

## • 基础研究 •

## shRNA 沉默 circ\_0089153 对 TPC-1 甲状腺癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响

郑述建 宋霖 严成 陈榕

**【摘要】 目的** 探讨 circ\_0089153 对 TPC-1 甲状腺癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响。**方法** 采用 circ\_0089153 shRNA 沉默 TPC-1 细胞中的 circ\_0089153 表达并分成空白对照组、阴性对照组及 shRNA 沉默组,通过 RT-PCR 及 Western blot 检测不同组 TPC-1 细胞中 circ\_0089153 mRNA 及蛋白的表达,采用 CCK-8 法检测不同组 TPC-1 细胞增殖,采用 Transwell 实验检测不同组细胞迁移和侵袭能力。**结果** shRNA 沉默组 circ\_0089153 mRNA 及蛋白表达水平较空白对照组、阴性对照组低 ( $P < 0.05$ );沉默 hsa\_circ\_0089153 后,TPC-1 细胞增殖受到抑制;shRNA 沉默组细胞增殖率、迁移和侵袭的细胞数较对照组低 ( $P < 0.05$ )。**结论** circ\_0089153 与甲状腺癌细胞增殖、迁移及侵袭密切相关。

**【关键词】** 甲状腺癌; circ\_0089153; 细胞增殖; 细胞迁移; 细胞侵袭

**【中图分类号】** R73 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1002-2600(2024)03-0090-04

## Effect of shRNA silencing circ\_0089153 on proliferation, migration and invasion of TPC-1 thyroid cancer cells

ZHENG Shujian, SONG Lin, YAN Cheng, CHEN Rong

Department of Thyroid and Breast Surgery, Fuzhou Second General Hospital, Fuzhou, Fujian 350007, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of circ\_0089153 on the proliferation, migration and invasion of TPC-1 thyroid cancer cells. **Methods** The expression of circ\_0089153 in TPC-1 cells was silenced by circ\_0089153 shRNA and divided into blank control group, negative control group and shRNA silenced group. The expression of circ\_0089153 mRNA and protein in TPC-1 cells in different groups was detected by RT-PCR and Western blot, the proliferation of TPC-1 cells in different groups was detected by CCK-8 method, and the migration and invasion ability of TPC-1 cells in different groups was detected by transwell assay. **Results** The mRNA and protein expression levels of circ\_0089153 in shRNA silencing group were lower than those in blank control group and negative control group ( $P < 0.05$ ). After silencing hsa\_circ\_0089153, TPC-1 cell proliferation was inhibited. The number of cell proliferation, migration and invasion in shRNA silencing group was lower than that in control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** circ\_0089153 is closely related to the proliferation, migration and invasion of thyroid cancer cells.

**【Key words】** thyroid cancer; circ\_0089153; cell proliferation; cell migration; cell invasion

甲状腺癌是头颈部常见恶性肿瘤,2020 年全球癌症数据显示,甲状腺癌新增病例高达 58.6 万例,在全球肿瘤发病率中居第 9 位,女性发病率更高,约为男性的 3.3 倍<sup>[1-2]</sup>,对其发生发展机制的研究一直是关注的焦点。环状 RNA (circRNA) 作为一类新型的非编码 RNA,自 2012 年由 SALZMAN 发现以来,大量的 circRNA 被报道与肿瘤的发生发展密切相关<sup>[3-4]</sup>,circ\_0089153 被证实与乳腺癌中显著上调且参与调控乳腺癌细胞的增殖及转移<sup>[5]</sup>。

基于此,本研究通过 circ\_0089153 shRNA 沉默 TPC-1 细胞中的 circ\_0089153 表达,探究其对甲状腺癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

人甲状腺乳头状癌细胞系 TPC-1 细胞株 (中国科学院上海培养库);DMEM 培养基、胎牛血清 (美国 Gibco 公司);Lipofectamine 3000 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司);circ\_0089153

基金项目:福建省自然科学基金资助项目 (2022J011322)

作者单位:福建省福州市第二总医院甲乳外科,福州 350007

DOI: 10.20148/j.fmj.2024.03.029

shRNA、shRNA NC (上海慧颖生物科技有限公司); TRIzol 试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司); SYBR Prime Script RT-PCR 试剂盒、SYBR Green PCR Master Mix (大连 TaKaRa 公司); BCA 试剂盒 (中国碧云天生物科技有限公司); circ\_0089153、 $\beta$ -actin 一抗、二抗、蛋白提取试剂 (美国 Sigma 公司), 细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) (美国 Enzo Life Sciences 公司); Transwell 小室 (北京孚博生物科技有限公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 人甲状腺乳头状癌 5TPC-1 细胞株的培养

冻存的 TPC-1 细胞株取出后迅速放入预热至 37 °C 的水浴箱中进行解冻复苏。待细胞完全解冻后, 立即将其转移至离心机中, 以 2 000 r/min 的速度离心 3 min, 以去除上层冻存液。随后在 5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的细胞培养箱中、采用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基对 TPC-1 细胞进行培养。待细胞长至对数期且状态良好时, 使用适量的胰酶进行消化处理并进行传代。整个培养过程需严格遵守无菌操作规范。

**1.2.2 细胞的转染** 取对数生长期的 TPC-1 细胞, 重新分散到无血清的 DMEM 培养基中, 调整细胞密度为  $1 \times 10^6$  个/mL。取 1 mL 细胞悬液接种到 6 孔板中, 待贴壁细胞融合度达 60% 时, 根据 Lipofectamine 3000 使用说明书步骤开始细胞转染。按照转染物的不同, 实验分为空白对照组 (TPC-1 组)、阴性对照组 (shRNA-NC 组)、shRNA 沉默组 (circ\_0089153 shRNA 沉默组), 继续在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 48 h 后观察基因沉默效果。

**1.2.3 RT-PCR 检测 TPC-1 细胞中 circ\_0089153 的 mRNA 水平** 用 TRIzol 试剂盒分别提取空白对照组、阴性对照组及 shRNA 沉默组细胞总 RNA, 按照 SYBR Prime Script RT-PCR 试剂盒说明书将 RNA 反转录成 cDNA。随后按照 SYBR Green PCR Master Mix 使用说明书完成 qRT-PCR, 其中 circ\_0089153 的引物为正向序列: 5'-CACCTAGTTC-CGTGCCATTG-3', 反向序列: 5'-CTTCTGTT-GAAGCCGCAGAT-3', 内参 GAPDH 的引物为正向序列: 5'-ACTCCTCCACCTTTGACGC-3', 反向序列: 5'-GCTGTAGCCAAATTCGTTGTC-3', 采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算 circ\_0089153 mRNA 的相对表达量。

**1.2.4 Western blot 检测 TPC-1 细胞中 circ\_0089153 的蛋白表达水平** 利用 RIPA 裂解液对各实验组细胞进行裂解处理, 10 000 r/min 离心富集

总蛋白。借助 BCA 法测定所收集蛋白的浓度。从各实验组中选取蛋白质量相等的样品, 进行聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳以实现蛋白质的分离, 随后将已分离的蛋白条带转移至 PVDF 膜上, 并用脱脂奶粉进行封闭处理。在 4 °C 环境下, 加入针对 circ\_0089153 和  $\beta$ -actin 的特异性一抗 (按 1:1 000 的比例稀释), 孵育一整夜。之后用 TBST 缓冲液对膜进行洗涤, 再加入相应的二抗, 于室温下孵育 2 h。完成二抗孵育后, 再次用 TBST 进行漂洗, 共进行 3 轮洗涤, 每轮持续 10 min。最后利用 ECL-plus 显色试剂盒进行信号处理, 以  $\beta$ -actin 作为内参对照并通过 ImageJ 软件对蛋白印迹的密度进行分析。

**1.2.5 CCK-8 法检测 TPC-1 细胞增殖** 收获转染后的 TPC-1 细胞, 随后取 100  $\mu$ L、 $1 \times 10^4$  个/mL 的密度接种于含 10% FBS 的 DMEM 培养基的 96 孔板中, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养条件下培养细胞。向每孔中加入 10  $\mu$ L CCK-8 溶液, 在 37 °C 下继续孵育 2 h 后继续培养 72 h, 分别于 24 h、48 h、72 h 使用 Synergy H4 多孔酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔的吸光度值, 每组设置 5 个重复孔。

### 1.2.6 Transwell 实验检测细胞迁移与侵袭能力

各组细胞首先经胰酶消化处理, 随后离心以去除培养液, 采用 PBS 缓冲液洗涤 1~2 次。洗涤后, 用含 BSA 的无血清培养基对细胞进行重悬, 并调整细胞密度至  $2 \times 10^5$  个/mL。在 Transwell 小室的下室中, 加入 500  $\mu$ L 含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。对于细胞侵袭实验, 还需预先在小室底部铺设一层稀释后的 Matrigel 溶液 (3.9  $\mu$ g/ $\mu$ L), 用量控制在 60~80  $\mu$ L, 以确保聚碳酸酯膜被适当浸润。之后, 取 200  $\mu$ L 细胞悬液加入到 Transwell 小室的上室中。将包含 Transwell 小室的 24 孔板置于细胞培养箱中, 在标准培养条件下培养 24 h。培养结束后, 取出 Transwell 小室, 去除上室中的培养基, 并用无钙 PBS 缓冲液洗涤 2 次。随后用甲醇固定细胞 30 min, 待其风干后, 使用 0.1% 结晶紫染液进行染色, 染色时间为 20 min。染色完成后, 用棉签轻轻擦除上层未迁移的细胞, 并再次用 PBS 缓冲液洗涤 3 次。在显微镜下, 随机选取 5 个高倍视野, 对迁移的细胞进行观察并计数。以 TPC-1 组作为空白对照组, 计算各组细胞的相对穿膜数量。

## 1.3 统计学分析

采用 SPSS 23.0 统计软件对数据进行统计分析。计量数据采用均数  $\pm$  标准差表示。组别比较使

用单因素方差分析, 组间比较使用 LSD-*t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

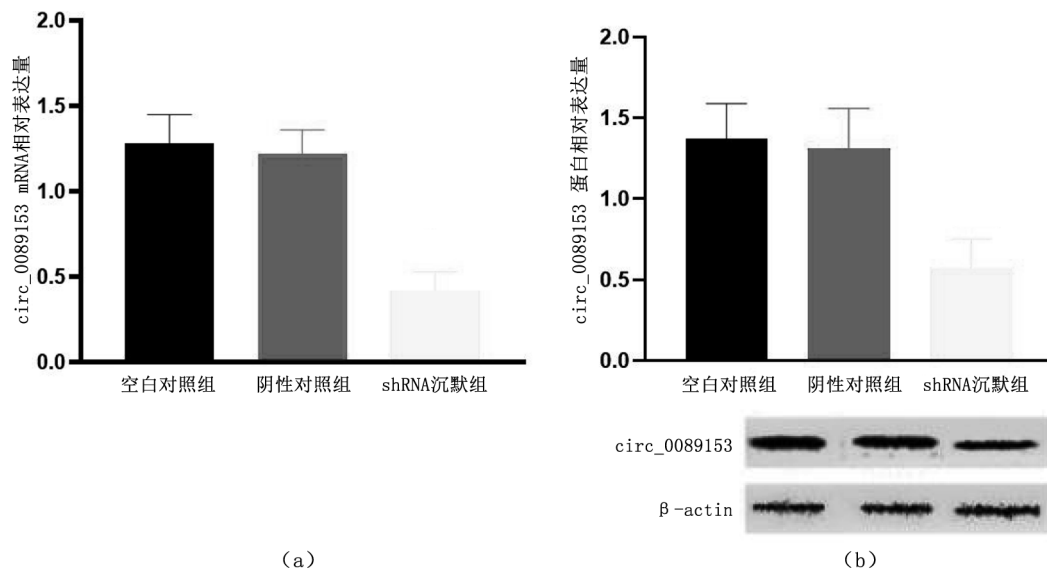
### 2.1 不同组细胞中 circ\_0089153 的 mRNA 及蛋白表达水平

shRNA 沉默组 circ\_0089153 mRNA 及蛋白表达水平低于空白对照组和阴性对照组 ( $P <$

0.05), 空白对照组和阴性对照组两组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见图 1。

### 2.2 不同组 TPC-1 细胞的增殖情况

CCK-8 实验结果表明, 沉默 circ\_0089153 后, TPC-1 细胞的增殖能力受到抑制, 与对照组相比, shRNA 沉默组细胞的生长曲线平缓, 增殖率降低。见图 2。



注: (a) 不同组细胞 circ\_0089153 mRNA 的相对表达量; (b) 不同组细胞 circ\_0089153 蛋白的相对表达量。

图 1 不同组细胞 circ\_0089153 的 mRNA 及蛋白的相对表达情况

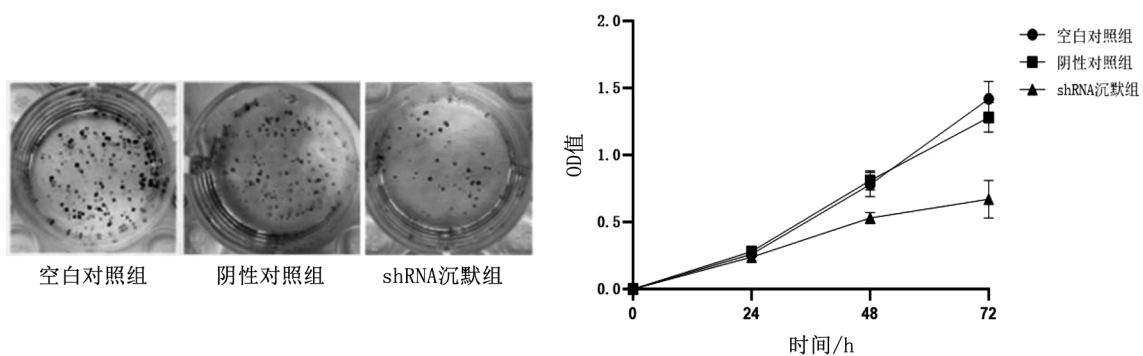


图 2 不同组 TPC-1 细胞的增殖情况

### 2.3 不同组 TPC-1 细胞的迁移和侵袭能力比较

空白对照组和阴性对照组的迁移和侵袭细胞数比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), shRNA 沉默组迁移和侵袭细胞数低于空白对照组和阴性对照组 ( $P < 0.05$ ), 见图 3。

## 3 讨论

近年来甲状腺癌全球发病率居高不下, 是内分泌系统常见恶性肿瘤, 对其机制的研究一直是医务工作者所关注的焦点<sup>[6-7]</sup>。有研究表明不同的非编

码 RNA (ncRNA), 如微小 RNA (miRNA)、长链非编码 RNA (lncRNA) 和环状 RNA (circRNA), 在甲状腺癌发展及治疗耐药性产生过程中有各自的作用<sup>[8]</sup>。

circRNA 是不同细胞中具有特殊环状结构、具备稳定表达的 ncRNA, 在细胞的生理过程中起着基本的调节作用, 同时也与人类疾病 (如癌症) 有关。从机理上讲, 环状 RNA 通过吸附 miRNA 或与蛋白质相互作用来产生下游效应<sup>[9-10]</sup>。CORK

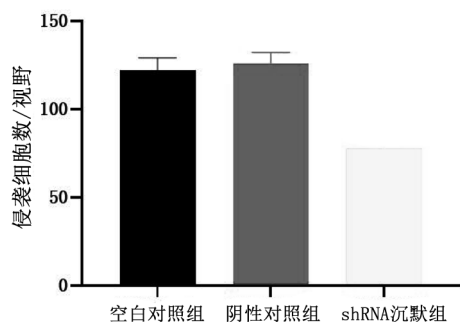


图3 不同组 TPC-1 细胞的迁移和侵袭能力

等<sup>[11]</sup>在乳头状甲状腺癌组织 (papillary thyroid carcinoma tissue, PTC) 组织及未分化甲状腺癌 (anaplastic thyroid carcinoma, ATC) 和 PTC 细胞系中发现环状叉头盒蛋白 M1 (circFOX M1) 表达的上调, 同时该研究还发现 circFOX M1 对线性 FOX M1 转录本没有影响, 但 circFOX M1 可通过吸附 miR-1179 和挽救高迁移率族蛋白 1 (high mobility group box-1 protein, HMGB1) 的表达来调节癌症的进展并促进 PTC 体内外肿瘤生长。LIU 等<sup>[12]</sup>在 PTC 组织和细胞系发现了 circ\_0008274 表达的上调, 证实了 circ\_0008274 的高表达与更晚期的甲状腺癌 TNM 分期和淋巴结转移有关, 而体外研究实验表明 circ\_0008274 促进了细胞的增殖和侵袭, 这主要是与雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路的激活相关。由于腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 对 mTOR 蛋白的已知负调控作用<sup>[13]</sup>, 因此也可以通过 circ\_0008274 来抑制 AMPK 蛋白来激活 mTOR 通路, 从而调节甲状腺癌的发生发展和进展。本研究通过 circ\_0089153 shRNA 来沉默 TPC-1 细胞中的 circ\_0089153 表达, 结果表明采用 shRNA 沉默 TPC-1 细胞后, 其中 circ\_0089153 的 mRNA 和蛋白表达受到了明显的抑制。GAO 等<sup>[14]</sup>发现 circ\_0089153 是乳腺癌的致癌基因, 它能够通过海绵作用 miR-2467-3p/E2F6 促进乳腺癌的增殖和转移。乳腺和甲状腺同属于激素应答性器官, 在一些调控通路之间两者也能相互影响<sup>[15]</sup>。本研究结果表明沉默 circ\_0089153 表达后抑制 TPC-1 甲状腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 说明 circ\_0089153 与甲状腺癌的发生发展也是密切相关的, 下一步将进一步研究 circ\_0089153 在甲状腺癌中的作用方式及调控位点, 为 circ\_0089153 在甲状腺癌发生发展中的作用研究提供新的思路和方法。

## 参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71 (3): 209-249.
- [2] 姜帆, 付振涛, 鹿子龙, 等. 基于年龄-时期-队列效应模型分析 2012-2022 年山东省甲状腺癌流行趋势 [J]. 中华预防医学杂志, 2024, 58 (1): 56-64.
- [3] SALZMAN J, GAWAD C, WANG P L, et al. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types [J]. PLS ONE, 2012, 7 (2): e30733.
- [4] 丁俊竹, 孙玉双, 李姗姗. 环状 RNA 的研究进展 [J]. 国际遗传学杂志, 2020, 43 (1): 27-29.
- [5] LIU J, QIAO X, LIU J, et al. Identification of circ\_0089153/miR-608/EGFR p53 axis in ameloblastoma via MAPK signaling pathway [J]. Oral Dis, 2022, 28 (3): 756-770.
- [6] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68 (6): 394-424.
- [7] FIORE M, OLIVERI CONTI G, CALTABIANO R, et al. Role of emerging environmental risk factors in thyroid cancer: a brief review [J]. Int J Environ Res Public Health, 2019, 16 (7): 1185.
- [8] TABATABAEIAN H, PEILING YANG S, TAY Y. Non-coding RNAs: uncharted mediators of thyroid cancer pathogenesis [J]. Cancers (Basel), 2020, 12 (11): 3264-3300.
- [9] SHEN Z, ZHOU L, ZHANG C, et al. Reduction of circular RNA Foxo3 promotes prostate cancer progression and chemoresistance to docetaxel [J]. Cancer Lett, 2020, 6 (1): 88-101.
- [10] ZHOU G K, ZHANG G Y, YUAN Z N, et al. Has\_circ\_0008274 promotes cell proliferation and invasion involving AMPK/mTOR signaling pathway in papillary thyroid carcinoma [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22 (24): 8772-8780.
- [11] CORK G K, THOMPSON J, SLAWSON C. Real talk: the inter-play between the mTOR, AMPK, and hexosamine biosynthetic pathways in cell signaling [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2018, 6 (9): 522.
- [12] LIU F, ZHANG J, QIN L, et al. Circular RNA EIF6 (Hsa\_circ\_0060060) sponges miR-144-3p to promote the cisplatin-resistance of human thyroid carcinoma cells by autophagy regulation [J]. Aging (Albany NY), 2018, 10 (12): 3806-3820.
- [13] ALLINEN M, BEROUKHIM R, CAI L, et al. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer [J]. Cancer Cell, 2004, 6 (1): 17-32.
- [14] GAO S L, FAN Y, LIU X D, et al. Circ\_0089153 exacerbates breast cancer cells proliferation and metastasis via sponging miR-2467-3p/E2F6 [J]. Environmental Toxicology, 2022, 37 (6): 1458-1471.
- [15] 王伟刚, 田保国, 王艳, 等. 乳腺癌与甲状腺疾病关系研究进展 [J]. 肿瘤研究与临床, 2020, 32 (3): 206-209.