

甲状腺激素促进肿瘤细胞增殖及血管新生信号通路的研究

郑楠 袁继红 刘欣 周晓丽 胡志梅 史亚男 李兰英

【摘要】 目的 探讨甲状腺激素促进肿瘤细胞增殖及血管新生的信号通路。**方法** 体外培养人胶质母细胞瘤细胞系(SNB19),给予甲状腺激素(主要为 T_4 , 100 nmol/L)、四碘甲状腺乙酸(tetraiodothyroacetic acid, Tetrac, 100 nmol/L)、蛋白激酶 C(PKC)抑制剂(2.5 μ mol/L)作用后,采用 Western 印迹方法检测磷酸化蛋白激酶 D1(PKD1)、磷酸化组蛋白去乙酰化酶(HDAC)5、磷酸化细胞外信号调节激酶(ERK)1/2 的表达,ELISA 方法检测细胞培养上清血管内皮生长因子(VEGF)的表达量,3-(4,5)-2-噻唑-(2,5)-二苯基溴化四氮唑蓝(MTT)比色法检测细胞增殖。**结果** 与对照组相比, T_4 干预组磷酸化 PKD1、磷酸化 HDAC5、磷酸化 ERK1/2 水平均增加(P 均 <0.05),Tetrac 干预组及 PKC 抑制剂干预组磷酸化 PKD1、磷酸化 HDAC5、磷酸化 ERK1/2 水平均降低(P 均 <0.05)。ELISA 结果显示,与对照组相比, T_4 干预组 VEGF 浓度升高 [(56.763 ± 2.611) ng/L vs. (36.597 ± 0.933) ng/L, $P < 0.05$],Tetrac+ T_4 干预组 VEGF 浓度降低 [(22.215 ± 1.531) ng/L vs. (36.597 ± 0.933) ng/L, $P < 0.05$]。MTT 结果显示,与对照组相比, T_4 干预组 OD 值较高 [(0.333 ± 0.020) vs. (0.243 ± 0.006) , $P < 0.05$],Tetrac 干预组 OD 值较低 [(0.060 ± 0.016) vs. (0.243 ± 0.006) , $P < 0.05$]。**结论** 甲状腺激素通过结合整合素 $\alpha v \beta 3$,激活 ERK1/2 信号通路促进肿瘤细胞增殖,激活 PKC/PKD1/HDAC5 信号通路促进血管新生。

【关键词】 甲状腺激素;血管内皮生长因子;整合素 $\alpha v \beta 3$;蛋白激酶 C;蛋白激酶 D1;组蛋白去乙酰化酶 5

Signaling pathway of thyroid hormone on the promotion of tumor cell proliferation and angiogenesis

Zheng Nan, Yuan Jihong, Liu Xin, Zhou Xiaoli, Hu Zhimei, Shi Yanan, Li Lanying. Key Laboratory of Hormones and Development, Ministry of Health, Institute of Endocrinology, The Metabolic Diseases Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Corresponding author: Li Lanying, Email: lily@tjmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the signaling pathway of proliferation and angiogenesis of tumor cells promoted by thyroid hormone. **Methods** Human glioblastoma cells(SNB19) were cultured with thyroid hormone (mainly T_4 , 100 nmol/L), tetraiodothyroacetic acid(Tetrac, 100 nmol/L) or protein kinase C (PKC) inhibitor (2.5 μ mol/L) *in vitro*. The expression of phosphorylated protein kinase D1(PKD1), phosphorylated histone deacetylase (HDAC)5 and phosphorylated extracellular regulated protein kinases(ERK)1/2 were detected by Western blots. The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in supernatant was measured by ELISA. The proliferation of SNB19 cells was detected by 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) colorimetric method. **Results** Compared with control group, phosphorylated PKD1, phosphorylated HDAC5 and phosphorylated ERK1/2 were all increased in T_4 group (all $P < 0.05$), and decreased in Tetrac+ T_4 group and PKC inhibitor group (all $P < 0.05$). The concentration of VEGF in T_4 group was enhanced [(56.763 ± 2.611) ng/L vs. (36.597 ± 0.933) ng/L, $P < 0.05$], while reduced in Tetrac+ T_4 group [(22.215 ± 1.531) ng/L vs. (36.597 ± 0.933) ng/L, $P < 0.05$], compared with control group. The results of MTT showed that compared with control group, the OD value of T_4 group was enhanced [(0.333 ± 0.020) vs. (0.243 ± 0.006) , $P < 0.05$], and reduced in Tetrac+ T_4 group [(0.060 ± 0.016) vs. (0.243 ± 0.006) , $P < 0.05$]. **Conclusion** Through binding to membrane integrin $\alpha v \beta 3$, thyroid hormone promotes the proliferation of tumor cells by activating the ERK1/2 signaling pathway, and promotes angiogenesis by activating the PKC/PKD1/HDAC5 signaling pathway.

【Key words】 Thyroid hormone; Vascular endothelial growth factor; Integrin $\alpha v \beta 3$; Protein kinase C; Protein kinase D1; Histone deacetylase 5

(Int J Endocrinol Metab, 2014, 34: 149-152)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2014.03.002

作者单位:300070 天津医科大学代谢病医院内分泌研究所,
卫生部激素与发育重点实验室

通信作者: 李兰英, Email: lily@tjmu.edu.cn

甲状腺激素对组织的生长、分化、新陈代谢以及生理活动有着重要的作用。多项临床研究显示,甲状腺功能亢进症或使用甲状腺激素可增加肿瘤的转移与复发风险,但其具体的机制尚不十分清楚。有研究表明甲状腺激素也可作用于细胞表面受体整合素 $\alpha v \beta 3$, 通过丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶(ERK)1/2 信号通路,促进人胶质母细胞瘤细胞表达增殖细胞核抗原,促进细胞增殖。笔者前期的研究表明甲状腺激素(T_4)可与血管内皮细胞膜表面的整合素 $\alpha v \beta 3$ 结合,通过蛋白激酶 C(PKC)/蛋白激酶 D1(PKD1)/组蛋白去乙酰化酶 5(HDAC5)信号转导通路促进血管新生。本研究以此为切入点探讨甲状腺激素(主要是 T_4)促进肿瘤细胞增殖及肿瘤血管新生的信号通路。

1 材料与方法

1.1 材料 细胞培养:人胶质母细胞瘤细胞系(SNB19)为本实验室留存,于 10%胎牛血清及 DMEM/F12 完全培养基,青霉素(1 000 U/ml)、链霉素(10 mg/ml),37℃、5%CO₂ 条件下培养。所用主要试剂:BCA 蛋白浓度试剂盒(北京博迈德科技发展有限公司),RIPA 裂解液(北京博迈德科技发展有限公司),磷酸化 HDAC5 (Ser498)/HDAC5 抗体、磷酸化 PKD1/PKD1 抗体、磷酸化 ERK1/2 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司),PKC 抑制剂购自美国 Santa Cruz 公司。GAPDH (杭州贤至生物科技有限公司),辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗购自美国 Invitrogen 公司,HRP 标记的山羊抗小鼠二抗购自美国 Santa Cruz 公司。ELISA 试剂盒购自美国 R&D 公司,四碘甲状腺乙酸(tetraiodothyroacetic acid, Tetrac)购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及处理条件 SNB19 细胞以 5×10^5 /ml 种植于 6 孔板,培养至 60%融合后,换用无血清 DMEM/F12 培养液继续培养 24 h,分别给予 T_4 、Tetrac 或 PKC 抑制剂进行干预。给予 PKC 抑制剂($2.5 \mu\text{mol/L}$)及 Tetrac(100 nmol/L)时需提前作用 30 min,再加入 T_4 (100 nmol/L),分别于作用 10 min、30 min 收集细胞,检测磷酸化 PKD1、HDAC5 及磷酸化 ERK1/2 水平。

1.2.2 Western 印迹法检测磷酸化 ERK、磷酸化 PKD1、磷酸化 HDAC5 的表达 收集上述处理后细胞,弃细胞培养上清,冰 PBS 洗涤 6 孔板,刮取细胞收集于 50 ml 离心管,1 000 rpm ($r = 6 \text{ cm}$) 离心 10 min,弃 PBS,将细胞沉淀转入 1.5 ml EP 管中,加入 RIPA 和 PMSF 混合裂解液,冰上裂解 10 min,4℃,12 000 g 离心 10 min,BCA 方法测定蛋白浓度,每孔上样量 25 μg ,

基层胶电压 60 V,待溴酚蓝进入分离胶后,调整电压至 120 V,待溴酚蓝至分离胶底,转膜仪半湿转膜,5%脱脂奶 37℃封闭 2 h,加入一抗(兔抗人磷酸化 PKD1/PKD1、磷酸化 HDAC5/HDAC5 和磷酸化 ERK1/2/ERK1/2, 1:2 000),4℃摇床过夜,TBST 洗膜 4 次,10 min/次,加入二抗(HRP 标记山羊抗兔 IgG, 1:2 000),37℃孵育 2 h,加入 ECL 发光液曝光显影。底片采用 Quantity One 软件进行图像分析,以目的蛋白与内参蛋白灰度值的比值表示蛋白的相对表达量。

1.2.3 ELISA 法检测细胞培养上清 VEGF 的表达 SNB19 常规传代后,以 5×10^4 /ml 接种于 96 孔板中,培养至 60%融合后,改用无血清细胞培养液培养 24 h,分别给予 T_4 (100 nmol/L)和 Tetrac (100 nmol/L)进行干预,每组设 3 个复孔,收集 72 h 细胞上清液,4℃离心机 3 000 rpm ($r = 6 \text{ cm}$) 离心 20 min,ELISA 采用双抗体夹心法,进行标准液体的稀释和加样,待测样本每孔 10 μl ,加 40 μl 稀释液,37℃孵育 30 min,弃上清,孔内液体干燥后 ELISA 盒子自带清洗液洗孔,30 s/次,洗 5 次。加入 HRP 结合液,每孔 50 μl ,37℃孵育 30 min,弃上清,待孔内液体干燥后使用清洗液洗孔,30 s/次,洗 5 次。每孔加入发光液 A、B 各 50 μl ,37℃避光 15 min,每孔加入 50 μl 反应终止液,在 450 nm 处以多功能酶标仪检测每孔 OD 值,将 OD 值代入四参数 Logistic 曲线拟合方程计算 VEGF 浓度。计算公式: $y = (A - D) / [1 + (x/C)^B] + D$ (A:曲线上渐近线估值, D:曲线下渐近线估值, B:曲线的斜率, C:最大结合一半时对应的剂量,通过标准孔的蛋白浓度和 OD 值绘出曲线计算出 A、B、C、D 的值)。

1.2.4 MTT 法检测 SNB19 细胞增殖 SNB19 常规传代后,以 5×10^4 /ml 每孔 150 μl 接种于 96 孔板中,培养至 60%融合后,换用无血清细胞培养液培养 24 h,添加 T_4 (100 nmol/L)、Tetrac (100 nmol/L)进行干预,每组设 3 个复孔,于 72 h 加入 MTT (10 g/L),每孔 15 μl ,37℃孵育 4 h,弃 MTT,每孔加入 DMSO 液 100 μl ,在 450 nm 处以多功能酶标仪检测每孔 OD 值。实验重复 3 次。

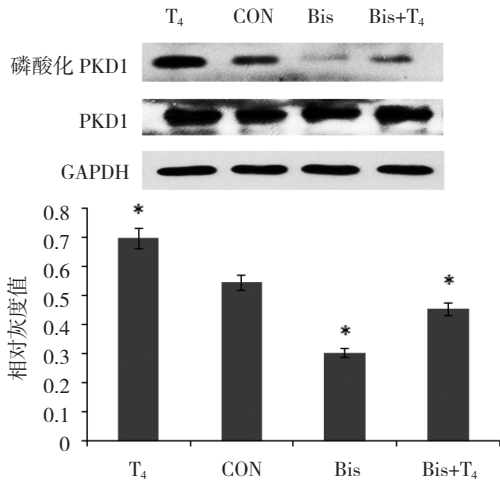
1.3 统计学处理 所有数据采用 SPSS13.0 统计学软件进行分析,计量数据以均数 \pm 标准差表示,多组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

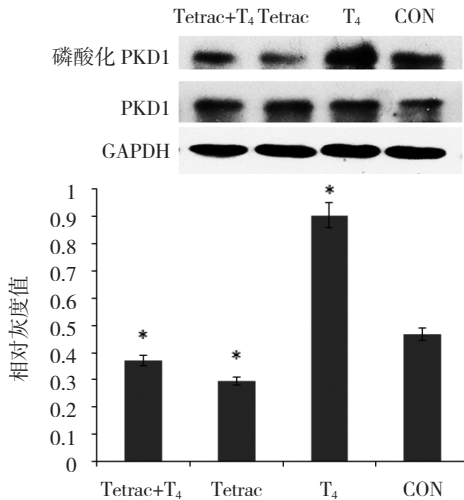
2.1 T_4 通过激活 PKC/PKD1/HDAC5 信号通路,促进 VEGF 表达

2.1.1 T_4 通过整合素 $\alpha v \beta 3$ /PKC 促进 PKD1 磷酸化

与对照组相比, T_4 干预组 PKD1 磷酸化水平增加 ($P < 0.05$), PKC 抑制剂 + T_4 干预组、Tetrac + T_4 干预组 PKD1 磷酸化水平降低 ($P < 0.05$), 见图 1, 图 2。



注:与对照组相比, * $P < 0.05$; Bis: PKC 抑制剂; PKD1: 蛋白激酶 D1
图 1 T_4 与 PKC 抑制剂对 SNB19 细胞 PKD1 磷酸化水平的影响



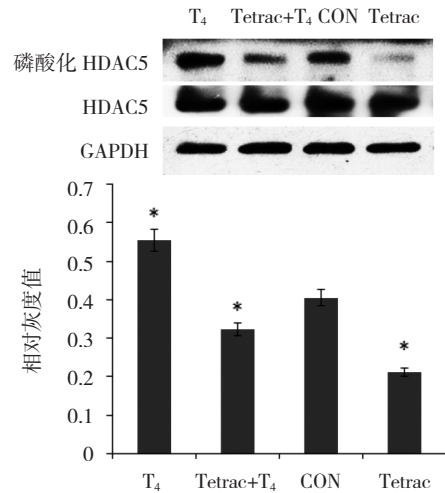
注:与对照组相比, * $P < 0.05$; PKD1: 蛋白激酶 D1
图 2 T_4 与 Tetrac 对 SNB19 细胞 PKD1 磷酸化水平的影响

2.1.2 T_4 促进 HDAC5 磷酸化 与对照组相比, T_4 干预组 HDAC5 磷酸化水平升高 ($P < 0.05$), Tetrac + T_4 干预组 HDAC5 磷酸化水平降低 ($P < 0.05$), 见图 3。

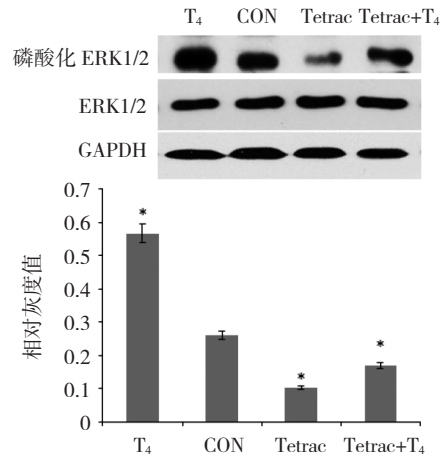
2.1.3 T_4 促进 SNB19 细胞 VEGF 表达 与对照组相比, T_4 干预组细胞培养上清 VEGF 浓度较高 [56.763 ± 2.611 ng/L vs. (36.597 ± 0.933) ng/L, $P < 0.05$], Tetrac 干预组 [16.223 ± 1.048 ng/L vs. (36.597 ± 0.933) ng/L, $P < 0.05$] 及 Tetrac + T_4 干预组细胞培养上清 VEGF 浓度较低 [22.215 ± 1.531 ng/L vs. (36.597 ± 0.933) ng/L, $P < 0.05$]。

2.2 T_4 激活 ERK1/2, 促进 SNB19 细胞增殖

2.2.1 T_4 通过结合整合素 $\alpha v \beta 3$, 促进 ERK1/2 磷酸化 与对照组相比, T_4 干预组 ERK1/2 磷酸化水平升高 ($P < 0.05$), Tetrac + T_4 干预组 ERK1/2 磷酸化水平降低 ($P < 0.05$), 见图 4。



注:与对照组相比, * $P < 0.05$; HDAC5: 组蛋白去乙酰化酶 5
图 3 T_4 与 Tetrac 对 SNB19 细胞 HDAC5 磷酸化水平的影响



注:与对照组相比, * $P < 0.05$; ERK1/2: 细胞外信号调节激酶 1/2
图 4 T_4 与 Tetrac 对 SNB19 细胞 ERK1/2 磷酸化水平的影响

2.2.2 T_4 促进 SNB19 细胞增殖 与对照组相比, T_4 干预组 OD 值较高 ($P < 0.05$), Tetrac 干预组及 Tetrac + T_4 干预组 OD 值较低 (P 均 < 0.05), 见表 1。

表 1 SNB19 细胞在不同干预因素下的吸光度值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	OD 值
对照组	0.243 ± 0.006
T_4 组	0.333 ± 0.020*
Tetrac 组	0.060 ± 0.016*
T_4 +Tetrac 组	0.102 ± 0.007*

注:与对照组相比, * $P < 0.05$

3 讨论

甲状腺激素的作用分为基因组作用和非基因组作用^[1]。甲状腺激素的基因组作用起始于甲状腺激素核受体。通过作用于甲状腺激素反应元件, 调节靶基因的转录。

近来研究发现, 甲状腺激素还可与细胞核外的受体结合, 发挥非基因组作用。目前已明确甲状腺激素的促血管新生和肿瘤细胞增殖的作用起始于

膜受体整合素 $\alpha v \beta 3$, 但其具体的信号转导通路尚未完全明了。研究显示, T_4 结合整合素 $\alpha v \beta 3$ 后, 可激活磷脂酶 C, 从而激活 PKC α , 进一步激活 ERK1/2, 激活的 ERK1/2 可直接穿梭入核, 参与肿瘤细胞的增殖^[2-3]。但该信号通路还有哪些重要组分参与, 仍是目前探讨的问题。

本实验发现用 T_4 处理肿瘤细胞后, ERK1/2 磷酸化水平升高, 而用 Tetrac 预处理细胞后, ERK1/2 磷酸化受到抑制。Tetrac 是 T_4 的一种类似物, 与 T_4 相比, 在结构上少了一个氨基, 可以阻止 T_4 与整合素 $\alpha v \beta 3$ 结合^[45]。本研究验证了 T_4 通过激活整合素 $\alpha v \beta 3$ /ERK1/2 信号途径, 促进肿瘤细胞的增殖。

PKD 属于一类新的丝/苏氨酸蛋白激酶, 可结合甘油二酯和佛波酯, 并由 PKC 激活^[6]。由于其激酶结构域与钙/钙调蛋白依赖激酶 (CAMK) 家族的同源性高于 PKC 家族, 故现已归为 CAMK 家族激酶。目前已鉴定出 3 种 PKD 亚型, 即 PKD1、PKD2、PKD3。已证实 PKD 参与细胞内高尔基体膜转运、细胞生长、增殖、迁移、分化和凋亡等多种细胞功能的调节。有研究发现, PKD1 磷酸化可调节整合素 $\alpha v \beta 3$ 在细胞内的转位, 促进后者由细胞质转位至细胞膜^[7]。由此推测, PKD1 可能促进了甲状腺激素与整合素 $\alpha v \beta 3$ 的相互作用。

组蛋白乙酰化是近年来研究得较多的一种可逆性修饰, 由乙酰基转移酶和去乙酰化酶 (HDACs) 完成。组蛋白被修饰所发生的染色质结构改变在真核生物基因表达调控和人类某些疾病的发生中发挥着重要的作用。研究发现, VEGF 可刺激血管内皮细胞 HDAC5 Ser259/498 发生磷酸化, 导致 HDAC5 从核内输出, 从而利于下游基因的转录, 该作用是由 PKD1 介导的^[8]。上述研究表明 PKD1 及 HDAC5 在调节血管新生中发挥重要作用。

本实验发现, T_4 可促进 PKD1 的磷酸化, 并进一步导致 HDAC5 磷酸化。给予 Tetrac 预处理细胞后

PKD1 和 HDAC5 的磷酸化水平均显著低于对照组, PKC 抑制剂也抑制了 PKD1 的磷酸化, 表明 T_4 可通过整合素 $\alpha v \beta 3$ /PKC/PKD1 信号转导通路促进 HDAC5 磷酸化。另外, T_4 可促进 SNB19 分泌 VEGF, 而 Tetrac 可抑制 SNB19 细胞分泌 VEGF, 表明整合素 $\alpha v \beta 3$ 参与了 T_4 的促血管新生作用, PKC/PKD1/HDAC5 信号通路可能介导了该作用, 但具体的调节机制还有待深入研究。

研究甲状腺激素促肿瘤细胞增殖及血管新生作用的信号通路, 有助于寻找治疗肿瘤的新靶点, 同时, 关注肿瘤患者的甲状腺功能状态, 有助于治疗方案的选择及改善预后。

参 考 文 献

- [1] Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions[J]. *Endocr Rev*, 2010, 31(2): 139-170.
- [2] Hiroi Y, Kim HH, Ying H, et al. Rapid nongenomic actions of thyroid hormone[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(38): 14104-14109.
- [3] Davis PJ, Leonard JL, Davis FB. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone[J]. *Front Neuroendocrinol*, 2008, 29(2): 211-218.
- [4] 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.
- [5] Davis PJ, Davis FB, Cody V. Membrane receptors mediating thyroid hormone action[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2005, 16(9): 429-435.
- [6] Rybin VO, Guo J, Steinberg SF. Protein kinase D1 autophosphorylation via distinct mechanisms at Ser744/Ser748 and Ser916[J]. *Biol Chem*, 2009, 284(4): 2332-2343.
- [7] di Blasio L, Droetto S, Norman J, et al. Protein kinase D1 regulates VEGF-A-induced $\alpha v \beta 3$ integrin trafficking and endothelial cell migration[J]. *Traffic*, 2010, 11(8): 1107-1118.
- [8] Ha CH, Wang W, Jhun BS, et al. Protein kinase D-dependent phosphorylation and nuclear export of histone deacetylase 5[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(21): 14590-14599.

(收稿日期: 2014-01-05)

《国际内分泌代谢杂志》

中文核心期刊、中文科技核心期刊

欢迎投稿 欢迎订阅