

• 论 著 •

lncRNA CRNDE 通过调控 miR-451 对乳头状甲状腺癌细胞恶性行为的影响^{*}

张 艳¹, 陈文好^{1,2}, 王 丽¹, 吴晨光^{1△}

1. 江苏大学附属人民医院内分泌科, 江苏镇江 212002; 2. 常州市肿瘤医院急诊科, 江苏常州 213000

摘 要: **目的** 探讨长链非编码 RNA 结直肠肿瘤差异表达基因(lncRNA CRNDE)对乳头状甲状腺癌(PTC)恶性进展中的生物学功能及其潜在调节机制。**方法** 收集 2019 年 7 月至 2021 年 1 月在江苏大学附属人民医院行甲状腺切除手术的 30 例 PTC 患者的癌和癌旁组织标本,另外选择人甲状腺癌细胞系(TPC-1 和 BCPAP)和人甲状腺正常细胞(Nthy-ori 3-1)作为靶细胞。实时定量聚合酶链反应(qPCR)检测 PTC 癌和癌旁组织及细胞系中 lncRNA CRNDE 和微小 RNA(miR)-451 的表达。将 TPC-1 和 BCPAP 细胞随机分为对照(Ctrl)组, lncRNA CRNDE 过表达(lncRNA CRNDE-OE)组和 lncRNA CRNDE 敲除(lncRNA CRNDE-siRNA)组。CCK-8 法检测细胞增殖活性; Transwell 法检测细胞侵袭和迁移; 流式细胞术检测细胞凋亡; Western blot 检测 N-钙黏蛋白(N-cadherin), 波形蛋白(Vimentin)和 E-钙黏蛋白(E-cadherin)蛋白表达; 荧光素酶报告实验分析 lncRNA CRNDE 与 miR-451 基因的靶向关系。**结果** 与癌旁组织相比, 癌组织中 lncRNA CRNDE 表达增多, miR-451 表达降低($P < 0.001$); 与 Nthy-ori 3-1 细胞相比, TPC-1 和 BCPAP 细胞中 lncRNA CRNDE 表达上调, miR-451 表达下调($P < 0.001$)。与 Ctrl 组相比, lncRNA CRNDE-OE 组 BCPAP 和 TPC-1 细胞存活率, 侵袭率和迁移率均升高, 细胞凋亡率降低, E-cadherin 蛋白表达减少, N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达升高, miR-451 表达降低($P < 0.01$); 而 lncRNA CRNDE-siRNA 组细胞存活率, 侵袭率和迁移率均降低, 细胞凋亡率升高, E-cadherin 蛋白表达增多, N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达降低($P < 0.01$); 双荧光素酶报告实验显示, lncRNA CRNDE 与 miR-451 具有明显的靶向关系。**结论** PTC 癌组织中 lncRNA CRNDE 高表达, 可能通过靶向抑制 miR-451 表达促进 PTC 细胞增殖、迁移、侵袭和上皮-间充质转化发生, 并抑制细胞凋亡。

关键词: 乳头状甲状腺癌; 长链非编码 RNA 结直肠肿瘤差异表达基因; 微小 RNA-451; 上皮-间充质转化; 迁移侵袭

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2024.21.012

中图法分类号: R736.1

文章编号: 1673-4130(2024)21-2620-06

文献标志码: A

Effect of lncRNA CRNDE on the malignant behavior of papillary thyroid carcinoma cells through regulating miR-451^{*}

ZHANG Yan¹, CHEN Wenyu^{1,2}, WANG Li¹, WU Chenguang^{1△}

1. Department of Endocrinology, Affiliated People's Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212002, China; 2. Department of Emergency, Changzhou Cancer Hospital, Changzhou, Jiangsu 213000, China

Abstract: Objective To investigate the biological function of long-stranded non-coding RNA colorectal tumor differentially expressed gene (lncRNA CRNDE) in the malignant progression of papillary thyroid carcinoma (PTC) and its potential regulatory mechanisms. **Methods** Cancer and paracancerous tissue specimens from totally 30 PTC patients who underwent thyroidectomy at the Affiliated People's Hospital of Jiangsu University from July 2019 to January 2021 were collected, and human thyroid cancer cell lines (TPC-1 and BCPAP) and normal human thyroid cells (Nthy-ori 3-1) were additionally selected as the target cells. Real time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed to detect the expression of lncRNA CRNDE and microRNA (miR)-451 in PTC cancer, paracancerous tissues, and cell lines. TPC-1 and BCPAP cells were randomly divided into control (Ctrl) group, lncRNA CRNDE overexpression (lncRNA CRNDE-OE) group and lncRNA CRNDE knockdown (lncRNA CRNDE-siRNA) group. CCK-8 method was used to detect cell

* 基金项目: 江苏省科技项目青年基金项目(BK20150476); 镇江市重点研发计划-社会发展项目(SH2019075, SH2020068)。

作者简介: 张艳, 女, 住院医师, 主要从事甲状腺肿瘤方面的研究。△ 通信作者, E-mail: wcgzj1128@aliyun.com。

proliferation activity. Transwell method was used to detect cell invasion and migration. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis. Western blot was used to detect N-cadherin, vimentin, and E-cadherin protein expression. The luciferase reporter assay was used to analyze the targeting relationship between lncRNA CRNDE and miR-451 gene. **Results** lncRNA CRNDE expression was increased and miR-451 expression was decreased in cancer tissues compared with paracancerous tissues ($P < 0.001$); lncRNA CRNDE expression was up-regulated and miR-451 expression was down-regulated in TPC-1 and BCPAP cells compared with Nthy-ori 3-1 cells ($P < 0.001$). Compared with the Ctrl group, BCPAP and TPC-1 cells in the lncRNA CRNDE-OE group showed increased survival, invasion and migration rates, decreased apoptosis, decreased E-cadherin protein expression, elevated N-cadherin and Vimentin protein expression, and decreased miR-451 expression ($P < 0.01$), whereas in the lncRNA CRNDE-siRNA group, cell survival, invasion rate and migration rate were decreased, apoptosis rate was elevated, E-cadherin protein expression was increased, and N-cadherin and Vimentin protein expression was decreased ($P < 0.01$). Dual luciferase reporter assay showed that lncRNA CRNDE had obvious targeting relationship with miR-451. **Conclusion** lncRNA CRNDE is highly expressed in PTC cancer tissues, which may promote PTC cell proliferation, migration, invasion, epithelial mesenchymal transition, and inhibit cell apoptosis by targeting miR-451 expression inhibition.

Key words: papillary thyroid cancer; long-stranded non-coding RNA colorectal tumor differentially expressed gene; microRNA-451; epithelial-mesenchymal transition; migration and invasion

甲状腺癌是内分泌系统最常见的恶性肿瘤,其中乳头状甲状腺癌(PTC)约占 85%^[1],中晚期患者治疗预后较差^[2]。积极探索 PTC 发病分子机制,寻找可靠且有价值的潜在分子诊断标志物,对临床有效诊断和治疗意义重大。长链非编码 RNA(lncRNA)是一类长度超过 200 个核苷酸的非编码 RNA,能够通过转录调节基因表达,影响肿瘤细胞的生物学功能^[3]。结直肠肿瘤差异表达基因(lncRNA CRNDE)是一种最早在结直肠腺瘤和腺癌中发现的 lncRNA,研究显示, lncRNA CRNDE 能够促进肝癌、胆囊癌、卵巢癌和前列腺癌等多种恶性肿瘤的进展^[4]。有研究发现, lncRNA CRNDE 在甲状腺癌组织中表达上调^[5]。然而, lncRNA CRNDE 在 PTC 发生发展中的作用及机制未见报道。故此本研究拟分析 lncRNA CRNDE 在 PTC 癌组织和癌旁组织中的表达,探讨其对于 PTC 细胞增殖、迁移和侵袭转移的影响及其可能机制,为 PTC 的防治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 选取 2019 年 9 月至 2021 年 10 月期间在江苏大学附属人民医院(下称本院)行手术切除治疗的 30 例 PTC 患者,收集其癌及癌旁组织(距 PTC 组织外缘 2 cm 以上)标本。纳入标准:(1)术后经病理学诊断为 PTC;(2)术前未经放射性碘治疗及促甲状腺激素抑制治疗;(3)临床资料完整;(4)患者知情且自愿参与本研究。排除标准:(1)合并其他恶性肿瘤;(2)合并甲状腺功能异常;(3)妊娠期。本研究经本院伦理委员会审议批准(伦理批准号:K-20190062-Y),并获得所有患者及其家属的知情同

意书。

1.1.2 主要试剂及材料 人甲状腺癌细胞(TPC-1 和 BCPAP),人甲状腺正常细胞(Nthy-ori 3-1)均购自武汉尚恩生物科技有限公司。RNA cDNA 第一链合成试剂盒购自北京全氏金生物技术有限公司;SG Fast qPCR Master Mix 预混液购自上海生工生物工程股份有限公司;SYBR Premix Ex TaqTM 购自日本 TAKARA 公司;细胞转染试剂 Lipofectamine 2000TM 购自美国 Invitrogen 公司;细胞计数试剂盒-8(CCK-8)购自英国 BBI Life Sciences 公司;凋亡检测试剂盒购自上海翌圣生物科技股份有限公司;Transwell 小室购自美国 Corning 公司;Anti-N-钙黏蛋白(N-cadherin),Anti-波形蛋白(Vimentin),Anti-E-钙黏蛋白(E-cadherin)抗体均购自英国 Abcam 公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自美国 Promega 公司;lncRNA CRNDE 过表达质粒(lncRNA CRNDE-MUT),空白质粒(lncRNA CRNDE-WT),lncRNA CRNDE siRNA,miR-451 模拟物(miR-451 mimics),miR-451 抑制物(miR-451 inhibitor)和阴性对照(miRNA NC)均由上海亚载生物有限公司合成构建。

1.1.3 主要仪器 Cytation3 多功能酶标仪(BioTek, 美国);Chemi Doc XRS 化学发光凝胶成像分析系统(Bio-Rad, 美国);NIB 910 光学显微镜(深圳博士达器械设备有限公司);FACS-Calibur 流式细胞仪(Becton Dickinson, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 实时定量聚合酶链反应(qPCR)检测 PTC 癌及癌旁组织和细胞株中 lncRNA CRNDE 和 miR-451 表达 使用 TRIzol 试剂从 PTC 细胞系和患者癌及

癌旁组织中提取总 RNA,按照 RNA cDNA 第一链合成试剂盒说明书逆转录成 cDNA。使用 SYBR Premix Ex Taq TM 在 qPCR 系统上进行 qPCR。20 μ L 反应体系:2 $\times$ Ultra SYBR Mixture 10 μ L,上游与下游引物均 2 μ L,cDNA 模板 2 μ L,ddH₂O 4 μ L;反应条件:95 $^{\circ}$ C 3 min,95 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,共 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 10 min;之后以 2^{- $\Delta\Delta$ ct} 法测定 lncRNA CRNDE 和 miR-451 相对表达量,分别以 GAPDH 和 U6 作为内参。lncRNA CRNDE 正向引物为 5'-CTAGTCGTGTCCCCT CGTG-3',lncRNA CRNDE 反向引物为 5'-CAAGGGCTCTACTCCG-GAAA-3';miR-451 正向引物为 5'-ATTGCACTT-GTCTCGGTCTG-3',miR-451 反向引物为 5'-CT-CAACTGGTGGTGTCTG-3';GAPDH 正向引物为 5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3',GAPDH 反向引物为 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3';U6 正向引物为 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAA T-3',U6 反向引物为 5'-CGCTTCACGAATTTGCGT-GTCAT-3'。

1.2.2 PTC 细胞转染及分组 取对数生长期的 TPC-1 和 BCPAP 细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板,随机分为对照(Ctrl)组,lncRNA CRNDE 过表达(lncRNA CRNDE-OE)组和 lncRNA CRNDE 敲除(lncRNA CRNDE-siRNA)组。待细胞融合度达 80%~90%时,根据制造商的说明,使用 Lipofectamine 2000 试剂按照分组分别转染 lncRNA CRNDE-WT,lncRNA CRNDE-MUT)或 lncRNA CRNDE siRNA(终浓度 100 nmol/ μ L),培养 48 h 后进行后续实验。

1.2.3 CCK-8 法检测癌细胞增殖活性 将 3 组 TPC-1 和 BCPAP 细胞以 2.5×10^4 个/孔的密度均匀接种于 96 孔板,每孔分别于相应转染处理后 72 h 加入 10 μ L CCK-8 溶液,37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h 后使用酶标仪在 450 nm 处测量吸光度(A)值。细胞存活率(%)=A 实验组/A 对照组 $\times 100\%$ 。

1.2.4 Transwell 检测癌细胞侵袭和迁移能力 使用具有或不具有基质胶 Matrigel 的 Transwell 小室测定来观察细胞侵袭或迁移能力。将约 1.5×10^4 个 TPC-1 或 BCPAP 细胞加入到上室,并将 600 μ L 完全培养基加入基质室。孵育 12 h 后,将该小室用 3.7%甲醛固定 15 min 并用结晶紫染色。去除未从膜顶部迁移/侵入的细胞,在光学显微镜下随机选取 5 个视野观察细胞并计数。

1.2.5 Western blot 检测上皮间充质转化(EMT)相关蛋白表达 用 RIPA 蛋白裂解缓冲液提取细胞总蛋白,并用 BCA 浓度测定试剂盒测定浓度。用 10%的 SDS-PAGE 凝胶分离总蛋白,然后湿转到 PVDF

膜上。5%脱脂奶粉封闭 1 h 后,用抗 E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 抗体(1:500 稀释)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日,洗膜 3 次,室温下与二抗(1:10 000 稀释)孵育 1 h,用 ECL 检测试剂显示蛋白条带,并用 Image J 软件分析条带灰度值,以 GAPDH 作为内参。

1.2.6 流式细胞术检测癌细胞凋亡 去离子水 4 倍稀释 $4 \times$ Binding Buffer,向细胞悬液中加入 250 μ L $1 \times$ Binding Buffer 重悬细胞,继续加入 $1 \times$ Binding Buffer 调节细胞悬液浓度为 1×10^6 个/毫升左右。取 100 μ L 细胞悬液于 5 mL 流式管中,加入 5 μ L Annexin FITC 和 10 μ L PI,混匀后在避光条件下室温反应 15 min,然后加入 400 μ L $1 \times$ Binding Buffer,充分混匀。样品在 1 h 内使用 FACScan 流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.7 萤光素酶报告基因验证 lncRNA CRNDE 和 miR-451 靶向关系 根据 TargetScan(<http://www.targetscan.org/>)生物信息学网站预测显示的 lncRNA CRNDE 和 miR-451 结合位点,构建含有 miR-451 结合位点的 lncRNA CRNDE 萤光素酶报告基因载体 lncRNA CRNDE-MUT。将 BCPAP 细胞以 5×10^4 个/孔浓度接种于 24 孔板中,利用 Lipofectamine 2000 试剂盒,分别单/共转染 lncRNA CRNDE-WT 或 lncRNA CRNDE-MUT 和 miR-451 mimics、miR-451 inhibitor 或 miRNA NC。转染 48 h 后使用双萤光素酶报告活性检测试剂盒测量萤光素酶活性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS26.0 统计软件进行数据分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析(one-way,ANOVA),然后进行 Tukey's post hoc 检验;Pearson 相关性分析 lncRNA CRNDE 和 miR-451 表达相关性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 lncRNA CRNDE 在 PTC 癌及癌旁组织和细胞系中的表达比较 qRT-PCR 结果显示,与癌旁组织相比,癌组织中 lncRNA CRNDE 表达水平(1.58 ± 0.56 vs. 0.86 ± 0.43)显著升高,差异有统计学意义($P < 0.001$)。与人甲状腺正常细胞系 Nthy-ori-1 比较,人甲状腺癌细胞系 BCPAP 和 TPC-1 中 lncRNA CRNDE 表达水平(8.97 ± 0.89 , 9.98 ± 0.84 vs. 1.03 ± 0.02)亦明显升高,差异有统计学意义($P < 0.001$)。

2.2 lncRNA CRNDE 对 PTC 细胞增殖活性,侵袭和迁移的影响 CCK-8 结果显示,与 Ctrl 组相比,lncRNA CRNDE OE 组 BCPAP 和 TPC-1 细胞增殖活力存活率显著升高,lncRNA CRNDE-siRNA 组细胞存活率明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。Transwell 实验结果显示,与 Ctrl 组相比,lncRNA

CRNDE-OE 组 BCPAP 和 TPC-1 细胞的侵袭率和迁移率均显著提高,而 lncRNA CRNDE-siRNA 组细胞侵袭率和迁移率明显降低,差异均有统计学意义($P<0.01$)。见表 1。

表 1 各组细胞增殖活性,侵袭和迁移率比较($\bar{x}\pm s, \%$)				
细胞	组别	细胞存活率	细胞侵袭率	细胞迁移率
BCPAP	Ctrl 组	322.65 $\pm$ 23.12	100.54 $\pm$ 5.67	99.87 $\pm$ 4.37
	lncRNA CRNDE OE 组	436.87 $\pm$ 46.82 [*]	146.57 $\pm$ 8.73 [*]	142.37 $\pm$ 3.47 [*]
	lncRNA CRNDE-siRNA 组	276.83 $\pm$ 14.63 [*]	72.35 $\pm$ 3.47 [*]	43.72 $\pm$ 5.73 [*]
TPC-1	Ctrl 组	412.31 $\pm$ 19.83	100.37 $\pm$ 4.83	99.83 $\pm$ 4.38
	lncRNA CRNDE OE 组	487.23 $\pm$ 32.34 [*]	138.67 $\pm$ 4.87 [*]	154.73 $\pm$ 5.47 [*]
	lncRNA CRNDE-siRNA 组	346.72 $\pm$ 16.87 [*]	73.46 $\pm$ 4.87 [*]	65.43 $\pm$ 3.23 [*]

注:与 Ctrl 组比较,^{*} $P<0.05$ 。

2.3 lncRNA CRNDE 对 PTC 细胞凋亡的影响 流式细胞术结果显示,与 Ctrl 组相比,lncRNA CRNDE OE 组 BCPAP 和 TPC-1 细胞凋亡率(27.65% $\pm$ 2.31% *vs.* 16.72% $\pm$ 1.78%,29.87% $\pm$ 1.69% *vs.* 18.73% $\pm$ 2.11%)显著降低($P<0.05$),而 lncRNA CRNDE siRNA 组的 BCPAP 和 TPC-1 细胞凋亡率(44.86% $\pm$ 1.28% *vs.* 46.28% $\pm$ 2.31%)显著升高,差异均有统计学意义($P<0.01$)。

2.4 lncRNA CRNDE 对 PTC 细胞 EMT 相关蛋白表达的影响 Western blot 结果显示,与 Ctrl 组相比,lncRNA CRNDE OE 组 BCPAP 和 TPC-1 细胞中上皮标志物 E-cadherin 蛋白表达减少,而间充质标志物 N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达升高;lncRNA

CRNDE siRNA 组细胞中 E-cadherin 蛋白表达增多,而 N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 1、表 2。

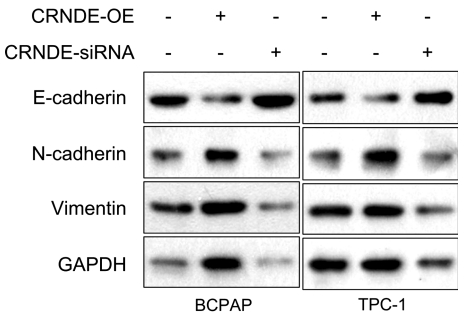


图 1 PTC 细胞中 E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 蛋白水平条带图

表 2 各组 EMT 相关蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)				
细胞	组别	E-cadherin	N-cadherin	Vimentin
BCPAP	Ctrl 组	1.02 $\pm$ 0.16	1.01 $\pm$ 0.06	0.96 $\pm$ 0.12
	lncRNA CRNDE OE 组	0.58 $\pm$ 0.07 [*]	2.76 $\pm$ 0.11 [*]	2.57 $\pm$ 0.04 [*]
	lncRNA CRNDE-siRNA 组	1.89 $\pm$ 0.16 [*]	0.67 $\pm$ 0.08 [*]	0.65 $\pm$ 0.05 [*]
TPC-1	Ctrl 组	1.03 $\pm$ 0.08	1.02 $\pm$ 0.03	1.02 $\pm$ 0.04
	lncRNA CRNDE OE 组	0.33 $\pm$ 0.05 [*]	2.45 $\pm$ 0.08 [*]	3.08 $\pm$ 0.34 [*]
	lncRNA CRNDE-siRNA 组	2.76 $\pm$ 0.27 [*]	0.51 $\pm$ 0.03 [*]	0.11 $\pm$ 0.02 [*]

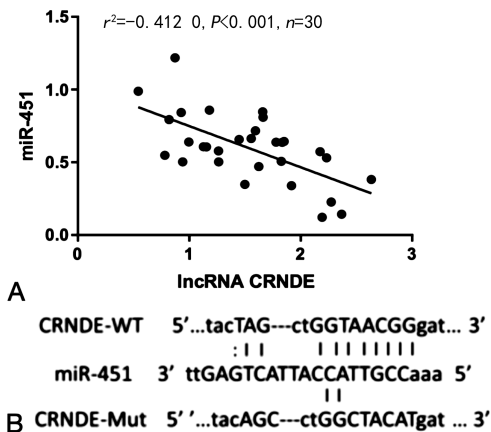
注:与 Ctrl 组比较,^{*} $P<0.05$ 。

2.5 miR-451 在 PTC 癌及癌旁组织和细胞系中的表达比较 与癌旁组织相比,PTC 癌组织中 miR-451 的表达显著降低(0.98 $\pm$ 0.26 *vs.* 0.62 $\pm$ 0.24),差异有统计学意义($P<0.001$)。与 Nthy-ori-1 细胞,BCPAP 和 TPC-1 细胞中 miR-451 表达水平(1.02 $\pm$ 0.03 *vs.* 0.43 $\pm$ 0.04,0.41 $\pm$ 0.03)显著降低,差异有统计学意义($P<0.001$)。

2.6 lncRNA CRNDE 与 miR-451 靶向关系验证 二元 Logistic 回归分析发现 PTC 癌组织中 lncRNA CRNDE 和 miR-451 表达呈负相关($r^2=-0.412$, $P<0.001$,图 2A)。在线生物信息学网站(Tar-

getScan)预测显示,miR-451 与 lncRNA CRNDE 存在可能的结合位点(图 2B)。qRT-PCR 结果显示,与 Ctrl 组相比,lncRNA CRNDE OE 组 BCPAP 和 TPC-1 细胞中 miR-451 表达显著下调(1.03 $\pm$ 0.17 *vs.* 0.37 $\pm$ 0.03,1.06 $\pm$ 0.22 *vs.* 0.41 $\pm$ 0.07),差异有统计学意义($P<0.01$)。双荧光素酶报告基因结果发现,在 BCPAP 细胞中,与单独转染 lncRNA CRNDE-WT 的细胞相比,同时转染 lncRNA CRNDE-WT 和 miR-451 mimic 的细胞荧光素酶活性降低(0.32 $\pm$ 0.07 *vs.* 1.03 $\pm$ 0.04),差异有统计学意义($P<0.05$),同时转染 lncRNA CRNDE-WT 和

miR-451 inhibitor 的细胞荧光素酶活性升高(1.33 ± 0.05),差异均有统计学意义($P < 0.001$);而共转染 lncRNA CRNDE Mut 和 miR-451-NC, lncRNA CRNDE Mut 和 miR-451 mimic, lncRNA CRNDE Mut 和 miR-451 inhibitor 的细胞的荧光素酶活性($1.08 \pm 0.11, 1.04 \pm 0.09, 0.99 \pm 0.06$)与单独转染 lncRNA CRNDE-WT 细胞相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注:A为PTC癌旁组织中miR-451和lncRNA CRNDE表达的相关性分析;B为miR-451和lncRNA CRNDE核苷酸序列的互补结合位点。

图2 lncRNA CRNDE与miR-451靶向关系验证

3 讨论

PTC患者总体预后较为良好,5年生存率超过95%,但部分PTC具有较高的侵袭性和致命性,10%~15%的患者可出现远处转移、复发或放射性碘治疗不敏感^[2],这种侵袭性行为已被归因于不同的组织学亚型和/或临床病理特征,是一种独立的预后标准。寻找那些能够揭示患者疾病风险水平的生物标志物,不仅对于制定针对性的治疗方案至关重要,而且对于患者如何进行长期管理及他们的整体预后评估同样具有关键的临床意义。

多种非编码RNA的异常表达是PTC的重要分子特征,主要包括miRNA和lncRNA,已被证实可作为癌症相关调节因子,并具有成为预后生物标志物的重要潜力^[3]。众多研究成果揭示了lncRNA在多种肿瘤细胞生物学活动中扮演的关键角色^[6],能够通过调控肿瘤细胞的生命周期,促进肿瘤的侵袭和转移以及抵抗化疗药物等方面均发挥调控作用,其功能与传统的致癌基因或抑癌基因相似。研究发现,失调的lncRNA通过在与蛋白质、miRNA或mRNA相互作用过程中充当向导、支架或分子海绵,形成复杂的信号调控网络,从而在PTC的发生发展中发挥关键作用^[7-8]。lncRNA CRNDE是一种致癌lncRNA,最初在结直肠癌和腺癌中被发现,并且在多种类型的癌症中表达上调。近期多项基础研究证实,lncRNA CRNDE表达上调与癌细胞的恶性表型相关。例如,

ZHU等^[9]发现,lncRNA CRNDE可通过miR-451a/CDKN2D轴促进胰腺癌的进展和血管新生。LI等^[10]发现,lncRNA CRNDE在非小细胞肺癌组织和细胞系中高度表达,沉默lncRNA CRNDE能够通过介导miR-455-3p/HDAC2轴抑制非小细胞肺癌进展。REN等^[11]研究显示,lncRNA CRNDE可通过调控miR-4262/ZEB1轴促进宫颈癌细胞增殖、EMT、迁移和侵袭。与这些研究结果类似,本研究发现lncRNA CRNDE在PTC组织和细胞系中表达上调,lncRNA CRNDE过表达可促进PTC细胞株BCPCP和TPC-1的增殖、侵袭和迁移,并抑制细胞凋亡。这些结果提示,lncRNA CRNDE在PTC的恶性进展中发挥重要作用,可能是临床PTC的一个潜在预后标志物和治疗靶点。

恶性肿瘤的转移被认为是肿瘤细胞通过EMT获得间质特性从原发部位向远处转移的过程^[12]。在这一过程中,肿瘤细胞逐渐失去上皮细胞特性,而获得间质细胞特性,具有更强的迁移和运动能力,最终导致肿瘤细胞的增殖和转移。目前已经证实,EMT关键蛋白E-cadherin、N-cadherin和Vimentin介导了细胞间黏附,在多种恶性肿瘤中扮演关键角色,其表达高低可判定EMT的进展。DING等^[13]研究发现,lncRNA CRNDE可通过上调E-cadherin表达并减少N-cadherin和Vimentin表达促进骨肉瘤细胞EMT。ZHANG等^[14]发现,lncRNA CRNDE可通过调控miR-136-5p抑制肾癌细胞活力和EMT。本研究结果显示,lncRNA CRNDE过表达后,E-cadherin表达增加而N-cadherin和Vimentin表达减少,提示lncRNA CRNDE过表达可调控EMT相关蛋白表达,促进细胞从上皮表型向间充质表型的转化。

在lncRNA参与肿瘤发生发展调控的多项机制中,lncRNA与miRNA靶向结合是目前研究最广泛的机制之一。多项比较基因组学分析和高通量实验研究表明,miRNA与转录本的结合是多元而复杂的,一个miRNA可能与mRNA、lncRNA、circRNA之间存在数百个结合位点,构成错综复杂的ceRNA网络,这也是近年来的研究热点,ceRNA网络中RNA相互作用有助于在转录后水平调控多种病理生理过程^[15]。miR-451位于染色体17q11.2位置上,在乳腺癌、肺癌、胃癌、肾细胞癌和白血病等多种癌症中表达下调,参与调控肿瘤细胞的增殖、凋亡、转移、血管生成、EMT和耐药性等,被认为是一种肿瘤抑制因子^[16]。LIU等^[17]发现,miR-451可通过靶向IL-6R/STAT3/VEGF通路抑制肝癌血管增殖。此外,miR-451的异常表达能够降低间质细胞标志物如N-cadherin和vimentin表达,提高上皮标志物如E-cadherin的表达,在肿瘤起始、生长、发展和进展的不同阶段均有重要

的作用^[18]。临床研究显示,甲状腺癌中 miR-451 表达下调,且与淋巴结转移有关,有希望用于指导手术范围的选择^[19]。本研究发现,在 PTC 组织中,miR-451 表达上调,并与 lncRNA CRNDE 表达呈负相关,提示 miR-451 和 lncRNA CRNDE 可能存在联系。为了进一步探究 lncRNA CRNDE 促进 PTC 恶性进展的机制,本研究利用在线生物信息分析和双荧光素酶报告基因实验证明了二者存在靶向结合位点,同时过表达 lncRNA CRNDE 能够抑制 miR-451 表达,说明 lncRNA CRNDE 靶向结合并负调控 miR-451 的表达,从而发挥生物学作用。

本研究因时间限制,还存在诸多不足,例如,本研究的临床标本量尚不充分,miR-451 的表达对 lncRNA CRNDE 是否存在反向调控还暂不清楚,关于 miR-451 的下游调控元件也需进一步寻找和实验验证。

综上所述,PTC 中 lncRNA CRNDE 表达显著增加,沉默 lncRNA CRNDE 能抑制甲状腺癌细胞增殖、侵袭、迁移和 EMT 并诱导细胞凋亡,其关键分子机制可能是通过靶向负调控 miR-451 表达有关,可能有助于临床 PTC 诊断和治疗工具的开发。

参考文献

- [1] BOUCAI L, ZAFEREO M, CABANILLAS M E. Thyroid cancer: a review[J]. JAMA, 2024, 331(5): 425-435.
- [2] RUIZ-POZO V A, CADENA-ULLAURI S, GUEVARA-RAMÍREZ P, et al. Differential microRNA expression for diagnosis and prognosis of papillary thyroid cancer[J]. Front Med (Lausanne), 2023, 10: 1139362.
- [3] CHI Y, WANG D, WANG J, et al. Long non-coding RNA in the pathogenesis of cancers[J]. Cells, 2019, 8(9): 1015.
- [4] GHAFOURI-FARD S, SAFARZADEH A, HUSSEN B M, et al. Contribution of CRNDE lncRNA in the development of cancer and the underlying mechanisms[J]. Pathol Res Pract, 2023, 244: 154387.
- [5] YAKUSHINA V D, STRELNIKOV V V, TANAS A S, et al. Long noncoding RNA landscapes specific to benign and malignant thyroid neoplasms of distinct histological subtypes[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 16728.
- [6] 侯丽杰, 马承旭, 王晶宇, 等. LncRNA(HOTAIR)/miR-206/TAGLN2 信号轴调控甲状腺乳头状癌细胞的侵袭[J]. 基础医学与临床, 2023, 43(11): 1642-1647.
- [7] 袁宁, 王晓娟, 白亚君, 等. LncRNA LINC00958 通过靶向 miR-490-3p 促进甲状腺乳头状癌细胞增殖、侵袭和迁移[J]. 现代肿瘤医学, 2023, 31(10): 1785-1793.
- [8] 王明政, 金妙妙, 宋佳璐, 等. 过表达 lncRNA HCG18 调控 miR-107/CDKN2B 轴对甲状腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的机制研究[J]. 广东医学, 2023, 44(3): 312-319.
- [9] ZHU H Y, GAO Y J, WANG Y, et al. LncRNA CRNDE promotes the progression and angiogenesis of pancreatic cancer via miR-451a/CDKN2D axis[J]. Transl Oncol, 2021, 14(7): 101088.
- [10] LI N, CHEN X J, ZENG Y H, et al. Silencing of lncRNA CRNDE attenuates nonsmall-cell lung cancer progression by mediating the miR-455-3p/HDAC2 axis[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2022, 38(8): 749-760.
- [11] REN L, YANG S, CAO Q, et al. CRNDE contributes cervical cancer progression by regulating miR-4262/ZEB1 axis[J]. Onco Targets Ther, 2021, 14: 355-366.
- [12] HUANG Y, HONG W, WEI X. The molecular mechanisms and therapeutic strategies of EMT in tumor progression and metastasis[J]. J Hematol Oncol, 2022, 15(1): 129.
- [13] DING Q, MO F, CAI X, et al. LncRNA CRNDE is activated by SP1 and promotes osteosarcoma proliferation, invasion, and epithelial-mesenchymal transition via Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. J Cell Biochem, 2020, 121(5-6): 3358-3371.
- [14] ZHANG Y, LAN X, WANG Y, et al. CRNDE mediates the viability and epithelial-mesenchymal transition of renal cell carcinoma via miR-136-5p[J]. J Recept Signal Transduct Res, 2021, 41(3): 234-244.
- [15] BALLANTYNE M D, MCDONALD R A, BAKER A H. LncRNA/MicroRNA interactions in the vasculature[J]. Clin Pharmacol Ther, 2016, 99(5): 494-501.
- [16] BAI H, WU S. miR-451: a novel biomarker and potential therapeutic target for cancer[J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 11069-11082.
- [17] LIU X, ZHANG A, XIANG J, et al. miR-451 acts as a suppressor of angiogenesis in hepatocellular carcinoma by targeting the IL-6R-STAT3 pathway[J]. Oncol Rep, 2016, 36(3): 1385-1392.
- [18] KHORDADMEHR M, JIGARI-ASL F, EZZATI H, et al. A comprehensive review on miR-451: a promising cancer biomarker with therapeutic potential[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(12): 21716-21731.
- [19] DUAN Y, ZHANG Y, PENG W, et al. MiR-7-5p and miR-451 as diagnostic biomarkers for papillary thyroid carcinoma in formalin-fixed paraffin-embedded tissues[J]. Pharmazie, 2020, 75(6): 266-270.

(收稿日期: 2024-01-12 修回日期: 2024-07-12)