

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.03.002

UPF1 甲基化和 miR-744-5p/CCND1 在甲状腺乳头状癌中的作用机制研究*

王斌^{1,2} 马骁^{2Δ} 陈洪丽³

(1 天津工业大学生命科学院 天津 300387; 2 北京南郊肿瘤医院头颈外一科 北京 100076;

3 北京大学肿瘤医院头颈外科 北京 100142)

摘要 目的:探讨 UPF1 甲基化和 miR-744-5p/CCND1 在甲状腺乳头状癌中的作用机制研究。**方法:**将人甲状腺乳头状癌细胞株 TCP-1 和正常甲状腺上皮细胞 Nthy-ori-3 分别用去甲基化试剂 5-Aza-CdR 进行干预,分别在干预前后采用甲基化特异性 PCR 技术检测 UPF1 基因甲基化变化,采用 Western-Blotting 检测干预 UPF1、DNMT1、miR-744-5p、CCND1 蛋白相对表达,采用 transwell 细胞侵袭实验检测细胞侵袭情况。**结果:**PCR 扩增显示,UPF1 基因在 Nthy-ori-3 组仅出现非甲基化引物扩增条带 (U 条带),在 TCP-1 组仅出现甲基化引物扩增条带 (M 条带)。经 5-Aza-CdR 作用后,UPF1 基因甲基化扩增条带减少,甲基化表达降低。各组 UPF1、DNMT1、miR-744-5p、CCND1 蛋白相对表达差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 Nthy-ori-3 组比较,TCP-1 组 DNMT1、UPF1 蛋白相对表达明显提高,miR-744-5p、CCND1 蛋白相对表达明显降低 ($P < 0.05$);与 TCP-1 组比较,TCP-1 干预组 DNMT1、UPF1 蛋白相对表达明显降低,miR-744-5p、CCND1 蛋白相对表达明显提高 ($P < 0.05$)。与 TCP-1 组比较,TCP-1 干预组细胞侵袭、迁移数量明显减少 ($P < 0.05$)。**结论:**UPF1 甲基化存在于甲状腺乳头状癌中,UPF1 基因甲基化的表达缺失可能抑制 miR-744-5p/CCND1 轴,在甲状腺乳头状癌发生发展中发挥关键作用。

关键词:甲状腺乳头状癌;UPF1;miR-744-5p;甲基化

中图分类号:R-33;R736.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2024)03-405-05

Mechanism of UPF1 Methylation and miR-744-5p/CCND1 in Papillary Thyroid Carcinoma*

WANG Bin^{1,2}, MA Xiao^{2Δ}, CHEN Hong-li³

(1 School of Life Sciences, Tianjin University of Technology, Tianjin, 300387, China;

2 Head and Neck Surgery Department of Beijing Nanjiao Tumor Hospital, Beijing, 100076, China;

3 Head and Neck Surgery Department of Peking University Cancer Hospital, Beijing, 100142, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the mechanism of UPF1 methylation and miR-744-5p/CCND1 in papillary thyroid cancer.

Methods: The human papillary thyroid cancer cell line TCP-1 and normal thyroid epithelial cell Nthy ori-3 were intervened with demethylation reagent 5-Aza CdR, respectively. Methylation specific PCR technology was used to detect the methylation changes of UPF1 gene before and after the intervention, and Western blotting was used to detect the relative expression of intervention UPF1, DNMT1, miR-744-5p, and CCND1 proteins. **Results:** PCR amplification showed that the UPF1 gene only showed non methylated primer amplification bands (U bands) in the Nthy ori-3 group, and only methylated primer amplification bands (M bands) in the TCP-1 group. After the action of 5-Aza-CdR, the methylation amplification bands of UPF1 gene decreased, and the methylation expression decreased. There was a statistically significant difference in the relative expression of UPF1, DNMT1, miR-744-5p, and CCND1 proteins among each group ($P < 0.05$). Compared with the Nthy ori-3 group, the relative expression of DNMT1 and UPF1 proteins in the TCP-1 group was significantly increased, while the relative expression of miR-744-5p and CCND1 proteins was significantly reduced ($P < 0.05$); Compared with the TCP-1 group, the relative expression of DNMT1 and UPF1 proteins in the TCP-1 intervention group was significantly reduced, while the relative expression of miR-744-5p and CCND1 proteins was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the TCP-1 group, the number of cell invasion and migration in the TCP-1 intervention group was significantly reduced ($P < 0.05$). **Conclusion:** UPF1 methylation is present in papillary thyroid cancer, and the expression loss of UPF1 gene methylation may inhibit the miR-744-5p/CCND1 axis, playing a key role in the occurrence and development of papillary thyroid cancer.

* 基金项目:北京市科研培育计划项目(PZ2021038)

作者简介:王斌(1987-),男,硕士,主治医师,主要从事头颈外科甲状腺肿瘤的相关研究,E-mail: maersting086@126.com

Δ 通讯作者:马骁(1974-),博士,副主任医师,主要研究方向:头颈肿瘤,颌面肿瘤,E-mail: XiaoMaResearch@163.com

(收稿日期:2023-08-23 接受日期:2023-09-18)

Key words: Papillary thyroid carcinoma; UPF1; miR-744-5p; Methylation

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R736.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-62731673-6273(2024)03-405-05

前言

甲状腺癌是内分泌系统常见恶性肿瘤,近年来全球发病率均呈现持续攀升的态势^[1]。GLOBOCAN 数据库显示,2020 年全球范围内,甲状腺癌的年龄标准化发病率为女性 10.1/10 万,男性 3.1/10 万^[2]。尽管甲状腺乳头状癌通常预后良好,但是仍有部分患者术后出现复发或转移,并表现为放射性碘抗性。针对甲状腺乳头状癌发病机制进行更深入的研究寻找合适的治疗靶点是临床努力的方向之一。报道显示,上游移码突变体(up-frame shift mutant 1, UPF1)在结直肠癌^[3]、乳腺癌^[4]、膀胱癌^[5]等多种肿瘤中发挥作用;非编码 RNA 是新靶向治疗的主要研究方向之一, MicroRNA(miRNA)异常表达在垂体腺瘤、胶质瘤、肝癌等多种肿瘤的发生和进展中起到关键作用;miR-744-5p 在肾癌^[6]、膀胱癌^[7]、喉癌^[8]等诸多恶性肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭中发挥作用。本研究旨在探讨 UPF1 甲基化和 miR-744-5p/CCND1 在甲状腺乳头状癌中的作用和机制,为甲状腺乳头状癌临床治疗提供新的手段。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人甲状腺乳头状癌细胞株 TCP-1 和正常甲状腺上皮细胞 Nthy-ori-3 购自中国科学院上海分院细胞库。

1.2 主要试剂与仪器

去甲基化试剂 5-Aza-CdR(美国 sigma 公司);甲基化修饰试剂盒(美国 ZYKO 公司);RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司);D180 CO₂ 细胞培养箱(深圳市瑞沃德生命科技有限公司);7500P 实时荧光定量 PCT 仪(美国 Thermo Fisher 公司);垂直电泳槽、电泳仪(伯乐公司)。

1.3 细胞培养、复苏、传代

(1)细胞培养:人甲状腺乳头状癌细胞株 TCP-1 和正常甲状腺上皮细胞 Nthy-ori-3 置于 RPMI-1640 培养基(10%FBS)在 37℃、5%CO₂ 环境下孵育,按 1:3 的比例传代,2~3 d 传代 1 次。(2)细胞复苏:全程在超净工作台进行,严格无菌操作。在 10 mL 无菌离心管中加入 6 mL 1640 完全培养基;冻存的细胞在 37℃ 水浴解冻融化,细胞悬浮液即刻加入无菌离心管中(稀释比例 1:10),移液枪换枪吹打使其充分悬浮后以 1200 r/min 离心分离 5 min,去除上清液;1 mL 的完全培养基加入到离心管中,吹散细胞,变成均匀的细胞悬液,转移至细胞培养瓶,37℃、5%CO₂ 细胞培养箱中培养。次日观察复苏细胞状态,弃置死细胞,加入新鲜培养基,根据细胞生长情况换液。显微镜下观察细胞形态,每日 1 次,待细胞密度超过 80% 时进行传代。(3)细胞传代:细胞生长状态良好且密度达到 80% 以后,分殖至新的培养瓶,按 1:5 的比例稀释。弃置旧培养基,加入 2 mL PBS 溶液清洗培养瓶,洗脱代谢物,操作 2 次。清洗好的培养皿中加入 1 mL 胰蛋白酶(含 EDTA),无菌、37℃、5% CO₂ 条件下孵育 4 min,显微镜下观察细胞消化过程,待细胞间隙变大、分离,呈现圆形时清

敲打培养瓶,使其脱落后即刻加入新鲜培养基终止消化。使用电动移液枪反复吹打培养瓶,使瓶壁和瓶底附着的细胞脱落,细胞悬液转移至预先准备好的离心管中,以 1200 r/min 离心分离 5 min 后弃置上清液。得到的细胞团块继续加入 1 mL 培养基,使用移液枪反复吹打直至形成均匀的细胞悬液。分别移入培养皿,无菌、37℃、5% CO₂ 条件下继续培养,多次进行细胞传代直至细胞数量满足后续实验要求。

1.4 分组

将人甲状腺乳头状癌细胞株 TCP-1 和正常甲状腺上皮细胞 Nthy-ori-3 作为对照组,分别为 TCP-1 组和 Nthy-ori-3 组;采用去甲基化试剂 5-Aza-CdR 对 TCP-1 和 Nthy-ori-3 进行干预,作为实验组,分别为 TCP-1 甲基化组和 Nthy-ori-3 甲基化组。

1.5 甲基化特异性 PCR 技术

(1)提取 DNA:实验组细胞经胰蛋白酶消化后置于 1.5 mL 离心管离心。弃置上清液后加入 200 μL GA 缓冲液,充分震荡后使细胞悬浮。同样步骤加入 20 μL Proteinase K,充分摇匀后在 70℃ 水浴锅中水浴 10 min,待溶液清亮后短暂离心(10s)。加入 200 μL 无水乙醇,振荡器震荡 30s 后出现絮状沉淀,短暂离心(10s)。将所得絮状沉淀溶液加入到 CB3 吸附柱,以 12000 r/min 离心 1 min,弃置废液。加入 500 μL GD 缓冲液,12000 r/min 离心 1 min 后弃置废液;继续加入 600 μL PW 漂洗液,处理同上;废液倒掉后吸附柱 12000 r/min 离心 3 min,室温晾干。将吸附柱套入无菌离心管,使用移液枪在吸附柱中加入 50 μL TE 洗脱缓冲液,室温静置 5 min 后 12000 r/min 离心 3 min,离心管中收集所有溶液。提取的 DNA 使用微分光光度计检测含量和纯度,-80℃ 保存。(2)基因 DNA 纯化和修饰:PCR 管中加入 20 μL DNA 样品和 130 μL 预先根据 DNA 甲基化修饰试剂盒说明书配制 CT Conversion Reagent 溶液(避光条件下配制),混匀后 98℃ 反应 10 min,64℃ 充分作用 150 min。Zymo-Spin IC Column 中加入 600 μL M-Binding Buffer,充分颠倒混匀后离心 30s,加入 200 μL M-Wash Buffer,离心 30 s;柱中分别依次加入 200 μL M-Desulphonation Buffer 和 M-Wash Buffer,离心 30 s;加入 10 μL M-Elution Buffer,放在 1.5 mL 试管中进行 DNA 洗脱,离心 2 min;DNA 经修饰和纯化后用于甲基化扩增。(3)PCR 反应:反应体系:4 μL DNA 模板,UPF1 上下游引物各 1 μL,2× Real SYBY Mixture 12.5 μL,DNA template 4 μL,水 6.5 μL。引物序列:UPF1 甲基化,上游:5'-GGATAGTCTGGTCTGGATGC-3',下游:5'-CCAGCTCTCTGGATAGA-3';UPF1 非甲基化,上游:5'-GGAGGTATTGATTGGATGTT-3',下游:5'-CAACGCTCTCTAAATACA-3';反应条件:94℃ 预变性 5 min,变性 94℃ 30 s;56℃ 退火 30 s;72℃ 延伸 1 min;35cycles,总延伸 5 min。(4)琼脂糖凝胶电泳:锥形瓶中加入 0.4 g 琼脂糖和 20 mL TBE 溶液,加热融化;底盘放在搅拌上插入梳子,待琼脂糖凝胶冷却到 50-60℃ 时加入溴化乙锭 1 μL,彻底融合后倒入胶板内,使用枪头消除起泡,静置 30 min,垂直拔掉梳子后取出胶体置于电泳槽内。胶

板第一跑道内加入 DNA Marker 2 μL , 其余一次性加入 5 μL 扩增产物;完成加样后进行电泳,电压维持在 100 V,待溴酚蓝指示剂电泳到胶板 4-5 格时关闭电源,停止电泳。取出胶板在凝胶自动成像仪器上观察并分析。

1.6 蛋白质免疫印迹

细胞悬液以 1200 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5min,弃置上清液;6 孔板中加入 RIPA 裂解液 100 μL ,以 1:100 的比例加入蛋白酶抑制剂 PMSF 共 1 μL 。样品经超声破碎仪超声后 12000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min,吸取上清液得到的液体为全蛋白。采用 BCA 试剂盒测定总蛋白浓度计算每孔上样量。根据 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒配制 12%SDS-PAGE 分离胶和 5%SDS-PAGE 浓缩胶;根据每个样品计算的上样量逐一上样;浓缩胶 80V 电压电泳 30 min,待溴酚蓝进入分离胶后调整电压至 120V,待溴酚蓝达到分离胶底部后停止电泳。根据目的蛋白胶条裁剪适合大小的 PVDF 膜,按顺序置于转膜夹中转膜,100 min 转膜完成后使用 5%脱脂牛奶封闭 1 h;TBST 冲洗液在摇床上冲洗,每次 5 min,共 3 次;根据试剂盒说明书配制 UPF1、DNMT1、miR-744-5p、CCND1 抗体浓度,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;次日回收二抗后再次洗膜,按 1:5000 的比例孵育二抗 1 h;弃置二抗后再次 TBST 洗膜,每次 10 min,共 3 次,加入 ECL 显影剂显影;使用 ImageJ 软件对目的蛋白条带和内参蛋白进行半定量分析,以 β -actin 抗体为内参计算蛋白相对表达量。

1.7 transwell 实验

使用预冷的 DMEM 培养基稀释 Matrigel 基质胶 (4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜),稀释比例为 1:8;在 transwell 小室上室中加入 80 μL 稀释后的基质胶,培养 5 h。取生长状态良好的细胞制成单细胞悬液,1000 r/min 离心 5 min,弃置上清后加入培养基重悬细胞(不含血清),细胞计数并调整细胞密度。下室内加入 600 μL 完全培养基(含 20% FBS),上室中加入 100 μL 细胞悬液(含 5×10^4 个 BCPAP 细胞)。培养 24 h 后取出 24 孔板,将上室内的培养基弃置。新的 24 孔板加入 4%多聚甲醛 600 μL ,并加入经 PBS 缓冲液清洗 3 遍的小室,多聚甲醛固定 15 min。继续使用 PBS 缓冲液清洗小室,加入 600 μL 经稀释(10:1)的 0.1%结晶紫溶液,染色 15 min。小室经 PBS 缓冲液清洗 3 次后将上室内未发生转移侵袭的细胞和基质胶清清擦拭去,使用显微镜观察小室外层滤膜上的穿孔细胞,随选取 5 个视野(200 \times)拍照,Image J 软件计数,评估细胞迁移或侵袭的能力。

1.8 统计学方法

采用 SPSS24.0 软件进行分析,计量资料符合正态分布以(均值 \pm 标准差)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 UPF1 基因甲基化状态

对 TCP-1 组、Nthy-ori-3 组、TCP-1 干预组和 Nthy-ori-3 干预组细胞进行甲基化特异性 PCR 扩增,结果显示 UPF1 基因在 Nthy-ori-3 组出现非甲基化引物扩增条带(U),而在 TCP-1 组出现甲基化引物扩增条带(M),提示甲状腺乳头状癌细胞存在 UPF1 基因甲基化。TCP-1 干预组和 Nthy-ori-3 干预组经 5-Aza-Cdr 作用后,UPF1 基因甲基化扩增条带减少,甲基化表

达降低。见图 1。

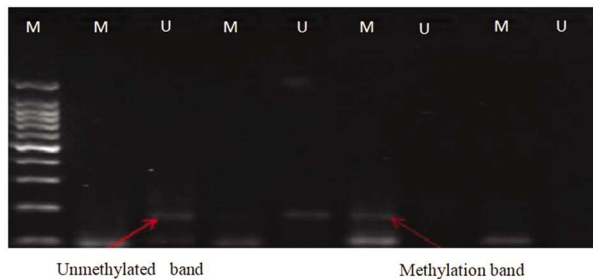


图 1 UPF1 基因甲基化特异性 PCR 扩增结果

Fig.1 Methylation specific PCR amplification results of UPF1 gene

2.2 DNMT1 蛋白相对表达情况

由图 2 可知,各组 DNMT1 蛋白相对表达比较差异具有统计学意义($F=10.352, P < 0.05$)。Nthy-ori-3 组和 Nthy-ori-3 干预组 DNMT1 蛋白相对表达较少,两组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$);相较于 Nthy-ori-3 组,TCP-1 组 DNMT1 蛋白相对表达明显提高,差异有统计学意义($P < 0.05$);相较于 TCP-1 组,TCP-1 干预组 DNMT1 蛋白相对表达明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

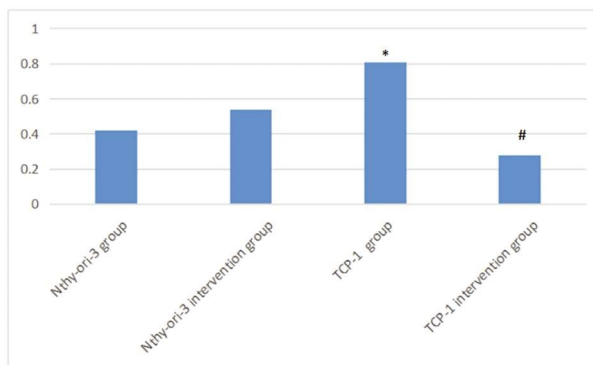


图 2 Western blotting 检测各组 DNMT1 蛋白相对表达

Fig.2 Western blotting detection of relative expression of DNMT1 protein in each group

Note: * $P < 0.05$, compared with the Nthy ori-3 group; # $P < 0.05$, compared with the TCP-1 group.

2.3 UPF1 蛋白相对表达情况

由图 3 可知,各组 UPF1 蛋白相对表达差异具有统计学意义($F=8.562, P < 0.05$)。Nthy-ori-3 组和 Nthy-ori-3 干预组 UPF1 蛋白相对表达较少,两组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$);相较于 Nthy-ori-3 组,TCP-1 组 UPF1 蛋白相对表达明显提高,差异有统计学意义($P < 0.05$);相较于 TCP-1 组,TCP-1 干预组 UPF1 蛋白相对表达明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 mir-744-5p 蛋白相对表达

由图 4 可知,各组 mir-744-5p 蛋白相对表达差异具有统计学意义($F=7.216, P < 0.05$)。Nthy-ori-3 组和 Nthy-ori-3 干预组 mir-744-5p 蛋白相对表达较多,两组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$);相较于 Nthy-ori-3 组,TCP-1 组 mir-744-5p 蛋白相对表达明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);相较于 TCP-1 组,TCP-1 干预组 mir-744-5p 蛋白相对表达明显提高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

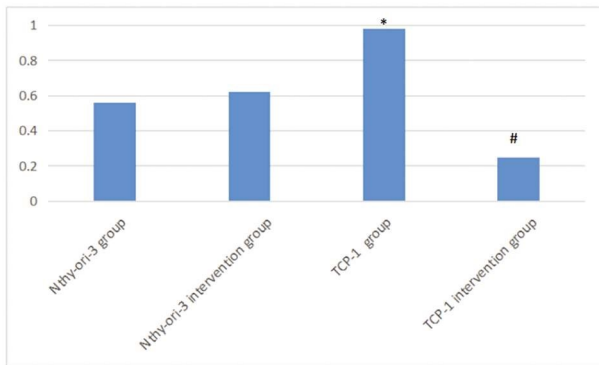


图3 Western blotting 检测各组 UPF1 蛋白相对表达

Fig.3 Western blotting detection of relative expression of UPF1 protein in each group

Note: * $P < 0.05$, compared with the Nthy ori-3 group; # $P < 0.05$, compared with the TCP-1 group.

2.5 CCND1 蛋白相对表达

由图4可知,各组 CCND1 蛋白相对表达差异具有统计学意义 ($F=5.872, P < 0.05$)。Nthy-ori-3 组和 Nthy-ori-3 干预组 CCND1 蛋白相对表达较多, 两组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 相较于 Nthy-ori-3 组, TCP-1 组 CCND1 蛋白相对表达明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 相较于 TCP-1 组, TCP-1 干预组 CCND1 蛋白相对表达明显提高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.6 UPF1 去甲基化对细胞侵袭、迁移的影响

Nthy-ori-3 组和 Nthy-ori-3 干预组细胞侵袭、迁移数量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 TCP-1 组比较, TCP-1 组干预组细胞侵袭、迁移数量明显减少 ($P < 0.05$)。见图6、图7。

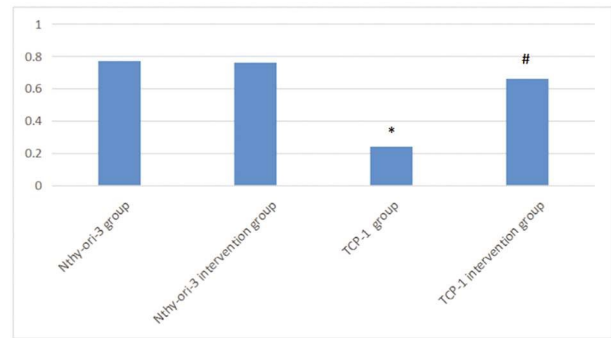


图4 Western blotting 检测各组 mir-744-5p 蛋白相对表达

Fig.4 Western blotting detection of relative expression of mir-744-5p protein in each group

Note: * $P < 0.05$, compared with the Nthy ori-3 group; # $P < 0.05$, compared with the TCP-1 group.

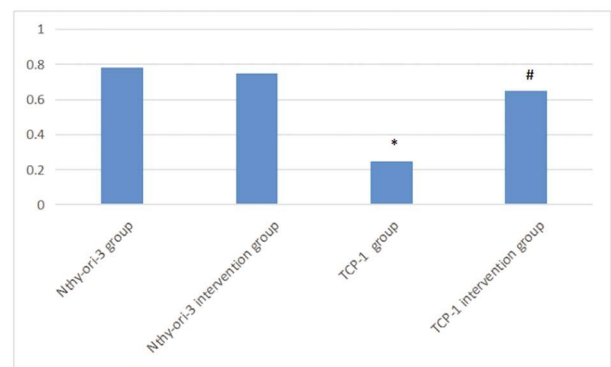
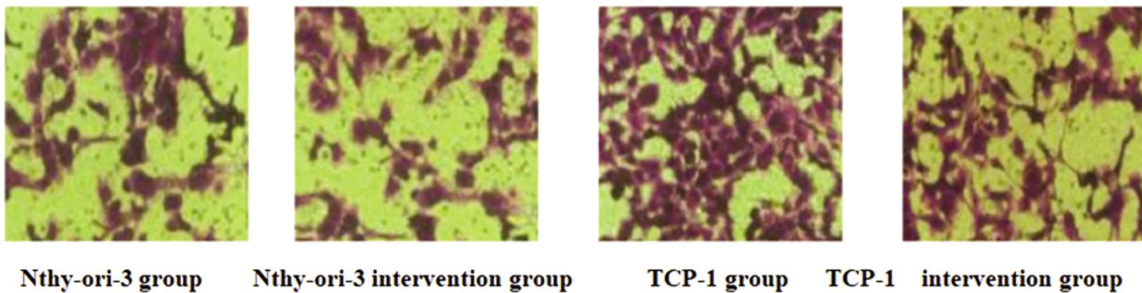


图5 Western blotting 检测各组 CNDD1 蛋白相对表达

Fig.5 Western blotting detection of relative expression of CNDD1 protein in each group

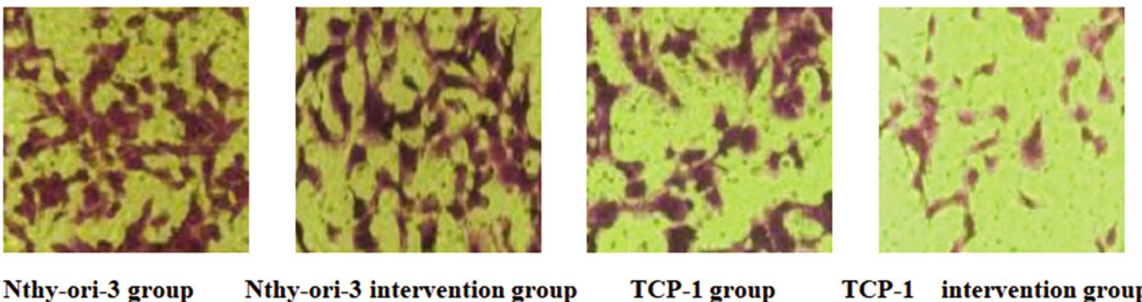
Note: * $P < 0.05$, compared with the Nthy ori-3 group; # $P < 0.05$, compared with the TCP-1 group.



Nthy-ori-3 group Nthy-ori-3 intervention group TCP-1 group TCP-1 intervention group

图6 UPF1 去甲基化对细胞侵袭的影响

Fig.6 Effect of UPF1 demethylation on cell invasion



Nthy-ori-3 group Nthy-ori-3 intervention group TCP-1 group TCP-1 intervention group

图7 UPF1 去甲基化对细胞迁移的影响

Fig.7 Effect of UPF1 demethylation on cell migration

3 讨论

甲状腺癌已经成为增长速度最快的恶性肿瘤,在美国是女性常见的第三大癌症,在我国女性恶性肿瘤发病中位居第四位^[9,10]。甲状腺乳头状癌是甲状腺癌主要临床分型,发病数占总数的80%以上^[11]。临床上对于甲状腺乳头状癌主要采取手术、放射性碘元素治疗、术后内分泌治疗等,取得良好的治疗效果,我国部分三甲医院数据显示,10年生存率可达90%^[12]。

当下研究显示,表观遗传学修饰在多种生理病理过程中扮演的十分重要的角色。DNA甲基化是指在DNA甲基化转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)的作用下,活性的甲基被转移到胞嘧啶残基的第5个碳上,形成5-甲基胞嘧啶^[13]。作为表观遗传学修饰的一种,其能调节下游基因的表达且不改变DNA序列,在肿瘤发病的过程中发挥重要作用。无义介导的mRNA降解途径(nonsense-mediated mRNA decay, NMD)能够降解异常mRNA,预防异常蛋白质的产生,被称为mRNA质量的监控系统^[14,15]。UPF1作为NMD中的关键蛋白,能够通过复杂的步骤降解异常mRNA,阻止其翻译^[16]。诸多研究证实,UPF1不仅在NMD降解异常mRNA中发挥作用,还参与多种正常基因的表达和细胞增殖、分化^[17]。UPF1与肿瘤之间的关系近年来成为研究的重点,在多种恶性肿瘤中扮演不同的角色。

甲状腺癌从低级向高级发展过程中,遗传学变异在其中发挥的作用不可忽视^[18],其中表观遗传学修饰作用即为重要。作为表观遗传学修饰最常见的方式之一,DNA甲基化在肿瘤发展过程中地位极其重要^[19,20]。异常的DNA甲基化会导致基因结构和功能受到抑制,从而影响其转录,推动癌症不同程度的进展^[21]。本次研究甲基化特异性PCR扩增结果显示,UPF1 DNA在甲状腺癌组织中出现非甲基化引物扩增,TCP-1细胞出现甲基化引物扩增,说明UPF1甲基化可能是甲状腺乳头状癌诊断的潜在分子标志物。

本次研究显示,TCP-1细胞中DNMT1蛋白高表达,而经过5-Aza-CdR干预后,DNMT1蛋白表达显著降低,提示5-Aza-CdR可抑制TCP-1细胞中DNMTs的表达,逆转高甲基化状态而恢复其正常的表达。TCP-1细胞中UPF1蛋白高表达,经过5-Aza-CdR干预后,UPF1蛋白表达显著降低,UPF1基因在TCP-1中的甲基化引物扩增条带减少甚至消失。抑癌基因UPF1启动子区域的高甲基化导致UPF1基因转录沉默^[22,23],提示5-Aza-CdR能够逆转UPF1基因甲基化状态,恢复UPF1蛋白的重新表达,达到治疗的目的。

miRNA表达水平与多种癌症具有紧密联系^[24,25]。mir-744-5p在恶性肿瘤中的作用首先在2017年被发现,大量研究证实其余多种恶性肿瘤的发生与进展联系密切^[26]。如mir-744-5p在前列腺癌中低表达,过表达mir-744-5p能够抑制乳腺癌细胞增殖、侵袭,减缓EMT进程^[27,28]。本次研究中,我们发现TCP-1细胞中mir-744-5p/CCND1表达水平明显低于正常细胞。CCND1是细胞周期蛋白家族中重要的一员,其主要功能是调节细胞周期进程,促进细胞由G1期转变为S期^[29,30]。作为mir-744-5p的下游靶基因,被发现存在与miR-744-5p的结合位点。经过去甲基化5-Aza-CdR干预后,TCP-1细胞mir-744-5p/CCND1表达明显提高。对细胞侵袭能力的研究显

示,UPF1去甲基化对正常甲状腺上皮细胞侵袭能力无影响,但是TCP-1细胞侵袭、迁移能力大幅度降低,提示UPF1去甲基化能抑制TCP-1细胞侵袭能力。

综上所述,UPF1甲基化存在于甲状腺乳头状癌中,UPF1基因甲基化的表达缺失可能抑制miR-744-5p/CCND1轴,在甲状腺乳头状癌发生发展中发挥关键作用。

参考文献(References)

- [1] 谷海燕,王丽丽,李广起,等.柱状细胞型甲状腺乳头状癌的临床病理学及分子遗传学特征[J].中华病理学杂志,2021,50(11):1257-1259.
- [2] 王冬海,李腾,田静,等.弥漫硬化型甲状腺乳头状癌临床病理特征分析[J].诊断病理学杂志,2021,28(8):652-656,661.
- [3] 强勇,王斐然,张小凤,等. circRNA-ZKSCAN1通过调节miR-628-5p/UPF1轴促进结直肠癌细胞增殖、迁移和侵袭[J].华中科技大学学报(医学版),2022,51(3):326-333.
- [4] 林海,林芮峰,邹自灏,等. UPF1通过mTOR/AKT信号通路调控膀胱癌的发生机制[J].广州医科大学学报,2021,49(4):19-26.
- [5] 胡凯,胡静,孙子久,等. UPF1在乳腺癌细胞中的表达与作用的研究[J].中国生物工程杂志,2022,42(1):58-71.
- [6] 赵艳利,康志强,毛雨,等. 微RNA-152靶向调控内质网脂质Raft关联蛋白1对甲状腺乳头状癌细胞增殖和迁移的影响[J].新乡医学院学报,2021,38(9):801-805.
- [7] 徐律,张炜,胡志,等. lncRNA CTD-2196 E14.5通过海绵吸附miR-744-5p抑制膀胱癌细胞的增殖和侵袭[J].现代肿瘤医学,2022,30(23):4233-4238.
- [8] 尹称意,马兵良,徐珏. lncRNA MNX1-AS1调节miR-744-5p/SH3BGRL3对喉癌细胞生长、迁移的影响[J].现代实用医学,2022,34(7):853-856,950,封2,封3.
- [9] 肖小琴,冷敏芳,陆艳萍,等. 甲状腺乳头状癌组织学亚型及其分子研究进展[J].癌症进展,2021,19(15):1517-1519,1529.
- [10] 孙团起. 甲状腺乳头状癌的核外分子遗传和表观遗传学研究[D].上海:复旦大学,2007.
- [11] 曹晓智,刘银华,韩艳丽,等. lncRNA MIR31HG在甲状腺乳头状癌组织中表达及其临床意义[J].中华实用诊断与治疗杂志,2021,35(10):1017-1020.
- [12] 秦小静,范会利,林旭,等. microRNA-7-5p在甲状腺乳头状癌中的表达及机制[J].实用医学杂志,2022,38(5):565-570.
- [13] 雷坤阳,谢文杰,孙庭,等. MiR-744-5p通过靶向CCND1抑制肾透明细胞癌细胞的增殖、侵袭和迁移[J].南方医科大学学报,2022,42(5):712-717.
- [14] 杜喜凤,胡志辉,景敏洁,等. miR-206过表达对甲状腺乳头状癌细胞增殖和迁移的影响[J].中国病理生理杂志,2020,36(5):871-876.
- [15] 胡凯. lncRNA SNHG3通过UPF1/SMAD轴促进乳腺癌进展[D].重庆:重庆医科大学,2022.
- [16] 叶凯丽,郑雯,叶启发,等. CDK1参与肝细胞癌的发展机制及其抑制剂应用价值[J].中国临床药理学与治疗学,2021,26(9):1086-1094.
- [17] YARUI LI, DAN GUO, YIFEI CHEN, et al. Long non-coding RNA SNAI3-AS1 promotes the proliferation and metastasis of Hepatocellular Carcinoma by regulating the UPF1/Smad7 Signaling Pathway[C]. //2019中国肿瘤学大会论文集,2019:699-700.
- [18] 叶志华,彭伟,桂定文,等. lncRNA ZFPM2-AS1在膀胱癌中的表达及对细胞迁移和增殖的影响[J].中国医师杂志,2021,23(3):354-358.

(下转第447页)

- Produced by a Methionine and Choline Deficient Diet [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 22(1): 51.
- [17] Fang C, Pan J, Qu N, et al. The AMPK pathway in fatty liver disease [J]. *Front Physiol*, 2022, 13: 1664-042X.
- [18] Xu Q, Tian W, He S, et al. Apocarotenoids from *Equisetum debile* Roxb. ex Vaucher regulate the lipid metabolism via the activation of the AMPK/ACC/SREBP-1c signaling pathway [J]. *Bioorg chem*, 2023, 138: 1090-2120.
- [19] Chang B, Bae J, Yun S, et al. Wheat sprouts (*Triticum aestivum* Linn.) cultured by a smart farm system ameliorate NAFLD through the AMPK-mediated SREBP signaling pathway [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2023, 32(11): 2092-6456.
- [20] Soetikno V, Andini P, Iskandar M, et al. Alpha-Mangosteen lessens high-fat/high-glucose diet and low-dose streptozotocin induced-hepatic manifestations in the insulin resistance rat model [J]. *Pharm Biol* 2023, 61(1): 1744-5116.
- [21] Zhang W, Li D, Li B, et al. STAT3 as a therapeutic target in the metformin-related treatment [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 116: 1878-1705.
- [22] Ciancaglini P, Yadav Mc Fau - Simão AMS, Simão Am Fau - Narisawa S, et al. Kinetic analysis of substrate utilization by native and TNAP-, NPP1-, or PHOSPHO1-deficient matrix vesicles [J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(4): 716-723.
- [23] Zhang ZA-O, Nam HA-O, Crouch S, et al. Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase Function in Bone and Muscle Progenitor Cells: Control of Mitochondrial Respiration and ATP Production [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(3): 1422-0067.
- [24] Sadhukhan S, Mehta P, Rajender S, et al. Proposing a clinical algorithm for better diagnosis of hypophosphatasia in resource-limiting situations [J]. *Osteoporos Int*, 2022, 33 (12): 1433-2965.
- [25] Shajani-Yi Z, Ayala-Lopez N, Black M, et al. Urine phosphoethanolamine is a specific biomarker for hypophosphatasia in adults Hypophosphatasia: Biological and Clinical Aspects, Avenues for Therapy [J]. *Bone*, 2022, 163: 1873-2763.

(上接第 409 页)

- [19] 韦柳兴, 李杨宏, 卢冠铭. 长链非编码 RNA 在甲状腺乳头状癌发生机制及临床应用的研究进展 [J]. *右江民族医学院学报*, 2020, 42 (4): 504-508.
- [20] 曲衍清, 刘新强, 崔莎莎, 等. 小干扰 RNA 靶向干扰低密度脂蛋白受体相关蛋白 4 基因对甲状腺乳头状癌细胞增殖的影响及其机制 [J]. *中华实验外科杂志*, 2021, 38(5): 832-834.
- [21] 熊代刚, 侯泽宇, 蔡玉怀, 等. 过表达 JAZF1 对甲状腺乳头状癌 BCP AP 细胞增殖、凋亡的影响及其机制 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(9): 55-60.
- [22] 霍青峰, 张生来, 张文杰. 甲状腺乳头状癌免疫逃逸机制进展 [J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35(2): 366-369.
- [23] 牛彦强, 谢金会, 倪雅琼, 等. 甲状腺乳头状癌自噬 - 上皮间质转化 - 铁死亡串扰调控机制的研究进展 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2022, 29(19): 1427-1432.
- [24] 牛彦强, 周祖邦, 田利民, 等. 非编码 RNAs 对甲状腺乳头状癌分子调控机制研究进展 [J]. *肿瘤防治研究*, 2021, 48 (11): 1030-1034.
- [25] 秦青青, 李婷婷, 郑永钦, 等. microRNA 在甲状腺乳头状癌中作用机制的研究进展 [J]. *基础医学与临床*, 2017, 37(8): 1184-1189.
- [26] Marczyk M, Polańska J, Wojcik A, et al. Analysis of the Applicability of microRNAs in Peripheral Blood Leukocytes as Biomarkers of Sensitivity and Exposure to Fractionated Radiotherapy towards Breast Cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8705.
- [27] 来旭, 范亚楠, 王瑞丰. LINC01106 靶向 miR-744-5p 影响乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移及侵袭 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2021, 28(4): 577-582.
- [28] El Kilany FH, Youness RA, Assal RA, et al. miR-744/eNOS/NO axis: A novel target to halt triple negative breast cancer progression [J]. *Breast Dis*, 2021, 40(3): 161-169.
- [29] 何黎明, 郭新程, 陶山松, 等. CCND1、ORA0V1、ERCC1 在舌鳞状细胞癌中的表达和临床意义 [J]. *口腔医学研究*, 2015, 31 (6): 597-600.
- [30] 王妹兴, 印季良, 肖健, 等. 结肠癌组织中 miR-340 和 CCND1 表达及临床意义 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2019, 24(6): 538-542.