

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.06.010

文章编号: 1005-8982(2016)06-0045-05

临床论著

MicroRNA-539 靶向膜相关的鸟苷酸激酶蛋白 1 抑制甲状腺癌细胞的侵袭与迁移

顾立学, 孙伟明

(辽宁医学院附属第一医院 普外乳甲整形病区, 辽宁 锦州 121000)

摘要:目的 观察 microRNA-539(miR-539)的表达对甲状腺癌细胞侵袭与迁移的影响,探究 miR-539 与膜相关的鸟苷酸激酶蛋白 1(CARMA1)在甲状腺癌中相互作用的机制。**方法** 构建 miR-539 与 CARMA1 高表达及低表达的细胞模型后通过 transwell 及 MTT 法检测两种不同的甲状腺癌细胞的侵袭、迁移及增殖能力。Western blot 及 RT-PCR 检测细胞中蛋白及 mRNA 表达。**结果** miR-539 抑制甲状腺癌细胞的侵袭与迁移。通过荧光素酶报告检测发现 miR-539 通过靶向 CARMA1 的 3'-UTR 端从而起到抑制甲状腺癌中 CARMA1 的作用。进一步的研究证实, CARMA1 可显著促进甲状腺癌细胞的侵袭与迁移。而调节 CARMA1 的表达, miR-539 随之变化。研究还发现,与对照组比较,甲状腺癌中 miR-539 的表达量降低而 CARMA1 的表达量增加。**结论** miR-539 靶向 CARMA1 抑制甲状腺癌细胞的侵袭与迁移。

关键词: 甲状腺癌; microRNA-539; CARMA1

中图分类号: R736.1

文献标识码: A

miR-539 directly targeting CARMA1 inhibits thyroid cancer cell migration and invasion

Li-xue Gu, Wei-ming Sun

(Department of Breast and Thyroid Surgery, the First Affiliate Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China)

Abstract: Objective To observe the impact of miR-539 on the invasion and migration of human thyroid carcinoma, and to investigate the interaction mechanism between miR-539 and caspase recruitment domain-containing membrane-associated guanylate kinase protein 1 (CARMA1). **Methods** The ability of cells to migrate and invade was assayed using transwell inserts and MTT assay. The expressions of miR-539 and CARMA1 in thyroid cancer cells were detected by Western blot and RT-PCR. **Results** miR-539 inhibited the invasion and migration of thyroid cancer cells. Luciferase reporter assay confirmed that miR-539 binding to the 3'-UTR region of CARMA1 inhibited the expression of CARMA1 in thyroid cancer cells. Further studies demonstrated that CARMA1 significantly promoted the migration and invasion of thyroid cancer cells. miR-539 changed as the expression of CARMA1 was regulated. Furthermore, the expression of miR-539 decreased while the expression of CARMA1 increased in thyroid cancer cell lines and thyroid cancer tissues compared with controls. **Conclusions** miR-539 can regulate migration and invasion in human thyroid cancer cells by targeting CARMA1.

Keywords: thyroid cancer; microRNA; CARMA1

甲状腺癌是最常见的内分泌恶性肿瘤,近十年来其发病率逐年递增^[1]。miRNAs 是一类天然的保守的非编码小分子 RNA,它通过与靶基因 mRNA 碱基

配对来控制大量基因的表达,从而达到裂解、转化 mRNA 的效果^[2]。最近的研究表明,多种 miRNA 对甲状腺癌的发生发展起作用^[3-5]。但其具体的作用机制

收稿日期:2015-11-25

目前尚无研究报道,为了探寻其作用机制,笔者设计了以下实验。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2010 年 2 月 -2015 年 2 月于辽宁医学院附属第一医院就诊并经病理证实的甲状腺癌标本共 44 例。标本离体时间不超过 30 min,将标本一分为二,一部分送病理科,并经病理证实,另一部分离体 30 min 内冻存于液氮中。所有患者均未接受过任何形式的术前新辅助治疗。

1.2 实验方法

1.2.1 实验试剂、细胞培养及转染 miRNA 类似物及抑制物(均购自美国 Ambion 公司),膜相关的鸟苷酸激酶蛋白 1 (CARD domain and MAGUK domain-containing protein-1, CARMA1)及 β -actin 抗体(购于美国 Sigma 公司),甲状腺癌细胞[中国典型培养物保藏中心(CCTCC)],置于 DMEM 培养基中培养,K1 及 WRO 细胞按说明书经脂质体 3000 试剂转染(购自美国 Invitrogen 公司)。

1.2.2 细胞迁移及侵袭性分析 通过 transwell 小室实验分析细胞的迁徙及进展能力。转染细胞经胰蛋白酶/EDTA 处理后在含血清的 DMEM 培养基中洗 1 次,将细胞浓度于无血清的 DMEM 培养基中调整至 1×10^5 并接种于下室中。除此之外,在侵袭实验中笔者在小室的过滤器上涂上 1 次 $45 \mu\text{g}$ 的基质胶。孵育 48 h 后,用棉签擦去上室中的细胞。收集下层细胞并用结晶紫染色 30 min,漂洗后计数细胞。实验重复 3 次。

1.2.3 核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)提取及实时定量 PCR 检测 按说明书操作,TRIzol 法提取组织及细胞中的总 RNA 并进行反转录。采用实时定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 法, TaqMan 试剂盒按说明书进行操作。U6 snRNA 作为内参。

1.2.4 RNA 转染 靶向 CARMA1 的 RNAi 质粒(购自美国 Origene 公司)。

1.2.5 四唑盐比色法(MTT 法) 采用 MTT 实验分析细胞增殖能力。细胞接种于 96 孔板,每孔 5×10^3 个细胞。孵育 24 h 后进行上机检测。实验重复 3 次。

1.2.6 Western blot 分析 放射免疫分析法(radio immunoprecipitation assay, RIPA)裂解液中裂解细胞提取蛋白,BCA(bicinchoninic acid)法测蛋白浓度。

采用浓度为 12% 凝胶进行电泳,电泳后蛋白转至硝酸纤维素膜上,封闭 2 h 后上机检测。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 进行配对 t 检验。所有实验结果均至少重复 3 次。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-539 抑制甲状腺癌细胞的迁移与侵袭

为了探寻 miR-539 对甲状腺癌细胞的作用,笔者合成了 1 个双链的 miR-539 类似物及 1 个互补的单链 miR-539 抑制物,并将它们转染至 K1 甲状腺癌细胞中。采用 transwell 实验来检测转染细胞的迁移及侵袭能力。结果表明,与对照组比较,转染了 miR-539 类似物的细胞迁移能力明显下降。相反,转染了 miR-539 抑制物的细胞迁移能力则明显高于对照组。侵袭能力实验得出的结果与此相同。此外,笔者在 WRO 甲状腺癌细胞中也进行了此项实验,结果与 K1 细胞相同。此后,笔者检测了甲状腺癌细胞的增殖能力,MTT 实验结果显示,K1 细胞及 WRO 细胞的增殖并不影响 miR-539 的量。这就表明 miR-539 是甲状腺癌的 1 种潜在的肿瘤转移抑制因子。见图 1。

2.2 miR-539 作用于甲状腺癌的靶点为 CARMA1

miR-539 可以抑制甲状腺癌细胞的转移,因此笔者推断存在 1 种特定的基因在此过程中起作用。经过计算预测后笔者发现 CARMA1 的 3'UTR 端有 1 个 miR-539 的结合位点。为了证实笔者的推测,笔者构建了 1 个野生型的 CARMA1 的 3'UTR 端及突变的荧光素酶报告质粒。荧光素酶活性报告显示 miR-539 类似物可显著阻碍野生型的 CARMA1 而对突变型则无作用,这就表明 miR-539 直接作用于此位点。紧接着,笔者检测了 miR-539 对内源性的 CARMA1 的表达的影响。在 K1 细胞中过表达 miR-539 可显著降低 CARMA1 的 mRNA 及蛋白质的表达水平,而抗 miR-539 的增加 CARMA1 的表达水平。这就表明 miR-539 直接靶向并调节 CARMA1 在甲状腺癌中的表达。见图 2。

2.3 CARMA1 促进甲状腺癌细胞的侵袭与迁移

为了检测 CARMA1 对甲状腺癌细胞的侵袭与迁移的影响,笔者构建了一系列 CARMA1 RNAi 的质粒,通过 RT-PCR 分析显示 4# 质粒可显著阻止 K1 细胞中内源性的 CARMA1 的表达,而 1# 及 2# 则不能影响其表达。见图 3A。笔者将质粒转染至 K1

细胞中进行 transwell 实验,来检测其侵袭及迁移能力。图 3B 和 3C 中所示,4# 质粒可显著降低 K1 细胞的侵袭及迁移能力。相反,过表达 CARMA1 可促进 K1 细胞的侵袭及迁移。综上所述,CARMA1 参与甲状腺癌细胞的侵袭及迁移。

2.4 miR-539 通过靶向 CARMA1 阻碍甲状腺癌细胞的侵袭与迁移

由于 miR-539 可阻碍甲状腺癌细胞的侵袭与迁移,而 CARMA1 是 miR-539 的靶向基因,那么 miR-539 是否通过靶向 CARMA1 从而在甲状腺癌

细胞中起作用的。Transwell 实验结果表明,过表达 CARMA1 可降低 miR-539 对 K1 细胞的抑制作用。同时,miR-539 的类似物及 CARMA1 的 4#RNAi 质粒可相互作用。应用 miR-539 抑制剂后,K1 细胞中 miR-539/CARMA1 信号通路的作用增加。miR-539 抑制剂及 CARMA1 的过表达质粒相互作用可促进 K1 细胞的侵袭及迁移。相反,当用 4# 质粒敲除 CARMA1 时 K1 细胞的侵袭及迁移能力下降。这些结果均证实了 miR-539 通过靶向 CARMA1 从而影响甲状腺癌细胞的侵袭与迁移。见图 4。

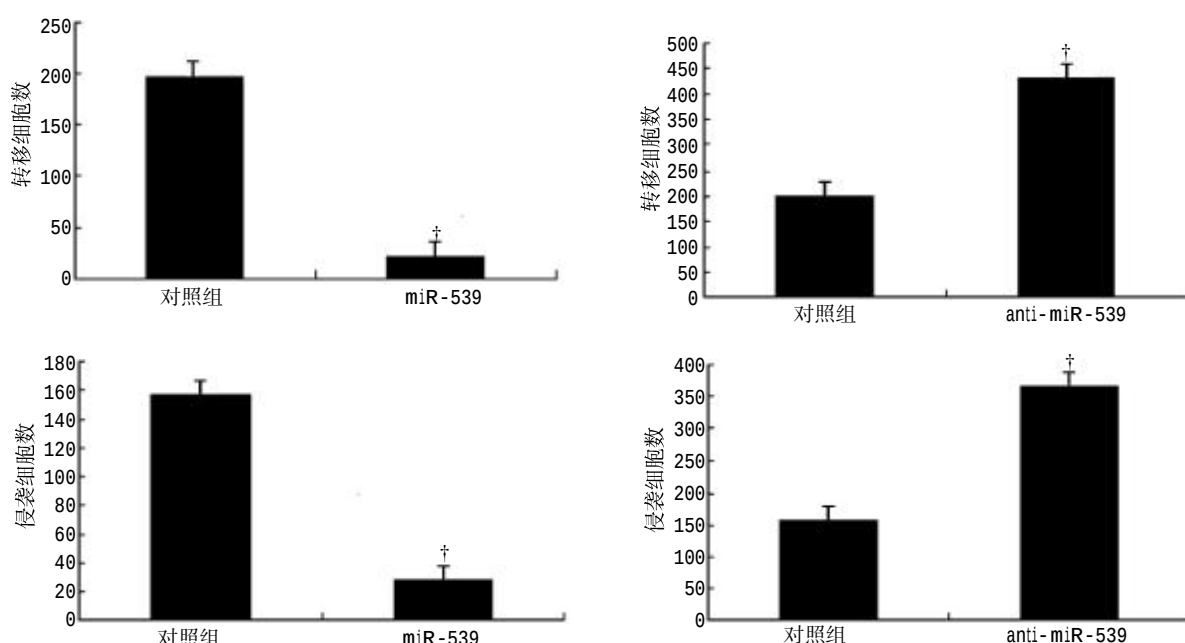


图 1 Transwell 实验转染细胞的迁移及侵袭能力

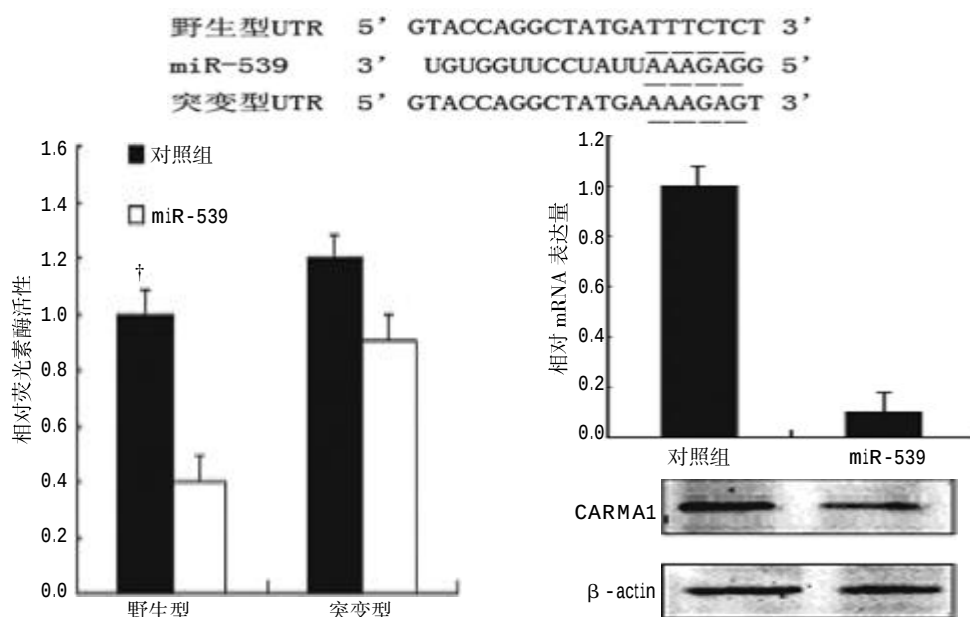


图 2 miR-539 对内源性的 CARMA1 的表达的影响

2.5 甲状腺癌细胞系及甲状腺癌组织中 miR-539 和 CARMA1 的表达情况

为了确定 miR-539 和 CARMA1 在甲状腺癌中的作用,笔者检测了人甲状腺癌细胞系及甲状腺癌组织中 miR-539 和 CARMA1 的表达情况。结果显示:在所有甲状腺癌细胞系中,与对照组比较 miR-539 的表达均较低,而 CARMA1 的表达量均

较高。笔者又检测了 32 例甲状腺乳头状癌及 12 例甲状腺滤泡状癌组织,结果与细胞系的结果类似,与癌旁正常组织比较,甲状腺乳头状癌及滤泡状癌组织中 miR-539 表达量低而 CARMA1 表达量高。miR-539 的表达量与 CARMA1 的表达量有相关性。这些结果进一步证实 miR-539 和 CARMA1 密切相关。

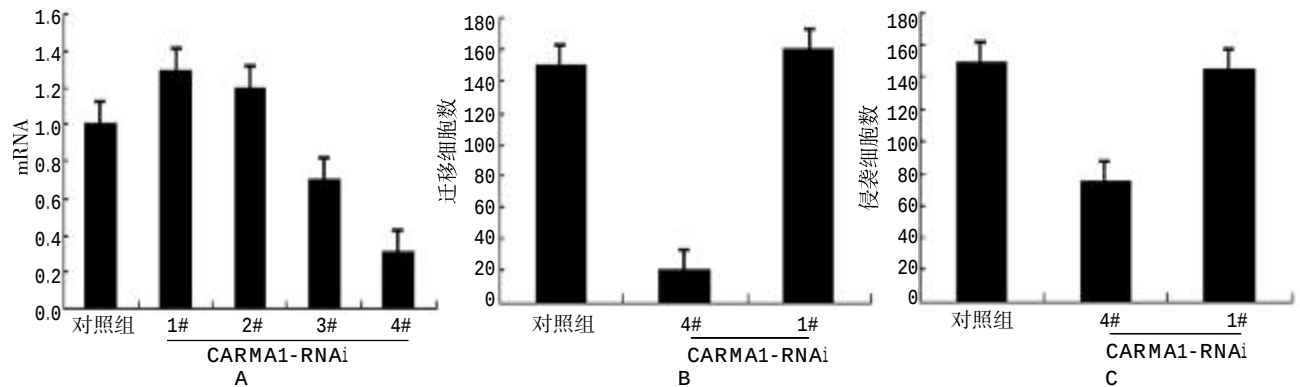


图 3 Transwell 实验检测质粒转染后细胞的侵袭及迁移能力

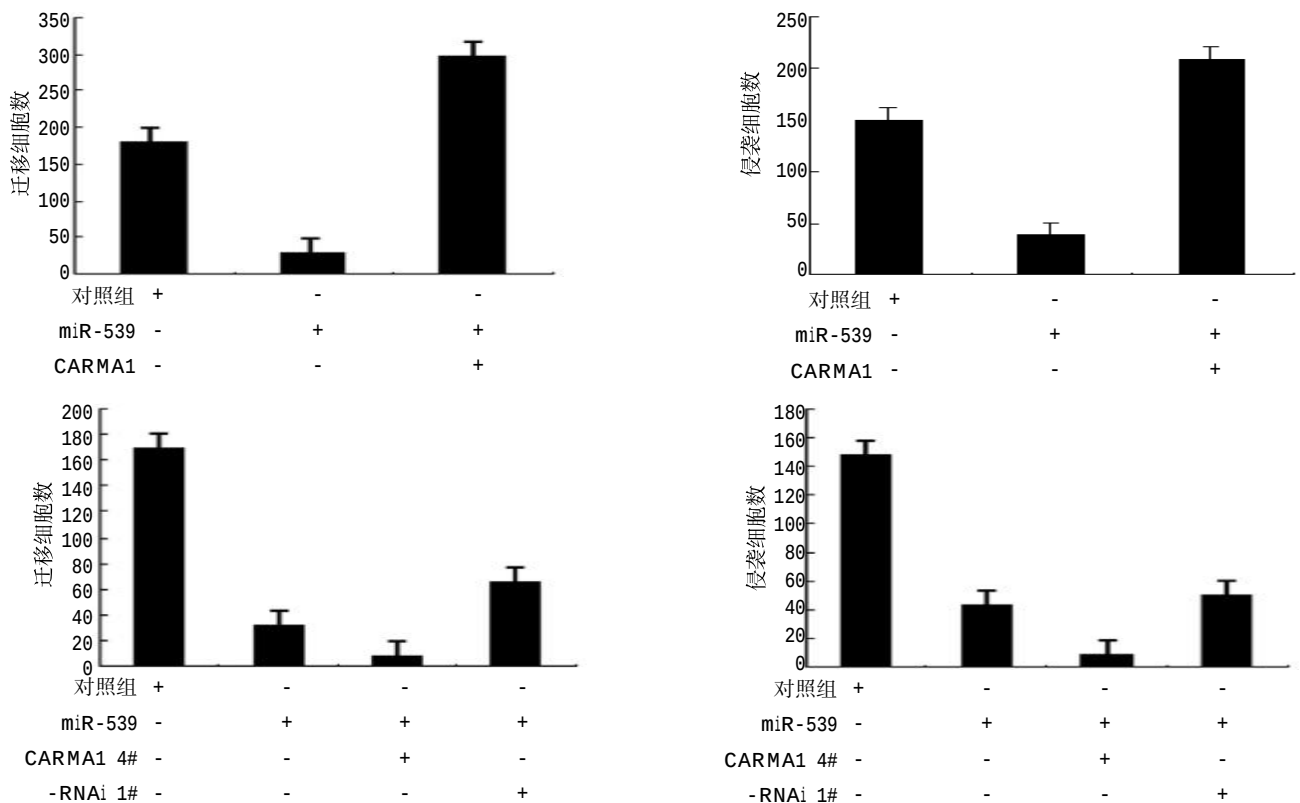


图 4 Transwell 实验检测质粒转染后细胞的侵袭及迁移能力

3 讨论

甲状腺癌是最常见的内分泌恶性肿瘤,近十年来其发病率逐年递增^[1]。大多数甲状腺肿瘤起源于滤泡细胞,可分为:高分化癌,低分化癌及未分化

癌^[6]。高分化癌包括:滤泡状癌和乳头状癌^[7],其预后较好,但总的复发率高达 35%^[8]。甲状腺未分化癌则较少见,以侵袭性高,预后差,病死率高为特点^[9]。

miRNAs 是一类天然的保守的非编码小分子

RNA,它通过与靶基因 mRNA 碱基配对来控制大量基因的表达,从而达到裂解、转化 mRNA 的效果^[10]。近年来,越来越多的研究表明小 RNAs 在细胞的生长、分化、增殖和凋亡过程中起重要的作用^[11]。而关于 miR-539 的研究则较少。有研究表明 miR-539 通过抑制 O-GlcNAcase 的表达从而在心脏衰竭的发病过程中起作用^[12]。miR-539 通过靶向 PHB2 调节线粒体的活性^[13]。最近的研究表明,多种 miRNA 对甲状腺癌的发生发展起作用^[3-5]。笔者构建了 miR-539 的类似物及抑制物通过生物信息学分析及荧光素酶活性分析证实了 CARMA1 是 miR-539 的一个作用靶点。

CARMA1 是一种细胞骨架蛋白,在 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞中参与 NF- κ B 的激活^[14-15]。大量的研究已证实 CARMA1 在 NF- κ B 信号转导通路中的作用,但 CARMA1 在癌症中的作用尚无研究证据表明。支架蛋白 CARMA1 参与 TCR 所致的淋巴激活过程。刺激 CARMA1 可激活 NF- κ B 途径的 JNK 和翻译因子^[16]。笔者的研究首次证实了 CARMA1 在甲状腺癌中起作用,但仍需进一步的实验来探究其深层机制。

笔者的研究旨在探究 miR-539 及 CARMA1 对甲状腺癌细胞转移的影响。结果表明 miR-539 通过靶向 CARMA1 的 3'-UTR 端下调甲状腺癌中 CARMA1 的表达,进而起到抑制甲状腺癌细胞转移的作用。此外,笔者还发现在甲状腺癌细胞及组织中 miR-539 的水平与 CARMA1 表达量呈负相关。笔者的研究首次证明了甲状腺癌细胞侵袭及迁移的机制。尽管靶向小 RNA 的治疗方式仍处于研究中,但笔者的研究为甲状腺癌的靶向治疗提供了新的思路及理论依据,这对甲状腺癌发病机制的探究及靶向治疗有着重要的意义。

参 考 文 献:

- [1] 石光清,曹艳.蛋白和基因在甲状腺癌中的表达[J].中国现代医学杂志,2012,19(19): 61-66.
- [2] Kobayashi E, Hornicek FJ, Duan Z. [J]. Sarcoma, 2012, 2012 (2012): 359739-359742.
- [3] Jikuzono T, Kawamoto M, Yoshitake H, et al. The miR-221/222 cluster, miR-10b and miR-92a are highly upregulated in metastatic minimally invasive follicular thyroid carcinoma[J]. International Journal of Oncology, 2013, 42(6): 1858-1868.
- [4] Mazeh H, Mizrahi I, Halle D, et al. Development of a microRNA-based molecular assay for the detection of papillary thyroid carcinoma in aspiration biopsy samples[J]. Thyroid Official Journal of the American Thyroid Association, 2011, 21(2): 111-118.
- [5] Pierlorenzo P, Rosa V, Carlo Maria C, et al. Deregulation of microRNA in follicular-cell-derived human thyroid carcinomas[J]. Endocrine-related Cancer, 2010, 17(1): 91-104.
- [6] Santos J C, Bastos A U, Cerutti J M, et al. Correlation of MLH1 and MGMT and promoter methylation with genomic instability in patients with thyroid carcinoma[J]. BMC Cancer, 2013, 13(4): 1-7.
- [7] Dongfeng N, Tetsuo K, Tadao N, et al. Differential of aquaporins and its diagnostic utility in thyroid cancer[J]. Plos One, 2012, 7 (7): 5567-5574.
- [8] Lin SF, Huang YY, Lin JD, et al. Utility of a PI3K/mTOR inhibitor (NVP-BEZ235) for thyroid cancer therapy[J]. Plos One, 2012, 7(10): 46726.
- [9] Xi L, Ge Z, Yinghou W, et al. RASSF7 and RASSF8 proteins are predictive factors for development and metastasis in malignant thyroid neoplasms[J]. Journal of Cancer Research & Therapeutics, 2013, 9(9): S173-S177.
- [10] Kobayashi E, Hornicek FJ, Duan Z. MicroRNA involvement in osteosarcoma[J]. Sarcoma, 2012, 2012(2012): 359729-359732.
- [11] Hebrant A, Floor S, Saiselet M, et al. miRNA Expression in Anaplastic Thyroid Carcinomas[J]. Plos One, 2014, 9(8): e103871.
- [12] Senthikumar M, Demartino AM, Watson LJ, et al. MicroRNA-539 is up-regulated in failing heart, and suppresses O-GlcNAcase expression [J]. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289 (43): 29665-29676.
- [13] Wang K, Long B, Zhou L Y, et al. CARL lncRNA inhibits anoxia-induced mitochondrial fission and apoptosis in cardiomyocytes by impairing miR-539-dependent PHB2 downregulation [J]. Nature Communications, 2014, 5(5): 29965-29967.
- [14] Marzenna B, Xin L. NF- κ B signaling pathways regulated by CARMA family of scaffold proteins[J]. Cell Research, 2011, 21 (1): 55-70.
- [15] Marzenna B, Donghyun J, Zweidler-Mckay PA, et al. CARMA1 controls Th2 cell-specific cytokine through regulating JunB and GATA3 transcription factors [J]. Journal of Immunology, 2012, 188(7):3160-3168.
- [16] Gaide O. CARMA1 is a critical lipid raft-associated regulator of TCR-induced NF- κ B activation[J]. Nature Immunology, 2002, 3(9): 836-843.

(王荣兵 编辑)