

• 临床医学 •

文章编号:1002-0217(2018)06-0527-04

甲状腺乳头状癌组织中 CELF1 表达及其功能研究

金沅武 赵 媛

(山东省淄博矿业集团有限责任公司中心医院 肿瘤血液科,山东 淄博 255120)

【摘要】目的:探讨 CELF1 在甲状腺乳头状癌(PTC)组织中表达及对 PTC 细胞增殖和侵袭力的影响。方法:免疫组化法检测 PTC 组织和癌旁组织中 CELF1 蛋白表达,小分子 RNA 构建 CELF1 低表达细胞系,实时荧光定量 PCR 技术检测 CELF1 表达,CCK-8 法和克隆形成实验检测细胞增殖能力,Transwell 小室检测细胞侵袭能力。结果:PTC 组织中 CELF1 蛋白阳性表达率较高,且与 TNM 分期、侵犯被膜和淋巴结转移有关($P<0.05$);与对照序列组和空白组相比,CELF1 干扰序列组细胞中 CELF1 mRNA 相对表达量降低($P<0.05$)、细胞增殖水平降低($P<0.05$)、侵袭细胞数降低($P<0.05$)。结论:CELF1 蛋白在 PTC 组织中呈高表达,特异性下调 PTC 细胞中 CELF1 基因表达可减少细胞增殖,抑制细胞侵袭力。

【关键词】甲状腺乳头状癌; CELF1; 细胞增殖; 细胞侵袭

【中图分类号】R 736.1 **【文献标志码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2018.06.005

CELF1 gene expression and its function in papillary thyroid carcinoma tissues

JIN Yuanwu ZHAO Yuan

Department of Oncology and Hematology, Central Hospital Zibo Mining Group Co., Ltd. Zibo 255120, China

【Abstract】Objective: To investigate the expression of CELF1 protein in the tissues of papillary thyroid carcinoma(PTC) and the effects of CELF1 expression on PTC cell proliferation and invasiveness.**Methods:** Immunohistochemistry was used to detect the expressions of CELF1 proteins in PTC tissues and adjacent tissues. CELF1 low expression cell line was constructed by small interfering RNA. CELF1 expression was determined using real-time fluorescence quantitative PCR and cell proliferation was detected using CCK-8 and clonogenic assay. Transwell chambers was used to detect cell invasiveness.**Results:** The positive expression rate of CELF1 protein was higher in PTC tissues and correlated with TNM stage, invasion of envelope and lymph node metastasis ($P<0.05$). Compared with the control sequence group and the blank group, decreased relative expression level of CELF1 mRNA, cell proliferation and the number of invasive cells were seen in CELF1 interference sequence group (all $P<0.05$). **Conclusion:** CELF1 protein is highly expressed in PTC tissues. Specific down-regulation of CELF1 gene expression in PTC cells could reduce cell proliferation and inhibit cell invasiveness.

【Key words】 thyroid papillary carcinoma; CELF1; cell proliferation; cell invasion

乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)是最为主要的甲状腺癌病理学类型,约占90%以上,具有多灶性生长及局部淋巴结转移的特点,是导致部分患者复发及预后不佳的主要因素^[1]。CELF1也称为CUG连接蛋白1(CUG-binding protein 1, CUGBP1),是RNA连接蛋白CELF家族重要成员之一,在调控mRNA翻译、降解过程中发挥关键性作用^[2]。近年来研究发现其与恶性肿瘤发生、进展关系密切,与非小细胞肺癌患者不良预后有关^[3],参与了膀胱癌BIU-87细胞增殖和侵袭过程^[4]。本研

究拟分析PTC组织中CELF1表达,并探讨其对PTC细胞增殖和侵袭能力的影响。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取2015年3月~2016年12月在我院择期行根治性手术治疗的PTC患者78例,纳入标准:①首发初次手术;②术前未接受任何治疗;③术后病理检查确诊为PTC。男29例,女49例,年龄30~65岁,平均年龄(47.8±10.4)岁。将手术中获得的PTC组织及癌旁组织用甲醛固定,石蜡

收稿日期:2018-02-05

作者简介:金沅武(1976-),男,副主任护师,硕士,(电话)13864492350,(电子信箱)2994719709@qq.com;

赵媛(女),副主任护师,(电子信箱)694826581@qq.com,通信作者。

包埋保存。本研究通过医院伦理委员会批准,所有患者或家属均知情同意。

1.2 主要试剂和设备 免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物,兔抗人 CELF1 多克隆抗体购自美国 Abcam,人 PTC 细胞株 TPC-1 购自上海拜力生物科技公司,DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司,Lipofectamin 2000 转染试剂盒、总 RNA 提取试剂盒(Trizol 法)购自美国 Invitrogen 公司,CELF1 干扰序列及对照序列均由上海吉玛制药技术有限公司设计合成,CELF1 和内参引物由上海生工生物公司设计合成,CCK-8 细胞增殖检测试剂盒购自上海拓然生物科技公司,Transwell 小室、Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司,荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组化法检测 PTC 组织和癌旁组织中 CELF1 蛋白表达 取石蜡包埋组织,切片、脱水,浸入柠檬酸盐中高压抗原修复,用 3%过氧化氢封闭。加入一抗兔抗人 CUGBP1 多克隆抗体(1:800 稀释)4℃过夜孵育,次日复温 1 h,PBS 冲洗 3 次,加入通用型二抗,室温下孵育 60 min,PBS 冲洗 3 次,二胺基联苯胺显色,苏木素复染,脱水、透明、封片。PBS 代替一抗作为对照,光学显微镜观察。结果判定:高倍镜下随机取 10 个视野,按照半定量法对结果进行判定^[5] ①染色强度:0 分无色;1 分淡黄色;2 分棕黄色;3 分黄褐色;②阳性细胞比例:0 分 ≤ 5%;1 分 6%~25%;2 分 26%~50%;3 分 51%~75%;4 分 >75%;③将两项评分相乘,≤1 分为阴性(-),>1 分为阳性(+)

1.3.2 细胞培养及分组 用 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清)对 TPC-1 细胞进行培养,培养条件:5% CO₂、饱和湿度、37℃ 恒温培养箱。取对数生长期细胞,胰酶消化,传代培养,待细胞融合度达 80%左右时进行分组转染,① CELF1 干扰序列组,转染 CELF1 基因的干扰序列:5'-GAGCCAACCUGUU-CAUCUA-3';②对照序列组,转染干扰序列的对照序列:5'-AAAGGACGGAGGACATTAT-3';③空白组,不作任何处理。各组转染后继续培养,完成后续实验。

1.3.3 实时荧光定量 PCR 技术检测细胞中 CELF1 表达 转染后培养 48 h 时,取各组细胞,用 Trizol 试剂对总 RNA 提取,并分析总 RNA 浓度,以 A260/A280 1.80~2.10 为合格,将合格样品逆转录为 cDNA,保存于-20℃ 备用。按照 PCR 试剂盒说明进行引物扩增,引物序列,CELF1,上游:5'-GCUUUG-

GUUUUGUAAGUUA-3';下游:5'-GGCUUAAAGUG-CAGCUCAA-3';GAPDH,上游:5'-TGATGGTACAT-GACAAGGTGC-3',下游:5'-ACAGTCCATGCCAT-CACTGC-3'。PCR 条件:94℃ 5 min,94℃ 30 s,60℃ 30 s,70℃ 30 s,连续循环扩增 38 次,利用 2^{-ΔΔCt} 获得各组细胞中 CELF1 mRNA 相对表达量。

1.3.4 CCK-8 法检测细胞增殖能力 取各组转染培养 48 h 细胞,接种至 96 孔板,调整密度为 2×10³ 个/孔,每组设 3 个复孔,置于恒温培养箱中贴壁培养 4 h。待细胞贴壁后,于培养 12、24、48、72、96 h 时,分别将 CCK-8 液 10 μL 加入各孔,恒温孵育培养 3 h。用酶标仪取 450 nm 波长处测定吸光度 A 值。

1.3.5 克隆形成实验检测细胞增殖能力 取各组转染培养 48 h 细胞,制备单细胞悬液,取约 500 个细胞接种在培养皿中培养 14 d 至肉眼见到有克隆形成止。除去培养液,加入 4% 多聚甲醛,固定 25 min,PBS 冲洗 3 次,结晶紫染色 25 min,用低倍显微镜观察,以超过 50 个细胞为 1 个克隆数,计算克隆形成率(%) = 克隆数/接种细胞数×100%,重复实验 3 次。

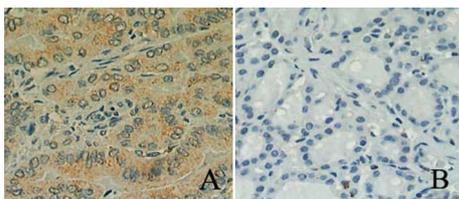
1.3.6 Transwell 小室检测细胞侵袭能力 将 Matrigel 基质胶稀释后平铺于 Transwell 小室,37℃ 风干后使用。将培养 48 h 细胞消化后,制备细胞悬液,取约 2×10⁵ 个细胞加入到小室上室,将含有 20% 胎牛血清的培养液约 500 μL 加入小室,放在恒温培养箱中孵育 24 h。将小室取出,除去培养液,PBS 冲洗 2 次,4% 甲醛固定,用棉签将未穿膜的散落细胞去除,0.1% 结晶紫染色 25 min,用倒置显微镜观察。

1.4 统计学分析 使用 SPSS 18.0 软件分析。计数资料采用率表示,组间比较采用 χ² 检验;计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析和重复测量方差分析,多组间两两比较采用 q 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PTC 组织和癌旁组织中 CELF1 蛋白表达 PTC 组织中 CELF1 蛋白阳性表达率(75.64%) 高于癌旁组织(38.46%),差异有统计学意义(χ² = 22.002 P=0.000),见图 1。

2.2 PTC 组织中 CELF1 蛋白表达与临床病理特征相关性 PTC 组织中 CELF1 蛋白表达与 TNM 分期、侵犯被膜和淋巴结转移有关(P<0.05),见表 1。



A.PTC 组织; B.癌旁组织 定位于细胞质 图片标尺为 50 μm。
图 1 PTC 组织和癌旁组织中 CELF1 蛋白表达

表 1 PTC 组织中 CELF1 蛋白表达与临床病理特征的相关性 [n(%)]

指标	n	CELF1 蛋白表达		χ ²	P
		+	-		
年龄/岁					
≥45	48	36(75.00)	12(25.00)	0.633	0.426
<45	30	20(66.67)	10(33.33)		
性别					
男	29	21(72.41)	8(27.59)	0.009	0.926
女	49	35(71.43)	14(28.57)		
肿瘤直径/cm					
>2	18	14(77.78)	4(22.22)	0.414	0.520
≤2	60	42(70.00)	18(30.00)		
肿瘤数量					
单个	58	43(74.14)	15(25.86)	0.613	0.434
多个	20	13(65.00)	7(35.00)		
TNM 分期					
I ~ II 期	55	35(63.64)	20(36.36)	6.131	0.013
III ~ IV 期	23	21(91.30)	2(8.70)		
侵犯被膜					
是	21	19(90.48)	2(9.52)	4.953	0.026
否	57	37(64.91)	20(35.09)		
淋巴结转移					
是	43	39(90.70)	4(9.30)	16.909	0.000
否	35	17(48.57)	18(51.43)		

2.3 各组细胞中 CELF1 基因表达、细胞克隆形成

表 3 各组细胞不同时点吸光度 A 值比较 ($\bar{x} \pm s$ n=6)

组别	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
空白组	0.17±0.02	0.39±0.03	0.54±0.07	0.65±0.10	0.75±0.02
对照序列组	0.17±0.06	0.38±0.03	0.50±0.12	0.71±0.20	0.81±0.10
CELF1 干扰序列组	0.14±0.02	0.25±0.08 ^{ab}	0.29±0.12 ^{ab}	0.38±0.07 ^{ab}	0.51±0.09 ^{ab}

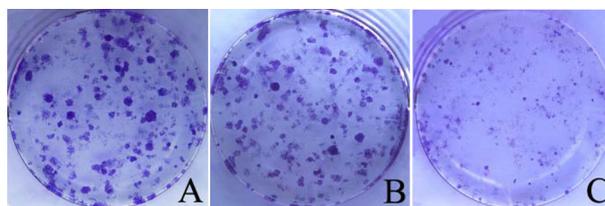
注:与空白组比较 ^a P<0.05; 与对照序列组比较 ^b P<0.05。

率和细胞侵袭能力 与对照序列组和空白组相比, CELF1 干扰序列组细胞中 CELF1 mRNA 相对表达量降低(P<0.05) ,见表 2; 与对照序列组和空白组比较 ,CELF1 干扰序列组细胞克隆形成率降低(P<0.05) ,见表 2、图 2。与对照序列组和空白组比较, CELF1 干扰序列组侵袭细胞数降低(P<0.05) ,见表 2、图 3。

表 2 各组细胞中 CELF1 基因表达和细胞克隆形成率比较 ($\bar{x} \pm s$ n=6)

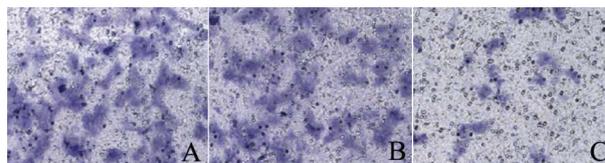
组别	CELF1 mRNA 相对表达量	细胞克隆形成率/%	侵袭细胞数/个
空白组	2.17±0.14	75.24±3.53	124.96±8.04
对照序列组	2.20±0.07	78.49±5.95	122.36±6.07
CELF1 干扰序列组	1.11±0.13 ^{ab}	20.78±4.23 ^{ab}	82.98±8.76 ^{ab}
F	163.436	287.537	55.867
P	0.000	0.000	0.000

注:与空白组比较 ^a P<0.05; 与对照序列组比较 ^b P<0.05。



A.空白组; B.对照序列组; C.CELF1 干扰序列组。

图 2 克隆形成实验检测细胞增殖能力



A.空白组; B.对照序列组; C.CELF1 干扰序列组。

图 3 Transwell 实验检测细胞侵袭能力

2.4 各组细胞增殖能力与空白组和对照序列组比较 CELF1 干扰序列组细胞 24、48、72、96 h 时吸光度 A 值均降低(P<0.05) ,见表 3、4。

表 4 各组细胞不同时间吸光度 A 值重复测量方差分析

变异来源	Df	SS	MS	F	P
分组	2	0.767	0.384	61.078	0.000
检测时间	2.187	3.068	1.403	87.826	0.000
分组×时间	4.374	0.229	0.052	3.277	0.020

注: Mauchly 球形检验 $W=0.134$ $P=0.002$ 拒绝球形假设 需校正。

3 讨论

由于 PTC 发病隐匿,多数患者发现时可能已经存在颈淋巴结转移或远处侵犯^[6],尽管 PTC 患者 5 年生存率达 95% 以上,但仍有部分患者由于肿瘤细胞侵袭力强、细胞分化程度低而预后不佳^[7]。CELF1 基因位于人染色体 11p11 上,最初发现在强直性肌营养不良发生中发挥重要作用^[8],随着研究深入,发现其在恶性肿瘤发生中发挥重要作用,在肺癌^[9]、口腔鳞癌^[10]、胶质瘤^[11]等多种恶性肿瘤组织中呈高表达,且与细胞增殖及侵袭力密切相关,亦有研究表明^[12],CELF1 高表达可作为预后不良的标志物。本研究结果显示,CELF1 蛋白在 PTC 组织中呈高表达,可能参与了 PTC 发生过程,且与 PTC 进展及恶性转移过程有关。

特异性干扰 PTC 细胞中 CELF1 基因后,CELF1 干扰序列组细胞中 CELF1 基因表达被成功抑制。有研究指出^[13],CELF1 高表达可促进胶质瘤细胞增殖及细胞周期改变。本研究结果显示,CELF1 干扰序列组细胞 24、48、72、96 h 时吸光度 A 值均低于对照序列组和空白组,且克隆形成实验显示,CELF1 干扰序列组细胞克隆形成率较对照序列组和空白组降低,这些结果说明沉默 PTC 细胞中 CELF1 基因可减少细胞增殖能力,提示 CELF1 基因高表达可能参与了 PTC 细胞恶性增殖过程。本研究结果显示,CELF1 干扰序列组侵袭细胞数均低于对照序列组和空白组,说明 CELF1 基因参与了 PTC 细胞侵袭过程,与细胞侵袭力相关。

综上所述,CELF1 蛋白在 PTC 组织中呈高表达,特异性下调 PTC 细胞中 CELF1 基因表达可减少细胞增殖,抑制细胞侵袭力,有望为 PTC 临床防治提供新的基因靶位。

【参考文献】

[1] AMBROSI F ,RIGHI A ,RICCI C *et al.*Hobnail variant of papillary thyroid carcinoma: a literature review [J].*Endocr Pathol* ,2017 ,28 (4) :293-301.

[2] KIM JH ,KWON HY ,RYU DH *et al.*Inhibition of CUG-binding protein 1 and activation of caspases are critically involved in piperazine derivative BK10007S induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells [J].*PLoS One* ,2017 ,12(10) : e0186490.

[3] ZHAO J ,ZHAO Y ,XUAN Y *et al.*Prognostic impact of CUG-binding protein 1 expression and vascular invasion after radical surgery for stage IB nonsmall cell lung cancer [J].*Indian J Cancer* ,2015 ,52(Suppl 2) : e125-129.

[4] 段堃,李岩岩,赵艳,等.CUG 连接蛋白 1 在膀胱癌中的表达及其对 BIU-87 细胞株增殖及侵袭能力的影响 [J].*实用医学杂志* ,2016 ,32(3) :411-414.

[5] 薛云,李道明,张静,等.Stat5 在甲状腺癌中的表达及其与上皮间质转化的关系 [J].*实用医学杂志* ,2017 ,33(6) :905-908.

[6] 张鹏,刘瑞磊,姚志成,等.甲状腺乳头状癌淋巴结转移规律及影响因素分析 [J].*中山大学学报(医学科学版)* ,2017 ,38(1) :85-88.

[7] CHEN L ,ZHAN L ,DING M *et al.*Higher expression level of tyrosine kinase-like orphan receptor 2 and Wnt member 5a in papillary thyroid carcinoma is associated with poor prognosis [J].*Oncol Lett* ,2017 ,14(5) :5966-5972.

[8] PENG X ,SHEN X ,CHEN X *et al.*Celf1 regulates cell cycle and is partially responsible for defective myoblast differentiation in myotonic dystrophy RNA toxicity [J].*Biochim Biophys Acta* ,2015 ,1852(7) :1490-1497.

[9] LU H ,YU Z ,LIU S *et al.*CUGBP1 promotes cell proliferation and suppresses apoptosis via down-regulating C/EBP α in human non-small cell lung cancers [J].*Med Oncol* ,2015 ,32(3) :82-86.

[10] HOUSE RP ,TALWAR S ,HAZARD ES *et al.*RNA-binding protein CELF1 promotes tumor growth and alters gene expression in oral squamous cell carcinoma [J].*Oncotarget* ,2015 ,6(41) :43620-43634.

[11] LIU Y ,HUANG H ,YUAN B *et al.*Suppression of CUGBP1 inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells [J].*Clin Invest Med* ,2014 ,37(1) :E10-18.

[12] WANG X ,JIAO W ,ZHAO Y *et al.*CUG-binding protein 1 (CUG-BP1) expression and prognosis of brain metastases from non-small cell lung cancer [J].*Thorac Cancer* ,2016 ,7(1) :32-38.

[13] XIA L ,SUN C ,LI Q *et al.*CELF1 is up-regulated in glioma and promotes glioma cell proliferation by suppression of CDKN1B [J].*Int J Biol Sci* ,2015 ,11(11) :1314-1324.