核仁小 RNA 宿主基因 16 和微 RNA-205-5p 在肝癌患者对奥沙利铂耐药中的作用及机制研究

时晓晓[1]，董 翔[1]，于若卉[2]，苏君君[1]，齐东东[1]，白 杨[1]，董 猛[1]*
（1. 河北省沧州中西医结合医院肝胆外二科，河北沧州 061000；2. 河北省沧州中西医结合医院耳鼻咽喉科，河北沧州 061000）

摘要：目的 探讨长链非编码（long non-coding，lnc）RNA 核仁小 RNA 宿主基因 16（small nucleolar RNA host gene 16，*SNHG16*）对肝细胞癌（hepatocellular carcinoma，HCC）细胞增殖、凋亡及对奥沙利铂（oxaliplatin，OXA）耐药的影响和作用机制。**方法** 实时荧光定量聚合酶链反应检测 HepG2、HL7702 细胞及肝癌耐药细胞（HepG2/OXA）中 lncRNA *SNHG16* 和微 RNA（micro RNA，miR）-205-5p 表达；MTT 法、流式细胞术检测细胞增殖、凋亡情况；在线数据库预测 lncRNA *SNHG16* 的靶基因，双荧光素酶报告试验验证两者结合关系；蛋白质印迹法检测多药耐药蛋白（multidrug resistance protein，MRP）1、细胞周期素 D1 和裂解的半胱氨酸蛋白酶 3 及 Akt/ 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR）信号通路相关蛋白表达。**结果** HepG2/OXA 细胞中 lncRNA *SNHG16* 表达较 HepG2 和 HL7702 细胞显著升高（$P < 0.05$）。OXA 对 HepG2/OXA 细胞增殖活力的抑制作用随浓度的增加而增强。si-*SNHG16* 组 HepG2/OXA 细胞耐药敏感性、细胞活力及 MRP1，细胞周期素 D1，磷酸化（phosphorylated，p）-mTOR，p-Akt 蛋白表达较对照组均降低，半胱氨酸蛋白酶 3 蛋白表达及细胞凋亡率则显著升高（$P < 0.05$）。MiR-205-5p 是 lncRNA *SNHG16* 的靶基因。下调 miR-205-5p 可逆转干扰 *SNHG16* 对 HepG2/OXA 细胞耐药敏感性、增殖、凋亡及信号通路的抑制 / 促进作用。**结论** LncRNA *SNHG16* 通过靶向调控 miR-205-5p，激活 Akt/mTOR 通路，抑制细胞增殖，诱导细胞凋亡，促使 HCC 细胞对 OXA 耐药。

关键词：核仁小 RNA 宿主基因 16；微 RNA-205-5p；肝细胞癌；奥沙利铂
中图分类号：R735.7 **文献标志码：**A **文章编号：**1672-9188（2023）09-0933-08
DOI：10.13683/j.wph.2023.09.007

Effects and mechanism of small nucleolar RNA host gene 16 and microRNA-205-5p on oxaliplatin resistance in patients with hepatocellular carcinoma

SHI Xiaoxiao[1], DONG Xiang[1], YU Ruohui[2], SU Junjun[1], QI Dongdong[1], BAI Yang[1], DONG Meng[1]*
(*1. Department of Hepatobiliary Surgery, Cangzhou Hospital of Integrated TCM and WM, Cangzhou 061012, Hebei Province, China; 2. Department of Otolaryngology, Cangzhou Hospital of Integrated TCM and WM, Cangzhou 061012, Hebei Province, China*)

Abstract: ***Objective*** To investigate the effects of long non-coding (lnc) RNA small nucleolar RNA host gene 16 (*SNHG16*) on proliferation, apoptosis and oxaliplatin (OXA) resistance of hepatocellular carcinoma (HCC) cell and its possible mechanism. ***Methods*** Real time fluorescent quantitative polymerase chain reaction was used to detect the expression of lncRNA *SNHG16* and microRNA (miR)-205-5p in HepG2, HL7702 cells and HCC drug resistant cells (HepG2/OXA). Methyl thiazolyl tetrazolium and flow cytometry were used to detect cell proliferation and apoptosis. The online database was used to predict the target gene of lncRNA *SNHG16*, and the double luciferase reporting experiment was used to verify the binding relationship between the two. Western blot was used to detect the expression of multidrug resistance protein (MRP) 1, cyclin D1, cleaved caspase-3 and Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway related proteins. ***Results*** The expression of lncRNA *SNHG16* in HepG2/OXA cells was significantly increased compared with HepG2 and HL7702 cells ($P<0.05$). The inhibitory effect of OXA on the proliferation activity of HepG2/OXA cells was

收稿日期：2021-11-29
作者简介：时晓晓，主治医师，硕士研究生，研究方向：普通外科及肝胆胰外科。
通信作者：董猛，副主任医师，研究方向：普通外科及肝胆胰外科。
基金项目：沧州市重点研发计划指导项目（204106065）

enhanced with increasing concentration. Compared with the control group, the drug resistance sensitivity, cell viability, the protein expression of MRP1, cyclinD1, phosphorylated (p) mTOR, and p-Akt in HepG2/OXA cells in si-*SNHG16* group were decreased, but cleaved caspase-3 protein expression and apoptosis rate were significantly increased ($P<0.05$). MiR-205-5p was a target gene of lncRNA *SNHG16*. Down-regulation of miR-205-5p reversed the inhibition/promotion of *SNHG16* on drug resistance sensitivity, proliferation, apoptosis and signaling pathway of HepG2/OXA cells. ***Conclusion*** LncRNA *SNHG16* activates Akt/mTOR pathway by targeting miR-205-5p, inhibits cell proliferation, induces cell apoptosis, and promotes OXA resistance in HCC cells.

Key words: small nucleolar RNA host gene 16; microRNA-205-5p; hepatocellular carcinoma; oxaliplatin

肝细胞癌（hepatocellular carcinoma，HCC）是一种临床常见的恶性肿瘤，通常起病隐匿且进展迅速，多数患者确诊时已至晚期或发生远处转移，无法接受手术治疗[1]。目前，第三代铂类化合物奥沙利铂（oxaliplatin，OXA）已逐渐成为晚期HCC治疗的一线化疗用药。研究表明，含OXA的联合化疗方案对于晚期HCC患者疗效确切，且安全性佳[2]。然而与其他化疗药物一样，肿瘤细胞对OXA产生的耐药性是影响治疗效果的主要原因之一[3]。

研究表明，长链非编码（long non-coding，lnc）RNA的异常表达与肿瘤的发生发展及诱导肿瘤细胞产生耐药有关[4—6]。LncRNA核仁小RNA宿主基因16（small nucleolar RNA host gene 16，*SNHG16*）是非蛋白编码小核仁RNA宿主基因家族成员之一，多种恶性肿瘤中lncRNA *SNHG16*异常表达，通过发挥促癌基因作用参与肿瘤的发生发展[7]。LncRNA *SNHG16*异常表达与肿瘤细胞化疗耐药相关，如lncRNA *SNHG16*通过海绵吸附微小RNA（microRNA，miR）-140-5p诱导HCC细胞对索拉非尼耐药[8]；敲低lncRNA *SNHG16*表达可提高膀胱癌细胞的化疗敏感性[9]，表明*SNHG16*功能的多样性。MiR-205-5p异常表达在调控肿瘤细胞生物学过程及肿瘤耐药中发挥重要作用，如食管鳞癌中过表达miR-205-5p后细胞对OXA敏感性提高[10]。下调miR-205-5p可增强鼻咽癌细胞对顺铂的敏感性[11]。现拟从细胞水平探究lncRNA *SNHG16*和miR-205-5p在HCC细胞OXA耐药中的作用及机制，以期为临床诊治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人HCC细胞HepG2、HCC HepG2/OXA耐药细胞购于中国科学院上海细胞库；人肝正常细胞株HL7702购于美国细胞培养收藏中心；OXA购于江苏恒瑞制药有限公司；*SNHG16*、miR-205-5p、U6及甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）引物序列由Thermo公司设计合成；DMEM培养基、胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）购自美国Gibco公司；TRIzol试剂、Lipofectamine™ 2 000试剂盒购自美国Invitrogen公司；*SNHG16*小干扰（small interfering，si）RNA、无序阴性对照（si-negative control，si-NC）、miR-205-5p模拟物（miR-205-5p mimics）及其阴性对照（mimics-NC）、miR-205-5p抑制物（anti-miR-205-5p）及其阴性对照（anti-miR-NC）由上海生工生物科技有限公司设计合成；双荧光素酶报告系统检测试剂盒购于美国Invitrogen公司；逆转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链反应（real time fluorescent quantitative polymerase chain reaction，RT-qPCR）试剂盒购自日本Takara公司；胰酶、蛋白裂解液及蛋白测定试剂盒购自上海碧云天生物科技有限公司；Matrigel基质胶和Transwell小室购自美国BD公司；噻唑蓝（methyl thiazolyl tetrazolium，MTT）试剂盒、膜Annexin V/碘化丙啶（propidium，PI）细胞凋亡试剂盒购自美国Invitrogen公司；多药耐药蛋白（multi drug resistance protein，MRP）1、细胞周期素（cyclin）D1和裂解的半胱氨酸蛋白酶3（cleaved caspase-3）兔源单克隆抗

体购自 Abcam 公司；一抗兔单克隆抗体 Akt/ 磷酸化 (phosphorylated，p)-Akt、兔单克隆抗体哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin，mTOR)/p-mTOR 购自美国 CST 公司；GAPDH 抗体、山羊抗兔免疫球蛋白 G 二抗购自英国 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及 OXA 耐药细胞株的构建

将 HCC 细胞株 HepG2 和正常肝细胞株 HL7702 置于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中，在 37 ℃、5% 二氧化碳培养箱中培养，每 3 d 进行 1 次传代。取对数生长期的 HepG2 细胞接种于 6 孔板中，加入 2 μmol/L 的 OXA 培养 24 h，待细胞稳定生长后，以 0.2 μmol/L 梯次增加药物浓度，经过约 4 个月的连续培养后，细胞能在 5 μmol/L OXA 培养基中稳定生长和传代即为构建成功，OXA 耐药 HepG2 细胞命名为 HepG2/OXA 细胞。

1.2.2 细胞分组与转染

细胞分组：主要设置 si-*SNHG16* 组、si-NC 组、miR-205-5p mimics 组、mimics-NC 组及空白对照组；验证 *SNHG16* 是否通过调控 miR-205-5p 表达影响 HCC 细胞 OXA 耐药时，设置 anti-miR-205-5p ＋ si-*SNHG16* 共转染组和 anti-miR-NC ＋ si-*SNHG16* 共转染组。

转染方法：将 HepG2/OXA 细胞接种于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中，在 37 ℃、5% 二氧化碳培养箱中培养，待细胞生长至对数期时，按照细胞转染 Lipofectamine™ 2000 试剂盒说明书进行转染，si-*SNHG16* 组转染 *SNHG16* 干扰小 RNA(small interfering RNA，siRNA) 序列，si-NC 组转染阴性对照 siRNA 序列，miR-205-5p mimics 组转染 miR-205-5p 模拟物 mimics，mimics-NC 组转染阴性对照 mimics，空白对照组不作任何处理；anti-miR-205-5p ＋ si-*SNHG16* 组共转染 siRNA 序列＋ anti-miR-205-5p；anti-miR-NC ＋ si-*SNHG16* 组共转染 siRNA 序列＋ miR-205-5p 阴性对照抑制物。转染 6 h 后，更换新鲜培养液，继续培养 48 h，胰酶消化收集细胞进行后续试验。

1.2.3 HepG2/OXA 细胞对 OXA 的半数抑制浓度

收集 si-*SNHG16* 组、si-NC 组、miR-205-5p mimics 组及 mimics-NC 组对数生长期细胞，调整细胞浓度接种至 96 孔板中，每孔加入浓度为 0、5、10、20、40 以及 80 μmol/L 的 OXA，作用培养 48 h 后每孔加入 20 μl 的 MTT，作用 4 h 后吸弃培养液，然后每孔加入 150 μl DMSO，放置于摇床快速震荡 10 min 后，用酶标仪在波长 490 nm 处检测各孔的光密度 (optical density，OD)。

1.2.4 RT-qPCR 试验

使用 TRIzol 液裂解细胞、逆转录试剂盒依据说明书步骤将 RNA 反转录成互补 DNA(complementary DNA，cDNA)，用以检测信使 RNA 表达水平。配置 15 μl PCR 反应体系，反应条件为 95 ℃＋ 30 s、60℃＋ 40 s、72 ℃＋ 10 s，循环 40 次。MiR-205-5p 以 U6 为内参，lncRNA *SNHG16* 以 GDAPH 为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达量，$\Delta Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{内参}$，其中 Ct 值的含义为每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数。所用引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列

Table 1 RT-qPCR primer sequence

基因	引物序列(5'-3')
SNHG16	正向：GTCCAGGCAGCAGAATG
	反向：TCACCAGAAACGAAACACC
miR-205-5p	正向：GGTCCTTCATTCCACCGG
	反向：ATCCTCCCTCCTTCCTTTCT
U6	正向：GTGTCCAGTTTTCCCAGGA
	反向：GCGTTGTGTTGTGTTGTGTT
GAPDH	正向：GCCAACGTGTCAGTGGTG
	反向：AAGGTGGAGGAGTGGGTGT

1.2.5 MTT 法检测 HepG2/OXA 细胞增殖能力

取各组对数生长期的 HepG2/OXA 细胞，以 4×10^4 个 /ml 细胞密度接种于 96 孔板，于 37 ℃、5% 二氧化碳培养箱中培养 48 h，于每孔中加入 20 μl MTT 溶液，避光孵育 4 h 后，使用酶标仪检测波长

在 490 nm 处的 OD 值。细胞增殖存活率＝试验组 OD 值 / 空白对照组 OD 值 ×100%。

1.2.6 流式细胞术检测 HepG2/OXA 细胞的凋亡情况

将分组处理的 HepG2/OXA 细胞接种于 6 孔板中，用 400 μl 结合缓冲液、5 μl Annexin V-FITC 和 5 μl PI 处理对数生长期的 HepG2/OXA 细胞，室温下避光孵育 20 min 后，使用流式细胞仪检测 HepG2/OXA 细胞的凋亡情况，重复 3 次。

1.2.7 蛋白质印迹法检测 HepG2/OXA 细胞中 MRP1、cyclin D1、cleaved caspase-3 及 Akt/mTOR 信号通路相关蛋白表达

收集各组细胞，加入适量的蛋白裂解缓冲液，离心后提取细胞内总蛋白，采用蛋白定量试剂盒检测其浓度。用 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳上样缓冲液电泳分离所有蛋白，转移至聚偏二氟乙烯膜上，室温下摇床封闭 1 h，加入一抗（1 ∶ 2 000）和 GAPDH（1 ∶ 10 000），4 ℃孵育过夜。用 TBST 清洗 5 次后，在室温下用二抗（稀释浓度为 1 ∶ 10 000）孵育 1 h。然后再次用 TBST 清洗膜 3 次后采用化学发光法显色，分析蛋白条带灰度值。

1.2.8 双荧光素酶报告基因检测试验

应用靶基因预测网站（http://starbase.sysu.edu.cn/）预测到 lncRNA *SNHG16* 和 miR-205-5p 有靶标位点。获得 *SNHG16* 3'- 非翻译区（non-translational region，UTR）荧光素酶报告基因载体，包括野生型（wild type，WT）*SNHG16* 基因 3'- 非翻译区（non-translational region，UTR）（WT-*SNHG16* 3'-UTR）和突变型（mutant，MUT）*SMAD3* 基因 3'-UTR（MUT-*SNHG16* 3'-UTR），放于 −20 ℃冰箱中保存备用；HepG2 细胞培养 24 h 后，取上述质粒 0.5 μg，分别与 miR-205-5p mimics、mimics-NC 共转染入 HCC 细胞 HepG2 中，具体转染分组为：miR-205-5p mimics ＋ *SNHG16*-WT、miR-205-5p mimics ＋ *SNHG16*-MUT、mimics-NC ＋ *SNHG16*-WT 及 mimics-NC ＋ *SNHG16*-MUT；转染 48 h 后，弃去旧培养基，PBS 溶液洗涤 3 次，按双荧光素酶报告系统检测试剂盒说明书操作，收集细胞，检测细胞内荧光素酶活性。

1.3 统计学方法

采用 SPSS20.0 分析处理数据，所有试验重复 3 次取平均值。经检验数据均符合正态分布，采用（$\bar{x}\pm s$）表示，两组间比较采用 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LncRNA *SNHG16* 和 miR-205-5p 在正常肝细胞、HCC 细胞及 HepG2/OXA 细胞中的表达

RT-qPCR 结果显示，与正常肝细胞 HL-7702 比较，HepG2 细胞中 lncRNA *SNHG16* 表达水平显著升高，miR-205-5p 表达水平显著降低（$P < 0.05$）。与 HepG2 细胞比较，HepG2/OXA 细胞中 lncRNA *SNHG16* 表达水平显著升高，miR-205-5p 表达水平显著降低（$P < 0.05$），见表 2。

表 2 LncRNA *SNHG16* 和 miR-205-5p 在正常肝细胞、HCC 细胞及 HepG2/OXA 细胞中的表达（$\bar{x}\pm s$）

Table 2 Expression of lncRNA *SNHG16* and miR-205-5p in normal hepatocytes, HCC cells and HepG2/OXA cells（$\bar{x}\pm s$）

细胞	lncRNA *SNHG16*	miR-205-5p
HL7702	1.00±0.18	0.97±0.20
HepG2	8.30±0.96[a]	0.32±0.03[a]
HepG2/OXA	15.12±1.85[ab]	0.15±0.01[ab]
*F*值	307.616	123.344
*P*值	0.000	0.000

注：较 HL7702 细胞，[a]$P < 0.05$；较 HepG2 细胞，[b]$P < 0.05$。

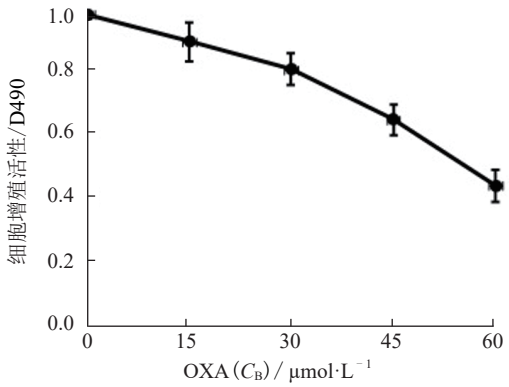
Note: *vs* HL7702 cells, [a]$P < 0.05$; *vs* HepG2 cells, [b]$P < 0.05$.

2.2 OXA 对 HepG2/OXA 细胞增殖活力的影响

OXA 对 HepG2/OXA 细胞增殖活力的抑制作用随浓度增加而增强，其半抑制浓度（half maximal inhibitory concentration，IC50）为 56.12 μmol/L，见图 1。

2.3 敲减 *SNHG16* 对 HepG2/OXA 细胞 OXA 敏感性、细胞增殖及凋亡的影响

RT-qPCR 试验结果显示，在 HepG2/OXA 细胞



注：图中“I”符号为标准差区间。

Note: The "I" symbol in the figure is the standard deviation interval.

图 1 OXA 浓度对 HepG2/OXA 细胞增殖活力的影响

Figure 1 Effects of OXA concentration on proliferation activity of HepG2/OXA cells

中敲低 *SNHG16* 并经过 OXA 处理后，si-*SNHG16* 组细胞中 *SNHG16* 的表达水平显著低于 si-NC 组（$P < 0.05$）；si-*SNHG16* 组细胞 OXA 的 IC50 显著低于 si-NC 组（$P < 0.05$）。与 si-NC 组比较，si-*SNHG16* 组 MRP1、cyclin D1 蛋白表达水平及细胞存活率显著降低，cleaved caspase-3 蛋白表达水平及细胞凋亡率显著升高（$P < 0.05$），见表 3。

2.4 过表达 miR-205-5p 对 HepG2/OXA 细胞 OXA 敏感性、增殖及凋亡的影响

在 HepG2/OXA 细胞中上调 miR-205-5p 并经过 OXA 处理后，miR-205-5p mimics 组中 miR-205-5p 的表达水平显著高于 mimics-NC 组（$P < 0.05$）；miR-205-5p mimics 组细胞 OXA 的 IC50 显著低于 mimics-NC 组（$P < 0.05$）。与 mimics-NC 组比较，miR-205-5p mimics 组 MRP1，cyclin D1 蛋白表达水平及细胞存活率显著降低，cleaved caspase-3 蛋白表达水平及细胞凋亡率显著升高（$P < 0.05$），见表 4。

2.5 LncRNA *SNHG16* 与 miR-205-5p 的靶向关系验证

LncRNA *SNHG16* 与 miR-205-5p 3'UTR 区有结合位点，见图 2。MiR-205-5p mimics + *SNHG16*-WT 组荧光素酶活性显著低于 mimics-NC + *SNHG16*-WT 组（0.36±0.01 *vs* 0.91±0.10，$P < 0.01$）。

2.6 下调 miR-205-5p 表达可逆转 *SNHG16* 下调对 HepG2/OXA 细胞 OXA 敏感性、增殖及凋亡的影响

与 anti-miR-NC + si-*SNHG16* 组比较，anti-miR-205-5p + si-*SNHG16* 组 HepG2/OXA 细胞 miR-205-

表 3 敲减 *SNHG16* 对 HepG2/OXA 细胞 OXA 敏感性、细胞增殖及凋亡的影响（$\bar{x}\pm s$）

Table 3 Effects of *SNHG16* knockdown on OXA sensitivity, cell proliferation and apoptosis of HepG2/OXA cells（$\bar{x}\pm s$）

组别	*SNHG16*	对OXA的IC50/μmol·L^{-1}	MRP1	cyclin D1	cleaved caspase-3	细胞存活率/%	凋亡率/%
si-*SNHG16*组（n=3）	0.23±0.01	17.42±1.89	0.29±0.03	0.42±0.04	0.91±0.09	53.66±1.78	19.74±2.63
si-NC组（n=3）	0.98±0.12	42.21±3.67	0.77±0.07	0.89±0.09	0.40±0.03	79.45±2.26	8.18±1.97
t值	18.685	18.016	18.908	14.316	16.128	26.894	10.554
P值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

表 4 过表达 miR-205-5p 对 HepG2/OXA 细胞 OXA 敏感性、细胞增殖及凋亡的影响（$\bar{x}\pm s$）

Table 4 Effects of miR-205-5p overexpression on OXA sensitivity, cell proliferation and apoptosis of HepG2/OXA cells（$\bar{x}\pm s$）

组别	miR-205-5p	对OXA的IC50/μmol·L^{-1}	MRP1	cyclin D1	cleaved caspase-3	细胞存活率/%	凋亡率/%
miR-205-5p mimics组（n=3）	2.53±0.32	12.75±1.87	0.34±0.03	0.38±0.04	0.86±0.08	45.18±1.87	14.27±2.51
mimics-NC组（n=3）	1.02±0.09	44.23±4.16	0.71±0.06	0.90±0.08	0.41±0.04	74.65±2.24	6.59±0.87
t值	13.628	20.824	16.547	17.441	15.093	30.299	8.673
P值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

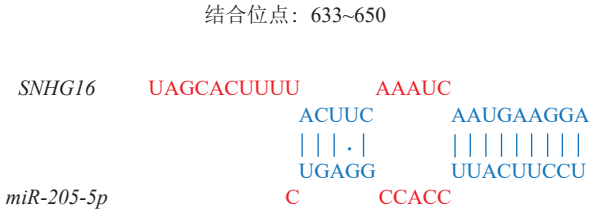


图 2 lncRNA *SNHG16* 与 miR-205-5p 的靶向关系

Figure 2 Targeting relationship between lncRNA *SNHG16* and miR-205-5p

5p 表达显著降低，MRP1、cyclin D1 表达水平以及对 OXA 的 IC50 及细胞存活率显著升高，cleaved caspase-3 表达水平和细胞凋亡率显著降低（$P<0.05$），见表 5。

2.7 Akt/mTOR 信号通路相关蛋白的表达

与 si-NC 组比较，si-*SNHG16* 组 HepG2/OXA 细胞的 p-mTOR 和 p-Akt 表达水平均显著降低（$P<0.05$）；与 anti-miR-NC ＋ si-*SNHG16* 组比较，anti-miR-205-5p ＋ si-*SNHG16* 组 HepG2/OXA 细胞的 p-mTOR 和 p-Akt 表达水平均显著升高（$P<0.05$），见表 6。

3 讨论

化疗是手术切除肿瘤后的一线辅助治疗和晚期肿瘤患者重要的治疗手段。OXA 与一二代铂类相比，其肾脏毒性较轻，具有更好的抗肿瘤效果。OXA 以 DNA 为靶作用部位，铂原子与 DNA 交叉联结，拮抗其复制与转录[12]。长时间使用药物后，DNA 修复系统可恢复其完整性，恶性肿瘤对 OXA 的敏感性减弱，导致肿瘤细胞耐药或化疗失败，影响疗效。

近年多项研究表明，lncRNA 在肿瘤发生发展及耐药中发挥重要作用[4—6]。研究显示，lncRNA *SNHG16* 在多种肿瘤中异常表达，且其高表达与肿瘤大小、分期及不良预后相关，如结直肠癌中 *SNHG16* 可促进肿瘤细胞的增殖和侵袭，还可通过竞争性内源（competing endogenous，ce）RNA 机制影响信号通路[13]。肺癌中，*SNHG16* 通过调控 G2/M 关键点进而调控细胞周期，诱导肿瘤恶性增殖[14]。Bu 等[15]研究发现，*SNHG16* 通过抑制 miR-488 上调 ITGA6，促进骨肉瘤上皮细胞 - 间充质转化。Guo 等[16]发现，下调 *SNHG16* 可抑制 HCC 细胞的增殖、迁移、侵袭及索拉非尼耐药。Liu 等[17]研究也表明，过表达自噬关键蛋白 ATG4B 可减弱 si-*SNHG16* 或 miR-

表 6 下调 miR-205-5p 对 Akt/mTOR 信号通路相关蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$）

Table 6 Down-regulation of miR-205-5p on the expression of related proteins in Akt/mTOR signaling pathway（$\bar{x}\pm s$）

组别	p-Akt	p-mTOR
si-*SNHG16*组（$n=3$）	0.59 ± 0.04^{a}	0.66 ± 0.05^{a}
si-NC组（$n=3$）	1.06 ± 0.11	1.10 ± 0.19
anti-miR-205-5p＋si-*SNHG16*组（$n=3$）	0.86 ± 0.08^{b}	0.90 ± 0.09^{b}
anti-miR-NC＋si-*SNHG16*组（$n=3$）	0.54 ± 0.04	0.59 ± 0.05
*F*值	98.032	39.774
*P*值	0.000	0.000

注：较 si-NC 组，$^{a}P<0.05$；较 anti-miR-NC ＋ si-*SNHG16* 组，$^{b}P<0.05$。

Note: *vs* si-NC group, $^{a}P<0.05$; *vs* anti-miR-NC ＋ si-*SNHG16* group, $^{b}P<0.05$.

表 5 下调 miR-205-5p 表达对 *SNHG16* 下调对 HepG2/OXA 细胞 OXA 敏感性、增殖及凋亡的影响（$\bar{x}\pm s$）

Table 5 Effects of down-regulated expression of miR-205-5p on down-regulated *SNHG16* on OXA sensitivity, proliferation and apoptosis of HepG2/OXA cells（$\bar{x}\pm s$）

组别	miR-205-5p	对OXA的IC50/μmol·L^{-1}	MRP1	cyclin D1	cleaved caspase-3	细胞存活率/%	凋亡率/%
anti-miR-205-5p＋si-*SNHG16*组（$n=3$）	0.50 ± 0.04	34.09 ± 3.57	0.69 ± 0.07	0.88 ± 0.09	0.51 ± 0.05	82.63 ± 2.56	7.33 ± 0.85
anti-miR-NC＋si-*SNHG16*组（$n=3$）	1.00 ± 0.08	13.20 ± 1.25	0.32 ± 0.03	0.45 ± 0.04	0.93 ± 0.09	57.03 ± 1.29	17.52 ± 1.36
*t*值	16.771	16.568	14.575	13.098	12.238	26.791	19.061
*P*值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

16 mimics 表达，促进骨肉瘤细胞自噬，抑制细胞凋亡，增强骨肉瘤细胞对顺铂的耐药能力。本研究显示，*SNHG16* 在 HCC/OXA 耐药细胞株中高表达，HepG2/OXA 细胞对 OXA 的 IC50 值为 56.12 μmol/L。干扰 *SNHG16* 表达后，HepG2/OXA 细胞的 IC50 值减小，细胞活力降低，凋亡率升高，推测高表达 *SNHG16* 诱导 HCC 细胞 OXA 耐药。

目前多项研究表明，不同 lncRNA 通过竞争性结合特定的 miR，起到 ceRNA 的作用，其通过抑制 miR 的表达活性及功能，调控 miR 靶标表达，进而影响相关通路的激活，促进肿瘤的发生发展 [18]。LncRNA 通过 ceRNA 活性发挥 miR 海绵作用，是 lncRNA 介导肿瘤发生及化疗耐药的重要机制 [19]。本研究显示，miR-205-5p 是 *SNHG16* 的重要靶标，*SNHG16* 负调控 miR-205-5p，表明两者之间存在相互结合作用。miR-205-5p 在胃癌、胶质瘤以及乳腺癌等多种实体瘤中低表达，发挥抑癌基因作用，上调 miR-205-5p 表达能够抑制肿瘤细胞的生长和转移 [20—22]。过表达 miR-205-5p 可对胆囊癌干细胞吉西他滨耐药发挥抑制作用 [23]。MiR-205-5p 可能通过靶向调控相关通路促进卵巢癌细胞对顺铂的耐药 [24]。本研究显示，HepG2/OXA 细胞中 miR-205-5p 低表达，上调 miR-205-5p 后 OXA 对 HepG2/OXA 细胞的 IC50 值降低，且同时降低细胞增殖活力及耐药敏感性，促进细胞凋亡。证实下调 miR-205-5p 表达可部分逆转下调 *SNHG16* 对 HepG2/OXA 细胞活力、凋亡及 OXA 耐药的影响。提示 miR-205-5p 表达下调与 HCC 细胞 OXA 耐药有关，*SNHG16* 对 HCC 细胞 OXA 耐药的作用依赖 miR-205-5p 的参与。

肿瘤基因发挥作用与信号转导通路的激活关系密切。大量研究表明，Akt/mTOR 信号通路不仅参与多种肿瘤的发生发展，也调控多种肿瘤的化疗耐药，且证实 Akt/mTOR 信号通路失活可逆转细胞耐药，部分恢复肿瘤细胞对化疗药物的敏感性 [25—27]。本研究显示，下调 *SNHG16* 表达可抑制 Akt/mTOR 信号通路的激活，而敲低 miR-205-5p 表达可逆转 *SNHG16* 低表达对 Akt/mTOR 信号通路的抑制，提示 *SNHG16* 可能通过靶向调控 miR-205-5p 激活 Akt/mTOR 信号通路，从而介导促进 HCC 细胞 OXA 耐药。

4 结论

综上所述，lncRNA *SNHG16* 通过靶向调控 miR-205-5p 而激活 Akt/mTOR 通路，抑制 HCC 细胞的增殖活力，诱导细胞凋亡，促使 HCC 细胞对 OXA 耐药，故 lncRNA *SNHG16* 可能是 HCC 潜在的分子靶点。

参考文献：

[1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政医管局. 原发性肝癌诊疗规范(2019年版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36(2): 277-292.

[2] 温娟, 王军. OXA与吉西他滨经肝动脉化疗栓塞对晚期原发性肝癌患者预后的影响[J]. 实用癌症杂志, 2018, 33(12): 2049-2051.

[3] 郑美玲, 华海清. OXA治疗肝细胞癌耐药的相关机制研究进展[J]. 临床肿瘤学杂志, 2017, 22(4): 369-373.

[4] Wei Y, Wang Z, Zong Y, *et al.* LncRNA *MFI2-AS1* promotes HCC progression and metastasis by acting as a competing endogenous RNA of miR-134 to upregulate FOXM1 expression[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 125: 109890.

[5] 张丹, 李万军, 李曾. LncRNA *UCA1*通过抑制miRNA-203a对乳腺癌细胞化疗耐药作用的影响[J]. 癌症进展, 2019, 17(14): 1656-1658.

[6] Li P, Xin Z, Wang L, *et al.* LncRNA hotair contributes to 5FU resistance through suppressing miR-218 and activating NF-κB/TS signaling in colorectal cancer[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2017, 8: 356-369.

[7] Liu SY, Zhang W, Liu YH, *et al.* LncRNA *SNHG16* promotes tumor growth of pancreatic cancer by targeting miR-218-5p[J]. Biomed pharmacother, 2019, 114: 108862.

[8] Ye J, Zhang R, Du X, *et al.* Long noncoding RNA *SNHG16* induces sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma cells through sponging miR-140-5p[J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 415-422.

[9] 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.

[10] 王芳, 肖帅帅, 阎婷. Hsa-miR-205-5p对食管鳞癌细胞系耐药的影响[J]. 山西医科大学学报, 2017, 48(6): 525-529.

[11] 赵伟曼, 董智勇, 时宗芬, 等. 下调miR-205-5p增强鼻咽癌细胞HNE1/DDP对顺铂诱导凋亡的敏感性[J]. 药学学报, 2019, 54(7): 1200-1206.

[12] Shen JH, Chen PH, Liu HD, *et al. HSF1/AMPKα2* mediated alteration of metabolic phenotypes confers increased oxaliplatin resistance in HCC cells[J]. Am J Cancer Res, 2019, 9(11): 2349-2363.

[13] 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.

[14] Zhu H, Zhang L, Yan S, *et al.* LncRNA16 is a potential biomarker for diagnosis of early-stage lung cancer that promotes cell proliferation by regulating the cell cycle[J]. Oncotarget, 2017, 8(5): 7867-7877.

[15] Bu J, Guo R, Xu XZ, *et al.* LncRNA *SNHG16* promotes epithelial-mesenchymal transition by upregulating ITGα6 through miR-488 inhibition in osteosarcoma[J]. J Bone Oncol, 2021, 27: 100348.

[16] Guo Z, Zhang J, Fan L, *et al.* Long noncoding RNA (lncRNA) small nucleolar RNA host gene 16 (*SNHG16*) predicts poor prognosis and sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma[J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 2079-2086.

[17] Liu Y, Gu S, Li H, *et al. SNHG16* promotes osteosarcoma progression and enhances cisplatin resistance by sponging miR-16 to upregulate ATG4B expression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 518(1): 127-133.

[18] 皮益苑, 周爽, 简鸣, 等. LncRNA中miRNA海绵活性与肿瘤的研究进展[J]. 中南医学科学杂志, 2019, 47(3): 5.

[19] 沈钲杰, 朱银银, 沈凡含, 等. LncRNA与miRNA调节关系和ceRNA关系在疾病中的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2018, 40(10): 7.

[20] Zhang J, Zhang J, Pang X, *et al.* MiR-205-5p suppresses angiogenesis in gastric cancer by downregulating the expression of VEGFA and FGF1[J]. Exp Cell Res, 2021, 404(2): 112579.

[21] 靳世辉, 张茜, 罗伟濠, 等. 胶质瘤组织中miR-205-5p的表达及其对胶质瘤细胞恶性生物学行为的影响[J]. 中国癌症防治杂志, 2020, 12(6): 664-669.

[22] Chen H, Yu C, Shen L, *et al.* NFIB functions as an oncogene in estrogen receptor-positive breast cancer and is regulated by miR-205-5p[J]. Pathol Res Pract, 2020, 216(12): 153236.

[23] Zhang GF, Wu JC, Wang HY, *et al.* Overexpression of microRNA-205-5p exerts suppressive effects on stem cell drug resistance in gallbladder cancer by down-regulating PRKCE[J]. Biosci Rep, 2020, 40(9): BSR20194509.

[24] Shi X, Xiao L, Mao X, *et al.* MiR-205-5p mediated downregulation of PTEN contributes to cisplatin resistance in C13K human ovarian cancer cells[J]. Front Genet, 2018, 9: 555.

[25] Tang XL, Yan L, Zhu L, *et al.* Salvianolic acid a reverses cisplatin resistance in lung cancer A549 cells by targeting c-met and attenuating Akt/mTOR pathway[J]. J Pharmacol Sci, 2017, 135(1): 1-7.

[26] 王媛, 白玉贤. PI3K/AKT/mTOR信号通路介导索拉非尼治疗原发性肝癌耐药机制的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27(21): 3923-3926.

[27] Dong C, Wu J, Chen Y, *et al.* Activation of PI3K/AKT/mTOR pathway causes drug resistance in breast cancer[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 628690.

（编辑：沈　盈）