

- (J). 中国药理学通报, 2003, 19(7): 727-731.
- (9) Meden A, Knez D, Jukic M, et al. Tryptophan-derived butyrylcholinesterase inhibitors as promising leads against Alzheimer's disease (J). Chem Commun (Camb), 2019, 55(26): 3765-3768.
- (10) Purgatorio R, De Candia M, Catto M, et al. Investigating 1,2,3,4,5,6-hexahydroazepino[4,3-b] indole as scaffold of butyrylcholinesterase-selective inhibitors with additional neuroprotective activities for Alzheimer's disease (J). Eur J Med Chem, 2019, 177(5): 414-424.
- (11) 刘佳莉, 苑玉和, 陈乃宏. 不同酶源乙酰胆碱酯酶的抑制剂筛选方法比较 (J). 神经药理学报, 2011, 1(3): 27-30.
- (12) 邓立刚, 李增梅, 郭长英, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定蔬菜中 7 种氨基甲酸酯类农药残留 (J). 食品科学, 2011, 32(6): 221-223.
- (13) Scheyer O, Rahman A, Hristov H, et al. Female Sex and Alzheimer's Risk: The Menopause Connection (J). J Prev Alzheimers Dis, 2018, 5(4): 225-230.
- (14) Uddin MS, Rahman MM, Jakaria M, et al. Estrogen Signaling in Alzheimer's Disease: Molecular Insights and Therapeutic Targets for Alzheimer's Dementia (J). Mol Neurobiol, 2020, 57(6): 2654-2670.

〔文章编号〕 1007-0893(2021)12-0005-04

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2021.12.002

## LncRNA SNHG14 调控 miR-656-3p/SIRT5 通路加重肝癌侵袭和迁移

杨景波 李世通 孙大勇 江丹<sup>\*</sup>

(深圳大学第一附属医院 深圳市第二人民医院, 广东 深圳 518035)

〔摘要〕 **目的:** 探讨长链非编码 RNA (lncRNA) 小核仁 RNA 宿主基因 14 (SNHG14) 对肝细胞癌 (HCC) 细胞侵袭和迁移的影响及机制。**方法:** 采用实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 检测肝癌细胞 SNHG14 和 miR-656-3p 的表达。与 sh-SNHG14, miR-656-3p 抑制剂, miR-656-3p 模拟物, pcDNA3.1-SIRT5 共转染后, 检测 HepG2 和 MHCC97H 细胞增殖、侵袭和迁移。然后用 qRT-PCR 测定 SNHG14、miR-656-3p 和 SIRT5 的表达水平, 荧光素酶报告基因检测和 RNA 下调 SNHG14 与 miR-656-3p 之间的关系, 以及 miR-656-3p 与 SIRT5 之间的关系。**结果:** HCC 细胞中 SNHG14 表达上调, miR-656-3p 表达下调。抑制 SNHG14 和 miR-656-3p 过表达, 可抑制 HepG2 和 MHCC97H 细胞增殖, 侵袭和迁移。SNHG14 直接作用于 miR-656-3p, SIRT5 是 miR-656-3p 的靶基因。miR-656-3p 抑制剂或 pcDNA3.1-SIRT5 可逆转 sh-SNHG14 对肝癌细胞增殖、侵袭和迁移的抑制作用。**结论:** SNHG14 通过调节 miR-656-3p/SIRT5 轴促进肝癌细胞的侵袭和迁移。

〔关键词〕 肝细胞癌; 小核仁 RNA 宿主基因 14; miR-656-3p/SIRT5 轴

〔中图分类号〕 R 735.7 〔文献标识码〕 A

### LncRNA SNHG14 Regulates miR-6-3p/SIRT5 Pathway to Aggravate Liver Cancer Invasion and Migration

YANG Jing-bo, LI Shi-tong, SUN Da-yong, JIANG Dan<sup>\*</sup>

(The First Affiliated Hospital of Shenzhen University, The Second People's Hospital of Shenzhen, Guangdong Shenzhen 518035)

〔Abstract〕 **Objective** To investigate the effect and mechanism of long non-coding RNA (lncRNA) small nucleolar RNA host gene 14 (SNHG14) on the invasion and migration of hepatocellular carcinoma (HCC) cells. **Methods** Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression of SNHG14 and miR-656-3p in liver cancer cells. After co-transfection with sh-SNHG14, miR-656-3p inhibitor, miR-656-3p mimic, and pcDNA3.1-SIRT5, the proliferation, invasion and migration of HepG2 and MHCC97H cells were detected. Then qRT-PCR was used to determine the expression levels of SNHG14, miR-656-3p and SIRT5, luciferase reporter gene detection and RNA down-regulation between SNHG14 and miR-656-3p, and between miR-656-3p and SIRT5 Relationship. **Results** The expression of SNHG14 was up-regulated in HCC cells,

〔收稿日期〕 2021-04-20

〔作者简介〕 杨景波, 男, 主治医师, 主要研究方向是慢性消化系统疾病的免疫分子机制。

〔\*通信作者〕 江丹 (E-mail: 361149368@qq.com; Tel: 13926134520)

and the expression of miR-656-3p was down-regulated. Inhibiting the overexpression of SNHG14 and miR-656-3p can inhibit the proliferation, invasion and migration of HepG2 and MHCC97H cells. SNHG14 acts directly on miR-656-3p, and SIRT5 is the target gene of miR-656-3p. miR-656-3p inhibitor or pcDNA3.1-SIRT5 can reverse the inhibitory effects of sh-SNHG14 on the proliferation, invasion and migration of liver cancer cells. **Conclusion** SNHG14 promotes the invasion and migration of liver cancer cells by regulating the miR-656-3p/SIRT5 axis.

**(Key Words)** Hepatocellular carcinoma, Small nucleolar RNA host gene 14, miR-656-3p/SIRT5 axis

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 作为肝脏的原发肿瘤, 其晚期预后较差, 中位生存时间不足 1 年, 5 年生存率仅为 7%<sup>[1]</sup>。过度饮酒、肝炎病毒感染、遗传疾病、代谢综合征等均可诱发 HCC<sup>[2]</sup>, 但其具体机制尚需进一步研究。因此, 需要深入研究 HCC 的发生和发展机制, 寻找改善预后和新致癌基因。

长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA), 即碱基对超过 200 且缺乏明显开放阅读框的 RNA, 在细胞分化、增殖、迁移和侵袭等多个细胞过程中发挥作用<sup>[3-4]</sup>。小核仁 RNA 宿主基因 14 (small nucleolar RNA host gene 14, SNHG14) 是一种能够促进结肠癌、非小细胞肺癌、胃癌等多种人类癌症的起始和进展的 lncRNA<sup>[5-7]</sup>。

通过检测 SNHG14 在 HCC 细胞中的表达, 笔者发现 SNHG14 在 HCC 中表达上调, 提示其可能与 HCC 的进展有关。双荧光素酶报告基因检测发现 miR-656-3p 可以同时与 SNHG14 和 SIRT5 结合。因此, 笔者推测 SNHG14 通过 miR-656-3p/SIRT5 轴的相互作用来调控肝癌细胞的迁移和侵袭。对此, 笔者的研究数据表明, SNHG14 作为 ceRNAs 以 miR-656-3p 依赖的方式调控 SIRT5 的表达。本研究分析了 SNHG14 对肝癌侵袭和迁移的作用及机制, 旨在从基因的角度寻找新的治疗靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

人 HCC 细胞 HepG2、Hep3B、MHCC97H、Huh7 以及人正常肝胚细胞 LO2 购于中国典型培养物保藏中心 (中国上海), 所有细胞均采用含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的 DMEM 高糖培养基 (Gibco, USA), 并置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 和 95% 湿度的恒温培养箱中培养。取对数生长期细胞用于实验。

### 1.2 细胞转染与分组

取对数生长期的 HepG2 和 MHCC97H 细胞, 接种于普通 6 孔培养板中 ( $2 \times 10^5 \cdot \text{孔}^{-1}$ ), 24 h 后, 转染 sh-SNHG14 (终浓度为  $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、miR-656-3p inhibitor (终浓度为  $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、miR-656-3p mimic (终浓度为  $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、pcDNA3.1-SIRT5 (2  $\mu\text{g}$ ) 或其相应的阴性对照质粒 (吉凯基因, 中国上海), 分别命名为 sh-SNHG14 组、sh-NC 组、miR-656-3p inhibitor 组、inhibitor-NC 组、miR-656-3p mimic 组、mimic-NC 组、pcDNA3.1-SIRT5 组、pcDNA3.1-NC 组; 或共转染 sh-SNHG14 和 miR-656-3p

inhibitor 或 pcDNA3.1-SIRT5, 命名为 sh-SNHG14 + miR-656-3p inhibitor 组、sh-SNHG14 + pcDNA3.1-SIRT5 组以及 sh-NC + inhibitor-NC 组。采用 lipfectamine 2000 转染试剂盒 (Invitrogen, USA) 进行转染, 所有转染操作均严格按照 lipfectamine 2000 转染说明书进行。

### 1.3 CCK8 实验

采用 CCK8 试剂盒 (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Japan) 评估 HepG2 和 MHCC97H 细胞的生长。将转染后的细胞 ( $5 \times 10^3 \text{ 细胞} \cdot \text{孔}^{-1}$ ) 接种在 96 孔板中, 分别孵育 24、48、72、96 h 后, 向每个孔中加入 CCK8 试剂孵育 2 h。选择 450 nm 波长, 采用多功能酶标仪 (Biotek, USA) 测定各孔吸光度值, 记录结果。

### 1.4 平皿集落形成实验

取处于对数增长长期转染后的 HepG2 和 MHCC97H 细胞, 在  $1000 \text{ 细胞} \cdot \text{mL}^{-1}$  的完全培养基中成为单细胞悬液, 然后接种至 24 孔培养板中连续培养 3 周。之后, 使用 4% 多聚甲醛将细胞固定 15 min, 采用 GIMSA 溶液染色 15 min, 在纤维镜下随机选取 5 个视野计数。集落形成率 = (克隆数 / 接种细胞数)  $\times 100\%$ 。

### 1.5 Transwell 侵袭实验

对于细胞侵袭能力测定, HepG2 或 MHCC97H 细胞用不含血清或生长因子的培养基重悬 ( $1 \times 10^6 \text{ 细胞} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 取 200  $\mu\text{L}$  细胞悬液接种到包被有 Matrigel 小室的上室 (孔径: 8  $\mu\text{m}$ ; Corning Costar, USA), 小室加入 600  $\mu\text{L}$  含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基。之后将继续细胞培养 24 h, 用棉签除去上室的细胞, 4% 多聚甲醛固定膜下表面上的细胞, 结晶紫染色 30 min。在光学显微镜下 ( $10\times$ , 每孔 5 个随机视野) 计数侵入膜的细胞数。细胞侵袭率 = (侵袭的细胞 / 接种细胞数)  $\times 100\%$ 。

### 1.6 伤口愈合实验

取处于对数生长期转染后的 HepG2 和 MHCC97H 细胞, 接种于普通 6 孔培养板中 ( $2 \times 10^5 \cdot \text{孔}^{-1}$ ) 中。待细胞融合率达到 80% 时, 用 1 个新的 100  $\mu\text{L}$  移液管尖端垂直缓慢刮擦细胞层, 之后用 PBS 洗涤 2 次, 采用无血清 DMEM 高糖培养基继续培养。分别于 0 h 和 24 h 在倒置显微镜下观察细胞迁移, 并拍照记录。细胞迁移率 = ((0 h 伤痕的距离 - 24 h 伤痕的距离) / 0 h 伤痕的距离)  $\times 100\%$ 。

### 1.7 实时荧光定量聚合酶链式反应实验

实验使用 TRIzol Reagent (Life Technologies) 提取总 RNA, 并用多功能酶标仪 (Biotek Synergy 2) 检测 RNA 浓

度及纯度。在聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增仪进行逆转录反应合成 cDNA 模版, 应用荧光定量 PCR 分析仪 (美国伯乐, CFX Connect) 进行实时荧光定量聚合酶链式反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 实验, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 和 U6 分别用作内部对照以标准化 mRNA 和 miRNA 的表达。反应条件为 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 34 s, 40 个循环。数据分析采用 2- $\Delta\Delta C_t$  法进行分析, 公式如下:  $\Delta\Delta C_t = (C_t(\text{目的基因}) - C_t(\text{内参基因}))_{\text{实验组}} - (C_t(\text{目的基因}) - C_t(\text{内参基因}))_{\text{对照组}}$ 。各基因及其引物的扩增序列详见表 1。

表 1 引物序列

引物名称	序列
miR-656-3p-F	GAATCGTCGTATCCAGTGCAA
miR-656-3p-R	CGTATCCAGTGCGTGTCG
SNHG14-F	GGGTGTTTACGTAGACCAGAACC
SNHG14-R	CTTCCAAAAGCCTTCTGCCTTAG
U6-F	CTCGCTTCGGCAGCACATATACT
U6-R	ACGCTTCACGAATTTGCGTGTC
SIRT5-F	GTCATCACCCAGAACAT CGA
SIRT5-R	ACGTGAGGTGCGCAGCAGCAAGCC
GAPDH-F	GTCGATGGCTAGTCGTAGCATCGAT
GAPDH-R	TGCTAGCTGGCATGCCCGATCGATC

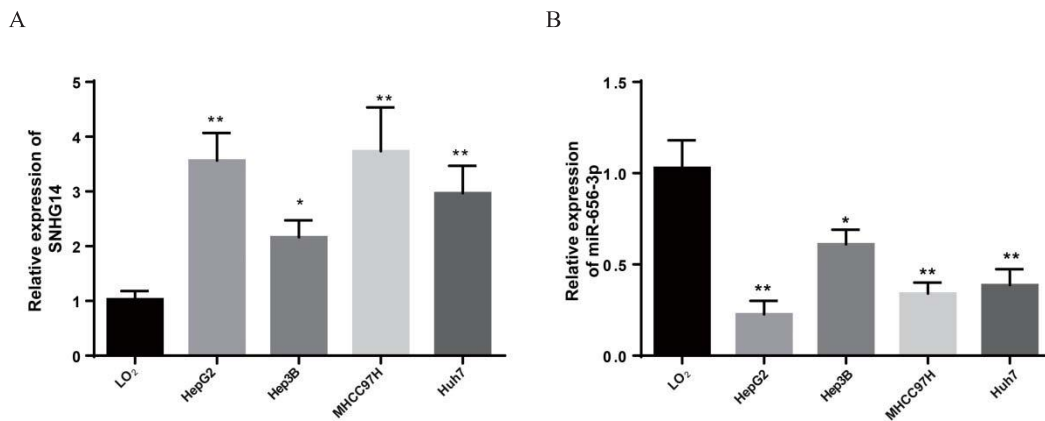
### 1.8 统计学分析

将 GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) 用于统计分析。所有实验数据均来自于 3 个独立实验结果, 以  $\bar{x} \pm s$  表示。两组之间的比较采用 *t* 检验, 多组之间的比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HCC 细胞中 lncRNA SNHG14 和 miRNA-656-3p 的表达

为检测 lncRNA SNHG14 和 miRNA-656-3p 是否对 HCC 的发生发展有关键作用, 笔者首先比较了 HCC HepG2、Hep3B、MHCC97H、以及 Huh7 细胞系和正常肝胚细胞 LO2 中 lncRNA SNHG14 和 miRNA-656-3p 的表达。如图 1A 所示, 与肝胚细胞 LO2 细胞系相比, HepG2、Hep3B、MHCC97H、以及 Huh7 细胞系中 lncRNA SNHG14 的表达水平明显上调 (图 1A,  $P < 0.05$ ), 而 miRNA-656-3p 在 HepG2、Hep3B、MHCC97H、以及 Huh7 细胞中的表达明显低于 LO2 细胞。提示 lncRNA SNHG14 和 miRNA-656-3p 可能参与了 HCC 的发生。



A: HCC 细胞系 HepG2、Hep3B、MHCC97H、Huh7 和 LO2 中 SNHG14 的表达; B: HCC 细胞系 HepG2、Hep3B、MHCC97H、Huh7 和 LO2 中 miRNA-656-3p 的表达。与 LO2 组比较, \* $P < 0.05$  表示; 与 LO2 组比较, \*\* $P < 0.01$ 。

图 1 HCC 细胞中 SNHG14 和 miRNA-656-3p 的表达

### 2.2 敲低 lncRNA SNHG14 抑制 HCC 细胞增殖、侵袭和迁移能力

为研究 lncRNA SNHG14 对 HCC 发生发展的影响, 笔者在体外检测了 sh-SNHG14 或 sh-NC 转染后 HepG2 和 MHCC97H 细胞的增殖能力。qRT-PCR 对转染效率检测发现, 与 sh-NC 转染相比, sh-SNHG14 转染后 HepG2 (插页五图 2A,  $P < 0.01$ ) 和 MHCC97H 细胞 (插页五图 2B,  $P < 0.01$ ) 中 lncRNA SNHG14 表达水平比 sh-NC 转染组明显降低。平皿集落形成和 CCK8 实验结果表明, 与 sh-NC 转染相比, sh-SNHG14 转染显著抑制 HepG2 细胞和

MHCC97H 细胞的增殖能力 (插页五图 2C~G,  $P < 0.01$ )。与 sh-NC 组相比, sh-SNHG14 组 HepG2 细胞的侵袭和迁移能力明显降低 (插页五图 2H 和 K,  $P < 0.01$ )。同样的, 笔者发现 sh-SNHG14 组 MHCC97H 侵袭以及迁移能力明显低于 sh-NC 组 (插页五图 2H 和 L,  $P < 0.01$ )。提示敲低 lncRNA SNHG14 对 HCC HepG2 和 MHCC97H 细胞系的增殖、侵袭以及迁移能力具有抑制作用。

### 2.3 miR-656-3p 对 HCC 细胞增殖、侵袭、迁移的影响

为了阐明 miR-656-3p 是否可抑制 HCC 细胞的增殖、侵袭和迁移, 笔者利用 miR-656-3p mimic、miR-656-3p



inhibitor 以及其相应的阴性对照分别转染 HepG2 和 MHCC97H 细胞。如插页六图 3A 和 B 所示, miR-656-3p inhibitor 显著降低 HepG2 或 MHCC97H 细胞中 miR-656-3p 的表达(插页六图 3A 和 3B,  $P < 0.01$ ), 而 miR-656-3p mimic 转染后 HepG2 或 MHCC97H 细胞中 miR-656-3p 的表达显著高于 mimic-NC 转染组(插页六图 3A 和 B,  $P < 0.01$ )。与 mimic NC 组相比, miR-656-3p mimic 组可显著抑制 HepG2 细胞的增殖(插页六图 3C,  $P < 0.01$ )、侵袭(插页六图 3E,  $P < 0.01$ )和迁移能力(插页六图 3F,  $P < 0.01$ ); 而 miR-656-3p inhibitor 转染后 HepG2 细胞的增殖、侵袭和迁移能力明显高于 inhibitor-NC 转染组。相似的, 在 MHCC97H 细胞中也得到了相似的结论(插页六图 3D、E 和 G)。提示 miR-656-3p 可调节 HCC 细胞增殖、侵袭和迁移。

### 3 讨论

目前治疗 HCC 最有效的方法是肝移植, 但肝移植后复发和不良事件频繁发生。更好地了解肝癌的进展是推进肝癌治疗策略的必要条件<sup>[8]</sup>。因此, 本研究检测了 SNHG14/miR-656-3p/SIRT5 轴在 HCC 细胞中的表达模式。笔者的数据显示, SNHG14 可以通过调控 miR-656-3p/SIRT5 轴来增强肝癌细胞的侵袭和迁移。

HCC 的主要危险因素包括乙型或丙型肝炎病毒感染、酒精性肝硬化、非酒精性脂肪性肝炎和吸烟, 在大多数国家, 其死亡率与发病率相当。为了寻找可能的肝癌治疗策略, 最近的研究强调了 lncRNAs 由于其调控基因转录的功能而对肝癌的起始和进展的影响。lncRNA MCM3AP-AS1 被发现现在 HCC 中增加, 并促进了 HCC 的起始和发展<sup>[9]</sup>。肝癌细胞中 SNHG7 表达上调可通过调控 miR-122-5p 和 RPL4<sup>[10]</sup> 促进肝癌的发展。据报道, SNHG14 是一种致癌基因, 与多种癌症的肿瘤进展有关。例如, SNHG14 在患者胰腺组织中表达上调, SNHG14 的高表达增强了胰腺癌细胞的增殖、生长和侵袭<sup>[11]</sup>。在本研究中, SNHG14 在 HCC 细胞中的表达明显增加。过表达 SNHG14 可恶化肝癌的发展, 而抑制 SNHG14 可抑制肝癌细胞的增殖、侵袭和迁移。因此, 笔者证实了 SNHG14 作为 HCC 的致癌基因会加剧细胞的增殖、侵袭和迁移。miR-656 作为一种肿瘤抑制因子, 被报道可以抑制胶质瘤细胞的增殖、迁移、侵袭和体内肿瘤生长<sup>[12]</sup>。本研究中, miR-656-3p 过表达可显著抑制肝癌细胞的增殖、侵袭和迁移, 而 miR-656-3p 下调则加重了肝癌的进展。

本研究的局限性在于研究对象的规模有限。本研究仅在细胞背景下探讨 SNHG14 对肝癌侵袭和迁移的影响及机制。在以后的研究中, 笔者将进一步鉴定动物背景下的研究结果。

基于本研究的数据, 笔者得出结论, SNHG14 可以通过抑制 miR-656-3p/SIRT5 轴来增强肝癌细胞的侵袭和迁移。本研究可能为 HCC 的治疗提供一种新的基因组策略。

### 〔参考文献〕

- (1) Sayiner M, Golabi P, Younossi ZM. Disease burden of hepatocellular carcinoma: a global perspective (J). *Dig Dis Sci*, 2019, 64(4): 910-917.
- (2) Pu J, Wang J, Wei H, et al. lncRNA MAGI2-AS3 prevents the development of HCC via recruiting KDM1A and promoting H3K4me2 demethylation of the RACGAP1 promoter (J). *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 18(8): 351-362.
- (3) Wu D, Xue WN, Li X, et al. Long noncoding RNA SNHG14 facilitates colorectal cancer metastasis through targeting EZH2-regulated EPHA7 (J). *Cell Death Dis*, 2019, 10(7): 514.
- (4) NG SY, Lin L, Soh BS, et al. Long noncoding RNAs in development and disease of the central nervous system (J). *Trends Genet*, 2019, 29(8): 461-468.
- (5) Jiao P, Hou J, Yao M, et al. SNHG14 silencing suppresses the progression and promotes cisplatin sensitivity in non-small cell lung cancer (J). *Biomed Pharmacother*, 2019, 117(9): 109-164.
- (6) Liu Z, Yan Y, Cao S, et al. Long non-coding RNA SNHG14 contributes to gastric cancer development through targeting miR-145/SOX9 axis (J). *J Cell Biochem*, 2018, 119(8): 6905-6913.
- (7) Ye T, Zhang N, Wu W, et al. SNHG14 promotes the tumorigenesis and metastasis of colorectal cancer through miR-32-5p/SKIL axis (J). *Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2019, 55(10): 106-108.
- (8) Schlachterman A, Craft WW, Hilgenfeldt E, et al. Current and future treatments for hepatocellular carcinoma (J). *World J Gastroenterol*, 2015, 21(28): 8478-8491.
- (9) Wang Y, Yang L, Chen T, et al. A novel lncRNA MCM3APAS1 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by targeting miR-194-5p/FOXAI axis (J). *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 28.
- (10) Yang X, Sun L, Wang L, et al. lncRNA SNHG7 accelerates the proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells via regulating miR-122-5p and RPL4 (J). *Biomed Pharmacother*, 2019, 118(10): 109386.
- (11) Deng PC, Chen WB, Cai HH, et al. lncRNA SNHG14 potentiates pancreatic cancer progression via modulation of annexin A2 expression by acting as a competing endogenous RNA for miR-613 (J). *J Cell Mol Med*, 2019, 14(8): 76-80.
- (12) Larkfors L, Ebendal T, Whittemore SR, et al. Decreased level of nerve growth factor (NGF) and its messenger RNA in the aged rat brain (J). *Brain Res*, 1987, 427(14): 55-60.