

miR-100-5p 对甲状腺癌细胞增殖与凋亡调控作用的实验研究

张廷华^{1a}, 胡友元^{1b}, 袁博² (1. 怀化市第二人民医院 a. 检验科; b. 病理科, 湖南怀化 418000; 2. 南方科技大学医院检验科, 广东深圳 518055)

摘要: **目的** 通过实验探讨微小核糖核酸 (microRNA, miR) -100-5p 在甲状腺癌细胞中的表达情况及其对细胞增殖与凋亡的调控作用。**方法** 使用荧光定量 PCR 检测 miR-100-5p 在甲状腺癌细胞系 (TPC-1, KTC-1) 与甲状腺正常细胞系 (Nthy-ori3-1) 中的相对表达情况。TPC-1 细胞分别转染 miR-100-5p 模拟物 (miR-100-5p mimic)、抑制物 (miR-100-5p inhibitor) 及相应阴性对照 (miR-mimic NC, miR-inhibitor NC) 后, 用 CCK-8 检测 TPC-1 细胞增殖情况, 流式细胞仪检测 TPC-1 细胞凋亡情况。通过 miRTarBase 和 TargetScan7.2 数据库对 miR-100-5p 的靶基因进行预测和功能富集分析, 用蛋白印迹实验与双荧光素酶报告基因实验验证 miR-100-5p 对成纤维细胞生长因子受体 3 (fibroblast growth factor receptor 3, FGFR3) 的靶向调控作用。**结果** 与 Nthy-ori3-1 细胞相比, miR-100-5p 在 TPC-1 细胞中表达水平 (1.87 ± 0.03 vs 1.00 ± 0.03) 与 KTC-1 细胞中表达水平 (6.33 ± 0.47 vs 1.00 ± 0.03) 均上调, 差异具有统计学意义 ($t=-34.220, -19.588$, 均 $P<0.05$)。转染 miR-100-5p mimic 组在 24, 48, 72h 细胞 450nm 吸光度 (A_{450nm}) 均高于 miR-mimic NC 组, 差异具有统计学意义 ($t=-7.516, -17.828, -8.445$, 均 $P<0.05$); 转染 miR-100-5p inhibitor 组在 24, 48, 72h A_{450nm} 均低于 miR-inhibitor NC 组, 差异具有统计学意义 ($t=6.720, 6.782, 6.073$, 均 $P<0.05$)。与 miR-mimic NC 组相比, 转染 miR-100-5p mimic 后凋亡率 ($7.43\% \pm 0.49\%$ vs $10.55\% \pm 0.80\%$) 下降 ($t=5.767, P=0.004$), 与 miR-inhibitor NC 组相比, 转染 miR-100-5p inhibitor 后凋亡率 ($3.19\% \pm 0.22\%$ vs $2.64\% \pm 0.15\%$) 上升 ($t=-3.606, P=0.023$), 差异均有统计学意义。蛋白印迹实验显示, 与 miR-mimic NC 组相比, FGFR3 在 miR-100-5p mimic 组蛋白表达水平 (0.78 ± 0.12 vs 1.00 ± 0.00) 下调 ($t=3.071, P=0.037$), 与 miR-inhibitor NC 组相比, FGFR3 在 miR-100-5p inhibitor 组蛋白表达水平 (1.17 ± 0.07 vs 1.00 ± 0.00) 上升 ($t=-4.509, P=0.046$), 差异均有统计学意义。与 miR-mimic NC 相比, miR-100-5p mimic 没有降低 FGFR3 3'UTR 野生型组荧光素酶活性 (1.01 ± 0.17 vs 1.00 ± 0.00) 与突变型组荧光素酶活性 (0.99 ± 0.11 vs 1.00 ± 0.00), 差异无统计学意义 ($t=-0.057, 0.181, P=0.96, 0.873$)。**结论** miR-100-5p 在甲状腺癌细胞中表达上调, 可促进甲状腺癌细胞增殖、抑制细胞凋亡, 其可能成为甲状腺癌诊疗中新生物标志物与调控靶点。

关键词: 微小核糖核酸 -100-5p; 甲状腺癌; 细胞增殖; 细胞凋亡

中图分类号: R736.1; R730.43 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2024) 04-056-07

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2024.04.011

Experimental Study on the Regulatory Effects of miR-100-5p on Proliferation and Apoptosis of Thyroid Cancer Cells

ZHANG Tinghua^{1a}, HU Youyuan^{1b}, YUAN Bo²

(1a. Department of Clinical Laboratory; 1b. Department of Pathology Laboratory, the Second People's Hospital of Huaihua City, Hunan Huaihua 418000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Southern University of Science and Technology Hospital, Guangdong Shenzhen 518055, China)

Abstract: **Objective** To explore the expression of microRNA (miR) -100-5p in thyroid cancer cells and its regulatory effects on cell proliferation and apoptosis through experiments. **Methods** The relative expressions of miR-100-5p in thyroid cancer cell lines (TPC-1 and KTC-1) and normal thyroid cell lines (Nthy ori3-1) were detected using fluorescence quantitative PCR. After transfection of miR-100-5p mimic, miR-100-5p inhibitor, and corresponding negative controls (miR-mimic NC, miR-inhibitor NC) into TPC-1 cells, the proliferation condition of TPC-1 cells was detected using CCK-8, and the apoptosis condition of TPC-1 cells was detected using flow cytometry. Prediction and functional enrichment analysis of target genes of miR-100-5p were performed using the miRTarBase and TargetScan7.2 databases. The targeted regulatory effect of miR-100-5p on fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) was validated using Western blot and dual luciferase reporter gene experiments. **Results** Compared

基金项目: 怀化市科技计划项目 (2021R3113)。

作者简介: 张廷华 (1989-), 男, 硕士, 副主任技师, 研究方向: 肿瘤分子诊断, E-mail: zth19890820@163.com。

通讯作者: 袁博 (1988-), 男, 硕士, 主管技师, 研究方向: 肿瘤分子诊断, E-mail: 503309099@qq.com。

with Nthy-ori3-1 cells, the expression levels of miR-100-5p in TPC-1 cells (1.87 ± 0.03 vs 1.00 ± 0.03) and KTC-1 cells (6.33 ± 0.47 vs 1.00 ± 0.03) were both up-regulated, with significant differences ($t=-34.220, -19.588$, all $P<0.05$). The 450nm absorbance (A_{450nm}) of cells transfected with miR-100-5p mimic at 24, 48 and 72 h were higher than the miR-mimic NC group, with significant differences ($t=-7.516, -17.828, -8.445$, all $P<0.05$). Conversely, the A_{450nm} values of cells transfected with miR-100-5p inhibitor at 24, 48 and 72 h were lower than the miR-inhibitor NC group, with significant differences ($t=6.720, 6.782, 6.073$, all $P<0.05$). The apoptosis rate after transfection with miR-100-5p mimic was decreased compared to miR-mimic NC group ($7.43\% \pm 0.49\%$ vs $10.55\% \pm 0.80\%$), with significant differences ($t=5.767, P=0.004$). Compared to miR-inhibitor NC group, the apoptosis rate after transfection with miR-100-5p inhibitor was increased ($3.19\% \pm 0.22\%$ vs $2.64\% \pm 0.15\%$), with significant differences ($t=-3.606, P=0.023$). Western blot experiments showed that FGFR3 protein expression levels in the miR-100-5p mimic group were down-regulated compared to the miR-mimic NC group (0.78 ± 0.12 vs 1.00 ± 0.00), with significant differences ($t=3.071, P=0.037$). Compared to the miR-inhibitor NC group, FGFR3 protein expression levels in the miR-100-5p inhibitor group were up-regulated (1.17 ± 0.07 vs 1.00 ± 0.00), with significant differences ($t=-4.509, P=0.046$). There was no significant difference in the luciferase activity of the FGFR3 wild-type (1.01 ± 0.17 vs 1.00 ± 0.00) and mutant groups (0.99 ± 0.11 vs 1.00 ± 0.00) between miR-100-5p mimic and miR-mimic NC, and the differences were statistically significant ($t=-0.057, 0.181, P=0.96, 0.873$). **Conclusion** MiR-100-5p in thyroid cancer cells was up-regulated, which may promote cell proliferation and inhibit apoptosis. It may become a new biomarker and regulatory target in the diagnosis and treatment of thyroid cancer.

Keywords: microRNA-100-5p; thyroid cancer; cell proliferation; cell apoptosis

甲状腺癌是人类最常见的内分泌恶性肿瘤, 其中甲状腺乳头状癌 (papillary thyroid cancer, PTC) 是最常见的病理类型。甲状腺癌近年来的发病增长率正在逐年上升, 且发病年龄呈年轻化趋势^[1]。微小核糖核酸 (microRNA, miRNA, miR) 是一类短小的非编码 RNA, 约含有 22 个核苷酸, 可通过识别同源序列并干扰转录、翻译或表观遗传过程来调节基因表达。随着分子生物信息学的发展, 越来越多的 miRNA 被发现与甲状腺癌的发生相关^[2]。多数 miRNA 在甲状腺癌中表达失调, 且 miRNA 在甲状腺癌的筛查诊断、调控治疗、预后发展中发挥关键作用^[3]。miRNA 被认为是甲状腺癌新的诊断和治疗工具^[4]。miR-100 被认为是最古老的动物 miRNA, 是 miR-99 家族成员之一, 进化十分保守, 存在日期早于两栖动物, 它在人类癌症中的作用可能是肿瘤抑制因子或者肿瘤促进因子^[5]。miR-100 在人类多种癌症中表达严重失调, 在细胞代谢、周期、迁移、上皮间质转化、分化等方面发挥着重要作用, 其表达失调还与癌症的诊断与预后密切相关^[6]。对 miR-100 的研究较为充分, 已发现 miR-100 在食管鳞癌、结直肠癌、乳腺癌和鼻咽癌中发挥抗肿瘤作用, 在肝细胞癌中也观察到 miR-100 的抗肿瘤作用^[7]。然而, 关于 miR-100-5p 在甲状腺癌中的报道很少见, 本研究通过荧光定量 PCR 实验、细胞增殖与凋亡实验、靶基因的预测与分析, 探讨 miR-100-5p 在甲状腺癌细胞中的表达情况及其调控作用。

1 材料与方法

1.1 细胞来源 Nthy-ori3-1 细胞 (人甲状腺正常细

胞系) 来源于上海沪震实业有限公司, TPC-1 细胞 (人甲状腺癌细胞系) 来源于湖南丰晖生物公司, KTC-1 细胞 (人甲状腺癌细胞系) 来源于武汉普诺赛公司。

1.2 仪器与试剂 TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂 (北京天根生化科技有限公司, 批号 Y2115, 有效期至 2025-05-14), RevertAid 反转录酶 EP0442 (美国 Thermo Scientific 公司, 批号 91254552, 有效期至 2025-09), 荧光定量 PCR 检测试剂 PerfectStart Green qPCR SuperMix AQ602 (北京全式金公司, 批号 R30911, 有效期至 2025-10-16), CCK-8 试剂 C0039 (上海碧云天公司, 批号 061223231019, 有效期至 2025-10-19), Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒 640914 (北京 Biolegend 公司, 批号 B393527, 有效期至 2025-07-15), 双荧光素酶检测试剂盒 E1910 (北京 Promega 公司, 批号 0000587212, 有效期至 2026-05-07), 荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司), 多功能酶标仪 ELx800 (美国 BIOTEK 公司), 流式细胞仪 (美国 Beckman 公司), 化学发光仪 ClineXChemiScope 6000 (上海勤翔公司), Lux-T020 高灵敏度管式发光检测仪 (广州博鹭腾公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养: Nthy-ori3-1, TPC-1, KTC-1 三种细胞均用含 10g/dl 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养, 培养条件为 37℃, 5ml/dl CO₂。

1.3.2 细胞转染: 使用 Lipofectamine 2000 对 TPC-1 细胞分别进行 miR-100-5p 模拟物 (miR-100-5p mimic)、模拟物阴性对照 (miR-mimic NC)、

miR-100-5p 抑制物 (miR-100-5p inhibitor)、抑制物阴性对照 (miR-inhibitor NC) 转染, 转染后细胞继续置于 37℃ 的 5ml/dl CO₂ 培养箱中培养。

1.3.3 miR-100-5p 荧光定量 PCR 检测: 在细胞中加入 TRNzol 总 RNA 提取试剂进行总 RNA 提取。使用 RevertAid 反转录酶将总 RNA 按 42℃, 60 min, 70℃, 10 min 逆转录为 cDNA。miR-100-

表 1 miR-100-5p 与 U6 引物序列

基 因	引物类型	引物序列
U6	上游引物	5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'
	下游引物	5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
miRNA	通用下游引物	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'
miR-100-5p	茎环逆转录引物	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGTCGAGGTATTCGACTGGATACGACCACAAG-3'
	上游引物	5'-GCCGAGAACCCGTAGATCCGAA-3'

1.3.4 CCK-8 检测细胞增殖: 对 TPC-1 细胞分别转染 miR-100-5p mimic, miR-mimic NC, miR-100-5p inhibitor, miR-inhibitor NC, 转染后继续培养 1~3 天, 用 CCK-8 试剂检测细胞增殖情况, 使用多功能酶标仪检测每个孔 450nm 处的吸光度 (A_{450nm})。

1.3.5 细胞凋亡检测: 对 TPC-1 细胞分别转染 miR-100-5p mimic, miR-mimic NC, miR-100-5p inhibitor, miR-inhibitor NC, 细胞转染 72h 后, 用 Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒在流式细胞仪上检测细胞凋亡率。

1.3.6 miR-100-5p 靶基因的预测及其功能富集分析: 用在线数据库 miRTarBase (https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/~miRTarBase/miRTarBase_2019/php/index.php) 与 TargetScan7.2 (https://www.targetscan.org/vert_72/) 分别预测 miR-100-5p 靶基因, 用韦恩图取二者交集得到预测靶基因。使用 DAVID Bioinformatics Resources 6.8(<https://david.ncifcrf.gov/>) 数据库对靶基因分别进行功能基因本体论 (GO) 富集分析和京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 途径富集分析。在数据库 TargetScan7.2 中查询 miR-100-5p 与目标靶基因 FGFR3 的结合位点。使用在线数据库网站 GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/index.html>) 分析目标靶基因 FGFR3 在甲状腺癌中表达的情况, 在数据库网站 Kaplan-Meier Plotter (<http://kmplot.com/>) 中分析 miR-100-5p 与目标靶基因 FGFR3 在甲状腺癌中的预后情况。

1.3.7 蛋白印迹实验: 用 RIPA 裂解液处理细胞, 然后用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白浓度测定, 电泳分离后转至 PVDF 膜上进行抗体孵育, 在避光环境下用化学发光仪 ClinxChemiScope 6000 进行成像分析。

1.3.8 双荧光素酶报告基因实验: 以质粒 psiCHECK 2 为骨架载体, 在位点选择 Xho I 与 Not

5p 特异性茎环逆转录引物用于合成 miR-100-5p 的第一链 cDNA。用荧光定量试剂 PerfectStart Green qPCR SuperMix 进行荧光定量 PCR 检测。PCR 反应条件: 94℃ 30s, 1 个循环; 94℃ 5s, 60℃ 15s, 72℃ 10s, 40 个循环。以 U6 为内参, 实验完成后, 通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析相对表达量, miR-100-5p 与 U6 上下游引物见表 1。

I 插入目标基因 FGFR3, 构建 FGFR3 双荧光素酶野生型载体 FGFR3-WT-psiCHECK 2 和突变型载体 FGFR3-MUT-psiCHECK 2。实验共分为四个组: FGFR3-WT 与 miR-mimic NC 组, FGFR3-WT 与 miR-100-5p mimic 组, FGFR3-MUT 与 miR-mimic NC 组, FGFR3-MUT 与 miR-100-5p mimic 组。用 Lipofectamine 2000 转染 TPC-1 细胞, 转染 48h 后, 收集细胞用双荧光素酶检测试剂盒中的试剂进行裂解, 在 Lux-T020 高灵敏度管式发光检测仪上测量荧光素酶活性。

1.4 统计学分析 本研究所得数据经检验符合正态分布的用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 并使用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析。两组间差异分析采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-100-5p 在甲状腺癌细胞中表达上调 荧光定量 PCR 检测发现, 与 Nthy-ori3-1 细胞相比, miR-100-5p 在 TPC-1 细胞中表达水平 (1.87 ± 0.03 vs 1.00 ± 0.03) 与 KTC-1 细胞中表达水平 (6.33 ± 0.47 vs 1.00 ± 0.03) 均上调, 差异具有统计学意义 ($t = -34.220, -19.588$, 均 $P < 0.05$)。

2.2 细胞转染后效率检测 与转染 miR-mimic NC 相比, TPC-1 细胞转染 miR-100-5p mimic 后, miR-100-5p 表达水平 (31.52 ± 4.85 vs 1.00 ± 0.06) 上调 ($t = -10.892, P = 0.008$), 与转染 miR-inhibitor NC 相比, TPC-1 细胞转染 miR-100-5p inhibitor 后, miR-100-5p 表达水平 (0.09 ± 0.00 vs 1.00 ± 0.03) 下调, ($t = 58.659, P < 0.001$), 差异具有统计学意义。

2.3 miR-100-5p 促进 TPC-1 细胞的增殖 见表 2。在 TPC-1 细胞中分别转染 miR-100-5p mimic, miR-mimic NC, miR-100-5p inhibitor 和 miR-inhibitor NC, 转染后 0~72h 用 CCK-8 检测细胞 450nm 吸光

度(A_{450nm}), 转染 miR-100-5p mimic 组在 24, 48, 72h A_{450nm} 均高于 miR-mimic NC 组, 差异具有统计学意义(均 $P<0.05$), 转染 miR-100-5p inhibitor 组

在 24, 48, 72h A_{450nm} 均低于 miR-inhibitor NC 组, 差异具有统计学意义(均 $P<0.05$)。以上结果表明 miR-100-5p 促进 TPC-1 细胞的增殖。

表 2 miR-100-5p 对甲状腺癌细胞增殖的影响 (A_{450nm} , $\bar{x} \pm s$)

时间 (h)	miR-mimic NC	miR-100-5p mimic	<i>t</i>	<i>P</i>	miR-inhibitor NC	miR-100-5p inhibitor	<i>t</i>	<i>P</i>
0	0.47 ± 0.01	0.48 ± 0.01	-1.096	0.335	0.62 ± 0.01	0.62 ± 0.00	-0.068	0.949
24	0.85 ± 0.02	1.01 ± 0.03	-7.516	0.002	1.20 ± 0.03	1.01 ± 0.04	6.720	0.003
48	1.08 ± 0.00	1.37 ± 0.03	-17.828	0.003	1.62 ± 0.05	1.34 ± 0.05	6.782	0.002
72	1.79 ± 0.01	1.89 ± 0.02	-8.445	0.001	1.64 ± 0.06	1.41 ± 0.03	6.073	0.004

2.4 miR-100-5p 抑制 TPC-1 细胞凋亡 TPC-1 细胞分别转染 miR-100-5p mimic, miR-mimic NC, miR-100-5p inhibitor 和 miR-inhibitor NC, 72h 后用流式细胞仪检测细胞凋亡率。与 miR-mimic NC 组相比, 转染 miR-100-5p mimic 后凋亡率 ($7.43\% \pm 0.49\%$ vs $10.55\% \pm 0.80\%$) 下降 ($t=5.767$, $P=0.004$); 与 miR-inhibitor NC 组相比, 转染 miR-100-5p inhibitor 后凋亡率 ($3.19\% \pm 0.22\%$ vs $2.64\% \pm 0.15\%$) 上升 ($t=-3.606$, $P=0.023$), 差异均有统计学意义。以上结果表明 miR-100-5p 抑制 TPC-1 细胞的凋亡。

2.5 miR-100-5p 靶基因的预测及其功能富集分析 用数据库 miRTarBase 与 TargetScan7.2 预测 miR-100-5p 的靶基因分别为 251 个与 59 个, 用韦恩图取二者交集得到 17 个共同预测靶基因 (图 1A), 分别为 HS3ST2, CTDSPL, THAP2, KBTBD8, FKBP5, FGFR3, SMARCA5, HOXA1, MTOR, TMEM30A, TRIB1, ZBTB7A, ZNRF2, GRHL1, PPP1CB, BMPR2 和 IGF1R。用 DAVID 6.8 数据库对 17 个预测靶基因进行 GO 功能和 KEGG

通路分析 (见表 3), 靶基因 GO 功能生物学过程主要富集类型有多细胞生物的发展、动脉发育、蛋白质自磷酸化等; 细胞成分富集类型有细胞核、受体复合物、细胞内膜结合细胞器; 分子功能富集类型有 ATP 结合、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性。KEGG 通路分析主要富集的通路有调节干细胞多能性的信号通路、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性、癌症中的蛋白聚糖等。在数据库 TargetScan7.2 中查询 miR-100-5p 与预测靶基因 FGFR3 的结合位点见图 1B。用数据库 GEPIA 网站分析发现, 基于 TCGA 数据和 GTEx 数据, 靶基因 FGFR3 在甲状腺癌组织中表达下调 ($P<0.05$) (图 1C)。在数据库 Kaplan-Meier Plotter 网站中分析发现, miR-100-5p 在甲状腺癌患者总生存期 (OS) 预后分析中为高风险因素, 风险比 (HR) 大于 1 ($P<0.05$) (图 1D), 目标靶基因 FGFR3 在甲状腺癌患者无复发生存期 (RFS) 预后分析中为低风险因素, HR 小于 1 ($P<0.05$) (图 1E)。以上表明 miR-100-5p 与 FGFR3 可能存在靶向调控作用。

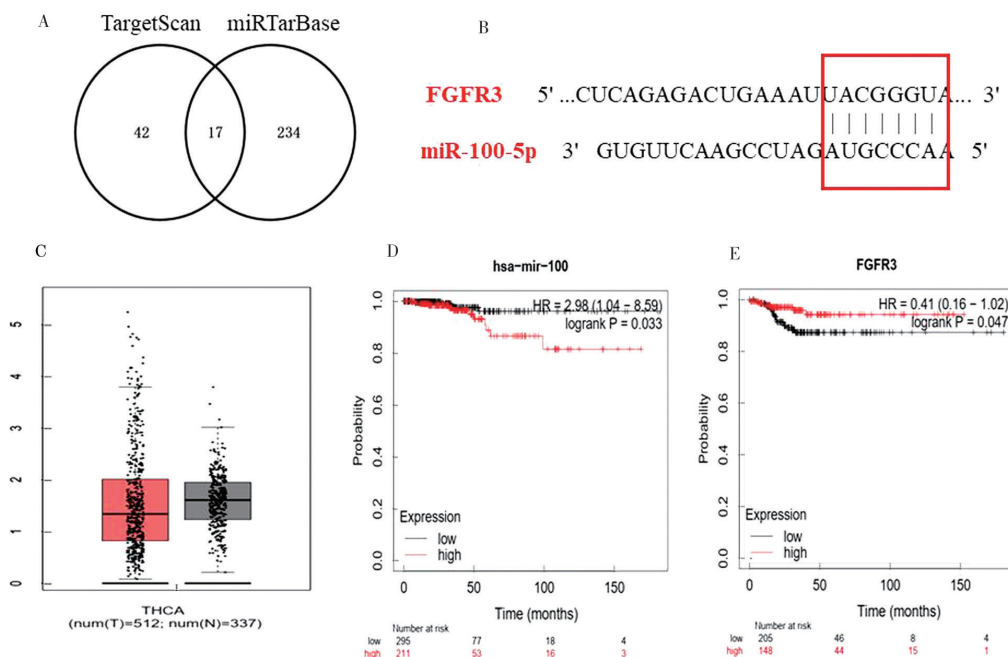


图 1 miR-100-5p 与预测靶基因 FGFR3 数据库分析

表3 miR-100-5p 靶基因 GO 功能和 KEGG 通路分析

类别	类型	描述	P 值
GO_BP (生物学过程)	GO:0007275	多细胞生物的发展	0.005
GO_BP (生物学过程)	GO:0060840	动脉发育	0.008
GO_BP (生物学过程)	GO:0046777	蛋白质自磷酸化	0.008
GO_BP (生物学过程)	GO:0045945	RNA 聚合酶 III 启动子转录的正调控	0.015
GO_BP (生物学过程)	GO:0048662	平滑肌细胞增殖的负调控	0.025
GO_BP (生物学过程)	GO:0006357	RNA 聚合酶 II 启动子转录调控	0.039
GO_BP (生物学过程)	GO:0071363	细胞对生长因子刺激的反应	0.044
GO_BP (生物学过程)	GO:0042752	昼夜节律的调节	0.048
GO_CC (细胞成分)	GO:0005634	细胞核	0.001
GO_CC (细胞成分)	GO:0043235	受体复合物	0.012
GO_CC (细胞成分)	GO:0043231	细胞内膜结合细胞器	0.040
GO_MF (分子功能)	GO:0005524	ATP 结合	0.007
GO_MF (分子功能)	GO:0004714	跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性	0.044
KEGG_PATHWAY (通路)	hsa04550	调节干细胞多能性的信号通路	0.000
KEGG_PATHWAY (通路)	hsa01521	EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性	0.002
KEGG_PATHWAY (通路)	hsa05205	癌症中的蛋白聚糖	0.011
KEGG_PATHWAY (通路)	hsa05206	癌症中的微小 RNA	0.025
KEGG_PATHWAY (通路)	hsa04151	PI3K-Akt 信号通路	0.032

2.6 miR-100-5p 在 TPC-1 细胞中可负向调控 FGFR3
TPC-1 细胞分别转染 miR-100-5p mimic 和 miR-mimic NC, miR-100-5p inhibitor, miR-inhibitor NC 72h 后, 蛋白印迹实验显示, 与 miR-mimic NC 组相比, FGFR3 在 miR-100-5p mimic 组蛋白表达水平 (0.78 ± 0.12 vs 1.00 ± 0.00) 下调 ($t=3.071$, $P=0.037$), 与 miR-inhibitor NC 组相比, FGFR3 在 miR-100-5p inhibitor 组蛋白表达水平 (1.17 ± 0.07 vs 1.00 ± 0.00) 上升 ($t=-4.509$, $P=0.046$), 差异均有统计学意义。以上表明 miR-100-5p 在 TPC-1 细胞中可负向调控 FGFR3。

2.7 FGFR3 在 TPC-1 细胞中不是 miR-100-5p 的直接靶基因
TPC-1 细胞中双荧光素酶报告基因实验显示, 与 miR-mimic NC 相比, miR-100-5p mimic 没有降低 FGFR3 3'UTR 野生型组荧光素酶活性 (1.01 ± 0.17 vs 1.00 ± 0.00) 与突变型组荧光素酶活性 (0.99 ± 0.11 vs 1.00 ± 0.00), 差异无统计学意义 ($t=-0.057$, 0.181 , $P=0.96$, 0.873), 说明 miR-100-5p 与 FGFR3 的 3' UTR 不结合, 或结合后不导致 FGFR3 的 3' UTR 的降解, FGFR3 在 TPC-1 细胞中不是 miR-100-5p 的直接靶基因。

3 讨论

近年来, 甲状腺癌的高发病率给人们带来了沉重的负担。有研究对湖南省 2015~2019 年恶性肿瘤发病与死亡情况进行了分析, 发现该省 2019 年甲状腺癌发病率上升到女性肿瘤发病率的前五名^[8]。甲状腺癌具体的发病机制尚不清楚, 了解和揭示其

发生发展机制, 找到更多特异性分子标志物及治疗靶点对临床诊治意义重大^[9]。miRNA 在人体内分布较为广泛且稳定, 取材便捷, 与甲状腺穿刺确诊方法相比, 可以减少患者的有创操作, 减轻患者经济负担。miRNA 可作为潜在的生物标志物, 用于甲状腺癌诊断与治疗管理^[4]。

本研究发现 miR-100-5p 在甲状腺癌细胞中表达上调。对细胞进行 miR-100-5p mimic, miR-mimic NC, miR-100-5p inhibitor, miR-inhibitor NC 转染后, 发现转染效率良好。miR-100-5p 过表达可促进甲状腺癌细胞增殖, 抑制细胞凋亡。Kaplan-Meier Plotter 网站中显示 miR-100-5p 在甲状腺癌患者总生存期预后分析中为高风险因素, 表明其可能为致癌 miRNA。miR-100 在不同细胞环境中可发挥致癌 miRNA 或抑癌 miRNA 的双重作用^[5], 这主要取决于肿瘤类型与微环境^[10]。miR-100 在乳腺癌细胞^[11]、脊索瘤细胞^[12]、前列腺癌细胞^[13]中作为抑癌 miRNA 发挥重要作用, 是口腔鳞状细胞癌中新的预后生物标志物^[14]。miR-100 与胰腺导管腺癌患者总体生存率和无病生存率降低相关^[15], 也是乳腺癌早期患者的生物标志物^[16], 其基因变异是儿童急性淋巴细胞白血病的保护因子^[17]。作为 miR-100 成熟序列的 miR-100-3p, 有文献首次报道了 miR-100-3p 通过调节肿瘤抑制因子 STK11 在头颈癌中发挥致癌作用^[18]。

miRNA 可对下游靶基因进行调控而发挥重要作用。结合 miR-100-5p 靶基因 GO 功能与 KEGG

通路分析发现, miR-100-5p 的靶基因在细胞中发挥重要的生物学作用, 对 miR-100-5p 进行过表达或抑制将对细胞起到重要的调控作用, 使其与靶基因有望成为重要的生物标志物与治疗靶点。多项研究证实, FGFR3 在骨肉瘤细胞^[19]、非小细胞肺癌细胞^[20]、胶质母细胞瘤细胞^[21]、胰腺癌细胞^[22]中为 miR-100-5p 的直接靶基因。本研究在数据库 TargetScan7.2 中可查到 miR-100-5p 与 FGFR3 的结合位点, GEPIA 网站中显示 FGFR3 在甲状腺癌组织中表达下调, Kaplan-Meier Plotter 网站显示 FGFR3 在甲状腺癌患者无复发生存期预后分析中为低风险因素, 以上数据预测 miR-100-5p 与 FGFR3 可能存在靶向调控作用。经实验证实, miR-100-5p 在甲状腺癌细胞中可以负向调控 FGFR3, 可是 FGFR3 在甲状腺癌细胞中不是 miR-100-5p 的直接靶基因。

虽然 FGFR3 在甲状腺癌细胞中不是 miR-100-5p 的直接靶基因, 但是调控 FGFR3 在甲状腺癌中具有重要的研究价值。儿童甲状腺癌发展中, FGFR3 突变是较为常见的遗传改变, 占比达 15%^[23]。FGFR3 可作为潜在的治疗靶点, 抑制治疗靶点可改善间变性甲状腺癌患者的预后^[24]。FGFR3 可能是甲状腺髓样癌转移性分子标志物^[25], 也可能是侵袭性较低甲状腺癌的生物标志物与分子靶点^[26]。FGFR3 可改变细胞信号传导而促进甲状腺癌细胞扩增^[27]。FGFR3 的串联复制是 FGFR 融合机制之一, 利用 FGFR 融合机制开发癌症治疗中的靶向药物具有很好的前景^[28]。通过对 miR-100-5p 进行过表达或抑制, 可以对 FGFR3 进行相关调控, 因而, miR-100-5p 未来有望成为甲状腺癌潜在的治疗制剂, FGFR3 未来有望成为甲状腺癌潜在的调控靶点。

本研究仍有很多局限性, 只在甲状腺癌细胞中检测了 miR-100-5p 的相对表达量, 需要扩大到患者病理组织中进行研究, 以及进行病例样本的多中心研究来分析和确认 miR-100-5p 的诊断、预后和治疗价值。此外, 本研究检测的 FGFR3 在甲状腺癌细胞中并不是 miR-100-5p 的直接靶基因, 需要进一步寻找 miR-100-5p 在甲状腺癌细胞中的直接靶基因, 并分析其相关作用机制。

综上所述, 本研究通过实验发现, miR-100-5p 在甲状腺癌细胞中表达上调, 可促进甲状腺癌细胞增殖, 抑制细胞凋亡, 可能成为甲状腺癌诊疗中新的生物标志物与调控靶点。

参考文献:

[1] 仲亚东, 孔德桐, 马伯敏. 甲状腺癌患者组织及手术前后血清中 NR3C2 和 ZEB1 表达水平及其与预后价值研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2023, 38(4): 94-99. ZHONG Yadong, KONG Detong, MA Baimin. Study on the expression level of NR3C2 and ZEB1 in thyroid

cancer tissue and serum of patients before and after surgery and their prognostic value[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2023, 38(4): 94-99.

[2] 刘星, 霍占江. 甲状腺乳头状癌组织中 galectin-3 与 miR-375 水平表达意义及相关性研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2023, 38(1): 49-52, 185. LIU Xing, HUO Zhanjiang. Expression significance and correlation of galectin-3 and miR-375 in papillary thyroid carcinoma tissue[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2023, 38(1): 49-52, 185.

[3] 张廷华, 胡友元. miRNA 在甲状腺癌中的研究进展 [J]. 生命的化学, 2022, 42(12): 2231-2236. ZHANG Tinghua, HU Youyuan. Research progress of miRNA in thyroid cancer[J]. Chemistry of Life, 2022, 42(12): 2231-2236.

[4] PAPAIOANNOU M, CHORTIAG, CHATZIKYRIAKI-DOU A, et al. MicroRNAs in papillary thyroid cancer: what is new in diagnosis and treatment[J]. Frontiers in Oncology, 2021, 11: 755097.

[5] ENIAFE J, JIANG Shuai. MicroRNA-99 family in cancer and immunity[J]. Wiley Interdisciplinary Reviews RNA, 2021, 12(3): e1635.

[6] 张廷华, 胡友元. miR-100 在人类癌症中的研究新进展 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2024, 16(1): 195-198. ZHANG Tinghua, HU Youyuan. New progress in the research of miR-100 in human cancer[J]. Journal of Molecular Diagnosis and Therapy, 2024, 16(1): 195-198.

[7] GE Yiman, SHU Jia, SHI Gang, et al. MiR-100 suppresses the proliferation, invasion, and migration of hepatocellular carcinoma cells via targeting CXCR7[J]. Journal of Immunology Research, 2021, 2021:9920786.

[8] 邹艳花, 许可葵, 李灿, 等. 2019 年湖南省肿瘤登记地区恶性肿瘤发病与死亡及 2015-2019 年变化趋势分析 [J]. 中国肿瘤, 2023, 32(7): 483-491. ZOU Yanhua, XU Kekui, LI Can, et al. Cancer incidence and mortality in hunan cancer registration areas in 2019 and its trend from 2015 to 2019[J]. China Cancer, 2023, 32(7): 483-491.

[9] 赵芳芳, 郭红, 陈嘉. LncRNA TUG1 在甲状腺癌组织中的表达及其对细胞增殖和迁移的影响 [J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(6): 42-47. ZHAO Fangfang, GUO Hong, CHEN Jia. Expression of LncRNA TUG1 in thyroid carcinoma tissues and its effect on cell proliferation and migration[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(6): 42-47.

[10] LI Chen, GAO Yanping, ZHANG Kai, et al. Multiple roles of microRNA-100 in human cancer and its therapeutic potential[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2015, 37(6): 2143-2159.

[11] XIE Haihui, XIAO Ruobing, HE Yaolin, et al. MicroRNA-100 inhibits breast cancer cell proliferation, invasion and migration by targeting FOXA1[J]. Oncology Letters, 2021, 22(6): 816.

[12] ZHANG Hongliang, YANG Kang, REN Tingting, et al. MiR-100-5p inhibits malignant behavior of chordoma cells by targeting IGF1R[J]. Cancer Management and Research, 2020, 12: 4129-4137.

[13] YE Yun, LI Suliang, WANG Jianjun. MiR-100-5p

- downregulates mTOR to suppress the proliferation, migration, and invasion of prostate cancer cells[J]. *Frontiers in Oncology*, 2020, 10: 578948.
- [14] JAKOB M, MATTES L M, KÜFFER S, et al. MicroRNA expression patterns in oral squamous cell carcinoma: hsa-mir-99b-3p and hsa-mir-100-5p as novel prognostic markers for oral cancer[J]. *Head & Neck*, 2019, 41(10): 3499-3515.
- [15] OTTAVIANI S, CASTELLANO L. MicroRNAs: novel regulators of the TGF- β pathway in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Molecular Cellular Oncology*, 2018, 5(6): e1499066.
- [16] FUSO P, DI SALVATORE M, SANTONOCITO C, et al. Let-7a-5p, miR-100-5p, miR-101-3p, and miR-199a-3p hyperexpression as potential predictive biomarkers in early breast cancer patients[J]. *Journal of Personalized Medicine*, 2021, 11(8): 816.
- [17] XUE Yao, YANG Xiaoyun, HU Shaoyan, et al. A genetic variant in miR-100 is a protective factor of childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. *Cancer Medicine*, 2019, 8(5): 2553-2560.
- [18] FIGUEROA-GONZÁLEZ G, CARRILLO-HERNÁNDEZ J F, PEREZ-RODRIGUEZ I, et al. Negative regulation of serine threonine kinase 11 (STK11) through miR-100 in head and neck cancer[J]. *Genes*, 2020, 11(9): 1058.
- [19] BI Yunlong, JING Yu, CAO Yang. Overexpression of miR-100 inhibits growth of osteosarcoma through FGFR3[J]. *Tumour Biology*, 2015, 36(11): 8405-8411.
- [20] LUO Jie, CHEN Bin, JI Xianxiu, et al. Overexpression of miR-100 inhibits cancer growth, migration, and chemosensitivity in human NSCLC cells through fibroblast growth factor receptor 3[J]. *Tumour Biology*, 2016, 37(12): 15517-15524.
- [21] LUAN Yongxin, ZHANG Shuyan, ZUO Ling, et al. Overexpression of miR-100 inhibits cell proliferation, migration, and chemosensitivity in human glioblastoma through FGFR3[J]. *Onco Targets and Therapy*, 2015, 8: 3391-3400.
- [22] LI Zhipeng, LI Xu, YU Chao, et al. MicroRNA-100 regulates pancreatic cancer cells growth and sensitivity to chemotherapy through targeting FGFR3[J]. *Tumour Biology*, 2014, 35(12): 11751-11759.
- [23] BAE J S, JUNG S H, HIROKAWA M, et al. High prevalence of DICER1 mutations and low frequency of gene fusions in pediatric follicular-patterned tumors of the thyroid[J]. *Endocrine Pathology*, 2021, 32(3): 336-346.
- [24] JONKER P K C, VAN DAM G M, OOSTING S F, et al. Identification of novel therapeutic targets in anaplastic thyroid carcinoma using functional genomic mRNA-profiling: paving the way for new avenues?[J]. *Surgery*, 2017, 161(1): 202-211.
- [25] TIEDJE V, TING S, WALTER R F, et al. Prognostic markers and response to vandetanib therapy in sporadic medullary thyroid cancer patients[J]. *European Journal of Endocrinology*, 2016, 175(3): 173-180.
- [26] ST BERNARD R, ZHENG Lei, LIU Wei, et al. Fibroblast growth factor receptors as molecular targets in thyroid carcinoma[J]. *Endocrinology*, 2005, 146(3): 1145-1153.
- [27] ONOSE H, EMOTO N, SUGIHARA H, et al. Overexpression of fibroblast growth factor receptor 3 in a human thyroid carcinoma cell line results in overgrowth of the confluent cultures[J]. *European Journal of Endocrinology*, 1999, 140(2): 169-173.
- [28] PARKER B C, ENGELS M, ANNALA M, et al. Emergence of FGFR family gene fusions as therapeutic targets in a wide spectrum of solid tumours[J]. *The Journal of Pathology*, 2014, 232(1): 4-15.
- 收稿日期: 2024-02-19
修回日期: 2024-03-03

(上接第44页)

- [16] GEERTS M, STEYAERT J, FRYNS J P. The XYY syndrome: a follow-up study on 38 boys[J]. *Genetic Counseling (Geneva, Switzerland)*, 2003, 14(3): 267-279.
- [17] 邱惠国, 潘华, 洪国舜, 等. 无创产前筛查技术在胎儿性染色体非整倍体筛查中的应用[J]. *中国妇幼保健*, 2022, 37(18): 3452-3456.
- QIU Huiguo, PAN Hua, HONG Guolin, et al. Application of non-invasive prenatal screening technology in screening for fetal sex chromosome aneuploidy[J]. *Maternal & Child Health Care of China*, 2022, 37(18): 3452-3456.
- [18] 彭建美, 李瑞, 于娇, 等. 颈项透明层厚度超声联合无创DNA对孕妇胎儿染色体非整倍体异常诊断效能的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2021, 21(11): 2129-2132.
- PENG Jianmei, LI Rui, YU Jiao, et al. Effect of ultrasound on thickness of neck transparent layer combined with noninvasive DNA on diagnosis of abnormal chromosomal aneuploidy [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2021, 21(11): 2129-2132.
- [19] 胡睿, 张竹, 王嘉敏, 等. 比较基因组杂交微阵列技术在高龄孕妇产前诊断胎儿染色体异常中的应用[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2021, 52(1): 117-123.
- HU Rui, ZHANG Zhu, WANG Jiamin, et al. Application of array-based comparative genomic hybridization in the prenatal diagnosis of fetal chromosomal aberration in gravidas with advanced age [J]. *Journal of Sichuan University(Medical Sciences)*, 2021, 52(1): 117-123.
- [20] 赵小秋, 崔婉婷. 205例羊水细胞嵌合体的产前诊断结果分析[J]. *中国生育健康杂志*, 2022, 33(1): 18-22, 26.
- ZHAO Xiaoqiu, CUI Wanting. Analysis of prenatal diagnosis outcomes of 205 cases with mosaicism in amniotic fluid cells [J]. *Chinese Journal of Reproductive Health*, 2022, 33(1): 18-22, 26.
- 收稿日期: 2023-12-22
修回日期: 2024-04-18