doi:10.11659/jjssx.06E021023

·基础研究·

沉默 PROX1 基因对甲状腺乳头状癌 TPC-1 细胞的影响

刘 菲[1],张晨曦[1],张苗苗[1],孙小莉[1],韩晨博[2],王 佳[3] (1.宝鸡市妇幼保健院病理科,陕西 宝鸡 721000;2.宝鸡市妇幼保健院综合外科,陕西 宝鸡 721000;3.西安市人民医院病理科,陕西 西安 710000)

[摘 要] **目的** 探讨沉默 prospero 相关同源异形盒蛋白 1(PROX1)基因对甲状腺乳头状癌(PTC)TPC-1 细胞增殖、侵袭、迁移和凋亡的影响。**方法** 将 TPC-1 细胞分别转染 NC-siRNA(NC-siRNA 组)和 PROX1-siRNA(PROX1-siRNA 组)。Western blot 检测 PTC 细胞系 BCPAP、TPC-1、K1、IHH4 和正常甲状腺滤泡上皮细胞系 Nthy-ori-3-1 中 PROX1 蛋白表达水平。CCK-8 法检测细胞增殖能力;Transwell 实验检测细胞侵袭能力;细胞划痕实验检测细胞迁移能力;Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测细胞凋亡情况。Western blot检测 Notch1 信号通路相关蛋白(hes1、hes5、NICD)表达水平。**结果** 与正常甲状腺滤泡上皮细胞系 Nthy-ori-3-1 比较,PTC 细胞系 TPC-1、BCPAP、K1 和 IHH4 中 PROX1 蛋白表达水平明显较高($P<0.05$),其中 TPC-1 最高。与 NC-siRNA 组比较,PROX1-siRNA 组 PROX1 蛋白表达水平及细胞增殖、侵袭、迁移能力较低,细胞凋亡率较高($P<0.05$)。与 NC-siRNA 组比较,PROX1-siRNA 组 hes1、hes5 和 NICD 蛋白表达水平较低($P<0.05$)。**结论** 沉默 PROX1 可通过抑制 Notch1 信号通路进而抑制 TPC-1 细胞的增殖、侵袭、迁移,并促进其凋亡。

[关键词] prospero 相关同源异形盒蛋白 1;甲状腺乳头状癌;增殖;侵袭;迁移;凋亡

[中图分类号] R736.1 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-06-04

Effect of silencing PROX1 gene on TPC-1 cells of papillary thyroid carcinoma

LIU Fei[1],ZHANG Chen-xi[1],ZHANG Miao-miao[1],SUN Xiao-li[1],HAN Chen-bo[2],WANG Jia[3] (1.Department of Pathology,Baoji Maternal and Child Health Care Hospital,Baoji Shaanxi 721000,China;2.Department of Comprehensive Surgery,Baoji Maternal and Child Health Care Hospital,Baoji Shaanxi 721000,China;3.Department of Pathology,Xi'an People's Hospital,Xi'an Shaanxi 710000,China)

Abstract: Objective To investigate the effect of silencing prospero-related homeobox 1 (PROX1) gene on the proliferation,invasion,migration and apoptosis of papillary thyroid carcinoma (PTC) TPC-1 cells. **Methods** The TPC-1 cells were transfected with NC-siRNA (the NC-siRNA group) and PROX1-siRNA (the PROX1-siRNA group),respectively. Western blot was used to detect the expression levels of PROX1 protein in the PTC cell lines BCPAP,TPC-1,K1,IHH4 and normal thyroid follicular epithelial cell line Nthy-ori-3-1. CCK-8 method was used to detect the cell proliferation ability;Transwell test was used to detect the cell invasion ability;cell scratch test was used to detect the cell migration ability;Annexin V-FITC/PI flow cytometry was used to detect the cell apoptosis ability. Western blot was used to detect the expression levels of Notch1 signaling pathway-related proteins (hes1,hes5 and NICD). **Results** Compared with the normal thyroid follicular epithelial cell line Nthy-ori-3-1,the expression levels of PROX1 protein in the PTC cell lines TPC-1,BCPAP,K1 and IHH4 were significantly higher ($P<0.05$),with TPC-1 being the highest. Compared with the NC-siRNA group,the PROX1-siRNA group had lower PROX1 protein expression level,cell proliferation ability,invasion ability and migration ability,and higher cell apoptosis rate ($P<0.05$). Compared with the NC-siRNA group,the protein expression levels of hes1,hes5 and NICD in the PROX1-siRNA group were lower ($P<0.05$). **Conclusion** Silencing PROX1 can inhibit the proliferation,invasion and migration of TPC-1 cells and promote their apoptosis by inhibiting the Notch1 signaling pathway.

Keywords: prospero-related homeobox 1;papillary thyroid carcinoma;proliferation;invasion;migration;apoptosis

甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma,PTC)在甲状腺癌中最为常见。随着外科技术及放化疗技术的发展,PTC 患者的 10 年生存率可达 74%~95%,但是复发和远处转移仍然是 PTC 患者死亡的主要原因[1]。因此,寻找潜在的 PTC 分子生物学标志物是临床及基础研究的重点。

prospero 相关同源异形盒蛋白 1(prospero-related homeobox 1,PROX1)是果蝇的同源异型盒基因 prospero 在哺乳动物中的同源框基因转录因子,在淋巴管的形成和发育中发挥重要作用[2]。越来越多的研究证实,PROX1 在脑胶质母细胞瘤、乳腺癌和肝细胞癌等肿瘤组织中高表达,并参与肿瘤的发生发展[3-5]。Notch1 是 PROX1 下游的信号通路[6],在 PTC 的发生发展中起重要作用[7]。TPC-1 是甲状腺乳头状癌细胞,在 PTC 体外研究中应用广泛[8]。为了探索 PROX1 在

[基金项目] 陕西省科学技术研究发展计划项目(2018JM014)

[通信作者] 王 佳,E-mail:526645234@qq.com

PTC 中的表达及意义,本研究检测 PTC 细胞系 TPC-1、BCPAP、K1、IHH4 中 PROX1 的表达,利用 RNA 干扰技术抑制 TPC-1 细胞中 PROX1 的表达,观察 TPC-1 细胞增殖、侵袭、凋亡及 Notch1 信号通路相关蛋白表达水平的变化。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

PTC 细胞系 BCPAP、TPC-1、K1、IHH4 和正常甲状腺滤泡上皮细胞系 Nthy-ori-3-1 均购于中科院上海细胞库,DMEM 培养基和胎牛血清购于南京生航生物技术有限公司,质粒由上海吉凯基因科技有限公司设计并提供,Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒购于美国 Promega 公司,CCK-8 试剂盒、Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒和 Transwell 小室均购于上海沪震实业有限公司,PROX1、hes1、hes5、NICD 和 GAPDH 抗体均购于美国 Sigma 公司。仪器:IX71 型倒置显微镜(奥林巴斯,日本)、680 型酶标仪(Bio-Rad,美国)、AlphaImager Mini 型凝胶成像仪(ProteinSimple,美国)、FACSCanto Ⅱ型流式细胞仪(BD,美国)。

1.2 细胞培养及转染

将 BCPAP、TPC-1、K1、IHH4、Nthy-ori-3-1 细胞接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,置于 5% CO_2、37 ℃恒温箱中培养。待细胞融合度达 80% 时进行传代,取 5 ~ 15 代对数生长期细胞进行后续实验。将TPC-1细胞随机分为 NC-siRNA 组和 PROX1-siRNA 组,用Lipofectamine™ 2000 转染 NC-siRNA 和 PROX1-siRNA。NC-siRNA 序列:5'-GGACGGGAAGUUAGACAAAGA-3';PROX1-siRNA 序列:5'-GGAAGUUAGACAAAGAUGAGA-3'。转染步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.3 Western blot 检测 PROX1、hes1、hes5、NICD 蛋白表达水平

转染 48 h 后用 RAPI 裂解液提取总蛋白,10% SDS-PAGE 分离蛋白,用半干转移法将蛋白转至 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉封闭 2 h,加入 PROX1(1∶500)、hes1(1∶1 000)、hes5(1∶1 000)、NICD(1∶1 000)和 GAPDH(1∶1 000)一抗,4 ℃孵育过夜,次日除去一抗,用 TBST 缓冲液洗涤 3 次后加入二抗(羊抗兔,1∶500),封闭 1 h。最后用 ECL 法显色,凝胶成像系统拍照,用 Image J 软件分析灰度值。

1.4 CCK-8 法检测细胞增殖能力

转染 48 h 后取对数生长期细胞,接种于 96 孔板。待细胞贴壁后,分别于培养 24 h、48 h、72 h 和 96 h 时加入 10 μL CCK-8 溶液,孵育 2 h 后用酶标仪检测光密度 OD 值,检测细胞增殖能力。设置 5 个复孔。

1.5 Transwell 实验检测细胞侵袭能力

在 Transwell 小室的上室铺基质胶,随后将 TPC-1 细胞接种于 24 孔板,以 2×10^5/mL 密度将细胞加入上室,每孔加量 100 μL;下室中加入培养基,每孔加量 250 μL。待细胞贴壁后更换上室培养液,继续培养 24 h。用无菌棉签拭去小室滤膜上的细胞,甲醛固定 15 min,HE 染色,光镜下统计膜背面侵袭的细胞数。设置 5 个复孔。

1.6 细胞划痕实验检测细胞迁移能力

取转染后细胞,以 5×10^4 个/孔密度将 TPC-1 细胞接种于 6 孔板,当细胞融合度达 90% 时,用无菌枪头进行划痕处理,随后置于无血清培养基中继续培养。培养 0 h、24 h 时用显微镜拍照,并计算细胞迁移率,细胞迁移率 =(0 h 划痕宽度 - 24 h 划痕宽度)/0 h划痕宽度 ×100%[8]。设置 5 个复孔。

1.7 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测凋亡细胞

取转染后细胞,用 500 μL 预冷 1 × 结合缓冲液将其制成 1×10^6/mL 的悬液。加入 5 μL 异硫氰基荧光素,混匀后孵育 10 min。随后加入 2.5 μL 碘化丙啶孵育 5 min。用流式细胞仪检测细胞凋亡率。设置 5 个复孔。

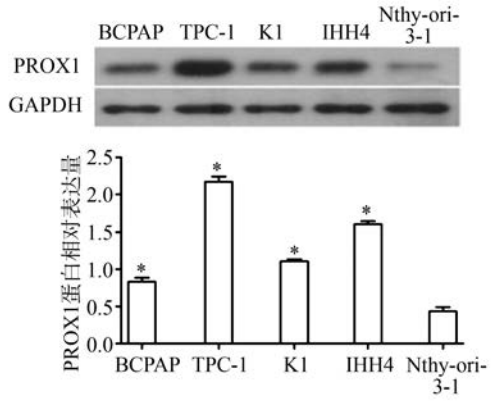
1.8 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析或 t 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PROX1 在 PTC 细胞系中的表达

与正常甲状腺滤泡上皮细胞系 Nthy-ori-3-1 比较,PTC 细胞系 TPC-1、BCPAP、K1 和 IHH4 中 PROX1 蛋白表达水平明显较高($F=36.989$,$P<0.05$),其中 TPC-1 最高,见图 1。



*:与 Nthy-ori-3-1 比较,$P<0.05$

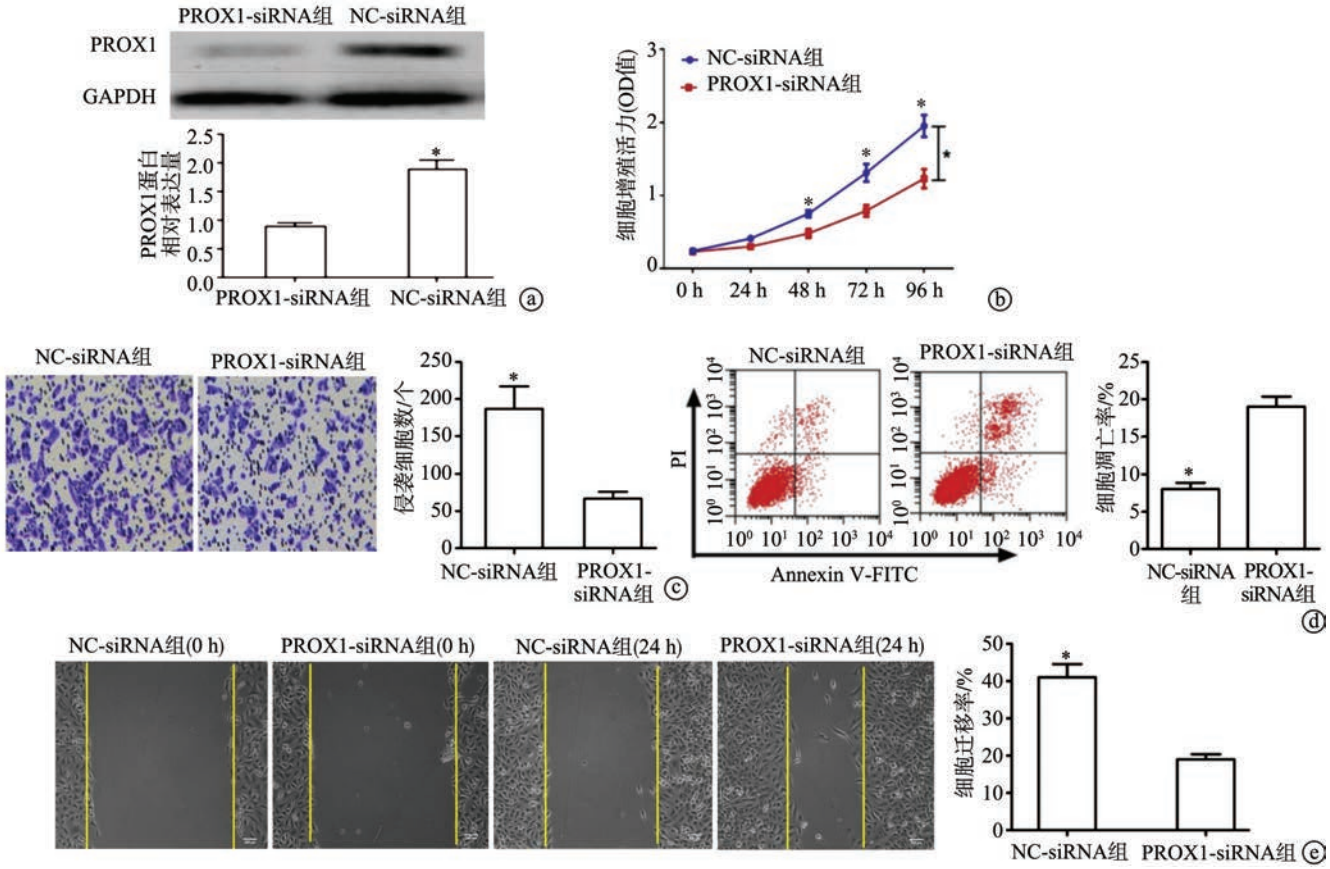
图 1 Western blot 检测细胞中 PROX1 蛋白表达

2.2 沉默 PROX1 基因对 TPC-1 细胞增殖、侵袭、迁移和凋亡的影响

与 NC-siRNA 组比较,PROX1-siRNA 组 PROX1 蛋白表达水平较低($t=19.012$,$P<0.05$),48 h、72 h 和 96 h 时细胞增殖活力 OD 值较低($t=6.034$,$P<0.05$),侵袭细胞数较少($t=10.012$,$P<0.05$),细胞迁移率较低($t=6.783$,$P<0.05$),细胞凋亡率较高($t=7.783$,$P<0.05$),见图 2。

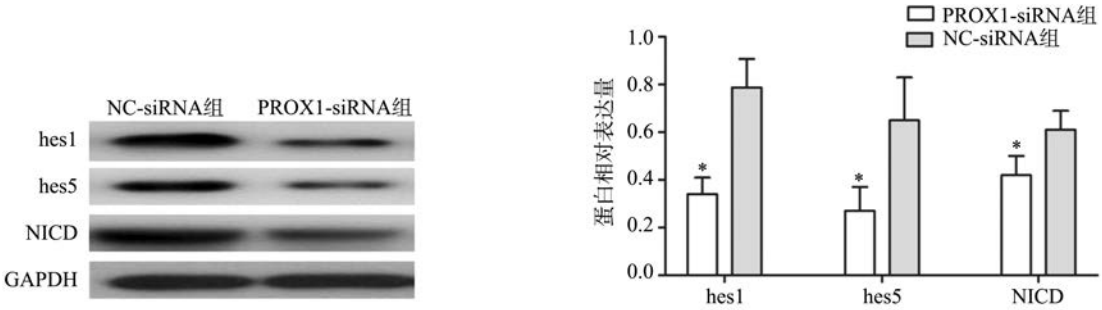
2.3 沉默 PROX1 基因对 TPC-1 细胞 Notch1 信号通路相关蛋白表达的影响

与 NC-siRNA 组比较,PROX1-siRNA 组 hes1($t=6.781$,$P<0.05$)、hes5($t=4.290$,$P=0.05$)和 NICD($t=8.342$,$P<0.05$)蛋白表达水平较低,见图 3。



a:Western blot 检测细胞中 PROX1 蛋白表达水平;b:CCK-8 法检测细胞增殖能力;c:Transwell 实验检测细胞侵袭能力(HE 染色,×100);d:Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测细胞凋亡;e:细胞划痕实验检测细胞迁移能力 *:与 PROX1-siRNA 组比较,$P<0.05$

图 2 沉默 PROX1 基因对 TPC-1 细胞增殖、侵袭、迁移和凋亡的影响



*:与 NC-siRNA 组比较,$P<0.05$

图 3 沉默 PROX1 基因对 TPC-1 细胞 Notch1 信号通路相关蛋白表达的影响

3 讨论

PROX1 在癌症的发生和发展中起着重要作用[9-11],但其作用机制尚未完全明确。有研究显示,PROX1 可以结合并抑制基质金属蛋白酶-14 的表达,从而促进肝细胞癌的血管生成和肿瘤侵袭[12]。PROX1 还能够促进核小体重塑,形成去乙酰化酶复合物,进而促进结直肠癌细胞的增殖[6]。另外,PROX1 与免疫炎症损伤

密切相关[13]。还有研究显示,PROX1 高表达于淋巴管内皮细胞,进而参与肿瘤淋巴管新生和淋巴转移[13-14]。PROX1 在甲状腺滤泡状癌和髓样癌中高表达[15-16],但 PROX1 在 PTC 中的表达以往少有报道。因此,本研究检测 PTC 细胞系 TPC-1、BCPAP、K1、IHH4 中 PROX1 的表达,探讨 PROX1 在 PTC 中的表达及意义。

本研究结果显示,与正常甲状腺滤泡上皮细胞系 Nthy-ori-3-1 比较,PTC 细胞系 TPC-1、BCPAP、K1 和 IHH4 中 PROX1 蛋白表达水平明显较高。沉默 PROX1 表达后 TPC-1 细胞的增殖、侵袭、迁移均受到抑制,且细胞凋亡率升高,说明 PROX1 可能作为促癌基因在 PTC 中发挥作用。Notch1 信号通路在甲状腺癌的发生和发展中起着重要作用,其可通过 DLL4 参与 PTC 肿瘤血管生成,并通过激活 MAPK 信号通路促进 PTC 癌细胞的增殖和侵袭[17-18]。Notch1 是 PROX1 的下游信号通路[6],抑制 TPC-1 细胞中 Notch1 的表达可以明显抑制 PTC 细胞的增殖、侵袭和迁移[18-19]。本研究结果显示,沉默 PROX1 基因可以明显抑制 Notch1 信号通路相关蛋白 hes1、hes5 和 NICD 的表达,提示沉默 PROX1 基因可能通过抑制 Notch1 信号通路抑制 TPC-1 细胞的增殖、侵袭、迁移,并促进其凋亡。

综上所述,PROX1 在 PTC 细胞中高表达,可能成为 PTC 的分子生物学标志物。本研究也存在一些局限性,如未检测 PTC 组织及血清中 PROX1 的表达,未分析 PROX1 与 PTC 临床病理特征和预后的关系,未来需要进一步分析 PTC 组织中 PROX1 的表达及其临床意义。

[参考文献]

[1] Miccoli P,Bakkar S. Surgical management of papillary thyroid carcinoma: an overview[J]. Updates Surg,2017,69(2):145-150. doi:10.1007/s13304-017-0449-5.

[2] Yu ZY,Wu L,Zhao FK,et al. RNA-seq reveals transcriptome changes of the embryonic lens cells in Prox1 tissue specific knockout mice[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2019,23(18):7740-7748. doi:10.26355/eurrev_201909_18983.

[3] Xu X, Wan X, Wei X. PROX1 promotes human glioblastoma cell proliferation and invasion via activation of the nuclear factor-κB signaling pathway[J]. Mol Med Rep,2017,15(2):963-968. doi:10.3892/mmr.2016.6075.

[4] 赵东丽,梁宪斌,王 艳,等. Prospero 相关同源异形盒蛋白 1 在乳腺癌组织中的表达及与预后相关性分析[J]. 中国癌症杂志,2019,29(4):272-276. doi:10.19401/j.cnki.1007-3639.2019.04.005.

[5] Liu Y,Ye X,Zhang JB,et al. PROX1 promotes hepatocellular carcinoma proliferation and sorafenib resistance by enhancing β-catenin expression and nuclear translocation[J]. Oncogene,2015,34(44):5524-5535. doi:10.1038/onc.2015.7.

[6] Högström J,Heino S,Kallio P,et al. Transcription factor prox1 suppresses Notch pathway activation via the nucleosome remodeling and deacetylase complex in colorectal cancer stem-like cells[J]. Cancer Res,2018,78(20):5820-5832. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-0451.

[7] 李 伟,饶文胜,张 伟,等. Notch-1 信号通路在甲状腺癌中作用的研究进展[J]. 现代肿瘤医学,2019,27(8):1429-1432. doi:10.3969/j.issn.1672-4992.2019.08.035.

[8] 余招焱,朱 昕,王超宇,等. 微小 RNA-136-5p 对甲状腺癌 TPC-1 细胞迁移与侵袭能力的影响[J]. 中华实验外科杂志,2018,35(5):962. doi:10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2018.05.050.

[9] Ueta K, Otowa Y, Kakeji Y, et al. PROX1 is associated with cancer progression and prognosis in gastric cancer[J]. Anticancer Res,2018,38(11):6139-6145. doi:10.21873/anticanres.12966.

[10] Laitinen A,Böckelman C,Hagström J,et al. High PROX1 expression in gastric cancer predicts better survival[J]. PLoS One,2017,12(8):e0183868. doi:10.1371/journal.pone.0183868.

[11] Kasurinen A, Gramolelli S, Hagström J, et al. High tissue MMP14 expression predicts worse survival in gastric cancer,particularly with a low PROX1[J]. Cancer Med,2019,8(16):6995-7005. doi:10.1002/cam4.2576.

[12] Gramolelli S, Cheng J, Martinez-Corral I. PROX1 is a transcriptional regulator of MMP14[J]. Sci Rep,2018,8(1):9531. doi:10.1038/s41598-018-27739-w.

[13] 李雯君,张四洋,崔泽实. Prox-1 与淋巴管新生和肿瘤转移的关系[J]. 临床与病理杂志,2010,30(4):332-336. doi:10.3969/j.issn.1673-2588.2010.04.012.

[14] Cho H,Kim J,Ahn JH,et al. YAP and TAZ negatively regulate Prox1 during developmental and pathologic lymphangiogenesis[J]. Circ Res,2019,124(2):225-242. doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.313707.

[15] Rudzinska M, Ledwon JK, Gawel D, et al. The role of prospero homeobox 1 (PROX1) expression in follicular thyroid carcinoma cells[J]. Oncotarget,2017,8(69):114136-114155. doi:10.18632/oncotarget.23167.

[16] Ishii J,Yazawa T,Chiba T,et al. PROX1 promotes secretory granule formation in medullary thyroid cancer cells[J]. Endocrinology,2016,157(3):1289-1298. doi:10.1210/en.2015-1973.

[17] Geers C,Colin IM,Gérard AC. Delta-like 4/Notch pathway is differentially regulated in benign and malignant thyroid tissues[J]. Thyroid,2011,21(12):1323-1330. doi:10.1089/thy.2010.0444.

[18] Yamashita AS, Geraldo MV, Fuziwara CS, et al. Notch pathway is activated by MAPK signaling and influences papillary thyroid cancer proliferation[J]. Transl Oncol,2013,6(2):197-205. doi:10.1593/tlo.12442.

[19] Kim HJ,Kim MJ,Kim A,et al. The role of Notch1 signaling in anaplastic thyroid carcinoma[J]. Cancer Res Treat,2017,9(2):509-517. doi:10.4143/crt.2016.214.

(编辑:贺绍梅)