

· 甲状腺癌靶向治疗 ·

甲状腺素通过 ERK1/2 通路促进整合素 $\alpha_v\beta_3$ 阳性分化型甲状腺癌进展的研究

梁一倩 贾茜 王源波 李慧婕 杨艺员 张月敏 许惠 杨爱民 高蕊

西安交通大学第一附属医院核医学科, 西安 710061

通信作者: 高蕊, Email: jacky_mg@xjtu.edu.cn

【摘要】 目的 探讨甲状腺素(T_4)能否通过整合素 $\alpha_v\beta_3$ 影响分化型甲状腺癌(DTC)细胞增殖、转移潜能及其分子机制。方法 体外培养甲状腺乳头状癌 TPC-1、K1 及甲状腺滤泡状癌(FTC)133 细胞株,采用免疫荧光和流式细胞术分析细胞表面整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的表达水平。给予 T_4 、四碘甲状腺乙酸(Tetrac)、精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)多肽单独或联合处理 DTC 细胞后,应用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法及 Transwell 小室迁移和侵袭实验检测细胞增殖和转移潜能的变化。通过小干扰 RNA(siRNA)转染模型验证整合素 α_v 或 β_3 亚基沉默能否逆转 T_4 对 DTC 细胞的作用。利用 Western blot 法检测下游信号蛋白磷酸化细胞外信号调节激酶(p-ERK)1/2、总细胞外信号调节激酶(ERK)1/2 的表达水平。应用丝裂原活化蛋白激酶的激酶(MEK)1/2 的抑制剂 GSK1120212 阻断 ERK1/2 磷酸化,检测其对 T_4 处理细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Tukey 法。结果 TPC-1、K1 和 FTC133 细胞整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达均呈阳性,相对平均荧光强度(MFI)分别为 61.93 ± 18.61 、 16.89 ± 2.43 和 32.36 ± 0.83 ,阳性细胞百分比分别为 $(94.38\pm 1.30)\%$ 、 $(74.11\pm 3.87)\%$ 和 $(50.67\pm 1.78)\%$ (F 值:13.36 和 217.30, P 值:0.006 和 <0.001)。 T_4 组 TPC-1、K1 和 FTC133 细胞的增殖、迁移和侵袭能力较对照组明显增强(96 h, F 值:62.67~297.50, q 值:13.15~20.73,均 $P<0.001$); T_4 +Tetrac 和 T_4 +RGD 多肽处理组 DTC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力较 T_4 组明显减低(96 h, q 值:8.61~17.54,均 $P<0.001$)。利用 siRNA 敲减整合素 α_v 或 β_3 亚基可明显抑制 T_4 对 3 种 DTC 细胞的促增殖、迁移和侵袭作用(72 h, F 值:7.75~70.98, q 值:4.77~15.21,均 $P<0.05$)。Western blot 结果显示, T_4 处理导致 DTC 细胞 ERK1/2 磷酸化水平明显升高,且 T_4 诱导的 ERK1/2 信号通路激活可被 Tetrac、RGD 多肽、整合素 α_v 或 β_3 亚基敲减所阻断。GSK1120212 可以明显逆转 T_4 诱导的细胞增殖、迁移和侵袭(96 h, F 值:47.53~151.40, q 值:10.32~16.65,均 $P<0.001$)。结论 T_4 通过与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 结合,激活 ERK1/2 通路促进 DTC 细胞的增殖和转移能力。

【关键词】 甲状腺肿瘤;整合素 $\alpha_v\beta_3$;甲状腺素;细胞外信号调节 MAP 激酶类;RNA,小分子干扰
基金项目:国家自然科学基金(81902322);陕西省自然科学基金基础研究计划(2020JQ-526)

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20230504-00119

Thyroxine promotes the progression of integrin $\alpha_v\beta_3$ -positive differentiated thyroid cancer through the ERK1/2 pathway

Liang Yiqian, Jia Xi, Wang Yuanbo, Li Huijie, Yang Yiyuan, Zhang Yuemin, Xu Hui, Yang Aimin, Gao Rui
Department of Nuclear Medicine, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

Corresponding author: Gao Rui, Email: jacky_mg@xjtu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To explore whether thyroxine (T_4) could promote differentiated thyroid cancer (DTC) progression by binding to integrin $\alpha_v\beta_3$ *in vitro* and its downstream mechanism. **Methods** Papillary thyroid cancer cell lines TPC-1, K1 and follicular thyroid cancer (FTC) cell line FTC133 were cultured *in vitro*, and the expressions of integrin $\alpha_v\beta_3$ in those 3 DTC cell lines were determined with immunofluorescence and flow cytometry analysis. After the treatment of T_4 , tetraiodo thyroacetic acid (Tetrac) and Arg-Gly-Asp (RGD) peptide alone or in combination, the proliferation and metastatic potential of DTC cell lines were detected by cell counting kit-8 (CCK-8), Transwell migration and invasion assays. The small interfering RNA (siRNA) transfection was used to verify whether integrin α_v or β_3 subunit knockdown could reverse the effect of T_4 on DTC cells. The expression levels of downstream signaling proteins phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (p-ERK)1/2 and total extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 were detected by Western blot. The effects of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)1/2 inhibitor (GSK1120212) on the proliferation, migration and invasion of T_4 -treated cells were detected. One-way analy-

sis of variance and Tukey test were used for data analysis. **Results** The integrin $\alpha_v\beta_3$ expressions in TPC-1, K1 and FTC133 cells were all positive, with the relative mean fluorescence intensity (MFI) of 61.93 ± 18.61 , 16.89 ± 2.43 and 32.36 ± 0.83 , and the percentages of positive cells of $(94.38 \pm 1.30)\%$, $(74.11 \pm 3.87)\%$ and $(50.67 \pm 1.78)\%$, respectively (F values: 13.36 and 217.30, $P=0.006$ and $P<0.001$). Compared with control group, the proliferation, migration and invasion in the three DTC cell lines treated with T_4 were significantly enhanced (96 h, F values: 62.67–297.50, q values: 13.15–20.73, all $P<0.001$). T_4 -induced cell proliferation, migration and invasion were markedly reversed by Tetrac or RGD (96 h, q values: 8.61–17.54, all $P<0.001$). T_4 -induced cell proliferation, migration and invasion were also significantly inhibited by the knockdown of integrin α_v or β_3 subunit (72 h, F values: 7.75–70.98, q values: 4.77–15.21, all $P<0.05$). Western blot results showed that the phosphorylation levels of ERK1/2 in DTC cells were significantly increased by T_4 treatment, and the T_4 -induced activation of ERK1/2 signaling pathway could be blocked by Tetrac, RGD, integrin α_v or β_3 subunit knockdown. T_4 -induced cell proliferation, migration and invasion were significantly reversed by GSK1120212 (96 h, F values: 47.53–151.40, q values: 10.32–16.65, all $P<0.001$). **Conclusion** T_4 can promote cell proliferation and metastasis of DTC cells by binding to integrin $\alpha_v\beta_3$ and activating the ERK1/2 pathway.

【Key words】 Thyroid neoplasms; Integrin $\alpha_v\beta_3$; Thyroxine; Extracellular signal-regulated MAP kinases; RNA, small interfering

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81902322); Natural Science Basic Research Program of Shaanxi Province (2020JQ-526)

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20230504-00119

通过服用外源性甲状腺素 (thyroxine, T_4) 抑制血清促甲状腺激素 (thyroid stimulating hormone, TSH) 水平以减少肿瘤复发,是目前分化型甲状腺癌 (differentiated thyroid cancer, DTC) 综合治疗的重要环节。但近年研究表明,超量 T_4 使得更低的 TSH 未能有效抑制肿瘤复发^[1]。一些 DTC 的生长不依赖于 TSH,即使将 TSH 抑制到很低的水平,仍很难延缓此类患者的病情发展^[2],这提示对 DTC 可能应制定个体化的 TSH 抑制治疗方案。整合素 $\alpha_v\beta_3$ 是 1 种异二聚体跨膜受体,在多种肿瘤细胞高表达,对肿瘤血管生成、侵袭和转移起着重要作用^[3],其与高危 DTC 患者预后不良密切相关^[4]。近期研究显示, T_4 可通过 T_4 - $\alpha_v\beta_3$ 复合物激活细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 1/2 信号通路,导致肿瘤进展^[5]。本研究通过体外实验探究 T_4 能否通过整合素 $\alpha_v\beta_3$ 促进 DTC 进展,并探索其相关机制。

材料与方 法

1. 主要试剂和药物。胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自上海吉泰依科赛生物科技公司。活性炭吸附 FBS 购自以色列 Biological Industries-Beit Haemek 公司。细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司。 T_4 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。四碘甲状腺乙酸 (tetraiodothyroacetic acid, Tetrac) 购自上海源叶生物科技公司。精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (Arg-Gly-Asp, RGD) 多肽和 GSK1120212 购自美国 SelleckChem 公司。Matrigel 基质胶购自美国 Corning

公司。蛋白酶抑制剂购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

2. 细胞培养及整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达水平测定。甲状腺乳头状癌 (papillary thyroid cancer, PTC) 细胞株 TPC-1 和 K1、甲状腺滤泡状癌 (follicular thyroid cancer, FTC) 细胞株 FTC133 分别培养于含体积分数 1% 青霉素/链霉素、10% FBS 的 DMEM/F-12 或 RPMI 1640 培养基中。在 T_4 处理实验中, DTC 细胞培养使用体积分数 10% 活性炭吸附的 FBS。行免疫荧光实验检测整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在 TPC-1、K1 和 FTC133 细胞表面的表达和分布;行流式细胞术实验定量分析其在 3 种 DTC 细胞表面的表达水平。

3. T_4 对 DTC 细胞增殖、迁移和侵袭的影响分析。分别将 TPC-1、K1 和 FTC133 细胞分为以下组别:对照组、 T_4 ($1 \mu\text{mol/L}$) 组、Tetrac (100 nmol/L) 组、RGD (50 nmol/L) 组、 T_4 +Tetrac 组、 T_4 +RGD 组。(1) 增殖实验。在 96 孔板接种细胞, FTC133 细胞的接种密度为 2×10^3 个细胞/孔, TPC-1 和 K1 细胞的接种密度为 800 个细胞/孔。37 °C 培养过夜贴壁。分别处理 0、24、48、72、96 h 后,每孔加入 $10 \mu\text{l}$ CCK-8 溶液,37 °C 温育 2 h。采用 FlexStation 3 酶标仪测定各孔 450 nm 处的吸光度 (A), 计算细胞增殖率。细胞增殖率 = $A_{\text{实验组}} / A_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。实验重复 3 次。(2) 迁移和侵袭实验。采用 1 mg/ml Matrigel 基质胶覆盖 Transwell 小室底部进行侵袭实验^[6]。上述组别处理细胞 24 h 后,消化收集细胞,重悬于无血清的培养基。在 24 孔板中加入含体积分数 10% FBS 的培养基,放入 Transwell 小室,在上室接入 6×10^4 个细胞。培养箱中温育 24 h 后,体积分数 70% 冰乙醇固定细胞并用质量分数 0.5% 结晶紫染色。

在光学显微镜下对不同组小室进行拍照观察。

4. 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 敲减对 T_4 发挥作用影响的探讨。(1) siRNA 转染。按说明使用 Invitrogen Lipofecta mine 2000 试剂进行 α_v siRNA、 β_3 siRNA 或阴性对照 (negative control, NC) siRNA 转染 DTC 细胞。其序列是 si- α_v (正义: 5'-GCAGGUCUCAGUGUCUCUATT-3', 反义: 5'-UAGAGACACUGAGACCUGCTT-3') 和 si- β_3 (正义: 5'-GUGACCAUACAUGUAUATT-3', 反义: 5'-UAUACAUGUAUGGUGACACTT-3')。(2) siRNA 敲减后的影响。分析 NC siRNA 组、NC siRNA+ T_4 (1 $\mu\text{mol/L}$) 组、 α_v siRNA+ T_4 组、 β_3 siRNA+ T_4 组的 DTC 细胞增殖、迁移和侵袭情况。

5. ERK1/2 信号通路的探讨。ERK1/2 是将细胞外信号传递到细胞核的重要环节, ERK1/2 磷酸化后才能发挥生物学效应。(1) 磷酸化 ERK (phospho-ERK, p-ERK) 1/2 蛋白水平测定。行 Western blot, 检测对照组、 T_4 组、 T_4 +Tetrac 和 T_4 +RGD 组的 p-ERK1/2 和总 ERK1/2 蛋白水平; 另检测 α_v 或 β_3 亚基敲减后 NC siRNA 组、NC siRNA+ T_4 组、 α_v siRNA 组、 α_v siRNA+ T_4 组、 β_3 siRNA 组、 β_3 siRNA+ T_4 组的 p-ERK1/2 和总 ERK1/2 蛋白水平。(2) 阻断 ERK1/2 信号通路的影响。丝裂原活化蛋白激酶的激酶 (mitogen-activated protein kinase kinase, MEK) 1/2 是 ERK1/2 信号通路磷酸化的上游调节激酶。应用 MEK1/2 抑制剂 GSK1120212 阻断下游 ERK1/2 的磷酸化, 分析对照组、 T_4 (1 $\mu\text{mol/L}$) 组、 T_4 +GSK1120212 (10 nmol/L) 组的 DTC 细胞增殖、迁移和侵袭情况。

6. 统计学处理。采用 IBM SPSS 22.0 和 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计分析。符合正态分布的定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析比较多组样本间的统计学差异, 组间两两比较采用 Tukey 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 整合素 α_v 、 β_3 在 3 种 DTC 细胞表面的表达情况。TPC-1、K1 和 FTC133 细胞表面均表达整合素 α_v 、 β_3 , 但表达水平不同。三者整合素 α_v 、 β_3 表达的相对平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI) 分别为 61.93 ± 18.61 、 16.89 ± 2.43 和 32.36 ± 0.83 , 阳性细胞百分比为 $(94.38 \pm 1.30)\%$ 、 $(74.11 \pm 3.87)\%$ 和 $(50.67 \pm 1.78)\%$, 差异均有统计学意义 (F 值: 13.36 和 217.30, P 值: 0.006 和 < 0.001)。

2. T_4 通过与整合素 α_v 、 β_3 结合促进 DTC 细胞增

殖、迁移和侵袭。(1) 增殖实验结果。对照组、 T_4 组、Tetrac 组、RGD 组、 T_4 +Tetrac 组、 T_4 +RGD 组 3 种 DTC 细胞处理后 96 h, TPC-1 细胞增殖率分别为 $(100.00 \pm 1.90)\%$ 、 $(121.41 \pm 1.45)\%$ 、 $(69.95 \pm 2.26)\%$ 、 $(84.75 \pm 1.13)\%$ 、 $(107.92 \pm 2.55)\%$ 和 $(103.08 \pm 1.21)\%$, K1 细胞增殖率分别为 $(100.00 \pm 2.37)\%$ 、 $(118.22 \pm 2.31)\%$ 、 $(91.29 \pm 2.81)\%$ 、 $(88.09 \pm 1.12)\%$ 、 $(106.17 \pm 2.74)\%$ 、 $(104.62 \pm 2.38)\%$, FTC133 细胞增殖率分别为 $(100.00 \pm 1.42)\%$ 、 $(120.83 \pm 1.64)\%$ 、 $(87.37 \pm 1.06)\%$ 、 $(85.84 \pm 2.10)\%$ 、 $(107.18 \pm 2.58)\%$ 、 $(104.17 \pm 3.51)\%$ 。与对照组相比, T_4 组 TPC-1、K1 和 FTC133 细胞的增殖能力明显增强 (F 值: 297.50、62.67、114.50, q 值: 20.73、13.15、17.04, 均 $P < 0.001$); Tetrac 与 RGD 能够明显抑制 TPC-1、K1 和 FTC133 细胞增殖 (q 值: 6.45 ~ 28.38, 均 $P < 0.01$)。与 T_4 组相比, T_4 +Tetrac 组或 T_4 +RGD 组 TPC-1、K1 和 FTC133 细胞的增殖能力明显减弱 (q 值: 8.61 ~ 17.54, 均 $P < 0.001$)。(2) 迁移和侵袭实验结果 (图 1)。与对照组相比, T_4 处理后 TPC-1、K1 和 FTC133 细胞的迁移和侵袭能力明显增强; Tetrac 或 RGD 处理后 DTC 细胞迁移和侵袭能力明显减弱; 且 Tetrac 和 RGD 能明显逆转 T_4 对 DTC 细胞迁移和侵袭的促进作用。

3. siRNA 敲减整合素 α_v 或 β_3 亚基对 T_4 促 DTC 细胞增殖、迁移和侵袭作用的影响。(1) 增殖实验结果。NC siRNA 组、NC siRNA+ T_4 组、 α_v siRNA+ T_4 组、 β_3 siRNA+ T_4 组 3 种 DTC 细胞处理后 72 h, TPC-1 细胞增殖率分别为 $(100.00 \pm 1.74)\%$ 、 $(118.12 \pm 3.44)\%$ 、 $(108.16 \pm 2.97)\%$ 、 $(109.29 \pm 2.47)\%$, K1 细胞增殖率分别为 $(100.00 \pm 1.36)\%$ 、 $(114.79 \pm 1.14)\%$ 、 $(103.98 \pm 1.52)\%$ 、 $(106.02 \pm 0.77)\%$, FTC133 细胞增殖率分别为 $(100.00 \pm 1.38)\%$ 、 $(118.00 \pm 6.39)\%$ 、 $(100.80 \pm 5.79)\%$ 、 $(103.40 \pm 5.57)\%$ 。与 NC siRNA 组相比, 整合素 α_v 或 β_3 亚基敲减后, T_4 对 TPC-1、K1 和 FTC133 细胞增殖的促进作用明显减弱 (F 值: 21.20、70.98、7.75, q 值: 4.77 ~ 15.21, 均 $P < 0.05$)。(2) 迁移和侵袭实验结果 (图 2)。与 NC siRNA 组相比, T_4 对 α_v 或 β_3 亚基敲减的 TPC-1、K1 和 FTC133 细胞促迁移和侵袭能力明显降低。这些结果提示, T_4 通过整合素 α_v 、 β_3 实现对 DTC 细胞的增殖及转移能力的促进作用。

4. T_4 通过整合素 α_v 、 β_3 影响 ERK1/2 信号通路及促进 DTC 进展。(1) ERK1/2 蛋白水平测定。Western blot 结果见图 3。与对照组相比, T_4 组 TPC-1、

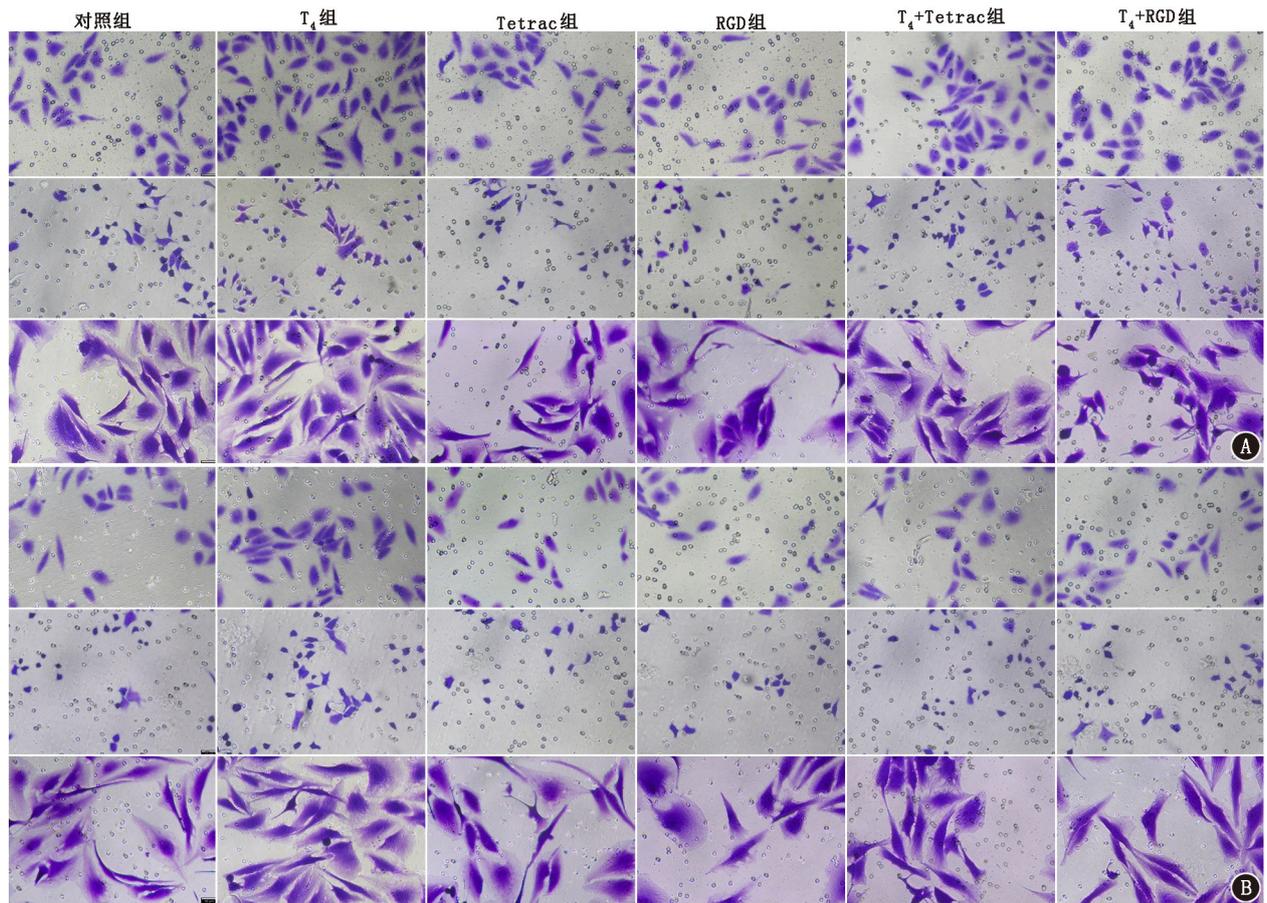


图 1 不同处理组甲状腺乳头状癌(PTC)细胞株 TPC-1(上)、K1(中)细胞和甲状腺滤泡状癌(FTC)细胞株 FTC133(下)细胞迁移(A)和侵袭(B)能力的 Transwell 实验结果(结晶紫染色 ×200)。RGD 为精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸, T₄ 为甲状腺素, Tetrac 为四碘甲状腺乙酸;可见 T₄ 组 TPC-1、K1 和 FTC133 细胞迁移和侵袭细胞数多于对照组, Tetrac 和 RGD 组 3 种细胞迁移和侵袭细胞数少于对照组, T₄+Tetrac 组和 T₄+RGD 组 3 种细胞迁移和侵袭细胞数少于 T₄ 组

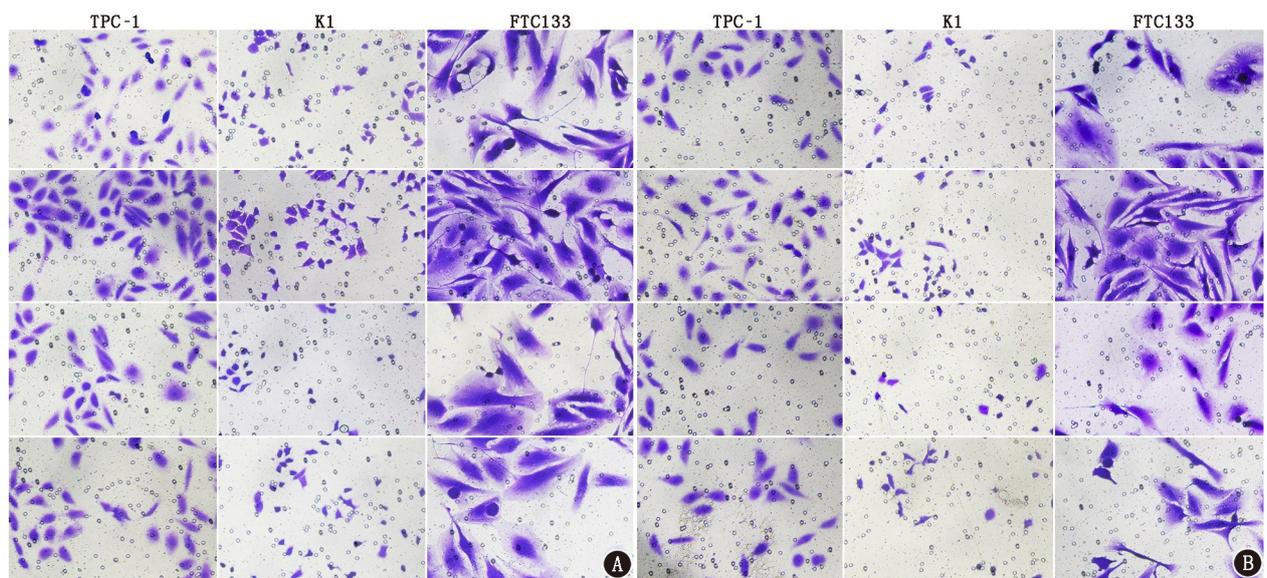


图 2 不同处理组 PTC 细胞株 TPC-1、K1 细胞和 FTC 细胞株 FTC133 细胞迁移(A)和侵袭(B)能力的 Transwell 实验结果(结晶紫染色 × 200)。每列图从上到下分别为阴性对照(NC)小干扰 RNA(siRNA)、NC siRNA+T₄、α_v siRNA+T₄、β₃ siRNA+T₄ 组;可见 α_v siRNA+T₄ 组和 β₃ siRNA+T₄ 组 TPC-1、K1 和 FTC133 细胞迁移和侵袭细胞数少于 NC siRNA+T₄ 组

K1 和 FTC133 细胞的总 ERK1/2 蛋白表达无明显差异,而 p-ERK1/2 蛋白水平明显升高;与 T₄ 组相比, T₄+Tetrac 和 T₄+RGD 组的 p-ERK1/2 蛋白水平明显降低。α_v 或 β₃ 亚基敲减后,与 NC siRNA+T₄ 组比较, α_v siRNA+T₄ 和 β₃ siRNA+T₄ 组 p-ERK1/2 蛋白水平明显降低。此外, T₄ 可以上调 TPC-1、K1 和 FTC133 细胞 α_v 和 β₃ 蛋白的表达。(2) GSK1120212 处理后的增殖、迁移和侵袭实验结果。对照组、T₄ 组、T₄+GSK1120212 组 3 种 DTC 细胞处理后 96 h, TPC-1 细胞增殖率分别为 (100.00±1.89)%、(120.30±1.26)%、(105.91±0.98)%、K1 细胞增殖率分别为 (100.00±

1.76)%、(119.03±2.39)%、(102.20±2.99)%、FTC133 细胞增殖率分别为 (100.00±1.42)%、(118.94±2.69)%、(104.08±2.96)%。与 T₄ 组相比, T₄+GSK1120212 组 TPC-1、K1 和 FTC133 细胞的增殖能力明显降低 (*F* 值:151.40、59.16、47.53, *q* 值:16.65、12.37、10.32, 均 *P*<0.001)。GSK1120212 明显抑制 T₄ 诱导的 TPC-1、K1 和 FTC133 细胞迁移和侵袭 (图 4)。以上结果表明, ERK1/2 的激活是 T₄ 诱导 DTC 细胞增殖、迁移和侵袭的必要条件。相关机制图见图 5。

讨 论

本研究表明,整合素 α_v、β₃ 在 PTC 细胞株 TPC-1、

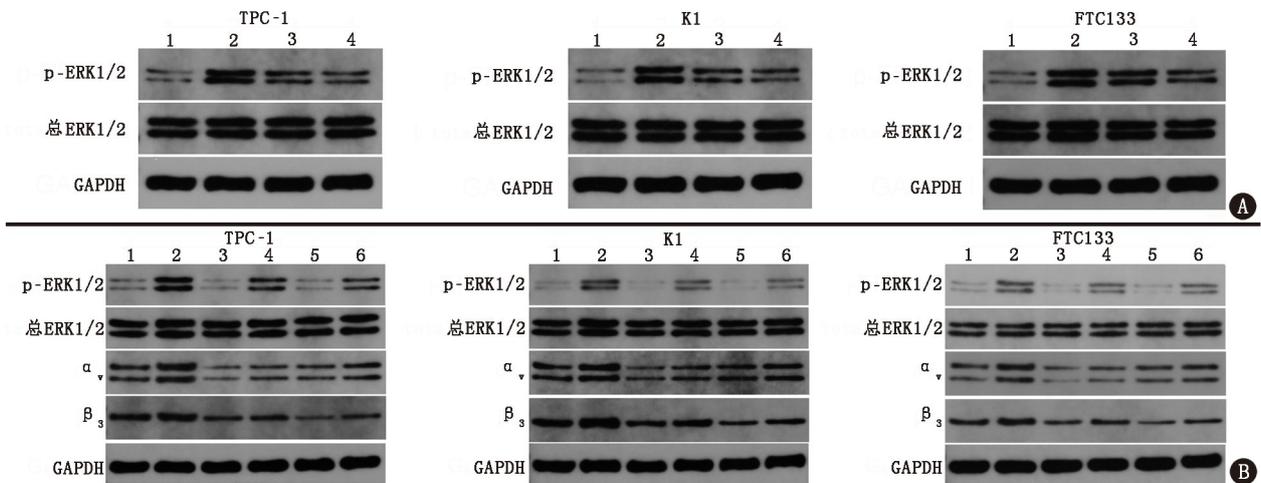


图 3 甲状腺素(T₄)通过整合素 α_v、β₃ 对不同类别分化型甲状腺癌(DTC)细胞磷酸化细胞外信号调节酶(p-ERK)1/2 表达影响的 Western blot 结果。A.泳道 1~4 分别为对照组、T₄ 组、T₄+四碘甲状腺乙酸(Tetrac)组、T₄+精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)组 p-ERK1/2 和总细胞外信号调节酶(ERK)1/2 的表达水平;可见 T₄ 组甲状腺乳头状癌(PTC)细胞株 TPC-1、K1 细胞和甲状腺滤泡状癌(FTC)细胞株 FTC133 细胞 p-ERK1/2 表达高于对照组, T₄+Tetrac 组与 T₄+RGD 组 3 种细胞 p-ERK1/2 表达低于 T₄ 组;B.泳道 1~6 分别为阴性对照(NC)小干扰 RNA(siRNA)组、NC siRNA+T₄ 组、α_v siRNA 组、α_v siRNA +T₄ 组、β₃ siRNA 组、β₃ siRNA+T₄ 组 p-ERK1/2、总 ERK1/2、α_v 和 β₃ 的表达水平;可见 α_v siRNA +T₄ 组和 β₃ siRNA +T₄ 组 TPC-1、K1 和 FTC133 细胞 p-ERK1/2 表达低于 NC siRNA +T₄ 组。GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶,是 Western blot 蛋白质标准化的内参

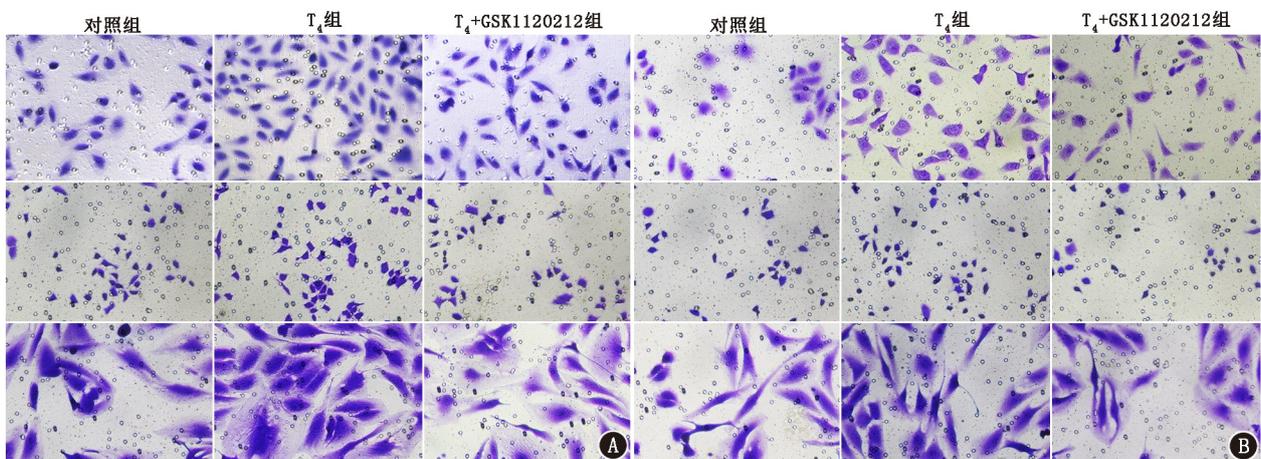


图 4 不同处理组 PTC 细胞株 TPC-1(上)、K1(中)细胞和 FTC 细胞株 FTC133(下)细胞迁移(A)和侵袭(B)能力的 Transwell 实验结果(结晶紫染色 ×200)。可见 T₄+GSK1120212 组 TPC-1、K1 和 FTC133 迁移和侵袭细胞数少于 T₄ 组

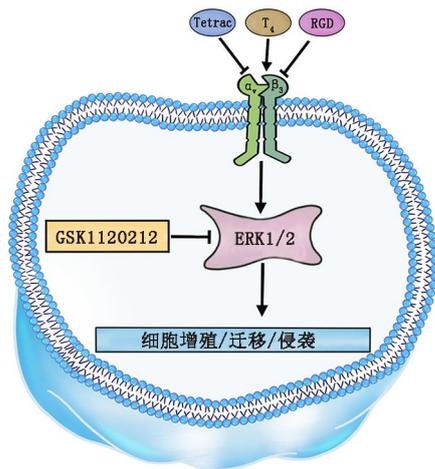


图5 甲状腺素(T_4)促进整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达阳性分化型甲状腺癌(DTC)细胞增殖及转移的机制图(采用Photoshop CS6软件绘制)。ERK1/2为细胞外信号调节激酶1/2,RGD为精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸,Tetrac为四碘甲状腺乙酸

K1和FTC细胞株FTC133均存在不同程度的表达, T_4 对TPC-1、K1、FTC133细胞的增殖、迁移和侵袭有促进作用。 T_4 的促肿瘤作用可被Tetrac或RGD多肽阻断,亦可通过敲减整合素 α_v 或 β_3 亚基所抑制。进一步的研究表明,整合素 $\alpha_v\beta_3$ 介导 T_4 激活ERK1/2信号通路,MEK1/2小分子抑制剂GSK1120212可有效阻断 T_4 对细胞增殖、迁移和侵袭的影响,提示整合素 $\alpha_v\beta_3$ 介导的 T_4 的促肿瘤作用依赖于ERK1/2通路的激活。

整合素是由 α 和 β 2个亚基组成的跨膜异二聚体蛋白,介导细胞间以及细胞和细胞外基质之间的相互作用^[7]。迄今已知有20余种整合素,其中整合素 $\alpha_v\beta_3$ 因其促血管生成和致瘤活性而成为肿瘤治疗领域的研究热点。Cheng等^[8]报道了PTC细胞株TPC-1和K1表达整合素 $\alpha_v\beta_3$ 。本课题组既往临床研究通过 $^{99}\text{Tc}^m$ -联肼尼克酰胺-3聚乙二醇-RGD环肽二聚体{hydrazinonicotinamide-(polyethylene glycol)₄-E[(polyethylene glycol)₄-c(RGDfk)]₂,3PRGD₂}显像发现高危DTC组织表达整合素 $\alpha_v\beta_3$,且其表达是高危DTC进展的独立预测因子^[4]。本研究进一步发现,DTC细胞表面的整合素 $\alpha_v\beta_3$ 介导 T_4 激活ERK1/2信号通路来发挥促肿瘤作用。Yalcin等^[9]发现 T_4 通过与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 结合来增强FTC细胞的在体肿瘤增殖和血管生成能力,与本研究结果一致。因此, T_4 通过与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 结合的促增殖和转移作用可能是TSH抑制治疗的DTC患者疾病进展的机制之一。

有基础研究表明,甲状腺激素可诱导肿瘤细胞

体外增殖,并有促进在体肿瘤生长和血管生成的作用^[10]。Klubo-Gwiedzinska等^[1]追踪了867例行甲状腺全切术和 ^{131}I 治疗后的中、高危DTC患者(中位随访时间7年),发现与接受TSH抑制治疗的患者相比,未接受TSH抑制治疗患者的3年总生存率更高。本研究结果也显示, T_4 有促进整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达阳性DTC细胞增殖及转移的作用。因此,TSH抑制治疗可能需要根据患者疾病的特点开展个体化评估。对于整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达阳性的DTC患者,可能应综合考量其甲状腺激素剂量。目前,已有多种基于RGD多肽的PET/CT或SPECT/CT显像剂应用于临床,如 ^{68}Ga -1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid, DOTA)-RGD₂^[11]、 $^{99}\text{Tc}^m$ -Galacto-RGD₂^[12]和 $^{99}\text{Tc}^m$ -3PRGD₂^[4],相关分子影像方法可能用于整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达阳性的识别,为DTC患者的个体化用药提供基础。但本研究结果还有待体内实验及大样本临床研究予以验证。

Tetrac和RGD多肽与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 结合后没有兴奋受体活性,但可以阻止 T_4 与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的结合。有研究表明,整合素 $\alpha_v\beta_3$ 与血管内皮生长因子受体和碱性成纤维细胞生长因子受体间存在串话,因此Tetrac和RGD多肽也可抑制这些受体配体引起的促肿瘤作用^[9]。本研究中,Tetrac和RGD多肽对整合素 $\alpha_v\beta_3$ 阳性DTC细胞的增殖、迁移和侵袭有明显的抑制作用,且能有效阻断 T_4 通过整合素 $\alpha_v\beta_3$ 诱导的促肿瘤效应和下游ERK1/2通路的激活。Schmohl等^[13]的在体研究显示,Tetrac能够抑制整合素 $\alpha_v\beta_3$ 阳性的甲状腺未分化癌细胞裸鼠异种移植瘤的生长、延长裸鼠生存时间。Tetrac可被细胞内化,并作用于细胞核内甲状腺激素受体发挥低水平的拟甲状腺素活性,且Tetrac在抑制血清TSH方面可能比 T_4 更有效,亦不会引起亚临床甲状腺功能亢进或心脏不良反应^[14]。Tetrac可能是TSH抑制治疗的理想替代药物,在DTC患者的辅助治疗中具有很大的应用前景。此外,用放射性核素标记RGD多肽(如 ^{177}Lu -DOTA-RGD₂)靶向整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的治疗已开始用于整合素 $\alpha_v\beta_3$ 显像阳性的放射性碘难治性DTC患者^[15],本研究的结果也为这一治疗提供了新的理论依据。

本研究存在一定的局限性。首先,上皮-间质转化是恶性肿瘤细胞获得迁移和侵袭能力的重要生物学过程,本研究尚未探讨上皮-间质转化在 T_4 -整合素 $\alpha_v\beta_3$ 轴促进DTC转移潜能中的作用。其次,本

研究仅开展了体外细胞实验,未来需要动物实验及临床研究进一步明确 T_4 对整合素 $\alpha_v\beta_3$ 阳性 DTC 的在体作用及其临床应用价值。第三,本研究发现 T_4 有上调整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达的作用,这与之前在慢性淋巴细胞白血病及骨髓瘤细胞中的研究一致^[16-17],但具体的调节机制还有待深入研究。

综上,本研究发现 DTC 细胞表面的整合素 $\alpha_v\beta_3$ 介导 T_4 的促增殖、迁移和侵袭作用,DTC 患者 TSH 抑制治疗的适应证可能需要通过基于 RGD 多肽的整合素 $\alpha_v\beta_3$ 分子影像重新评估。使用 Tetrac 或放射性标记的 RGD 多肽阻断整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的功能是很有前景的 DTC 治疗的临床转化方案。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 梁一倩:研究实施、数据采集与分析、统计学分析、论文撰写;贾茜:研究指导、数据分析与解释、统计学分析;王源波、李慧婕、杨艺员、张月敏、许惠:研究实施、数据采集;杨爱民:研究指导、论文修改;高蕊:研究设计与指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

- [1] Klubo-Gwiedzinska J, Auh S, Gershengorn M, et al. Association of thyrotropin suppression with survival outcomes in patients with intermediate- and high-risk differentiated thyroid cancer[J]. JAMA Netw Open, 2019, 2(2): e187754. DOI:10.1001/jamanetworkopen.2018.7754.
- [2] Zafón C. TSH-suppressive treatment in differentiated thyroid cancer. A dogma under review[J]. Endocrinol Nutr, 2012, 59(2): 125-130. DOI:10.1016/j.endonu.2011.10.002.
- [3] 赵海涛, 翟洛萍, 高瀚男, 等. 靶向整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的新型 isoDGR 多肽用于脑胶质瘤 SPECT/CT 显像[J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2017, 37(11): 689-693. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2017.11.004.
Zhao HT, Zhai LP, Gao HN, et al. A novel integrin $\alpha_v\beta_3$ -targeted isoDGR probe for SPECT/CT imaging of glioma[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2017, 37(11): 689-693. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2017.11.004.
- [4] Liang Y, Jia X, Wang Y, et al. Evaluation of integrin $\alpha_v\beta_3$ -targeted imaging for predicting disease progression in patients with high-risk differentiated thyroid cancer (using ^{99m}Tc -3PRGD₂) [J]. Cancer Imaging, 2022, 22(1): 72. DOI:10.1186/s40644-022-00511-0.
- [5] Bergh JJ, Lin HY, Lansing L, et al. Integrin $\alpha_v\beta_3$ contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis [J]. Endocrinology, 2005, 146(7): 2864-2871. DOI:10.1210/en.2005-0102.
- [6] Wang YH, Shen CY, Lin SC, et al. Monocytes secrete CXCL7 to promote breast cancer progression [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(12): 1090. DOI:10.1038/s41419-021-04231-4.
- [7] Barbakadze T, Natsvlshvili N, Mikeladze D. Thyroid hormones differentially regulate phosphorylation of ERK and Akt via integrin $\alpha_v\beta_3$ receptor in undifferentiated and differentiated PC-12 cells [J]. Cell Biochem Funct, 2014, 32(3): 282-286. DOI:10.1002/cbf.3013.
- [8] Cheng W, Feng F, Ma C, et al. The effect of antagonizing RGD-binding integrin activity in papillary thyroid cancer cell lines [J]. Onco Targets Ther, 2016, 9: 1415-1423. DOI:10.2147/OTT.S99166.
- [9] Yalcin M, Bharali DJ, Dyskin E, et al. Tetraiodothyroacetic acid and tetraiodothyroacetic acid nanoparticle effectively inhibit the growth of human follicular thyroid cell carcinoma [J]. Thyroid, 2010, 20(3): 281-286. DOI:10.1089/thy.2009.0249.
- [10] Lin YH, Lin KH, Yeh CT. Thyroid hormone in hepatocellular carcinoma: cancer risk, growth regulation, and anticancer drug resistance [J]. Front Med (Lausanne), 2020, 7: 174. DOI:10.3389/fmed.2020.00174.
- [11] Parihar AS, Mittal BR, Kumar R, et al. ^{68}Ga -DOTA-RGD₂ positron emission tomography/computed tomography in radioiodine refractory thyroid cancer: prospective comparison of diagnostic accuracy with ^{18}F -FDG positron emission tomography/computed tomography and evaluation toward potential theranostics [J]. Thyroid, 2020, 30(4): 557-567. DOI:10.1089/thy.2019.0450.
- [12] Xu Q, Liu R, Wang J, et al. Role of [^{99m}Tc]Tc-Galacto-RGD₂ SPECT/CT in identifying metastatic differentiated thyroid carcinoma after thyroidectomy and radioactive iodine therapy [J]. Nucl Med Biol, 2020, 88-89: 34-43. DOI:10.1016/j.nucmedbio.2020.06.006.
- [13] Schmohl KA, Han Y, Tutter M, et al. Integrin $\alpha_v\beta_3$ -dependent thyroid hormone effects on tumour proliferation and vascularisation [J]. Endocr Relat Cancer, 2020, 27(12): 685-697. DOI:10.1530/ERC-20-0353.
- [14] Brenta G, Danzi S, Klein I. Potential therapeutic applications of thyroid hormone analogs [J]. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2007, 3(9): 632-640. DOI:10.1038/ncpendmet0590.
- [15] Klubo-Gwiedzinska J, Chen X. Targeting integrins with radiolabeled RGD analogues for radiotheranostics of metastatic radioactive iodine nonresponsive thyroid cancer: new avenues in personalized medicine [J]. Thyroid, 2020, 30(4): 476-478. DOI:10.1089/thy.2020.0169.
- [16] Cohen K, Ellis M, Khoury S, et al. Thyroid hormone is a MAPK-dependent growth factor for human myeloma cells acting via $\alpha_v\beta_3$ integrin [J]. Mol Cancer Res, 2011, 9(10): 1385-1394. DOI:10.1158/1541-7786.MCR-11-0187.
- [17] Abadi U, Weisz A, Kidron D, et al. $\alpha_v\beta_3$ integrin expression and mitogenic effects by thyroid hormones in chronic lymphocytic leukemia [J]. J Clin Med, 2021, 10(8): 1766. DOI:10.3390/jcm10081766.

(收稿日期:2023-05-04)