

利用CRISPR/Cas9技术敲除长非编码RNA SNHG16基因促进K562细胞CD235a的表达上调

郭青 徐长禄 马艺戈 王冰蕊 赵艳红 王鼎 张英楠 黄鑫 刘金花 高洁* 石莉红*

(实验血液学国家重点实验室, 中国医学科学院血液病医院/中国医学科学院血液学研究所, 天津 300020)

摘要 为了探究敲除长非编码RNA SNHG16对人慢性髓系白血病K562细胞的影响, 我们利用CRISPR/Cas9技术在K562细胞中敲除SNHG16基因, 通过流式分选获得单细胞, 经扩增培养、基因组PCR鉴定、测序鉴定后, 获得SNHG16杂合和纯合敲除株; 通过Wright-Giemsa染色、MTS检测、流式分析和qRT-PCR分别检测了SNHG16敲除后对K562细胞形态、增殖、细胞表面标志蛋白及红系分化调控因子的影响。实验结果显示, 敲除SNHG16后不影响K562细胞的形态和增殖, 显著促进了K562细胞表面标志蛋白CD235a和红系分化调控因子的表达水平。该研究表明, 长非编码RNA SNHG16不影响K562细胞的增殖, 但SNHG16对K562细胞表面标志蛋白CD235a的表达水平有一定的调控作用。

关键词 CRISPR/Cas9技术; 长非编码RNA SNHG16; CD235a; 红系分化调控因子

Knockout of Long Noncoding RNA SNHG16 Gene by CRISPR/Cas9 System Enhanced Expression of CD235a in K562 Cells

Guo Qing, Xu Changlu, Ma Yige, Wang Bingrui, Zhao Yanhong, Wang Ding, Zhang Yingnan, Huang Xin, Liu Jinhua, Gao Jie*, Shi Lihong*

(State Key Laboratory of Experimental Hematology, Chinese Academy of Medical Sciences Blood Diseases Hospital/Chinese Academy of Medical Sciences Institute of Hematology, Tianjin 300020, China)

Abstract The aim of this work was to investigate the effect of long noncoding RNA SNHG16 knock-out on human chronic myeloid leukemia cells (K562 cells). The SNHG16 gene in K562 cells was knocked out by using CRISPR/Cas9 system. Single cells were gained by flow cytometric sorting technique. SNHG16^{+/-} and SNHG16^{-/-} cell lines were gained after culture, identification of PCR and sequencing. The effects of SNHG16 depletion on morphology, proliferation, cell surface marker and erythroid transcription factors of K562 cells were detected by Wright-Giemsa staining, MTS assay, flow cytometry, and qRT-PCR. The results indicated that SNHG16 depletion did not affect the morphology and proliferation of K562 cells, but promoted the expression level of K562 cell surface marker CD235a and erythroid transcription factors. In conclusion, long noncoding RNA SNHG16 does not af-

收稿日期: 2019-04-03 接受日期: 2019-04-24

国家重点研发计划(批准号: 2016YFA0102300、2017YFA0103102)、国家自然科学基金委(批准号: 81870089、81700105)、中国医学科学院医学与健康科技创新工程(批准号: 2016-I2M-1-018、2016-I2M-3-002、2017-I2M-1-015)、中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费(批准号: 2018PT31033)和实验血液学国家重点实验室自主课题(批准号: 157-z18-07)资助的课题

*通讯作者。Tel: 022-23909448, E-mail: shilihongxys@ihcams.ac.cn; Tel: 15122366426, E-mail: gaojie2@ihcams.ac.cn

Received: April 3, 2019 Accepted: April 24, 2019

This work was supported by the National Key Research and Development Plan (Grant No.2016YFA0102300, 2017YFA0103102), National Natural Science Foundation of China (Grant No.81870089, 81700105), CAMS Initiative for Innovative Medicine (Grant No. 2016-I2M-1-018, 2016-I2M-3-002, 2017-I2M-1-015), CAMS Medical Epigenetics Research Center (Grant No.2018PT31033) and State Key Laboratory of Experimental Hematology Independent Subject (Grant No.157-z18-07)

*Corresponding authors. Tel: +86-22-23909448, E-mail: shilihongxys@ihcams.ac.cn; Tel: +86-15122366426, E-mail: gaojie2@ihcams.ac.cn

网络出版时间: 2019-08-12 15:12:28 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190812.1512.034.html>

fect the proliferation of K562 cells, but SNHG16 plays a role in the regulation of K562 cell surface marker protein CD235a.

Keywords CRISPR/Cas9 system; long noncoding RNA SNHG16; CD235a; erythroid transcription factors

人类基因组中大约75%的DNA序列可以转录为RNA,然而只有不到2%的基因编码蛋白^[1]。在大量的非编码RNA中,长度大于200个核苷酸的转录本被称为长链非编码RNA(long noncoding RNA, lncRNA),具有与mRNA相似的结构但没有明显的开放阅读框^[2]。LncRNA通过不同的分子机制在细胞增殖、分化、衰老和凋亡等多种生物过程中发挥关键功能,同时也参与多种癌症的发生发展过程^[3-4]。目前关于lncRNA在正常生理和疾病中的功能仍然是研究的热点。

研究发现, lncRNA SNHG16 (small nucleolar RNA host gene 16)是多种癌症的潜在致癌基因,在癌症发生发展中发挥重要作用,且多通过作为竞争性内源RNA(ceRNA)结合microRNA(miRNA)发挥其功能。Christensen等^[5]首先发现, SNHG16在腺瘤和各个阶段的结直肠癌中的表达水平发生显著上调, Wnt信号通路能够调节SNHG16,从而使SNHG16在结直肠癌发展过程中发挥致癌作用。在膀胱癌患者肿瘤组织中也发现SNHG16的表达量上调,降低SNHG16的表达水平能够抑制膀胱癌细胞增殖,促进癌细胞凋亡^[6], SNHG16通过结合miR-98从而调节miR-98及其靶点STAT3的表达水平,进而激活Wnt/ β -catenin信号通路促进膀胱癌发生^[7],此外SNHG16可以作为膀胱癌临床诊断和预后的标志分子^[8-9]。除了对实体瘤的影响, Yang等^[10]研究发现, SNHG16也在急性淋巴细胞白血病细胞(acute lymphoblastic leukemia, ALL)中上调表达, SNHG16表达量下调会抑制ALL细胞的体外增殖、癌细胞转移以及体内移植。为了进一步研究SNHG16对其他类型白血病及对白血病细胞相关特性的影响,本研究利用CRISPR/Cas9技术,在人慢性髓系白血病细胞K562中成功实现了SNHG16基因的敲除,并进一步探索了长链非编码RNA SNHG16对K562细胞增殖、细胞表面标志蛋白CD235a表达水平和红系分化调控因子的影响。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

K562细胞系购自美国ATCC细胞库; RPMI-1640基础培养液、胎牛血清、L-glutamine、Penicillin-Strepto-

mycin等细胞培养相关试剂均购自美国Gibco公司; pL-CRISPR-EFS-GFP、pLKO5-EFS-tRFP质粒由周家喜研究员课题组惠赠; DH5 α 感受态菌株、2 \times EasyTaq PCR SuperMix、TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix购自北京全式金生物公司; Lipofectamine3000转染试剂购自美国invitrogen公司; pGEM-T Easy Vector System、CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay试剂均购自美国Promega公司; Wright-Giemsa染液购自贝索生物技术公司; 基因组提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; CD71、CD235a流式抗体购自美国eBioscience公司; 所有寡核苷酸序列合成及测序均由华大基因生物技术有限公司完成; Synergy H4多功能酶标仪购自美国伯腾仪器有限公司; Shandon Cytospin 4细胞离心涂片机购自Thermo Scientific公司; 流式细胞仪Canto II购自Bection Dickinson公司。

1.2 设计针对SNHG16的特异性向导RNA(sgRNA)

使用sgRNA设计网站<http://crispr.mit.edu>, 分别针对SNHG16 5'端和3'端设计sgRNA, 由于SNHG16 Exon4的3'端与其他基因存在重合, 因此只能在Exon4上与该基因不重合的部分设计3'端sgRNA。输入目的序列后, 根据结果在基因5'端和3'端各挑选两个评分在75分以上的sgRNA, 命名为5'-sg1、5'-sg2、3'-sg1、3'-sg2, 由于载体使用限制性内切酶BsmB I进行酶切, 需要在sgRNA的5'端添加CACC, 在互补链的5'端添加AAAC, 最终获得的sgRNA序列如下, 见表1。

1.3 质粒构建

将合成的sgRNA寡核苷酸链加水溶解, 取上游链和下游链各1 μ L(浓度100 μ mol/L), 加到8 μ L水中混匀(终浓度10 μ mol/L), 37 $^{\circ}$ C孵育30 min, 95 $^{\circ}$ C 5 min, 随后以5 $^{\circ}$ C/min的速率降温至25 $^{\circ}$ C, 使sgRNA寡核苷酸链退火形成双链。

连接5'端和3'端sgRNA所使用的载体分别为pL-CRISPR-EFS-GFP和pLKO-EFS-tRFP。使用限制性内切酶BsmB I对其进行酶切, 酶切体系为载体500 ng, BsmB I 1 μ L, Cutsmart buffer 1 μ L, 加水补充到10 μ L, 37 $^{\circ}$ C孵育1 h。将完成退火的5'端sgRNA与酶切后的pL-CRISPR-EFS-GFP载体进行连接, 将3'端sgRNA

表1 sgRNA序列
Table 1 sgRNA sequence

名称 Name	sgRNA序列(5'→3') sgRNA sequence (5'→3')
5'-sg1-F	CAC CGC CGA GAA GAC TTG CGC GCA G
5'-sg1-R	AAA CCT GCG CGC AAG TCT TCT CGG C
5'-sg2-F	CAC CGT GCC GAG AAG ACT TGC GCG C
5'-sg2-R	AAA CGC GCG CAA GTC TTC TCG GCA C
3'-sg1-F	CAC CGT AGT GGG TAA CTA AAC AAG
3'-sg1-R	AAA CCT TGT TTA GTT ACC CAC TAC
3'-sg2-F	CAC CGT CTC CGC AGA GTG CCT TCC
3'-sg2-R	AAA CGG AAG GCA CTC TGC GGA GAC

与酶切后的pLKO-EFS-tRFP载体进行连接, 连接体系为酶切后的载体10 μ L、sgRNA寡核苷酸链1 μ L、T4 ligase 1 μ L、T4 ligase buffer 1.5 μ L、H₂O 1.5 μ L, 室温连接2 h。使用DH5 α 感受态菌株将连接产物进行转化。过夜培养后, 挑取长出的单菌落, 摇菌6~8 h, 送华大基因生物技术有限公司进行测序。

1.4 细胞培养

K562细胞使用RPMI-1640基础培养基, 添加10%胎牛血清、Penicillin(终浓度100 U/mL)-Streptomycin(终浓度100 μ g/mL)、L-glutamine(终浓度2 mmol/L), 置于37 $^{\circ}$ C、CO₂体积分数为5%的孵箱中培养。

1.5 质粒转染

使用Lipofectamine3000转染试剂将pL-CRISPR-EFS-GFP-5'sgRNA和pLKO-EFS-tRFP-3'sgRNA同时转到K562细胞中, 转染体系如下: EP管中加入125 μ L opti-MEM与7.5 μ L Lipo3000混匀; EP管中加入125 μ L opti-MEM与10 μ L P3000, 再加入pL-CRISPR-EFS-GFP-5'sgRNA和pLKO-EFS-tRFP-3'sgRNA各2 μ g(按照5'-sg1与3'-sg1、5'-sg2与3'-sg2的组合), 混匀。将P3000混合物加到Lipo3000混合物中, 混匀后室温静置15 min。准备K562细胞种于6孔板中, 细胞密度为 5×10^5 个/mL, 每孔2 mL细胞, 共两孔, 将静置好的转染试剂加到细胞中, 摇匀后放培养箱培养, 12 h后换液。

1.6 单细胞分选及敲除株鉴定

K562细胞转染48 h后, 使用AriaIII细胞分选仪分选同时表达绿色荧光蛋白GFP和红色荧光蛋白RFP的细胞到96孔板中, 保证1个细胞/孔, 置于培养箱中培养2~3周, 直到细胞生长到足够数量, 每孔取 2×10^5 个细胞提取基因组DNA进行PCR鉴定。

PCR鉴定的引物使用Primer-BLAST设计, 外侧鉴定引物设计在SHNG16基因两端Cas9切割位点的

外侧, 目的片段长度为509 bp和996 bp, 上下游引物序列分别为F-5'-CCC CTC GAA CTT TCT GTG CT-3'、R-5'-TGC CTT GGT GAG TCA ACA CT-3'。PCR体系为: EasyTaq PCR SuperMix 10 μ L, 上下游引物各0.5 μ L, 基因组DNA 1 μ L, ddH₂O 8 μ L。PCR程序为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 30个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。内侧鉴定引物设计在基因内部, 目的片段长度为1 109 bp, 上下游引物序列分别为F-5'-GTG GCT GTT AGT GCT ATG GTC-3'、R-5'-CAT GCC AGT CGT GAC ATT CAG-3'。PCR体系为: EasyTaq PCR SuperMix 10 μ L, 上下游引物各0.5 μ L, 基因组DNA 1 μ L, ddH₂O 8 μ L。PCR程序为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 75 s, 30个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。每孔细胞都使用外侧引物和内侧引物进行PCR, PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测条带大小。符合目的条带的PCR产物与pGEM-T Easy载体连接后使用DH5 α 感受态菌株将连接产物进行转化, 挑取单菌落, 摇菌6~8 h, 送华大基因生物技术有限公司进行测序。

1.7 Wright-Giemsa染色

收集 3×10^4 个细胞, 使用90 μ L PBS(含2% FBS)将细胞重悬, 使用细胞离心涂片机进行甩片。将甩好的片子浸泡于甲醇中1 min, 然后晾干。在细胞上滴加50 μ L染液A液染色30 s, 再滴加100 μ L染液B液, 用洗耳球吹匀后染色10 min, 水洗30 s。

1.8 MTS检测细胞增殖

96孔板中种 4×10^3 个/孔(体积为100 μ L)K562细胞, 每株细胞5个复孔, Day 0~3连续3天检测细胞增殖。检测前, 加CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay试剂20 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C培养箱放置2 h后, 用酶标仪检测490 nm处的D₄₉₀值。

表2 qRT-PCR引物序列
Table 2 qRT-PCR primer sequence

引物名称 Primer Name	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')
SNHG16-F	GTC AGC CTC AGT TTC CAA AGC
SNHG16-R	TAA AGA CAT GGC ACT TTG GGT C
β -Actin -F	GGC ACC ACC ATG TAC CCT G
β -Actin -R	CAC GGA GTA CTT GCG CTC AG
GATA1-F	AGA TGA ATG GGC AGA ACA GG
GATA1-R	ACA GTG TCG TGG TGG TCG T
TALI-F	GAA GAG GAG ACC TTC CCC CT
TALI-R	GGT GAA GAT ACG CCG CAC A
KLF1-F	CCA AGA GCT CCC ACC TGA
KLF1-R	CGT GTG TTT CCG GTA GTG G

1.9 流式细胞术检测

取 1×10^5 个细胞, 300 g离心5 min, 弃上清。加1 mL PBS洗一遍细胞, 用100 μ L PBS(含2% FBS)重悬, 每管添加PE-CD235a、APC-CD71流式抗体各1 μ L, 4 $^{\circ}$ C避光孵育15 min。加1 mL PBS洗一遍细胞, 用300 μ L PBS重悬细胞后, 使用Canto II流式细胞分析仪进行检测。

1.10 qRT-PCR

使用Trizol法提取细胞总RNA, 按照逆转录试剂盒的说明合成cDNA。以 β -actin作为内参, 使用荧光定量PCR仪检测靶基因表达情况, 引物序列见表2。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析各组细胞之间基因表达差异。

1.11 统计学分析

每次实验至少独立重复3次, 采用GraphPad Prism 6.0软件对实验数据进行统计分析及图表制作。检测数据以平均值 \pm 标准差 (means \pm SD)来表示, 数据的统计学差异采用 t 检验进行统计学分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 SNHG16 sgRNA重组载体构建及单个细胞分选

SNHG16基因信息及5'端及3'端sgRNA的相对位置和序列如图所示(图1A)。将sgRNA退火得到双链, 分别与酶切后的pL-CRISPR-EFS-GFP和pLKO5-EFS-tRFP载体进行连接。

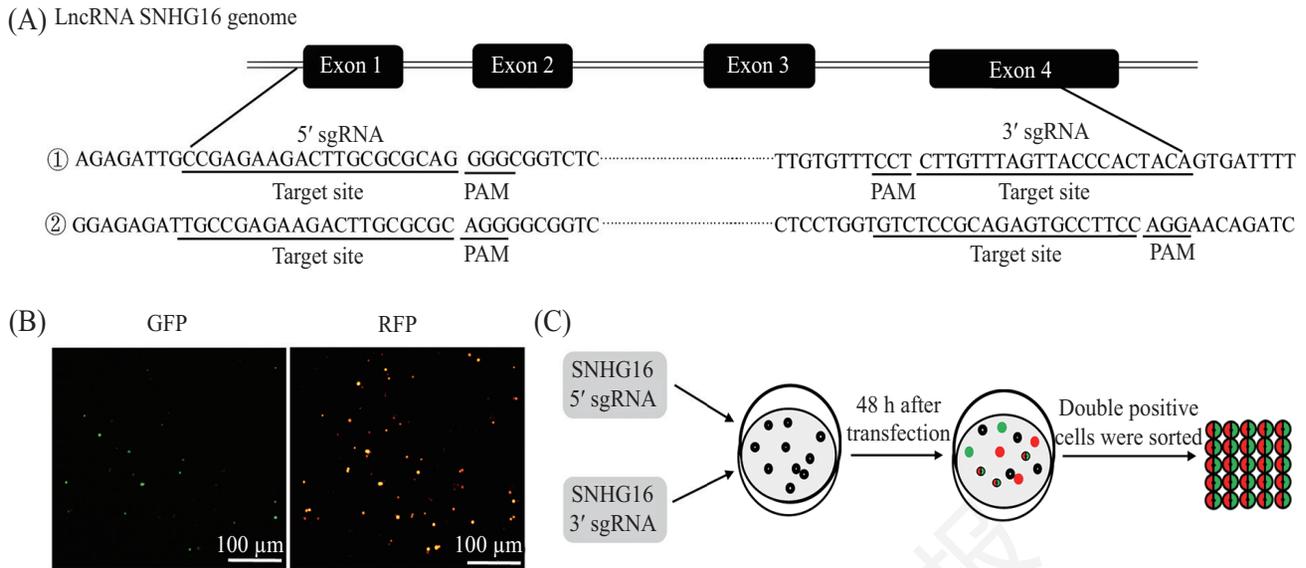
同时向K562细胞中转染5'和3'端sgRNA重组质粒, 质粒共转染48 h后观察到K562细胞同时表达绿色荧光蛋白和红色荧光蛋白(图1B), 随后使用流式分选仪将同时表达绿色荧光和红色荧光的单个细胞

分选到96孔板中, 1个细胞/孔(图1C)。培养2~3周后, 提取每株细胞的基因组DNA, 进行PCR鉴定。

2.2 筛选杂合及纯合敲除SNHG16基因的K562细胞株

针对SNHG16基因设计外侧鉴定引物(outside primer)和内侧鉴定引物(inside primer)(图2A)。经PCR鉴定外侧引物能扩增出目的条带, 内侧引物不能扩增出目的条带的细胞为SNHG16纯合敲除细胞; 外侧引物与内侧引物均能扩增出目的条带的细胞为SNHG16杂合敲除细胞; 外侧引物不能扩增出目的条带, 内侧引物能扩增出目的条带的细胞为未敲除细胞。我们通过这种鉴定方法获得了杂合敲除和纯合敲除SNHG16的K562细胞, 其中SNHG16^{+/-}-1、SNHG16^{+/-}-2为杂合敲除细胞, SNHG16^{-/-}-1、SNHG16^{-/-}-2为纯合敲除细胞(图2B), 由于不同的5'和3'端sgRNA的靶向位点不同, 因而使用外侧引物获得的PCR产物的条带大小有差异。为进一步确定SNHG16敲除情况, 我们将2株杂合敲除株和2株纯合敲除株的基因组DNA用外侧引物进行PCR, 并将PCR产物连T载后进行测序。测序结果显示, SNHG16^{+/-}-1、SNHG16^{+/-}-2的一条染色体和SNHG16^{-/-}-1、SNHG16^{-/-}-2的两条染色体都发生大片的碱基缺失, 说明我们成功获得了SNHG16杂合和纯合敲除株(图2C)。

使用qRT-PCR检测敲除株中SNHG16的表达水平, 结果显示杂合敲除株SNHG16^{+/-}-1和SNHG16^{+/-}-2中SNHG16的表达水平均明显降低, 纯合敲除株SNHG16^{-/-}-1和SNHG16^{-/-}-2中SNHG16的表达水平极低, 几乎为0(图2D)。



A: sgRNA在基因组上的位置及序列信息, 序列①、②代表两组不同5'和3'sgRNA序列的组合; B: GFP与RFP的表达水平; C: SNHG16敲除细胞构建流程。

A: location of sgRNA on the genome and the sequence information, sequence①, ② represent combination of different 5' and 3' sgRNA sequences; B: expression level of GFP and RFP; C: construction of SNHG16 knock-out cell line.

图1 sgRNA序列信息及SNHG16敲除细胞构建

Fig.1 sgRNA sequence information and construction of SNHG16 knock-out cell line

2.3 敲除SNHG16对K562细胞形态及增殖没有影响

在对照细胞和敲除SNHG16的K562细胞中进行了Wright-Giemsa染色, 染色结果显示, 敲除SNHG16对K562细胞形态没有影响(图3A)。为了检测SNHG16敲除细胞增殖的变化, 将对照组Control和敲除组SNHG16^{+/-}-1、SNHG16^{+/-}-2、SNHG16^{-/-}-1和SNHG16^{-/-}-2同时进行了MTS实验。实验结果显示, 杂合和纯合敲除SNHG16后细胞株增殖与对照组相比没有发生显著变化(图3B), 敲除SNHG16不影响K562细胞增殖。

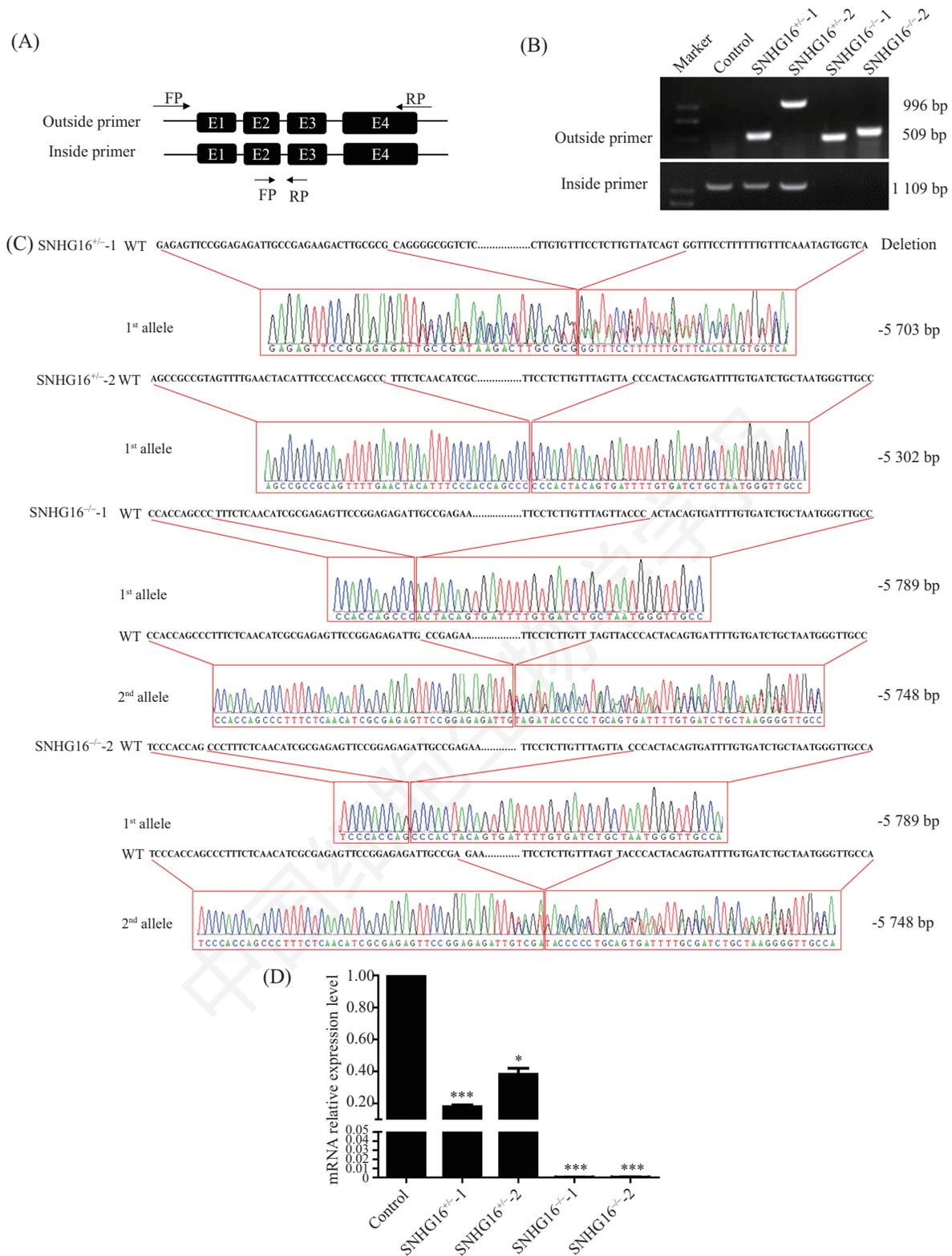
2.4 敲除SNHG16促进CD235a和红系分化相关转录因子的表达上调

为了检测K562细胞表面标志蛋白CD71和CD235a的变化情况, 我们使用流式细胞分析仪检测了SNHG16杂合敲除和纯合敲除细胞CD71和CD235a的表达水平。流式结果显示, 敲除SNHG16后细胞表面标志蛋白CD235a表达高于对照组细胞, 而CD71的表达水平没有发生显著变化(图4A)。对CD235a⁺细胞的比例进行统计学分析, SNHG16^{+/-}-1与Control组相比差异显著, SNHG16^{+/-}-2、SNHG16^{-/-}-1、SNHG16^{-/-}-2与Control组相比差异极显著, 而各组之间CD71⁺细胞的比例

没有显著变化(图4B)。由于CD235a是红细胞膜表面的特异糖蛋白, 其表达水平的变化的可能由于红系相关转录因子的表达发生变化引起的。我们使用qRT-PCR检测了红系分化关键的调控因子GATA1、TALI、KLF1等mRNA的表达水平, 结果显示敲除SNHG16后, GATA1、TALI、KLF1 mRNA的表达水平均发生上升, 且在纯合敲除细胞中, 转录因子的升高水平高于杂合敲除细胞的水平(图4C)。

3 讨论

CRISPR/Cas9系统是一个有效的基因编辑工具^[11], 我们通过CRISPR/Cas9技术构建了敲除SNHG16基因的K562细胞株, 用以研究SNHG16对人慢性髓系白血病K562细胞的影响。由于构建长非编码RNA敲除株需要在基因的5'端及3'端同时进行切割, 因此获得基因纯合敲除细胞的概率较低。在使用5' sgRNA及3' sgRNA同时转染野生型K562细胞, 并进行分选、培养、基因组DNA PCR鉴定后, 只获得了SNHG16杂合敲除细胞, 未获得纯合敲除细胞。因此我们挑选了一株杂合敲除株, 向该细胞中再次转染新的5' sgRNA和3' sgRNA, 进行同样的筛选流程后, 提高了纯合敲除株的比例, 成功获得了SNHG16基因

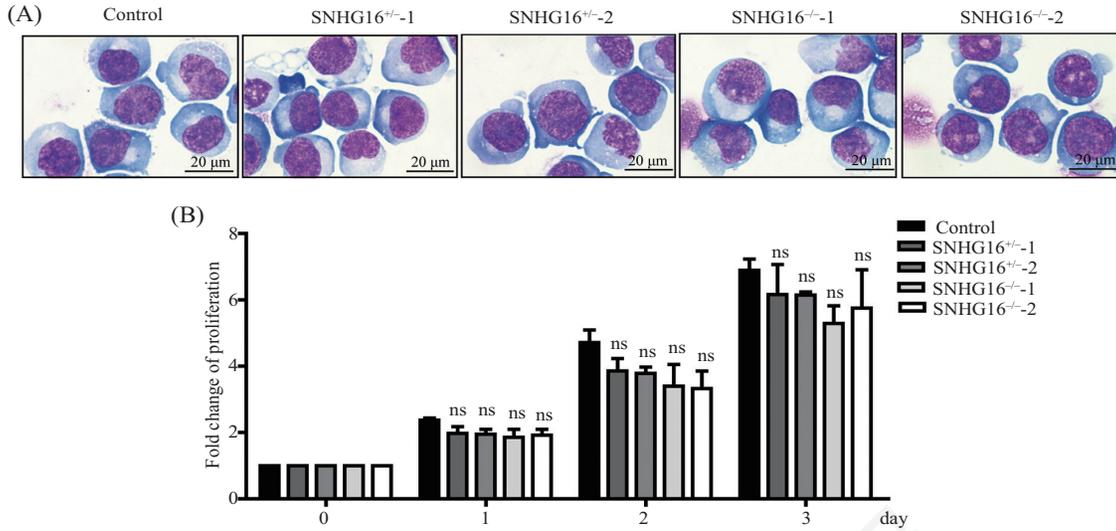


A: PCR鉴定引物设计位点(FP:正向引物, RP: 反向引物); B: 琼脂糖凝胶电泳检测 Control、SNHG16^{+/-}和SNHG16^{-/-}细胞PCR产物大小; C: WT(wild type)序列及SNHG16^{+/-}和SNHG16^{-/-}细胞测序结果; D: qRT-PCR检测SNHG16^{+/-}和SNHG16^{-/-}细胞中SNHG16 mRNA表达水平, 与Control比较, **P*<0.05, ****P*<0.001。

A: location of primers for identification (FP: forward primer, RP: reverse primer); B: PCR products of Control, SNHG16^{+/-} and SNHG16^{-/-} cell lines detected by agarose gel electrophoresis; C: the sequences of WT (wild type), SNHG16^{+/-} and SNHG16^{-/-} cell lines; D: SNHG16 mRNA expression in SNHG16^{+/-} and SNHG16^{-/-} cells was measured by qRT-PCR analysis, compared with Control, **P*<0.05, ****P*<0.001.

图2 SNHG16敲除株鉴定及SNHG16表达水平检测

Fig.2 Identification of SNHG16 knocked out cell lines and SNHG16 expression level detection

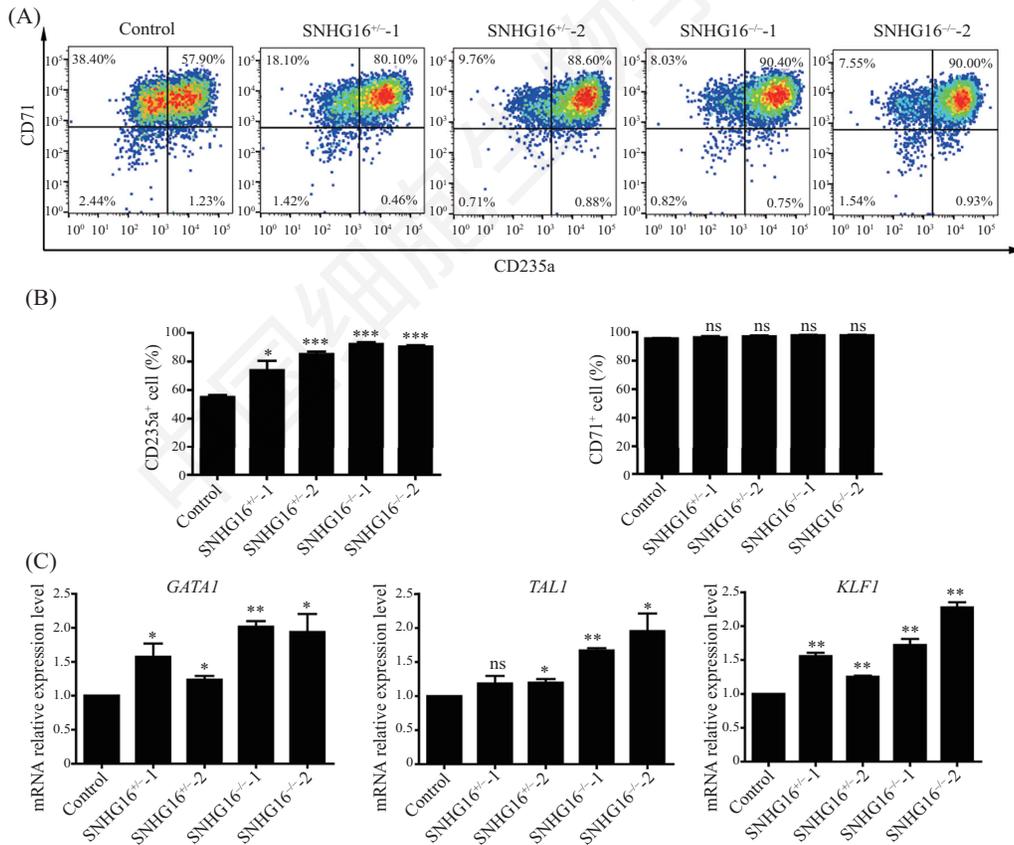


A: Wright-Giemsa染色; B: MTS检测Control、SNHG16^{+/-}和SNHG16^{-/-}细胞增殖; 与Control比较, ns代表无显著性差异。

A: Wright-Giemsa staining; B: the proliferation of Control, SNHG16^{+/-} and SNHG16^{-/-} cell lines tested by MTS assay, compared with Control, ns: not significant.

图3 对照组与SNHG16敲除组细胞形态和增殖检测

Fig.3 Morphology and proliferation in Control and SNHG16 knocked out cell lines



A: 流式检测Control、SNHG16^{+/-}和SNHG16^{-/-}细胞CD71和CD235a表达水平; B: Control、SNHG16^{+/-}和SNHG16^{-/-}细胞CD235a⁺和CD71⁺细胞比例统计结果; C: qRT-PCR检测GATA1、TAL1、KLF1 mRNA相对表达水平。与Control比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns代表无显著性差异。

A: flow cytometry analysis of CD71 and CD235a expression of Control, SNHG16^{+/-} and SNHG16^{-/-} cell lines; B: statistical result of CD235a⁺ cell and CD71⁺ cell proportion in Control, SNHG16^{+/-} and SNHG16^{-/-} cell lines; C: GATA1, TAL1, KLF1 mRNA relative expression level was measured by qRT-PCR analysis. Compared with Control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns: not significant.

图4 CD235a、CD71与红系分化调控因子表达水平分析

Fig.4 Analysis of CD235a, CD71 and erythroid transcription factors expression

纯合敲除的细胞株。

LncRNA SNHG16是一个与多种癌症密切相关的lncRNA,近期的研究发现,SNHG16在肝癌^[12]、乳腺癌^[13]、宫颈癌^[14]、胶质瘤^[15]等多种癌症中都是潜在的致癌基因。SNHG16在肝癌细胞中表达上调并与肝癌的不良预后相关^[12],SNHG16通过促进肝癌细胞增殖、转移、侵袭和上皮间质转换过程,并抑制细胞凋亡促进肝癌的进程^[16-19]。SNHG16在乳腺癌组织中的表达也高于正常细胞^[20],SNHG16通过与E2F5(E2F transcription factor 5 protein)竞争性结合miRNA-98引起乳腺癌细胞转移扩散,可作为乳腺癌的潜在治疗靶点^[21-22]。但是目前关于SNHG16在白血病中的功能研究较少。在本研究中,在K562细胞中敲除SNHG16对细胞的形态和增殖并没有显著影响,说明SNHG16对K562细胞的生存及增殖不具有关键的调控功能,提示我们在不同的癌症类型中,SNHG16对癌细胞生存和增殖的影响是存在差别的。

CD235a蛋白是红细胞膜表面的特异糖蛋白,在红细胞分化发育过程中表达量逐渐升高,提示红细胞的成熟。敲除SNHG16后检测到K562细胞表面CD235a表达显著升高,且纯合敲除株的升高程度更高。从本实验室的RNA-Seq数据中发现,SNHG16在红细胞分化早期的原始红细胞中具有较高的表达水平,结合该数据,说明SNHG16可能具有维持红细胞处于分化早期状态,抑制红细胞分化及成熟的功能。通过检测红系分化关键的转录因子GATA1、TALI、KLF1等的mRNA表达水平,发现敲除SNHG16后,对红细胞分化成熟具有促进作用的转录因子GATA1、TALI、KLF1的表达均发生上升,提示我们SNHG16可能通过调控红系关键转录因子,进而影响红系分化的进程。下一步我们将探索SNHG16对红系分化过程的具体影响及其作用的分子机制。

参考文献 (References)

- Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mor-tazavi A, *et al.* Landscape of transcription in human cells. *Nature* 2012; 489(7414): 101-8.
- Li W, Ren Y, Si Y, Wang F, Yu J. Long non-coding RNAs in he-matopoietic regulation. *Cell Regen (Lond)* 2018; 7(2): 27-32.
- Lee Y, Park C, Lee S, Lee D, Kim J. Isolation and Functional Examination of the Long Non-Coding RNA Redrum. *Mol Cells* 2018; 41(2): 134-9.
- Zhu H, Zeng Y, Zhou CC, Ye W. SNHG16/miR-216-5p/ZEB1 signal pathway contributes to the tumorigenesis of cervical can-cer cells. *Arch Biochem Biophys* 2018; 637: 1-8.
- Christensen LL, True K, Hamilton MP, Nielsen MM, Damas ND, Damgaard CK, *et al.* SNHG16 is regulated by the Wnt pathway in colorectal cancer and affects genes involved in lipid metabo-lism. *Mol Oncol* 2016; 10(8): 1266-82.
- Cao X, Xu J, Yue D. LncRNA-SNHG16 predicts poor prognosis and promotes tumor proliferation through epigenetically silenc-ing p21 in bladder cancer. *Cancer Gene Ther* 2018; 25(1/2): 10-7.
- Feng F, Chen A, Huang J, Xia Q, Chen Y, Jin X. Long noncoding RNA SNHG16 contributes to the development of bladder cancer via regulating miR-98/STAT3/Wnt/beta-catenin pathway axis. *J Cell Biochem* 2018; 119(11): 9408-18.
- Zhang S, Du L, Wang L, Jiang X, Zhan Y, Li J, *et al.* Evaluation of serum exosomal LncRNA-based biomarker panel for diagno-sis and recurrence prediction of bladder cancer. *J Cell Mol Med* 2019; 23(2): 1396-405.
- Duan W, Du L, Jiang X, Wang R, Yan S, Xie Y, *et al.* Identifica-tion of a serum circulating lncRNA panel for the diagnosis and recurrence prediction of bladder cancer. *Oncotarget* 2016; 7(48): 78850-8.
- Yang T, Jin X, Lan J, Wang W. Long non-coding RNA SNHG16 has Tumor suppressing effect in acute lymphoblastic leukemia by inverse interaction on hsa-miR-124-3p. *IUBMB Life* 2019; 71(1): 134-42.
- Zhang F, Wen Y, Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet* 2014; 23(R1): R40-6.
- Guo Z, Zhang J, Fan L, Liu J, Yu H, Li X, *et al.* Long Noncoding RNA (lncRNA) small nucleolar RNA host gene 16 (SNHG16) predicts poor prognosis and sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma. *Med Sci Monit* 2019; 25: 2079-86.
- Kong Q, Qiu M. Long noncoding RNA SNHG15 promotes human breast cancer proliferation, migration and invasion by sponging miR-211-3p. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 495(2): 1594-600.
- Aalijahan H, Ghorbian S. Long non-coding RNAs and cervical cancer. *Exp Mol Pathol* 2019; 106: 7-16.
- Lu YF, Cai XL, Li ZZ, Lv J, Xiang YA, Chen JJ, *et al.* LncRNA SNHG16 functions as an oncogene by sponging MiR-4518 and up-regulating PRMT5 expression in glioma. *Cell Physiol Biochem* 2018; 45(5): 1975-85.
- Li W, Xu W, Song JS, Wu T, Wang WX. LncRNA SNHG16 promotes cell proliferation through miR-302a-3p/FGF19 axis in hepatocellular carcinoma. *Neoplasma* 2019.
- Lin Q, Zheng H, Xu J, Zhang F, Pan H. LncRNA SNHG16 aggravates tumorigenesis and development of hepatocellular carcinoma by sponging miR-4500 and targeting STAT3. *J Cell Biochem* 2019; 120(7): 11604-15.
- Ye J, Zhang R, Du X, Chai W, Zhou Q. Long noncoding RNA SNHG16 induces sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma cells through sponging miR-140-5p. *Onco Targets Ther* 2019; 12: 415-22.
- Xu F, Zha G, Wu Y, Cai W, Ao J. Overexpressing lncRNA SNHG16 inhibited HCC proliferation and chemoresistance by functionally sponging hsa-miR-93. *Onco Targets Ther* 2018; 11:

- 8855-63.
- 20 Kholghi OV, Geranpayeh L, Omrani MD, Ghafouri-Fard S. Assessment of functional variants and expression of long noncoding RNAs in vitamin D receptor signaling in breast cancer. *Cancer Manag Res* 2018; 10: 3451-62.
- 21 Cai C, Huo Q, Wang X, Chen B, Yang Q. SNHG16 contributes to breast cancer cell migration by competitively binding miR-98 with E2F5. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 485(2): 272-8.
- 22 Li J, Gao C, Liu C, Zhou C, Ma X, Li H, *et al.* Four lncRNAs associated with breast cancer prognosis identified by coexpression network analysis. *J Cell Physiol* 2019; 234(8): 14019-30.

中国细胞生物学学报