

lncRNA SH3BP5-AS1 在肝癌中的差异表达及促进肝癌发生机制

徐 东,陆欢华,王晓亮,吴伟新

摘要 目的 探究 lncRNA SH3BP5-AS1 在肝癌中的差异表达及促进肝癌发生的可能机制。方法 qRT-PCR 法检测 SH3BP5-AS1 在肝癌组织/癌旁组织($n=91$)中表达;TCGA 数据库可视化软件 UALCAN 分析 SH3BP5-AS1 在大样本肝癌组织($n=371$)中表达;qRT-PCR 检测 SH3BP5-AS1 在正常肝细胞 THLE-2 和肝癌细胞系 Huh 7、BEL-7405、SNU-387、Hep 3B 中表达。siRNA 技术沉默 SH3BP5-AS1 表达后,CCK-8 法、细胞克隆形成实验、Edu 法检测沉默 SH3BP5-AS1 对 Hep 3B 细胞增殖的影响,流式检测沉默 SH3BP5-AS1 对 Hep 3B 细胞凋亡、周期的影响。基于肝癌组织中 SH3BP5-AS1 和 TM6SF2 表达量,统计并分析表达相关性。结果 SH3BP5-AS1 在肝癌组织中高表达;SH3BP5-AS1 在 TCGA 数据库中大样本肝癌组织中高表达;SH3BP5-AS1 在不同肝癌细胞系 Huh 7、BEL-7405、SNU-387 和 Hep 3B 中均不同程度高表达。siRNA 沉默 SH3BP5-AS1 抑制 Hep 3B 细胞的增殖能力,促进细胞凋亡能力,影响细胞周期, G_1 期细胞增多。肝癌组织中 SH3BP5-AS1 与 TM6SF2 表达负相关。结论 SH3BP5-AS1 是一个重要的促癌非编码 RNA,该研究为肝癌患者的肿瘤靶向治疗提供理论基础。

关键词 lncRNA SH3BP5-AS1;肝癌;TM6SF2;细胞增殖;细胞凋亡;细胞周期

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)06-0872-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.06.006

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是目前常见的恶性肿瘤之一,病死率高,且该病的发病率和病死率呈现稳步上升趋势^[1]。手术切除是治疗肝癌最有效的治疗方法,但高复发率、早期远处转移及对化疗和放疗的频繁抵抗导致预后不良^[2]。因此,寻找有效的生物标志物对肝癌的早期发现和预后改善具有重要意义。长非编码 RNA(long non-coding RNAs, lncRNAs)是一类位于细胞核或细胞质中,长度超过 200 bp 的核苷酸^[3]。已经证实 lncRNAs 可以调节大脑发育、胚胎发育、组织分化和器

官发生等^[4-5]。最近的研究^[6]表明,lncRNAs 也参与了癌症中许多复杂的细胞过程。如 SH3BP5-AS1 在头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)中异常表达。然而,SH3BP5-AS1 在肝癌发生发展中的作用尚不清楚。该研究旨在探讨 SH3BP5-AS1 在肝癌中的表达特点并分析其对人肝癌细胞株 Hep 3B 和 Huh 7 细胞增殖、凋亡、周期的影响。

1 材料与方法

1.1 组织样本与主要试剂

1.1.1 病例资料与实验细胞 从在复旦大学附属中山医院青浦分院接受肝切除术的患者中收集了总共 91 对肝癌和肿瘤邻近组织。所有肝癌患者均未接受任何术前治疗,如射频消融、经导管动脉化疗栓塞、免疫治疗和靶向治疗。组织样本由 2 名组织病理学专家确认。所有样品立即在液氮中速冻,随后储存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 用于 RNA 提取。正常肝细胞 THLE-2 和肝癌细胞系 Huh 7、BEL-7405、SNU-387 和 Hep 3B 均购自中科院上海细胞库。

1.1.2 主要试剂 TRIzol 试剂和 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒购自美国麻省 Thermo Fisher 公司;SYBR® Premix Ex Taq™ II 购自大连宝生物公司;CCK-8、BeyoClick™ Edu-488 细胞增殖检测试剂盒、FITC-Annexin V 凋亡检测试剂盒和 cycle TEST PLUS DNA 试剂盒购自上海碧云天生物公司。引物序列合成购自深圳华大基因公司。

1.2 方法

1.2.1 qRT-PCR 法检测 SH3BP5-AS1 和跨膜蛋白 6 超家族成员 2 (transmembrane 6 superfamily member 2, TM6SF2) 在肝癌组织/细胞中表达 TRIzol 试剂用于从 HCC 组织和培养细胞中分离总 RNA。使用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒将总 RNA 逆转录为 cDNA。qRT-PCR 分析使用 SYBR® Premix Ex Taq™ II 在 ABI PRISM 7300 序列检测系统中进行。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 SH3BP5-AS1 和 TM6SF2 表达,由 GAPDH 归一化相对基因表达。SH3BP5-AS1 引物序列(F:5'-ATCAGGCTCAGGTTT-

2022-03-19 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81670514)

作者单位:复旦大学附属中山医院青浦分院,上海 201700

作者简介:徐 东,男,硕士,主治医师;

吴伟新,男,副主任医师,责任作者,E-mail: wuwweixin@yeah.net

GCTCC-3'; R: 5'-AGGCTAGCAGGGTAGTCTTCA-3'); TM6SF2 引物序列(F:5'-CCCTAAGGTGCAGATGCTGA-3';R:5'-CACGGTAGGTGAAGGGTGTG-3')。

1.2.2 沉默 SH3BP5-AS1 表达 设计并合成两对 SH3BP5-AS1 特异性小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 序列, si-SH3BP5-AS1-1 序列 (F: 5' GCUGUUUAAUGUUCUAAAUA-3'; R: 5'-UUUAA-GAACAUAAAACAGCCG-3'); si-SH3BP5-AS1-2 序列 (F: 5'-GGAGACUAAGUGAAGACUACC-3'; R: 5'-UAGUCUUCACUAGUCUCCUG-3')。通过转染试剂 Lipofectamine 3000 转染至对数期的 Hep 3B 细胞。培养 48 h 后通过 qRT-PCR 法检测 SH3BP5-AS1 沉默效率。基于 TCGA 数据库可视化软件 UALCAN^[6] 分析。

1.2.3 细胞增殖活性检测 ① CCK-8 法:以每孔 5 000 个细胞的密度种植到 96 孔板后,10 μ l CCK-8 试剂加入到每个孔中,孵育 2 h 后,使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度。检测时间点分别为细胞贴壁后的 0、24、48、72 h。② 细胞克隆形成实验:将 500 个细胞种植到细胞培养 6 孔板中。持续培养直至出现可见克隆,除去培养基,并用 4% 多聚甲醛溶液将细胞固定 30~60 min,用 0.1% 结晶紫染色,拍照并计数。③ 流式检测 EdU 法:将细胞培养在 12 孔板上 48 h 后,按照 BeyoClick™ EdU-488 细胞增殖检测试剂盒操作,添加 100 mg/L EdU 试剂,孵育 2 h,并用 DAPI 试剂对细胞核染色 5 min,细胞悬液样品进行流式检测并分析 EdU⁺ 阳性细胞比例。

1.2.4 流式检测细胞凋亡和细胞周期 胰蛋白酶法收获细胞。在 FITC-Annexin V 和碘化丙啶双重染色后,使用 FITC-Annexin V 凋亡检测试剂盒,通过流式细胞仪进行细胞凋亡检测。使用 cycle TEST PLUS DNA 试剂盒对细胞进行氧化丙啶染色后,通过流式细胞仪进行细胞周期检测,并通过 FACScan 软件进行分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,采用 $\bar{x} \pm s$ 进行描述,组间差异用单因素方差分析进行比较,如方差分析结果显示组间差异有统计学意义,则进一步采用 *t* 检验进行组间差异的两两比较。应用 χ^2 检验分析 SH3BP5-AS1 和 TM6SF2 表达的关系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SH3BP5-AS1 在肝癌中表达水平 qRT-PCR 结果显示 SH3BP5-AS1 在肝癌组织中相对表达量为

(3.46 ± 0.80),在癌旁组织中相对表达量为(1.62 ± 0.74),其在临床肝癌组织中高表达($P < 0.05$,图 1A)。基于 TCGA 数据库可视化软件 UALCAN 分析,结果表明 SH3BP5-AS1 在大样本肝癌组织($n = 371$)中高表达,且在肝癌临床分期 I、II、III 中同样高表达($P < 0.05$,图 1B)。细胞水平检测结果显示,相对于正常肝细胞 THLE-2,SH3BP5-AS1 在不同肝癌细胞系 Huh 7、BEL-7405、SNU-387 和 Hep 3B 中表达均不同程度升高($P < 0.05$,图 1C)。

2.2 沉默 SH3BP5-AS1 表达效率检测 Hep 3B 细胞中,通过 siRNA 技术沉默 SH3BP5-AS1 表达后,qRT-PCR 结果显示,SH3BP5-AS1 在空白组中相对表达量为(1.02 ± 0.09),在对照组中相对表达量为(0.98 ± 0.05),在 si-SH3BP5-AS1 沉默组-1 组中相对表达量为(0.16 ± 0.03),在 si-SH3BP5-AS1 沉默组-2 中相对表达量为(0.32 ± 0.02),表达量分别降为之前的约 1/6、1/3。沉默 SH3BP5-AS1 表达的 Hep 3B 细胞用于后续功能研究($P < 0.01$)。

2.3 沉默 SH3BP5-AS1 对 Hep 3B 细胞增殖的影响 CCK-8 结果显示,相较于对照组,si-SH3BP5-AS1 沉默组-1 和 si-SH3BP5-AS1 沉默组-2 在 48 h 和 72 h 吸光度值(450 nm)均降低($P < 0.05$,图 2A)。细胞克隆形成实验结果显示空白组、对照组、si-SH3BP5-AS1 沉默组-1 和 si-SH3BP5-AS1 沉默组-2 细胞克隆数分别为(323.00 ± 19.00)、(312.30 ± 16.07)、(156.00 ± 9.16) ($F = 111.80, P < 0.05$) 和 (181.70 ± 15.63) ($F = 64.54, P < 0.05$) (图 2B)。Edu 结果显示空白组、对照组、si-SH3BP5-AS1 沉默组-1 和 si-SH3BP5-AS1 沉默组-2 Edu⁺ 阳性细胞比例分别为(25.42 ± 1.20)、(25.85 ± 0.77)、(14.69 ± 1.13) ($F = 109.10, P < 0.05$) 和 (16.56 ± 1.15) ($F = 73.76, P < 0.05$) (图 2C)。以上结果均表明沉默 SH3BP5-AS1 具有抑制 Hep 3B 细胞增殖能力。

2.4 沉默 SH3BP5-AS1 对 Hep 3B 细胞凋亡的影响 流式结果显示,空白组、对照组、si-SH3BP5-AS1 沉默组-1 和 si-SH3BP5-AS1 沉默组-2 总细胞凋亡率分别为(12.77 ± 0.80)、(13.58 ± 0.63)、(26.47 ± 0.82) 和 (23.56 ± 1.47);与对照组比较,si-SH3BP5-AS1 沉默组-1 ($F = 31.25, P < 0.05$) 和 si-SH3BP5-AS1 沉默组-2 ($F = 26.06, P < 0.05$) 总细胞凋亡率增加,差异有统计学意义(图 3),结果表明沉默 SH3BP5-AS1 促进 Hep 3B 细胞凋亡能力。

2.5 沉默 SH3BP5-AS1 对 Hep 3B 细胞周期影响 流式结果显示空白组、对照组和 SH3BP5-AS1 沉

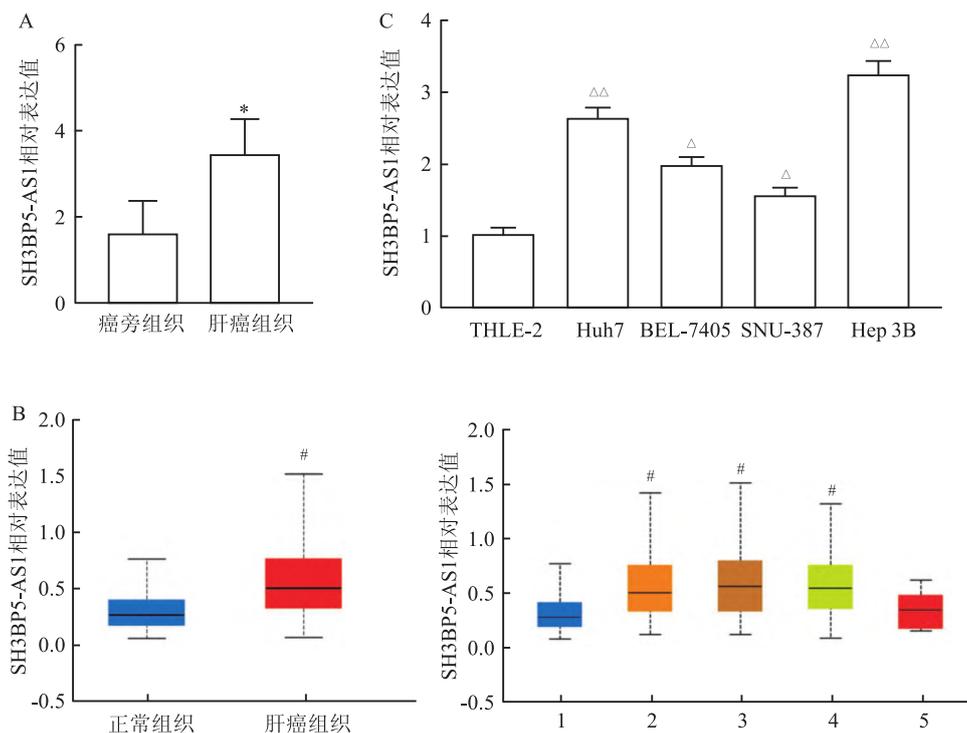


图1 SH3BP5-AS1 在肝癌中表达水平

A: qRT-PCR 检测 SH3BP5-AS1 在癌旁组织/肝癌组织中表达;B: TCGA 数据库可视化软件 UALCAN 软件分析 SH3BP5-AS1 在肝癌组织及不同肝癌临床分期中表达;C:qRT-PCR 检测 SH3BP5-AS1 在正常肝细胞 THLE-2 和肝癌细胞系 Huh 7、BEL-7405、SNU-387、Hep 3B 中表达;1:正常组织(n=50);2:肝癌 I 期(n=171);3:肝癌 II 期(n=86);4:肝癌 III 期(n=85);5:肝癌 IV 期(n=5);与癌旁组织组比较: * P < 0.05;与正常组织组比较: # P < 0.05;与 THLE-2 组相比较: Δ P < 0.05, ΔΔ P < 0.01

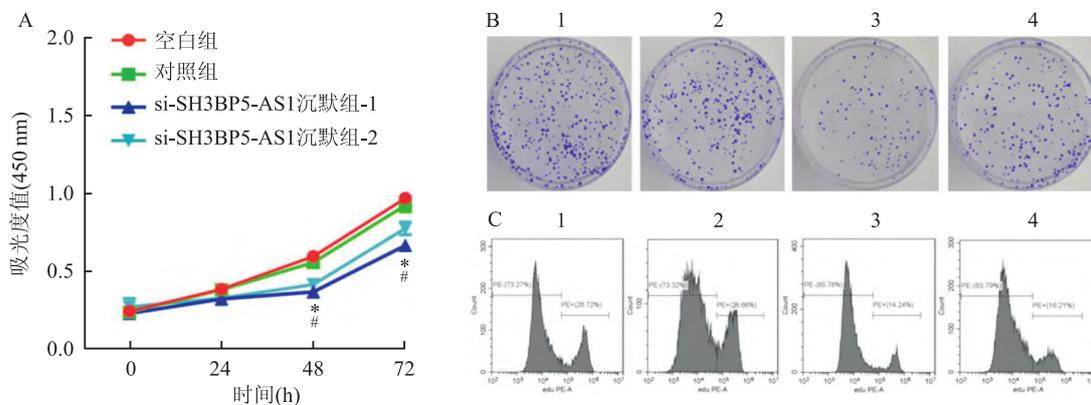


图2 沉默 SH3BP5-AS1 抑制 Hep 3B 细胞增殖作用

A:CCK-8 法;B:细胞克隆形成实验 ×1;C:流式检测 Edu 法;1:空白组;2:对照组;3:si-SH3BP5-AS1 沉默组-1;4:si-SH3BP5-AS1 沉默组-2;与空白组比较: * P < 0.05;与对照组比较: # P < 0.05

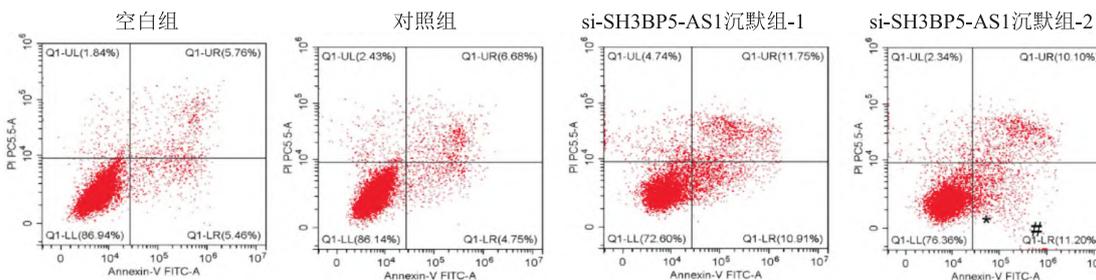


图3 沉默 SH3BP5-AS1 促进 Hep 3B 细胞凋亡作用

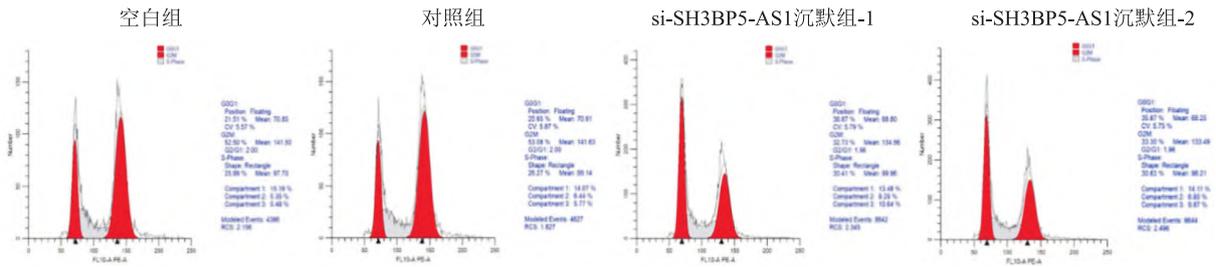


图4 沉默SH3BP5-AS1对Hep 3B细胞周期影响

默组处于 G_1 期细胞的比例为 (20.05 ± 3.49) 、 (20.86 ± 1.89) 、 (35.95 ± 2.70) 和 (33.59 ± 2.03) ($P < 0.05$), 处于 S 期细胞的比例为 (22.68 ± 7.52) 、 (24.74 ± 1.09) 、 (27.29 ± 6.98) 和 (30.17 ± 10.55) , 处于 G_2 期细胞的比例为 (57.27 ± 4.97) 、 (54.40 ± 2.40) 、 (36.76 ± 9.66) 和 (36.24 ± 10.39) 。见图 4。结果表明,与对照组相比,沉默 SH3BP5-AS1 组 G_1 期细胞增多。

2.6 SH3BP5-AS1 和 TM6SF2 在肝癌组织中表达负相关 qRT-PCR 检测沉默 SH3BP5-AS1 细胞中 TM6SF2 的表达情况,结果显示,与对照组相比,沉默 SH3BP5-AS1 组中 TM6SF2 呈现高表达 ($P < 0.05$, 图 5A)。基于肝癌组织中 SH3BP5-AS1 和 TM6SF2 表达量,统计并分析表达相关性,结果显示两者在肝癌组织中表达负相关 ($R^2 = 0.26, 95\% CI: -0.39 \sim -0.19, P < 0.05$, 图 5B)。

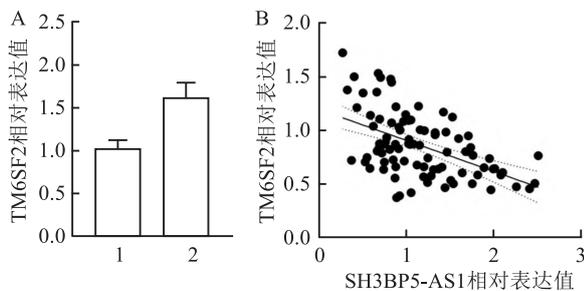


图5 SH3BP5-AS1 和 TM6SF2 在肝癌组织中表达负相关

A: qRT-PCR 检测沉默 SH3BP5-AS1 细胞中 TM6SF2 表达; 1: 对照组; 2: si-SH3BP5-AS1 沉默组; B: 肝癌组织中 SH3BP5-AS1 和 TM6SF2 表达相关性

3 讨论

肝癌是全球第 6 大常见癌症,也是癌症相关死亡的主要原因之一。虽然目前肝癌的诊断和治疗已经取得了重大进展,但肝癌患者的长期生存率仍然很低。肝癌预后不良主要有两个原因:一是肿瘤复发;二是原发性肿瘤在剩余肝脏的发展/转移^[7]。

肿瘤转移是一个复杂的过程,涉及多种基因改变。越来越多的学者^[8]开始关注肝癌发生和发展过程中多种因素的协同作用,包括 miRNA、lncRNA 和表观遗传因素等。在过去的几年中,诸多 lncRNAs 在肝癌发展/转移中的重要性已经被证实。Huang et al^[9]研究表明 lncRNA-MIAT 通过吸附 miR-214 促进肝癌细胞的增殖和侵袭;Chao et al^[10]研究表明 lncRNA-D16366 在大样本肝细胞癌患者组织和血清中含量较对照组明显降低,其表达受肿瘤大小、Hb-sAg、门静脉癌栓、Child-Pugh 评分、治疗和肿瘤转移的影响,可作为 HCC 的独立诊断和预后指标。Lee et al^[11]在针对 79 例肝癌患者的前瞻性研究中,表明外周血 lncRNA-ATB 与肝癌 TNM 分期及 T 分期、门静脉血栓形成等预后因素有关,表明 lncRNA-ATB 的升高是病死率和疾病进展的独立预测因子。

lncRNA SH3BP5-AS1 是 SH3BP5 的反义转录本 1,长度为 5 592 bp。目前有关 SH3BP5-AS1 在肿瘤研究中较少,仅检索到的文献是 Lina et al^[6]在研究 HNSCC 中,应用加权基因共表达网络分析(WGCNA)对与 HNSCC 预后相关的 lncRNAs 共表达模块进行分析,结果表明 SH3BP5-AS1 可以作为 HNSCC 的独立预后因子,主要参与血管发育、分解代谢过程的正向调节和生长调节等生物学过程。该研究旨在探索 SH3BP5-AS1 在肝癌中的差异表达及其促进肝癌发生的可能机制。首先,基于收集到的临床肝癌样本,通过 qRT-PCR 定量检测 SH3BP5-AS1 表达量,结果显示其在肝癌组织中高表达;同时,通过 TCGA 数据库在线分析网站 UALCAN,表明 SH3BP5-AS1 在大样本肝癌组织($n = 371$)中高表达;此外,细胞水平检测结果同样显示 SH3BP5-AS1 在不同肝癌细胞中高水平表达。以上均表明 SH3BP5-AS1 在肝癌中高表达,其在肝癌发生发展中发挥重要作用。为了研究 SH3BP5-AS1 在肝癌细胞中的潜在功能,该研究通过 siRNA 技术沉默 SH3BP5-AS1 表达,qRT-PCR 结果显示设计的 2 个

平行 si-SH3BP5-AS1 均是有效的,选择沉默效率更高的 si-SH3BP5-AS1-1 用于后续实验。

肿瘤细胞增殖活性与其生长、转移、复发和浸润等生物学行为及预后密切相关^[12]。该研究通过 CCK-8、细胞克隆形成实验和 Edu 方法检测 si-SH3BP5-AS1 后 Hep 3B 的增殖,结果一致表明,沉默 SH3BP5-AS1 抑制肝癌细胞增殖能力。细胞凋亡,也称为程序性细胞死亡,是在特定时间段内活跃发生的基因调控的细胞死亡过程。该研究结果显示沉默 SH3BP5-AS1 促进 Hep 3B 细胞凋亡能力。细胞凋亡是细胞生长分化调节的重要手段,又是机体免受肿瘤危害的重要保护机制,癌变了的细胞发生凋亡的能力通常极低,而增殖能力则相应增强,这直接导致了瘤细胞快速而病态地分裂增殖^[13],表明 SH3BP5-AS1 可能通过抑制凋亡促进肿瘤生长。在肿瘤中,常见调节细胞周期机制和频率元件的错乱反映出异常的细胞周期对肿瘤恶性增殖表型的重要性^[14]。该研究结果显示,沉默 SH3BP5-AS1 组 G₁ 期细胞增多,说明沉默 SH3BP5-AS1 可能将肝癌细胞阻断在 DNA 合成前期,从而抑制细胞增殖。

TM6SF2 主要表达于与载脂蛋白 B (APOB)-脂蛋白产生相关的组织中,包括肝脏、小肠和肾脏,提示在脂蛋白代谢中可能发挥作用。该课题组前期研究^[15]表明 TM6SF2 在肝癌中表达降低,该研究表明 TM6SF2 在沉默 SH3BP5-AS1 肝癌细胞中高表达,且基于肝癌组织中 SH3BP5-AS1 和 TM6SF2 两者表达负相关,提示 SH3BP5-AS1 可能基于 TM6SF2 发挥作用。

综上所述,该研究表明 SH3BP5-AS1 是一个重要的促癌非编码 RNA。该研究可为肝癌患者的肿瘤靶向治疗提供理论基础。

参考文献

[1] El Jabbour T, Lagana S M, Lee H. Update on hepatocellular carcinoma: pathologists' review[J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25

(14):1653-65.

- [2] Hartke J, Johnson M, Ghabril M. The diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Semin Diagn Pathol*, 2017, 34(2): 153-9.
- [3] Peng W X, Koirala P, Mo Y Y. LncRNA-mediated regulation of cell signaling in cancer[J]. *Oncogene*, 2017, 36(41):5661-7.
- [4] Zhao Z, Sun W, Guo Z, et al. Mechanisms of lncRNA/microRNA interactions in angiogenesis[J]. *Life Sci*, 2020, 254:116900.
- [5] Zhu J, Fu H, Wu Y, et al. Function of lncRNAs and approaches to lncRNA-protein interactions[J]. *Sci China Life Sci*, 2013, 56(10):876-85.
- [6] Lina S. Identification of hub lncRNAs in head and neck cancer based on weighted gene co-expression network analysis and experiments[J]. *FEBS Open Bio*, 2021, 11(7):2060-73.
- [7] Piñero F, Dirchwolf M, Pessôa M G. Biomarkers in hepatocellular carcinoma: diagnosis, prognosis and treatment response assessment[J]. *Cells*, 2020, 9(6):1370.
- [8] Han T S, Hur K, Cho H S, et al. Epigenetic associations between lncRNA/circRNA and miRNA in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(9):2622.
- [9] Huang X, Gao Y, Qin J, et al. lncRNA MIAT promotes proliferation and invasion of HCC cells via sponging miR-214[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2018, 314(5):G559-65.
- [10] Chao Y, Zhou D. lncRNA-D16366 is a potential biomarker for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25:6581-6.
- [11] Lee Y R, Kim G, Tak W Y, et al. Circulating exosomal noncoding RNAs as prognostic biomarkers in human hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(6):1444-52.
- [12] Evan G I, Vousden K H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer[J]. *Nature*, 2001, 411(6835):342-8.
- [13] Goldar S, Khaniani M S, Derakhshan S M, et al. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(6):2129-44.
- [14] Kastan M B, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer[J]. *Nature*, 2004, 432(7015):316-23.
- [15] 汪一村,徐东,陆欢华,等. TM6SF2 在肝癌中的差异表达及其对肝癌细胞生物学行为的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(2):180-5.

Differential expression of lncRNA SH3BP5-AS1 in hepatocellular carcinoma and its mechanisms of promoting hepatocarcinogenesis

Xu Dong, Lu Huanhua, Wang Xiaoliang, Wu Weixin

(Qingpu Branch of Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 201700)

Abstract Objective To investigate the differential expression of lncRNA SH3BP5-AS1 in hepatocellular carcinoma and the possible mechanism of promoting hepatocarcinogenesis. **Methods** The expression of SH3BP5-AS1 in hepatocellular carcinoma tissue/paraneoplastic tissue ($n = 91$) was detected by qRT-PCR. TCGA database visual-

重组 PACAP13 神经肽对小鼠胸腺功能的影响

吴倩妍¹, 梁阳², 刘贞银³, 张华华¹

摘要 目的 在细胞、器官及个体水平探究垂体腺苷酸环化酶激活肽重组 13 肽 (PACAP13 肽) 对胸腺功能的影响及其机制。方法 通过体外原代培养胸腺上皮细胞 (TEC) 及骨髓间充质干细胞 (MSC), 设置淋巴细胞组、淋巴细胞 + TEC 组、淋巴细胞 + MSC 组、淋巴细胞 + TEC + MSC 组, 检测 PACAP13 肽处理后各组淋巴细胞的增殖情况, 检测培养液中细胞因子白细胞介素 (IL)-1、IL-2、IL-6 和转化生长因子 (TGF) 的含量; 上述各组细胞加入地塞米松 (Dex) 诱导细胞凋亡, Annexin V-FITC/PI 流式双染检测 PACAP13 肽对各组淋巴细胞凋亡的情况。设置胸腺组、胸腺 + TEC 组、胸腺 + MSC 组、胸腺 + TEC + MSC 组, 并添加 PACAP13 肽, 实时定量 PCR (qPCR) 检测胸腺信号结合 T 细胞受体删除环 (sjTREC) 的含量。注射降植烷诱导狼疮模型小鼠, 随机分为模型组和 PACAP13 组, 模型组注射 0.9% 生理盐水, PACAP13 组注射 PACAP13 肽, qPCR 检测胸腺、脾脏 sjTREC 含

量; ELISA 检测血清狼疮相关自身抗体水平及逆转录 PCR (qRT-PCR) 检测胸腺相关 mRNA 表达水平。结果 与淋巴细胞组相比, 淋巴细胞 + TEC 组、淋巴细胞 + MSC 组、淋巴细胞 + TEC + MSC 组胸腺淋巴细胞增殖率增加, 凋亡率下降 ($P < 0.05$); 与对照组相比, PACAP13 组淋巴细胞增殖率增加, 凋亡率下降, 细胞培养液中细胞因子 IL-1、IL-2、IL-6 和 TGF 增加 ($P < 0.05$)。与胸腺组相比, 胸腺 + TEC 组、胸腺 + MSC 组、胸腺 + TEC + MSC 组胸腺 sjTREC 含量增加; 与对照组相比, PACAP13 肽组胸腺 sjTREC 含量增加。与模型组相比, PACAP13 组狼疮小鼠胸腺和脾脏中 sjTREC 的含量增加 ($P < 0.05$), 胸腺中 Aire、Fezf2、Foxp3、TGF- β mRNA 表达水平增加 ($P < 0.01$), 胸腺 CXCL13 mRNA 表达水平下降 ($P < 0.01$), 血清自身抗体抗 dsDNA 抗体、抗 RNP/sm 抗体、ANA 水平下降 ($P < 0.05$)。结论 PACAP13 肽能促进胸腺淋巴细胞增殖和抗凋亡, 在体外及体内均具有增强胸腺淋巴细胞的生成和输出能力以及降低狼疮小鼠自身抗体水平的免疫调节作用, 其作用机制与调节胸腺细胞因子分泌和基因转录水平有关。

关键词 PACAP13 肽; 胸腺; 胸腺上皮细胞; 骨髓间充质干细胞

中图分类号 R 392.11

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)06-0877-08
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.06.007

2022-03-25 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31200679); 广东省自然科学基金 (编号: 2018A0303130291)

作者单位: 广东医科大学¹ 基础医学院、³ 科研平台服务管理中心, 东莞 523808

² 广东茂名健康职业学院, 茂名 525400

作者简介: 吴倩妍, 女, 硕士研究生;

张华华, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: huahua-zhang@126.com

ization software UALCAN analyzed SH3BP5-AS1 expression in a large sample of hepatocellular carcinoma tissues ($n = 371$). The expression of SH3BP5-AS1 was detected by qRT-PCR in normal hepatocytes THLE-2 and hepatoma cell lines Huh 7, BEL-7405, SNU-387, Hep 3B. After silencing SH3BP5-AS1 expression by siRNA technology, the effects of silencing SH3BP5-AS1 on the proliferation of Hep 3B cells were detected by CCK-8 assay, cell clone formation assay and Edu assay, and the effects of silencing SH3BP5-AS1 on apoptosis and cycle of Hep 3B cells were detected by flow-through assay. Based on the expression of SH3BP5-AS1 and TM6SF2 in hepatocellular carcinoma tissues, the expression correlation was counted and analyzed. **Results** SH3BP5-AS1 was highly expressed in hepatocellular carcinoma tissues. SH3BP5-AS1 was highly expressed in a large sample of hepatocellular carcinoma tissues from the TCGA database SH3BP5-AS1 was highly expressed in different hepatocellular carcinoma cell lines Huh 7, BEL-7405, SNU-387 and Hep 3B to a different extent. Silencing of SH3BP5-AS1 by siRNA inhibited the proliferation ability of Hep 3B cells, promoted apoptosis ability, affected the cell cycle and increased the number of G1 phase cells. SH3BP5-AS1 and TM6SF2 expression were negatively correlated in hepatocellular carcinoma tissues. **Conclusion** SH3BP5-AS1 is an important oncogenic non-coding RNA that can provide a theoretical basis for tumour-targeted therapy in patients with hepatocellular carcinoma.

Key words lncRNA SH3BP5-AS1; hepatocellular carcinoma; TM6SF2; cell proliferation; cell apoptosis; cell cycle