



分类号: R736.1

学号: 2016110256

重 庆 医 科 大 学

硕 士 学 位 论 文

(学术学位)

论 文 题 目 CITED1通过Wnt/ β -catenin信号通路促进甲状腺乳头状癌恶性生物学行为

作 者 姓 名 王 英

指导教师姓名 (职称、单位名称) 庞华 教授

 重庆医科大学附属第一医院

一级学科名称 临床医学

二级学科名称 影像医学与核医学

论文答辩年月 2019年 5月

重庆医科大学

研究生学位论文独创性声明

本人申明所提交的论文是我本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得重庆医科大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料，与我同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

学位论文作者签名： 王莫

日期： 2019.3.10

学位论文版权使用授权书

本人完全了解重庆医科大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在攻读学位期间论文工作的知识产权单位属重庆医科大学。本人保证毕业离校后，发表论文或使用论文工作成果时署名单位为重庆医科大学。学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。学校可以公布学位论文的全部或部分内容（保密内容除外），并编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他手段保存论文。保密论文在解密后适用本授权书。

论文作者签名： 王莫

指导教师签名： 王莫

日期： 2019.3.10

目 录

英汉缩略语名词对照.....	1
中文摘要.....	2
英文摘要.....	5
论文正文: CITED1 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路促进甲状腺乳头状癌恶性生物学行为.....	9
引 言.....	9
第一部分 CITED1 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路促进甲状腺乳头状癌恶性生物学行为的体外研究.....	10
1 材料和方法.....	10
2 结果.....	15
3 讨论.....	21
第二部分 CITED1 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路促进甲状腺乳头状癌恶性生物学行为的体内研究.....	24
1 材料与方法.....	24
2 结果.....	25
3 讨论.....	26
全文总结.....	28
参考文献.....	29
文献综述: 碘难治性分化型甲状腺癌治疗的研究进展.....	32
致 谢.....	39
硕士期间发表文章.....	40

英汉缩略语名词对照

英文缩写	英文全称	中文全称
CITED1	Cbp/p300 interacting transactivator with glu/Asp rich carboxy-terminal domain 1	结合转化激活因子
shRNA	Short hairpin RNA	短发夹 RNA
PTC	Papillary thyroid carcinoma	甲状腺乳头状癌
CCK-8	Cell counting kit	细胞计数试剂盒
FCM	Flow Cytometry	流式细胞术
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	培养基
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链反应
ECL	Enhanced chemiluminescence	增强化学发光法
DEPC	Diethylpyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
TGF- β	Transforming growth factor beta	转化生长因子 β
EP	Eppendorf	离心管
PVDF	Polyvinylidene difluoride	聚偏二氟乙烯
PBS	Phosphate buffered solution	磷酸盐缓冲液
OD	Optical density	光密度

CITED1 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路促进甲状腺乳头状癌恶性生物学行为

摘要

背景

甲状腺癌是最常见的内分泌系统恶性肿瘤，其发病率在过去 10 年迅速上升。其中，乳头状甲状腺癌（papillary thyroid carcinoma, PTC）是最常见的甲状腺癌病理类型，其属于一种分化型甲状腺癌。甲状腺癌的发生和发展是一个涉及多种因素、多种基因和多种信号通路的复杂过程。因此，探讨甲状腺癌生物学行为的分子机制，对进一步提高甲状腺癌患者的治愈率与生存率具有重大意义。

CITED1 (Cbp/p300 interacting transactivator with Glu/Asp rich carboxy-terminal domain 1, also known as MSG1)属于转录共激活因子家族。近年来相关研究表明，甲状腺癌、黑色素瘤、Wilms 瘤、成肝细胞瘤及其他肿瘤中 CITED1 表达异常，与肿瘤发生和发展密切相关，表明 CITED1 可能发挥着类似癌基因的作用。

目的

本研究将通过体内外实验明确 CITED1 对甲状腺乳头状癌生物学行为的影响，并探讨其是否通过 Wnt/ β -catenin 信号通路引起上述一系列过程，为甲状腺乳头状癌的早期诊断及治疗提供新的思路。

方法

(1) 分别用 real-time PCR 和 western blot 方法检测三种甲状腺乳头状癌细胞株 K1, BCPAP, TPC-1 和正常甲状腺组织细胞 Nthy-ori 3-1 中的 CITED1 mRNA 和蛋白表达水平, 从中选取 CITED1 表达水平最高的甲状腺乳头状癌细胞进行下一步实验。

(2) 分别用 CITED1-shRNA 及其阴性对照 NC-shRNA 的重组慢病毒感染 K1 细胞, 采用 real-time PCR 和 western blot 方法检测 CITED1 基因沉默效率; 然后采用 CCK-8 法检测细胞增殖, FCM 法检测细胞周期和细胞凋亡, 细胞划痕愈合实验和 transwell 实验检测细胞迁移和侵袭能力; 最后通过 western blot 方法检测沉默 CITED1 表达后 β -catenin、c-myc 和 cyclinD1 蛋白表达变化。

(3) 在裸鼠皮下接种 K1 细胞, 建立裸鼠移植瘤模型, 观察小鼠肿瘤形成情况。每 3 d 测量裸鼠移植瘤长度及宽度, 计算移植瘤体积。于 27 d 后处死裸鼠并取出完整的移植瘤组织, 称取瘤重, 并用 western blot 方法检测移植瘤中 β -catenin、c-myc 和 cyclinD1 蛋白表达水平。

结果

(1) CITED1 在甲状腺癌细胞中的表达明显高于正常甲状腺组织细胞, 但 CITED1 在 K1 细胞中的相对表达高于 BCPAP, TPC-1 细胞, 因此将 K1 细胞用作后续实验所需细胞。

(2) 经携带 CITED1-shRNA 的重组慢病毒感染后, 甲状腺乳头状癌 K1 细胞中 CITED1 mRNA 和蛋白的表达水平均明显降低, 证明成功获得了 CITED1 基因沉默的 K1 细胞株。沉默 CITED1 基因表达

后, K1 细胞的增殖能力显著降低, 细胞凋亡率明显增加, G 0 /G 1 期细胞比例明显增高, G 2 /M 及 S 期细胞比例降低, 划痕实验表明细胞迁移能力明显减弱, 而且 transwell 实验表明细胞迁移和侵袭能力均减低; western blot 实验检测到沉默 CITED1 的表达可以增加 β -catenin、c-myc 和 cyclinD1 蛋白表达。

(3) 裸鼠成瘤实验表明, CITED1-shRNA 组裸鼠移植瘤生长速度缓慢, 移植瘤体积和重量均明显减小。western blot 实验结果和体外实验结果一致, CITED1-shRNA 组裸鼠移植瘤 β -catenin、c-myc 和 cyclinD1 蛋白表达水平均增加。

结论

(1) CITED1 在 PTC 细胞中的表达相对于正常甲状腺组织细胞更高。

(2) CITED1 可以促进 PTC 生长、侵袭和迁移, 且抑制其凋亡。

(3) CITED1 通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路来促进 PTC 的发生发展。

关键词: 甲状腺乳头状癌, CITED1, Wnt/ β -catenin 信号通路, 细胞增殖, 细胞迁移

CITED1 CONTRIBUTES TO THE MALIGNANT BEHAVIOR OF THYROID PAPILLARY CARCINOMA VIA THE WNT/B-CATENIN SIGNAL PATHWAY

ABSTRACT

Background

The incidence rate of thyroid cancer, the most common endocrine malignancy, has increased rapidly over the past 10 years. Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the pathological types of thyroid cancer, which is a kind of differentiated thyroid cancer. The occurrence and development of thyroid cancer is a complex process involving multiple factors, genes and signaling pathways. Therefore, it is of great significance to study the process of invasion and metastasis of thyroid cancer and explore the molecular mechanism of proliferation, apoptosis and metastasis of cancer cells for further improving the cure rate and survival rate of thyroid cancer patients.

CITED1 is the first member of the CITED family of cofactors. Its overexpression has been observed in a variety of cancers including thyroid cancer, melanoma, hepatoblastoma, Wilms' tumor, and other cancer; moreover, high CITED1 levels are strongly correlated with a poor prognosis. Therefore, it is an oncogene in various cancers.

Objective

We investigated the effects of CITED1 on the biological behavior and tumor growth in *in vitro* and *in vivo* models of PTC, and determine whether the transcriptional regulator acts via the Wnt/ β -catenin pathway. Our study provides a new idea for clinical diagnosis and molecular targeted therapy of PTC.

Methods

(1) CITED1 mRNA and protein levels in normal human thyroid cells (Nthy-ori 3-1) and human thyroid papillary cancer cell lines (K1, BCPAP, and TPC-1) detected by qRT-PCR and Western blotting analyses. The papillary thyroid cancer cells with the highest CITED1 expression were selected for the next experiment.

(2) The recombinant lentivirus carrying CITED1-shRNA or the negative control (NC)-shRNA was successfully infected into thyroid cancer K1 cells. The silencing efficiency of CITED 1 gene was detected by real-time fluorescent quantitative PCR and Western blotting. The cell proliferation was detected by CCK-8 method, the cell cycle distribution and apoptosis were detected by FCM, and the cell migration and invasion ability was detected by cell scratch healing assay and transwell experiments. Finally, the expression changes of β -catenin, c-myc, cyclinD1 after silencing CITED1 were detected by Western blotting analyses.

(3) Human thyroid papillary cancer K1 cells were inoculated under the

skin to established the tumor model in nude mice. The length and width of transplanted tumor in nude mice were measured every 3 days, and the volume of transplanted tumor was calculated. After 27 days, the nude mice were sacrificed and the whole transplanted tumor tissue was collected and weighed, and the expression levels of β -catenin, c-myc, cyclinD1 in the transplanted tumor were detected by Western blotting analyses.

Results

(1) CITED1 was overexpressed in PTC cells compared to normal thyroid cells. Furthermore, CITED1 expression in the K1 cells was relatively high in the three PTC cell lines. Therefore, K1 cells were subjected to stable transfection with CITED1-shRNA.

(2) After the recombinant lentivirus carrying CITED1-shRNA was successfully infected into papillary thyroid carcinoma K1 cells, the expression levels of CITED1 mRNA and protein were significantly decreased, which suggested that the K1 cells with CITED1 gene silencing was successfully obtained. After silencing CITED1 gene expression, the cell proliferation was significantly inhibited, the apoptosis rate was significantly increased, the proportion of G0 /G1 phase cells increased significantly, the proportion of G2 /M and S phase cells decreased significantly, and the cell migration abilities at 12h and 24h were significantly decreased. Transwell assay showed that the ability of cell migration and invasion were both reduced. And the expression of β -catenin,

c-myc, cyclinD1 were increased after silencing CITED1.

(3) The growth rate of transplanted tumor in the CITED1-shRNA group was slow, the volume and weight of transplanted tumor were also significantly reduced. The results of western blot were consistent with the results in vitro. The expression levels of β -catenin, c-myc, cyclinD1 in transplanted tumor in nude mice in the CITED1-shRNA group were increased.

Conclusion

(1) The expression of CITED1 in PTC cells was significantly higher than that in normal thyroid tissue cells.

(2) CITED1 can promote the proliferation, migration and invasion of PTC and inhibit apoptosis of tumor.

(3) CITED1 contributes to progression of the malignant phenotype of PTC via the Wnt/ β -catenin signal pathway.

Key words: papillary thyroid carcinoma, CITED1, Wnt/ β -catenin signal pathway, cell proliferation, cell migration

CITED1 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路促进甲状腺乳头状癌恶性生物学行为

引言

甲状腺癌是最常见的内分泌系统来源恶性肿瘤，其发病率在头颈部肿瘤中居于首位。据报道，2018 年美国预计有 53,990 名新发甲状腺癌患者，其中有 2,060 人因此死亡。并且甲状腺癌发病率已经跃升至女性肿瘤发病率的第 5 位^[1]。乳头状甲状腺癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)和滤泡性甲状腺癌(follicular thyroid carcinoma, FTC)是最常见的甲状腺癌病理类型，属于分化型甲状腺癌，其发病率占有所有甲状腺癌的 90%~95%^[2,3]。绝大多数分化型甲状腺癌患者可以通过“手术+¹³¹I 治疗+促甲状腺激素抑制”治疗模式获得良好的预后，而一小部分(2-5%)分化型甲状腺癌患者在治疗或自然病程进展中，肿瘤细胞形态和功能将发生退行性，分化表型缺失，从而成为碘难治型甲状腺癌^[4-7]。因此，探讨 PTC 发生的分子机制，寻找潜在的治疗分子靶点具有重要临床意义。

本课题组在前期研究中发现，共转录因子 CITED1 (Cbp/p300 interacting transactivator with Glu/Asp rich carboxy-terminal domain 1) 基因在 PTC 组织中 mRNA 表达水平显著高于癌旁组织^[8]。CITED1 最早在小鼠的黑色素瘤细胞中发现^[9]，后来发现在脊椎动物的发育过程中，CITED1 也在心脏、四肢、轴向骨骼、肾脏和胎盘的祖细胞中表达。另外，还发现 CITED1 可能在肾上皮形态形成过程中起关键的协调作用，并参与乳腺的发育^[10]。近年来大量研究还表明，CITED1 可能与 PTC 的发展密切相关^[11-14]，然而，其发挥作用的机制尚不清楚。目前，有研究报告 CITED1 在多种肿瘤中通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路来促进肿瘤的恶性生物学行为^[10, 15, 16]。因此，CITED1 在 PTC 中发挥的作用及其分子机制值得我们探讨。

总之，本研究通过 RNA 干扰技术研究了 CITED1 基因沉默对体内和体外 PTC 细胞生长的抑制作用，并探讨了其是否通过 Wnt/ β -catenin 信号通路起作用。希望为探讨 CITED1 的生物学作用及寻找潜在的分子治疗靶点提供依据。

第一部分 CITED1 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路促进 甲状腺乳头状癌恶性生物学行为的体外研究

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系及病毒载体

人甲状腺乳头状癌细胞系 (K1、BCPAP、TPC-1) 和人正常甲状腺组织细胞 Nthy-ori 3-1 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。携带特异性靶向 CITED1 基因 shRNA (CITED1-shRNA) 及其阴性对照 shRNA (negative control-shRNA, NC-shRNA) 的重组慢病毒[含有增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 基因序列]均购自上海锐赛生物技术有限公司。

1.1.2 主要仪器与试剂

超净工作台	美国 Baker 公司
恒温水浴箱	北京长风仪器仪表公司
恒温摇床	上海智成分析仪器有限公司
超纯水系统	日本 Tomy 公司
低温高速离心机	德国 IKA 公司
制冰机	美国 Thermo 公司
酶标仪	美国 BioRod 公司
微量移液器	法国 Eppendorf 公司
荧光定量 PCR 仪	Applied Biosystems
分光光度计	Thermo scientific
化学发光成像仪	美国 BioRod 公司
DMEM 高糖培养基	美国 Gibco 公司
胎牛血清	美国 Hyclone 公司
PCR 试剂盒	日本 Takara 公司

引物	日本 Takara 公司
抗 CITED1 抗体	美国 Abcam 公司
抗 beta-catenin 抗体	美国 Abcam 公司
抗 c-myc 抗体	美国 Abcam 公司
抗 cyclinD1 抗体	美国 Abcam 公司
抗 β -actin 抗体	Proteintech 公司
Western blot 试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司
ECL 化学发光试剂盒	美国 GeneCopoeia 公司
CCK-8 试剂盒	北京博奥龙免疫技术有限公司
细胞凋亡检测试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司
Transwell 小室	美国 Corning 公司

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

人甲状腺乳头状癌细胞株 (K1、BCPAP、TPC-1) 和人甲状腺正常组织细胞 Nthy-ori 3-1 在 DMEM 培养液中 (高糖且含 10%胎牛血清), 37 °C、CO₂ 体积分数为 5%及常规湿度条件下培养。待细胞生长至培养瓶的 80%~90%时, 用 0.125% 胰蛋白酶消化并常规传代。

1.2.2 mRNA 的检测

1.2.2.1 细胞总 RNA 的提取

(1) 当 6 孔板的细胞生长至 90%~100% 时,取出并去其上清。然后用 PBS 洗涤两次,每孔加入 TRIZOL 试剂 1 ml,吹打均匀后将其移至 1.5 ml 无酶 EP 管中。

(2) 12000 rpm, 5 min, 4 °C, 离心。加氯仿 0.2 ml, 轻摇 15 s。震荡混匀后放置 15 min。

(3) 12000 rpm, 15 min, 4 °C, 离心。然后将上清无色水相移至新的无酶 EP 管, 加入 0.5 ml 异丙醇, 在室温下静置 10 min。

(4) 12000 rpm, 10 min, 4 °C, 离心。观察管底的白色沉淀, 弃去上清液, 用 1.0 ml 75% 乙醇洗涤。

(5) 7500 rpm, 5 min, 4 °C, 离心。弃上清, 用小 Tip 吸干液体。风干沉淀后, 加入 20 μ l DEPC 处理过的水, 吹打均匀, 溶解总 RNA, 并用分光光度计测量 OD 值。

1.2.2.2 逆转录反应

(1) 本实验使用的逆转录试剂盒为 takara 的 PrimeScriptTMRT reagent Kit with gDNA Eraser, 所有操作均在冰上进行。配制反应体系于 0.2 ml PCR 管中。

Master Mix

试剂	使用量
5 \times gDNA Eraser Buffer	2.0 ul
gDNA Eraser	1.0 ul
Total RNA	1.0 ug
Rnase Free dH ₂ O	Up to 10 ul
室温下 5 min	

(2) 反转录反应: SYBR Green qPCR 法

Master Mix

试剂	使用量
步骤 1 的反应液	10.0 ul
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1.0 ul
RT Primer Mix	4.0 ul
5 \times PrimeScript Buffer 2	4.0 ul
Rnase Free dH ₂ O	1.0 ul
Total	20.0 ul
反应条件: 37 °C 15 min \rightarrow 85 °C 5 s \rightarrow 4 °C ∞	

1.2.2.3 Real Time PCR

(1) 反应体系 (反应液在冰上配制)

试剂	使用量
SYBR Premix Ex Taq II	5.0 ul
PCR Forward Primer	0.4 ul
PCR Reverse Primer	0.4 ul
cDNA 反应液	0.8 ul
dH ₂ O	3.4 ul
Total	10.0 ul

PCR 反应条件：95 °C 30 s；95 °C 5 s，60 °C 60 s

(2) 基因引物：

CITED1 基因的上游引物序列为 5'-CGGTGAAAGATCCCAAAGC-3'，

下游引物序列为 5'-GATCAAGGAGCCCTAGAG-GTT-3'；

内参 β -actin 基因的上游引物序列为 5'-GCACCCAGCACAATGAAGA-3'，

下游引物序列为 5'-ACTCTAACCGTACCGAAATAA-3'。

1.2.3 蛋白的检测

1.2.3.1 细胞总蛋白的提取

(1) PBS 洗涤细胞 2 次，用细胞刮将细胞刮下，移至 EP 管中。

(2) 5000 rpm，5 min，4 °C，离心。弃上清，加入 80 ul 细胞裂解液。

(3) 冰上裂解 30min，每隔 5 分钟震荡一次，期间全程在冰上进行。

(4) 12000 rpm，15 min，4 °C，离心。将其转移至新的 EP 管中，按 4:1 比例加入 5 \times 上样缓冲液将其稀释为 1 \times ，混匀，然后在 100 °C 下煮 10 min，于 -20 °C 保存备用。

1.2.3.2 Western blot 检测

(1) 电泳：两块玻璃板之间灌注 12% 分离胶，待其凝固之后，继续加入浓缩胶，并插上齿梳，待浓缩胶凝固后，拔出齿梳，每孔加入 50 ug 蛋白上样量，内外槽加满电泳液后，于 80 V 电压电泳 2.5 h。

(2) 转膜：在 marker 指示下将目的胶切下，按照从负极到正极（海绵-滤纸-胶-PVDF 膜-滤纸-海绵）的三明治结构依次摆放，于 100 V 电压转膜 60 min。

(3) 封闭：在室温条件下，将 PVDF 膜浸泡在 5 %脱脂奶粉中，在摇床上封闭 1.5 h。

(4) 一抗孵育：将配制好的一抗孵育在膜蛋白面，并在 4 °C 冰箱中孵育过夜。

(5) 二抗孵育：回收一抗，使用新配制的 TBST 于摇床上反复洗涤膜，为 8 min×4 次；然后在室温下用配制好的二抗继续孵育膜 1 h，再在摇床上用 TBST 清洗膜，分别为 8 min×4 次。

(6) ECL 显影。

1.2.4 慢病毒感染 K1 细胞

取处于对数生长期的 K1 细胞，用 0.125%胰蛋白酶溶液消化并制成细胞悬液。按每孔 5×10^4 个接种细胞于 6 孔板中，然后置于培养箱中继续培养，至细胞融合度约 30%时取出 6 孔板；根据病毒的感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 50，加入滴度为 1×10^8 TU/mL、携带 CITED1-shRNA 的重组慢病毒，5 μ L/孔。72 h 后，在荧光显微镜下观察细胞中绿色荧光蛋白的表达，用绿色荧光显色细胞所占的百分比表示感染效率。感染效率为 80%以上时进行后续实验。

1.2.5 CCK-8 法检测细胞活力

收集感染效率为 80%以上的 K1 细胞，将其接种于 5 块 96 孔板（每孔细胞数为 3×10^3 个）中，每组设置 4 个复孔。待细胞分别培养 1、2、3、4 和 5 d 后，向每个孔中加入 10 μ L CCK-8 试剂，再于培养箱中继续培养 1 h 后，用酶联免疫检测仪测量每孔 450 nm 波长处的 OD 值，以此反映细胞的增殖活力。

1.2.6 FCM 法检测细胞凋亡和细胞周期

收集感染效率为 80%以上的 K1 细胞，用 PBS 缓冲液吹打成细胞悬液并移至 EP 管中，每管细胞数约为 5×10^5 个；加入 5 μ L Annexin V-EGFP 并混匀后，再加入 10 μ L PI 并混匀；置于室温、避光条件下，反应 15 min，最后通过流式细胞仪检测细胞凋亡率。

另外，收集感染效率为 80%以上的 K1 细胞，用 0.5 mL PBS 重悬细胞并移至灭菌试管中，于每管中加入 4 °C 预冷的 75%乙醇溶液 4.5 mL，将细胞固定 24 h，然后用 PBS 洗涤细胞。将细胞悬液转移到 EP 管中（每管细胞数为 1×10^6 个）并

加入 500 μL 的 PI 溶液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下进行常规染色反应 30 min, 最后通过流式细胞仪检测细胞周期分布。

1.2.7 划痕愈合实验检测细胞迁移

收集感染效率为 80% 以上的 K1 细胞并调整细胞浓度至 4×10^5 个/mL。使用记号笔在 6 孔板背后均匀的划线, 然后将每组细胞接种于 6 孔板中, 置于细胞培养箱中孵育。24 h 后, 取出 6 孔板, 在每孔中央用黄色枪头水平划痕, 然后用 PBS 洗涤 3 次; 在光学显微镜下观察划痕的相对距离并拍照, 将其作为 0 h 划痕距离; 然后更换培养液为无血清的 DMEM 培养液, 置于培养箱中继续培养 12 h 和 24 h, 分别在显微镜下观察划痕创面距离并拍照。使用 Image J 软件分析细胞相对迁移率。12 或 24 h 细胞相对迁移率 (%) = (0 h 细胞划痕距离 - 12 或 24 h 细胞划痕距离) / 0 h 细胞划痕距离 $\times 100\%$ 。

1.2.8 transwell 实验检测细胞迁移和侵袭能力

收集感染效率为 80% 以上的 K1 细胞, 在 transwell 小室的下室中加入含 20% FBS 的细胞培养基 700 μL , 再在其上室中加入 100 μL 无血清培养基培养的细胞 (细胞数为 1×10^6 个), 将其放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 体积分数为 5% 的培养箱中继续培养。24 h 后, 取出小室, 首先用棉签擦去上室中没有穿膜的细胞, 用多聚甲醛来固定细胞 30 min, 然后用结晶紫染色液染色细胞, 显微镜下计数细胞数目。

1.2.9 统计

采用 SPSS 19.0 软件对各实验结果进行统计学分析。本研究中所有实验均独立重复 3 次, 结果中计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。通过方差分析进行多组间均数的比较, 并通过 LSD-*t* 检验进行组内两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CITED1 在不同 PTC 细胞中的表达鉴定

实时荧光定量 PCR 结果 (图 1.1 A) 显示, CITED1 在 PTC 细胞 K1、BCPAP、TPC-1 中的 mRNA 表达均较正常甲状腺组织细胞 Nthy-ori 3-1 中的 mRNA 表达量

高 ($F=144.061$, $P<0.001$; LSD - t 检验的 P 值均 <0.001), 并且还发现 K1 细胞中 CITED1 的表达含量显著高于 BCPAP、TPC-1 细胞。蛋白质印迹法 (图 1.1 B) 也得到一样的结论 ($F=240.039$, $P<0.001$; LSD - t 检验的 P 值均 <0.001), 因此 K1 细胞被选择用于下一步实验。

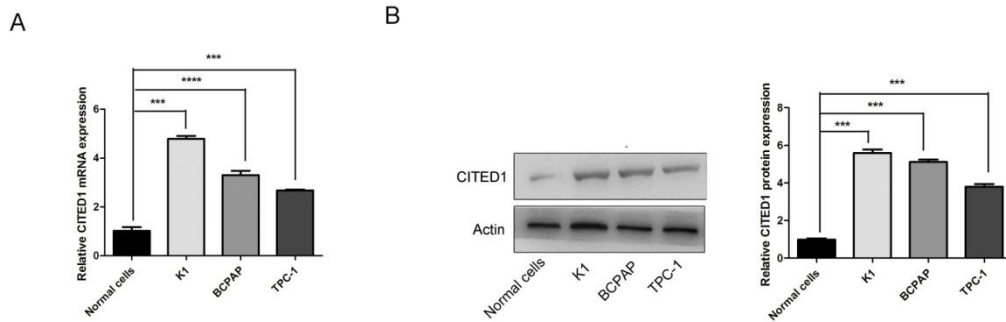


图 1.1 CITED1 在人 PTC 细胞中的过表达

Fig. 1.1 CITED1 was overexpressed in human PTC cells. *** $P<0.001$ compared to the Negative and Control groups.

2.2 慢病毒成功感染 K1 细胞

将 CITED1-shRNA 重组慢病毒及阴性空载体 NC-shRNA 慢病毒分别感染 K1 细胞 72 h 后, 荧光显微镜下观察发现, 干扰组 (图 1.2) 和阴性对照组 (图 1.2) 的绝大多数细胞都可见绿色荧光着色, 与背景反差明显。结果提示, 2 组细胞中目的 shRNA 的转染效率均较高。

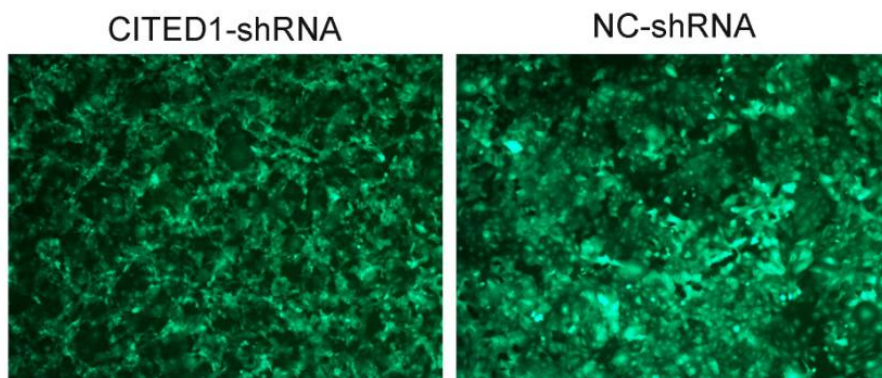


图 1.2 荧光显微镜下观察 CITED1-shRNA 和 NC-shRNA 慢病毒感染 72 h 后 K1 细胞中的绿色荧光蛋白表达情况

Fig. 1.2 The expression of green fluorescent protein in K1 cells after infection with the CITED1-shRNA and the NC-shRNA 72 h was observed by fluorescence microscopy.

2.3 CITED1 基因被有效沉默

实时 real-time PCR 结果 (图 1.3 A) 显示, 干扰组、阴性对照组和空白组的 CITED1 mRNA 相对表达量分别为 0.16 ± 0.03 、 0.99 ± 0.15 和 1.00 ± 0.12 ; 统计学分析表明, 干扰组的 CITED1 mRNA 表达量明显低于阴性对照组和空白组 ($F=55.94$, $P<0.001$; LSD - t 检验, $P<0.01$, $P<0.001$)。蛋白质印迹法检测结果 (图 1.3 B) 显示, 干扰组、阴性对照组和空白组的 CITED1 蛋白的相对表达水平分别为 0.425 ± 0.07 、 1.038 ± 0.03 和 1.12 ± 0.21 ; 统计学分析结果显示, 与阴性对照组和空白组相比, 干扰组的 CITED1 蛋白表达量明显降低 ($F=26.30$, $P=0.001$; LSD - t 检验的 P 值均 <0.01)。上述结果表明, 成功感染 CITED1-shRNA 慢病毒后, K1 细胞中 CITED1 mRNA 和蛋白表达均被明显抑制, 即 CITED1 基因沉默的 K1 细胞株构建成功。

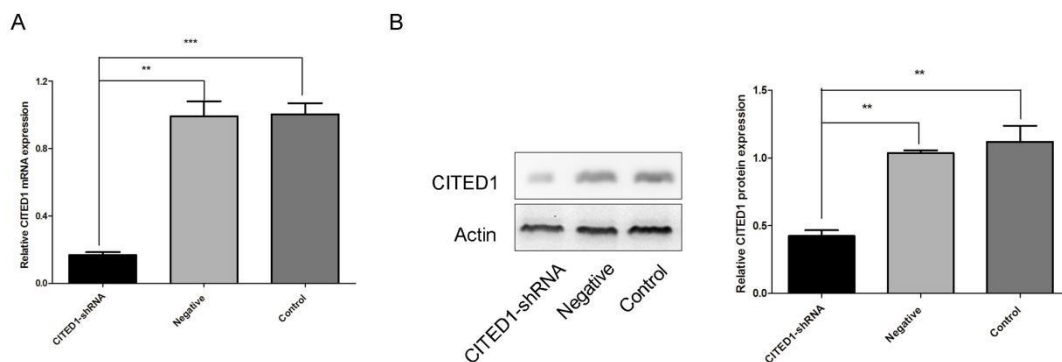


图 1.3 实时荧光定量 PCR (A) 和蛋白质印迹法 (B) 分别检测 CITED1-shRNA 转染后 K1 细胞中 CITED1 mRNA 和蛋白的表达水平

Fig. 1.3 The expressions of CITED1 mRNA and protein in K1 cells after transfection with CITED1-shRNA were detected by real-time fluorescent quantitative PCR (A) and Western blotting (B), respectively. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared to the Negative and Control groups.

2.4 沉默 CITED1 基因对 K1 细胞增殖的影响

CCK-8 实验结果 (图 1.4) 显示, 继续培养细胞 1 d 后, 各组细胞的增殖活力无明显差异 ($F=1.256$, $P>0.05$); 然后继续培养 2、3、4 及 5 d 后, 与空白组及阴性对照组相比, 干扰组的细胞增殖活力明显下降 (LSD - t 检验的 P 值均 <0.01); 而阴性对照组与空白组之间细胞增殖活力无显著差异 (P 值均 >0.05)。结果表明, 感染 CITED1-shRNA 重组慢病毒后, K1 细胞的增殖能力明显减弱。

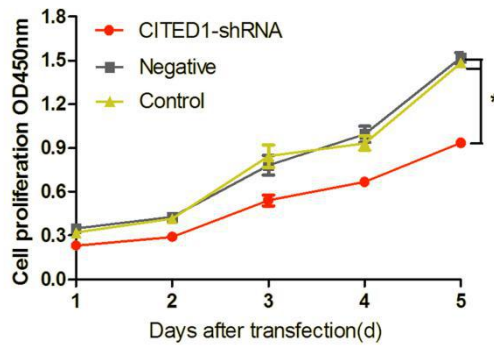


图 1.4 CCK-8 法检测 CITED1-shRNA 转染后 K1 细胞增殖改变

Fig. 1.4 The proliferation of K1 cells transfected CITED1-shRNA was detected by CCK-8 method. *P<0.05 compared to the Negative and Control groups.

2.5 沉默 CITED1 基因对 K1 细胞凋亡率的影响

FCM 法检测细胞凋亡的结果(图 1.5)显示,与空白组细胞凋亡率[(12.9±3.2)%]及阴性对照组细胞凋亡率[(13.9±2.8)%]相比,干扰组细胞凋亡率[(28.2±3.1)%]明显升高 (F=23.24, P=0.001; LSD - t 检验的 P 值均<0.01); 而阴性对照组与空白组之间细胞凋亡率无显著差异 (P>0.05)。结果表明,感染 CITED1-shRNA 重组慢病毒后, K1 细胞凋亡率明显增高。

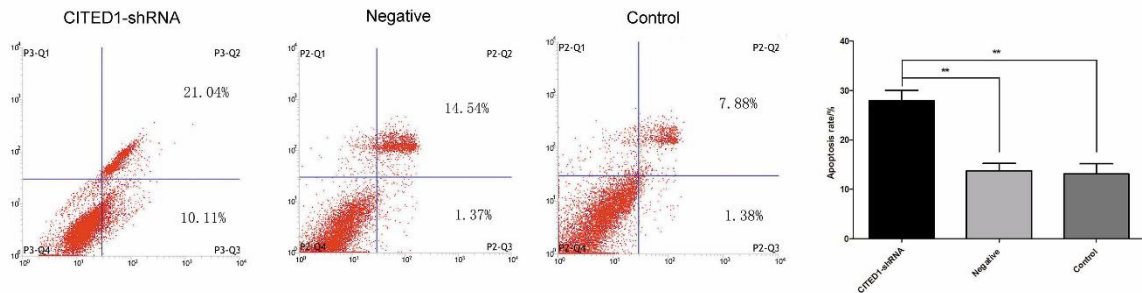


图 1.5 FCM 法检测 CITED1-shRNA 转染后 K1 细胞凋亡改变

Fig. 1.5 The apoptosis of K1 cells transfected CITED1-shRNA was detected by CCK-8 method. **P<0.01 compared to the Negative and Control groups.

2.6 沉默 CITED1 基因对 K1 细胞周期的影响

FCM 法检测细胞周期的结果(图 1.6)显示,与空白组及阴性对照组相比,干扰组 G0/G1 期细胞比例明显增加 (F=13.27, P=0.007; LSD - t 检验的 P 值均=0.007), 而 G2 期 (F=9.48, P=0.014; LSD - t 检验, P<0.05, P<0.001) 和 S 期 (F=5.54, P=0.043; LSD - t 检验的 P 值均<0.05) 细胞所占的比例明显减少;

阴性对照组与空白组之间各期细胞所占比例无明显差异 (P 值均>0.05)。结果表明, 感染 CITED1-shRNA 重组慢病毒后, K1 细胞周期被阻滞在了 G₀/G₁ 期。

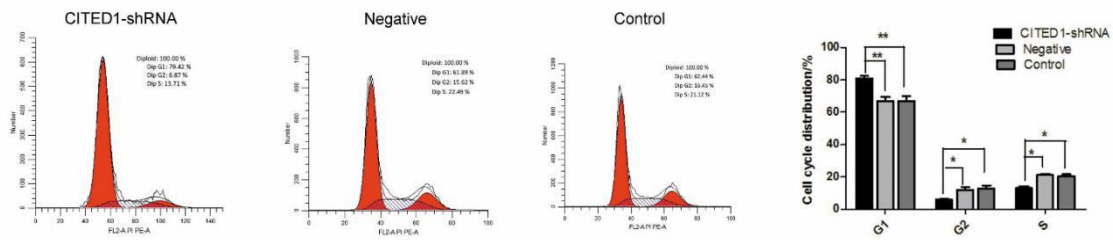


图 1.6 FCM 法检测 CITED1-shRNA 转染后 K1 细胞周期改变

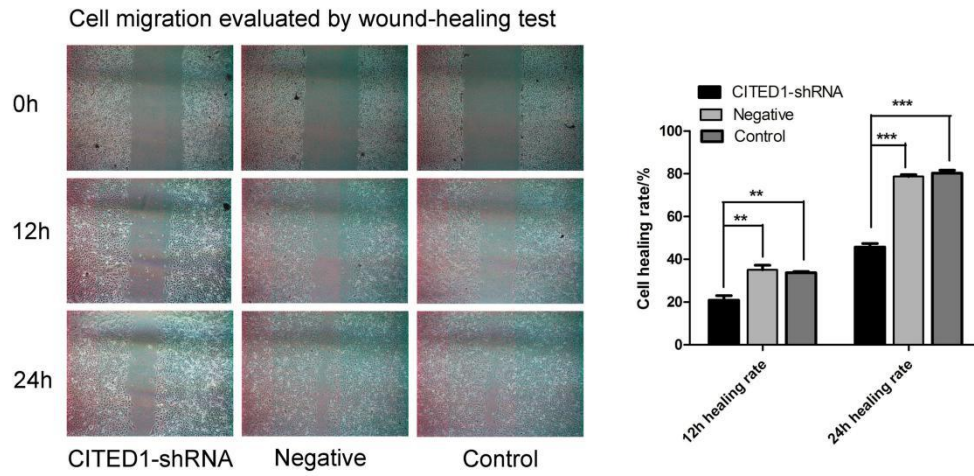
Fig. 1.6 The cell cycle distribution of K1 cells transfected CITED1-shRNA was detected by CCK-8 method. *P<0.05, **P<0.01 compared to the Negative and Control groups.

2.7 沉默 CITED1 基因对 K1 细胞迁移和侵袭的影响

划痕愈合实验结果 (图 1.7 A) 显示, 划痕 12 h (F=18.85, P=0.003; LSD - t 检验的 P 值均=0.002) 及 24 h (F=215.28, P<0.001; LSD - t 检验的 P 值均<0.01) 后, 干扰组的细胞相对迁移距离较空白组及阴性对照组明显减少, 差异均有统计学意义; 而与阴性对照组及空白组相比, 划痕 12 h 及 24 h 后的细胞相对迁移距离均无显著差异 (P 值均>0.05)。

Transwell 实验结果 (图 1.7 B) 也显示, 与空白组及阴性对照组相比, 干扰组细胞侵袭能力和迁移能力均显著减弱 (F=60.299, P<0.001; LSD - t 检验的 P 值均<0.01) 和 (F=106.251, P<0.001; LSD - t 检验的 P 值均<0.001); 而 K1 细胞侵袭能力和迁移能力在阴性对照组与空白组之间均无统计学意义上的改变 (P 值均>0.05)。结果表明, 感染 CITED1-shRNA 重组慢病毒后, K1 细胞的迁移能力和侵袭能力均明显减弱。

A



B

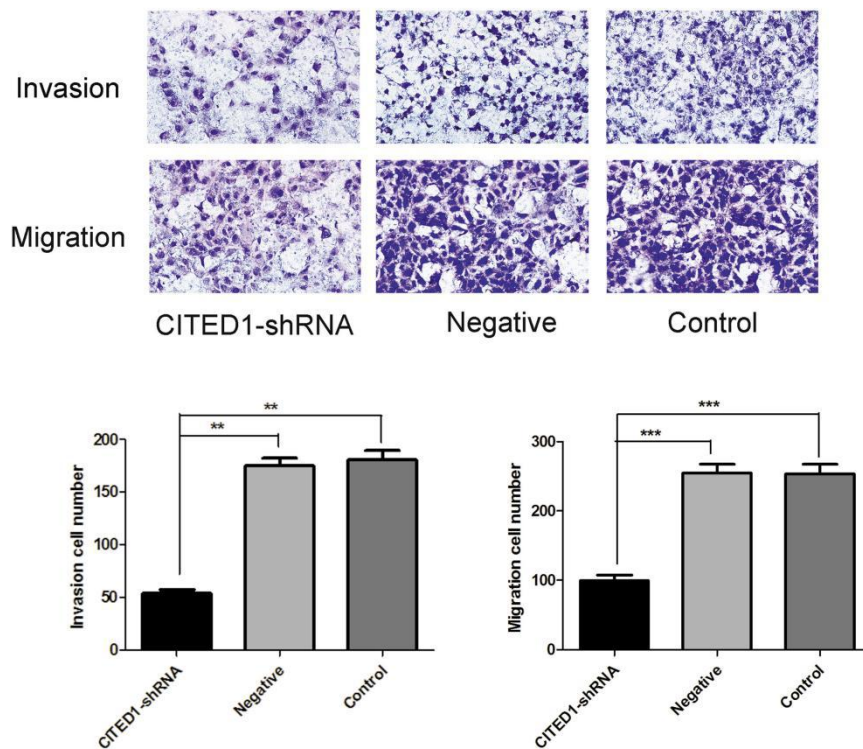


图 1.7 细胞划痕愈合实验 (A) 和 transwell 实验(B)检测 CITED1 基因沉默对 K1 细胞迁移和侵袭能力的影响

Fig. 1.7 Effect of CITED1 gene silencing on the cell migration and invasion ability of K1 cells was detected by cell scratch healing assay and transwell assay. **P<0.01, ***P<0.001 compared to the Negative and Control groups.

2.8 沉默 CITED1 基因对 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响

免疫印记法结果（图 1.8）显示，干扰组 Wnt/ β -catenin 信号通路下游蛋白 beta-catenin、c-myc、cyclinD1 的表达含量均较阴性组与空白组表达量增加，统计学结果分别为（ $F=8.887$ ， $P=0.016$ ；LSD - t 检验的 P 值均 <0.05 ）、（ $F=10.034$ ， $P=0.012$ ；LSD - t 检验的 P 值均 <0.01 ）和（ $F=14.736$ ， $P=0.005$ ；LSD - t 检验的 P 值均 $=0.003$ ）。结果表明，CITED1 在 PTC 中可能通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路来起作用。

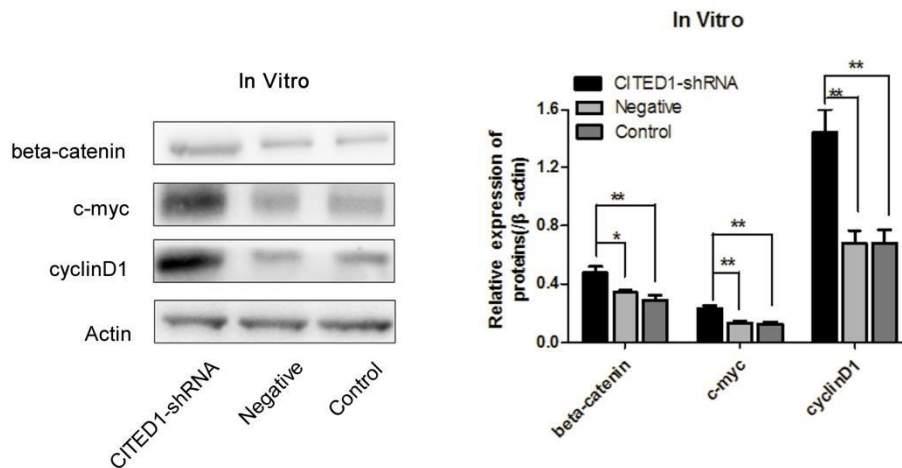


图 1.8 蛋白质印迹法检测 CITED1-shRNA 转染后 Wnt/ β -catenin 信号通路的改变

Fig. 1.8 The protein of Wnt/ β -catenin pathway in K1 cells transfected CITED1-shRNA was detected by CCK-8 method. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared to the Negative and Control groups.

3 讨论

甲状腺癌的发生和发展是一个涉及多种因素、多种基因、多种信号通路的复杂过程。致癌基因的激活、肿瘤抑制基因的缺失及相关蛋白的异常表达均可导致甲状腺滤泡细胞的异常增殖和突变，最终诱发肿瘤的形成。已有研究发现，鼠类肉瘤滤过性毒菌致癌同源体 B1 基因（v-raf murine sarcomaviral oncogene homolog, BRAF）和 Ras 基因的突变、原癌基因酪氨酸激酶受体（proto-oncogenetyrosine-protein kinase receptor, RET）/ PTC 和配对盒基因 8（paired box gene 8, PAX 8）/过氧化物酶体增殖物激活受体 γ （peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ ）染色体的重排，以及丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase,

MAPK) 和磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) - 蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) 信号通路的激活都是诱发甲状腺癌发生的分子机制^[17]。因此, 探讨甲状腺癌生物学行为的分子机制, 对进一步提高甲状腺癌患者的治愈率与生存率具有重大意义。

CITED1 又称为黑色素细胞特异基因 (melanocyte-specific gene 1, MSG1), 属于转录共激活因子家族。由 CITED1 基因编码的蛋白常作为转录辅助激活因子来发挥生理作用, 因此广泛参与 Cbp/P300 依赖的转录调节反应, 其转录调节能力还受细胞周期中磷酸化调节^[18]。随后研究发现, CITED1 主要表达在肾源性的祖细胞中, 当细胞分化为肾上皮细胞时其表达水平明显降低^[19, 20]。在前期研究中发现, 甲状腺癌组织中 CITED1 的表达水平较周围正常组织明显升高, 但是关于其表达增加的分子机制目前还不清楚^[8]。有研究指出, CITED1 在甲状腺组织中的高表达与其启动子异常甲基化相关^[11]。WATANABE^[21]等发现, CITED1 基因在 PTC 中高表达与 BRAF 基因突变有病理生理性的相关性, 其中 BRAF 基因突变是甲状腺癌中最显著的基因突变。

临床研究发现, 在 CITED1 高表达的成肾细胞瘤裸鼠移植瘤中肿瘤生长体积明显增加^[16, 22]。同样有研究表明, CITED1 高表达可促进 Hep293TT 成肝细胞瘤细胞增殖^[15]。VALERIE^[10]等发现, CITED1 基因缺失的肠管肿瘤裸鼠模型生存时间由 203.5 d 延长到了 515 d。本研究采用 CCK-8 实验检测到, 通过 RNA 干扰技术沉默 CITED1 基因表达后的 PTC K1 细胞增殖能力明显降低, 同时 FCM 法检测到细胞凋亡率明显增高。这些发现都表明 CITED1 能够促进肿瘤细胞的生长。

恶性肿瘤最基本的生物学特征之一是由细胞周期调控紊乱引起的细胞发生恶性转化和肿瘤细胞的不可控增殖。本研究发现, 沉默 CITED1 基因表达后, K1 细胞处于 G₀/G₁ 期细胞数目明显增加, G₂ 和 S 期细胞数明显减少, 表明细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期, 细胞周期的阻滞从而使细胞生长能力受阻, 这与细胞凋亡率的增加和增殖能力的降低一致。

本研究还发现, 在沉默 CITED1 基因表达后, PTC K1 细胞的迁移和侵袭能力均显著减弱。CANTELLI^[23]等研究发现, CITED1 在黑素瘤及其转移组织中表达丰富, 并且通过转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)-Smad2-CITED1 轴的方式促进肿瘤转移。SCHULTEN^[24]等比较了 PTC 脑转移瘤、甲状腺癌及脑肿

瘤的微阵列表达谱，发现 CITED1 基因在 PTC 脑转移瘤中表达水平明显上调。上述结果表明，CITED1 在恶性肿瘤的侵袭中发挥了重要作用。

综上所述，本研究初步探讨了 CITED1 基因在 PTC 中的作用，发现 CITED1 基因高表达可能促进 PTC 细胞增殖与迁移等生物学行为。

第二部分 CITED1 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路促进 甲状腺乳头状癌恶性生物学行为的体内研究

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株

同第一部分

1.1.2 实验动物

15 只 4-5 周龄雌性裸鼠，由重庆医科大学实验动物中心提供并饲养。

1.1.3 主要仪器与试剂

同第一部分

1.2 实验方法

1.2.1 裸鼠移植瘤模型的建立

在注射细胞悬液之前，用碘伏局部消毒裸鼠皮肤。将细胞悬液吹打均匀，用 1ml 注射器抽取细胞悬液（细胞浓度为 2×10^8 个/ml），然后平行进针至右侧腋窝皮下，慢慢向前约 1.5 cm，吸吮，无血液，推注 0.1 mL 细胞悬液后快速拔针，用棉签按压数秒，并观察局部是否有漏液、出血等情况发生。每隔 3 天观察一次老鼠精神状态，用游标卡尺测量并记录瘤体长度（L）与宽度（W），计算肿瘤体积： $V=L \times W^2 \times 0.5$ 。27 天后，处死裸鼠，取出完整的移植瘤并称取瘤重，于液氮中储存用于后续实验。

1.2.2 Western blot 检测

同第一部分

1.2.3 统计

同第一部分

2 结果

2.1 瘤体生长实验

本实验成功建立人甲状腺乳头状癌 K1 细胞裸鼠移植瘤模型，一周左右观察到除干扰组有 1 只裸鼠未见明显移植瘤以外，其余 14 只裸鼠均形成肉眼可见皮下肿瘤。从图 2.1 中可得知，干扰组裸鼠瘤体生长速度更慢，生长受到明显抑制。第 27 天后，三组体积分别为：干扰组：301.13 ± 140.13，阴性组：1408.77 ± 368.84，空白组：1554.41 ± 394.43，统计学具有显著差异（ $F=22.980$ ， $P<0.001$ ；LSD - t 检验，均 $P<0.001$ ）。同时观察到干扰组裸鼠移植瘤的体重也明显低于阴性组和空白组（ $F=10.411$ ， $P=0.003$ ；LSD - t 检验，均 $P<0.01$ ）。

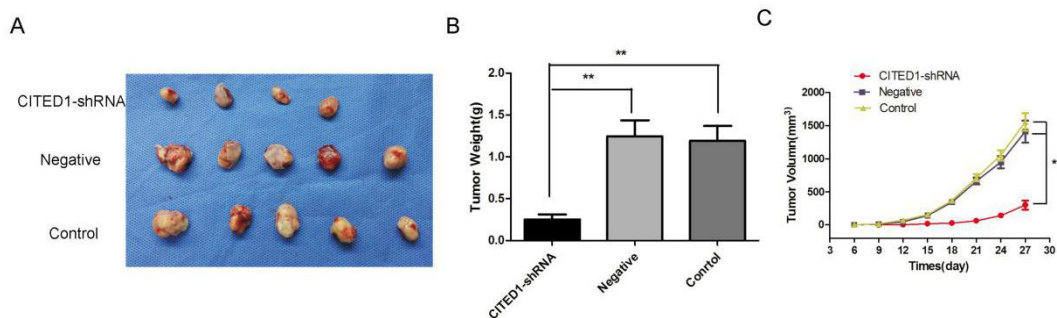


图 2.1 裸鼠移植瘤实验

Fig. 2.1 Tumor transplantation in nude mice. ** $P<0.01$ compared to the Negative and Control groups

2.2 Western blot 检测

与第一部分体内实验结果一致，免疫印迹法结果显示，沉默 CITED1 基因后的移植瘤内 beta-catenin、myc、cyclinD1 蛋白表达含量增加，统计学结果分别为（ $F=5.927$ ， $P=0.038$ ；LSD - t 检验的 P 值均 <0.05 ）、（ $F=19.729$ ， $P=0.002$ ；LSD - t 检验的 P 值均 <0.01 ）和（ $F=7.80$ ， $P=0.021$ ；LSD - t 检验的 P 值均 <0.05 ）。实验结果说明 CITED1 基因抑制 Wnt/beta-catenin 信号通路。

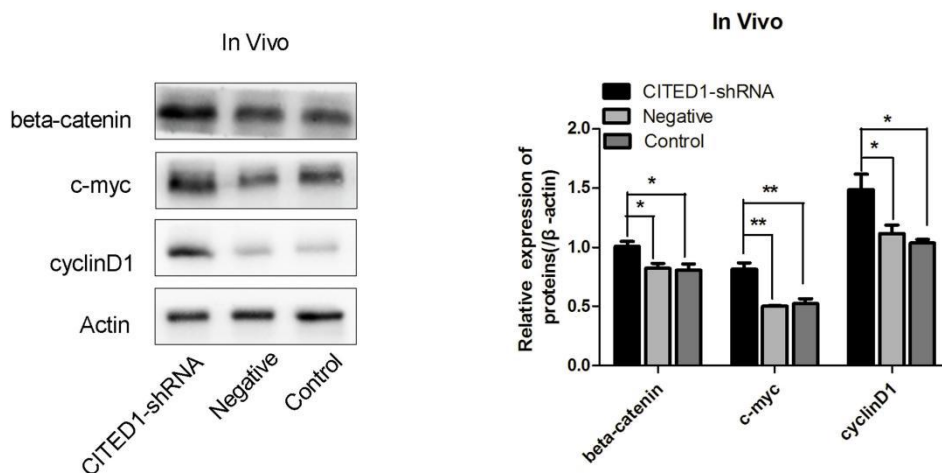


图 2.2 蛋白质印迹法检测 CITED1-shRNA 转染后 Wnt/ β -catenin 信号通路的改变

Fig. 2.2 The protein of Wnt/ β -catenin pathway in K1 cells transfected CITED1-shRNA was detected by CCK-8 method. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared to the Negative and Control groups.

3 讨论

本研究在第一部分通过 RNA 干扰技术沉默 CITED1 基因的表达后，观察到 K1 细胞的增殖活力减低，细胞凋亡率增加，细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期，细胞迁移及侵袭能力减弱，从而证明了 CITED1 有促进 PTC 恶性生物学行为的作用。为进一步验证该作用，本部分实验采用将甲状腺乳头状癌 K1 细胞注射入裸鼠皮下，构建皮下移植瘤模型的方式，在体内验证 CITED1 基因在 PTC 中的作用。本部分实验结果显示，干扰组裸鼠移植瘤生长速度明显低于空白组及阴性组；并且 27 天处死裸鼠后，取出的瘤体体积及瘤重也均低于另外两组，说明 CITED1 促进裸鼠 PTC 移植瘤的生长。该结果与体外实验结果一致，均提示 CITED1 促进 PTC 的恶性生物学行为，CITED1 在 PTC 中具有一定的致瘤作用。

在正常成年人中，Wnt 信号通路涉及细胞许多的重要功能，通过调节上皮细胞的增殖、干细胞活化及自我更新来维持组织稳态；同时，Wnt 信号通路也参与许多肿瘤的发生，包括乳腺癌、肺癌、甲状腺癌和肠道肿瘤^[25-28]。Wnt 信号通路有多种参与途径，包括经典途径和非经典途径，典型的经典途径就是 Wnt/ β -catenin 信号途径，当 Wnt 蛋白与受体结合后，通过一系列的反应使细胞核内的 β -catenin 蛋白表达含量相应增加，Wnt 途径被激活， β -catenin 下游蛋白 c-myc、cyclinD1、c-jun 蛋白表达也相应增加。在甲状腺癌中，Wnt 信号通路的大量激活

使得甲状腺肿瘤生长,并且在甲状腺癌中主要是 Wnt /beta-catenin 通路激活发挥作用^[29]。国外多项研究发现 CITED1 与 Wnt/beta-catenin 信号通路相关, CBP 和 P300 参与 Wnt 信号通路的调节,而 CITED1 广泛参与 CBP/P300 依赖的转录调节反应,因此, CITED1 可能作为一个辅助调节因子来辅助调节 CBP/P300 参与的干细胞维护及细胞分化等作用^[30, 31]。我们的研究中发现, CITED1-shRNA 组 Wnt 信号通路下游蛋白 beta-catenin、c-myc、cyclinD1 表达量较空白组及阴性明显增加,体内外 Western blot 实验均证明了 CITED1 抑制肿瘤的 Wnt/beta-catenin 信号通路。然而有趣的是肿瘤的发生却多是 Wnt 通路的激活导致细胞增殖失控所致,这看似矛盾的现象在 CITED1 过表达的多种肿瘤均有出现, CITED1 缺失的肠道肿瘤 Wnt 通路明显激活, CITED1 核内富集的 Wilms 瘤 Wnt 通路受到抑制,这些研究均发现 CITED1 在不同肿瘤中通过抑制 Wnt 通路发挥作用。针对这一现象 Murphy 给出的解释是 CITED1 缺失使 Wnt 通路的异常激活,肿瘤增殖、凋亡都明显增加,分化能力降低,但凋亡水平大于增殖水平,所以 CITED1 缺失的小鼠生存时间明显延长^[10, 15, 16]。我们认为可能是 CITED1 的磷酸化作用使 Wnt 通路关键蛋白 beta-catenin 核内表达降低,因此该通路受到抑制,下游 c-myc、cyclinD1 蛋白表达也相应降低。因此, CITED1 在不同肿瘤中均抑制 Wnt/beta-catenin 信号通路。

在体内外实验中, CITED1 干扰组 PTC 细胞及移植瘤生长能力均明显下降,并且干扰组 Wnt/beta-catenin 信号通路下游蛋白 beta-catenin、c-myc、cyclinD1 表达量增加。以上研究结果表明 CITED1 通过 Wnt/beta-catenin 信号通路促进 PTC 的恶性生物学行为。

全文总结

本研究通过慢病毒介导构建 CITED1 基因干扰 PTC 细胞株的方法研究了 CITED1 基因在 PTC 中的作用及发挥作用的相关信号通路。现总结如下：

一、本研究中发现所有 PTC 细胞株 CITED1 mRNA 及蛋白含量均较正常甲状腺组织细胞表达更高，并且 K1 细胞是所有 PTC 细胞中相对表达量最高的细胞株，因此我们选择 K1 细胞用于后续实验。

二、在体外实验中，CCK-8 实验检测到 CITED1-shRNA 组细胞生长速度明显低于阴性组及空白组；流式实验发现 CITED1-shRNA 组细胞凋亡率显著增加，细胞周期阻滞在了 G₀/G₁ 期；细胞划痕实验及细胞迁移实验均发现 CITED1-shRNA 组细胞迁移和侵袭能力明显减弱。以上研究结果表明 CITED1 促进 PTC 细胞的恶性生物学行为。

三、在体内实验中，通过皮下成瘤方法，成功构建 CITED1-shRNA 裸鼠 PTC 移植瘤；在 27d 的观察中我们发现 CITED1-shRNA 组裸鼠移植瘤的生长速度明显低于阴性组及空白组，并且最终剥离出的瘤组织体积及重量均显著小于另外两组。以上研究结果表明 CITED1 促进 PTC 裸鼠移植瘤的生长。

四、本研究通过 Western blot 实验检测 Wnt/beta-catenin 信号通路下游蛋白 beta-catenin、c-myc、cyclinD1 的表达量，发现 CITED1-shRNA 组各蛋白表达量均显著增加，以上结果说明 CITED1 可能是通过抑制 Wnt/beta-catenin 信号通路在 PTC 中来发挥作用。

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018,68(1):7-30.
- [2] Ibrahim E Y, Busaidy N L. Treatment and surveillance of advanced, metastatic iodine-resistant differentiated thyroid cancer[J]. Curr Opin Oncol, 2017,29(2): 151-158.
- [3] Faugeras L, Pirson A S, Donckier J, et al. Refractory thyroid carcinoma: which systemic treatment to use?[J]. Ther Adv Med Oncol, 2018,10:1960367893.
- [4] Jin Y, Van Nostrand D, Cheng L, et al. Radioiodine refractory differentiated thyroid cancer[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2018,125:111-120.
- [5] Cabanillas M, Terris D J, Sabra M. Information for Clinicians: Approach to the patient with progressive radioactive iodine refractory thyroid cancer- When to use systemic therapy[J]. Thyroid, 2017.
- [6] Jaber T, Waguespack S G, Cabanillas M E, et al. Targeted Therapy in Advanced Thyroid Cancer to Resensitize Tumors to Radioactive Iodine[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2018,103(10):3698-3705.
- [7] Naoum G E, Morkos M, Kim B, et al. Novel targeted therapies and immunotherapy for advanced thyroid cancers[J]. Mol Cancer, 2018,17(1):51.
- [8] Li W B, Zhou J, Xu L, et al. Identification of Genes Associated with Papillary Thyroid Carcinoma (PTC) for Diagnosis by Integrated Analysis[J]. Horm Metab Res, 2016,48(4):226-231.
- [9] Howlin J, Cirenajwis H, Lettiero B, et al. Loss of CITED1, an MITF regulator, drives a phenotype switch in vitro and can predict clinical outcome in primary melanoma tumours[J]. PeerJ, 2015,3:e788.
- [10] Meniel V, Song F, Phesse T, et al. Cited1 deficiency suppresses intestinal tumorigenesis[J]. PLoS Genet, 2013,9(8):e1003638.
- [11] Sassa M, Hayashi Y, Watanabe R, et al. Aberrant promoter methylation in

- overexpression of CITED1 in papillary thyroid cancer[J]. *Thyroid*, 2011,21(5):511-517.
- [12] Schulten H J, Hussein D, Al-Adwani F, et al. Microarray expression profiling identifies genes, including cytokines, and biofunctions, as diapodesis, associated with a brain metastasis from a papillary thyroid carcinoma[J]. *Am J Cancer Res*, 2016,6(10):2140-2161.
- [13] Huang Y, Prasad M, Lemon W J, et al. Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001,98(26):15044-15049.
- [14] Scognamiglio T, Hyjek E, Kao J, et al. Diagnostic usefulness of HBME1, galectin-3, CK19, and CITED1 and evaluation of their expression in encapsulated lesions with questionable features of papillary thyroid carcinoma[J]. *Am J Clin Pathol*, 2006,126(5):700-708.
- [15] Murphy A J, de Caestecker C, Pierce J, et al. CITED1 expression in liver development and hepatoblastoma[J]. *Neoplasia*, 2012,14(12):1153-1163.
- [16] Murphy A J, Pierce J, de Caestecker C, et al. CITED1 confers stemness to Wilms tumor and enhances tumorigenic responses when enriched in the nucleus[J]. *Oncotarget*, 2014,5(2):386-402.
- [17] Nikiforov Y E, Nikiforova M N. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2011,7(10):569-580.
- [18] Shi G, Boyle S C, Sparrow D B, et al. The transcriptional activity of CITED1 is regulated by phosphorylation in a cell cycle-dependent manner[J]. *J Biol Chem*, 2006,281(37):27426-27435.
- [19] Da S S, Thornton M E, Petrosyan A, et al. Direct Isolation and Characterization of Human Nephron Progenitors[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017,6(2):419-433.
- [20] Brown A C, Muthukrishnan S D, Guay J A, et al. Role for compartmentalization in nephron progenitor differentiation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013,110(12):4640-4645.
- [21] Watanabe R, Hayashi Y, Sassa M, et al. Possible involvement of BRAFV600E in

- altered gene expression in papillary thyroid cancer[J]. *Endocr J*, 2009,56(3):407-414.
- [22] Lovvorn H N, Westrup J, Opperman S, et al. CITED1 expression in Wilms' tumor and embryonic kidney[J]. *Neoplasia*, 2007,9(7):589-600.
- [23] Cantelli G, Orgaz J L, Rodriguez-Hernandez I, et al. TGF-beta-Induced Transcription Sustains Amoeboid Melanoma Migration and Dissemination[J]. *Curr Biol*, 2015,25(22):2899-2914.
- [24] Schulten H J, Hussein D, Al-Adwani F, et al. Microarray expression profiling identifies genes, including cytokines, and biofunctions, as diapodesis, associated with a brain metastasis from a papillary thyroid carcinoma[J]. *Am J Cancer Res*, 2016,6(10):2140-2161.
- [25] MacDonald B T, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases[J]. *Dev Cell*, 2009,17(1):9-26.
- [26] Wen D, Liao T, Ma B, et al. Downregulation of CSN6 attenuates papillary thyroid carcinoma progression by reducing Wnt/beta-catenin signaling and sensitizes cancer cells to FH535 therapy[J]. *Cancer Med*, 2018,7(2):285-296.
- [27] Li K, Xu X, He Y, et al. P21-activated kinase 7 (PAK7) interacts with and activates Wnt/beta-catenin signaling pathway in breast cancer[J]. *J Cancer*, 2018,9(10):1821-1835.
- [28] Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer[J]. *Oncogene*, 2017,36(11):1461-1473.
- [29] Sastre-Perona A, Santisteban P. Role of the wnt pathway in thyroid cancer[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2012,3:31.
- [30] Sun Y, Kolligs F T, Hottiger M O, et al. Regulation of beta -catenin transcription by the p300 transcriptional coactivator[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000,97(23):12613-12618.
- [31] Takemaru K I, Moon R T. The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression[J]. *J Cell Biol*, 2000,149(2):249-254.

文献综述

碘难治性分化型甲状腺癌治疗的研究进展

摘要: 大多数分化型甲状腺癌(differentiated thyroid cancer, DTC)可以通过“手术+¹³¹I 治疗+促甲状腺激素抑制”治疗模式获得良好的预后;然而,一小部分 DTC 的患者在治疗或自然病程进展中丧失了碘摄取能力而发展成为碘难治性 DTC(radioiodine-refractory DTC, RAIR-DTC)。随着对 RAIR-DTC 分子生物学的深入研究,靶向药物治疗为 RAIR-DTC 提供了新的治疗方法。为进一步提升治疗 RAIR-DTC 患者的临床疗效,改善患者预后,本研究就 RAIR-DTC 的治疗进展进行综述。

关键词: 分化型甲状腺癌, 碘难治性, 靶向治疗, 进展

甲状腺癌是临床上较为常见的头颈部恶性肿瘤,常根据病理将甲状腺癌分为乳头状甲状腺癌、滤泡状甲状腺癌、髓样甲状腺癌及未分化型甲状腺癌 4 种类型,其中乳头状甲状腺癌(PTC)及滤泡状甲状腺癌(FTC)均属于分化型甲状腺癌(differentiated thyroid cancer, DTC)。DTC 细胞具有共同的生理特性,即在促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone, TSH)的调节作用下从血液中摄取碘并合成甲状腺激素,放射性碘(radioiodine, RAI)治疗正是利用这一共同特征来达到治疗效果的。绝大多数的 DTC 患者可通过“手术+¹³¹I 治疗+促甲状腺激素抑制”治疗获得良好的预后^[1,2],但是一小部分(2-5%) DTC 在治疗过程或自然病程中,肿瘤细胞形态和功能将发生退行性变化,分化表型逐渐缺失导致摄碘能力丧失,从而发展成为碘难治型分化型甲状腺癌(radioiodine-refractory DTC, RAIR-DTC)^[3-6]。DTC 患者主要的死因是远处转移。研究表明,远处转移病灶的碘摄取能力与 DTC 患者的预后密切相关^[7,8],摄碘的患者 10 年生存率可达 56%,而不摄碘患者 10 年生存率低于 10%^[8]。因此,RAIR-DTC 的相关研究已成为目前甲状腺癌领域研究的难点和热点。本文将结合国内外相关文献,详细阐述现阶段 RAIR-DTC 的治疗进展。

1 局部治疗

当 DTC 复发或转移的癌灶局限、在身体的关键部位构成致命风险或者伴随临床症状时，局部治疗需要被考虑。治疗方式包括手术切除、化疗药物栓塞、体外放疗、射频消融术和冷冻消融术等方式。DTC 患者约 15-30%发生转移，而远处转移占其中的 5-10%。在所有的远处转移部位中，肺转移是最常见的，发生率约 50%；骨转移仅随其后，发生率约 25%；而同时发生肺转移与骨转移者占 20%^[8]。立体定向放疗(stereotactic body radiotherapy, SBRT)、调强放疗(intensity-modulated radiotherapy, IMRT)、射频消融(radiofrequency ablation, RFA)及冷冻治疗为较常采用的局部治疗手段。2015 年 ATA 指南强烈推荐：对于具有局部并发症伴高危风险的远处转移 RAIR-DTC 患者，在进行全身系统治疗之前，应优先选择 SBRT、RFA 或冷冻治疗等局部治疗方法^[9]。研究报道，发生局部肺转移的患者在进行手术治疗或者外放射治疗（external beam radiotherapy treatment, EBRT)等局部治疗控制后，患者反应治疗疗效较好^[10]。同样对于 DTC 伴骨转移的患者，尤其是骨折风险高、骨痛明显和存在脊髓压迫潜在风险的患者，可以考虑应用体外放疗减轻相应临床症状以改善患者生存质量^[11]。

2 全身治疗

随着对 RAIR-DTC 分子生物学的深入研究，许多分子靶向治疗药物已显示出良好的应用前景。分子靶向药物通过干预或阻止肿瘤细胞特定的基因/分子改变，从而在分子生物学层面遏制肿瘤的恶性生物学行为。在未来，分子靶向药物治疗有望成为 RAIR-DTC 患者的主要治疗方式，它所针对的靶点包括血管内皮生长因子(VEGF)、磷脂酰肌醇激酶(P13K)和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路。

2.1 索拉非尼

索拉非尼是一种口服多激酶抑制剂，可抑制 RAF-1、B-RAF 激酶活性，以及 VEGFR-2、VEGFR-3、PDGFR- β 、KIT 等多种受体的酪氨酸激酶活性^[12]。2005 年 FDA 批准索拉非尼用于治疗晚期肾癌患者；2007 年该药物的适应证又再次扩大，也可用于治疗不能手术切除的肝癌患者。一项 III 期临床试验研究表明，索拉非尼应用

于局部晚期、转移性和 RAIR-DTC 患者时有显著的疗效, 该研究是将来自 18 个国家 77 个中心的 417 例患者随机分为索拉非尼组和安慰剂组进行观察, 随着疾病的进展, 安慰剂组患者可进入索拉非尼组, 其主要观察结果为无进展生存期。结果显示索拉非尼组无进展生存期显著长于安慰剂组(10.8 个月比 5.8 个月)^[13], 这一研究成果使索拉非尼在美国获得了继转移性肾癌和进展期肝癌之后的第三项适应症, 索拉非尼于 2017 年 3 月在中国也获得了批准。

2.2 乐伐替尼

乐伐替尼是另一种口服多受体酪氨酸激酶抑制剂, 可抑制 VEGFR1-3、PDGFR、RET、FGFR1-4 和 c-Kit 等激酶活性。2015 年 2 月乐伐替尼在美国上市, 其适应症主要是针对有局部复发、转移或进展性 DTC 及 RR-DTC 患者的治疗^[14]。其第 III 阶段临床试验主要研究对比了乐伐替尼与安慰剂在 RAIR-DTC 患者的作用。结果显示, 乐伐替尼显著延长了患者的无进展生存期(18.3 个月比 3.6 个月)。同时这项研究中的 392 例患者应用乐伐替尼后出现了前所未有的反应率, 其反应率为 64.8%, 而安慰剂组仅仅只有 1.5%^[15]。2018 年, Hewett^[16]等综合阐述了乐伐替尼的临床应用前景。除此之外, 乐伐替尼还被用于治疗 MTC。因此, 无论是 RR-DTC 患者还是 MTC 患者, 乐伐替尼作为新型靶向药物均有较高的潜在应用价值^[17]。

2.3 凡德他尼

凡德他尼也是一种口服的小分子多靶点酪氨酸激酶抑制剂, 它主要成分是化学合成的苯胺喹唑啉。除可同时抑制多种酪氨酸激酶外, 还可选择性地抑制丝氨酸/苏氨酸等激酶。由于它的多靶点联合阻断信号传导作用, 凡德他尼成为了一种肿瘤多通道信号传导抑制剂。2012 年, Lancet 上发表了关于凡德他尼的随机、对照、双盲的 II 期临床试验^[18]。该研究纳入了来自 16 个欧洲医学中心的 145 例进展性或转移性 RR-DTC 患者, 其中 HTC 57 例(39.3%)、PTC 49 例(33.8%)、FTC 20 例(13.8%)。结果显示, 凡德他尼组的无进展生存期明显长于安慰剂组(11.1 个月比 5.9 个月)。凡德他尼的 III 期临床研究共纳入了 331 例 MTC 患者, 其按 2:1 比例平均分为凡德他尼组(500mg/d)和安慰剂组, 主要研究终点为 PFS。24 个月的中

位随访时间后，结果表明，37%的患者进展，15%的患者死亡；与安慰剂组相比，治疗组的 PFS 风险比为 0.46^[19]。

2.4 分子靶向治疗挑战

近年来，随着 RAIR-DTC 的分子机制研究取得不断进步，许多分子靶向治疗药物已显示出广阔的应用前景。但同时，我们可以发现即使一些 RAIR-DTC 患者已经处在碘的难治性状态下，其仍可生存相当长时间，因此有关靶向治疗的最佳时机的选择仍是当前的难点。当 RAIR-DTC 患者处于病情稳定或缓慢无快速进展状态时，目前各指南均建议不必立即开始其他相关的治疗。TSH 抑制治疗可以继续，并且每 3~12 个月密切监测血清学及影像学改变^[20-22]。且分子靶向治疗药物虽然延长了患者的无进展时间，但是现阶段没有确切证据表明其可以延长 DTC 患者的生存时间，故患者靶向药物治疗对患者长远影响来看是否真的受益并不明确；同时 RAIR-DTC 易发于老年人群，该人群对靶向药物不良反应如腹泻、厌食、乏力、手足皮肤反应以及高血压等耐受能力较差，故对于同时患有高血压的老年患者而言，应用靶向药物无疑还会增加该类患者心脑血管疾病的发生率，其对患者也会带来一定的危害，对于此类患者应当权衡利弊，决定是否使用靶向药物，或适当减量^[23]。另外关于分子靶向治疗药物的停药时机，肿瘤学的停药原则是：在治疗过程中疾病再次出现进展时，或出现难以耐受的不良反应时停药。然而，一旦停止这些增殖通路的抑制剂，肿瘤生长可能会激增^[24]，目前没有较好的应对方法。

3 总结

RAIR-DTC 是目前甲状腺癌治疗的难点。通过对 RAIR-DTC 患者进行个体化的管理和治疗，能明显控制患者的病情进展。因此，如何进行 RAIR-DTC 的个体化治疗，如何平衡疗效与不良反应，以及如何改善这些患者的生存率，这将是未来临床研究的重点和努力的方向。

参考文献

- [1] Ibrahim E Y, Busaidy N L. Treatment and surveillance of advanced, metastatic iodine-resistant differentiated thyroid cancer[J]. *Curr Opin Oncol*, 2017,29(2): 151-158.
- [2] Faugeras L, Pirson A S, Donckier J, et al. Refractory thyroid carcinoma: which systemic treatment to use?[J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2018,10:1960367893.
- [3] Jin Y, Van Nostrand D, Cheng L, et al. Radioiodine refractory differentiated thyroid cancer[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2018,125:111-120.
- [4] Cabanillas M, Terris D J, Sabra M. Information for Clinicians: Approach to the patient with progressive radioactive iodine refractory thyroid cancer- When to use systemic therapy[J]. *Thyroid*, 2017.
- [5] Jaber T, Waguespack S G, Cabanillas M E, et al. Targeted Therapy in Advanced Thyroid Cancer to Resensitize Tumors to Radioactive Iodine[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2018,103(10):3698-3705.
- [6] Naoum G E, Morkos M, Kim B, et al. Novel targeted therapies and immunotherapy for advanced thyroid cancers[J]. *Mol Cancer*, 2018,17(1):51.
- [7] van Tol K M, Jager P L, de Vries E G, et al. Outcome in patients with differentiated thyroid cancer with negative diagnostic whole-body scanning and detectable stimulated thyroglobulin[J]. *Eur J Endocrinol*, 2003,148(6):589-596.
- [8] Durante C, Haddy N, Baudin E, et al. Long-term outcome of 444 patients with distant metastases from papillary and follicular thyroid carcinoma: benefits and limits of radioiodine therapy[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006,91(8):2892-2899.
- [9] Haugen B R, Alexander E K, Bible K C, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer[J]. *Thyroid*, 2016,26(1):1-133.

- [10] Spigel D R, Hainsworth J D, Yardley D A, et al. Tracheoesophageal fistula formation in patients with lung cancer treated with chemoradiation and bevacizumab[J]. *J Clin Oncol*, 2010,28(1):43-48.
- [11] Qiu Z L, Song H J, Xu Y H, et al. Efficacy and survival analysis of ¹³¹I therapy for bone metastases from differentiated thyroid cancer[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011,96(10):3078-3086.
- [12] Duntas L H, Bernardini R. Sorafenib: rays of hope in thyroid cancer[J]. *Thyroid*, 2010,20(12):1351-1358.
- [13] Brose M S, Nutting C M, Jarzab B, et al. Sorafenib in radioactive iodine-refractory, locally advanced or metastatic differentiated thyroid cancer: a randomised, double-blind, phase 3 trial[J]. *Lancet*, 2014,384(9940):319-328.
- [14] 王凌霄, 肖典, 周辛波. 口服多靶点酪氨酸激酶抑制剂——乐伐替尼[J]. *临床药物治疗杂志*, 2015,13(05):11-14.
- [15] Schlumberger M, Tahara M, Wirth L J, et al. Lenvatinib versus placebo in radioiodine-refractory thyroid cancer[J]. *N Engl J Med*, 2015,372(7):621-630.
- [16] Hewett Y, Ghimire S, Farooqi B, et al. Lenvatinib - A multikinase inhibitor for radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer[J]. *J Oncol Pharm Pract*, 2018,24(1):28-32.
- [17] Cabanillas M E, Habra M A. Lenvatinib: Role in thyroid cancer and other solid tumors[J]. *Cancer Treat Rev*, 2016,42:47-55.
- [18] Leboulleux S, Bastholt L, Krause T, et al. Vandetanib in locally advanced or metastatic differentiated thyroid cancer: a randomised, double-blind, phase 2 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2012,13(9):897-905.
- [19] Wells S J, Robinson B G, Gagel R F, et al. Vandetanib in patients with locally advanced or metastatic medullary thyroid cancer: a randomized, double-blind phase III trial[J]. *J Clin Oncol*, 2012,30(2):134-141.
- [20] Haugen B R. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: What is new and what has changed?[J]. *Cancer*, 2017,123(3):372-381.

- [21] 谭建, 李亚明. 再谈¹³¹I治疗分化型甲状腺癌[J]. 标记免疫分析与临床, 2014,21(01):1-3.
- [22] 林岩松, 张彬, 梁智勇, 等. 复发转移性分化型甲状腺癌诊治共识[J]. 中国癌症杂志, 2015,25(07):481-496.
- [23] Pitoia F, Jerkovich F. Selective use of sorafenib in the treatment of thyroid cancer[J]. Drug Des Devel Ther, 2016,10:1119-1131.
- [24] Yun K J, Kim W, Kim E H, et al. Accelerated disease progression after discontinuation of sorafenib in a patient with metastatic papillary thyroid cancer[J]. Endocrinol Metab (Seoul), 2014,29(3):388-393.

致 谢

三年的研究生时光匆匆而过，从现实眺望未来，希望自己能继续“脚踏实地，仰望星空”。在此，我谨向所有关心、爱护、帮助过我的人们表示最诚挚的感谢。在您的帮助下，我学会了负责任的生活、学习、工作，懂得“务实、认真、担当、包容”。首先我要衷心的感谢我的导师庞华教授，我学习道路上最重要的引导者，每次在我实验遇到瓶颈时，您的点拨都能使我茅塞顿开；同时还是我人生道路的指明灯，既传授我以临床经验与技术，又教导我为人处世，做一个真正的医务工作者，既是良师，又是益友。然后感谢我的同门，师兄师姐师妹师弟们，我们共同学习，共同进步，感谢你们的包容与理解，关心和支持；因为您的陪伴，三年求学之路多了一份温情少了一份孤独。感谢重庆医科大学附属第一医院核医学科所有老师的教学和指导。最后感谢重庆医科大学生命科学院实验研究中心所有老师对我实验的帮助指导。未来的道路上，希望依然拥有梦想，也珍重现实的幸福。

硕士期间发表文章

- [1] 王英, 庞华, 黄欢, 等. 沉默 CITED1 基因对甲状腺乳头状癌 K1 细胞的生物形态学影响[J]. 肿瘤, 2018,38(09):840-846+900.
- [2] 黄欢, 庞华, 王英, 等. 枸杞多糖对电离辐射所致小鼠骨髓单核细胞凋亡的抑制作用[J]. 环境与职业医学,2018,35(10):933-937.
- [3] Wang Y, Huang H, Hu FQ, et al. CITED1 contributed to the progression of thyroid papillary carcinoma through targeting Wnt/ β -catenin signal pathway[J]. Horm Metab Res(投稿中).
- [4] Huang H, Wang Y, Hu FQ, et al. Lycium barbarum polysaccharide inhibits apoptosis of bone marrow mononuclear cells in mice with radiation injury through mitochondrial pathway[J] (投稿中).