

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.11.006

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.11.006

Micro146b 在甲状腺乳头状癌中的表达及其对 甲状腺乳头状癌侵袭迁移的影响

龚麒麟, 叶钦, 刘辉

(福建省肿瘤医院, 福建医科大学附属肿瘤医院头颈外科, 福州 350014)

[摘要] 目的: 探讨miR-146b在甲状腺乳头状癌中的表达及其对甲状腺乳头状癌侵袭转移的影响。方法: 体外培养人甲状腺乳头状癌TPC-1细胞并转染miR-146b, 分为4组: miR-146b抑制组及抑制对照组、miR-146b转染组及转染对照组。分别通过qRT-PCR检测miR-146b的表达, CCK-8法检测细胞增殖, Transwell法检测细胞侵袭能力, 划痕法检测细胞的迁移能力。结果: MiR-146b在甲状腺乳头状癌TPC-1细胞中高表达($P<0.01$)。CCK-8法检测发现miR-146b抑制组TPC-1细胞活力与抑制对照组相比显著降低($P<0.01$), 而miR-146b转染组细胞活力与转染对照组相比显著提高($P<0.01$)。Transwell法检测发现抑制miR-146b后细胞的穿膜数明显减少($P<0.01$), 而过表达miR-146b后细胞的穿膜数明显增加($P<0.01$)。划痕法检测发现miR-146b抑制组的迁移距离与抑制对照组比显著扩大($P<0.01$), 而miR-146b转染组的迁移距离与对照组比显著缩小($P<0.01$)。结论: 甲状腺乳头状癌TPC-1细胞中存在miR-146b的高表达。miR-146b的高表达可促进TPC-1细胞的增殖、侵袭及迁移。

[关键词] 微小RNA-146b; 甲状腺乳头状癌; 侵袭; 迁移

Expression of miR-146b in thyroid cancer and its role in invasion and migration of thyroid cancer cells

GONG Qilin, YE Qin, LIU Hui

(Department of Head and Neck Surgery, Fujian Cancer Hospital, Fujian Medical University Cancer Hospital, Fuzhou 350014, China)

Abstract **Objective:** To investigate the expression level of micro RNA-146b in thyroid cancer cell lines and its impact on thyroid cancer invasion and metastasis. **Methods:** MiR-146b was transfected into human thyroid cancer cells TPC-1 in vitro. All cells were divided into an inhibited miR-146b group, an inhibitor negative control group, a transfected miR-146b group, and a negative control group. MiR-146b expression was detected by qRT-PCR in thyroid cancer cell lines (TPC-1) and negative control cell lines. The characteristics of invasion and migration of the transfected MiR-146b cells were examined by transwell assay. The expression of miR-146b was detected by qRT-PCR, cell proliferation was determined by CCK-8 assay. Migration rate was measured by wound healing assay. **Results:** MiR-

收稿日期 (Date of reception): 2019-03-25

通信作者 (Corresponding author): 刘辉, Email: liuhui@sina.com

基金项目 (Foundation item): 福建省科技厅自然科学基金 (2017J01258); 福建省卫生健康科研人才培养项目 (2016-1-13)。This work was supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (2017J01258) and Fujian Provincial Health Technology Project (2016-1-13), China.

146b was highly expression in thyroid cancer cells TPC-1 ($P<0.01$). CCK-8 assay found that the cell viability in the miR-146b inhibitor group were significantly lower than that in the inhibitor NC group ($P<0.01$), while that in the miR-146b mimics group were significantly higher than that in the NC group ($P<0.01$). Transwell assay found that the number of cells through membranes was decreased evidently in the miR-146b inhibitor group ($P<0.01$), while that was increased evidently in the miR-146b mimics group ($P<0.01$). The wound healing assay found that the migration distance of miR-146b inhibitor group was farther than that in the inhibitor NC group ($P<0.01$), while that of the miR-146b mimics group was shorter than that in the NC group ($P<0.01$). **Conclusion:** MiR-146b has high expression in thyroid cancer cells TPC-1. The overexpression miR-146b can promote cell proliferation, invasion, and migration.

Keywords microRNA; papillary thyroid carcinoma; invasion; migration

甲状腺癌是常见的恶性肿瘤,也是近几年发病率上升最快的恶性肿瘤之一。甲状腺乳头状癌是甲状腺癌最常见的病例类型,其发病率约占甲状腺癌的70%^[1]。大部分甲状腺乳头状癌生长缓慢,10年存活率可达90%,预后良好。但在10年存活患者中,尚有30%为带病生存状态,在这期间可能遭受局部或远处复发的痛苦^[2]。且约10%甲状腺乳头状癌患者生长迅速,侵袭度高,易转移,预后差。

微小RNA(microRNA, miR)在细胞的发育、增殖、分化、凋亡过程中发挥重要作用。研究^[3]发现:miR的异常表达与肿瘤的发生、发展有关。miR-146b是pre miR-146经细胞质Dicer酶加工后形成,其与miR-146a属于同一家族,作为转录后基因沉默,在炎症反应及肿瘤发生、发展过程中发挥重要作用^[4]。研究^[5]发现:甲状腺乳头状癌组织中存在miR-146b的高表达。本研究通过体外甲状腺乳头状癌细胞进一步验证在甲状腺乳头状癌细胞中存在miR-146b的表达,并研究其对肿瘤增殖、侵袭及迁移过程中的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞和主要试剂

人甲状腺乳头状癌TPC-1购自中国科学院上海细胞生物研究所。Lipo3000转染试剂购自美国Invitrogen公司。CCK-8试剂盒购自中国Biosharp公司, Tripure Isolation Reagent购自瑞士Roche公司, HiFi-MMLV cDNA第一链合成试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司。相关miR在上海吉玛生物科技有限公司合成。

1.2 细胞培养

甲状腺癌细胞TPC-1在含有1%双抗、10%胎牛血清的DMEM培养液中, 37℃, 5% CO₂保持饱和湿度培养, 2 d扩增1次。

1.3 转染

siRNA转染: TPC-1细胞铺板至6孔细胞培养板中, 调整细胞浓度为 1×10^5 个/孔, 37℃, CO₂培养箱中培养过夜。观察细胞融合度大约为80%后, 将细胞生长液换成不含血清的DMEM不完全培养基继续孵育1 h, 增加转染效率。

Lipo3000转染: 将100 pmol miRNA加到250 μL Opti-mem无血清培养基中; 将7.5 μL Lipo3000加到250 μL Opti-mem无血清培养基中。将上述两管混合, 放置15~20 min。将混合液加入6孔板对应孔中, 4~6 h后换成有血清培养基, 继续培养。

实验共分为4组, miR-146b转染组加入miR-146b模拟物; 转染对照组加入miR-146b模拟物对照物; miR-146b抑制组加入miR-146b抑制剂; 抑制对照组加入miR-146b抑制剂对照物。序列信息见表1。

1.4 qRT-PCR 检测 miR-146b 的表达

通过Tripure提取细胞标本的RNA, 反转录RNA, 按HiFi-MMLV cDNA第一链合成试剂盒说明书配置反应体系, 涡旋震荡混匀, 短暂离心, 42℃孵育50 min, 85℃孵育5 min, 进行反转录。将反转录得到的cDNA稀释20倍, 然后取8 μL cDNA与10 μL UltraSYBR Mixture及2 μL引物混合(引物序列见表2), 在20 μL反应体系中, 反应条件: 95℃ 10 min; 95℃ 15 s, 60℃ 20 s, 40个循环; 72℃ 25 s, 72℃ 5 min。miR-146b的相对表达量在细胞中用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 来计算。引物序列信息见表2。

1.5 细胞增殖、侵袭和迁移实验

CCK-8法检测转染细胞增殖情况: 转染后的TPC-1细胞接种于96孔细胞培养板中, 同时设置空白对照组, 空白对照组用未转染的TPC-1, 细胞浓度为 1×10^5 个/mL, 每孔加入100 μL细胞悬液(每组设置6孔重复)。37℃ CO₂培养箱中培养24 h后, 加入CCK-8进行细胞增殖检测, 2 h内读取OD₄₅₀值。

表1 实验分组序列信息

Table 1 Sequence information of experimental groups

名称	序列(5'→3')
miR-146b转染组	UGAGAACUGAAUCCAUAAGGCU CCUAUGGAAUUCAGUUCUCAUU
转染对照组	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT ACGUGACACGUUCGGAGAATT
miR-146b抑制组	AGCCUAUGGAAUUCAGUUCUCA
抑制对照组	CAGUACUUUUGUGUAGUACAA

表2 引物序列信息

Table 2 Sequence information of primers

引物名称	Primer序列	
	正向(5'→3')	反向(5'→3')
Human-GAPDH	CGGAGTCAACGGATTGGTCGTAT	AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGA
Human-U6	TGCGGGTGCTCGCTTCGGCAGC	GTGCAGGGTCCGAGGT
Human-miR-146b	CGGCACTGAGAAGTGAATCC	CAGTGCAGGGTCCGAGGTATC

Transwell法检测细胞侵袭能力：在细胞转染24 h后，消化细胞，无血清培养基洗3次，计数配成 5×10^5 个/mL细胞悬液，在上室中加入100 μ L细胞悬液(3个室)，下室中加入500 μ L完全培养基，经过24 h培养后，多聚甲醛固定，擦去上室内基质胶和细胞，1%结晶紫乙醇溶液孵育染色，显微镜下随机计数($\times 100$)16个视野内的膜下面细胞数。

划痕法检测细胞的迁移能力：先用marker笔在6孔板背后，用直尺划横线，每孔3条。在孔中加入约 3.5×10^6 个细胞，细胞贴壁后用枪头和直尺垂直于背后的横线划痕，用PBS洗细胞2~3次，去除划下的细胞，加入无血清培养基。放入37 $^{\circ}$ C 5% CO₂培养箱，培养0, 24, 48 h拍照各6张。

1.6 统计学处理

用Image-Pro Plus 6.0软件对图片进行分析。计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，采用SPSS 14.0统计软件分析数据，两组比较采用 t 检验，不同实验组间比较采用单因素方差分析，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 甲状腺乳头状癌细胞中 miR-146b 的表达

转染了miR-146b的TPC-1细胞培养24 h后，qRT-PCR检测TPC-1细胞中miR-146b的表达，结

果显示：miR-146b抑制组miR-146b的相对表达量下调为抑制对照组的76.92倍($t=62.83$, $P < 0.01$)；与转染对照组相比，miR-146b转染组miR-146b的相对表达量上调了4 429.88倍($t=-93.41$, $P < 0.01$ ；图1)。

2.2 MiR-146b 对甲状腺乳头状癌 TPC-1 细胞增殖力的影响

转染了miR-146b的TPC-1细胞培养24 h后，用CCK-8法检测OD₄₅₀值，结果显示：抑制对照组和miR-146b抑制组的OD₄₅₀值分别为(1.01 \pm 0.17)，(0.70 \pm 0.15)个，差异有统计学意义($t=14.021$, $P < 0.01$)；转染对照组和miR-146b转染组的OD₄₅₀值分别为(0.88 \pm 0.01)和(1.19 \pm 0.14)个，差异有统计学意义($t=-21.137$, $P < 0.01$ ；图2)。

2.3 MiR-146b 对甲状腺乳头状癌 TPC-1 细胞侵袭能力的影响

转染miR-146b的TPC-1细胞培养24 h后，用Transwell法检测细胞的侵袭能力(图3)，结果显示：抑制对照组和miR-146b抑制组的穿膜细胞数分别为(296.88 \pm 9.16)和(81.63 \pm 6.30)个，差异有统计学意义($t=19.367$, $P < 0.01$)；转染对照组和miR-146b转染组的穿膜细胞数(272.56 \pm 14.60)和(537.75 \pm 20.00)个，差异有统计学意义($t=-10.59$, $P < 0.01$ ；图4)。

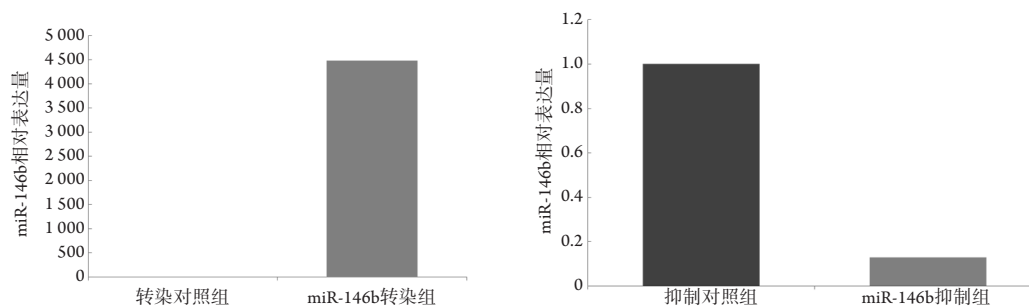


图1 qRT-PCR检测miR-146b的相对表达量

Figure 1 Expression level of miR-146b was detected by qRT-PCR

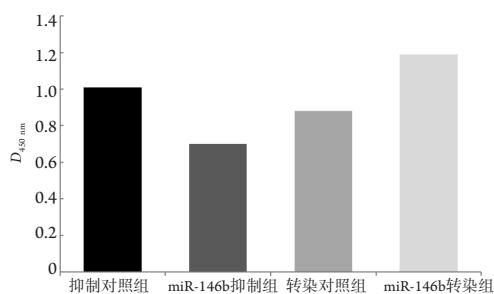


图2 CCK-8法检测细胞的OD450值

Figure 2 OD450 values of cells detected by CCK-8 method

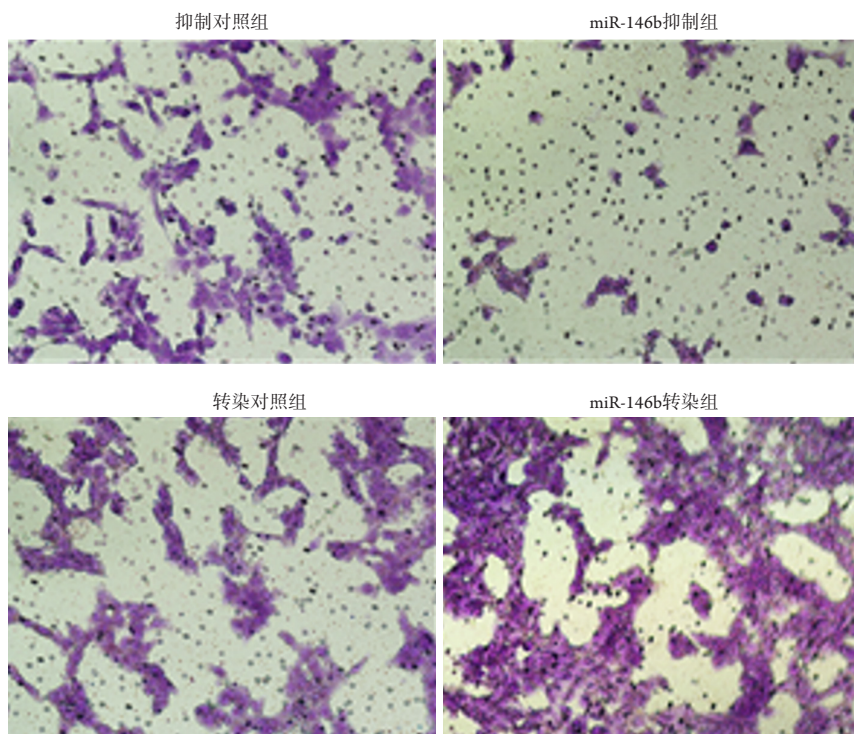


图3 培养24 h后1%结晶紫乙醇溶液染色观察细胞形态(× 100)

Figure 3 Cellular morphology was observed by 1% crystal violet staining assay after 24 hours (× 100)

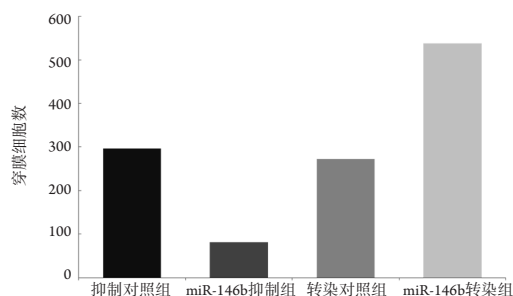


图4 Transwell法检测各组细胞穿膜数

Figure 4 Cells through membrane detected by Transwell method

2.4 MiR-146b 对甲状腺乳头状癌 TPC-1 细胞迁移能力的影响

转染miR-146b的TPC-1细胞培养24 h后, 用划痕法处理48 h(图5), 结果显示: 抑制对照组和miR-146b抑制组的迁移距离分别为 297.21 ± 28.04 , 111.59 ± 33.81 , 差异有统计学意义($t=4.226$, $P<0.01$); 转染对照组和miR-146b转染组的迁移距离为 198.98 ± 52.97 和 598.10 ± 30.22 , 差异有统计学意义($t=-6.544$, $P<0.01$; 图6)。

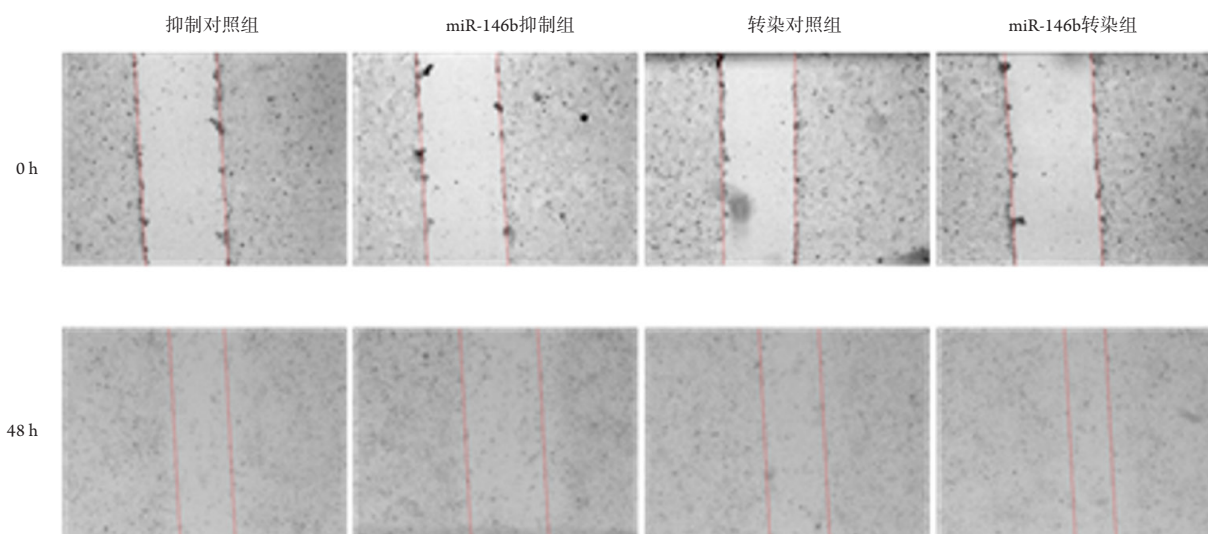


图5 划痕处理48 h后细胞形态($\times 100$)

Figure 5 Cellular morphology was observed by scratch test after 48 hours ($\times 100$)

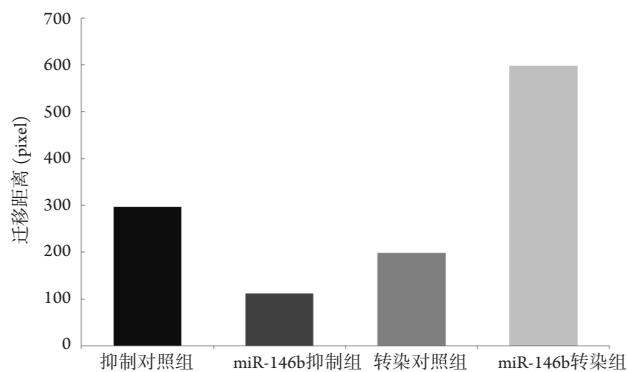


图6 划痕法检测各组细胞的迁移距离

Figure 6 Migration distances of cells in each group measured by scratch tester

3 讨论

MiR是一类有19~25个核苷酸组成的非编码RNA, 通过与mRNA互补, 诱导mRNA降解或翻译抑制发挥重要作用。已有研究发现有多种miR的表达异常, 在肿瘤细胞的分化、增生、迁移、凋亡中起重要作用, 如结直肠癌^[6]、食管癌^[7]、舌癌^[8]、乳腺癌^[9]、慢性淋巴细胞性白血病^[10]等。

已有研究^[5]证实: 在甲状腺癌组织中, miR-146b的表达高于癌旁组织。本研究通过体外细胞培养进一步证实了在甲状腺乳头状癌TPC-1细胞中存在miR-146b的表达。这提示miR-146b可在临床上作为甲状腺乳头状癌的标志物。

甲状腺结节是我国人群中的多发病和常见病, 正确区分良、恶性对甲状腺结节的治疗至关重要。超声引导下甲状腺细针穿刺活检(fine-needle aspiration biopsy, FNAB)是鉴别甲状腺结节良恶性的一个重要方法。对于甲状腺结节>0.5 cm的肿物, FNAB可以有较高的敏感性和准确性^[11]。而对于甲状腺结节<0.5 cm的肿物, 因细胞穿刺量少, 常无法获得满意的结果。美国甲状腺协会^[12]和韩国指南^[13]认为: 对于临床触诊或超声检查发现具有恶性可疑征象的甲状腺结节, 如果结节最大径<5 mm, 不推荐行FNAB。临床上经常碰到很多甲状腺微小良性结节患者因误诊接受手术而造成难以弥补的创伤。本研究进一步证实了在甲状腺乳头状癌细胞中存在miR-146b的表达, 这为检测术前穿刺细胞中miR-146b来鉴别肿瘤提供了理论基础。检测术前穿刺细胞的miR-146b可以为FNAB检测提供更多的信息, 提高FNAB的准确性。更为重要的是可以提高肿物直径<0.5 cm甲状腺结节FNAB的准确性, 从而减少许多不必要的手术发生。不过在穿刺液中鉴别甲状腺乳头状癌的miR-146b标准量化指标, 需要后续进一步的实验研究阐明。

本研究通过CCK-8法、Transwell试验及划痕法分别实验证实了miR-146b的高表达可促进TPC-1细胞的增殖、侵袭及迁移。而抑制miR-146b的表达则会降低TPC-1细胞的增殖、侵袭及迁移。miR-146b的表达量与甲状腺乳头状癌的增殖、侵袭及迁移呈正相关。有研究^[14]发现: miR-146b可以通过调控ZNF3, 从而诱导甲状腺癌细胞的上皮向间质转化, 促进甲状腺乳头状癌肿瘤细胞的侵袭和转移。也有学者^[15]发现: miR-146b可以通过调控SMAD4的表达, 激活TGF- β 信号通路, 促进甲

状腺乳头状癌侵袭和转移。然而, miR-146b的作用机制似乎并没有如此简单, 其在肿瘤发展的不同的过程中及不同肿瘤之间均发挥不同的作用。事实上, 除在甲状腺乳头状癌细胞中miR-146b的高表达可促进肿瘤细胞的增殖、侵袭及迁移。而在神经胶质瘤^[16]、肺癌^[17]、胰腺癌^[18]和骨肉瘤^[19]中, miR-146b的高表达可抑制其肿瘤细胞侵袭和转移。miR-146b是具体如何对肿瘤细胞发挥作用的, 需要后续更多的实验来证明。

临床上也经常发现有些甲状腺乳头状癌患者, 尽管癌灶还很小, 但很快已发生淋巴结或远处转移, 推测这可能与miR-146b的表达呈正相关, 需进一步实验证实。

综上所述, 研究miR-146b与甲状腺乳头状癌细胞的关系, 有助于进一步揭开甲状腺乳头状癌的增殖、侵袭及迁移的机制的神秘面纱。检测miR-146b有助于早期鉴别甲状腺乳头状癌, 而抑制miR-146b可以阻碍甲状腺乳头状癌的发展。针对miR-146b治疗有望为甲状腺乳头状癌的临床诊治开辟一条新的途径, 提高甲状腺乳头状癌的疗效。

参考文献

1. Lam AK, Lo CY, Lam KS. Papillary carcinoma of thyroid: a 30-yr clinicopathological review of the histological variants[J]. *Endocr Pathol*, 2005, 16(4): 323-330.
2. Lee JC, Zhao JT, Clifton-Bligh RJ, et al. MicroRNA-222 and microRNA-146b are tissue and circulating biomarkers of recurrent papillary thyroid cancer[J]. *Cancer*, 2013, 119(24): 4358-4365.
3. Farazi TA, Hoell JI, Morozov P, et al. MicroRNAs in human cancer[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2013, 774: 1-20.
4. Paterson MR, Kriegel AJ. MiR-146a/b: a family with shared seeds and different roots[J]. *Physiol Genomics*, 2017, 49(4): 243-252.
5. 戴璇璇, 周毅力, 刘超, 等. miRNAs在甲状腺乳头状癌中的表达及临床病理意义[J]. *浙江医学*, 2013, 35(20): 1802-1806. DAI Xuanxuan, ZHOU Yili, LIU Chao, et al. Expressions of miRNAs in papillary thyroid cancer and their clinicopathological significance[J]. *Zhejiang Medical Journal*, 2013, 35(20): 1802-1806.
6. Gopalan V, Pillai S, Ebrahimi F, et al. Regulation of microRNA-1288 in colorectal cancer: altered expression and its clinicopathological significance[J]. *Mol Carcinog*, 2014, 53(Suppl 1): E36-E44.
7. Amin M, Lam AK. Current perspectives of mi-RNA in oesophageal adenocarcinoma: roles in predicting carcinogenesis, progression and values in clinical management[J]. *Exp Mol Pathol*, 2015, 98(3): 411-418.

8. Li J, Huang H, Sun L, et al. MiR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(12): 3998-4008.
9. Wang B, Yang Z, Wang H, et al. MicroRNA-320a inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells by targeting RAB11A[J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(9): 2719-2729.
10. Ferrajoli A, Ivan C, Ciccone M, et al. Epstein-Barr virus microRNAs are expressed in patients with chronic lymphocytic leukemia and correlate with overall survival[J]. *EBioMedicine*, 2015, 2(6): 572-582.
11. Mahar SA, Husain A, Islam N. Fine needle aspiration cytology of thyroid nodule: diagnostic accuracy and pitfalls[J]. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 2006, 18(4): 26-29.
12. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer[J]. *Thyroid*, 2009, 19(11): 1167-1214.
13. Moon WJ, Baek JH, Jung SL, et al. Ultrasonography and the ultrasound-based management of thyroid nodules: consensus statement and recommendations[J]. *Korean J Radiol*, 2011, 12(1): 1-14.
14. Deng X, Wu B, Xiao K, et al. MiR-146b-5p promotes metastasis and induces epithelial-mesenchymal transition in thyroid cancer by targeting ZNRF3[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(1): 71-82.
15. Geraldo MV, Yamashita AS, Kimura ET. MicroRNA miR-146b-5p regulates signal transduction of TGF- β by repressing SMAD4 in thyroid cancer[J]. *Oncogene*, 2012, 31(15): 1910-1922.
16. Li Y, Wang Y, Yu L, et al. miR-146b-5p inhibits glioma migration and invasion by targeting MMP16[J]. *Cancer Lett*, 2013, 339(2): 260-269.
17. Patnaik SK, Kannisto E, Mallick R, et al. Overexpression of the lung cancer-prognostic miR-146b microRNAs has a minimal and negative effect on the malignant phenotype of A549 lung cancer cells[J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22379.
18. Lin F, Wang X, Jie Z, et al. Inhibitory effects of miR146b-5p on cell migration and invasion of pancreatic cancer by targeting MMP16[J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2011, 31(4): 509.
19. Al-Khalaf HH, Aboussekhra A. MicroRNA-141 and microRNA-146b-5p inhibit the prometastatic mesenchymal characteristics through the RNA-binding protein AUF1 targeting the transcription factor ZEB1 and the protein kinase AKT[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(45): 31433-31447.

本文引用: 龚麒麟, 叶钦, 刘辉. Micro146b在甲状腺乳头状癌中的表达及其对甲状腺乳头状癌侵袭迁移的影响[J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(11): 2380-2386. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.11.006

Cite this article as: GONG Qilin, YE Qin, LIU Hui. Expression of miR-146b in thyroid cancer and its role in invasion and migration of thyroid cancer cells[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2019, 39(11): 2380-2386. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.11.006