

赵建刚,赵光远,鲍双振,等. LncRNA SNHG16 通过 miR-106b-5p/PHF1 轴调节结直肠癌细胞的增殖、凋亡、迁移和侵袭 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(2): 56-65.
Zhao JG, Zhao GY, Bao SZ, et al. LncRNA SNHG16 regulates the proliferation, apoptosis, migration, and invasion of colorectal cancer cells via the miR-106b-5p/PHF1 axis [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(2): 56-65.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.02.008

LncRNA SNHG16 通过 miR-106b-5p/PHF1 轴调节 结直肠癌细胞的增殖、凋亡、迁移和侵袭

赵建刚,赵光远,鲍双振,刘义粉*

(衡水市人民医院,河北 衡水 053000)

【摘要】 目的 探讨长链非编码 RNA(LncRNA)小核仁 RNA 宿主基因 16(SNHG16)通过 miR-106b-5p/聚梳组蛋白家族指蛋白 1(PHF1)轴对结直肠癌(CRC)细胞的增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响。**方法** 实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 CRC 组织、相邻正常组织及体外培养的 CRC 细胞系(LoVo、Caco-2、HCT116 和 SW480)和正常人结肠上皮细胞(CCD 841 CON)中 SNHG16、miR-106b-5p、PHF1 表达。将 SW480 细胞随机分组为对照组、si-NC 组、si-SNHG16 组、si-SNHG16+inhibitor-NC 组、si-SNHG16+miR-106b-5p inhibitor 组、si-PHF1 组、miR-NC 组、miR-106b-5p 组、miR-106b-5p+pcDNA 组、miR-106b-5p+pcDNA-PHF1 组。采用 qRT-PCR 检测各组 SW480 细胞中 SNHG16、miR-106b-5p 和 PHF1 的表达水平。MTT 法、流式细胞术和 Transwell 法分别检测 SW480 细胞的增殖、凋亡、迁移和侵袭能力。双荧光素酶报告基因实验验证 SNHG16、miR-106b-5p 和 PHF1 之间的相互作用。Western blot 检测 PHF1 的蛋白水平。**结果** SNHG16 和 PHF1 在 CRC 组织和细胞中高表达,miR-106b-5p 低表达($P < 0.05$)。选择 SNHG16 表达最高的 SW480 细胞进行转染实验。SNHG16 的下调降低了 SW480 细胞的增殖、迁移、侵袭,促进了 SW480 细胞的凋亡($P < 0.05$)。miR-106b-5p 可与 SNHG16 相互作用,其抑制剂恢复沉默 SNHG16 对 SW480 细胞进展的抑制作用($P < 0.05$)。PHF1 是 miR-106b-5p 的靶点,沉默 PHF1 可抑制 SW480 细胞的进展($P < 0.05$)。PHF1 过表达恢复了 miR-106b-5p 对 SW480 细胞进展的抑制作用($P < 0.05$)。SNHG16 通过下调 miR-106b-5p 促进 SW480 细胞中 PHF1 的表达($P < 0.05$)。**结论** LncRNA SNHG16 通过靶向调控 miR-106b-5p/PHF1 轴促进 CRC 细胞的增殖、迁移和侵袭并抑制凋亡。

【关键词】 结直肠癌;小核仁 RNA 宿主基因 16;miR-106b-5p;聚梳组蛋白家族指蛋白 1;凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 02-0056-10

LncRNA SNHG16 regulates the proliferation, apoptosis, migration, and invasion of colorectal cancer cells via the miR-106b-5p/PHF1 axis

ZHAO Jiangang, ZHAO Guangyuan, BAO Shuangzhen, LIU Yifen*
(Hengshui People's Hospital, Hengshui 053000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of long non-coding RNA (LncRNA) small nucleolar RNA host gene 16 (SNHG16) on the proliferation, apoptosis, migration, and invasion of colorectal cancer (CRC) cells via the miR-106b-5p/PHD family finger protein 1 (PHF1) axis. **Methods** The expression of SNHG16, miR-106b-5p, and PHF1 in

[基金项目]衡水市科技计划项目(2020014045Z)。

[作者简介]赵建刚(1986—),男,硕士,研究方向:胃肠道恶性肿瘤。E-mail:tiank2022@126.com

[通信作者]刘义粉(1983—),女,硕士,研究方向:胃肠道恶性肿瘤。E-mail:275078746@qq.com

CRC tissues, adjacent normal tissues, CRC cell lines (LoVo, Caco-2, HCT116 and SW480), and normal human colon epithelial cells (CCD 841 CON) was determined by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). SW480 cells were randomly divided into Control group, si-NC group, si-SNHG16 group, si-SNHG16+inhibitor-NC group, si-SNHG16+miR-106b-5p inhibitor group, si-PHF1 group, miR-NC group, miR-106b-5p group, miR-106b-5p+pcDNA group, and miR-106b-5p+pcDNA-PHF1 group. The expression levels of SNHG16, miR-106b-5p, and PHF1 in SW480 cells were detected by qRT-PCR. The proliferation, apoptosis, migration, and invasion abilities of SW480 cells were detected by MTT method, flow cytometry and Transwell method, respectively. The interactions between SNHG16, miR-106b-5p, and PHF1 were verified by dual luciferase reporter gene experiments. The protein level of PHF1 was measured by Western blot. **Results** SNHG16 and PHF1 were expressed at high levels, while miR-106b-5p was expressed at low levels ($P < 0.05$), in CRC tissues and cells. SW480 cells with the highest expression of SNHG16 were selected for a transfection experiment. The down-regulation of SNHG16 reduced the proliferation, migration, and invasion and promoted the apoptosis of SW480 cells ($P < 0.05$). MiR-106b-5p was able to interact with SNHG16, and its inhibitor restored the inhibitory effect of silencing SNHG16 on SW480 cell progression ($P < 0.05$). PHF1 was a target of miR-106b-5p, and silencing PHF1 inhibited the progression of SW480 cells ($P < 0.05$). PHF1 overexpression restored the inhibitory effect of miR-106b-5p on CRC cell progression ($P < 0.05$). SNHG16 promoted the expression of PHF1 in SW480 cells by down-regulating miR-106b-5p ($P < 0.05$). **Conclusions** LncRNA SNHG16 regulates miR-106b-5p/PHF1 axis by targeting to promote the proliferation, migration, and invasion of CRC cells and inhibits apoptosis.

【Keywords】 colorectal cancer; small nucleolar RNA host gene 16; miR-106b-5p; PHD family finger protein 1; apoptosis

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

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)已成为世界范围内的一种常见癌症,且进展迅速^[1]。据统计,2018 年全球新增 CRC 病例超过 180 万例,发病率和死亡率分别居世界第三位和第二位^[2]。近几十年来,在 CRC 的预防、诊断和治疗方面取得了显著进展^[3]。然而,由于 CRC 发病机制复杂,其 5 年生存率仍然很低^[4]。因此,阐明 CRC 的分子机制,探索治疗 CRC 的新途径迫在眉睫。研究表明,长链非编码 RNA(lncRNAs)和 microRNAs(miRNAs)在 CRC 发展过程中可作为癌基因或抑癌基因,调控细胞增殖、侵袭、凋亡和预后^[5-7]。小核仁 RNA 宿主基因 16(small nucleolar RNA host gene 16, SNHG16)已被证明在许多癌症中高表达,包括肝细胞癌^[8]、骨肉瘤^[9]和胰腺癌^[10]。同样, Li 等^[11]发现 SNHG16 在 CRC 中表达增加,且与 CRC 患者预后不良相关。此外,一些研究证实 SNHG16 与 CRC 的增殖、转移等恶性生物学行为及脂质代谢有关^[12-14]。然而,目前关于 SNHG16 调控 CRC 进展的分子机制研究较少。有研究表明 SNHG16 通过调控 miR-106b-5p 促进腹主动脉瘤生长并抑制凋亡^[15],但二者是否在 CRC 进展中发挥作用尚无研究。另外,前期生物学信息分析显示 miR-106b-5p 与聚梳组蛋白家族指蛋白 1(PHD finger protein 1, PHF1)存在靶向结合关系,然而 miR-106b-5p 能否通过调控 PHF1 表达影响 CRC

进展目前仍不清楚。本研究将探讨 SNHG16 在 CRC 进展中的作用及其与 miR-106b-5p/PHF1 轴的关系,为 CRC 的靶向治疗提供新的可能性。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞

CRC 细胞系(LoVo、Caco-2、HCT116 和 SW480)和正常人结肠上皮细胞(CCD 841 CON)购自上海钰博生物科技有限公司。

1.1.2 组织样本

收集 2020~2021 年哈励逊国际和平医院收治的未经任何治疗的 100 例 CRC 患者的肿瘤组织及相邻正常组织,标本迅速置于液氮中保存。所有患者均签署知情同意书,本研究方案经哈励逊国际和平医院伦理委员会批准(202001003)。

1.2 主要试剂与仪器

SNHG16 和 PHF1 的小干扰 RNA(si-SNHG16 和 si-PHF1)或阴性对照(si-NC), SNHG16 和 PHF1 过表达质粒(pcDNA-SNHG16 和 pcDNA-PHF1)或阴性对照(pcDNA), miR-106b-5p 模拟物(miR-106b-5p), miR-106b-5p 抑制剂(miR-106b-5p inhibitor)及其阴性对照(miR-NC 和 inhibitor-NC)均购自广州锐博生物公司; RPMI-1640(美国 Gibco 公司,批号:

11875119); Lipofectamine 3000 和 TRIzol 试剂 (Invitrogen, 批号: L3000001、15596018); 反转录试剂盒、Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒和增强化学发光 (ECL) 溶液 (上海翌圣公司, 批号: 11119ES60、40302ES20、36208ES60); SYBR Green 和 Matrigel、BCA 检测试剂盒 (北京索莱宝公司, 批号: SR4110、356234、PC0020); MTT 试剂盒、双荧光素酶报告试剂盒 (上海艾博抗公司, 批号: ab211091、ab287865); 裂解缓冲液 (北京百奥莱博公司, 批号: MT0066); 抗 PHF1、GAPDH 的一抗及辣根过氧化物酶偶联的二抗 (武汉艾美捷科技有限公司, 批号: 70R-33702、70R-32845、111-036-047)。ABI7500 系统 (美国应用生物系统公司); FlowSight 型流式细胞仪 (德国默克公司); 6XB-PC 型显微镜 (上光仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养和转染

RPMI-1640 培养液中加入 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 0.1 mg/mL 链霉素, 所有细胞置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。使用 Lipofectamine 3000 将所有寡核苷酸或质粒载体转染到 SW480 细胞中, 并依次命名为对照组、si-NC 组、si-SNHG16 组、si-SNHG16 + inhibitor-NC 组、si-SNHG16 + miR-106b-5p inhibitor 组、si-PHF1 组、miR-NC 组、miR-106b-5p 组、miR-106b-5p + pcDNA 组、miR-106b-5p + pcDNA-PHF1 组。

1.3.2 实时定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)

用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 用反转录试剂盒合成 cDNA。利用 ABI7500 系统, 采用 SYBR Green 量化 SNHG16、miR-106b-5p 和 PHF1 的水平。扩增条件如下: 在 95℃ 预变性 5 min, 在 95℃ 变性 15 s, 在 55℃ 退火 30 s, 在 60℃ 延伸 1 min, 40 个循环。GAPDH 和 U6 被用作内对照。引物如下: SNHG16: F 5'-CAGAATGCCATGTTTCCCC-3', R 5'-TGGCAAGAGACTTCTGAGG-3'; PHF1: F 5'-CCATCTTGTCTGTATCACCT-3', R 5'-GAAATGAAACGGTCTTGTG-3'; GAPDH: F 5'-CCACATCGCTCAGACACCAT-3', R 5'-ACCAGCGCCCAATACG-3'; miR-106b-5p: F 5'-TGCGGCAACACCAGTCGATGG-3', R 5'-CCAGTGCAGGGTCCGAGGT-3'; U6: F 5'-CTCGCTTCGGGCAGCACA-3', R 5'-AACGCTTCACGAATTGCCT-3'。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算其相对表达水平。

1.3.3 细胞活力测定

采用 MTT 检测 CRC 细胞增殖。转染 24 h、48 h、96 h 后的 SW480 细胞用 MTT 溶液培养 4 h, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤细胞后, 加入二甲基亚砷震动溶解 10 min, 用分光光度计测定 490 nm 处的吸光度 (OD) 值。OD 值与细胞活力呈正比。

1.3.4 流式细胞术

Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡。胰蛋白酶消化后, 将 SW480 细胞用 PBS 重新悬浮, 收集到离心管中。离心后收集 2×10⁵ 个细胞, 加入 100 μL 1×Binding Buffer 重悬细胞; 然后添加 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI, 充分混匀, 避光 20 min, 加入 400 μL 1×Binding Buffer, 混匀, 置于冰上, 1 h 内用流式细胞仪检测细胞的荧光信号, 评价凋亡细胞的数量。

1.3.5 Transwell 实验

采用 8 μm 聚碳酸酯膜进行 Transwell 检测。上腔室预涂上 Matrigel 以检测细胞侵袭, 而未涂上 Matrigel 以检测细胞迁移。收集转染后的 SW480 细胞 (2×10⁵/mL), 并将 200 μL 植入上腔室。上腔室充满无血清培养基, 下腔室充满 500 μL 含血清培养基。24 h 后, 吸去多余液体, 用多聚甲醛 (上室 200 μL, 下室 500 μL) 固定 30 min; 弃去固定液, PBS 清洗后晾干 3~5 min, 加入结晶紫染色 20 min; 弃去染色液, PBS 清洗 2 次, 晾干。最后, 在显微镜下拍摄图像, 观察并计数迁移和侵袭细胞的数量。

1.3.6 双荧光素酶报告分析

Starbase3.1 工具预测 miR-106b-5p 与 SNHG16、PHF1 的靶向结合位点。含有 miR-106b-5p 结合位点和突变结合位点的 SNHG16 野生型 (WT-SNHG16) 和突变型 (MUT-SNHG16) 报告载体由安徽通用生物系统公司合成。同样, WT-PHF1/MUT-PHF1 报告载体的构建方法也相同。使用 Lipofectamine 3000 将上述报告载体与 miR-106b-5p 模拟物和 miR-NC 共转染到 SW480 细胞中, 分为 miR-NC + WT-SNHG16 组、miR-106b-5p + WT-SNHG16 组、miR-NC + MUT-SNHG16 组、miR-106b-5p + MUT-SNHG16 组和 miR-NC + WT-PHF1 组、miR-106b-5p + WT-PHF1 组、miR-NC + MUT-PHF1 组、miR-106b-5p + MUT-PHF1 组。48 h 后, 采用双荧光素酶报告试剂盒检测萤火虫和海肾荧光素酶产生的荧光强度, 以评价细胞的荧光素酶活性 (萤火虫

荧光素酶荧光强度/海肾荧光素酶荧光强度)。

1.3.7 Western blot 分析

用 400 μ L 含 PMSF 的裂解缓冲液在冰上裂解 SW480 细胞 30 min, 细胞收集在离心管中。离心后将上清分装保存。冻存的上清于室温下放置 0.5 h, 用 BCA 检测试剂盒检测蛋白浓度。等量蛋白质样品用 SDS-PAGE 分离, 然后转移到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂牛奶阻断后, 用抗 PHF1 的一抗 (1:2000) 或 GAPDH (1:5000) 的一抗在 4℃ 过夜培养膜, 然后用辣根过氧化物酶偶联的二抗 (1:2000) 培养膜。用 ECL 溶液使膜显影, 用凝胶图像处理系统分析目标条带的分子量和灰度值。

1.4 统计学方法

实验数据以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。采用 GraphPad 5.0 软件进行统计学分析。正常组织和肿瘤组织间数据比较采用 *t* 检验, 3 组及以上用单因素方差分析进行数据比较, 并使用 SNK-*q* 检验进行组内两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SNHG16、miR-106b-5p、PHF1 mRNA 在 CRC 中的表达

如表 1 所示, 与相邻正常组织相比, SNHG16、PHF1 mRNA 在 CRC 肿瘤组织中的表达明显升高, miR-106b-5p 明显降低 ($P < 0.05$)。此外, 与 CCD 841 CON 细胞相比, LoVo、Caco-2、HCT116 和 SW480 细胞中 SNHG16、PHF1 mRNA 水平也上调, miR-106b-5p 水平则下调 ($P < 0.05$), 见表 2。由于 SW480 细胞中 SNHG16、miR-106b-5p、PHF1 mRNA 的水平与 CCD 841 CON 细胞相差最大, 故以 SW480 细胞作为接下来的实验对象。

2.2 miR-106b-5p 与 CRC 中的 SNHG16 存在靶向关系

Starbase3.1 工具预测显示 miR-106b-5p 与

表 1 qRT-PCR 检测 SNHG16、miR-106b-5p、PHF1 mRNA 在 CRC 组织中的表达 ($\bar{x}\pm s, n=100$)

Table 1 Expression of SNHG16, miR-106b-5p, PHF1 mRNA detected by qRT-PCR in CRC tissues

组织 Tissues	SNHG16	miR-106b-5p	PHF1 mRNA
正常组织 Normal tissue	1.00 $\pm$ 0.12	1.00 $\pm$ 0.23	1.00 $\pm$ 0.35
肿瘤组织 Tumor tissue	3.17 $\pm$ 0.86	0.51 $\pm$ 0.06	4.02 $\pm$ 0.71
<i>t</i>	24.990	20.614	38.152
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000

SNHG16 具有互补结合位点, 见图 1。表 3 显示, miR-106b-5p+WT-SNHG16 组的荧光素酶活性显著低于 miR-NC+WT-SNHG16 组 ($P < 0.05$), 而 miR-NC+MUT-SNHG16 组与 miR-106b-5p+MUT-SNHG16 组间的荧光素酶活性无明显差异 ($P > 0.05$)。此外, SNHG16 过表达后 miR-106b-5p 表达减少, SNHG16 敲低后 miR-106b-5p 表达增加 ($P < 0.05$), 见表 4。

2.3 miR-106b-5p inhibitor 恢复 SNHG16 敲低对 CRC 细胞进展的抑制作用

si-SNHG16 组与对照组、si-NC 组相比, SNHG16 显著降低, miR-106b-5p 显著升高, OD 值和迁移、侵

表 2 qRT-PCR 检测 SNHG16、miR-106b-5p、PHF1 mRNA 在 CRC 细胞系中的表达 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Expression of SNHG16, miR-106b-5p, PHF1 mRNA detected by qRT-PCR in CRC cell lines

细胞系 Cell lines	SNHG16	miR-106b-5p	PHF1 mRNA
CCD 841 CON	1.00 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.05
LoVo	4.79 $\pm$ 0.45 *	0.59 $\pm$ 0.05 *	3.78 $\pm$ 0.63 *
Caco-2	4.98 $\pm$ 0.52 *	0.51 $\pm$ 0.03 *	3.89 $\pm$ 0.56 *
HCT116	5.26 $\pm$ 0.63 *	0.45 $\pm$ 0.04 *	4.03 $\pm$ 0.72 *
SW480	5.51 $\pm$ 0.49 *	0.39 $\pm$ 0.02 *	4.21 $\pm$ 0.69 *

注: 与 CCD 841 CON 比较, * $P < 0.05$ 。

Note. Compared with CCD 841 CON, * $P < 0.05$.

表 3 双荧光素酶报告基因检测 CRC 细胞中 miR-106b-5p 与 SNHG16 的相互作用 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Interaction between miR-106b-5p and SNHG16 detected by double luciferase reporter gene in CRC cells

组别 Groups	相对荧光素酶活性 Relative luciferase activity
miR-NC+WT-SNHG16 组 miR-NC+WT-SNHG16 group	1.00 $\pm$ 0.06
miR-106b-5p+WT-SNHG16 组 miR-106b-5p+WT-SNHG16 group	0.48 $\pm$ 0.02 *
miR-NC+MUT-SNHG16 组 miR-NC+MUT-SNHG16 group	1.01 $\pm$ 0.04
miR-106b-5p+MUT-SNHG16 组 miR-106b-5p+MUT-SNHG16 group	1.00 $\pm$ 0.07

注: 与 miR-NC+WT-SNHG16 组比较, * $P < 0.05$ 。

Note. Compared with miR-NC+WT-SNHG16 group, * $P < 0.05$.

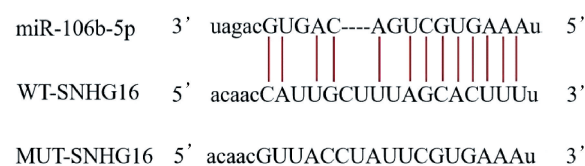


图 1 miR-106b-5p 与 SNHG16 的结合位点及突变序列

Figure 1 Binding site and mutation sequence of miR-106b-5p and SNHG16

侵袭数量显著减少,凋亡细胞显著增多($P < 0.05$); si-SNHG16+miR-106b-5p inhibitor 组与 si-SNHG16 组、si-SNHG16+inhibitor-NC 组相比, SNHG16 显著增高, miR-106b-5p 显著下降, OD 值和迁移、侵袭数量明显增多, 凋亡细胞明显减少($P < 0.05$), 见图 2、表 5。

2.4 PHF1 的沉默抑制了 CRC 细胞的增殖、迁移、侵袭, 促进 CRC 细胞的凋亡

si-PHF1 组 PHF1 的表达显著低于对照组和 si-NC 组, OD 值和迁移、侵袭细胞数量明显减少, 凋亡细胞明显增加($P < 0.05$), 见图 3、表 6。

表 4 qRT-PCR 检测各组 CRC 细胞中 miR-106b-5p 表达($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Expression of miR-106b-5p detected by qRT-PCR in CRC cells of each group

组别 Groups	miR-106b-5p
pcDNA 组	1.00±0.03
pcDNA group	
pcDNA-SNHG16 组	0.49±0.02 *
pcDNA-SNHG16 group	
si-NC 组	1.00±0.02
si-NC group	
si-SNHG16 组	2.26±0.15 #
si-SNHG16 group	

注: 与 pcDNA 组比较, * $P < 0.05$; 与 si-NC 组比较, # $P < 0.05$ 。

Note. Compared with pcDNA group, * $P < 0.05$. Compared with si-NC group, # $P < 0.05$.

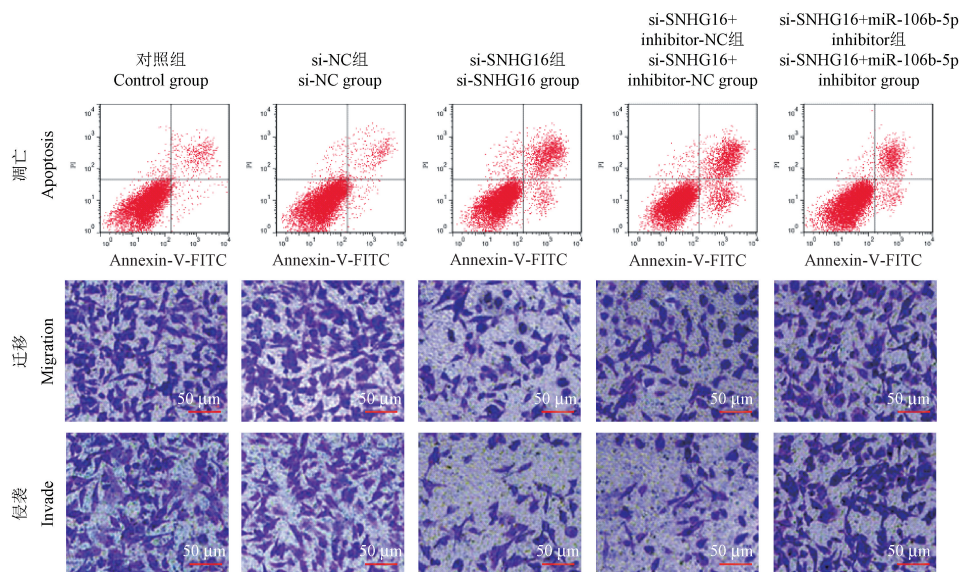


图 2 SNHG16 和 miR-106b-5p 的下调控 CRC 细胞的凋亡、迁移和侵袭

Figure 2 Down-regulation of SNHG16 and miR-106b-5p regulates apoptosis, migration and invasion of CRC cells

表 5 SNHG16 和 miR-106b-5p 的下调控 CRC 细胞的进展($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Down-regulation of SNHG16 and miR-106b-5p regulates the progression of CRC cells

组别 Groups	SNHG16	miR-106b-5p	OD 值(490 nm) OD value(490 nm)			凋亡细胞(%) Apoptosis cells	迁移细胞数 Migrating cell number	侵袭细胞数 Invaded cell number
			24 h	48 h	72 h			
对照组 Control group	1.00±0.03	1.00±0.02	0.36±0.03	0.73±0.04	1.19±0.15	6.87±0.52	198.53±13.24	146.76±12.86
si-NC 组 si-NC group	0.98±0.02	0.99±0.03	0.34±0.02	0.71±0.05	1.16±0.17	6.90±0.53	197.29±13.18	145.58±12.79
si-SNHG16 组 si-SNHG16 group	0.46±0.03 **	2.23±0.12 **	0.28±0.01 **	0.35±0.03 **	0.51±0.06 **	28.91±3.16 **	95.87±11.06 **	50.02±7.23 **
si-SNHG16+ inhibitor-NC 组 si-SNHG16+ inhibitor-NC group	0.48±0.04	2.21±0.18	0.29±0.02	0.38±0.04	0.53±0.05	28.75±3.12	96.93±11.12	51.26±7.28
si-SNHG16+miR- 106b-5p inhibitor 组 si-SNHG16+miR- 106b-5p inhibitor group	0.85±0.05 & §	1.52±0.15 & §	0.35±0.02 & §	0.62±0.03 & §	0.98±0.19 & §	19.03±3.21 & §	159.24±12.25 & §	100.05±12.34 & §

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 si-NC 组比较, # $P < 0.05$; 与 si-SNHG16 组比较, & $P < 0.05$; 与 si-SNHG16+anti-miR-NC 组比较, § $P < 0.05$ 。

Note. Compared with control group, * $P < 0.05$. Compared with si-NC group, # $P < 0.05$. Compared with si-SNHG16 group, & $P < 0.05$. Compared with si-SNHG16+anti-miR-NC group, § $P < 0.05$.

2.5 PHF1 是 miR-106b-5p 在 CRC 中的靶点

Starbase3.1 工具预测显示 PHF1 与 miR-106b-5p 存在相互作用的位点(图 4)。表 7 显示,与 miR-NC+WT-PHF1 组相比,miR-106b-5p+WT-PHF1 组细胞的荧光素酶活性显著降低($P < 0.05$);而与 miR-NC+MUT-PHF1 组相比,miR-106b-5p+MUT-PHF1 组细胞的荧光素酶活性差异不大($P > 0.05$)。此外,miR-106b-5p 过表达后 PHF1 表达减少,miR-106b-5p 敲低后 PHF1 表达增加($P < 0.05$),见图 5、表 8。

2.6 过表达的 PHF1 恢复了 miR-106b-5p 对 CRC 细胞进展的抑制作用

miR-106b-5p 组与对照组、miR-NC 组相比,

PHF1 显著降低,OD 值和迁移、侵袭数量明显减少,凋亡细胞明显增多($P < 0.05$);miR-106b-5p+pcDNA-PHF1 组与 miR-106b-5p 组、miR-106b-5p+pcDNA 组相比,PHF1 显著增高,OD 值和迁移、侵袭数量显著增多,凋亡细胞显著减少($P < 0.05$),见图 6、表 9。

2.7 SNHG16 通过海绵吸附 miR-106b-5p 调控 CRC 细胞中 PHF1 的表达

si-SNHG16 组与对照组、si-NC 相比,PHF1 mRNA 和蛋白水平明显降低($P < 0.05$);si-SNHG16+miR-106b-5p inhibitor 组与 si-SNHG16 组、si-SNHG16+inhibitor-NC 组相比,PHF1 mRNA 和蛋白水平明显升高($P < 0.05$),见图 7、表 10。

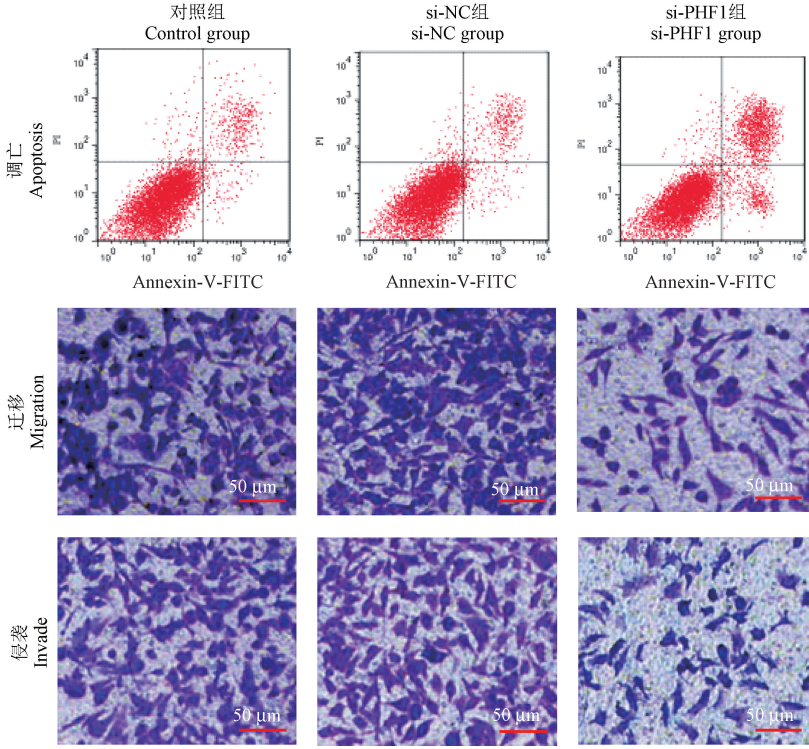


图 3 SNHG16 和 miR-106b-5p 的下调控 CRC 细胞的凋亡、迁移和侵袭

Figure 3 Down-regulation of SNHG16 and miR-106b-5p regulates apoptosis, migration and invasion of CRC cells

表 6 沉默的 PHF1 调控 CRC 细胞的进展($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 6 Progression of CRC cells regulated by silenced PHF1

组别 Groups	PHF1	OD 值(490 nm) OD value(490 nm)			凋亡细胞(%) Apoptosis cells	迁移细胞数 Migrating cell number	侵袭细胞数 Invaded cell number
		24 h	48 h	72 h			
对照组 Control group	1.00±0.04	0.38±0.03	0.74±0.03	1.12±0.18	5.06±0.08	215.32±20.31	139.35±17.45
si-NC 组 si-NC group	1.01±0.03	0.36±0.02	0.72±0.05	1.09±0.16	5.09±0.11	213.28±20.27	137.31±17.48
si-PHF1 组 si-PHF1 group	0.39±0.02 ^{**}	0.32±0.01 ^{**}	0.37±0.02 ^{**}	0.51±0.09 ^{**}	25.46±2.39 ^{**}	106.48±12.15 ^{**}	51.23±10.16 ^{**}

注:与对照组比较, * $P < 0.05$;与 si-NC 组比较, # $P < 0.05$ 。

Note. Compared with control group, * $P < 0.05$. Compared with si-NC group, # $P < 0.05$.

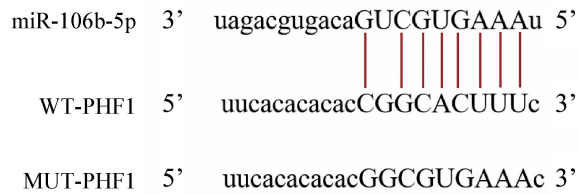


图 4 PHF1 与 miR-106b-5p 的结合位点及突变序列

Figure 4 Binding sites and mutation sequences of PHF1 and miR-106b-5p

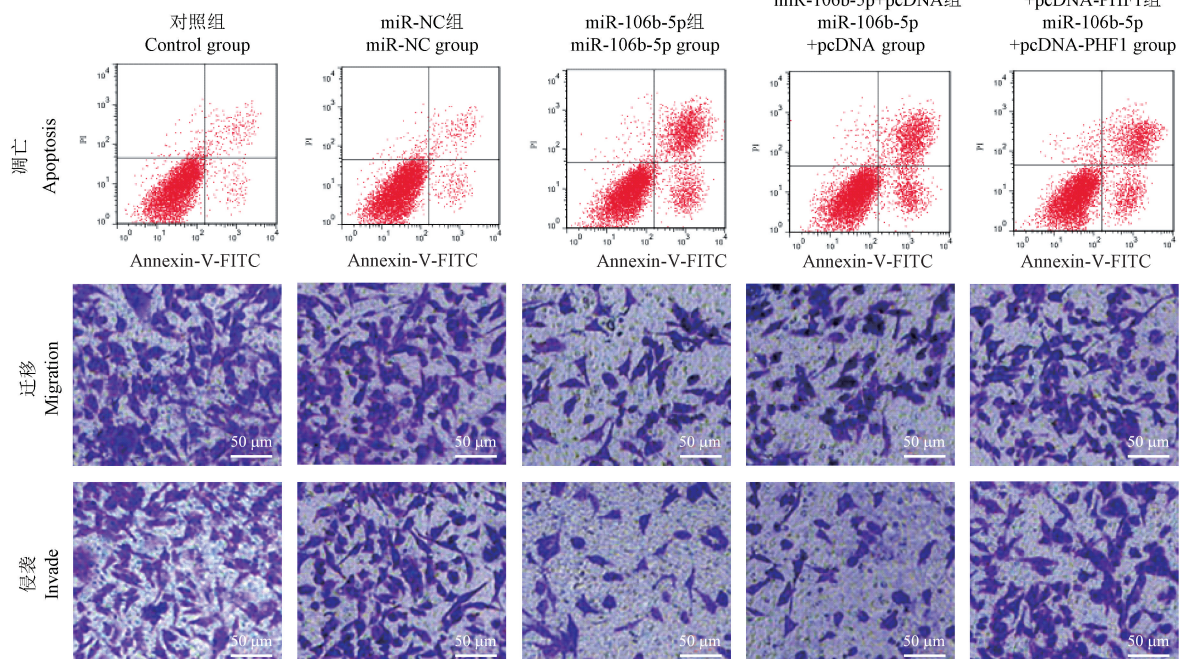


图 6 miR-106b-5p 和 PHF1 过表达调控 CRC 细胞的生物学过程

Figure 6 miR-106b-5p and PHF1 overexpression regulate the biological process of CRC cells

表 7 双荧光素酶报告基因检测证实 PHF1 可以在 CRC 细胞中与 miR-106b-5p 相互作用 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 7 Dual luciferase reporter gene assay confirmed that PHF1 could interact with miR-106b-5p in CRC cells

组别 Groups	相对荧光素酶活性 Relative luciferase activity
miR-NC+WT-PHF1 组 miR-NC+WT-PHF1 group	1.00±0.03
miR-106b-5p+WT-PHF1 组 miR-106b-5p+WT-PHF1 group	0.45±0.02*
miR-NC+MUT-PHF1 组 miR-NC+MUT-PHF1 group	1.00±0.04
miR-106b-5p+MUT-PHF1 组 miR-106b-5p+MUT-PHF1 group	0.97±0.05

注:与 miR-NC+WT-PHF1 组比较, * $P < 0.05$ 。

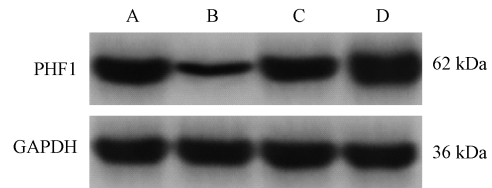
Note. Compared with miR-NC+WT-PHF1 group, * $P < 0.05$.

表 8 过表达或抑制 miR-106b-5p 对 PHF1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 8 Influence of overexpression or inhibition of miR-106b-5p on PHF1 expression

组别 Groups	PHF1 mRNA	PHF1 蛋白 PHF1 protein
miR-NC 组 miR-NC group	1.00±0.11	1.00±0.13
miR-106b-5p 组 miR-106b-5p group	0.41±0.03*	0.38±0.02*
inhibitor-NC 组 inhibitor-NC group	0.99±0.08	1.00±0.09
miR-106b-5p inhibitor 组 miR-106b-5p inhibitor group	1.86±0.25 [#]	1.74±0.21 [#]

注:与 miR-NC 组比较, * $P < 0.05$;与 inhibitor-NC 组比较, [#] $P < 0.05$ 。
Note. Compared with miR-NC group, * $P < 0.05$. Compared with inhibitor-NC group, [#] $P < 0.05$.



注: A: miR-NC 组, B: miR-106b-5p 组, C: inhibitor-NC 组, D: miR-106b-5p inhibitor 组。

图 5 Western blot 检测各组 CRC 细胞中 PHF1 蛋白表达

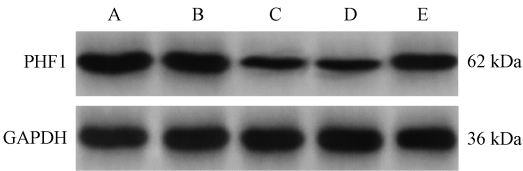
Note. A, miR-NC group. B, miR-106b-5p group. C, inhibitor-NC group. D, miR-106b-5p inhibitor group.

Figure 5 PHF1 protein expression in CRC cells of each group was detected by Western blot

表 9 miR-106b-5p 和 PHF1 过表达调控 CRC 细胞的进展($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 9 miR-106b-5p and PHF1 overexpression regulate the progression of CRC cells

组别 Groups	PHF1	OD 值(490 nm) OD value (490 nm)			凋亡细胞(%) Apoptosis cells	迁移细胞数 Migrating cell number	侵袭细胞数 Invaded cell number
		24 h	48 h	72 h			
对照组 Control group	0.99±0.02	0.47±0.03	0.77±0.06	1.16±0.13	4.95±0.08	236.59±14.43	162.64±16.85
miR-NC 组 miR-NC group	1.00±0.04	0.48±0.05	0.79±0.08	1.18±0.16	4.97±0.11	235.48±14.39	160.58±16.79
miR-106b-5p 组 miR-106b-5p group	0.37±0.02 ^{*#}	0.25±0.02 ^{*#}	0.39±0.03 ^{*#}	0.49±0.04 ^{*#}	24.38±1.62 ^{*#}	114.56±10.28 ^{*#}	50.03±7.64 ^{*#}
miR-106b-5p+pcDNA 组 miR-106b-5p+pcDNA group	0.39±0.03	0.27±0.03	0.36±0.02	0.51±0.03	23.96±1.54	115.14±9.67	51.11±7.69
miR-106b-5p+ pcDNA-PHF1 组 miR-106b-5p+ pcDNA-PHF1 group	0.77±0.05 ^{&§}	0.45±0.03 ^{&§}	0.75±0.06 ^{&§}	1.02±0.08 ^{&§}	18.13±1.25 ^{&§}	168.75±12.14 ^{&§}	107.86±12.47 ^{&§}

注:与对照组比较, ^{*} $P < 0.05$;与 miR-NC 组比较, [#] $P < 0.05$;与 miR-106b-5p 组比较, [&] $P < 0.05$;与 miR-106b-5p+pcDNA 组比较, [§] $P < 0.05$ 。
Note. Compared with control group, ^{*} $P < 0.05$. Compared with miR-NC group, [#] $P < 0.05$. Compared with miR-106b-5p group, [&] $P < 0.05$. Compared with miR-106b-5p+pcDNA group, [§] $P < 0.05$.



注:A: 对照组; B: si-NC 组; C: si-SNHG16 组; D: si-SNHG16 + inhibitor-NC 组; E: si-SNHG16 + miR-106b-5p inhibitor 组。

图 7 Western blot 检测各组 CRC 细胞中 PHF1 蛋白表达

Note. A, Control group. B, si-NC group. C, si-SNHG16 group. D, si-SNHG16 + inhibitor-NC group. E, si-SNHG16+miR-106b-5p inhibitor group.

Figure 7 PHF1 protein expression in CRC cells of each group was detected by Western blot

3 讨论

最近的研究表明,SNHG16 在许多癌症中是一种潜在的致癌基因^[11]。在 CRC 中,He 等^[16]报道 SNHG16 促进了 CRC 进展和肿瘤生长。本研究已与发表的研究结果一致,SNHG16 在 CRC 肿瘤组织和细胞中富集。功能实验证实,SNHG16 的下调抑制了体外 CRC 细胞的进展。与 SNHG16 在其他癌症^[8-10]中的作用一致,本研究结果显示,SNHG16 在 CRC 的发展中发挥了促进作用。因此,阐明 SNHG16 在 CRC 中的分子机制有助于我们开发治疗 CRC 的新方法。

LncRNA 一般通过海绵吸附 miRNA 发挥作用。前期生物信息学预测到 miR-106b-5p 是 SNHG16 的

表 10 抑制 SNHG16 和 miR-106b-5p 可调控 PHF1 的表达($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 10 Inhibition of SNHG16 and miR-106b-5p can regulate PHF1 expression

组别 Groups	PHF1 mRNA	PHF1 蛋白 PHF1 protein
对照组 Control group	1.00±0.02	1.00±0.02
si-NC 组 si-NC group	0.99±0.03	1.01±0.04
si-SNHG16 组 si-SNHG16 group	0.47±0.06 ^{*#}	0.45±0.06 ^{*#}
si-SNHG16+inhibitor-NC 组 si-SNHG16+inhibitor-NC group	0.49±0.04	0.47±0.07
si-SNHG16+miR-106b-5p inhibitor 组 si-SNHG16+miR-106b-5p inhibitor group	0.78±0.08 ^{&§}	0.75±0.09 ^{&§}

注:与对照组比较, ^{*} $P < 0.05$;与 si-NC 组比较, [#] $P < 0.05$;与 si-SNHG16 组比较, [&] $P < 0.05$;与 si-SNHG16 + anti-miR-NC 组比较, [§] $P < 0.05$ 。

Note. Compared with control group, ^{*} $P < 0.05$. Compared with si-NC group, [#] $P < 0.05$. Compared with si-SNHG16 group, [&] $P < 0.05$. Compared with si-SNHG16+anti-miR-NC group, [§] $P < 0.05$.

潜在靶点,但研究发现 miR-106b-5p 在肿瘤中的作用不尽相同。在肝细胞癌^[17]和宫颈鳞状细胞癌^[18]中 miR-106b-5p 表达上调,而在肺癌^[19]和乳腺导管原位癌^[20]中表达下调。近期的研究发现,miR-106b-5p 在 CRC 中较正常组低表达,过表达 miR-106b-5p 抑制 CRC 细胞的增殖和转移^[21-22]。Yang 等^[15]认为 miR-106b-5p 可能参与了 SNHG16 对腹主动脉瘤的调控。因此本研究推测 miR-106b-5p 可能也参与了 SNHG16 对 CRC 进展的调控。本研究首次证明了 SNHG16 在 CRC 中可以海绵吸附 miR-106b-5p,并且 miR-106b-5p 的表达受 SNHG16 在体外的调控。与之前的研究^[21-22]一致,本研究结果显示 miR-106b-5p 在 CRC 中的表达降低。此外,回复实验结果显示,SNHG16 通过海绵吸附 miR-106b-5p

调控 CRC 的增殖、凋亡、迁移和侵袭。因此,我们证实 miR-106b-5p 在 CRC 中也具有抑癌作用。此外,miR-106b-5p 的抗癌作用也有助于我们更好地了解 SNHG16 促进 CRC 进展的潜在原因。

为了明确 SNHG16 通过海绵吸除 miR-106b-5p 影响 CRC 进展的下游机制,本研究通过生物信息学预测了 miR-106b-5p 的下游靶标,结果显示 PHF1 是 miR-106b-5p 的可能靶点。PHF1 是多梳基因 (PcG) 家族的一员,包含两种组蛋白阅读模块,一个 Tudor 域和两个 PHD 手指,是表观遗传调控和基因组维护的重要因子。据报道,PHF1 通过 Tudor 结构域识别 H3K36 me₃,协同 PRC2 在 H3K27 三甲基化上的活性^[23]。另外,PHF1 也与 DNA 损伤修复有关。它与 Ku70-Ku80 物理相互作用,Ku70-Ku80 结合到 DSB 末端,并可能在非同源端连接和维持基因组稳定性中发挥作用^[24]。最近的研究显示,PHF1 在乳腺癌、肺癌等癌症中显著上调表达^[25-26]。然而,PHF1 在 CRC 中的作用还不清楚。与上述的研究结果一致,本研究发现 PHF1 在 CRC 中上调表达,在 CRC 进展中起促癌作用。在机制方面,本研究通过双荧光素酶实验证实 PHF1 是 miR-106b-5p 的靶点。此外,PHF1 的异常表达恢复了 miR-106b-5p 过表达对 CRC 细胞增殖和转移的减弱作用,促进 CRC 的进展。为了更好地了解 SNHG16/miR-106b-5p/PHF1 轴的功能关系,本研究还检测了 SNHG16 和 miR-106b-5p 对 PHF1 水平的影响。结果证实了 SNHG16 通过海绵吸收 miR-106b-5p 调控 PHF1 的表达。这些结果完善了 LncRNA SNHG16 作为 ceRNA 通过海绵 miRNAs 调控下游靶基因表达的假设,丰富了 SNHG16 对 CRC 进展的研究。

当然,目前的研究有一定的局限性。对于细胞的增殖、凋亡和转移相关蛋白水平的检测可以进一步验证本研究的实验结果,进而丰富其实验内容。此外,本研究发现 miR-106b-5p 抑制剂对 SNHG16 敲除的逆转作用只是部分的,提示可能还有其他 miRNAs 参与了 SNHG16 对 CRC 进展的调控,需要进一步证实。

综上所述,本研究首次发现 PHF1 在 CRC 中高表达,且 LncRNA SNHG16 通过吸收 miR-106b-5p,调控 PHF1 表达,促进 CRC 发展。本研究结果明确了 LncRNA SNHG16 与 CRC 分子发病机制的关系,为 CRC 的治疗提供了潜在的途径。

参考文献:

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, et al. Colorectal cancer statistics, 2017 [J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(3): 177-193.
- [2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [3] Lee RM, Cardona K, Russell MC. Historical perspective: two decades of progress in treating metastatic colorectal cancer [J]. J Surg Oncol, 2019, 119(5): 549-563.
- [4] Mody K, Baldeo C, Bekaii-Saab T. Antiangiogenic therapy in colorectal cancer [J]. Cancer J, 2018, 24(4): 165-170.
- [5] Xu J, Meng Q, Li X, et al. Long noncoding RNA MIR17HG promotes colorectal cancer progression via miR-17-5p [J]. Cancer Res, 2019, 79(19): 4882-4895.
- [6] Liu L, Wang HJ, Meng T, et al. lncRNA GAS5 inhibits cell migration and invasion and promotes autophagy by targeting miR-222-3p via the GAS5/PTEN-signaling pathway in CRC [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2019, 17: 644-656.
- [7] Tang J, Yan T, Bao Y, et al. LncRNA GLCC1 promotes colorectal carcinogenesis and glucose metabolism by stabilizing C-Myc [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 3499.
- [8] Hu YL, Feng Y, Chen YY, et al. SNHG16/miR-605-3p/ TRAF6/NF- κ B feedback loop regulates hepatocellular carcinoma metastasis [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(13): 7637-7651.
- [9] Xiao X, Jiang G, Zhang S, et al. LncRNA SNHG16 contributes to osteosarcoma progression by acting as a ceRNA of miR-1285-3p [J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 355.
- [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] Li Y, Lu Y, Chen Y. Long non-coding RNA SNHG16 affects cell proliferation and predicts a poor prognosis in patients with colorectal cancer via sponging miR-200a-3p [J]. Biosci Rep, 2019, 39(5): BSR20182498.
- [12] Chen ZY, Wang XY, Yang YM, et al. LncRNA SNHG16 promotes colorectal cancer cell proliferation, migration, and epithelial-mesenchymal transition through miR-124-3p/MCP-1 [J]. Gene Ther, 2022, 29(3/4): 193-205.
- [13] 李晓燕, 张启芳, 陈卓琳, 等. Lnc SNHG16 通过调控 miR-140-5p/wnt1 对结直肠癌细胞增殖和迁移的影响 [J]. 肿瘤学杂志, 2020, 26(6): 506-510.
- [14] Christensen LL, True K, Hamilton MP, et al. SNHG16 is regulated by the Wnt pathway in colorectal cancer and affects genes involved in lipid metabolism [J]. Mol Oncol, 2016, 10(8): 1266-1282.
- [15] Yang B, Wang X, Ying C, et al. Long noncoding RNA SNHG16 facilitates abdominal aortic aneurysm progression through the

- miR-106b-5p/STAT3 feedback loop [J]. J Atheroscler Thromb, 2021, 28(1): 66-78.
- [16] He X, Ma J, Zhang M, et al. Long non-coding RNA SNHG16 activates USP22 expression to promote colorectal cancer progression by sponging miR-132-3p [J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 4283-4294.
- [17] Gu H, Gu S, Zhang X, et al. miR-106b-5p promotes aggressive progression of hepatocellular carcinoma via targeting RUNX3 [J]. Cancer Med, 2019, 8(15): 6756-6767.
- [18] Sun H, Chen X. miR-106b-5p promotes malignant behaviors of cervical squamous cell carcinoma cells by targeting TIMP2 [J]. Reprod Sci, 2022, 29(1): 203-211.
- [19] Ling B, Liao X, Tang Q, et al. microRNA-106b-5p inhibits growth and progression of lung adenocarcinoma cells by downregulating IGSF10 [J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(14): 18740-18756.
- [20] Lee J, Kim HE, Song YS, et al. miR-106b-5p and miR-17-5p could predict recurrence and progression in breast ductal carcinoma *in situ* based on the transforming growth factor-beta pathway [J]. Breast Cancer Res Treat, 2019, 176(1): 119-130.
- [21] 方洪生, 骆洋, 林海萍, 等. miR-106b-5p 靶向调控细胞周期蛋白 D1 抑制结直肠癌细胞增殖、迁移与侵袭 [J]. 现代肿瘤医学, 2022, 30(6): 949-955.
- [22] Ni S, Weng W, Xu M, et al. miR-106b-5p inhibits the invasion and metastasis of colorectal cancer by targeting CTSA [J]. Onco Targets Ther, 2018, 11: 3835-3845.
- [23] Cai L, Rothbart SB, Lu R, et al. An H3K36 methylation-engaging Tudor motif of polycomb-like proteins mediates PRC2 complex targeting [J]. Mol Cell, 2013, 49(3): 571-582.
- [24] Hong Z, Jiang J, Lan L, et al. A polycomb group protein, PHF1, is involved in the response to DNA double-strand breaks in human cell [J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36(9): 2939-2947.
- [25] Liu R, Gao J, Yang Y, et al. PHD finger protein 1 (PHF1) is a novel reader for histone H4R3 symmetric dimethylation and coordinates with PRMT5-WDR77/CRL4B complex to promote tumorigenesis [J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(13): 6608-6626.
- [26] 李佳浓, 于冠宇, 郑阔. PHF1 基因在不同类型非小细胞肺癌中的表达水平及其生物学功能 [J]. 热带医学杂志, 2019, 19(3): 320-324.
- [收稿日期]2022-06-24

《中国实验动物学报》刊期变更通知

为缩短出版周期,及时反映本学科最新科技动态,应广大读者、作者要求,本刊向主管部门及北京市新闻出版局提出申请变更刊期。经批准《中国实验动物学报》自 2022 年 8 月份起由双月刊变更为月刊。从 2023 年期起全年共 12 期。

欢迎读者积极订阅! 欢迎各位学者踊跃投稿!