

microRNA-21 对人甲状腺乳头状癌细胞增殖和凋亡的影响

吴 夕, 缪 珩*

(南京医科大学第二附属医院内分泌科, 江苏 南京 210011)

[摘要] 目的:探讨 microRNA-21(miR-21)在人甲状腺乳头状癌中的表达及其对人甲状腺乳头状癌 K1 细胞增殖和凋亡能力的影响。方法:通过 qRT-PCR 检测 12 对甲状腺乳头状癌组织(PTC)与癌旁正常组织中 miR-21 的表达差异;将 miR-21 抑制试剂(Anti-miR-21)、过表达试剂(miR-21 mimic)分别转染入 K1 细胞,并各自设立阴性对照组,运用 qRT-PCR 验证 K1 细胞中 miR-21 的表达;MTT 实验检测 miR-21 对 K1 细胞增殖能力的影响;流式细胞术检测转染后 K1 细胞凋亡的变化,Western blot 检测细胞凋亡增殖相关蛋白的表达情况。结果:miR-21 在 PTC 组织中的表达明显高于癌旁正常甲状腺组织($P < 0.05$);与阴性对照组相比,瞬时转染 Anti-miR-21 的 K1 细胞 miR-21 的表达明显减弱($P < 0.01$);MTT 实验结果显示抑制 miR-21 表达后,K1 细胞的增殖能力明显下降($P < 0.05$);流式细胞仪检测显示转染 Anti-miR-21 后的 K1 细胞凋亡明显增加,凋亡率为 19.5%,阴性对照组的凋亡率为 9.4%;Western blot 结果显示转染 Anti-miR-21 组 K1 细胞 Bcl-2 表达降低,Bax 表达升高。转染 miR-21mimic 的 K1 细胞增殖和凋亡无明显改动。结论:miR-21 在人甲状腺乳头状癌中呈高表达,抑制 miR-21 的表达能显著降低 K1 细胞的增殖能力,增加 K1 细胞凋亡率。

[关键词] microRNA-21;甲状腺乳头状癌;增殖;凋亡

[中图分类号] R736.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)04-437-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140407

Effect of microRNA-21 on proliferation and apoptosis of papillary thyroid carcinoma cells

Wu Xi, Miao Heng*

(Department of Endocrinology, the Second Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210011, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the expression of microRNA-21 (miR-21) in papillary thyroid carcinoma (PTC) and its effect on proliferation and apoptosis of K1 cell. **Methods:** Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was performed to detect and compare the expressions of miR-21 in 12 pairs of PTC tissues and adjacent normal tissues. K1 cell was respectively transfected with Anti-miR-21 and mimic-miR-21 and their corresponding negative control groups were constructed. The expression of miR-21 in K1 cells was identified by qRT-PCR. Cell proliferation after transfection with anti-miR-21 was analyzed using MTT assay. The cell apoptosis of K1 after transfection was analyzed by flow cytometry. Western blotting was performed to detect the expressions of proliferation and apoptosis-related proteins. **Results:** Compared with adjacent normal tissues, miR-21 in PTC tissues was significantly up-regulated ($P < 0.05$). Compared with the negative control (Anti-miR-NC) group, the miR-21 expression of K1 cells was significantly down-regulated after Anti-miR-21 transfection ($P < 0.01$). MTT assay showed that the inhibition of miR-21 expression significantly reduced the proliferation of K1 cells ($P < 0.05$). Flow cytometry showed that K1 apoptosis rate after Anti-miR-21 transfection was significantly increased to 19.5%, while the negative control (Anti-miR-NC) group was 9.4%. Western blotting showed that the expression of Bcl-2 was down-regulated and the expression of Bax was up-regulated in the anti-miR-21 treated K1 cells. **Conclusion:** The expression of miR-21 is up-regulated in PTC. Down-regulated expression of miR-21 significantly inhibits proliferation while promotes the apoptosis of K1 cell.

[Key words] microRNA-21; papillary thyroid carcinoma; proliferation; apoptosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(04):437-441]

[基金项目] 江苏省卫生厅科研项目(H201010)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: miaoheng@med-mail.com.cn

甲状腺癌是内分泌系统最常见的恶性肿瘤,约占所有恶性肿瘤的 1.3%。乳头状甲状腺癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)是甲状腺组织中最常见

的恶性肿瘤,占所有甲状腺癌的80%,近年来发病率呈现上升趋势^[1]。微小RNA(microRNA, miRNA)是一类长约22个核苷酸的非编码小RNA,广泛存在于植物和动物细胞内,通过碱基互补原理结合到靶基因mRNA的3'端非编码区(3'UTR),降解靶基因mRNA或抑制其翻译而在肿瘤的发生、发展过程中发挥着类似于癌基因和抑癌基因的功能^[2-3]。全基因组miRNA表达谱的研究表明,miR-21在肺癌、乳腺癌、结肠癌、胰腺癌、神经胶质瘤等多种肿瘤中都存在异常高表达^[4-7]。有关miR-21与人类肿瘤细胞的作用机制已逐渐被阐明,但是关于miR-21在人甲状腺乳头状癌细胞中作用的研究仍较少,本实验通过qRT-PCR检测了12对PTC人组织标本与癌旁正常甲状腺组织中miR-21的差异表达,发现其在PTC癌组织中的表达明显高于癌旁正常甲状腺组织。本实验进一步将miR-21抑制试剂(Anti-miR-21)及过表达试剂(miR-21 mimic)瞬时转染入甲状腺乳头状癌细胞系K1细胞,分别抑制和促进miR-21在K1细胞中的表达,从两方面探究miR-21对K1细胞增殖、凋亡能力的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

12例PTC和癌旁正常组织标本由本院普外科提供。K1细胞株(广州吉妮欧公司)。RPMI-1640培养基、胎牛血清(FBS)(Hyclone公司,美国)。RNA抽提试剂(TRIZOL, TaKaRa公司,日本)。Anti-miR-21由美国Invitrogen公司合成,control miRNA为阴性对照(negative control, NC)。Lipofectamine 2000(Invitrogen公司,美国)。SYBR Green Real time PCR Master Mix(Roche公司,美国)。鼠抗人Bcl-2、Bax单克隆抗体(Cell Signaling公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

K1细胞在含10%FBS的RPMI-1640培养液,37℃ 5%CO₂及饱和湿度条件下培养。

1.2.2 细胞转染

对数生长期K1细胞于转染前24h接种于6孔板中,培养至细胞达80%融合度时进行细胞转染。按照操作说明将Anti-miR-21、miR-21 mimic转染入K1细胞中,并转染Anti-miR-NC、miR-NC各自作为上述两组细胞的阴性对照。37℃,5%CO₂培养箱中继续培养后进行相关检测。

1.2.3 荧光实时定量PCR

PCR条件为95℃ 30 s,95℃ 5 s,60℃ 34 s,进行40个循环;采用U6作为内参。3次独立样本经过3次独立实验后得到的数据,通过比较C_T值法(2^{-ΔΔC_T})进行相对定量分析。miR-21、U6相应的逆转录引物以及PCR引物见表1。

1.2.4 MTT实验检测细胞增殖

收集上述各实验组细胞制备成单细胞悬液,3000个/孔接种于96孔培养板,每组细胞设5个平行孔。37℃、5%CO₂饱和湿度下培养24~96h,每孔加入5 mg/ml的MTT 20 μl,继续孵育4h,弃孔内培养液,每孔加入150 μl二甲基亚砷(DMSO),振荡10 min,待结晶物充分溶解后,酶标仪检测490 nm处各孔吸光度值。抑制率=(1-实验组吸光度值/对照组吸光度值)×100%。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡

分别收集Anti-miR-21、miR-21 mimic和随机对照序列Anti-miR-NC、miR-NC转染的K1细胞,以PBS重悬细胞。按照试剂盒说明进行操作,流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.6 Western blot检测细胞中相关蛋白的表达

采用Western blot方法,收集待检测细胞,提取总蛋白,10%SDS-PAGE电泳后转膜,将膜放在含5%脱脂奶粉中室温封闭2h,加入用TBST 1:1000稀释的鼠抗人Bcl-2、Bax单克隆抗体4℃过夜孵育。TBST缓冲液洗膜3次,用辣根过氧化物酶标记抗兔IgG抗体,在室温下孵育1h。将膜洗涤后,用ECL加蛋白质印迹检测系统分析(Amersham,美国),以β-actin作为内参。

1.3 统计学方法

所有实验重复3次,运用SPSS18.0统计软件分析。数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用方差分析(两两比较采用SNK法)和t检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RNA质量测定

以相应溶剂为空白对照(Blank),取2 μl RNA溶液于紫外分光光度计检测,观察D(260 nm)/D(280 nm)比值及连续波长吸收峰,并计算RNA溶液浓度,PTC组织和K1细胞系总RNA的D(260 nm)/D(280 nm)介于2.0~2.3,表明RNA提取的质量可以满足后续qRT-PCR所需。

2.2 miR-21在PTC和癌旁正常组织中的表达

qRT-PCR检测显示:miR-21在12例PTC组织

表 1 qRT-PCR 检测 miR-21 的引物序列
Table 1 Primer sequences for miR-21 detection in qRT-PCR

基因	引物	序列(5' → 3')
miR-21	RT 引物	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGACTCAACA
	PCR 引物	上游:TAAACATTAGCAGGGTCCGAGGTAT
		下游:TTACTTCATTCCGTAGCTTATCAGACTG
U6	RT 引物	AACGCTTCACGAATTTGCGT
	PCR 引物	上游:CTCGCTTCGGCAGCAC
		下游:AACGCTTCACGAATTTGCGT

中的表达明显高于正常甲状腺组织,两者差异具有统计学意义($P < 0.05$,图 1)。

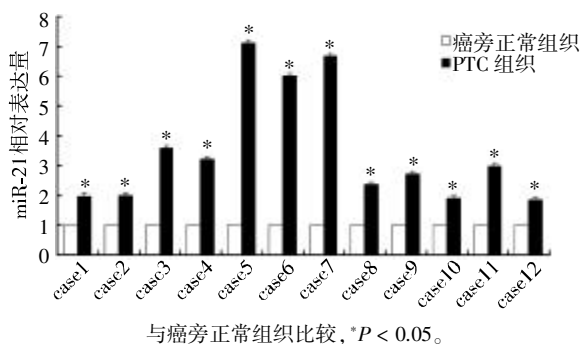


图 1 miR-21 在甲状腺乳头状癌中的表达

Figure 1 The expression of miR-21 in 12 pairs of PTC

2.3 Anti-miR-21、miR-21 mimic 对 K1 细胞 miR-21 表达的影响

转染 Anti-miR-21、miR-21 mimic 入 K1 细胞 24 h 后,用荧光实时定量 PCR 检测 miR-21 的表达情况,结果显示 Anti-miR-21 转染组与 Anti-miR-NC 对照组相比,miR-21 的表达较对照组显著下降($P < 0.01$),miR-21 mimic 转染组与 miR-NC 对照组表达无明显差异(图 2)。

2.4 miR-21 对 K1 细胞增殖能力的影响

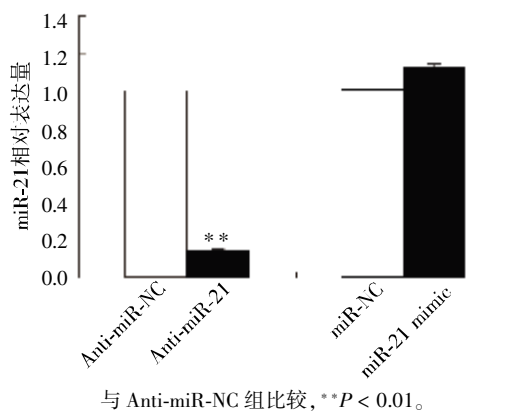
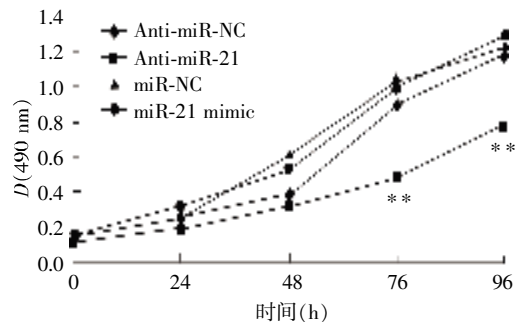


图 2 qRT-PCR 检测瞬时转染后 miR-21 表达结果

Figure 2 Results of miR-21 expression after transient transfection detected by real-time quantitative PCR

MTT 实验结果显示,转染 Anti-miR-21 组与转染 Anti-miR-NC 阴性对照组相比,K1 细胞的增殖能力明显降低,两者差异有统计学意义($P < 0.01$),miR-21 mimic 转染组与 miR-NC 对照组表达无明显差异(图 3)。



与 Anti-miR-NC 组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 3 miR-21 对 K1 细胞增殖能力的影响

Figure 3 The effect of miR-21 on K1 proliferation

2.5 miR-21 对 K1 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测细胞凋亡的结果显示,K1 细胞在转染 Anti-miR-21 后与 Anti-miR-NC 对照组相比凋亡明显增加,miR-21 mimic 转染组与 miR-NC 对照组无明显差异(图 4)。

2.6 miR-21 对蛋白表达水平的影响

Western blot 检测结果显示,转染了 Anti-miR-21 的 K1 细胞中 Bcl-2 蛋白表达水平明显低于对照组,Bax 蛋白表达水平明显高于 Anti-miR-NC 对照组(图 5)。

3 讨论

MicroRNA 简称 miRNA,是近几年来分子生物学和遗传学领域的研究热点。miRNA 在调控 mRNA 代谢和蛋白翻译方面发挥着重要作用,具有调控人类至少 30% 基因的能力^[8]。人类 miRNA 靶点及功能预测显示,miRNA 可能通过参与调控众多肿瘤相关信号通路,从而对肿瘤细胞的分化、增殖、迁移、凋亡起到调节作用^[9]。

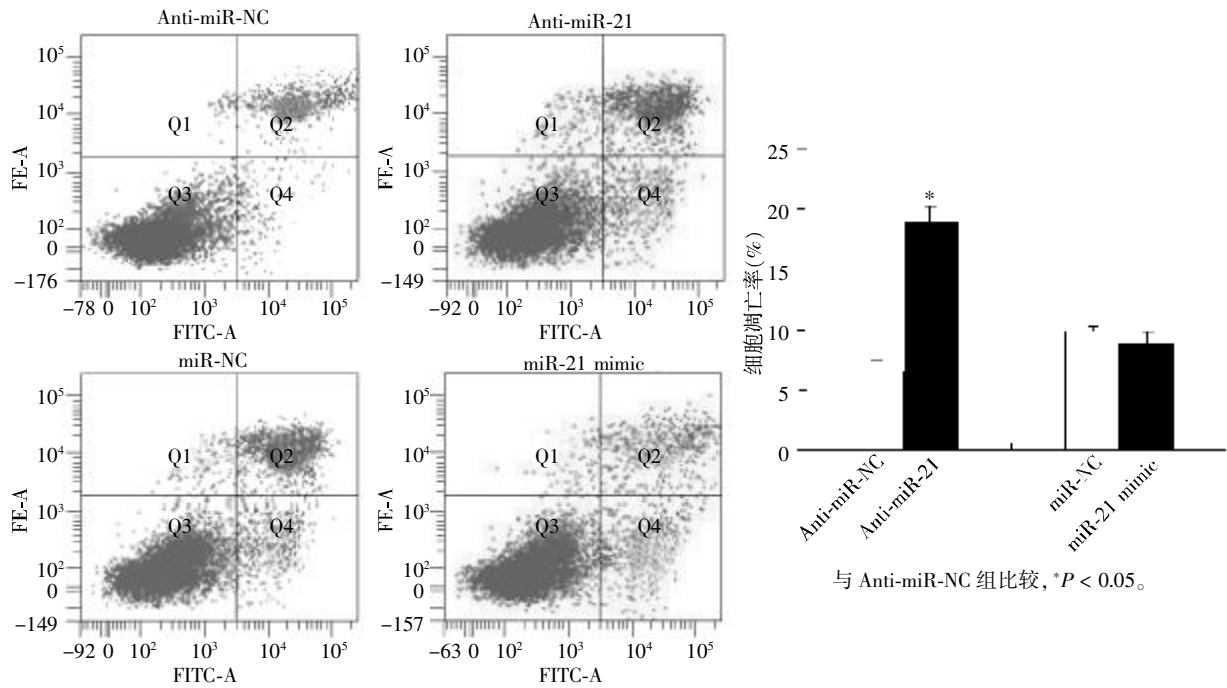
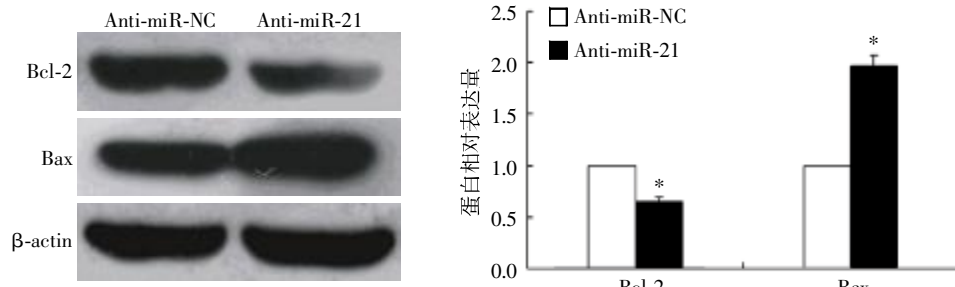


图 4 流式细胞仪检测 Anti-miR-21 转染后 K1 细胞凋亡情况

Figure 4 Apoptosis in K1 cells after transfection of Anti-miR-21 detected by flow cytometry



与 Anti-miR-NC 组比较, *P < 0.05。

图 5 Bcl-2、Bax 蛋白在 K1 细胞中的表达情况

Figure 5 Bcl-2, Bax protein level in K1 cells after transfection of anti-miR-21 detected by Western blot

近年来的研究显示,miR-21 不仅在肺癌、乳腺癌、结肠癌、胰腺癌、前列腺癌等多种肿瘤中都存在显著高表达^[4-7]。在宫颈癌^[10]、霍奇金淋巴瘤^[11]等肿瘤研究中 miR-21 同样存在异常高表达。国外有研究采用 miRNA 微阵列芯片技术筛查 PTC 组织与正常对照组织的 miRNA 差异表达谱,发现 miR-21 在 PTC 组织中的表达明显增加^[12-13]。Tetzlaff,Sheu 等^[14-15]在利用石蜡包埋的甲状腺组织进行的研究中也发现,miR-21 在 PTC 中的表达水平明显高于其在滤泡型腺瘤及结节性甲状腺肿中的表达水平。本实验通过 qRT-PCR 方法检测了 12 例临床上收集的 PTC 组织与癌旁正常甲状腺组织中 miR-21 的表达,结果显示

miR-21 在 PTC 组织中呈明显高表达,两者差异具有统计学意义。国内外的这些研究均表明 miR-21 对 PTC 的发生、发展起到了一定的促进作用。

为了进一步探索 miR-21 对人甲状腺乳头状癌细胞增殖能力的影响,本实验将人工合成的 Anti-miR-21、miR-21 mimic 转染到 K1 细胞中,分别从抑制和过表达两个方面来探讨其功能。通过 qRT-PCR 检测出 Anti-miR-21 组 K1 细胞中 miR-21 的表达明显下调,MTT 实验检测转染 Anti-miR-21 后的 K1 细胞所显示出的增殖能力明显下降,流式细胞术检测转染 Anti-miR-21 后 K1 细胞的凋亡率明显增加,差异有统计学意义。细胞凋亡抑制基因 Bcl-2 与促调

亡基因 Bax 是目前发现的与凋亡关系密切相关的 2 个基因。Western blot 实验检测 Bcl-2 及 Bax 蛋白的变化,发现转染 Anti-miR-21 的 K1 细胞 Bcl-2 蛋白水平明显降低,Bax 蛋白水平明显增高,由此可以推测,miR-21 影响肿瘤细胞的增殖过程可能是通过调节 Bcl-2、Bax 的表达来影响细胞的凋亡活动,继而调控肿瘤细胞的增殖能力。本实验中转染 miR-21 mimic 的 K1 细胞在 qRT-PCR、MTT、流式细胞术等实验结果中,与对照组相比均未显示出明显差异,分析其原因,可能是因 miR-21 在人甲状腺乳头状癌中本就呈高表达状态,少量外源性 miR-21 mimic 不足以产生明显影响。

综上所述,在 PTC 中,miR-21 与癌细胞的增殖和凋亡能力密切相关,抑制 miR-21 的表达对 PTC 可起到的抑制增殖、促进凋亡的调节作用,本实验研究结果提示 miR-21 可能成为 PTC 基因诊断和治疗的新靶点。

[参考文献]

- [1] Siegel R,Naishadham D,Jemal A. Cancer statistics,2012 [J]. CA Cancer J Clin,2012,62(1):10-29
- [2] Farazi TA,Spitzer JI,Morozov P,et al. miRNAs in human cancer[J]. J Pathol,2011,223(2):102-115
- [3] Lal A,Navarro F,Maher CA,et al. miR-24 Inhibits cell proliferation by targeting E2F2,MYC,and other cell-cycle genes via binding to "seedless" 3'UTR microRNA recognition elements[J]. Mol Cell,2009,35(5):610-625
- [4] Volinia S,Calin GA,Liu CG,et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2006,103(7):2257-2261
- [5] Dong CG,Wu WK,Feng SY,et al. Co-inhibition of microRNA-10b and microRNA-21 exerts synergistic inhibition on the proliferation and invasion of human glioma cells[J]. Int J Oncol,2012,41(3):1005-1012
- [6] Kumar S,Keerthana R,Pazhanimuthu A,et al. Overexpression of circulating miRNA-21 and miRNA-146a in plasma samples of breast cancer patients [J]. Indian J Biochem Biophys,2013,50(3):210-214
- [7] Jiang M,Zhang P,Hu G,et al. Relative expressions of miR-205-5p,miR-205-3p,and miR-21 in tissues and serum of non-small cell lung cancer patients[J]. Mol Cell Biochem,2013,383(1-2):67-75
- [8] Kent OA,Mendell JT. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes [J]. Oncogene,2006,25(46):6188-6196
- [9] Calin GA,Sevignani C,Dumitru CD,et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2004,101(9):2999-3004
- [10] 刘琳,王月玲,王江芬. miR-21,miR-126,miR-143 和 miR-373 在正常宫颈组织、宫颈癌组织及 Hela 细胞中的表达差异[J]. 四川大学学报:医学版,2012,43(4):536-539
- [11] Navarro A,Gaya A,Martinez A,et al. MicroRNA expression profiling in classic Hodgkin lymphoma [J]. Blood,2008,111(5):2825-2832
- [12] Zhang J,Liu Y,Liu Z,et al. Differential expression profiling and functional analysis of microRNAs through stage I-III papillary thyroid carcinoma [J]. Int J Med Sci,2013,10(5):585-592
- [13] Pallante P,Visone R,Ferracin M,et al. MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas[J]. Endocr Relat Cancer,2006,13(2):497-508
- [14] Tetzlaff MT,Liu A,Xu X,et al. Differential expression of miRNAs in papillary thyroid carcinoma compared to multinodular goiter using formalin fixed paraffin embedded tissues[J]. Endocr Pathol,2007,18(3):163-173
- [15] Sheu SY,Grabellus F,Schwertheim S,et al. Differential miRNA expression profiles in variants of papillary thyroid carcinoma and encapsulated follicular thyroid tumours [J]. Br J Cancer,2010,102(2):376-382

[收稿日期] 2013-10-23