



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2022.05.007
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2022.05.007
Chinese Journal of General Surgery, 2022, 31(5):619-630.

· 甲状腺疾病专题研究 ·

甲状腺乳头状癌细胞中长链非编码RNA FoxP4-AS1的表达及其生物学功能

杨惠芳¹, 汤蕊², 罗雪^{1,3}, 高庆军³, 陈星宏¹, 赵代伟^{1,4}

(1. 贵州医科大学临床医学院, 贵州 贵阳 550000; 2. 贵州省毕节市第一人民医院 甲状腺外科, 贵州 毕节 551700; 3. 贵州医科大学附属医院 甲状腺外科, 贵州 贵阳 550000; 4. 贵州省第二人民医院 甲状腺外科, 贵州 贵阳 550004)

摘要

背景与目的: 笔者前期研究发现, 长链非编码RNA FoxP4-AS1 (lncRNA FoxP4-AS1) 在甲状腺乳头状癌(PTC)组织中异常表达, 其低表达是PTC区域淋巴结转移的独立危险因素, 但其功能及作用机制尚不清楚。因此, 本研究探讨lncRNA FoxP4-AS1在PTC细胞中的表达, 初步分析其对PTC细胞生物学行为的影响。

方法: 用qRT-PCR检测PTC细胞系(TPC-1、K1细胞)和正常甲状腺滤泡上皮细胞(Nthy-ori3-1细胞)中lncRNA FoxP4-AS1的表达; 将TPC-1、K1细胞分别转染FoxP4-AS1过表达慢病毒载体和空载病毒载体(阴性对照)后, 并分别用CCK-8实验、克隆形成实验、EdU、Transwell实验、流式细胞术分析细胞生物学功能的变化; 通过GEPIA数据库和LncTar网站预测FoxP4-AS1的靶基因, 并用Western blot进行验证。用以上转染后的细胞构建小鼠皮下移植瘤模型, 观察移植瘤的生长情况, 免疫组化检测瘤组织Ki-67的表达。通过KEGG数据库初步分析FoxP4-AS1可能影响的信号通路。

结果: qRT-PCR结果显示, 与正常甲状腺滤泡上皮细胞比较, lncRNA FoxP4-AS1在两种PTC细胞中的表达水平均明显降低(均 $P<0.05$)。细胞功能实验显示, 转染FoxP4-AS1过表达慢病毒载体的TPC-1、K1细胞增殖活力明显减弱、侵袭和迁移能力均较阴性对照组细胞明显降低, 且细胞周期阻滞在G₀/G₁期(均 $P<0.01$)。GEPIA数据库和LncTar网站预测FoxP4-AS1与CDK4存在潜在的相互作用靶点, Western blot结果显示, 转染FoxP4-AS1过表达慢病毒载体两种细胞的CDK4/cyclinD1表达水平较各自阴性对照组细胞明显降低(均 $P<0.05$)。皮下移植瘤实验结果显示, 转染FoxP4-AS1过表达慢病毒载体的PTC细胞较转染空载病毒载体的PTC细胞在小鼠体内生长慢, 形成的瘤体小, 且瘤组织中Ki-67表达减少。KEGG通路富集分析显示, FoxP4-AS1低表达主要富集于PI3K-Akt-mTOR通路、细胞周期、细胞凋亡、免疫调节相互作用, FoxP4-AS1高表达主要富集于DNA甲基化、氧化应激通路等。

结论: lncRNA FoxP4-AS1在PTC细胞中表达下调, 且与PTC细胞的恶性生物学行为密切相关, FoxP4-AS1可能通过抑制CDK4/cyclinD1表达抑制PTC细胞增殖, 作为保护性因素发挥作用。

关键词

甲状腺肿瘤; RNA, 长链非编码; 细胞增殖; 肿瘤浸润

中图分类号: R736.1

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81860478)。

收稿日期: 2021-09-28; **修订日期:** 2022-04-25。

作者简介: 杨惠芳, 贵州医科大学临床医学院硕士研究生, 主要从事甲状腺癌基础方面的研究。

通信作者: 赵代伟, Email: zhaodw@hotmail.com

Expression of long non-coding RNA FoxP4-AS1 in papillary thyroid carcinoma cells and its biological function

YANG Huifang¹, TANG Rui², LUO Xue^{1,3}, GAO Qingjun³, CHEN Xinghong¹, ZHAO Daiwei^{1,4}

(1. Clinical Medical College of Guizhou Medical University, Guizhou, Guiyang 550000, China; 2. Department of Thyroid Surgery, Bijie First People's Hospital, Bijie, Guizhou 550017, China; 3. Department of Thyroid Surgery, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550000, China; 4. Department of Thyroid Surgery, the Second People's Hospital of Guizhou Province, Guiyang 550004, China)

Abstract

Background and Aims: The authors have previously found that the long non-coding RNA FoxP4-AS1 (lncRNA FoxP4-AS1) is abnormally expressed in papillary thyroid carcinoma (PTC) tissue, and its low expression is an independent risk factor for regional lymph node metastasis in PTC. However, its function and action mechanism remain unclear. Therefore, this study was conducted to investigate the expression of lncRNA FoxP4-AS1 in PTC cells, and make a preliminary analysis of its effect on the biological behavior of PTC cells.

Methods: The expressions of lncRNA FoxP4-AS1 in PTC cell lines (TPC-1, K1 cells) and normal thyroid follicular epithelial cells (Nthy-ori3-1 cells) were determined by qRT-PCR. In TPC-1 and K1 cells after transfection with FoxP4-AS1 overexpressing lentiviral vector or empty virus vector (negative control), the changes in biological functions were analyzed by CCK-8 assay, colony formation assay, EdU incorporation assay, Transwell assay and flow cytometry, respectively. The potential target genes of FoxP4-AS1 were predicted by GEPIA database and LncTar website, and then verified by Western blot analysis. Using above transfected cells, subcutaneous tumor models in mice were created, then, the growth of the xenograft tumors was observed and Ki-67 expressions in the tumors were determined by immunohistochemical staining. A preliminary analysis of the signaling pathways potentially associated with FoxP4-AS1 was performed by using the KEGG database.

Results: qRT-PCR results showed that the expression levels of lncRNA FoxP4-AS1 in the two types of PTC cells were significantly lower than that in the normal thyroid follicular epithelial cells (both $P < 0.05$). Cell function experiments showed that the proliferation activity as well as invasion and migration abilities were significantly decreased with G₀/G₁ phase arrest in TPC-1 and K1 cells after transfection with FoxP4-AS1 overexpressing lentivirus vector compared with the negative control cells (all $P < 0.01$). The GEPIA database and LncTar website predicted that there were potential interaction targets between FoxP4-AS1 and CDK4. Western blot results showed that the expression levels of CDK4/cyclinD1 in the two types of cells transfected with FoxP4-AS1 overexpressing lentivirus vector were significantly lower than those in their corresponding negative control cells (all $P < 0.05$). In the subcutaneous tumor transplantation models, the PTC cells transfected with FoxP4-AS1 overexpressing lentivirus vector showed a slow growth in the mice, small volume of the formed tumor and low Ki-67 expression in the tumor compared with PTC cells transfected with empty virus vector. KEGG pathway enrichment analysis showed that the FoxP4-AS1 low expression was mainly enriched in PI3K-AKT-MTOR pathway, cell cycle, apoptosis, and immune regulation interactions, and the FoxP4-AS1 high expression was mainly enriched in DNA methylation and oxidative stress pathways.

Conclusion: The expression of lncRNA FoxP4-AS1 is down-regulated in PTC cells and is closely related to the malignant biological behavior of PTC cells. FoxP4-AS1 may exert its actions as a protective factor by suppressing the expression of CDK4/cyclinD1 and thereby inhibiting the

proliferation of PTC cells.

Key words Thyroid Neoplasms; RNA, Long Noncoding; Cell Proliferation; Neoplasm Invasiveness

CLC number: R736.1

甲状腺乳头状癌 (papillary thyroid carcinoma, PTC) 是甲状腺癌中最常见的病理组织学类型, 约占甲状腺癌 (thyroid carcinoma, TC) 的 80% 以上^[1], 近年来其发病率以每年 4% 的速度上升^[2]。多数的 PTC 患者通过手术治疗、促甲状腺激素 (thyroid stimulating hormone, TSH) 抑制治疗及¹³¹I 治疗后可达到临床治愈, 但侵袭性较高的 PTC 患者其 5 年复发率约 5%^[3], 且晚期 PTC 通常预后不良^[4]。PTC 的发生发展机制尚不清楚, 但已发现不少危险因素与 PTC 的发生发展有关, 包括遗传、环境暴露、表观遗传改变等^[5-6]。因此, 深入探讨 PTC 发生发展的分子机理对于寻求新的防治靶点有着重要意义。

长链非编码 RNAs (long non-coding RNA, lncRNA) 在调控肿瘤的发生发展中起着重要作用。其中, 长链非编码 RNA FoxP4-AS1 (lncRNA FoxP4-AS1) 是位于 6 号染色体的基因间 lncRNA, 与 FoxP4 反向头尾分布, 但外显子无互补区域, 含 588 个碱基对^[7-8]。lncRNA FoxP4-AS1 首次在结直肠癌中被发现^[9], 此后, 人们在多种肿瘤中发现 FoxP4-AS1 的表达, 包括骨肉瘤^[10]、胃癌^[11]、前列腺癌^[12]、宫颈癌^[13]、鼻咽癌^[14]、食管鳞状细胞癌^[15] 以及胰腺导管腺癌^[16] 等, 且 FoxP4-AS1 在肿瘤中高表达, 预示着预后不良。而课题组前期研究^[17] 发现, FoxP4-AS1 在 PTC 中表达下调, 其低表达是 PTC 区域淋巴结转移的独立危险因素。但 FoxP4-AS1 对 PTC 细胞生物学的影响及其作用机理目前尚不清楚。因此, 本研究旨在通过慢病毒稳定转染技术探究 lncRNA FoxP4-AS1 对 PTC 细胞 (TPC-1、K1 细胞) 生物学行为的影响, 及其潜在的影响机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人甲状腺乳头状癌细胞 TPC-1 (武汉普诺赛生命科技有限公司), 人甲状腺乳头状癌细胞 K1 及人正常甲状腺滤泡上皮细胞 Nthy-ori3-1 (上海市长

海医院); RPMI 1640 培养基和 DMEM 培养基 (Gibco, 美国); 6 孔、24 孔组织培养板 (康宁公司, 美国); 过表达慢病毒 (上海吉凯基因医学科技股份有限公司, GOSL0262738, 中国); TRIzol (Ambion, 美国); ECL 显色试剂盒、nanodrop 2000 (Thermo Fisher, 美国); LnRcute LncRNA cDNA 第一链合成试剂盒、LnRcute LncRNA 荧光定量检测试剂盒 (天根生化科技有限公司, 中国北京); CFX Connect 检测系统 (Bio-rad, 美国); CCK-8 试剂盒 (APE×BIO 公司, 美国); 甲醇、4% 多聚甲醛、苏木素 (Servicebio, 中国武汉); EdU 检测试剂盒 (Ribobio, 中国广州); DAPI (Solarbio, 中国北京); 周期试剂盒 (凯基生物, 中国); 流式细胞仪 (Beckman, 美国); Transwell 小室、基质胶 (Corning 公司, 美国); 抗体 (贵州华远生物技术有限公司, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、分组和转染 人 PTC 细胞 TPC-1 和人正常甲状腺滤泡上皮细胞 Nthy-ori3-1 培养在 RPMI 1640 完全培养基 (含 10% 胎牛血清、0.1 mg/mL 链霉素和 100 U/mL 青霉素) 中, 人甲状腺乳头状癌细胞 K1 培养在 DMEM 完全培养基 (含 10% 胎牛血清、0.1 mg/mL 链霉素和 100 U/mL 青霉素) 中, 置于恒温培养箱中 (37 °C、5% CO₂)。将甲状腺乳头状癌细胞 (TPC-1、K1 细胞) 分别分为 FoxP4-AS1 组 (转染 FoxP4-AS1 过表达慢病毒载体) 和阴性对照组 (negative control, NC 组) (转染空载病毒)。慢病毒的构建由上海吉凯基因医学科技股份有限公司完成, 其核苷酸序列为: FoxP4-AS1 组: GAG GAT CCC CGG GTA CCG GTC CCT GGT TTT CTG TGG AAA G; NC: CAC ACA TTC CAC AGG CTA GCT GCA CTT TGA TAA CAA TAA ACT C。取对数生长期细胞制备细胞悬液, 以 5 × 10⁴ 个/孔的细胞密度接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁, 将配制好的病毒感染液 (MOI=100, 病毒滴度=1 × 10⁸ TU/mL) 加入 6 孔板中, 置于细胞培养箱中培养 12~16 h 后, 更换为完全培养基, 继续培养 72 h, 中途可换液。感染 72 h 后 (细胞汇合度达 70%~80%), 用嘌呤霉

素 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 对细胞进行筛选, 倒置荧光显微镜观察细胞感染效率。

1.2.2 RNA提取及qRT-PCR TRIzol试剂从细胞中提取总RNA, Nanodrop 2000测定RNA的浓度和纯度。取1 μg 总RNA, 用LnRcute LncRNA cDNA第一链合成试剂盒将RNA逆转录成cDNA, LnRcute

LncRNA荧光定量检测试剂盒和CFX Connect检测系统进行qRT-PCR反应。lncRNA_{FoxP4-AS1}的表达以GAPDH为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。FoxP4-AS1引物及内参引物均由上海捷瑞生物工程有限公司设计合成(表1)。以上实验均重复3次。

表1 FoxP4-AS1引物及内参引物序列

Table 1 The primer sequences of FoxP4-AS1 and internal reference

基因名称	正向引物	反向引物
FoxP4-AS1	GTG AGC TTC TGG GTT CGA CA	ATT GAG GGT TAG GGC AGC AC
GAPDH	CAC CCA CTC CTC CAC CTT TG	CCA CCA CCC TGT TGC TGT AG

1.2.3 细胞增殖实验(CCK-8法) 细胞以 5×10^3 /孔的密度接种于96孔板, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的恒温培养箱中培养。转染0、1、2、3、4 d后, 将10 μL CCK-8试剂加入每个孔中, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育1 h。使用酶标仪分别检测0、1、2、3、4 d的450 nm处的吸光度。以上实验均重复3次。

1.2.4 细胞克隆形成实验 制备好细胞悬液后, 以1 000个/孔的细胞密度接种于六孔板中, 每组设3个平行复孔, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养。2周左右肉眼可观察到细胞克隆团, 弃去培养基, 以PBS洗3次, 甲醇固定细胞15 min, 晾干后加入苏木素染色30 min, 晾干后扫描拍照, 计数肉眼可见的细胞克隆团。

1.2.5 EdU实验 用EdU检测试剂盒检测细胞的增殖能力。用慢病毒或空载体转染两种PTC细胞系, 以20 000个细胞/孔的细胞密度接种于24孔板中, 每组设3个平行复孔。将50 μM EdU标记培养基加入到24孔板中, 置于培养于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的环境中孵育2 h。用4%多聚甲醛固定细胞30 min, 甘氨酸(2 mg/mL)洗涤残留的甲醛, 用0.5% Triton X-100脱色摇床孵育10 min。PBS清洗后, 加入抗EdU工作溶液在室温避光染色30 min, 然后用100 μL DAPI在室温孵育5 min并在荧光显微镜下进行观察。

1.2.6 细胞侵袭及迁移实验 用Transwell小室检测细胞的侵袭及迁移能力。转染后的细胞消化, 用无血清的RPMI 1640或DMEM培养基重悬, 添加到涂有Matrigel基质胶的Transwell上室(迁移试验不添加基质胶)中, 下室加入含10%血清的1640或DMEM培养基。小室置于细胞恒温培养箱中培养

24 h后, 轻轻除去膜上的细胞, 膜下的细胞用甲醇固定, 结晶紫染色并计数。

1.2.7 流式细胞术检测细胞周期 制备好细胞悬液后, 用PBS缓冲液洗涤细胞1次(离心800 r/min, 5 min), 收集细胞行70%乙醇4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 再离心收集细胞, PBS重悬, 加入提前配制好的500 μL 碘化丙啶(propidium, PI)/核糖核酸酶A(Rnase A)(Rnase A:PI=1:9)染色工作液, 室温避光染色30 min后, 经流式细胞仪分析细胞周期。以上实验均重复3次。

1.2.8 Western blot 收集细胞后, 经裂解液裂解, 在4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心12 000 r/min, 30 min提取蛋白。使用BCA法测定蛋白浓度后, 40 μg 蛋白经12% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 转移至PVDF膜上, 在室温条件下用5%脱脂牛奶封闭2 h, 再加入CDK4/cyclinD1抗体(1:1 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST洗去一抗, HRP标记二抗(1:5 000)室温孵育1 h, TBST洗3次, 通过ECL化学发光试剂盒显影, 以GAPDH(1:1 000)作为内参。以上实验均重复3次。

1.2.9 皮下移植瘤模型的构建 选取4~8周龄雌性NOD-SCID小鼠20只, 用耳标钳对小鼠标记, 随机将小鼠分为4组, 每组5只。消化细胞, 用生理盐水重悬并调整细胞浓度为 5×10^7 个/mL, 于小鼠背部皮下注射体积为0.2 mL的单细胞悬液, 接种后每5天观察1次, 选取适当时间, 将实验小鼠处死, 取出肿瘤进行后续实验。本实验经贵州医科大学实验动物伦理委员会审批(伦理审批号: No1800829)。

1.2.10 FoxP4-AS1在甲状腺癌中的功能富集分析

下载KEGG数据库中的GSEA数据,对FoxP4-AS1低表达和FoxP4-AS1高表达的基因组之间的差异通路进行了富集分析。统计出满足标准($P<0.05$)的相关信号通路,使用ggplot2包可视化重要功能及通路。

1.3 统计学处理

分别采用SPSS 22.0和Graphpad Prism 9.0统计软件进行统计学分析和绘图,对符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,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 PTC细胞中lncRNA FoxP4-AS1表达水平

通过qRT-PCR检测人PTC细胞系(TPC-1、K1细胞)和人正常甲状腺滤泡上皮细胞(Nthy-ori3-1细胞)中FoxP4-AS1的表达情况。结果显示:人PTC细胞系TPC-1、K1中FoxP4-AS1的表达水平明显低于人正常甲状腺滤泡上皮细胞Nthy-ori3-1,差异均有统计学意义(0.660 ± 0.078 vs. 1.000 ± 0.000 ; 0.523 ± 0.006 vs. 1.000 ± 0.000 , 均 $P<0.05$) (图1)。

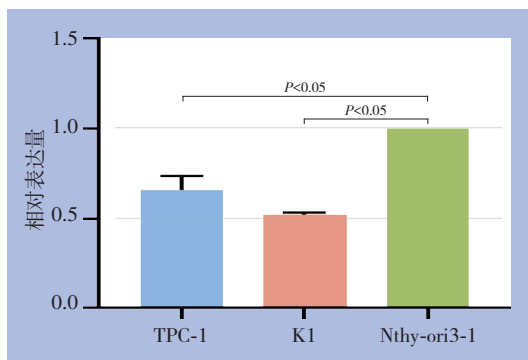


图1 qRT-PCR检测lncRNA FoxP4-AS1表达

Figure 1 qRT-PCR detection of lncRNA FoxP4-AS1 expression

2.2 慢病毒稳定转染结果

为探讨FoxP4-AS1在PTC细胞中的生物学功能,通过慢病毒转染实验将FoxP4-AS1过表达慢病毒转染到TPC-1、K1细胞中,qRT-PCR检验转染效能。结果显示,转染FoxP4-AS1过表达慢病毒(FoxP4-AS1组)后,TPC-1、K1细胞的FoxP4-AS1

表达水平明显升高,与NC组相比,差异有统计学意义(0.440 ± 0.026 vs. 1.000 ± 0.000 ; 0.273 ± 0.021 vs. 1.000 ± 0.000 , 均 $P<0.01$) (图2)。

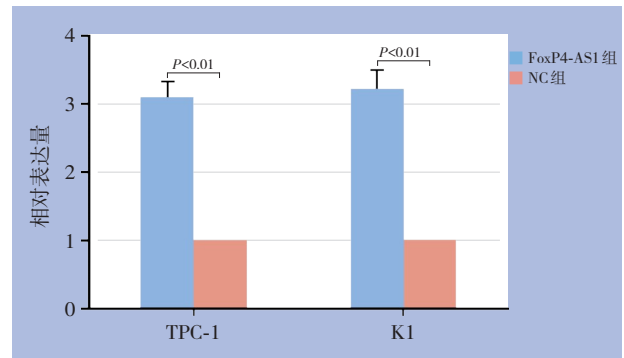


图2 qRT-PCR检测转染效果

Figure 2 qRT-PCR detection of transfection effect

2.3 FoxP4-AS1对PTC细胞增殖能力的影响

细胞增殖实验(CCK-8法)、细胞克隆形成实验、EdU实验结果均显示:慢病毒转染过表达FoxP4-AS1后,TPC-1、K1细胞的增殖能力明显降低,差异有统计学意义(均 $P<0.05$) (图3)。

2.4 FoxP4-AS1对PTC细胞侵袭和迁移能力的影响

Transwell实验结果显示:使用慢病毒稳定转染技术过表达FoxP4-AS1后,与NC组相比,TPC-1、K1细胞的侵袭和迁移能力明显降低,差异有统计学意义(均 $P<0.05$) (图4)。

2.5 流式细胞术检测细胞周期

细胞周期实验结果显示:通过转染使TPC-1、K1细胞的FoxP4-AS1表达上调,采用流式细胞术检测两种细胞周期情况。结果显示,过表达FoxP4-AS1后,细胞周期阻滞在 G_0/G_1 期,差异有统计学意义($P<0.01$) (图5)。

2.6 GEPIA数据库和LncTar网站的分析

GEPIA数据库的预测信息显示,仅CDK4在甲状腺癌和癌旁(thyroid carcinoma, THCA)中有较为明显的差异,在CDK2和CDK6中无明显差异。LncTar (<http://www.cuilab.cn/lncstar>)网站通过FASTA格式预测FoxP4-AS1与CDK4的潜在相互作用靶点,结果显示,FoxP4-AS1与CDK4存在多个潜在的相互作用靶点,且结合较牢固(图6)。

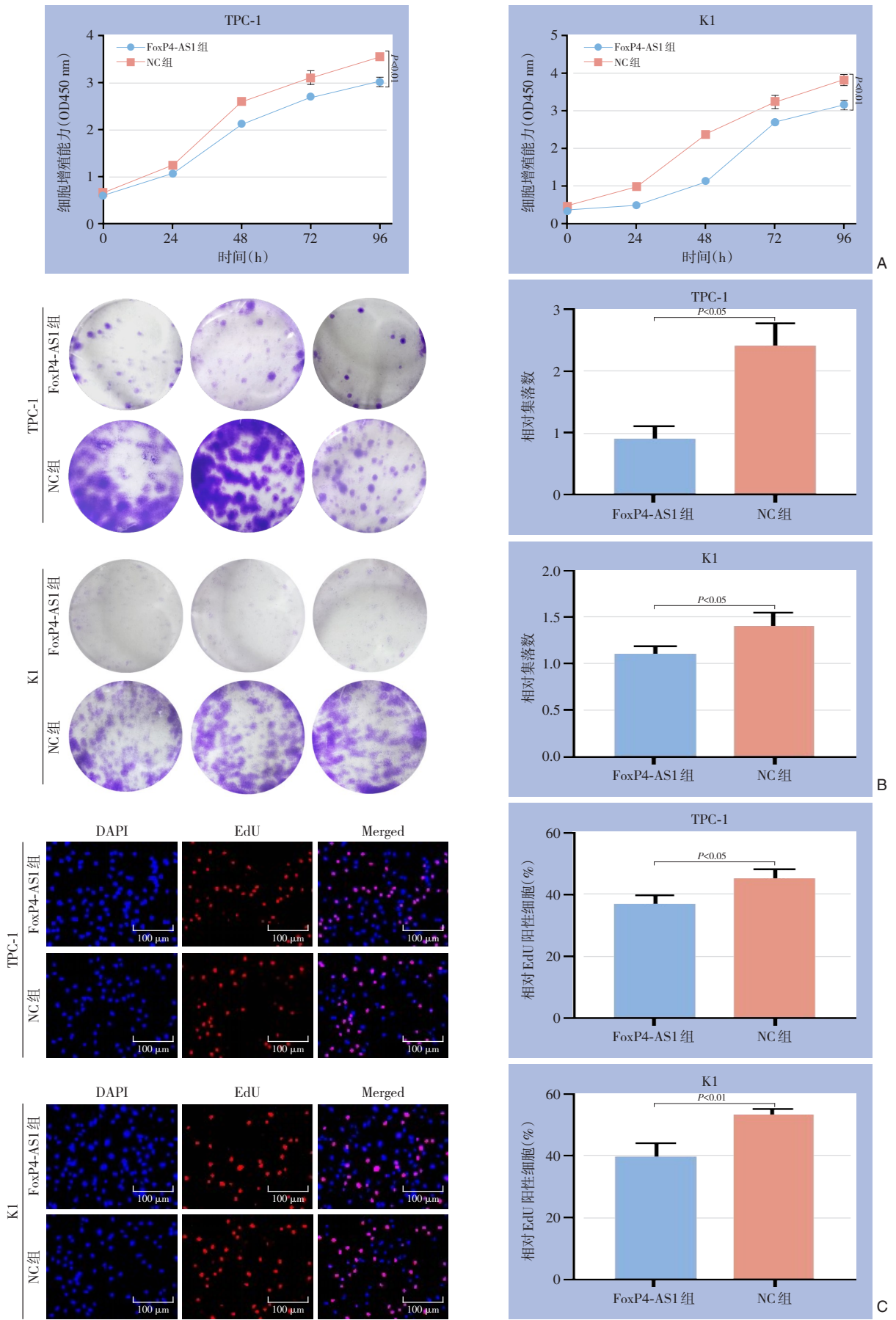


图3 细胞的增殖能力检测 A: CCK-8实验; B: 细胞克隆形成实验; C: EdU实验

Figure 3 Detection of cell proliferative capacity A: CCK-8 assay; B: Colony formation assay; C: EdU incorporation assay

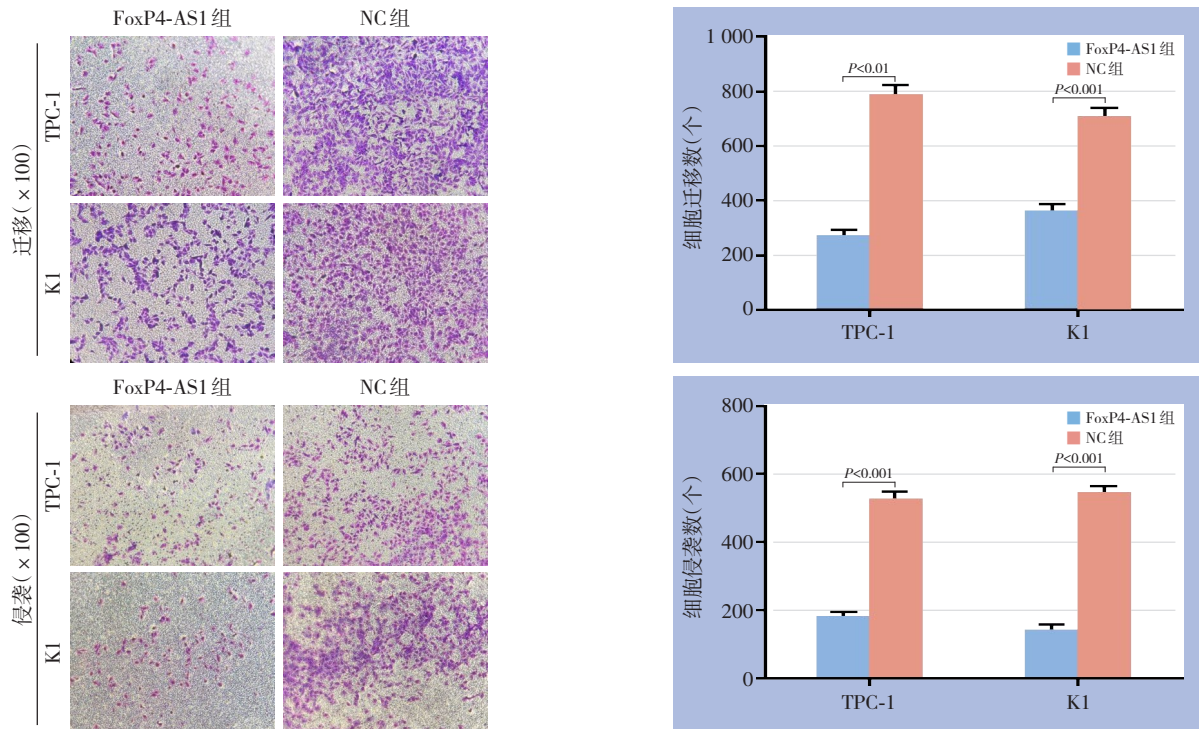


图4 Transwell实验检测PTC细胞的迁移和侵袭能力

Figure 4 Transwell assay for detecting the migration and invasion abilities of PTC cells

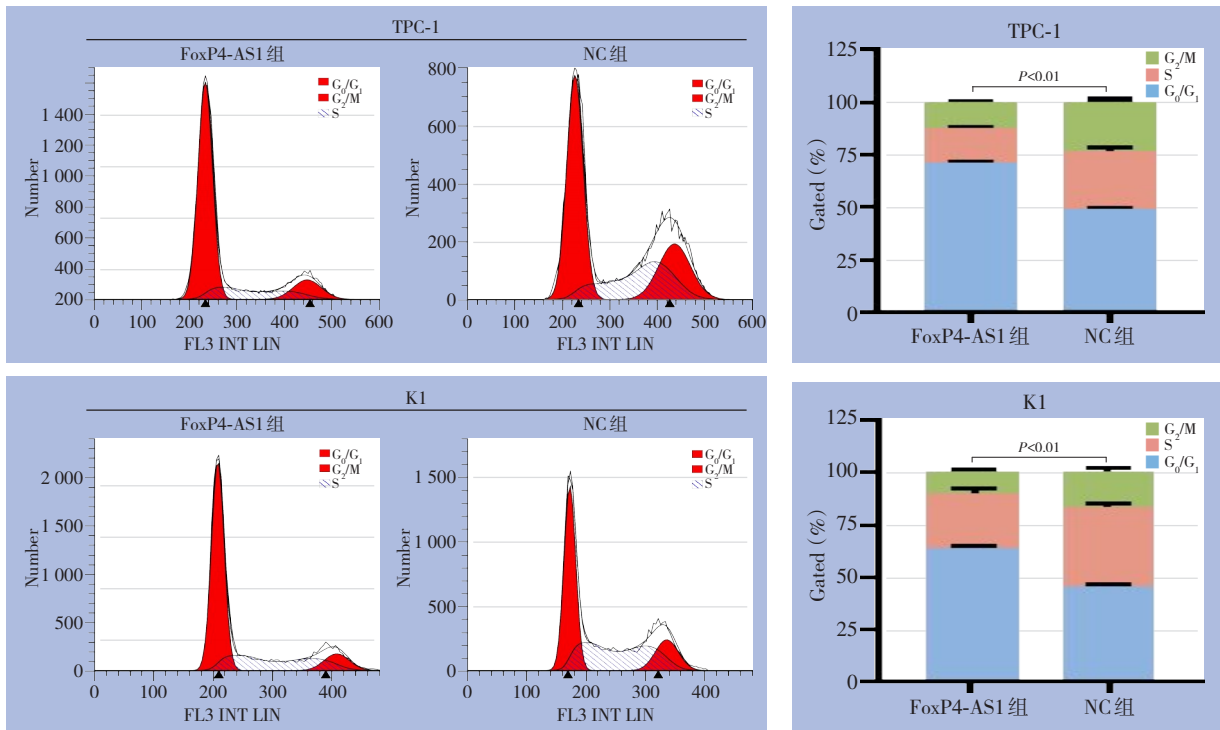


图5 流式细胞术检测PTC细胞的细胞周期

Figure 5 Detection of cell cycle of PTC cells by flow cytometry

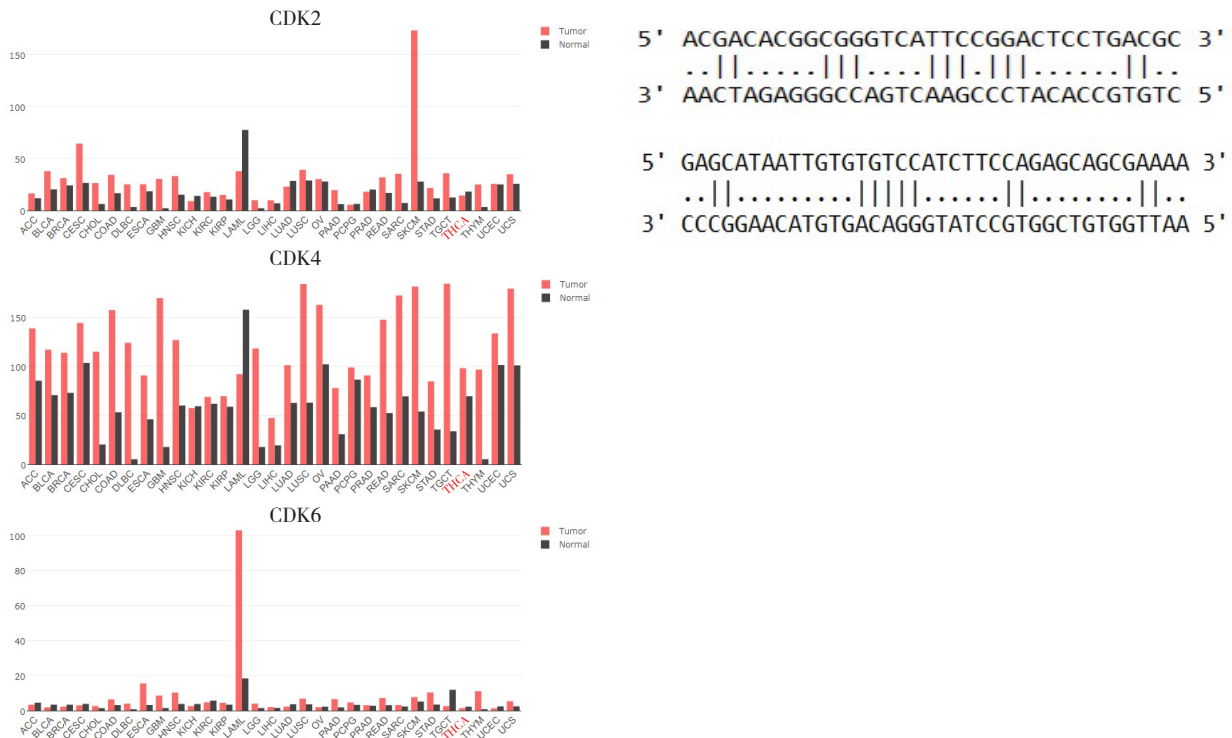


图6 GEPIA数据库和LncTar网站分析FoxP4-AS1与CDK4潜在的相互作用靶点

Figure 6 Analysis of the potential interaction targets of FoxP4-AS1 and CDK4 using the GEPIA database and LncTar website

2.7 Western blot检测转染后的PTC细胞中CDK4/cyclinD1表达情况

通过慢病毒过表达TPC-1、K1细胞中的FoxP4-AS1表达水平，采用Western blot检测CDK4/cyclinD1

表达情况。结果显示，过表达FoxP4-AS1后，CDK4/cyclinD1明显减少，差异有统计学意义 ($P < 0.01$) (图7)。

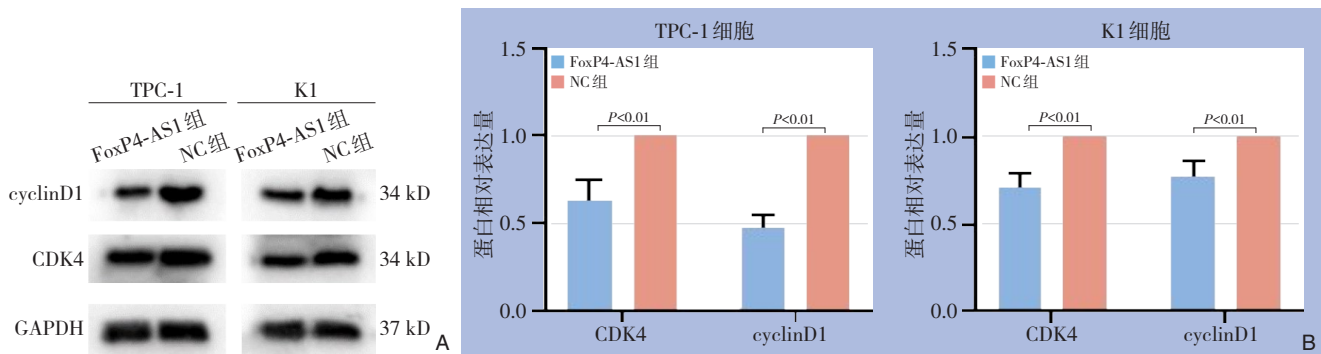


图7 Western blot检测CDK4/cyclinD1表达情况 A: 蛋白条带; B: 灰度值分析

Figure 7 Western blot detection of CDK4/cyclinD1 expressions A: Protein bands; B: Gray value analysis

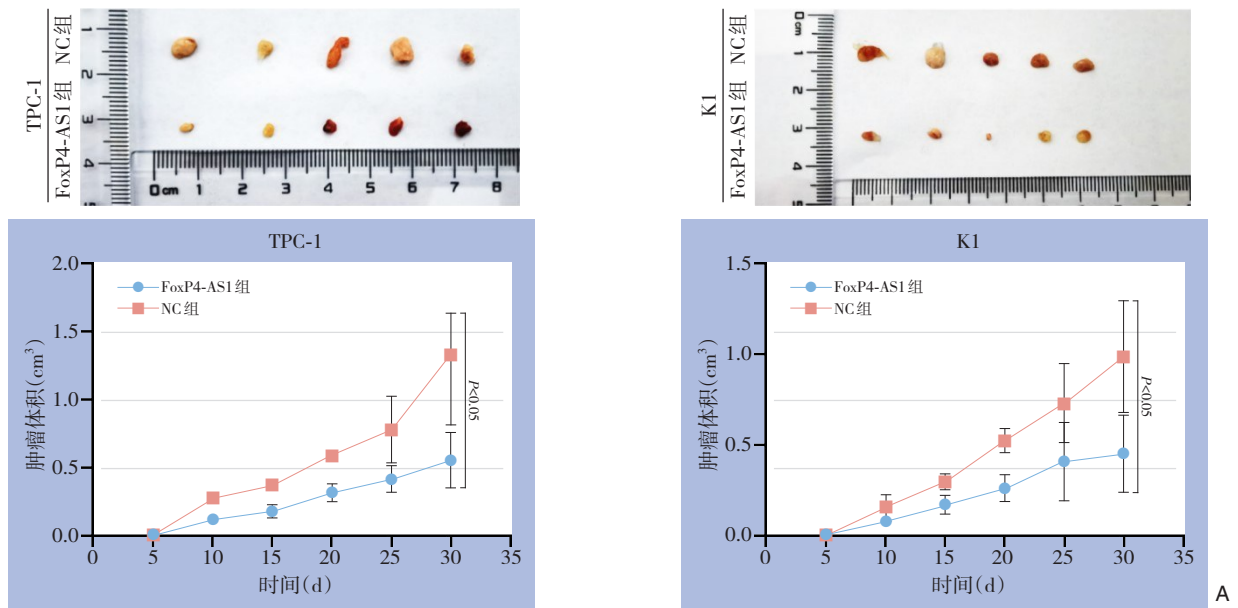
2.8 皮下移植瘤模型的构建

NOD-SCID小鼠饲养于SPF级的环境中，待小鼠适应环境，5d后于皮下接种细胞，30d后处死小鼠，每5天对小鼠及瘤体进行观察和测量。结果显示：过表达FoxP4-AS1后，皮下移植瘤大小及体积明显缩小。HE染色显示：肿瘤细胞胞质稀疏，胞核形态各异，肿瘤为PTC。免疫组织化学染色实验结果表明：过表达FoxP4-AS1后，Ki-67

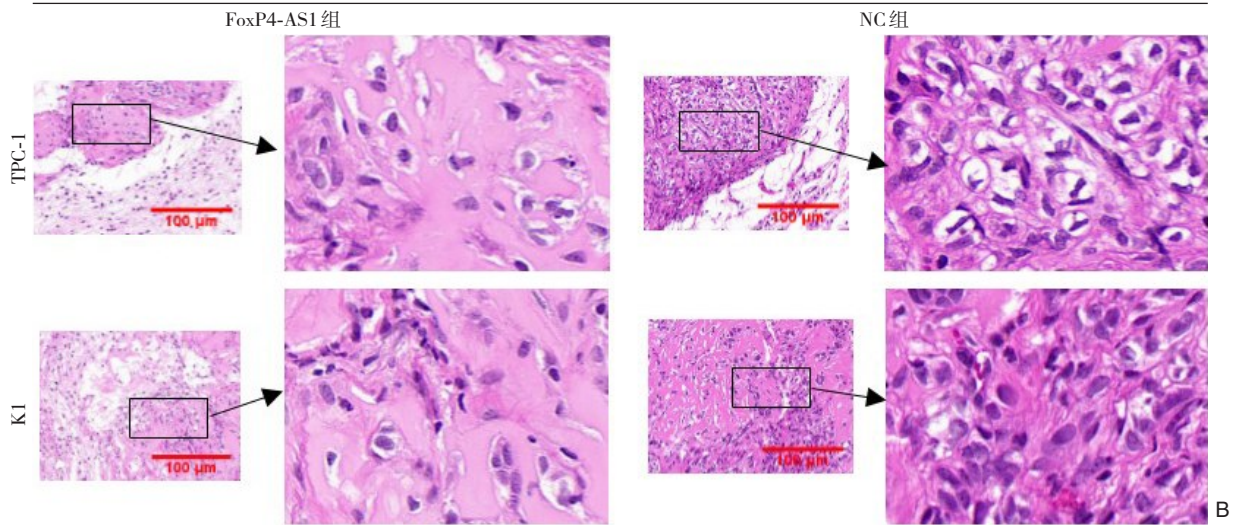
表达明显减少(图8)。

2.9 TC中FoxP4-AS1的功能富集分析

基于KEGG数据库，对FoxP4-AS1低表达和FoxP4-AS1高表达的基因组之间的差异通路进行了GSEA富集分析，PI3K-Akt-mTOR通路、细胞周期、细胞凋亡、免疫调节相互作用在FOXPA-AS1低表达组中被富集(图9A-D)；DNA甲基化、氧化应激通路等在FOXPA-AS1高表达组中被富集(图9E-F)。



乳头状甲状腺癌



Ki-67

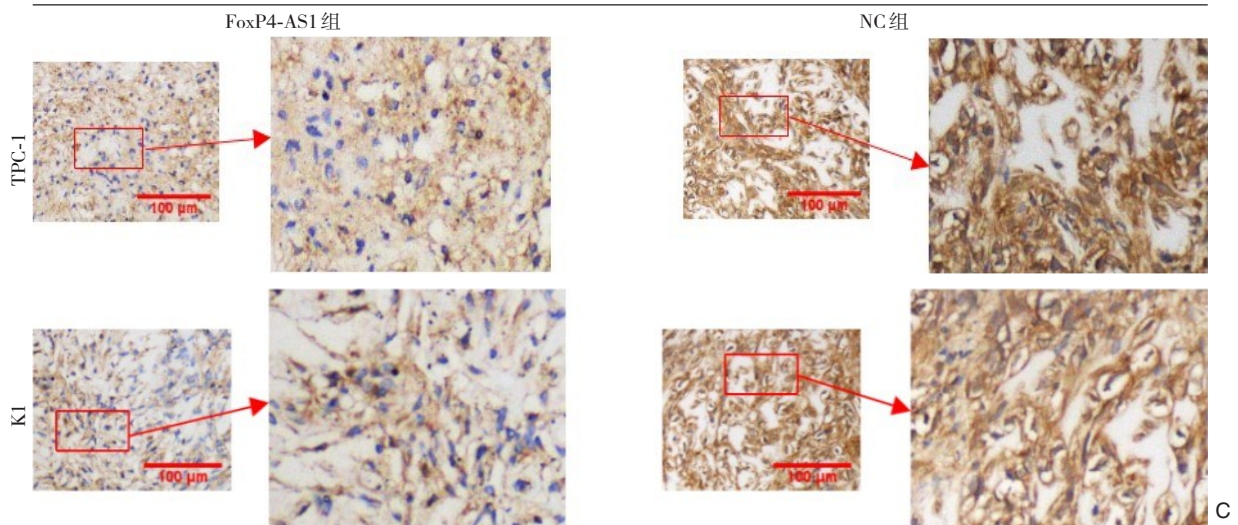


图8 皮下移植瘤实验 A: 瘤体大小及体积; B: HE染色 (×100); C: 免疫组织化学染色法检测 Ki-67的表达 (×100)
 Figure 8 Subcutaneous tumor transplantation model A: Tumor size and volume; B: HE staining (×100); C: The expression of Ki-67 detected by immunohistochemical staining (×100)

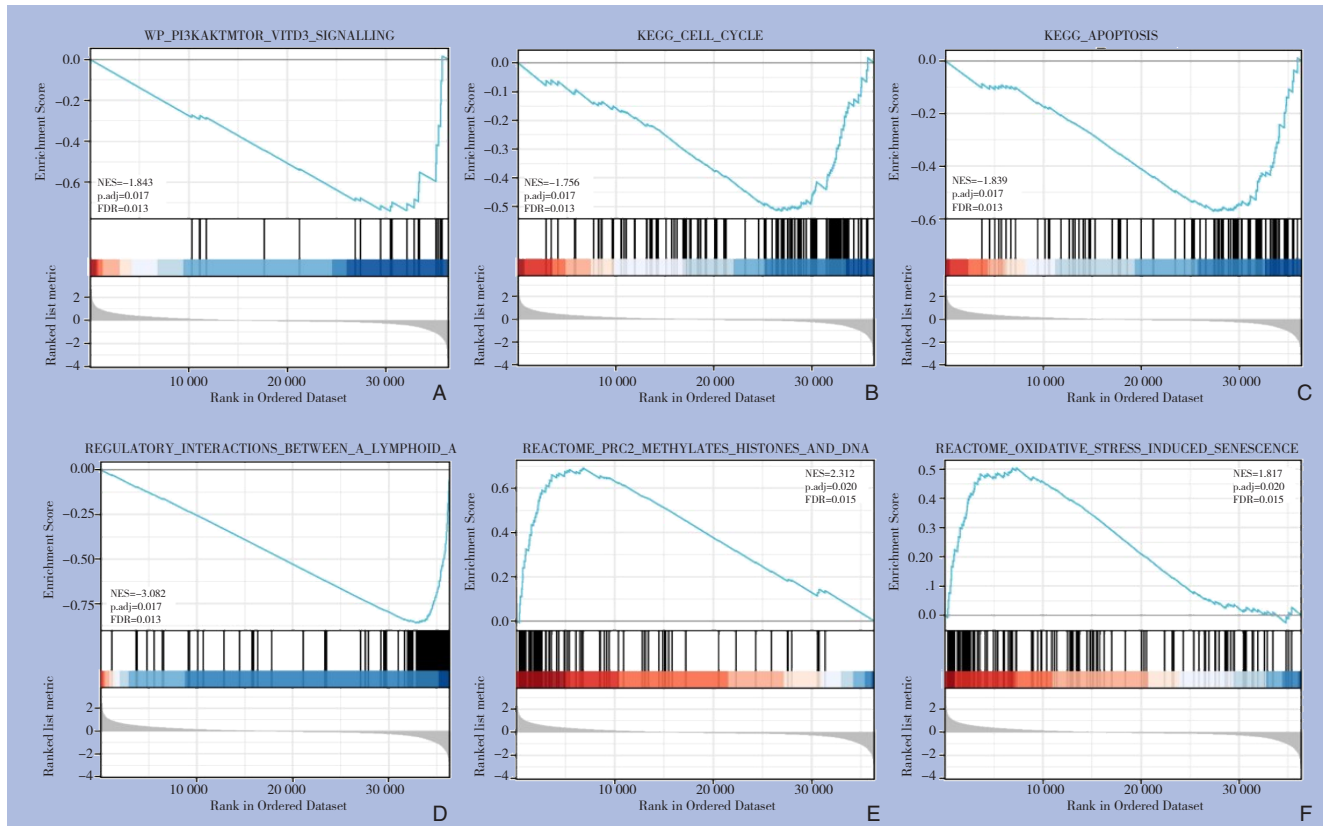


图9 通路富集分析 A: PI3K-Akt-mTOR通路; B: 细胞周期; C: 细胞凋亡; D: 免疫调节相互作用; E: DNA甲基化; F: 氧化应激通路

Figure 9 Pathway enrichment analysis A: PI3K-Akt-mTOR pathway; B: Cell cycle; C: Apoptosis; D: Immunomodulatory interactions; E: DNA methylation; F: oxidative stress pathway

3 讨论

近年来随着B超、细针穿刺活检技术的普及,PTC的发病率逐年升高,且逐渐趋向年轻化^[18]。尽管PTC的治疗手段取得了长足的进步,但PTC患者的复发率和癌症相关病死率并没有明显改善^[19]。因此,寻找PTC有效的分子生物标志物和治疗靶点是十分必要的。

lncRNA是肿瘤发生发展的重要调控因子。它是一类长度超过200个核苷酸,大小在200 bp到100 kb之间,且无编码蛋白质能力的转录物^[20]。许多研究表明lncRNA对肿瘤的发生发展中起着关键作用^[21],通过多种方式参与调控细胞生物学过程,促进或抑制肿瘤发生与进展^[22]。研究^[23]发现lncRNA是多种生物调节活性的主要调控因子,如基因表达、剂量补偿、等位基因印迹和基因组包装等。随着人们对lncRNA研究的深入,越来越多的证据表明lncRNA表达失调对肿瘤的发生发展发挥至关重要的作用,它们的表达失调与恶性肿瘤

的发生、侵袭和转移有关^[24-26],lncRNA FoxP4-AS1是其中研究相对较少的基因。已有研究^[9-16]证明FoxP4-AS1在许多恶性肿瘤中高表达,其高表达预示着预后不良。而在甲状腺乳头状癌中,已有文献^[17]表明,FoxP4-AS1在PTC中表达明显降低,其低表达是PTC区域淋巴结转移的独立危险因素,但其对PTC细胞生物学行为的影响及其作用机理目前尚不明确。

因此,本实验在此基础上继续研究,首先通过qRT-PCR检测lncRNA FoxP4-AS1在PTC细胞和人甲状腺正常滤泡上皮细胞中的表达水平,通过慢病毒稳定转染技术对PTC细胞(TPC-1细胞和K1细胞)进行FoxP4-AS1过表达,qRT-PCR检测其转染效能;同时探究FoxP4-AS1对PTC细胞生物学行为的影响。此外,通过生信分析预测FoxP4-AS1与CDK4之间的潜在作用靶点,并通过Western blot进行验证,同时进行动物实验验证。研究发现,FoxP4-AS1在PTC细胞中表达下调,这与汤蕊等^[17]研究结果一致。过表达FoxP4-AS1后,CCK-8实验

和细胞克隆形成实验均显示 FoxP4-AS1 组的增殖能力降低,这提示 FoxP4-AS1 可抑制 PTC 的增殖。同时 EdU 实验结果表明:在 TPC-1 细胞和 K1 细胞中, FoxP4-AS1 组的细胞数目(带红色荧光)较 NC 组来说是减少的,说明上调 FoxP4-AS1 表达可抑制两种细胞的增殖能力,进一步证明 FoxP4-AS1 能够抑制 PTC 细胞增殖。此外,上调 FoxP4-AS1 后, Transwell 实验结果显示:两种细胞的侵袭和迁移能力明显降低,提示 FoxP4-AS1 可以降低 PTC 的侵袭性,可以作为 PTC 的一个保护性因素。增殖作为癌细胞的重要特性,由于肿瘤细胞周期失控,增殖无局限性,是导致恶性肿瘤复发的重要原因^[27]。因此我们通过流式细胞术检测 PTC 细胞的周期,结果表明:过表达 FoxP4-AS1 后,细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期。由于 CDK 是调控细胞周期的一个关键物质,它是通过对其他蛋白质的化学修饰来驱动整个细胞周期的,而 cyclin 具有调控 CDK 的功能,且通常以 cyclin/CDK 复合物的形式发挥作用,CDK 和 cyclin 相互配合能更有效地控制整个细胞周期的全过程^[28]。细胞周期的失调会导致一系列的疾病,如癌症、神经退行性疾病和中风等^[29-30]。因此,本研究使用 GEPIA 数据库预测 CDK2/4/6 在 THCA 中的表达,发现仅 CDK4 在 THCA 中的表达有差异,而 CDK2 和 CDK6 则没有明显差异, LncTar 网站分析显示 FoxP4-AS1 与 CDK4 之间存在潜在的相互作用靶点,且结合较牢固,提示 FoxP4-AS1 可能直接与 CDK4 相互结合而发挥作用。因在细胞周期的调控过程中,CDK4 通常与 cyclinD1 结合发挥作用^[31],因此,通过 Western blot 实验检验 FoxP4-AS1 与 CDK4 之间的相关性发现,上调 FoxP4-AS1 后,CDK4/cyclinD1 表达减少,提示 FoxP4-AS1 可能负向调控 CDK4/cyclinD1,进而抑制细胞增殖。通过建立 NOD-SCID 小鼠异种移植瘤模型,发现过表达 FoxP4-AS1 后,NOD-SCID 小鼠所成肿瘤的大小和体积均明显降低,且 Ki-67 表达减少,提示 FoxP4-AS1 可能作为一个保护性因素在 PTC 中发挥作用。甲状腺癌中 FoxP4-AS1 的功能富集分析显示,PI3K-Akt-mTOR 通路、细胞周期、细胞凋亡、免疫调节相互作用在 FoxP4-AS1 低表达组中被富集,与细胞功能学实验结果相一致。提示 FoxP4-AS1 通过细胞周期发挥作用。

综上所述, FoxP4-AS1 在 PTC 中发挥抑癌基因作用,过表达 FoxP4-AS1 后, CDK4/cyclinD1 表达减

少,抑癌作用增强, FoxP4-AS1 在 PTC 中可能通过负向调控 CDK4/cyclinD1 的表达发挥抑癌作用,且具有一定的抑制 PTC 细胞增殖、侵袭和迁移的能力,有望成为 PTC 治疗的潜在临床靶点。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] Kitahara CM, Sosa JA. The changing incidence of thyroid cancer[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2016, 12(11): 646-653. doi: 10.1038/nrendo.2016.110.
- [2] Chen WQ, Zheng RS, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132. doi: 10.3322/caac.21338.
- [3] Grant CS. Recurrence of papillary thyroid cancer after optimized surgery[J]. *Gland Surg*, 2015, 4(1):52-62. doi: 10.3978/j.issn.2227-684X.2014.12.06.
- [4] Batool S, Afridi MS, Khoja A, et al. Pre-operative serum TSH levels: a risk factor for advanced metastatic differentiated thyroid carcinoma[J]. *Pak J Med Sci*, 2019, 35(5): 1312-1317. doi: 10.12669/pjms.35.5.704.
- [5] Lee SH, Roh JL, Gong G, et al. Risk factors for recurrence after treatment of N1b papillary thyroid carcinoma[J]. *Ann Surg*, 2019, 269(5):966-971. doi: 10.1097/SLA.0000000000002710.
- [6] Kitahara CM, Slettebø Daltveit D, Ekbohm A, et al. Maternal health, in-utero, and perinatal exposures and risk of thyroid cancer in offspring: a Nordic population-based nested case-control study[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2021, 9(2): 94-105. doi: 10.1016/S2213-8587(20)30399-5.
- [7] Kopp F, Mendell JT. Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs[J]. *Cell*, 2018, 172(3): 393-407. doi: 10.1016/j.cell.2018.01.011.
- [8] Xie Y, Dang W, Zhang SW, et al. The role of exosomal noncoding RNAs in cancer[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 37. doi: 10.1186/s12943-019-0984-4.
- [9] Li J, Lian YF, Yan CS, et al. Long non-coding RNA FOXP4-AS1 is an unfavourable prognostic factor and regulates proliferation and apoptosis in colorectal cancer[J]. *Cell Prolif*, 2017, 50(1): e12312. doi: 10.1111/cpr.12312.
- [10] Yang L, Ge DW, Chen X, et al. FOXP4-AS1 participates in the development and progression of osteosarcoma by downregulating LATS1 via binding to LSD1 and EZH2[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 502(4):493-500. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.05.198.
- [11] Chen RY, Ju Q, Feng LM, et al. The carcinogenic complex lncRNA FOXP4-AS1/EZH2/LSD1 accelerates proliferation, migration and

- invasion of gastric cancer[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(19):8371–8376. doi: [10.26355/eurrev_201910_19148](https://doi.org/10.26355/eurrev_201910_19148).
- [12] Wu XC, Xiao Y, Zhou Y, et al. LncRNA FOXP4-AS1 is activated by PAX5 and promotes the growth of prostate cancer by sequestering miR-3184-5p to upregulate FOXP4[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(7):472. doi: [10.1038/s41419-019-1699-6](https://doi.org/10.1038/s41419-019-1699-6).
- [13] Zhao J, Yang T, Li L. LncRNA FOXP4-AS1 is involved in cervical cancer progression via regulating miR-136-5p/CBX4 axis[J]. *Oncotargets Ther*, 2020, 13:2347–2355. doi: [10.2147/OTT.S241818](https://doi.org/10.2147/OTT.S241818).
- [14] Zhong LK, Zhou J, He X, et al. Long non-coding RNA FOXP4-AS1 acts as an adverse prognostic factor and regulates proliferation and apoptosis in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(15): 8008–8016. doi: [10.26355/eurrev_202008_22484](https://doi.org/10.26355/eurrev_202008_22484).
- [15] Li YH, Li TT, Yang YB, et al. YY1-induced upregulation of FOXP4-AS1 and FOXP4 promote the proliferation of esophageal squamous cell carcinoma cells[J]. *Cell Biol Int*, 2020, 44(7):1447–1457. doi: [10.1002/cbin.11338](https://doi.org/10.1002/cbin.11338).
- [16] Liu XG, Xu H, Chen M, et al. Identify potential clinical significance of long noncoding RNA forkhead box P4 antisense RNA 1 in patients with early stage pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Cancer Med*, 2020, 9(6): 2062–2076. doi: [10.1002/cam4.2818](https://doi.org/10.1002/cam4.2818).
- [17] 汤蕊, 杨慧芳, 高庆军, 等. 甲状腺乳头状癌长链非编码RNA FoxP4-AS1表达与淋巴结转移的相关性研究[J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2021, 28(5): 566–570. doi: [10.7507/1007-9424.202101002](https://doi.org/10.7507/1007-9424.202101002).
- Tang R, Yang HF, Gao QJ, et al. Expression of long non-coding RNA FoxP4-AS1 in papillary thyroid carcinoma and its relationship with lymph node metastasis[J]. *Chinese Journal of Bases and Clinics in General Surgery*, 2021, 28(5):566–570. doi: [10.7507/1007-9424.202101002](https://doi.org/10.7507/1007-9424.202101002).
- [18] Kitahara CM, Sosa JA. Understanding the ever-changing incidence of thyroid cancer[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2020, 16(11): 617–618. doi: [10.1038/s41574-020-00414-9](https://doi.org/10.1038/s41574-020-00414-9).
- [19] Oyer SL, Fritsch VA, Lentsch EJ. Comparison of survival rates between papillary and follicular thyroid carcinomas among 36, 725 patients[J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2014, 123(2):94–100. doi: [10.1177/0003489414523563](https://doi.org/10.1177/0003489414523563).
- [20] Lopez-Pajares V. Long non-coding RNA regulation of gene expression during differentiation[J]. *Pflugers Arch*, 2016, 468(6): 971–981. doi: [10.1007/s00424-016-1809-6](https://doi.org/10.1007/s00424-016-1809-6).
- [21] Liu SJ, Dang HX, Lim DA, et al. Long noncoding RNAs in cancer metastasis[J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(7):446–460. doi: [10.1038/s41568-021-00353-1](https://doi.org/10.1038/s41568-021-00353-1).
- [22] Winkle M, El-Daly SM, Fabbri M, et al. Noncoding RNA therapeutics-challenges and potential solutions[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(8):629–651. doi: [10.1038/s41573-021-00219-z](https://doi.org/10.1038/s41573-021-00219-z).
- [23] Chandra Gupta S, Nandan Tripathi Y. Potential of long non-coding RNAs in cancer patients: from biomarkers to therapeutic targets[J]. *Int J Cancer*, 2017, 140(9):1955–1967. doi: [10.1002/ijc.30546](https://doi.org/10.1002/ijc.30546).
- [24] Zhao WY, Geng DH, Li SQ, et al. LncRNA HOTAIR influences cell growth, migration, invasion, and apoptosis via the miR-20a-5p/HMGA2 axis in breast cancer[J]. *Cancer Med*, 2018, 7(3):842–855. doi: [10.1002/cam4.1353](https://doi.org/10.1002/cam4.1353).
- [25] Chen FJ, Sun M, Li SQ, et al. Upregulation of the long non-coding RNA HOTAIR promotes esophageal squamous cell carcinoma metastasis and poor prognosis[J]. *Mol Carcinog*, 2013, 52(11):908–915. doi: [10.1002/mc.21944](https://doi.org/10.1002/mc.21944).
- [26] Liu D, Li YW, Luo G, et al. LncRNA SPRY4-IT1 sponges miR-101-3p to promote proliferation and metastasis of bladder cancer cells through up-regulating EZH2[J]. *Cancer Lett*, 2017, 388:281–291. doi: [10.1016/j.canlet.2016.12.005](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.12.005).
- [27] Li YY, Cheng JY, Li Y, et al. CXCL8 is associated with the recurrence of patients with acute myeloid leukemia and cell proliferation in leukemia cell lines[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 499(3):524–530. doi: [10.1016/j.bbrc.2018.03.181](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.181).
- [28] Bury M, le Calvé B, Ferbeyre G, et al. New insights into CDK regulators: novel opportunities for cancer therapy[J]. *Trends Cell Biol*, 2021, 31(5):331–344. doi: [10.1016/j.tcb.2021.01.010](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.01.010).
- [29] Łukasik P, Załuski M, Gutowska I. Cyclin-dependent kinases (CDK) and their role in diseases development-review[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(6):2935. doi: [10.3390/ijms22062935](https://doi.org/10.3390/ijms22062935).
- [30] Wu YS, Liang S, Li DY, et al. Cell cycle dysregulation and renal fibrosis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 714320. doi: [10.3389/fcell.2021.714320](https://doi.org/10.3389/fcell.2021.714320).
- [31] Liu B, Li XK, Sun FZ, et al. HP-CagA+ regulates the expression of CDK4/CyclinD1 via reg3 to change cell cycle and promote cell proliferation[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 21(1): 224. doi: [10.3390/ijms21010224](https://doi.org/10.3390/ijms21010224).

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 杨慧芳, 汤蕊, 罗雪, 等. 甲状腺乳头状癌细胞中长链非编码 RNA FoxP4-AS1 的表达及其生物学功能[J]. *中国普通外科杂志*, 2022, 31(5): 619–630. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2022.05.007](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2022.05.007)

Cite this article as: Yang HF, Tang R, Luo X, et al. Expression of long non-coding RNA FoxP4-AS1 in papillary thyroid carcinoma cells and its biological function[J]. *Chin J Gen Surg*, 2022, 31(5):619–630. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2022.05.007](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2022.05.007)