

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.12.003
文章编号: 1005-8982(2020)12-0013-09

lncRNA MIR31HG 对甲状腺乳头状癌细胞增殖、迁移、侵袭的影响及作用机制研究

彭书旺¹, 陈露阳²

(湖南中医药大学第一附属医院 胃肠甲状腺血管外科, 湖南 长沙 410007)

摘要: 目的 探究长链非编码 RNA (lncRNA) MIR31HG 对甲状腺乳头状癌 (PTC) 细胞增殖、迁移、侵袭的影响及可能的作用机制。**方法** 选取 2018 年 8 月—2019 年 4 月在湖南省中医药大学第一附属医院行甲状腺癌根治术的 48 例患者的新鲜癌组织及癌旁组织标本, 男女各 24 例。利用 TCGA 数据库验证 lncRNA MIR31HG 在甲状腺癌组织与癌旁组织中的表达, 患者术后病理报告确诊为 PTC, 提取样本 RNA 行 qRT-PCR 验证 lncRNA MIR31HG 在 PTC 组织与癌旁组织中表达情况及与患者临床病理特征的相关性; 利用 lncRNA MIR31HG 的小干扰 RNA 转染 PTC 细胞系 TPC-1 并验证抑制率, 保证抑制率 >60%, MTT 检测 TPC-1 细胞增殖能力, 细胞划痕实验和 Transwell 小室实验检测细胞迁移及侵袭能力, Western blotting 检测 Akt 信号通路关键蛋白分子 Akt、磷酸化 Akt (p-Akt)、PTEN 的表达。**结果** 宫颈鳞状细胞癌、乳头状肾细胞癌、头颈部鳞癌、胰腺癌及甲状腺癌组织 lncRNA MIR31HG 相对表达量较癌旁组织高 ($P < 0.05$), 膀胱癌、前列腺癌组织较癌旁组织低 ($P < 0.05$)。PTC 组织 lncRNA MIR31HG 相对表达量较癌旁组织高 ($P < 0.05$)。TPC-1、K1 及 BCPAP 的 lncRNA MIR31HG 相对表达量较 Nthy-ori 3-1 高 ($P < 0.05$), 且 TPC-1 相对表达量最高。实验组 lncRNA MIR31HG 相对表达量均较 siRNA-NC 组下降 ($P < 0.05$), 其中 siRNA-1 组与 siRNA-3 组沉默效率均 >60%。各组 OD 值比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。siRNA-1 组与 siRNA-3 组划痕愈合率较 siRNA-NC 组低 ($P < 0.05$)。siRNA-1 组、siRNA-3 组侵袭至 Transwell 小室下室的细胞数较 siRNA-NC 组低 ($P < 0.05$)。siRNA-1 组、siRNA-3 组 PTEN mRNA 和蛋白较 siRNA-NC 组升高 ($P < 0.05$), 且 siRNA-3 组最高; siRNA-1 组、siRNA-3 组 p-Akt 蛋白较 siRNA-NC 组低, 且 siRNA-3 组最低 ($P < 0.05$)。**结论** lncRNA MIR31HG 在 PTC 组织中高表达并与 PTC 患者肿瘤分期有关; 下调 lncRNA MIR31HG 的表达可以抑制 TPC-1 细胞增殖、迁移及侵袭能力, 其机制可能与 lncRNA MIR31HG 抑制 PTEN 表达从而激活 Akt 通路有关。

关键词: 癌, 乳头状; 甲状腺; 长链非编码 RNA/ 核糖核酸酶类

中图分类号: R736.1

文献标识码: A

Effect and mechanism of lncRNA MIR31HG on proliferation, migration and invasion of TPC-1 cell line

Shu-wang Peng¹, Lu-yang Chen²

(Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

Abstract: Objective To explore the effects of long-chain non-coding MIR31HG on cell proliferation, migration and invasion of papillary thyroid carcinoma (PTC) cells and its possible mechanisms. **Methods** Fresh specimens were collected from 48 patients (male: 24 females, females: 24 patients), all of them were confirmed as

收稿日期: 2019-12-16

[通信作者] 陈露阳, 461392742@qq.com; Tel: 15273172084

PTC by postoperative pathological report. TCGA database was used to verify the expression of lncRNA MIR31HG in thyroid carcinoma and paracancerous tissues; the specimens RNA was extracted and qRT-PCR was used to verify the expression of lncRNA MIR31HG in PTC tissues and paracancerous tissues. Then we transfected PTC cell line TPC-1 with small interfering RNAs of lncRNA MIR31HG and verified transfection efficiency, ensured the inhibition rate of lncRNA MIR31HG was above 60%. The proliferation ability of TPC-1 cells was detected by MTT colorimetric assay. Cell migration and invasion ability were detected by cell scratch assay and transwell chamber assay. Western blotting was used to detect the expression of key protein molecules Akt, phosphorylated Akt (p-Akt) and PTEN in Akt signaling pathway. **Results** The relative expression of lncRNA MIR31HG in cervical squamous cell carcinoma, papillary renal cell carcinoma, head and neck squamous cell carcinoma, pancreatic carcinoma and thyroid carcinoma was higher than that in paracancerous tissues ($P < 0.05$), while that in bladder cancer and prostate cancer was lower than that in paracancerous tissues ($P < 0.05$). The relative expression of lncRNA MIR31HG in PTC tissue was higher than that in paracancerous tissue ($P < 0.05$). The relative expression of MIR31HG in TPC-1, K1 and BCPAP was higher than that in Nthy-ori 3-1 ($P < 0.05$), and the relative expression of TPC-1 was the highest. The relative expression of lncRNA MIR31HG in experimental group was lower than that in siRNA-NC group ($P < 0.05$), and the silencing efficiency of siRNA-1 group and siRNA-3 group was more than 60%. There was statistical significance in OD value of each group ($P < 0.05$). The scratch healing rate of siRNA-1 group and siRNA-3 group was lower than that of siRNA-NC group ($P < 0.05$). The number of cells invading the subventricular space of Transwell in siRNA-1 and siRNA-3 groups was lower than that in siRNA-nc group ($P < 0.05$). PTEN mRNA and protein in siRNA-1 group and siRNA-3 group were higher than those in siRNA-NC group ($P < 0.05$), and the highest in siRNA-3 group; p-Akt protein in siRNA-1 group and siRNA-3 group was lower than that in siRNA-NC group, and the lowest in siRNA-3 group ($P < 0.05$). **Conclusions** lncRNA MIR31HG is highly expressed in PTC tissues and positively correlated with tumor stage in PTC patients; inhibition of lncRNA MIR31HG expression can inhibit the proliferation ability, migration ability and invasion ability of TPC-1 cell. Its mechanism may be related to the inhibition of PTEN expression by lncRNA MIR31HG to activate the Akt pathway.

Keywords: cancer, papillary; thyroid; long-chain non-coding rna / ribonucleases

甲状腺癌是最常见的恶性肿瘤之一，居恶性肿瘤发病率的第 7 位，在女性中居第 4 位，是增长最快的恶性肿瘤之一^[1-3]。甲状腺癌术后预后较好，但仍有约 30% 患者出现复发转移，因此探索甲状腺癌复发转移的机制具有重要意义^[4-5]。MIR31HG 在不同癌症中作用不同，YANG 等^[6]发现 MIR31HG 在胰腺导管癌中发挥促癌作用。而 YAN 等^[7]发现 MIR31HG 在肝细胞癌中发挥抑癌作用。目前尚未有研究报道 MIR31HG 在甲状腺癌中的作用。本研究拟通过临床资料分析及体外实验研究 MIR31HG 在甲状腺癌中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选取 2018 年 8 月—2019 年 4 月在湖南省中医药大学第一附属医院行甲状腺癌根治术的 48 例患者的新鲜癌组织及癌旁组织标本，男女各 24 例。人永生生化正常甲状腺细胞系 Nthy-ori 3-1、人甲状腺乳头状癌 (papillary carcinoma of thyroid, PTC) 细胞系 TPC-1、K1 及 BCPAP 由湖南省中医药大学基础医学院实

验室馈赠，Trizol RNA 提取试剂、RNA 保护液及转染试剂 Lipofectamine 2000 均购自美国 Thermo Fisher 公司，RNA 逆转录试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司，qRT-PCR 试剂盒购自上海翊圣生物科技有限公司，BCA 法蛋白浓度检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司，PTEN 抗体 (ab32199) 购自美国 Abcam 公司，pan-Akt 抗体 (#4685)、p-Akt (Ser473) 抗体 (#4060) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司，内参 GAPDH (10494-1-AP) 抗体、鼠二抗及兔二抗购自美国 Proteintech 公司，RPMI 1640 无血清培养基及 FBS 购自以色列 Biological Industries 公司，lncRNA MIR31HG 小干扰 RNA 序列及对照序列由广州锐博生物技术有限公司合成，lncRNA MIR31HG 引物及内参 Actin 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 数据库分析 笔者利用 GEPIA 在线数据库 (<http://gepia.cancer-pku.cn>) 分析 lncRNA MIR31HG 在各种癌症及甲状腺癌中的表达。其数据主要来源于

TCGA 和 GTEx project 数据库。

1.2.2 RNA 提取 选取患者癌组织及癌旁组织标本, 并剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 小块放入 RNA 保护液中防止 RNA 降解, 标本立即放入液氮冷冻保存, 选取患者组织标本提取 RNA, 提取前先液氮预冷研钵, 在研钵中将组织磨成粉末, 加入 Trizol RNA 提取试剂裂解细胞, 参照 Trizol 说明书分步提取组织 RNA, 并测定 RNA 浓度, 选取 OD260/OD280 在 1.9 ~ 2.1 的 RNA 进行后续实验, 保证 RNA 的完整性, 参照逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录合成 cDNA, 细胞样本 RNA 提取方法同上, 提取的 RNA 置于 -80℃ 保存。

1.2.3 qRT-PCR 采用常规 Trizol 法分别提取癌组织、癌旁组织样本和 Nthy-ori 3-1、TPC-1、K1 及 BCPAP 细胞系总 RNA, 参照逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录成 cDNA, 参照 qRT-PCR 试剂盒说明书采用 qPCR 二步法进行实验, 反应条件: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 10 s, 60℃ 退火及延伸 30 s, 共计 40 个循环。利用 β -actin 作为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 lncRNA MIR31HG 在不同样本中的相对表达量。lncRNA MIR31HG 正向引物: 5'-TATATCAGCATCCACAACCT-3', 长度 20 bp; 反向引物: 5'-GCCAACCAACAAGCATT-3', 长度 18 bp; β -actin 正向引物: 5'-TGCCTGACATTAAGGAGAA-3', 长度 19 bp; 反向引物: 5'-AAGGAA GGCTGGAAGAGT-3', 长度 18 bp。将癌旁组织样本或 Nthy-ori 3-1 细胞系相对表达量设为 1, 计算癌组织、TPC-1、K1 及 BCPAP 中 lncRNAMIR31HG 表达情况, 实验重复 3 次, 取平均值。

1.2.4 细胞培养 将 Nthy-ori 3-1、TPC-1、K1 及 BCPAP 细胞系培养于含 10% FBS、1% 100 μ g/ml 青霉素及 100 μ g/ml 链霉素的 RPMI 1640 完全培养基中, 置于 37℃、5% 二氧化碳细胞培养箱中培养。

1.2.5 细胞转染及分组 将 TPC-1 细胞胰酶消化并接种于 6 孔板内, 待第 2 天细胞融合度为 70% ~ 90%, 参照 Lipofectamine 2000 Transfection Reagent 说明书, 转染 3 条 lncRNA MIR31HG siRNA 作为实验组, 分别为 siRNA-1、siRNA-2 及 siRNA-3 组。将作为对照的 siRNA-NC 组转染 24 h 后, 提取细胞 RNA 样本, qRT-PCR 验证 lncRNA MIR31HG 的抑制效率, 保证 lncRNA MIR31HG 抑制率 >60%, 用于后续实验研究。lncRNA MIR31HG siRNA-1 (序列: 5'-UUCAACUUCUCACACAAAGCG-3', 屏蔽序列

位置为 751 ~ 773, 共 22 个核苷酸)、siRNA-2 (序列: 5'-UCAACUUCUCACACAAAGCGC-3', 屏蔽序列位置为 784 ~ 806, 共 22 个核苷酸)、siRNA-3 (序列: 5'-AAAAGCAUCCUGAUUUCUCAA-3', 屏蔽序列位置为 1 032 ~ 1 054, 共 22 个核苷酸) 及相应阴性对照序列 3 条 siRNA 均可以靶向 lncRNA MIR31HG 的 4 个转录本 (Accession Number 为 NR_027054.2、NR_152877.1、NR_152878.1 和 NR_152879.1)。

1.2.6 MTT 检测细胞增殖能力 TPC-1 细胞转染 lncRNA MIR31HG 小干扰 RNA siRNA-1、siRNA-3 及阴性对照序列 24 h 后, 收集对数期生长的实验组及 siRNA-NC 组细胞, 调整细胞浓度, 取 100 μ l 接种于 96 孔板, 保证每孔约 2 000 个细胞 (5×10^5 个/ml), 分别于培养 0、24、48、72 及 96 h 后更换培养基, 每孔 100 μ l, 向每孔加入 10 μ l MTT 工作液, 继续培养 4 h, 小心吸掉上清, 每孔加入 100 μ l 二甲基亚砜 37℃ 孵育 10 min, 使结晶物充分溶解。在 570 nm 波长处利用酶标仪测定各孔 OD 值, 实验重复 3 次, 取平均值并绘制增殖曲线。

1.2.7 划痕实验检测细胞迁移能力 预先用 Marker 笔在 6 孔板背后每隔 0.5 cm 划一道横线。培养各组细胞至对数期, 按每孔 5×10^5 个/ml 接种入 6 孔板, 37℃ 细胞培养箱内培养过夜, 待第 2 天细胞刚好铺满, 用 20 μ l 枪头抵住直尺, 垂直于横线进行划痕, PBS 洗 2 次, 分别加入无血清培养基, 于 100 倍镜下拍照, 记录 0 h 划痕位置及宽度, 继续培养 24 h 后, 在 100 倍镜下选取与 0 h 同一位置视野进行拍照, 测定细胞迁移距离, 计算划痕愈合率, 计算公式: 愈合率 = (0 h 划痕宽度 - 24 h 划痕宽度) / (0 h 划痕宽度), 实验重复 3 次, 取平均值。

1.2.8 Transwell 实验检测细胞侵袭能力 将生长于对数期的实验组及 siRNA-NC 组细胞用胰酶消化并吹打均匀, 1 000 r/min 离心 3 min, 用不含血清的 RPMI 1640 培养基重悬细胞, 细胞计数并将细胞密度调整至 2×10^4 个/ml, 取 200 μ l 细胞悬液接种于 Transwell 小室上室, 下室加入含 10% FBS 的完全培养基, 培养 24 h 后用 PBS 轻洗 2 遍, 甲醇固定细胞, 用棉签小心擦拭掉上室细胞, 0.1% 结晶紫溶液染色, 染色 30 min 后显微镜下 100 倍视野观察, 分别取左上、左下、右上、右下及中间共 5 个视野, 计算穿膜细胞数, 实验重复 3 次, 取平均值。

1.2.9 Western blotting 提取 siRNA-1 组、siRNA-3

组及 siRNA-NC 组细胞总 RNA 及蛋白, 用 qRT-PCR 反应验证 PTEN 及 Akt 的表达, 重复 3 次, 每次将 siRNA-NC 组表达量设置为 1, 计算实验组 PTEN 及 Akt 相对表达量。Western blotting 检测蛋白相对表达量, BCA 法测定蛋白浓度, 各取 40 mg 蛋白加入上样缓冲液, 100℃煮 5 min 变性, 10% SDS-PAGE 电泳胶上样, 电泳条件: 浓缩胶 80 V 至蛋白 Marker 分离后, 加大电压到 120 V 至溴酚蓝跑至胶底; 转膜条件: 恒压 100 V 转 90 min, 含 5% 脱脂奶粉的 TBST 工作液室温封闭 1 h, 加入一抗, 4℃过夜, TBST 洗 3 遍, 5 min/次, 二抗室温孵育 1 h, ECL 液显影, 并计算灰度值, 每次将 siRNA-NC 组表达量设置为 1, 计算实验组 PTEN、Akt 及 p-Akt 相对表达量, 实验重复 3 次, 取平均值。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件。计量资料以

均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 t 检验、单因素方差分析或重量复测量设计的方差分析, 进一步两两比较用 LSD- t 检验; 计数资料以构成比表示, 比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

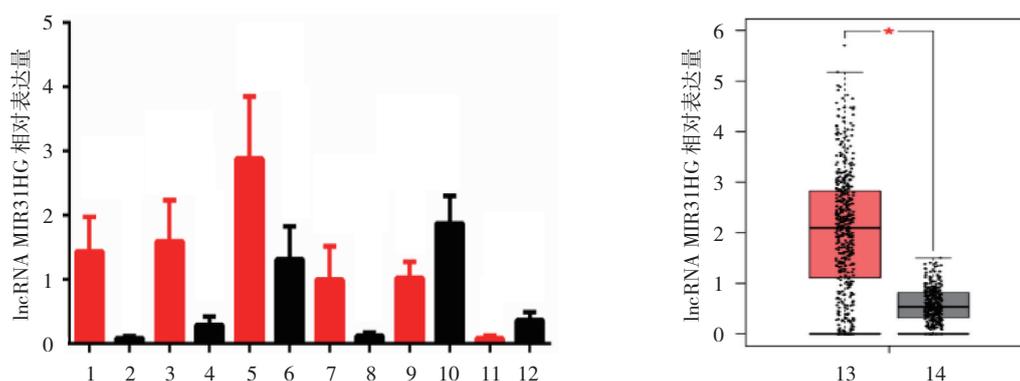
2 结果

2.1 不同癌组织及癌旁组织 lncRNA MIR31HG 相对表达量比较

GEPIA 数据库在线分析显示, 宫颈鳞状细胞癌、乳头状肾细胞癌、头颈部鳞癌、胰腺癌、甲状腺癌、膀胱癌及前列腺癌组织与癌旁组织 lncRNA MIR31HG 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 宫颈鳞状细胞癌、乳头状肾细胞癌、头颈部鳞癌、胰腺癌及甲状腺癌组织较癌旁组织高, 膀胱癌、前列腺癌组织较癌旁组织低。见表 1 和图 1。

表 1 不同癌组织及癌旁组织 lncRNA MIR31HG 相对表达量比较 ($n=48, \bar{x} \pm s$)

类型	宫颈鳞状细胞癌	乳头状肾细胞癌	头颈部鳞癌	胰腺癌	甲状腺癌	膀胱癌	前列腺癌
癌组织	1.433 ± 0.541	1.592 ± 0.644	2.883 ± 0.963	0.997 ± 0.523	2.010 ± 0.880	1.024 ± 0.248	0.081 ± 0.042
癌旁组织	0.084 ± 0.036	0.294 ± 0.128	1.314 ± 0.514	0.124 ± 0.051	0.551 ± 0.282	1.875 ± 0.427	0.364 ± 0.127
t 值	8.976	15.530	10.670	21.730	29.450	10.424	27.011
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000



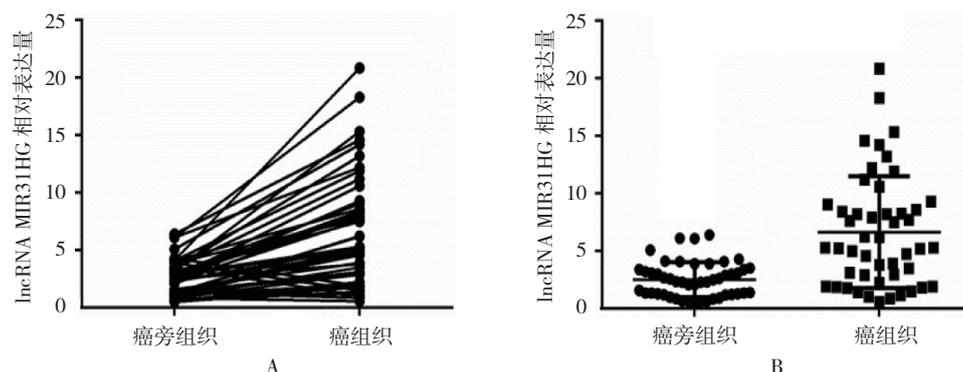
1: 宫颈鳞状细胞癌; 2: 宫颈癌旁组织; 3: 乳头状肾细胞癌; 4: 乳头状肾癌旁组织; 5: 头颈部鳞癌; 6: 头颈部癌旁组织; 7: 胰腺癌; 8: 胰腺癌旁组织; 9: 膀胱癌; 10: 膀胱癌旁组织; 11: 前列腺癌; 12: 前列腺癌旁组织; 13: 甲状腺癌; 14: 甲状腺癌旁组织。

图 1 不同癌组织及癌旁组织 lncRNA MIR31HG 相对表达量比较 ($n=48, \bar{x} \pm s$)

2.2 PTC 组织与癌旁组织 lncRNA MIR31HG 相对表达量比较

PTC 组织与癌旁组织 lncRNA MIR31HG 相对表达量分别为 (6.650 ± 0.700) 和 (2.515 ± 0.221), 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=5.635, P=0.000$), PTC 组

组织较癌旁组织高 (见图 2)。以 lncRNA MIR31HG 中位表达量为界, 将患者分为高表达组和低表达组, 各 24 例, 高表达组与低表达组患者肿瘤大小、肿瘤分期及淋巴结转移比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (见表 2)。



A: PTC 及癌旁组织 lncRNA MIR31HG 相对表达量; B: PTC 及癌旁组织 lncRNA MIR31HG 相对表达量散点图。

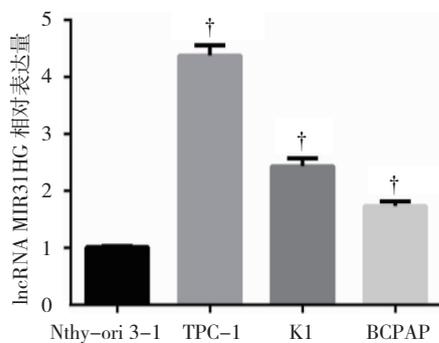
图 2 PTC 组织与癌旁组织 lncRNA MIR31HG 相对表达量比较

表 2 lncRNA MIR31HG 在 PTC 组织与癌旁组织的相对表达量比较 (n=24)

组别	年龄 / (岁, $\bar{x} \pm s$)	男 / 女 / 例	肿瘤大小 / 例		肿瘤分期 / 例		淋巴结转移 / 例	
			<2 cm	≥ 2 cm	T ₁ 、T ₂ 期	T ₃ 、T ₄ 期	N ₀ 期	N ₁ 期
高表达组	40.25 ± 11.09	11/13	5	19	11	13	7	17
低表达组	42.66 ± 13.76	13/11	16	8	19	5	14	10
t/ χ^2 值	0.668	0.333	10.243		5.689		4.148	
P 值	0.507	0.773	0.001		0.017		0.042	

2.3 不同 PTC 细胞系 lncRNA MIR31HG 相对表达量比较

将甲状腺正常细胞系 Nthy-ori 3-1 的 lncRNA MIR31HG 相对表达量设为 (1.00 ± 0.00), PTC 细胞系 TPC-1、K1 及 BCPAP 的 lncRNA MIR31HG 相对表达量分别为 (2.43 ± 0.08)、(1.74 ± 0.05) 和 (4.38 ± 0.11), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=431.300$, $P=0.000$), TPC-1、K1 及 BCPAP 较 Nthy-ori 3-1 高, 且 TPC-1 相对表达量最高。见图 3。

† 与 Nthy-ori 3-1 比较, $P < 0.05$ 。图 3 不同 PTC 细胞系 lncRNA MIR31HG 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

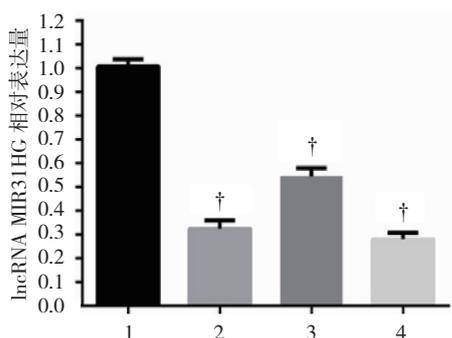
2.4 lncRNA MIR31HG 基因沉默对 TPC-1 细胞增殖能力的影响

2.4.1 沉默效率验证 将 siRNA-NC 组 lncRNA MIR31HG 相对表达量设为 (1.000 ± 0.000), siRNA-1 组、siRNA-2 组及 siRNA-3 组分别为 (0.320 ± 0.020)、(0.540 ± 0.021) 和 (0.280 ± 0.015), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F=330.300$, $P=0.000$), 实验组均较 siRNA-NC 组下降, 其中 siRNA-1 组与 siRNA-3 组沉默效率均 >60% (见图 4), 因此选取 siRNA-1 与 siRNA-3 小干扰 RNA 用于后续实验研究。

2.4.2 细胞活力验证 siRNA-NC 组、siRNA-1 组、siRNA-3 组 0、24、48、72 及 96 h 的 OD 值比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点的 OD 值比较, 差异有统计学意义 ($F=14 192.911$, $P=0.000$); ②各组 OD 值比较, 差异有统计学意义 ($F=3 661.345$, $P=0.000$); ③各组 OD 值变化趋势比较, 差异有统计学意义 ($F=2 374.012$, $P=0.000$)。lncRNA MIR31HG 沉默可明显降低 TPC-1 的增殖能力。见表 3 和图 5。

2.5 lncRNA MIR31HG 基因沉默对 TPC-1 细胞迁移及侵袭能力的影响

siRNA-NC 组、siRNA-1 组及 siRNA-3 组 24 h 划



1: siRNA-NC 组; 2: siRNA-1 组; 3: siRNA-2 组; 4: siRNA-3 组。† 与 siRNA-NC 组比较, $P < 0.05$ 。

图 4 各组 lncRNA MIR31HG 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

表 3 各组不同时间点 OD 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
siRNA-NC 组	0.205 ± 0.003	0.355 ± 0.033	0.643 ± 0.032	1.251 ± 0.033	2.176 ± 0.055
siRNA-1 组	0.206 ± 0.005	0.275 ± 0.003	0.453 ± 0.006	0.791 ± 0.005	1.226 ± 0.015
siRNA-3 组	0.206 ± 0.002	0.266 ± 0.004	0.404 ± 0.009	0.686 ± 0.007	1.128 ± 0.015

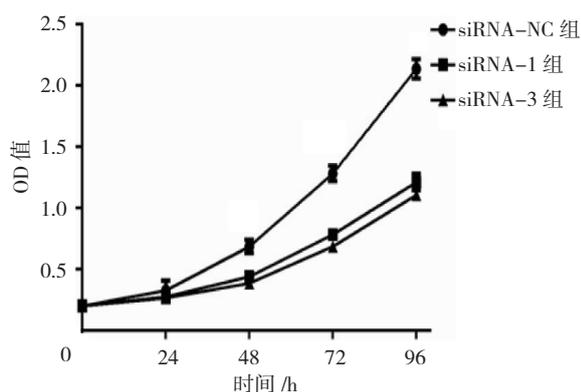


图 5 各组不同时间点 OD 值变化趋势 ($\bar{x} \pm s$)

痕愈合率分别为 (74.7 ± 0.91) %、(36.1 ± 1.13) % 和 (20.53 ± 1.60) %，经单因素方差分析，差异有统计学意义 ($F = 442.700, P = 0.000$)；siRNA-1 组与 siRNA-3 组较 siRNA-NC 组降低，表明 lncRNA MIR31HG 沉默可明显降低 TPC-1 细胞的迁移能力。见图 6、7。

siRNA-NC 组、siRNA-1 组及 siRNA-3 组侵袭至 Transwell 小室下室的细胞数分别为 (423.00 ± 11.93)、(240.00 ± 12.10) 和 (224.00 ± 9.45) 个，经单因素方差分析，差异有统计学意义 ($F = 97.200, P = 0.000$)；siRNA-1 组、siRNA-3 组较 siRNA-NC 组降低，表明 lncRNA MIR31HG 沉默可明显抑制 TPC-1 细胞的侵袭能力。见图 8、9。

2.6 lncRNA MIR31HG 基因沉默对 Akt 信号通路的影响

各组 PTEN mRNA、PTEN 蛋白及 p-Akt 蛋白相对表达量比较，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)；siRNA-1 组、siRNA-3 组 PTEN mRNA 和蛋白相对表达量较 siRNA-NC 组升高，且 siRNA-3 组最高；siRNA-1 组、siRNA-3 组 p-Akt 蛋白较 siRNA-NC 组降低，且 siRNA-3 组最低。各组 Akt mRNA 和蛋白相对表达量比较，差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) 表明 lncRNA MIR31HG 沉默可明显升高 PTEN 基因的表达，从而抑制 Akt 的磷酸化。见表 4 和图 10。

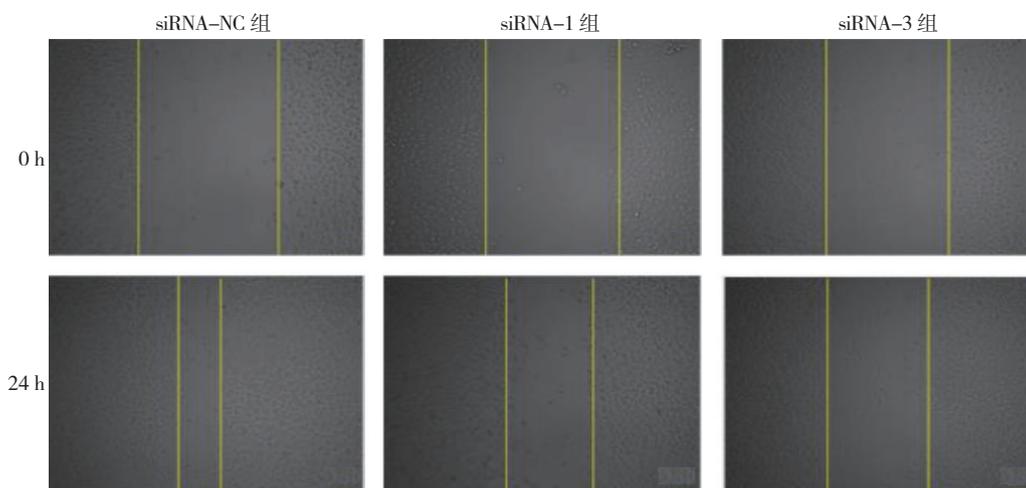
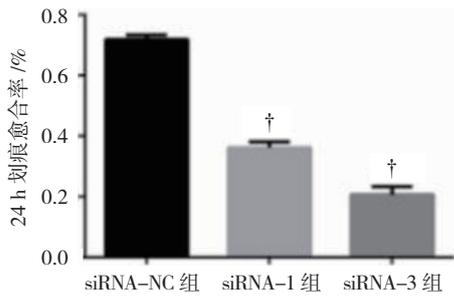
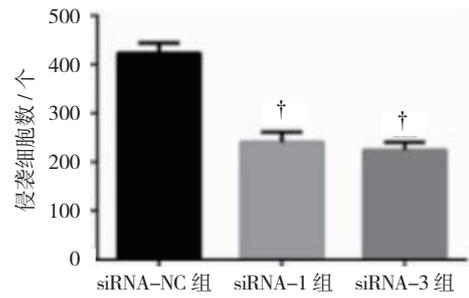


图 6 各组细胞划痕实验结果 ($\times 100$)



†与 siRNA-NC 组比较, $P < 0.05$ 。

图 7 各组细胞 24 h 划痕愈合率比较 ($\bar{x} \pm s$)



†与 siRNA-NC 组比较, $P < 0.05$ 。

图 8 各组侵袭细胞数比较 ($\bar{x} \pm s$)

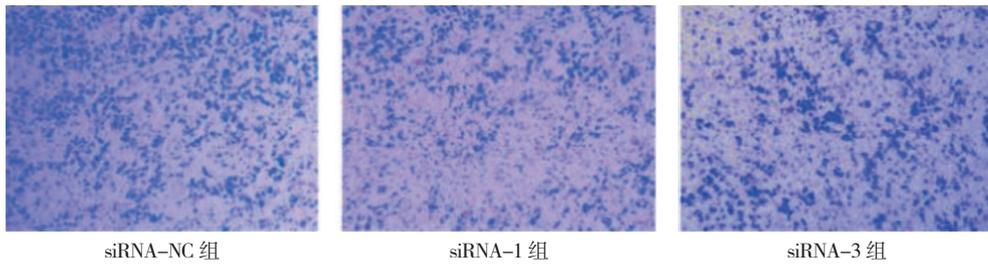
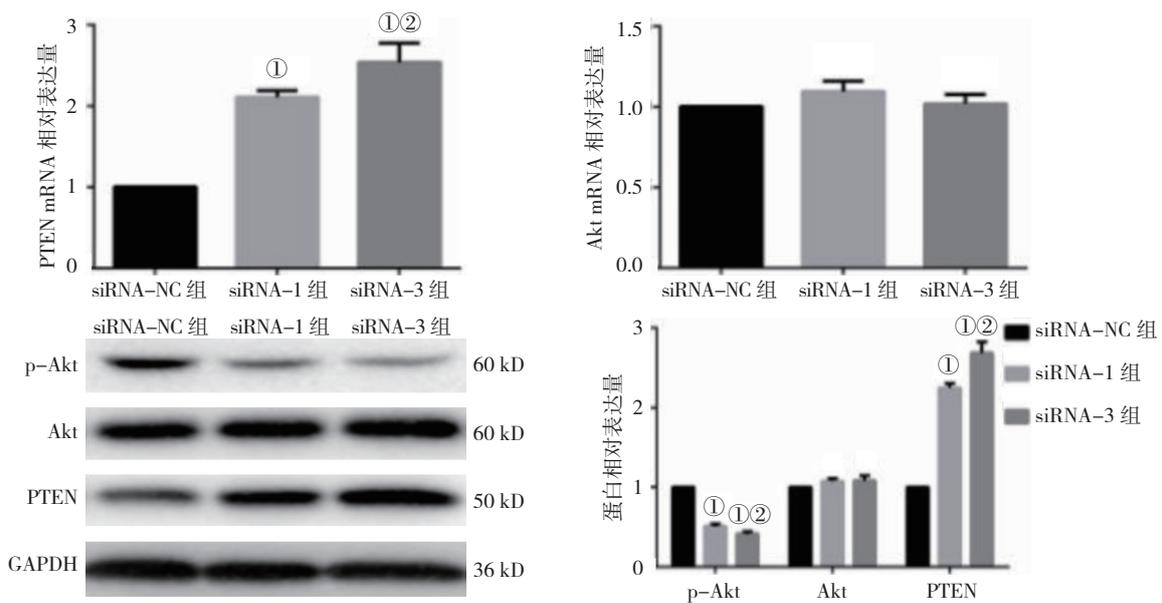


图 9 各组 Transwell 小室侵袭实验结果 ($\times 100$)

表 4 各组 PTEN、Akt 及 p-Akt mRNA 和蛋白的相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	PTEN mRNA	PTEN 蛋白	Akt mRNA	Akt 蛋白	p-Akt 蛋白
siRNA-NC 组	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
siRNA-1 组	2.107 ± 0.047 ^①	2.247 ± 0.035 ^①	1.093 ± 0.038	1.077 ± 0.019	0.510 ± 0.017 ^①
siRNA-3 组	2.537 ± 0.136 ^{①②}	2.683 ± 0.081 ^{①②}	1.017 ± 0.034	1.083 ± 0.035	0.413 ± 0.019 ^{①②}
F 值	91.290	295.200	2.909	4.049	460.600
P 值	0.000	0.000	0.131	0.077	0.000

注: ①与 siRNA-NC 组比较, $P < 0.05$; ②与 siRNA-1 组比较, $P < 0.05$ 。



①与 siRNA-NC 组比较, $P < 0.05$; ②与 siRNA-1 组比较, $P < 0.05$ 。

图 10 lncRNA MIR31HG 基因沉默对 Akt 信号通路的影响

3 讨论

有研究发现多种 lncRNA 的异常表达与甲状腺癌的发生、发展密切相关^[8-10]。虽然 lncRNA 没有开放阅读框,不能编码蛋白,但其通过调控基因表达、翻译后修饰、蛋白稳定性及活性等方式在细胞功能的调控上发挥重要作用。越来越多的研究表明 lncRNA 的异常表达在肿瘤的发生、发展中发挥了重要作用, lncRNA 通过吸附 miRNA 形成 ceRNA,从而调控基因的表达是其发挥作用的主要机制之一^[11-12]。

lncRNA MIR31HG 是 miR-31 的宿主基因,在多种肿瘤中表达异常,有研究发现 lncRNA MIR31HG 在肺癌中高表达,并与患者的不良预后密切相关^[13]。其通过与 miRNA-214 结合,调控下游基因表达,从而调控非小细胞肺癌的侵袭、转移^[14]。ZHENG 等^[15]发现 lncRNA MIR31HG 还可以通过 Wnt/ β -catenin 信号通路来调控肺癌的侵袭、转移。WANG 等^[16]发现 lncRNA MIR31HG 可以通过激活 EGFR/PI3K/Akt 信号通路增加非小细胞肺癌对吉非替尼的耐药性。lncRNA MIR31HG 的高表达在胰腺癌、口腔癌等癌症中同样发挥了促进肿瘤增殖、侵袭及迁移的作用^[6, 17]。然而也有研究发现在肝癌、胃癌及食管鳞状细胞癌中, lncRNA MIR31HG 与肿瘤的临床分期及预后密切相关,其表达下调可抑制肿瘤的发生、发展^[7, 18-19]。lncRNA MIR31HG 在 PTC 的作用及机制尚未有报道。

本研究通过数据库分析 TCGA 病例资料,结合笔者收集的病例资料发现,PTC 组织 lncRNA MIR31HG 相对表达量较癌旁组织升高,其表达水平与患者肿瘤大小、肿瘤分期及淋巴结转移情况关系密切。在体外细胞实验中笔者发现, lncRNA MIR31HG 的沉默抑制了 TPC-1 细胞系的增殖及迁移、侵袭能力。

为进一步探究 lncRNA MIR31HG 在 PTC 发生、发展中的作用及机制,笔者通过文献阅读发现 lncRNA MIR31HG 可以激活 Akt 通路^[19]。笔者通过在线数据库 miRDB (www.mirdb.org) 及 miRBase (www.mirbase.org) 等网站发现 miRNA-575 及 miRNA-214 可以靶向 *PTEN* 基因的 3'UTR,调控 *PTEN* 基因的表达。*PTEN* 基因作为抑癌基因,在 Akt 去磷酸化、抑制 Akt 活化及 Akt 下游通路的激活方面具有重要作用。本实验发现 lncRNA MIR31HG 沉默可明显高 *PTEN* 基因的表达,但对 Akt 表达无明显影响,然而沉默 lncRNA MIR31HG 后 p-Akt 的表达明显下降,表明 lncRNA

MIR31HG 沉默可能靶向调控 *PTEN* 的表达,从而抑制 Akt 通路的活化。

综上所述, lncRNA MIR31HG 在 PTC 组织及细胞系中高表达,与患者肿瘤大小及淋巴结转移密切相关,下调 lncRNA MIR31HG 可以抑制 TPC-1 细胞的增殖、迁移及侵袭能力,其机制可能与 lncRNA MIR31HG 通过吸附 miRNA 形成 ceRNA 调控 *PTEN* 表达,从而调控 Akt 通路的活化相关。lncRNA MIR31HG 可作为 PTC 潜在的预后标志物及治疗靶点。

参考文献:

- [1] 郑荣寿,孙可欣,张思维,等.2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析[J].中华肿瘤杂志,2019,41(1):19-28.
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2017[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(3): 177-193.
- [3] NIEDZIELA M. Thyroid nodules[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2014, 28 (2): 245-277.
- [4] LUSTER M, WEBER T, VERBURG F A. Differentiated thyroid cancer-personalized therapies to prevent overtreatment[J]. Nat Rev Endocrinol, 2014, 10(9): 563-574.
- [5] HAUGEN B R, ALEXANDER E K, BIBLE K C, et al. 2015 American thyroid association management guidelines for adult patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: the american thyroid association guidelines task force on thyroid nodules and differentiated thyroid cancer[J]. Thyroid, 2016, 123(3): 372-381.
- [6] YANG H, LIU P, ZHANG J, et al. Long noncoding RNA MIR31HG exhibits oncogenic property in pancreatic ductal adenocarcinoma and is negatively regulated by miR-193b[J]. Oncogene, 2016, 35(28): 3647-3657.
- [7] YAN S Y, TANG Z R, CHEN K, et al. Long noncoding RNA MIR31HG inhibits hepatocellular carcinoma proliferation and metastasis by sponging microRNA-575 to modulate ST7L expression[J]. J Exp Cancer Res, 2018, 37(1): 214.
- [8] MURUGAN A K, MUNIRAJAN A K, ALZHRANI A S. Long noncoding RNAs: emerging players in thyroid cancer pathogenesis[J]. Endocr Relat Cancer, 2018, 25(2): R59-R82.
- [9] HUANG J K, MA L, SONG W H, et al. lncRNA-MALAT1 promotes angiogenesis of thyroid cancer by modulating tumor-associated macrophage FGF2 protein secretion[J]. Biochem, 2017, 118(12): 4821-4830.
- [10] SUI F, JI M J, HOU P. Long non-coding RNAs in thyroid cancer: Biological functions and clinical significance[J]. Mol Cell Endocrinol, 2018, 4(69): 11-22.
- [11] BHAN A, SOLEIMANI M, MANDAL S S. Long noncoding RNA and cancer: a new paradigm[J]. Long Cancer Res, 2017, 77(15): 3965-3981.
- [12] PARASKEVOPOULOU M D, HATZIGEORGIOU A G. Analyzing miRNA-lncRNA interactions[J]. Methods Mol Biol,

- 2016, 14(2): 271-286.
- [13] QIN J B, NING H C, ZHOU Y, et al. lncRNA MIR31HG overexpression serves as poor prognostic biomarker and promotes cells proliferation in lung adenocarcinoma[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 9(9): 363-368.
- [14] WU D D, CHEN J J, HE H Y, et al. Long noncoding RNA MIR31HG is activated by SP1 and promotes cell migration and invasion by sponging miR-214 in NSCLC[J]. *Gene*, 2019, 6(92): 223-230.
- [15] ZHENG S, ZHANG X, WANG X, et al. MIR31HG promotes cell proliferation and invasion by activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway in non-small cell lung cancer[J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(1): 221-229.
- [16] WANG B, JIANG H, WANG L M, et al. Increased MIR31HG lncRNA expression increases gefitinib resistance in non-small cell lung cancer cell lines through the EGFR/PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(5): 3394-3500.
- [17] SHIH J W, CHIANG W F, WU A T H, et al. Long noncoding RNA LncHIFCAR/MIR31HG is a HIF-1 α co-activator driving oral cancer progression[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: DOI: 10.1038/ncomms15874.
- [18] NIE F Q, MA S, XIE M, et al. Decreased long noncoding RNA MIR31HG is correlated with poor prognosis and contributes to cell proliferation in gastric cancer[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(6): 7693-7701.
- [19] REN Z P, CHU X Y, XUE Z Q, et al. Down-regulation of lncRNA MIR31HG correlated with aggressive clinicopathological features and unfavorable prognosis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(17): 3866-3870.

(李科 编辑)

本文引用格式: 彭书旺, 陈露阳. lncRNA MIR31HG 对甲状腺乳头状癌细胞增殖、迁移、侵袭的影响及作用机制研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(12): 13-21.