

柳扬,范伟,丁洁. lncRNA SNHG16通过调控 miR-570对肝癌细胞索拉非尼耐药的机制研究[J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(11): 63-70.

Liu Y, Fan W, Ding J. MiR-570-related lncRNA SNHG16 regulation of hepatoma cell resistance to sorafenib [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(11): 63-70.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.11.009

lncRNA SNHG16通过调控 miR-570对肝癌细胞索拉非尼耐药的机制研究

柳扬¹, 范伟^{1*}, 丁洁²

(1. 贵州省人民医院肝胆外科二部, 贵阳 550002; 2. 贵州省人民医院肿瘤科, 贵阳 550002)

【摘要】 目的 分析长链非编码 RNA SNHG16(long non-coding RNA SNHG16, lncRNA SNHG16)通过调控微小 RNA-570(miR-570)对肝癌细胞索拉非尼耐药的机制研究。方法 采用实时荧光 RT-PCR 检测人体正常肝组织、肝癌细胞组织中 HepG2、HepG2-R 细胞的 lncRNA SNHG16、miR-570 表达,并对 HepG2-R 细胞做转染,后分别记为 HepG2-R+pcDNA 组、HepG2-R+pcDNA SNHG16 组、HepG2-R+anti-miR-NC 组、HepG2-R+anti-miR-570 组、HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-NC 组、HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-570 组,用于后续试验,且将 miR-NC、miR-570、si-NC、si-SNHG16 用相同方式转染至 HepG2 细胞,分别记为 miRNC 组、miR-570 组、si-NC 组、si-SNHG16 组。用 MTT 法、流式细胞仪、Transwell 试验检测细胞增殖、凋亡及侵袭,Western blot 法测定细胞 CyclinD1、P21、MMP-9、MMP-2 表达变化。结果 与人体正常肝组织组相比,肝癌细胞组织组的 lncRNA SNHG16 表达升高,miR-570 表达下降($P < 0.05$)。与正常细胞 HepG2-P 组相比,HepG2-R 组的 lncRNA SNHG16 及 IC_{50} 值提高,miR-570、HepG2-R 细胞在索拉非尼浓度为 1、2、4、8、16 $\mu\text{mol/L}$ 中的抑制水平下降($P < 0.05$)。HepG2-R+pcDNA SNHG16 作为过表达组,其 lncRNA SNHG16 表达显著升高($P < 0.05$),与 HepG2-R+pcDNA 组对比,HepG2-R+pcDNA SNHG16 组的迁移的细胞个数及 CyclinD1、P21、MMP-9、MMP-2 的表达水平降低,抑制率、凋亡率及 P21 的表达水平上升($P < 0.05$)。与 HepG2-R+anti-miR-NC 组相比,HepG2-R+anti-miR-570 组 miR-570 表达水平降低($P < 0.05$),与 HepG2-R+anti-miR-NC 组比较,HepG2-R+anti-miR-570 组 CyclinD1、MMP-9、MMP-2 表达水平降低,抑制率、凋亡率及 P21 的表达水平升高($P < 0.05$)。双荧光素酶报告实验显示,与 miR-NC 组相比,miR-570 使 WT-SNHG16 荧光素酶活性降低($P < 0.05$),而对 MUT-SNHG16 荧光素酶活性影响较小($P > 0.05$)。过表达 lncRNA SNHG16 可使 HepG2-R 细胞中 miR-570 表达下降($P < 0.05$),与 HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-NC 组相比,HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-570 组迁移的细胞个数及 CyclinD1、MMP-9、MMP-2 的表达水平升高,抑制率、凋亡率及 P21 的表达水平降低($P < 0.05$)。结论 lncRNA SNHG16 可调控 HepG2-R 肝癌细胞的耐药性,其机制与 lncRNA SNHG16 靶向调控 miR-570 有关,为临床治疗肝癌细胞提供了新的靶点。

【关键词】 肝癌;长链非编码 RNA SNHG16;微小 RNA-570;索拉非尼

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 11-0063-08

MiR-570-related lncRNA SNHG16 regulation of hepatoma cell resistance to sorafenib

LIU Yang¹, FAN Wei^{1*}, DING Jie²

(1. Department 2 of Hepatobiliary Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, China.

2. Oncology Department, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002)

【基金项目】 贵州省卫生健康委员会科学技术基金项目(gzkwj2021-175)。

【作者简介】 柳扬(1986—),男,硕士,副主任医师,研究方向:肝胆胰脾疾病治疗。E-mail: iqyek84@163.com

【通信作者】 范伟(1967—)男,博士,主任医师,研究方向:肝胆胰脾疾病治疗。E-mail: zhuyufanwei@126.com

【Abstract】 Objective To explore the mechanism by which long non-coding RNA SNHG16 (lncRNA SNHG16) promotes liver cancer cell resistance to sorafenib by regulating microRNA-570 (miR-570). **Methods** Real-time fluorescent RT-PCR was used to detect lncRNA SNHG16 and miR-570 expression of human normal liver tissue and liver cancer cells, HepG2 and HepG2-R. HepG2-R cells were transfected to provide the following groups: HepG2-R+pcDNA, HepG2-R+pcDNA SNHG16, HepG2-R+anti-miR-NC, HepG2-R+anti-miR-570, and HepG2-R+pcDNA group. HepG2-R+SNHG16+miR-NC and HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-570 groups were used for follow-up tests. miR-NC, miR-570, si-NC, and si-SNHG16 were transfected into HepG2 cells in the same way to give HepG2+miRNC, HepG2+miR-570, HepG2+si-NC, and HepG2+si-SNHG16 groups. MTT assay, flow cytometry and Transwell assay were used to detect cell proliferation, apoptosis, and invasion. Western blot assay was used to detect the changes in expression of CyclinD1, P21, MMP-9, and MMP-2. **Results** Compared with normal liver tissue, the liver cancer tissue showed increased lncRNA SNHG16 and decreased miR-570 expression ($P<0.05$). Compared with the normal cell HepG2-P group, the HepG2-R group had increased lncRNA SNHG16 and IC₅₀ values, and the inhibition rates of miR-570 in HepG2-R cells were decreased at sorafenib concentrations of 1, 2, 4, 8, 16 $\mu\text{mol/L}$ ($P<0.05$). In the HepG2-R+pcDNA SNHG16 overexpression group, lncRNA SNHG16 expression was significantly increased ($P<0.05$). Compared with the HepG2-R+pcDNA group, the HepG2-R+pcDNA SNHG16 group's number of migrated cells and expression of CyclinD1, P21, MMP-9, and MMP-2 were decreased, while the inhibition rate, apoptosis rate, and P21 expression were increased ($P<0.05$). Compared with the HepG2-R+anti-miR-NC group, the HepG2-R+anti-miR-570 group's miR-570 levels were decreased ($P<0.05$). Compared with the HepG2-R+anti-miR-NC group, the HepG2-R+anti-miR-570 group showed decreased levels of CyclinD1, MMP-9, and MMP-2 and increased inhibition rate, apoptosis rate, and P21 expression ($P<0.05$). A dual luciferase reporting experiment showed that, compared with the miR-NC group, miR-570 reduced WT-SNHG16 luciferase activity ($P<0.05$), but there was little effect on the luciferase activity of MT-SNHG16 ($P>0.05$). Overexpression of lncRNA SNHG16 decreased the expression of miR-570 in HepG2-R cells ($P<0.05$). Compared with the HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-NC group, the HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-570 group's number of migrated cells and expression levels of CyclinD1, MMP-9, and MMP-2 were increased, while the inhibition rate, apoptosis rate, and P21 expression were decreased ($P<0.05$). **Conclusions** lncRNA SNHG16 can regulate the drug resistance of HepG2-R liver cancer cells. The mechanism is related to the targeted regulation of miR-570 by lncRNA SNHG16, thus miR-570 provides a new target for the clinical treatment of liver cancer cells.

【Keywords】 liver cancer; lncRNA SNHG16; microRNA-570; sorafenib

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

原发性肝癌的死亡率在全世界排名第三,患病率位居第五,有约 70% 的肝癌患者在确诊时已处于晚期,生存时长低于 1 年^[1-2]。索拉非尼属于在肝癌治疗指南中主要推荐的诊治晚期肝癌的重要方案,有效率约 40%,但其长时间服用会出现耐药性,最后导致治疗效果相对较差^[3-4]。且有越来越多的学者研究显示,肿瘤中的上皮-间质的转化为影响药物耐药的因素之一,但耐药机制尚不清晰,因而探索索拉非尼的耐药机制对于晚期肝细胞肝癌临床效果的改善及预后有着积极作用。lncRNA 为一类特异性的非编码 RNA,在修饰组蛋白、重塑基因构造、转录及遗传后基因的表达等过程中起到了一定的作用,SNHG16 属于 lncRNA 家族中的其中一员,且在 miRNA 分子的作用下能够对细胞的分化及增殖有效调节,并在肿瘤的化疗耐药及发展中有所参与^[5]。miR-570 是肿瘤抑制因子的一种,在减缓

肝癌细胞增殖、血管的生长中有着重要的作用,且在血清及肝癌组织内其表达呈低水平^[6]。基于此,本文探究了 lncRNA SNHG16 通过靶向调控 miR-570 可有效改善肝癌细胞 HepG2 对于索拉非尼的耐药性,效果显著。

1 材料和方法

1.1 细胞

人肝癌细胞 HepG2 购自于(澳睿赛生物技术(上海)有限公司;货号:ORC0088)。

1.2 主要试剂与仪器

RPMI-1640 培养基(上海百赛生物技术股份有限公司,货号:10-040-CM);MTT 试剂(艾美捷科技有限公司,货号:MBS843090-C);Lipofectamine TM 2000 转染试剂(11668019)购自于北京百奥创新科技有限公司;BCA 蛋白试剂盒(赛默飞世尔科技,货

号:23221-23230); CyclinD1、P21、MMP9、MMP2 抗体分别购自于上海抚生实业有限公司、北京泽平科技有限责任公司、北京义翘神州科技股份有限公司。酶标仪(美谷分子仪器(上海)有限公司,型号: SpectraMax iD5); 流式细胞仪(上海顶仪科技有限公司,型号: FACSCalibur)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

通过浓度递增方法对肝癌细胞 HepG2 实施长期的培养,创建索拉非尼耐药 HepG2 细胞株模型,即为 HepG2-R。使用 HepG2 作亲本细胞,通过在 37℃、5% CO₂ 的环境中培育,待细胞的状态平稳后,在培养液中置入 1、2、4、8 及 16 μmol/L 索拉非尼,行 1 周培育后,索拉非尼换为更高的含量,直到在索拉非尼(16 μmol/L)的培养液中细胞能稳定生长,说明诱导 HepG2-R 细胞成功。后续在培养基中对 HepG2-R 细胞中低浓度的索拉非尼施以常规培育,维持耐药性,且将 HepG2 的正常细胞标记成 HepG2-P。

1.3.2 lncRNA SNHG16、miR-570 在肝癌细胞中表达水平检测

提取肝癌细胞、正常肝细胞中总 RNA,逆转录为 cDNA,选取实时荧光定量法予以检测 lncRNA SNHG16、miR-570 表达量,采用 Primer 5.0 软件设计引物序列,PCR 反应体系:0.5 μL 的上下游引物、模板为 2 μL cDNA、8 μL 的 SYBR Green,放蒸馏水至 30 μL。反应条件:96℃ 6 min、92℃ 30 s、75℃ 45 s、80℃ 10 min,共行 45 个循环,以 GAPDH 为内参,采取 2^{-ΔΔCt} 方法计算出 lncRNA SNHG16、miR-570 的表达量。(见表 1)

1.3.3 细胞转染

通过对 SNHG16 的 siRNA 进行合成,HepG2-R 细胞按密度为 2×10⁵/孔置于 6 个孔板内,待细胞开

始贴壁后,放入含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640。培养箱内培育 24 h,细胞融合程度为 35%~55%,后将完成稀释的 HepG2 siRNA 混合于 Lipofectamine™ 2000 试剂中,产生 HepG2 siRNA/Lipofectamine™ 2000 复合物,接着在细胞培养板孔中加 HepG2 siRNA 转染载体予以融合,后置入 5% CO₂ 37℃ 的培养箱实施培育,6 h 之后换为 RPMI-1640 培养液(含 10% 胎牛血清),20 h 恢复生长,使用荧光显微镜检测细胞荧光蛋白的表达量,使用 qRT-PCR 法检测转染率,确认成功转染后,分别将其记作 HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-570 组、HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-NC 组、HepG2-R+anti-miR-570 组、HepG2-R+anti-miR-NC 组、HepG2-R+pcDNA SNHG16 组和 HepG2-R+pcDNA 组,用于后续的试验。接着将 si-NC、si-SNHG16、miR-NC、miR-570 通过类似的操作在 HepG2 细胞内实施转染,分别记 si-NC 组、si-SNHG16 组、miRNC 组和 miR-570 组。

1.3.4 MTT 法测定细胞增殖抑制率

集取细胞,调至 5×10⁵/mL,于 96 孔板内进行接种,加 MTT 溶液(5 g/L 25 μL),培育 4 h,去除清液,放入二甲基亚砷(DMSO)(120 μL),摇匀,直到结晶紫开始融化,后将酶标仪调到 470 nm 波长,以此对细胞吸光(A)值进行测定。细胞增殖抑制率=(对照组 A 值-试验组 A 值)/对照组 A 值×100%。并根据药物的浓度及抑制率分别记作横轴与纵轴,描绘出浓度对应的曲线,算出半数的抑制浓度 IC₅₀。

1.3.5 流式细胞仪检测细胞的凋亡

按照上述的形式收集每组的 HepG2-R 细胞通过 PBS 洗涤后制出单细胞的悬浮液(2×10⁵/mL),接着将 100 mL 细胞悬浮液放入 96 孔板中,后滴加 Annexin V-FITC 6 mL,在 5℃ 环境中培育约 30 min,接着加 4 mL 的碘化丙啶,均匀混合后于室温下培育 10 min,并采用流式细胞仪测试细胞的凋亡。

1.3.6 Transwell 测定细胞迁移

首先将细胞在无血清的培养基中培育 24 h,集取细胞,调节至 5×10⁶/mL,取 150 μL 的细胞放于 Transwell 小室的上室中,取 550 μL 含有清液的培养基放于 Transwell 小室的下室中,后将 Transwell 小室放置于培养箱内培育 48 h,接着预备结晶紫染色液与甲醛固定液予以备用,后将 Transwell 小室取出,利用棉签缓慢地擦拭掉聚碳酸酯膜表面上的细胞,后将膜移置固定液内,30~35 min,接着将膜放入染色液内 15 min 进行染色,后通过镊子缓慢将膜的下

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

引物 Primer	序列(5'-3') Sequences(5'-3')
lncRNA SNHG16-F	5'-AGGCTGAAGTTACAGGTC-3'
lncRNA SNHG16-R	5'-TCGCTCCCAGTGTCTTA-3'
miR-570-F	5'-TGCGGTTTGCCAATGGTAGAAC-3'
miR-570-R	5'-CCAGTGCAGGTCGAGCT-3'
GAPDH-F	5'-GGACCTGACCTGCCCTCTAG-3'
GAPDH-R	5'-GTAGCCCAGGATGCCCTTGA-3'

方朝上置于载玻片予以固定,使用光镜检测细胞数目,取其平均数值。

1.3.7 CyclinD1、P21、MMP9、MMP2 检测

选用 Western blot 法测定细胞内的细胞周期蛋白(CyclinD1、P21、MMP9、MMP2)表达,首先在含甲基磺酰氟(PMSF)的裂解液内使细胞发生裂解反应,取蛋白后经 BCA 法对蛋白进行定量测定,接着在沸水内进行约 15 min 的浸泡处理,使其变性,加样本,调节 60 V 电压实施电泳处理,40 min 左右,调电压到 120 V 后继续电泳,90~120 min 后停止,将蛋白经转膜仪换至 PVDF 膜上,在低温环境下转膜,完成后通过 5% 的脱脂奶粉进行 1 h 封闭处理,培养一抗(抗体 P21、CyclinD1、MMP2、MMP9)、二抗(经过氧化酶所标记后的 LgG 抗体),并在暗室放置膜,加 ECL 试剂,用凝胶检测软件观察条带的灰度数值,内参为 GAPDH。

1.3.8 双荧光素酶报告试验

集取细胞,取裂解液裂解细胞,加荧光素酶底物(5 μ L)、缓冲液,混匀,测定荧光强度,放入缓冲液及底物,混匀,对荧光的强度进行检测。实验重复 5 次,分别对各个样本作复孔 3 个,最后对荧光素酶强度比较分析,检测 SNHG16 联合 miR-570 在细胞中的影响。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件分析,shapiro-wilk 检验符合正态分布,以平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用重读测量方差分析,同一时间点两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间进行比较采用 F 检验,以率(%)表示计数资料采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

表 3 lncRNA SNHG16 和 miR-570 在肝癌细胞及肝癌不同浓度的索拉非尼耐药细胞中的表达($\bar{x}\pm s$)
Table 3 Expression of lncRNA SNHG16 and miR-570 in liver cancer cells and Sorafenib resistant cells with different concentrations of liver cancer

组别 Groups	宿主基因 16 SNHG16	miR-570	半抑制浓度(μ mol/L) IC ₅₀	索拉非尼(μ mol/L) Sorafenib				
				1	2	4	8	16
HepG2-P 组 HepG2-P group	1.12 \pm 0.16	1.05 \pm 0.18	30.28 \pm 2.11	6.97 \pm 0.71	20.95 \pm 2.77	38.86 \pm 3.18	69.34 \pm 6.06	86.24 \pm 9.05
HepG2-R 组 HepG2-R group	2.08 \pm 0.22 ^a	0.59 \pm 0.10 ^a	200.46 \pm 12.07 ^a	5.06 \pm 0.57 ^a	16.57 \pm 2.03 ^a	24.43 \pm 2.26 ^a	37.41 \pm 2.58 ^a	40.57 \pm 5.69 ^a
t	13.670	8.652	53.790	8.125	4.940	14.330	18.780	16.550
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 HepG2-P 组相比,^a $P<0.05$ 。

Note. Compared with HepG2-P group, ^a $P<0.05$.

2 结果

2.1 lncRNA SNHG16、miR-570 在肝癌细胞组织及正常肝组织中的表达

如表 2 所示,与人体正常肝组织相比,肝癌细胞组织的 lncRNA SNHG16 表达升高,miR-570 表达下降,具有显著性差异($P<0.05$)。

2.2 lncRNA SNHG16 和 miR-570 在肝癌细胞及肝癌不同浓度的索拉非尼耐药细胞中的表达

如表 3 所示,与 HepG2-P 组相比,HepG2-R 组 lncRNA SNHG16 表达上升,miR-570 表达水平下降($P<0.05$),表明与 HepG2-P 组对比,HepG2-R 组细胞在索拉非尼浓度为 1、2、4、8、16 μ mol/L 中的抑制率均下降,IC₅₀ 值上升,具有显著性差异($P<0.05$)。

2.3 lncRNA SNHG16 过表达联合索拉非尼对 HepG2-R 细胞增殖、凋亡、迁移的影响

如表 4,图 1、图 2 所示,HepG2-R + pcDNA SNHG16 作为过表达组,其 lncRNA SNHG16 表达明

表 2 lncRNA SNHG16、miR-570 在肝癌细胞组织组及正常肝组织组中的表达($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Expression of lncRNA SNHG16 and miR-570 in liver cancer cell tissue group and normal liver tissue group

组别 Groups	宿主基因 16 SNHG16	miR-570
人体正常肝组织组 Human normal liver tissue group	1.13 \pm 0.14	1.08 \pm 0.20
肝癌细胞组织组 Liver cancer cell tissue group	2.10 \pm 0.27 ^a	0.61 \pm 0.15 ^a
t	12.350	7.281
P	<0.001	<0.001

注:与人体正常肝组织组相比,^a $P<0.05$ 。

Note. Compared with human normal liver tissue group, ^a $P<0.05$.

显升高 ($P < 0.05$), 表明 lncRNA SNHG16 过表达的 HepG2-R 细胞株构建成功, 与 HepG2-R+pcDNA 组相比, HepG2-R+pcDNA SNHG16 组的迁移细胞个数及 CyclinD1、P21、MMP-9、MMP-2 的表达水平降低, 抑制率、凋亡率及 P21 的表达水平上升, 具有显著

性差异 ($P < 0.05$)。

2.4 抑制 miR-570 表达联合索拉非尼对 HepG2-R 细胞增殖、凋亡、迁移的影响

如表 5, 图 3、图 4 所示, 与 HepG2-R+anti-miR-NC 组相比, HepG2-R+anti-miR-570 组 miR-570 表达

表 4 lncRNA SNHG16 过表达联合索拉非尼对 HepG2-R 细胞增殖、凋亡、迁移的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effects of lncRNA SNHG16 overexpression combined with Sorafenib on proliferation, apoptosis and migration of HepG2-R cells

组别 Groups	HepG2-R+pcDNA 组 HepG2-R+pcDNA group	HepG2-R+pcDNA SNHG16 组 HepG2-R+pcDNA SNHG16 group	<i>t</i>	<i>P</i>
宿主基因 16 SNHG16	1.17±0.15	2.12±0.24 ^a	13.000	<0.001
抑制率 (%) Inhibition rate	11.72±1.10	42.29±2.44 ^a	44.240	<0.001
凋亡率 (%) Apoptosis rate	17.87±2.09	22.41±3.24 ^a	4.560	<0.001
迁移的细胞个数 (<i>n</i>) Number of migrated cells	138.51±10.16	83.28±7.55 ^a	16.900	<0.001
周期素 D1 CyclinD1	0.95±0.13	0.51±0.07 ^a	11.540	<0.001
p21 蛋白抗体 P21	0.35±0.09	0.73±0.14 ^a	8.843	<0.001
基质金属蛋白酶 9 MMP-9	0.67±0.08	0.35±0.05 ^a	13.140	<0.001
基质金属蛋白酶 2 MMP-2	0.83±0.09	0.49±0.06 ^a	12.170	<0.001

注: 与 HepG2-R+pcDNA 组相比, ^a $P < 0.05$ 。

Note. Compared with HepG2-R+pcDNA group, ^a $P < 0.05$.

表 5 抑制 miR-570 表达联合索拉非尼对 HepG2-R 细胞增殖、凋亡、迁移的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effects of miR-570 inhibition combined with Sorafenib on proliferation, apoptosis and migration of HepG2-R cells

组别 Groups	HepG2-R+anti-miR-NC 组 HepG2-R+anti-miR-NC group	HepG2-R+anti-miR-570 组 HepG2-R+anti-miR-570 group	<i>t</i>	<i>P</i>
微小 RNA-570 miR-570	1.11±0.12	0.52±0.09 ^a	15.230	<0.001
抑制率 (%) Inhibition rate	12.36±2.25	41.61±3.18 ^a	29.080	<0.001
凋亡率 (%) Apoptosis rate	18.32±2.11	24.46±3.47 ^a	5.856	<0.001
迁移的细胞个数 (<i>n</i>) Number of migrated cells	76.86±8.10	40.43±6.06 ^a	13.950	<0.001
周期素 D1 CyclinD1	0.76±0.09	0.39±0.06 ^a	13.250	<0.001
p21 蛋白抗体 P21	0.33±0.04	0.79±0.09 ^a	18.090	<0.001
基质金属蛋白酶 9 MMP-9	0.68±0.07	0.25±0.04 ^a	20.660	<0.001
基质金属蛋白酶 2 MMP-2	0.79±0.08	0.36±0.05 ^a	17.650	<0.001

注: 与 HepG2-R+anti-miR-NC 组相比, ^a $P < 0.05$ 。

Note. Compared with HepG2-R+anti-miR-NC group, ^a $P < 0.05$.

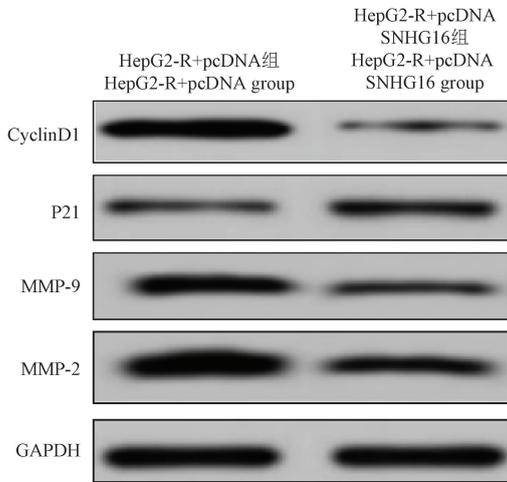


图 1 增殖、凋亡、迁移相关蛋白表达

Figure 1 Expression of proteins related to proliferation, apoptosis and migration

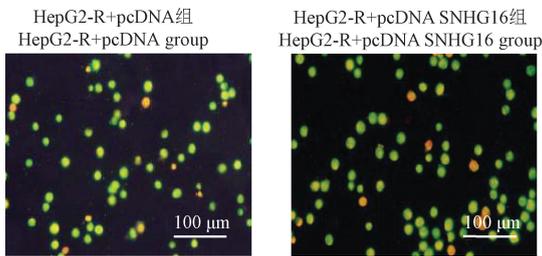


图 2 细胞凋亡图

Figure 2 Cell apoptosis

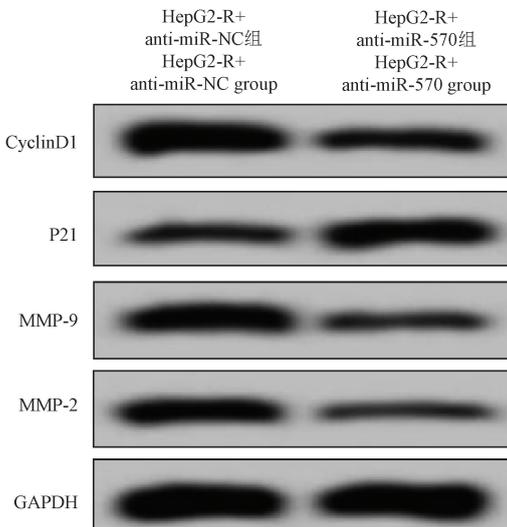


图 3 增殖、凋亡、迁移相关蛋白表达

Figure 3 Expression of proteins related to proliferation, apoptosis and migration

水平降低($P<0.05$),表明抑制 miR-570 的 HepG2-R 细胞株构建成功,与 HepG2-R+anti-miR-NC 组比较, HepG2-R+anti-miR-570 组 CyclinD1、MMP-9、MMP-2 表达水平降低,抑制率、凋亡率及 P21 表达水平升高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.5 双荧光素酶报告试验

如表 6 所示,双荧光素酶报告试验显示,miR-NC 组 WT-SNHG16、miR-570 组 WT-SNHG16、miR-NC 组 MUT-SNHG16、miR-570 组 MUT-SNHG16 细胞相对荧光素酶表达活性分别为(1.16 ± 0.14)、(0.50 ± 0.10)、(1.02 ± 0.08)、(0.98 ± 0.07),且相较于 miR-NC 组 WT-SNHG16,miR-570 组 WT-SNHG16 表达活性较低,说明 lncRNA SNHG16 靶向调控 miR-570。

2.6 过表达 miR-570 干扰 lncRNA SNHG16 对 HepG2-R 细胞耐药性的影响

如表 7,图 5 所示,过表达 lncRNA SNHG16 可使 HepG2-R 细胞中 miR-570 表达下降($P<0.05$),与 HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-NC 组相比, HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-570 组的迁移细胞个数及 CyclinD1、MMP-9、MMP-2 的表达水平升高,抑制率、凋亡率及 P21 的表达水平降低,具有显著性差异($P<0.05$)。

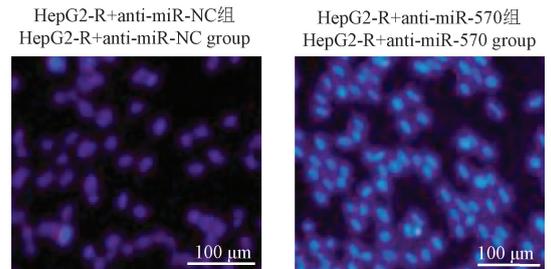


图 4 细胞凋亡图

Figure 4 Cell apoptosis

表 6 双荧光素酶报告试验($\bar{x}\pm s$)

Table 6 Double luciferase reporting tests

组别 Groups	野生型宿主基因 16 WT-SNHG16	变异型宿主基因 16 MUT-SNHG16
miR-NC 组 miR-NC group	1.16±0.14	1.02±0.08
miR-570 组 miR-570 group	0.50±0.10 ^a	0.98±0.07
<i>t</i>	14.860	1.457
<i>P</i>	<0.001	0.156

注:与 miR-NC 组相比, ^a $P<0.05$ 。

Note. Compared with miR-NC group, ^a $P<0.05$.

表 7 过表达 miR-570 干扰 lncRNA SNHG16 对 HepG2-R 细胞耐药性的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 7 Effect of overexpression of miR-570 interfering lncRNA SNHG16 on drug resistance of HepG2-R cells

组别 Groups	HepG2-R+pcDNA HepG2-R+pcDNA group	HepG2-R+pcDNA SNHG16 组 HepG2-R+pcDNA SNHG16 group	HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-NC 组 HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-NC group	HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-570 组 HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-570 group	F	P
miR-570	0.93±0.13	0.44±0.07 ^a	0.38±0.06	0.79±0.11 ^b	14.880	<0.001
抑制率 (%) Inhibition rate	13.29±1.12	45.35±3.76 ^a	47.30±3.13	18.68±2.09 ^b	39.620	<0.001
凋亡率 (%) Apoptosis rate	17.95±2.11	20.46±2.87 ^a	29.40±3.06	17.75±2.09 ^b	11.930	<0.001
迁移的细胞个数 (n) Number of migrated cells	90.48±8.29	50.21±6.75 ^a	47.37±5.42	80.54±7.67 ^b	16.860	<0.001
周期素 D1 CyclinD1	0.71±0.07	0.25±0.03 ^a	0.24±0.04	0.62±0.06 ^b	22.580	<0.001
p21 蛋白抗体 P21	0.31±0.03	0.72±0.08 ^a	0.76±0.09	0.45±0.05 ^b	18.370	<0.001
基质金属蛋白酶 9 MMP-9	0.68±0.07	0.29±0.04 ^a	0.25±0.03	0.54±0.05 ^b	21.870	<0.001
基质金属蛋白酶 2 MMP-2	0.80±0.09	0.36±0.05 ^a	0.32±0.03	0.60±0.07 ^b	19.600	<0.001

注:与 HepG2-R+pcDNA 组相比, ^aP<0.05;与 HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-NC 组相比, ^bP<0.05。

Note. Compared with HepG2-R+pcDNA group, ^aP<0.05. Compared with HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-NC group, ^bP<0.05.

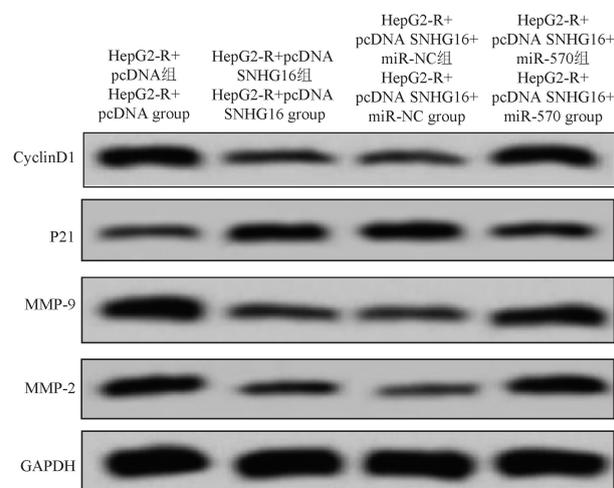


图 5 CyclinD1、P21、MMP-9、MMP-2 表达 Western blot 图

Figure 5 Western blot expression of CyclinD1, P21, MMP-9 and MMP-2

3 讨论

肝癌在每个年龄段都有可能会出现,各种类型肝炎病毒引起的慢性感染可致使机体发生慢性肝炎,伴随疾病的进展发展为肝癌,且肝内脂肪的积累、肝硬化或长时间进食霉变的食物等均与肝癌疾病发生有着紧密联系^[7-8]。

化疗是临床治疗癌症最基本的方案之一,临床救治失败主要因为化疗药物的耐药性产生、DNA 受损修复、药物的排外、细胞凋亡等因素互相作用,使

耐药病理机制相对复杂^[9]。索拉非尼通过靶向多项相关靶点,可减缓肿瘤细胞的增殖及新生血管的产生,发挥对肝癌抑制的效果,并且该药物为首要诊治晚期肝癌的靶向药物,能有效改善预后^[10-11]。研究发现,上皮间质的转化、肿瘤的微环境及信号通路等可能会与索拉非尼的耐药有关^[12-13]。本文研究发现肝癌细胞 HepG2 与 lncRNA SNHG16 对索拉非尼耐药有一定的关联性,说明 lncRNA SNHG16 对 miR-570 进行调控可有助于减轻肝癌细胞对索拉非尼耐药的预后。

研究显示,lncRNA 在肿瘤出现及进展中有一定的参与,lncRNA 也可对肝癌的转移起到调节作用^[14-15]。SNHG16 在乳腺癌、肝癌、结直肠癌等肿瘤组织及细胞中表达异常,与肿瘤细胞的侵袭、迁移及增殖相关^[16-17]。随着临床对 miRNA 的研究不断加深,可知其能对多类肿瘤发挥出明显的调节作用,且在恶性肿瘤中表达异常,其主要的特异性常表现为对恶性肿瘤细胞增殖、分化的调控^[18]。研究显示,miR-570 可在肿瘤产生及进展中有所参与,且可有效调节肿瘤免疫有关的靶向基因,进而对肝癌细胞的侵袭、转移、增殖及凋亡的过程发挥一定的干预效果,同时可经调节 B7-H1 基因进行靶向调控,抑制肝癌细胞的侵袭、增殖^[19]。研究发现,与人体正常的肝组织比较,肝癌细胞组织中的 lncRNA SNHG16 表达升高,miR-570 呈低表达,且在 HepG2-R+pcDNA SNHG16 组及 HepG2-R+anti-miR-570 组

中迁移细胞的个数及 CyclinD1、P21、MMP-9、MMP-2、miR-570 的表达水平降低, lncRNA SNHG16、抑制率、凋亡率及 P21 的表达水平升高; CyclinD1、MMP-9、MMP-2 的表达水平降低, 抑制率、凋亡率及 P21 的表达水平升高, 促进肝癌细胞的发展, 经对 lncRNA SNHG16 水平进行调控可有效改善 HepG2-R 细胞耐药性, 与其他学者研究较相似^[20-21]。表明 lncRNA SNHG16 经调控 miR-570 水平表达, 可有效改善 HepG2 细胞对索拉非尼耐药。

综上所述, 在肝癌细胞中分析 lncRNA SNHG16、miR-570 的作用, 探究 lncRNA SNHG16、miR-570 在肝癌病症中的病理机制, 结果显示 lncRNA SNHG16 在肝癌索拉非尼耐药细胞中呈高水平表达, 经靶向调控 miR-570 表达可有效促进索拉非尼的耐药性, 为临床进一步分析肝癌索拉非尼耐药病理机制指明了方向。

参考文献:

- [1] Li X, Ramadori P, Pfister D, et al. The immunological and metabolic landscape in primary and metastatic liver cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(9): 541-557.
- [2] Pope ED 3rd, Kimbrough EO, Vemireddy LP, et al. Aberrant lipid metabolism as a therapeutic target in liver cancer [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2019, 23(6): 473-483.
- [3] 胡惠华, 陈大红, 刁文婧, 等. G6PD 调控 PI3K/Akt 信号通路诱导肝癌细胞索拉非尼耐药的机制研究 [J]. *中国药房*, 2022, 33(19): 2338-2342.
- [4] 陈鹏, 崔锐, 梁鸿飞, 等. microRNA-124 靶向髓样分化因子 88 增强肝癌细胞对索拉非尼敏感性的研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38(9): 913-918.
- [5] 刘景云, 杨斌, 熊丽, 等. 上皮性卵巢癌患者血清 miR-302b-3p、lncRNA SNHG16 水平变化及其临床意义 [J]. *山东医药*, 2022, 62(16): 9-13.
- [6] 袁冲, 赵征, 廖子君, 等. 血清 miR-122 和 miR-570 联合检测对原发性肝癌的临床诊断价值 [J]. *现代肿瘤医学*, 2021, 29(2): 267-270.
- [7] Liu J, Li P, Wang L, et al. Cancer-associated fibroblasts provide a stromal niche for liver cancer organoids that confers trophic effects and therapy resistance [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2021, 11(2): 407-431.
- [8] 徐彦楠, 赵青, 赵俊霞, 等. 异牛肝菌素对人肝癌细胞增殖、

凋亡影响及其与 PI3K/Akt 通路的关系 [J]. *山东医药*, 2022, 62(20): 1-5.

- [9] 曹绍华, 王庆庆, 张金冉. 索拉非尼联合卡培他滨治疗肝细胞肝癌疗效及对患者血清 miR-212 和 miR-132 水平的影响 [J]. *陕西医学杂志*, 2020, 49(5): 615-618.
- [10] 刘路政, 陈家诚, 陈良, 等. HBx 不同表达水平对 HepG2 肝癌细胞增殖、侵袭以及索拉非尼耐药的影响 [J]. *中华肝胆外科杂志*, 2021, 27(11): 842-846.
- [11] 林智才, 陈燕丽, 苏小清, 等. Hsp90 抑制剂减弱肝癌耐药细胞株对索拉非尼诱导铁死亡的耐受性 [J]. *现代肿瘤医学*, 2022, 30(21): 3862-3868.
- [12] 黄玉双, 孙艾军, 高鹏, 等. 索拉非尼通过调节 Beclin-1 的表达诱导肝癌细胞自噬的实验研究 [J]. *中国现代普通外科进展*, 2021, 24(3): 220-222, 226.
- [13] 韩丽丽, 吴菲, 黄蓝莹, 等. 香菇多糖对培养肝癌细胞索拉非尼耐药的逆转作用及机制 [J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2021, 42(1): 48-52, 64.
- [14] 陶玲. lncRNA SNHG16 促进宫颈癌细胞增殖、迁移、侵袭并抑制凋亡及机制初探 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2021, 29(4): 449-457.
- [15] 周云松, 温小辉, 张琦, 等. lncRNA SNHG16 在结直肠癌组织和细胞中表达及其调控结肠癌细胞中 GPAM 表达的机制 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(1): 58-66.
- [16] 倪志福, 汪晓玲, 屈振繁, 等. lncRNA SNHG16 通过靶向 miR-22-3p 调控肾母细胞瘤 WIT49 细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的分子机制 [J]. *临床外科杂志*, 2021, 29(9): 883-888.
- [17] 李萍, 刁玉佩, 宋春霞. 长链非编码 RNA SNHG16 通过微小 RNA-455-3p/Nocth2 对鼻咽癌细胞增殖、凋亡和周期的影响 [J]. *中华实验外科杂志*, 2022, 39(10): 1964-1967.
- [18] 杨大伟, 刘晓飞, 钱娟娟. TIPE2、IP-10、miR-570 在肝癌患者外周血单个核细胞中的表达及意义 [J]. *国际检验医学杂志*, 2022, 43(18): 2196-2200.
- [19] 孙凤仪, 黄煜, 刘敏敏, 等. miR-124 联合 miR-570 在宫颈癌不同病变阶段组织中的表达及其意义 [J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2022, 43(5): 734-737.
- [20] 胡娜, 盛磊, 饶辉, 等. 淫羊藿素对肝癌 HepG2 细胞的抗增殖作用及其机制研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38(16): 1887-1891.
- [21] 郭梦雅, 邵晓雯, 黄佳宁, 等. LINC02870 对肝细胞性肝癌细胞增殖的影响及机制 [J]. *山东医药*, 2022, 62(31): 48-51.

[收稿日期] 2023-03-23