

PES1上调ER α /ER β 蛋白比率促进甲状腺乳头状癌细胞增殖和侵袭迁移

程 龙^{1,2}, 邱伊波¹, 许琳婉¹, 刘智敏¹

(重庆医科大学 1. 分子医学与肿瘤研究中心, 重庆 400016; 2. 附属第二医院乳腺甲状腺外科, 重庆 400010)

摘要:【目的】研究 PES1 通过上调 ER α /ER β 蛋白比率促进甲状腺乳头状癌(PTC)细胞增殖和侵袭转移的分子机制。【方法】用免疫组化法检测 PES1、ER α 和 ER β 在正常甲状腺组织以及 PTC 组织中的表达情况;用 Western blot 法分别检测正常甲状腺细胞株 Nthy-ori3-1 和 PTC 细胞株 BCPAP 和 K1 中 PES1、ER α 和 ER β 的表达情况,以及 PES1 过表达、PES1 下调时对 Nthy-ori3-1 细胞和 BCPAP 细胞中 ER α 、ER β 蛋白表达比率的影响;用 MTT 以及 Transwell 小室法检测 PES1、ER α 和 ER β 对 PTC 细胞增殖、侵袭和迁移的影响。【结果】在 PTC 组织中 PES1 和 ER α 蛋白表达水平显著高于对应的癌旁正常组织,而 ER β 蛋白的表达水平明显低于对应的癌旁正常组织;随着 PTC 患者恶性程度的逐渐增加,PES1 和 ER α 蛋白水平逐渐升高,ER β 蛋白水平逐渐降低,肿瘤大、有 ETE、有 LNM、高 BRAFV600E 表达和高 TNM 分期(III-IV)的 PTC 患者有较高的 PES1 和 ER α 蛋白表达,而 ER β 蛋白表达较低;在 Nthy-ori3-1 细胞中 ER α /ER β 蛋白比率显著小于 1(≈ 0.43),而在 BCPAP 和 K1 细胞中 ER α /ER β 蛋白比率显著大于 1(≈ 2.25 , ≈ 2.82),PES1 蛋白表达水平与 ER α /ER β 蛋白比率呈正相关;PES1 过表达使 Nthy-ori3-1 细胞中 ER α /ER β 蛋白比率明显增大(≈ 2.54);PES1 下调使 BCPAP 细胞中 ER α /ER β 蛋白比率明显降低(≈ 0.41);PES1 下调使 PTC 细胞增殖、侵袭和迁移能力明显减弱,PES1 过表达使 PTC 细胞增殖、侵袭和迁移能力显著增强。【结论】ER α 和 ER β 在人 PTC 组织和细胞中共表达,PES1 可调节 ER α 和 ER β 之间的平衡,PES1 通过升高 ER α 蛋白水平,同时降低 ER β 蛋白水平,进而上调 ER α /ER β 蛋白比率,促进 PTC 细胞的增殖和侵袭迁移。

关键词: PES1; ER α ; ER β ; 甲状腺乳头状癌

中图分类号: R736.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2020)04-0515-10

PES1 Promotes the Proliferation, Invasion and Migration of Papillary Thyroid Cancer by Upregulating the ER α /ER β Protein Ratio

CHENG Long^{1,2}, QIU Yi-bo¹, XU Lin-wan¹, LIU Zhi-min¹

(1. Molecular Medicine and Cancer Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Department of Surgery for Breast and Thyroid Gland, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University; Chongqing 400010, China)

Correspondence to: LIU Zhi-min; E-mail: liuzm9999@aliyun.com

Abstract:【Objective】To investigate the molecular mechanism of PES1 promoting the proliferation, invasion and migration of papillary thyroid cancer by upregulating the ER α /ER β protein ratio.【Methods】The protein expression level of PES1, ER α , and ER β in normal thyroid tissue specimens and PTC tissue specimens were analyzed by immunohistochem-

收稿日期:2019-10-06

基金项目:国家自然科学基金(81272937)

作者简介:程龙,硕士,医师,研究方向:乳腺癌、甲状腺癌发生发展的机制研究,E-mail:chenglong.0522@163.com;刘智敏,通信作者,硕士生导师、教授,研究方向:甲状腺癌发生发展分子机制,E-mail:liuzm9999@aliyun.com

istry. We performed Western blotting to detect the expression of PES1, ER α and ER β using human PTC-derived BCPAP and K1 cells and normal thyroid-derived Nthy-ori3-1 cells. In Nthy-ori3-1 and BCPAP cells, Western blot was used to detect the effect of PES1 overexpression and PES1 knockdown on the ratio of ER α and ER β protein expression. MTT and Transwell were used to measure the effect of PES1, ER α and ER β on the proliferation, invasion and migration of PTC cells.【Results】The protein expression level of PES1 and ER α in PTC tissues was significantly higher than that in normal adjacent tissues, while the protein expression level of ER β was significantly lower than that in normal adjacent tissues. PES1 and ER α protein levels were gradually increased and ER β protein level was decreased with the degree of malignant behavior of PTC patients. And PTC patients with large tumor size, ETE, LNM, high BRAFV600E expression and high TNM stage (III-IV) had higher rates of high PES1 and ER α protein expression and low ER β protein expression. In Nthy-ori3-1 cells ER α /ER β protein ratio was significantly less than 1 (about 0.43), however, in BCPAP and K1 cells ER α /ER β protein ratio was significantly greater than 1 (about 2.25, about 2.82). The protein expression level of PES1 was positively correlated with the protein ratio of ER α /ER β . The overexpression of PES1 made a significant increase of ER α /ER β protein ratio in Nthy-ori3-1 cells (about 2.54). The down-regulation of PES1 significantly reduced ER α /ER β protein ratio in BCPAP cells (about 0.41). The down-regulation of PES1 decreased the proliferation, invasion and migration of papillary thyroid carcinoma cells, while the overexpression of PES1 significantly enhanced the proliferation, invasion and migration of papillary thyroid carcinoma cells.【Conclusions】ER α and ER β are co-expressed in human PTC tissues and cells. PES1 modulates the balance between ER α and ER β by elevating the ER α protein level and simultaneously reducing the ER β protein level, then up-regulating the ER α /ER β protein ratio and promoting the proliferation, invasion and migration of PTC cells, and then promoting the occurrence and development of PTC.

Key words: PES1; ER α ; ER β ; papillary thyroid carcinoma

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2020, 41(4): 515-524]

甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)是甲状腺癌中最常见的组织学类型,约占甲癌总数的80%,近年来PTC的发病率呈上升趋势。从青春期到绝经期PTC在女性中的发病率是男性的3倍,女性绝经后PTC发病率逐渐下降,且用雌激素替代治疗的女性更易患PTC^[1-2]。这些数据表明雌激素(17 β -Estradiol, E2)在PTC的发生、发展过程中起重要作用^[3]。E2对靶细胞的作用主要是通过雌激素受体ER α 和ER β 介导的,ER α 和ER β 在AF-1和AF-2功能结构与仅有28%和58%的同源性^[4]。结构的差异导致其功能的不同。在雌激素相关肿瘤中,ER α 促进肿瘤发生、发展,而ER β 抑制肿瘤的发生、发展,ER α /ER β 蛋白比率上调大于1,易导致雌激素反应器官肿瘤发生^[5-7]。Pescadillo(PES1)是在研究逆转录病毒诱发的斑马鱼胚胎发育缺陷中发现的,它是一种进化上保守的蛋白质,含有BRCT结构域(BRCA1 C-terminal-domain),在DNA复制和细胞周期调控中发挥重要作用,与细胞增生、恶性转化以及肿瘤的发生、发展有关^[8-10]。近年来有研究发现PES1与乳腺癌和卵巢癌等雌激素相关肿

瘤的发生发展密切相关^[11-12],但有关PES1在PTC中的研究国内外均尚无报道。本研究将通过免疫组化法检测PES1、ER α 和ER β 在正常甲状腺组织以及PTC组织中的表达情况,用Western blot法分别检测Nthy-ori3-1、BCPAP和K1中PES1、ER α 和ER β 的表达情况,以及PES1过表达和PES1下调时对ER α /ER β 蛋白表达比率的影响,最后通过MTT和Transwell小室法检测PES1、ER α 和ER β 蛋白表达水平对PTC细胞增殖、侵袭和迁移的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

收集重庆医科大学附属第二医院三腺外科经病理诊断为PTC的组织标本200例作为实验组,及其对应的癌旁正常组织标本200例作为对照组,研究方案得到重庆医学大学伦理委员会的批准,所有患者均获得知情同意。本实验所用正常甲状腺细胞Nthy-ori3-1,与人PTC细胞系BCPAP均由香港中文大学George G.Chen教授惠赠。

1.2 主要试剂

免疫组织化学SP法试剂盒, DAB显色试剂盒(北京中杉金桥公司);无酚红RPMI1640培养液、RPMI 1640培养液、胎牛血清(FBS;美国Gibco公司);胰蛋白酶、RIPA裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE配胶试剂盒、免疫印迹化学发光剂ECL(碧云天公司);预染蛋白Marker(美国BIORAD公司);羊抗人PES1抗体(美国Gene Tex公司);兔抗人ER α 抗体、兔抗人ER β 抗体、兔抗人 β -actin抗体、兔抗羊二抗、鼠抗兔二抗(Bioworld公司);17 β -雌二醇、PPT、DPN、MTT试剂盒、DMSO(Sigma公司);Matrigel基质胶(美国BD Biosciences公司);Lipofectamine RNAiMAX(美国Invitrogen公司);pcDNA3.1表达载体(Invitrogen);PES1-siRNA、PES1-overexpression vector、Scrambled siRNA、Empty vector序列(上海生工生物工程有限公司)。

1.3 免疫组织化学法

用免疫组织化学染色法,即链霉亲和素-过氧化物酶(sreptavidin-peroxidase, SP)测定PES1、ER α 和ER β 的表达情况。主要步骤为:①将组织标本用10%甲醛固定,石蜡包埋,4 μ m连续切片;②组织切片用二甲苯脱蜡;③枸橼酸钠盐95 $^{\circ}$ C抗原修复;④3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶;⑤滴加一抗(1:100稀释羊抗人PES1抗体;1:100稀释兔抗人ER α 抗体、1:100兔抗人ER β 抗体)4 $^{\circ}$ C过夜;⑥滴加生物素二抗(羊抗兔/兔抗羊);⑦加入HRP标记亲和素(试剂三)37 $^{\circ}$ C, 30 min;⑧DAB显色。用PBS替代一抗,作为阴性对照。

1.4 判断指标

半定量免疫组化(IHC)评分由两名观察员在双盲条件下判定结果。IHC评分基于染色强度和阳性细胞百分比。强度为0(无染色)、1(弱染色)、2(中度染色)3(强染色);百分比为0(<5%阳性细胞)、1(6%~25%阳性细胞)、2(26%~50%阳性细胞)、3(51%~75%阳性细胞)、4(>75%阳性细胞)。强度和百分比的分数乘积为最终的IHC评分:0(阴性)、+(1-4)、++(5-8)、+++ (9-12)。为便于统计分析:0(阴性)和+(1-4)为阴性低表达组;++(5-8)和+++ (9-12)为阳性高表达组。

1.5 细胞培养

将正常甲状腺细胞Nthy-ori3-1以及PTC细胞株BCPAP培养于含10% FBS、100 μ g/mL链霉素和100 U/mL青霉素的RPMI 1640培养基中,置于

37 $^{\circ}$ C、体积分数5% CO_2 饱和湿度孵育箱中培养,细胞贴壁生长,根据细胞生长状态进行换液、传代,对数生长期细胞用于实验。

1.6 siRNA转染和过表达

根据Lipofectamine RNAiMAX使用说明书对Nthy-ori3-1细胞和BCPAP细胞进行转染, siRNA模版如下:PES1-siRNA:5'-CCGCCAGAAGATC-ATGTTTGGCAACTCGAGTTGCCAAACATGATCTT-CTGTTTTTTG-3'; Scrambled-siRNA:5'-CCTAAG-GTTAAGTCGCCCTCGCTCGAGCGAGGCGACTTA-ACCTTAGG-3'。根据Lipofectamine RNAiMAX的制造商使用说明将siRNA转染到Nthy-ori3-1细胞和BCPAP细胞中。将与PES1开放阅读框序列对应的PCR扩增片段插入pcDNA3.1表达载体,根据说明书用Lipofectamine 2000将该表达构建体转染到相应的细胞中。转染后48 h收集细胞,提取细胞总蛋白等进行后续实验。

1.7 蛋白质免疫印迹实验

根据实验目的将处理后的细胞进行分组,收集并裂解Nthy-ori3-1细胞和BCPAP细胞,提取细胞总蛋白。将30 μ g的细胞总蛋白上样后进行10%聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,接着电转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,再用5%的脱脂奶粉封闭1 h, PBST洗膜,加入相应稀释后的一抗,4 $^{\circ}$ C过夜。PBST漂洗3次,每次5 min,加二抗,37 $^{\circ}$ C孵育1.5 h, PBST洗膜后用ECL发光剂显色, Bio-Rad凝胶成像系统采集图像,分析目的条带。实验重复3次。

1.8 MTT法检测细胞增殖

用MTT法检测Nthy-ori3-1和BCPAP细胞的体外增殖能力。细胞经胰酶消化后,制成单细胞悬液。将细胞接种在96孔板中,密度为3 000个/孔。接着培养于37 $^{\circ}$ C, 体积分数5% CO_2 孵育箱中,孵育24 h。细胞贴壁后分组处理细胞,继续培养48 h,每孔加入20 μ L MTT(5 mg/mL)继续培养4 h。将培养基除去,每孔加入150 μ L DMSO,充分溶解。用ELISA平板读数仪在570 nm处测定光密度值,导出结果。实验重复3次。

1.9 Transwell侵袭迁移实验

使用Transwell评价Nthy-ori3-1和BCPAP细胞的体外侵袭和迁移能力。将细胞饥饿处理24 h,将细胞消化、离心、弃去原培养液,再加入无酚红和无血清培养基重新悬浮制成细胞悬液。取200 μ L

静止细胞悬液置于Transwell小室内室中,外室中填充无酚红和血清的培养基,补充E2、PPT或DPN 72 h。对于侵袭试验,将Matrigel按1:8的比例稀释后预涂覆于Transwell小室基底膜的内室面上。最后再加入MTT处理4 h,用棉棒拭去上室底部膜表面残留的细胞。将含有残余细胞的棉棒和外室中迁移或侵入细胞置于含有400 μ L DMSO的24孔板中。轻轻摇动1 h后,取100 μ L样品,用ELISA平板读数仪测量570 nm处的吸光度。迁移或侵入细胞的百分比计算方法为:迁移或侵入细胞的百分比 $=A/(A+B)\times 100$,其中A代表迁移或侵入细胞的吸收率,B表示剩余细胞的吸收率。

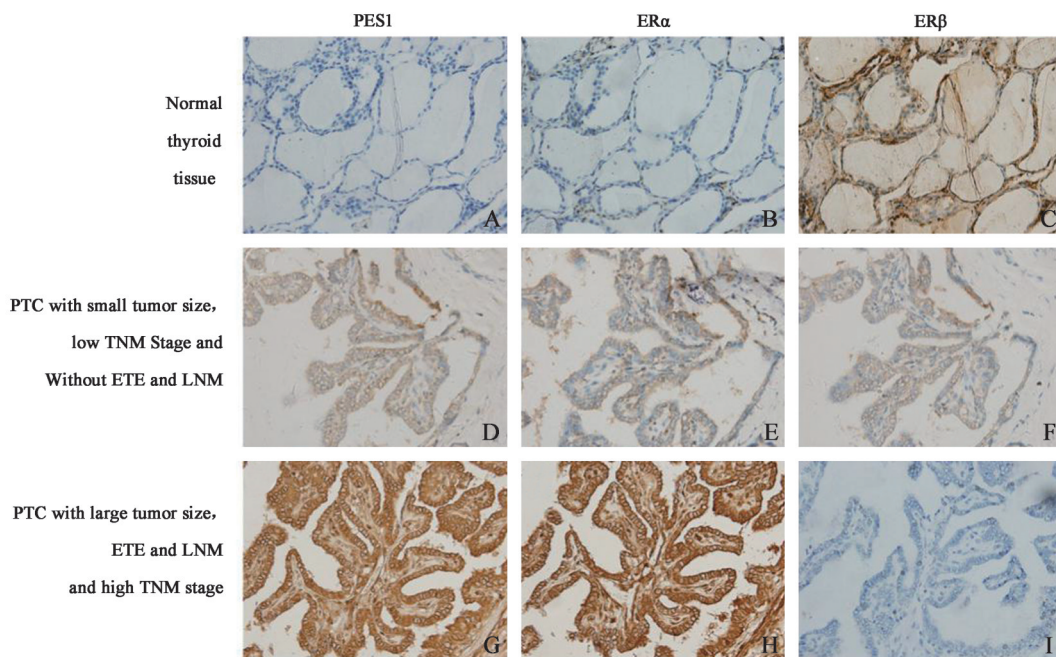
1.10 统计学分析

采用SPSS 18.0软件进行统计学分析。实验重复3次,数据呈正态分布且方差齐的多组间均数差异用One way-ANOVA进行分析,差异有统计学意义时,多个实验组与一个对照组均数比较时用Dunnett-*t*检验,多组间相互比较时采用Bonferroni法进行两两比较。组织标本分析采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 时有统计学意义。

2 结果

2.1 PES1、ER α 和ER β 在正常甲状腺组织以及PTC组织中的表达情况

免疫组化法分析200例PTC组织以及对应的癌旁正常组织发现:在正常甲状腺组织中,PES1几乎没有滤泡细胞染色(图1A),ER α 有少量滤泡细胞弱染色(图1B),ER β 有大量滤泡细胞的强染色(图1C);在恶性程度低的PTC组织中,PES1(图1D)、ER α (图1E)、ER β (图1F)有部分肿瘤细胞中等程度的染色;在恶性程度高的PTC组织中,PES1(图1G)和ER α (H)有大量肿瘤细胞的强染色,ER β (图1I)有少量肿瘤细胞的弱染色。PES1、ER α 和ER β 在PTC中的阳性表达例数分别为104(52%)、103(51.5%)和30(15%),在对应的癌旁正常组织中的阳性表达例数分别为0(0%)、19(9.5%)、112(56%)。PES1和ER α 蛋白在PTC组织中的表达水平明显高于对应的癌旁正常组织($P < 0.001$),而ER β 蛋白的表达水平明显低于对应的癌旁正常组织($P < 0.001$);图1,表1)。



A-C is an example of normal thyroid tissues, showing almost no follicular cells with staining for PES1 (A), a few of follicular cells with weak staining for ER α (B) and a lot of follicular cells with strong staining for ER β (C). D-F is an example of PTC tissues with small tumor size, low BRAFV600E expression and TNM stage I and without ETE and LNM, showing quite a few of tumor cells with moderate staining for PES1 (D), ER α (E) and ER β (F). G-I is an example of PTC tissues with large tumor size, ETE, LNM, high BRAFV600E expression and TNM stage IV, showing a lot of tumor cells with strong staining for PES1 (G) and ER α (H), but a few of tumor cells with weak staining for ER β (I). (SP method, $\times 400$)

图1 PES1、ER α 和ER β 在正常甲状腺组织和PTC组织中的表达

Fig. 1 The expressions of PES1, ER α and ER β in normal thyroid tissue and papillary thyroid carcinoma tissue

2.2 PES1、ER α 和ER β 蛋白表达水平与PTC患者肿瘤恶性程度及预后的相关性

用卡方检验系统评价PES1、ER α 和ER β 蛋白水平与PTC患者临床病理特征的相关性。如表1所示,PTC患者的PES1、ER α 和ER β 蛋白水平与组织学亚型($P = 0.165$ 、 $P = 0.286$ 、 $P = 0.222$)、年龄($P = 0.280$ 、 $P = 0.143$ 、 $P = 0.144$)、性别($P = 0.187$ 、 $P = 0.115$ 、 $P = 0.145$)无统计学显著相关,然而与肿

瘤大小($P = 0.005$ 、 $P = 0.003$ 、 $P = 0.007$)、ETE($P = 0.002$ 、 $P = 0.001$ 、 $P = 0.003$)、LNM($P = 0.004$ 、 $P = 0.006$ 、 $P = 0.003$)、BRAFV600E突变($P = 0.008$ 、 $P = 0.002$ 、 $P = 0.004$)和TNM分期($P = 0.002$ 、 $P = 0.001$ 、 $P = 0.002$)有统计学显著相关。肿瘤恶性程度越高、有BRAFV600E突变,即预后越差的PTC患者PES1、ER α 蛋白表达水平较高,ER β 蛋白表达水平较低。

表1 PES1、ER α 和ER β 在200例PTC患者中的表达及其与临床病理特征的关系

Table 1 Correlations of PES1, ER α and ER β protein levels with clinicopathological characteristics in 200 PTC patients (n)

Characteristics	Case (n)	PES1			ER α			ER β		
		Low	High	P	Low	High	P	Low	High	P
Tissue type										
Normal thyroid tissue	200	200	0		181	19		88	112	
PTC	200	96	104		97	103		170	30	
Classic PTC	142	69	73	<0.001 0.165	70	72	<0.001 0.286	124	18	<0.001 0.222
Follicular Variant of PTC	21	12	9		13	8		18	3	
Tall Cell Variant of PTC	24	7	17		8	16		17	7	
Oncocytic Variant of PTC	13	8	5		6	7		11	2	
Age/year										
< 45	24	14	10	0.280	15	9	0.143	18	6	0.144
≥ 45	176	82	94		82	94		152	24	
Gender										
Male	46	26	20	0.187	27	19	0.115	36	10	0.145
Female	154	70	84		70	84		134	20	
Tumor size /cm										
T1 ≤ 2	62	39	23	0.005	41	21	0.003	46	16	0.007
2 < T2 ≤ 4	71	34	37		31	40		61	10	
T3 > 4	67	23	44		25	42		63	4	
Extrathyroid extension (ETE)										
Positive	161	86	75	0.002	87	74	0.001	131	30	0.003
Negative	39	10	29		10	29		39	0	
Lymph node metastasis (LNM)										
Positive	110	63	47	0.004	63	47	0.006	86	24	0.003
Negative										
BRAFV600E										
Low	90	33	57	0.008	34	56	0.002	84	6	0.004
High	67	41	26		43	24		50	17	
	133	55	78		54	79		120	13	
TNM stage										
I - II	100	59	41	0.002	60	40	0.001	77	23	0.002
III - IV	100	37	63		37	63		93	7	

P-values derived using Chi-square test to compare the protein levels of PES1, ER α and ER β between subgroups defined by each clinicopathological parameter; $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

2.3 PES1、ER α 和ER β 在正常甲状腺细胞Nthy-ori3-1以及PTC细胞BCPAP和K1中的表达情况

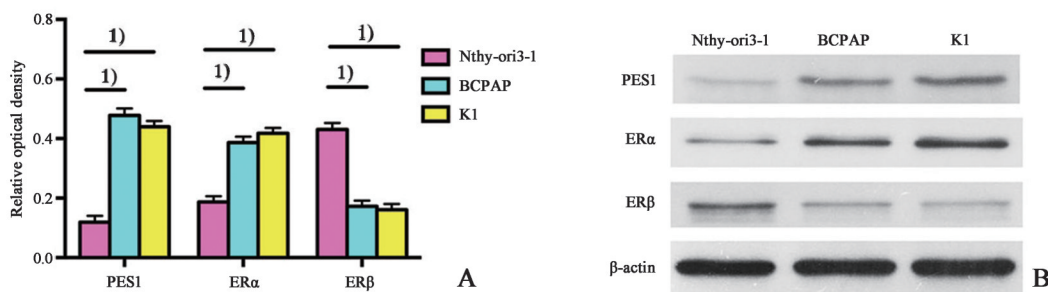
提取正常甲状腺细胞Nthy-ori3-1以及PTC细胞BCPAP和K1中的细胞总蛋白,Western blot方法检测PES1、ER α 及ER β 的表达情况。结果显示:经方差分析3组之间有显著差异PES1($F = 262.170$, $P < 0.001$)、ER α ($F = 129.870$, $P < 0.001$)、ER β ($F = 166.257$, $P < 0.001$),进一步用Dunnett- t 检验对PTC细胞与正常甲状腺细胞进行相互比较,较正常甲状腺细胞Nthy-ori3-1,PTC细胞株BCPAP中PES1($P < 0.001$)和ER α ($P < 0.001$)蛋白表达水平显著增高,而ER β 蛋白表达水平显著降低($P < 0.001$),K1中PES1($P < 0.001$)和ER α ($P < 0.001$)蛋白表达水平显著增高,而ER β 蛋白表达水平显著降低($P < 0.001$)。为了定量测定Nthy-ori3-1、BCPAP和K-1细胞中的ER α /ER β 蛋白比率,分别测定这3种细胞中ER α 和ER β 的蛋白浓度,在正常甲状腺细胞Nthy-ori3-1中,ER α 蛋白表达水平显著低于ER β 蛋白表达水平($t = 14.440$, $P < 0.001$),ER α 和ER β 蛋白浓度分别为10.13 fmol/30 μ g和23.56 fmol/30 μ g,ER α /ER β 蛋白比率小于1(≈ 0.43);在PTC细胞BCPAP($t = 13.432$, $P < 0.001$)和K1($t = 16.475$, $P < 0.001$)中,ER α 蛋白表达水平显著高于ER β 蛋白表达水平,BCPAP细胞中的ER α 和ER β 蛋白浓度分别为28.96 fmol/30 μ g和12.87 fmol/30 μ g, K-1细胞中的ER α 和ER β 蛋白浓度分别为34.37 fmol/30 μ g和12.19 fmol/30 μ g,ER α /ER β 蛋白比率大于1(≈ 2.25 , ≈ 2.82)。在3组甲状腺细胞中,PES1蛋白表达水平与ER α /ER β 蛋白比率呈正相关(图2)。

2.4 Nthy-ori3-1细胞中PES1过表达对ER α 和ER β 蛋白表达比率的影响

分别用Empty vector和PES1 Overexpression vector转染Nthy-ori3-1细胞,用Western blot方法检测ER α 和ER β 的表达情况,Veh为空白对照组,Empty vector为阴性对照组,PES1 Overexpression vector为实验组。结果显示:经方差分析3组之间有显著差异PES1($F = 208.227$, $P < 0.001$)、ER α ($F = 359.995$, $P < 0.001$)、ER β ($F = 72.189$, $P < 0.001$),进一步用Bonferroni法进行两两比较,实验组中PES1和ER α 蛋白表达水平显著高于相应的空白对照组($P < 0.001$)和阴性对照组($P < 0.001$),而ER β 蛋白表达水平显著低于空白对照组($P < 0.001$)和阴性对照组($P < 0.001$),PES1过表达使Nthy-ori3-1细胞中ER α 表达增高,ER β 表达降低,ER α 和ER β 蛋白浓度分别为35.26 fmol/30 μ g和13.88 fmol/30 μ g,ER α /ER β 蛋白比率(≈ 2.54)明显增大。空白对照组与阴性对照组间差异无统计学意义($P = 0.339$, $P = 0.237$, $P = 0.253$,图3)。

2.5 BCPAP细胞中PES1下调对ER α 和ER β 蛋白表达比率的影响

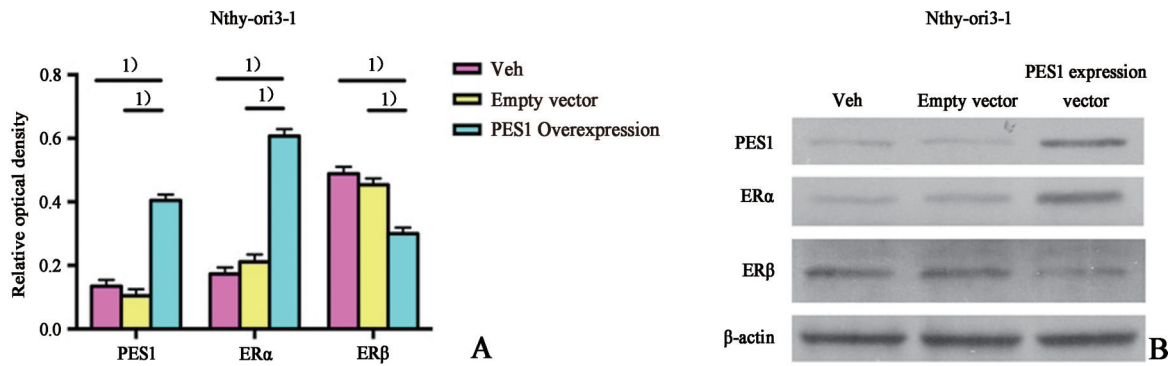
分别用scrambled-siRNA和PES1-siRNA转染BCPAP细胞,用Western blot方法检测ER α 和ER β 的表达情况,Veh为空白对照组,scrambled-siRNA为阴性对照组,PES1-siRNA为实验组。结果显示:经方差分析3组之间有显著差异PES1($F = 121.433$, $P < 0.001$)、ER α ($F = 110.885$, $P < 0.001$)、ER β ($F = 88.100$, $P < 0.001$),进一步用Bonferroni法进行两两比较,实验组中PES1和ER α 蛋白表达水平



A: The concentrations of PES1, ER α and ER β protein in BCPAP, K1 and Nthy-ori3-1 cells. B: Blot examples of PES1, ER α and ER β protein levels in BCPAP, K1 and Nthy-ori3-1 cells. 1) $P < 0.001$, PES1 ($F = 262.170$, $P < 0.001$), ER α ($F = 129.870$, $P < 0.001$), ER β ($F = 166.257$, $P < 0.001$), vs. Nthy-ori3-1 group. $n = 3$.

图2 在PTC细胞BCPAP、K-1和正常甲状腺细胞Nthy-ori3-1中PES1、ER α 和ER β 的蛋白表达水平

Fig. 2 PES1, ER α and ER β protein levels in human PTC-derived BCPAP and K1 cells and normal thyroid-derived Nthy-ori3-1 cells



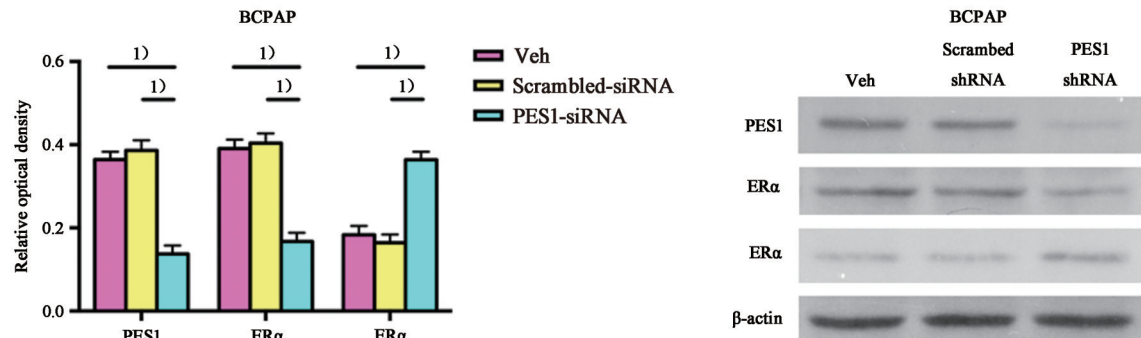
A: The concentrations of PES1, ER α and ER β protein in Nthy-ori3-1 cells. B: Blot examples of PES1, ER α and ER β protein levels in Nthy-ori3-1 cells. 1) $P < 0.001$, PES1 ($F = 208.227$, $P < 0.001$), ER α ($F = 359.995$, $P < 0.001$), ER β ($F = 72.189$, $P < 0.001$), $n = 3$.

图3 在正常甲状腺细胞Nthy-ori3-1中PES1过表达时ER α 蛋白表达增高,ER β 的蛋白表达降低

Fig. 3 In normal thyroid cells, the over-expression of PES1 elevated the ER α protein level and simultaneously reduced the ER β protein level

显著低于相应的空白对照组 ($P < 0.001$) 和阴性对照组 ($P < 0.05$), 而ER β 蛋白表达水平显著高于空白对照组 ($P < 0.001$) 和阴性对照组 ($P < 0.001$), PES1下调使BCPAP细胞中ER α 表达降低, ER β 表

达增高, ER α 和ER β 蛋白浓度分别为11.73 fmol/30 μ g和28.61 fmol/30 μ g, ER α /ER β 蛋白比率(≈ 0.41)明显降低。空白对照组与阴性对照组间差异无统计学意义 ($P = 0.742$, $P = 1.000$, $P = 0.883$, 图4)。



A: The concentrations of PES1, ER α and ER β protein in BCPAP cells. B: Blot examples of PES1, ER α and ER β protein levels in BCPAP cells. 1) $P < 0.001$, PES1 ($F = 121.433$, $P < 0.001$), ER α ($F = 110.885$, $P < 0.001$), ER β ($F = 88.100$, $P < 0.001$), $n = 3$

图4 在BCPAP细胞中PES1过下调时ER α 蛋白表达降低,ER β 的蛋白表达增高

Fig. 4 In BCPAP cells, the down-regulation of PES1 reduced the ER α protein level and simultaneously elevated the ER β protein level

2.6 PES1、ER α 和ER β 对PTC细胞增殖、侵袭和迁移的影响

实验共设8组,分别为Veh组、E2组、PPT组(ER α 激动剂)、DPN(ER β 激动剂)组、E2+scrambled-siRNA组、E2+Empty vector组、E2+PES1-siRNA组、E2+PES1 Overexpression组, E2浓度均为 10^{-8} mol/L,处理24 h。MTT法检测细胞的增殖能力,Transwell小室法检测细胞侵袭和迁移能力,结果显示:经方差分析Veh组、E2组、PPT组和DPN组间差有显著差异 Nthy-ori3-1 ($F_{增殖} = 38.131$, $P <$

0.001)、($F_{侵袭} = 29.524$, $P < 0.001$)、($F_{迁移} = 45.105$, $P < 0.001$); BCPAP ($F_{增殖} = 151.372$, $P < 0.001$), ($F_{侵袭} = 93.971$, $P < 0.001$)、($F_{迁移} = 140.437$, $P < 0.001$)。进一步用Dunnett-t检验对各实验组与Veh组进行相互比较,与Veh组相比, PPT组 Nthy-ori3-1和BCPAP细胞增殖 ($P = 0.002$, $P < 0.001$)、侵袭 ($P = 0.003$, $P < 0.001$)和迁移 ($P < 0.001$, $P < 0.001$)能力显著增强; DPN组 Nthy-ori3-1和BCPAP细胞增殖 ($P = 0.002$, $P = 0.013$)、侵袭 ($P = 0.008$, $P = 0.046$)和迁移 ($P = 0.018$, $P = 0.031$)能力显著减弱; E2组

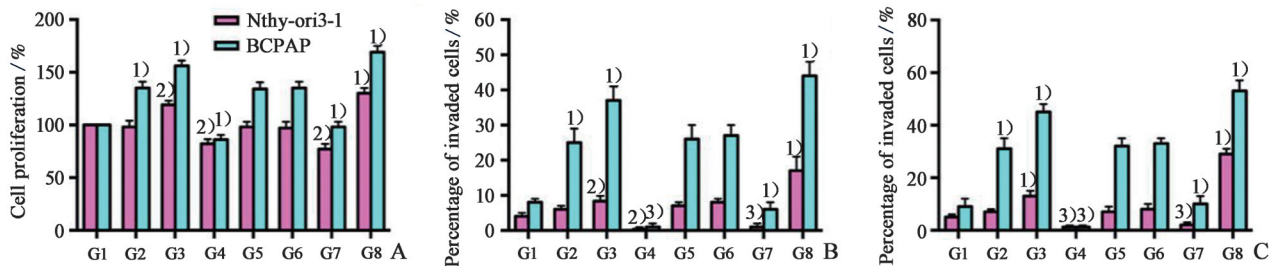
Nthy-ori3-1 细胞增殖($P = 0.890$)、侵袭($P = 0.124$)和迁移($P = 0.197$)能力差异无统计学意义,而BCPAP细胞增殖($P < 0.001$)、侵袭($P < 0.001$)和迁移($P < 0.001$)能力显著增强。经方差分析E2组、E2+scrambled-siRNA组、E2+Empty vector组、E2+PES1-siRNA组和E2+PES1 Overexpression组间差有显著差异Nthy-ori3-1($F_{增殖} = 36.888, P < 0.001$)、($F_{侵袭} = 25.275, P < 0.001$)、($F_{迁移} = 119.250, P < 0.001$);BCPAP($F_{增殖} = 53.983, P < 0.001$)、($F_{侵袭} = 44.582, P < 0.001$)、($F_{迁移} = 64.361, P < 0.001$)。进一步用Dunnett- t 检验对各实验组与E2组进行相互比较,与E2组相比,E2+scrambled-siRNA组Nthy-ori3-1和BCPAP细胞增殖($P = 1.000, P = 0.999$)、侵袭($P = 0.926, P = 0.989$)和迁移($P = 1.000, P = 0.986$)能力差异无统计学意义;E2+Empty vector组Nthy-ori3-1和BCPAP细胞增殖($P = 0.998, P = 1.000$)、侵袭($P = 0.576, P = 0.888$)和迁移($P = 0.873, P = 0.867$)能力差异无统计学意义;E2+PES1-siRNA组Nthy-ori3-1和BCPAP细胞增殖($P = 0.003, P < 0.001$)、侵袭($P < 0.038, P < 0.001$)和迁移($P = 0.014, P < 0.001$)能力显著减弱;E2+PES1 Overexpression组Nthy-ori3-1和BCPAP细胞增殖($P < 0.001, P < 0.001$)、侵袭($P < 0.001, P < 0.001$)和迁移($P < 0.001, P < 0.001$)能力显著增强(图5)。

3 讨论

越来越多的研究表明,E2可能参与PTC的发生、发展^[1-3],E2对靶细胞的作用主要是通过雌激素

受体ER α 和ER β 介导的^[4],ER α 和ER β 常共表达并参与雌激素的生理和病理反应^[13]。在本研究中,我们用免疫组化和Western Blot的方法检测ER α 和ER β 的蛋白水平,发现ER α 和ER β 在人PTC组织和细胞中均共表达,且与正常甲状腺组织和细胞相比,PTC组织和细胞中ER α 蛋白表达上调,ER β 蛋白表达下调。这一结果与曾报道的研究结果相一致,即ER α 和ER β 在正常甲状腺组织和肿瘤组织中共同表达,与正常甲状腺组织相比,在PTC组织中ER α 的水平相对高于ER β ^[14]。

虽然ER α 和ER β 在结构上类似,都包括N-末端结构域(NTD)、DNA结合域(DBD)和配体结合结构域(LBD)的3个功能域,但它们在NTD和LBD的结构上存在着明显的差异,它们的结构差异表明ER α 和ER β 可能具有不同的功能,乳腺癌MDA-231细胞系和子宫内膜癌HEC-1细胞系细胞分析显示ER β 的活性一般低于ER α ,且可能会影响ER α 的活性^[5]。尽管有极少数报道显示:在ER α 阴性的肿瘤组织和细胞中ER β 对肿瘤有促增值作用。但大量的体外和体内数据支持ER β 作为一种抗增殖和促凋亡因子,特别是与ER β 与ER α 共表达时^[15]。大多数研究表明:ER α 促进细胞增殖、侵袭和迁移,具有促肿瘤作用,而ER β 与ER α 共表达时,可能对ER α 介导的促肿瘤作用起抑制作用^[16]。与过去的报道结果相一致,在本研究中我们通过对PTC组织的免疫组化结果分析发现:ER α 蛋白水平与PTC患者的恶性侵袭性行为呈正相关,ER β 蛋白水平与PTC患者的恶性侵袭性行为呈负相关。肿瘤体积大、有ETE和LNM、高BRAFV600E表达、高



A: The proliferation of these transfected cells was assessed by MTT assay. B and C: The invasion and migration of these transfected cells were assessed by Transwell assay. 1) $P < 0.001$, 2) $P < 0.01$, 3) $P < 0.05$, vs Veh group Nthy-ori3-1 ($F_p = 38.131, P < 0.001$), ($F_1 = 29.524, P < 0.001$), ($F_M = 45.105, P < 0.001$), BCPAP ($F_p = 151.372, P < 0.001$), ($F_1 = 93.971, P < 0.001$), ($F_M = 140.437, P < 0.001$); vs E2 treated group Nthy-ori3-1 ($F_p = 36.888, P < 0.001$), ($F_1 = 25.275, P < 0.001$), ($F_M = 119.250, P < 0.001$), BCPAP ($F_p = 53.983, P < 0.001$), ($F_1 = 44.582, P < 0.001$), ($F_M = 64.361, P < 0.001$), $n = 3$

图5 PES1促进甲状腺乳头状癌细胞和正常甲状腺细胞增殖、侵袭和迁移

Fig. 5 PES1 promoted the proliferation, invasion and migration of human PTC-derived BCPAP cells and normal thyroid-derived Nthy-ori3-1 cells

TNM分期(III-IV)的PTC患者有高ER α 、低ER β 蛋白表达。

ER α 和ER β 蛋白水平之间的平衡和比率对于确定其对雌激素相关肿瘤发生、发展的总体反应至关重要。有报道显示:ER α /ER β 的比值可以作为判定PTC患者和子宫内膜癌患者预后和生存率的指标,即ER α /ER β 比值较高时PTC患者以及子宫内膜癌患者肿瘤恶性程度高、预后差^[14,17]。在乳腺癌中,当ER α /ER β >1促进癌细胞的增殖;当ER α /ER β <1时抑制癌细胞增殖^[7,18]。与这些研究结果一致,本研究中在细胞水平我们发现:在正常甲状腺细胞Nthy-ori3-1中ER α /ER β 蛋白比率显著小于1(\approx 0.43),而在BCPAP和K1细胞中ER α /ER β 蛋白比率显著大于1(\approx 2.25, \approx 2.82)。

PES1是一种含有BRCT结构域的蛋白质,参与胚胎发育、核糖体的生物合成、DNA复制、染色体稳定性和细胞周期进程,这些都是决定细胞增殖的重要组成因素^[8-10]。近期有研究发现:在卵巢癌和乳腺癌这些雌激素相关肿瘤中,PES1能使ER α /ER β 蛋白比率显著增高,促进乳腺癌和卵巢癌的发生和发展^[11-12]。然而PES1在PTC中的研究国内外均尚无报道,且由于有报道显示ERs的作用具有组织特异性^[19],因此在本研究中,我们检测了PTC组织和细胞中的PES1蛋白水平,并评估其蛋白水平

与ER α 和ER β 蛋白水平以及PTC的发生和发展的相关性。结果表明:PES1升高ER α 蛋白水平,同时降低ER β 蛋白水平,导致ER α /ER β 蛋白比值升高,进而促进人PTC细胞的增殖、侵袭和迁移。MTT和Transwell实验进一步证实:PES1下调使癌细胞增殖、侵袭和迁移能力明显减弱,PES1过表达使癌细胞增殖、侵袭和迁移能力显著增强,这与之前的报道结果相一致。

PES1蛋白表达水平与ER α /ER β 蛋白比率呈正相关;PES1过表达使Nthy-ori3-1细胞中ER α /ER β 蛋白比率明显增大(\approx 2.54);PES1下调使BCPAP细胞中ER α /ER β 蛋白比率明显降低(\approx 0.41);PES1下调使PTC细胞增殖、侵袭和迁移能力明显减弱,PES1过表达使PTC细胞增殖、侵袭和迁移能力显著增强。

综上所述,PTC患者的PES1和ER α 蛋白水平较高,ER β 水平较低,高PES1、高ER α 蛋白表达水平和低ER β 蛋白表达水平与PTC恶性侵袭性行为相关。PES1增加ER α 蛋白水平,降低ER β 蛋白水平,增加ER α /ER β 蛋白比率,促进PTC细胞的增殖、侵袭、迁移。PES1对PTC的发生、发展起到重要作用,PES1可能成为PTC治疗和预后的一个潜在靶点,为PTC的早期发现、临床治疗以及预后评估提供新思路。

参考文献

- [1] Derwahl M, Nicula D. Estrogen and its role in thyroid cancer[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2014, 21(5): T273-283.
- [2] Lorenz K, Schneider R, Elwerr M. Thyroid Carcinoma; Do we need to treat men and women differently? [J]. *Visc Med*, 2020, 36(1): 10-14.
- [3] Zhang Y, Wei F, Zhang J, et al. Bisphenol A and estrogen induce proliferation of human thyroid tumor cells via an estrogen-receptor-dependent pathway [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2017, 633: 29-39.
- [4] Hewitt SC, Korach KS. Estrogen receptors: new directions in the new millennium [J]. *Endocr Rev*, 2018, 39(5): 664-675.
- [5] Rubio GA, Catanuto P, Glassberg MK, et al. Estrogen receptor subtype expression and regulation is altered in papillary thyroid cancer after menopause [J]. *Surgery*, 2018, 163(1): 143-149.
- [6] Acconcia F, Fiocchetti M, Marino M. Xenoestrogen regulation of ER α /ER β balance in hormone-associated cancers [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 457: 3-12.
- [7] Oueslati M, Bittaieb I, Sassi N, et al. ER α and ER β Co-expression: an indicator of aggressive tumors and hormonal sensitivity [J]. *Oncol Lett*, 2017; 14(2): 1675-1682.
- [8] Allende ML, Amsterdam A, Becker T, et al. Insertional mutagenesis in zebrafish identifies two novel genes, pescadillo and dead eye, essential for embryonic development [J]. *Genes Dev*, 1996, 10: 3141-3155.
- [9] Lerch-Gaggl A, Haque J, Li J, et al. Pescadillo is essential for nucleolar assembly, ribosome biogene-

- sis, and mammalian cell proliferation [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(47): 45347-45355.
- [10] Cheng L, Yuan B, Ying S, et al. PDS1 is a critical component of telomerase assembly and regulates cellular senescence[J]. *Sci Adv*, 2019, 5(5): 1090.
- [11] Cheng L, Li J, Han Y, et al. PDS1 promotes breast cancer by differentially regulating ER α and ER β [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(8): 2857-2870.
- [12] Li J, Zhuang Q, Lan X, et al. PDS1 differentially regulates the expression of ER α and ER β in ovarian cancer [J]. *IUBMB Life*, 2013, 65 (12) : 1017-1025.
- [13] Yakimchuk K, Jondal M, Okret S. Estrogen receptor α and β in the normal immune system and in lymphoid malignancies[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 375(1-2): 121 - 129.
- [14] Yi JW, Kim SJ, Kim JK, et al. Upregulation of the ESR1 Gene and ESR ratio (ESR1/ESR2) is associated with a worse prognosis in papillary thyroid carcinoma: the impact of the estrogen receptor α/β expression on clinical outcomes in papillary thyroid carcinoma patients [J]. *Ann Surg Oncol*, 2017, 24 (12): 3754 - 3762.
- [15] Guo L, Zhang YU, Yilamu D, et al. ER β overexpression results in endocrine therapy resistance and poor prognosis in postmenopausal ER α -positive breast cancer patients [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11 (2): 1531-1536.
- [16] Williams C, Edvardsson K, Lewandowski SA, et al. A genome-wide study of the repressive effects of estrogen receptor beta on estrogen receptor alpha signaling in breast cancer cells [J]. *Oncogene*, 2008, 27: 1019 - 1032.
- [17] Zannoni GF, Monterossi G, Stefano ID, et al. The expression ratios of estrogen receptor α (ER α) to estrogen receptor β 1 (ER β 1) and ER α to ER β 2 identify poor clinical outcome in endometrioid endometrial cancer[J]. *Hum Pathol*, 2013, 44: 1047 - 1054.
- [18] Pons DG, Vilanova-Llompert J, Gaya-Bover A, et al. The phytoestrogen genistein affects inflammatory-related genes expression depending on the ER α /ER β ratio in breast cancer cells[J]. *Int J Food Sci Nutr*, 2019, 70 (8): 941-949.
- [19] Della TS, Ciana P. Selective estrogen receptor modulators and the tissue-selective estrogen complex: analysis of cell type-specific effects using in vivo imaging of a reporter mouse model[J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1366: 297-313.

(编辑 孙慧兰)