



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.11.021
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.11.021
China Journal of General Surgery, 2023, 32(11):1813-1818.

· 简要论著 ·

miR-204-5p/TNFRSF12A轴对甲状腺乳头状癌细胞侵袭能力的影响及机制

喻洁, 杨秋怡, 易嘉宁, 曾杰

[湖南省人民医院(湖南师范大学附属第一医院)乳甲外科, 湖南长沙410005]

摘要

背景与目的: 前期, 笔者通过生物信息学分析和验证发现 miR-204-5p 在甲状腺乳头状癌 (PTC) 中呈低表达, 并可能是 PTC 发生发展中的关键分子。因此, 本研究进一步探讨 miR-204-5p 对 PTC 细胞侵袭能力的影响及机制。

方法: 采用 Transwell 实验检测 miR-204-5p 过表达和敲低对 PTC 细胞系 TPC-1 细胞的侵袭能力影响; 通过 miRDB 网站预测 miR-204-5p 下游靶基因, 并采用 Western blot 实验、Transwell 实验、GEPIA 数据库分析及双荧光素酶报告基因实验验证。

结果: Transwell 实验结果显示, 过表达 miR-204-5p 的 TPC-1 细胞侵袭能力明显降低, 而 miR-204-5p 抑制的 TPC-1 细胞侵袭能力明显增强 (均 $P < 0.05$)。miRDB 网站预测显示, TNFRSF12A 可能为 miR-204-5p 下游靶基因; Western blot 结果显示, 过表达 miR-204-5p 的 TPC-1 细胞 TNFRSF12A 表达下调, 而 miR-204-5p 抑制的 TPC-1 细胞 TNFRSF12A 表达上调; 过表达 TNFRSF12A 的 TPC-1 细胞侵袭能力明显增强, TNFRSF12A 抑制的 TPC-1 细胞的侵袭能力明显降低; TNFRSF12A 可逆转 miR-204-5p 对 TPC-1 细胞侵袭能力的影响 (均 $P < 0.05$)。GEPIA 数据库分析显示, TNFRSF12A 在 PTC 组织中高表达。双荧光素酶报告基因实验结果显示, TNFRSF12A 是 miR-204-5p 的靶基因。

结论: miR-204-5p 可靶向结合 TNFRSF12A mRNA 的 3'UTR 抑制 TNFRSF12A 的表达, 而 PTC 细胞中 miR-204-5p 表达下调, 削弱了其对 TNFRSF12A 表达的抑制, 从而导致 PTC 细胞侵袭能力增强。

关键词

甲状腺肿瘤; 癌, 乳头状; 微RNAs; TNFRSF12A

中图分类号: R736.1

甲状腺癌是全球最常见的内分泌系统恶性肿瘤, 已成为恶性肿瘤第8位, 为女性第4位高发癌症, 严重加重全球卫生负担, 而甲状腺乳头状癌 (papillary thyroid carcinoma, PTC) 是甲状腺癌的主要形式, 约占所有甲状腺癌患者的 80%~85%^[1]。PTC 的主要特征之一是能够侵入邻近结构, 例如淋巴管。大约有 10% 的患者在初诊时已经具有转移病灶。尽管大多数 PTC 在生物学行为上表现良好,

但由于其发病率和复发率均较高, 仍严重威胁人类健康。随着对 PTC 分子发病机制的深入研究, 从基因水平探讨 PTC 的分子机制, 分析 PTC 发生、发展过程中关键基因的改变, 寻找更加有效的治疗靶点, 对 PTC 的预防及治疗至关重要。

microRNA (miRNA) 是一类小型非编码 RNA, 能够识别特定目标 mRNA 的 3' 非翻译区域 (3'UTR), 并在转录后水平通过促进靶 mRNA 的降解或抑制翻译过程而发挥负调控基因表达的作用。细胞内主要信号通路往往与关键 miRNA 分子相互协调作用, 促进肿瘤发展。Su 等^[2]发现 miR-200a 通过调节 HIF-1 α /VEGF 信号通路促进宫颈癌细胞增殖; Kim 等^[3]发现 miR-155 能驱动肿瘤细胞的增殖, 其表达情况与乳腺癌患者的生存密切相关; Larson

基金项目: 湖南省教育厅科学研究基金资助项目 (20B355)。

收稿日期: 2023-10-02; **修订日期:** 2023-11-05。

作者简介: 喻洁, 湖南省人民医院/湖南师范大学附属第一医院主治医师, 主要从事甲状腺及乳腺疾病临床及基础方面的研究。

通信作者: 曾杰, Email: zengjie227@126.com

等^[4]通过高通量的检测技术在前列腺癌中建立了与肿瘤恶性进展相关的基因和 miRNA 调控网络；Chou 等^[5]发现在肺癌中 EGFR 信号可以通过 Ras/ERK/Myc 信号通路诱导 miR-7 的表达，而 miR-7 通过其靶点 EGFR 影响 Akt 信号通路的活性；Nourmohammadi 等^[6]发现在食道癌中 miR-200c 可以通过 Akt 信号通路使肿瘤对化疗产生耐药性；miR-21 是一种致癌的 miRNA，Dan 等^[7]发现其在体外与乳腺肿瘤的生长和转移相关，而体内高水平的 miR-21 预示着乳腺癌患者预后不良，而下调 miR-21 的表达可以改善乳腺癌的疾病进展。由此可见，miRNA 分子参与了肿瘤细胞内信号转导网络的调控功能，对肿瘤的发生、发展和预后起到了关键性的作用。

通过前期查阅文献、数据^[8]和笔者在 PTC 细胞中相关分子表达验证发现，miR-204-5p 在 PTC 中呈低表达，并可能作为关键分子在 PTC 中发挥重要作用。因此，本研究进一步探讨 miR-204-5p 对 PTC 侵袭能力影响的调控机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

选用 PTC 细胞系 TPC-1 细胞，根据细胞培养要求选用 1640 培养基，并在培养基中加入 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素和 1% 谷氨酰胺，将细胞放置于 5% CO₂ (v/v) 的培养箱中孵育，设置温度为 37 ℃。

1.2 qRT-PCR 实验

收集细胞样本后，用 TRIzol 法提取各组细胞总 RNA，核酸定量仪检测 RNA 的纯度和浓度。按照 Invitrogen 公司“用于 qRT-PCR 的 M-MLV 第一链合成系统”操作说明，取 1~3 μg 总 RNA 建立 20 μL 逆转录体系合成 cDNA。继之，使用 Invitrogen 公司的“Platinum SYBR Green qPCRSuperMix-UDG with ROX”试剂盒和 ABI 7500 Fast Real-time PCR 扩增仪进行荧光扩增。

1.3 Western blot 实验

电泳胶由上层胶（浓缩胶）和下层胶（分离胶）组成，下层胶可根据不同分子量大小配置浓度不一，可分为 15%、12%、10%、8% 不等，上层胶浓度为 5%。将配备好的胶嵌入电泳槽中，向槽内加满 1x 电泳液，取出玻璃槽中的梳子，分别加入待测样本，在待测样本临近孔中加入 1 μL

Protein Marker，然后继续在电泳盒中加入电泳液。接通电源即开始电泳。然后通过转膜、封闭、一抗孵育、洗膜、二抗孵育、洗膜后显影。将 A、B 显影液按 1:1 体积提前配备好，将 PVDF 膜浸润显影液后，通过 Bio-Rad 蛋白显影成像系统进行曝光处理。根据曝光后蛋白条带的清晰程度可手动调节曝光程序和曝光时间。

1.4 Transwell 侵袭实验

在 24 孔板下室加入 500 μL 含 10% FBS 培养基。然后用镊子将 Transwell 小室置于 24 孔板内。每孔加入 200 μL 细胞悬液到 Transwell 上室中。培养箱培养 24 h 后可进行固定染色。取出 Transwell 小室，吸走培养基，用棉签轻轻擦拭 Matrigel 和上室内的细胞。在 24 孔板干净的孔中加入 4% 多聚甲醛 600 μL，将小室放入后固定 20~30 min。弃去固定液，将小室在盛有 PBS 的 6 cm 皿中刷洗 1 遍。用 0.1% 结晶紫染色 5~10 min，PBS 刷洗 3 遍，除去未与细胞结合的结晶紫，用棉签轻轻擦拭小室的上侧，将非特异性结合于小室上表面的染料擦掉，以便后续镜检。适当风干后，在 10 倍显微镜下选取 5 个视野观察细胞并计数。

1.5 双荧光素酶报告基因实验

通过 miRDB 网站预测 miR-204-5p 与 TNFRSF12A 3'UTR 结合位点，然后分别构建 TNFRSF12A 3'UTR 野生型和突变型质粒，过表达 miR-204-5p 和加入 miR-204-5p 抑制剂后，采用双荧光素酶报告系统分别测量野生型和突变型 TNFRSF12A 3'UTR 的荧光值。

1.6 统计学处理

每次实验都进行 3 次重复，统计分析采用 SPSS 19.0 统计软件。研究结果用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，用单因素方差分析或 *t* 检验统计不同组间的差异。实验结果可视化分析用 Graphpad 软件。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-204-5p 对 PTC 细胞侵袭能力的影响

Transwell 实验结果显示，过表达 miR-204-5p 后，TPC-1 细胞的侵袭能力减弱（图 1A），而抑制 miR-204-5p 表达后，TPC-1 细胞的侵袭能力增强（均 *P* < 0.05）（图 1B）。

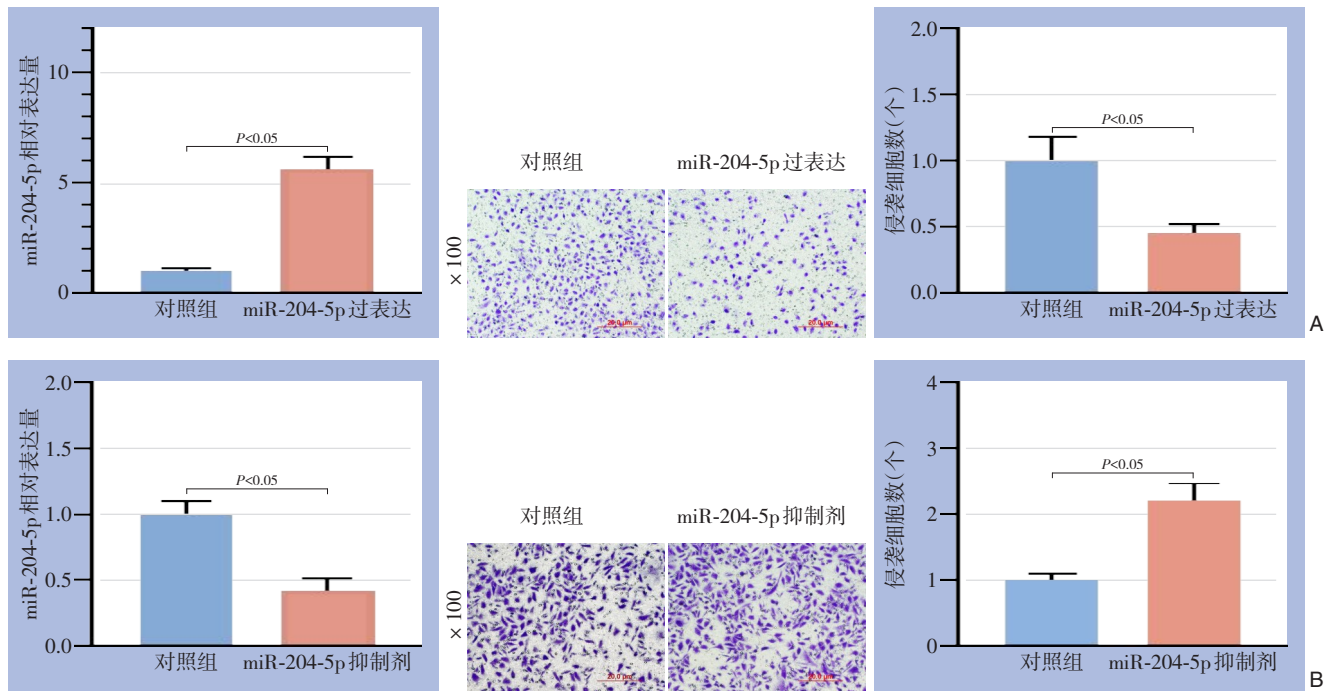


图 1 miR-204-5p 对 TPC-1 细胞的侵袭能力的影响 A: 过表达 miR-204-5p 后 TPC-1 细胞侵袭能力减弱; B: 加入 miR-204-5p 抑制剂后 TPC-1 细胞侵袭能力增强

2.2 miR-204-5p 下游靶基因分析

通过生物信息学分析, TNFRSF12A 可能为 miR-204-5p 调控的靶点, 且可能为 PTC 预后标志物^[8]。有研究^[9]显示, TNFRSF12A 与血管生成相关。先前的研究发现, 血管生成对肿瘤的生长和进展至关重要。同时 Tanaka 等^[10]报道了血管生成和抗血管生成因子之间的平衡与 PTC 的明显侵袭相关, 提示了血管生成在 PTC 中的重要性。故推测这两者与 PTC 的发生发展有关联。为了进一步验证 miR-204-5p 对 TNFRSF12A 的调控, 用 Western blot 实验检验了过表达或抑制 miR-204-5p 后 PTC 细胞中 TNFRSF12A 的表达情况, 结果表明: 过表达 miR-204-5p 后 TPC-1 细胞中 TNFRSF12A 表达降低, 抑制 miR-204-5p 后 TPC-1 细胞中 TNFRSF12A 表达升高 (均 $P<0.05$) (图 2A-B)。进一步功能实验表明: TNFRSF12A 可增强 TPC-1 细胞侵袭能力, 而敲低 TNFRSF12A 后 TPC-1 细胞的侵袭能力减弱 (均 $P<$

0.05) (图 2C-D)。同时, 逆转实验表明过表达 TNFRSF12A 可部分逆转 miR-204-5p 对 TPC-1 细胞侵袭能力的影响 (均 $P<0.05$) (图 2E)。同时, GEPIA 数据库 (<http://gepia.cancer-pku.cn>) 分析也表明 TNFRSF12A 在 PTC 组织中高表达 (图 2F)。

2.3 miR-204-5p 对 TNFRSF12A 的调控关系分析

为了在分子水平验证 miR-204-5p 对 TNFRSF12A 的调控, 进一步分析 miR-204-5p 在 TNFRSF12A 3'UTR 的潜在结合位点 (图 3A), 使用双荧光素酶报告实验对该靶点功能进行了检测, 结果表明, 过表达 miR-204-5p 降低了转染野生型 TNFRSF12A 3'UTR TPC-1 细胞中的荧光素酶活性, 而加入 miR-204-5p 抑制剂增加了转染野生型 TNFRSF12A 3'UTR TPC-1 细胞中荧光素酶的活性 (均 $P<0.05$), 而对突变型 TNFRSF12A 3'UTR 无明显影响 (均 $P>0.05$) (图 3B)。

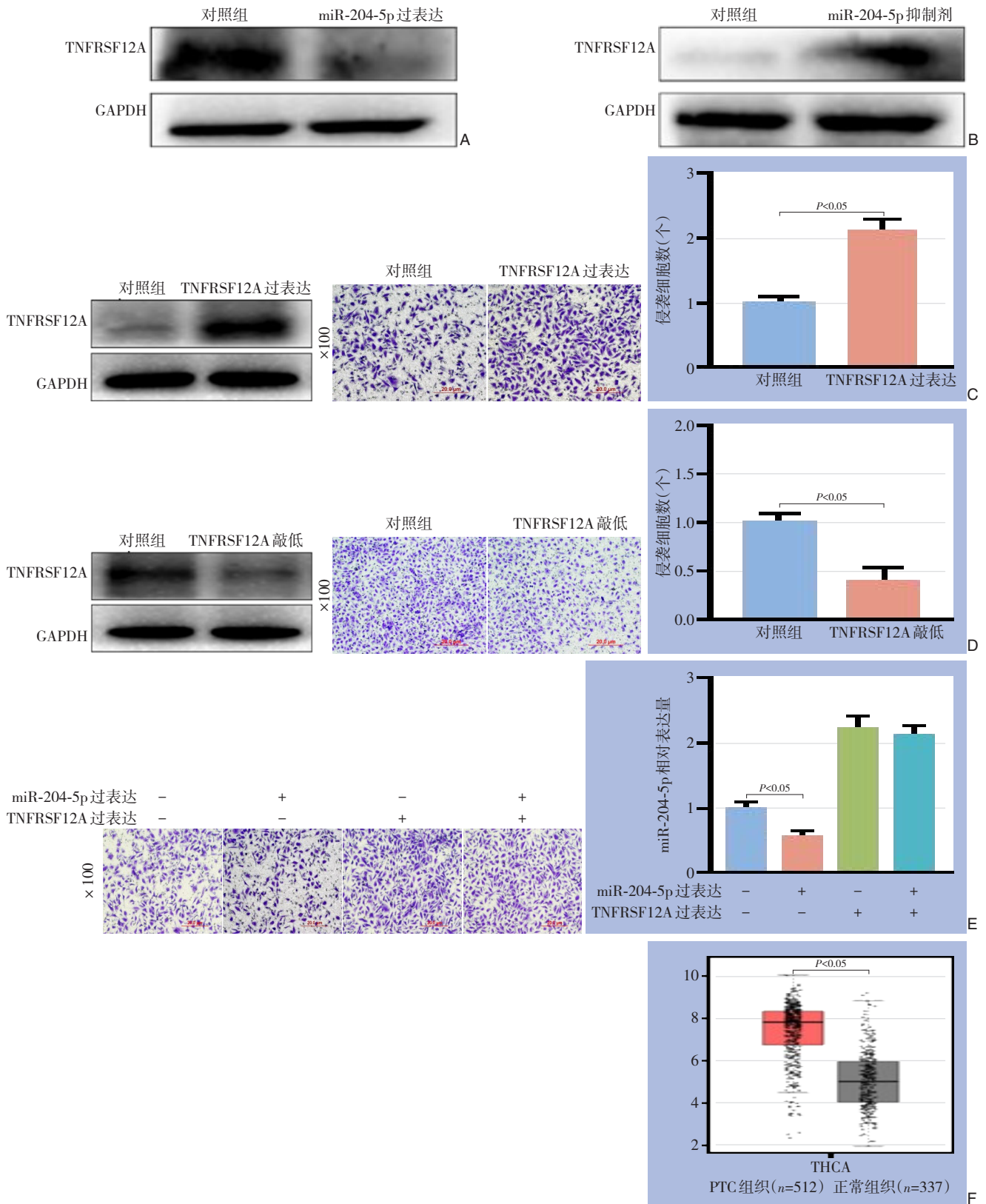


图2 miR-204-5p 下游靶基因分析 A: 过表达 miR-204-5p 后 TPC-1 细胞 TNFRSF12A 蛋白表达水平降低; B: 加入 miR-204-5p 抑制剂后 TPC-1 细胞 TNFRSF12A 蛋白表达水平增高; C: TPC-1 细胞过表达 TNFRSF12A 后侵袭能力增强; D: TPC-1 细胞敲低 TNFRSF12A 后侵袭能力减弱; E: TNFRSF12A 可逆转 miR-204-5p 降低 TPC-1 侵袭能力的作用; F: GEPIA 数据库分析表明 TNFRSF12A 在 PTC 组织中高表达

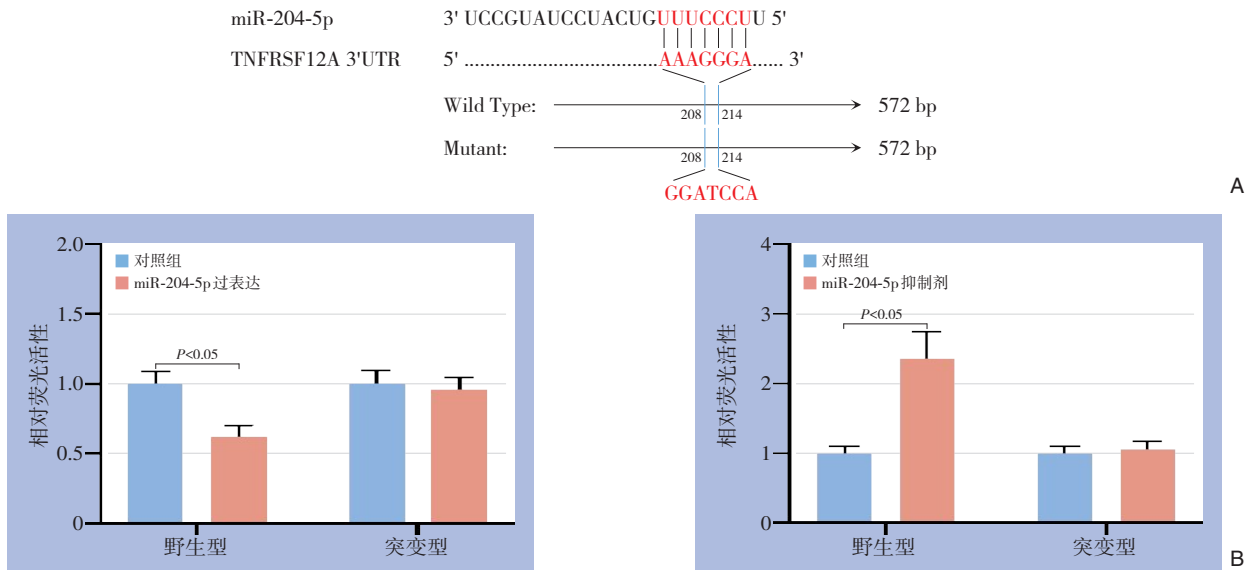


图3 miR-204-5p对TNFRSF12A的调控关系分析 A: 与miR-204-5p相作用的野生型及突变型TNFRSF12A 3'UTR序列; B: 双荧光素酶实验验证转染野生型或突变型TNFRSF12A 3'UTR后, 过表达或加入miR-204-5p抑制剂对TPC-1细胞的影响

3 讨论

根据全球数据^[11]表示, 在过去的30年间, 甲状腺癌的发病呈爆发式增长, 而PTC约占所有甲状腺癌病例的85%左右。在碘缺乏或碘过量饮食的国家, 它也是最常见甲状腺癌亚型^[12]。PTC可发生在任何年龄^[13-14], 其发病的平均年龄为40岁, 且发病率随着年龄的增长而增加, 女性更为多见, 比例为2:1~4:1^[15]。PTC的发病机制及原因尚不明确, 可能与放射线接触史^[16]、碘缺乏或遗传等因素^[17]相关。进一步研究和探索PTC发病的分子机制和潜在的治疗靶点对PTC的预防和治疗有重要意义。

miRNA通过抑制细胞质中mRNA的翻译和(或)降解, 以及改变细胞核中基因表达, 在基因的转录调节中发挥关键作用^[18]。miRNA的失调已经被证实与多种疾病的发生与进展密切相关, 与遗传分析相比, 关于miRNA作为PTC生物标志物的应用的研究有很多。目前, 已经有研究证实, 与正常甲状腺组织相比, PTC始终与特定miRNA(例如miR-146b, miR-221和miR-222)的过表达有关。这些miRNA的表达显然与指示肿瘤侵袭性的特征有关, 例如甲状腺癌侵犯、复发、淋巴结或远处转移和BRAFV600E突变等^[19-20]。

笔者通过对相关的测序进行分析, 筛选出了潜在研究靶点(miR-204-5p、miR-7-2、miR-146b、miR-222), 然后通过PTC癌组织和细胞中进行验证, 最终确定miR-204-5p为研究对象, 并通过侵袭实验验证了miR-204-5p对PTC细胞的影响, 进一步

证实了miRNA在PTC进展中的作用。由于目前研究的局限性, 其他三种miRNA在PTC中的作用及分子机制仍需进一步实验证实。

结合到下游基因3'UTR区域以此抑制下游基因的表达的转录后调控机制是miRNA调控的最主要分子机制。以此为基础, 结合相应的生物信息学分析数据, 本研究筛选出了TNFRSF12A可能作为miR-204-5p调控靶点。TNFRSF12A, 也被称为Fn14, 它是TNF受体超家族中包含细胞质死亡结构域的最小个体。有研究报道TNFRSF12A在肝癌、肺癌等恶性肿瘤中表达升高, 其水平的升高与临床病理分期、淋巴结转移相关^[21-22], TNFRSF12A也被认为是促进前列腺癌骨转移的一个重要因素^[23], 但它与PTC的相关研究较少。本研究中发现TNFRSF12A在PTC组织中高表达, 结合miR-204-5p在PTC组织中低表达, 预示着miR-204-5p可能通过转录后调控抑制TNFRSF12A。本研究结果也证实了miR-204-5p能通过结合TNFRSF12A 3'UTR转录后调控其表达。

总之, miR-204-5p/TNFRSF12A轴PTC的侵袭与进展中起了重要作用, 机制为PTC细胞中miR-204-5p表达下调, 削弱了对TNFRSF12A表达的抑制, 从而导致PTC细胞侵袭能力增强。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明: 曾杰实验设计、实验指导、审核和修改论文; 喻洁、杨秋怡负责文献查阅、实验实施、数据收集和处理; 喻洁、易嘉宁负责数据分析和解释; 喻洁负责手稿写作。

参考文献

- [1] 李杨, 王权, 杨珂璐, 等. 基于文献计量学的甲状腺癌诊疗进展历程的循证可视化研究[J]. 中国普通外科杂志, 2023, 32(5):707-717. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2023.05.010.
- Li Y, Wang Q, Yang KL, et al. Evidence-based visualization study on the progress of diagnosis and treatment for thyroid cancer based on bibliometrics[J]. China Journal of General Surgery, 2023, 32(5): 707-717. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2023.05.010.
- [2] Su XL, Lang CH, Luan AA, et al. miR-200a promotes proliferation of cervical cancer cells by regulating HIF-1 α /VEGF signaling pathway[J]. J BUON, 2020, 25(4):1935-1940.
- [3] Kim S, Lee ES, Lee EJ, et al. Targeted eicosanoids profiling reveals a prostaglandin reprogramming in breast Cancer by microRNA-155[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40(1): 43. doi: 10.1186/s13046-021-01839-4.
- [4] Larson NB, McDonnell SK, Fogarty Z, et al. A microRNA transcriptome-wide association study of prostate cancer risk[J]. Front Genet, 2022, 13:836841. doi: 10.3389/fgene.2022.836841.
- [5] Chou YT, Lin HH, Lien YC, et al. EGFR promotes lung tumorigenesis by activating miR-7 through a Ras/ERK/Myc pathway that targets the Ets2 transcriptional repressor ERF[J]. Cancer Res, 2010, 70(21): 8822-8831. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0638.
- [6] Nourmohammadi F, Forghanifard MM, Abbaszadegan MR, et al. EZH2 regulates oncomiR-200c and EMT markers in esophageal squamous cell carcinomas[J]. Sci Rep, 2022, 12: 18290. doi: 10.1038/s41598-022-23253-2.
- [7] Dan T, Shastri AA, Palagani A, et al. miR-21 plays a dual role in tumor formation and cytotoxic response in breast tumors[J]. Cancers (Basel), 2021, 13(4):888. doi: 10.3390/cancers13040888.
- [8] Qiu J, Zhang W, Zang C, et al. Identification of key genes and miRNAs markers of papillary thyroid cancer[J]. Biol Res, 2018, 51(1):45. doi: 10.1186/s40659-018-0188-1.
- [9] Ruiz BI, Lowman XH, Yang Y, et al. Alpha-ketoglutarate regulates Tnfrsf12a/Fn14 expression via histone modification and prevents cancer-induced Cachexia[J]. Genes, 2023, 14(9):1818. doi: 10.3390/genes14091818.
- [10] Tanaka K, Sonoo H, Kurebayashi J, et al. Inhibition of infiltration and angiogenesis by thrombospondin-1 in papillary thyroid carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(5):1125-1131.
- [11] Filetti S, Durante C, Hartl D, et al. Thyroid cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up[J]. Ann Oncol, 2019, 30(12): 1856-1883. doi: 10.1093/annonc/mdz400.
- [12] Fan LJ, Meng FG, Gao YY, et al. Insufficient iodine nutrition may affect the thyroid cancer incidence in China[J]. Br J Nutr, 2021, 126(12):1852-1860. doi: 10.1017/S0007114521000593.
- [13] Raposo L, Morais S, Oliveira MJ, et al. Trends in thyroid cancer incidence and mortality in Portugal[J]. Eur J Cancer Prev, 2017, 26(2):135-143. doi: 10.1097/cej.0000000000000229.
- [14] Todaro M, Bonventre S, Mannino E, editor. Trends In Thyroid Cancer Research[M]. New York: Nova Science Publishers Inc., 2007.
- [15] LiVolsi VA. Papillary thyroid carcinoma: an update[J]. Mod Pathol, 2011, 24(Suppl 2):S1-9. doi: 10.1038/modpathol.2010.129.
- [16] Reiners C, Drozd V. Editorial: radiation as risk factor, early diagnosis, therapy, and follow-up of differentiated thyroid cancer[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2021, 12: 797969. doi: 10.3389/fendo.2021.797969.
- [17] Zhou JG, Singh P, Yin KH, et al. Non-medullary thyroid cancer susceptibility genes: evidence and disease spectrum[J]. Ann Surg Oncol, 2021, 28(11): 6590-6600. doi: 10.1245/s10434-021-09745-x.
- [18] 王欣, 徐翰, 范培芝, 等. microRNA-186-5p 及其靶基因 CLDN18 与甲状腺乳头状癌复发风险的关系[J]. 中国普通外科杂志, 2020, 29(11): 1336-1345. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2020.11.007.
- Wang X, Xu H, Fan PZ, et al. Relationship between microRNA-186-5p with its target gene CLDN18 and recurrence risk of papillary thyroid carcinoma[J]. China Journal of General Surgery, 2020, 29(11): 1336-1345. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2020.11.007.
- [19] Chou CK, Liu RT, Kang HY. microRNA-146b: a novel biomarker and therapeutic target for human papillary thyroid cancer[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(3):636. doi: 10.3390/ijms18030636.
- [20] Ma LX, Espin-Garcia O, Bedard PL, et al. Clinical application of next-generation sequencing in advanced thyroid cancers[J]. Thyroid, 2022, 32(6):657-666. doi: 10.1089/thy.2021.0542.
- [21] Wang T, Ma S, Qi X, et al. Knockdown of the differentially expressed gene TNFRSF12A inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration in vitro[J]. Mol Med Rep, 2017, 15(3): 1172-1178. doi: 10.3892/mmr.2017.6154.
- [22] Chang WA, Yen MC, Hung JY, et al. Investigation of the role of tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis in non-small cell lung cancer[J]. Oncol Rep, 2018, 39(2):573-581. doi: 10.3892/or.2017.6141.
- [23] Li L, Ameri AH, Wang SM, et al. EGR1 regulates angiogenic and osteoclastogenic factors in prostate cancer and promotes metastasis[J]. Oncogene, 2019, 38(35): 6241-6255. doi: 10.1038/s41388-019-0873-8.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 喻洁, 杨秋怡, 易嘉宁, 等. miR-204-5p/TNFRSF12A 轴对甲状腺乳头状癌细胞侵袭能力的影响及机制[J]. 中国普通外科杂志, 2023, 32(11): 1813-1818. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2023.11.021

Cite this article as: Yu J, Yang QY, Yi JN, et al. Effect of the miR-204-5p/TNFRSF12A axis on the invasive ability of thyroid papillary cancer cells and the mechanism[J]. Chin J Gen Surg, 2023, 32(11): 1813-1818. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2023.11.021