

蛋白酶体激活因子 γ 对未分化甲状腺癌细胞摄碘功能的影响

亢龙 何薇

复旦大学医学院附属华东医院核医学科, 上海 200040

通信作者: 何薇, Email: heweixu@hotmail.com

【摘要】 目的 观察沉默蛋白酶体激活因子 γ (REG γ) 前后的甲状腺癌 ARO 及 WRO 细胞株的摄碘能力变化及摄碘相关特异蛋白 mRNA 水平变化, 研究 REG γ 与甲状腺癌摄碘的关系。方法 常规培养 AROshN、AROshR、WROshN 及 WROshR 甲状腺癌细胞株 (shN 为空白质粒, shR 为沉默 REG γ 质粒), 加入低剂量 Na¹²⁵I (3.7 kBq) 后 5、10、15、20、40 和 70 min 测量细胞的摄碘率, 观察细胞摄碘能力的变化, 并利用实时荧光 PCR 检测摄碘相关特异蛋白 [钠/碘转运体 (NIS)、促甲状腺激素受体 (TSHR)、甲状腺过氧化物酶 (TPO)、甲状腺球蛋白 (Tg)] mRNA 水平的变化。采用配对 *t* 检验分析数据。结果 沉默 REG γ 的 AROshR 及 WROshR 细胞摄碘能力均提高, 其中 AROshR 细胞的提高率为 128.1% [峰值 (1 974±12) 与 (4 502±23) 计数/min; *t* = 17.30, *P* < 0.05], WROshR 细胞的提高率为 67.4% [峰值 (2 988±25) 与 (5 001±16) 计数/min, *t* = 13.20, *P* < 0.05]。沉默 REG γ 的 AROshR 及 WROshR 细胞的 NIS、TSHR、TPO、Tg mRNA 表达均提高, 其中在 AROshR 细胞中分别为 AROshN 细胞中的 2.82、1.98、2.65 和 2.31 倍, 在 WROshR 细胞中分别为 WROshN 细胞中的 2.21、1.78、2.51 和 1.78 倍, 与未沉默组相比差异均有统计学意义 (*t* 值: 13.80~21.93, 均 *P* < 0.05)。结论 沉默 REG γ 可使甲状腺癌细胞摄碘相关特异蛋白上调表达, 从而提高未分化型甲状腺癌细胞的摄碘能力。

【关键词】 甲状腺肿瘤; 肿瘤细胞, 培养的; 蛋白酶体内肽酶复合物; 基因沉默; 碘放射性同位素
DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2019.02.009

Influence of proteasome activator γ on iodine uptake capability of anaplastic thyroid carcinoma

Qi Long, He Wei

Department of Nuclear Medicine, Huadong Hospital of Fudan University, Shanghai 200040, China

Corresponding author: He Wei, Email: heweixu@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the changes of iodine uptake capability (IUC) and mRNA expression of iodine uptake-related proteins in ARO and WRO thyroid carcinoma cell lines after silence of proteasome activator γ (REG γ), and observe the relation between REG γ and IUC of thyroid carcinoma. **Methods** The AROshN, AROshR, WROshN and WROshR (shN = blank plasmid, shR = plasmid with silence of REG γ) thyroid carcinoma cell lines were routinely cultured. Low dosage (3.7 kBq) of Na¹²⁵I was added and then IUC was determined at different time points (5, 10, 15, 20, 40 and 70 min). The mRNA expressions of sodium/iodine symporter (NIS), thyroid stimulating hormone receptor (TSHR), thyroid peroxidase (TPO) and thyroglobulin (Tg) were examined by real-time PCR. Paired *t* test was used to analyze the data. **Results** After the silence of REG γ , the peak values of IUC in AROshR and WROshR cells were increased from (1 974±12) to (4 502±23) counts/min, and from (2 988±25) to (5 001±16) counts/min, respectively. The increase rates were 128.1% in AROshR cells and 67.4% in WROshR cells (*t* values: 17.30, 13.20, both *P* < 0.05). The mRNA expressions of NIS, TSHR, TPO, Tg in AROshR cells were 2.82, 1.98, 2.65 and 2.31 times higher than those in AROshN cells, and the expressions in WROshR cells were 2.21, 1.78, 2.51 and 1.78 times higher than those in WROshN cells (*t* values: 13.80~21.93, all *P* < 0.05). **Conclusion** Silence of REG γ can increase the gene expressions of the iodine uptake-related proteins and elevate the IUC of thyroid carcinoma cells.

【Key words】 Thyroid neoplasms; Tumor cells, cultured; Proteasome endopeptidase complex; Gene silencing; Iodine radioisotopes

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2019.02.009

甲状腺癌是最常见的内分泌系统恶性肿瘤, 其病死率在内分泌系统肿瘤中居第 1 位, 且近年来发病率呈持续上升趋势^[1]。目前研究认为, 甲状腺癌

的发生是由一系列遗传学及表观学的改变引起, 其中最常见遗传学改变包括: 鼠类肉瘤滤过性毒菌致癌同源体 B1 (V-raf murine sarcoma viral oncogene

homolog B1, BRAF)、受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RET)/甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)、大鼠肉瘤(rat sarcoma, RAS)、配对盒转录因子 8(paired box transcription factor 8, PAX8)-过氧化物酶体增生激活受体 γ (peroxisome proliferative activated receptor gamma, PPARC)等癌基因及 p53、磷酸酶及张力蛋白同源基因(phosphatase and tension protein homologous genes, PTEN)等抑癌基因的突变^[2]。甲状腺癌分为分化型和未分化型 2 种,其中,未分化甲状腺癌(anaplastic thyroid carcinoma, ATC)占甲状腺癌的 1.0%~7.5%,由于 ATC 摄碘能力极低,治疗手段十分有限,因而 5 年生存率低于 10%^[3]。Kebebew 等^[4]报道 ATC 患者 6 个月死亡率为 68.4%,12 个月死亡率为 80.7%。提高 ATC 的摄碘能力,对临床治疗 ATC 具有重要意义。最近有实验表明,蛋白酶体激活因子 γ (proteasome activators γ , REG γ)可通过促进小鼠双微体(murine double minute 2, MDM2)介导的 p53 蛋白泛素化途径使 p53 蛋白水平降低^[5]。根据前期研究,本研究通过沉默 REG γ 前后甲状腺癌 ARO 及 WRO 细胞株¹²⁵I 照射后的摄碘率及与摄碘相关蛋白 mRNA 的改变,探讨 REG γ 对 ATC 细胞摄碘功能的影响。

材料与方法

1.主要试剂。胎牛血清、细胞培养液 1640、青霉素-链霉素及胰蛋白酶均购自美国 Gibco 公司。Trizol(美国 Invitrogen 公司),反转录及 PCR 试剂盒(加拿大 Fermentas 公司),Sybgreen I real-time PCR 试剂盒(日本 Toyobo 公司)。¹²⁵I 购自中国科学院原子能研究所。

2.细胞株及其培养。甲状腺癌细胞 AROshN、AROshR、WROshN 及 WROshR 由华东师范大学李晓涛实验室惠赠,其中 shN 为空白质粒、shR 为沉默 REG γ 质粒,上述细胞均经稳定转染得到^[6]。以 5×10^4 /ml 浓度将细胞接种于 25 cm² 培养瓶内,用含体积分数 10%胎牛血清、质量分数 1%青霉素-链霉素的 RPMI-1640 培养液培养细胞,置于 37 °C、含体积分数 5% CO₂ 的培养箱中。接种次日更换培养液,以后隔日更换含培养液 1 次,每天观察细胞生长情况。

3.细胞摄碘率的测定。取对数生长期细胞,以 5×10^4 /ml 浓度接种于 24 孔培养板,培养 12 h 后,每孔加入 3.7 kBq Na¹²⁵I,分别在培养 5、10、15、20、40 和 70 min 后测细胞摄碘率。

摄碘实验参照 Weiss 等^[7]提出的方法进行:将

培养细胞以 5×10^4 /ml 的浓度接种于 24 孔培养板,培养 24 h 后,吸掉培养液,用 Hank's 平衡盐溶液(Hank's balanced salt solution, HBSS)洗 2 次,加入 1 μ l 含 3.7 kBq Na¹²⁵I 和 1 μ mol/L 的 NaI 的 HBSS,培养 20 min,用冰冷的 HBSS 洗 3 次,加入 1 ml 冰冷的无水乙醇,20 min 后吸取无水乙醇置试管中,通过 γ 计数器测定其放射性计数。

4.总 RNA 的提取、反转录及实时荧光 PCR。按照 Trizol 说明书提取细胞总 RNA,分别取 1 μ l 总 RNA 用 RevertAidTM 反转录试剂盒进行反转录,用 Sybgreen 试剂盒、实时荧光 PCR 仪 LightCycler(瑞士 Roche 公司)进行扩增。引物序列如下:(1) β -肌动蛋白(β -actin)上游引物 5'-CCTTGACGACGTATGTGAC-3',下游引物 5'-CGTGAAGCACCTTACC-3';(2)钠/碘转运体(sodium/iodide symporter, NIS)上游引物 5'-GACAAACCTCTGAGGACAGGG-3',下游引物 5'-ATACTGGGGACGGTTGAAGC-3';(3)促甲状腺激素受体(thyroid stimulating hormone receptor, TSHR)上游引物 5'-TCATTTGACATAGCAGAAAC-3',下游引物 5'-TAATAGTGACCAAGTTCTGA-3';(4)甲状腺过氧化物酶(thyroid peroxidase, TPO)上游引物 5'-ACACAGGCAAATCGGAAATC-3',下游引物 5'-GCAATGTTTACAAGAAAAGGCC-3';(5)甲状腺球蛋白(thyroglobulin, Tg)上游引物 5'-GGGCATGTTACTGCATGTC-3',下游引物 5'-TTTGAACACAGGTCTGCCA-3'。扩增程序:95 °C,5 min;95 °C,5 s;退火温度(β -actin、NIS、TSHR、TPO、Tg)分别为 56、62、56、60、62 °C,25 s;72 °C,25 s,共 40 个循环。均进行溶解曲线分析,作为阳性控制。采用相对定量法进行数据处理:目的 mRNA 改变 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta\Delta Ct = (Ct_{各时间点目的基因} - Ct_{各时间点\beta-actin}) - (Ct_{对照组目的基因} - Ct_{对照组\beta-actin})$ 。

5.统计学处理。采用 SPSS 13.0 软件分析数据。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,沉默前后比较采用配对 *t* 检验,组间差异采用两样本 *t* 检验或单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1.沉默 REG γ 后细胞摄碘率测定结果。细胞摄碘曲线(图 1)显示,AROshR 及 WROshR 细胞摄碘值明显升高,其中 AROshR 提高最为显著,提高率为 128.1%,与 AROshN 相比差异有统计学意义[峰值(1 974 \pm 12)与(4 502 \pm 23)计数/min; $t = 17.30, P < 0.05$];WROshR 提高率为 67.4%,与 WROshN 相比差异有统

计学意义[峰值($2\ 988\pm 25$)与($5\ 001\pm 16$)计数/min; $t=13.20, P<0.05$], AROshN 与 WROshN 相比差异有统计学意义($t=15.40, P<0.05$), 但 AROshR 与 WROshR 相比差异无统计学意义($t=12.10, P>0.05$)。

2. 沉默 REG γ 前后 NIS、TSHR、TPO、Tg mRNA 水平的变化。实时荧光 PCR 检测结果显示, 沉默 REG γ 后 NIS、TSHR、TPO、Tg mRNA 水平呈上升趋势。AROshR 细胞中 NIS、TSHR、TPO、Tg mRNA 分别为 AROshN 细胞中的 2.82 倍($t=20.80, P<0.05$)、1.98 倍($t=14.23, P<0.05$)、2.65 倍($t=21.93, P<0.05$)和 2.31 倍($t=19.01, P<0.05$); WROshR 细胞中 NIS、TSHR、TPO、Tg mRNA 分别为 WROshN 细胞中的 2.21 倍($t=19.83, P<0.05$)、1.78 倍($t=13.80, P<0.05$)、2.51 倍($t=21.03, P<0.05$)和 1.78 倍($t=13.81, P<0.05$); AROshR 与 WROshR 细胞中 NIS、TSHR、TPO、Tg mRNA 差异无统计学意义(t 值: $-14.00\sim -9.00$, 均 $P>0.05$)。

讨 论

ATC 的低分化特性导致其摄碘能力非常低下, 不能接受常规的联合治疗, 系统治疗或化疗疗效亦不佳, 死亡率很高。目前对 ATC 尚缺乏有效的治疗

手段。研究表明, 部分分化型甲状腺癌呈进展性发展, 逐渐丧失摄碘能力, 最终发展为 ATC^[8-9]。大量研究证实, 与分化较好的甲状腺癌及正常甲状腺组织相比, 分化较差的甲状腺癌中的 NIS、TSHR 及 TPO 和 Tg 等的表达明显下降, 摄碘能力也明显下降^[10-13], 因此, 摄碘相关基因表达水平过低可能是 ATC 摄碘能力低下的直接原因。目前对 ATC 的研究, 很多学者通过将 NIS 基因或甲状腺转录因子-1、PAX8 等转染进分化较差的甲状腺癌细胞中, 并以此来上调甲状腺癌细胞的摄碘率, 由此产生了针对 NIS 的基因治疗^[11]; 也有学者用维甲酸、曲格列酮等多种药物诱导失分化的甲状腺癌细胞再摄碘^[10]。这些方法都是针对细胞内 NIS 表达的。

最近有实验表明, REG γ 可以通过促进 MDM2 介导的 p53 蛋白的泛素化途径使 p53 蛋白水平降低^[5, 14-17]; 还有研究报道, REG γ 在 ATC 中的表达明显高于分化型甲状腺癌^[18-19]。REG γ 在系统性红斑狼疮的患者血清中首次被发现, 是一种自身免疫性抗体的核内靶蛋白^[20]。该蛋白质属于 11S 蛋白酶激活因子家族或 REG 家族。已有研究证明, REG γ 敲除的小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF) 细胞凋亡水平明显高于对照组^[21]。

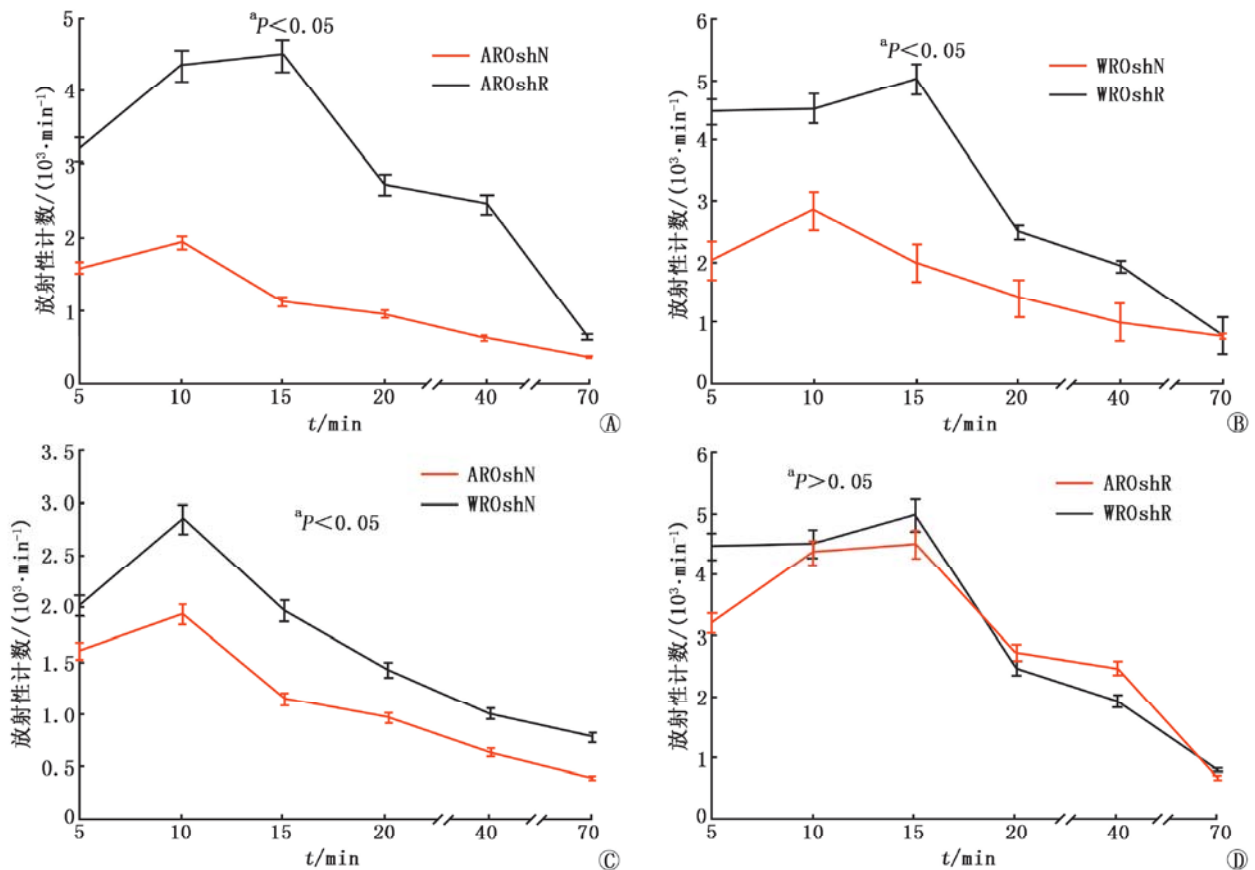


图 1 不同细胞的摄碘曲线(^a 曲线峰值比较)。A. ARO 细胞敲除蛋白酶体激活因子 γ (REG γ) 前后 (AROshN 与 AROshR) 的动态摄碘曲线; B. WRO 细胞敲除 REG γ 前后 (WROshN 与 WROshR) 的动态摄碘曲线; C. ARO 及 WRO 细胞敲除 REG γ 前的动态摄碘曲线; D. ARO 及 WRO 细胞敲除 REG γ 后的动态摄碘曲线

本研究通过体外培养沉默 REG γ 前后的甲状腺癌 ARO 及 WRO 细胞株、低剂量¹²⁵I 内照射下摄碘能力的变化及甲状腺细胞特异蛋白(NIS、TSHR、TPO、Tg)mRNA 水平变化,研究 REG γ 对甲状腺癌摄碘功能的影响。结果显示,沉默 REG γ 的 AROshR 及 WROshR 细胞与正常表达 REG γ 的 AROshN 及 WROshN 细胞相比,摄碘率明显提高。进一步研究发现,沉默 REG γ 后,甲状腺癌细胞特异蛋白 TSHR、NIS、TPO 和 Tg 在 mRNA 水平有明显上调,NIS 表达上调可以解释摄碘能力的提高;同时,也说明了沉默 REG γ 可以使 ARO 细胞出现分化,而沉默 REG γ 的 WRO 细胞摄碘能力的提高则进一步说明 REG γ 可以明显提高与摄碘相关基因的 mRNA 水平。

综上,通过体外沉默 REG γ 可以使甲状腺癌细胞摄碘能力及摄碘相关基因 mRNA 水平提高,说明 REG γ 对 ATC 细胞的分化程度有影响,但具体机制尚需进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

[1] Todaro M, Iovino F, Eterno V, et al. Tumorigenic and metastatic activity of human thyroid cancer stem cells[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(21): 8874-8885. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-10-1994.

[2] Mao I, Liu J, Li X, et al. REGgamma, a proteasome activator and beyond? [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(24): 3971-3980. DOI:10.1007/s00018-008-8291-z.

[3] 满国栋,王军.甲状腺髓样癌的手术治疗现状及进展[J]. *中国医学文摘-耳鼻咽喉科学*, 2016, 31(5): 269-271.
Man GD, Wang J. Current status and progress of surgical treatment of medullary thyroid carcinoma[J]. *Chin Med Dig: Otorhinolaryngol*, 2016, 31(5): 269-271.

[4] Kebebew E, Greenspan FS, Clark OH, et al. Anaplastic thyroid carcinoma. Treatment outcome and prognostic factors[J]. *Cancer*, 2005, 103(7): 1330-1335. DOI:10.1002/cncr.20936.

[5] Zhang Z, Zhang R. Proteasome activator PA28 gamma regulates p53 by enhancing its MDM2-mediated degradation[J]. *EMBO J*, 2008, 27(6): 852-864. DOI:10.1038/emboj.2008.25.

[6] Ali A, Wang Z, Fu J, et al. Differential regulation of the REG γ -proteasome pathway by p53/TGF- β signalling and mutant p53 in cancer cells[J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2667. DOI:10.1038/ncomms3667.

[7] Weiss SJ, Philp NJ, Grollman EF. Iodide transport in a continuous line of cultured cells from rat thyroid[J]. *Endocrinology*, 1984, 114(4): 1090-1098. DOI:10.1210/endo-114-4-1090.

[8] Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, et al. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88(11): 5399-5404. DOI: 10.1210/jc.2003-030838.

[9] Quiros RM, Ding HG, Gattuso P, et al. Evidence that one subset of anaplastic thyroid carcinomas are derived from papillary carcinomas due to BRAF and p53 mutations [J]. *Cancer*, 2005, 103(11): 2261-2268. DOI:10.1002/cncr.21073.

[10] Matsumoto H, Sakamoto A, Fujiwara M, et al. Decreased expression of the thyroid-stimulating hormone receptor in poorly-differentiated carcinoma of the thyroid [J]. *Oncol Rep*, 2008, 19(6): 1405-1411. DOI:10.3892/or.19.6.1405.

[11] Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P. A perspective view of sodium iodide symporter research and its clinical implications [J]. *Eur J Endocrinol*, 2006, 155(4): 495-512. DOI:10.1530/eje.1.02257.

[12] Siklar Z, Ocal G, Berberoğlu M, et al. Importance of thyroglobulin levels for diagnosis and monitoring of follicular thyroid carcinoma in an adolescent with severe iodine deficiency [J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2006, 19(9): 1175-1178. DOI:10.1515/JPEM.2006.19.9.1175.

[13] Harish K. Thyroglobulin: current status in differentiated thyroid carcinoma (review) [J]. *Endocr Regul*, 2006, 40(2): 53-67.

[14] 章培,陈季武,涂媛,等. REG γ 与人类多种癌症发生的相关性 [J]. *四川医学*, 2014, 35(10): 1276-1278.
Zhang P, Chen JW, Tu Y, et al. The expression of REG γ in cancer [J]. *Sichuan Med J*, 2014, 35(10): 1276-1278.

[15] 亓龙,左娣,王辉,等. REG γ , p53, NOTCH1 和 BRAF 在甲状腺癌中的表达及其临床意义 [J]. *华东师范大学学报(自然科学版)*, 2012(6): 89-95. DOI:10.3969/j.issn.1000-5641.2012.06.010.
Qi L, Zuo D, Wang H, et al. Expression of REG γ , p53, NOTCH1 and BRAF gene in thyroid cancer and their clinical relevance [J]. *J East China Norm Univ: Natural Sci*, 2012(6): 89-95. DOI:10.3969/j.issn.1000-5641.2012.06.010.

[16] Zhang Z, Zhang R. Proteasome activator PA28 gamma regulates p53 by enhancing its MDM2-mediated degradation [J]. *EMBO J*, 2008, 27(6): 852-864. DOI:10.1038/emboj.2008.25.

[17] 张矛,任国胜,甘露. REG γ 基因沉默对甲状腺髓样癌细胞凋亡的影响 [J]. *中国肿瘤临床*, 2009, 36(2): 87-91. DOI:10.3969/j.issn.1000-8179.2009.02.008.
Zhang M, Ren GS, Gan L. The effects of knocking down REG γ gene on apoptosis in medullary thyroid carcinoma cells [J]. *Chin J Clin Oncol*, 2009, 36(2): 87-91. DOI: 10.3969/j.issn.1000-8179.2009.02.008.

[18] Okamura T, Taniguchi S, Ohkura T, et al. Abnormally high expression of proteasome activator-gamma in thyroid neoplasm [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88(3): 1374-1383. DOI:10.1210/jc.2002-021413.

[19] Zhang M, Gan L, Ren GS. REG γ is a strong candidate for the regulation of cell cycle, proliferation and the invasion by poorly differentiated thyroid carcinoma cells [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2012, 45(5): 459-465. DOI:10.1590/S0100-879X2012007500035.

[20] Mao I, Liu J, Li X, et al. REGgamma, a proteasome activator and beyond? [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(24): 3971-3980. DOI:10.1007/s00018-008-8291-z.

[21] Li X, Amazit L, Long W, et al. Ubiquitin- and ATP-independent proteolytic turnover of p21 by the REGgamma-proteasome pathway [J]. *Mol Cell*, 2007, 26(6): 831-842. DOI:10.1016/j.molcel.2007.05.028.

(收稿日期:2018-08-18)