达高于 si-SNHG1NC 组和空白对照组(t 分别=2.65、5.01, P 均 <0.05)。结论 SNHG1 在脑胶质瘤细胞 U251 和组织中表达上调,高表达 SNHG1 可以抑制细胞增殖,调控脑胶质瘤的血管生成能力。

[关键词] 长链非编码 RNA SNHG1; 替莫唑胺; 脑胶质瘤; 血管生成能力

Effect of lncRNA SNHG1 on angiogenesis in glioma cells induced by temozolomide MAO Dandan, LYV Yao, JIE Yuanqing, et al. Department of Neurosurgery, Quzhou People's Hospital, Quzhou 324000, China.

[Abstract] **Objective** To explore the effect of SNHG1 on angiogenesis in glioma cells induced by temozolomide.

Methods Human glioma cells U251 were divided into si-SNHG1 group (transfected with si-SNHG1), si-SNHG1NC group (transfected with si-SNHG1NC), and blank control group. All three groups were treated with temozolomide. The expressions of SNHG1 in human glioma cells U251 and normal glioma cells was checked. CCK8 test was used to detect the proliferation ability of cells. Transwell was used to detect the abilities of migration and invasion of cells. Tubular formation was used to detect the tube formation ability of HUVEC cells, and the expression of VEGF was checked by ELISA. **Results** The expression of lncRNA SNHG1 in normal glial cells and tissues was obviously lower than that in glioma cells U251 and tissues ($t=2.24, 2.46, P<0.05$). The cell proliferation ability of the si-SNHG1 group at 48 h and 72 h was lower than that of the si-SNHG1NC group and the blank control group ($t=17.29, 16.86, 8.20, 11.60, P<0.05$). The cell migration and invasion ability of the si-SNHG1 group were lower than those of the blank control group and the si-SNHG1NC group. The tubule formation ability of the si-SNHG1 group was stronger than that of the si-SNHG1NC group and the blank control group. The VEGF level in si-SNHG1 group was higher than that in si-SNHG1NC group and blank control group ($t=2.65, 5.01, P<0.05$). **Conclusion** SNHG1 is up-regulated in glioma cells U251 and tissues. High expression of SNHG1 can inhibit cell proliferation and regulate angiogenesis of gliomas.

[Key words] lncRNA SNHG1; temozolomide; glioma; angiogenesis

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2021.006.004

基金项目:衢州市科学计划项目(20172040)

作者单位:324000 浙江衢州,衢州市人民医院神经外科

胶质母细胞瘤的致死性极高,严重影响人们的日常生活,其病死率已经占到胶质瘤的 50% 以上^[1]。替莫唑胺可以通过干预机体内 DNA 的复制等方式来促使疾病相关细胞凋亡^[2,3]。临床上使用

替莫唑胺治疗可以实现抑制肿瘤细胞增殖的作用,从而提高肿瘤疾病患者的生存时间。临床上替莫唑胺耐药性的发生会大大降低其治疗效果^[4,5]。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA) SNHG1作为一个致癌基因,可以促进结直肠癌细胞的增殖和侵袭,并且抑制其细胞凋亡^[6]。虽然目前对于lncRNA在癌细胞增殖方面的机制很多,但关于SNHG1在替莫唑胺诱导脑胶质瘤细胞方面的机制研究还鲜有报道。本研究主要探讨SNHG1对替莫唑胺诱导脑胶质瘤细胞血管生成能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 脑胶质瘤细胞U251、正常脑胶质细胞(由上海复祥生物科技有限公司生产)、胎牛血清(由上海碧云天公司生产)、DMEM培养基(由美国HyClone生产)、转染试剂Li-pofectamine™ 2000(由美国Invitrogen生产)、逆转录试剂盒(由北京杰辉博高生物技术有限公司生产)、胎牛血清(由美国Gibco公司生产)、SNHG1 siRNA及其阴性对照(由广州复能基因有限公司生产)等。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理 替莫唑胺的浓度调配为1 000 μmol/L的母液。脑胶质瘤细胞U251在37℃、5% CO₂的培养箱中用DMEM高糖培养基(含10%胎牛血清)培养,当细胞生长到融合度80%后,用替莫唑胺干预U251细胞24 h,进行相关的检测,脑胶质瘤细胞经替莫唑胺诱导成功后用于后续实验。

1.2.2 细胞转染 将实验培养的人的脑胶质瘤细胞U251分为:空白对照组、si-SNHG1组(转染si-SNHG1)、si-SNHG1NC组(转染si-SNHG1-NC)。取对数生长期的细胞接种在6孔板中,细胞增长至约70%融合时行转染,磷酸缓冲盐溶液洗涤2次之后每孔加入1 ml的DMEM高糖培养基(含20%胎牛血清)。用去离子水溶解siRNA至20 μmol/L,将siRNA与500 μl无血清DMEM混匀后静置,此为A管,将转染试剂Li-pofectamine™ 2000与无血清DMEM混匀后静置,此为B管,然后将A、B管混匀静置20 min后加入各孔中,培养4~6 h后更换培养基,继续培养24~28 h。使用实时荧光定量PCR技术(real-time polymerase chain reaction, RT-PCR)检测转染效率,细胞转染率达到50%即可用于后续实验。

1.2.3 RT-PCR检测SNHG1的表达情况 取适量对数生长期的各组细胞,提取细胞及组织中的总RNA,定量后据逆转录试剂盒说明书合成cDNA,再依

RT-PCR试剂盒操作完成SNHG1的检测,将GAPDH作为SNHG1的内参,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算其表达情况。引物序列见表1。

表1 引物序列

基因名称	引物序列
SNHG1	上游 5'-AGGCTGAAGTTACAGGTC-3'
	下游 5'-TTGGCAATCCCAGTGTCTTA-3'
GAPDH	上游 5'-GTCAACGGATTGCTCTGTATT-3'
	下游 5'-AGTCTTACTGGGTGGCAGTGAT-3'

1.2.4 CCK-8实验检测细胞的增殖能力 将细胞接种至96孔板,每孔的密度为 1.0×10^3 个细胞。于细胞转染后的0 h、24 h、48 h、72 h时加入10 μl的CCK-8试剂,2 h后在酶标仪上测吸光度(optical density, OD)450值。

1.2.5 Transwell实验检测细胞的迁移侵袭能力 收集培养SNHG1的细胞,置于无血清培养基制成细胞悬液,接种至Transwell小室上层,等风干后加入500 μl 0.1%结晶紫染色,于显微镜下拍照并计算迁移的细胞数量。细胞的侵袭实验需要在Transwell小室上层加入50 μl 2.0 mg/ml基质胶Matrigel,等其凝固后接种SNHG1的细胞,之后的操作同细胞迁移。

1.2.6 小管形成实验 取6代内人脐静脉内皮细胞,培养基与培养条件同1.2.1下细胞培养。细胞培养基取干扰SNHG1表达的脑胶质瘤的培养上清,1 500 r/min离心10 min,1:1与DMEM混匀。铺胶在冰盒上进行,1:1和DMEM培养基稀释,混匀后,每孔80 μl加入24孔板,37℃细胞孵箱放1 h后,每孔铺 2×10^4 个细胞,加入预配的培养基,后放入孵箱中继续培养。细胞成管后在显微镜下观察并拍照。

1.2.7 酶联免疫法检测血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 选取经转染的后脑胶质瘤细胞的细胞培养上清液,37℃放置90 min;每个孔中加入100 μl生物素化的抗体工作液,于37℃下放置1 h;每个孔中加入100 μl酶结合工作液,37℃放置30 min;每个孔中加入90 μl TMB底物溶液,37℃下避光放置15 min左右;然后每个孔中加50 μl终止液;测量各孔的OD值。建立标准曲线,然后进行计算。

1.3 统计学方法 采用SPSS 24.0行统计分析,计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)来表示,用t检验。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组中SNHG1的表达 人脑胶质瘤细胞U251中SNHG1的表达为 0.06 ± 0.05 ,明显高于正常脑胶质细胞中SNHG1的表达(0.01 ± 0.01),差异有统计学意义($t=2.24, P<0.05$);脑胶质瘤组织中LINC00337的表达为 0.06 ± 0.06 ,明显高于正常脑胶质组织中LINC00337的表达(0.01 ± 0.01),差异有统计学意义($t=2.46, P<0.05$)。

2.2 各组脑胶质瘤细胞的增殖能力比较见图1

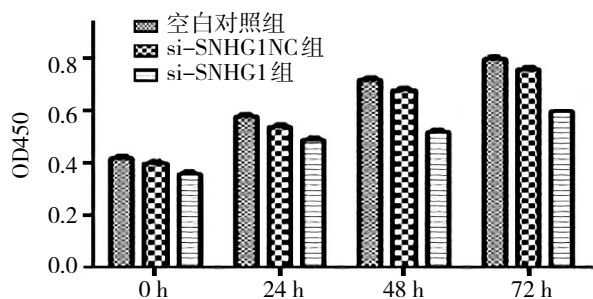


图1 各组脑胶质瘤细胞的增殖能力

由图1可见,si-SNHG1组在48 h和72 h时细胞的增殖能力明显低于si-SNHG1NC组和空白对照组(t 分别=17.29、16.86;8.20、11.60, P 均 <0.05)。

2.3 各组脑胶质瘤细胞的迁移和侵袭比较见封二图1~2

由封二图1~2可见,si-SNHG1组的迁移和侵袭能力较空白对照组和si-SNHG1NC组明显下降。

2.4 各组的小管形成能力比较见封二图3

由封二图3可见,si-SNHG1组的小管形成能力明显高于si-SNHG1NC组和空白对照组。

2.5 各组中VEGF的表达见表2

表2 各组中VEGF的表达/pg/ml

组别	VEGF
si-SNHG1组	$1.86 \pm 0.43^{**}$
si-SNHG1NC组	1.25 ± 0.37
空白对照组	0.92 ± 0.18

注:*,与si-SNHG1NC组比较, $P<0.05$;#:与空白对照组比较, $P<0.05$ 。

由表2可见,VEGF在si-SNHG1组中的表达明显高于si-SNHG1NC组和空白对照组(t 分别=2.65、5.01, P 均 <0.05)。

3 讨论

临床上对于脑胶质瘤的主要治疗方法仍然以手术为主,放化疗为辅的综合治疗方案。至目前为

止,替莫唑胺在神经外科临床上已被用作主要辅助药物对患者进行治疗。相关研究表明,在许多的生物过程中lncRNA发挥着至关重要的作用^[7],lncRNA虽然是一种非编码RNA,但能够以RNA的形式通过不同的层面在机体中参与调控多种生物学功能,它能够在表观遗传学、通过对转录水平的调控调节蛋白质的编码基因,参与干细胞多功能,体细胞重编程的调控等^[8,9],例如lncRNA都可以通过参与mRNA剪接、基因组印记和核质转运等生物机制从而来实现对细胞的分化和细胞周期的调控作用^[10,11]。机体内生物学信号的改变可以对lncRNA的水平产生一定影响^[12]。Lan等^[13]研究发现在甲状腺乳头状癌中,lncRNA的表达呈现异常,其中某些lncRNA可以对甲状腺乳头状癌细胞的生物学功能进行调控。Wang等^[14]研究发现高表达的SNHG1与肾癌的不良预后具有一定的相关性。研究发现在肺癌和结肠癌组织中SNHG1呈异常表达,下调SNHG1可以对肺癌细胞及结肠癌细胞的增殖起到抑制作用^[15,16]。研究显示在喉鳞状细胞癌中敲除SNHG1可抑制喉癌细胞的迁移侵袭和上皮间质转化^[17]。在胃癌^[18]、食管癌^[19]以及肝癌^[20]中SNHG1均呈现出异常表达,SNHG1的水平变化在多种疾病的发生发展中具有重大意义。

本次研究选用人的脑胶质瘤细胞U251、正常脑胶质细胞来探索SNHG1对替莫唑胺诱导脑胶质瘤细胞血管生成能力的影响,结果发现,与正常脑胶质细胞及组织比较,人的脑胶质瘤细胞U251及组织中SNHG1的表达量明显升高($P<0.05$)。si-SNHG1组在48 h和72 h时细胞的增殖能力明显低于si-SNHG1NC组和空白对照组($P<0.05$),说明高表达的SNHG1对脑胶质瘤细胞增殖具有明显影响,起到抑制细胞的效果。本次研究对脑胶质瘤细胞的迁移和侵袭情况发现,si-SNHG1组细胞的迁移和侵袭能力较空白对照组和si-SNHG1NC组明显下降($P<0.05$)。si-SNHG1组的小管形成能力明显高于si-SNHG1NC组和空白对照组($P<0.05$),说明SNHG1的表达对脑胶质瘤的血管生成能力方面有着一定的影响。同时本次研究发现VEGF在si-SNHG1组中的表达明显高于si-SNHG1NC组和空白对照组($P<0.05$)。以上结果均提示着SNHG1水平变化在脑胶质瘤中具重大作用,SNHG1可能可以通过调控VEGF的表达,进而对脑胶质瘤的血管生成能力产生影响,临床上把过表达的SNHG1来

作为治疗脑胶质瘤的新型生物标志物,同时在脑胶质瘤的基因治疗中也可以将其作为潜在的生物靶标来应用。目前看来,本次研究的样本量太少,规模不大,有必要在更大样本的条件下去验证已有的实验结果,更深层次地探讨细胞间的相互作用以及SNHG1参与的分子机制。

综上所述,上调SNHG1的表达可以促使替莫唑胺诱导脑胶质瘤细胞迁移、侵袭以及增殖能力下降,从而调控脑胶质瘤的血管生成能力。本研究为脑胶质瘤的临床治疗可提供新的方向和思路,但对于其是否可广泛应用于脑胶质瘤的临床诊断和作为治疗干预靶点,仍然需要大规模样本、多中心的临床研究来进行验证,促使其以后可能成为脑胶质瘤治疗的另一突破口。

参考文献

- 1 吕英琪,陈曜星,卫晨莹,等.胶质母细胞瘤的免疫治疗研究进展[J].药学报,2019,54(10):1792-1801.
- 2 Yongzhi W, Xuzhu C, Zhong Z, et al. Comparison of the clinical efficacy of temozolomide (TMZ) versus nimustine (ACNU)-based chemotherapy in newly diagnosed glioblastoma[J]. Neurosurg Rev, 2014, 37(1): 73-78.
- 3 陈芸,左频,罗林,等.脑胶质瘤MGMT表达与血清和脑脊液MGMT基因启动子甲基化的相关性[J].临床与实验病理学杂志,2018,34(12):1344-1347.
- 4 汤兆奇,王克生,徐宏彬.没药甙酮下调PI3K/Akt通路增强替莫唑胺抗脑胶质瘤细胞增殖作用[J].中国药理学通报,2019,35(8):1098-1103.
- 5 胡大玲,张寅.FoxO3在复发胶质母细胞瘤中的表达及其对替莫唑胺耐药性的影响[J].南京医科大学学报(自然科学版),2017,37(11):1389-1394.
- 6 Sun X, Wang Z, Yuan W. Down-regulated long non-coding RNA SNHG1 inhibits tumor genesis of colorectal carcinoma[J]. Cancer Biomark, 2017, 20(1): 67-73.
- 7 He Y, Wu Z, Qiu C, et al. Long non-coding RNA GAPLINC promotes angiogenesis by regulating miR-211 under hypoxia in human umbilical vein endothelial cells [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(12): 8090-8100.
- 8 Jing Z, Gao L, Wang H, et al. Long non-coding RNA GAS5 regulates human B lymphocytic leukaemia tumorigenesis and metastasis by sponging miR-222[J]. Cancer Biomark, 2019, 26(3): 385-392.
- 9 Dong C, Min T, Yuepeng S, et al. Indole-3-acetic acid has long-term effects on long non-coding RNA gene methylation and growth in populus tomentosa[J]. Mol Genet Genomics, 2019, 294(6): 1511-1525.
- 10 Zhao HY, Zhang ST, Cheng X, et al. Long non-coding RNA GAS5 promotes PC12 cells differentiation into Tuj1-positive neuron-like cells and induces cell cycle arrest[J]. Neural Regen Res, 2019, 14(12): 2118-2125.
- 11 Yang Y, Yang W, Jin L. The role of long non-coding RNA prostate cancer-associated transcript 1 in prostate cancer[J]. J Comput Biol, 2019, 26(9): 975-984.
- 12 胡倩,姚和瑞.长链非编码RNA与肿瘤研究现状[J].中华肿瘤防治杂志,2014,21(21):1746-1750.
- 13 Lan X, Zhang H, Wang Z, et al. Genome-wide analysis of long noncoding RNA expression profile in papillary thyroid carcinoma[J]. Gene, 2015, 569(1): 109-117.
- 14 Wang H, Lu B, Chen J. Knockdown of lncRNA SNHG1 attenuated Aβ25-35-induced neuronal injury via regulating KREMEN1 by acting as a ceRNA of miR-137 in neuronal cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 518(3): 438-444.
- 15 汤锐明,邱惠思,黄岩,等.长链非编码RNA SNHG1促进肺癌细胞增殖[J].中国生物化学与分子生物学报,2017,33(12):1274-1279.
- 16 Lin SX, Jiang H, Xiang GZ, et al. Up-regulation of long noncoding RNA SNHG1 contributes to proliferation and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(5): 1333-1341.
- 17 Gao L, Cao H, Cheng X. A positive feedback regulation between long noncoding RNA SNHG1 and YAP1 modulates growth and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Am J Cancer Res, 2018, 8(9): 1712-1724.
- 18 Hu Y, Ma Z, He Y, et al. lncRNA-SNHG1 contributes to gastric cancer cell proliferation by regulating DNMT1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 491(4): 926-931.
- 19 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.
- 20 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]. Med Sci Monit, 2016, 22: 4820-4829.

(收稿日期 2019-12-09)

(本文编辑 蔡华波)