ssc-let-7c对猪甲状腺细胞体外培养增殖研究

陈理星,黄敏婕,梁晶婕,徐宁迎*
(浙江大学动物科学学院,浙江杭州 310058)

摘 要:MiR-let-7c是let-7家族的主要成员之一,在甲状腺的生长发育过程中起着重要的作用。本实验通过体外转染miR-let-7c类似物探索其对猪甲状腺细胞体外培养增殖的影响。观察猪甲状腺细胞在3D条件下的生长状况和猪甲状腺原代及传代细胞的形态变化,并计算细胞生长速度;通过实时荧光定量(qPCR)、MTT技术检测3组体外培养猪甲状腺细胞中miR-let-7c的表达量和细胞增殖情况;利用在线预测软件miRWalk2.0对miR-let-7c的靶基因及其功能进行预测。结果表明:传代2代后的甲状腺细胞生长缓慢,且形态由圆逐渐变长。细胞免疫荧光鉴定结果发现有明显的绿色荧光,表明猪甲状腺细胞功能正常。荧光定量PCR结果显示管家基因Met-tRNA表达稳定,转染mimics组miR-let-7c表达量明显高于其他2组。利用MTT法的细胞增殖实验中转染mimics组的OD值显著小于其他2组($P<0.05$)。利用在线预测软件发现miR-let-7c的靶基因主要聚集在与胰岛素及癌症等相关的通路。本研究揭示了miR-let-7c在甲状腺细胞生长过程中的重要作用,为研究miR-let-7家族在调控猪生长发育过程中的作用提供了有益参考。

关键词:miR-let-7c;细胞增殖;3D培养;猪
中图分类号:S828.3 文献标识码:A 文章编号:0258-7033(2016)21-0025-06

甲状腺是人体重要的内分泌器官,主要通过分泌甲状腺激素发生作用。甲状腺激素(thyroid hormone,TH)在人体的生长发育,代谢以及对其他器官的功能起到重要调节作用。有研究表明甲状腺激素与青春期前期的血压升高有关[1],并参与大脑的发育[2];Labad等[3]通过对比精神疾病患者和正常人体内的甲状腺激素水平,发现其随着人的注意力和警觉度的变化而变化。摄取促甲状腺激素(TSH)有助于减轻精神病患者服用奥氮平后体重增加的副作用[4]。有研究表明,甲状腺激素在肥胖治疗中也起一定的作用[5];甲状腺激素水平降低还会导致心律降低和心脏收缩强度减弱[6]等。

MicroRNA(miRNA)是一类长度约为21~23 bp的非编码RNA,通过结合相应的靶基因来调控转录效率,具有高度的种间保守性[7],可以广泛参与到细胞的增殖、凋亡、分化等多个生物学过程[8-9],大概参与了20%~30%的基因表达调控[10]。miR-Let-7家族是一类序列相似、功能接近的miRNA,早在线虫中被发现,与mir-84、mir48、mir241共同调节不同时期的线虫幼虫生长发育[11],广泛参与到生物的生长发育过程中。在果蝇的一系列蜕皮过程中,蜕化素的释放与pri-,pre及成熟miR-let-7的表达呈正相关。在脊椎动物中,老鼠胚胎形成时期miR-let-7的表达水平上升[12],在老鼠的大脑形成时期,成熟的miR-let-7a和miR-let-7c及其前体均有上调[13]。目前在猪的miRNA数据库(http://www.mirbase.org/)中发现了382个小RNA,分别在猪的空肠回肠等组成的小RNA池中、成纤维细胞、肝脏、心脏以及卵巢等中被鉴定出来[14-15]。我们课题组通过前期实验完成了猪甲状腺小RNA的深度测序(结果未发表),得出了猪甲状腺小RNA的表达情况,并通过分析猪不同阶段甲状腺中(E60、E80、E105、初生、25、60、90、120、150、180日龄)miR-let-7家族的表达情况发现差异极显著[16],且miR-let-7a可能与FAS基因存在靶向关系,从而来调控甲状腺细胞的凋亡[17]。由于miR-let-7家族成员结构的相似性,这就提示miR-let-7c做为miR-let-7家族的重要一员在参与miR-let-7家族的重要调控功能中可能发挥着重要作用。

与普通二维模式相比3D培养提供的纳米纤维和空隙为其生长提供了立体的支架[18],可以更好的模拟细胞的生活环境,促进细胞与细胞之间的交流,有利于生长因子的充分吸收。本实验试探性的创造了3D模型培养甲状腺细胞并记录其生长情况,以期

收稿日期:2016-03-10;修回日期:2016-06-22
资助项目:国家自然科学基金(31272424)
作者简介:陈理星(1991-),男,安徽人,硕士研究生,主要从事MicroRNA方面的研究,Email:21417001@zju.edu.cn
*通讯作者:徐宁迎,Email:nyxu@zju.edu.cn

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

为后续试验提供更准确的试验方法。

1　材料与方法

1.1　细胞材料　甲状腺细胞原代细胞购自（上海）赛百慷上海技术有限公司。

1.2　试剂　TRNZOL- A+、cDNA第1链合成试剂盒、荧光定量PCR检测试剂盒购自天根生化科技有限公司。D-MEM/F12培养液购自由美国GIBCO公司。EHS（Engelbreth-Holm-Swarm，Matrigel）购自康宁公司miR-let-7c mimics，negative control（NC）购自美国Invirogen公司。转染试剂购自promega公司。一抗购自proteinech公司，二抗购自invitrogen公司。

1.3　甲状腺细胞的鉴定　取四片玻璃片于24孔板，每孔加1 mL培养基及约0.05 million个细胞进行爬片，置培养箱2 h或过夜。待细胞铺平后，吸出培养基，用PBS洗1遍，加入4% PFA于室温固定30 min，吸去固定液后，用PBS洗3次，每次5 min。取50 μL 破膜封闭液（0.25% Triton X 100和10%羊血清）于防水膜上，玻片取出吸干水分，将有细胞的一面盖在防水膜上，室温放置1 h。1 h后取50 μL一抗（抗体与PBS 1:100配置）滴于防水膜上，将玻片上有细胞一面盖上，并放置4℃过夜。将玻片取出用PBS洗3次，每次5 min。取二抗（抗体与PBS 1:500 配置），滴50 μL 与防水膜上，并将玻片有细胞一面盖上，室温放置2 h，操作过程注意避光并保持细胞湿润。2 h后将玻片用PBS洗3次，每次5 min，吸干多余水分，取Fluoromount-G 1滴于载玻片上，并将玻璃片上有细胞一面盖上，待封片后在荧光显微镜下进行观察。

1.4　甲状腺细胞的培养　按照GIBCO公司要求配制F_{12}细胞基础培养液，加入青霉素链霉素（双抗）1%、胎牛血清10%配制完全培养液培养原代细胞，待细胞生长至对数期按照1:2传代培养。细胞冻存选用DMSO与血清1:9配制细胞冻存液。细胞复苏时候采用快速解冻法在37℃ 水浴锅中解冻2~3 min。观察细胞不同代数生长情况，最终获得传至3代的细胞用于实验。

1.5　甲状腺细胞的3D培养　将EHS至于4℃冰箱过夜。提前将24孔板放于-20℃冰箱中使其完全预冷。吸取50 μL EHS于24孔表面，用枪轻吹混匀。此操作需在冰上操作，并且液体移取过程中不可产生泡沫。置于37℃培养箱15~30 min使其凝结成胶。选取汇合度大概75%的贴壁或悬浮细胞。胰蛋白酶消化细胞成单细胞，离心3 min，加入300 μL/孔EHS于离心管中，轻轻吹匀细胞，培养箱孵育30 min使其凝胶。移取500 μL/孔的培养液于培养 板中。继续培养10 d每2 d换液。

1.6　细胞的转染及MTT法检测细胞增殖　复苏细胞待细胞生长至70%~80%左右，提前1 d换无双抗的培养液转染miR-let-7c mimics，NC（4 pm/孔×4）。待转染48 h后每孔加入20 μL MTT（5 mg/mL），继续培养4 h。小心吸去培养液每孔加入150 μL二甲基亚砜，在摇床上低速震荡10 min使结晶完全溶解，在酶联免疫仪OD570 nm处检测吸光值。

1.7　RNA的提取、反转录及实时荧光定量　按照天根TRNZOL- A+操作方法提取RNA，在超微粒核酸仪（美国NANODROP 2000c）下检测RNA浓度和纯度。对符合要求的RNA按照天根反转录试剂盒（miRcute miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit）合成cDNA第1链。荧光定量采用相对荧光定量法，以Met-tRNA为内参。相应引物序列如下：

Met-tRNA：CAGAGTGGCGCAGCGGAAGC

ssc-miR-let-7c：TGAGGTAGTAGGTTGTATGGTT

2　结果与分析

2.1　细胞生长状况分析　将购买的甲状腺置于6孔板铺满细胞换液培养并拍照记录生长状况，与传代后的甲状腺细胞作对比。发现每个孔细胞张状态类似，原代细胞生长较快，2 d即可长满，显微镜下呈现圆形椭圆形生长（图1-1）。传代细胞生长较慢，生长大约4 d才可长满，细胞形态发生轻微改变，细胞变长但不影响实验效果（图1-2）。

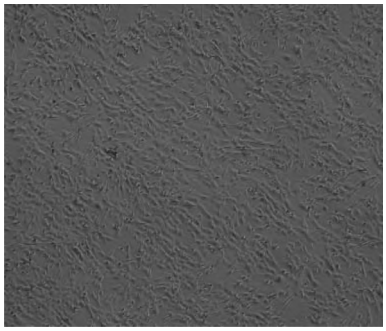


图1-1　甲状腺原代细胞

2.2　细胞鉴定　鉴定试验分为2组，实验组和阴性对照组；其中实验组正常使用一抗、二抗孵育，阴性对照组使用5% BSA代替一抗孵育，二抗正常孵育。图2-1、图2-2为实验组，图2-3、2-4为对照组。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

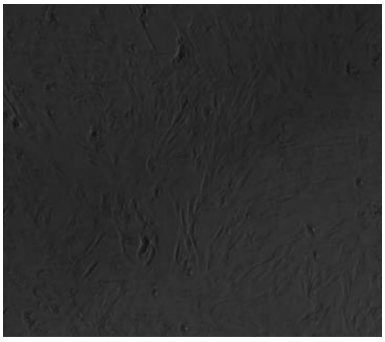


图1–2 甲状腺传代细胞

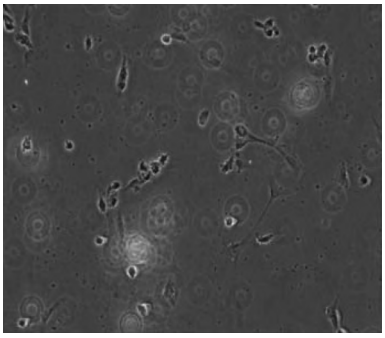


图2–1 实验组普通照片



图2–2 实验组荧光照片

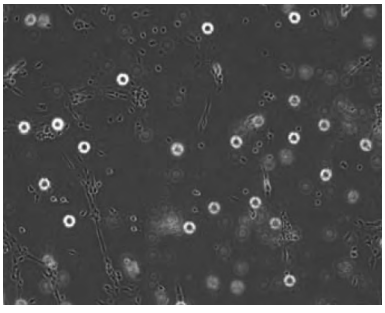


图2–3 对照组普通照片

2.3 3D条件下细胞生长情况 3D条件下细胞生长较慢,大约10 d左右可以达到实验级别水平。细胞生长以单个细胞为单位向周围扩增。图4为倒置式生物显微镜下拍摄出明暗场下3D细胞生长效果图。

2.4 过表达miR–let–7c及细胞增殖的检测 荧光定量结果显示,转染外源性mimics组的miR–let–7c表达量明显高于抑制内源性miR–let–7c表达的阴性对照组(NC)和空白对照组(图4–1)。细胞增殖数据显示转染mimics、NC、blank组OD值分别为0.420±8E–04、0.828±0.002、0.718±0.002。结果表明,与转染NC和空白对照组相比转染mimics组OD显著小于其他2组



图2–4 对照组荧光照片

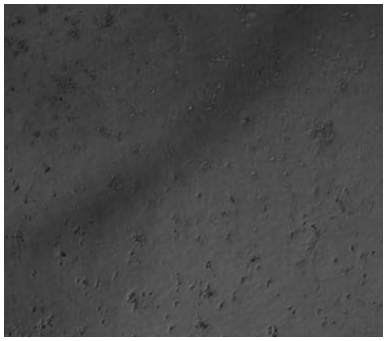


图3–1 (生长2 d)

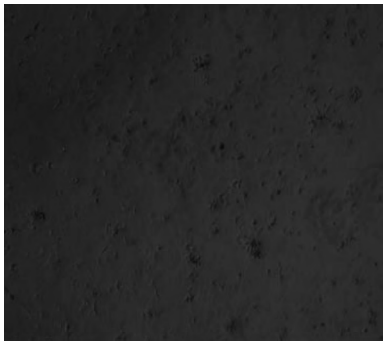


图3–2 (生长4 d)

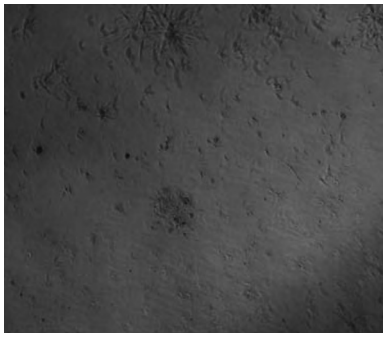


图3–3 (生长6 d)

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

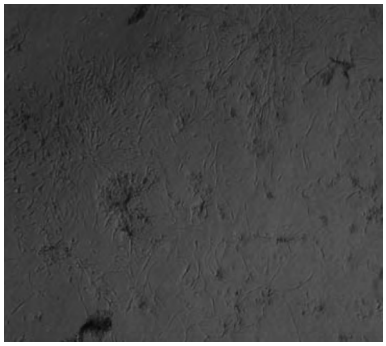
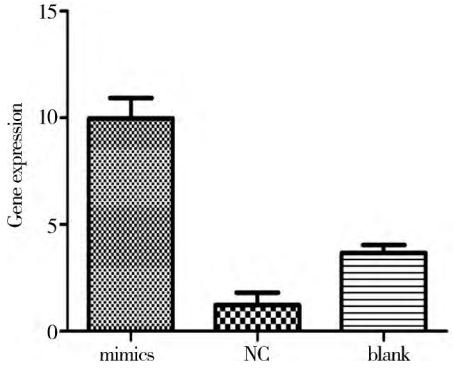


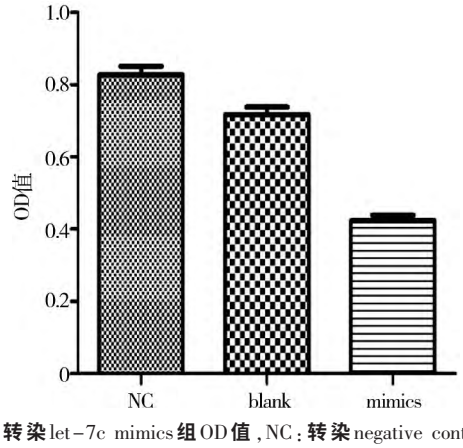
图3-4 （生长8 d）

（$P<0.05$）（图4-2）。（数据处理使用spss20.0处理，单因素方差分析）。



mimics：转染let-7c mimics组let-7c表达量，NC：转染negative control组let-7c表达量，blank：对照组let-7c表达量，内参基因为Met-tRNA，生物学重复数n=3

图4-1 荧光定量结果



mimics：转染let-7c mimics组OD值，NC：转染negative control组OD值，blank：对照组OD值，生物学重复数n=4

图4-2 MTT结果

3 讨 论

本实验室前期通过原位杂交技术发现miR-let-7家族主要存在家甲状腺滤泡上皮细胞中，所以对甲状腺传代细胞的培养至关重要。国内现阶段对甲状腺的实验基本停留在原代的操作上，实验成本高，细胞数目少。现阶段我们已经可以成功将其培养2~3代，虽然形态发生轻微变化但不影响下游试验，保证了实验来源并提高了甲状腺细胞生长速度和实验数据的准确性。在二维培养的基础上我们尝试了3D条件下甲状腺细胞的培养，3D细胞培养模拟了细胞的生存环境，可以更好的促进细胞之间的交流。Weaver等[19]利用β-1整合蛋白处理恶性乳腺癌细胞，记录了其在3D表型转化为正常细胞的2形态和数目变化并与二维条件下的细胞形态变化做了比较。Nagaya等[20]在3D培养基础上建立了1个在胰腺移植过程中估计免疫抑制剂效果的新系统。大量资料表明在细胞交流过程中3D培养模式相对于二维培养有着绝对的优势，也为后续研究miR-let-7家族之间的信息交流对甲状腺功能的调控提供了有益尝试。

在对miR-let-7家族的研究中大多数以人为实验对象，Gong等[21]利用RT-PCR，ELISA，双荧光素酶报告系统等技术研究了miR-let-7f通过靶向IL-6降低人大面积脑梗塞的炎症水平，并设想miR-let-7家族还有可能成为未来检测癌症的生物标记[22]。但在猪的研究中资料稍显缺乏，Cao等[23]人通过基因芯片技术，筛选出miR-let-7家族中miR-let-7g在猪的卵巢卵泡闭锁过程中可以提高颗粒细胞的凋亡率。Li等[24]人通过深度测序，得到在脂肪形成过程中227个miRNA的表达涉及到miR-143、miR-103、miR-let-7和 miR-148等家族。miR-Let-7c可以抑制前列腺癌细胞增殖[25]，通过靶向*ITGB3*和*MAP4K3*基因抑制了非小细胞型肺癌的转移[26]。由此可推测miR-let-7c在细胞增殖过程中可能起到一定作用，本试验通过研究miR-let-7c在猪甲状腺细胞当中的作用，发现过表达miR-let-7c类似物可以显著降低细胞的增殖数量，这与现有的文献描述基本相符。通过后续靶基因预测及通路富集分析发现了癌症相关通路，胰岛素传导通路等。从中筛选出与细胞增殖相关的靶基因*IGF-1R*（胰岛素样生长因子受体）。

IGF1R为蛋白质编码基因，长约4 000 bp，主要参与到细胞粘附，MAPK以及IGF-1R信号级联放大通路，常与胰岛素样生长因子共同发生作用[27]。在TargetScan Human 6.2中用人的miR-let-7c序列代替猪的miR-let-7c序列预测hsa-let-7c与靶基因*IGF-1R*的结合位点发现3′非编码端有6个连续的碱基互补配对，在其上游也发现4个连续的碱基互补配对。Taliaferro-

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Smith等[28]人用shRNA结合IGF1R导致其沉默的方法证明了过表达IGF1R有利于三阴性乳腺癌细胞系的转移和侵染。在细胞凋亡方面Cookman 等[29]人利用雌激素β受体上调IGF1R的作用在成神经管细胞瘤细胞系中通过引发细胞保护机制降低细胞凋亡率。由此可见IGF1R在细胞增殖和凋亡中起到重要作用，研究miR-let-7c与IGF1R的靶向关系具有重要意义。

4 结 论

本研究以猪甲状腺传代3代以内细胞为实验对象，利用RT-PCR以及MTT方法得到miR-let-7c对细胞增殖存在抑制作用，提出可能存在的作用机制仍需进一步探究，利用3D细胞培养技术成功创造甲状腺细胞新的培养环境，为后续miR-let-7家族的机制研究提供了有益思路。

参考文献：

[1] Park B H, Baik S J, Lee H A, *et al*. The association of thyroid hormones and blood pressure in euthyroid preadolescents [J]. J Pediatr Endocrinol Metab, 2016, 171(1-3): 182-186.

[2] Bernal J. Thyroid hormones and brain development [J]. Vitam Horm, 2005, 71: 95-122.

[3] Labad J, Barbero J D, Gutierrez-Zotes A, *et al*. Free thyroxine levels are associated with cognitive changes in individuals with a first episode of psychosis: A prospective 1-year follow-up study [J]. Schizophr Res, 2016.

[4] Evers S S, van Vliet A, van Vugt B, *et al*. A low TSH profile predicts olanzapine-induced weight gain and relief by adjunctive topiramate in healthy male volunteers[J]. Psychoneuroendocrinology, 2016, 66: 101-110.

[5] Martinez-Sanchez N, Alvarez C V, Ferno J, *et al*. Hypothalamic effects of thyroid hormones on metabolism [J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2014, 28(5): 703-712.

[6] Vargas-Uricoechea H, Bonelo-Perdomo A, Sierra-Torres C H. Effects of thyroid hormones on the heart [J]. Clin Investig Arterioscler, 2014, 26(6): 296-309.

[7] Lim L P, Lau N C, Weinstein E G, *et al*. The microRNAs of Caenorhabditis elegans[J]. Genes Dev, 2003, 17(8): 991-1008.

[8] O'Donnell K A, Wentzel E A, Zeller K I, *et al*. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression [J]. Nature, 2005, 435(7043): 839-843.

[9] Nilsen T W. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells[J]. Trends Genet, 2007, 23(5): 243-249.

[10] Stark A, Brennecke J, Bushati N, *et al*. Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3′UTR evolution[J]. Cell, 2005, 123(6): 1133-1146.

[11] Reinhart B J, Slack F J, Basson M, *et al*. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans[J]. Nature, 2000, 403(6772): 901-906.

[12] Schulman B R, Esquela-Kerscher A, Slack F J. Reciprocal expression of lin-41 and the microRNAs let-7 and mir-125 during mouse embryogenesis[J]. Dev Dyn, 2005, 234(4): 1046-1054.

[13] Wulczyn F G, Smirnova L, Rybak A, *et al*. Post-transcriptional regulation of the let-7 microRNA during neural cell specification[J]. FASEB J, 2007, 21(2): 415-426.

[14] Sharbati-Tehrani S, Kutz-Lohroff B, Scholven J, *et al*. Concatameric cloning of porcine microRNA molecules after assembly PCR [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 375(3): 484-489.

[15] Reddy A M, Zheng Y, Jagadeeswaran G, *et al*. Cloning, characterization and expression analysis of porcine microRNAs [J]. BMC Genomics, 2009, 10: 65.

[16] 王琪，王云霞. [miR-let-7家族在约克夏猪甲状腺生长发育过程中的表达分析 [J]. 《农业生物技术学报》, 2015, 23(3): 337-343.

[17] 王云霞，王琪，周辉云. miR_let_7a在大白猪甲状腺中的表达及其对甲状腺细胞凋亡的影响 [J]. 《农业生物技术学报》, 2015, 23(2): 220-226.

[18] Yamada K M, Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D[J]. Cell, 2007, 130(4): 601-610.

[19] Weaver V M, Petersen O W, Wang F, *et al*. Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies [J]. J Cell Biol, 1997, 137(1): 231-245.

[20] Nagaya M, Arai Y, Matsunari H, *et al*. A new system to evaluate the influence of immunosuppressive drugs on pancreatic islets using epigenetic analysis in a 3-dimensional culture [J]. Pancreas, 2015, 44(5): 778-785.

[21] Gong Z, Zhao S, Zhang J, *et al*. Initial research on the relationship between let-7 family members in the serum and massive cerebral infarction [J]. J Neurol Sci, 2016, 361: 150-157.

[22] Dai Y, Wang D, Tian X, *et al*. Insights into the application of let-7 family as promising biomarker in cancer screening [J]. Tumour Biol, 2015, 36(7): 5233-5239.

[23] Cao R, Wu W J, Zhou X L, *et al*. Expression and preliminary functional profiling of the let-7 family during porcine ovary follicle atresia[J]. Mol Cells, 2015, 38(4): 304-311.

[24] Li G, Li Y, Li X, *et al*. MicroRNA identity and abundance in developing swine adipose tissue as determined by Solexa sequencing[J]. J Cell Biochem, 2011, 112(5): 1318-1328.

[25] Nadiminty N, Tummala R, Lou W, *et al*. MicroRNA let-7c is downregulated in prostate cancer and suppresses prostate cancer growth[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e32832.

（下转第33页）

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

development of mammalian embryos[J]. J Reprod Dev, 2012, 58 (1): 1-9.

[9] Gao C, Han H B, Tian X Z, *el al*. Melatonin promotes em—bryonic development and reduces reactive oxygen species in vitrified mouse 2-cell embryos [J]. J Pineal Res, 2012, 52(3): 305-311.

[10] Wang F, Tian X Z, Zhang L, *el al*. Beneficial effects of melatonin on in vitro bovine embryonic development are media—ted by melatonin receptor 1 [J]. J Pineal Res, 2014, 56 (3): 333-342.

[11] 贾秀芬, 周燕华, 刘慧雯, 等. 抗氧化剂对小鼠体外受精胚胎发育的影响[J]. 解剖科学进展, 2009, 1(15): 70-73.

[12] Miyuki M, Shojiro K, Masa-aki H. Development of a single bovine embryo improved by co-culture with trophoblastic vesicles in vitamin-supplemented medium [J]. J Reprod Dev, 2012, 58(6): 210-216.

[13] Larson M A, Kimura K, Kubisch H M, *el al*. Sexual dimorphism among bovine embryos in their ability to make the transition to expended blastocyst and in the expression of the signaling mole—cule lFN—tau [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 9677-9682.

[14] Wu G Q, Jia B Y, Li J J, *el al*. L-carnitine enhances oocyte maturation and development of parthenogenetic embryos in pigs [J]. Theriogenology, 2011, 76(5): 785-793.

(上接第 29 页)

[26] Zhao B, Han H, Chen J, *et al*. MicroRNA let-7c inhibits migration and invasion of human non-small cell lung cancer by targeting ITGB3 and MAP4K3 [J]. Cancer Lett, 2014, 342(1): 43-51.

[27] Schweiger M, Steffl M, Amselgruber W M. Cell-type specific expression of IGF-1R in porcine islet cells [J]. Growth Horm IGF Res, 2005, 15(1): 33-38.

[28] Taliaferro-Smith L, Oberlick E, Liu T, *et al*. FAK activation is required for IGF1R-mediated regulation of EMT, migration, and invasion in mesenchymal triple negative breast cancer cells[J]. Oncotarget, 2015, 6(7): 4757-4772.

[29] Cookman C J, Belcher S M. Estrogen Receptor-beta Up-Regulates IGF1R Expression and Activity to Inhibit Apoptosis and Increase Growth of Medulloblastoma[J]. Endocrinology, 2015, 156(7): 2395-2408.

Study on the Proliferation of Porcine Thyroid Cell Cultured *in vitro* by Disposal of SSC-let-7c

CHEN Li-xing, HUAGMin-jie, LIANG Jing-jie, XU Ning-ying*

(College of Animal Science, Zhejiang University, Zhejiang Hangzhou 31008, China)

Abstract: MiR-let-7c is one of the main members in miR-let-7 family and plays an important role during the growth and development period. In this experiment, method for transfecting miR-let-7c mimics *in vitro* was applied to explore whether there's difference in the proliferation of the cultured porcine thyroid cells. Firstly the status of these cells cultured in three-dimensional (3D) system was observed and the morphological change both in the primary and extended cells are also observed by microscope to determine the variation of the cell growth rate. Then the technique of quantitative Real-time PCR and MTT were utilized to detect the expression of miR-let-7c and the proliferation of thyroid cells. At last, the target genes of miR-let-7c were predicted by the the online software miRWalk2.0, and with assembling their function pathway. The results showed that after the second passage, the thyroid cells show lower growth rate and mildly change in shapes. The Green fluorescence result indicated the normal function of thyroid cells. The results of the real-time quantitative PCR revealed that the housekeeping gene Met-tRNA expressed steady, and the expression of miR-let-7c in the miR-let-7 mimics group was significantly higher than that in the other groups, and the OD value in the group of the miR-let-7c mimics group was markedly less than that of other disposals by the MTT determined method ($P<0.05$). The large amount of target genes were found by using the miRWalk2.0 software, which mainly assemble in ubiquitin mediated proteolysis, pathways in cancer etc. This research revealed that the important effect of let-7c during the progress of thyroid cell's development and provides a useful reference for the study of how does the let-7 family regulate the growth of swine.

Key words: miR-let-7c; proliferation of cells; 3D culture; swine

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net