·基础研究· doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2025.05.004
网络首发 https://link.cnki.net/urlid/50.1097.r.20250317.1700.002(2025-03-18)

长链非编码 RNA DPP10-AS1 促进甲状腺乳头状癌淋巴结转移的机制研究*

薛景丽[1,2],刘瑞静[1],刘 稳[1,2],魏于清[1,2],姜贝贝[1,3],尹义强[1,3],李培峰[1,2△]
(1.锦州医科大学中国人民解放军解放军联勤保障部队第九六〇医院研究生培养基地,济南 250031;
2.中国人民解放军联勤保障部队第九六〇医院病理科,济南 250031;3.济南市
第四人民医院病理科,济南 250031)

[摘要] **目的** 筛选甲状腺乳头状癌(PTC)淋巴结转移相关的长链非编码 RNA(lncRNA)并进行体外功能验证,为阐明 PTC 淋巴结转移的分子机制提供理论基础。**方法** 采用 lncRNA+mRNA 芯片检测有和无淋巴结转移 PTC 组织中差异性表达的 lncRNA 和 mRNA,实时荧光定量 PCR(qPCR)验证目标差异性 lncRNA。以慢病毒为载体构建目标 lncRNA 高表达和低表达 PTC 细胞系,细胞计数试剂盒-8(CCK-8)、细胞划痕、Transwell、细胞克隆形成试验分别检测目标 lncRNA 对 PTC 细胞增殖、迁移、侵袭及克隆形成的影响。**结果** 与 5 例无淋巴结转移 PTC 组织比较,基因芯片在 5 例淋巴结转移 PTC 组织中检测到 119 个 lncRNA 和 53 个 mRNA 表达水平上调,263 个 lncRNA 和 198 个 mRNA 表达水平下调。进一步选择 21 个 lncRNA 在原 10 例 PTC 标本中进行验证,结果显示,与无淋巴结转移 PTC 组织比较,淋巴结转移 PTC 组织中 lncRNA FLJ20444、DPP10-AS1、ENST00000567197 高表达,而 uc021thd.1、LNC00944、ENST00000429730、BLNK 低表达($P<0.05$)。另外 30 例新鲜 PTC 组织 qPCR 结果显示,与无淋巴结转移 PTC 组织比较,淋巴结转移 PTC 组织中 DPP10-AS1 高表达,LNC00944 低表达($P<0.05$)。细胞功能实验显示 DPP10-AS1 高表达组细胞增殖、迁移、侵袭及克隆形成能力均高于 DPP10-AS1 低表达组($P<0.05$)。**结论** lncRNA DPP10-AS1 可能通过某些信号通路在 PTC 转移过程中发挥作用。

[关键词] 甲状腺乳头状癌;淋巴结转移;lncRNA;DPP10-AS1;差异性表达
[中图法分类号] R736.1 [文献标识码] A [文章编号] 1671-8348(2025)05-1066-08

Mechanism study of long non-coding RNA DPP10-AS1 promotes lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma*

XUE Jingli[1,2],*LIU Ruijing*[1],*LIU Wen*[1,2],*WEI Yuqing*[1,2],*JIANG Beibei*[1,3],
YIN Yiqiang[1,3],*LI Peifeng*[1,2△]
(1.*Graduate Training Base*,*the* 960th *Hospital of PLA Joint Logistic Support Force*,*Jinzhou Medical University*,*Jinan*,*Shandong* 250031,*China*;2.*Department of Pathology*,*the* 960th *Hospital of PLA Joint Logistics Support Force*,*Jinan*,*Shandong* 250031,*China*;3.*Department of Pathology*,*the Fourth People's Hospital of Jinan*,*Jinan*,*Shandong* 250031,*China*)

[**Abstract**] **Objective** To screen long non-coding RNA (lncRNA) associated with lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma (PTC) and verify its function in vitro,so as to provide a theoretical basis for elucidating the molecular mechanism of lymph node metastasis in PTC. **Methods** lncRNA+mRNA microarray was used to detect the differential expression of lncRNA and mRNA in PTC cancer tissues with and without lymph node metastasis. Real time fluorescence quantitative PCR (qPCR) verified target differential lncRNAs. Lentivirus was used as vector to construct high and low lncRNA expression PTC cell lines. Cell counting kit-8 (CCK-8),cell scratches assay,Transwell assay,cell clone formation assay were used to detect the effects of target lncRNA on proliferation,migration,invasion,clonal formation of PTC cells. **Results** Compared with 5 cases of PTC tissues without lymph node metastasis,gene chips detected 119 lncRNA and 53 mRNA expression levels upregulated,while 263 lncRNA and 198 mRNA expression levels down regulated in 5 cases of PTC tissues with lymph node metastasis. Furthermore,21 lncRNAs were selected for validation in the original 10 PTC samples,and the results showed that,compared with PTC tissues without lymph node metastasis,lncRNAs FLJ20444,DPP10-AS1 and ENST00000567197 were highly expressed in PTC tissues with lymph node

* 基金项目:济南市临床医学科技创新计划(202019024)。 △ 通信作者,E-mail:lipeifeng00@hotmail.com。

metastasis, while uc021thd.1, LNC00944, ENST00000429730 and BLNK were lowly expressed ($P<0.05$). In addition, qPCR results of another 30 fresh PTC tissues showed that compared with PTC tissues without lymph node metastasis, DPP10-AS1 was highly expressed and LNC00944 was lowly expressed in PTC tissues with lymph node metastasis ($P<0.05$). Cell function experiments showed that the proliferation, migration, invasion, and colony formation abilities of PTC cells in the DPP10-AS1 high expression group were higher than those in the DPP10-AS1 low expression group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** lncRNA DPP10-AS1 may play a role in PTC metastasis through certain signaling pathways.

[**Key words**] papillary thyroid carcinoma; lymph node metastasis; lncRNA; DPP10-AS1; differential expression

甲状腺癌是最常见的内分泌恶性肿瘤，目前其全球发病率呈快速上升趋势。虽然大多数甲状腺癌患者具有极高的生存率，但首次手术治疗后其复发率可达 8%～23%[1]。甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma，PTC)是临床最为常见的甲状腺癌病理类型，其癌细胞分化程度高，尽管较其他病理类型甲状腺癌发展缓慢，但易于发生淋巴结转移。这给临床对其实施根治性手术增加了难度，而且远处转移的发生更是降低 PTC 患者 5 年生存率的重要因素。美国癌症中心的研究数据表明，无转移 PTC 的患者 5 年生存率是 100%，有局部淋巴结转移的患者 5 年生存率是 98%，而有远处转移的患者 5 年生存率却仅有 78%[2]。因此，PTC 转移的发生不仅降低了患者总生存期和生活质量，还极大地加重了患者的治疗负担。阐明 PTC 发生转移的分子机制，寻找相关分子标志物及有效治疗靶点，有助于 PTC 患者早期转移的预判和个体化治疗，提高患者的远期生存率和生活质量。

随着基因芯片技术和全基因组测序技术的发展，越来越多的非编码 RNA(noncoding RNAs，ncRNAs)被发现在细胞生长、发育和疾病病理过程中发挥重要作用。长链非编码 RNA(long noncoding RNA，lncRNA)是一类转录本长度超过 200 nt 且不编码蛋白的 RNA 分子，它可在多种层面调控基因表达，与多种肿瘤的发生、发展和预后密切相关[3-6]，因此，lncRNA 成为近年来肿瘤研究的热点。国内外不少研究发现 lncRNA 与 PTC 的发生、发展密切相关[7-9]。GUO 等[7]研究发现 lncRNA MIAT 可作为竞争性内源 RNA，通过下调微 RNA-150-5p(microRNA-150-5p，miR-150-5p)靶向 Zeste 增强子同源物 2(enhancer of zeste homolog，EZH2)，促进甲状腺癌的进展。lncRNA PAPAS 过表达通过下调 lncRNA HOTTIP 抑制 PTC 生长[10]。lncRNA MPEG1-1 通过结合 miR-766-5p 促进 PTC 细胞的增殖和转移[11]。虽然学者们已对 lncRNA 做了大量研究[12]，但对 lncRNA 在 PTC 中的生物学作用的研究还不明确，对于 lncRNA 在 PTC 转移中作用研究相对不足。

本研究使用基因芯片技术筛选有和无淋巴结转移的 PTC 组织中差异表达的 lncRNA，探讨其在 PTC 发生、发展中的潜在功能，为 PTC 治疗新靶点的分子机制研究奠定基础，从而为 PTC 的预防、诊断及个体化精准治疗提供更充分的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源

选取 2021 年 1 月至 2022 年 5 月首次在锦州医科大学中国人民解放军联勤保障部队第九六〇医院行甲状腺肿瘤切除术的患者为研究对象，且病理学证实为 PTC，手术中收集患者新鲜的 PTC 组织及癌旁组织。将收集好的组织标本立即放入－80 ℃冰箱待用。共收集 40 例患者标本，有、无淋巴结转移患者各 20 例。用于芯片检测的 10 例标本(淋巴结转移 PTC 组织和无淋巴结转移 PTC 组织各 5 例)对应的患者，男 4 例、女 6 例，年龄 26～71 岁，平均(48.0±4.7)岁。用于芯片结果验证的 30 例标本(淋巴结转移和无淋巴结转移各 15 例)对应的患者，男 14 例、女 16 例，年龄 18～73 岁，平均(45.5±6.5)岁。所有 PTC 患者术前均未经化疗和放疗等。PTC 细胞系 TPC-1 购自武汉普诺赛科技有限公司。所有标本的采集及后续分析均经患者知情同意，且经锦州医科大学中国人民解放军联勤保障部队第九六〇医院伦理委员会批准(审批号：2020-38)。

1.1.2 主要仪器与试剂

Arraystar 人类 lncRNA 基因芯片(V3.0)检测由康成生物科技有限公司完成，TRIzol 试剂、逆转录试剂盒、PCR 扩增试剂盒均购自日本 TaKaRa 公司，RPMI-1640 培养基、胎牛血清、0.25%胰酶均购自美国 Gibco 公司，无血清冻存液购自苏州新赛美生物科技有限公司，0.1%结晶紫购自北京雷根生物技术有限公司，10%中性甲醛、细胞计数试剂盒-8(cell counting kit，CCK-8)、Matrigel 胶、细胞培养瓶、Transwell 小室、各规格移液器、枪头及 EP 管、PCR 扩增八连管均购自美国 Axygen 公司。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。AB GeneAmp PCR 仪购自上海艾研科技有限公司，SLAN-96P real-time PCR 仪购自上海宏石医疗科技有限公司，Thermo 低温高速离心机、RT6000 酶标仪均购自美国 Thermo Fisher 公司。

1.2 方法

1.2.1 基因芯片检测与生物信息学分析

提取新鲜 PTC 组织总 RNA，Agilent ND-1000 检测 RNA 是否降解并测定总 RNA 浓度。Arraystar

人类 lncRNA+mRNA 基因芯片(V3.0)检测标本 lncRNA 和 mRNA 表达。使用 Arraystar RNA Flash Labeling 试剂盒对标本进行标记,Agilent SureHyb 进行杂交。芯片经过洗涤后,使用 Agilent DNA Microarray Scanner 扫描。利用 Agilent Feature Extraction11.0.1.1 软件采集芯片探针信号值。使用 Agilent GeneSpring GX12.1 软件进行芯片标准化分析,并比较差异性表达 lncRNA 和 mRNA。对差异 lncRNA 进行基因本体(Gene Ontology,GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)通路分析。

1.2.2 实时荧光定量 PCR(real time fluorescence quantitative PCR,qPCR)检测组织和细胞中的 lncRNA 表达水平

采用 TRIzol 试剂从冷冻组织标本或新鲜培养细胞中提取总 RNA。使用 NanoDrop 1000 分光光度计(美国 ThermoScientific 公司)测定总 RNA 的浓度和纯度。采用 TaKaRa RR047A 反转录试剂盒中 gDNA Eraser 在 42 ℃孵育 2 min 去除总 RNA 基因组中的 DNA。使用 RT Primer Mix(日本 TaKaRa 公司)通过在逆转录酶的作用下,以 RNA 为模板,在 AB GeneAmp PCR 仪上转录合成 cDNA,反应条件:37 ℃ 15 min、85 ℃ 5 s。使用 SYBR 预混剂 ExTaq(日本 TaKaRa 公司)在 SLAN-96P real-time PCR 仪上行 PCR 反应,各基因引物序列见表 1,以甘油醛 3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)作为内参,反应条件:95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各基因表达水平。

1.2.3 细胞培养和慢病毒转染构建稳定 PTC 细胞株

TPC-1 细胞用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基于 5% CO_2、37 ℃培养箱内培养。稳定转染慢病毒由上海吉凯基因医学科技股份有限公司构建,DPP10-AS1 短发夹 RNA(DPP10-AS1-shRNA)旨在下调 DPP10-AS1 的表达,利用载体 GV493 构建干扰慢病毒 DPP10-AS1-shRNA,转染 TPC-1 后细胞株命名为 sh-DPP10-AS1-TPC-1 组,空载体转染 TPC-1 作为对照,命名为 sh-NC-TPC-1 组。利用载体 GV513 构建 DPP10-AS1 过表达慢病毒 GV513-DPP10-AS1,GV513-DPP10-AS1 上调 DPP10-AS1 的表达,GV513-NC 转染 TPC-1 作为对照,转染细胞株分别命名为 GV-DPP10-AS1-TPC-1 组、GV-NC-TPC-1 组。转染时,取 200 μL 细胞浓度为 4×10^4/mL 的 TPC-1 接种于 24 孔培养板。24 h 后,用相应的慢病毒转染,转染 24 h 后采用嘌呤霉素加压筛选进而获得稳定细胞株。

1.2.4 CCK-8 实验检测细胞增殖能力

将构建的稳定细胞株以约 1 000/孔接种至 96 孔培养板中培养,分别在培养 24、48、72、96 h 加入 CCK-8 试剂,孵育 2 h 后,在酶标仪中测量 450 nm 处的吸光度[$A_{(450)}$]值。

1.2.5 细胞划痕实验检测细胞迁移能力

用无血清培养基制备细胞悬液,将 5×10^4/孔细胞接种于 6 孔培养板中,在其对数生长期进行划痕并拍照,放入培养箱孵育,分别在培养 24、48、72 h 后拍照,用 Image J 软件测量划痕面积,并计算细胞迁移率。

表 1 qPCR 验证差异性表达的 lncRNA 引物及产物大小

基因名称	方向	引物序列(5′—3′)	产物大小(bp)
FLJ20444	正向	TCA TCT GTA CGG TTG GGA CA	203
	反向	ACT CCT GCA AGT GTG CTC CT	
DPP10-AS1	正向	CTG CCC TTC CCA AAG AAA AT	198
	反向	CCA CGG GGA AAT GTA TCT TG	
ENST00000567197	正向	TAT GAG GAA GCA AGG GCA TT	208
	反向	TGT TTT GGA CTT GGT TTG CT	
GAPDH	正向	GGC CTC CAA GGA GTA AGA CC	122
	反向	AGG GGA GAT TCA GTG TGG TG	
uc021thd1.1	正向	GTG CAG CTG GTG GAG TCT G	133
	反向	CCA GTC CCT TCC CTG GAG	
LINC00944	正向	CGA ACC CTT CGA TTG AGA AG	201
	反向	CTT CCT CTG CAT CAG GCT GT	
ENST00000429730	正向	TCA CAG TGT TCC TCC CTC CT	199
	反向	AGG CAG GTG GTG CAA AAT AG	
BLNK	正向	GAG GCA GCT TCA AAA GAT GG	199
	反向	CCG AGT GCT CAT CTG GAT TT	

1.2.6 Transwell 实验检测细胞侵袭能力

将 5×10^4 个细胞悬浮于无血清的 RPMI-1640 培养液中,取 200 μL 均匀地加入 Transwell 室(8 μm 孔径,事先铺好 Matrigel 胶)上室,下室加入含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液 500 μL/室。孵育 48 h 后,将小室在 10%中性甲醛中固定 20 min,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline,PBS)清洗 3 次后,用 0.1%结晶紫染色 2 min,PBS 清洗后风干,用棉签轻轻擦拭小室底膜内面,拭去未迁移的细胞,在显微镜下取 5 个视野观察细胞并计数、拍照。

1.2.7 平板克隆形成实验检测细胞克隆形成能力

将 500/孔细胞接种到 6 孔培养板中,37 ℃ 5% CO_2 培养箱中培养 14 d,弃培养液,PBS 清洗,10%中性甲醛固定 30 min,0.1%结晶紫染色 2 min,观察细胞团块形成大小及数量。

1.3 统计学处理

采用 SPSS26.0 软件进行数据统计分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,比较采用 t 检验,计数资料以例数或百分比表示,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

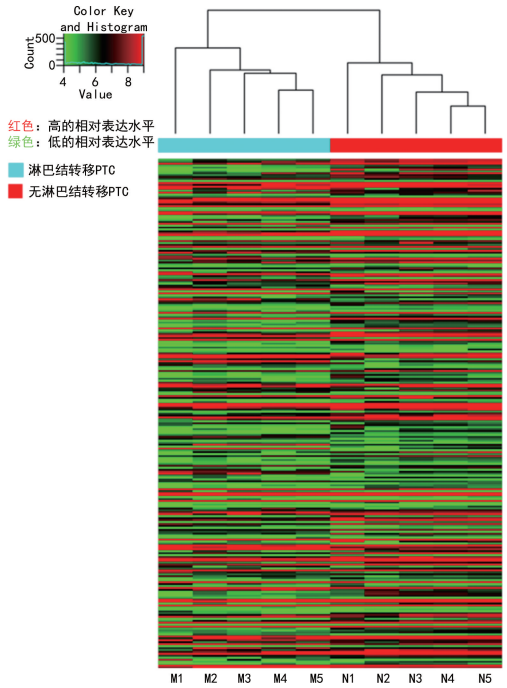
2 结 果

2.1 筛选差异性表达的 lncRNA

采用 lncRNA+mRNA 基因芯片检测 10 例 PTC 组织中 26 053 个 lncRNA 和 21 693 个 mRNA 表达水平。与 5 例无淋巴结转移 PTC 组织比较,5 例淋巴

结转移 PTC 组织中 119 个 lncRNA 和 53 个 mRNA 表达上调，263 个 lncRNA 和 198 个 mRNA 表达下调。样本聚类分析显示淋巴结转移 PTC 组织和无淋巴结转移 PTC 组织呈现不同的 lncRNA 表达，见图 1。GO 功能富集分析结果表明，表达上调的 mRNA 主要参与神经肽激素活性调控、表皮生长因子受体结合、微管正端结合及小分子蛋白激酶激活等生物学过程；而表达下调的 mRNA 则富集于免疫系统调节（包括免疫应答调控、白细胞及淋巴细胞活化等）相关功能。KEGG 通路富集分析显示，表达上调的 mRNAmRNA 富集于嗅觉信号转导、ErbB 和细胞因子—细胞因子受体相互作用信号通路；而表达下调的 mRNA 主要参与抗原加工呈递、造血细胞谱系分化及移植物抗宿主病等病理生理过程。

基于基因芯片表达数据计算候选基因与所有 lncRNA 间的相关系数，并依据相关系数选择明显关联的基因 lncRNA 配对，进而构建共同表达网络 CNC-network，见图 2，并结合临近基因分析结果和倍数差异明显的指标，选择 21 个 lncRNA 采用 qPCR 在原 10 例 PTC 标本中进行验证，结果显示 uc021thd.1、LINC00944、ENST00000429730、BLNK、FLJ20444、DPP10-AS1、ENST00000567197 在淋巴结转移 PTC 组织标本和无转移 PTC 组织标本表达存在差异，FLJ20444、DPP10-AS1、ENST00000567197 在淋巴结转移 PTC 组织中高表达，其余 4 个 lncRNA 低表达，见表 2。



M1、M2、M3、M4、M5：5 例淋巴结转移 PTC 组织标本；N1、N2、N3、N4、N5：5 例无淋巴结转移 PTC 组织标本。

图 1　基因芯片检测 10 例 PTC 组织标本 lncRNA 表达聚类分析

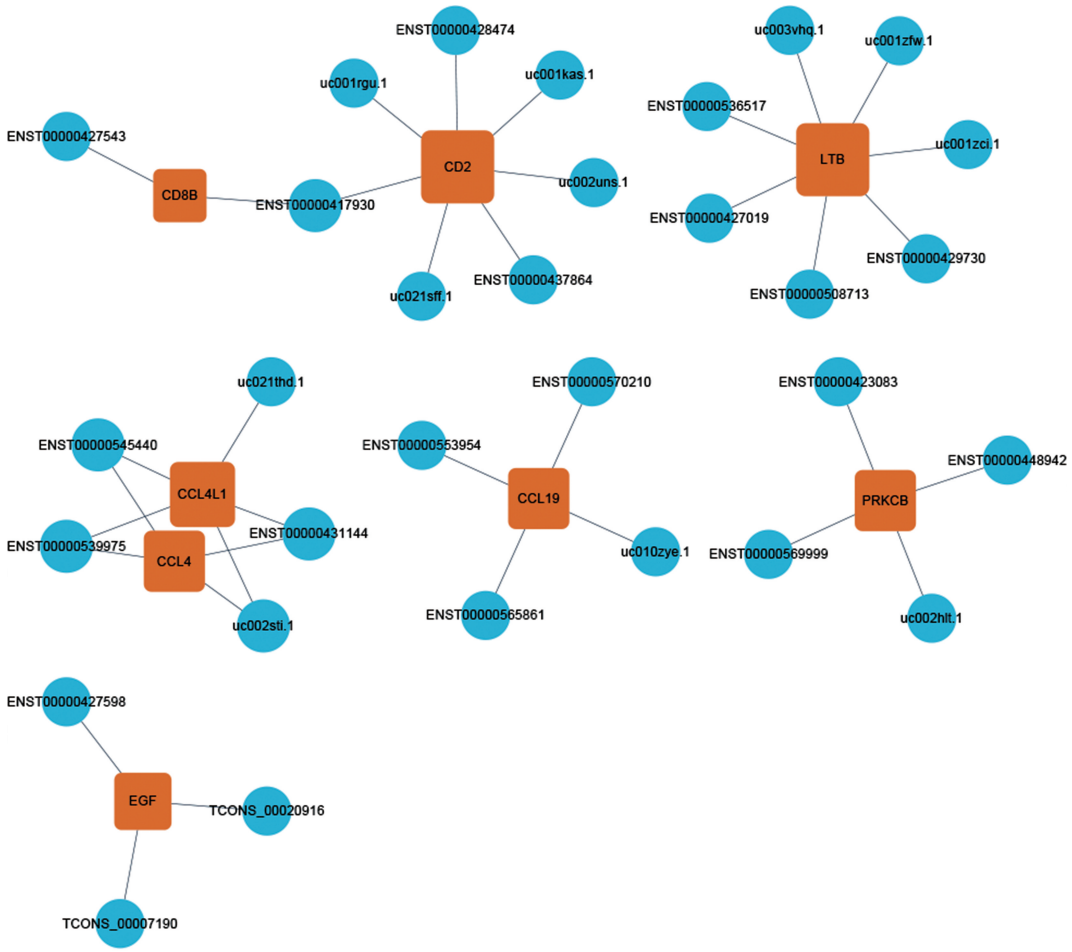


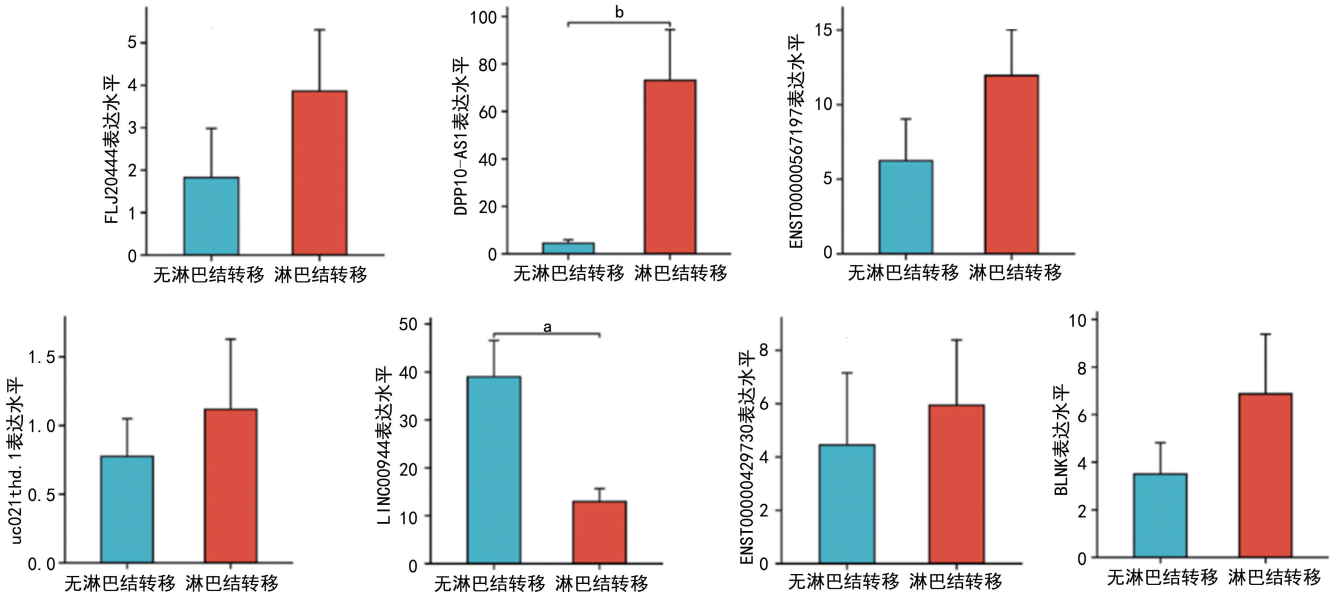
图 2　基因芯片检测结果 CNC-network 分析

表 2　淋巴结转移与无淋巴结转移 PTC 组织中差异表达的 lncRNA

lncRNA 名称	P	调控	RNA 长度(bp)	染色体
FLJ20444	<0.001	上调	1 028	chr9
DPP10-AS1	0.008	上调	744	chr2
ENST00000567197	0.003	上调	571	chr4
uc021thd.1	<0.001	下调	138	chr16
LINC00944	0.009	下调	421	chr12
ENST00000429730	0.035	下调	492	chr2
BLNK	0.012	下调	1 541	chr10

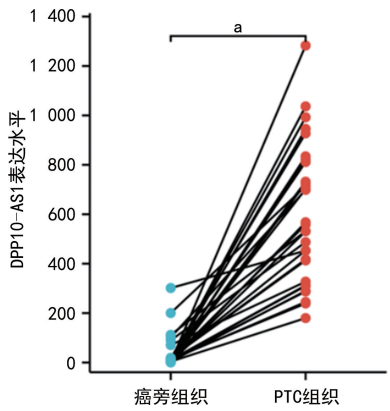
2.2　lncRNA 在淋巴结转移 PTC 中的表达的验证

将上述 7 个 lncRNA 在另外 30 例新鲜 PTC 组织进行 qPCR 检测，DPP10-AS1 在淋巴结转移 PTC 组织中较无淋巴结转移 PTC 组织中表达水平升高($P<0.001$)，而 LINC00944 表达水平降低($P=0.039$)，其余 5 个 lncRNA 表达水平在两者间无明显差异($P>0.05$)，见图 3。为进一步研究 DPP10-AS1 的生物学功能，本研究比较了 30 对 PTC 组织与癌旁组织中 DPP10-AS1 的表达水平，结果显示 PTC 组织中 DPP10-AS1 表达水平高于癌旁组织，差异有统计学意义($P=0.017$)，见图 4。



[a]：$P<0.05$；[b]：$P<0.001$。

图 3　淋巴结转移 PTC 组织与无淋巴结转移 PTC 组织 lncRNA 表达水平比较

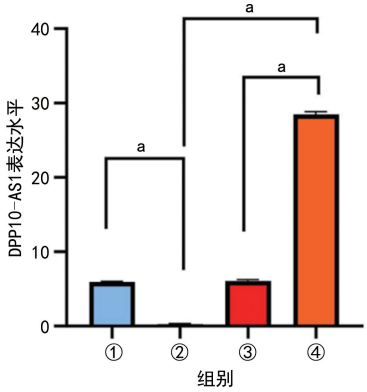


[a]：$P<0.05$。

图 4　PTC 和癌旁组织中 DPP10-AS1 的表达水平比较

2.3　DPP10-AS1 促进 TPC-1 细胞增殖、迁移、侵袭及细胞克隆形成

为便于 DPP10-AS1 的体外功能研究，本研究通过慢病毒转染技术构建了 DPP10-AS1 高表达和低表达细胞系，qPCR 结果显示 sh-DPP10-AS1-TPC-1 组 DPP10-AS1 表达水平较 sh-NC-TPC-1 组降低，而 GV-DPP10-AS1-TPC-1 组 DPP10-AS1 表达水平较 GV-NC-TPC-1 组升高，差异均有统计学意义($P<0.05$)，见图 5。

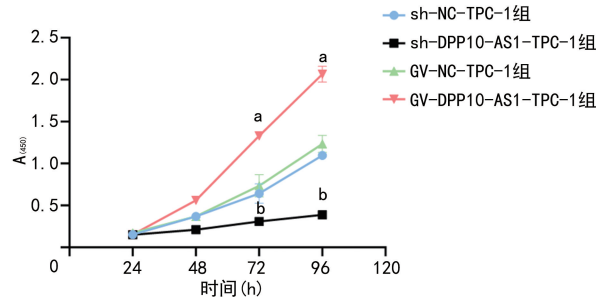


①：sh-NC-TPC-1 组；②：sh-DPP10-AS1-TPC-1 组；③：GV-NC-TPC-1 组；④：GV-DPP10-AS1-TPC-1 组；[a]：$P<0.001$。

图 5　4 组细胞株中的 DPP10-AS1 表达水平比较

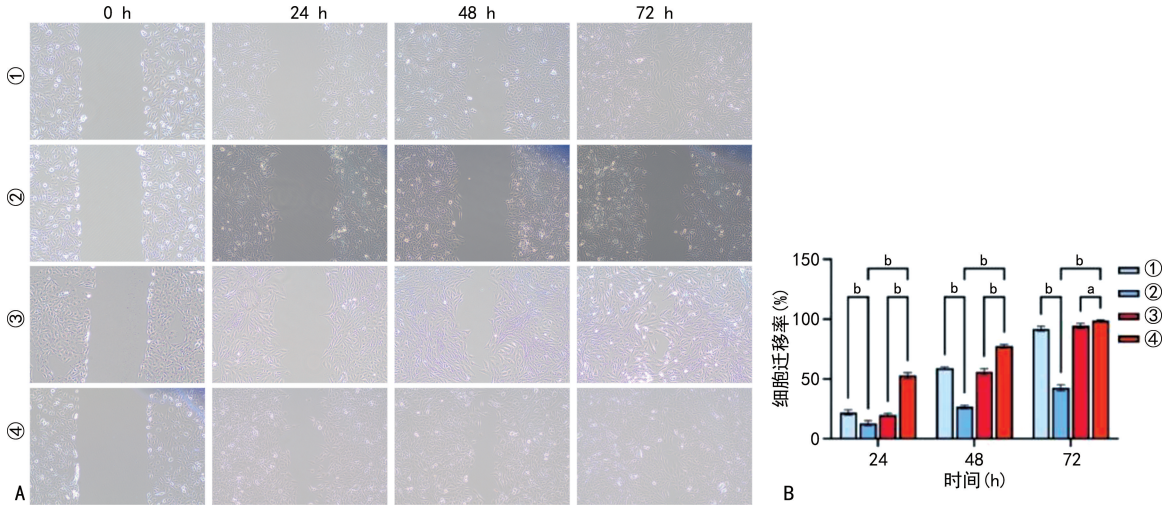
CCK-8 实验结果显示，在细胞培养 72、96 h，sh-DPP10-AS1-TPC-1 组细胞增殖数较 sh-NC-TPC-1 组明显减少，而 GV-DPP10-AS1-TPC-1 组细胞增殖数

较 GV-NC-TPC-1 组明显增加，差异有统计学意义（$P<0.05$），见图 6。细胞划痕实验显示在细胞划痕后 24、48、72 h sh-DPP10-AS1-TPC-1 组细胞迁移率较 sh-NC-TPC-1 组明显减少，而 GV-DPP10-AS1-TPC-1 组细胞迁移率较 GV-NC-TPC-1 组明显增加，差异有统计学意义（$P<0.05$），见图 7。Transwell 实验显示 sh-DPP10-AS1-TPC-1 组穿膜细胞数较 sh-NC-TPC-1 组明显减少，而 GV-DPP10-AS1-TPC-1 组穿膜细胞数较 GV-NC-AS1-TPC-1 组明显增多，差异有统计学意义（$P<0.05$），见图 8。克隆形成实验结果显示：sh-DPP10-AS1-TPC-1 组细胞克隆形成数较 sh-NC-TPC-1 组明显减少，而 GV-DPP10-AS1-TPC-1 组细胞克隆形成数较 GV-NC-AS1-TPC-1 组明显增多，差异有统计学意义（$P<0.05$），见图 9。



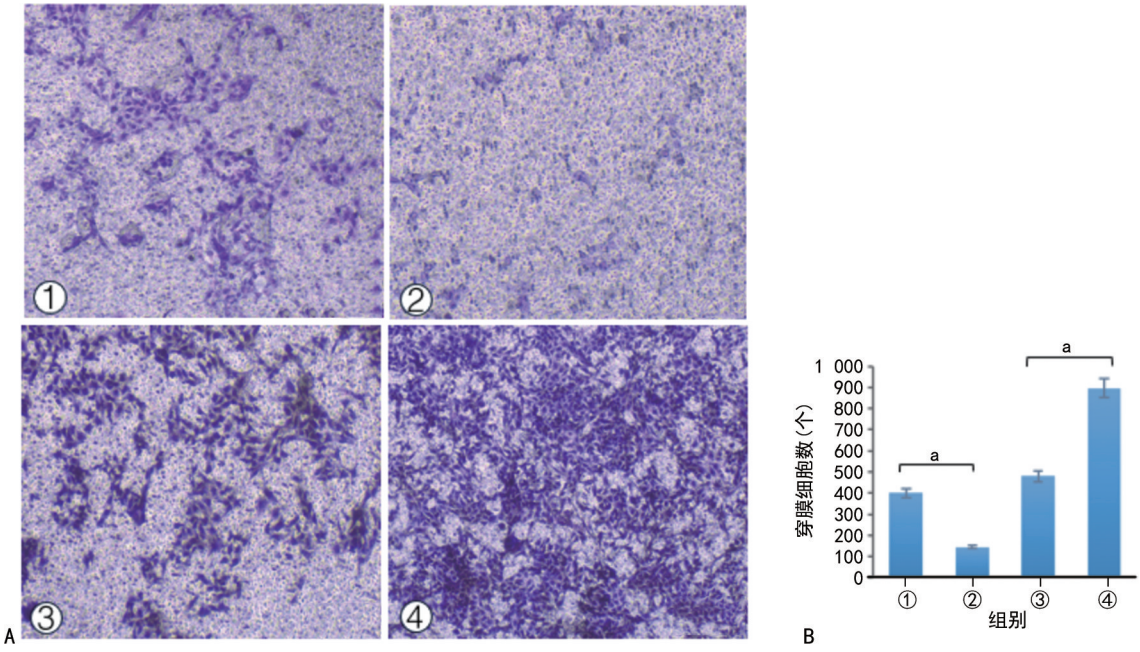
[a]：$P<0.05$，与 GV-NC-TPC-1 组比较；[b]：$P<0.05$，与 sh-NC-TPC-1 组比较。

图 6　DPP10-AS1 促进 TPC-1 细胞增殖



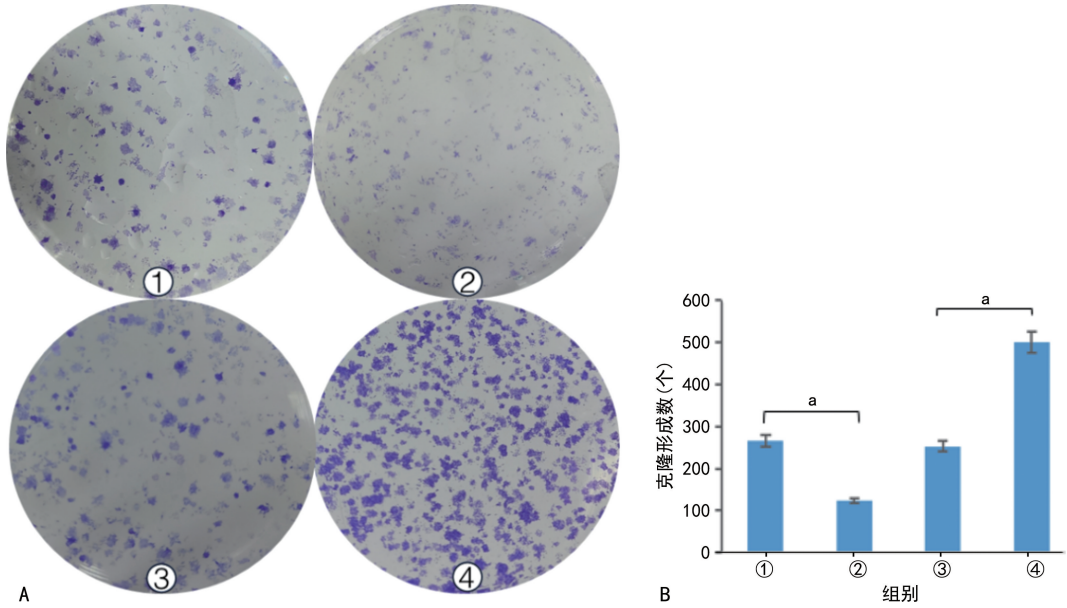
A：划痕实验（200×）；B：划痕实验定量分析；①：sh-NC-TPC-1 组；②：sh-DPP10-AS1-TPC-1 组；③：GV-NC-TPC-1 组；④：GV-DPP10-AS1-TPC-1 组；[a]：$P<0.05$；[b]：$P<0.001$。

图 7　DPP10-AS1 促进 TPC-1 细胞迁移



A：Transwell 侵袭实验（200×）；B：Transwell 侵袭实验定量分析；①：sh-NC-TPC-1 组；②：sh-DPP10-AS1-TPC-1 组；③：GV-NC-TPC-1 组；④：GV-DPP10-AS1-TPC-1 组；[a]：$P<0.001$。

图 8　DPP10-AS1 促进 TPC-1 细胞侵袭



A:细胞克隆形成实验;B:细胞克隆形成实验定量分析;①:sh-NC-TPC-1 组;②:sh-DPP10-AS1-TPC-1 组;③:GV-NC-TPC-1 组;④:GV-DPP10-AS1-TPC-1 组;[a]:$P<0.001$。

图 9 DPP10-AS1 促进 TPC-1 细胞克隆形成

3 讨 论

自 lncRNA 被发现以来,许多研究已经证实其在多种恶性肿瘤中发挥重要作用,而且具有非常复杂和精确的调控能力。参与甲状腺癌发生的 lncRNA 也不断被研究[11-16]。例如:lncRNA AK023507 通过典型 Wnt/β-catenin 通路抑制 PTC 的细胞转移和增殖[17];GUO 等[7]发现 lncRNA MIAT 可能通过 miR-150/EZH2 通路抑制 EZH2 的表达,促进 PTC 细胞侵袭;ZENG 等[13]发现 lncRNA HAGLROS 通过调节 miR-206/HMGA2 通路促进 PTC 的进展。本研究通过基因芯片技术筛选出了淋巴结转移 PTC 与无淋巴结转移 PTC 组织中差异表达的 lncRNA;经过 qPCR 验证发现 DPP10-AS1 在 PTC 组织中的表达水平明显高于癌旁组织,且在淋巴结转移 PTC 组织中表达水平明显高于无淋巴结转移 PTC 组织。而 LINC00944 在淋巴结转移 PTC 组织中表达水平明显低于无淋巴结转移 PTC 组织。本研究为 PTC 淋巴结转移研究提供了新的分子标志物。

DPP10-AS1 是长度约 744 bp 的长链非编码 RNA,属于反义 RNA,位于染色体 2q14.1。在人的正常组织中存在不同程度的表达,睾丸组织中表达水平最高,大脑皮层组织中次之,甲状腺、乳腺、结直肠、胰腺和肺等组织中也有表达[18]。多项研究发现 DPP10-AS1 参与多种肿瘤的发生、发展[19-21]。DPP10-AS1 在肺癌组织中表达明显高于正常肺组织,体内和体外实验表明其过表达能促进肺癌细胞的增殖和迁移,是肺癌的重要调节因子[22]。JIANG 等[23]研究证实 DPP10-AS1 介导的 miR-324-3p 的下调通过增强紧密连接蛋白(claudin3,CLDN3)的表达水平促进胰腺癌的恶性进展。YANG 等[24]通过高通量测序及生物信息学分析发现 DPP10-AS1 在 Her-2 阳性乳腺癌中发挥一定作用。本研究通过体外细胞功能实验发现过表达 DPP10-AS1 促进 PTC 细胞系 TPC-1 的增殖、迁移、侵袭及克隆形成,而干扰 DPP10-AS1 表达则作用相反。这一结果与在肺癌[22]和胰腺癌[23]中观察到的结果一致,验证了 DPP10-AS1 在 PTC 中具有促癌作用。

然而,DPP10-AS1 在肿瘤发生、发展中的作用仍存在争议。LIN 等[25]研究发现 DPP10-AS1 可通过上调组织金属蛋白酶抑制剂 3(tissue inhibitor of metalloproteinase 3,TIMP3),使 Wnt/β-catenin 通路失活,从而抑制结直肠癌的转移。而 LIU 等[21]研究表明 DPP10-AS1 通过调控 miR-127-3p 和苷酸环化酶 1(adenylate cyclase 1)抑制结直肠癌增殖。在胃癌中,DPP10-AS1 和毗邻基因二肽基肽酶样 10(dipeptidyl peptidase like 10)在胃癌组织和胃癌细胞系中的表达水平均较相应的正常胃组织和胃上皮细胞明显降低,对胃癌的发展有抑制作用[19];在前列腺癌中也有 DPP10-AS1 拮抗肿瘤发展的报道[21,23]。DPP10-AS1 在不同系统肿瘤中发挥功能及作用的机制有所不同,进一步深入研究其功能有助于阐明其分子作用机制。

综上所述,本研究在 PTC 中分析 lncRNA DPP10-AS1 的生物学功能,研究发现 DPP10-AS1 表达水平在淋巴结转移 PTC 组织中较无淋巴结转移 PTC 组织明显升高,并能促进 PTC 细胞系 TPC-1 的增殖、迁移、侵袭及克隆形成,为进一步研究 lncRNA 在 PTC 中的作用打下了基础。DPP10-AS1 作为 PTC 中新发现的一种 lncRNA,虽然其确切的分子机制有待进一步研究,但有可能成为 PTC 新的诊断或治疗靶点。

参考文献

[1] CHEN D W,LANG B H H,MCLEOD D S A,

et al. Thyroid cancer [J]. Lancet, 2023, 401 (10387):1531-1544.

[2] GIAQUINTO A N, MILLER K D, TOSSAS K Y, et al. Cancer statistics for African American/black people 2022[J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72(3):202-229.

[3] YANG Q, TIAN H, GUO Z, et al. The role of noncoding RNAs in the tumor microenvironment of hepatocellular carcinoma[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2023, 55(11): 1697-1706.

[4] CAO H, LIU Z, HUANG P, et al. lncRNA-RMRP promotes proliferation, migration and invasion of bladder cancer via miR-206[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(3):1012-1021.

[5] XING C, SUN S G, YUE Z, et al. Role of lncRNA LUCAT1 in cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 134:111158.

[6] HASHEMI M, MOOSAVI M S, ABED H M, et al. Long non-coding RNA (lncRNA) H19 in human cancer: from proliferation and metastasis to therapy[J]. Pharmacol Res, 2022, 184: 106418.

[7] GUO K, QIAN K, SHI Y, et al. LncRNA-MIAT promotes thyroid cancer progression and function as ceRNA to target EZH2 by sponging miR-150-5p [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(12): 1097.

[8] HUO N, CONG R, SUN Z J, et al. STAT 3/LINC00671 axis regulates papillary thyroid tumor growth and metastasis via LDHA-mediated glycolysis [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(9):799.

[9] SHI L, CONG Y, WANG Z. LncRNA NORAD promotes thyroid carcinoma progression by targeting miR-451 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2021, 25(20):6187-6195.

[10] XIAO J, BING Z, XIAO G, et al. Long non-coding (lnc)RNA PAPAS overexpression inhibits tumor growth in papillary thyroid carcinoma by downregulating lncRNA HOTTIP [J]. Oncol Lett, 2020, 19(3):2281-2285.

[11] HUANG C, SU X, ZhOU D, et al. A diagnostic and predictive lncRNA lnc-MPEG1-1 promotes the proliferation and metastasis of papillary thyroid cancer cells by occupying miR-766-5p [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2022, 28:408-422.

[12] BAI D, GUO C, WANG A, et al. LncRNA CASC15 promotes the proliferation of papillary thyroid carcinoma cells by regulating the miR-7151-5p/WNT7A axis [J]. Pathol Res Pract, 2021, 225:153561.

[13] ZENG Z, TANGS, ChEN L, et al. LncRNA HAGLROS contribute to papillary thyroid cancer progression by modulating miR-206/HMGA2 expression [J]. Aging (Albany NY), 2023, 15(24): 14930-14944.

[14] 陈超,张伟丽. lncRNA PCAT19 靶向 miR-143-3p 通过信号通路 PI3K/Akt 对甲状腺癌细胞增殖和凋亡的影响及机制[J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(8):1712-1717.

[15] MA Z, WANG G, HU L. lncRNA EGFEM1P Drives the Progression of Papillary Thyroid Cancer by Regulating miR-6867-5p/CHI3L1 Axis. [J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2023, 33(6):29-41.

[16] ZHANG X, ZHANG X, YANG G, et al. LncRNA SOCS2-AS1 promotes the progression of papillary thyroid cancer by destabilizing p53 protein [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2023, 669:95-102.

[17] YANG M, HUANG S, ZHAO Y, et al. Novel LncRNA AK023507 inhibits cell metastasis and proliferation in papillary thyroid cancer through β-catenin/Wnt signaling pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2023, 655:104-109.

[18] OSHIKAWA M. Full-Length Transcriptome analysis of human retina-derived cell lines ARPE-19 and Y79 using the vector-capping method [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(9):6662-6670.

[19] 鹿飞. 长链非编码 RNA:DPP10-AS1 的筛选及其在胃癌中的表达和临床意义[D]. 南充:川北医学院, 2022.

[20] ZHOU Y, ZHOU Z, JI Z, et al. Tetramethylpyrazine reduces prostate cancer malignancy through inactivation of the DPP10AS1/CBP/FOXM1 signaling pathway[J]. Int J Oncol, 2020, 57(1): 314-324.

[21] LIU G, ZHAO H, SONG Q, et al. Long noncoding RNA DPP10-AS1 exerts anti-tumor effects on colon cancer via the upregulation of ADCY1 by regulating microRNA-127-3p [J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(7):9748-9765.

[22] TIAN H, PAN J, FANG S, et al. LncRNA DPP10-AS1 promotes malignant processes through epigenetically activating its cognate gene DPP10 and predicts poor prognosis in lung cancer patients [J]. Cancer Biol Med, 2021, 18(3):675-692.

[23] JIANG F, LI S, WANG X, et al. DPP10-AS1 mediated downregulation of microRNA-324-3p is conducive to the malignancy of pancreatic cancer by enhancing CLDN3 expression [J]. Pancreas, 2022, 51(9):1201-1210.

(下转第 1079 页)