

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.04.003
View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.04.003>

长链非编码 RNA SNHG16 在口腔鳞癌细胞系中的表达及对其增殖和迁移的影响

顾杰林, 李正华, 叶翀

(贵港市人民医院口腔科, 广西 贵港 537100)

[摘要] 目的: 分析长链非编码RNA (long non-coding RNA, LncRNA)SNHG16在口腔鳞癌细胞系中的表达及对细胞增殖和迁移的影响。方法: 采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)测定口腔鳞癌细胞系Cal-27, Tca8113及舌鳞癌细胞系(tongue scale cancer cell line, TSCCA)和正常口腔上皮细胞系HOK中LncRNA SNHG16的表达, 将TSCCA分成3组: SNHG16-siRNA组、NT-siRNA组及Control组。利用LipofectamineTM 2000分别转染pcDNA3.1-LncRNA-SNHG16-siRNA, pcDNA3.1-LncRNA-SNHG16-NC及空质粒。MTT试验和细胞划痕试验分别测定细胞增殖和迁移能力, qRT-PCR及Western印迹分别测定E2F5 mRNA和蛋白表达水平。结果: LncRNA SNHG16在口腔鳞癌细胞系Cal-27, Tca8113及TSCCA中的相对表达量高于正常口腔上皮细胞系HOK($P<0.05$)。转染0, 24, 48, 72及96 h后, SNHG16-siRNA组与NT-siRNA组的吸光度值分别为 0.17 ± 0.02 vs 0.19 ± 0.01 ($P>0.05$), 0.39 ± 0.04 vs 0.40 ± 0.05 ($P>0.05$), 0.53 ± 0.05 vs 0.65 ± 0.06 ($P<0.05$), 0.63 ± 0.05 vs 0.91 ± 0.08 ($P<0.05$), 0.85 ± 0.08 vs 1.28 ± 0.10 ($P<0.01$)。SNHG16-siRNA组划痕愈合率为 $(27.8\pm2.1)\%$, NT-siRNA组为 $(56.9\pm5.70)\%$, SNHG16-siRNA组划痕愈合率低于NT-siRNA组, 差异有统计学意义($P<0.01$)。SNHG16-siRNA组E2F5 mRNA相对表达量为 0.49 ± 0.031 , NT-siRNA组为 1.0 ± 0.04 , SNHG16-siRNA组E2F5 mRNA相对表达量低于NT-siRNA组, 差异有统计学意义($P<0.01$)。SNHG16-siRNA组E2F5蛋白相对表达量为 0.57 ± 0.05 , NT-siRNA组为 1.0 ± 0.03 , SNHG16-siRNA组E2F5蛋白相对表达量低于NT-siRNA组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。结论: LncRNA SNHG16在口腔鳞癌细胞系中高表达, 并沉默抑制口腔鳞癌细胞增殖和迁移, 其机制可能与下调E2F5表达有关。

[关键词] 口腔鳞癌; 长链非编码RNA SNGH16; 增殖; 迁移

Expression of long non-coding RNA SNGH16 in oral squamous cell carcinoma and its effect on proliferation and migration

GU Jielin, LI Zhenghua, YE Chong

(Department of Stomatology, Guigang People's Hospital, Guigang Guangxi 537100, China)

Abstract **Objective:** To explore the expression of long non-coding RNA (LncRNA SNGH16) in oral squamous cell

收稿日期 (Date of reception): 2017-12-20

通信作者 (Corresponding author): 顾杰林, Email: gujlinhs@126.com

carcinoma cell lines and its effect on proliferation and migration. **Methods:** We compared the expression of LncRNA SNHG16 in oral squamous cell carcinoma cell line, Cal-27, Tca8113 and tongue scale cancer cell line (TSCCA), and normal oral squamous cell line, HOK by quantitatitae realtime PCR (qRT-PCR). The TSCCA cell line was divided into three groups: SNHG16-siRNA group transfect with pcDNA3.1-LncRNA-SNHG16-siRNA, NT-siRNA group with pcDNA3.1-LncRNA-SNHG16-NC and Control group with blank plasmid by Lipofectamine™ 2000. MTT assay and cell wound scratch assay was used to measure the proliferation and migration ability. qRT-PCR and western blot was used to measure the expression level of E2F5 mRNA and protein. **Results:** Compare to the normal oral squamous cell line, HOK, the expression of LncRNA SNHG16 had a higher expression in oral squamous cell carcinoma cell line, Cal-27, Tca8113 and TSCCA. After transfection of LncRNA SNGH16 for 0, 24, 48, 72 and 96 h, the proliferation of oral squamous carcinoma cells was inhibited significantly ($P<0.01$). The scar healing rate was $(27.8\pm2.1)\%$ in SNHG16-siRNA group, which was significantly lower than $(56.9\pm5.70)\%$ in NT-siRNA group ($P<0.01$). The expression level of E2F5 mRNA in SNHG16-siRNA group was 0.49 ± 0.031 , which was significantly lower than 1.0 ± 0.04 in NT-siRNA group ($P<0.01$). The expression level of E2F5 protein was 0.57 ± 0.05 in SNHG16-siRNA group, which was significantly lower than 1.0 ± 0.03 in NT-siRNA group ($P<0.05$). **Conclusion:** LncRNA SNGH16 has a high expression in the oral squamous cancer cell lines. Silencing the expression of LncRNA SNHG16 can inhibit oral squamous carcinoma cell proliferation and migration, which mechanism may be associated with down-regulated expression of E2F5.

Keywords oral squamous carcinoma; long non-coding RNA SNGH16; proliferation; migration

口腔鳞癌主要发生在口底、牙龈、舌、软硬腭和黏膜等部位，其全世界发病率占各种恶性肿瘤的第8位^[1]。在中国，每10万人中就有3.29例口腔癌患者，其5年生存率低于50%，主要由于大多数患者确诊时已处于晚期，发生淋巴结转移患者的预后往往也较差^[2]。因此，寻找合适的早期诊断靶点和预后标志，对提高口腔鳞癌患者的生存率具有重要意义。长链非编码RNA(long non-coding RNA, LncRNA)是近年来发现的一类RNA，长度超过200 bp，其主要功能不是编码蛋白质，而是通过调控基因或竞争性靶向miRNA调控肿瘤的生物学过程。LncRNA SNHG16最早在神经母细胞瘤中被发现^[3]。其具有在神经母细胞瘤^[3]、乳腺癌^[4]及膀胱癌^[5]中调控增殖、化疗耐药等多个肿瘤生物学功能。然而目前LncRNA SNHG16在口腔鳞癌细胞系中的表达及其对增殖和迁移的影响鲜见报道。本研究旨在探讨LncRNA SNHG16在口腔鳞癌细胞系中的表达及其对增殖和迁移的影响及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

口腔鳞癌细胞系Cal-27, Tca8113, 舌鳞癌细胞系(tongue scale cancer cell line, TSCCA)及正常口腔上皮细胞系HOK均购自美国ATCC细胞库。实验

所需的E2F5及甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)一抗均购自美国Santa Cruz公司，二抗购自美国BD公司。pcDNA3.1载体由广州锐博生物公司定制。Lipofectamine™ 2000转染试剂和实时荧光定量PCR(qRT-PCR)仪购自美国BD公司。HBS-1096B酶标仪购自南京德铁实验设备有限公司。Western印迹电泳设备购自美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、转染及分组

口腔鳞癌细胞系Cal-27, Tca8113, TSCCA及正常口腔上皮细胞系HOK均种植于RPMI 1640培养基(上海和序生物科技有限公司)，并培养于37 °C, 5%CO₂培养箱中，48 h后消化传代。取TSCCA分成3组：SNHG16-siRNA组、NT-siRNA组和Control组，利用Lipofectamine™ 2000分别转染pcDNA3.1-LncRNA-SNHG16-siRNA及pcDNA3.1-LncRNA-SNHG16-NC序列；Control组为空白对照组，仅转染空白质粒pcDNA3.1。pcDNA3.1-LncRNA-SNHG16-siRNA序列正向引物为5'-GGAAAAGGAUCCUCUAGUAUU-3'；反向引物为5'-UACUAGAGGAUCCUUUUCUU-3'。pcDNA3.1-LncRNA-SNHG16-NC序列正向引物为5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'；反向引物

为5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'，转染浓度为300 nmol/孔。

1.2.2 RNA 提取及 qRT-PCR

LncRNA SNHG16的测定：使用All-in-One miRNA抽提试剂盒(上海伯易生物科技有限公司)和All-in-One miRNA qRT-PCR检测试剂盒(美国Thermo Scientific公司)提取和分离RNA，采用NanoDrop 1 000分光光度计(美国BiO-rad公司)测定RNA浓度，在7900 HT RT-PCR系统(美国Applied Biosystems公司)测定。通过阈值分析比较，采用循环数(Ct)法对数据行分析处理。LncRNA SNHG16引物序列：正向引物为5'-CAGAATGCCATGGTTCCCC-3'，反向引物为5'-TGGCAAGAGACTTCCTGAGG-3'；GAPDH正向引物为5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-3'，反向引物为3'-CTAACGTCAAGTCCGCCTAGAACAGCA-5'。定量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法，GAPDH为内参，计算LncRNA SNHG16的相对表达量。

E2F5 mRNA的测定：提取总RNA后，使用7900 HT RT-PCR系统测定。通过阈值分析比较，采用Ct法对数据行分析处理。E2F5 mRNA引物序列：正向引物为5'-TCATTCAGGACCTATCCATGTGC-3'，反向引物为5'-GTCACTGGAGTCAAGGACTGG-3'；GAPDH正向引物为5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-3'，反向引物为3'-CTAACGTCAAGTCCGCCTAGAACAGCA-5'。定量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法，GAPDH为内参，计算E2F5 mRNA的相对表达量。

1.2.3 细胞增殖能力测定

MTT法测定SNHG16-siRNA组与NT-siRNA组的细胞增殖。将两组细胞消化成单细胞悬液后，将3组细胞以 2×10^3 个/孔种植于96孔板上，每个孔按200 μL上样，经0, 1, 2, 3, 4 d培养后，每孔加入20 μL MTT溶液，继续培养1 h后，在490 nm波长下，用酶标仪测定各孔光密度(OD)值，以时间为横坐标，OD为纵坐标绘制细胞增殖曲线。

1.2.4 细胞迁移能力测定

采用细胞划痕试验，将两组细胞培养于12孔板中，待细胞长满融合后，使用20 μL无菌Tips枪头画直线，0, 48 h时在显微镜下观察修复情况，划痕愈合率=(划痕后即刻的划痕面积-划痕后48 h的划痕面积)/划痕后即刻的划痕面积×100%。试验在同一情况及条件下重复测量3次，迁移能力与划痕愈合率成正比。

1.2.5 Western印迹法

采用Western印迹法，将两组细胞裂解、变性后，每孔30 μg蛋白，浓缩胶条件为50 min 80 V，分离胶条件为100 min 100 V，常规转膜，加入E2F5

及GAPDH一抗，抗体浓度为1:200，于4 °C孵育过夜。二抗(1:500)经37 °C孵育4 h后，PBS溶液漂洗3次，在电化学发光(electro-chemi-luminescence, ECL)液下显影(北京泰新生物科技有限公司)，Quantity One 1-D分析目标蛋白灰度值，目标蛋白相对表达量=目标蛋白吸光度值/GAPDH吸光度值。实验重复3次，取平均值。

1.3 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件进行数据分析，采用Prism软件作图。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，两组间的比较采用t检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LncRNA SNHG16 在口腔鳞状细胞癌细胞系中的表达

qRT-PCR示：LncRNA SNHG16在正常口腔上皮细胞系HOK中的相对表达量为 1.0 ± 0.02 ，在口腔鳞癌细胞系Cal-27, Tca8113及TSCCA中相对表达量分别为 3.27 ± 0.21 , 5.97 ± 0.39 及 7.30 ± 0.52 ，高于正常口腔上皮细胞系HOK，差异有统计学意义($P < 0.01$ ，图1)。

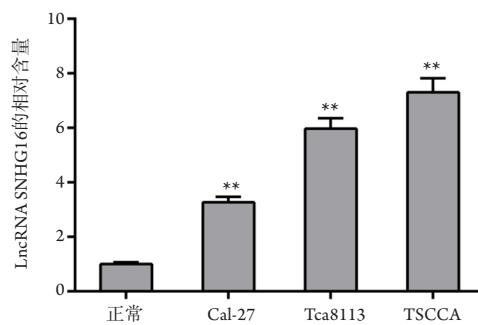


图1 LncRNA SNHG16在口腔鳞癌细胞系及正常口腔上皮细胞系中的表达

Figure 1 Expression of LncRNA SNHG16 in oral squamous cell carcinoma and normal oral squamous cell line

$^{**}P < 0.01$.

2.2 LncRNA SNHG16 沉默对细胞增殖的影响

转染24 h后，qRT-PCR示：SNHG16-siRNA组LncRNA SNHG16相对表达量为 0.27 ± 0.03 ，NT-siRNA组为 1.1 ± 0.03 ，Control组为 1.0 ± 0.02 。SNHG16-siRNA组LncRNA SNHG16相对表达量低于NT-siRNA组和Control组，差异有统计学意义

($P<0.001$, 图2A)。

MTT试验结果示：转染0, 24, 48, 72及96 h后, SNHG16-siRNA组与NT-siRNA组的OD490nm值分别为 0.17 ± 0.02 vs 0.19 ± 0.01 ($P>0.05$), 0.39 ± 0.04 vs 0.40 ± 0.05 ($P>0.05$), 0.53 ± 0.05 vs 0.65 ± 0.06 ($P<0.05$), 0.63 ± 0.05 vs 0.91 ± 0.08 ($P<0.05$), 0.85 ± 0.08 vs 1.28 ± 0.10 ($P<0.01$)。Control组分别为 0.18 ± 0.02 , 0.42 ± 0.04 , 0.67 ± 0.06 , 0.93 ± 0.08 , 1.33 ± 0.11 , 与NT-siRNA组相比, 差异无统计学意义($P>0.05$, 图2B)。

2.3 LncRNA SNHG16 沉默对细胞迁移的影响

细胞划痕试验结果显示：SNHG16-siRNA组划痕愈合率为 $(27.8\pm2.1)\%$, NT-siRNA组为

$(56.9\pm5.70)\%$, SNHG16-siRNA组划痕愈合率低于NT-siRNA组, 差异有统计学意义($P<0.01$, 图3)。

2.4 LncRNA SNHG16 调节 E2F5 基因的表达

qRT-PCR结果显示：SNHG16-siRNA组E2F5 mRNA相对表达量为 0.49 ± 0.031 , NT-siRNA组为 1.0 ± 0.04 , SNHG16-siRNA组E2F5 mRNA相对表达量低于NT-siRNA组, 差异有统计学意义($P<0.01$, 图4A)。

Western印迹结果显示：SNHG16-siRNA组E2F5蛋白相对表达量为 0.57 ± 0.05 , NT-siRNA组为 1.0 ± 0.03 , SNHG16-siRNA组E2F5蛋白相对表达量低于NT-siRNA组, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图4B, 4C)。

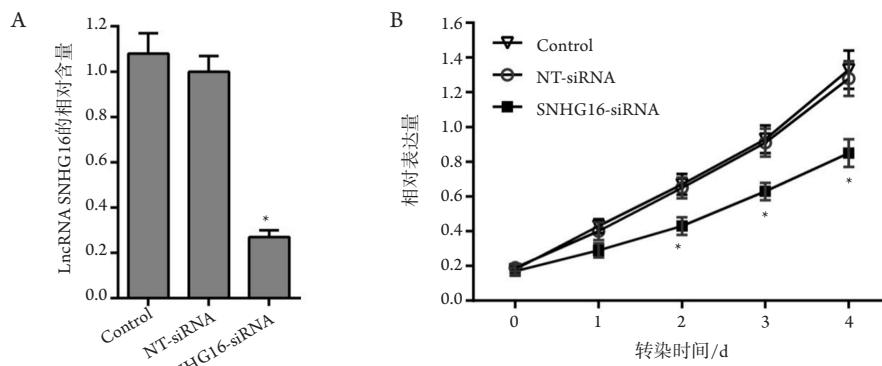


图2 转染24 h后, LncRNA SNHG16沉默抑制细胞增殖

Figure 2 After transfection of 24 h, silencing the expression of LncRNA SNHG16 can inhibit oral squamous carcinoma cell proliferation

(A)3组LncRNA SNHG16的相对表达量比较; (B)3组细胞增殖曲线比较。 $*P<0.01$ 。

(A) Comparison of SNHG16 expression between the 3 groups; (B) Comparison of proliferation curve between the 3 groups. $*P<0.01$.

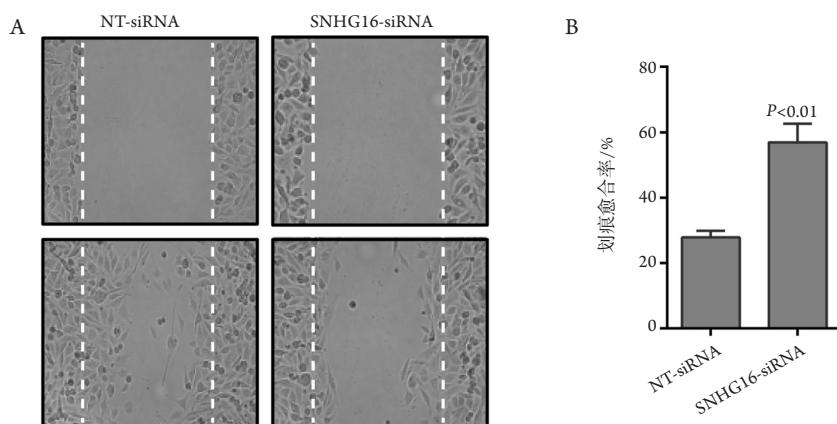


图3 LncRNA SNHG16沉默抑制细胞迁移

Figure 3 Silencing the expression of LncRNA SNHG16 can inhibit oral squamous carcinoma cell migration

(A)两组细胞划痕试验; (B)两组划痕愈合率比较。

(A) Cell wound scratch assay of the two groups; (B) Comparison of scar healing rate between the two groups.

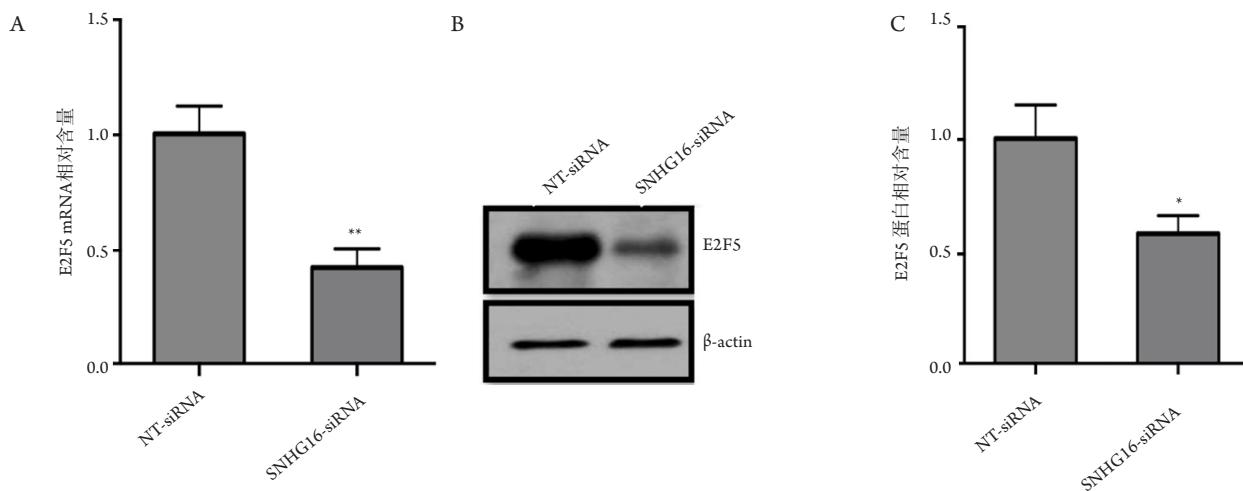


图4 LncRNA SNHG16沉默下调E2F5基因表达

Figure 4 Silencing the expression of LncRNA SNHG16 can inhibit the expression of E2F5

(A)两组E2F5 mRNA相对表达量的比较; (B)Western印迹法检测两组E2F5蛋白表达; (C)两组E2F5蛋白的比较。*P<0.05, **P<0.01。

(A) Comparison of E2F5 mRNA between the two groups; (B) Expression of E2F5 protein between the two groups by Western blot; (C) Comparison of E2F5 protein between the two groups. *P<0.05, **P<0.01.

3 讨论

临幊上对口腔鱗癌的治疗手段主要包括手术和放化疗，但是由于其发现较晚和转移性，仍需寻找合适的早期诊断或药物靶点。

LncRNA SNHG16最早在神经母细胞瘤中被发现。研究^[3-5]显示：LncRNA SNHG16在神经母细胞瘤、膀胱癌和乳腺癌中高表达，且与神经母细胞瘤患者不良预后与膀胱癌的侵袭和化疗耐药性相关。这些研究结果与本研究结果一致：在口腔鱗癌细胞系Cal-27, Tca8113和TSCCA中，LncRNA SNHG16高表达，提示其可能有类似于原癌基因的功能。为进一步验证假设，本研究在口腔鱗癌细胞系中，将LncRNA SNHG16沉默表达后，对其增殖和迁移能力进行检测，发现敲除LncRNA SNHG16可抑制口腔鱗癌细胞的增殖和迁移能力，提示LncRNA SNHG16确实具有类似于原癌基因的功能，这与文献[6]的研究结果一致。在乳腺癌中，通过敲除实验也证实LncRNA SNHG16对乳腺癌有明显的促癌作用，可显著增强其迁移能力，但对癌细胞增殖能力影响不大^[5]。研究^[5]发现：LncRNA SNHG16具有miR-98的结合位点，能与miR-98直接结合并影响其表达。miR-98的一个重要的靶基因是E2F5，miR-98能够直接靶向影响E2F5抑制乳腺癌细胞迁移能力^[5,7]。E2F5属E2F转录因子家族，受LncRNA SNHG16调控，同时也可

反过来参与调控SNHG16的表达。E2F5蛋白在多种肿瘤中的表达均有异常上升，包括卵巢癌、结直肠癌、肝癌和前列腺癌^[5,8-11]。E2F5能与细胞周期相关的基因启动子部位结合，进而影响细胞周期调控、分化和转化，尤其是在细胞由G0期向G1期转化的过程中^[8,12-13]。本研究结果显示LncRNA SNHG16沉默后，E2F5表达下调，提示在口腔鱗癌中LncRNA SNHG16可能类似于其在乳腺癌中，通过影响E2F5的表达而发挥作用，但这其中是否涉及到miRNA和哪些miRNA，其具体的作用机制如何，仍需进一步研究。

本研究也存在一定的局限性，如LncRNA SNHG16在口腔鱗癌组织中的表达水平及与预后的关系尚不明确，值得进一步研究。

综上所述，LncRNA SNHG16在口腔鱗癌细胞系中高表达，而沉默LncRNA SNHG16可抑制口腔鱗癌细胞的增殖和迁移，其机制可能与下调E2F5表达有关。

参考文献

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
2. Vergez S, Morinière S, Dubrulle F, et al. Initial staging of squamous cell carcinoma of the oral cavity, larynx and pharynx (excluding

- nasopharynx). Part I: Locoregional extension assessment: 2012 SFORL guidelines[J]. Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis, 2013, 130(1): 39-45.
3. Yu M, Ohira M, Li Y, et al. High expression of ncRAN, a novel non-coding RNA mapped to chromosome 17q25.1, is associated with poor prognosis in neuroblastoma[J]. Int J Oncol, 2009, 34(4): 931-938.
 4. Zhu Y, Yu M, Li Z, et al. ncRAN, a newly identified long non-coding RNA, enhances human bladder tumor growth, invasion, and survival[J]. Urology, 2011, 77(2): 510.e1-e5.
 5. Cai C, Huo Q, Wang X, et al. SNHG16 contributes to breast cancer cell migration by competitively binding miR-98 with E2F5[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 485(2): 272-278.
 6. Cao X, Xu J, Yue D. LncRNA-SNHG16 predicts poor prognosis and promotes tumor proliferation through epigenetically silencing p21 in bladder cancer[J]. Cancer Gene Ther, 2018, 25(1/2): 10-17.
 7. Kropp J, Degerny C, Morozova N, et al. miR-98 delays skeletal muscle differentiation by down-regulating E2F5[J]. Biochem J, 2015, 466(1): 85-93.
 8. Zhao J, Wu X, Ling X, et al. Analysis of genetic aberrations on chromosomal region 8q21-24 identifies E2F5 as an oncogene with copy number gain in prostate cancer[J]. Med Oncol, 2013, 30(1): 465.
 9. Lu GF, Sun YL, An SL, et al. MicroRNA-34a targets FMNL2 and E2F5 and suppresses the progression of colorectal cancer[J]. Exp Mol Pathol, 2015, 99(1): 173-179.
 10. Sun J, Li H, Huo Q, et al. The transcription factor FOXN3 inhibits cell proliferation by downregulating E2F5 expression in hepatocellular carcinoma cells[J]. Oncotarget, 2016, 7(28): 43534-43545.
 11. Tian H, Hou L, Xiong YM, et al. miR-132 targeting E2F5 suppresses cell proliferation, invasion, migration in ovarian cancer cells[J]. Am J Transl Res, 2016, 8(3): 1492-1501.
 12. Kothandaraman N, Bajic VB, Brendan PN, et al. E2F5 status significantly improves malignancy diagnosis of epithelial ovarian cancer[J]. BMC Cancer, 2010, 10(1): 64.
 13. Ishimoto T, Shiozaki A, Ichikawa D, et al. E2F5 as an independent prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Anticancer Res, 2013, 33(12): 5415-5420.

本文引用: 顾杰林, 李正华, 叶翀. 长链非编码RNA SNHG16在口腔鳞癌细胞系中的表达及对其增殖和迁移的影响[J]. 临床与病理杂志, 2018, 38(4): 700-705. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.04.003
Cite this article as: GU Jielin, LI Zhenghua, YE Chong. Expression of long non-coding RNA SNGH16 in oral squamous cell carcinoma and its effect on proliferation and migration[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2018, 38(4): 700-705. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.04.003