

LncRNA SNHG9 敲除对胶质瘤细胞增殖影响及其作用机制的生物信息学探讨

叶静静^{1,2} 陈天兵^{1,2}

摘要 目的 利用 CRISPR-Cas9 结合流式单细胞分选构建 lncRNA SNHG9 基因敲除的 U251 细胞株,检测基因敲除对细胞增殖能力的影响。利用生物信息学分析探讨 SNHG9 基因发挥功能的可能机制。方法 在 SNHG9 基因上、下游分别设计一个 Cas9 作用靶点,将两对单链向导 RNA 的引物模板退火连接 px330-EGFP 载体,构建成功的目的质粒共转染 U251 细胞后,通过流式单细胞分选在 96 孔板中培养,通过 PCR 扩增和测序验证筛选得到 SNHG9 敲除成功的单克隆细胞株并扩大培养。RTCA 方法检测 SNHG9 敲除后细胞增殖能力的改变。利用在线工具分析 lncRNA SNHG9 的表达情况,查找共表达基因并进行富集分析。结果 构建成功用于

SNHG9 敲除的质粒。培养共存活了 8 个克隆,且得到 1 株 SNHG9 成功敲除的细胞株。敲除细胞的增殖能力明显降低 ($P < 0.05$)。分析显示 SNHG9 在胶质母细胞瘤 (GBM) 组织中高表达,富集分析显示共表达基因主要与线粒体的功能相关。结论 成功建立了 SNHG9 敲除的克隆细胞株且能抑制 U251 细胞的增殖,生物信息学分析显示 SNHG9 可能参与线粒体的功能调控。

关键词 CRISPR-Cas9; SNHG9; 胶质瘤; 细胞增殖; 生物信息学分析

中图分类号 R 739.41; Q 789

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)03-0342-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.03.002

2020-10-15 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(编号: 81901519); 安徽省自然科学基金青年项目(编号: 1908085QH380)

作者单位: 皖南医学院¹ 重大疾病非编码 RNA 转化研究安徽普通高校重点实验室、² 弋矶山医院中心实验室 芜湖 241001

作者简介: 叶静静,女,检验技师初级;

陈天兵,男,博士,助理研究员,责任作者, E-mail: ctb0410021@qq.com

胶质母细胞瘤 (glioblastoma multiforme, GBM) 是最常见和恶性程度最高的颅内肿瘤^[1],具有病程短、进展快、预后差、死亡率高的特点^[2]。目前传统治疗方法,如放疗等并没有明显改善胶质瘤患者的预后^[3-4]。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类长度超过 200 核苷酸但不编

pregnant mice were randomly divided into the control group and the chronic stress group. After the mice were born, the male offspring mice were randomly divided into the control group (CON group), the control + CRHR1 gene knockout heterozygous mice group (CON + CKOH group), the control + CRHR1 gene knockout homozygous mice group (CON + CKOA group), the chronic unpredictable mild stress group (CUMS group), the chronic unpredictable mild stress + CRHR1 gene knockout heterozygous mice group (CUMS + CKOH group), the chronic unpredictable mild stress + CRHR1 gene knockout homozygous mice group (CUMS + CKOA group). The degree of depression in male offspring mice was observed by sucrose preference experiment, tail suspension experiment and forced swimming experiment. TUNEL staining was used to observe apoptosis in hippocampal CA3 area. Western blot was used to quantitatively detect the expression of mTOR and p-mTOR (Ser2448) in hippocampus. **Results** Chronic stress during pregnancy induced depression-like behavior, increased neuronal apoptosis index in hippocampal CA3 area, and attenuated the level of hippocampal mTOR and p-mTOR protein significantly in male offspring mice. Hippocampal CRHR1 gene conditional knockout could significantly improve depressive-like behavior, neuronal apoptosis in the hippocampus CA3 region and the levels of mTOR and p-mTOR proteins in the male offspring mice whose mother suffered from chronic stress during pregnancy. **Conclusion** Chronic stress during pregnancy can lead to depression-like behavior in male offspring mice through activating CRHR1 of hippocampus and attenuating mTOR protein expression in the hippocampus, which results in neuronal injury in the CA3 region of offspring hippocampus.

Key words depression; chronic prenatal stress; hippocampus; corticotrophin-releasing hormone receptor1; conditional knockout; *cre/loxp*

码蛋白质的 RNA 分子^[5],参与调控细胞增殖、分化、凋亡等多种与肿瘤形成和发展相关的生物学过程^[6-7]。SNHG9 是一个在肿瘤组织中具有较高表达丰度的 lncRNA 然而其在肿瘤中的功能却较少报道。该实验旨在利用高效率 and 操作流程简单的基因编辑方法 CRISPR/Cas9 来构建 SNHG9 基因敲除的胶质细胞瘤细胞株^[8-9],观察 SNHG9 敲除对胶质瘤细胞增殖能力的影响,并通过生物信息学分析探讨 SNHG9 可能参与的生物学过程,为进一步深入研究 SNHG9 的功能和分子机制打下基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料 胶质瘤细胞株 U251 购自中国科学院细胞库。px330-EGFP 载体源自 px330-mCherry(美国 Addgene 公司,货号:98750),由本实验室改造而得(通过 Not I 位点将 mCherry 表达模块替换成 EGFP 表达模块)。南美胎牛血清购自美国 Gibco 公司;胰蛋白酶及 DMEM 高糖培养基购自美国 Hyclone 公司;lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司;BbsI、Buffer 2 购自美国 NEB 公司;T4、感受态细胞购自日本 Takara 公司;基因组提取试剂盒、胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自美国 Omega 公司;6/24/96 孔板、Yeast extract、Tryptone、琼脂糖和琼脂粉等购自上海碧云天生物技术有限公司;RTCA 实时无标记细胞分析仪(型号为 xCELLigence RTCA DP)购自艾森生物(杭州)有限公司;倒置荧光显微镜(型号:尼康 Ti-U 型)购自日本尼康公司。

1.2 方法

1.2.1 靶点和检测引物设计 从 Ensembl 上下载 SNHG9 所在位置上的基因组序列(含内含子、外显子、不同转录本序列信息),分别截取基因上游和下游约 800 bp 序列用作靶点和检测引物的设计。综合不同在线设计工具给出的靶点序列和得分,选取在多个工具中都出现的且排名都靠前的序列作为最终使用的靶点。用到的在线工具包括 E-CRISP (<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/index.html>), CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/crispor.py>), ZiFiT (<http://zifit.partners.org/ZiFiT/>)。检测引物的位置分别设计在上、下游靶点的外侧,以及 SNHG9 基因的内部,利用 Primer5 给出的引物序列的得分,选取得分较高的用作敲除后的基因型检测。

1.2.2 px330-EGFP-sgRNA 质粒的构建 靶点序列引物(浓度 20 $\mu\text{mol/L}$)按比例(5 μl F + 5 μl R + 10 μl Buffer2 + 80 μl H₂O)加入到 1.5 毫升 EP 管

中,放置于沸水中自然冷却,形成短的含黏性末端的双链 DNA 片段(连接片断);px330-EGFP 经 BbsI 酶切后过胶回收吸附柱,用无菌水洗脱回收(连接载体);连接体系(1 μl 连接片断 + 1 μl 连接载体 + 1 μl T4 连接酶 + 1 μl T4 Buffer + 7 μl H₂O);22 $^{\circ}\text{C}$ 连接 1 h,连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,涂氨苄霉素抗性 LB 平板,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜;挑取菌落,摇菌,抽提质粒后送样测序鉴定。

1.2.3 SNHG9 基因敲除克隆的建立 癌症细胞系百科全书(<https://portals.broadinstitute.org/ccle>)上分析显示 SNHG9 在 U251 细胞中无基因拷贝数变异,表明其为正常的二倍性。U251 细胞铺种在 6 孔板中,待细胞密度达到 80% 左右进行转染。将上述构建成功的含上、下游靶点序列的两质粒等量混合,按体系(4 μl Lipo2000 + 2.5 μg 质粒 + 125 μl opti-DMEM)进行转染,次日更换 DMEM,并用荧光显微镜观察 EGFP 的荧光信号;转染 36 h 后胰酶消化制备单细胞悬液进行流式单细胞分选;分选到 96 孔板中的克隆经过 2~3 周的培养后,转移并备份到 24 孔板中继续培养;分别提取克隆细胞株的基因组 DNA,利用检测引物进行 PCR 扩增,取 10 μl PCR 产物跑凝胶电泳进行检测,从扩增片断的带型上判断克隆细胞株的基因型(正常型、杂合型和纯合敲除型),PCR 产物直接测序或连 TA 克隆后测序获得敲除后的具体序列。

1.2.4 细胞增殖检测 实时无标记细胞分析技术(RTCA 法):体外大量培养 SNHG9 敲除成功的 U251 细胞,选择对数生长期的敲除成功的胶质瘤 U251-m3 单克隆细胞和正常的 U251 细胞,消化后进行计数,然后将获得的细胞稀释至 4×10^4 个/ml 细胞悬液,设置 3 个复孔,在 RTCA 的 16 孔板中的每个孔中加入 50 μl DMEM 培养基,再在每个孔中加入 100 μl 的细胞悬浮液。连续观察 200 h,通过仪器来检测细胞的增殖能力。

1.2.5 生物信息学分析工具 利用 GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>)分析 SNHG9 表达情况;GEPIA2 和 UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/analysis.html>)共同用于相似表达基因的提取;FunRich (<http://www.funrich.org/>)用于韦恩图的绘制和信号通路的富集分析。每一种工具在网络上都有对应的教程指导使用。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 19.0 统计学软件对实验结果进行数据分析。结果用表示,RTCA 的实验结果采用双因素方差分析进行统计,组间比较采用

Tukey HSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 靶点和检测引物设计 利用在线工具在 SNHG9 基因的上、下游各设计 1 个靶点,从分析得到的序列中筛选得分高的作为靶点(T1、T2),并在 5'端添加相应的黏性末端序列用作与 px330-EGFP 载体相连(图 1),在设计好的两靶点(T1、T2)的外侧和内部各设计 1 对引物(FO/RO 和 FI/RI)用作敲除细胞的基因型检测(表 1)。

表 1 靶点序列和检测引物序列列表

引物名称	引物序列(5'-3')
sgRNA-T1(F)	CACCGGCCCGCTGCAGCGACCAAC
sgRNA-T1(R)	AAACGTTGGTCGCTGCAGCGGGCC
sgRNA-T2(F)	CACCCGACTCGCCTATCAGCCTGG
sgRNA-T2(R)	AAACCCAGGCTGATAGGCGAGTCCG
检测(FO)	GGCTGATACCTACCTCCTTA
检测(RO)	AGAATCTCACCTGGTCTCAC
检测(FI)	AGGTAGTCTGCGCGCTTGAC
检测(RI)	CAGTCGGGTCAGGAGTCAGGG

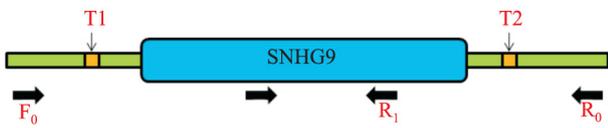


图 1 SNHG9 基因结构

2.2 px330-EGFP-sgRNA 质粒的构建 反向互补的靶点引物对(指导 sgRNA 合成)退火后与经 BbsI

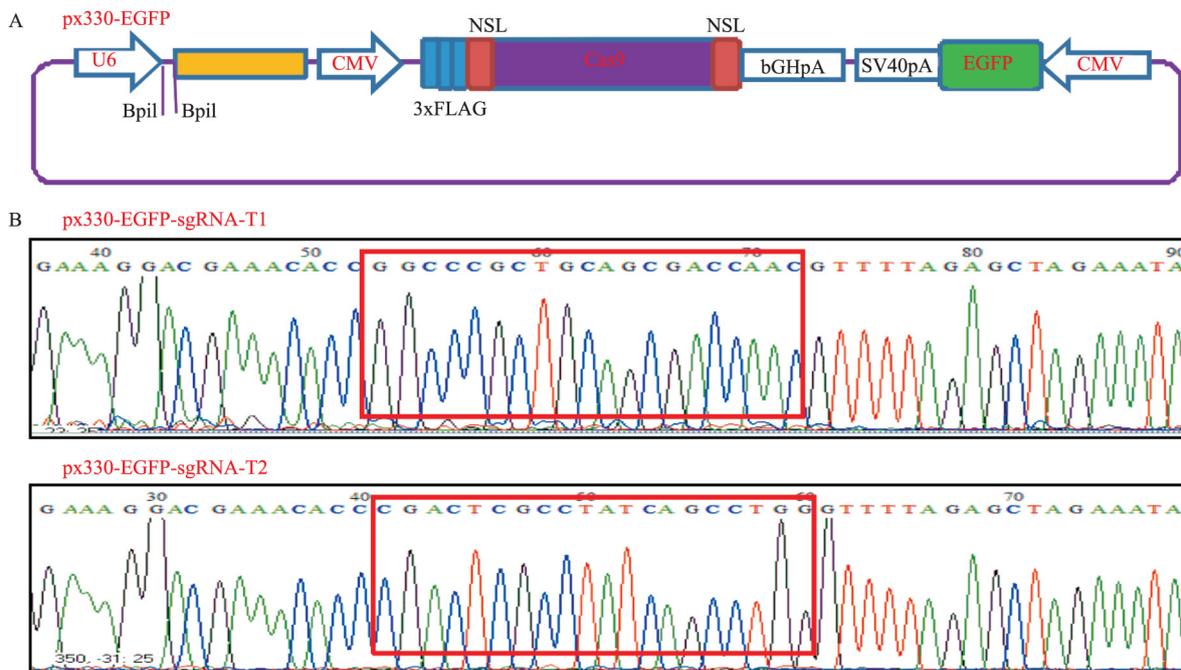


图 2 px330-EGFP-sgRNA 质粒的构建

A: px330-EGFP 载体结构示意图; B: px330-EGFP-sgRNA 质粒测序峰图; 红色框: 靶点序列

酶切回收的 px330 载体相连,产物经转化、涂平板、克隆摇菌后进行质粒提取和送样测序。测序结果显示质粒 px330-EGFP-sgRNA-T1 和 px330-EGFP-sgRNA-T2 构建成功(图 2)。

2.3 SNHG9 敲除克隆细胞株的建立 将 px330-EGFP-sgRNA-T1 和 px330-EGFP-sgRNA-T2 共转染 U251 细胞,转染后 12 h 即可见 EGFP 表达,通过在软件上圈选,可将强荧光表达的细胞通过 MoFlo_XDP 分选到 96 孔板中,分选后的细胞在培养箱中培养 2~3 周。本研究共成功培养出 8 个克隆细胞株,利用检测引物 FO RO 进行 PCR 扩增,根据跑胶条带大小分析显示 3 号克隆仅含有敲除条带(纯合敲除型,约 600 bp),4 号克隆既含有敲除条带又含有正常条带(杂合型),其他克隆均只有正常条带(正常型,约 1 421 bp)(图 3A)。进一步用检测引物 FI/RI 进行 PCR 扩增,结果显示 3 号克隆扩增不出正常大小的片断(图 3A)。对 3 号克隆(U251-m3)的 PCR 片断进行测序,结果显示该片断为单一序列组成的成功敲除后的重组片断,中间删除了一个包含 SNHG9 基因的 756 bp 的片断(图 3B)。

2.4 SNHG9 敲除对细胞形态的影响 对建立的敲除细胞株进行扩大培养,并通过显微镜观察细胞形态。如图 4 所示,普通 U251 细胞形态一致性较高,而 U251-m3 则表现出一定的形态异质性,部分细胞的胞体变得扁平宽大。

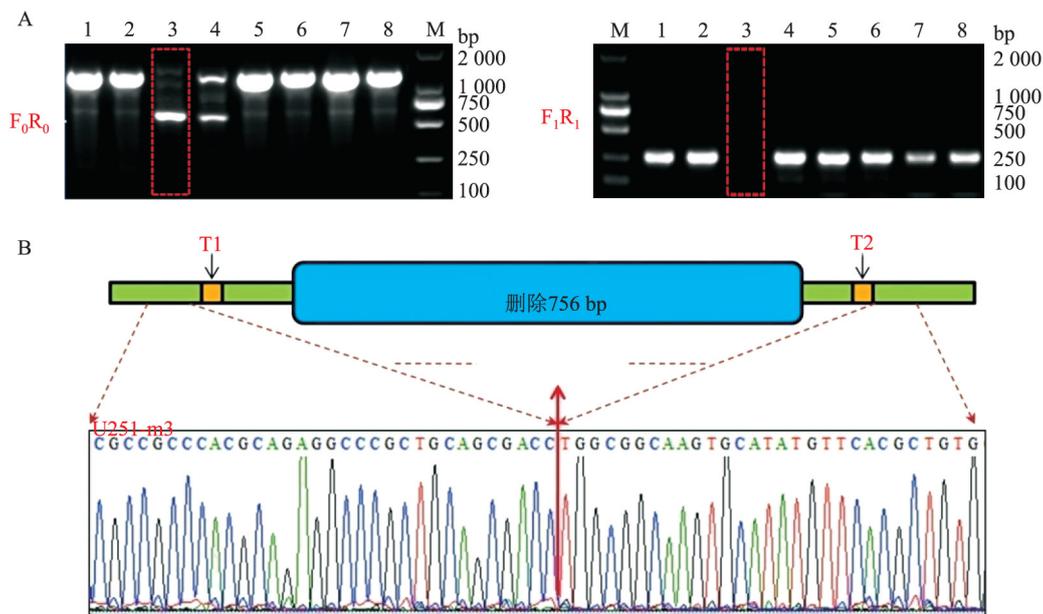


图3 敲除克隆细胞株的鉴定

A: 8个克隆细胞株的基因型分析; B: 纯合敲除克隆 U251-m3 的序列信息; 1、2、5、6、7、8号: 正常克隆基因型; 3号: 纯合敲除克隆基因型; 4号: 杂合敲除克隆基因型

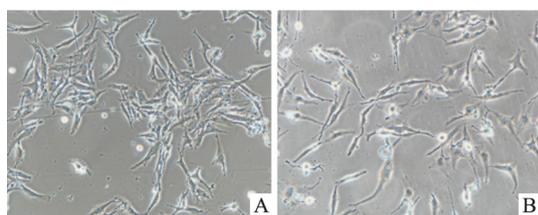


图4 敲除克隆细胞株的形态学观察 ×200
A: U251; B: U251-m3

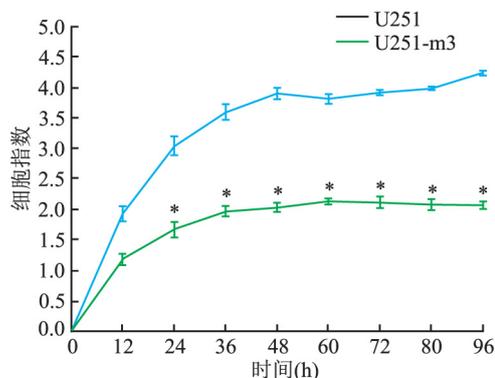


图5 RTCA 法检测 SNHG9 基因敲除对 U251 细胞增殖的影响
与对照组 U251 细胞比较: * $P < 0.05$

2.5 SNHG9 敲除对 U251 细胞增殖的影响

RTCA 实时无标记细胞分析仪显示不同时间点下敲除成功的 U251-m3 细胞和对照组 U251 细胞的细胞指数的统计描述指标如表 2 所示, 敲除成功的 U251-m3 增殖的细胞指数与对照组 U251 细胞比较, 增殖速度显著降低。

表2 不同时间点的对照组 U251 细胞和实验组 U251-m3 细胞增殖的统计数值的大小及增殖抑制率 ($n=4, \bar{x} \pm s$)

时间(h)	U251(细胞指数)	U251-m3(细胞指数)	1-U251-m3/U251
12	1.93 ± 0.12	1.18 ± 0.09	0.32 ± 0.06
24	3.04 ± 0.16	1.67 ± 0.13*	0.37 ± 0.07
36	3.59 ± 0.13	1.97 ± 0.08*	0.37 ± 0.04
48	3.90 ± 0.09	2.04 ± 0.07*	0.39 ± 0.03
60	3.81 ± 0.08	2.13 ± 0.05*	0.36 ± 0.03
72	3.91 ± 0.04	2.12 ± 0.09*	0.37 ± 0.02
80	3.98 ± 0.03	2.08 ± 0.09*	0.39 ± 0.02
96	4.23 ± 0.04	2.07 ± 0.06*	0.41 ± 0.01

与对照组 U251 细胞比较: * $P < 0.05$

2.6 SNHG9 的表达分析, 共表达基因查找及富集分析

GEPIA2 在线分析显示 SNHG9 在 GBM 肿瘤组织中的表达相比在正常组织(N)中的表达明显升高(图 6A)。从 GEPIA2 中提取到 1 000 个在 GBM 肿瘤中与 SNHG9 表达相似的基因(表达相关性系数 R 大于 0.3), 从 UALCAN 中提取到 568 个表达相关性系数大于 0.3 的基因, 两者的交集为 474 个基因(图 6B)。将这 474 个基因进行 FunRich 信号通路分析, 结果显示这些基因显著地富集在与线粒体功能相关的条目下, 包括呼吸电子传递链、ATP 合成、TCA 循环等(图 6C)。

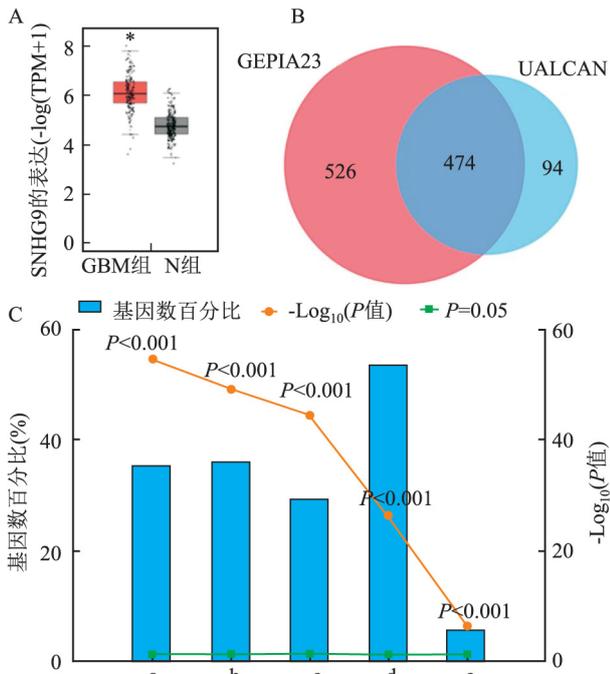


图 6 SNHG9 的生物信息学分析

A: GEPIA2 中 SNHG9 的表达分析; B: SNHG9 相似表达基因提取; C: SNHG9 共表达基因的信号通路富集分析: a: 呼吸电子运输, ATP 合成; b: 柠檬酸循环和电子运输; c: 呼吸电子传递; d: 新陈代谢; e: 化学渗透偶联产生 ATP; 与正常组 (N) 比较: * P < 0.05

3 讨论

CRISPR/Cas 系统最早发现于原核生物中,与获得性免疫相关,能使宿主细胞获得抵抗噬菌体、质粒等外来 DNA 入侵的能力^[10]。自 2012 年开始,CRISPR/Cas 系统逐渐被广泛应用于真核细胞的基因组 DNA 编辑,并得到了深入地发展,衍生出包括敲除、敲入、转录抑制或激活、RNA 水平编辑、组学水平筛选等多种新的技术手段^[8];相比以往的基因编辑手段,由于其操作简便,快速省时、编辑效率高等优点推进了生命科学和基础医学研究方法的革新,并促成了许多新的治疗手段的开发和临床转化,如在纠正某些遗传病的基因突变和癌症病人的免疫细胞治疗中的应用等^[8-9]。

以 siRNA、shRNA 来进行的肿瘤基因功能研究,实验操作、试剂以及敲降效率等对最终的结果都有很大的影响,经常需要多次重复才能得到较为肯定的结论。相比之下,CRISPR/Cas9 系统介导的基因敲除可实现对目的基因产物的完全消除,敲除结局稳定遗传,避免了许多干扰因素,具有独特的方法学上的优势。本研究通过结合流式单克隆分选,成功

建立一株 SNHG9 敲除的 U251 细胞株 (U251-m3)。相比于通过有限稀释法获得单克隆,单细胞分选操作省时、高效且精准。尽管 PCR 从 U251-m3 扩增出的敲除片段的测序结果为单一序列组成,但两对检测引物从 U251-m3 中都未扩增出正常大小的基因片段,表明 SNHG9 已被完全敲除。造成单一序列组成的原因有两种:一是两等位基因上发生了敲除后的重组序列完全一致的现象;另一种可能是上、下游两靶点在双链断裂修复的过程中丢失了断点处部分片段,而当丢失的这部分片段包含引物序列时就无法被正常扩增。

LncRNA 的异常表达与肿瘤的发生、发展及预后相关,近年来已成为肿瘤学基础研究、标志物和治疗靶点挖掘的又一热点^[11-12]。本研究显示 SNHG9 在 GBM 组织中相比正常组织表达水平显著升高,SNHG9 敲除后细胞形态上有一定程度的改变,SNHG9 敲除的 U251-m3 细胞株相比正常的 U251 细胞增殖能力受到显著抑制,这些结果表明 SNHG9 在 GBM 中是一个促癌基因。在细胞的生物学过程中,功能相关的基因通常受控于相同的调控机制,因此具有共同的表达模式;该研究通过两个常用的在线工具提取了 SNHG9 在 GBM 中的共表达基因,共表达基因的富集分析结果提示 SNHG9 可能与线粒体的相关功能有关;能量代谢重编程是癌或癌细胞的十大特征之一,Warburg 效应 (有氧糖酵解) 与线粒体的功能直接相关^[13-14];这些结果显示 SNHG9 有可能是通过影响线粒体功能进而调控胶质瘤细胞的生物学形为的。最近一篇研究^[11]显示干扰 SNHG9 的表达确实可调节胶质瘤细胞的生长和有氧糖酵解,该研究分析的结果与之一致,但其采用的是敲降的手段,对 SNHG9 的表达干扰不完全,并且未有很深入的机制上的研究。然而又有研究^[15]提示 SNHG9 在胰腺癌中扮演着抑癌基因的角色,表明 SNHG9 在肿瘤中的功能和角色具有类型特异性。

参考文献

[1] Zhang H, Qin D, Jiang Z, et al. SNHG9/miR-199a-5p/Wnt2 axis regulates cell growth and aerobic glycolysis in glioblastoma[J]. NeuroPathol Exp Neurol, 2019, 78(10): 939-48.

[2] Furnari F B, Fenton T, Bachoo R M, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment [J]. Genes Dev, 2007, 21(21): 2683-710.

[3] Fuller C E, Jones D T W, Kieran M W. New Classification for central nervous system tumors: implications for diagnosis and therapy [J]. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2017, 37: 753-63.

- [4] Grossman S A , Ye X , Piantadosi S , et al. Survival of patients with newly diagnosed glioblastoma treated with radiation and temozolomide in research studies in the United States [J]. *Clin Cancer Res* 2010 ,16(8) :2443 –9.
- [5] Quinn J J , Chang H Y. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function [J]. *Nat Rev Genet* 2016 ,17(1) :47 –62.
- [6] Hauptman N , Glava D. Long non-coding RNA in cancer [J]. *Int J Mol Sci* 2013 ,14(3) :4655 –69.
- [7] Yu C , Xue J , Zhu W , et al. Warburg meets non-coding RNAs: the emerging role of ncRNA in regulating the glucose metabolism of cancer cells [J]. *Tumour Biol* ,2015 ,36(1) :81 –94.
- [8] Pickar-Oliver A , Gersbach C A. The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol* , 2019 ,20(8) :490 –507.
- [9] Zhan T , Rindtorff N , Betge J , et al. CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy. [J]. *Semin Cancer Biol* 2019 ,55:106 –19.
- [10] 孟泽松 ,王飞飞 ,王光林 等. CRISPR/Cas9 基因编辑技术在肿瘤研究及治疗中的应用 [J]. *肿瘤* ,2016 ,36(12) :1395 –401.
- [11] Huarte M. The emerging role of lncRNAs in cancer [J]. *Nat Med* , 2015 ,21(11) :1253 –61.
- [12] Arun G , Diermeier S D , Spector D L. Therapeutic targeting of long non-coding RNAs in cancer [J]. *Trends Mol Med* ,2018 ,24(3) :257 –77.
- [13] Hanahan D , Weinberg R A. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. *Cell* 2011 ,144(5) :646 –74.
- [14] Zong W X , Rabinowitz J D , White E. Mitochondria and cancer [J]. *Mol Cell* 2016 ,61(5) :667 –76.
- [15] Zhang B , Li C , Sun Z. Long non-coding RNA LINC00346 , LINC00578 , LINC00673 , LINC00671 , LINC00261 , and SNHG9 are novel prognostic markers for pancreatic cancer [J]. *Am J Transl Res* 2018 ,10(8) :2648 –58.

Effects of LncRNA SNHG9 knockout on glioma cell proliferation and bioinformatic exploration of its mechanism

Ye Jingjing^{1,2} , Chen Tianbing^{1,2}

(¹Key Laboratory of Non-coding RNA Transformation Research of Anhui Higher Education Institution ,
²Central Laboratory , Yijishan Hospital , Wannan Medical College , Wuhu 241001)

Abstract Objective To establish SNHG9-knocked out U251 cells by combination of CRISPR/Cas9 and single cell sorting through flow cytometry , and test the effect of SNHG9 deletion on cell proliferation. And to explore the potential mechanism that SNHG9 involved by bioinformatic analysis. **Methods** Two targets were separately designed for Cas9 at the genomic sites upstream and downstream of SNHG9 gene , the two pairs of primers that guide the synthesis of sgRNA were annealed and cloned into px330-EGFP , and U251 cell were co-transfected with the two successfully constructed plasmids followed by single cell sorting into 96-well plates. Cell clones were raised and the genotypes were identified Gby PCR and sequencing , SNHG9-deleted clone cells were selected for subsequent experiments. Effect of SNHG9 deletion on cell proliferation was assessed by RTCA. Expression of lncRNA SNHG9 , its co-expressed genes and their enrichment analysis were performed by online tools. **Results** Effective targets were designed and plasmid of SNHG9 knockout was successfully constructed. 8 clones survived after single cell sorting and culture , from which 1 clone with SNHG9 totally deleted was obtained. The proliferation capacity of U251 cells significantly decreased after SNHG9 knocking-out ($P < 0.05$). SNHG9 was overexpressed glioblastoma multiforme (GBM) samples when compared with normal tissues , the co-expressed genes most significantly enriched in mitochondrion related functions. **Conclusion** The SNHG9-deleted U251 clone was successfully established; SNHG9 knocking-out suppressed the proliferation of U251 cells; bioinformatic analysis showed that SNHG9 might involve in the regulation of mitochondrial function.

Key words CRISPR/Cas9; SNHG9; glioma; cell proliferation; bioinformatic analysis