

肿瘤内分泌

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002224

长链非编码 RNA-LINC00152 在甲状腺乳头状癌中的表达及功能研究

刘家锋, 谢 洋

(赣南医学院第一附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 赣州 341000)

【摘要】目的:长链非编码 RNA-LINC00152 在多种类型的恶性肿瘤中发挥致癌作用,但其在甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)尚不清楚。**方法:**纳入 32 例 PTC 患者。术中从 PTC 患者收集肿瘤组织和相邻的正常组织。通过 qRT-PCR 检测 LINC00152 在这些组织中的表达。敲降 LINC00152,建立 LINC00152 低表达 PTC 细胞系,并通过 Transwell 迁移和侵袭实验、细胞克隆实验、生长实验、划痕实验,研究 LINC00152 在 PTC 发生发展中起到的作用。**结果:**大多数 PTC 患者肿瘤组织中 LINC00152 的表达水平高于相邻正常组织($n=64, P<0.01$)。体外细胞实验证明,敲降 LINC00152 使 PTC 细胞的生长增殖、侵袭迁移等恶性能力降低。**结论:**长链非编码 RNA-LINC00152 在 PTC 中呈显著高表达,降低 LINC00152 可明显降低 PTC 细胞的恶性能力。

【关键词】LINC00152; 甲状腺乳头状癌; 长链非编码 RNA; 侵袭; 迁移

【中图分类号】R739.9

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-01-10

Expression and function of long non-coding RNA-LINC00152 in papillary thyroid carcinoma

Liu Jiafeng, Xie Yang

(Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, The First Affiliated Hospital of Gannan Medical College)

【Abstract】Objective: To investigate the role of long non-coding RNA LINC00152 in papillary thyroid carcinoma (PTC). **Methods:** A total of 32 patients with PTC were enrolled. Tumor tissue and adjacent normal tissue samples were collected during surgery, and qRT-PCR was used to measure the expression of LINC00152 in these samples. Knockdown of LINC00152 was performed to establish a PTC cell line with low expression of LINC00152, and Transwell migration and invasion experiments, cell cloning experiments, growth experiments, and wound healing assay were used to investigate the role of LINC00152 in the development and progression of PTC. **Results:** In 64 of all patients with PTC, the expression of LINC00152 in tumor tissue was higher than that in adjacent normal tissue ($P<0.01$). *In vitro* cell experiments demonstrated that knockdown of LINC00152 reduced the growth, proliferation, invasion, and migration abilities of PTC cells. **Conclusion:** Long non-coding RNA-LINC00152 has high expression in PTC and reduction in LINC00152 can significantly reduce the malignant ability of PTC cells.

【Key words】LINC00152; papillary thyroid carcinoma; long non-coding RNA; invasion; migration

甲状腺癌是一种主要来源于滤泡细胞的恶性肿瘤,滤泡细胞是甲状腺单细胞上皮的主要成分^[1]。尽管已经努力预防和治疗甲状腺癌,但在过去的几十年中,这种疾病的发病率增加了 2 倍,并且发病

呈现年轻化趋势^[2]。甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)是甲状腺癌的主要类型,占有病例的 80%以上^[3]。虽然 PTC 早期治疗取得了令人满意的结果和较高的总体生存率^[4],但许多患者被诊断时已为晚期,失去了根治性治疗的最佳时机^[5]。此外,PTC 一旦发生远处转移,即使在手术切除后,仍然具有较高复发率,疗效较差^[6]。因此,早期诊断对 PTC 的治疗至关重要。随着基因组学的进展,

作者介绍:刘家锋, Email: ljfhns@126.com,

研究方向:甲状腺乳头状癌。

基金资助:江西省卫计委星火计划推广课题资助项目(编号:20188016)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190613.0859.002.html>

(2019-06-13)

学者发现除了编码蛋白质的信使 RNA(mRNA)外,人类基因组还可以转录大量非编码 RNA(ncRNA),这些 RNA 在关键的生理过程和病理变化中具有关键作用^[7-8]。其中长链非编码 RNA 为超过 200 个核苷酸组成的 ncRNA 的亚型,已证明在多种不同类型的人类疾病(包括不同类型的恶性肿瘤)的发病机制中发挥着重要作用^[9]。目前,研究证明长链非编码 RNA-LINC00152 在若干类型的癌症中发挥致癌作用,如结直肠癌^[10]和胶质瘤^[11]等。但是在甲状腺乳头状癌中表达情况以及功能仍然较为欠缺,因此,本研究发现 LINC00152 在 PTC 中的表达情况以及在该肿瘤中的功能,期望为该疾病的诊治和进一步研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 患者及标本

本文选择我院 2016 年 6 月至 2018 年 6 月收治的甲状腺乳头状癌 32 例。其中男性 6 例,女性 26 例,年龄 31~69 岁,平均年龄(56.2 ± 8.1)岁。根据世界卫生组织标准进行诊断,病理结果为 PTC,且排除其他类型甲状腺肿瘤。所有患者均为原发肿瘤,行手术切除,术中收集肿瘤组织及肿瘤周围 2 cm 内的邻近正常组织。患者入院前均未接受放疗或化疗。本研究得到我院伦理委员会的批准。所有患者签署知情同意书。

1.2 细胞系和细胞培养

人源 PTC 细胞系 IHH-4 和 HTH83 购于 American Type Culture Collection(ATCC,美国)。应用 10% FBS(Invitrogen, Carlsbad, CA),100 U/mL 链霉素(Invitrogen, Carlsbad, CA)和 100 mg/mL 青霉素 G(Invitrogen, Carlsbad, CA)的 DMEM 培养基(Thermo Fisher Scientific, USA),在培养箱(37 °C, 5% CO₂)中培养。在对数生长阶段收集细胞进行后续实验。

1.3 稳转细胞系的建立

分别合成人源 LINC00152 shRNA 序列 sh-1 和 sh-2,克隆到慢病毒载体(System Biosciences, Palo Alto, CA)中。确认载体序列并分别命名为 sh1-152 和 sh2-152。同源性的发夹 shRNA 命名为 sh-NC 为阴性对照。使用 Lipofectamine 2000 试剂(Invitrogen)将 5 μg sh1-152 或 sh2-152,10 μg PsPax2 和 5 μg pMD2G 转染到 293T 细胞中。转染后 48 h 和 72 h 收集含病毒的上清液。感染 IHH-4 和 HTH83 细胞并在含有 4 μg 嘌呤霉素(Invitrogen)的培养基中进行筛选培养。稳定传代后,通过 qRT-PCR 检测 LINC00152 敲降效率。

1.4 Transwell 迁移及侵袭实验

Transwell 上室(BD Biosciences, San Jose, USA)填充含 5×

10⁴ 细胞的无血清 DMEM 培养基和含 20% 的 DMEM 培养基(Thermo Fisher Scientific, USA)。FCS(Sigma-Aldrich, USA)用于填充下室。培养 18 h 后收集膜,并用 0.5% 结晶紫染色 20 min。在光学显微镜(400 ×, Olympus, Tokyo, Japan)下对染色细胞进行计数。Transwell 侵袭实验前,将上室用 5% Matrigel(356234, Millipore, Billerica, USA)覆膜预处理。

1.5 划痕实验

将细胞接种在 6 孔板中并培养直至汇合达到约 90%。用 200 μL 枪头垂直刮擦细胞层。PBS 清洗 3 遍,去除划下的细胞,更换无血清培养基,24 h 后,测量划痕宽度以评估测试细胞迁移能力。

1.6 细胞增殖和克隆实验

用 Cell Counting Kit-8(CCK-8; Dojindo, Japan)法测定细胞增殖。将细胞接种到 96 孔板的孔中并培养 24~72 h。在指定的时间点(24, 48 和 72 h),向每个孔中加入 20 μL 的 CCK-8 溶液并孵育 4 h。然后,使用 ELISA 酶标仪(Bio-Rad)测量 450 nm 处的光密度。对于集落形成测定,每孔 1 000 个细胞的密度接种在 6 孔板中并使其生长 10 d。将细胞集落用 PBS 洗涤 2 次,用 70% 乙醇固定 30 min,并用 0.1% 结晶紫(Sigma-Aldrich)染色 5 min。拍摄细胞集落并在光学显微镜(Olympus, Tokyo, Japan)下计数。

1.7 RNA 提取及实时定量 PCR

将冰冻研磨后的组织或体外培养的细胞和 Trizol 试剂(Invitrogen, USA)混合,使用 Trizol 法提取样品总 RNA。使用 RNA 样品作为模板进行逆转录以合成 cDNA。SYBR[®] Green Real-Time PCR Master Mix(Thermo Fisher Scientific, USA)用于制备 PCR 反应体系。以下引物用于 PCR 反应,LINC00152: 5'-TTGATGGCTTGAACATTTGG-3'(正向)和 5'-TCGTGATTTTCGGTGTCTGT-3'(反向);GAPDH 引物: 5'-GACCTC-TATGCCAACACAGT-3'(正向)和 5'-AGTACTTGGCTCA-GGAGGA-3'(反向)。所有数据均使用 2-DDCt 法处理,以 GAPDH 为内参。

1.8 统计学处理

使用 SPSS 19.0(SPSS Inc., USA)处理所有数据。定性数据如性别和其他基本信息,通过卡方检验进行处理。定量数据如 RNA 表达水平,表示为均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)。t 检验用于 2 组之间的比较,并且单因素方差分析用于多组之间的比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 LINC00152 在 PTC 患者的肿瘤组织高表达

通过 qRT-PCR 测量 32 名 PTC 患者的肿瘤组织和正常组织中 LINC00152 的表达水平,以 GAPDH 为内参。如图 1 所示,32 例患者中 29 例患者肿瘤组织中 LINC00152 的表达水平明显高于瘤周组织($P<0.01$)。相比之下,仅在 3 名患者

中观察到正常组织中 LINC00152 的表达水平高于肿瘤组织中的表达水平。总体而言,在 PTC 中,LINC00152 呈现高表达,这些数据表明,LINC00152 的上调很可能与 PTC 的发病机制有关。

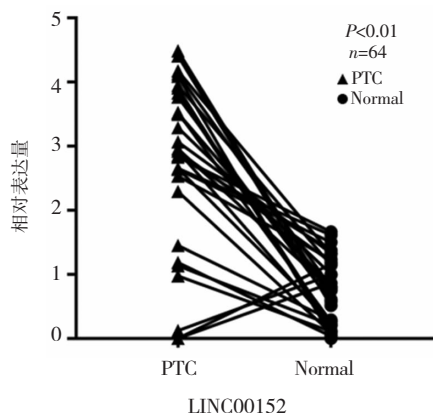


图 1 LINC00152 在甲状腺乳头状癌中的表达水平高于瘤周组织

2.2 LINC00152 低表达抑制 PTC 细胞的侵袭迁移能力

构建慢病毒,转染 LINC00152 低表达细胞系,通过使用 qRT-PCR 测量 LINC00152 的表达水平(图 2),确认 LINC00152 低表达人 PTC 细胞系 IHH-4(sh1-152)和 HTH83(sh1-152)。sh1-152 的 LINC00152 敲降效率更优,因此在体外细胞 Transwell 实验和划痕实验中,应用 IHH-4-NC、IHH-4-sh1-152 细胞系和 HTH83-NC、HTH83-sh1-152 细胞系。如图 3、图 4 所示,Transwell 迁移实验及划痕实验中,LINC00152 低表达细胞系的迁移能力与对照组细胞相比显著减弱。Transwell 侵袭实验中(图 3),较对照组细胞,LINC00152 低表达细胞的侵袭能力同样显著下降。

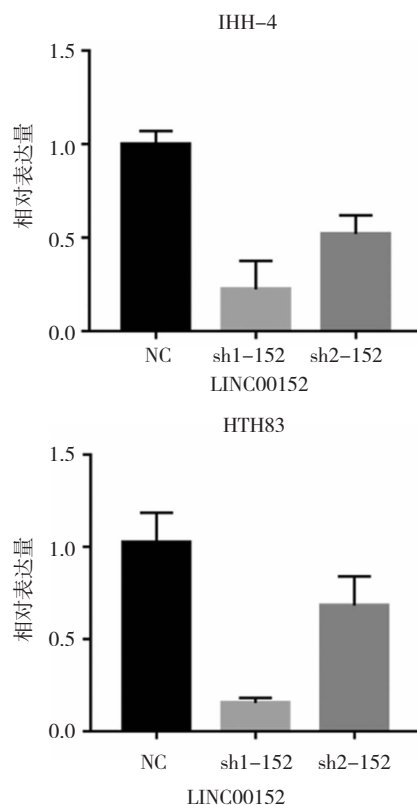


图 2 构建 LINC00152 低表达甲状腺癌细胞系

2.3 LINC00152 低表达减弱了 PCT 细胞的增殖及克隆能力

细胞克隆实验显示敲降 LINC00152 的表达明显降低 TPC 细胞的克隆能力(图 5)。此外,CCK-8 实验检测 TPC 细胞增殖,结果显示敲降 TPC 细胞中 LINC00152 导致细胞增殖能力明显下降(图 6)。这些结果表明,LINC00152 的下调抑制了体外 PTC 细胞的克隆增殖能力。

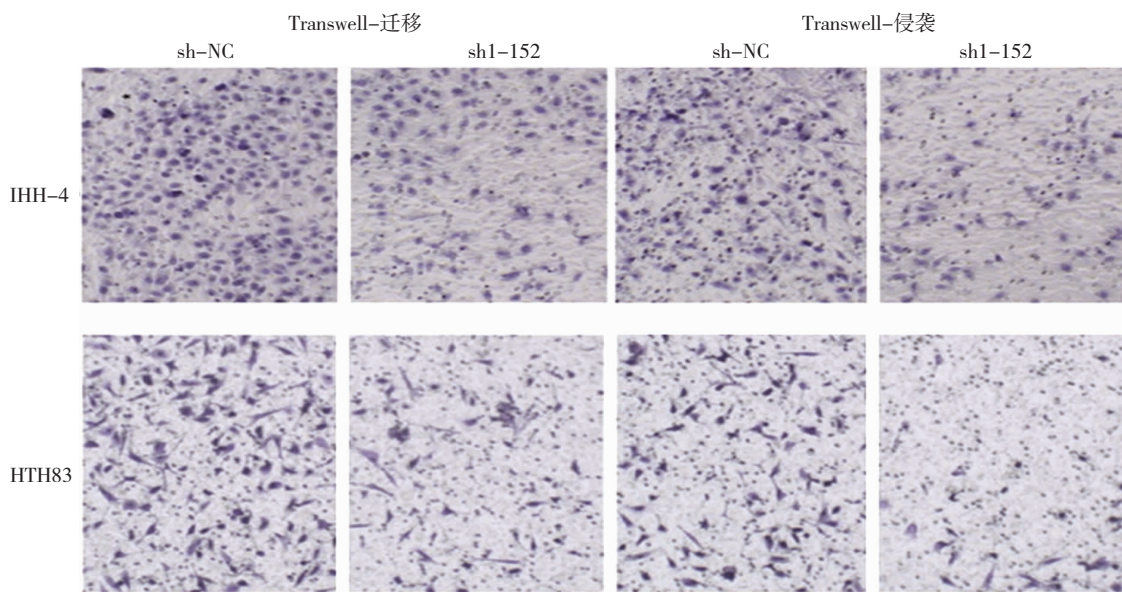


图 3 LINC00152 低表达可减弱甲状腺癌细胞系的侵袭及迁移能力

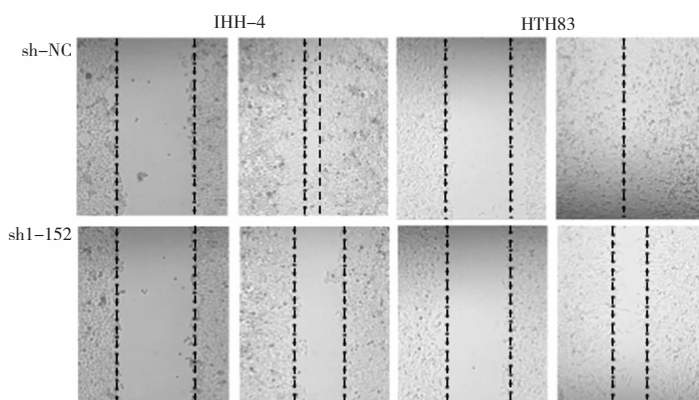


图 4 LINC00152 低表达可减弱甲状腺癌细胞系的迁移能力

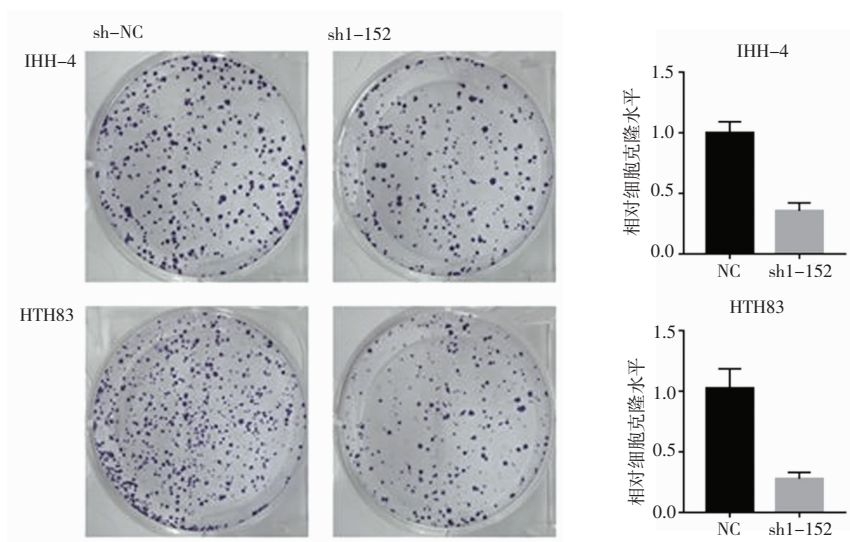


图 5 LINC00152 低表达可减弱甲状腺癌细胞系的克隆能力

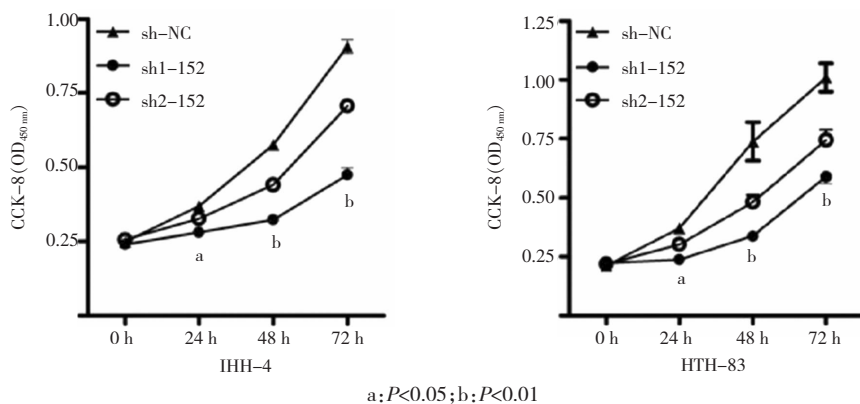
a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$

图 6 LINC00152 低表达可减弱甲状腺癌细胞系的增殖能力

3 讨论

越来越多的研究表明,在 PTC 的发生发展过程中,lncRNA 发挥着重要作用,甚至可能成为诊治的重要参考指标^[12-13]。LINC00152 位于染色体 2p11.2 上,并在多种类型的癌症中起致癌基因的作用^[14]。有

学者报道 LINC00152 在胃癌组织中过表达,通过内源性竞争结合机制下调 miR-193a-3p 的水平,以增强 MCL1 表达,促进胃癌细胞增殖,进而影响患者预后^[15]。Bian 等^[16]学者揭示 LINC00152 通过调节 miR-139-5p/NOTCH1 通路促进细胞增殖、迁移和侵袭,并在结直肠癌中产生 5-氟尿嘧啶(5-FU)抗性,影响结直肠癌治疗效果以及患者预后。Yu 等^[14]

证明 LINC00152 通过调节 miR-103a-3p/FEZF1/CDC25A 途径促进胶质瘤干细胞增殖、迁移和侵袭,并抑制细胞凋亡。Li 等^[17]发现 LINC00152 在肝细胞癌中的表达水平有重要意义,可作为诊断及远期预后的诊断指标。不仅如此,LINC00152 可通过影响 HIF-1 α 、mTOR、EGFR 等多个经典致癌通路在肿瘤进展中发挥重要作用,影响肿瘤恶性进展^[18-20]。

然而,到目前为止,关于 LINC00152 在 PTC 中的表达及作用的研究仍然较为局限。本实验数据表明,与配对样本的正常组织相比,LINC00152 表达在 PTC 肿瘤组织中明显上调,表明 LINC00152 在 PTC 中可能参与 PTC 发生及进展。因此,本研究进行体外细胞实验,构建 LINC00152 低表达 PTC 细胞系,发现在 PTC 细胞中,敲低 LINC00152 的表达水平,可以明显抑制肿瘤细胞增殖、克隆、迁移和侵袭等多种恶性能力,减弱肿瘤细胞的恶性进展。实验结果证明,LINC00152 不仅在 PTC 中表达较高,而且发挥重要促癌功能。

当然,本研究仍然存在局限性。第一,需要患者来源的原代 PTC 细胞来验证 LINC00152 在 PTC 的发育和进展中的生物学功能。第二,体外环境与体内仍有差别,需进行动物试验,完成体内试验验证 LINC00152 功能,获得更为可靠证据支持。第三,lncRNA 在 PTC 及多种肿瘤中常常与蛋白或核酸作用,通过影响多种通路进而发挥致癌功能,因此,LINC00152 在 PTC 中的具体作用机制仍需进一步实验证实,以明确 LINC00152 在 PTC 中发挥作用的详细途径以及治疗干预的可能性。第四,目前的研究仍然局限于基础层面,需要进一步扩大样本数量及完善临床数据统计,进而探索 LINC00152 的临床指导意义。

综上所述,本研究证明 LINC00152 在 PTC 组织中显著上调。此外,通过一系列体外细胞实验确定了 LINC00152 对 PTC 恶性生物学行为的影响,为进一步研究 PTC 的发生发展机制及诊断治疗提供了参考及思路。

参 考 文 献

- [1] Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma[J]. Cell, 2014, 159(3): 676-690.
- [2] Olaleye O, Ekrikpo U, Moorthy R, et al. Increasing incidence of differentiated thyroid cancer in South East England: 1987-2006 [J]. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology, 2011, 268(6): 899-906.
- [3] Londero SC, Kroghdahl 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.

- [4] LiVolsi VA. Papillary thyroid carcinoma: an update[J]. Modern Pathology, 2011, 24: S1-9.
- [5] Hay ID, Thompson GB, Grant CS, et al. Papillary thyroid carcinoma managed at the Mayo Clinic during six decades (1940-1999): temporal trends in initial therapy and long-term outcome in 2444 consecutively treated patients[J]. World Journal of Surgery, 2002, 26(8): 879-885.
- [6] Ito Y, Miyauchi A, Kudo T, et al. The effectiveness of prophylactic modified neck dissection for reducing the development of lymph node recurrence of papillary thyroid carcinoma[J]. World Journal of Surgery, 2017, 41(9): 2283-2289.
- [7] Mattick JS, Makunin IV. Non-coding RNA[J]. Human Molecular Genetics, 2006, 15(1): R17-29.
- [8] Fan Q, Yang L, Zhang X, et al. The emerging role of exosome-derived non-coding RNAs in cancer biology[J]. Cancer Letters, 2018, 414: 107-115.
- [9] Cui Z, Ren S, Lu J, et al. The prostate cancer-up-regulated long noncoding RNA PlncRNA -1 modulates apoptosis and proliferation through reciprocal regulation of androgen receptor[J]. Urologic Oncology Seminars & Original Investigations, 2013, 31(7): 1117-1123.
- [10] Shi SJ, Wang LJ, Yu B, et al. LncRNA-ATB promotes trastuzumab resistance and invasion-metastasis cascade in breast cancer[J]. Onco-target, 2015, 6(13): 11652-11663.
- [11] Iguchi T, Uchi R, Nambara S, et al. A long noncoding RNA, lncRNA-ATB, is involved in the progression and prognosis of colorectal cancer[J]. Anticancer Research, 2015, 35(3): 1385-1388.
- [12] Liyanarachchi S, Li W, Yan P, et al. Genome-wide expression screening discloses long noncoding RNAs involved in thyroid carcinogenesis[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2016, 101(11): 4005-4013.
- [13] Marchese FP, Raimondi I, Huarte M. The multidimensional mechanisms of long noncoding RNA function[J]. Genome Biology, 2017, 18(1): 206.
- [14] Yu M, Xue Y, Jian Z, et al. Linc00152 promotes malignant progression of glioma stem cells by regulating miR-103a-3p/FEZF1/CDC25A pathway[J]. Molecular Cancer, 2017, 16(1): 110.
- [15] Huang Y, Luo H, Li F, et al. LINC00152 down-regulated miR-193a-3p to enhance MCL1 expression and promote gastric cancer cells proliferation[J]. Biosci Rep, 2018, 38(3): BSR20171607.
- [16] Bian Z, Zhang J, Li M, et al. Long non-coding RNA LINC00152 promotes cell proliferation, metastasis, and confers 5-FU resistance in colorectal cancer by inhibiting miR-139-5p[J]. Oncogenesis, 2017, 6(11): 395.
- [17] Li J, Wang X, Tang J, et al. HULC and Linc00152 act as novel biomarkers in predicting diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. Cellular Physiology & Biochemistry, 2015, 37(2): 687-696.
- [18] Zhou J, Zhi X, Wang L, et al. Erratum to: Linc00152 promotes proliferation in gastric cancer through the EGFR-dependent pathway[J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2016, 35: 30.
- [19] Ji J, Tang J, Deng L, et al. LINC00152 promotes proliferation in hepatocellular carcinoma by targeting EpCAM via the mTOR signaling pathway[J]. Oncotarget, 2015, 6(40): 42813-42824.
- [20] Cai Q, Wang Z, Wang S, et al. Long non-coding RNA LINC00152 promotes gallbladder cancer metastasis and epithelial-mesenchymal transition by regulating HIF-1 α via miR-138[J]. Open Biology, 2017, 7(1): 160247.

(责任编辑:唐秋姗)