

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.11.005

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.11.005

## 微小 RNA-411 抑制甲状腺癌细胞增殖和侵袭

陈芙蓉

(开封市中心医院病理科, 河南 开封 475000)

**[摘要]** 目的: 探讨微小RNA(miR)-411对甲状腺癌细胞增殖和侵袭的影响及其机制。方法: 采用实时荧光定量PCR检测100例甲状腺癌组织和3种甲状腺癌细胞系SW579, TPC-1, FTC-133中miR-411的表达水平, 并分析miR-411表达与甲状腺癌患者临床病理特征的相关性; 将体外培养的TPC-1细胞分为未转染组、阴性对照(NC)组和miR-411组, 转染miR-411模拟物及其阴性对照后, 采用实时荧光定量PCR检测各组细胞中miR-411的表达, 噻唑蓝(MTT)法和Transwell小室分别检测各组细胞增殖和侵袭。结果: 与癌旁组织相比, 甲状腺癌组织中miR-411表达水平明显降低( $P<0.05$ ), 且miR-411表达量与肿瘤大小、TNM分期和淋巴结转移有关( $P<0.05$ ), 但与患者性别和年龄无关( $P>0.05$ )。与人甲状腺正常细胞系Nthy-ori 3-1相比, SW579, TPC-1, FTC-133细胞中miR-411明显降低( $P<0.05$ ), 且miR-411在TPC-1细胞中的表达最低。与未转染组相比, NC组细胞中miR-411的表达水平、细胞增殖活力和侵袭细胞数差异均无统计学意义( $P>0.05$ ); 与未转染组或NC组相比, miR-411组细胞中miR-411的表达水平明显升高, 而细胞增殖活力和侵袭细胞数明显降低( $P<0.05$ )。结论: miR-411在甲状腺癌中低表达, 上调其表达可抑制细胞增殖和侵袭。

**[关键词]** 甲状腺癌; miR-411; 细胞增殖; 侵袭

## MicroRNA-411 inhibiting the proliferation and invasion of thyroid cancer cells

CHEN Furong

(Department of Pathology, Kaifeng Central Hospital, Kaifeng Henan 475000, China)

**Abstract** **Objective:** To investigate the effect of microRNA (miR)-411 on proliferation and invasion of thyroid cancer cells and its mechanism. **Methods:** The expression of miR-411 in 100 thyroid cancer tissues and 3 thyroid cancer cell lines SW579, TPC-1 and FTC-133 were detected by real-time fluorescence quantitative PCR, and the relationship between the expression of miR-411 and the clinicopathological characteristics of thyroid cancer patients was analyzed. The cultured TPC-1 cells were divided into an untransfected group, a negative control group (NC) and a miR-411 group. After transfection of miR-411 mimic and its negative control, the expression of miR-411 was detected by real-time fluorescence quantitative PCR, the proliferation and invasion of cells in each group were detected by methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay and Transwell chamber, respectively. **Results:** Compared with the adjacent tissues, the expression of miR-411 in thyroid cancer tissues was significantly

收稿日期 (Date of reception): 2019-10-06

通信作者 (Corresponding author): 陈芙蓉, Email: 1037465471@qq.com

lower ( $P < 0.05$ ), and the expression of miR-411 was related to tumor size, TNM stage, and lymph node metastasis ( $P < 0.05$ ), but not to gender and age ( $P > 0.05$ ). Compared with the normal human thyroid cell line Nthy-ori 3-1, the expression of miR-411 in SW579, TPC-1, and FTC-133 cells was significantly lower ( $P < 0.05$ ), and the expression of miR-411 in TPC-1 cells was the lowest. There was no significant difference in the expression level of miR-411, proliferation activity and number of invasive cells between the non-transfected group and the NC group ( $P > 0.05$ ). Compared with the non-transfected group or the NC group, the expression level of miR-411 increased significantly, while the proliferation activity and number of invasive cells decreased significantly in the miR-411 group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The expression of miR-411 is low in thyroid cancer. Upregulation of miR-411 expression can inhibit cell proliferation and invasion.

**Keywords** thyroid cancer; microRNA-411; cell proliferation; invasion

甲状腺癌是内分泌系统中常见的恶性肿瘤, 发病率在全球范围内呈升高趋势<sup>[1]</sup>; 其病理分型包括分化型甲状腺癌、未分化甲状腺癌和低分化型甲状腺癌, 其中以分化型甲状腺癌(包括滤泡状甲状腺癌和乳头状甲状腺癌)最为常见, 约占90%<sup>[2]</sup>。目前, 手术及术后促甲状腺激素抑制治疗、碘-131治疗是甲状腺癌常见的治疗手段, 多数患者经治疗后预后效果较好, 5年生存率可达90%以上; 但还有部分患者会出现远处转移和复发导致治疗效果并不理想<sup>[3]</sup>。因此, 了解甲状腺癌发生发展机制寻找有效的分子靶点以提高临床诊疗效果十分必要。微小RNA(microRNA, miRNA)是一类不具有编码蛋白质功能的内源性非编码RNA, 通过与靶基因mRNA的3'-非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)结合, 促进靶基因mRNA降解或抑制其翻译, 影响细胞功能, 参与甲状腺癌的发生发展<sup>[4-6]</sup>。MiR-411是miRNA家族成员, 被证实存在乳腺癌、结直肠癌和骨肉瘤等肿瘤中异常表达, 且可通过调控细胞增殖、侵袭等发挥癌基因或抑癌基因的作用<sup>[7-9]</sup>; 然而, miR-411在甲状腺癌中的作用未见报道。本研究通过观察miR-411在甲状腺癌中的表达及其对细胞增殖和侵袭的影响, 并探讨其可能的分子机制, 以初步揭示miR-411在甲状腺癌发生发展中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 组织标本及细胞来源

收集2014年1月至2018年1月开封市中心医院经病理学确诊并行手术切除的100例甲状腺癌和癌旁组织标本, 患者在手术前均未行放射治疗(以下简称放疗)和化学药物治疗(以下简称化疗), 所有标本的收集经患者知情同意, 本实验获得开封市中心医院医学伦理委员会审批。100例患者中男48例,

女52例, 年龄30~65(平均46.5)岁。标本离体后迅速放入液氮中保存。人甲状腺癌细胞系SW579购于中国科学院上海细胞库, 人甲状腺癌细胞系TPC-1、FTC-133和人甲状腺正常细胞系Nthy-ori 3-1购于美国模式菌种收集中心/美国生物标准品收藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)、胰蛋白酶和二甲亚砜购于美国Sigma公司, TRIzol试剂和脂质体2000购于美国Invitrogen公司, 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)引物、miR-411模拟物、miR-411抑制剂及模拟物阴性对照(mimics negative control, NC)、抑制剂阴性对照(inhibitor negative control, anti-NC)购于上海吉玛生物公司, 胎牛血清、改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)培养基购于美国Promega公司, 反转录试剂盒购于美国Fermentas公司, miRNA荧光定量PCR检测试剂盒购于北京百奥莱博科技公司。Transwell小室购于美国Corning公司, PCR扩增仪购于德国Eppendorf公司, 荧光倒置显微镜购于日本Olympus公司, 二氧化碳细胞培养箱购于日本Sanyo公司, 酶标仪购于芬兰Labsystems公司, 紫外分光光度计购于上海精密仪器仪表公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

将冻存的SW579, TPC-1, FTC-133和Nthy-ori 3-1细胞解冻复苏后, 采用含10%胎牛血清DMEM培养基在5%CO<sub>2</sub>的37℃恒温细胞培养箱中常规培养。收集长势良好的指数期细胞进行实验。

#### 1.2.2 实时荧光定量PCR检测 miR-411 的表达

采用TRIzol法提取甲状腺癌组织标本及SW579, TPC-1, FTC-133和Nthy-ori 3-1细胞的

总RNA后, 使用紫外分光光度计检测总RNA的浓度。参照反转录试剂盒说明书将RNA进行反转录, 以反转录产物cDNA为模板, 按照miRNA荧光定量PCR检测试剂盒说明书进行PCR扩增, 其中PCR反应条件为95 °C预变性3 min后, 进行40个循环阶段: 95 °C变性30 s, 58 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 之后再以72 °C总延伸6 min。PCR扩增引物序列: U6正向5'-CTCGCTTCGGCAGCACACA-3'; 反向5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。miR-411正向5'-GGGGTAGTAGACCGTATAG-3'; 反向5'-TGCGTGTCGTGGAGTC-3'。以U6为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算组织和细胞中miR-411的表达水平。

### 1.2.3 TPC-1 细胞转染

将指数期的TPC-1细胞按照每孔 $3 \times 10^5$ 个接种至6孔板上后, 置于二氧化碳培养箱中常规培养。将细胞分为未转染组(未转染)、阴性对照(negative control, NC)组(转染NC)和miR-411组(转染miR-411模拟物), 其中每组设置3个复孔。待细胞培养达70%汇合度时, 参照脂质体2000说明书步骤将制备的模拟物/阴性对照-脂质体2000复合物根据实验分组加入到TPC-1细胞中。转染6 h后换液继续培养, 培养48 h后胰蛋白酶消化收集各组细胞并采用实时荧光定量PCR检测细胞中miR-411的表达水平以评价转染效果。实验重复3次。

### 1.2.4 MTT 法检测 TPC-1 细胞增殖

将指数期的TPC-1细胞以每孔 $10^6$ 个接种至96孔板上后, 于二氧化碳培养箱中常规培养。按照1.2.3中的分组并转染, 其中每组设置3个复孔。转染后置于细胞培养箱中继续培养至所需时间后, 弃培养基, 加入5 g/L MTT试剂20  $\mu$ L/孔孵育4 h。弃上清液后, 加入二甲基亚砜150  $\mu$ L/孔震荡反应至MTT结晶溶解。采用酶标仪在490 nm波长处检测各组细胞的光密度值。实验重复3次。

### 1.2.5 Transwell 小室试验检测 TPC-1 细胞侵袭

使用50  $\mu$ L浓度为1 g/L的基质胶溶液包被Transwell小室中孔径为8  $\mu$ m的聚碳酸酯微孔膜, 置于室温下充分融合。收集转染48h后的未转染组、NC组和miR-411组细胞, 并使用无血清的DMEM培养基制成浓度为 $10^4$ 个/mL的细胞悬液。将包被后的Transwell小室放入24孔中, 在上室中加入200  $\mu$ L/孔细胞悬液, 并在下室中加入500  $\mu$ L/孔的含血清培养基, 于细胞培养箱中常规培养24 h。取出小室后, 轻轻拭去上层残留的细胞后, 分别以4%多聚甲醛和0.1%结晶紫对滤膜下的细胞进行固定与染色。洗去染色液后, 采用倒置显微镜观察

各组中的穿膜细胞数, 结果以随机选取的3个视野内的细胞数均值表示。实验重复3次。

## 1.3 统计学处理

采用SPSS 22.0统计软件进行数据分析。数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 多组间比较使用单因素方差分析, 组间多重比较采用SNK-*q*, 两组间比较采用独立样本*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MiR-411 在甲状腺癌组织中表达下调

实时荧光定量PCR检测结果显示: 100例甲状腺癌组织中miR-411的相对表达量( $0.26 \pm 0.03$ )较癌旁组织( $0.97 \pm 0.08$ )明显降低( $t = 83.10$ ,  $P < 0.05$ )。

### 2.2 MiR-411 在甲状腺癌中表达与临床病理特征的关系

MiR-411表达量与甲状腺癌患者肿瘤大小、TNM分期和淋巴结转移明显相关( $P < 0.05$ ), 而与患者性别、年龄无关( $P > 0.05$ , 表1)。

表1 MiR-411表达与甲状腺癌患者临床病理特征的关系

Table 1 Relationship between miR-411 expression and clinical characteristics of patients with thyroid cancer

临床病理特征	<i>n</i>	miR-411	<i>P</i>
性别			0.884
男	48	$0.262 \pm 0.021$	
女	52	$0.254 \pm 0.032$	
年龄/岁			0.593
$\geq 50$	56	$0.266 \pm 0.025$	
$< 50$	44	$0.263 \pm 0.031$	
肿瘤大小/cm			$< 0.001$
$\geq 2$	69	$0.282 \pm 0.033$	
$< 2$	31	$0.216 \pm 0.025$	
TNM分期			$< 0.001$
I-II	72	$0.246 \pm 0.028$	
III-IV	28	$0.302 \pm 0.026$	
颈部淋巴结转移			$< 0.001$
有	36	$0.225 \pm 0.031$	
无	64	$0.276 \pm 0.027$	

### 2.3 转染miR-411模拟物上调甲状腺癌TPC-1细胞中miR-411的表达

实时荧光定量PCR检测SW579, TPC-1和FTC-133这3种甲状腺癌细胞系中miR-411的表达水平分别为 $0.65 \pm 0.03$ ,  $0.21 \pm 0.02$ 和 $0.32 \pm 0.03$ , 与人甲状腺正常细胞系Nthy-ori 3-1( $1.00 \pm 0.08$ )相比均明显降低( $t=12.29$ ,  $t=28.74$ ,  $t=23.88$ ,  $P<0.05$ ), 且miR-411在TPC-1细胞中的表达最低。后续以TPC-1细胞进行实验。与未转染组相比, NC组细胞中miR-411表达差异无统计学意义( $P>0.05$ ); 与未转染组或NC组相比, miR-411组细胞中miR-411的表达水平明显升高( $P<0.05$ , 表2)。

### 2.4 上调 miR-411 抑制甲状腺癌 TPC-1 细胞增殖

MTT实验结果显示: 与未转染组相比, 转染12~72 h后NC组细胞的增殖活力差异无统计学意义( $P>0.05$ ); 与未转染组或NC组相比, 转染24~72 h后NC组细胞的增殖活力明显降低( $P<0.05$ , 表3)。

### 2.5 上调 miR-411 减弱甲状腺癌 TPC-1 细胞侵袭能力

Transwell小室检测结果显示: 与未转染组相比, NC组中侵袭细胞数差异无统计学意义( $P>0.05$ ); 与未转染组或NC组相比, miR-411组中侵袭细胞数明显减少( $P<0.05$ , 图1, 表4)。

表2 各组细胞中miR-411的表达水平( $n=9$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 MiR-411 expression levels in each group of cells ( $n=9$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	miR-411
未转染组	$1.00 \pm 0.07$
NC组	$0.95 \pm 0.06$
miR-411组	$3.10 \pm 0.25^*$
<i>F</i>	572.64
<i>P</i>	<0.01

与未转染组或NC组相比,  $*P<0.05$ 。

Compared with untransfected group or NC group,  $*P<0.05$ .

表3 转染不同时间后各组细胞光密度值的比较( $n=9$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison of optical density values of cells in different groups after different transfection time ( $n=9$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	光密度值			
	12 h	24 h	48 h	72 h
未转染组	$0.25 \pm 0.03$	$0.47 \pm 0.03$	$0.68 \pm 0.04$	$0.92 \pm 0.06$
NC组	$0.22 \pm 0.03$	$0.51 \pm 0.04$	$0.72 \pm 0.03$	$0.95 \pm 0.05$
miR-411组	$0.24 \pm 0.02$	$0.32 \pm 0.02^*$	$0.54 \pm 0.03^*$	$0.67 \pm 0.05^*$
<i>F</i>	2.86	93.41	70.94	74.20
<i>P</i>	0.08	<0.01	<0.01	<0.01

与未转染组或阴性组相比,  $*P<0.05$ 。

Compared with untransfected group or NC group,  $*P<0.05$ .

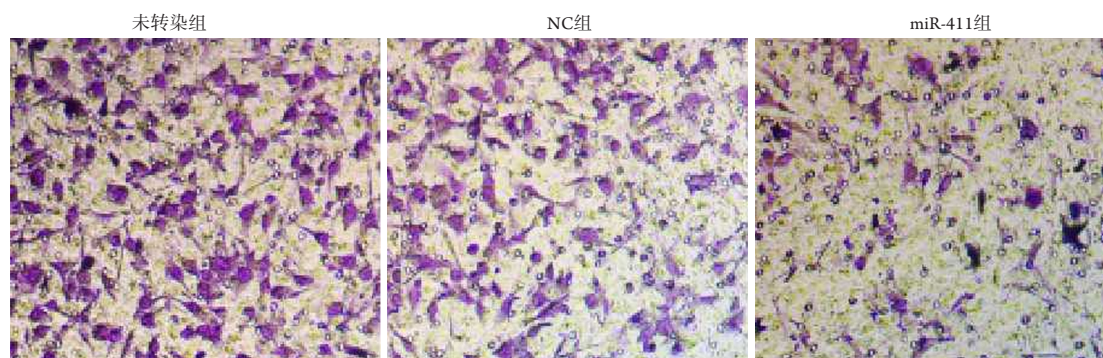


图1 Transwell小室检测各组细胞的侵袭能力(结晶紫染色,  $\times 200$ )

Figure 1 Invasion ability of cells in each group by Transwell chamber (crystal violet staining,  $\times 200$ )

表4 各组中侵袭细胞数的比较( $n=9$ ,  $\bar{x} \pm s$ )Table 4 Comparison of the number of invasive cells in each group ( $n=9$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	侵袭细胞数/个
未转染组	124.00 $\pm$ 11.00
NC组	118.00 $\pm$ 9.00
miR-411组	72.00 $\pm$ 6.00*
F	91.82
P	<0.01

与未转染组或NC组相比, \* $P<0.05$ 。

Compared with untransfected group or NC group, \* $P<0.05$ .

### 3 讨论

在甲状腺癌中存在多种异常表达的miRNAs, 而甲状腺癌的发生发展与这些miRNAs的调控有着密切关系。有些miRNAs如miR-144-3p和miR-96-5p等具有致癌作用, 其过度表达可促进肿瘤的形成和转移<sup>[10-11]</sup>; 而有些miRNAs如miR-149-5p和miR-431等具有抑癌作用, 上调其表达则可抑制肿瘤的形成与转移<sup>[12-13]</sup>。随着研究的不断深入, 甲状腺癌中越来越多的miRNAs的作用被揭示, 但还存在部分miRNAs的作用未被发现。

MiR-411是一种与肿瘤发生发展关系密切的miRNA, 但在不同肿瘤中其发挥的作用不尽相同。有研究<sup>[9]</sup>指出: MiR-411在骨肉瘤中表达上调, 其高表达可通过靶向调控转移抑制蛋白1增强骨肉瘤细胞的增殖和迁移, 发挥致癌作用; 据文献<sup>[14]</sup>报道, 在人非小细胞肺癌中miR-411表达升高, 并且miR-411可通过下调硫氧还蛋白结合蛋白质和抑癌基因SPRY4的表达促进肿瘤的生长和转移。MiR-411除了在骨肉瘤和非小细胞肺癌中发挥促癌作用外, 还在一些肿瘤中发挥着抑癌作用。有研究<sup>[15]</sup>发现: miR-411在肾癌中表达下调, 而上调其表达可通过抑制肿瘤细胞增殖、迁移并诱导细胞凋亡发挥抑癌作用。据文献<sup>[16]</sup>报道, 宫颈癌中miR-411表达下调, 而其过度表达可通过靶向调控信号转导和转录激活因子3在宫颈癌细胞的增殖和侵袭过程中发挥抑制作用。然而, miR-411在甲状腺癌中的作用及调控机制并不清楚。本研究结果显示miR-411在甲状腺癌组织和细胞中的表达水平明显降低, 这提示miR-411可能在甲状腺癌发生发展过程中发挥重要作用。本研究成功上调miR-411表达后发现: 甲状腺癌TPC-1细胞增殖和

侵袭能力均明显减弱。这提示miR-411可通过调控细胞增殖和侵袭在甲状腺癌恶性演变过程中发挥重要的抑制作用。

综上, 本研究观察到miR-411在100例甲状腺癌组织和3种甲状腺癌细胞中表达下调, 并初步揭示了miR-411表达上调具有抑制肿瘤细胞增殖和侵袭的作用, 该结果可为甲状腺癌的发生发展机制及靶向治疗提供新线索。

### 参考文献

- Sanabria A, Kowalski LP, Shah JP, et al. Growing incidence of thyroid carcinoma in recent years: factors underlying overdiagnosis[J]. *Head Neck*, 2018, 40(4): 855-866.
- 阎振蕾, 王玉君, 余红波, 等. 未分化型甲状腺癌相关基因的研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(22): 5736-5739.  
CHUANG Zhenlei, WANG Yujun, YU Hongbo, et al. Research progress of undifferentiated thyroid cancer related genes[J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2016, 36(22): 5736-5739.
- 张文涛. 难治性甲状腺癌靶向治疗的分子基础及治疗进展[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2018.  
ZHANG Wentao. Molecular basis and progress of targeted therapy for refractory thyroid cancer[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2018.
- Wang Y, Xu H, Si L, et al. MiR-206 inhibits proliferation and migration of prostate cancer cells by targeting CXCL11[J]. *Prostate*, 2018, 78(7): 479-490.
- Kiener M, Chen L, Krebs M, et al. miR-221-5p regulates proliferation and migration in human prostate cancer cells and reduces tumor growth in vivo[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 627.
- Luo B, Kang N, Chen Y, et al. Oncogene miR-106a promotes proliferation and metastasis of prostate cancer cells by directly targeting PTEN in vivo and in vitro[J]. *Minerva Med*, 2018, 109(1): 24-30.
- Guo L, Yuan J, Xie N, et al. miRNA-411 acts as a potential tumor suppressor miRNA via the downregulation of specificity protein 1 in breast cancer[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(4): 2975-2982.
- Zhao J, Xu J, Zhang R. MicroRNA-411 inhibits malignant biological behaviours of colorectal cancer cells by directly targeting PIK3R3[J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(2): 633-642.
- Xu N, Yang W, Liu Y, et al. MicroRNA-411 promoted the osteosarcoma progression by suppressing MTSS1 expression[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2018, 25(12): 12064-12071.
- Liu C, Su C, Chen Y, et al. MiR-144-3p promotes the tumor growth and metastasis of papillary thyroid carcinoma by targeting paired box gene 8[J]. *Cancer Cell Int*, 2018, 18(1): 54.

11. Liu ZM, Wu ZY, Li WH, et al. MiR-96-5p promotes the proliferation, invasion and metastasis of papillary thyroid carcinoma through down-regulating CCDC67[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(8): 3421-3430.
12. Ye X, Chen X. miR-149-5p inhibits cell proliferation and invasion through targeting GIT1 in medullary thyroid carcinoma[J]. Oncol Lett, 2019, 17(1): 372-378.
13. 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.
14. Zhang C, Wang H, Liu X, et al. Oncogenic microRNA-411 promotes lung carcinogenesis by directly targeting suppressor genes SPRY4 and TXNIP[J]. Oncogene, 2019, 38(11): 1892.
15. Zhang X, Zhang M, Cheng J, et al. MiR-411 functions as a tumor suppressor in renal cell cancer[J]. Int J Biol Markers, 2017, 32(4): 454-460.
16. Shan D, Shang Y, Hu T. MicroRNA-411 inhibits cervical cancer progression by directly targeting STAT3[J]. Oncol Res, 2019, 27(3): 349-358.

本文引用：陈芙蓉. 微小RNA-411抑制甲状腺癌细胞增殖和侵袭[J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(11): 2830-2835. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.11.005

**Cite this article as:** CHEN Furong. MicroRNA-411 inhibiting the proliferation and invasion of thyroid cancer cells[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2020, 40(11): 2830-2835. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.11.005