



DOI: 10.11817/j.issn.1672-7347.2021.200764

<http://xbyxb.csu.edu.cn/xbwk/fileup/PDF/2021101054.pdf>

微RNA-21-5p 靶向调控含硬化蛋白域蛋白1对甲状腺癌 细胞生长的影响

刘妙妙, 邓豪余, 赵雅洁, 李灿, 刘桦

(中南大学湘雅医院核医学科, 长沙 410008)

[摘要] 目的: 通过分析微RNA(microRNA, miR)-21-5p及其靶基因含硬化蛋白域蛋白1(recombinant sclerostin domain containing protein 1, SOSTDC1)在甲状腺癌中的作用, 深入了解甲状腺癌转移的分子机制。方法: 通过生物信息学分析和细胞验证筛选出miR-21-5p, 通过miR-21-5p抑制剂转染甲状腺癌细胞系; 采用MTT实验、流式细胞术和细胞划痕实验分别检测miR-21-5p抑制剂组和抑制剂对照组的甲状腺癌细胞增殖、凋亡和迁移的情况; 采用荧光素酶报告实验验证miR-21-5p和SOSTDC1的靶向调控关系; 采用蛋白质印迹法检测miR-21-5p抑制剂组和抑制剂对照组甲状腺癌细胞中SOSTDC1、下游磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)/细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)信号通路因子的表达水平及磷酸化水平。结果: MiR-21-5p在甲状腺癌细胞中显著上升, 且与SOSTDC1呈负相关($r=-0.24$, $P<0.01$); miR-21-5p抑制剂组甲状腺癌细胞增殖和迁移显著低于抑制剂对照组(均 $P<0.01$), 细胞凋亡率显著高于抑制剂对照组($P<0.01$); 荧光素酶报告实验表明miR-21-5p能够靶向调控SOSTDC1表达水平; 甲状腺癌细胞中PI3K/Akt和MAPK/ERK信号通路检测显示miR-21-5p抑制剂组PI3K表达水平显著低于抑制剂对照组($P<0.01$), Akt和ERK1/2水平无显著变化, 但miR-21-5p抑制剂组Akt和ERK1/2磷酸化水平显著低于抑制剂对照组(均 $P<0.01$)。结论: 甲状腺癌细胞中miR-21-5p能够靶向抑制SOSTDC1的表达, 影响PI3K/Akt和MAPK/ERK活性, 从而抑制甲状腺癌细胞凋亡, 促进细胞的增殖和迁移能力。

[关键词] 甲状腺癌; 微RNA-21-5p; 含硬化蛋白域蛋白1

Impact of microRNA-21-5p on the growth of thyroid cancer cells via targeting the recombinant sclerostin domain containing protein 1

LIU Miaomiao, DENG Haoyu, ZHAO Yajie, LI Can, LIU Hua

(Department of Nuclear Medicine, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

ABSTRACT

Objective: To explore the molecular mechanism for thyroid cancer metastasis via

收稿日期(Date of reception): 2020-09-09

第一作者(First author): 刘妙妙, Email: liumm0527@163.com, ORCID: 0000-0001-5435-7302

通信作者(Corresponding author): 刘桦, Email: liuhua23@csu.edu.cn, ORCID: 0000-0002-1741-3157

analyzing the role of microRNA (miR)-21-5p and its target gene recombinant sclerostin domain containing protein 1 (SOSTDC1) in thyroid cancer.

Methods: The target miR-21-5p was screened through bioinformatics analysis and cell verification, and the thyroid cancer cell lines was transfected with miR-21-5p inhibitor. 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT) test, flow cytometry, and cell scratch test were used to detect the proliferation, apoptosis and migration of thyroid cancer cells in the miR-21-5p inhibitor group and the inhibitor control group, respectively. The luciferase report experiment was used to verify the relationship between miR-21-5p and SOSTDC1, Western blotting was used to detect the expression levels and phosphorylation levels of SOSTDC1, phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K), protein kinase B (Akt) and mitogen-activated protein kinases (MAPK), extracellular regulated protein kinases (ERK) in thyroid cancer cells.

Results: MiR-21-5p was significantly increased in thyroid cancer cells, which was negatively correlated with SOSTDC1 ($r=-0.24$, $P<0.01$). The proliferation and migration of thyroid cancer cells in the miR-21-5p inhibitor group was significantly lower than that in the inhibitor control group (both $P<0.01$), and the apoptosis rate in the miR-21-5p inhibitor group was significantly higher than that in the inhibitor control group ($P<0.01$). The luciferase report experiment showed that miR-21-5p could target and regulate the expression level of SOSTDC1, and the expression of PI3K in the miR-21-5p inhibitor group was significantly lower than that in the inhibitor control group ($P<0.01$). There were no significant changes in Akt and ERK1/2 levels, but the phosphorylation levels of Akt and ERK1/2 in the miR-21-5p inhibitor group were significantly lower than those in the inhibitor control group (both $P<0.01$).

Conclusion: MiR-21-5p in thyroid cancer cells can target the expression of SOSTDC1 and affect the activities of PI3K/Akt and MAPK/ERK, thereby inhibiting the apoptosis of thyroid cancer cells and promoting cell proliferation and migration.

KEY WORDS

thyroid cancer; microRNA-21-5p; recombinant sclerostin domain containing protein 1

甲状腺癌是最普遍的内分泌恶性肿瘤, 占全世界癌症发病率的1.3%, 占癌症病死率的0.5%^[1]。近年来中国甲状腺癌的发病率呈上升趋势, 新发病例数占全球甲状腺癌总数的15.6%, 死亡病例数占全球的13.8%^[2]。甲状腺癌是一种发展相对缓慢的恶性肿瘤, 对无甲状腺癌病史或非典型肺转移患者的诊断和治疗十分困难。因此, 深入了解甲状腺癌转移的分子机制将有助于寻找新的诊断和治疗方法。

微RNA(microRNA, miRNA)是一类由内源性基因编码的长度约为22个核苷酸的非编码单链RNA分子, 主要通过结合mRNA的特定位点负性调节基因的表达, 或阻碍翻译过程和降解mRNA分子, 参与所有生理和疾病过程^[3]。特定的miRNA可以作为癌基因或抑癌基因, miRNA在甲状腺癌中也被证明起

重要的调控作用^[4]。近年来, 甲状腺癌细胞的增殖、侵袭活性已成为研究的热点, 并证实许多分子途径与甲状腺肿瘤的生长有关。含硬化蛋白域蛋白1(sclerostin domain containing 1, SOSTDC1)是一种广泛参与细胞生理学和病理学的细胞信号调节因子^[5], 越来越多的研究^[6-7]证据表明SOSTDC1可能在许多癌症中起肿瘤抑制作用, 包括在非小细胞肺癌和乳腺癌等癌症中均有报道, 同时SOSTDC1也能够通过磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)/细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)信号通路调控甲状腺癌细胞的增殖、凋亡, 影响肿瘤细胞的恶性特性^[5]。PI3K/Akt信号通

路和MAPK/ERK信号通路在癌细胞中能够调节多种细胞活动,包括细胞增殖、凋亡、侵袭和分化等^[8-10],并且在甲状腺癌的发生发展中起重要作用。因此进一步研究SOSTDC1在甲状腺癌中的异常表达机制可能为甲状腺癌的诊断和治疗提供新的切入点。本文拟通过探讨miRNA介导SOSTDC1对甲状腺癌细胞生长的影响,深入了解甲状腺癌的发病机制,并为甲状腺癌的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织和细胞

甲状腺癌细胞系TPC-1购自美国TOKU-E公司;人正常甲状腺细胞系NTHY-ORI3.1购自德国HyperCLDB细胞培养机构。

1.1.2 主要试剂

TRIzol RNA提取试剂盒、反转录试剂盒购自日本Takara公司;蛋白质提取试剂盒、蛋白定量试剂盒、BCA试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;Hairpin-itTM microRNA RT-PCR Quantitation试剂盒购自上海吉玛制药技术有限公司;SOSTDC1抗体(ab99340)、PI3K抗体(ab32089)、Akt抗体(ab8805)、p-Akt抗体(ab38449)、ERK1/2抗体(ab54230)、p-ERK1/2抗体(ab214362)、 β -actin抗体(ab8226)和羊抗兔二抗均购自美国Abcam公司。MiR-21-5p拟似剂/抑制剂均由上海吉玛制药技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 生物信息分析

通过癌症基因组图谱(Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库(<https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga>),在TCGA-甲状腺癌中筛选甲状腺癌中表达上调并与SOSTDC1表达负相关的成熟体miRNA,然后通过在线工具mirDIP(microRNA Data Integration Portal)(<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>)预测其中能够结合到SOSTDC1-3'-非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)的miRNA,筛选得到候选因子。

1.2.2 细胞培养及转染

使用含有10% FBS, 100 U/mL青霉素G和100 U/mL硫酸链霉素的高葡萄糖调节DMEM培养基,在37℃, 5% CO₂条件下培养TPC-1细胞系。使用含有10% FBS, 100 U/mL青霉素G和100 U/mL硫酸链霉素的高葡萄糖调节RPMI1640培养基,在37℃, 5% CO₂的条件下培养NTHY-ORI3.1细胞系。

将贴壁甲状腺癌细胞以 1×10^5 个/孔铺到24孔板中,通过细胞转染试剂lipofectamine 2000(转染浓度为100 nmol/ μ L)的miR-21-5p拟似剂/抑制剂实现miR-21-5p过表达或敲低表达,将细胞分为miR-21-5p拟似剂组和拟似剂对照组、miR-21-5p抑制剂组和抑制剂对照组。

1.2.3 MTT实验

通过miR-21-5p抑制剂或抑制剂对照组转染甲状腺癌细胞系TPC-1后,使用MTT法分别检测miR-21-5p抑制剂组、抑制剂对照组细胞增殖情况。将TPC-1细胞系(浓度为 1×10^4 个/孔)接种至96孔细胞培养板上进行培养。然后以每孔20 μ mol/L的浓度加入MTT, 37℃孵育4 h,取出培养基,每孔加入150 μ L二甲基亚砜。待结晶充分溶解后,在酶联免疫检测仪上测定各孔570 nm处的吸光度值。

1.2.4 流式细胞术

将miR-21-5p抑制剂组及抑制剂对照组甲状腺癌细胞在培养48 h后用胰蛋白酶消化并收获,然后使用预冷的PBS洗涤3次。将细胞用标记了异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)的磷脂结合蛋白(Annexin V)作为荧光探针,用Annexin V-FITC结合溶液重悬,添加Annexin V-FITC荧光素溶液混合。然后加入工作浓度20 μ g/mL的碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色溶液,在室温下避光孵育30 min,采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况,并使用CELLQuest软件分析蓝色荧光对红色荧光的散点图。

1.2.5 细胞划痕实验

通过细胞划痕实验研究miR-21-5p表达变化对细胞迁移能力的潜在影响。用miR-21-5p抑制剂转染甲状腺癌细胞系TPC-1后,将miR-21-5p抑制剂组及抑制剂对照组细胞以浓度为 5×10^5 个/mL接种于6孔细胞培养板上,并在每个孔上划出一条直线,然后加入血清培养基,在37℃, 5% CO₂条件下孵育。在光学显微镜下观察细胞在0、24和48 h时的细胞迁移距离。

1.2.6 RNA提取及定量PCR分析

甲状腺癌细胞使用去RNA酶处理的PBS洗涤,然后使用TRIzol试剂盒提取细胞的总RNA,使用反转录试剂盒将提取的RNA反转录为cDNA,使用Hairpin-itTM microRNA RT-PCR Quantitation试剂盒检测miR-21-5p的表达,利用SYBR Green PCR master mix检测SOSTDC1、PI3K、Akt、ERK1/2 mRNA的相对表达水平,通过比较阈值计算相对表达量。以抑制剂对照组作为对照组,miR-21-5p抑制剂组作为处理组,以目的基因的平均Ct值减去内参基因的平均Ct值,即为 Δ Ct值,然后计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值,以此值表

示两组的相对表达量。计算相对表达量的差异,重复3次后进行统计分析并做图。

1.2.7 蛋白质印迹法检测

对数生长期的miR-21-5p抑制剂组及抑制剂对照组细胞用细胞裂解液裂解,然后使用蛋白质提取试剂盒提取细胞总蛋白质,用BCA法测定蛋白质浓度。用12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)浓缩胶分离蛋白质。然后将蛋白质电转到聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)上。用Tris-盐酸洗膜缓冲液(Tris-buffered saline Tween 20, TBST)冲洗PVDF膜10~15 min,将其置于含有5%脱脂奶粉的TBST封闭缓冲液中,并在室温下振荡2 h。在添加适当稀释的一抗后,在室温下培养2 h,用含1%脱脂奶粉的TBST稀释。然后用TBST洗膜,再用二抗在室温下培养1 h。TBST洗膜3次后检测蛋白质条带。

1.2.8 荧光素酶报告检测

荧光素酶报告实验显示:通过在线工具mirDIP预测miR-21-5p与SOSTDC1的3'-UTR区有结合位点,二者以不完全互补的方式结合,构建野生型(wt)-SOSTDC1-3'-UTR和突变型(mut)-SOSTDC1-3'-UTR荧光素酶报告基因载体,将其与miR-21-5p拟似剂/抑制剂分别转染到工具细胞293T中,将野生型和突变型荧光素酶报告基因载体分别分为miR-21-5p拟似剂组和拟似剂对照组、miR-21-5p抑制剂组及抑制剂对照组,然后接种于24孔细胞培养板中,经培养后,测定荧光素酶的活性,计算相对荧光强度,采用双荧光素酶报告基因活性分析miR-21-5p与SOSTDC1的3'-UTR区是否直接结合。

1.3 统计学处理

通过统计软件SPSS 20.0分析处理实验中的所有数据,所有数据均以3次平行重复实验的均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,数据之间两两比较采用LSD-*t*检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MiRNA 筛选

通过TCGA-THAC甲状腺癌数据库筛选在甲状腺癌中表达上调且与SOSTDC1表达呈负相关的miRNA,结果得到54个miRNA,进一步通过mirDIP预测与SOSTDC1具有结合位点的miRNA,得到4个备选基因(hsa-miR-21-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-92b-3p, hsa-miR-513a-5p)(hsa为物种,代表人类),

miR-21-5p在甲状腺癌中的表达情况及其与SOSTDC1表达相关性及其结合位点如图1所示。miR-21-5p表达为相对值,甲状腺癌组织中miR-21-5p表达水平显著高于正常组织($P<0.01$,图1A),miR-21-5p与SOSTDC1表达有相关性($r=-0.24$, $P<0.01$;图1B),结合位点如图1C所示。通过在甲状腺癌细胞系TPC-1和人正常甲状腺细胞系NTHY-ORI3.1中进行real-time RT-PCR检测,结果表明其中miR-21-5p的上调最为显著($P<0.01$)(图1D),因此选择miR-21-5p进行后续实验。

2.2 甲状腺癌细胞中miR-21-5p靶向调控SOSTDC1

将miR-21-5p抑制剂转染至甲状腺癌TPC-1细胞系,构建出miR-21-5p敲低表达细胞系,real-time RT-PCR检测miR-21-5p表达水平并验证其转染效率,结果显示miR-21-5p抑制剂转染TPC-1细胞后miR-21-5p表达水平显著下降($P<0.01$,图2A),转染效率良好,可用于后续实验。Real-time PCR和蛋白质印迹法检测miR-21-5p抑制剂转染甲状腺癌TPC-1细胞中SOSTDC1的表达变化,结果显示miR-21-5p抑制剂组甲状腺癌细胞中SOSTDC1 mRNA和蛋白表达量显著高于抑制剂对照组(均 $P<0.01$;图2B, 2C),real-time RT-PCR验证miR-21-5p拟似剂/抑制剂转染293T细胞转染效率,结果显示miR-21-5p拟似剂组miR-21-5p表达显著上升($P<0.01$),miR-21-5p抑制剂组显著下降($P<0.01$),表明转染效率良好,可用于后续实验(图2D);荧光素酶报告实验结果表明:wt-SOSTDC1 3'-UTR组中,miR-21-5p敲低表达后荧光素酶的相对活性显著上升,miR-21-5p过表达后则相反,荧光素酶相对活性显著下降(均 $P<0.01$);而mut-SOSTDC1-3'-UTR组中,miR-21-5p表达变化差异无统计学意义($P>0.05$),表明miR-21-5p直接靶向调控SOSTDC1(图2E)。

2.3 MiR-21-5p表达调控甲状腺癌细胞恶性进展

MTT实验显示miR-21-5p抑制剂组甲状腺癌细胞增殖活性显著低于抑制剂对照组,提示miR-21-5p敲低能够抑制甲状腺癌细胞的增殖活性($P<0.01$,图3A)。流式细胞术检测表明miR-21-5p抑制剂组细胞凋亡率较抑制剂对照组显著上升($P<0.01$;图3B, 3C)。细胞划痕实验显示相较于抑制剂对照组,miR-21-5p抑制剂组细胞迁移能力显著下降($P<0.01$;图3D, 3E, 3F),表明敲低miR-21-5p能够抑制甲状腺癌细胞的恶性进展。

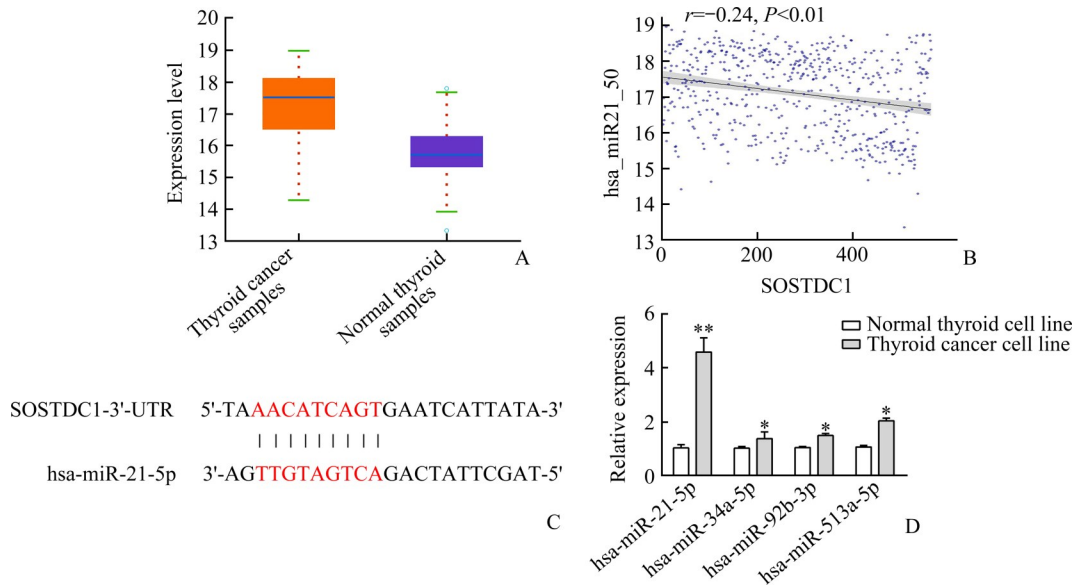


图1 MiR-21-5p在甲状腺癌中的表达及其与SOSTDC1的相关性

Figure 1 Expression of miR-21-5p in thyroid cancer and its correlation with SOSTDC1

A: Comparison of miR-21-5p expression in thyroid tumor tissues. Starbase database analysis of miR-21-5p expression levels is shown in thyroid cancer samples and normal samples. B: Expression correlation diagram between miR-21-5p and SOSTDC1. Analysis of the correlation is shown between miR-21-5p and SOSTDC1 expression in thyroid cancer tissues in the Starbase database. C: Schematic diagram of the binding site of miR-21-5p and SOSTDC1. MirDIP predicts the binding site of miR-21-5p and SOSTDC1 mRNA. D: Comparison of miRNA expression in tumor cells. The relative expressions of miR-21-5p, miR-34a-5p, miR-92b-3p and miR-513a-5p in TPC-1 and NTHY-ORI3.1 cells were detected by real-time RT-PCR. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the normal thyroid cell line.

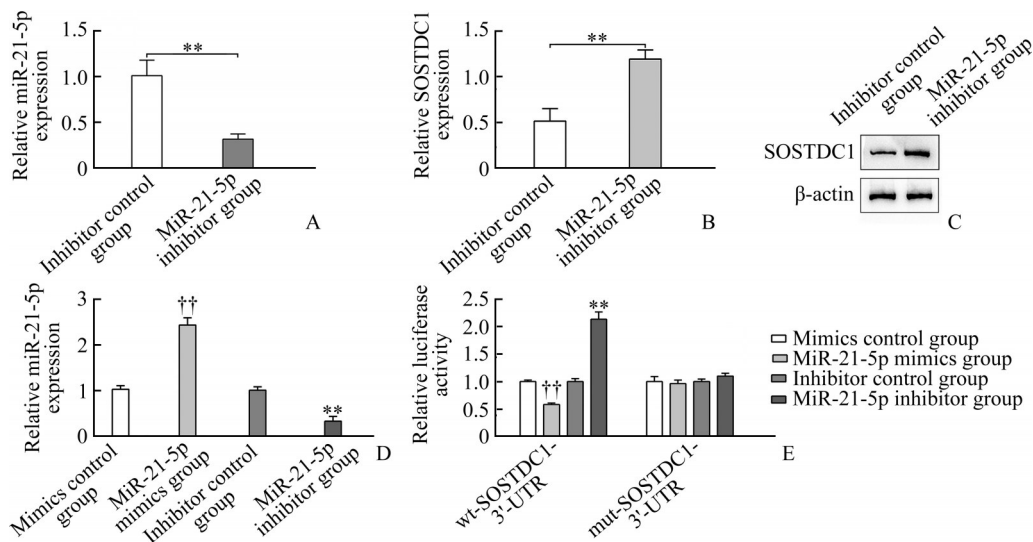


图2 MiR-21-5p和SOSTDC1靶向调控关系

Figure 2 Targeting regulation relationship between miR-21-5p and SOSTDC1

A: Comparison of miR-21-5p expression. The relative expression of miR-21-5p in the inhibitor control group and the miR-21-5p inhibitor group was detected by real-time RT-PCR. B: Comparison of SOSTDC1 mRNA expression. The relative expression of SOSTDC1 mRNA in TPC-1 cells was detected by real-time RT-PCR. C: Comparison of SOSTDC1 protein level. The SOSTDC1 protein expression in TPC-1 cells was detected by Western blotting. D: Comparison of miR-21-5p expression. The relative expression of miR-21-5p was detected by real-time RT-PCR in 293T cells in the mimics control group, the miR-21-5p mimics group, the inhibitor control group, and the miR-21-5p inhibitor group. E: Comparison of relative luciferase activity. The fluorescence microplate reader showed the relative luciferase activity in the 293T cells in the miR-21-5p mimics/inhibitor groups and/or the wt/mut-SOSTDC1-3'-UTR. ** $P < 0.01$ vs the inhibitor control group; †† $P < 0.01$ vs the mimics control group.

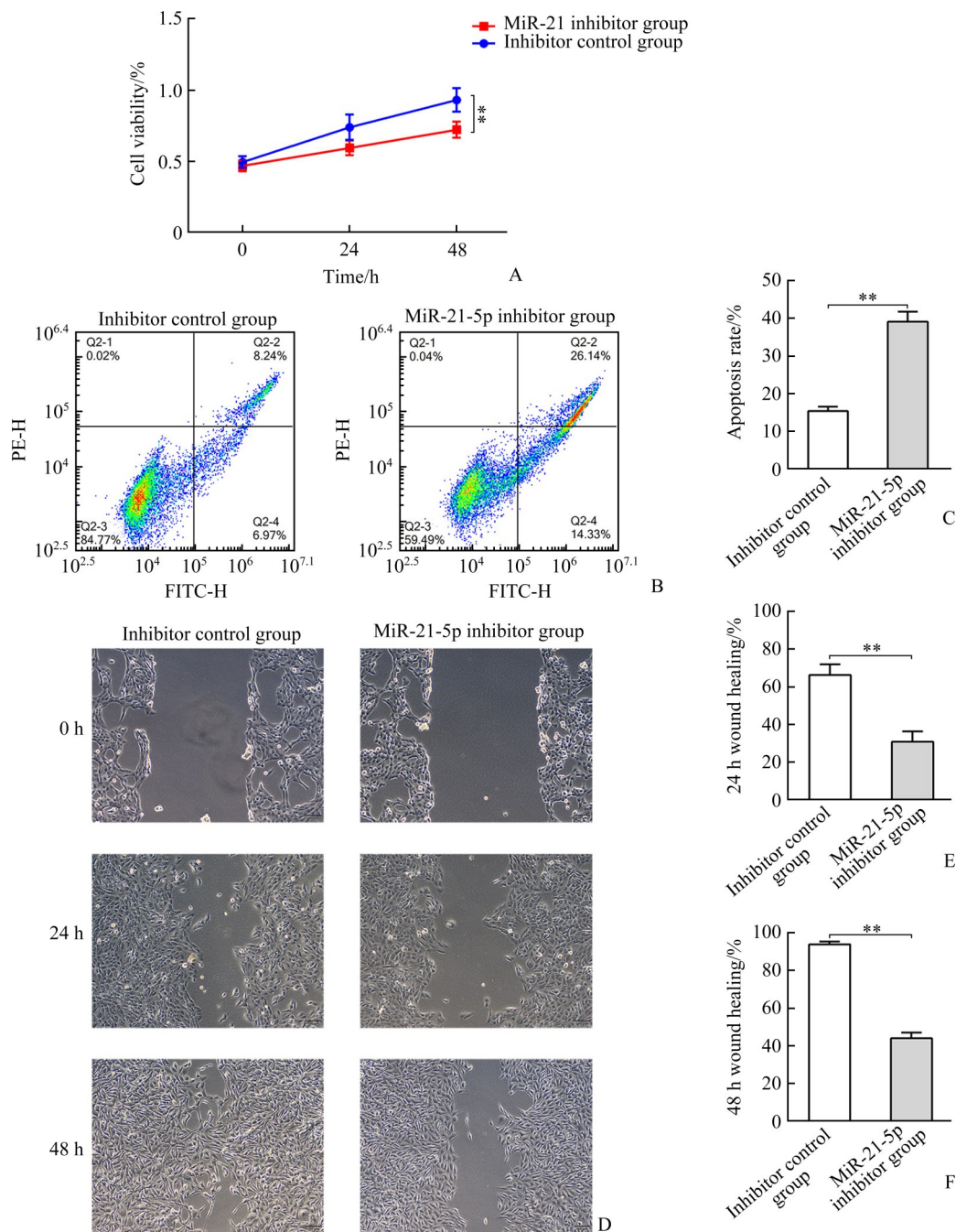


图3 MiR-21-5p对甲状腺癌细胞增殖、凋亡、迁移的影响

Figure 3 Effects of miR-21-5p on the proliferation, apoptosis, and migration of thyroid cancer cells

A: Comparison of tumor cell proliferation. MTT assay showed the proliferation activity of TPC-1 cells in the inhibitor control group and the miR-21-5p inhibitor group. B: Comparison of tumor cell apoptosis. Flow cytometry showed the apoptosis of TPC-1 cells in the 2 groups; C: Histogram of cell apoptosis. D: Comparison of tumor cell migration. The cell scratch test showed the migration distance of TCP-1 cells. E: Wound healing at 24 h. F: Wound healing at 48 h. ** $P < 0.01$ vs the inhibitor control group.

2.4 MiR-21-5p 表达影响 SOSTDC1 下游 PI3K、Akt 和 ERK 的活性

Real-time RT-PCR 检测 miR-21-5p 抑制剂转染甲状腺癌 TPC-1 细胞中 SOSTDC1 下游 PI3K/Akt 和 MAPK/ERK 信号通路的 PI3K、Akt 和 ERK1/2 的表达变化, 结果发现相较抑制剂对照组, miR-21-5p 抑制

剂组 PI3K mRNA 表达水平显著下调($P < 0.01$), 但 Akt 和 ERK 的表达无显著变化(均 $P > 0.05$, 图 4A)。蛋白质印迹法灰度分析检测 miR-21-5p 表达变化对甲状腺癌细胞中 PI3K、Akt 和 ERK1/2 蛋白表达水平和磷酸化水平的影响, 结果显示 miR-21-5p 抑制剂组甲状腺癌细胞中 PI3K 蛋白表达显著低于抑制剂对照组($P <$

0.01), 而 Akt 和 ERK1/2 无显著变化(均 $P>0.05$), 但 p-Akt 和 p-ERK1/2 均显著下调(均 $P<0.01$; 图 4B, 4C), 表明 miR-21-5p 表达变化不会影响 SOSTDC1 下

游 PI3K/Akt 和 MAPK/ERK 信号通路的 Akt 和 ERK 的表达水平, 但会影响 PI3K 的表达及 Akt 和 ERK 的磷酸化水平。

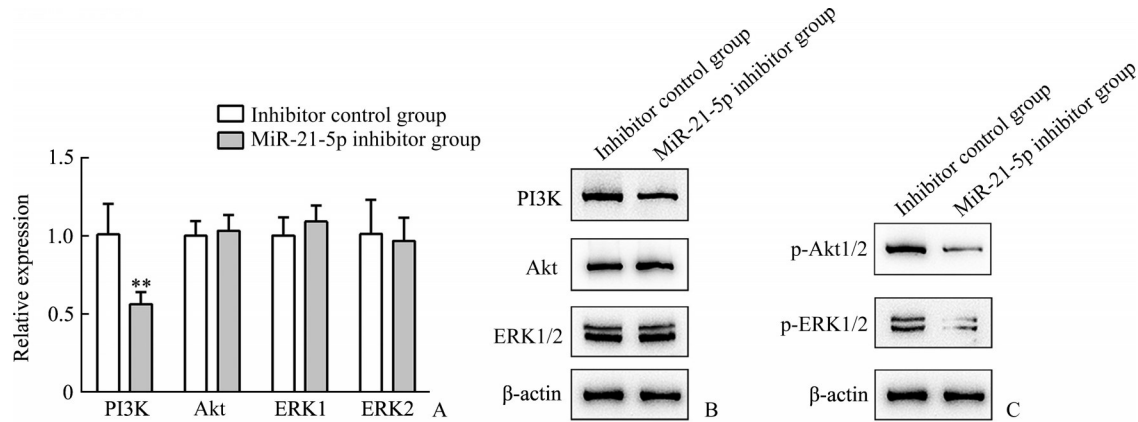


图4 MiR-21-5p 敲低表达对 PI3K、Akt 和 ERK 的活性的影响

Figure 4 Effect of miR-21-5p knockdown expression on the activities of PI3K, Akt, and ERK

A: Comparison of PI3K, Akt, and ERK1/2 mRNA expression. The relative expressions of PI3K, Akt, and ERK1/2 mRNA were detected by real-time RT-PCR in the inhibitor control group and the miR-21-5p inhibitor group. B: Comparison of the activities of PI3K, Akt, and ERK1/2. The expressions of PI3K, Akt, ERK1/2, p-Akt, and p-ERK1/2 were detected by Western blotting in the inhibitor control group and the miR-21-5p inhibitor group. ** $P<0.01$ vs the inhibitor control group.

3 讨论

近年来 miRNAs 已经作为诊断和预后的生物学标志物进入了癌症临床, 以评估肿瘤的发生、发展和对治疗的反应, 因此可从 miRNA 调控角度出发探讨 miRNA 对甲状腺癌的调控机制。通过生物信息学分析发现 miR-21-5p 在不同类型甲状腺癌和正常组织中的表达水平存在差异, 在甲状腺癌中的表达水平显著高于其他组织, 且与 SOSTDC1 的表达呈负相关。利用生物信息学软件 mirDIP 预测 miR-21-5p 可以与 SOSTDC1 靶向结合。荧光素酶报告基因分析表明 miR-21-5p 可靶向 SOSTDC1 的 3'-UTR 区, 抑制 SOSTDC1 的表达。SOSTDC1 是近年来在各类癌症中起抑癌作用的因子, SOSTDC1 蛋白可作为骨形态发生蛋白的拮抗剂调控细胞增殖、凋亡和分化^[11]; 并且参与 MAPK/ERK 途径^[12], 可通过 PI3K/Akt 和 MAPK/ERK 信号转导途径调节细胞增殖^[5], 实验表明甲状腺癌中 miR-21-5p 的高表达可能是 SOSTDC1 下调的重要因素。有研究^[13]报道 miR-21 在许多细胞调控过程中起关键作用, 尤其在癌症中。MiR-21 在各种人类肿瘤和癌细胞系中经常呈过表达, 其中包括胰腺癌、肾癌、肝癌、宫颈癌、神经胶质瘤等^[14-18]。癌细胞系的功能研究^[13, 19-20]表明: miR-21 在致癌过程中起重要作用, 与癌细胞的增殖能力、侵袭和转移能力

相关。癌细胞系的功能研究^[21]还表明: 其与高增殖、低凋亡、高侵袭和转移潜能相关, 在一项对 540 例癌症患者(包括肺、乳腺、胃、前列腺、结肠和胰腺癌临床样本)的研究中, miR-21 是唯一在各类癌症中均表达上调的 miRNA。MiR-21 在甲状腺癌中的研究报道还较少, 且大多仍处于分子标志物阶段。通过探讨 miR-21-5p 对甲状腺癌细胞生长的影响及其作用机制, 进一步了解 miRNA 调控甲状腺癌的作用机制, 可为甲状腺癌的发生、发展机制提供新视角。

PI3K/Akt 信号通路是控制细胞生长、增殖、存活、葡萄糖代谢、基因组稳定性和血管形成等重要细胞过程的调节通路, 已被证明在癌症中起重要调控作用^[22], MAPK/ERK1/2 信号通路与恶性肿瘤的发病机制密切相关, 在细胞生长调控、分化、增殖和凋亡等方面发挥重要作用^[23]。研究^[24-26]表明 miR-21 能够通过 PI3K/Akt 和 MAPK/ERK 信号通路在各类癌症进展中起调控作用, 如 miR-21 通过 PI3K/Akt 信号通路调控骨肉瘤细胞增殖, miR-21 通过调节 MAPK/ERK 信号通路影响人骨髓间充质干细胞分化过程, miR-21 通过调控 Akt/ERK1/2 的活性影响上皮间充质转化和肿瘤干细胞表型。PI3K/Akt 和 MAPK/ERK 信号通路与各种癌症的发病机制有关, 但 miR-21 与 PI3K/Akt 和 MAPK/ERK 通路之间的调控机制有待进一步研究, 通过研究 miR-21 表达变化对 PI3K、Akt

和 ERK 的表达水平和磷酸化水平的影响, 验证了 miR-21 能够靶向调控 SOSTDC1, 影响 SOSTDC1 下游 PI3K/Akt 和 MAPK/ERK 活性, 进而影响甲状腺癌细胞的增殖和迁移能力。

通过细胞增殖、凋亡和迁移实验证明了 miR-21-5p 调控甲状腺癌细胞生长和转移的潜力, 同时也证明了 miR-21 能够靶向调控 SOSTDC1, 且能够影响下游 PI3K/Akt 和 MAPK/ERK 信号通路活性, 这为甲状腺癌的靶向治疗的进一步研究提供了线索。

利益冲突声明: 作者声称无任何利益冲突。

参考文献

- [1] La Vecchia C, Malvezzi M, Bosetti C, et al. Thyroid cancer mortality and incidence: A global overview[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(9): 2187-2195.
- [2] 董芬, 张彪, 单广良. 中国甲状腺癌的流行现状和影响因素[J]. *中国癌症杂志*, 2016, 26(1): 47-52.
DONG Fen, ZHANG Bia, SHAN Guangliang. Distribution and risk factors of thyroid cancer in China[J]. *China Oncology*, 2016, 26(1): 47-52.
- [3] Kiszalkiewicz J, Piotrowski W, Brzezińska-Lasota E. Signaling pathways and their miRNA regulators involved in the etiopathology of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and hypersensitivity pneumonitis (HP)[J]. *Adv Respir Med*, 2017, 85(3): 169-178.
- [4] Lodewijk L, Prins AM, Kist JW, et al. The value of miRNA in diagnosing thyroid cancer: A systematic review[J]. *Cancer Biomark*, 2012, 11(6): 229-238.
- [5] Qinyi Z, Jun C, Jialin F, et al. SOSTDC1 inhibits follicular thyroid cancer cell proliferation, migration, and EMT via suppressing PI3K/Akt and MAPK/Erk signaling pathways[J]. *Mol Cell Biochem*, 2017, 435(1/2): 87-95.
- [6] Gopal G, Raja UM, Shirley S, et al. SOSTDC1 down-regulation of expression involves CpG methylation and is a potential prognostic marker in gastric cancer[J]. *Cancer Genet*, 2013, 206(5): 174-182.
- [7] Liu L, Wu SS, Yang Y, et al. SOSTDC1 is down-regulated in non-small cell lung cancer and contributes to cancer cell proliferation[J]. *Cell Biosci*, 2016, 6: 24. doi: 10.1186/s13578-13016-10091-13579.
- [8] Ewa B. A minireview: the role of MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways in thyroid follicular cell-derived neoplasm[J]. *Front Bio*, 2011, 16(1): 422-439.
- [9] Manfredi GI, Dicitore A, Gaudenzi G, et al. PI3K/Akt/mTOR signaling in medullary thyroid cancer: a promising molecular target for cancer therapy[J]. *Endocrine*, 2015, 48(2): 363-370.
- [10] Milosevic Z, Pesic M, Stankovic T, et al. Targeting RAS-MAPK-ERK and PI3K-AKT-mTOR signal transduction pathways to chemosensitize anaplastic thyroid carcinoma[J]. *Transl Res*, 2014, 164(5): 411-423.
- [11] Henley KD, Gooding KA, Economides AN, et al. Inactivation of the dual Bmp/Wnt inhibitor Sostdc1 enhances pancreatic islet function[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012, 303(6): E752-E761.
- [12] Li H, Zhao D, Wang S, et al. Bone morphogenetic protein 9 promotes the differentiation of mouse spleen macrophages into osteoclasts via the ALK1 receptor and ERK 1/2 pathways invitro[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(5): 4545-4550.
- [13] Pfeffer SR, Yang CH, Pfeffer LM. The role of miR-21 in cancer[J]. *Drug Dev Res*, 2015, 76(6): 270-277.
- [14] Abue M, Yokoyama M, Shibuya R, et al. Circulating miR-483-3p and miR-21 is highly expressed in plasma of pancreatic cancer[J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(2): 539-547.
- [15] An F, Liu Y, Hu Y. MiR-21 inhibition of LATS1 promotes proliferation and metastasis of renal cancer cells and tumor stem cell phenotype[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(4): 4684-4688.
- [16] Hu L, Ye H, Huang G, et al. Long noncoding RNA GAS5 suppresses the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells via miR-21[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(2): 2691-2702.
- [17] Zhang J, Yao T, Wang Y, et al. Long noncoding RNA MEG3 is downregulated in cervical cancer and affects cell proliferation and apoptosis by regulating miR-21[J]. *Cancer Biol Ther*, 2016, 17(1): 104-113.
- [18] Huang SY, Wang CJ, Yi YJ, et al. Kruppel-like factor 9 inhibits glioma cell proliferation and tumorigenicity via downregulation of miR-21[J]. *Cancer Lett*, 2015, 356(2 Pt B): 547-555.
- [19] Folini M, Gandellini P, Longoni N, et al. MiR-21: an oncomir on strike in prostate cancer[J]. *Mol Cancer*, 2010, 9: 12. doi: 10.1186/1476-4598-1189-1112.
- [20] Simonian M, Sharifi M, Nedaeinia R, et al. Evaluation of miR-21 inhibition and its impact on cancer susceptibility candidate 2 long noncoding RNA in colorectal cancer cell line[J]. *Adv Biomed Res*, 2018, 7: 14. doi: 10.4103/abr.abr_4214_4116.
- [21] Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(7): 2257-2261.
- [22] Cheng HW, Chen YF, Wong JM, et al. Cancer cells increase endothelial cell tube formation and survival by activating the PI3K/Akt signalling pathway[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 27.
- [23] Sainz RM, Hevia D, Quiros I, et al. MAPK/ERK signaling mediates melatonin-induced neuroendocrine differentiation in prostate cancer cells[J]. *EJC Supplements*, 2008, 6(9): 86.
- [24] Yang JX, Zou YG, Jiang DM. Honokiol suppresses proliferation and induces apoptosis via regulation of the miR-21/PTEN/PI3K/AKT signaling pathway in human osteosarcoma cells[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(4): 1845-1854.
- [25] Mei Y, Bian C, Li J, et al. miR-21 modulates the ERK-MAPK signaling pathway by regulating SPRY2 expression during human mesenchymal stem cell differentiation[J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114(6): 1374-1384.

[26] Han M, Liu M, Wang Y, et al. Antagonism of miR-21 reverses epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotype through Akt/ERK1/2 inactivation by targeting PTEN

[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e39520.

(本文编辑 傅希文)

本文引用: 刘妙妙, 邓豪余, 赵雅洁, 李灿, 刘桦. 微RNA-21-5p 靶向调控含硬化蛋白域蛋白1对甲状腺癌细胞生长的影响[J]. 中南大学学报(医学版), 2021, 46(10): 1054-1062. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2021.200764

Cite this article as: LIU Miaomiao, DENG Haoyu, ZHAO Yajie, LI Can, LIU Hua. Impact of microRNA-21-5p on the growth of thyroid cancer cells via targeting the recombinant sclerostin domain containing protein 1[J]. Journal of Central South University. Medical Science, 2021, 46(10): 1054-1062. DOI: 10.11817/j.issn.1672-7347.2021.200764

本刊常用词汇英文缩写表(按英文字母排序)

从2012年第1期开始, 本刊对大家较熟悉的以下常用词汇, 允许直接使用缩写, 即首次出现时可不标注中文。

5-FU	5-氟尿嘧啶	FDA	美国食品药品监督管理局	NS	生理氯化钠溶液
5-HT	5-羟色胺	FITC	异硫氰酸荧光素	PaCO ₂	动脉血二氧化碳分压
ABC法	抗生物素蛋白-生物素酶复合物法	GFP	绿色荧光蛋白	PaO ₂	动脉血氧分压
ACh	乙酰胆碱	GSH	谷胱甘肽	PBS	磷酸盐缓冲液
AIDS	获得性免疫缺陷综合征	HAV	甲型肝炎病毒	PCR	聚合酶链反应
ALT	丙氨酸转氨酶	Hb	血红蛋白	PI3K	磷脂酰肌醇3激酶
AngII	血管紧张素II	HBV	乙型肝炎病毒	PLT	血小板
APTT	活化部分凝血活酶时间	HCG	人绒毛膜促性腺激素	PT	凝血酶原时间
AST	天冬氨酸转氨酶	HCV	丙型肝炎病毒	PVDF	聚偏二氟乙烯膜
ATP	三磷酸腺苷	HDL-C	高密度脂蛋白胆固醇	PET/CT	正电子发射计算机断层显像仪
bFGF	碱性成纤维细胞转化生长因子	HE	苏木精-伊红染色	RBC	红细胞
BMI	体重指数	HGF	肝细胞生长因子	RNA	核糖核酸
BP	血压	HIV	人类免疫缺陷病毒	ROS	活性氧
BSA	牛血清白蛋白	HR	心率	real-time PCR	实时聚合酶链反应
BUN	尿素氮	HRP	辣根过氧化物酶	real-time RT-PCR	实时反转录聚合酶链反应
CCr	内生肌酐清除率	HSP	热休克蛋白	RT-PCR	反转录聚合酶链反应
CCK-8	细胞计数试剂盒-8	HPF	高倍视野	SABC法	链霉抗生物素蛋白-生物素酶复合物法
COX-2	环氧化酶-2	IC ₅₀	半数抑制浓度	SDS-PAGE	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶
Cr	肌酐	ICU	重症监护病房	SCr	血肌酐
CRP	C反应蛋白	IFN	干扰素	SO ₂	血氧饱和度
CT	计算机断层摄影	IL	白细胞介素	SOD	超氧化物歧化酶
CV	变异系数	iNOS	诱导型一氧化氮合酶	SP法	标记的链霉抗生物素蛋白-生物素法
DAB	二氨基联苯胺	IPG	固相pH梯度	SPF	无特定病原体
ddH ₂ O	双蒸水	JNK	氨基末端激酶	STAT3	信号转导和转录激活因子3
DMEM	杜尔贝科改良伊格培培养基	LDL-C	低密度脂蛋白胆固醇	Tbil	总胆红素
DMSO	二甲基亚砜	LPS	内毒素/脂多糖	TBST	Tris-盐酸洗膜缓冲液
DNA	脱氧核糖核酸	MAP	平均动脉压	TC	总胆固醇
ECG	心电图	MAPK	丝裂原活化蛋白激酶	TG	三酰甘油
ECL	增强化学发光法	MDA	丙二醛	TGF	转化生长因子
ECM	细胞外基质	MMP	基质金属蛋白酶	Th	辅助性T细胞
EDTA	乙二胺四乙酸	MRI	磁共振成像	TLRs	Toll样受体
EEG	脑电图	mTOR	雷帕霉素靶蛋白	TNF	肿瘤坏死因子
EGF	表皮生长因子	MTT	四甲基偶氮唑盐微量酶反应	TUNEL	原位末端标记法
ELISA	酶联免疫吸附测定	NADPH	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸	VEGF	血管内皮生长因子
eNOS	内皮型一氧化氮合酶	NF-κB	核因子-κB	VLDL-C	极低密度脂蛋白胆固醇
ERK	细胞外调节蛋白激酶	NK细胞	自然杀伤细胞	vWF	血管性血友病因子
ESR	红细胞沉降率	NO	一氧化氮	WBC	白细胞
FBS	胎牛血清	NOS	一氧化氮合酶	WHO	世界卫生组织