

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.05.007

lncRNA TUG1 通过 miR-524-5p/BRAF 轴调节甲状腺乳头状癌 TPC-1 细胞的增殖、凋亡和 EMT 进程

李秀君¹, 刘宝利¹, 朱翠敏²(1. 河北省唐山市工人医院 病理科, 河北 唐山 063003; 2. 承德医学院附属医院 肿瘤科, 河北 承德 067020)

[摘要] **目的:** lncRNA 牛磺酸上调基因 1 (lncRNA TUG1) 对甲状腺乳头状癌 (PTC) 细胞 (TPC-1) 增殖、凋亡和 EMT 进程的影响及作用机制。 **方法:** qPCR 检测人 PTC 组织 (2019 年 5 月至 2021 年 4 月期间在河北省唐山市工人医院手术切除的 35 例 PTC 组织及对应癌旁组织标本) 与人 PTC 细胞 TPC-1、BHP10-3、K1、SW-1736 及人正常甲状腺上皮 Nthyori 3-1 细胞中 lncRNA TUG1 的表达。体外培养 TPC-1 细胞, 将其分为对照组、si-NC 组、si-TUG1 组、miR-NC 组、miR-524-5p mimic 组、si-TUG1+NC inhibitor 组、si-TUG1+miR-524-5p inhibitor 组、miR-524-5p mimic+pcDNA 组、miR-524-5p mimic+pcDNABRAF 组, 对细胞进行 si-TUG1、miR-524-5p mimic、miR-524-5p inhibitor、pcDNA BRAF 和各自相应的对照质粒转染, 采用 CCK-8 法、FCM 法分别检测 TPC-1 细胞增殖、凋亡情况; WB 法检测 TPC-1 细胞中 BRAF、PCNA、Caspase-3、E-cadherin、N-cadherin 和 vimentin 的表达, 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-524-5p 与 lncRNA TUG1、BRAF 的靶向关系。 **结果:** lncRNA TUG1 在 PTC 组织及细胞中呈高表达 (均 $P < 0.05$); 敲减 lncRNA TUG1 表达或上调 miR-524-5p 表达可显著抑制 TPC-1 细胞增殖及 EMT, 促进细胞凋亡 (均 $P < 0.05$); 双荧光素酶报告基因实验显示, lncRNA TUG1 与 BRAF、miR-524-5p 之间存在靶向关系; 抑制 miR-524-5p 表达可逆转敲减 lncRNA TUG1 表达对 TPC-1 细胞的增殖、EMT 进程的抑制及对其凋亡的促进作用 (均 $P < 0.05$), 上调 BRAF 表达可逆转过表达 miR-524-5p 对 TPC-1 细胞增殖、EMT 的抑制及对其凋亡的促进作用 (均 $P < 0.05$)。 **结论:** lncRNA TUG1 在 PTC 组织与 TPC-1 细胞中呈高表达, 敲减 lncRNA TUG1 表达可通过 miR-524-5p/BRAF 轴抑制 PTC 细胞的增殖与 EMT 进程, 并促进 TPC-1 细胞凋亡。

[关键词] 长链非编码 RNA 牛磺酸上调基因 1; miR-524-5p; 鼠类肉瘤滤过性毒菌致癌同源体 B1; 甲状腺乳头状癌; 增殖; 凋亡; 上皮间质转化

[中图分类号] R736.1; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)05-0434-08

lncRNA TUG1 regulates the proliferation, apoptosis and EMT of thyroid papillary carcinoma TPC-1 cells by regulating the miR-524-5p/BRAF axis

LI Xiujun¹, LIU Baoli¹, ZHU Cuimin² (1. Department of Pathology, Tangshan Workers' Hospital, Tangshan 063003, Hebei, China; 2. Department of Oncology, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067020, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of long non-coding RNA (lncRNA) taurine up-regulated gene 1 (TUG1) on the proliferation, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of papillary thyroid carcinoma (PTC) cells and its mechanism. **Methods:** Real-time fluorescent quantitative PCR (qPCR) was used to detect the expression of lncRNA TUG1 in 35 pairs of PTC tissue and corresponding paracancerous tissue specimens that were surgically resected in Tangshan Workers' Hospital, Hebei Province from May 2019 to April 2021, human PTC cell lines (TPC-1, BHP10-3, K1, SW1736) and human normal thyroid epithelial Nthyori 3-1 cells. TPC-1 cells were cultured *in vitro* and divided into control group, si-NC group, si-TUG1 group, miR-NC group, miR-524-5p mimic group, si-TUG1+NC inhibitor group, si-TUG1+miR-524-5p inhibitor group, miR-524-5p mimic+pc-DNA group, and miR-524-5p mimic+ pcDNA BRAF (V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) group by transfecting corresponding vectors. CCK-8 and FCM methods were used to detect the proliferation and apoptosis of TPC-1 cells, WB method was used to detect the expression of BRAF, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), cysteine protease-3 (Caspase-3), E-cadherin, N-cadherin and vimentin in TPC-1 cells, and the dual-luciferase reporter gene experiment was used to verify the targeting relationship between miR-524-5p and lncRNA TUG1 as well as BRAF. **Results:** lncRNA TUG1 was up-regulated in PTC tissues and cells ($P < 0.05$). Silencing the expression of lncRNA TUG1 or up-regulating the expression of miR-524-5p could significantly inhibit the proliferation and EMT, and promote apoptosis of TPC-1 cells (all $P < 0.05$). Dual-luciferase reporter gene experiment showed that there was a targeting relationship between miR-524-5p

[作者简介] 李秀君 (1984—), 女, 主治医师, 头颈部肿瘤及女性生殖系统肿瘤, E-mail: lxj1984li@163.com

and lncRNA TUG1 as well as between miR-524-5p and BRAF (all $P < 0.05$). Silencing the expression of miR-524-5p could reverse the effects of lncRNA TUG1 knockdown on inhibiting proliferation and EMT and promoting apoptosis of TPC-1 cells (all $P < 0.05$), and up-regulation of BRAF expression could reverse the effects of miR-524-5p overexpression on inhibiting proliferation, EMT and promoting apoptosis of TPC-1 cell (all $P < 0.05$). **Conclusion:** lncRNA TUG1 is up-regulated in PTC tissues and TPC-1 cells. Silencing the expression of lncRNA TUG1 can inhibit proliferation and EMT but promote cell apoptosis of PTC cells by regulating the miR-524-5p/BRAF axis.

[Key words] long non-coding RNA taurine up-regulated gene 1 (lncRNA TUG1); miR-524-5p; V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 (BRAF); papillary thyroid carcinoma (PTC); proliferation; apoptosis; epithelial-mesenchymal transition (EMT)

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(5): 434-441. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.05.007]

甲状腺乳头状癌 (papillary thyroid carcinoma, PTC) 是甲状腺癌的亚型之一, 占有甲状腺恶性肿瘤的 80%, 多数 PTC 可被治愈, 仍有部分患者治疗后发生复发与转移, 影响其预后。EMT 是 PTC 发展的关键步骤, 因此研究 PTC 发生发展机制, 寻找新的治疗靶点具有重要意义^[1-2]。牛磺酸上调基因 1 (taurine up-regulated gene 1, TUG1) 为 lncRNA 之一, 有研究^[3]发现, lncRNA TUG1 在 PTC 组织与细胞系中表达上调, 上调 lncRNA TUG1 表达可显著促进 PTC 细胞增殖与侵袭, 而下调 lncRNA TUG1 可明显抑制细胞增殖、迁移与侵袭。lncRNA 通过作为内源性竞争性 RNA 通过结合 miRNA 影响疾病进展, lncRNA TUG1 通过结合 miR-524-5p 来介导无远端同源盒 1 (distal-less homeobox 1, DLX1) 基因的表达从而调控口腔鳞癌的发展^[4]。有研究^[5]发现, miR-524-5p 在 PTC 组织与细胞中低表达, 可影响 PTC 细胞活力、迁移、侵袭和凋亡。鼠类肉瘤滤过性毒菌致癌同源体 B1 (V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1, BRAF) 基因与 PTC 的发展密切相关, 其基因突变与 PTC 患者的临床病理特征和预后相关^[6]。有研究^[7]表明, miR-524-5p 通过靶向 BRAF 和 ERK2 抑制黑色素瘤的生长。lncRNA TUG1 是否通过调控 miR-524-5p/BRAF 轴影响 PTC 发生发展尚未见报道。本研究将探索 lncRNA TUG1 对 PTC 细胞增殖、凋亡、EMT 进程的影响及其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 组织标本、细胞及主要试剂

选择 2019 年 5 月至 2021 年 4 月间在河北省唐山市工人医院手术切除的 35 例 PTC 组织及对应癌旁组织标本。患者术前未经任何放化疗, 年龄 29~72 岁, 平均年龄 (60.10±9.30) 岁, 经病理诊断均为 PTC。本研究方案经本院伦理委员会批准 (批准号: GRY-LL-KJ2019-K43), 所有患者知情同意并签署知情同意书。

人 PTC 细胞 TPC-1、BHP10-3、K1、SW-1736 及正常人甲状腺上皮细胞 Nthyori 3-1 均购自美国 ATCC

公司, RPMI 1640 培养基 (SH30809.01)、胎牛血清 (SH30068.03) 购自美国 Hyclone 公司。抑制 lncRNA TUG1 表达质粒 (si-TUG1) 及对照质粒 (si-NC)、miR-524-5p 过表达质粒 (miR-524-5p mimic) 及对照质粒 (miR-NC)、抑制 miR-524-5p 表达质粒 (miR-524-5p inhibitor) 及对照质粒 (NC inhibitor)、BRAF 过表达质粒 (pcDNA BRAF) 及对照质粒 (pcDNA), 以及 miR-524-5p、lncRNA TUG1 及 U6、GAPDH 引物均购自 GenePharma 公司。TRIzol 试剂 (R0016)、BeyoRT™ II cDNA 第一链合成试剂盒 (D7168M)、BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (D7260)、CCK-8 试剂盒 (C0038) 均购自 Beyotime 公司, Lipofectamine® 3000 转染试剂 (L3000008) 购自 Invitrogen 公司, 双荧光素酶活性检测试剂盒 (ZY130595) 购自泽叶生物公司, Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒 (CA1020) 购自北京索莱宝公司, 兔抗人 BRAF (9433)、PCNA (13110)、Caspase-3 (14220) 抗体均购自美国 CST 公司, 兔抗 E-cadherin (ab76319)、N-cadherin (ab245827)、vimentin (ab92547) 抗体及 HRP 标记羊抗兔二抗 (ab6721) 均购自 Abcam 公司。

1.2 细胞培养及转染

TPC-1、BHP10-3、K1、SW1736、Nthyori 3-1 细胞均用含 10% 的 RPMI 1640 培养基进行培养。

将 TPC-1 细胞分为对照组、si-NC 组、si-TUG1 组、miR-NC 组、miR-524-5p mimic 组、si-TUG1+miR-524-5p inhibitor 组、si-TUG1+NC inhibitor 组、miR-524-5p mimic+pcDNA 组和 miR-524-5p mimic+pcDNA BRAF 组, 选择对数生长期 TPC-1 细胞, 以每孔 4×10^5 个细胞接种至 6 孔板中, 待细胞汇合度至约 70% 时, 按上述分组进行转染, 转染 6 h 后更换新的 RPMI 1640 培养基继续培养 48 h, 进行鉴定转染效率检测实验。

1.3 qPCR 检测 PTC 组织和细胞中 lncRNA TUG1、miR-524-5p 表达

TRIzol 试剂提取 PTC 组织及细胞总 RNA, BeyoRT™ II cDNA 第一链合成试剂盒合成 cDNA 后, 采用 SYBR Green 法试剂盒进行 qPCR 实验。qPCR

反应条件为 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 30 s、65 °C 45 s, 40 个循环, 72 °C 5 min。以 GAPDH、U6 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算 lncRNA TUG1、miR-524-5p 的相对表达量。lncRNA TUG1 的正向引物为 5'-CTATACTCAGCTTCAGTGTT-3', 反向引物为 5'-TACTGTATGGCCACCACTCC-3'; GAPDH 的正向引物为 5'-CTGGGCTACACTGAGCACC-3', 反向引物为 5'-AGTGGTCGTTGAGGGCAATG-3'; miR-524-5p 的正向引物为 5'-CTACAAAGGGAA GCACTT-3', 反向引物为 5'-GAACATGTCTGCG TATCTC-3'; U6 的正向引物为 5'-CTCGCT TCGGCAGCACA-3', 反向引物为 5'-AACGCTTCA CGAATTTGCGT-3'。

1.4 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-524-5p 与 lncRNA TUG1、BRAF 之间的靶向关系

数据库 (MicroRNA、StarBase 和 RegRNA) 预测结果显示 miR-524-5p 与 lncRNA TUG1、BRAF 之间有结合位点, 根据结合区域序列, 分别构建 TUG1-WT、BRAF-WT 野生型荧光素酶质粒与 TUG1-MUT、BRAF-MUT 突变型荧光素酶质粒, 将构建质粒分别和 miR-NC、miR-524-5p mimic 共转染 TPC-1 细胞, 转染 48 h 后, 裂解细胞, 检测荧光素酶活性。

1.5 CCK-8 法检测细胞增殖

各组转染后 TPC-1 细胞生长至对数期时, 以每孔 2×10^4 个接种至 96 孔板中, 分别在培养 24、48、72 h 时每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 继续培养 2 h, 酶标仪测定在波长 450 nm 处光密度 (D) 值, 绘制细胞生长曲线。

1.6 FCM 法检测细胞凋亡

转染 48 h 的各组 TPC-1 细胞, 制备成 1×10^6 个/mL 的细胞悬液, 使用 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡, 计算细胞凋亡率。

1.7 WB 法检测转染后 TPC-1 细胞中 BRAF、PCNA、Caspase-3、E-cadherin、N-cadherin、vimentin 蛋白表达的影响

收集转染后的各组 TPC-1 细胞, 加入 RIPA 裂解液提取总蛋白, 蛋白用 10% SDS-PAGE 分离后转至 PVDF 膜, 5% 牛血清白蛋白封闭后, 分别加入 BRAF、PCNA、Caspase-3、E-cadherin (均 1:1 000 稀释)、N-cadherin (1:1 500 稀释)、vimentin (1:1 000 稀释) 一抗, 4 °C 处理过夜, 加入 HRP 标记的羊抗兔二抗 (1:1 500 稀释), 室温处理 2 h, 加入 ECL 显色液显色, 以 β -actin 为内参, Image J 软件分析蛋白相对表达量。

1.8 统计学处理

以上主要实验均独立重复 3 次。采用 SPSS 25.0 进行数据统计, 符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验; GraphPad Prism 8.0 绘制

生长曲线。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA TUG1 在 PTC 组织及细胞中呈明显高表达

qPCR 检测结果显示, lncRNA TUG1 在 PTC 组织中表达水平显著高于癌旁组织 (2.49 ± 0.29 vs 1.00 ± 0.11 , $P < 0.05$)。与人正常甲状腺上皮 Nthyori 3-1 细胞比较, lncRNA TUG1 在 TPC-1 (3.48 ± 0.41 vs 1.00 ± 0.02)、BHP10-3 (2.53 ± 0.32 vs 1.00 ± 0.02)、K1 (1.98 ± 0.24 vs 1.00 ± 0.02)、SW-1736 (2.03 ± 0.27 vs 1.00 ± 0.02) 细胞中表达明显处于高水平 (均 $P < 0.05$), 其中以 TPC-1 细胞中表达水平最高, 故选择 TPC-1 细胞进行后续实验。

2.2 敲减 lncRNA TUG1 表达可抑制 TPC-1 细胞增殖及 EMT 进程而促进其凋亡

qPCR 结果显示, 与 si-NC 组比较, si-TUG1 组 TPC-1 细胞 lncRNA TUG1 表达水平显著降低 (0.37 ± 0.05 vs 0.98 ± 0.10 , $P < 0.05$), 说明转染 si-TUG1 有效地敲减了 PTC-1 细胞中 TUG1 的表达水平。CCK-8 (图 1A)、FCM (图 1B) 及 WB (图 1C) 法结果显示, 与 si-NC 组比较, si-TUG1 组 TPC-1 细胞增殖能力、PCNA、N-cadherin、vimentin 等蛋白的表达水平均显著降低 (均 $P < 0.05$), 细胞凋亡率 ($P < 0.05$) 及其凋亡相关蛋白 Caspase-3、E-cadherin 的表达水平均显著升高 (均 $P < 0.05$), 对照组与 si-NC 组之间上述指标比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。上述结果表明, 敲减 lncRNA TUG1 表达后能抑制 TPC-1 细胞增殖及 EMT 进程, 并促进其凋亡。

2.3 lncRNA TUG1 靶向 miR-524-5p 且抑制其表达

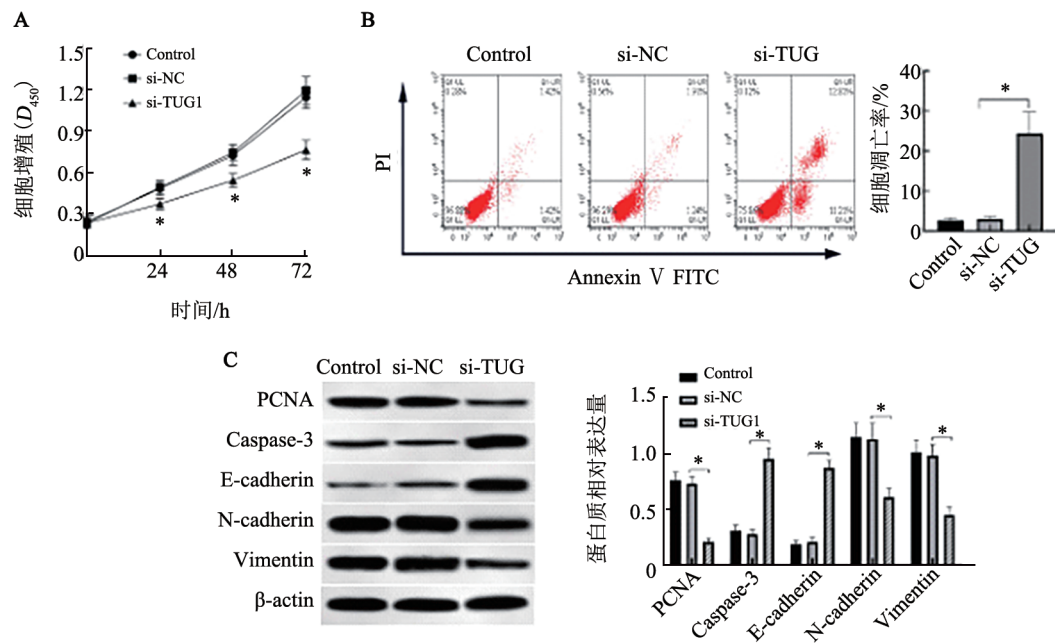
生物信息学软件预测显示 lncRNA TUG1 与 miR-524-5p 有结合位点 (图 2A); 双荧光素酶报告基因实验结果 (图 2B) 显示, 与 TUG1-WT+miR-NC 共转染的 TPC-1 细胞比较, TUG1-WT+miR-524-5p mimic 共转染的 TPC-1 细胞其相对荧光素酶活性显著降低 ($P < 0.05$); qPCR 结果显示, 敲减 lncRNA TUG1 表达后, miR-524-5p 表达水平显著升高 (图 2C, $P < 0.05$)。上述结果表明, lncRNA TUG1 靶向 miR-524-5p 且抑制其表达。

2.4 过表达 miR-524-5p 能抑制 TPC-1 细胞增殖和 EMT 进程而促进其凋亡

qPCR 结果显示, 与 miR-NC 组比较, miR-524-5p mimic 组 TPC-1 细胞 miR-524-5p 表达水平显著升高 (2.36 ± 0.24 vs 1.05 ± 0.15 , $P < 0.05$), 说明转染 miR-524-5p mimic 后, TPC-1 细胞过表达了 miR-524-5p。

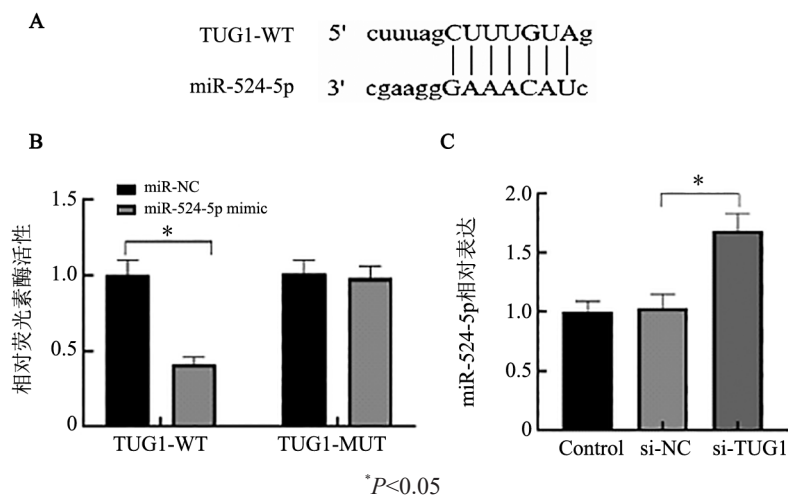
CCK-8(图 3A)、FCM(图 3B)及 WB 法(图 3C)检测结果显示,与 miR-NC 组比较,miR-524-5p mimic 组 TPC-1 细胞增殖与 PCNA、N-cadherin、vimentin 蛋白表达水平显著降低(均 $P < 0.05$),细胞凋亡率及凋亡相关蛋白 Caspase-3、E-cadherin 等表达水

平显著升高(均 $P < 0.05$),对照组与 miR-NC 组之间上述指标比较差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。上述结果表明,过表达 miR-524-5p 能抑制 TPC-1 细胞增殖、EMT 进程,促进其凋亡。



与 si-NC 组比较, * $P < 0.05$

图1 敲减 lncRNA TUG1 表达对 TPC-1 细胞增殖(A)、凋亡(B)及 EMT 相关蛋白表达(C)的影响



* $P < 0.05$

图2 lncRNA TUG1 靶向 miR-524-5p(A)并抑制其表达(B)

2.5 抑制 miR-524-5p 能逆转敲减 TUG1 表达对 TPC-1 细胞增殖、凋亡及 EMT 进程的影响

CCK-8(图 4A)、FCM(图 4B)及 WB 法(图 4C)检测结果显示,与 si-TUG1+NC inhibitor 组比较,si-TUG1+miR-524-5p inhibitor 组 TPC-1 细胞增殖与 PCNA、N-cadherin、vimentin 蛋白表达水平显著升高(均 $P < 0.05$),细胞凋亡率及凋亡相关蛋白 Caspase-3、E-cadherin 蛋白表达水平显著降低(均 $P < 0.05$),

si-TUG1 组与 si-TUG1+NC inhibitor 组之间上述指标比较差异不显著(均 $P > 0.05$)。上述结果表明,抑制 miR-524-5p 能逆转敲减 lncRNA TUG1 表达对 TPC-1 细胞增殖、凋亡及 EMT 进程的影响。

2.6 miR-524-5p 靶向 BRAF 并抑制其表达

生物信息学软件预测显示 BRAF 基因与 miR-524-5p 有靶向结合位点(图 5A)。双荧光素酶报告基因实验结果显示,与 BRAF-WT 与 miR-NC 共转染

细胞比较, BRAF-WT与miR-524-5p mimic共转染细胞相对荧光素酶活性显著降低(图5B, $P < 0.05$); WB法结果显示, 与miR-NC组比较, 过表达miR-524-5p

后, miR-524-5p mimic组的BRAF蛋白表达水平显著降低(图5C, $P < 0.05$)。上述结果表明, miR-524-5p靶向BRAF并抑制其表达。

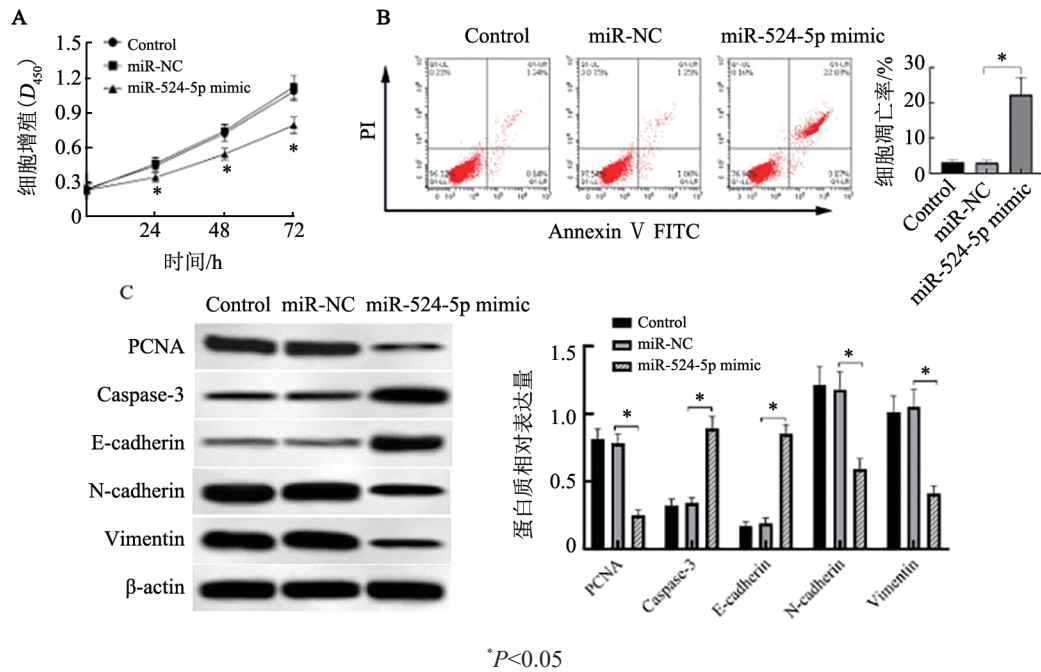


图3 过表达miR-524-5p表达对TPC-1细胞增殖(A)、凋亡(B)及EMT相关蛋白表达(C)的影响

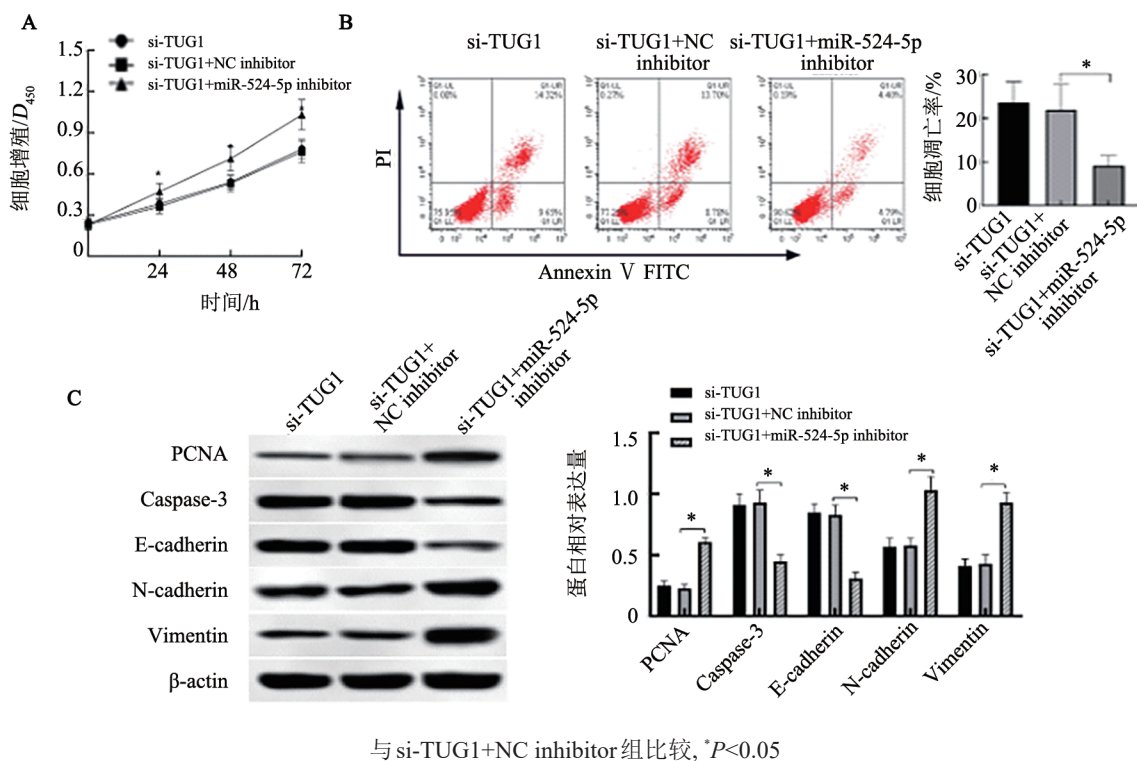


图4 同时抑制miR-524-5p与lncRNA TUG1表达对TPC-1细胞增殖(A)、凋亡(B)及EMT相关蛋白表达(C)的影响

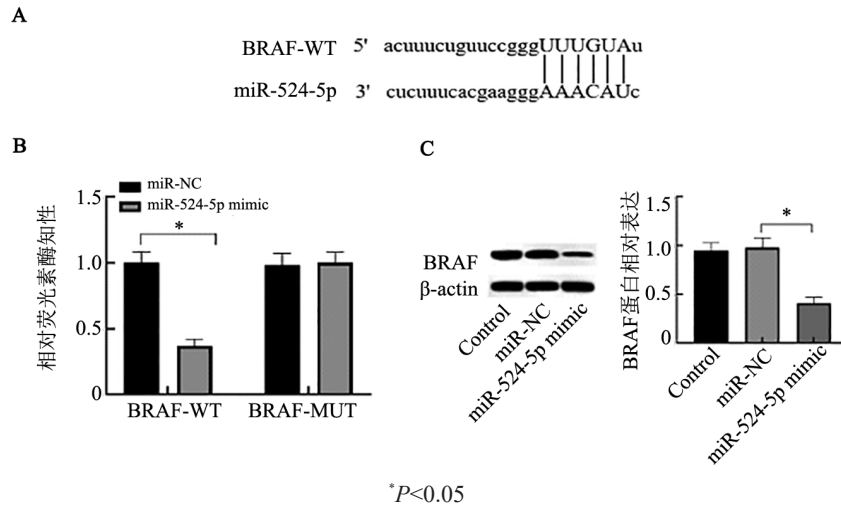
2.7 过表达BRAF逆转过表达miR-524-5p对TPC-1细胞增殖、凋亡及EMT进程的影响

CCK-8、WB、FCM法检测结果显示, 与miR-524-5p mimic+pc-DNA组比较, miR-524-5p mimic+

pcDNA BRAF组TPC-1细胞增殖(图6A)与PCNA、N-cadherin、vimentin蛋白表达水平(图6C)显著升高(均 $P < 0.05$), 细胞凋亡率(图6B)及凋亡相关蛋白Caspase-3、E-cadherin蛋白表达水平(图6C)显著降低

(均 $P < 0.05$), miR-524-5p mimic 组与 miR-524-5p mimic+pc-DNA 组之间上述指标比较差异不显著 (图 6, 均 $P > 0.05$)。上述结果表明, 过表达 BRAF 可

部分逆转过表达 miR-524-5p 对 TPC-1 细胞增殖、凋亡及 EMT 进程的影响。



A: 生物信息学方法预测 miR-524-5p 与 BRAF 基因之间的结合位点为; B: 双荧光素酶报告基因实验检测 miR-524-5p 与 BRAF 基因间的靶向调控关系; C: WB 法检测过表达 miR-524-5p 对 TPC-1 细胞中 BRAF 蛋白表达的影响

图 5 miR-524-5p 靶向 BRAF 并抑制其表达

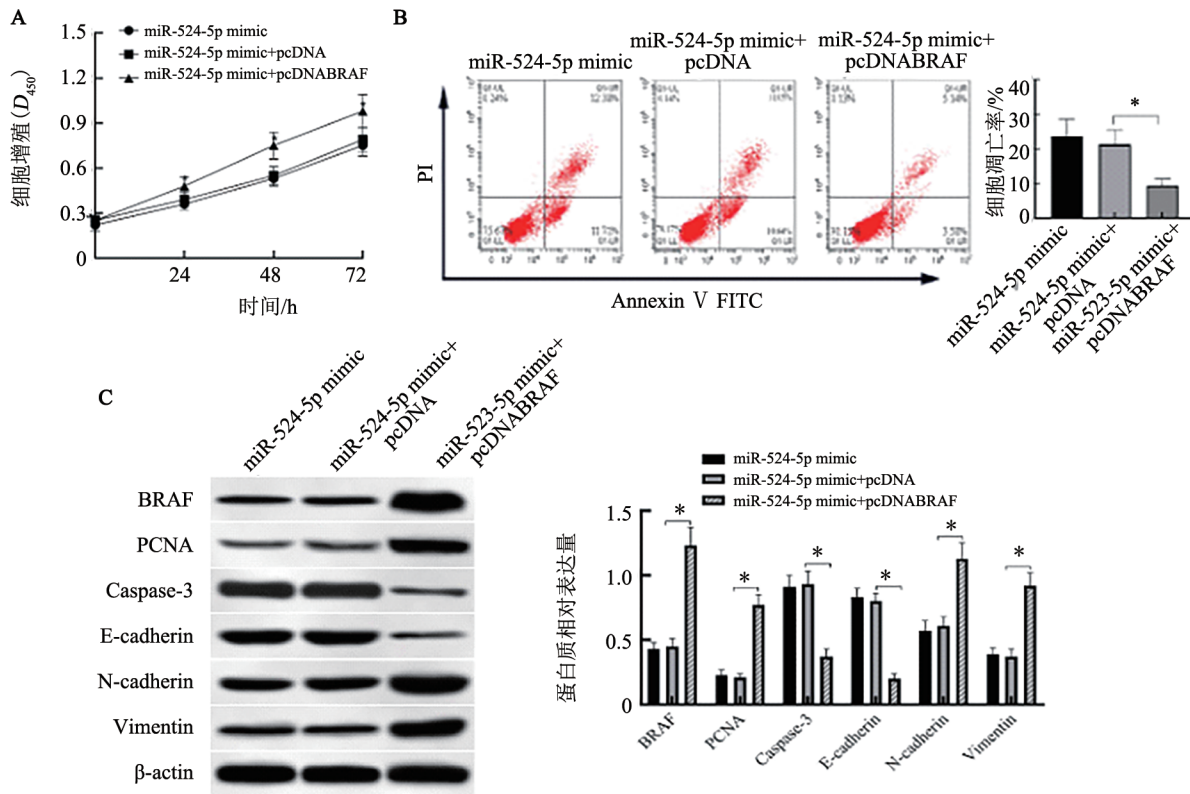


图 6 同时过表达 BRAF 和 miR-524-5p 对 TPC-1 细胞增殖(A)、凋亡(B)及 EMT 相关蛋白表达(C)的影响

3 讨论

lncRNA 在肿瘤的发生、发展中发挥重要作用, HOTAIR、MALAT1、H19 等多种 lncRNA 已经被证明

是许多癌症发生发展的关键调控因子^[8-9]。多种 lncRNA 与 PTC 的发展、转移和预后密切相关, 可参与调控 PTC 细胞增殖与迁移等恶性生物学行为^[10-11]。lncRNA TUG1 与多种肿瘤的发生发展密切相关, 在

食管癌中, lncRNA TUG1 通过结合 miR-1294 调节 PLK1 表达影响食管癌细胞的增殖、凋亡和侵袭^[12]。已有研究^[13]显示, lncRNA TUG1 在 PTC 组织与细胞中表达上调, 抑制 lncRNA TUG1 表达可靶向作用于 miR-145, 上调锌指 E-盒结合同源异形盒-1 的表达, 抑制 PTC 细胞的增殖与侵袭。lncRNA TUG1 还可通过结合 miR-382 促进胰腺癌细胞增殖、迁移和 EMT 表型的形成^[14]。本研究 qPCR 结果显示, lncRNA TUG1 在 PTC 组织与细胞中表达水平显著升高, 与申伟等^[13] 研究结果一致。在 TPC-1 细胞中敲减 lncRNA TUG1 表达后, TPC-1 细胞增殖与 PCNA、N-cadherin、vimentin 蛋白表达水平显著降低, 细胞凋亡率及凋亡相关蛋白 Caspase-3、E-cadherin 表达水平显著升高, 提示敲减 lncRNA TUG1 表达可显著抑制 TPC-1 细胞增殖及 EMT 进程, 并促进细胞凋亡, 与先前报道结果^[3]类似。

lncRNA 可通过作为竞争性内源性 RNA 结合 miRNA 参与肿瘤的发生发展^[15]。在胃癌中, miR-524-5p 可抑制胃癌细胞的生长和侵袭能力, 发挥抑癌基因的作用^[16]。在乳腺癌中, miR-524-5p 可靶向 FSTL1 抑制乳腺癌细胞的迁移、侵袭和 EMT 进程^[17]。本研究发现, lncRNA TUG1 能海绵化 miR-524-5p 并抑制其作用; TPC-1 细胞中敲减 lncRNA TUG1 表达可上调 miR-524-5p 表达; TPC-1 细胞中过表达 miR-524-5p 能抑制细胞增殖与 PCNA、N-cadherin、vimentin 蛋白表达, 促进细胞凋亡及 Caspase-3、E-cadherin 蛋白表达; 抑制 miR-524-5p 表达可逆转敲减 lncRNA TUG1 表达对 TPC-1 细胞的作用。上述结果表明, lncRNA TUG1 通过靶向 miR-524-5p 调控 PTC 细胞增殖、凋亡与 EMT 进程。

miR-524-5p 可与靶基因的 3' UTR 区结合调控肿瘤细胞的增殖、迁移与侵袭^[18-19]。BRAF 是 MAPK/ERK 通路的上游分子, 在第 600 位(V600E)发生的氨基酸改变即 V600E 显性激活突变, 与肿瘤的发生密切相关^[20]。研究^[21]显示, BRAF 在 PTC 中呈阳性表达, 其基因突变与 PTC 肿瘤直径、淋巴结转移等有关。本研究证实, miR-524-5p 与 BRAF 存在靶向关系, 并发现 TPC-1 细胞中 miR-524-5p 呈高表达、BRAF 呈低表达; 过表达 BRAF 可逆转过表达 miR-524-5p 对 TPC-1 细胞增殖、EMT 的抑制和凋亡的促进作用, 表明 miR-524-5p 可通过靶向抑制 BRAF 表达, 从而抑制 TPC-1 细胞增殖及 EMT, 促进细胞凋亡。

综上所述, lncRNA TUG1 在 PTC 组织与细胞中呈高表达, 敲减 lncRNA TUG1 可通过调节 miR-524-5p/BRAF 轴抑制 PTC 细胞增殖与 EMT 进程、促进细胞凋亡。

[参考文献]

- [1] SHAKIB H, RAJABI S, DEGHAN M H, *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition in thyroid cancer: a comprehensive review [J]. *Endocrine*, 2019, 66(3): 435-455. DOI: 10.1007/s12020-019-02030-8.
- [2] YAN T, QIU W W, SONG J L, *et al.* ARHGAP36 regulates proliferation and migration in papillary thyroid carcinoma cells[J]. *J Mol Endocrinol*, 2021, 66(1): 1-10. DOI:10.1530/JME-20-0230.
- [3] LEI H W, GAO Y, XU X Y. lncRNA TUG1 influences papillary thyroid cancer cell proliferation, migration and EMT formation through targeting miR-145[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2017, 49(7): 588-597. DOI:10.1093/abbs/gmx047.
- [4] LIU S Y, LIU L H, HU W W, *et al.* Long noncoding RNA TUG1 regulates the development of oral squamous cell carcinoma through sponging miR-524-5p to mediate DLX1 expression as a competitive endogenous RNA[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(11): 20206-20216. DOI:10.1002/jcp.28620.
- [5] LIU H, CHEN X, LIN T, *et al.* MicroRNA-524-5p suppresses the progression of papillary thyroid carcinoma cells via targeting on FOXE1 and ITGA3 in cell autophagy and cycling pathways[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 18382-18391. DOI:10.1002/jcp.28472.
- [6] 代丽丽, 张国安, 韩莎, 等. BRAF V600E 和 TERT 启动子突变与甲状腺乳头状癌临床病理特征的关系[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2018, 34(6): 673-676. DOI:10.13315/j.cnki.cjcep.2018.06.021.
- [7] LIU S M, LU J, LEE H C, *et al.* miR-524-5p suppresses the growth of oncogenic BRAF melanoma by targeting BRAF and ERK2[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(19): 9444-9459. DOI:10.18632/oncotarget.2452.
- [8] LIM L J, WONG S Y S, HUANG F Y, *et al.* Roles and regulation of long noncoding RNAs in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2019, 79(20): 5131-5139. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-19-0255.
- [9] LI Z Y, LIU W Z, GUANG H, *et al.* Silencing of long noncoding RNA H19 inhibited invasion and migration of papillary thyroid cancer cells via microRNA-138-dependent regulating of LRRK2[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2021, 35(1): 253-258. DOI:10.23812/20-422-L.
- [10] XIAO X, LI L, CUI J C, *et al.* lncRNA FALEC promotes proliferation, migration, and invasion of PTC cells through regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(8): 4361-4367. DOI: 10.26355/eurrev_202004_21017.
- [11] GUAN Y, LI Y, YANG Q B, *et al.* lncRNA ABCC6P1 promotes proliferation and migration of papillary thyroid cancer cells via Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(8): 664 [2021-12-6]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33987362/>. DOI: 10.21037/atm-21-505.
- [12] ZONG M Z, FENG W T, WAN L, *et al.* lncRNA TUG1 promotes esophageal cancer development through regulating PLK1 expression by sponging miR-1294[J]. *Biotechnol Lett*, 2020, 42(12): 2537-2549. DOI:10.1007/s10529-020-02984-0.
- [13] 申伟, 赵苏远, 张珊珊, 等. 长链非编码 RNA 牛磺酸上调基因靶向作用于微小 RNA-145 对甲状腺癌细胞侵袭的影响及其机制[J]. *中华实验外科杂志*, 2021, 38(2): 323-326. DOI: 10.3760/cma.j.cn421213-20200608-01194.

- [14] ZHAO L, SUN H W, KONG H R, *et al.* The lncRNA-TUG1/EZH2 axis promotes pancreatic cancer cell proliferation, migration and EMT phenotype formation through sponging mir-382[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(6): 2145-2158. DOI:10.1159/000479990.
- [15] ZHANG Y, GUO S, WANG S, *et al.* lncRNA OIP5-AS1 inhibits ferroptosis in prostate cancer with long-term cadmium exposure through miR-128-3p/SLC7A11 signaling[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 220: 112376[2021-12-6]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651321004887?via%3Dihub>. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2021.112376.
- [16] ZHU C Y, MENG F Q, LIU J. MicroRNA-524-5p suppresses cell proliferation and promotes cell apoptosis in gastric cancer by regulating CASP3[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(18): 7968-7977. DOI:10.26355/eurrev_201909_19013.
- [17] JIN T B, ZHANG Y, ZHANG T Y. miR-524-5p suppresses migration, invasion, and EMT progression in breast cancer cells through targeting FSTL1[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2020, 35(10): 789-801. DOI:10.1089/cbr.2019.3046.
- [18] CHEN H W, CHENG C, GAO S M. MicroRNA-524-5p inhibits proliferation and induces cell cycle arrest of osteosarcoma cells *via* targeting CDK6[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 530(3): 566-573. DOI:10.1016/j.bbrc.2020.07.092.
- [19] BAI X, ZHANG S, QIAO J, *et al.* Long non-coding RNA SchLAP1 regulates the proliferation of triple negative breast cancer cells *via* the miR-524-5p/HMGA2 axis[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(6): 446 [2021-12-6]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33846810/>. doi: 10.3892/mmr.2021.12085.
- [20] SU X, LI P, HAN B, *et al.* Vitamin C sensitizes BRAF V600E thyroid cancer to PLX4032 *via* inhibiting the feedback activation of MAPK/ERK signal by PLX4032[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 34[2021-12-6]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33468157/>. DOI:10.1186/s13046-021-01831-y.
- [21] 刘世阳, 赵璐, 王琨, 等. 雌激素受体 α 蛋白与 BRAF V600E 蛋白在甲状腺乳头状癌中的表达及其临床意义[J]. *中华普通外科杂志*, 2021, 36(6): 436-439. DOI:10.3760/cma.j.cn113855-20200712-00554.

[收稿日期] 2022-01-08

[修回日期] 2022-04-21

[本文编辑] 向正华