

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2026.08.006

· 基础研究 ·

## miR-532-3p 靶向 DDOST 抑制甲状腺癌 TPC-1 细胞增殖、糖酵解及裸小鼠移植瘤生长

徐慧海<sup>1</sup>, 王文帅<sup>1</sup>, 王倩<sup>1</sup>, 杜秀然<sup>1</sup>, 李姿健<sup>2</sup> (1. 河北省胸科医院 普通外科, 河北 石家庄 050000; 2. 河北省胸科医院 胸外科, 河北 石家庄 050000)

**[摘要]** **目的:** 本研究旨在探讨 miR-532-3p 对甲状腺癌 TPC-1 细胞增殖及糖酵解的调控作用, 并以多萜醇二磷酸寡糖蛋白糖基转移酶非催化亚基(DDOST)为靶标初步探讨其潜在机制。**方法:** 检测正常甲状腺细胞 Nthy-ori 3-1 及甲状腺癌细胞 TPC-1、FTC-133、IHH-4 中 miR-532-3p 基础表达; 根据检测结果选择 TPC-1 细胞进行后续实验, 并将其分为 mimic-NC 组、miR-532-3p mimic 组、inhibitor-NC 组、miR-532-3p inhibitor 组、mimic-NC + pcDNA-NC 组、mimic-NC + pcDNA-DDOST 组、miR-532-3p mimic + pcDNA-NC 组、miR-532-3p mimic + pcDNA-DDOST 组。采用双萤光素酶报告基因实验检测 miR-532-3p 与 DDOST 的靶向关系。采用 CCK-8 法检测细胞增殖活力。采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)和蛋白质印迹(Western blotting)法检测 mRNA 和蛋白表达。将 TPC-1 细胞经皮下注射接种于裸小鼠右后侧腋窝处, 构建甲状腺癌裸小鼠移植瘤模型, 记录肿瘤生长情况。采用免疫组织化学法检测移植瘤组织中 Ki-67 和 DDOST 的阳性表达。采用乳酸检测试剂盒和葡萄糖检测试剂盒检测乳酸生成量及葡萄糖消耗率。**结果:** 与正常甲状腺细胞 Nthy-ori 3-1 相比, 甲状腺癌细胞(TPC-1、FTC-133、IHH-4)中 miR-532-3p 表达水平均明显降低( $P < 0.05$ ), 其中 TPC-1 细胞中 miR-532-3p 表达水平最低, 而 DDOST 的表达显著升高( $P < 0.05$ )。过表达 miR-532-3p 可抑制 TPC-1 细胞增殖活力和糖酵解水平, 并下调 DDOST 表达( $P < 0.05$ ), 且这些作用可被 DDOST 过表达所逆转( $P < 0.05$ )。过表达 miR-532-3p 可抑制裸小鼠甲状腺癌移植瘤生长, 并降低移植瘤组织中 DDOST 的表达( $P < 0.05$ )。**结论:** 过表达 miR-532-3p 可通过靶向调控 DDOST 抑制 TPC-1 细胞增殖和糖酵解, 进而抑制裸小鼠甲状腺癌移植瘤生长。

**[关键词]** miR-532-3p; 多萜醇二磷酸寡糖蛋白糖基转移酶非催化亚基; 增殖; 糖酵解; 甲状腺癌

**[中图分类号]** R736.1; R730.23 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2026)08-0857-10

## miR-532-3p targets DDOST and inhibits thyroid cancer TPC-1 cell proliferation, glycolysis, and xenograft tumor growth in nude mice

Xu Huihai<sup>1</sup>, Wang Wenshuai<sup>1</sup>, Wang Qian<sup>1</sup>, Du Xiuran<sup>1</sup>, Li Zijian<sup>2</sup> (1. Department of General Surgery, Hebei Chest Hospital, Shijiazhuang 050000, Hebei, China; 2. Department of Thoracic Surgery, Hebei Chest Hospital, Shijiazhuang 050000, Hebei, China)

**[Abstract]** **Objective:** This study aimed to investigate the effects of miR-532-3p on thyroid cancer TPC-1 cell proliferation and glycolysis and to preliminarily explore the underlying mechanism by targeting dolichyl-diphosphooligosaccharide protein glycosyltransferase non-catalytic subunit (DDOST). **Methods:** The basal expression of miR-532-3p was assessed in normal thyroid Nthy-ori 3-1 cells and thyroid cancer cell lines TPC-1, FTC-133, and IHH-4. TPC-1 cells were selected for subsequent experiments and divided into mimic-NC group, miR-532-3p mimic group, inhibitor-NC group, miR-532-3p inhibitor group, mimic-NC + pcDNA-NC group, mimic-NC+pcDNA-DDOST group, miR-532-3p mimic + pcDNA-NC group, and miR-532-3p mimic + pcDNA-DDOST group. The targeting relationship between miR-532-3p and DDOST was detected by dual-luciferase reporter gene assay. Cell proliferation was detected by the CCK-8 method. Gene and protein expression levels were detected by reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting. The TPC-1 cells were subcutaneously injected into the right posterior axillary region of nude mice to establish a xenograft tumor model of thyroid carcinoma, and the growth status of the tumors was recorded. Ki-67 and DDOST expression in xenograft tumor tissues was detected by immunohistochemistry. Lactate concentration and glucose consumption were measured using the corresponding assay kits. **Results:** Compared with normal thyroid cells Nthy-ori 3-1, the expression levels of miR-532-3p in thyroid cancer cell lines (TPC-1, FTC-133, IHH-4) were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), with the lowest level observed in TPC-1 cells. The expression of DDOST was significantly increased ( $P < 0.05$ ). Overexpression of miR-532-3p inhibited TPC-1 cell proliferation and

**[作者简介]** 徐慧海(1987—),男,硕士,副主任医师

**[通信作者]** 李姿健(扫码获取作者通信方式)



glycolysis and downregulated DDOST expression ( $P < 0.05$ ). Moreover, these effects were reversed by DDOST overexpression ( $P < 0.05$ ). Overexpression of miR-532-3p inhibited thyroid cancer xenograft growth and reduced DDOST expression in xenograft tumor tissues ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Overexpression of miR-532-3p inhibited TPC-1 cell proliferation and glycolysis by targeting DDOST and suppressed thyroid cancer xenograft growth in nude mice.

**[Key words]** miR-532-3p; DDOST; proliferation; glycolysis; thyroid cancer

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(8): 857-866. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2026.08.006]

甲状腺癌是常见的内分泌恶性肿瘤之一,其发病率在全球范围内持续增长<sup>[1]</sup>。虽然临床已有手术、放射性碘治疗和甲状腺激素抑制治疗等方法,但仍存在放射性碘治疗耐受、药物耐药及不良反应等局限性<sup>[2]</sup>。因此,开发新的甲状腺癌治疗策略至关重要。微小RNA(microRNA, miRNA)是一类短链非编码RNA分子,能够通过与靶基因mRNA的3'-非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)结合,诱导其降解或抑制其翻译,从而在转录后水平精确调控基因表达。研究<sup>[3-4]</sup>表明,miRNA异常表达广泛参与调控肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移等恶性生物学行为,还能通过调节肿瘤糖酵解途径间接影响肿瘤进展。其中,miR-532-3p被报道在甲状腺癌组织中表达明显低于良性肿瘤组织,其高表达可抑制甲状腺癌细胞的恶性生物学行为<sup>[5]</sup>。然而有关miR-532-3p在甲状腺癌中的机制研究仍缺乏。多萜醇二磷酸寡糖蛋白糖基转移酶非催化亚基(dolichyl-diphosphooligosaccharide protein glycosyltransferase non-catalytic subunit, DDOST)作为一种重要的糖基转移酶亚基,参与蛋白质的糖基化修饰过程。越来越多的证据表明,DDOST在宫颈癌、肝细胞癌等多种恶性肿瘤中异常高表达,并通过促进肿瘤细胞增殖、侵袭及糖酵解等过程促进肿瘤进展<sup>[6-8]</sup>。基于生物信息学工具预测,DDOST可能是miR-532-3p的潜在靶基因,但两者之间在甲状腺癌中的直接调控关系尚缺乏实验验证。因此,本研究旨在探究miR-532-3p与DDOST的相互作用关系及其对甲状腺癌发生发展的影响,以期为甲状腺癌的治疗提供新的理论依据和潜在靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验模型

#### 1.1.1 实验动物

4周龄、雄性SPF级BALB/c裸小鼠(体质量约25 g),购自北京生物制品研究所有限责任公司,实验动物许可证号:SYXK(京)2023-0073,在室温( $23 \pm 2$ )℃、相对湿度40%~50%、12 h光照/12 h黑暗周期的环境中常规饲养,自由摄食饮水,每日由专人巡查动物精神状态、摄食及健康情况。适应性喂养1周后进行实验。所有实验操作均符合GB/T 35892-2018

《实验动物福利伦理审查指南》及RB/T 173-2018《动物实验人道终点评审指南》相关规定。本研究已通过本院动物伦理审查委员会审批(批号:202410320)。

#### 1.1.2 实验细胞

本研究所用人正常甲状腺细胞(Nthy-ori 3-1)、甲状腺癌细胞(TPC-1、FTC-133、IHH-4)购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)。所有细胞系均经短串联重复序列(STR)鉴定确认,支原体检测均为阴性。本研究中,人正常甲状腺细胞系Nthy-ori 3-1作为对照细胞,甲状腺癌细胞TPC-1、FTC-133、IHH-4均用于检测miR-532-3p的基础表达水平,完成细胞水平初筛。结合后续实验结果,TPC-1细胞中miR-532-3p表达水平最低,因此选取TPC-1细胞开展后续细胞功能实验及动物体内移植瘤实验,FTC-133、IHH-4细胞仅用于本研究miR-532-3p基础表达筛选。所有细胞均培养于含10%胎牛血清和1%青-链霉素的DMEM培养基中,在37℃、5% CO<sub>2</sub>、95%空气的饱和湿度培养箱中培养。

### 1.2 主要实验试剂与仪器

miR-532-3p模拟物(miR-532-3p mimic, 序列CCUCCACACCCAAGGCUUGCA, 转染终浓度50 nmol/L)、miR-532-3p抑制剂(miR-532-3p inhibitor, 序列UGCAAGCCUUGGGUGUGGGA, 转染终浓度50 nmol/L)及其阴性对照(分别为mimic-NC和inhibitor-NC)均购自美国MedChemExpress (MCE)公司,DDOST过表达质粒(pcDNA-DDOST)及其阴性对照(pcDNA-NC)均购自上海纽普生物科技有限公司,引物序列由上海生工生物工程有限公司合成,胎牛血清、青-链霉素、DMEM(高糖)购自德国Merck KGaA公司,Lipofectamine 3000试剂购自美国Thermo Scientific公司,TRIzol试剂购自南京诺唯赞生物科技有限公司,miRNA逆转录试剂盒购自深圳凯杰(QIAGEN)生物工程有限公司,SYBR Premix Ex Taq试剂盒购自日本TaKaRa公司,基质胶购自美国Becton Dickinson(BD)Biosciences公司;RIPA裂解液、BCA检测试剂盒均购自上海Beyotime公司,PVDF膜购自美国Millipore公司,ECL化学发光液购自北京索莱宝生物科技有限公司,PKM2抗体(货号

15822-1-AP)、HK2 抗体(货号 22029-1-AP)、LDHA 抗体(货号 21799-1-AP)、DDOST 抗体(货号 14916-1-AP)、Ki-67 抗体(货号 27309-1-AP)、GAPDH 抗体(货号 10494-1-AP)以及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗(货号 SA00001-2)均购自武汉三鹰生物技术有限公司,乳酸检测试剂盒、葡萄糖检测试剂盒均购自美国 Sigma-Aldrich 公司,实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,ChemiDoc XRS+型成像系统、Mini-PROTEAN 电泳系统均购自美国 Bio-Rad 公司。

### 1.3 TPC-1 细胞转染及分组

将细胞分为 8 组: mimic-NC 组(转染 mimic-NC)、miR-532-3p mimic 组(转染 miR-532-3p mimic)、inhibitor-NC 组(转染 inhibitor-NC)、miR-532-3p inhibitor 组(转染 miR-532-3p inhibitor)、mimic-NC + pcDNA-NC 组(转染 mimic-NC + pcDNA-NC)、mimic-NC + pcDNA-DDOST 组(转染 mimic-NC + pcDNA-DDOST)、miR-532-3p mimic + pcDNA-NC 组(转染 miR-532-3p mimic + pcDNA-NC)、miR-532-3p mimic + pcDNA-DDOST 组(转染 miR-532-3p mimic + pcDNA-DDOST)。转染前 24 h,将处于对数生长期的 TPC-1 细胞以  $2 \times 10^5$ /孔接种于 6 孔板,培养过夜至汇合度达 60%~70% 后进行转染。严格参照 Lipofectamine 3000 说明书操作:miR-532-3p mimic、

miR-532-3p inhibitor 及其对应阴性对照(mimic-NC、inhibitor-NC)每孔使用 100 pmol 核酸(即 5  $\mu$ L 20  $\mu$ mol/L 储存液,终浓度 50 nmol/L),与 5  $\mu$ L Lipofectamine 3000 分别溶于 125  $\mu$ L Opti-MEM 后混合,室温静置 15 min 形成复合物;对于共转染组,miR-532-3p mimic 或 mimic-NC 按照相应分组与 pcDNA-DDOST 或 pcDNA-NC 共转染;每孔加入 2.5  $\mu$ g 质粒及 5  $\mu$ L Lipofectamine 3000(按 2  $\mu$ L/ $\mu$ g DNA 比例),同样于 125  $\mu$ L Opti-MEM 中配制复合物。每孔复合物总体积约 250  $\mu$ L,逐滴加入孔内,转染 6 h 后更换新鲜完全培养基,继续培养 24 h 收集细胞,用于后续实验。采用 RT-qPCR 检测转染后各组细胞 miR-532-3p 和 DDOST mRNA 表达,采用 Western blotting 法检测 DDOST 蛋白表达,以验证转染效率。

### 1.4 RT-qPCR 检测细胞和移植瘤组织 miR-532-3p 及相关基因 mRNA 表达

取适量细胞或经液氮充分研磨的移植瘤组织,使用 TRIzol 试剂提取总 RNA,按照逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录为 cDNA,使用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒进行 RT-qPCR 反应。反应条件包括在 95  $^{\circ}$ C 初始变性 3 min,循环 1 次;95  $^{\circ}$ C 变性 12 s,60  $^{\circ}$ C 退火和延伸 45 s,循环 45 次。mRNA 检测以 GAPDH 为内参,miRNA 检测以 U6 为内参。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列(5'→3')

| 引物名称       | 正向序列                | 反向序列                 |
|------------|---------------------|----------------------|
| miR-532-3p | CGTTTCCAACGTATG     | CAACGGCGGATGGCC      |
| DDOST      | TCTCTGGATTCTTCAGCGA | TGTCTGAGAATACCTCTGCG |
| U6         | CTCGCTTCGGCAGCACA   | ACGCTTCACGAATTTGCGT  |
| GAPDH      | TCCTTTAGGATTTGGCCGT | TTGATGGCAACAATCTCCAC |

### 1.5 双萤光素酶报告基因实验验证 TPC-1 细胞中 miR-532-3p 与 DDOST 的靶向关系

构建含 DDOST 基因 3'-UTR miR-532-3p 结合位点的野生型(DDOST-WT)和突变型(DDOST-MUT) pmirGLO 报告载体。具体实验步骤如下:(1)将 TPC-1 细胞接种于 6 孔板,培养过夜至适宜密度;(2)参照 Lipofectamine 3000 转染试剂说明书,将构建好的报告载体分别与 miR-532-3p mimic 或 mimic-NC、miR-532-3p inhibitor 或 inhibitor-NC 共转染至细胞;(3)转染 48 h 后收集细胞裂解液;(4)使用碧云天双萤光素酶报告基因检测试剂盒检测萤光素酶活性,并以海肾萤光素酶(Renilla luciferase)活性作为内参进行标准化。本实验独立重复 3 次。

### 1.6 Western blotting 法检测 TPC-1 细胞 DDOST 及

### 糖酵解相关蛋白表达

收集各组细胞,加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,冰上裂解 30 min 后,于 4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,BCA 法定量蛋白浓度。每组取 30  $\mu$ g 总蛋白上样,经 10% SDS-PAGE 分离,采用湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜,于 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h。分别加入 DDOST(1:2 000)、HK2(1:1 000)、PKM2(1:1 000)、LDHA(1:1 000)及 GAPDH(1:5 000)抗体,4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,Tris 缓冲盐水吐温溶液(Tris-buffered saline with Tween-20, TBST)洗膜 5 次,每次 5 min,滴加辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1:5 000)室温作用 1 h, TBST 再次洗膜后,加入 ECL 化学发光剂显影曝光,以 GAPDH 为内参,用 Image Lab 软件分析条带灰度值,计算各目的蛋白与

GAPDH条带灰度值的比值。

### 1.7 CCK-8法检测TPC-1细胞增殖活力

将处于对数生长期的TPC-1细胞以 $5 \times 10^3$ 个/孔的密度接种于96孔板中,每孔培养基体积为100  $\mu$ L。细胞接种后置于培养箱中贴壁培养,分别于0 h(贴壁后即刻)、24 h、48 h和72 h四个时间点进行检测。每个时间点每组设置3个技术复孔,并设3个空白对照孔(仅含完全培养基,无细胞)。到达各检测时间点时,每孔加入10  $\mu$ L的10% CCK-8溶液,于37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中继续培养2 h。采用酶标仪测定450 nm处的光密度( $D_{450}$ )值。所有实验独立重复3次,最终数据以3次独立实验结果的均值表示。

### 1.8 试剂盒法检测TPC-1细胞葡萄糖消耗率和乳酸浓度

收集各组细胞培养上清液,于4  $^{\circ}$ C、2 000 r/min离心10 min去除细胞碎片及悬浮细胞,取上清液用于检测。按乳酸检测试剂盒和葡萄糖检测试剂盒说明书,现配现用检测工作液,向96孔板中分别加入50  $\mu$ L梯度标准品、空白对照或待测样本,再各加入100  $\mu$ L乳酸或葡萄糖检测工作液,轻柔吹打混匀后,37  $^{\circ}$ C避光静置30 min,在酶标仪相应波长(葡萄糖505 nm,乳酸530 nm)处测定各孔光密度( $D$ )值,以标准品浓度为横坐标、对应光密度( $D$ )值为纵坐标绘制标准曲线,计算样本中葡萄糖和乳酸浓度( $\mu\text{mol/L}$ )。葡萄糖消耗率=(无细胞空白孔葡萄糖浓度-实验孔葡萄糖浓度)/无细胞空白孔葡萄糖浓度 $\times 100\%$ ;细胞乳酸生成量以标准曲线计算所得的实验孔乳酸浓度表示。所有实验独立重复3次,结果以均值表示。

### 1.9 裸小鼠皮下移植瘤实验检测miR-532-3p对甲状腺癌移植瘤生长的影响

将1.3中经RT-qPCR验证的过表达/抑制稳定转染的各组细胞株用于动物接种(mimic-NC组、miR-532-3p mimic组、inhibitor-NC组和miR-532-3p inhibitor组)。将各组TPC-1细胞消化重悬于无血清DMEM培养基与Matrigel基质胶(体积比1:1)的混合液中,调整细胞密度为 $1 \times 10^7$ 个/mL。接种前经台盼蓝染色计数,确保细胞活率 $>95\%$ 。采用随机数字表法将BALB/c裸小鼠均分为4组( $n=5$ ),分别为mimic-NC组、miR-532-3p mimic组、inhibitor-NC组、miR-532-3p inhibitor组。于裸小鼠右后侧腋窝皮下注射200  $\mu$ L上述细胞悬液(即每只小鼠接种 $2 \times 10^6$ 个活细胞)<sup>[2]</sup>。每日监测裸小鼠精神状态及皮下移植瘤生长状况。见瘤后,每隔3 d测量裸小鼠皮下移植瘤的长径( $a$ )和短径( $b$ ),计算移植瘤体积(tumor volume,  $TV$ ),计算公式为 $TV = a \times b^2/2$ 。21 d后采用颈椎脱臼法处死裸小鼠,完整剥离移植瘤并称重。

实验观察及肿瘤测量由对分组情况不知情的专人负责(盲法操作),以减少测量偏倚。若实验期间小鼠出现移植瘤体积 $\geq 2\,000\text{ mm}^3$ 、体重下降超过初始体重20%、持续萎靡至濒死状态中的任一情况,则腹腔注射50 mg/kg戊巴比妥钠深度麻醉后颈椎脱臼法处死。

### 1.10 免疫组织化学法检测移植瘤组织Ki-67和DDOST表达

移植瘤体积和质量测量结束后,将各组移植瘤分为两半,一半置于-80  $^{\circ}$ C冰箱用于RT-qPCR检测。另一半置于4%多聚甲醛中固定24 h后,经脱水、包埋,石蜡切片,脱蜡水化、柠檬酸钠修复液微波修复、3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 封闭内源性过氧化物酶、封闭,分别滴加适量一抗,4  $^{\circ}$ C结合过夜,滴加二抗,37  $^{\circ}$ C恒温箱中结合30 min,DAB显色(避光)、苏木精复染,逐级脱水,封片。在显微镜下随机选取3个视野观察并拍照,使用ImageJ软件定量Ki-67、DDOST的阳性表达(棕色)面积和视野总面积,计算阳性表达率。阳性表达率=阳性染色面积/视野总面积 $\times 100\%$ 。

### 1.11 统计分析

采用SPSS 18.0软件(IBM Corporation)进行统计分析。所有细胞实验均独立重复3次。采用Shapiro-Wilk检验评估数据正态性,并通过Levene检验判断方差齐性。符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用独立样本 $t$ 检验,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),事后多重比较采用Bonferroni校正。若数据不符合正态分布或方差不齐,则两组间比较用Mann-Whitney  $U$ 检验,多组间比较用Kruskal-Wallis  $H$ 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 甲状腺癌细胞miR-532-3p表达降低及TPC-1细胞转染效率

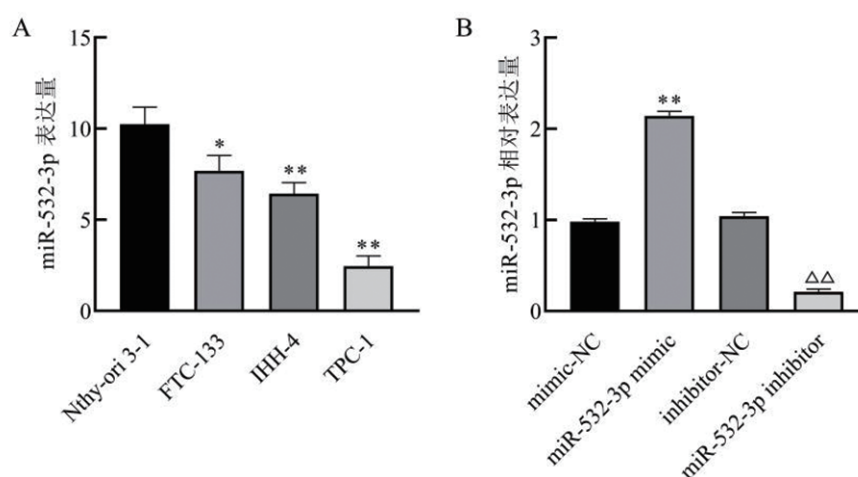
与正常甲状腺细胞Nthy-ori 3-1相比,甲状腺癌细胞(TPC-1、FTC-133、IHH-4)中miR-532-3p表达水平显著降低( $P < 0.05$ ),其中TPC-1细胞中miR-532-3p表达水平最低( $P < 0.05$ ),因此选用TPC-1细胞进行后续实验(图1A)。RT-qPCR检测结果显示,与mimic-NC组比,miR-532-3p mimic组细胞中miR-532-3p表达水平显著升高( $P < 0.05$ );与inhibitor-NC组比,miR-532-3p inhibitor组miR-532-3p表达水平显著降低(图1B,  $P < 0.05$ )。

### 2.2 过表达miR-532-3p抑制TPC-1细胞增殖及糖酵解

CCK-8法检测结果(图2A)显示,与mimic-NC组比,miR-532-3p mimic组的细胞增殖活力明显降低

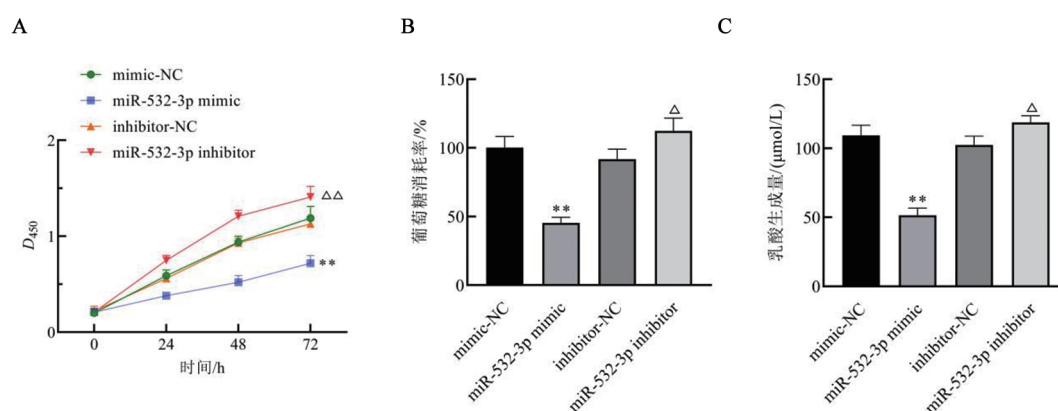
( $P < 0.05$ ); 与 inhibitor-NC 组比, miR-532-3p inhibitor 组细胞增殖活力明显升高( $P < 0.05$ )。TPC-1 细胞糖酵解检测结果(图 2B、C)显示, 与 mimic-NC 组比, miR-532-3p mimic 组葡萄糖消耗率及乳酸浓度明显

显降低( $P < 0.05$ ); 与 inhibitor-NC 组比, miR-532-3p inhibitor 组葡萄糖消耗率及乳酸浓度明显升高( $P < 0.05$ )。



A: miR-532-3p 在正常甲状腺细胞和甲状腺癌细胞中的表达水平; B: 各组 TPC-1 细胞中 miR-532-3p 的表达水平。  
与 Nthy-ori 3-1 或 mimic-NC 组比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与 inhibitor-NC 组比,  $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图 1 各组细胞 miR-532-3p 表达水平



A: 各组 TPC-1 细胞增殖活力; B: 各组 TPC-1 细胞葡萄糖消耗率; C: 各组 TPC-1 细胞中乳酸浓度。

与 mimic-NC 组比, \*\* $P < 0.01$ ; 与 inhibitor-NC 组比,  $\Delta P < 0.05$ 。

图 2 miR-532-3p 对 TPC-1 细胞增殖及糖酵解的影响

RT-qPCR 及 Western blotting 检测结果(图 3)显示, 与 mimic-NC 组比, miR-532-3p mimic 组 HK2、PKM2、LDHA mRNA 及蛋白表达水平明显降低( $P < 0.05$ ); 与 inhibitor-NC 组比, miR-532-3p inhibitor 组 HK2、PKM2、LDHA mRNA 及蛋白表达水平明显升高( $P < 0.05$ )。

### 2.3 miR-532-3p 靶向 DDOST 并下调其表达

通过 TargetScan 数据库预测发现, miR-532-3p 与 DDOST 3'-UTR 存在互补结合位点(图 4A)。为验证 miR-532-3p 与 DDOST 的靶向关系,本研究进行双萤光素酶报告基因实验,结果(图 4B)显示,与 mimic-NC 组比, miR-532-3p mimic 组的萤光素酶活性

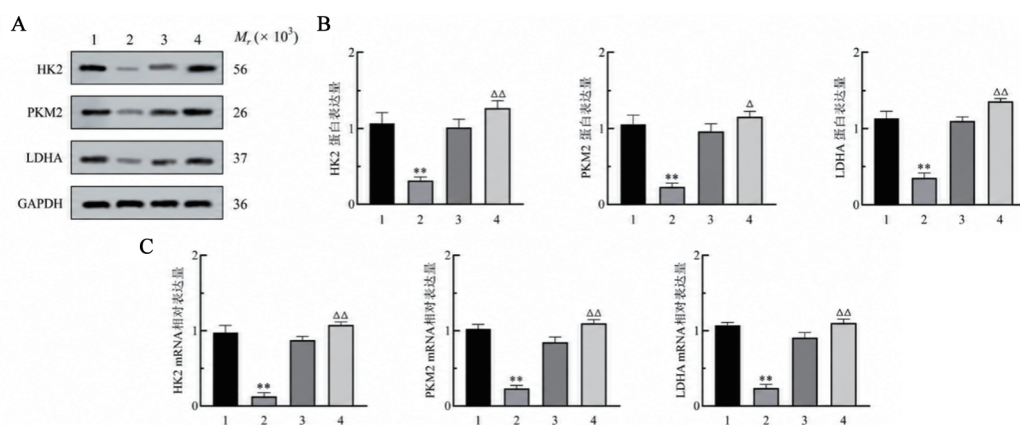
明显降低( $P < 0.05$ ),与 inhibitor-NC 组比, miR-532-3p inhibitor 组的萤光素酶活性明显升高( $P < 0.05$ )。同样,与正常甲状腺细胞 Nthy-ori 3-1 相比,甲状腺癌细胞(TPC-1、FTC-133、IHH-4)中 DDOST 表达水平均显著升高,其中 TPC-1 细胞中 DDOST 表达升幅最大(图 5A,  $P < 0.05$ )。RT-qPCR 和 Western blotting 检测结果(图 5B~D)显示,与 mimic-NC 组比, miR-532-3p mimic 组中 DDOST mRNA 及蛋白表达水平明显降低( $P < 0.05$ ),与 inhibitor-NC 组比, miR-532-3p inhibitor 组中 DDOST mRNA 及蛋白表达水平明显升高( $P < 0.05$ )。

### 2.4 DDOST 过表达部分逆转 miR-532-3p 对 TPC-1

细胞增殖及糖酵解的抑制作用

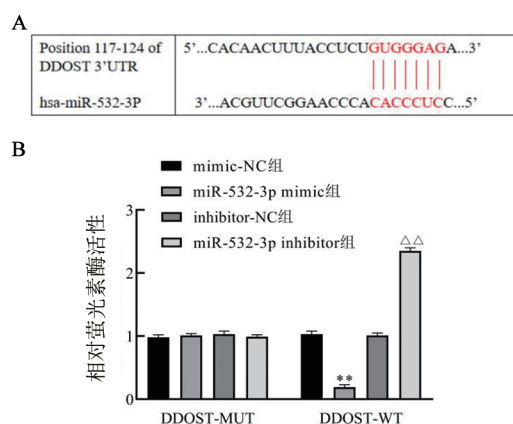
CCK-8法检测结果(图6A)显示,与mimic-NC + pcDNA-NC组比,mimic-NC + pcDNA-DDOST组的

细胞增殖活力明显增加( $P < 0.05$ );与miR-532-3p mimic + pcDNA-NC组比,miR-532-3p mimic + pcDNA-DDOST组细胞增殖活力明显增加( $P < 0.05$ )。



1:mimic-NC组;2:miR-532-3p mimic组;3:inhibitor-NC组;4:miR-532-3p inhibitor组。A:HK2、PKM2及LDHA Western blotting图;B:HK2、PKM2及LDHA蛋白相对表达水平;C:HK2、PKM2及LDHA mRNA相对表达水平。与mimic-NC组比,\*\* $P < 0.01$ ;与inhibitor-NC组比, $\Delta P < 0.05$ , $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图3 各组TPC-1细胞HK2、PKM2及LDHA的mRNA和蛋白表达水平



A:DDOST与miR-532-3p的潜在结合位点;B:各组TPC-1细胞萤光素酶活性。与mimic-NC组比,\*\* $P < 0.01$ ;与inhibitor-NC组比, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图4 miR-532-3p与DDOST靶向关系验证

TPC-1细胞糖酵解检测结果(图6B、C)显示,与mimic-NC + pcDNA-NC组比,mimic-NC + pcDNA-DDOST组的葡萄糖消耗率及乳酸浓度明显增加( $P < 0.05$ );与miR-532-3p mimic + pcDNA-NC组比,miR-532-3p mimic + pcDNA-DDOST组葡萄糖消耗率及乳酸浓度明显增加( $P < 0.05$ )。

RT-qPCR及Western blotting检测结果(图7)显示,与mimic-NC + pcDNA-NC组比,mimic-NC + pcDNA-DDOST组HK2、PKM2、LDHA mRNA及蛋白表达水平明显升高( $P < 0.05$ );与miR-532-3p mimic + pcDNA-NC组比,miR-532-3p mimic + pcDNA-DDOST组HK2、PKM2、LDHA mRNA及蛋

白表达水平明显升高( $P < 0.05$ )。

2.5 过表达miR-532-3p抑制裸小鼠移植瘤生长及增殖 RT-qPCR检测结果(图8)显示,与mimic-NC组比,miR-532-3p mimic组miR-532-3p表达水平显著提高( $P < 0.05$ );与inhibitor-NC组比,miR-532-3p inhibitor组miR-532-3p表达水平显著降低( $P < 0.05$ )。

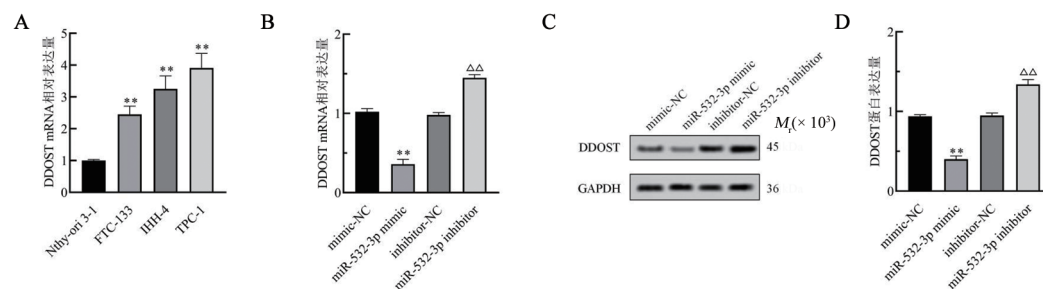
移植瘤测量结果(图9)显示,裸小鼠成瘤后,各组移植瘤体积均随时间逐渐增加。与mimic-NC组比,miR-532-3p mimic组移植瘤体积明显减小,移植瘤质量明显降低( $P < 0.05$ );与inhibitor-NC组比,miR-532-3p inhibitor组移植瘤体积和移植瘤质量明显增加( $P < 0.05$ )。

免疫组织化学结果(图10)显示,与mimic-NC组比,miR-532-3p mimic组中Ki-67和DDOST阳性染色明显减弱,阳性表达率明显降低( $P < 0.05$ );与inhibitor-NC组比,miR-532-3p inhibitor组中Ki-67和DDOST阳性染色明显增强,阳性表达率明显升高( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

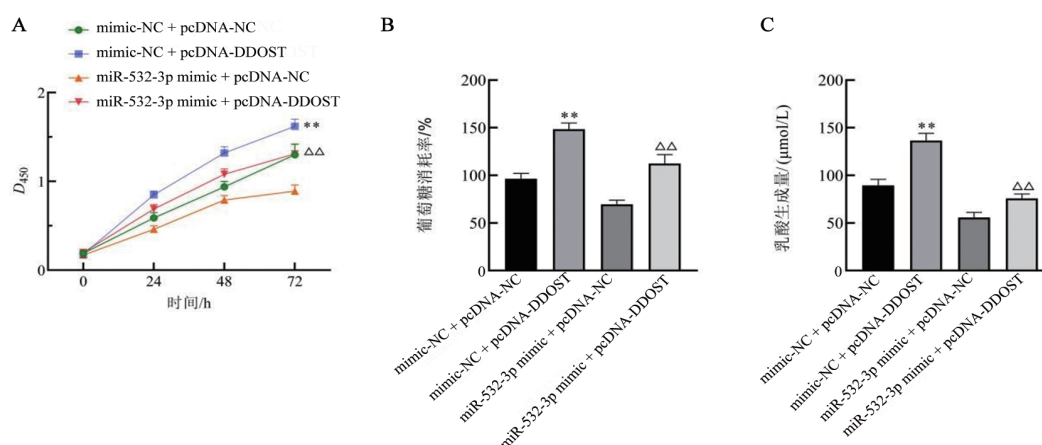
甲状腺癌是内分泌系统最常见的恶性肿瘤,其中乳头状甲状腺癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)是最主要的组织学亚型,约占所有甲状腺癌病例的80%~90%<sup>[9]</sup>。虽然大多数PTC患者预后良好,10年生存率可达90%以上,但部分患者的肿瘤侵袭性较强、死亡风险较高;另有部分患者仍会出现淋巴结或远处转移,导致不良预后<sup>[10]</sup>。因此,有必要识别新的

靶点并开发新的治疗策略,以改善甲状腺癌的管理。



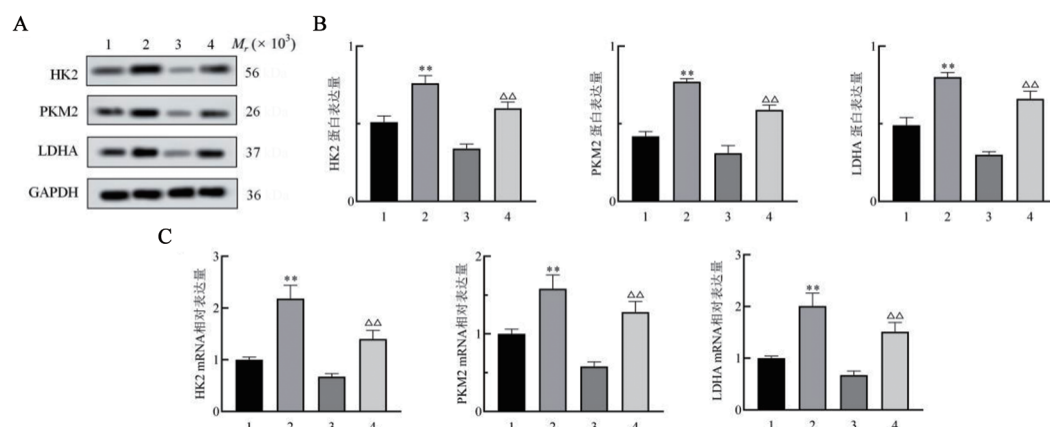
A: DDOST 在甲状腺癌细胞的表达水平; B: DDOST mRNA 相对表达水平; C: DDOST 蛋白质印迹图; D: DDOST 蛋白相对表达水平。与 Nthy-ori 3-1 或 mimic-NC 组比,  $^{**}P < 0.01$ ; 与 inhibitor-NC 组比,  $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ 。

图5 各组细胞 DDOST mRNA 及蛋白表达水平



A: TPC-1 细胞增殖活力; B: TPC-1 细胞葡萄糖消耗率; C: TPC-1 细胞乳酸浓度。与 mimic-NC + pcDNA-NC 组比,  $^{**}P < 0.01$ ; 与 miR-532-3p mimic + pcDNA-NC 组比,  $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ 。

图6 DDOST 过表达对 TPC-1 细胞增殖及糖酵解的影响



1: mimic-NC + pcDNA-NC 组; 2: mimic-NC + pcDNA-DDOST 组; 3: miR-532-3p mimic + pcDNA-NC 组; 4: miR-532-3p mimic + pcDNA-DDOST 组。A: HK2、PKM2 及 LDHA 蛋白质印迹图; B: HK2、PKM2 及 LDHA 蛋白相对表达水平; C: HK2、PKM2 及 LDHA mRNA 相对表达水平。与 mimic-NC + pcDNA-NC 组比,  $^{**}P < 0.01$ ; 与 miR-532-3p mimic + pcDNA-NC 组比,  $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ 。

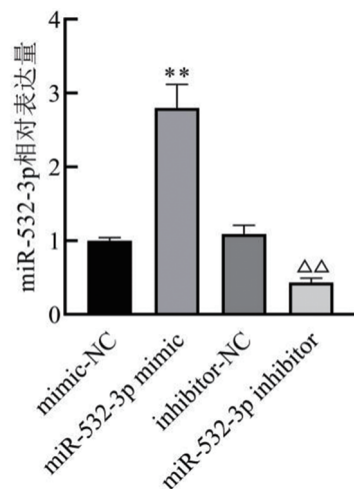
图7 各组 TPC-1 细胞糖酵解相关蛋白的 mRNA 和蛋白表达水平

miRNA 在肿瘤发生发展中发挥双重作用,既可充当促癌因子,也可作为抑癌分子,其表达异常与肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭和转移等恶性表型密切相关。

其中, miR-532-3p 作为一种具有抑癌潜能的 miRNA,在多种恶性肿瘤中呈低表达。相关研究<sup>[11]</sup>表明, miR-532-3p 在卵巢癌中低表达,过表达 miR-532-3p

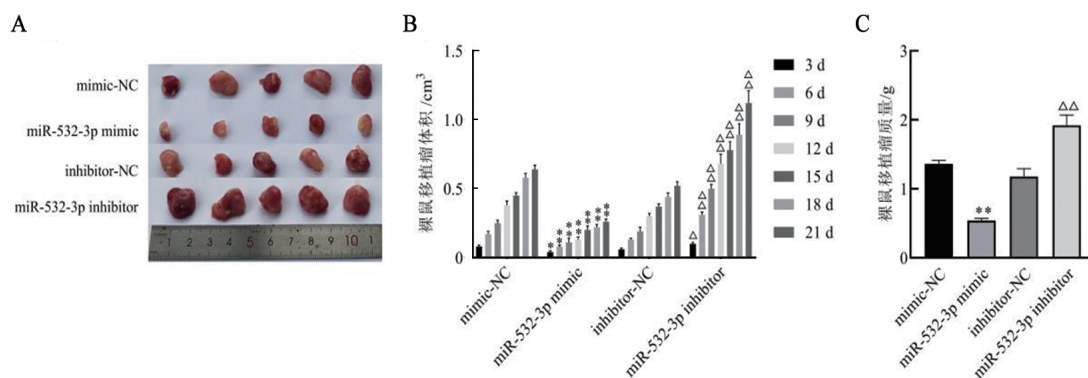
可抑制卵巢癌细胞增殖及裸小鼠卵巢癌移植瘤生长。此外,过表达 miR-532-3p 也在前列腺癌细胞中表现出显著的抑瘤作用<sup>[12]</sup>。因此,本研究检测甲状腺癌细胞 (TPC-1、FTC-133、IHH-4) 中 miR-532-3p 水平,发现 TPC-1 细胞中 miR-532-3p 表达水平最低,且过表达 miR-532-3p 能抑制 TPC-1 细胞增殖活力;相反,抑制 miR-532-3p 表达可促进 TPC-1 细胞增殖活力。上述结果提示,miR-532-3p 与甲状腺癌的发生发展有关,其可能作为抑癌分子参与甲状腺癌的发生发展。进一步的体内实验结果显示,过表达 miR-532-3p 可抑制裸小鼠甲状腺癌移植瘤生长。免疫组织化学结果显示,过表达 miR-532-3p 可降低裸小鼠甲状腺癌移植瘤组织中 Ki-67 的阳性表达;Ki-67 是常用的细胞增殖标志物<sup>[13]</sup>。上述结果表明,过表达 miR-532-3p 可抑制 TPC-1 细胞增殖并延缓裸小鼠甲状腺癌皮下移植瘤生长,说明 miR-532-3p 具有抑癌潜

能,且体内实验结果一致。



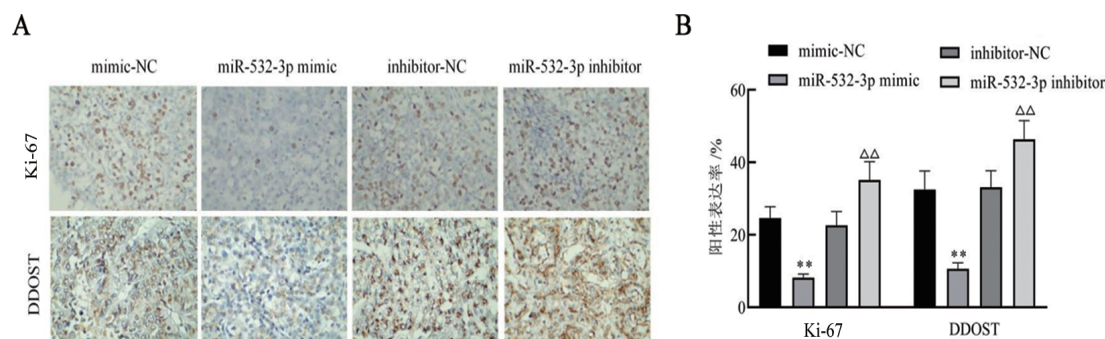
与 mimic-NC 组比, \*\* $P < 0.01$ ; 与 inhibitor-NC 组比,  $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图8 各组裸小鼠移植瘤 miR-532-3p 表达水平



A: 各组裸小鼠移植瘤大体标本; B: 移植瘤体积; C: 移植瘤质量。与 mimic-NC 组比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与 inhibitor-NC 组比,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图9 各组裸小鼠移植瘤大体标本、体积和质量



A: 各组裸小鼠 Ki-67、DDOST 免疫组织化学染色结果( $\times 200$ ); B: 各组裸小鼠 Ki-67、DDOST 阳性表达率。与 mimic-NC 组比, \*\* $P < 0.01$ ; 与 inhibitor-NC 组比,  $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图10 各组裸小鼠移植瘤 Ki-67 和 DDOST 免疫组织化学染色及阳性表达率

miRNA 作为基因表达的关键调控因子,主要通过特异性识别靶基因 mRNA 的 3'-UTR 实现对众多基因表达水平的精细调控。本研究结合生物信息学靶

点预测和双萤光素酶报告基因实验,结果提示 DDOST 是 miR-532-3p 的直接作用靶标。DDOST 作为寡糖转移酶复合体的关键亚基,通过调控蛋白质

N-糖基化过程显著影响肿瘤细胞的恶性生物学行为。多项研究<sup>[14-15]</sup>表明,DDOST 高表达可促进肿瘤细胞异常增殖。此外,DDOST 表达与肿瘤预后相关,可能具有预后标志物价值<sup>[7]</sup>。本研究也发现,DDOST 在 TPC-1 细胞中表达上调,过表达 miR-532-3p 可抑制 DDOST 的 mRNA 及蛋白表达,而抑制 miR-532-3p 表达可上调 DDOST 表达。进一步的免疫组织化学染色结果显示,过表达 miR-532-3p 可降低 DDOST 的蛋白表达。上述结果提示,miR-532-3p 可在 TPC-1 细胞和裸小鼠甲状腺癌移植瘤组织中调控 DDOST 表达,从而发挥抑癌作用。肿瘤细胞代谢呈现显著特征性改变,其最突出的表现为即使在氧气充足的条件下,仍持续增强糖酵解活性并大量生成乳酸,这一特殊代谢模式被称为有氧糖酵解。该代谢重编程现象通过持续供应能量及生物合成前体物质,促进肿瘤细胞增殖。目前,有氧糖酵解被视为恶性肿瘤的标志之一<sup>[16]</sup>。相关研究<sup>[17]</sup>表明,糖酵解在细胞信号传导中可促进肿瘤细胞的增殖、侵袭及迁移。因此,抑制有氧糖酵解可作为治疗恶性肿瘤的重要机制。糖酵解途径中 HK2、PKM2 和 LDHA 等关键酶的异常激活,是促进肿瘤细胞有氧糖酵解代谢重编程的关键因素。其中,HK2 作为糖酵解起始步骤的调控枢纽,其过表达与多种恶性肿瘤的发生发展密切相关<sup>[18]</sup>; PKM2 是糖酵解过程中的关键限速酶,调控丙酮酸和 ATP 的生成过程<sup>[19]</sup>; LDHA 是糖酵解过程中的核心限速酶,在细胞能量代谢调控中发挥重要作用。LDHA 通过催化丙酮酸向乳酸转化,不仅能够弥补线粒体氧化磷酸化功能缺陷,还能在低氧微环境中维持细胞内氧化还原平衡,从而确保细胞在应激状态下的存活能力<sup>[20]</sup>。此外,在甲状腺恶性肿瘤中,LDHA 呈异常高表达,促进甲状腺癌细胞的增殖、侵袭和转移<sup>[21-22]</sup>。因此,本研究检测 TPC-1 细胞中的葡萄糖消耗率及乳酸生成,结果显示,过表达 miR-532-3p 可显著降低 TPC-1 细胞中的葡萄糖消耗率及乳酸生成,而过表达 DDOST 可逆转上述影响。进一步检测 TPC-1 细胞中糖酵解相关蛋白 HK2、PKM2 和 LDHA 的 mRNA 及蛋白表达,结果显示,过表达 miR-532-3p 可显著降低三者的 mRNA 及蛋白表达。上述结果提示,过表达 miR-532-3p 可通过靶向 DDOST 抑制 TPC-1 细胞糖酵解,进而抑制其增殖。

综上所述,过表达 miR-532-3p 可通过靶向调控 DDOST 抑制 TPC-1 细胞增殖和糖酵解,并可抑制裸小鼠甲状腺癌移植瘤生长。本研究仍存在仅使用 1 株甲状腺癌细胞、缺乏独立样本验证及未开展体内 DDOST 回复实验等局限;miR-532-3p/DDOST 轴的具体上、下游调控机制仍待进一步阐明。

## 参考文献

- [1] Kitahara C M, Sosa J A. Understanding the ever-changing incidence of thyroid cancer[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2020, 16(11): 617-618. DOI:10.1038/s41574-020-00414-9.
- [2] Zhang L, Xu S, Cheng X, et al. Curcumin induces autophagic cell death in human thyroid cancer cells[J]. *Toxicol In Vitro*, 2022, 78: 105254. DOI:10.1016/j.tiv.2021.105254.
- [3] He J, Wang L, Yu B, et al. Extracellular vesicle-derived microRNAs in renal cell carcinoma: biological roles and clinical applications[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2025, 13: 1694257. DOI:10.3389/fcell.2025.1694257.
- [4] 丁雯钰, 高杨丽, 杨一飞. miR-126-3p.1 通过 SLC7A5 调控间变性甲状腺癌细胞糖酵解的作用机制[J]. *西部医学*, 2024, 36(2): 205-210. DOI:10.3969/j.issn.1672-3511.2024.02.009.
- [5] 陈鹏, 马德寿. circ\_0072088 通过调控 miR-532-3p/WEE1 轴促进甲状腺癌 IHH4 细胞的恶性生物学行为[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2021, 28(6): 598-604. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2021.06.007.
- [6] Mei J, Pan L, Huang M, et al. DDOST is associated with tumor immunosuppressive microenvironment in cervical cancer[J]. *Discov Oncol*, 2024, 15(1): 69. DOI:10.1007/s12672-024-00927-z.
- [7] Zhu C, Xiao H, Jiang X, et al. Prognostic biomarker DDOST and its correlation with immune infiltrates in hepatocellular carcinoma[J]. *Front Genet*, 2022, 12: 819520. DOI:10.3389/fgene.2021.819520.
- [8] 李晓亮. DDOST 在头颈鳞状细胞癌中的生物信息学及临床意义研究[D]. 桂林医学院, 2024. DOI:10.27806/d.cnki.gglyx.2024.000028.
- [9] Lim H, Devesa S S, Sosa J A, et al. Trends in thyroid cancer incidence and mortality in the United States, 1974-2013[J]. *JAMA*, 2017, 317(13): 1338-1348. DOI:10.1001/jama.2017.2719.
- [10] Ma W, Guo Y, Hua T, et al. Lateral lymph node metastasis in papillary thyroid cancer: is there a difference between PTC and PTMC? [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2024, 103(17): e37734. DOI:10.1097/MD.00000000000037734.
- [11] Tuo X, Zhou Y, Yang X, et al. miR-532-3p suppresses proliferation and invasion of ovarian cancer cells via GPNMB/HIF-1 $\alpha$ /HK2 axis[J]. *Pathol Res Pract*, 2022, 237: 154032. DOI:10.1016/j.prp.2022.154032.
- [12] Wa Q, Zou C, Lin Z, et al. Ectopic expression of miR-532-3p suppresses bone metastasis of prostate cancer cells via inactivating NF- $\kappa$ B signaling[J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2020, 17: 267-277. DOI:10.1016/j.omto.2020.03.024.
- [13] La Rosa S. Diagnostic, prognostic, and predictive role of Ki-67 proliferative index in neuroendocrine and endocrine neoplasms: past, present, and future[J]. *Endocr Pathol*, 2023, 34(1): 79-97. DOI:10.1007/s12022-023-09755-3.
- [14] Lin S, Cao Y, Zhu K, et al. Identification of a novel prognostic signature based on N-linked glycosylation and its correlation with immunotherapy response in hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatocell Carcinoma*, 2023, 10: 1749-1765. DOI:10.2147/JHC.S417407.
- [15] Madrid F F, Grossman L I, Aras S. Mitochondria autoimmunity and MNR1 in breast carcinogenesis: a review[J]. *J Cancer Immunol (Wilmington)*, 2020, 2(4): 138-158. DOI:10.33696/cancerimmunol.2.027.
- [16] Duan S, Wu M, Zhang Z, et al. The potential role of reprogrammed glucose metabolism: an emerging actionable codependent target in

- thyroid cancer[J]. J Transl Med, 2023, 21(1): 735. DOI:10.1186/s12967-023-04617-2.
- [17] Lee L J, Papadopoli D, Jewer M, et al. Cancer plasticity: the role of mRNA translation[J]. Trends Cancer, 2021, 7(2): 134-145. DOI: 10.1016/j.trecan.2020.09.005.
- [18] Zhang L, Jiang C, Zhong Y, et al. STING is a cell-intrinsic metabolic checkpoint restricting aerobic glycolysis by targeting HK2[J]. Nat Cell Biol, 2023, 25(8): 1208-1222. DOI: 10.1038/s41556-023-01185-x.
- [19] Zhu S, Guo Y, Zhang X, et al. Pyruvate kinase M2 (PKM2) in cancer and cancer therapeutics[J]. Cancer Lett, 2021, 503: 240-248. DOI:10.1016/j.canlet.2020.11.018.
- [20] Wang C, Li Y, Yan S, et al. Interactome analysis reveals that lncRNA HULC promotes aerobic glycolysis through LDHA and PKM2[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 3162. DOI:10.1038/s41467-020-16966-3.
- [21] Kachel P, Trojanowicz B, Sekulla C, et al. Phosphorylation of pyruvate kinase M2 and lactate dehydrogenase A by fibroblast growth factor receptor 1 in benign and malignant thyroid tissue[J]. BMC Cancer, 2015, 15: 140. DOI:10.1186/s12885-015-1135-y.
- [22] Gao Y, Yang F, Yang X, et al. Mitochondrial metabolism is inhibited by the HIF1alpha-MYC-PGC-1beta axis in BRAF V600E thyroid cancer[J]. FEBS J, 2019, 286(7): 1420-1436. DOI:10.1111/febs.14786.
- [收稿日期] 2026-02-16 [修回日期] 2026-08-10  
[本文编辑] 黄静怡