·论著·

miRNA-140-5P 在甲状腺癌细胞 TPC-1 中的表达及对其增殖迁移侵袭能力的影响*

罗义[1] 李阳敏[2] 鲜童丞[1] 杨闵叶[1] 王杰[1] 苏强[1]

(1. 首都医科大学附属北京安贞医院南充医院·南充市中心医院乳腺甲状腺外科，四川 南充 637000；
2. 南充市中心医院嘉陵院区妇科，四川 南充 637000)

【摘要】 目的 探讨 miR-140-5p 在甲状腺癌发展中的作用及其分子生物调节机制，miRNA-140-5P 对甲状腺癌细胞 TPC-1 侵袭、迁移的调控作用机制。**方法** 收集 2021 年 1 月—2022 年 1 月南充市中心医院手术切除的甲状腺恶性肿瘤 36 例和良性肿瘤 32 例的肿瘤标本。qt-PCR 检测 miRNA-140-5P 在甲状腺恶性肿瘤和良性肿瘤组织中 mRNA 的表达水平，外购甲状腺癌细胞 TPC-1，WB 实验检测 miRNA-140-5P 在甲状腺恶性肿瘤和良性肿瘤细胞中的蛋白表达水平，评估 miRNA-140-5P 在两种组织中的表达差异；实验引入 miRNA-140-5Pmimics 转染细胞，Transwell 小室实验、CCK-8 对甲状腺肿瘤细胞迁移、侵袭、增殖能力进行检测；实验对甲状腺癌细胞 TPC-1 中 NLRP3 炎性小体进行检测，并对 NLRP3 表达进行干预，评估甲状腺肿瘤细胞中 miR-140-5P 与 NLRP3 的调控关系。**结果** miRNA-140-5P 在甲状腺恶性肿瘤组织和细胞中呈低表达（$P<0.05$）。而 miRNA-140-5P mimics 可增强甲状腺癌细胞 TPC-1 的增殖、迁移和侵袭能力，miRNA-140-5P 可减弱甲状腺癌细胞中炎性介质 NLRP3 的表达。**结论** miRNA-140-5P 可降低甲状腺癌细胞 TPC-1 的增殖、迁移和侵袭能力；并在甲状腺恶性肿瘤细胞中与 NLRP3 炎性小体存在交互调控，其可能降低了对 NLRP3 的抑制作用，从而激发了 NLRP3 参与的活化调控而诱发了甲状腺癌的发生发展。

【关键词】 miRNA-140-5P；甲状腺癌；增殖；迁移；侵袭

【中图分类号】 R653.2 **【文献标志码】** A **DOI**：10.3969/j.issn.1672-3511.2024.09.006

Expression of miRNA-140-5P in thyroid cancer cells TPC-1 and its effect on proliferation, migration and invasion

LUO Yi[1], LI Yangmin[2], XIAN Tongcheng[1], YANG Mingye[1], WANG Jie[1], SU Qiang[1]

(1. *Beijing Anzhen Nanchong Hospital, Capital Medical University, Nanchong Central Hospital, Nanchong* 637000, *Sichuan, China*;
2. *Department of Gynecology, Jialing Hospital, Nanchong Central Hospital, Nanchong* 637000, *Sichuan, China*)

【Abstract】 Objective To explore the role of miR-140-5p in the development of thyroid cancer and its molecular biological regulation mechanism, the regulatory mechanism of miRNA-140-5P on the invasion and migration of thyroid cancer cells (TPC-1). **Methods** From January 2021 to January 2022, 36 cases of thyroid malignant tumor and 32 cases of benign tumor were collected. The mRNA expression level of miRNA-140-5P in thyroid malignant and benign tumor tissues was detected by qt-PCR, and the protein expression level of miRNA-140-5P in thyroid malignant and benign tumor cells was detected by WB assay. The difference of miRNA-140-5P expression in the two tissues was evaluated; The experiment introduced miRNA-140-5Pmimics transfected cells, Transwell cell experiment, CCK-8 to detect the migration, invasion and proliferation of thyroid tumor cells. The experiment detected NLRP3 inflammatory corpuscles in thyroid cancer cells (TPC-1), and intervened in the expression of NLRP3 to evaluate the regulatory relationship between miR-140-5P and NLRP3 in thyroid cancer cells. **Results** miRNA-140-5P showed low expression in thyroid malignant tumor tissues and cells ($P<0.05$). However, miRNA-140-5Pmimics could enhance the proliferation, migration and invasion of thyroid cancer cell TPC-1, and reduce the expression of inflammatory mediator NLRP3 in thyroid cancer cells.

基金项目：四川省科技厅课题基金项目（2022NSFSC0711）

通讯作者：苏强，E-mail：187169442@qq.com

引用本文：罗义，李阳敏，鲜童丞，等. miRNA-140-5P 在甲状腺癌细胞 TPC-1 中的表达及对其增殖迁移侵袭能力的影响[J]. 西部医学，2024，36(9)：1277-1281. DOI：10.3969/j.issn.1672-3511.2024.09.006

Conclusion miRNA-140-5P can reduce the proliferation, migration and invasion of thyroid cancer cell TPC-1. There is interaction regulation with NLRP3 inflammatory body in thyroid malignant tumor cells, which may reduce the inhibition of NLRP3, thus stimulating the activation regulation of NLRP3 and inducing the occurrence and development of thyroid cancer.

【Key words】 miRNA-140-5P; Thyroid cancer; Proliferation; Migration; Invasion

近年来，甲状腺癌的患病率有逐年上升的趋势。MicroRNA（miRNA）可调节多种生理和病理状况，包括缺氧和氧化应激，由于其可协调细胞氧化还原稳态，因此它们被认为是调节癌症的核心参与者。而miR-140-5p是近几年比较热门且被认为对肿瘤免疫系统具有调节作用的miRNA[1]，研究发现miR-140-5p在胃癌，肾母细胞瘤、喉鳞状细胞癌、非小细胞癌、多发性骨髓瘤及视网膜母细胞瘤等癌组织和细胞中表达异常[2-4]。然而，miR-140-5p在甲状腺癌中的作用相关研究报道较少。因此本研究拟探讨miRNA-140-5P在甲状腺癌中的表达情况，并探索其对甲状腺癌细胞侵袭迁移能力的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料 甲状腺癌细胞株TPC-1购自中国科学院上海细胞所细胞库。将细胞置于5%CO_2、37 ℃恒温培养箱中常规培养，取对数生长期细胞进行实验。组织标本收集2021年1月—2022年1月在南充市中心医院甲状腺外科进行手术的甲状腺肿瘤患者的肿瘤标本，包括良性肿瘤32例、恶性肿瘤36例。组织取材前，取得每位患者的书面同意，并经南充市中心医院医学伦理委员会批准。取材完成后，立即将手术新鲜组织样本放入液氮中保存，随后置于－70 ℃冰箱中保存备用。

1.2 主要试剂及设备 DMEM高糖培养液及培养粉、胎牛血清FBS（美国Gibco公司）；Lipofectamine™2000、双抗（Invitrogen公司）；胰蛋白酶（Sigma-Aldrich）；EDTA.2Na.$2H_2O$（上海华舜生物工程有限公司）；细胞活性检测试剂盒（Dojindo公司）；二甲基亚砜（DMSO）（Sigma-Aldrich公司）；Western及IP细胞裂解液、BCA试剂盒（碧云天公司）。

1.3 实验方法

1.3.1 qRT-PCR 取转染后各组细胞，按照Trizol试剂说明书，提取总RNA。使用紫外/可见光分光光度计测量280 nm下吸光度，对总RNA的质量进行鉴定及测定浓度。用逆转录试剂盒合成cDNA，进行PCR反应扩增。PCR反应用20 μL的反应体系。MiR-140-5p以U6为内参。

1.3.2 Westernblot 用含有1%蛋白酶抑制剂（Sigma-Aldrich Co.）的RIPA缓冲液从G401细胞中提取总蛋白。用二辛可宁酸法（Sigma-Aldrich Co.）进行定量后，将每个样品中的20 μg蛋白质提交至10% SDS-PAGE，然后转移至硝酸纤维素膜（Thermo Fisher Scientific）。接下来，用在含有0.1% Tween 20的Tris缓冲盐水中稀释的5%脱脂牛奶封闭膜，做蛋白标准曲线，计算待测蛋白浓度；SDSPAGE电泳、转膜后，一抗孵育过夜；二抗（稀释度1∶5 000）37 ℃孵育2 h，洗膜。最后，凝胶成像系统拍照并记录。

1.3.3 Transwell侵袭迁移实验 将TPC1细胞接种在六孔板中并孵育过夜，然后用miR-140-5p的模拟物或抑制剂或其阴性对照转染。当汇合度达到100%时，用20 μL移液器吸头进行刮擦。用PBS洗涤细胞数次以去除漂浮细胞，并用不含FBS的新鲜细胞培养基更换培养基。在刮擦步骤后0 h和24 h拍摄照片。对于细胞侵袭，将用miR-140-5p的模拟物或抑制剂或其阴性对照转染的TPC1细胞（1×10^5个细胞悬浮于200 μL培养基中，不含FBS）接种到涂有Matrigel的transwell顶室，600 μL完全培养基同步加入底室。然后，transwell在细胞培养箱中保持48 h。接下来，使用棉签擦拭顶室中的非侵袭性细胞，并将底室中的细胞固定在4%多聚甲醛中，并用0.25%结晶紫染色10 min。使用放大200倍的显微镜在五个随机选择的视野中拍摄照片。

1.3.4 CCK-8法检测细胞增殖 实验采用细胞计数试剂盒8（CCK-8）测定以确定细胞增殖。将各组细胞转染5 d后，去除培养基，向96孔板中加入100 μL CCK-8培养基，37 ℃再孵育4 h。使用酶标仪（Bio-Rad，Richmond，CA，USA）测量450 nm处的吸光度。

1.4 统计学分析 采用SPSS 21.0软件进行统计学分析，计量资料以（$\bar{x}\pm s$）表示，组间两两比较采用t检验，多组间比较采用单因素方差分析法。$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miRNA-140-5P的表达情况及miRNA-140-5P mimics对甲状腺癌细胞TPC-1迁移侵袭能力的影响

为了研究miRNA-140-5P在甲状腺癌发病机制中的作用，本研究利用实时定量PCR法和WB检测甲状腺恶性肿瘤组织、细胞和甲状腺良性肿瘤组织、细胞中miRNA-140-5P的表达情况，结果显示与甲状腺

良性病变组织和细胞中的表达相比，miRNA-140-5P 在甲状腺癌组织和细胞中的表达明显减弱（$P<0.05$），见图 1A、B。实验引入了 miRNA-140-5P mimics 转染细胞，并将细胞分为正常细胞组，TPC-1 组，TPC-1＋NC 组，TPC-1＋mimics 组 4 组。在转染 miRNA-140-5P mimics 后 qRT-PCR 检测 miRNA-140-5P 表达明显增强（$P<0.05$）。进一步采用 WB 检测验证了 miRNA-140-5P 的变化趋势，见图 1C、D、E、F。为进一步明确 miR-140-5p 对甲状腺恶性肿瘤细胞迁移及侵袭性的调节作用，通过 Transwell 迁移及侵袭实验检测 4 组细胞迁移及侵袭能力。结果表明 miRNA-140-5P mimics 可增强 TPC-1 的迁移及侵袭能力（$P<0.05$），见图 1G、H。

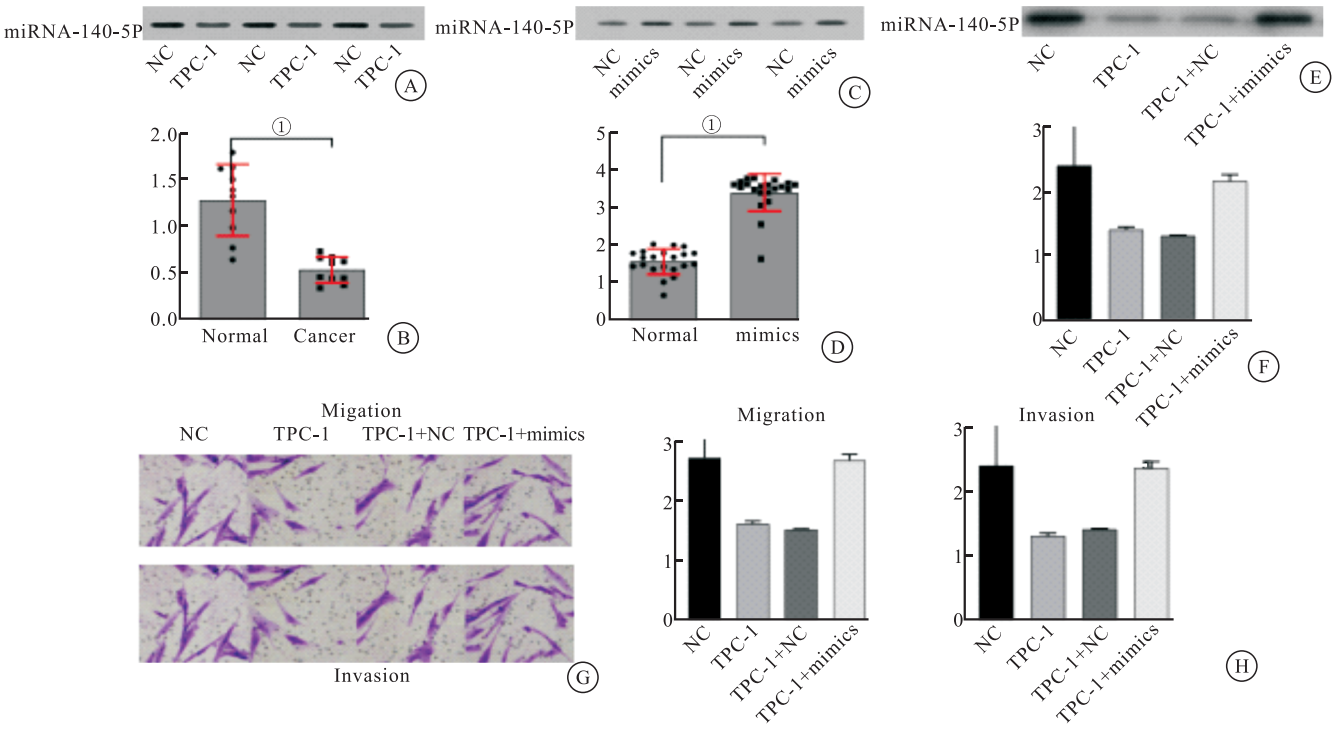

图 1 miRNA-140-5P 的表达情况及 miRNA-140-5P mimics 对甲状腺癌细胞 TPL-1 迁移侵袭能力的影响

Figure 1 Expression of miRNA-140-5P and influence of miRNA-140-5P mimics on migration and invasion of thyroid cancer cells

注：A、B. miRNA-140-5P 在甲状腺癌组织和甲状腺良性肿瘤中的表达情况；C、D. 显示 miRNA-140-5P mimics 转染成功；E、F. miRNA-140-5P mimics 对甲状腺癌细胞中 miRNA-140-5P 表达水平的影响；G、H. miRNA-140-5P mimics 对 TPC-1 细胞迁移侵袭的水平的影响。①$P<0.05$。

2.2 miRNA-140-5P mimics 对甲状腺癌细胞增殖水平的影响 为进一步明确 miRNA-140-5Pmimics 对甲状腺癌 TPC-1 细胞增殖活性的调节作用，本研究进一步通过 CCK-8 检测各组细胞增殖活性水平变化。结果表明 miRNA-140-5P mimics 可增强甲状腺癌 TPC-1 细胞增殖活性水平（$P<0.05$），见图 2。

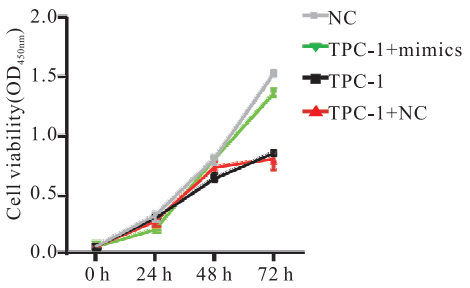

图 2 miRNA-140-5P mimics 对甲状腺癌细胞增殖水平的影响

Figure 2 Effect of miRNA-140-5P mimics on the proliferation level of thyroid cancer cells

2.3 miRNA-140-5P mimicsr 对甲状腺癌细胞中炎性复合体 NLRP3 的影响 为了探索 miRNA-140-5P inhibitor 甲状腺癌影响的机制研究，实验进一步在 TPC-1 中检测 NLRP3 炎性复合体相关蛋白。WB 结果显示，甲状腺癌 TPC-1 中 NLRP3 表达水平受到显著的增强，而在 miR-140-5P mimics 处理后，NLRP3 的表达明显减弱（$P<0.05$），见图 3。

3 讨论

甲状腺癌起病较为隐匿，而肿瘤细胞的迁移侵袭是影响甲状腺癌患者疾病进展的重要危险因素。因此，探索甲状腺癌细胞的迁移侵袭机制并阻断相关通路，抑制其侵袭转移成为改善甲状腺癌预后的有效手段。

MiRNA 是一类小的内源性非编码 RNA 分子，长度为 18～25 核苷酸。MiRNA 通过与各自的 mRNA 8

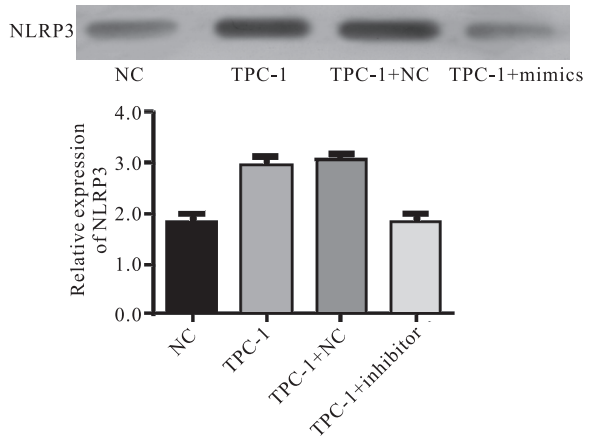

图 3　miRNA-140-5P mimics 对甲状腺癌细胞中炎性复合体 NLRP3 的影响

Figure 3　Effect of miRNA-140-5P mimics on the inflammatory complex NLRP3 in thyroid cancer cells

配对诱导其靶基因的转录后抑制，并广泛参与大多数生理过程的调节，包括细胞凋亡、增殖、存活、细胞周期和分化。鉴于超过 50% 的 miRNA 位于癌症相关基因组区域或脆弱位点，因此它们在许多类型癌症的发病机制中具有重要意义[5-6]。

本研究发现，在甲状腺恶性肿瘤组织和细胞中 miR-140-5p 的表达明显低于良性病变组织。但甲状腺恶性肿瘤细胞转染 miRNA-140-5P mimics 后，miRNA-140-5P 在恶性肿瘤组织和细胞中的表达水平明显增强。表明 miRNA-140-5P 可能参与甲状腺癌细胞功能变化。MiRNA-140-5P 是蛋白质酪氨酸磷酸酶家族的成员，是生长、细胞因子及其他细胞外刺激的下游信号分子。它在体内的各种组织和细胞中均发现有表达，并且与细胞增殖、分化、迁移和凋亡等重要细胞功能变化的调节密切相关[7]。

同一种 miRNA 在不同的肿瘤中可以发挥完全相反的作用，表现为肿瘤促进作用或抑制作用，这是由肿瘤的靶基因和环境所决定的[8]。研究表明，在恶性肿瘤发生发展过程中，细胞的增殖、迁移和侵袭能力不断增强，miR-140-5p 可以作为强有效的肿瘤抑制剂影响恶性肿瘤的形成。本研究发现，与甲状腺正常细胞相比，miR-140-5p 能明显减低 TPC-1 的增殖、迁移和侵袭能力，而 miR-140-5pmimics 能逆转这一现象，表明 miR-140-5P 可能参与了甲状腺癌细胞的功能变化，实验也证实了 miR-140-5p 对甲状腺肿瘤细胞发生发展存在一定的抑制性。研究发现 miR-140-5P 在原发性和转移性乳腺癌组织中下调，其上调明显抑制细胞侵袭和血管生成[9]；参与食管癌细胞的上皮间质化以及迁移侵袭[10]；胃癌组织中上调 miR-140-5P 可显著抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭[11]；过表达的 miR-140 -5P 可通过靶向作用于 PGDFA3 非编码区进一步抑制卵巢癌细胞的增殖等[12]。这些研究均证实 miR-140-5P 在多种实体恶性肿瘤的发生发展中起着一定的作用，但在甲状腺癌细胞功能变化中的具体作用需进一步探讨。

为了进一步明确 miR-140-5P 在甲状腺癌细胞功能变化中的作用及对甲状腺癌形成机制的探讨，实验进一步检测了 TPC-1 中的炎性介质 NLRP3。炎性介质是先天免疫系统的组成部分，研究表明它与多种恶性肿瘤的形成相关，在恶性肿瘤细胞和肿瘤微环境之间的相互作用中发挥关键作用[13]。在众多恶性肿瘤形成起重要作用的炎性介质中，NLRP3 是最具有典型特征的[14-15]，其表达水平的提高可诱导肿瘤细胞的迁移和侵袭[16]，其机制可能是由于 NLRP3 炎症小体的激活，细胞毒性 T 淋巴细胞的比例和活性降低，使肿瘤细胞能够抵抗免疫系统的杀伤作用[17-18]。通过介导半胱氨酸蛋白酶-1 的激活，进一步增加白介素-1β 和白介素-18 的分泌，从而影响肿瘤的发生发展[19]。本研究发现 NLRP3 在与甲状腺正常细胞中相比，其在 TPC-1 中的表达明显增强，但在转染 miR-140-5P mimics 后，NLRP3 在 TPC-1 中的表达明显减弱。研究发现，微小 RNA 介导的转录后调控在基因表达的控制中起重要作用。如 miR-223 可以靶向 NLRP3 mRNA 的 3′-UTR 区域，从而抑制 NLRP3 的翻译和表达[20]。为了防止在体内触发免疫反应，在病毒入侵期间释放微小 RNA 以抑制 NLRP3 炎症小体的激活。来源于 EB 病毒的 MiR-BART15 可以与 MiR-223 结合到相同的 NLRP3′-UTR 区域，以抑制其表达[21-22]。此外，miR-7 和 miR-155 也可能参与 NLRP3 炎症小体激活的调节[23-24]。综合本研究表明 miR-140-5P 在 TPC-1 中的表达弱化，可能降低了对 NLRP3 的抑制作用致其表达增强，从而激发了 NLRP3 参与的的活化调控，使肿瘤细胞能够抵抗免疫系统的杀伤作用，继而诱发其介导的肿瘤形成过程，但具体的形成机制仍需进一步探讨。

4　结论

在甲状腺癌组织和细胞中 miRNA-140-5P 的表达明显减弱，转染 miR-140-5P mimics 后可逆转这一现象。miRNA-140-5P 可降低甲状腺癌细胞 TPC-1 的增殖、迁移和侵袭能力，并在甲状腺恶性肿瘤细胞中与 NLRP3 炎性小体存在交互调控，可能降低了对 NLRP3 的抑制作用，从而激发了 NLRP3 参与的活化调控而诱发甲状腺癌的发生发展。

【参考文献】

[1] LIU Z, HE F, OUYANG S, *et al*. mir-140-5p could suppress tumor proliferation and progression by targeting TGFBRI/SMAD2 /3 and IGF-1R/AKT signaling pathways in Wilms' tumor[J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 405.

[2] FANG Z, YIN S, SUN R, *et al*. mir-140-5p suppresses the proliferation, migration and invasion of gastric cancer by regulating YES1[J]. Mol Cancer, 2017, 16(1): 139.

[3] FLAMINI V, JIANG W G, CUI Y. Therapeutic role of MiR-140-5p for the treatment of non-small cell lung cancer[J]. Anticancer Res, 2017, 37(8): 4319-4327.

[4] INGELMO-TORRES M, LOZANO J J, IZQUIERDO L, *et al*. Urinary cell microRNA-based prognostic classifier for non-muscle invasive bladder cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8 (11): 18238-18247.

[5] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.

[6] GAMMELL P. MicroRNAs: recently discovered key regulators of proliferation and apoptosis in animal cells: identification of miRNAs regulating growth and survival[J]. Cytotechnology. 2007, 53(1-3): 55-63.

[7] KABEKKODU S P, SHUKLA V, VARGHESE V K, *et al*. Clustered miRNAs and their role in biological functions and diseases[J]. Biol Rev, 2018, 93(4): 1955-1986.

[8] VALADI H, EKSTRÖM K, BOSSIOS A, *et al*. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells[J]. Nat Cell Biol, 2007, 9: 654-659.

[9] LU Y, QIN T, LI J, *et al*. MicroRNA-140-5p inhibits invasion and angiogenesis through targeting VEGF-A in breast cancer [J]. Cancer Gene Ther, 2017, 24(9): 386-392.

[10] ZHANG K, SONG H, CHEN J, *et al*. SNHG16/ miRNA-140-5P paxis promotes esophagus cancer cell proliferation, migration and EMT for mation through regulation ZEB1[J]. Oncotarget, 2017, 9(1): 1028-1040.

[11] FANG Z, YIN S, SUN R, *et al*. miRNA-140-5P suppress the proliferation migration and invasion of gastric cancer by regulation YES1[J]. Molcancer, 2017, 16(1): 139-143.

[12] LAN H, CHEN W S, HE G L, *et al*. miRNA-140-5P inhibit so varian cancer growth partially by repression of PDGFRA[J]. Biomed pharmacohther, 2015, 75: 117-122.

[13] GROSS O, POECK H, BSCHEIDER M, *et al*. Syk kinase signalling couples to the Nlrp3inflammasome for ant-i fungal host defence[J]. Nature, 2009, 59: 433-436.

[14] KARKI R, MAN S M, KANNEGANTI T D. Inflammasomes and cancer.[J]. Cancer Immunol Res, 2017, 5(2): 94-99.

[15] THEIVANTHIRAN B, EVANS K S, DEVITO N C, *et al*. A tumorintrinsic PD-L1/NLRP inflammasome signaling pathway drives resistance to anti-PD-1immunotherapy[J]. J Clin Invest, 2020, 130(5): 2570-2586.

[16] XU Y, LI H, CHEN W. *et al*. Mycoplasma hyorhinis activates the NLRP3 inflammasome and promotes migration and invasion of gastric cancer cells[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e77955.

[17] MOOSSAVI M, PARSAMANESH N, BAHRAMI A, *et al*. Role of the NLRP3 inflammasome in cancer[J]. Mol Cancer, 2018, 17: 158.

[18] KARKI R, KANNEGANTI T D. Diverging inflammasome signals in tumorigenesis and potential targeting. [J]. Nat Rev Cancer, 2019, 19(4): 197-214.

[19] HAMARSHEH S, ZEISER R. NLRP3 inflammasome activation in cancer: a double-edged sword. [J]. Front Immunol, 2020, 11: 1444.

[20] BAUERNFEIND F, RIEGER A, SCHILDBERG F A, *et al*. NLRP3 inflammasome activity is negatively controlled by miR-223[J]. J Immunol, 2012, 189: 4175-4181.

[21] HANEKLAUS M, GERLIC M, KUROWSKA-STOLARSKA M, *et al*. Cutting edge: miR-223 And EBV miR-BART15 regulate the NLRP inflammasome and IL-1β production[J]. JImmunol, 2012, 189: 3795-3799.

[22] FAN Z, LU M, QIAO C, *et al*. MicroRNA-7 enhance ssubven tricular Zoneneur ogenesis by inhibiting NLRP3/caspase-1 axis inadult Neuralstem cells. [J]. MolNeurobiol, 2015. DOI: 10.1007/s12035-015-9620-5.

[23] CHEN S, SMITH B A H, IYPE J, *et al*. MicroRNA-155-deficient dendritic cells cause less severe GVHD through reduced migration and defective inflammasome activation [J]. Blood, 2015, 126: 103-112.

[24] ZHANG N P, LIU X J, XIE L, *et al*. Impaired mitophagy triggers NLRP3 inflammasome activation during the progression from nonal coholic fatty liver to nonalcoholic steatohepatitis. [J]. Lab Invest, 2019, 99(7): 749-763.

（收稿日期：2023-03-07；修回日期：2023-12-08；编辑：张翰林）