

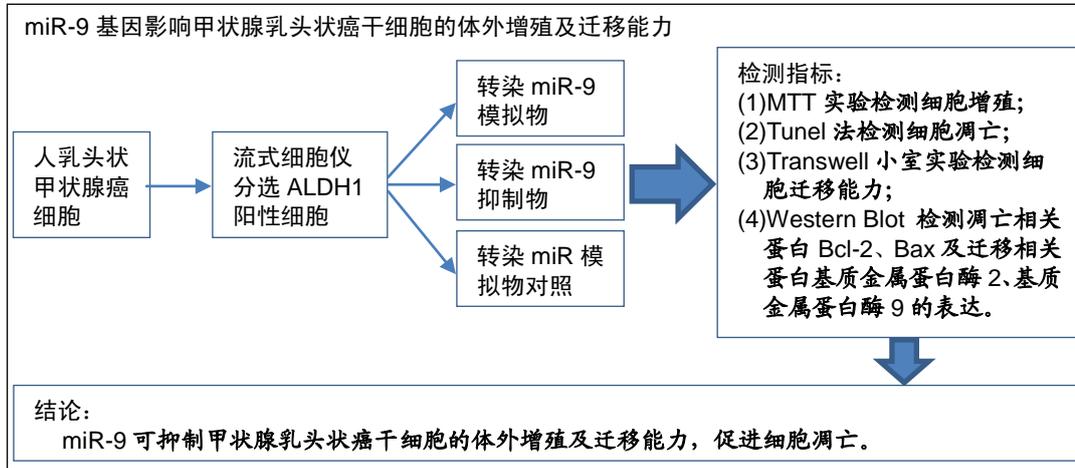
miR-9对甲状腺乳头状癌干细胞体外增殖及迁移能力的影响

韩菲, 秦海霞(乌兰察布医学高等专科学校, 内蒙古自治区乌兰察布市 012400)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1763

ORCID: 0000-0002-4873-0673(韩菲)

文章快速阅读:



韩菲, 女, 1987 年生, 河北省保定市人, 蒙古族, 2011 年内蒙古医科大学毕业, 硕士, 讲师, 主要从事病理学方面的研究。

通讯作者: 秦海霞, 硕士, 助教, 乌兰察布医学高等专科学校, 内蒙古自治区乌兰察布市 012400

文献标识码:A

稿件接受: 2019-02-21



文题释义:

miR-9: 是 miRNA 中的一个亚型, 广泛存在于不同物种中, miR-9 表达紊乱可导致基因表达异常, 从而在癌症的发生、转移及复发中发挥重要作用, 其在乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、胃癌、鼻咽癌及血液系统恶性肿瘤的发生与发展中发挥着重要作用。

乙醛脱氢酶 1(ALDH1): 是一类存在于细胞浆的酶类, 广泛分布于不同的组织中, 具有高度氧化活性, 在氧化视黄醇为视黄酸过程中参与基因的表达和组织分化, 乙醛脱氢酶 1 高表达在多种肿瘤组织中可作为肿瘤干细胞的标记, 在肿瘤的诊断、治疗、判断预后中具有一定的作用。

摘要

背景: miR-9 在各类型肿瘤及肿瘤不同发生发展阶段的作用不一样, 而对于其在甲状腺乳头状癌中的作用目前尚不清楚。

目的: 分析 miR-9 基因对甲状腺乳头状癌干细胞体外增殖及迁移能力的影响。

方法: 实验采用流式细胞仪从人乳头状甲状腺癌细胞中分选 ALDH1 阳性细胞, 实时反转录 PCR 检测 miR-9 基因的表达。取对数生长期的 ALDH1 阳性细胞, 分别转染 miR-9 模拟物、miR-9 抑制物或 miR 模拟物对照, 48 h 后采用 qRT-PCR 检测 miR-9 转染效率, MTT 实验、TUNEL 法、Transwell 小室实验检测细胞增殖、凋亡、迁移能力, Western Blot 检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 及迁移相关蛋白基质金属蛋白酶 2、基质金属蛋白酶 9 的表达。

结果与结论: ①miR-9 模拟物组 miR-9 基因表达高于 miR 模拟物对照组 ($P < 0.05$), miR-9 抑制物组 miR-9 基因表达低于 miR 模拟物对照组 ($P < 0.05$), 说明实验转染成功; ②与 miR 模拟物对照组比较, miR-9 模拟物组细胞增殖能力和迁移能力下降, 细胞凋亡增多, 而 miR-9 抑制物组细胞增殖能力和迁移能力增强, 细胞凋亡减少; ③与 miR 模拟物对照组比较, miR-9 模拟物组 Bcl-2 蛋白减少、Bax 蛋白增多 (P 均 < 0.05), miR-9 抑制物组 Bcl-2 蛋白增多、Bax 蛋白减少 (P 均 < 0.05); ④与 miR 模拟物对照组比较, miR-9 模拟物组基质金属蛋白酶 2、基质金属蛋白酶 9 表达减少 ($P < 0.05$), miR-9 抑制物组基质金属蛋白酶 2、基质金属蛋白酶 9 表达增多 ($P < 0.05$); ⑤结果显示, miR-9 可抑制甲状腺乳头状癌干细胞的体外增殖及迁移, 促进细胞凋亡。

关键词:

甲状腺乳头状癌; 肿瘤干细胞; ALDH1 阳性细胞; miR-9; 基因转染; 细胞增殖; 细胞迁移; 细胞凋亡

中图分类号: R459.9; R394.2

缩略语:

乙醛脱氢酶 1: aldehyde dehydrogenase 1, ALDH1

Han Fei, Master, Lecturer, Ulanqab Medical College, Ulanqab 012400, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Corresponding author: Qin Haixia, Master, Assistant lecturer, Ulanqab Medical College, Ulanqab 012400, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Effects of microRNA-9 on proliferation and migration of thyroid papillary cancer stem cells *in vitro*

Han Fei, Qin Haixia (Ulanqab Medical College, Ulanqab 012400, Inner Mongolia Autonomous Region, China)

Abstract

BACKGROUND: MicroRNA-9 (miR-9) exerts different effects in different types of tumors and at different stages of tumorigenesis, but its role in thyroid papillary carcinoma remains unclear.

OBJECTIVE: To analyze the effects of miR-9 on the proliferation and migration of thyroid papillary cancer stem cells *in vitro*.

METHODS: ALDH1 positive cells and ALDH1 negative cells were separated from human papillary thyroid cancer cells by flow cytometry. Expression of miR-9 mRNA was detected using reverse transcription PCR. ALDH1 positive cells in logarithmic growth phase were transfected with miR-9 mimetic, miR-9 inhibitor or miR mimetic control. After 48 hours, the transfection efficiency of miR-9 was detected by qRT-PCR; cell proliferation, apoptosis and migration were detected by MTT, TUNEL, and Transwell chamber assay, respectively. The expression of apoptosis-related proteins (Bcl-2 and Bax) and migration-related proteins (matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9) was detected by western blot.

RESULTS AND CONCLUSION: Successful transfections were confirmed by increased miR-9 gene expression in the miR-9 mimetic group and decreased miR-9 expression in the miR-9 inhibitor group relative to the miR mimetic control group ($P < 0.05$). Compared with the miR mimetic control group, the miR-9 mimetic group showed decreased cell proliferation and migration ability, and increased apoptosis, while in the miR-9 inhibitor group, cell proliferation and migration abilities were increased, and cell apoptosis decreased. Compared with the miR mimetic control group, the expression of Bcl-2 protein was decreased and the expression of Bax protein increased in the miR-9 mimetic group ($P < 0.05$), and the expression of Bcl-2 protein increased and expression of Bax protein decreased in the miR-9 inhibitor group ($P < 0.05$). Compared with the miR mimetic control group, the expression of matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase-9 was decreased in the miR-9 mimetic group ($P < 0.05$), and the expression of matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase-9 in the miR-9 inhibitor group was increased ($P < 0.05$). To conclude, miR-9 can inhibit the proliferation and migration of thyroid papillary cancer stem cells *in vitro*, but increase cell apoptosis.

Key words: papillary thyroid carcinoma; tumor stem cells; ALDH1 positive cells; miR-9; gene transfection; cell proliferation; cell migration; apoptosis

0 引言 Introduction

甲状腺乳头状癌是发病率最高的甲状腺恶性肿瘤,约占甲状腺癌的80%,并且发病率呈逐年上升趋势,以中年女性多发^[1]。甲状腺乳头状癌的发病相对缓慢,早期可无明显症状,但其侵袭能力较强,往往在患者就诊时就有淋巴结转移或已侵犯周围器官和组织,并且甲状腺乳头状癌发生浸润和远处转移后的5年生存率仅为35%^[2-3]。因而,如何提高甲状腺乳头状癌患者的生存率及生活质量,寻找有效的基因靶点是目前亟待解决的难题。

研究发现不同肿瘤中均存在一类具有自我更新、多系分化、耐药性、高度致瘤性等干细胞特性的细胞亚群,称为肿瘤干细胞,虽然肿瘤干细胞在肿瘤中仅占一小部分,但它被认为是肿瘤异质性、肿瘤发生、复发和转移的初始细胞。迄今为止,在乳腺癌、结肠癌、肝癌、胃癌等大多数实体瘤中发现了肿瘤干细胞,为针对肿瘤干细胞靶向治疗肿瘤提供了理论依据。尽管肿瘤干细胞理论应用于临床还有很多问题需要解决,但初步研究表明通过特异性靶向肿瘤干细胞来治疗肿瘤前景远大。

miRNA是一类长度为21-23个核苷酸的非编码小分子单链RNA,参与基因转录后水平的调控,在恶性肿瘤的发生与发展中扮演着重要角色^[4-6]。miR-9是miRNA中的一个亚型,广泛存在于不同物种中,miR-9表达紊乱可导致基因表达异常,从而在癌症的发生、转移及复发中发挥重要作用^[7-8]。miR-9基因在乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、胃癌、鼻咽癌及血液系统恶性肿瘤的发生与发展中发挥着重要作用^[9-19]。研究发现在复发的甲状腺乳头状癌组织中,miR-9表达水平较低。目前关于miR-9与甲状腺乳头状癌干细胞的相关研究并不多见,该研究采用流式细胞仪分选出乙醛脱氢酶1(aldehyde dehydrogenase1, ALDH1)阳性甲状腺乳头状癌干细胞,观察转染miR-9对其体外增殖及迁移能力的影响,以期为甲状腺乳头状癌的诊治靶点提供一些线索。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学实验。

1.2 时间及地点 2017年12月至2018年7月在乌兰察布医学高等专科学校完成。

1.3 材料 人乳头状甲状腺癌细胞(TPC-1细胞)(南京科佰生物科技有限公司); miR-9模拟物、miR-9抑制物及miR-9模拟物对照(广州市锐博生物科技有限公司); ALDH1-FITC抗体(美国BD公司); DMEM/F12培养基(武汉普诺赛生命科技有限公司); 重组人表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子(北京同立海源生物科技有限公司); 胎牛血清(江苏麦莎实业有限公司); All-in-One miRNA qRT-PCR Detection Kit试剂盒(亚太恒信生物科技(北京)有限公司); 流式细胞仪(美国贝克曼库尔特公司); 显微镜(上海谱赛光学仪器有限公司); Lipofectamine 2000转染试剂盒(大连美仑生物技术有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 甲状腺乳头状癌干细胞的分离培养 复苏冻存的TPC-1细胞,加入含体积分数10%胎牛血清的DMEM/F12培养基,置于37 °C、体积分数5%CO₂培养箱内培养。取对数生长期的TPC-1细胞,胰酶消化,1 000 r/min离心10 min,弃上清后重悬于FACS缓冲液中,调整细胞浓度为1×10⁹ L⁻¹;加入ALDH1-FITC抗体,37 °C孵育1 h; PBS清洗2次,流式细胞仪分选ALDH1阳性细胞与ALDH1阴性细胞。将ALDH1阳性细胞与ALDH1阴性细胞在含20 μg/L重组人表皮生长因子与20 μg/L碱性成纤维细胞生长因子的DMEM/F12培养基中培养。

1.4.2 实时反转录PCR检测miR-9基因的表达 提取ALDH1阳性细胞与ALDH1阴性细胞的总RNA,根据反转录试剂盒说明书进行反转录操作,合成cDNA,进行PCR扩增反应,采用2^{-ΔΔCt}方法分析miR-9在2种细胞中的相对表达。设计引物序列:miR-9的正向引物为:5'-GGT CTT TGG

甲状腺乳头状癌干细胞的培养及鉴定

细胞来源:	从乳头状甲状腺癌细胞 TPC-1 中分选获得 ALDH1 阳性细胞
细胞培养基:	DMEM/F12 培养基
添加材料:	20 $\mu\text{g/L}$ 重组人表皮生长因子与 20 $\mu\text{g/L}$ 碱性成纤维细胞生长因子
培养时间:	在含细胞生长因子的无血清培养基中培养, 两三天半量换液, 6-8 d 传代
细胞鉴定:	研究已证实, ALDH1 是肿瘤干细胞标志物之一, 同时其也是甲状腺癌肿瘤干细胞的有效标志物

TTA TCT AGC TGT ATG-3', U6的正向引物为: 5'-ATT GGA ACG ATA CAG AGA AGA TT-3', 反向引物为试剂盒自带的随机通用引物。实验重复3次。

1.4.3 甲状腺乳头状癌干细胞的基因转染 取对数生长期的ALDH1阳性细胞, 以 2×10^3 /孔的细胞密度接种于6孔板中, 每孔添加150 μL 转染剂miR-9模拟物、miR-9抑制物或miR模拟物对照, 严格依照Lipofectamine 2000转染试剂盒说明书操作进行, 24 h后更换为新鲜的干细胞培养基, 48 h后收集细胞, 采用qRT-PCR检测miR-9转染效率。

1.4.4 细胞增殖检测 取各组转染细胞, 以干细胞培养基重悬, 接种于96孔板中, 每孔200 μL , 细胞接种密度为 2×10^3 /孔, 每组6个复孔。培养的第1, 2, 3, 4, 5天, 取出96孔板, 每孔加入MTT溶液20 μL , 继续孵育4 h, 离心弃上清, 每孔加150 μL 二甲基亚砜, 震荡10 min, 于490 nm波长处检测吸光度值。

1.4.5 细胞凋亡检测 采用Tunel法检测细胞凋亡。取各组转染细胞, 制备细胞爬片, 培养24 h后无血清培养48 h, PBS清洗, 每组3个复孔; 多聚甲醛室温固定1 h, PBS清洗3次, 3 min/次; 体积分数0.3%过氧化氢溶液室温孵育20 min, PBS清洗3次, 3 min/次; 加入含0.1% Triton X-100的PBS水浴2 min; 添加TdT酶孵育60 min, PBS清洗3次, 3 min/次; 添加Streptavidin-HRP孵育30 min, PBS清洗3次, 5 min/次; DAB显色。

1.4.6 细胞迁移能力检测 取各组转染细胞, 以Invasion Buffer重悬, 调整细胞浓度为 $2.0 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 去除Transwell小室中的Invasion Buffer, 将200 μL 细胞悬液加至Transwell小室上室中, 将600 μL 含体积分数10%胎牛血清的DMEM/F12培养基加至Transwell小室下室中, 置于培养箱中培养24 h。取出Transwell小室, PBS清洗2次, 放入多聚甲醛中固定20 min, 结晶紫染色, 显微镜下随机计数6个视野穿过滤膜的细胞数, 取平均值。实验重复3次。

1.4.7 细胞凋亡与迁移相关蛋白检测 采用Western Blot检测Bcl-2、Bax、基质金属蛋白酶2、基质金属蛋白酶9的表达。简要步骤为: 取各组转染细胞, 250 $\times\text{g}$ 离心5 min后去上清, PBS清洗1次, 加入细胞裂解液, 提取总蛋白, 测定每个蛋白样品的蛋白浓度; 在蛋白样品中加入适量浓缩的SDS-PAGE蛋白上样缓冲液, 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热3-5 min; 冷

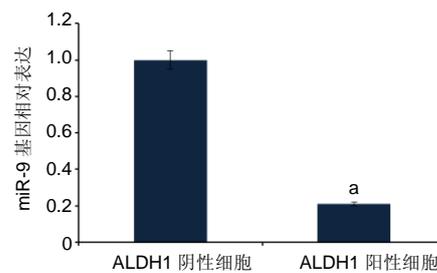
却到室温后, 把蛋白样品直接上样到SDS-PAGE胶加样孔内; 转膜, 将蛋白膜放置到预先准备好的Western洗涤液中漂洗一两分钟; 加入Western封闭液室温封闭60 min; 加入一抗室温孵育1 h; 加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育1 h; 显色曝光。

1.5 主要观察指标 ①ALDH1阳性细胞与ALDH1阴性细胞中miR-9基因的表达; ②转染48 h后, 各组ALDH1阳性细胞miR-9基因表达; ③转染48 h后, 各组ALDH1阳性细胞的增殖、凋亡、迁移能力及相关蛋白表达。

1.6 统计学分析 采用统计学软件SPSS 22.0, 组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 甲状腺乳头状癌肿瘤干细胞中miR-9基因的表达 qRT-PCR检测结果显示, ALDH1阳性细胞内miR-9基因表达明显低于ALDH1阴性细胞, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 见图1。



图注: 与 ALDH1 阴性细胞比较, ^a $P < 0.05$ 。

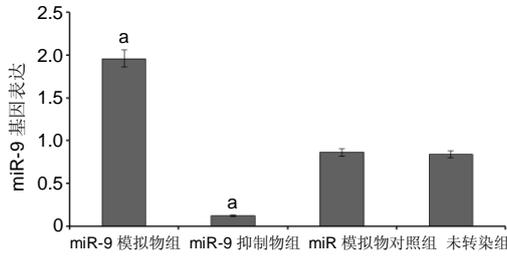
图1 ALDH1 阳性甲状腺乳头状癌干细胞与 ALDH1 阴性甲状腺乳头状癌细胞内 miR-9 基因的表达

Figure 1 Expression of microRNA-9 gene in ALDH1 positive cells and ALDH1 negative cells

2.2 细胞转染效果 实验检测了转染miR-9模拟物、miR-9抑制物、miR模拟物对照的ALDH1阳性细胞及未转染ALDH1阳性细胞内的miR-9基因表达, 发现miR模拟物对照组miR-9基因表达与未转染组比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 排除了miR模拟物对照对miR-9基因表达的影响; miR-9模拟物组miR-9基因表达高于miR模拟物对照组($P < 0.05$), miR-9基因表达是miR模拟物对照组的1.78倍; miR-9抑制物组miR-9基因表达低于miR模拟物对照组($P < 0.05$), miR-9基因表达较miR模拟物对照组下降了58.67%, 结果见图2。因此后续实验选择了miR-9模拟物组、miR-9抑制物组、miR模拟物对照组进行检测。

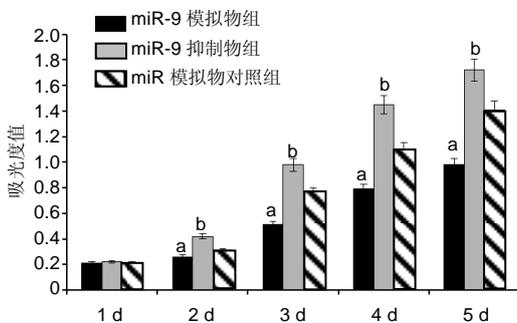
2.3 细胞增殖检测结果 MTT检测显示, 随着观察时间的延长, 各组细胞的吸光度值呈逐渐增加趋势; 培养第1天时, 各组细胞吸光度值比较差异无显著性意义($P > 0.05$); 培养第2天, miR-9模拟物组吸光度值低于miR-9抑制物组、miR模拟物对照组($P < 0.05$), 并且miR-9抑制物组吸光度值高于miR模拟物对照组($P < 0.05$); 培养的第3-5天, miR-9

模拟物组吸光度值低于miR-9抑制物组、miR模拟物对照组 ($P < 0.05$), miR-9抑制物组吸光度值高于miR模拟物对照组 ($P < 0.05$), 见图3。



图注: 与未转染组比较, $^aP < 0.05$ 。

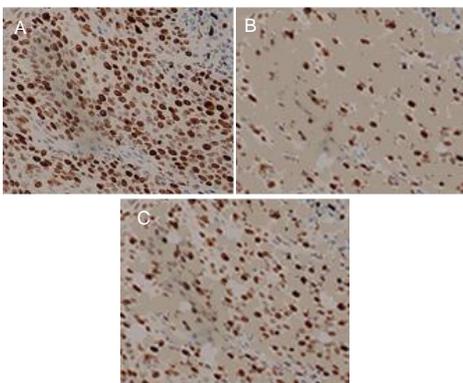
图2 各组 ALDH1 阳性甲状腺乳头状癌干细胞的 miR-9 基因表达
Figure 2 The expression of microRNA-9 gene in ALDH1 positive cells in each group



图注: 与 miR-9 抑制物组、miR 模拟物对照组比较, $^aP < 0.05$; 与 miR 模拟物对照组比较, $^bP < 0.05$ 。

图3 各组 ALDH1 阳性甲状腺乳头状癌干细胞的增殖情况
Figure 3 Proliferation of ALDH1 positive cells in each group

2.4 细胞凋亡实验结果 TUNEL染色显示, miR-9模拟物组细胞核固缩, 细胞体积较小, 呈棕黄色或黄褐色颗粒, 细胞凋亡明显; miR-9抑制物组、miR模拟物对照组细胞凋亡少于miR-9模拟物组, 见图4。

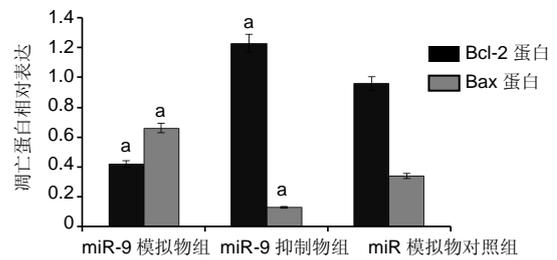
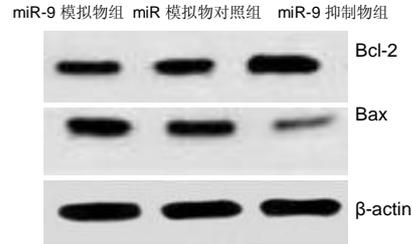


图注: 图中 A 为 miR-9 模拟物组; B 为 miR-9 抑制物组; C 为 miR 模拟物对照组。miR-9 模拟物组细胞凋亡明显多于 miR-9 抑制物组、miR 模拟物对照组。

图4 转染 48 h 后各组 ALDH1 阳性甲状腺乳头状癌干细胞的凋亡 (TUNEL 染色, $\times 200$)

Figure 4 Apoptosis of ALDH1 positive cells 48 hours after transfection (TUNEL staining, $\times 200$)

Western Blot检测显示, 与miR模拟物对照组比较, miR-9模拟物组细胞Bcl-2蛋白表达减少($P < 0.05$), Bax蛋白表达增多($P < 0.05$); 与miR模拟物对照组比较, miR-9抑制物组Bcl-2蛋白表达增多($P < 0.05$), Bax蛋白表达减少($P < 0.05$), 见图5。

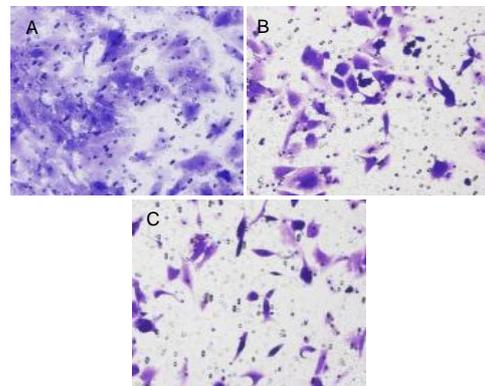


图注: 与 miR 模拟物对照组比较, $^aP < 0.05$ 。

图5 转染 48 h 后各组 ALDH1 阳性甲状腺乳头状癌干细胞凋亡蛋白的表达

Figure 5 Expression of apoptotic proteins in ALPH1 positive cells 48 hours after transfection

2.5 细胞迁移能力检测结果 Transwell小室显示, miR-9模拟物组、miR模拟物对照组、miR-9抑制物组的穿膜细胞数分别为 69.81 ± 10.23 , 203.14 ± 6.78 , 537.29 ± 6.31 , miR-9模拟物组穿膜细胞数少于miR模拟物对照组 ($P < 0.05$), miR-9抑制物组穿膜细胞数多于miR模拟物对照组 ($P < 0.05$), 见图6。

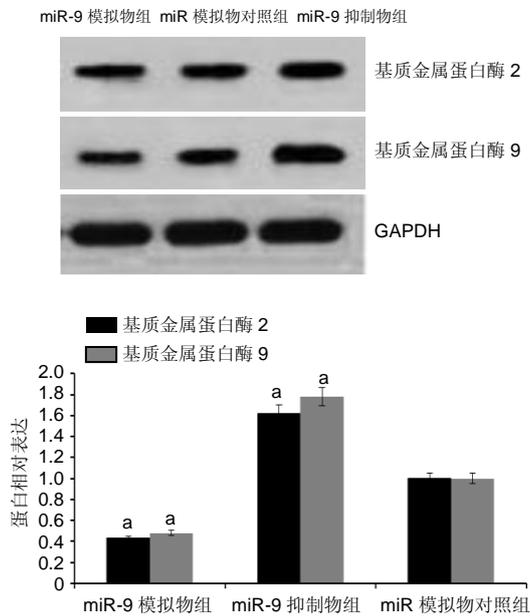


图注: 图中 A 为 miR-9 抑制物组; B 为 miR 模拟物对照组; C 为 miR-9 模拟物组。miR-9 模拟物组穿膜细胞数少于 miR 模拟物对照组, miR-9 抑制物组穿膜细胞数多于 miR 模拟物对照组。

图6 转染 48 h 后各组 ALDH1 阳性甲状腺乳头状癌干细胞的迁移能力(结晶紫染色, $\times 200$)

Figure 6 The migration ability of ALDH1 positive cells 48 hours after transfection (crystal violet staining, $\times 200$)

Western Blot检测显示, 与miR模拟物对照组比较, miR-9模拟物组细胞基质金属蛋白酶2、基质金属蛋白酶9蛋白表达减少($P < 0.05$), miR-9抑制物组细胞基质金属蛋白酶2、基质金属蛋白酶9蛋白表达增多($P < 0.05$), 见图7。



图注: 与 miR 模拟物对照组比较, $^aP < 0.05$ 。

图7 转染48 h后各组ALDH1阳性甲状腺乳头状癌干细胞的迁移相关蛋白表达

Figure 7 Expression of migration-related proteins in ALDH1-positive cells 48 hours after transfection

3 讨论 Discussion

miR-9在许多恶性肿瘤中存在异常表达^[20-23],关于其与肿瘤发生发展的关系有一定的争议,有研究认为其是抑癌基因,有研究认为其是促癌基因。刘文明等^[14]研究发现,上调miR-9表达可促进胃癌细胞的增殖与迁移,认为miR-9在胃癌中发挥促癌作用;而罗花南等^[17]认为miR-9能抑制鼻咽癌细胞的体外迁移和侵袭能力,在鼻咽癌中发挥抑癌作用;木扎帕尔·阿不都克热木等^[10]研究发现,在体外过表达miR-9可抑制乳腺癌细胞MCF-7的增殖及转移能力。上述系列研究结果说明miR-9在不同肿瘤中的作用机制不同。miR-9在不同类型肿瘤及肿瘤的不同发生发展阶段的作用不一样,而其在甲状腺乳头状癌中发挥什么作用目前尚不清楚,因此有必要探讨miR-9对于甲状腺乳头状癌肿瘤干细胞增殖及迁移能力的影响。

肿瘤干细胞是肿瘤细胞中能够引起肿瘤生长和维持自我更新及分化潜能的一小群细胞,能够有选择地启动肿瘤的生长等生物学行为,与肿瘤的复发、转移及耐药性等密切相关,影响肿瘤患者的治疗及预后^[24-25]。因此实验从甲状腺乳头状癌细胞中提取肿瘤干细胞,以其为研究对象。研究已证实,ALDH1是肿瘤干细胞标志物之一,同时其也是甲状腺癌肿瘤干细胞的有效标志物^[26]。实验采用流式细

胞仪从人乳头状甲状腺癌细胞中分选ALDH1阳性细胞与ALDH1阴性细胞, qRT-PCR检测结果显示, ALDH1阳性细胞内miR-9基因表达明显低于ALDH1阴性细胞, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。

实验通过MTT实验对转染miR-9模拟物、miR-9抑制物或miR模拟物ALDH1阳性细胞的增殖能力进行对比, 结果发现: 转染miR-9模拟物后, 培养第2-5天的ALDH1阳性细胞生长速度明显减慢, 克隆形成率明显降低; 而转染miR-9抑制物后, ALDH1阳性细胞生长速度明显加快, 克隆形成率明显升高, 说明上调miR-9基因可抑制ALDH1阳性细胞的增殖, 而下调miR-9基因可促进ALDH1阳性细胞的增殖, 间接反映了miR-9可能在甲状腺乳头状癌中扮演着抑癌因子的角色。郝博等^[27]将miR-9 mimics转染至口腔鳞状癌细胞后, 通过平板克隆形成实验证实miR-9抑制口腔鳞状癌细胞的增殖, 支持miR-9抑制肿瘤细胞增殖的观点。此实验也支持miR-9抑制肿瘤细胞增殖的观点。

凋亡是细胞的生理性死亡, 也是肿瘤细胞发生的重要机制之一^[28-30]。Bcl-2、Bax是细胞凋亡中非常重要的凋亡基因, 其中Bcl-2为抗凋亡基因, Bax为促凋亡基因^[28]。实验Tunel染色结果显示, 转染miR-9模拟物后, ALDH1阳性细胞凋亡细胞数量显著增多, Bcl-2蛋白表达减少($P < 0.05$), Bax蛋白表达增多($P < 0.05$); 而转染miR-9抑制物后, ALDH1阳性细胞仅见少量的细胞凋亡, Bcl-2蛋白表达增加($P < 0.05$), Bax蛋白表达减少($P < 0.05$); 推测miR-9可能通过调控Bcl-2、Bax表达来诱导甲状腺乳头状癌干细胞的凋亡。王公平等^[31]将miR-9 mimics转染至人胃癌SGC-7901细胞中, Western blot法检测证实人胃癌SGC-7901细胞Bcl-2蛋白表达下调、Bax表达上调, 也得出miR-9可能通过调控Bcl-2、Bax表达来诱导胃癌细胞凋亡的结论。

肿瘤干细胞的迁移能力在肿瘤进展中发挥着关键作用^[32-35]。实验进行了Transwell小室与迁移相关蛋白检测, 实验结果显示: 转染miR-9模拟物后, ALDH1阳性细胞的迁移能力明显下降, 迁移相关蛋白基质金属蛋白酶2、基质金属蛋白酶9的表达显著下降; 而转染miR-9抑制物后, ALDH1阳性细胞的迁移能力明显提高, 迁移相关蛋白基质金属蛋白酶2、基质金属蛋白酶9的表达显著升高, 说明miR-9可能通过调控基质金属蛋白酶2、基质金属蛋白酶9的表达来抑制甲状腺乳头状癌干细胞的迁移能力。

综合上述实验结果, 作者认为miR-9可抑制甲状腺乳头状癌干细胞的体外增殖与迁移能力, 促进甲状腺乳头状癌干细胞的凋亡。未来将进行动物体内实验, 进一步证实miR-9对甲状腺乳头状癌干细胞的增殖与迁移能力的影响。

作者贡献: 实验的设计、实施及评估由全体作者共同完成。

经费支持: 该文章没有接受任何经费支持。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中

不存在利益冲突。

机构伦理问题: 研究用细胞的实验方案符合相关伦理学要求。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过乌兰察布医学高等专科学校生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Xue S, Wang P, Hurst ZA, et al. Active Surveillance for Papillary Thyroid Microcarcinoma: Challenges and Prospects. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:736.
- [2] Cokmez H, Gulbahar A, Yigit S, et al. Oncocytic and tall columnar type papillary thyroid carcinoma arising on a mature cystic teratoma: A case report and literature review. *J Pak Med Assoc*. 2019;69(1):116-119.
- [3] Kuo EJ, Thi WJ, Zheng F, et al. Individualizing Surgery in Papillary Thyroid Carcinoma Based on a Detailed Sonographic Assessment of Extrathyroidal Extension. *Thyroid*. 2017;27(12):1544-1549.
- [4] Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(3):203-222.
- [5] Kim D, Chang HR, Baek D. Rules for functional microRNA targeting. *BMB Rep*. 2017;50(11):554-559.
- [6] 刘雯,沙银中,李亚东.循环microRNA在常见肿瘤中的应用研究进展[J].*国际检验医学杂志*,2018,39(16):1950-1954.
- [7] Xie H, Zhao Y, Zhou Y, et al. MiR-9 Regulates the Expression of BACE1 in Dementia Induced by Chronic Brain Hypoperfusion in Rats. *Cell Physiol Biochem*. 2017;42(3):1213-1226.
- [8] 李晓琳,胡雪玲,孙丽华.微小RNA-9在癌症及神经退行性疾病中的研究现状[J].*中国临床药理学杂志*,2015,31(4):315-316,320.
- [9] 杨珏,宋辉,吕小波,等. MicroRNA-9调控乳腺癌细胞转移机制的研究[J].*药物生物技术*,2014,21(4):306-310.
- [10] 木扎帕尔·阿不都克热木,杨乐,孙刚,等.微小RNA-9对乳腺癌细胞MCF-7增殖与转移能力的影响及其机制[J].*中华实验外科杂志*,2016,33(10):2338-2340.
- [11] 郭伟逢,周波,马丁,等.miR-9通过E-cadherin/snail1信号途径促进卵巢癌细胞侵袭与转移的研究[J].*中国妇幼保健*,2015,30(22):3891-3893.
- [12] 周波,孙朝阳,夏萌,等.miR-9在卵巢癌细胞上皮间质转化中的初步研究[J].*现代生物医学进展*,2016,16(31):6001-6004,6009.
- [13] Lu MH, Huang CC, Pan MR, et al. Prospero homeobox 1 promotes epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells by inhibiting E-cadherin via miR-9. *Clin Cancer Res*. 2012;18(23):6416-6425.
- [14] 刘文明,范燕云,田钊旭,等.MiR-9对人胃癌细胞增殖和迁移的影响[J].*胃肠病学*,2018,23(6):342-346.
- [15] 宋皓军,周为东,丁小云.miR-9的表达异常对胃癌上皮间质转化的影响[J].*现代实用医学*,2016,28(7):851-853,封3.
- [16] 南寿山,王珏磊.MicroRNA-9通过NRP1抑制胃癌SGC-7901细胞上皮-间充质转化功能[J].*中国病理生理杂志*,2017,33(7):1191-1195.
- [17] 罗花南,马思敬,易春曦,等.miR-9过表达对鼻咽癌细胞迁移和侵袭的影响[J].*陕西医学杂志*,2017,46(10):1332-1334.
- [18] 郑朝攀,韩灵,侯伟坚,等.负向调控miR-9抑制鼻咽癌细胞的增殖、迁移和侵袭[J].*中国病理生理杂志*,2014,30(4):640-644.
- [19] 李锋.经典型霍奇金淋巴瘤细胞CD99、miR-9与NF-κB信号通路调控机制研究[D].广州:南方医科大学,2011.
- [20] Kiani S, Akhavan-Niaki H, Fattahi S, et al. Purified sulforaphane from broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) leads to alterations of CDX1 and CDX2 expression and changes in miR-9 and miR-326 levels in human gastric cancer cells. *Gene*. 2018;678:115-123.
- [21] Lu J, Liu QH, Wang F, et al. Exosomal miR-9 inhibits angiogenesis by targeting MDK and regulating PDK/AKT pathway in nasopharyngeal carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37(1):147.
- [22] Khosravi A, Alizadeh S, Jalili A, et al. The impact of Mir-9 regulation in normal and malignant hematopoiesis. *Oncol Rev*. 2018;12(1):348.
- [23] Nowek K, Wiemer EAC, Jongen-Lavrencic M. The versatile nature of miR-9/9* in human cancer. *Oncotarget*. 2018;9(29):20838-20854.
- [24] 靖林林,姚学清,符秀琼,等.肿瘤干细胞及其niche的中医属性及发生病机[J].*南京中医药大学学报*,2018,34(2):214-216.
- [25] 秦越,丁宁,陈艺,等.肿瘤微环境与肿瘤演进作用的研究进展及展望[J].*临床普外科电子杂志*,2018,6(1):37-40.
- [26] 岳常丽,赵晓丽,田澄,等.甲状腺乳头状癌 ALDH1A1表达与淋巴结转移的相关性[J].*中华病理学杂志*,2015,44(7):490-494.
- [27] 郝博,高小玲,贺红. MicroRNA-9对口腔鳞状细胞癌细胞增殖和凋亡的影响[J].*临床和实验医学杂志*,2017,16(18):1779-1783.
- [28] 艾晓兰,姚芳,王晓晴,等.同种异体移植炎症因子-1在结肠癌细胞增殖、迁移及凋亡中的作用[J].*南方医科大学学报*,2018,38(5):511-519.
- [29] 向利军,贺翊峰,鲁才杰,等.siRNA干扰Notch1诱导肝癌细胞凋亡的机制研究[J].*湖南中医药大学学报*,2018,38(3):284-288.
- [30] Xu J, Koizumi K, Liu M, et al. Shikonin induces an anti-tumor effect on murine mammary cancer via p38-dependent apoptosis. *Oncol Rep*. 2019;41(3):2020-2026.
- [31] 王公平,周博,金灿辉,等.微小RNA-9对胃癌细胞SGC-7901增殖及凋亡的影响[J].*中华实验外科杂志*,2015,32(8):1899-1901.
- [32] 蔡坤,喻超,田舍,等. TRIM31沉默抑制胰腺癌侵袭和迁移[J].*贵州医科大学学报*,2018,43(8):869-873.
- [33] 张达容,王维莲,吴立翔,等. Twist促进人三阴性乳腺癌细胞迁移和侵袭[J].*基础医学与临床*,2018,38(6):771-775.
- [34] Srinivasan M, Bharali DJ, Sudha T, et al. Downregulation of Bmi1 in breast cancer stem cells suppresses tumor growth and proliferation. *Oncotarget*. 2017;8(24):38731-38742.
- [35] Huang L, Xu C, Xu P, et al. Intelligent Photosensitive Mesenchymal Stem Cells and Cell-Derived Microvesicles for Photothermal Therapy of Prostate Cancer. *Nanotheranostics*. 2018;3(1):41-53.