

## · 专题 · 儿童神经母细胞瘤 ·

## SNHG7-miR-653-5p-STAT2 反馈通路在神经母细胞瘤进展中的调节作用研究



全文二维码

杨槟伊<sup>1</sup> 刘小梅<sup>1</sup> 陈鑫<sup>1</sup> 陈伟明<sup>2</sup> 范煦<sup>3</sup> 李富江<sup>1</sup> 鹿洪亭<sup>4</sup><sup>1</sup> 青岛大学附属医院小儿外科, 青岛 266000; <sup>2</sup> 青岛大学, 青岛 266071; <sup>3</sup> 胜利油田中心医院儿科, 东营 257034; <sup>4</sup> 青岛大学附属妇女儿童医院小儿外科, 青岛 266011

通信作者: 鹿洪亭, Email: luhongting@126.com

**【摘要】 目的** 研究 lncRNA SNHG7 在神经母细胞瘤 (neuroblastoma, NB) 进展中的作用, 以及 SNHG7-miR-653-5p-STAT2 反馈通路在神经母细胞瘤进展中的调节作用。 **方法** 从青岛大学附属医院收治的 NB 患儿体内获得 92 对 NB 组织及相邻非肿瘤组织。采用 qRT-PCR 检测 SNHG7 在神经母细胞瘤肿瘤组织及细胞中的表达情况。采用 Kaplan-Meier 分析神经母细胞瘤患儿的总体存活率。采用比色法 (MTT 法) 和集落形成法检测 SNHG7 对 SK-N-SH 和 SH-SY5Y 细胞的作用。采用 Transwell 侵袭及迁移试验检测 SK-N-SH 和 SH-SY5Y 细胞的侵袭和迁移能力。采用荧光素酶检测 miR-653-5p 和 SNHG7、STAT2 之间的作用。采用 RIP 测定及 RNA 下拉测定检验 SNHG7 和 miR-653-5p 在 NB 中的相对表达情况。采用 Spearman 相关分析探究 SNHG7 与 miR-653-5p、STAT2 的相关性。 **结果** qRT-PCR 显示, 92 对 NB 组织及相邻非肿瘤组织中, 肿瘤组织 ( $n = 53$ ) 中 SNHG7 的表达量高于非肿瘤组织 ( $n = 39$ )。SNHG7 高表达的 NB 患儿 ( $n = 53$ ) 总生存期随月份的增加而逐渐降低, SNHG7 低表达的 NB 患儿 ( $n = 39$ ) 总生存期随月份的增加也逐渐降低, 两组差异有统计学意义 ( $P = 0.004$ )。细胞功能试验: ① MTT 法和集落形成法检测结果显示, SNHG7 的下调对 SK-N-SH 和 SH-SY5Y 细胞的存活和增殖有明显抑制作用; ② Transwell 试验检测结果显示, 敲低 SNHG7 可明显抑制 SK-N-SH 和 SH-SY5Y 细胞的细胞迁移和侵袭能力 ( $P < 0.05$ ); ③ 荧光素酶检测显示, miR-653-5p 能降低 SNHG7-WT (野生型) 的荧光素酶活性, 且 miR-653-5p 与 STAT2-WT (野生型) 之间存在特异性的相互作用。Spearman 相关分析显示: ① NB 组织中 SNHG7 与 miR-653-5p 表达水平呈负相关 ( $r = -0.281, P = 0.007$ ); ② STAT2 的表达量与 NB 组织中 miR-653-5p 表达水平呈负相关 ( $r = -0.295, P = 0.004$ ), STAT2 的表达量与 NB 组织中 SNHG7 表达水平呈正相关 ( $r = 0.296, P = 0.004$ )。 **结论** SNHG7 通过 miR-653-5p/STAT2 通路促使 NB 进展, 这为 NB 提供了一个新的治疗靶点和预测预后的生物标志物。

**【关键词】** 神经母细胞瘤/病因学; 神经母细胞瘤/预防和控制**基金项目:** 青岛市民生科技计划项目 (18-6-1-71-nsh)

DOI: 10.3760/cma.j.cn101785-201910074-006

**Role of SNHG7-miR-653-5p-STAT2 feedback loop in regulating neuroblastoma progression**Yang Bingyi<sup>1</sup>, Liu Xiaomei<sup>1</sup>, Chen Xin<sup>1</sup>, Chen Weiming<sup>2</sup>, Fan Xu<sup>3</sup>, Li Fujiang<sup>1</sup>, Lu Hongting<sup>4</sup><sup>1</sup> Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266000, China; <sup>2</sup> Qingdao University, Qingdao 266071, China; <sup>3</sup> Shengli Oilfield Central Hospital of Pediatrics, Dongying 257034, China; <sup>4</sup> Women and Children's Hospital Affiliated to Qingdao University, Qingdao 266011, China

Corresponding author: Lu Hongting, Email: luhongting@126.com

**【Abstract】 Objective** To explore the role of lncRNASNHG7 in the progression of neuroblastoma (NB) and examine the regulatory role of snhg7-mir-653-5p-stat2 feedback pathway in NB. Long noncoding RNAs (lncRNAs) have been implicated in the pathogenesis of various cancers, including neuroblastoma (NB). However, the role of lncRNASNHG7 in NB progression remains elusive. **Methods** The expression of SNHG7 in NB tissues and cells was detected by quantitative realtime-polymerase chain reaction (qRT-PCR). Cellular invasion and migration were detected by Transwell invasion and migration assay. Luciferase assay was utilized for detecting the interaction between mir-653-5p, SNHG7 and STAT2. The relative expressions of SNHG7 and mir-653-5p in NB were

determined by RNA-binding protein immunoprecipitation (RIP) assay and RNA pull-down assay. *Spearman's* correlation curve was employed for examining the relationship between SNHG7 and miR-653-5p and STAT2. Overall survival was measured by Kaplan-Meier analysis. The effects of SNHG7 on SK-N-SH/SH-SY5Y cells were determined by methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) and colony formation. **Results** qRT-PCR demonstrated that, among 92 pairs of neuroblastoma (NB) and adjacent non-tumor tissues, expression quantity of SNHG7 was higher in tumor tissues ( $n=53$ ) than that in non-tumor tissues ( $n=39$ ). Kaplan Meier analysis revealed that overall survival decreased with advancing months in high SNHG7 patients ( $n=53$ ) and similarly in low SNHG7 counterparts ( $n=39$ ) with a lower extent ( $P=0.004$ ). An up-regulation of SNHG7 was correlated with a poor overall survival rate of NB patients. Cell function test indicated that a down-regulation of SNHG7 by MTT and colony formation significantly suppressed the survival and proliferation of SK-N-SH/SH-SY5Y cells. Transwell test indicated that knocking down SNHG7 significantly suppressed the migration and invasion of SK-N-SH/SH-SY5Y cells ( $P<0.01$ ). Luciferase assay revealed that miR-653-5p lowered the luciferase activity of SNHG7-wt (wildtype). And a specific interaction existed between miR-653-5p and STAT2-wt (wildtype). *Spearman's* correlation curve analysis indicated that SNHG7 in NB tissues was negatively correlated with miR-653-5p ( $r=-0.281, P=0.007$ ). The expression of STAT2 was negatively correlated with miR-653-5p in NB tissues ( $r=-0.295, P=0.004$ ) and positively correlated with SNHG7 in NB tissues ( $r=0.296, P=0.004$ ). These data suggested that SNHG7 played a role in NB progression by regulating the pathway of miR-653-5p/STAT2. **Conclusion** SNHG7 promotes NB progression through the pathway of miR-653-5p/STAT2. Thus it may provide a novel therapeutic target and prognostic biomarker for NB.

**【Key words】** Neuroblastoma/ET; Neuroblastoma/PC

**Fund program:** People's Livelihood science and Technology Project of Qingdao Science and Technology Bureau (18-6-1-71-nsh)

DOI:10.3760/cma.j.cn101785-201910074-006

神经母细胞瘤(neuroblastoma, NB)是交感神经系统的胚胎性颅外实体瘤,是儿童交感神经系统最常见的恶性肿瘤<sup>[1-2]</sup>。NB的平均诊断年龄约17个月,临床表现多样,预后个体差异较大<sup>[3-5]</sup>。NB因病死亡率高、预后差而被视为一种高风险的儿童恶性肿瘤<sup>[3,6-7]</sup>。目前大量研究表明,长链非编码RNA(long noncoding RNAs, lncRNA)在肿瘤进展中起着关键作用<sup>[8]</sup>。lncRNA一般超过200个核苷酸,缺乏蛋白质编码能力<sup>[9]</sup>。此外,lncRNA能够调节与肿瘤异常增殖、凋亡、迁移、侵袭和转移相关基因的表达<sup>[9-10]</sup>。lncRNA SNHG7全长2176 bp,位于染色体9q34.3上。SNHG7具有促进多种肿瘤细胞增殖和抑制细胞凋亡的作用。例如,lncRNA SNHG7与miR-34a相互作用,通过PI3K/Akt/mTOR通路上调结肠癌中GALNT7的表达水平<sup>[11]</sup>。lncRNA SNHG7通过上调FAIM2蛋白的表达水平,促进细胞增殖,抑制癌细胞凋亡<sup>[12]</sup>。虽然SNHG7被认为是多种癌症的重要调控因子,但其在神经母细胞瘤进展中的作用及机制尚未明确。

miRNA长度通常为20~22个核苷酸,缺乏蛋白质编码潜能,通过结合靶mRNA上的互补序列,在转录后下调基因表达<sup>[13]</sup>。越来越多的研究表明,lncRNA

可以通过miRNA的海绵作用调控多种癌症中mRNA的表达<sup>[14-15]</sup>。例如,lncRNA FTH1P3可通过miR-206/ABCB1激活乳腺癌患儿的紫杉醇耐药<sup>[16]</sup>。有报道SNHG7在多种癌症中作为miRNA发挥海绵样作用<sup>[17]</sup>。例如,SNHG7通过分泌miR-503经cyclin D1促进前列腺癌的增殖和周期进展<sup>[18]</sup>。MiR-653-5p是以前从未被研究过的miRNA之一,miR-653-5p是否参与NB的进展仍有待阐明。本研究旨在探索SNHG7在神经母细胞瘤进展中的作用,并进一步探讨SNHG7中的分子机制对NB的潜在影响。

## 材料与方法

### 一、研究对象

从青岛大学附属医院收治的NB患儿体内获得92对NB组织及相邻非肿瘤组织。样品获取后即置于-80℃低温冰箱保存。所有患儿未接受术前治疗,患儿家属签署书面知情同意书,本研究获得青岛大学附属妇女儿童医院伦理委员会批准(QYFY-WZLL 25816)。

### 二、研究方法

#### 1. 细胞培养和转染:人神经母细胞瘤细胞系

[SK-N-AS, SK-N-SH, SH-SY5Y, IMR-32, SK-N-BE(2)-C] 购于美国 ATCC 公司。细胞的培养液(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)及 100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素购于美国默赛飞世尔公司, 10% 的灭活胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购于美国 Hyclone 公司, 然后置于含有 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 的细胞培养箱中培养。以 SNHG7 为靶点的 shRNA 和相应的对照组 shRNA (sh-NC) 由上海吉玛基因制药技术有限公司提供。合成 STAT2 序列, 亚克隆到 pcDNA3.1 载体 (pcDNA/STAT2) 购于英杰公司。从上海吉玛公司获得 miR-653-5p 模拟物和 miR-653-5p 抑制。SK-N-SH 细胞和 SH-SY5Y 细胞与质粒使用 lipofectamine 2000 进行转染。转染 24 h 后, 收集细胞并保存, 以备后续研究。

2. RNA 提取和实时荧光定量 PCR: 采用 Trizol 试剂(美国默赛飞世尔公司)从患儿组织和 NB 细胞中提取 RNA。采用分光光度法测定 RNA 样品的浓度和纯度。纯化后的 RNA 经相应逆转录试剂盒(购自德国德商宝公司)逆转录成 cDNA。基因的相对表达水平用反转录试剂盒(中国大连的宝生物公司)进行验证。用 U6 作为内参, 每组实验重复 3 次。

3. 比色法实验: 将 SK-N-SH 和 SH-SY5Y 两种细胞( $2 \times 10^5$ ) 分别在 96 孔板中培养 24 h、48 h、72 h、96 h。向每个孔中加入 3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基-2-H-四唑溴化物(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT, 0.5 mg/mL) 溶液。将细胞依次孵育 4 h, 除去剩余的 MTT 溶液, 再向每个孔中加入二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)以溶解晶体。此后, 使用 ELX-800 光谱仪读数器(美国宝特仪器有限公司)测量 490 nm 处的吸光度。每组实验重复 3 次。

4. 集落形成实验: 转染后, 将 SK-N-SH 和 SH-SY5Y 两种细胞( $1 \times 10^3$  细胞/孔)接种到 12 孔板中。培养基每 3 天更换 1 次。2 周后, 用 PBS 轻轻洗涤细胞, 甲醇固定 10 min 后用 0.1% 结晶紫染色 5 min, 最后手动计数含有超过 50 个细胞的集落。每组实验重复 3 次。

5. 细胞的侵袭和迁移实验: 利用 Transwell 小室实验(美国的康宁公司)检测上述两种细胞, SK-N-SH 和 SH-SY5Y 两种细胞( $2 \times 10^4$ ) 置于有 200  $\mu$ L 新鲜 DMEM 培养基的上室中, 将含有 10% FBS 的 800  $\mu$ L 培养基加入下室。孵育 24 h 后, 用 4% 多聚甲醛固定细胞 20 min, 并用 0.1% 结晶紫染色 5 min。然后通过光学显微镜(日本奥林巴斯公司, 型号

BX51)放大 200 倍对膜底部侵入或迁移的细胞进行计数。每组实验重复 3 次。

6. 荧光素酶报告实验: 将含有预测的 miR-653-5p 结合位点和 SNHG7 的全长序列的 STAT2 的 3'-UTR 序列克隆到 psiCHECK-2 载体(普洛麦格公司, 美国)上来产生野生型 STAT2 报告基因(STAT2-Wt)和野生型 SNHG7 报告基因(SNHG7-Wt)。突变型 STAT2 报告基因(STAT2-Mut)和突变型 SNHG7 报告基因(SNHG7-Mut)由定点突变试剂盒(购于默赛飞世尔公司)产生。用 HEK-293T 细胞与 miRNA(miR-NC, miR-653-5p 模拟物)以及 miRNA 抑制物(miR-NC, miR-653-5p 抑制物)一起转染这些构建的分子报告基因。在转染 48 h 后, 用双荧光素酶报告系统(普洛麦格系统, 美国)测量荧光素酶活性。每组试验重复 3 次。

7. RIP 测定法(RNA 结合蛋白免疫沉淀法): 运用蛋白质免疫沉淀试剂盒对 SK-N-SH 和 SH-SY5Y 细胞进行处理。将细胞裂解物(SK-N-SH 和 SH-SY5Y)在含有磁珠的 RIP 缓冲液中孵育, 所述磁珠与人抗-Ago2 抗体结合, 正常 IgG 和 Input 分别充当对照组。用蛋白酶 K 分离免疫沉淀的 RNA。最后, 提取纯化的 RNA, 通过实时 PCR 测量。每组实验重复 3 次。

8. RNA 下拉测定法: Bio-SNHG7-WT, Bio-SNHG7-Mut 和 Bio-NC 由中国上海吉玛公司生物素化所得。将生物素标记的 RNA 转染到 SK-N-SH 和 SH-SY5Y 细胞中。转染 48 h 后, 收集细胞并裂解。将细胞裂解物与含有抗-Ago2 或抗-IgG 的珠子一起孵育 10 min。通过 qRT-PCR 分析纯化的 RNA 复合物。每组实验重复 3 次。

### 三、统计学处理

使用 GraphPad Prism 5 进行统计分析。对于计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。采用 Kaplan-Meier 曲线描述 NB 患儿的总存活率。基因间表达量的相关性采用 Spearman 相关分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、SNHG7 在 NB 组织和细胞中表达明显上调

为了探讨 SNHG7 在 NB 进展中的作用, 首先用 qRT-PCR 检测 92 对 NB 组织中 SNHG7 的表达。如图 1A 所示, 与相应的非肿瘤组织相比, SNHG7 在肿

瘤组织中的表达明显上调。检测 NB 细胞[SK-N-SH,SH-SY5Y,IMR-32,SK-N-AS,SK-N-BE(2)-C]中 SNHG7 的表达水平发现,SNHG7 在 SK-N-SH 和 SH-SY5Y 细胞中高表达(图 1B),提示 SNHG7 可能参与 NB 的发生发展。

## 二、SNHG7 表达与 NB 临床预后的关系

为了进一步确定 SNHG7 对 NB 的影响,分析临床病理特征与 NB 患儿 SNHG7 表达水平之间的关系,根据实时 PCR 分析得到 SNHG7 的平均表达水平,将所有患儿分为高表达组和低表达组。如表 1 所示,SNHG7 的高表达与淋巴结转移( $\chi^2 = 4.843, P = 0.035$ )、INSS 分期( $\chi^2 = 5.101, P = 0.034$ )、视神经侵犯( $\chi^2 = 10.163, P = 0.003$ )有关,但 SNHG7 的表达与年龄、性别、分化程度无关( $P > 0.05$ )。Kaplan-Meier 分析发现,SNHG7 高表达的患儿预后较差(图 1C)。此外,SNHG7 的表达( $P = 0.042$ )可以作为 NB 患儿预后的独立预测因子(表 2),NB 患儿 SNHG7 的表达水平可能与预后有关。

表 1 SNHG7 表达等级与临床特征的关联性( $n = 92$ )

Table 1 Correlation between SNHG7 expression and clinical features ( $n = 92$ )

变量	分类	SNHG7 表达等级		$\chi^2$ 值	P 值
		低	高		
年龄(岁)	<2.5	24	35	0.198	0.667
	$\geq 2.5$	15	18		
性别(例)	男	26	33	0.189	0.826
	女	13	20		
淋巴结转移	是	16	34	4.843	0.035
	否	23	19		
INSS 分期(例)	1~2A	24	20	5.101	0.034
	2B~4S	15	33		
分化程度	好	11	13	0.158	0.811
	差	28	40		
视神经侵犯	否	24	15	10.163	0.003
	是	15	38		

## 三、SNHG7 的下调抑制细胞增殖

为了探讨 SNHG7 在 NB 进展中的作用,使用特异性 shRNA 来沉默具有 SNHG7 高表达的两个 NB 细胞系 SK-N-SH 和 SH-SY5Y。如图 2A 所示,在 SK-N-SH 和 SH-SY5Y 细胞中,shSNHG7 有效降低了 SNHG7 的表达。MTT 测定显示 SNHG7 的下调明显抑制了 SK-N-SH 和 SH-SY5Y 细胞的活力(图 2B)。此外,SNHG7 下调显著减少了 SK-N-SH 和 SH-SY5Y 细胞中的集落数(图 2C)。

表 2 NB 患儿预后相关因素的 Cox 回归分析结果

Table 2 Multivariate analysis of prognostic parameters in NB children by Cox regression

变量	分类	P 值
年龄(岁)	<2.5	0.360
	$\geq 2.5$	
性别	男	0.765
	女	
淋巴结转移	是	0.031
	否	
分期	1~2A	0.041
	2B~4S	
分化程度	好	0.881
	中/差	
视神经侵犯	否	0.076
	是	
SNHG7 表达等级	高低	0.042

## 四、SNHG7 的下调抑制 NB 细胞的迁移、侵袭

为了进一步研究 SNHG7 对 NB 转移的影响,应用 Transwell 测定法验证 SK-N-SH 和 SH-SY5Y 细胞的细胞迁移和侵袭能力。从图 3A 和图 3B 可以看出,SNHG7 的下调明显抑制了 SK-N-SH 和 SH-SY5Y 细胞迁移和侵袭的能力,这表明沉默 SNHG7 可抑制 NB 细胞转移。

## 五、SNHG7 在 NB 细胞中与 miR-653-5p 的相互作用及相关性

最近,越来越多的证据表明,lncRNA 含有与 miRNA 互补的序列,并且对 miRNA 的表达和活性具有抑制作用<sup>[18-19]</sup>。我们通过生物信息学分析发现,SNHG7 RNA 含有一个保守元件,可能是 miR-653-5p 的靶位点。为了确保这种可能性,本研究分别用 SNHG7 的野生型序列(SNHG7-WT)和突变型序列(SNHG7-Mut)构建了两个 pMIR 荧光素酶报告基因(图 4A)。如图 4B 所示,miR-653-5p 模拟物仅能降低 SNHG7-WT 的荧光素酶活性,但不能降低 SNHG7-Mut 的荧光素酶活性,而对 miR-NC 则没有影响。此外,RIP 测定结果显示,与对照 IgG 免疫沉淀物相比,SNHG7 和 miR-653-5p 均含来自 SK-N-SH 和 SH-SY5Y 提取物的 Ago2 沉淀(图 4C)。另外,miR-653-5p 与 SNHG7 之间存在一定的相互作用并受其影响,其促进作用可被 SNHG7 抑制(图 4D)。

为了进一步证实 SNHG7 与 miR-653-5p 的相关性,本研究分析了它们在 NB 组织中的表达情况。qRT-PCR 结果显示,与非肿瘤组织相比,miR-653-5p



在 NB 组织中表达下调(图 4E)。Spearman 相关分析显示,miR-653-5p 表达与 SNHG7 的表达呈负相关( $r = -0.281, P = 0.007$ ),详见图 4F。

六、STAT2 是受 SNHG7 和 SNHG7/miR-653-5p 轴调控的靶基因

使用 StarBase 2.0 发现,STAT2 是 miR-653-5p 的一个假定靶点(图 5A)。荧光素酶报告基因检测显示,miR-653-5p 模拟物可降低 STAT2-WT 的荧光素酶活性,而其他组的荧光素酶活性变化不大,说明 miR-653-5p 与 STAT2-WT 存在特异性的相互作用(图 5B)。Spearman 相关分析表明,STAT2 表达与 miR-

653-5p 水平呈负相关( $r = -0.295, P = 0.004$ ),而与 NB 组织中的 SNHG7 表达呈正相关( $r = 0.296, P = 0.004$ ),见图 5C 和 5D。这些数据说明 SNHG7 通过调节 miR-653-5p/STAT2 途径在 NB 进展中发挥作用。

## 讨论

越来越多的证据表明,lncRNA 在多种恶性肿瘤(包括神经母细胞瘤)的进展中起着至关重要的作用。例如,新型长非编码 RNA 的 linc-NeD125 携带

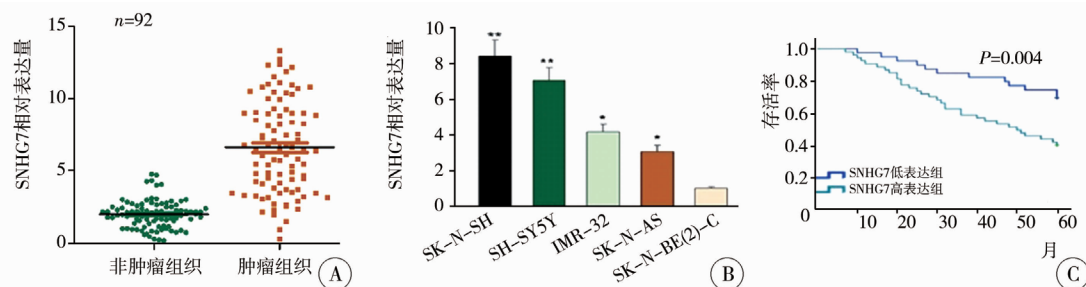


图 1 SNHG7 在 NB 组织和细胞中表达上调相关结果图 注 A:与配对的非肿瘤组织相比,92 例 NB 组织中 SNHG7 表达上调;B:SNHG7 在 5 株 NB 细胞中的表达情况;C:Kaplan-Meier 分析低( $n = 39$ )和高( $n = 53$ ) SNHG7 表达的 NB 患儿总生存期(\*代表  $P < 0.05$ , \*\*代表  $P < 0.01$ )

Fig. 1 SNHG7 expression became up-regulated in NB tissues and cells

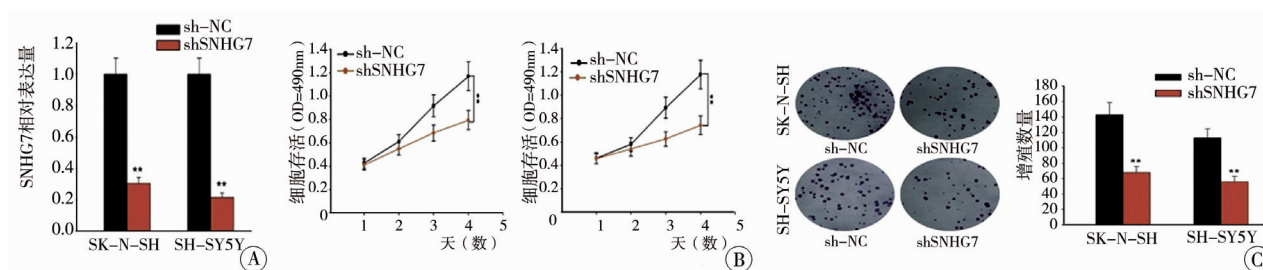


图 2 SNHG7 在体外抑制 NB 细胞增殖、体内抑制肿瘤生长的相关结果图 注 A:采用 qRT-PCR 检测转染 shCtrl 或 shSNHG7 后 SK-N-SH 和 SH-SY5Y 细胞中 SNHG7 的相对表达水平;B:通过 MTT 法检测 SNHG7 下调对 SK-N-SH 和 SH-SY5Y 细胞存活和增殖的作用;C:菌落形成法检测答案显示 SNHG7 下调对 SK-N-SH 和 SH-SY5Y 细胞存活和增殖有明显抑制作用

Fig. 2 SNHG7 suppressed NB cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo

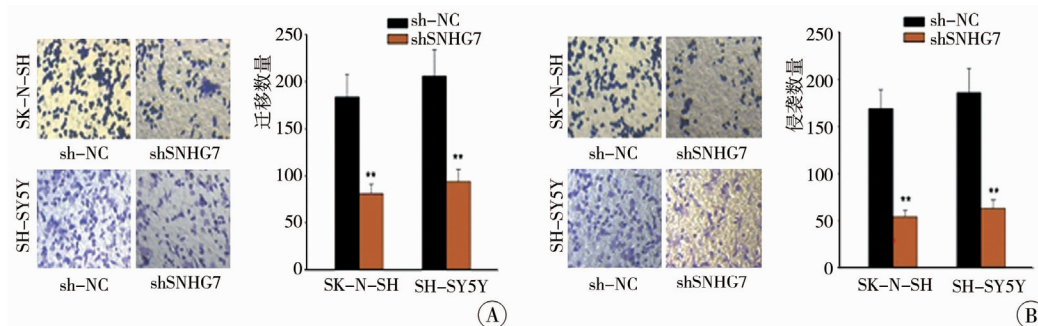


图 3 SNHG7 基因敲除抑制 NB 细胞迁移、侵袭能力的相关结果图 注 A 和 B:Transwell 试验结果表明,敲低 SNHG7 可明显抑制 SK-N-SH 和 SH-SY5Y 细胞的细胞迁移和侵袭能力(\*\*代表  $P < 0.01$ )

Fig. 3 A knockdown of SNHG7 suppressed the migration and invasion of NB cell

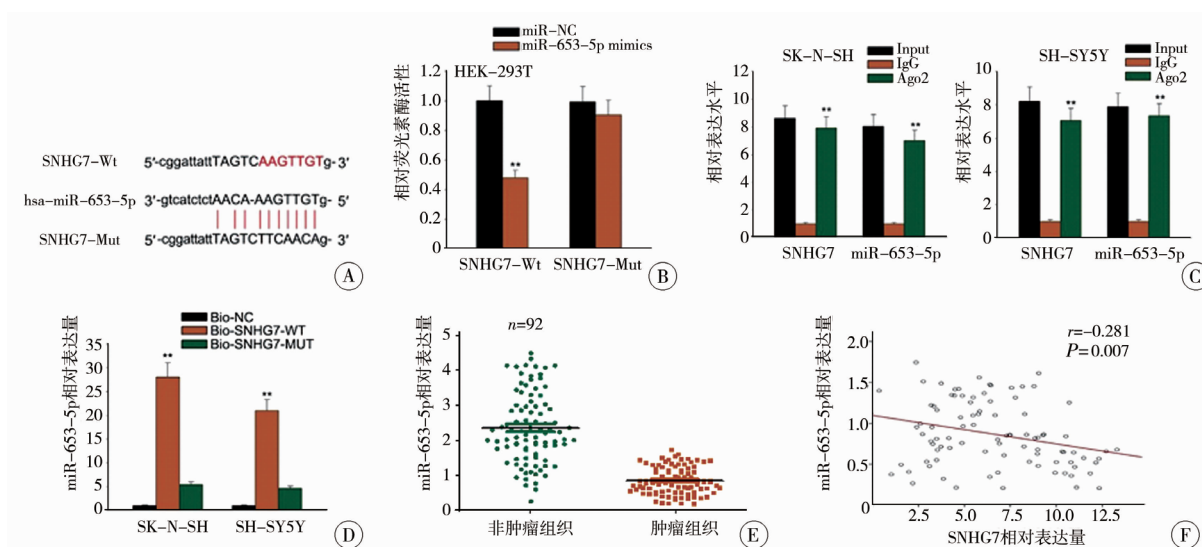


图4 SNHG7 在 NB 细胞中与 miR-653-5p 结合的相关结果图 注 A:miR-653-5p 与 SNHG7 序列的预测结合位点; B:荧光素酶报告基因测定用于检测转染 HEK-293T 细胞的荧光素酶活性; C:RIP 法检测珠子中 SNHG7 和 miR-653-5p 的 qRT-PCR 结果; D:采用 qRT-PCR 检测 SK-N-SH 和 SH-SY5Y 细胞中 RNA 下拉法拉低复合物中 miR-653-5p 的相对表达情况; E:NB 组织中 miR-653-5p 表达的 qRT-PCR 结果; F:Spearman 相关显示 NB 组织中 SNHG7 与 miR-653-5p 呈负相关( \*\* 代表  $P < 0.01$  )

Fig.4 SNHG7 could conjugate with miR-653-5p in NB cells

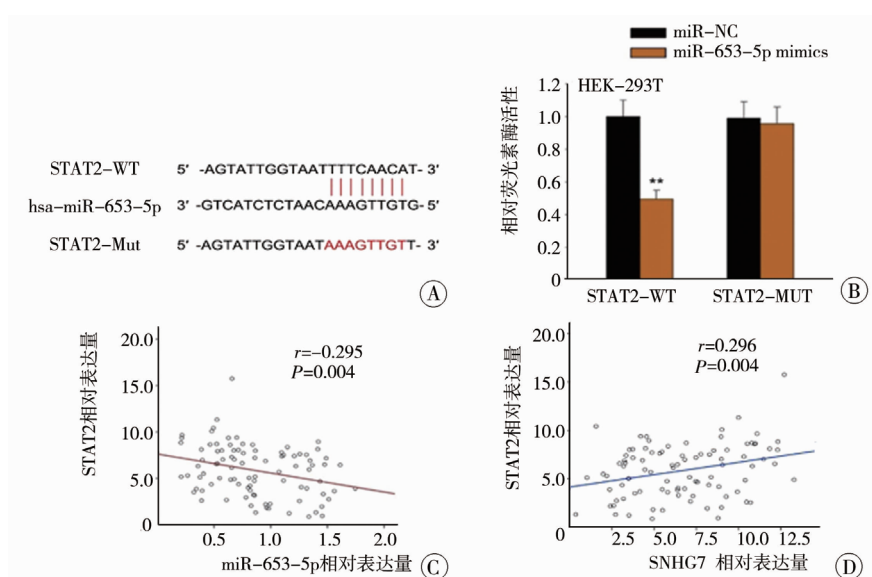


图5 STAT2 是 SNHG7 调控 miR-653-5p 的靶点, 以及 SNHG7/miR-653-5p/STAT2 轴在 NB 进展中的作用 注 A:miR-653-5p 与 STAT2 序列的预测结合位点; B:采用 HEK-293T 细胞荧光素酶报告基因检测 miR-653-5p 与 STAT2 的结合; C、D:Spearman 相关分析揭示了 STAT2 的表达与 NB 组织中 miR-653-5p 或 SNHG7 水平存在相关性

Fig.5 As a target of miR-653-5p regulated by SNHG7, STAT2 played some role of SNHG7/miR-653-5p/STAT2 axis in NB progression

miR-125b-1, 并负向控制人神经母细胞瘤细胞的增殖<sup>[20]</sup>。CASC15 在神经母细胞瘤中起肿瘤抑制剂的作用<sup>[21]</sup>。SNHG7 是一种 lncRNA, 已被鉴定为几种癌症的致癌基因<sup>[12,18,22]</sup>。然而, 其在神经母细胞瘤发展中的作用和调节机制尚不清楚。本研究发现 NB 组织和细胞系中, SNHG7 的表达水平显著升高,

而 SNHG7 的表达具有重要的临床意义, 可以预测 NB 患儿的预后。随后, 细胞功能实验验证 SNHG7 的下调会抑制 NB 细胞增殖, 并抑制细胞迁移、侵袭。

越来越多的证据表明, 与 miRNA 序列互补的 lncRNA 能够抑制 miRNA 的表达和活性<sup>[19,23]</sup>。例

如,长链非编码 RNA GAPLINC 作为 miR-378 分子的靶基因可通过海绵作用调控 *MAPK1* 表达,促进胃癌细胞增殖<sup>[24]</sup>。LncRNA CCAT1 通过下调 miR-143 在 FTC-133 甲状腺癌细胞株中的表达,促进细胞增殖、迁移和侵袭<sup>[25]</sup>。本研究通过生物信息学分析发现,miR-653-5p 与 SNHG7 和 STAT2 含有预测的结合位点,提示 SNHG7 通过类似机制调控神经母细胞瘤进展。本研究证实了 miR-653-5p 与 SNHG7 或 STAT2 的相互作用。此外,STAT2 表达与 miR-653-5p 水平呈负相关,但与 NB 组织中 SNHG7 水平呈正相关。

信号转导子和转录激活子 (signal transduction and activator of transcription, STATs) 是 JAKs-STATs 信号通路中常见的转录因子。经常参与多种细胞因子信号通路的调控<sup>[26]</sup>。STAT2 是著名的 STAT 家族蛋白之一,在调控靶基因转录方面发挥重要作用<sup>[27]</sup>。诸多文献报道 STAT2 参与了某些癌症的发生<sup>[28-29]</sup>。例如,与宫颈炎和发育不良组织相比,宫颈癌组织中 *STAT2* 上调<sup>[28]</sup>。与这些研究一致,本研究发现 NB 组织中 *STAT2* 水平较非肿瘤组织显著上调,说明 *STAT2* 与 NB 肿瘤进展有关。此外,STAT2 过表达和 miR-653-5p 抑制 shSNHG7 诱导的细胞增殖、迁移和侵袭的恢复表明,SNHG7 通过调控 miR-653-5p/STAT2 通路参与 NB 的进展。

综上所述,本研究初步阐明了 SNHG7-miR-653-5p-STAT2 信号通路在调节 NB 进展中的作用,为进一步探索新的 NB 治疗靶点和预后生物标志物提供了依据,后续会通过蛋白印迹及免疫组化等试验进一步验证此实验的准确性,未来还需要更多的 NB 动物实验以及临床实验来证实本研究结果。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 文献检索为杨槟伊、陈伟明,论文调查设计为杨槟伊、刘小梅、陈鑫,数据收集与分析为杨槟伊、范煦、陈伟明、李富江、陈鑫、刘小梅,论文结果撰写为杨槟伊、陈伟明、范煦、鹿洪亭,论文讨论分析为杨槟伊、刘小梅、鹿洪亭

## 参 考 文 献

- Maris JM. Recent advances in neuroblastoma[J]. N Engl J Med, 2010, 362(23):2202-2011. DOI: 10.1056/NEJMra0804577.
- Suo C, Deng W, Vu TN, et al. Accumulation of potential driver genes with genomic alterations predicts survival of high-risk neuroblastoma patients[J]. Biol Direct, 2018, 13(1):14. DOI: 10.1186/s13062-018-0218-5.
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? [J]. Nat Rev Genet, 2008, 9(2):102-114. DOI: 10.1038/nrg2290.
- Ridinger J, Koenke E, Kolbinger FR, et al. Dual role of HDAC10 in lysosomal exocytosis and DNA repair promotes neuroblastoma chemoresistance [J]. Sci Rep, 2018, 8(1):10039. DOI: 10.1038/s41598-018-28265-5.
- Zhou H, Zhuo Z, Chen S, et al. Polymorphisms in MYCN gene and neuroblastoma risk in Chinese children: a 3-center case-control study[J]. Cancer Manag Res, 2018, 10:1807-1816. DOI: 10.2147/CMAR.S168515.
- Uhl KL, Schultz CR, Geerts D, et al. Harmine, a dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase (DYRK) inhibitor induces caspase-mediated apoptosis in neuroblastoma[J]. Cancer Cell Int, 2018, 18:82. DOI: 10.1186/s12935-018-0574-3.
- Wu W, Jingbo S, Xu W, et al. S-trityl-L-cysteine, a novel Eg5 inhibitor, is a potent chemotherapeutic strategy in neuroblastoma [J]. Oncol Lett, 2018, 16(1):1023-1030. DOI: 10.3892/ol.2018.8755.
- Schmitt AM, Chang HY. Long noncoding RNAs in cancer pathways[J]. Cancer Cell, 2016, 29(4):452-463. DOI: 10.1016/j.ccell.2016.03.010.
- Zhao M, Sun L, Sun S, et al. The 42.1 and 53.7 kDa bands in SDS-PAGE of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata* [J]. Int J Biol Macromol, 2013, 60:405-411. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.06.009.
- Marchese FP, Raimondi I, Huarte M. The multidimensional mechanisms of long noncoding RNA function[J]. Genome Biol, 2017, 18(1):206. DOI: 10.1186/s13059-017-1348-2.
- Li Y, Zeng C, Hu J, et al. Long non-coding RNA-SNHG7 acts as a target of miR-34a to increase GALNT7 level and regulate PI3K/Akt/mTOR pathway in colorectal cancer progression[J]. J Hematol Oncol, 2018, 11(1):89. DOI: 10.1186/s13045-018-0632-2.
- She K, Huang J, Zhou H, et al. LncRNA-SNHG7 promotes the proliferation, migration and invasion and inhibits apoptosis of lung cancer cells by enhancing the FAIM2 expression[J]. Oncol Rep, 2016, 36(5):2673-2680. DOI: 10.3892/or.2016.5105.
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? [J]. Nat Rev Genet, 2008, 9(2):102-114. DOI: 10.1038/nrg2290.
- Tay Y, Rinn J, Pandolfi PP. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition[J]. Nature, 2014, 505(7483):344-352. DOI: 10.1038/nature12986.
- Tu J, Zhao Z, Xu M, et al. NEAT1 upregulates TGF- $\beta$ 1 to induce hepatocellular carcinoma progression by sponging hsa-mir-139-5p [J]. J Cell Physiol, 2018, 233(11):8578-8587. DOI: 10.1002/jcp.26524.
- Wang R, Zhang T, Yang Z, et al. Long non-coding RNA FTH1P3 activates paclitaxel resistance in breast cancer through miR-206/ABCB1 [J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(9):4068-4075. DOI: 10.1111/jcmm.13679.
- Shan Y, Ma J, Pan Y, et al. LncRNA SNHG7 sponges miR-216b to promote proliferation and liver metastasis of colorectal cancer through upregulating GALNT1 [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(7):722. DOI: 10.1038/s41419-018-0759-7.
- Qi H, Wen B, Wu Q, et al. Long noncoding RNA SNHG7 accelerates prostate cancer proliferation and cycle progression through cyclin D1 by sponging miR-503 [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 102:326-332. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.03.011.
- Zhao W, Fu H, Zhang S, et al. LncRNA SNHG16 drives proliferation, migration, and invasion of hemangioma endothelial cell through modulation of miR-520d-3p/STAT3 axis [J]. Cancer



- Med, 2018, 7(7):3311-3320. DOI: 10.1002/cam4.1562.
- [20] Bevilacqua V, Gioia U, Di Carlo V, et al. Identification of linc-NeD125, a novel long non coding RNA that hosts miR-125b-1 and negatively controls proliferation of human neuroblastoma cells [J]. RNA Biol, 2015, 12(12):1323-1337. DOI: 10.1080/15476286.2015.1096488.
- [21] Russell MR, Penikis A, Oldridge DA, et al. CASC15-S Is a tumor suppressor lincRNA at the 6p22 neuroblastoma susceptibility locus [J]. Cancer Res, 2015, 75(15):3155-3166. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3613
- [22] Ren J, Yang Y, Xue J, et al. Long noncoding RNA SNHG7 promotes the progression and growth of glioblastoma via inhibition of miR-5095 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 496(2):712-718. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.01.109.
- [23] Wang M, Cai WR, Meng R, et al. miR-485-5p suppresses breast cancer progression and chemosensitivity by targeting survivin [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 501(1):48-54. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.04.129.
- [24] Diao L, Wang S, Sun Z. Long noncoding RNA GAPLINC promotes gastric cancer cell proliferation by acting as a molecular sponge of miR-378 to modulate MAPK1 expression [J]. Onco Targets Ther, 2018, 11:2797-2804. DOI: 10.2147/OTT.S165147.
- [25] Liu Y, Yang L, Yin J, et al. MicroRNA-15b deteriorates hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte apoptosis by downregulating Bcl-2 and MAPK3 [J]. J Invest Med, 2018, 66(1):39-45. DOI: 10.1136/jim-2017-000485.
- [26] Shuai K, Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system [J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3(11):900-911. DOI: 10.1038/nri1226.
- [27] Johansen C, Rittig AH, Mose M, et al. STAT2 is involved in the pathogenesis of psoriasis by promoting CXCL11 and CCL5 production by keratinocytes [J]. PLoS One, 2017, 12(5):e0176994. DOI: 10.1371/journal.pone.0176994.
- [28] Liang Z, Gao LH, Cao LJ, et al. Detection of STAT2 in early stage of cervical premalignancy and in cervical cancer [J]. Asian Pac J Trop Med, 2012, 5(9):738-742. DOI: 10.1016/S1995-7645(12)60117-5.
- [29] Ogony J, Choi HJ, Lui A, et al. Interferon-induced transmembrane protein 1 (IFITM1) overexpression enhances the aggressive phenotype of SUM149 inflammatory breast cancer cells in a signal transducer and activator of transcription 2 (STAT2)-dependent manner [J]. Breast Cancer Res, 2016, 18(1):25. DOI: 10.1186/s13058-016-0683-7.

(收稿日期:2021-10-31)

**本文引用格式:** 杨彬伊, 刘小梅, 陈鑫, 等. SNHG7-miR-653-5p-STAT2 反馈通路在神经母细胞瘤进展中的调节作用研究 [J]. 临床小儿外科杂志, 2022, 21(2):128-135. DOI: 10.3760/cma.j.cn101785-201910074-006.

**Citing this article as:** Yang BY, Liu XM, Chen X, et al. Role of SNHG7-miR-653-5p-STAT2 feedback loop in regulating neuroblastoma progression [J]. J Clin Ped Sur, 2022, 21(2):128-135. DOI: 10.3760/cma.j.cn101785-201910074-006.

## 首届“金匠杯”全国小儿外科中青年医师手术技能大赛通知

### 一、参赛手术视频要求

以常见手术的规范化操作为主线,重点考核中青年医师手术技术规范与手术基本功情况及临床思维与决策能力。参赛手术范围:①腹腔镜下阑尾切除术;②Ladd 索带松解肠旋转不良矫治术;③肱骨髁上骨折闭合复位经皮克氏针固定术;④腹腔镜下睾丸下降固定术;⑤胸骨正中切口室间隔缺损修补术;⑥脑室镜下颅内蛛网膜囊肿造瘘术。

视频中应有简要病例介绍,包括简要病史,诊断依据(包括影像学资料),治疗方案,手术指征、时机和方式,手术总时长,术中出血情况,手术效果,病人恢复情况。手术适应证和操作过程应符合相关的外科医疗技术规范。视频需要呈现手术基本操作步骤,如手术入路与切口选择、切开分离、对周围组织的保护、止血、打结、缝合等操作以及手术器材使用情况。可配相关示意图和文字说明。视频中可有字幕,但不得泄露手术者姓名、单位及患者相关信息。视频为参赛选手亲自主刀原创作品,无署名争议,无侵权行为(需要签署视频授权书)。不能使用收费字体、侵犯版权的素材(图片、音乐、视频等)。

视频制作要求:①视频文件格式:MPEG, MP4, AVI 或 WMV;②视频分辨率:保持原有视频分辨率不变,帧数在 25 帧为佳;推荐分辨率:1920×1080;③视频大小:800 MB 以内;④视频允许剪辑,但不可加速,禁止多个手术视频拼接;⑤视频时长:时长 8~15 分钟。

### 二、投稿方式

通过 U 盘邮寄方式投稿,邮寄地址:湖南省长沙市梓园路 86 号,临床小儿外科杂志编辑部(湖南省儿童医院内)王凤姣收,联系电话:137 5519 6960。有个人云盘的作者可将视频材料上传至个人云盘里,再将二维码和提取码发送至编辑部邮箱(china\_jcps@sina.com),邮件主题和文件都请按照“作者+单位+手术名+手机号”命名。截稿日期:2022 年 3 月 31 日。