

· 基础研究 ·

miR-590-3p对甲状腺乳头状癌的抑制作用研究

童厚超, 斯岩, 张浩, 蔡晶昇, 沈美萍*

南京医科大学第一附属医院普外科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:探究miR-590-3p在甲状腺乳头状癌进展中的作用。方法:利用RT-PCR检测甲状腺乳头状癌患者标本及其细胞系中miR-590-3p的表达。利用CCK-8、EdU、划痕、Transwell实验以及细胞流式技术检测miR-590-3p对细胞相关功能的影响。Western blot检测上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)途径相关蛋白表达量的变化。结果:在甲状腺乳头状癌组织及细胞系中miR-590-3p的表达量明显低于癌旁组织和正常甲状腺滤泡上皮细胞。与对照组相比,干扰miR-590-3p明显提升TPC-1细胞的增殖活性($P < 0.01$),过表达miR-590-3p则降低K-1细胞的增殖活性($P < 0.01$)。干扰miR-590-3p可增加TPC-1细胞的迁移与侵袭能力,抑制细胞凋亡($P < 0.01$),过表达miR-590-3p则降低K-1细胞的迁移与侵袭能力,促进细胞凋亡($P < 0.01$)。同时可以抑制EMT相关蛋白的表达。结论:miR-590-3p在甲状腺乳头状癌的发生发展中发挥抑癌基因的作用,可能为甲状腺乳头状癌的治疗提供帮助。

[关键词] miR-590-3p; EMT; 甲状腺乳头状癌

[中图分类号] R736.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)06-873-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20190616

miR-590-3p functions as a tumor suppressor by regulating EMT in papillary thyroid cancer

Tong Houchao, Si Yan, Zhang Hao, Cai Jingsheng, Shen Meiping*

Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to explore the function of miR-590-3p in papillary thyroid cancer (PTC). **Methods:** We examined the miR-590-3p expression in human PTC tissues and cell lines by RT-PCR. CCK-8, EdU, wound healing, Transwell, flow cytometry were performed to analyze PTC cell function. Changes of epithelial-mesenchymal transition (EMT) signaling proteins were detected by Western blot. **Results:** The expression of miR-590-3p was decreased in PTC tissues and cell lines. Compared with the normal control, knockdown of miR-590-3p promoted cell proliferation, migration, invasion and inhibited cell apoptosis in PTC cells ($P < 0.01$). However, overexpression of miR-590-3p inhibited cell proliferation, migration, invasion and promoted cell apoptosis in PTC cells ($P < 0.01$). And miR-590-3p significantly inhibited EMT process. **Conclusion:** MiR-590-3p acts as a tumor suppressor in PTC carcinogenesis and metastasis, and may be a therapeutic target for PTC.

[Key words] miR-590-3p; EMT; papillary thyroid cancer

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(06): 873-879]

甲状腺癌是最常见的内分泌系统肿瘤,近年甲状腺癌发病率在全球范围内都显著上升^[1]。其根据病理类型可分为乳头状癌、滤泡癌、髓样癌和未分化癌4种类型^[2]。甲状腺乳头状癌(papillary thyroid

carcinoma, PTC)是最常见的甲状腺恶性肿瘤,超过80%的甲状腺癌为PTC^[3]。通常情况下,早期PTC患者经过手术治疗有着非常好的预后,5年生存率达到97%,但是10%~15%的患者由于远处转移及复发,存在不良预后^[4]。近年来,随着分子生物学的不断发展,越来越多的肿瘤学难题被攻克。因此,进一步探讨PTC发生发展与分子机制的关系显得尤为重要。

微小RNA(microRNA, miRNA)是总长度不超

[基金项目] 江苏省卫生厅科研基金面上项目(H201203);南京医科大学第一附属医院科技招标项目(20180513)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: shenmeiping@jsph.org.cn

过200个核苷酸的小RNA,具有高度保守的序列,主要是通过与其靶基因的3'-UTR区域结合,减少靶基因的翻译,实现对转录后水平的调控^[5]。越来越多的研究表明,miRNA在肿瘤的发生发展中起到了至关重要的作用^[6]。不同种类的miRNA已被证明参与肿瘤细胞增殖、分化、细胞周期、凋亡等的调控^[7]。根据最新研究,miR-590-3p在乳腺癌、骨肉瘤、肝癌等肿瘤中异常表达,并影响肿瘤的进展^[8-10]。但是,目前miR-590-3p在PTC中表达水平以及对PTC细胞的影响仍未有明确报道。本研究采用PCR技术明确miRNA-590-3p在PTC组织及其细胞中的表达量,同时利用多种细胞功能实验验证其对PTC细胞生物行为的影响,探讨miR-590-3p在PTC发生发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

50例癌组织及对应癌旁组织来源于2017年1月—2018年1月在南京医科大学第一附属医院行手术治疗的PTC患者,包括其病理类型都被常规病理所确认。所有患者术前均未接受过任何放化疗。甲状腺腺叶在离体后的30 min内被取材置于液氮罐中,长期存放于-80℃冰箱保存备用。本研究经南京医科大学第一附属医院伦理委员会批准通过,所有患者均签署知情同意书。

人PTC细胞系IHH-4、TPC-1来源于南京医科大学第一附属医院内分泌科,人PTC细胞系K-1、B-CPAP和人正常甲状腺滤泡上皮细胞Nthy-ori 3-1由中国医科大学第一附属医院甲状腺外科张浩教授赠予。所有的细胞均用DMEM培养基+10%胎牛血清+1%双抗(青霉素、链霉素)混合溶液在37℃含5% CO₂的培养箱中培养。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染

首先取处于对数生长期的PTC细胞种植于6孔板培养24 h,利用Lipofectamine 3000(Invitrogen公司,美国)将miR-590-3p过表达序列(miR-590-3p mimics)、miR-590-3p敲减序列(miR-590-3p inhibitor)(上海吉玛公司)以及其对应的阴性对照组转染入细胞系中,具体的实验流程参照试剂盒说明书。转染48 h后,行转染效率检测并进行细胞功能实验。

1.2.2 RNA提取和定量实时PCR

根据TRIzol试剂盒(TaKaRa公司,日本)的说明书提取组织及细胞中总的RNA。Nanodrop 2000检

测提取的RNA纯度及浓度(Nanodrop公司,美国)。使用逆转录试剂盒(TaKaRa公司,日本)完成cDNA的合成。应用TaqMan Universal PCR Master Mix试剂(ABI公司,美国)及StepOnePlus™ Real-time PCR system(ABI公司,美国)确定miR-590-3p的表达水平。扩增条件为:95℃预变性10 min;95℃变性15 s,60℃延伸1 min,扩增40个循环;U6作为内参确定miR-590-3p的表达水平。总体积为10 μL的反应混合物包括:5 μL反应预混液,miRNA-590-3p或U6 0.5 μL,模板cDNA 1 μL,ddH₂O 3.5 μL。目的基因和内参的引物如下:miRNA-590-3p正义链5'-AAAGATTCCAAGAAGCTAAGGGTG-3',反义链5'-CCTAACTGGTTTCCTGTGCCTA-3',U6正义链5'-CGCTTACAGCAGACATAC-3',反义链5'-TTCACGAATTTGCCGTGCAT-3'。2^{-ΔΔCt}方法计算miR-590-3p的相对表达量。

1.2.3 细胞增殖实验

转染后的细胞被收集清洗,在96孔板中每个孔加入100 μL含2×10³个细胞的培养基。分别在培养箱中培养1、2、3、4 d后,于每个实验组及对照组加入90 μL培养基与10 μL CCK-8试剂(南京Beyotime公司)的混合液,然后置于培养箱中孵育2 h,利用Spectrophotometer(Olympus公司,日本)检测细胞的增殖活性。为进一步验证,使用EdU实验检测细胞增殖活性。在96孔板每孔加入4×10⁴个细胞,根据EdU试剂盒(南京KeyGENBioTECH公司)说明书,培养48 h后每孔加入相应试剂,最后利用荧光显微镜拍照记录具有增殖活性的细胞。

1.2.4 细胞划痕实验

将转染后的细胞均匀铺于6孔板中,每孔约6×10⁵个细胞。待90%的细胞贴壁后,撤去含血清培养基,用200 μL的枪头在6孔板中划痕,用PBS洗涤悬浮细胞,再加入不含血清培养基,在显微镜下观察并记录划痕,于24 h后再次拍照记录。

1.2.5 细胞迁移及侵袭实验

利用Transwell小室以及Matrigel(Corning公司,美国)检测PTC细胞的迁移及侵袭能力。在迁移实验中,Transwell下室中加入500 μL含牛血清的培养基,在Transwell上室中加入含1×10⁵个细胞的200 μL不含牛血清的培养基。在培养箱中孵育24 h后,取出小室,用棉签拭去上室表面的细胞,PBS冲洗干净,甲醛固定,0.1%的结晶紫染色,再用PBS洗涤多余结晶紫,晾干后用显微镜观察拍照计数。对于侵袭实验开始之前在上室中铺Matrigel,将Matrigel加入到

DMEM中稀释(1:6),加入上室中,37℃放置1h,其余具体步骤同前。

1.2.6 细胞凋亡实验

细胞在转染48h后被处理,用冷的PBS溶液洗涤2次和配制1000 mL的缓冲液[10 mmol/L HEPES/NaOH (pH 7.4), 140 mmol/L NaCl 和 2.5 mmol/L CaCl₂],根据凋亡检测试剂盒(南京 Beyotime 公司)说明书的实验流程,取100 μL缓冲液(含1×10⁵个细胞)加到5 mL试剂管中,向试剂管中加入5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI染色细胞,随后在暗室及室温下孵育15 min。孵育结束后,在每管中加入400 μL的缓冲液。使用细胞流式仪观察各个时期细胞凋亡百分比。

1.2.7 Western blot

使用RIPA裂解处理后的PTC细胞,提取总蛋白,BCA法定量蛋白,每个泳道上样40 μg蛋白,经SDS-PAGE分离后电转至PVDF膜;用5%的脱脂奶粉溶液封闭2h;加入一抗4℃摇床孵育过夜,TBST洗膜3次,每次10 min;加入二抗室温孵育1h,TBST洗膜3次;加入发光反应液,凝胶电泳成像系统进行读片分析。GAPDH、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin抗体稀释比例均为1:1000。

1.3 统计学方法

所有的数据分析和制图采用SPSS22.0软件及Graphd prism 7.0软件进行处理。实验数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,CCK-8实验中两组间比较采用双因素方差分析检验(two-way ANOVA),考虑处理条件及时间两个因素的影响,其余两组间的比较采用Student's *t*检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-590-3p在PTC组织及细胞系中低表达

通过荧光定量PCR检测50对癌和癌旁组织,发现miR-590-3p在癌组织中的表达量明显低于癌旁组织($P < 0.01$,图1A),进一步检测显示,miR-590-3p在4种PTC细胞系中的表达量低于其在正常甲状腺滤泡上皮细胞中的表达量($P < 0.01$,图1B)。

2.2 miR-590-3p mimics 或 inhibitor 明显改变 PTC 细胞系中的表达量

为了研究miR-590-3p对PTC细胞的影响,本研究通过miR-590-3p inhibitor和mimics改变其在细胞中的表达量,通过实时荧光PCR证实,在TPC-1和K-1细胞中分别转染miR-590-3p inhibitor、miR-590-3p mimics后,miR-590-3p的表达水平在TPC-1细胞

中明显降低($P < 0.01$,图2A),在K-1细胞中显著升高($P < 0.01$,图2B)。

2.3 miR-590-3p影响PTC细胞的增殖活性

通过CCK-8及EdU实验检测在miR-590-3p干

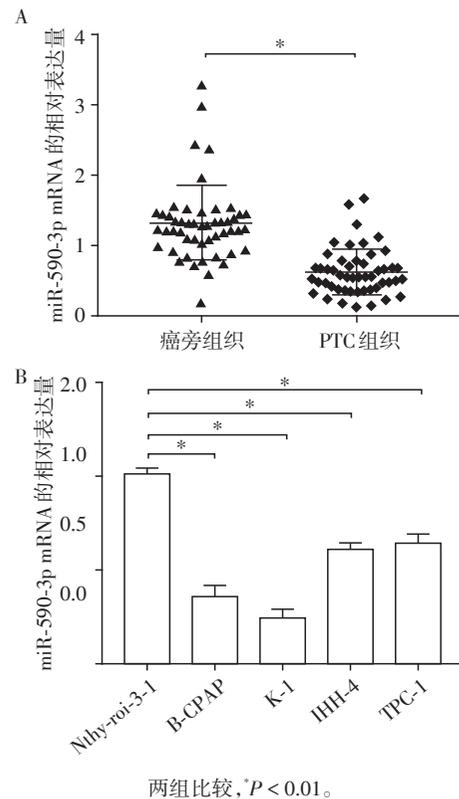
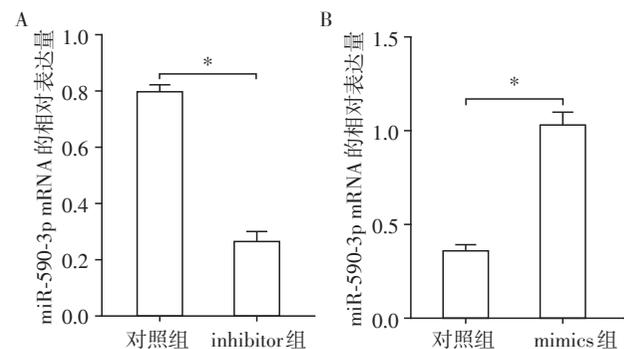


图1 miR-590-3p在PTC组织(A)及不同PTC细胞系(B)中的相对表达量

Figure 1 Relative expression of miR-590-3p in PTC tissues (A) and cell lines (B)



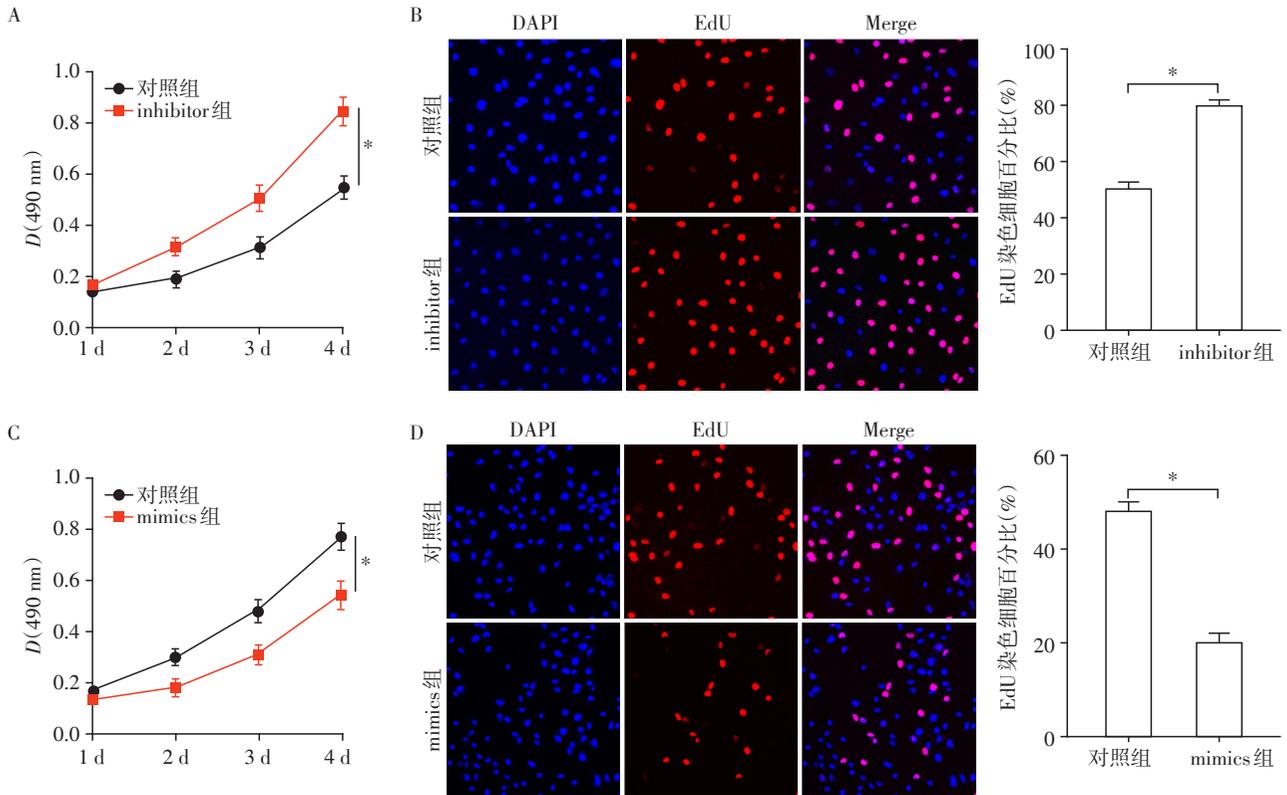
A: TPC-1细胞在转染inhibitor序列后miR-590-3p的表达降低; B: K-1细胞在转染mimics序列后miR-590-3p的表达升高。两组比较, $P < 0.01$ 。

图2 通过转染miR-590-3p inhibitor 或 mimics 改变 PTC 细胞中 miR-590-3p 的表达

Figure 2 Charging expression of miR-590-3p in PTC cell lines by miR-590-3p inhibitor or mimics transfection

扰或过表达的情况下,对PTC细胞增殖活性的影响。结果显示,干扰后TPC-1细胞的增殖活性明显

高于对照组($P < 0.01$,图3A、B),过表达后K-1细胞的增殖活性显著低于对照组($P < 0.01$,图3C、D)。



A、B:TPC-1细胞在转染miR-590-3p inhibitor后增殖活性显著增加;C、D:K-1细胞在转染miR-590-3p mimics后增殖活性显著下降;B、D:荧光显微镜($\times 20$)。两组比较,* $P < 0.01$ 。

图3 miR-590-3p对PTC细胞增殖活性的影响

Figure 3 Effect of miRNA-590-3p on proliferation of PTC cells

2.4 miR-590-3p影响PTC细胞的迁移和侵袭能力

通过划痕实验检测在miR-590-3p干扰或过表达的情况下,对PTC细胞迁移能力的影响。结果显示,干扰后TPC-1细胞的迁移能力高于对照组($P < 0.01$,图4A),过表达后K-1细胞的迁移能力显著低于对照组($P < 0.01$,图4B)。为进一步验证,进行了Transwell实验。结果显示,干扰组的TPC-1细胞迁移和侵袭能力高于对照组($P < 0.01$,图4C),而过表达组的K-1细胞迁移和侵袭能力明显低于对照组($P < 0.01$,图4D)。

2.5 miR-590-3p影响PTC细胞的凋亡

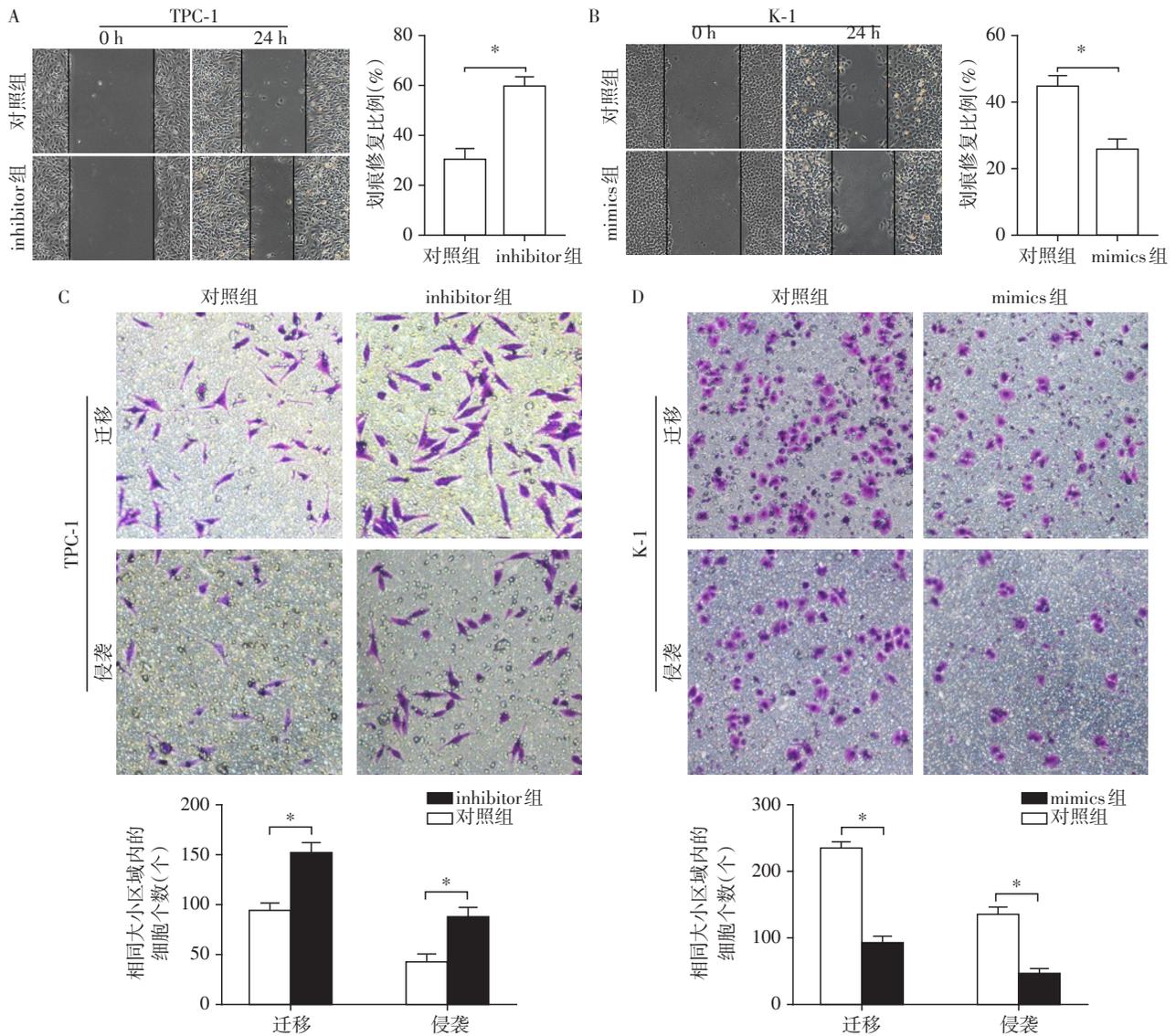
通过凋亡实验检测在miR-590-3p干扰或过表达的情况下,对PTC细胞凋亡的影响。结果显示,干扰组的TPC-1细胞凋亡数明显低于对照组($P < 0.01$,图5A),而过表达后的K-1细胞凋亡数显著高于对照组($P < 0.01$,图5B)。

2.6 miR-590-3p调节上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)

为了进一步研究miR-590-3p抑制PTC细胞迁移和侵袭的分子机制,通过Western blot检测了EMT相关蛋白在miR-590-3p表达量改变后的变化。结果显示,TPC-1细胞组E-cadherin蛋白的表达量下调,N-cadherin蛋白和Vimentin蛋白的表达量上调($P < 0.01$,图6A),而在K-1细胞组E-cadherin蛋白的表达量上调,N-cadherin蛋白和Vimentin蛋白表达量下调($P < 0.01$,图6B)。

3 讨论

目前甲状腺癌的发病率逐年上升,而其中主要的类型为PTC,已经引起了社会各界的广泛重视。虽然通过手术治疗以及术后的药物治疗,大部分患者都能取得较好预后,但是少部分患者也出现了不



A: TPC-1细胞在转染miR-590-3p inhibitor后迁移能力增强; B: K-1细胞在转染miR-590-3p mimics后迁移能力减弱; C: TPC-1细胞在转染miR-590-3p inhibitor后迁移和侵袭能力增强; D: K-1细胞在转染miR-590-3p mimics后迁移和侵袭能力减弱; A、B: 划痕实验($\times 100$); C、D: Transwell实验($\times 100$)。两组比较, $*P < 0.01$ 。

图4 miR-590-3p对PTC细胞迁移和侵袭能力影响

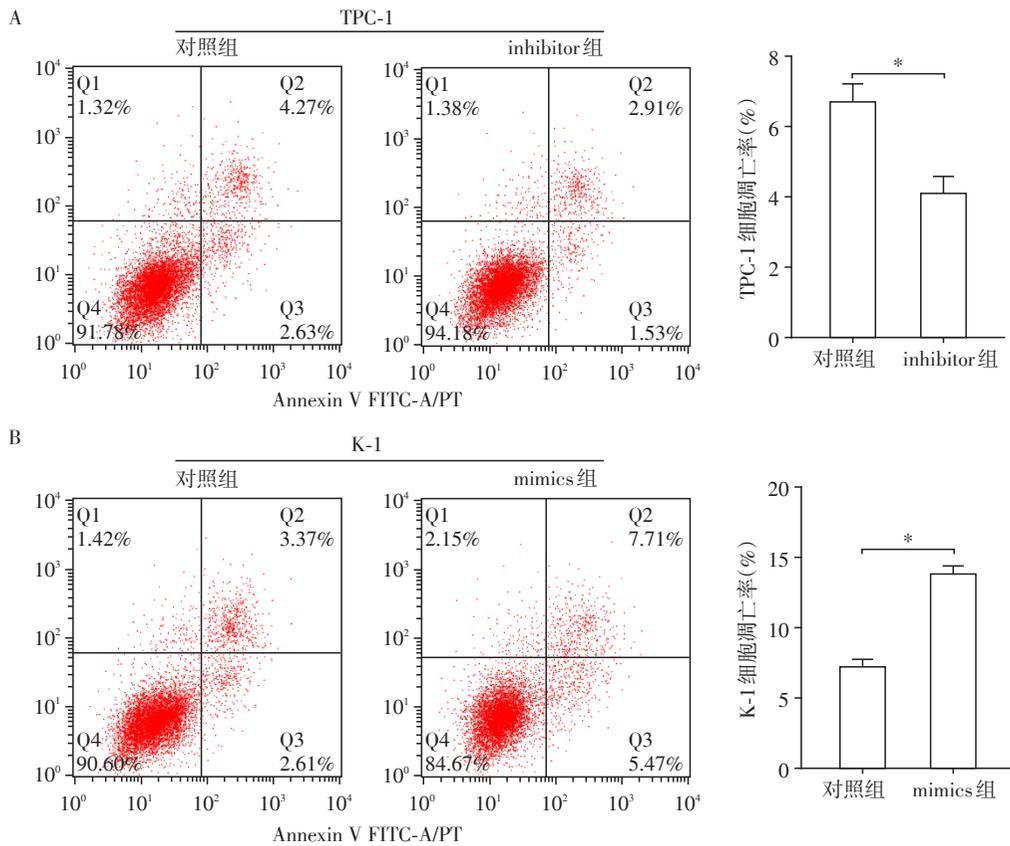
Figure 4 Effect of miRNA-590-3p on migration and invasion of PTC cells

良预后,对生活质量产生了影响。因此对PTC的研究十分必要。

已经有大量报道证实,miRNA参与了多种肿瘤发生发展的调控,主要是通过一系列的分子机制最终对肿瘤起到抑制或促进作用。比如在非小细胞肺癌中,miR-939表达量明显升高,与淋巴结转移及TNM分期密切相关,且影响细胞的侵袭能力^[11]。在鼻咽癌中,miR-639的过表达会抑制肿瘤细胞的迁移和增殖能力^[12]。在肝癌组织及其细胞系中miR-873高表达,并通过激活JAK2/STAT3信号通路促进肝癌细胞的侵袭和转移^[13]。肝癌组织中miR-522高

表达,并与肿瘤TNM分期和分级相关,且miR-522的表达与患者的总生存率显著相关^[14]。在上皮性卵巢癌中miRNA-145低表达,在肿瘤的发生发展中起到抑制作用,可能成为协助诊断及评价预后的生物学标志物^[15]。在PTC中miRNA也有相关报道,如miR-214在PTC组织中低表达,通过下调靶基因PSMD10的表达水平抑制肿瘤细胞的迁移和增殖能力^[16];miRNA-431在PTC组织中低表达,与PTC患者淋巴结转移关系密切,同时过表达的miRNA-431抑制PTC细胞的迁移和侵袭能力^[17]。

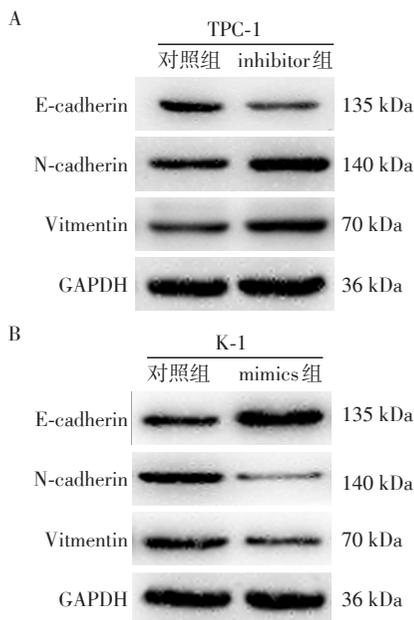
miR-590-3p在多种肿瘤中被研究,但在PTC中



A: TPC-1 细胞在转染 miR-590-3p inhibitor 后细胞凋亡率减少; B: K-1 细胞在转染 miR-590-3p mimics 后细胞凋亡率上升。两组比较, * $P < 0.01$ 。

图5 miR-590-3p 对 PTC 细胞凋亡的影响

Figure 5 Effect of miR-590-3p on apoptosis of PTC cells



A: TPC-1 细胞在转染 miR-590-3p inhibitor 后 EMT 相关蛋白表达的改变; B: K-1 细胞在转染 miR-590-3p mimics 后 EMT 相关蛋白表达的改变。

图6 miR-590-3p 调节 EMT 进程

Figure 6 miR-590-3p regulates EMT process

的作用还未知。为了研究 miR-590-3p 在 PTC 中的作用,本研究通过 PCR 技术检测了其在癌组织及细胞系中的表达量,发现 PTC 组织中 miR-590-3p 的表达量明显低于癌旁组织,且在 PTC 细胞系的表达也低于正常甲状腺滤泡上皮细胞,表明 miR-590-3p 可能在 PTC 中起到抑制作用。为了进一步研究 miR-590-3p 的功能,本研究构建了 miR-590-3p 过表达和干扰的细胞系。通过 CCK-8 及 EdU 实验检测 miR-590-3p 表达水平变化是否影响 PTC 细胞的增殖活性。实验结果表明,在 miR-590-3p 过表达的 K-1 细胞中,其增殖活性明显降低,而在 miR-590-3p 抑制的 TPC-1 细胞中,其增殖活性明显升高。通过划痕和 Transwell 实验检测 miR-590-3p 对 PTC 细胞迁移和侵袭能力的影响,结果显示,在 miR-590-3p 过表达的 K-1 细胞中,其迁移和侵袭能力显著下降,而在 miR-590-3p 抑制的 TPC-1 细胞中,其迁移和侵袭能力明显升高。

EMT 是指上皮细胞通过特定程序转化为具有间质表型细胞的生物学过程,通过 EMT 上皮细胞可获得较高的迁移与侵袭、抗凋亡等能力^[18]。例如在

乳腺癌中,miR-27a可通过EMT途径促进癌细胞的迁移^[19];miR-590-3p可结合下游靶基因ZEB1和ZEB2调控EMT相关蛋白的表达,抑制脑胶质瘤细胞的迁移和侵袭能力^[20]。上述实验结果已经表明,miR-590-3p表达的改变可以影响PTC细胞的迁移和侵袭能力,但其机制不明,因此本研究进一步检测miR-590-3p是否对EMT途径具有调控作用。结果表明过表达miR-590-3p后E-cadherin蛋白的表达量下调,N-cadherin蛋白和Vimentin蛋白表达量上调,而干扰miR-590-3后相关蛋白的表达呈相反趋势。

综上所述,miR-590-3p在PTC中的表达量明显下降,在PTC的增殖、迁移和侵袭过程中发挥重要作用,其迁徙和侵袭的机制可能与miR-590-3p调控EMT途径有关。

[参考文献]

[1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(1):5-29

[2] Gimm O. Thyroid cancer [J]. *Cancer Lett*, 2001, 163(2):143-156

[3] Balentine RW, Levenson CJ, Havlena GE, et al. Trends in the presentation, treatment, and survival of patients with medullary thyroid cancer over the past 30 years [J]. *Surgery*, 2017, 161(1):137-146

[4] Grant CS. Recurrence of papillary thyroid cancer after optimized surgery [J]. *Gland Surg*, 2015, 4(1):52-62

[5] Hammond SM. An overview of microRNAs [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 87(1):3-14

[6] Di LG, Garofalo M, Croce CM. MicroRNAs in cancer [J]. *Annu Rev Pathol*, 2014, 9:287-314

[7] Wang C, Ren M, Zhao X, et al. Emerging roles of circular RNAs in osteosarcoma [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24:7043-7050

[8] Gu L, Lu LS, Zhou DL, et al. UCA1 promotes cell proliferation and invasion of gastric cancer by targeting CREB1 sponging to miR-590-3p [J]. *Cancer Med*, 2018, 7(4):1253-1263

[9] Wang WT, Qi Q, Zhao P, et al. miR-590-3p is a novel microRNA which suppresses osteosarcoma progression by targeting SOX9 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 107:

1763-1769

[10] 杨红飞,郑文宏,赵文涛,等. miR-590-5p和miR-590-3p参与肝细胞肝癌发展的机制[J]. *南方医科大学学报*, 2013, 33(6):804-811

[11] 陈爱东,魏 磊,刘胜平,等. miR-939对非小细胞肺癌侵袭能力及上皮细胞-间充质转化过程的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(8):1054-1058

[12] Wang YH, Yin YW, Zhou H, et al. miR-639 is associated with advanced cancer stages and promotes proliferation and migration of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(6):6903-6909

[13] 韩国勇,张 龙,陈志强,等. miRNA-873促进肝癌细胞的迁移与侵袭[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(9):1076-1080

[14] 苗志龙,施育华,刘小兵,等. miR-522在肝细胞肝癌中的表达及临床意义[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(12):1735-1737

[15] 刘 萍,邹 晨. MicroRNA-145在上皮性卵巢癌及细胞株中表达及其临床意义[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(11):1528-1532

[16] Liu F, Lou K, Zhao X, et al. miR-214 regulates papillary thyroid carcinoma cell proliferation and metastasis by targeting PSMD10 [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(6):3027-3036

[17] Liu Y, Li L, Liu Z, et al. Downregulation of miR-431 expression associated with lymph node metastasis and promotes cell invasion in papillary thyroid carcinoma [J]. *Cancer Biomark*, 2018, 22(4):727-732

[18] Yao D, Dai C, Peng S. Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation [J]. *Mol Cancer Res*, 2011, 9(12):1608-1620

[19] Jiang G, Shi W, Fang H, et al. miR27a promotes human breast cancer cell migration by inducing EMT in a FBXW7 dependent manner [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(6):5417-5426

[20] Pang H, Zheng Y, Zhao Y, et al. miR-590-3p suppresses cancer cell migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma multiforme by targeting ZEB1 and ZEB2 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 468(4):739-745

[收稿日期] 2019-01-13