

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.07.006

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.07.006

MiR-103a-3p 靶向 FLOT2 调控甲状腺癌细胞增殖、 凋亡的分子机制

刘兵雄, 李学刚

(汉川市人民医院普外三科, 湖北 汉川 431600)

[摘要] 目的: 研究miR-103a-3p对甲状腺癌细胞增殖、凋亡的影响及其机制。方法: 运用RT-qPCR法检测甲状腺癌细胞SW579, FTC-133及人甲状腺上皮细胞TEC中miR-103a-3p、脂筏结构蛋白2(FLOT2)的表达。将miR-NC(miR-NC组)、miR-103a-3p mimics(miR-103a-3p组)、anti-miR-NC(anti-miR-NC组)、anti-miR-103a-3p(anti-miR-103a-3p组)、si-NC(si-NC组)、si-FLOT2(si-FLOT2组)、miR-103a-3p+pcDNA mimics(miR-103a-3p+pcDNA组)、miR-103a-3p mimics+pcDNA-FLOT2(miR-103a-3p+pcDNA-FLOT2组)用脂质体法转染至SW579细胞。蛋白质印迹法检测细胞中FLOT2、多肿瘤抑制基因(P16)、细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子1A(P21)、聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶[poly-(ADP-ribose)polymerase, PARP]、裂解的PARP(cleaved-PARP)、半胱天冬酶-3的前体(pro-caspase-3)、裂解的半胱天冬酶3(cleaved-caspase-3)的蛋白表达; 细胞计数试剂盒(CCK-8)法检测细胞增殖; 流式细胞术检测细胞凋亡; 双荧光素酶报告基因检测实验检测细胞的荧光活性。结果: 与人甲状腺上皮细胞TEC相比, 甲状腺癌细胞中miR-103a-3p的表达明显下调, FLOT2的表达明显上调($P<0.05$); 过表达miR-103a-3p、敲减FLOT2均可抑制甲状腺癌细胞的增殖, 促进凋亡; miR-103a-3p明显抑制野生型FLOT2细胞的荧光活性, 且负向调控FLOT2的表达; 过表达FLOT2逆转miR-103a-3p对甲状腺癌细胞的增殖抑制和凋亡促进作用。结论: miR-103a-3p可抑制甲状腺癌细胞的增殖, 促进凋亡, 其机制可能与靶向FLOT2相关, 可为甲状腺癌的治疗提供参考。

[关键词] miR-103a-3p; 脂筏结构蛋白2; 甲状腺癌

Molecular mechanism of miR-103a-3p targeting FLOT2 to regulate proliferation and apoptosis of thyroid cancer cells

LIU Bingxiong, LI Xuegang

(Department of General and Foreign Studies, Hanchuan People's Hospital, Hanchuan Hubei 431600, China)

Abstract **Objective:** To study the effect of miR-103a-3p on proliferation and apoptosis of thyroid cancer cells and its mechanism. **Methods:** RT-qPCR was used to detect the expression of miR-103a-3p and FLOT2 in thyroid cancer cells SW579, FTC-133 and human thyroid epithelial cells. MiR-NC group (transfected miR-NC), miR-103a-3p group (transfected miR-103a-3p mimics), anti-miR-NC (anti-miR-NC group), anti-miR-103a-3p (anti-miR-103a-

收稿日期 (Date of reception): 2019-08-11

通信作者 (Corresponding author): 李学刚, Email: 355113715@qq.com

3p group), si-NC (si-NC group), si-FLOT2 (si-FLOT2 group), miR-103a-3p mimics+pcDNA (miR-103a-3p + pcDNA group), miR-103a-3p mimics + pcDNA-FLOT2 (miR-103a-3p + pcDNA-FLOT2 group) were transfected with liposome method to SW579 cells, respectively. Western blot was used to detect the expression of FLOT2, P16, P21, cleaved-PARP and cleaved-caspase-3 in cells; CCK-8 method was used to detect cell proliferation; flow cytometry was used to detect apoptosis; dual luciferase reporter gene detection assay was used to detect the fluorescence activity of cells. **Results:** Compared with human thyroid epithelial TEC, the expression of miR-103a-3p was down-regulated and the expression of FLOT2 was up-regulated ($P<0.05$). Overexpression miR-103a-3p or knockdown FLOT2 inhibited proliferation and promoted apoptosis of thyroid cancer cells; miR-103a-3p significantly inhibits the fluorescence activity of wild-type FLOT2 cells and negatively regulates the expression of FLOT2; overexpression of FLOT2 reverses the proliferation inhibition of thyroid cancer cells by miR-103a-3p Apoptosis promoting effect. **Conclusion:** MiR-103a-3p can inhibit the proliferation and promote apoptosis of thyroid cancer cells. The mechanism may be related to the targeting of FLOT2, which will provide a reference for the treatment of thyroid cancer.

Keywords miR-103a-3p; FLOT2; thyroid cancer

甲状腺癌的发病率快速升高, 现已成为最常见的肿瘤之一。常规的甲状腺癌治疗标准(手术+放射性碘消融)在临床上具有较好的预后, 其中部分患者在治疗后出现持续或复发、转移, 而这种患者在临床上对放化疗的抗性较强, 治疗效果较差^[1]。因此, 提供甲状腺癌患者的治疗效率具有十分重要的临床意义。微RNA(microRNA, miRNA)是一种18~25 nt的内源性非编码稳定的微RNA分子, 其通过抑制靶基因的转录或蛋白翻译, 调控癌症的进展过程^[2]。MiR-103a-3p在甲状腺癌中的功能尚未十分清楚。脂质筏参与生物学过程中分子信号通路的传递和转化, 其在癌症的进展中发挥重要作用, 其中脂筏结构蛋白2(flotillin-2, FLOT2)在细胞的黏附、信号转导、跨膜转运中发挥重要作用, 且可诱导癌症的恶性行为^[3]。但是miR-103a-3p, FLOT2在甲状腺癌细胞中的功能和作用关系尚未清楚。本研究拟以甲状腺癌细胞为研究对象, 检测其中miR-103a-3p, FLOT2的表达, 观察过表达miR-103a-3p、敲减FLOT2对甲状腺癌细胞增殖、凋亡的影响, 揭示其机制, 以期作为甲状腺癌的治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人甲状腺上皮细胞TEC、人甲状腺癌细胞SW579, FTC-133均购自美国菌种保藏中心(ATCC); 杜氏培养基(dulbecco's modified eagle

medium, DMEM)培养基购自上海慧颖生物科技有限公司; 细胞计数试剂盒(cell counting kit, CCK-8)试剂购自杭州联科生物技术股份有限公司; 膜联蛋白-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(annexin V-FITC/PI)凋亡检测试剂盒购自上海BestBio贝博生物公司; 双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自上海美轩生物科技有限公司; Lipofectamine™ 3000购自上海太阳生物技术有限公司; 二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒、反转录试剂盒、兔抗cleaved-caspase-3(货号: AC033)购自上海碧云天生物技术有限公司。兔抗人FLOT2多克隆抗体(货号: PAB28427)购自美国Abnova公司; 鼠抗人P21单克隆抗体[货号: 554262(T)]购自上海雷浩信息科技有限公司; 鼠抗人P16单克隆抗体(货号: OB190)购自广州欧边生物制品有限公司; 兔抗人多克隆cleaved-PARP, PARP抗体(货号: ABP50072)购自美国BioVision公司; 鼠抗人pro-caspase-3单克隆抗体(货号: GTX13586)购自美国Santa公司; 辣根过氧化物酶HRP标记的山羊抗兔IgG抗体、HRP标记的山羊抗鼠IgG抗体(货号: 4050-05)购自美国Santa Cruz公司; 磷酸甘油醛脱氢酶(reduced glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(货号: A01025)购自美国Cell Signaling Technology公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

用10%胎牛血清的DMEM培养基进行人甲状腺

上皮细胞TEC、人甲状腺癌细胞SW579、FTC-133的培养。培养条件为,用37℃,5% CO₂的细胞培养箱进行常规培养、传代。

1.2.2 细胞转染与分组

取培养至对数增殖期的细胞,调整细胞密度至 5×10^6 个/mL,接种至24孔板。用脂质体lipofectamine™ 3000试剂,按照说明书要求将miR-NC, miR-103a-3p mimics, anti-miR-NC, anti-miR-103a-3p, si-NC, si-FLOT2, miR-103a-3p+pc DNA, miR-103a-3p + pc DNA-FLOT2转染至SW579细胞,转染48 h,用RT-qPCR法检测转染效率,转染成功后分别标记为miR-NC组、miR-103a-3p组、anti-miR-NC组、anti-miR-103a-3p组、si-NC组、si-FLOT2组、miR-103a-3p+pc DNA组、miR-103a-3p+pc DNA-FLOT2组,用于后续的RT-qPCR实验、蛋白质印迹法、CCK-8实验和流式细胞术。

1.2.3 RT-qPCR检测细胞中miR-103a-3p, FLOT2 mRNA表达

TRIzol法提取细胞样本总RNA,并用Nano-Drop 2000微量分光光度计进行RNA定量。反转录反应采用反转录试剂盒,操作按照试剂盒说明书进行,合成模板链cDNA。按照反应体系进行,每个样品做3个平行,实验重复3次,取平均值,反应结束后通过比较Ct值,以GAPDH和U6作为内参,计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值,测定miR-103a-3p, FLOT2的相对表达水平。引物序列:miR-103正向5'-GAGCAGCATTGTACAG-3',反向5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'; U6正向5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3',反向5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'; FLOT2正向5'-CCCCAGATTGCTGCCAAA-3',反向5'-TCCACTGAGGACCACAATCTCA-3'; GAPDH正向5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3',反向5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。

1.2.4 蛋白质印迹法检测细胞中FLOT2, P16, P21, PARP, cleaved-PARP, pro-caspase-3, cleaved-caspase-3的蛋白表达

收集对数生长期的细胞,加入细胞裂解液置于冰上裂解反应约30 min,在冷冻离心机上,12 000 r/min,离心15 min。将上清转移至新的EP管中,在沸水中行蛋白变性,约10 min,12 000 r/min,20 min,取上清,定量后,用上样缓冲液进行5倍稀释,准备进行蛋白电泳。先调整电压至80 V进行稳流,再进行120 V的稳压电泳,结束后,进行转膜、封闭。最后用稀释好的一抗

孵育过夜,次日,用稀释好的二抗进行室温孵育2 h,清洗后,将膜置于暗室中进行显影曝光。Image J分析目的条带的灰度值,以目的条带灰度值与GAPDH灰度值的比值表示目的蛋白的表达。

1.2.5 CCK-8法检测细胞增殖

取对数增殖期细胞,调整密度至 10^5 个/mL,以100 μL/孔接种96孔板,37℃,5% CO₂培养24 h。每组设3个平行,实验重复3次,分别转染48, 72, 96 h加入CCK-8溶液20 μL,在酶标仪上检测490 nm波长下的吸光度(OD₄₉₀值)。细胞的增殖能力与细胞的吸光值成正比。

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡

收集细胞并按照Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒的说明书依次加入Annexin V-FITC和PI,整个过程避光进行,结束后,快速上流式细胞仪进行检测分析。细胞的凋亡率=早期凋亡率+晚期凋亡率。

1.2.7 双荧光素酶报告基因检测实验检测细胞的荧光活性

通过在线靶基因预测库Target Scan(<http://www.targetscan.org/>)预测miR-103a-3p与FLOT2是否存在结合的可能性,结果显示二者存在互补的靶向结合位点,再在体外构建野生型FLOT2荧光素酶报告质粒(含BDNF 3'-UTR片段)和突变型FLOT2荧光素酶报告质粒(含BDNF 3'-UTR突变体片段)。将这两个载体质粒分别与miR-103a-3p, miR-NC共转染,转染后培养24 h,按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒要求检测细胞的荧光活性。记录萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的荧光活性,以两者的比值评价miR-103a-3p与FLOT2的结合能力。

1.3 统计学处理

采用SPSS 21.0软件进行数据分析。计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组比较采用t检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-103a-3p, FLOT2在甲状腺癌细胞中的表达

与TEC组相比,SW579, FTC-133组细胞中miR-103a-3p mRNA表达显著降低, FLOT2 mRNA和蛋白表达均显著升高($P < 0.05$; 表1, 图1)。

表1 MiR-103a-3p, FLOT2在甲状腺癌细胞中的表达($n=9, \bar{x} \pm s$)Table 1 Expressions of miR-103a-3p and FLOT2 in thyroid cancer cells ($n=9, \bar{x} \pm s$)

组别	MiR-103a-3p mRNA	FLOT2 mRNA	FLOT2蛋白
TEC	1.01 ± 0.06	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.07
SW579	0.31 ± 0.02*	2.54 ± 0.21*	1.85 ± 0.10*
FTC-133	0.44 ± 0.04*	1.98 ± 0.13*	1.57 ± 0.14*
F	668.411	253.951	146.844
P	<0.001	<0.001	<0.001

与TEC组比较, * $P<0.05$ 。

Compared with the TEC group, * $P<0.05$.

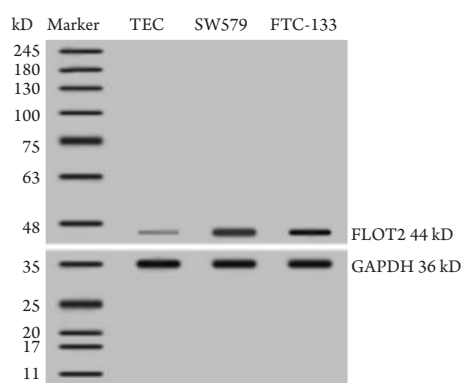


图1 FLOT2在甲状腺癌细胞中的蛋白表达

Figure 1 Protein expression of FLOT2 in thyroid cancer cells

2.2 过表达 miR-103a-3p 对甲状腺癌细胞增殖、凋亡的影响

与miR-NC组相比, miR-103a-3p组SW579细胞中miR-103a-3p表达显著升高, 在48, 72 h时, 细胞增殖显著降低, 细胞凋亡率显著升高, P16, P21, cleaved-PARP, cleaved-caspase-3的蛋白表达均显著

升高, 差异具有统计学意义($P<0.05$; 表2, 图2)。

2.3 miR-103a-3p 靶向 FLOT2

运用生物信息学预测得到, miR-103a-3p与FLOT2的3'-UTR端存在6个互补的靶向结合核苷酸序列, 分别为UGCUGC(图3A)。双荧光素酶报告基因检测实验得到, 与miR-NC组相比, miR-103a-3p组WT-FLOT2细胞的荧光活性显著降低(表3); 与anti-miR-NC组相比, anti-miR-103a-3p组细胞中FLOT2 mRNA表达和蛋白表达均显著升高, 与miR-NC组相比, miR-103a-3p组细胞中FLOT2 mRNA表达和蛋白表达均显著降低($P<0.05$; 图3B, 表4)。

2.4 敲减 FLOT2 对甲状腺癌细胞增殖、凋亡的影响

与si-NC组相比, si-FLOT2组细胞中FLOT2表达显著降低, 在48, 72 h时, 细胞增殖显著降低, 细胞凋亡率显著升高, FLOT2, PARP, pro-caspase-3蛋白表达均显著降低, P16, P21, cleaved-PARP, cleaved-caspase-3的蛋白表达均显著升高, 差异有统计学意义($P<0.05$; 图4, 表5)。

表2 过表达miR-103a-3p对甲状腺癌细胞增殖、凋亡的影响($n=9, \bar{x} \pm s$)Table 2 Effects of overexpression of miR-103a-3p on proliferation and apoptosis of thyroid cancer cells ($n=9, \bar{x} \pm s$)

组别	miR-103a-3p	OD ₄₉₀ 值			凋亡率 /%
		24 h	48 h	72 h	
miR-NC	1.00 ± 0.06	0.41 ± 0.04	0.91 ± 0.05	1.32 ± 0.12	8.41 ± 0.37
miR-103a-3p	5.31 ± 0.03*	0.43 ± 0.04	0.56 ± 0.05*	0.81 ± 0.07*	24.18 ± 2.11*
t	192.749	1.061	14.849	11.013	22.085
P	<0.001	0.305	<0.001	<0.001	<0.001

与 miR-NC 组比较, * $P<0.05$ 。

Compared with miR-NC group, * $P<0.05$.

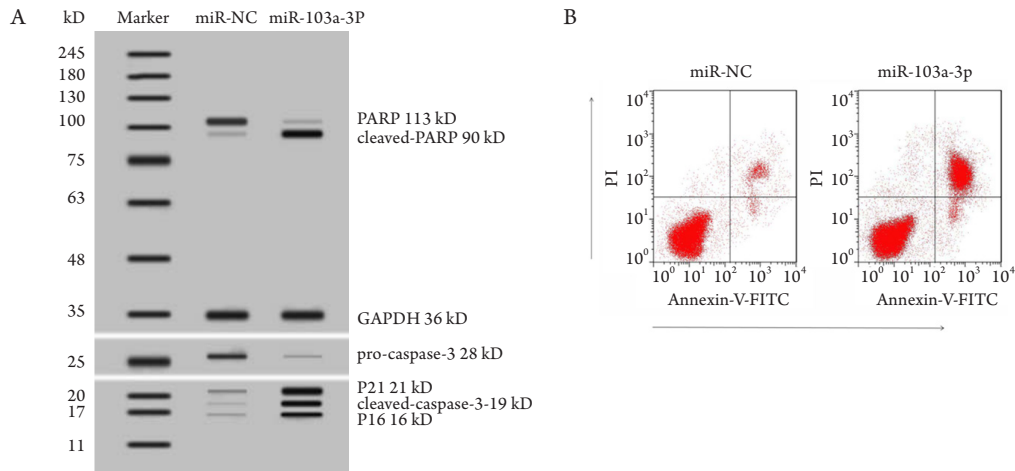


图2 过表达miR-103a-3p对甲状腺癌细胞增殖、凋亡相关蛋白表达及凋亡的影响

Figure 2 Effect of overexpression miR-103a-3p on proliferation, apoptosis-related protein expression and apoptosis of thyroid cancer cells

(A)蛋白表达图; (B)凋亡图。

(A) Protein expression diagram; (B) Apoptosis diagram.

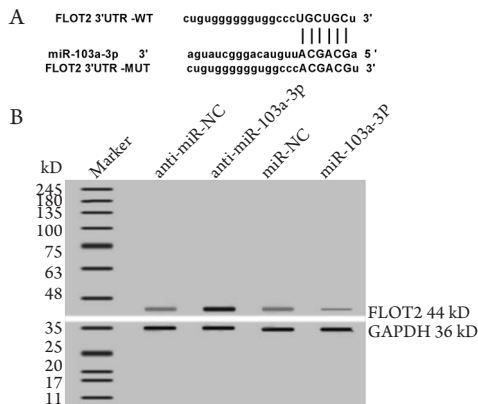


图3 miR-103a-3p靶向FLOT2

Figure 3 MiR-103a-3p targeting FLOT2

(A) MiR-103a-3p与FLOT2之间存在互补的结合位点; (B) MiR-103a-3p调控FLOT2蛋白表达。

(A) There were complementary binding sites between miR-103a-3p and FLOT2; (B) MiR-103a-3p regulates FLOT2 protein expression.

表3双荧光素酶报告基因检测实验结果(n=9, $\bar{x} \pm s$)

Table 3 Results of double luciferase reporter gene assay (n=9, $\bar{x} \pm s$)

组别	WT-FLOT2	MUT-FLOT2
miR-NC	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.07
miR-103a-3p	0.19 ± 0.02	0.99 ± 0.04
t	67.396	0.372
P	<0.001	0.715

表4 MiR-103a-3p对FLOT2蛋白表达的影响(n=9, $\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effects of miR-103a-3p on FLOT2 protein expression (n=9, $\bar{x} \pm s$)

组别	FLOT2 mRNA	FLOT2蛋白
anti-miR-NC	1.01 ± 0.08	1.00 ± 0.06
anti-miR-103a-3p	2.89 ± 0.26*	2.31 ± 0.19*
miR-NC	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.04
miR-103a-3p	0.48 ± 0.04 [#]	0.21 ± 0.02 [#]
F	510.076	653.986
P	<0.001	<0.001

与anti-miR-NC组比较, *P<0.05; 与miR-NC组比较, [#]P<0.05。

Compared with the anti-miR-NC group, *P<0.05; compared with miR-NC group, [#]P<0.05.

2.5 过表达 FLOT2 逆转 miR-103a-3p 对甲状腺癌细胞的增殖抑制和凋亡促进作用

与miR-103a-3p+pc DNA组相比, miR-103a-3p+pc DNA-FLOT2组细胞中miR-103a-3p表达显著降低, 在48, 72 h时, 细胞增殖显著升高, 细胞凋亡率显著降低, FLOT2, PARP, pro-caspase-3蛋白表达均显著升高, P16, P21, cleaved-PARP, cleaved-caspase-3的蛋白表达均显著降低, 差异具有统计学意义(P<0.05; 图5, 表6)。

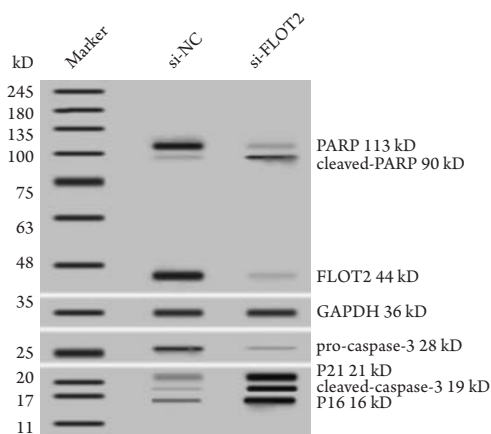


图4 敲减FLOT2对甲状腺癌细胞增殖、凋亡相关蛋白表达的影响

Figure 4 Effects of FLOT2 knockdown on the expression of thyroid cancer cell proliferation and apoptosis-related proteins

表5 敲减FLOT2对甲状腺癌细胞增殖、凋亡的调控($n=9, \bar{x} \pm s$)

Table 5 Regulation of FLOT2 knockdown on proliferation and apoptosis of thyroid cancer cells ($n=9, \bar{x} \pm s$)

组别	FLOT2	OD ₄₉₀ 值			凋亡率/%
		24 h	48 h	72 h	
si-NC	1.00 ± 0.06	0.38 ± 0.04	0.86 ± 0.07	1.15 ± 0.11	9.01 ± 0.71
si-FLOT2	0.31 ± 0.03*	0.39 ± 0.04	0.51 ± 0.05*	0.73 ± 0.07*	23.87 ± 2.15*
<i>t</i>	30.858	0.530	12.206	9.664	19.689
<i>P</i>	<0.001	0.603	<0.001	<0.001	<0.001

与si-NC组比较, * $P < 0.05$ 。

Compared with the si-NC group, * $P < 0.05$.

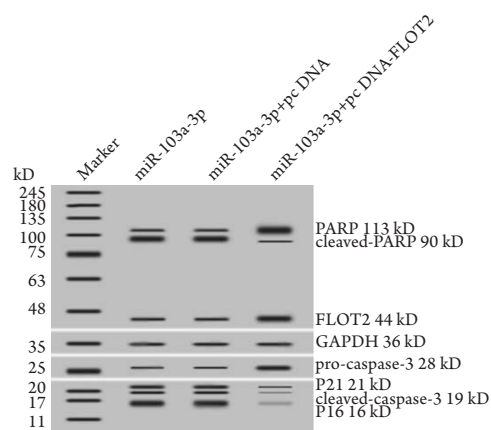


图5 过表达FLOT2逆转了过表达miR-103a-3p对甲状腺癌细胞增殖、凋亡相关蛋白表达的影响

Figure 5 Overexpression of FLOT2 reversed the effect of overexpression of miR-103a-3p on the expression of thyroid cancer cell proliferation and apoptosis-related proteins

表6 过表达FLOT2逆转了过表达miR-103a-3p对甲状腺癌细胞增殖、凋亡的调控($n=9, \bar{x} \pm s$)Table 6 Overexpression of FLOT2 reversed the regulation of overexpression of miR-103a-3p on proliferation and apoptosis of thyroid cancer cells ($n=9, \bar{x} \pm s$)

组别	miR-103a-3p	OD ₄₉₀ 值			凋亡率 /%
		24 h	48 h	72 h	
miR-103a-3p	1.00 ± 0.06	0.43 ± 0.04	0.66 ± 0.06	0.75 ± 0.05	27.11 ± 1.77
miR-103a-3p + pc DNA	0.96 ± 0.06	0.45 ± 0.04	0.67 ± 0.06	0.78 ± 0.07	25.91 ± 2.11
miR-103a-3p+pc DNA-FLOT2	0.51 ± 0.05*	0.46 ± 0.04	0.98 ± 0.08*	1.58 ± 0.11*	8.53 ± 0.61*
F	206.072	1.313	65.713	306.877	366.873
P	<0.001	0.288	<0.001	<0.001	<0.001

与 miR-103a-3p+pc DNA 组比较, * $P<0.05$ 。

Compared with the miR-103a-3p + pc DNA group, * $P<0.05$.

3 讨论

目前, miRNA在癌症中的作用已得到国内外的普遍认可, 由于其调控机制的复杂性, 导致其在癌症治疗中的应用受到限制。众所周知, miRNA可以同时靶向多个不同功能的靶基因, 一个靶基因也可以同时受多个miRNA的调控^[4]。尽管miR-103a-3p在胰腺癌、胶质瘤、膀胱癌中均出现表达异常^[5-7], 但是其在甲状腺癌中的表达很少有研究。Fang等^[8]研究发现: 参麦注射液(SMI)能够通过miR-103/GPER1信号通路抑制CD4⁺ T细胞分化为调节性T细胞(Treg)细胞, 提高¹³¹I放疗患者的术后免疫功能。这说明miR-103对肿瘤患者的预后具有积极的作用。Liu等^[9]在甲状腺癌组织中检测到几百种失调的miRNA, 其中hsa-miR-103(靶基因为整合素 $\alpha 2$, ITGA2)为表达异常降低的miRNA之一, 可惜, 并未深入研究miR-103对甲状腺癌细胞表型的影响。猜测miR-103a-3p对甲状腺癌细胞的细胞表型的恶化应该也具有一定的抑制作用。本研究发现: 甲状腺癌细胞中miR-103a-3p表达水平异常降低, 这与Liu等^[9]在甲状腺癌组织中的实验结果一致; 进一步研究发现: 过表达miR-103a-3p能够抑制甲状腺癌细胞的增殖, 促进凋亡。这个结果为探索miR-103a-3p在甲状腺癌中的其他功能奠定了基础。增殖相关蛋白多肿瘤抑制基因(p16)、细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子1A(p21)在过表达miR-103a-3p的甲状腺癌细胞中的表达明显上调, 细胞凋亡标志物cleaved-PARP, cleaved-caspase-3的蛋白表达也发生明显的上调。

Cleaved-PARP是凋亡细胞中活化的caspase-3

水解产物, 为细胞发生凋亡的主要标志之一。多聚(ADP-核糖)聚合酶PARP是caspase-3最主要的底物之一, 参与DNA修复、基因的完整和细胞凋亡的启动^[10]。这揭示miR-103a-3p参与调控甲状腺癌细胞中凋亡相关蛋白PARP, pro-caspase-3, cleaved-PARP, cleaved-caspase-3的表达。本研究通过生物信息学分析、双荧光素酶报告基因检测和蛋白质印迹法实验验证了miR-103a-3p能够靶向负调控FLOT2, 猜测miR-103a-3p在甲状腺癌细胞增殖、凋亡的调控功能可能与FLOT2存在一定的相关性。

FLOT2是脂筏蛋白家族中参与癌症调控功能最多的成员, 其在众多癌症中均具出现失调, 如结直肠癌、胶质瘤、肺癌^[11-14]。汪斐等^[15]报道: FLOT2在胃癌、乳腺癌、肾癌、鼻咽癌中均出现表达异常升高。早在2006年, Zhao等^[16]通过基因芯片研究甲状腺癌, 发现FLOT2在甲状腺癌中出现差异表达。Tian等^[17]在甲状腺癌的微阵列分析中发现: FLOT2为甲状腺癌众多差异表达的基因之一, 具有作为甲状腺癌标志物的潜力。为探究FLOT2在甲状腺癌中的功能, 假设FLOT2对甲状腺癌细胞增殖、凋亡具有一定的调控功能。本研究通过RT-qPCR法、蛋白质印迹法发现: 甲状腺癌细胞中FLOT2的表达异常升高, 并且敲减FLOT2对甲状腺癌细胞增殖、凋亡的影响与过表达miR-103a-3p相类似, 这个结果不仅揭示FLOT2对甲状腺癌细胞增殖、凋亡的调控作用, 还说明了FLOT2与miR-103a-3p对甲状腺癌细胞增殖、凋亡的调控功能是相反的。本研究发现: 过度表达FLOT2可以逆转miR-103a-3p对甲状腺癌细胞的

增殖抑制和凋亡促进作用, 揭示了FLOT2能够反向逆转miR-103a-3p在甲状腺癌细胞中的表达和功能。这些结果为miR-103a-3p, FLOT2在甲状腺癌中的生物治疗提供理论参考。

综上所述, miR-103a-3p可抑制甲状腺癌细胞的增殖, 促进凋亡, 其机制可能与靶向FLOT2有关, 为甲状腺癌的治疗提供了新靶标。

参考文献

- Santiago JM, Torrado AI, Arocho LC, et al. Expression profile of flotillin-2 and its pathophysiological role after spinal cord injury[J]. *J Mole Neuro*, 2013, 49(2): 347-359.
- Axtell MJ, Meyers BC. Revisiting criteria for plant miRNA annotation in the era of big data[J]. *Plant Cell*, 2018, 30(2): 272-284.
- Morris EAR, Bodin S, Delaval B, et al. Flotillins control zebrafish epiboly through their role in cadherin-mediated cell-cell adhesion[J]. *Biol Cell*, 2017, 109(1): 210-221.
- Rasnic R, Linial N, Linial M. Enhancing identification of cancer types via lowly-expressed microRNAs[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(9): 5048-5060.
- Zhou H, Rigoutsos I. MiR-103a-3p targets the 5' UTR of GPRC5A in pancreatic cells[J]. *RNA*, 2014, 20(9): 1431-1439.
- Yu M, Xue Y, Zheng J, et al. Linc00152 promotes malignant progression of glioma stem cells by regulating miR-103a-3p/FEZF1/CDC25A pathway[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 110-110.
- Zhong Z, Lv M, Chen J. Screening differential circular RNA expression profiles reveals the regulatory role of circTCF25-miR-103a-3p/miR-107-CDK6 pathway in bladder carcinoma[J]. *Sci Rep*, 2016, 6(8): 30919-30919.
- Fang T, Li J, Wu X. Shenmai injection improves the postoperative immune function of papillary thyroid carcinoma patients by inhibiting differentiation into Treg cells via miR-103/GPER1 axis[J]. *Drug Dev Res*, 2018, 79(7): 324-331.
- Liu X, He M, Hou Y, et al. Expression profiles of microRNAs and their target genes in papillary thyroid carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(4): 1415-1420.
- Liu L, Huang Z, Chen J, et al. Protein phosphatase 2A activation mechanism contributes to JS-K induced caspase-dependent apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 142.
- Deng Y, Ge P, Tian T, et al. Prognostic value of flotillins (flotillin-1 and flotillin-2) in human cancers: A meta-analysis[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2018, 481(1): 90-98.
- Li T, Cao C, Xiong Q, et al. FLOT2 overexpression is associated with the progression and prognosis of human colorectal cancer[J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(3): 2802-2808.
- Huang S, Zheng S, Huang S, et al. Flot2 targeted by miR-449 acts as a prognostic biomarker in glioma[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 250-255.
- Wei G, Xu Y, Peng T, et al. miR-133 involves in lung adenocarcinoma cell metastasis by targeting FLOT2[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(2): 224-230.
- 汪斐, 王红兵. Flot2基因与恶性肿瘤的关系[J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(5): 816-819.
WANG Fei, WANG Hongbing. Relationship between Flot2 gene and malignant tumors[J]. *Modern Oncology*, 2017, 25(5): 816-819.
- Zhao JM, Christa L, Erich B, et al. Molecular characterization of well-differentiated human thyroid carcinomas by cDNA arrays[J]. *2006, Int J Oncol*, 29(5): 1041-1051.
- Tian S, Zeng X, DiCarlo J, et al. Thyroid cancer biomarker: U.S. Patent US 2015/0038376 A1[P]. 2015-02-05.

本文引用: 刘兵雄, 李学刚. MiR-103a-3p靶向FLOT2调控甲状腺癌细胞增殖、凋亡的分子机制[J]. *临床与病理杂志*, 2020, 40(7): 1668-1675. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.07.006

Cite this article as: LIU Bingxiong, LI Xuegang. Molecular mechanism of miR-103a-3p targeting FLOT2 to regulate proliferation and apoptosis of thyroid cancer cells[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2020, 40(7): 1668-1675. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.07.006