

LncRNA XIST、miR-204及FN1在甲状腺乳头状癌中的表达及意义

孙茂林¹, 张文伟¹, 姜立伟¹, 臧传善¹, 秦作荣¹, 王效军¹, 孙彦¹, 刘明波^{2*}, 邱杰^{1*}

¹青岛大学附属医院, 山东 青岛

²中国人民解放军总医院海南医院, 海南 三亚

Email: wfqpeter2000@163.com, mingbo666@vip.163.com

收稿日期: 2021年6月7日; 录用日期: 2021年6月28日; 发布日期: 2021年7月12日

摘要

目的: 探讨LncRNA XIST, miR-204及FN1在PTC组织和癌旁组织及LncRNA XIST在PTC细胞系中的表达及意义。方法: 应用Real-time PCR技术检测20例甲状腺乳头状癌和其癌旁组织中LncRNA XIST, miR-204及FN1的表达情况, 应用QPCR检测3株甲状腺癌细胞系(BCPAP, TPC-1, KTC-1) LncRNA XIST, miR-204-5p的表达水平, 应用荧光原位杂交(FISH)检测PTC细胞系BCPAP中LncRNA XIST的表达定位, 应用双荧光素酶报告基因检测人293T细胞的LncRNA XIST、miR-204及FN1相互作用。结果: 与癌旁组相比, PTC癌组织组的LncRNA XIST的表达水平显著上调($p < 0.05$), PTC癌组织组的FN1的表达水平极显著上调($p < 0.01$), 而PTC癌组织组的miR-204-5p的表达水平极显著下调($p < 0.01$), 差异均具有统计学意义; BCPAP细胞的LncRNA XIST的表达水平最高, 且miR-204-5p的表达水平最低; LncRNA XIST主要在细胞质中表达; LncRNA XIST与miR-204有相互作用($p < 0.05$), FN1与miR-204有相互作用($p < 0.05$)。结论: LncRNA XIST在甲状腺乳头状癌中高表达, miR-204在甲状腺乳头状癌中低表达, FN1在甲状腺乳头状癌中高表达; LncRNA XIST, miR-204及FN1相互作用, 参与甲状腺乳头状癌的发生发展, 并可为甲状腺乳头状癌潜在诊断标志物和治疗靶点的寻找提供理论依据, LncRNA XIST可能是甲状腺乳头状癌诊断和治疗的一个新靶点。

关键词

LncRNA XIST基因, miR-204基因, FN1基因, 甲状腺乳头状癌

Expression and Significance of LncRNA XIST, miR-204 and FN1 in Papillary Thyroid Carcinoma

Maolin Sun¹, Wenwei Zhang¹, Liwei Jiang¹, Chuanshan Zang¹, Zuorong Qin¹,
Xiaojun Wang¹, Yan Sun¹, Mingbo Liu^{2*}, Jie Qiu^{1*}

*通讯作者。

文章引用: 孙茂林, 张文伟, 姜立伟, 臧传善, 秦作荣, 王效军, 孙彦, 刘明波, 邱杰. LncRNA XIST、miR-204 及 FN1 在甲状腺乳头状癌中的表达及意义[J]. 临床医学进展, 2021, 11(7): 3033-3046. DOI: 10.12677/acm.2021.117441

¹Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

²Hainan Hospital of Chinese People's Liberation Army General Hospital, Sanya Hainan

Email: *wfqpeter2000@163.com, *mingbo666@vip.163.com

Received: Jun. 7th, 2021; accepted: Jun. 28th, 2021; published: Jul. 12th, 2021

Abstract

Objective: To investigate the expression and significance of LncRNA XIST, miR-204 and FN1 in PTC tissues and adjacent tissues, and LncRNA XIST in PTC cell lines. **Method:** The expression of LncRNA XIST, miR-204 and FN1 in 20 cases of papillary thyroid carcinoma and its adjacent tissues were detected by Real-time PCR technology, and 3 thyroid cancer cell lines (BCPAP, TPC-1, KTC-1) were detected by QPCR, the expression levels of LncRNA XIST and miR-204-5p were detected by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) to detect the expression and location of LncRNA XIST in the PTC cell line BCPAP, and double luciferase reporter gene was used to detect the interaction of LncRNA XIST, miR-204 and FN1 in human 293T cells. **Result:** The expression level of LncRNA XIST in the PTC cancer tissue group was significantly increased in comparison with the adjacent group ($p < 0.05$), the expression level of FN1 in the PTC cancer tissue group was extremely significantly up-regulated ($p < 0.01$), while the expression level of miR-204-5p in the PTC cancer tissue group was extremely significantly down-regulated ($p < 0.01$), the differences are statistically significant; the expression level of LncRNA XIST in BCPAP cells was the highest, and the expression level of miR-204-5p was the lowest; LncRNA XIST was mainly expressed in the cytoplasm; LncRNA XIST interacted with miR-204 ($p < 0.05$), and FN1 interacted with miR-204 ($p < 0.05$). **Conclusion:** LncRNA XIST is highly expressed in papillary thyroid carcinoma, miR-204 is low expressed in papillary thyroid carcinoma, and FN1 is highly expressed in papillary thyroid carcinoma; the interaction between LncRNA XIST, miR-204 and FN1 is involved in the occurrence and development of thyroid papillary carcinoma, and can provide a theoretical basis for the search of potential diagnostic markers and therapeutic targets for thyroid papillary carcinoma. LncRNA XIST may be a new target for the diagnosis and treatment of thyroid papillary carcinoma.

Keywords

LncRNA XIST Gene, miR-204 Gene, FN1 Gene, PTC

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

甲状腺癌是最常见的甲状腺恶性肿瘤,全身恶性肿瘤中约 3%是甲状腺癌,甲状腺癌的发病率近年来呈上升趋势[1]。甲状腺癌按照病理分类可分为甲状腺乳头状癌(PTC)、未分化癌(ATC)、髓样癌(MTC)及滤泡状癌(FTC) [2] [3]。其中, PTC 是最常见的甲状腺癌类型, 占所有甲状腺癌病例的 75%至 85% [4],与其他病理类型相比, PTC 分化好, 生长缓慢, 恶性程度低, 因此总体预后相对较好, 5 年生存率可达 96%以上[5]。流行病学研究发现, 相对男性而言, 女性更容易罹患 PTC, 男女患病比例约为 1:2.5 [6]。然而, PTC 可能较早出现颈部淋巴结转移, 因此, 尽早诊断 PTC 并加以积极治疗非常重要。

临幊上 PTC 的诊断一般通过病理切片证实。典型的 PTC 具有特征性核形态的乳头状结构, 在病理切

片中清晰可见。然而，仅仅通过病理学诊断，可能会将 PTC 与其他甲状腺良性病变，如结节性甲状腺肿、乳头状生长的甲状腺腺瘤或桥本氏甲状腺炎混淆，造成误诊及过度治疗。因此，近几年来逐渐发展出一些 PTC 和良性甲状腺肿瘤伴有乳头状增生的鉴别诊断的标志物，如 CK19、Galectin-3 及 HBME1 [7]。但由于它们的敏感性和特异性相对较低，在临床应用上受到限制。有研究显示 *Braf^{V600E}* 基因在甲状腺癌中的突变率很高，且特异性较高，可用于甲状腺癌的早期诊断[8]，但对于甲状腺癌具体分型的诊断仍需探索，因此，寻找新的 PTC 潜在诊断标志物，有利于 PTC 早期诊断，具有重要的临床意义。

非编码 RNA (Non-coding RNAs)即不能翻译成蛋白质的功能性 RNA 分子，约占人类基因组的 98%，广泛参与人体生理、病理活动，与多种肿瘤密切相关。根据 RNA 分子大小，非编码 RNA 可分为长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA)和短链非编码 RNA (包括 miRNA、siRNA 和 piRNA)两类[9]。lncRNA 是一类转录本长度超过 200 个核苷酸的功能性 RNA 分子。由于其缺少编码蛋白质的能力，一度被认为是“垃圾” RNA [10]。而随着研究的深入，研究人员逐渐发现，lncRNA 是生命体中含有丰富信息的“暗物质”，这些信息仍有待探索。证据表明，lncRNA 通过多种方式(如转录调控、转录后调控及表观遗传学等)调控基因的表达水平，从而在生物的发育、癌症、疼痛和炎症等过程发挥作用[11]。MiRNA 是短链非编码 RNA，长度一般为 18~22 个核苷酸，主要通过其“种子序列”与靶基因 3'端非翻译区域互补结合，裂解 mRNA 或抑制其翻译过程，从而参与肿瘤发生和发展[12]。作为非编码 RNA 研究领域的热点，越来越多的研究表明曾被认为是基因组转录“噪音”的 lncRNA 逐步成为解释疾病发生、发展机制，作为诊断、预后判断和治疗靶点的新的候选分子。此研究旨在验证 PTC 中 lncRNA XIST、miR-204-5p 和 FN1 的表达、相互作用及细胞定位，寻找甲状腺乳头状癌潜在诊断标志物，并为临床靶向治疗 PTC 提供新资料、方法奠定基础。

2. 资料与方法

2.1. 研究对象

① 收集 2019 年 7 月至 2020 年 8 月期间在青岛大学附属医院行甲状腺切除患者的手术标本，所有患者均有完整临床资料。将所有患者分为甲癌和癌旁 2 组，甲状腺乳头状癌(甲癌组) 20 例、配对癌旁正常组织(癌旁组)(癌旁组织取自距癌灶边缘 > 0.8 cm 的位置) 20 例，以上所有甲状腺标本均经我院病理科确诊，并且患者均签署实验知情同意书。② 3 株甲状腺乳头状癌细胞系(BCPAP, TPC-1, KTC-1)。③ 人 293T 细胞。

2.2. 纳入标准

① 各项临床资料完整；② 无其他恶性肿瘤病史；③ 无桥本甲状腺炎病史；④ 无内分泌相关疾病病史；⑤ 术前无放疗、化疗治疗史及甲状腺手术史；⑥ 无严重的心脑血管疾病。

2.3. 研究方法

2.3.1. 仪器和试剂

RNA 提取试剂等来自 TAKARA 公司，PCR 反应膜来自 ABI 公司，DMEM 培养基等来自 Gibco 公司；BCPAP、TPC-1、KTC-1 细胞及 293T 细胞来自中科院细胞库，FISH 探针等来自广州锐博生物，引物由上海生工合成，PAGE 纯化。

2.3.2. 实验方法

1) PTC 癌组织及其癌旁组织中 lncRNA XIST, miR-204 及 FN1 表达水平检测

将新鲜组织 50~100 mg 研磨至糜状，Trizol 法提取组织总 RNA，而后进行逆转录得到 RNA 总量，

将产物 cDNA 取出后利用无酶水稀释至 500 μl 并保存待用, miRNA 逆转录反应体系为 10 μl , 包含 RT-Primer (10 μM) 3 μl 、dNTP Mixture (10 mM each) 1 μl 、RNA 500~1000 ng、RNase Free 水 up to 10 μl , 反应条件: 65°C, 5 min, 冰上预冷。在上述反应管中配制下列反转录反应液, 总量为 20 μl , 包括上述变性后反应液 10 μl 、5 \times PrimeScript II Buffer 4 μl 、RNase Inhibitor (40 U/ μl) 0.5 μl (20 U)、PrimeScript II RTase (200 U/ μl) 1 μl (200 U)、RNase Free 水 up to 20 μl , 移液器轻轻混匀上述配制的反应液, 短暂离心后按下列条件进行反转录反应: 42°C, 60 min, 95°C, 5 min (酶失活), 将反转录产物放在冰上冷却备用。mRNA 逆转录反应体系为 20 μl , 包括 5 \times primeScript RT Master Mix (perfect Real Time) 4 μl 、Total RNA 0.5 μg 、RNase Free 水 up to 20 μl , 反应条件: 37°C, 60 min, 85°C, 5 s, 将反转录产物放在冰上备用。而后进行 qPCR 检测, 其中 lncRNA XIST 正向引物: 5'-GACACAAGGCCAACGACCTA-3', 反向引物: 5'-TCGCTTGGGTCCCTATCCA-3'; hsa-miR-204-5p 正向引物: 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGGATACGACaggcat-3'; hsa-miR-204-5p 反向引物: GCGCGttcccttgcattcct, 引物由上海生工合成, PAGE 纯化, PCR 反应条件: 温度 50°C、2 min; 95°C、2 min; 95°C、15 s; 60°C、60 s, 共重复 40 个循环, 每个样本重复测量 3 次取平均 Ct 值, 相对定量采用 2- $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法, $\Delta\text{Ct} = \text{Ct(目的基因)} - \text{Ct(管家基因)}$, $\Delta\Delta\text{Ct} = \text{实验组 } \Delta\text{Ct} - \text{对照组 } \Delta\text{Ct}$ 。

2) QPCR 检测 3 株甲状腺癌细胞系(BCPAP, TPC-1, KTC-1) lncRNA XIST、miR-204-5p 的表达水平

(1) RNA 提取: ① 将收集的细胞样本, 加入 1000 μl RNAiso Plus (Trizol) 充分裂解, 随后加入 200 μl 氯仿, 振荡混匀后室温放置 5 min。② 4°C, 12000 g 离心 15 min, 吸取上层水相, 至另一离心管中。③ 加入 0.5 ml 异丙醇混匀, 4°C, 12000 g 离心 10 min, 弃上清, RNA 沉于管底。④ 加入 1 ml 75% 乙醇, 温和颠倒离心管, 4°C, 7500 g 离心 5 min, 尽量弃上清。⑤ 室温晾干 10 min, 用 20 μl DEPC H₂O 溶解 RNA 沉淀。⑥ 检测 RNA 纯度和浓度: 以 DEPC H₂O 为对照(Blank), 取 2 μl RNA 溶液于分光光度计检测。DEPC H₂O 为对照(Blank), 取 2 μl RNA 溶液于酶标仪上检测样本浓度和质量。

(2) miRNA 反转录: 按照试剂盒说明书, 配制如下 10 μl 体系: RT-Primer (10 μM), 3 μl ; dNTP Mixture (10 mM each), 1 μl ; RNA, 500~1000 ng; RNase Free 水, up to 10 μl 。反应条件: 65°C, 5 min, 冰上预冷。在上述反应管中配制下列反转录反应液, 总量为 20 μl : 上述变性后反应液 10 μl ; 5 \times PrimeScript II Buffer, 4 μl ; RNase Inhibitor (40 U/ μl), 0.5 μl (20 U); PrimeScript II RTase (200 U/ μl), 1 μl (200 U); RNase Free 水, up to 20 μl 。移液器轻轻混匀上述配制的反应液, 短暂离心后按下列条件进行反转录反应: 42°C, 60 min; 95°C, 5 min (酶失活), 将反转录产物放在冰上冷却备用。

(3) mRNA 反转录: 按照试剂盒说明书, 配制如下 20 μl 体系: 5 \times primeScript RT Master Mix (perfect Real Time), 4 μl ; Total RNA, 0.5 μg ; RNase Free 水, up to 20 μl 。反应条件: 37°C, 60 min; 85°C, 5 s, 将反转录产物放在冰上备用。

(4) 荧光定量 PCR 扩增: 按照试剂盒说明书, 配制如下 PCR 扩增反应体系: SYBR Premix EX Taq (2 \times), 10 μl ; Forward primer, 10 μM , 1 μl ; Reverse primer, 10 μM , 1 μl ; cDNA, 2 μl ; ddH₂O, up to 20 μl 。用 ABI ViiA7 荧光定量 PCR 仪进行 Real time PCR 反应, 程序如下: 50.0°C, 2 min; 95.0°C, 2 min; 95.0°C for 15 s; 60.0°C for 60 s, 共重复 40 个循环。熔解条件: 95.0°C for 15 s; 60.0°C for 60 s; 95.0°C for 15 s。

引物信息

引物名称	引物序列(5'-3')
颈环法通用下游引物	GTGCAGGGTCCGAGGT
hsa-U6-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGGATACGACAAAATATG
hsa-U6-F	CTCGCTTCGGCAGCACA

Continued

hsa-U6-R	AACGCTTCACGAATTGCGT
GAPDH-hF	TGACAACTTGGTATCGTGGAGG
GAPDH-hR	AGGCAGGGATGATGTTCTGGAGAG
lncRNA XIST-hF	GACACAAGGCCAACGACCTA
lncRNA XIST-hR	TCGCTTGCGCCTCTATCCA
hsa-miR-204-5p-JH	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGGCAT
hsa-miR-204-5p-F	GCGCGTTCCCTTGTACATCCT

3) BCPAP 细胞培养及荧光原位杂交(FISH)

BCPAP 细胞培养: 当细胞密度达 80%~90%时进行传代。在超净工作台中吸弃细胞培养上清, 用无菌 1×PBS 洗涤细胞 1 次, 加入胰蛋白酶 1~2 ml, 轻轻晃动, 保证胰蛋白酶充分接触细胞, 在倒置显微镜下观察, 细胞间隙增大开始脱落时, 加入新鲜培养液终止消化, 滴管吹打细胞使其全部脱落, 转移细胞悬液于离心管中, 1000 rpm 离心 5 min, 然后弃去上清, 加新鲜的培养液并吹打成细胞悬液, 按 1:2 传代至新培养瓶中, 补充培养液, 继续培养。细胞培养基: 1640 + 10% FBS + 1% PS。

荧光原位杂交(FISH)实验: (1) 细胞培养: 将细胞爬片置于 24 孔板孔底, 培养适量细胞(6×10^4 /孔)。实验前使细胞融合度达到 60%左右。(2) 细胞固定与通透: a. 用 1× PBS 清洗细胞 5 min; b. 用 4%多聚甲醛室温固定 10 min; c. 用 1× PBS 清洗细胞 5 min, 共 3 次; d. 每孔加入 1 ml 预冷的通透液(含 0.5% Triton X-100 的 PBS), 4°C 静置 5 min; e. 弃去通透液后, 加入 1 × PBS 清洗细胞 5 min, 3 次。(3) 探针检测: a. 每孔加入 200 μ l 预杂交液, 37°C 封闭 30 min; b. 弃去每孔细胞中的预杂交液, 加入 100 μ L 含有探针的探针杂交液(避光条件下, 把 2.5 μ l 20 μ M FISH Probe Mix 储存液加入到 100 μ l 杂交液中), 避光, 37°C 杂交过夜; c. 避光, 42°C, 杂交洗液 I 清洗每孔细胞 3 次, 每次 5 min; d. 避光, 42°C, 杂交洗液 II 清洗细胞 1 次; e. 避光, 42°C, 杂交洗液 III 清洗细胞 1 次; f. 避光, 1× PBS 清洗细胞, 室温 5 min。(4) 封片: 避光条件下, 从孔中小心取出细胞爬片, 用封片剂(含 DAPI)将其固定于载玻片上, 荧光显微镜拍照检测。

4) 293T 细胞复苏、传代及双荧光素酶报告基因检测

293T 细胞复苏及传代: 从液氮罐中取出 293T 细胞, 迅速置于 37°C 水浴, 并不断振荡使其融化, 消毒冻存管表面后, 在超净台中将细胞悬液转移至无菌离心管中, 补加培养液 5 ml, 轻轻吹打成细胞悬液后, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入培养液吹打, 吸取悬液至 25 ml 培养瓶内, 置于细胞培养箱中培养, 次日换液, 观察细胞贴壁情况。细胞培养液配制如下: 45 ml DMEM + 5 ml FBS + 500 μ l 双抗。当细胞密度达 80%~90%时进行传代。在超净工作台中吸弃细胞培养上清, 用无菌 1 × PBS 洗涤细胞 1 次, 加入胰蛋白酶 1 ml, 轻轻晃动, 保证胰蛋白酶充分接触细胞, 在倒置显微镜下观察, 细胞间隙增大开始脱落时, 加入新鲜培养液终止消化, 滴管吹打细胞使其全部脱落, 转移细胞悬液于离心管中, 1000 rpm 离心 5 min, 然后弃去上清, 加新鲜的培养液并吹打成细胞悬液, 按 1:2 传代至新培养瓶中, 补充培养液, 继续培养。

质粒构建及抽提: 化学合成人 LncRNA XIST 序列, 连接至 psiCHECK2 质粒中, 构建 psiCHECK2-lncRNA XIST-WT 和 psiCHECK2-lncRNA XIST-MUT 质粒;

化学合成人 FN1 3'UTR WT (野生型)及 MUT (突变)序列, 连接至 pGL3-promoter 质粒中, 构建 pGL3-FN1-WT 和 pGL3-FN1-MUT 质粒。

摇菌：配制 LB 培养液：称取 7.5 g LB Broth Medium，加入 300 ml ddH₂O，混匀后，高温高压消毒灭菌后室温放置。用无菌牙签或枪头挑穿刺菌落，至含有抗生素的 LB 液体培养基(15~30 ml)中，摇菌 12~14 hr 左右(220 rpm, 37°C)。

质粒提取：具体步骤参见 Omega 试剂盒步骤：(1) 取 10~15 ml 的菌液，室温下 4000g 离心 10 分钟，收集菌体。(2) 弃培养液，往沉淀中加入 500 μl Solution I/RNase A，涡旋振荡使细胞完全重新悬浮。(3) 将细胞悬液转移至新的 2 ml 离心管中。(4) 加入 500 μl Soulution II，轻柔的上下颠倒混匀 8~10 次，室温静置 2~3 分钟，不应超过 5 分钟。(5) 加入 250 μl 预冷的 N3 buffer，轻柔的上下颠倒混匀离心管数次，直至形成白色絮状沉淀。室温静置 2 分钟。(6) 室温 13000g 离心 10 分钟。(7) 收集上清到新的 1.5 ml 离心管中。(8) 加入 0.1 倍体积的 ETR Solution，上下颠倒混匀 10 次，裂解液变浑浊，然后冰浴静置 10 分钟后将逐渐澄清。(9) 将上述裂解液于 42°C 水浴 5 分钟。裂解液将再次出现浑浊。(10) 室温 12000g 离心 3 分钟。ETR 溶液将在底部形成蓝色分层。(11) 将上清转移至新的 1.5 ml 离心管中，加入 0.5 倍体积的无水乙醇，轻轻上下颠倒混匀 6~7 次，室温静置 2 分钟。(12) 把 HiBind DNA MiniColumn II 套入 2 ml 收集管中。(13) 转移步骤 11 得到的混合液 700 μl 到结合柱中，室温 13000g 离心 1 分钟，弃滤液。(14) 重复步骤 13，直至步骤 11 所得混合液全部结合到结合柱中。(15) 加入 500 μl HBC Buffer，室温 13000g 离心 1 分钟，弃滤液。(16) 加入 700 μl DNA Wash Buffer，室温 13000g 离心 1 分钟，弃滤液。(17) 加入 700 μl DNA Wash Buffer，室温 13000 g 离心 1 分钟，弃滤液。(18) 室温 13000 g 离心 1 分钟，空甩。(19) 把 HiBind DNA MiniColumn II 套入新的 1.5 ml 离心管，加入 120 μl H₂O，室温下静置 3 分钟，室温 13000g 离心 1 分钟。(20) 用紫外分光光度计测量质粒浓度及纯度。-20°C 保存。

双荧光素酶报告基因检测：细胞种板：收集培养至对数生长期的 293T 细胞，用无 PS 的完全培养液重悬细胞，细胞计数，按每孔 1×10^4 个细胞，将细胞接种至 96 孔板中，放置细胞培养箱中静置培养过夜。转染：(1) 细胞换成无血清培养基，每孔 500 μl (2) a1: Lipofectamin 3000 (0.2 μl/孔) + 无血清 Opti-MEM 培养基(10 μl/孔); b1: miRNA-204-5p mimic 或 NC (100 nM) + psiCHECK2-LncRNA XIST-WT 或 psiCHECK2-LncRNA XIST-MUT 或 psiCHECK2 空载(0.4 μg/孔) + 无血清 OMEM 培养基(10 μl/孔); a2: Lipofectamin 3000 (0.2 μl/孔) + 无血清 OMEM 培养基(10 μl/孔); b2: miRNA-204-5p mimic 或 NC (100 nM) + pGL3-FN1 3'UTR WT 或 pGL3-FN1 3'UTR MUT 或 pGL3-Promoter 空载(0.4 μg/孔) + pRL-TK (0.2 μg/孔) + 无血清 OMEM 培养基(10 μl/孔)，室温静置 5 min。(3) 将上述中的 a1 和 b1 混合或 a2 和 b2 混合，室温静置 20 min。(4) 更换细胞培养基为无血清培养基，加入制备的转染混合液。6 小时后换液，加入完全培养基常规培养 48 hours，以未转染组为阴性对照组。收样、酶标仪检测：吸尽细胞培养液后，加入 100 μl 的报告基因细胞裂解液，充分裂解后，10,000~15,000g 离心 3~5 分钟，取上清用于测定。融解萤火虫萤光素酶检测试剂和海肾萤光素酶检测缓冲液，并达到室温。海肾萤光素酶检测底物(100×)置于冰浴或冰盒上备用。按照每个样品需 100 μl 的量，取适量海肾萤光素酶检测缓冲液，按照 1:100 加入海肾萤光素酶检测底物(100×)配制成海肾萤光素酶检测工作液。按仪器操作说明书开启化学发光仪或具有检测化学发光功能的多功能酶标仪，将测定间隔设为 2 秒，测定时间设为 10 秒。每个样品测定时，取样品 50 μl，加入 100 μl 萤火虫萤光素酶检测试剂，用枪打匀或用其它适当方式混匀后测定 RLU (relative light unit)。在完成上述测定萤火虫萤光素酶步骤后，加入 100 微升海肾萤光素酶检测工作液，用枪打匀或用其它适当方式混匀后测定 RLU (relative light unit)。

2.4. 统计学处理

作图软件为 Graphpad prism 5 (Graphpad Software, San Diego, CA); 荧光定量软件为 Image J，数据分析软件 Graphpad prism 5 (Graphpad Software, San Diego, CA); t-test 分析 LncRNA XIST, miR-204 及 FN1

三者在 PTC 癌组织及癌旁组织的表达差异(表 1)，以单因素方差分析和 TUKEY 法进行事后检验研究 LncRNA XIST，miR-204 在 BCPAP、TPC-1 及 KTC-1 三组细胞系中的表达差异(表 2)，以双因素方差分析和 TUKEY 法进行事后检验研究人 293T 细胞中 LncRNA XIST 与 miR-204、FN1 与 miR-204 的关系(表 3)。以 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 为显著性差异和极显著性差异的筛选标准。

3. 结果

① 甲状腺乳头状癌及癌旁组织中 LncRNA XIST 和 miR-204-5p 的表达比较：荧光定量 PCR 结果表明，与癌旁组相比，癌组织组的 LncRNA XIST 的表达水平显著上调($p < 0.05$) (图 1)；与癌旁组相比，癌组织组的 miR-204-5p 的表达水平极显著下调($p < 0.01$) (图 2)；与癌旁组相比，癌组织组的 FN1 的表达水平极显著上调($p < 0.01$) (图 3)，差异均具有统计学意义。

② 荧光定量 PCR 结果表明，三组细胞系(BCPAP、TPC-1 及 KTC-1)中，LncRNA XIST 的表达，BCPAP 细胞表达水平比 TPC-1 细胞($p < 0.05$)及 KTC-1 细胞($p < 0.01$)显著上调，且 miR-204-5p 的表达，BCPAP 细胞表达水平比 TPC-1 细胞($p < 0.05$)及 KTC-1 细胞($p < 0.01$)显著下调，差异均具有统计学意义。BCPAP 细胞的 LncRNA XIST 的表达水平最高(图 4)，且 miR-204-5p 的表达水平最低(图 5)，故选择该细胞开展后续实验。

③ LncRNA XIST 主要在细胞质中表达(图 6~8)。

④ LncRNA XIST 与 miR-204 有相互作用($p < 0.05$)，FN1 与 miR-204 有相互作用($p < 0.05$) (图 10~图 13)。

Table 1. LncRNA XIST, miR-204 and FN1 t-test

表 1. LncRNA XIST, miR-204 和 FN1 t-test

	检验方式	t 值
MiR-204-5p	T 检验	$t = 3.309$
LncRNA XIST	T 检验	$t = 3.046$
FN1	T 检验	$t = 6.257$

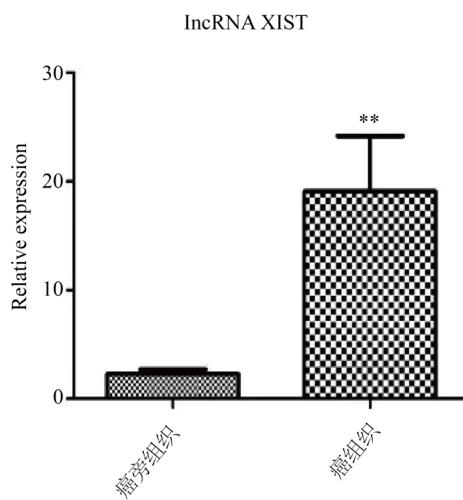


Figure 1. Expression of LncRNA XIST in papillary thyroid carcinoma and adjacent tissues

图 1. 甲状腺乳头状癌及癌旁组织中 LncRNA XIST 的表达

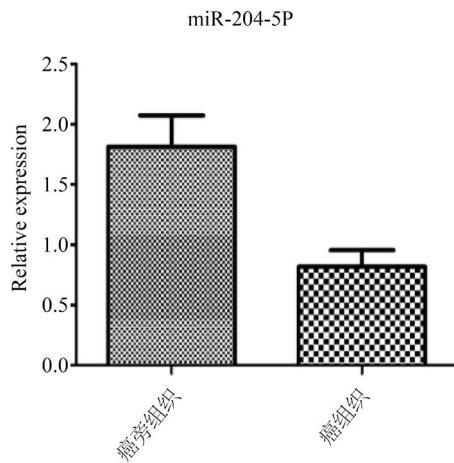


Figure 2. The expression of miR-204-5p in papillary thyroid carcinoma and adjacent tissues

图2. 甲状腺乳头状癌及癌旁组织中 miR-204-5p 的表达

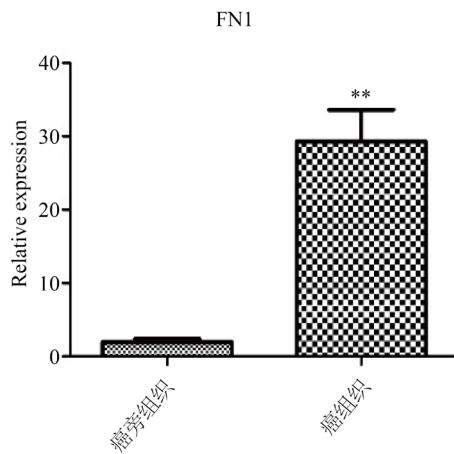


Figure 3. Expression of FN1 in papillary thyroid carcinoma and adjacent tissues

图3. 甲状腺乳头状癌及癌旁组织中 FN1 的表达

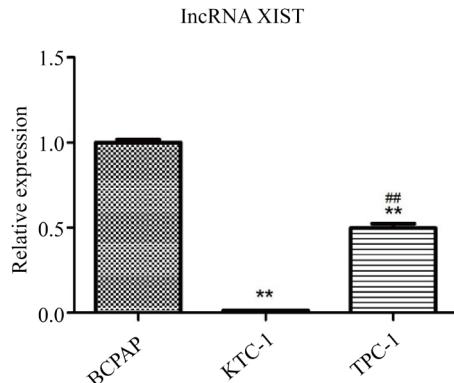


Figure 4. The expression of LncRNA XIST in BCPAP, TPC-1 and KTC-1

图4. BCPAP、TPC-1 及 KTC-1 中 LncRNA XIST 的表达

Table 2. LncRNA XIST, miR-204 one-way analysis of variance
表 2. LncRNA XIST, miR-204 单因素方差分析

	检验方式	F 值
MiR-204-5p	单因素方差分析	F = 170.7
LncRNA XIST	单因素方差分析	F = 733.6

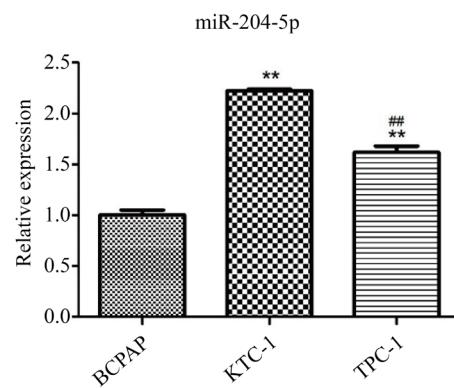


Figure 5. The expression of miR-204-5p in BCPAP, TPC-1 and KTC-1

图 5. BCPAP、TPC-1 及 KTC-1 中 miR-204-5p 的表达

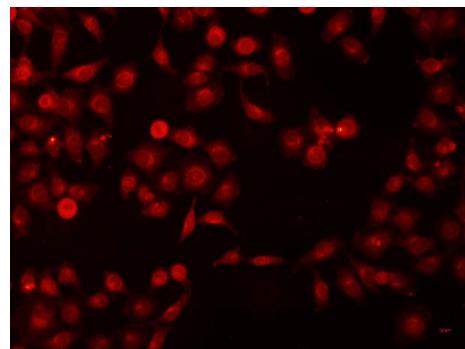


Figure 6. Results of *in situ* hybridization (FISH)—LncRNA XIST (300×)

图 6. 原位杂交(FISH)结果——LncRNA XIST (300×)

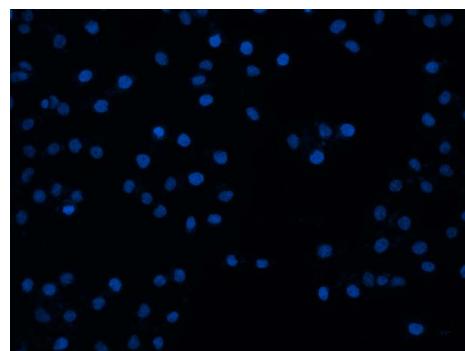


Figure 7. Results of *in situ* hybridization (FISH)—DAPI (300×)

图 7. 原位杂交(FISH)结果——DAPI (300×)

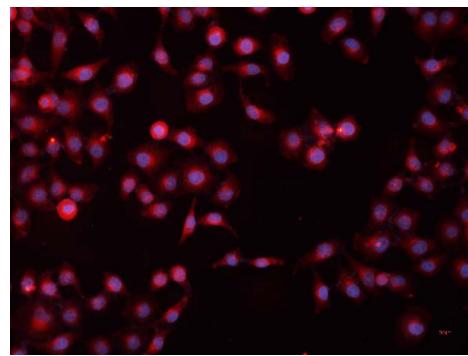


Figure 8. Results of *in situ* hybridization (FISH)—Merge (300×)

图 8. 原位杂交(FISH)结果——Merge (300×)

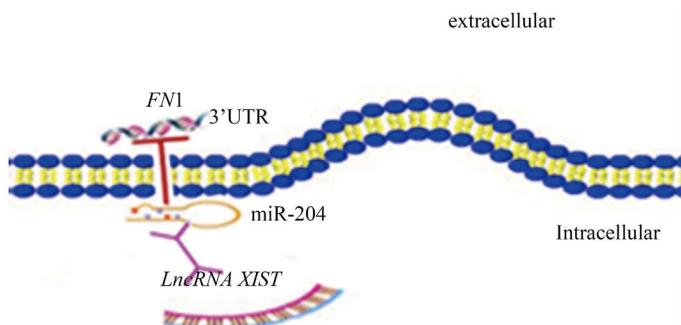


Figure 9. LncRNA XIST indirectly regulates the expression of FN1 by competitively binding miR-204, and participates in the development of PTC

图 9. LncRNA XIST 通过竞争性结合 miR-204，间接调控 FN1 的表达，参与 PTC 发生发展

Table 3. Two-way analysis of variance of LncRNA XIST, miR-204 and FN1

表 3. LncRNA XIST、miR-204 及 FN1 双因素方差分析

	检验方式	F 值
LncRNA-miRNA 交互作用的统计	双因素方差分析	F = 5.870
FN1-miRNA 交互作用的统计	双因素方差分析	F = 6.966

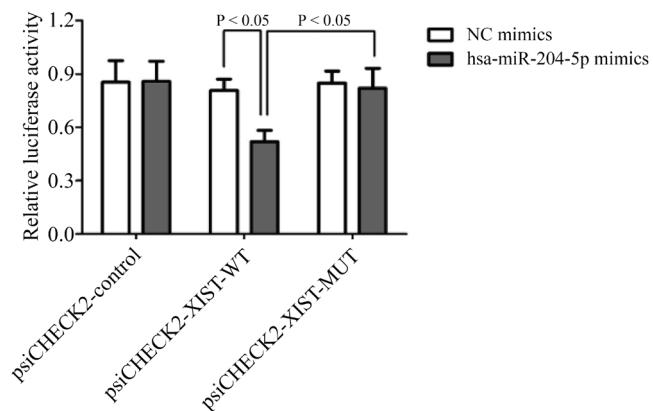
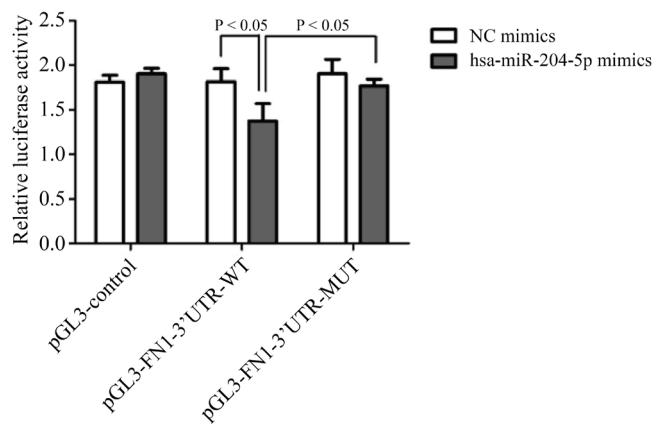
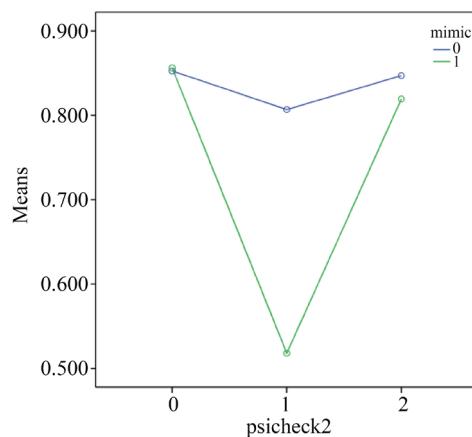
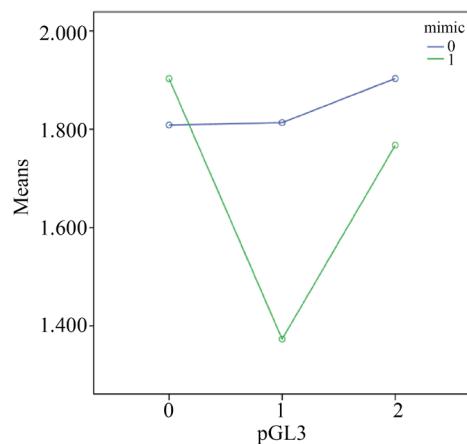


Figure 10. LncRNA XIST interacts with miR-204

图 10. LncRNA XIST 与 miR-204 有相互作用

**Figure 11.** FN1 interacts with miR-204**图 11.** FN1 与 miR-204 有相互作用**Figure 12.** LncRNA XIST and miR-204 dual luciferase reporter gene detection results**图 12.** LncRNA XIST 与 miR-204 的双荧光素酶报告基因检测结果**Figure 13.** FN1 and miR-204 dual luciferase reporter gene detection results**图 13.** FN1 与 miR-204 的双荧光素酶报告基因检测结果

4. 讨论

LncRNA XIST 位于 X 染色体上，是最早发现的非编码 RNA 之一。早在 20 年前，它就被确定为一个沉默因子。研究人员发现 LncRNA XIST 通过在 X 染色体上扩展来沉默基因[13]。Engreitz 等人研究发现 Xist 在诱导 X 染色体失活期间，通过利用 X 染色体的三维构象识别结合区域，在 X 染色体广泛结合，从而阻止 X 染色体上的基因转录[14]。进一步的研究发现，LncRNA XIST 通过与 SHARP 直接结合，招募 SMRT，激活了 HDAC3，将组蛋白去乙酰化以使 RNA 聚合酶 II 不能结合 X 染色体[15]。因此，我们推测 LncRNA XIST 在 PTC 中异常高表达可能是 PTC 在女性患者中发病率显著高于男性原因之一。

miR-204 是定位于人类第 9 号染色体 73424891~73425000 位之间。在肿瘤组织中 miR-204 存在异常表达，miR-204 与肿瘤增殖、转移、化疗抵抗及不良预后关系密切[16] [17] [18] [19]。

FN1 是在血浆中发现的细胞外基质可溶性蛋白质，在伤口愈合、胚胎发育等 EMT 相关过程中表达量均有增加。上皮 - 间质细胞转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)是指上皮细胞获得特定的遗传变化及生物学特性，并逐步转变为间充质表型的过程。在胚胎发育、组织重建、慢性炎症以及癌症发生及转移等疾病中发挥了重要作用。在 EMT 期间，上皮细胞失去细胞极性并实现间充质表型，从而增加细胞侵袭和迁移能力[20]。EMT 主要特征有上皮细胞标志物表达量降低，如 E-钙黏蛋白(E-cadherin)，而间质细胞标志物表达量增加，如 N-钙黏蛋白(N-cadherin)，FN1、Snail、波形蛋白(Vimentin) [21]。除了我们所研究的 PTC 外，在乳腺癌、头颈部鳞状细胞癌、恶性外周神经鞘瘤以及鼻咽癌等等多种恶性肿瘤中均发现 FN1 的表达增高[22] [23] [24] [25]。

大量文献报导，LncRNA XIST 参与了多种癌症的发生发展[26] [27]。研究发现，LncRNA 可能通过诱导基因的表观遗传学修饰或作为 miRNA “海绵” 吸附 miRNA，通过调控靶基因的表达的方式导致疾病发生，这种机制也被称为竞争性内源性 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA)机制[27]。本实验结果提示，与癌旁组相比，癌组织组的 LncRNA XIST 和 FN1 的表达水平显著上调，而癌组织组的 miR-204-5p 的表达水平极显著下调，查阅文献发现，Ab Mutalib 等人通过分析 TCGA 的数据，筛选出 hsa-miR-204 在 PTC 中显著下调[28]。实验结果显示 LncRNA XIST 与 miR-204 及 FN1 与 miR-204 有相互作用，同时应用 Starbase 2.0 数据库，我们发现 LncRNA XIST 可以与 miR-204 结合，且 XIST 与 miR-204 结合的位点和 miR-204 与 FN1 结合位点有重叠部分，说明 XIST 与 FN1 可能存在竞争性结合 miR-204 的关系(图 9)，因此，我们推测 LncRNA XIST 在 PTC 中异常高表达可以吸附部分 miR-204 应答原件，从而导致 PTC 的发生发展。我们将在未来的研究中证明这些推测。同时，我们通过荧光原位杂交(FISH)实验证实，LncRNA XIST 主要在细胞质中表达，这将有利于后续实验的开展，便于后续研究其通路，探究其对 PTC 细胞生物学功能的影响。

综上所述，实验证实 LncRNA XIST 和 FN1 在甲状腺乳头状癌中高表达，miR-204 在甲状腺乳头状癌中低表达，LncRNA XIST 主要在细胞质中表达，我们推测 LncRNA XIST 在 PTC 中异常高表达可以吸附部分 miR-204，竞争性阻止 miR-204 对 FN1 的抑制作用，从而促进 FN1 的高表达，进而扰乱上皮 - 间质细胞转化等重要的癌症信号通路，最终导致了 PTC 的发生(图 9)。LncRNA 通过多种方式调控 miRNA 的表达，从而导致肿瘤发生发展[29]，其中一种为 LncRNA 可发挥内源性 miRNA 海绵(miRNA sponge) 的功能，抑制 miRNA 的表达进而影响肿瘤细胞的恶性生物学行为[30]。因此，下调 LncRNA XIST 会降低甲状腺乳头状癌细胞的增殖及上调 miR-204-5p [31]，相反，我们在低表达 PTC 细胞中过表达 LncRNA XIST 可能会导致甲状腺乳头状癌的增殖以及侵袭迁移能力增强[32]。另外，LncRNA XIST 主要在细胞质中表达，便于后续研究其通路，探究其对细胞生物学功能的影响，沉默 LncRNA XIST 有望成为甲状腺乳头状癌治疗新的生物学靶点[33] [34]，LncRNA XIST 可能与甲状腺乳头状癌的转移和恶化等有关[35] [36]

[37]，其分子机制仍有待研究。LncRNA XIST，miR-204 及 FN1 相互作用，参与甲状腺乳头状癌的发生发展，并可为甲状腺乳头状癌潜在诊断标志物和治疗靶点的寻找提供理论依据，并且 LncRNA XIST 可能是甲状腺乳头状癌诊断和治疗的一个新靶点。本实验研究样本量较少，在以后的研究将加大样本量研究 LncRNA XIST 等基因在 PTC 中的作用机制。

基金项目

海南省耳鼻咽喉头颈疾病临床医学研究中心项目(项目编号：HN01ENT07)青岛大学附属医院“临床医学 + X”科研项目(项目编号：3400)。

参考文献

- [1] Siraj, A.K., Hussain, A.R., Alrasheed, M., et al. (2011) Demethylation of TMS1 Gene Sensitizes Thyroid Cancer Cells to TRAIL-Induced Apoptosis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **96**, E215-E224. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-0790>
- [2] Kim, H.I., et al. (2018) Refining the Eighth Edition AJCC TNM Classification and Prognostic Groups for Papillary Thyroid Cancer with Lateral Nodal Metastasis. *Oral Oncology*, **78**, 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2018.01.021>
- [3] Shteinshnaider, M., et al. (2018) Reassessment of Differentiated Thyroid Cancer Patients Using the Eighth TNM/AJCC Classification System: A Comparative Study. *Thyroid*, **28**, 201-209. <https://doi.org/10.1089/thy.2017.0265>
- [4] Londero, S.C., et al. (2013) Papillary Thyroid Microcarcinoma in Denmark 1996-2008: A National Study of Epidemiology and Clinical Significance. *Thyroid*, **23**, 1159-1164. <https://doi.org/10.1089/thy.2012.0595>
- [5] Gong, Y., et al. (2018) MiR-26a Inhibits Thyroid Cancer Cell Proliferation by Targeting ARPP19. *American Journal of Cancer Research*, **8**, 1030-1039.
- [6] Vaisman, F., Corbo, R. and Vaisman, M. (2011) Thyroid Carcinoma in Children and Adolescents-Systematic Review of the Literature. *Journal of Thyroid Research*, **2011**, Article ID: 845362. <https://doi.org/10.4061/2011/845362>
- [7] Wang, X., et al. (2018) A Potential Biomarker hsa-miR-200a-5p Distinguishing between Benign Thyroid Tumors with Papillary Hyperplasia and Papillary Thyroid Carcinoma. *PLoS ONE*, **13**, e0200290. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200290>
- [8] Kim, S.K., Lee, J.H., Woo, J.W., et al. (2015) Prediction Table and Nomogram as Tools for Diagnosis of Papillary Thyroid Carcinoma: Combined Analysis of Ultrasonography, Fine-Needle Aspiration Biopsy, and BRAF V600E Mutation. *Medicine*, **94**, e760. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000760>
- [9] Arjumand, W., Asiaf, A. and Ahmad, S.T. (2018) Noncoding RNAs in DNA Damage Response: Opportunities for Cancer Therapeutics. *Methods in Molecular Biology*, **1699**, 3-21. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7435-1_1
- [10] 余春晖. LncRNA XIST 在原发性胆汁性胆管炎免疫细胞中的作用研究[D]: [硕士学位论文]. 青岛: 青岛大学, 2020.
- [11] Spizzo, R., et al. (2012) Long Non-Coding RNAs and Cancer: A New Frontier of Translational Research. *Oncogene*, **31**, 4577-4587. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.621>
- [12] 李墨林, 贾婷婷, 白晗, 李传刚, 李连宏. MicroRNA 与甲状腺癌发生、发展关系的研究进展[J]. 临床与实验病理学杂志, 2015, 31(7): 794-798.
- [13] Plath, K., et al. (2002) Xist RNA and the Mechanism of X Chromosome Inactivation. *Annual Review of Genetics*, **36**, 233-278. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.36.042902.092433>
- [14] Engreitz, J.M., et al. (2013) The Xist lncRNA Exploits Three-Dimensional Genome Architecture to Spread across the X Chromosome. *Science*, **341**, Article ID: 1237973. <https://doi.org/10.1126/science.1237973>
- [15] McHugh, C.A., et al. (2015) The Xist lncRNA Interacts Directly with SHARP to Silence Transcription through HDAC3. *Nature*, **521**, 232-236. <https://doi.org/10.1038/nature14443>
- [16] Ma, L., Deng, X., Wu, M., et al. (2014) Down-Regulation of miRNA-204 by LMP-1 Enhances CDC42 Activity and Facilitates Invasion of EBV-Associated Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *FEBS Letters*, **588**, 1562-1570. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.02.039>
- [17] Vimalraj, S., Miranda, P.J., Ramyakrishna, B., et al. (2013) Regulation of Breast Cancer and Bone Metastasis by MicroRNAs. *Disease Markers*, **35**, 369-387. <https://doi.org/10.1155/2013/451248>
- [18] Ryan, J., Tivnan, A., Fay, J., et al. (2012) microRNA-204 Increases Sensitivity of Neuroblastoma Cells to Cisplatin

- and Is Associated with a Favourable Clinical Outcome. *British Journal of Cancer*, **107**, 967-976. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.356>
- [19] Zeng, L., Yu, J., Huang, T., et al. (2012) Differential Combinatorial Regulatory Network Analysis Related to Venous Metastasis of Hepatocellular Carcinoma. *BMC Genomics*, **13**, S14. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-S8-S14>
- [20] Polyak, K. and Weinberg, R.A. (2009) Transitions between Epithelial and Mesenchymal States: Acquisition of Malignant and Stem Cell Traits. *Nature Reviews Cancer*, **9**, 265-273. <https://doi.org/10.1038/nrc2620>
- [21] Sampayo, R.G., et al. (2018) Fibronectin Rescues Estrogen Receptor Alpha from Lysosomal Degradation in Breast Cancer Cells. *Journal of Cell Biology*, **217**, 2777-2798. <https://doi.org/10.1083/jcb.201703037>
- [22] Ruiz-Garcia, E., et al. (2010) Gene Expression Profiling Identifies Fibronectin 1 and CXCL9 as Candidate Biomarkers for Breast Cancer Screening. *British Journal of Cancer*, **102**, 462-468. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605511>
- [23] Jerhammar, F., et al. (2010) Fibronectin 1 Is a Potential Biomarker for Radioresistance in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Biology & Therapy*, **10**, 1244-1251. <https://doi.org/10.4161/cbt.10.12.13432>
- [24] Karpinsky, G., et al. (2018) Tumor Expression of Survivin, p53, Cyclin D1, Osteopontin and Fibronectin in Predicting the Response to Neo-Adjuvant Chemotherapy in Children with Advanced Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **144**, 519-529. <https://doi.org/10.1007/s00432-018-2580-1>
- [25] Wang, J., et al. (2017) High Expression of Fibronectin 1 Suppresses Apoptosis through the NF-kappaB Pathway and Is Associated with Migration in Nasopharyngeal Carcinoma. *American Journal of Translational Research*, **9**, 4502-4511.
- [26] Sun, K., Jia, Z., Duan, R., et al. (2019) Long Non-Coding RNA XIST Regulates miR-106b-5p/P21 Axis to Suppress Tumor Progression in Renal Cell Carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **510**, 416-420. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.01.116>
- [27] 邢益桓, 付斌, 夏鹰. lncRNA XIST 介导的 ceRNA 调控网络在恶性肿瘤中作用的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2020, 27(9): 1062-1067.
- [28] Wapinski, O. and Chang, H.Y. (2011) Long Noncoding RNAs and Human Disease. *Trends in Cell Biology*, **21**, 354-361. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.04.001>
- [29] Ab Mutalib, N.S., et al. (2016) Integrated microRNA, Gene Expression and Transcription Factors Signature in Papillary Thyroid Cancer with Lymph Node Metastasis. *PeerJ*, **4**, e2119. <https://doi.org/10.7717/peerj.2119>
- [30] 涂超峰, 武明花, 李桂源. lncRNA 与 miRNA 相互调控作用及其与肿瘤的关系[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2013, 29(11): 1029-1034.
- [31] Wang, J.Y., Liu, X.F., Wu, H.C., Ni, P.H., Gu, Z.D., Qiao, Y.X., Chen, N., Sun, F.Y. and Fan, Q.S. (2010) CREB Up-Regulates Long Non-Coding RNA, HULC Expression through Interaction with microRNA-372 in Liver Cancer. *Nucleic Acids Research*, **38**, 5366-5383. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq285>
- [32] 王帅, 李文雅. lncRNA XIST 调控 miR-486-5p 影响食管癌细胞增殖的实验研究[J]. 现代肿瘤医学, 2020(4): 539-543.
- [33] 刘颖. 过表达 lncRNA GAS5 对甲状腺乳头状瘤侵袭和迁移能力的影响及机制研究[J]. 标记免疫分析与临床, 2020, 27(10): 1761-1766+1776.
- [34] 杨梅柳. LncRNA 在甲状腺乳头状瘤中的表达及功能分析[D]: [博士学位论文]. 石家庄: 河北医科大学, 2016.
- [35] 王科, 王应强, 叶静, 张雪, 钟玲, 杨力, 马世丽. LncRNA RP11-316M1.12 在甲状腺乳头状瘤中的表达及对细胞侵袭、迁移的影响[J]. 现代生物医学进展, 2020(14): 2646-2650+2622.
- [36] 林冲, 王霄. 基于竞争性内源 RNA 的甲状腺乳头状瘤淋巴结转移差异性 lncRNA-miRNA-mRNA 差异网络的构建与分析[J]. 饮食保健, 2020, 7(22): 48-49.
- [37] 何亚丽, 毛玉娟, 杨锐, 江华, 谢青, 申进增, 伊琳, 顾远辉. lncRNA 在甲状腺乳头状瘤中的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘(连续型电子期刊), 2020, 20(68): 65-68.