doi:10.11659/jjssx.12E017078

·基础研究·

miR-181b 通过下调 CYLD 蛋白影响甲状腺乳头状癌细胞的增殖和凋亡

王 雷,于东升,赵临潇,柴丽霞 (延安大学咸阳医院病理科,陕西 咸阳 712000)

[摘 要] **目的** 探讨 miR-181b 通过下调 CYLD 蛋白影响甲状腺乳头状癌细胞的增殖和凋亡行为及其机制。**方法** qPCR 检测 miR-181b 在甲状腺乳头状癌组织和正常甲状腺组织中的表达情况及差异;Western blotting 实验检测 miR-181b 与 CYLD 蛋白之间的调控作用;克隆形成实验检测抑制 miR-181b 后甲状腺癌细胞增殖能力的变化情况;流式细胞术实验检测抑制 miR-181b 后甲状腺癌细胞凋亡行为的变化情况。**结果** 与正常甲状腺组织相比,甲状腺乳头状癌组织中 miR-181b 的表达水平相对上调,差异具有统计学意义($P<0.05$);在 FTC-133 细胞株中 miR-181b 的表达水平相对较高;Western blotting 实验证实 miR-181b 能直接调控 CYLD 蛋白的表达水平;抑制 miR-181b 的表达后可以抑制甲状腺癌细胞的增殖行为,并在一定程度上促进其凋亡。**结论** miR-181b 可以调控 CLYD 的表达影响甲状腺癌细胞的增殖和凋亡行为。

[关键词] miR-181b;甲状腺乳头状癌;CYLD;细胞凋亡

[中图分类号] R736.1 [文献标识码] A [收稿日期] 2017-12-13

Effects of miR-181b on proliferation and apoptosis of thyroid papillary carcinoma cells by down-regulating CYLD protein

WANG Lei, YU Dong-sheng, ZHAO Lin-xiao, CHAI Li-xia (Department of Pathology, Xianyang Hospital, Yan'an University, Xianyang Shannxi 712000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of miR-181b on the proliferation and apoptosis of thyroid papillary carcinoma cells by down-regulating CYLD protein and its mechanism. **Methods** qPCR was used to detect the expression and difference of miR-181b in papillary thyroid carcinoma and normal thyroid tissue. Western blotting was used to detect the regulation between miR-181b and CYLD protein. Clone formation assay was used to detect the proliferation of thyroid cancer cells after inhibition of miR-181b. Flow cytometry was used to detect the apoptosis of thyroid carcinoma cells after inhibition of miR-181b. **Results** Compared with normal thyroid tissue, the expression of miR-181b in papillary thyroid carcinoma was up-regulated, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The expression level of miR-181b in FTC-133 cell line was relatively high. Western blotting confirmed that miR-181b could directly regulate the expression of CYLD protein. Inhibition of miR-181b expression can inhibit the proliferation of thyroid cancer cells, and to some extent promote its apoptosis behavior. **Conclusion** miR-181b can regulate the expression of CLYD and affect the proliferation and apoptosis of thyroid cancer cells.

Keywords: miR-181b; thyroid papillary carcinoma; CYLD; apoptosis

甲状腺癌是最常见的内分泌异常的恶性肿瘤,占女性所有类型恶性肿瘤的 5% 左右,在中国,每年约有 20 000 的恶性甲状腺癌患者死亡[1-2]。甲状腺乳头状癌(PTC)是甲状腺恶性肿瘤中最常见的肿瘤类型,约占 80%[3]。针对甲状腺乳头状癌的治疗目前主要采取手术联合放疗,但是治愈率不高[4]。探讨新型肿瘤分子标记物是目前急需解决的问题。

目前研究指出参与甲状腺乳头状癌发展的最常见的遗传改变包括 RET-RAS-BRAF 基因激、RET 基因重排、BRAFV600E 点突变及 RAS 突变等[5]。虽然这些遗传改变会导致相同的信号通路的激活,但针对其具体机制作用的发挥目前不甚清楚。在人类基因组中,每个 miRNA 可以控制多个基因靶标,并且可以通过翻译抑制调控相应蛋白的表达。关于基因表达模式的调节,miRNA 类似于直接调节靶基因表达的 DNA 结合转录因子及其直接靶向于分子通路,负责特定的生物学现象。关于如何在甲状腺癌中转录和转录后水平调节 miRNA 的信息有限[6],有研究通过结合核小体染色质标记以及 DNA 序列鉴定了 175 个 miRNA 的启动子区域,用于预测调控 miRNA 的转录因子,探讨 miRNA 在不同恶性肿瘤类型中的候选转录起始位点及生物学表达模式[7-8]。圆柱菌酶(cylindromatosis,CYLD)是卵巢肿瘤家族中的一种泛素-羧基末端水解酶,其由分解各种细胞蛋白质中的赖氨酸酶连接多聚蛋白链组成[9]。CYLD 在多种组织中均有表达,但其精确的生物学功能仍然不确定[10]。体外转染研究结果表明,CYLD 通过蛋白水解酶来降低 NF-κB 活性干扰肿瘤细

[基金项目] 陕西省科学技术研究发展计划基金(2012SF2-02-05)

胞的生长[11]。但 CYLD 和 miRNA 之间的直接作用缺乏研究证据。

本实验通过研究 miR-181b 和 CYLD 在甲状腺乳头状癌中的表达情况及相互作用,抑制 miR-181b 表达后甲状腺癌细胞株的增殖和凋亡行为的变化情况来推测 miR-181b 在甲状腺癌中的表达模式,明确其对甲状腺乳头状癌细胞的调控作用,为甲状腺癌乳头状癌的发病机制和发展过程的进一步研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞株及实验材料

收集 2016 年 7 月至 2017 年 1 月在我院手术切除并且经病理检查确诊为甲状腺癌患者 30 例的病变组织,同时取 30 例癌旁正常人的组织。离体后放入 4% 多聚甲醛中固定。人甲状腺乳头状癌细胞株 FTC-133、IHH-4、TPC-1 和 K1 细胞在含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基中培养。miR-181b-inhibitor 和阴性对照(NC)购自中国上海 GenePharma 生物有限公司。脂质体 Lipofectamine 2000、miR-181b-inhibitor 和 NC 组模拟物购自上海吉凯基因,TRIzol 购自美国 Ambion 公司,逆转录试剂盒(FSQ-101)购自日本 TOYOBO 公司,PCR 试剂盒购自美国 Kapa 公司。

1.2 定量实时 PCR 分析

将细胞接种在 12 孔板中,生长至 50% 融合以进行 siRNA 转染,90% 用于质粒转染。根据制造商的方案,使用 Lipofectamine 2 000 转染质粒和 siRNA。在转染后第 3 天,收获细胞,并使用 TRIZOL 试剂提取总 RNA。使用 ImProm-II TM 逆转录系统对总 RNA 水平进行 qPCR 分析。所有反应用 Step-One Plus 实时 PCR 系统进行,实验重复 3 次。

1.3 蛋白质印迹测定

使用 RIPA 缓冲液提取总细胞裂解物,通过配置 12% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质,并转移到 PVDF 膜,用 5% 脱脂奶粉封闭,并在 4 ℃ 下与一抗(浓度 1∶1 000)一起孵育过夜。随后,将膜与二抗孵育,最后用 ECL 底物试剂盒检测,实验重复 3 次。

1.4 细胞克隆形成实验

将 NC 组细胞和 miR-181b-inhibitor 组细胞分别以 2×10^3 浓度接种在 6 孔板中,在 37 ℃ 孵箱孵育 2 周,每 3 d 更换新鲜培养基,2 周后在显微镜下观察细胞形态,计数细胞克隆形成数目,对比 2 组之间的差异,实验重复 3 次。

1.5 流式细胞仪分析

流式细胞术检测甲状腺乳头状癌细胞凋亡情况。将 FTC-133 细胞以 2×10^5/孔的浓度接种在 6 孔板中,分别用 NC 和 miR-181b-inhibitor 转染,转染 72 h 后,通过 FITC 标记的 AnnexinV/碘化丙啶细胞凋亡检测试剂盒检测凋亡细胞,实验重复 3 次。

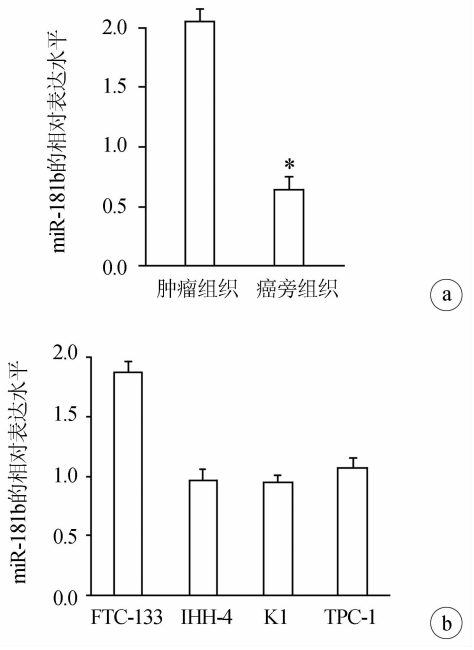
1.6 统计分析

采用 SPSS 22.0 软件,计量数据以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,2 组间均数比较采用 t 检验,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-181b 在甲状腺乳头状癌组织和细胞中的表达情况

qPCR 结果表明:与癌旁正常组织相比(图 1),甲状腺乳头状癌组织中 miR-181b 表达水平明显较高[(2.21 ± 0.31) *vs.* (0.62 ± 0.17)],差异有统计学意义($P<0.05$);miR-181b 在 FTC-133 胞株中表达水平比 IHH-4、K1、TPC-1 细胞株明显增高[(1.86 ± 0.18) *vs.* (0.89 ± 0.11) *vs.* (0.86 ± 0.14) *vs.* (1.07 ± 0.11),$P<0.05$](图 1)。综合上述试验结果,挑选 FTC-133 为进一步生物学功能实验的细胞株。



a:miR-181b 在甲状腺乳头状癌组织和正常组织中的表达;b:miR-181b在不同甲状腺乳头状癌细胞株中的表达

图 1 miR-181b 的表达情况

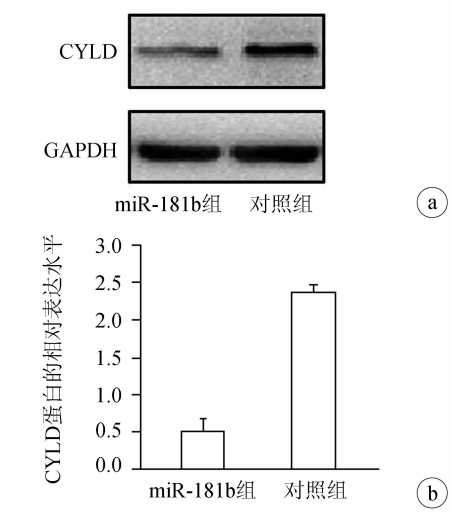
2.2 miR-181b 与 CYLD 之间的调控关系

通过 Western blotting 检测 miR-181b 调控 CYLD 的表达水平。结果显示,在 miR-181b-ibhibitor 组中

CYLD 的表达水平比 NC 组的明显降低[(0.55 ±0.11) *vs.* (2.39 ±0.32), $P<0.05$],见图 2,表明抑制 miR-181b 的表达后,CYLD 蛋白的激活水平相应下调。

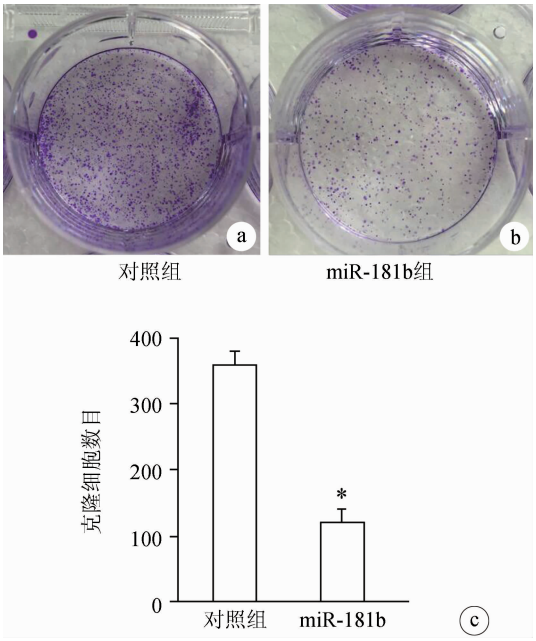
2.3 miR-181b 调控甲状腺乳头状癌细胞的增殖行为

细胞克隆形成实验结果显示(图 3),miR-181b-inhibitor 实验组的细胞克隆形成数目明显低于 NC 对照组[(351.2 ±25.6) *vs.* (112.6 ±18.6)],差异具有统计学意义($P<0.05$)。表明抑制 miR-181b 的表达后,甲状腺乳头状细胞 FTC-133 的增殖能力受到一定的抑制。



a:Western blotting 检查 CYLD;b:Western blotting 结果定量分析

图 2 Western blotting 检测 miR-181b 对 CYLD 蛋白表达的调控

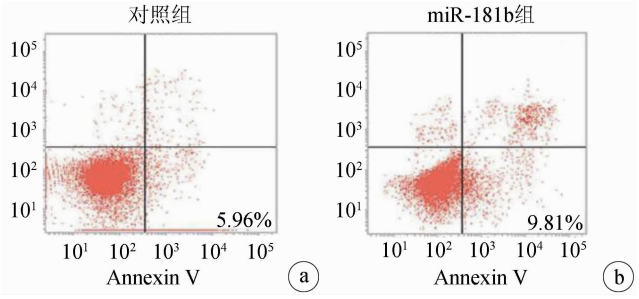


a:对照组;b:miR-181b 组;c:2 组细胞数量定量分析

图 3 克隆形成实验检测 miR-181b 对甲状腺乳头状癌细胞增殖能力的影响

2.4 miR-181b 调控甲状腺乳头状癌的凋亡行为

细胞凋亡实验显示,miR-181b-inhibitor 实验组的细胞凋亡比率明显高于 NC 对照组[(2.28 ±0.27) *vs.* (0.75 ±0.18), $P<0.05$],差异具有统计学意义,表明抑制 miR-181b 的表达后,甲状腺乳头状癌细胞的凋亡行为得到一定程度的促进。



a:对照组;b:miR-181b 组

图 4 流式细胞术检测 miR-181b 对甲状腺乳头状癌细胞凋亡行为的影响

3 讨论

在不同甲状腺肿瘤的组织病理学类型具有不同的 miRNA 差异谱,反映了在 miRNA 在肿瘤中的特异性致癌突变[12]。从其发现的早期阶段,已经知道许多 miRNA 以组织特异性方式表达[13]。因此,研究 miRNA 在甲状腺肿瘤之间的表达模式有重要的临床意义。在甲状腺乳头状癌中经常观察到 miR-181b 的表达异常现象[14]。然而迄今为止,miR-181b 和甲状腺乳头状癌之间的关系尚未完全了解。本研究结果表明 miR-181b 在肿瘤性甲状腺乳头状细胞中具有一定的致癌作用,作为 CYLD 蛋白的调节因子参与甲状腺癌细胞的增殖和凋亡过程。事实上,据其他学者的相关报道指出,miR-181b 在其他肿瘤中也可观察到明显的上调状态,包括胶质瘤细胞系,前列腺癌细胞系和转移性乳腺癌细胞系[15-17]。miR-181b 可能有一定的肿瘤组织特异性和依赖性,其与基因表达调控的复杂网络相关联,在不同类型的恶性肿瘤中可以靶向不同的下游蛋白种类[18]。类似地,CYLD 蛋白在恶性肿瘤中具有相似的作用,在上皮衍生的肿瘤中作为调控因子发挥作用,并且可作为间质源性肿瘤的上皮-间质转化的肿瘤启动子因子[19]。因此,miR-181b 对 CYLD 蛋白的调控可能是甲状腺乳头状癌中独特的表达模式。

恶性肿瘤细胞的增殖潜力取决于调控因子对细胞周期阻滞的能力。miR-181b 与甲状腺乳头状癌细胞的增殖能力密切相关,而且可以通过调控 CYLD 的表达介导 FTC-133 细胞的细胞周期停滞,表明 miR-181b 具备一定的促细胞增殖的能力。miRNA 分析的结果

提供了更多的证据来支持肿瘤细胞具有独特的上调miRNA并且与常规肿瘤类型不同,尤其是腺瘤和癌之间的表达差异。根据之前的相关研究,指出miRNA表达谱在特定肿瘤类型中具有显着的变异性[20]。本实验的研究数据表明,在这三种miRNA中,miR-181b在所有类型的滤泡细胞衍生的甲状腺肿瘤中以及甲状腺增生性结节中都存在过表达状态,且和甲状腺乳头状癌细胞的增殖和凋亡行为直接相关。

总体而言,本实验观察到甲状腺乳头状癌的肿瘤类型和miR-181b表达之间的具有显著相关性,与甲状腺乳头状癌的表型特征及生物学特性相关。且miR-181b的表达和CYLD的表达之间的具体调控机制尚不清楚,但miR-181b的确可以影响甲状腺乳头状癌的生长和增殖,可能被用作临床甲状腺乳头状癌的治疗和预后标志物。

[参考文献]

[1] Vaccarella S,Franceschi S,Bray F,et al. Worldwide thyroid-cancer epidemic the increasing impact of overdiagnosis[J]. New Engl J Med,2016,375(7):614-617. doi:10.1056/NEJMp1604412.

[2] Londero SC,Krogdahl A,Bastholt L,et al. Papillary thyroid microcarcinoma in Denmark 1996-2008:a national study of epidemiology and clinical significance[J]. Thyroid,2013,23(9):1159-1164. doi:10.1089/thy.2012.0595.

[3] Rahib L,Smith BD,Aizenberg R,et al. Projecting cancer incidence and deaths to 2030:the unexpected burden of thyroid,liver,and pancreas cancers in the United States[J]. Cancer Res,2014,74(11):2913-2921. doi:10.1158/0008-5472.

[4] Davies L,Morris LG,Haymart M,et al. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology disease state clinical review:the increasing incidence of thyroid cancer[J]. Endocrine Practice,2015,21(6):686-696. doi:10.4158/EP14466.DSCR.

[5] Seo JY,Kim EK,Baek JH,et al. Can ultrasound be as a surrogate marker for diagnosing a papillary thyroid cancer? Comparison with BRAF mutation analysis[J]. Yonsei Med J,2014,55(4):871-878. doi:10.3349/ymj.

[6] Erler P,Keutgen XM,Crowley MJ,et al. Dicer expression and microRNA dysregulation associate with aggressive features in thyroid cancer[J]. Surgery,2014,156(6):1342-1350.

[7] Haugen BR,Alexander EK,Bible KC,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,2016,26(1):1-133. doi:10.1089/thy.2009.0110.

[8] Graham MER,Hart RD,Douglas S,et al. Serum microRNA profiling to distinguish papillary thyroid cancer from benign thyroid masses[J]. J Otolaryngol Head Neck Surg,2015,44(1):33. doi:10.1186/s40463-015-0083-5.

[9] Draber P,Kupka S,Reichert M,et al. LUBAC-recruited CYLD and A20 regulate gene activation and cell death by exerting opposing effects on linear ubiquitin in signaling complexes[J]. Cell reports,2015,13(10):2258-2272. doi:10.1016/j.celrep.2015.11.009.

[10] Hrdinka M,Fiil BK,Zucca M,et al. CYLD limits Lys63-and Met1-linked ubiquitin at receptor complexes to regulate innate immune signaling[J]. Cell reports,2016,14(12):2846-2858. doi:10.1016/j.celrep.2016.02.062.

[11] Zhao X,Jin B,Yang B,et al. Gadolinium chloride ameliorates acute lung injury associated with severe acute pancreatitis in rats by regulating CYLD/NF-κB signaling[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications,2017,492(2):255-261. doi:10.1016/j.bbrc.2017.08.061.

[12] Debette S,Verbaas CAI,Bressler J,et al. Genome-wide studies of verbal declarative memory in nondemented older people:the Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology consortium[J]. Biological psychiatry,2015,77(8):749-763. doi:10.1016/j.biopsych.2014.08.027.

[13] Zhu C,Ren C,Han J,et al. A five-microRNA panel in plasma was identified as potential biomarker for early detection of gastric cancer[J]. Bri J Cancer,2014,110(9):2291-2299. doi:10.1038/bjc.2014.119.

[14] Liu J,Shi W,Wu C,et al. miR-181b as a key regulator of the oncogenic process and its clinical implications in cancer[J]. Biomedical reports,2014,2(1):7-11. doi:10.3892/br.2013.199.

[15] Sun Y,Wang J,Guo C,et al. MiR-181b sensitizes glioma cells to teniposide by targeting MDM2[J]. BMC cancer,2014,14(1):611. doi:10.1186/1471-2407-14-611.

[16] Tao T,Liu C,Huang Y,et al. Mp55-15 involvement of Mir-181b-mediated ezh2/igf-1r signalling pathway in the growth and energy metabolism of prostate cancer[J]. J Urol,2015,193(4):e678. doi:10.1016/j.juro.2015.02.2058.

[17] Strotbek M,Schmid S,Sánchez-González I,et al. miR-181 elevates Akt signaling by co-targeting PHLPP2 and INPP4B phosphatases in luminal breast cancer[J]. Int J Cancer,2017,140(10):2310-2320. doi:10.1002/ijc.30661/full.

[18] Zheng Y,Lv X,Wang X,et al. miR-181b promotes chemoresistance in breast cancer by regulating bim expression[J]. Oncology reports,2016,35(2):683-690. doi:10.3892/or.2015.4417.

[19] Xu D,Zhou P,Wang Y,et al. Reciprocal activation between STAT3 and miR-181b regulates the proliferation of esophageal cancer stem-like cells via the CYLD pathway[J]. Molecular cancer,2016,15(1):40. doi:10.1186/s12943-016-0521-7.

[20] 涂超峰,肖 岚,武明花,等. MiRNA基因及miRNA相关基因单核苷酸多态性与肿瘤易感性[J]. 国际病理科学与临床杂志,2014,33(6):520-524. doi:10.3969/j.issn.1673-2588.2013.06.014.

(编辑:左艳芳)