

MAPK抑制剂与组蛋白去乙酰化酶抑制剂对甲状腺癌细胞的联合再分化作用

程凌霄, 刘敏, 靳雨辰, 陈立波

上海交通大学附属第六人民医院核医学科, 上海 200233

[摘要] **背景与目的:** 应用MAPK抑制剂诱导再分化是治疗放射性碘难治性甲状腺癌的一种全新策略, 但其临床有效率偏低。组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitor, HDACI)是另一类诱导甲状腺癌再分化的药物, 将其与MAPK抑制剂联合有可能提高再分化疗效。本研究旨在评估MAPK与HDACI联用是否能提高再分化的效果。**方法:** 采用实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR)、蛋白[质]印迹法(Western blot)、免疫荧光、流式细胞术、放射性核素摄取/流出及克隆形成等实验方法测试BRAF/MEK抑制剂(达拉非尼/司美替尼)及去乙酰化酶抑制剂(帕比司他)单药和联合用药时3种甲状腺癌细胞(BCPAP、K1和BHP 2-7)的碘和糖代谢相关基因的表达水平和功能状态。**结果:** 达拉非尼/司美替尼可以一定程度提高BCPAP和K1细胞中碘代谢相关基因表达并抑制葡萄糖转运体表达; 帕比司他对3种细胞都有一定的再分化作用。达拉非尼/司美替尼与帕比司他联合作用在BCPAP和K1细胞中取得较单药更好的再分化效果, 在BHP 2-7中并未获得比单用帕比司他更明显的效果。**结论:** 对具有BRAF^{V600E}突变的甲状腺癌细胞应用达拉非尼/司美替尼和帕比司他联合用药, 可以获得较单药更好的再分化效果。

[关键词] 甲状腺癌; 再分化治疗; MAPK抑制剂; 组蛋白去乙酰化酶抑制剂; 钠-碘转运体

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2017.11.001

中图分类号: R736.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2017)11-0841-06

Combined redifferentiation via HDAC inhibitor and MAPK inhibitor in thyroid cancer cells CHENG Lingxiao, LIU Min, JIN Yuchen, CHEN Libo (Department of Nuclear Medicine, Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China)

Correspondence to: CHEN Libo E-mail: libochen888@hotmail.com

[Abstract] **Background and purpose:** Redifferentiation therapy with MAPK inhibitor is a novel strategy for radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer, but its efficacy is relatively low. Histone deacetylase inhibitor (HDACI) is another kind of redifferentiation drug, given histone deacetylation at the sodium/iodide symporter (NIS) promoter by histone deacetylase (HDAC) as a mechanism, combined therapy using HDACI and BRAF/MEK inhibitor may produce better effect. In the present study, we assessed whether combining HDACI with BRAF/MEK inhibitor suppressing both BRAF/MEK and HDAC could more effectively induce thyroid gene expression and radioiodine uptake in thyroid cancer cells. **Methods:** We tested iodine and glucose handling gene expression and radioiodine uptake in BCPAP, K1, BHP 2-7 cells treated with dabrafenib/selumetinib and panobinostat alone or in combination using (real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RTFQ-PCR), Western blot, immunofluorescence, flow cytometry, radionuclide uptake/efflux assay and *in vitro* clonogenic assay. **Results:** Dabrafenib/selumetinib induced modest expression of thyroid genes and radioiodine uptake and suppressed GLUT1 expression in BCPAP and K1 cells, panobinostat showed redifferentiation effect in all the cells. Dabrafenib/selumetinib and panobinostat showed synergistic effect on redifferentiation in BCPAP and K1 cells. **Conclusion:** Simultaneously suppressing BRAF/MEK and HDAC

induced more robust expression of thyroid genes and radioiodine uptake in thyroid cancer cells harboring *BRAF*^{V600E} compared with suppressing BRAF/MEK or HDAC alone, which warrants further investigation in animal and clinical trials.

[Key words] Thyroid cancer; Redifferentiation therapy; MAPK inhibitor; Histone deacetylase inhibitor; Sodium-iodide symporter

甲状腺癌是最常见的恶性内分泌肿瘤, 其中分化型甲状腺癌(differentiated thyroid carcinoma, DTC)占全部甲状腺癌的90%^[1]。大多数肿瘤呈相对惰性, 经过手术、¹³¹I消融及TSH替代/抑制治疗, 疾病可治愈。然而, 近5%的DTC发生失分化, 伴随一系列碘代谢相关基因的沉默、肿瘤细胞摄碘率的下降, 最终导致¹³¹I治疗的失败^[2-3]。这些放射性碘难治性分化型甲状腺癌(radioiodine refractory differentiated thyroid carcinoma, RR-DTC)常进展迅速, 伴多处转移, 是甲状腺癌致死的主要原因^[2]。

RR-DTC病灶在¹⁸F-FDG PET-CT检查中常呈阳性, 这是失分化的甲状腺癌细胞GLUT1等糖代谢相关基因表达上调、糖代谢活跃所致^[3-5]。甲状腺癌的失分化、碘代谢相关基因沉默与MAPK通路的激活相关, 而MAPK通路的激活是*BRAF*^{V600E}所致^[4]。我们之前的研究已经证实, MAPK抑制剂(索拉非尼和卡博替尼)可使甲状腺癌细胞再分化, 在提高其摄碘率的同时降低细胞GLUT1表达水平^[6]。其他类似的基础实验结果也表明, BRAF/MEK抑制剂可通过抑制甲状腺癌细胞中异常激活的MAPK通路提高甲状腺癌摄碘率, 表现出良好的临床应用前景^[6-8]。然而, 相关临床试验发现, 司美替尼和达拉非尼只能使部分RR-DTC患者肿瘤摄碘提高。部分患者肿瘤摄碘量并未达到治疗剂量阈值, 其中的具体机制尚未明确^[9-10]。

MAPK通路的激活所致钠-碘转运体(sodium-iodide symporter, NIS)基因启动子区组蛋白去乙酰化是NIS基因沉默的重要机制之一^[11]。包括帕比司他在内的多种组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitor, HDACI)都被发现可以增加甲状腺癌细胞中NIS的表达, 提高摄碘率^[12-14]。据此推测, BRAF/MEK抑制剂联合HDACI可能具有协同再分化作

用, 能较单药更显著地提高摄碘率。

本研究将观察上述联合再分化策略能否较单独应用获得更强的再分化作用, 从而进一步提高细胞的摄碘能力并产生更强的放射性碘毒性。同时, 我们还将评估各种再分化方案下细胞GLUT1的表达及葡萄糖代谢的变化, 进一步揭示¹⁸F-FDG PET-CT在评估再分化疗效方面的作用。

1 材料和方法

1.1 细胞培养和药物

本研究所用细胞系均为乳头状甲状腺癌(papillary thyroid cancer, PTC)细胞。BCPAP细胞购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所细胞库, K1细胞系由中国科学院上海生命科学研究院健康科学研究所惠赠, BHP 2-7细胞系由Jerome M. Hershman教授惠赠。

细胞培养在含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中, 置于37℃、CO₂体积分数为5%的培养箱中。各项试验中, 细胞分别用达拉非尼、司美替尼、帕比司他单独或达拉非尼与帕比司他联合、司美替尼与帕比司他联合处理一定时间, 并用二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)处理组作为对照。

1.2 突变检测及细胞增殖试验

用RNeasy Kit(购自德国Qiagen公司)提取细胞总RNA送检。将3种细胞用药物处理24、48和72 h后, 用Cell Counting Kit-8(购自日本同仁化学研究所)检测, 使用GraphPad Prism 5.0计算IC₅₀。

1.3 细胞周期测试

接种3.0×10⁵个细胞于25 cm²培养瓶中, 过夜, 达拉非尼(0.1 μmol/L)、司美替尼(2.5 μmol/L)、帕比司他(0.05 μmol/L)单独或达

拉非尼(0.1 $\mu\text{mol/L}$)与帕比司他(0.05 $\mu\text{mol/L}$)联合、司美替尼(2.5 $\mu\text{mol/L}$)与帕比司他(0.05 $\mu\text{mol/L}$)联合温育24 h后进行流式细胞术检测,实验重复3次。

1.4 实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR)

接种 3.0×10^5 个细胞于25 cm^2 培养瓶中,过夜,达拉非尼(0.1 $\mu\text{mol/L}$)、司美替尼(2.5 $\mu\text{mol/L}$)、帕比司他(0.05 $\mu\text{mol/L}$)单独或达拉非尼(0.1 $\mu\text{mol/L}$)与帕比司他(0.05 $\mu\text{mol/L}$)联合、司美替尼(2.5 $\mu\text{mol/L}$)与帕比司他(0.05 $\mu\text{mol/L}$)联合作用48 h后提取细胞总RNA。使用QuantiTect Reverse Transcription Kit(购自德国Qiagen公司)由RNA(1 μg)反转录得cDNA。最后,在ABI Prism 7900HT Sequence Detector上进行RTFQ-PCR分析,所用试剂盒SYBR Green MasterMix购自德国Qiagen公司。本实验用18S作为内参。实验重复3次。

1.5 蛋白[质]印迹法(Western blot)

培养的细胞用相应药物处理48 h后,用RIPA裂解细胞,12 000 \times g离心10 min,变性。将蛋白样品电泳,转移到PVDF膜上,封闭后一抗4度温育16 h,二抗室温温育1.5 h,最后曝光检测。本试验所用一抗来源包括:Cell Signaling Technology(p-Erk1/2、Erk1/2、Ac-Histone H3和Histone H3)和Protein tech(NIS、Tg、TPO、TSHR、GLUT1和GLUT3)。

1.6 碘摄取实验

接种 1.5×10^5 个细胞于6孔板上,分别用达拉非尼、司美替尼、帕比司他单独或达拉非尼与帕比司他联合、司美替尼与帕比司他联合处理细胞48 h。进行碘摄取实验时,每组3孔,1孔用于细胞计数,另2孔用含2 μCi NaI的无血清培养基于37 $^\circ\text{C}$ 下温育1 h(其中1孔作为对照用300 $\mu\text{mol/L}$ NaClO_4 预处理30 min)。弃去液体,在冰上将细胞用0.3 mol/L NaOH溶液裂解后用伽玛计数器测得细胞内 ^{125}I 计数。实验重复3次。

1.7 克隆形成实验

采用本课题组以往方法^[15],接种 4×10^2

个细胞于6孔板上,贴壁48 h。此后,加药培养48 h, PBS洗涤,然后实验组每孔细胞用含20 μCi NaI的1 mL完全培养基温育6 h。随后弃去含NaI的培养基,洗涤,并用完全培养基继续培养6 d。最后将细胞用4%多聚甲醛固定,结晶紫染色后观察克隆数。实验重复3次。

1.8 统计学处理

细胞周期检测结果用 χ^2 检验进行统计分析。RTFQ-PCR、放射性碘摄取和流出实验数据采用 t 检验分析。所有统计分析均利用SPSS 17.0软件进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 基因突变检测

BCPAP细胞具有 $BRAF^{V600E}$ 突变及野生型 $NRAS$ 基因。K1细胞具有 $BRAF^{V600E}$ 、 $PIK3CA$ 突变及野生型 $NRAS$ 基因。BHP2-7细胞具有 $RET/PTC1$ 重排,其 $BRAF$ 、 $NRAS$ 基因为野生型。

2.2 再分化药物对细胞增殖和周期的影响

BCPAP细胞、K1细胞及BHP2-7细胞中达拉非尼的 IC_{50} 分别为232、146和315 nmol/L,司美替尼的 IC_{50} 分别为9 274、16 270和23 370 nmol/L,帕比司他的 IC_{50} 分别为62、148和64 nmol/L。当与0.05 $\mu\text{mol/L}$ 帕比司他联合处理细胞时,达拉非尼的 IC_{50} 降低到64、31和148 nmol/L,司美替尼的 IC_{50} 降低到1 800、1 022和4 382 nmol/L。

对照组BCPAP细胞52.8%处于 G_1 期,6.9%处于S期,40.3%处于 G_2 期。BCPAP细胞经MAPK抑制剂或帕比司他处理24 h后, G_1 期细胞均较对照组明显增多($P < 0.01$);用MAPK抑制剂联合帕比司他作用于BCPAP细胞, G_1 期细胞均较单药组增多(图1)。

2.3 碘和糖代谢相关基因的表达

达拉非尼或司美替尼作用细胞48 h后,BCPAP和K1细胞的碘代谢相关基因(NIS 、 Tg 、 TPO 及 $TSHR$)的mRNA表达量有所增加, $GLUT1$ 基因的mRNA表达量有所减少,而 $GLUT3$ 基因的表达水平无明显变化。BHP2-7细胞在2种MAPK抑制剂作用下,碘代谢相关基因表达并未

出现明显变化。将MAPK抑制剂和帕比司他联用后, BCPAP和K1细胞碘代谢相关基因表达显著增加, *GLUT1*基因表达显著减少(图2)。

0.1 μmol/L达拉非尼抑制BCPAP和K1细胞p-ERK的表达(图3)。0.05 μmol/L帕比司他可使3种细胞乙酰化组蛋白H3表达量增加。

2.4 放射性碘摄取

达拉非尼、司美替尼、帕比司他处理组

BCPAP和K1细胞放射性碘摄取均高于对照组 ($P<0.05$, 图4)。BCPAP和K1细胞在MAPK抑制剂和帕比司他联合处理后, 摄碘率较单药作用均进一步提高($P<0.05$)。BHP 2-7在MAPK抑制剂作用下摄碘率并未见提高($P>0.05$); 帕比司他单独或联合MAPK抑制剂时摄碘率均有所提高($P<0.05$)。所有药物提高摄碘率的作用均会被NaClO₄阻断。

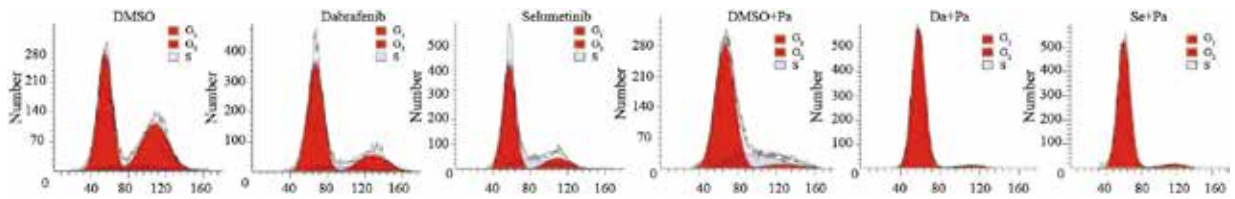


图1 达拉非尼、司美替尼、帕比司他单独或联合对BCPAP细胞周期的影响

Fig. 1 Influence of dabrafenib, selumetinib and panobinostat alone or in combination on cell cycle of BCPAP cells

Da: Dabrafenib; Se: Selumetinib; Pa: Panobinostat

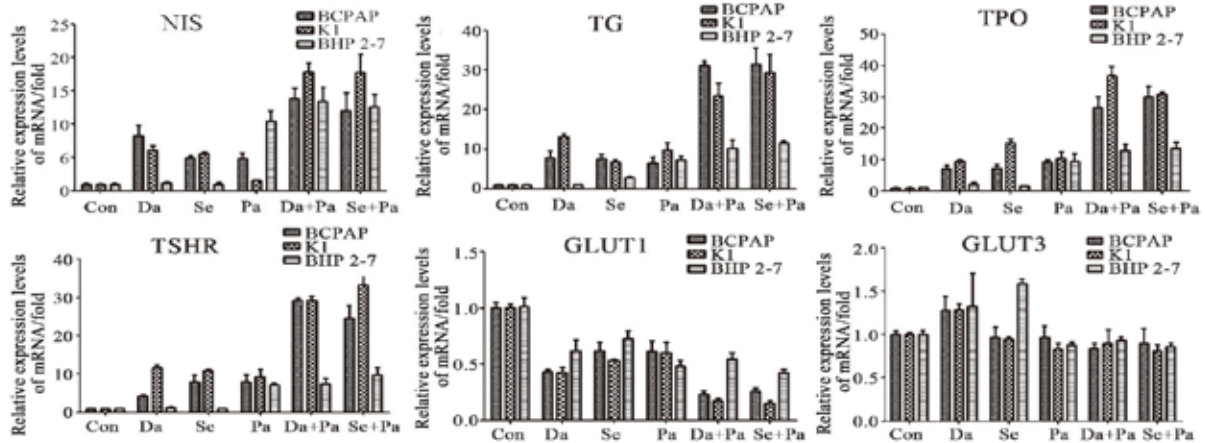


图2 达拉非尼、司美替尼、帕比司他单独或联合对PTC细胞碘糖代谢基因mRNA表达量的影响

Fig. 2 Influence of dabrafenib, selumetinib and panobinostat alone or in combination on mRNA level of iodine and glucose handling genes in PTC cells

Con: Control; Da: Dabrafenib; Se: Selumetinib; Pa: Panobinostat

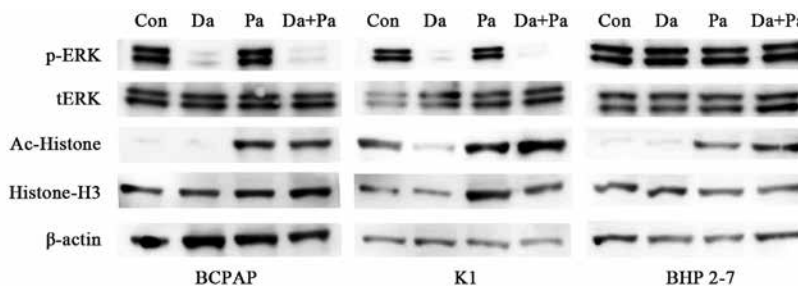


图3 达拉非尼、帕比司他单独或联合对PTC细胞p-ERK及Ac-Histone表达量的影响

Fig. 3 Influence of dabrafenib and panobinostat alone or in combination on p-ERK and Ac-Histone level in PTC cells

Con: Control; Da: Dabrafenib; Pa: Panobinostat

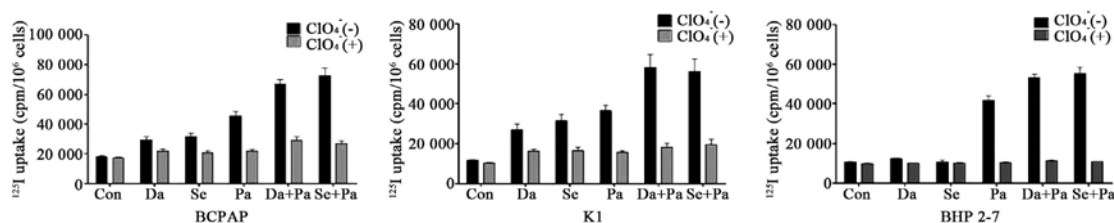


图4 达拉非尼、司美替尼、帕比司他单独或联合对PTC细胞摄碘能力的影响

Fig. 4 Influence of dabrafenib, selumetinib and panobinostat alone or in combination on radioiodine uptake in PTC cells

Con: Control; Da: Dabrafenib; Se: Selumetinib; Pa: Panobinostat

2.5 ¹³¹I 毒性实验

经达拉非尼、司美替尼或帕比司他单药并用¹³¹I处理组的BCPAP细胞克隆数明显少于对照组($P < 0.05$)。MAPK抑制剂、帕比司他、¹³¹I联合处理组的BCPAP细胞克隆数较单药处理组更少($P < 0.05$, 图5)。

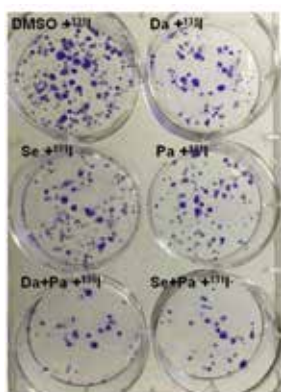


图5 达拉非尼、司美替尼、帕比司他单独或联合对BCPAP细胞¹³¹I细胞毒性作用的影响

Fig. 5 Influence of dabrafenib, selumetinib and panobinostat alone or in combination on ¹³¹I toxicity in BCPAP cells

Con: Control; Da: Dabrafenib; Se: Selumetinib; Pa: Panobinostat

3 讨论

MAPK通路的激活等因素所致的NIS等碘代谢相关基因的沉默通常导致甲状腺癌出现放射性碘抵抗^[4]。相比BRAF/MEK抑制剂,多激酶抑制剂的患者耐受较差,故而BRAF/MEK特异性抑制剂成为诱导RR-DTC再分化并介导¹³¹I治疗的较佳选择^[16-18]。然而,在小样本临床试验中,BRAF/MEK抑制剂诱导再分化的有效率并不太高,其原因尚不明确,提高上述MAPK抑制

剂诱导再分化效能的研究十分必要^[9-10]。

帕比司他是一种新型HDACI,以往的体外实验显示,其可以提高分化型甲状腺癌NIS蛋白表达水平及摄碘能力^[14]。本研究中,对于携带BRAF^{V600E}突变的PTC细胞,用帕比司他与MAPK抑制剂联合作用后,其碘代谢相关基因表达较单药处理进一步提高,细胞膜上NIS蛋白表达更多,摄碘率进一步提高,放射性碘对细胞毒性作用也比单一用药更加明显。两类药物协同再分化作用的原因可能是,NIS启动子区组蛋白去乙酰化导致其沉默,而BRAF^{V600E}突变所致MAPK通路激活可导致NIS启动子区组蛋白去乙酰化,因而MAPK抑制剂和HDACI联合,可以强有力地抑制NIS启动子区组蛋白去乙酰化,从而显著提高NIS表达水平^[11]。

甲状腺癌细胞的碘和糖代谢之间存在“跷跷板”效应^[5]。随着肿瘤细胞的失分化,碘代谢相关基因下调, GLUT1表达上调,故而低分化甲状腺癌细胞摄取¹⁸F-FDG能力提高^[3,5]。在我们此前的研究中, BHP2-7细胞经多激酶抑制剂再分化治疗后, GLUT1、GLUT3表达和¹⁸F-FDG摄取率降低^[6]; HDACI也曾被发现可以降低肺癌细胞GLUT1的表达^[19]。与之相似地,本研究中的APK抑制剂和HDACI均可降低GLUT1表达,这为用¹⁸F-FDG PET/CT预测再分化治疗效果提供了理论基础。

此外,本研究还发现达拉非尼抑制肿瘤生长及诱导再分化的作用具有选择性,即对携带BRAF^{V600E}突变的BCPAP和K1细胞作用明显,而对不含BRAF^{V600E}突变的BHP 2-7细胞无显著作用。这一现象与之前一些研究中BRAF抑制剂的

BRAF^{V600E}突变依赖性类似^[20-21]。本研究中司美替尼的作用也具有选择性, BHP 2-7细胞疗效较差, 可能是因为该细胞系中虽然MAPK通路被抑制, 激活的PI3K/AKT通路依然对肿瘤细胞生长与代谢影响产生重要影响^[22]。该发现可能会为未来甲状腺癌的精准确再分化治疗奠定基础。

[参 考 文 献]

- [1] KITAHARA C M, SOSA J A. The changing incidence of thyroid cancer [J] . Nat Rev Endocrinol, 2016, 12(11): 646-653.
- [2] SCOTT E, LEAROYD D, CLIFTON-BLIGH R J. Therapeutic options in papillary thyroid carcinoma: current guidelines and future perspectives [J] . Future Oncol, 2016, 12(22): 2603-2613.
- [3] KIM S, CHUNG J K, MIN H S, et al. Expression patterns of glucose transporter-1 gene and thyroid specific genes in human papillary thyroid carcinoma [J] . Nucl Med Mol Imaging, 2014, 48(2): 91-97.
- [4] VAISMAN F, CARVALHO D P, VAISMAN M. A new appraisal of iodine refractory thyroid cancer [J] . Endocr Relat Cancer, 2015, 22(6): R301-R310.
- [5] GRABELLUS F, NAGARAJAH J, BOCKISCH A, et al. Glucose transporter 1 expression, tumor proliferation, and iodine/glucose uptake in thyroid cancer with emphasis on poorly differentiated thyroid carcinoma [J] . Clin Nucl Med, 2012, 37(2): 121-127.
- [6] RUAN M, LIU M, DONG Q, et al. Iodide- and glucose-handling gene expression regulated by sorafenib or cabozantinib in papillary thyroid cancer [J] . J Clin Endocrinol Metab, 2015, 100(5): 1771-1779.
- [7] HOU P, BOJDANI E, XING M. Induction of thyroid gene expression and radioiodine uptake in thyroid cancer cells by targeting major signaling pathways [J] . J Clin Endocrinol Metab, 2010, 95(2): 820-828.
- [8] CHAKRAVARTY D, SANTOS E, RYDER M, et al. Small-molecule MAPK inhibitors restore radioiodine incorporation in mouse thyroid cancers with conditional BRAF activation [J] . J Clin Invest, 2011, 121(12): 4700-4711.
- [9] HO A L, GREWAL R K, LEBOEUF R, et al. Selumetinib-enhanced radioiodine uptake in advanced thyroid cancer [J] . N Engl J Med, 2013, 368(7): 623-632.
- [10] ROTHENBERG S M, DANIELS G H, WIRTH L J. Redifferentiation of iodine-refractory *BRAF* V600E-mutant metastatic papillary thyroid cancer with dabrafenib-response [J] . Clin Cancer Res, 2015, 21(24): 5640-5641.
- [11] ZHANG Z, LIU D, MURUGAN A K, et al. Histone deacetylation of NIS promoter underlies *BRAF* V600E-promoted NIS silencing in thyroid cancer [J] . Endocr Relat Cancer, 2014, 21(2): 161-173.
- [12] KELLY W K, O'CONNOR O A, KRUG L M, et al. Phase I study of an oral histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid, in patients with advanced cancer [J] . J Clin Oncol, 2005, 23(17): 3923-3931.
- [13] SHERMAN E J, SU Y B, LYALL A, et al. Evaluation of romidepsin for clinical activity and radioactive iodine reuptake in radioactive iodine-refractory thyroid carcinoma [J] . Thyroid, 2013, 23(5): 593-599.
- [14] PUGLIESE M, FORTUNATI N, GERMANO A, et al. Histone deacetylase inhibition affects sodium iodide symporter expression and induces ¹³¹I cytotoxicity in anaplastic thyroid cancer cells [J] . Thyroid, 2013, 23(7): 838-846.
- [15] CHEN L, ALTMANN A, MIER W, et al. Radioiodine therapy of hepatoma using targeted transfer of the human sodium/iodide symporter gene [J] . J Nucl Med, 2006, 47(5): 854-862.
- [16] CABANILLAS M E, PATEL A, DANYSH B P, et al. BRAF inhibitors: experience in thyroid cancer and general review of toxicity [J] . Horm Cancer, 2015, 6(1): 21-36.
- [17] DADU R, DEVINE C, HERNANDEZ M, et al. Role of salvage targeted therapy in differentiated thyroid cancer patients who failed first-line sorafenib [J] . J Clin Endocrinol Metab, 2014, 99(6): 2086-2094.
- [18] THOMAS L, LAI S Y, DONG W, et al. Sorafenib in metastatic thyroid cancer: a systematic review [J] . Oncologist, 2014, 19(3): 251-258.
- [19] AMOËDO N D, RODRIGUES M F, PEZZUTO P, et al. Energy metabolism in H460 lung cancer cells: effects of histone deacetylase inhibitors [J] . PLoS One, 2011, 6(7): e22264.
- [20] XING J, LIU R, XING M, et al. The *BRAF* T1799A mutation confers sensitivity of thyroid cancer cells to the *BRAF* V600E inhibitor PLX4032 (RG7204) [J] . Biochem Biophys Res Commun, 2011, 404(4): 958-962.
- [21] SALERNO P, DE FALCO V, TAMBURRINO A, et al. Cytostatic activity of adenosine triphosphate-competitive kinase inhibitors in *BRAF* mutant thyroid carcinoma cells [J] . J Clin Endocrinol Metab, 2010, 95(1): 450-455.
- [22] MANFREDI G I, DICITORE A, GAUDENZI G, et al. PI3K/Akt/mTOR signaling in medullary thyroid cancer: a promising molecular target for cancer therapy [J] . Endocrine, 2015, 48(2): 363-370.

(收稿日期: 2017-05-02 修回日期: 2017-08-25)