

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.02.006

促甲状腺激素并非甲状腺乳头状癌发生发展的关键因素*

梁声茹^{1#} 杨阳^{2#} 刘槩赟^{3#} 鱼馨文¹ 周洁¹ 姬秋和^{1Δ}

(1 空军军医大学西京医院 陕西 西安 710032; 2 空军军医大学唐都医院 陕西 西安 710032;

3 空军军医大学基础医学院 陕西 西安 710032)

摘要 目的:血清促甲状腺激素(TSH)在甲状腺乳头状癌(PTC)中的作用及机制尚不明确,本研究主要探讨 TSH 对甲状腺细胞系及乳头状癌细胞系的作用。**方法:**体外培养人甲状腺细胞系和乳头状癌细胞系,分别给予不同剂量(0 mU/L、5 mU/L 及 20 mU/L)的 TSH 干预。通过 MTS 及流式细胞术,观察 TSH 对甲状腺及乳头状癌细胞系增殖和细胞周期的作用;通过 RNA-seq、ELISA 检测 TSH 对细胞因子的影响;通过实时荧光定量 PCR 及 Western blot 寻找潜在的作用靶点。**结果:**MTS 及流式细胞术结果显示,TPC-1 和 Nthy-ori-3-1 细胞经 TSH 干预后增殖指数下降,20 mU/L 浓度的 TSH 干预组细胞周期缩短。ELISA 结果显示 TPC-1 中 TSH 下调 CXCL8,上调 CXCL10,而 CXCL12 的表达无明显变化。在 Nthy-ori-3-1 细胞中 CXCL8 和 CXCL10 的表达也观察到类似的结果,但 CXCL12 表达受到 TSH 的抑制。TSH 可使 Nthy-ori-3-1 和 Bcpap 细胞中细胞命运决定因子(DACH1)的表达呈剂量依赖性上调,且 TSH 可抑制 Bcpap 中 BRAF(V600E)以及 Nthy-ori-3-1 和 TPC-1 中 BRAF 的表达。**结论:**综上所述,我们并未发现 TSH 对甲状腺癌细胞有明显的促肿瘤作用。相反,本研究提示 TSH 可能呈部分抗癌作用。因此,TSH 对甲状腺的致癌作用仍有待进一步研究。

关键词:促甲状腺激素;甲状腺乳头状癌;DACH1;BRAF;细胞增殖

中图分类号:R-33;R736.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)02-230-07

Thyroid Stimulating Hormone may not be a Key Factor for the Development and Progression of Papillary Thyroid Cancer*

LIANG Sheng-ru^{1#}, YANG Yang^{2#}, LIU Bo-yun^{3#}, YU Xin-wen¹, ZHOU Jie¹, JI Qiu-he^{1Δ}

(1 Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China; 2 Tangdu Hospital, Air Force Medical University,

Xi'an, Shaanxi, 710032, China; 3 School of Basic Medicine, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: The role and mechanism of serum thyroid-stimulating hormone (TSH) in thyroid papillary carcinoma (PTC) is still unclear. This study focused on the effect of TSH on thyroid cell lines and PTC cell lines. **Methods:** TSH was given to cultured human thyroid and PTC cell lines for various dosages (0 mU/L, 5 mU/L and 20 mU/L). The effect of TSH on the proliferation and cell cycle of thyroid and papillary cancer cell lines was observed by MTS and flow cytometry. The effect of TSH on cytokines was detected by RNA-seq and ELISA. Potential targets were identified by real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot. **Results:** MTS showed that the proliferation index decreased after TSH intervention in TPC-1 and Nthy-ori-3-1 cells. Besides, shortened cell cycle was only observed in the 20 mU/L TSH-intervention group. The results of ELISA indicated that TSH downregulated CXCL8 and upregulated CXCL10 in TPC-1, while no change was observed in CXCL12 expression. Similar results were also observed in CXCL8 and CXCL10 expression in Nthy-ori-3-1 cells. However, unlike the negative result of CXCL12 expression in TPC-1, its expression was inhibited by TSH in Nthy-ori-3-1 cells. Moreover, DACH1 expression was upregulated by TSH in a dose-dependent manner in Nthy-ori-3-1 and Bcpap cells, while BRAF (V600E) expression in Bcpap and BRAF expression in Nthy-ori-3-1 and TPC-1 were inhibited by TSH. **Conclusion:** In summary, we did not find obvious tumor promoting effect of TSH on thyroid cancer cell. Conversely, this study suggests that TSH may have a partial anticancer effect. Therefore, the carcinogenic effect of TSH on thyroid remains to be further studied.

Key words: Thyroid stimulating hormone (TSH); Papillary thyroid cancer (PTC); DACH1; BRAF; Proliferation

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R736.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)02-230-07

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81873639;82070839);陕西省自然科学基金重点项目(S2020-JC-ZD-0042)

作者简介:梁声茹(1989-),女,博士研究生,主要研究方向:内分泌代谢疾病,E-mail:276142342@qq.com;

杨阳(1988-),男,博士研究生,主要研究方向:重症医学,E-mail:YYfmmu@126.com;

刘槩赟(1998-),男,本科,主要研究方向:内分泌代谢疾病,E-mail:1044660350@qq.com

Δ 通讯作者:姬秋和(1962-),男,博士生导师,教授,主要研究方向:内分泌代谢疾病,E-mail:qiuheji@hotmail.com

(收稿日期:2021-05-26 接受日期:2021-06-22)

前言

越来越多的临床证据表明,血清促甲状腺激素(Thyroid Stimulating Hormone, TSH)是结节性甲状腺疾病患者甲状腺恶性肿瘤诊断的独立预测因子。甲状腺乳头状癌(Papillary thyroid cancer, PTC)的TSH水平明显高于良性甲状腺结节(benign thyroid nodular disease, BTND),且更高的TSH值,即使在正常范围内,也与甲状腺恶性肿瘤的更大风险有关。然而,目前的这些临床研究有一个共同的缺陷,即所采用的回归方法仅仅能够证明TSH与甲状腺癌存在相关性,但未采用合适的方法,如孟德尔遗传学研究^[1],以证明二者之间是否存在因果关系。因此,现有的临床证据并不能支持TSH是甲状腺癌的诱因。

TSH与其受体的相互作用,以及随后的GTP结合蛋白及其效应物腺苷基环化酶的激活对甲状腺细胞的生长产生重要的调控作用。然而,研究发现甲状腺癌中通常不会出现与信号转导增加相关的TSH受体及G蛋白 α 亚单位的突变^[2]。而多项研究显示TSH受体的突变分析可以作为诊断PTC的候选标志物^[3-5]。虽然临床证据显示TSH是甲状腺癌的危险因素,然而在部分毒性结节引起甲亢的患者中,在对侧抑制叶仍可发现乳头状癌,但这些患者均未检测到血清TSH^[6]。

鉴于临床数据结论与实验室检查结果之间的不一致性,我们推测可能是由于TSH与一些未知因素和/或信号通路相互作用,导致了TSH所展现出来的与甲状腺乳头状癌之间的正相关性。而其他尚不明确的因子和通路,并非TSH及其受体,可能在甲状腺癌的发生发展过程中发挥着更为重要的作用。

因此,为了排除其他潜在的干扰,进一步探究单纯的TSH在甲状腺乳头状癌中的作用,本研究通过体外培养甲状腺细胞系及乳头状癌细胞系,观察给予TSH后甲状腺细胞系及乳头状癌细胞系的多种生物学变化,以期为更深入的了解TSH在甲状腺癌中的作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂 胎牛血清(Gibco公司),DMEM高糖培养液(Hyclone公司),RIPM1640培养液(Hyclone公司),人TSH(Sigma公司)Trizol(Invitrogen公司),反转录试剂盒(TaKaRa公司),SYBR Premix Ex Taq II实时荧光定量PCR试剂盒(TaKaRa公司),DACH1抗体(Proteintech公司),BRAF抗体(Abcam公司),BRAF(V600E)抗体(Abcam公司),MTS试剂盒(Promega公司)。引物订购由上海生工生物工程有限公司完成。

1.1.2 主要仪器 超净工作台(造鑫企业有限公司);细胞培养箱(Thermo公司);离心机(Thermo Fisher公司);PCR仪(Agilent公司);流式细胞仪(Bio-Rad公司);电泳仪(Bio-Rad公司);化学发光成像系统(Bio-Rad公司);全自动酶标仪(BioTek公司)。

1.1.3 细胞株 Nthy-ori-3-1、Bcpap及TPC-1细胞。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及TSH处理 将人甲状腺Nthy-ori-3-1细胞及乳头状癌Bcpap细胞置于含10%胎牛血清的RIPM1640培养液中,人甲状腺乳头状癌TPC-1细胞置于含10%胎牛血清

的DMEM培养液中,在37℃,饱和湿度,5%CO₂培养箱中常规培养。分别设置对照组和3个不同给药浓度实验组,取对数生长期的甲状腺细胞,对细胞进行血清饥饿后,弃去无血清培养液,分别加入以RIPM1640/DMEM高糖完全培养液稀释的TSH处理液,使其终浓度分别为5mU/L、20mU/L,对照组加入不含TSH的培养液常规培养72小时。

1.2.2 MTS细胞活性检测 收集细胞,加入100 μ L细胞悬液(约5,000-10,000个细胞)至96孔板,每组设置3个复孔。每孔加入20 μ L MTS检测液,37℃孵育3h后检测490nm的吸光度值。

1.2.3 流式细胞术 每组设置3个复孔,收集待检测细胞并用PBS重悬后,用70%乙醇固定。加入碘化丙啶与RNase A避光孵育30分钟,上流式细胞仪检测分析细胞DNA含量。

1.2.4 ELISA 每组设置3个复孔,分别给予不同剂量的TSH处理Bcpap、TPC-1和Nthy-ori-3,培养72h。收集上清液,根据说明书使用ELISA试剂盒检测CXCL8、CXCL10和CXCL12的水平。

1.2.5 RNA制备,反转录,实时定量PCR 取经过"1.2.1"项处理的细胞,用PBS洗两次加入1mL Trizol,室温裂解1min后吹下细胞置于EP管中加氯仿,4℃离心10min将上清移至另一EP管中加等体积异丙醇,室温静置10min后4℃离心10min,小心吸弃上清液加75%乙醇4℃离心5min,弃上清空气干燥5min,溶于40 μ L DEPC处理水中。用紫外分光光度计测定浓度之后,用逆转录试剂盒得到cDNA,以GAPDH作为内参照,进行qPCR扩增(表1)。qPCR扩增条件为95℃预变性3min,95℃10s,56℃15s,72℃15s,45个循环结束。PCR反应结束后对所扩增的PCR产物熔解曲线进行分析,荧光定量PCR仪读取循环阈值(cycle threshold, Ct),首先计算各样本测定基因Ct值与内对照GAPDH基因Ct值的差值 Δ Ct,再用各实验组样本的 Δ Ct减去正常对照样本的 Δ Ct,得到 $\Delta\Delta$ Ct,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算,表示实验组测定基因相对的表达水平。

表1 qRT-PCR引物序列

Table 1 Primers for quantitative real-time PCR analyses

Gene	Primers(5'→3')
CXCL8	Sense: AAC TGA GAG TGA TTG AGA GTG G
	Antisense: ATG AAT TCT CAG CCC TCT TCA A
CXCL10	Sense: CTC TCT CTA GAA CTG TAC GCT G
	Antisense: ATT CAG ACA TCT CTT CTC ACC C
CXCL12	Sense: CCA ACG TCA AGC ATC TCA AAA T
	Antisense: CAC ACT TGT CTG TTG TTG TTC T
DAPDH	Sense: GTA TCG TGG AAG GAC TCA TGA C
	Antisense: ACC ACC TTC TTG ATG TCA TCA T

1.2.6 Western Blot 取经过"1.2.1"项处理的细胞,用冰RIPA提取各组细胞的蛋白,以BCA法得到标准曲线求得样品浓度,加入上样缓冲液,煮沸5min。上样、SDS-PAGE电泳、转膜、5%脱脂奶粉封闭、加入一抗、二抗,在化学发光检测系统中检测成像结果。

1.2.7 RNA-seq 对提取的总 RNA 进行 mRNA 富集法处理,加入适量打断试剂至富集所得的 mRNA 中,将其打断为片段。cDNA 一链的合成,参照上一步所得的片段作为模板,然后合成的 cDNA 二链为合成反应体系的产物,并依次使用试剂纯化回收试剂盒、将粘性末端进行修复、添加 "A" 碱基并连接在 3' 尾端,筛选片段的长短之后目的性扩增,通过质检后进行测序。

1.2.8 统计分析 应用 Graphpad Prism 5 软件处理实验数据,多组间比较采用 Kruskal-Wallis 检验,如果结果有统计学差异,则进一步采用 Mann-Whitney U 检验进行组间的两两比较并作出柱状图。 $P < 0.05$ 时有统计学意义。

2 结果

2.1 TSH 抑制 Nthy-ori-3-1 及 TPC-1 细胞的增殖

血清饥饿后,分别给予 Bcpap、TPC-1 和 Nthy-ori-3-1 细胞不同浓度的 TSH (0 mU/L, 5 mU/L, 20 mU/L),常规培养 72 h。使用 MTS 试剂盒检测细胞活力。结果表明,Bcpap 细胞在各处理组的增殖指数无统计学差异,TPC-1 和 Nthy-ori-3-1 细胞经 TSH 干预后细胞增殖指数较对照组明显降低($P < 0.05$)。上述结果提示 TSH 延缓了甲状腺细胞系和乳头状癌细胞系的生长(图 1)。

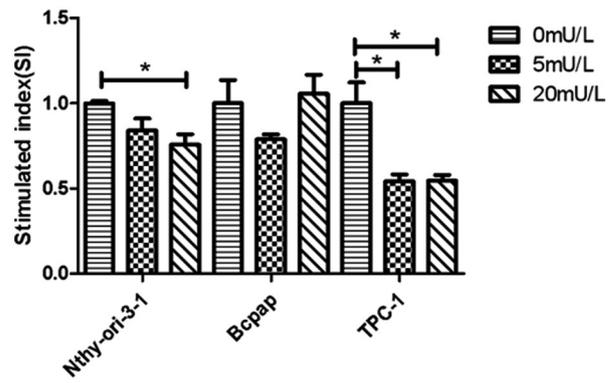


图 1 不同浓度 TSH 对 Nthy-ori-3-1、Bcpap 及 TPC-1 细胞增殖指数的影响。* 表示 $P < 0.05$ 。

Fig. 1 The proliferation of Nthy-ori-3-1, Bcpap and TPC-1 cells treated with different concentrations of TSH ($*P < 0.05$).

通过流式细胞术检测细胞周期(S+G2/M 期)。在 Bcpap 细胞中,S+G2/M 期在三组间未见统计学差异。在 Nthy-ori-3-1 和 TPC-1 细胞中,5 mU/L 的 TSH 处理对细胞周期没有影响,20 mU/L 的 TSH 处理组细胞周期缩短(Nthy-ori-3-1, $*P < 0.05$; TPC-1, $**P < 0.01$),提示 TSH 处理降低 S+G2/M 期比例可能有助于抑制细胞增殖(图 2)。

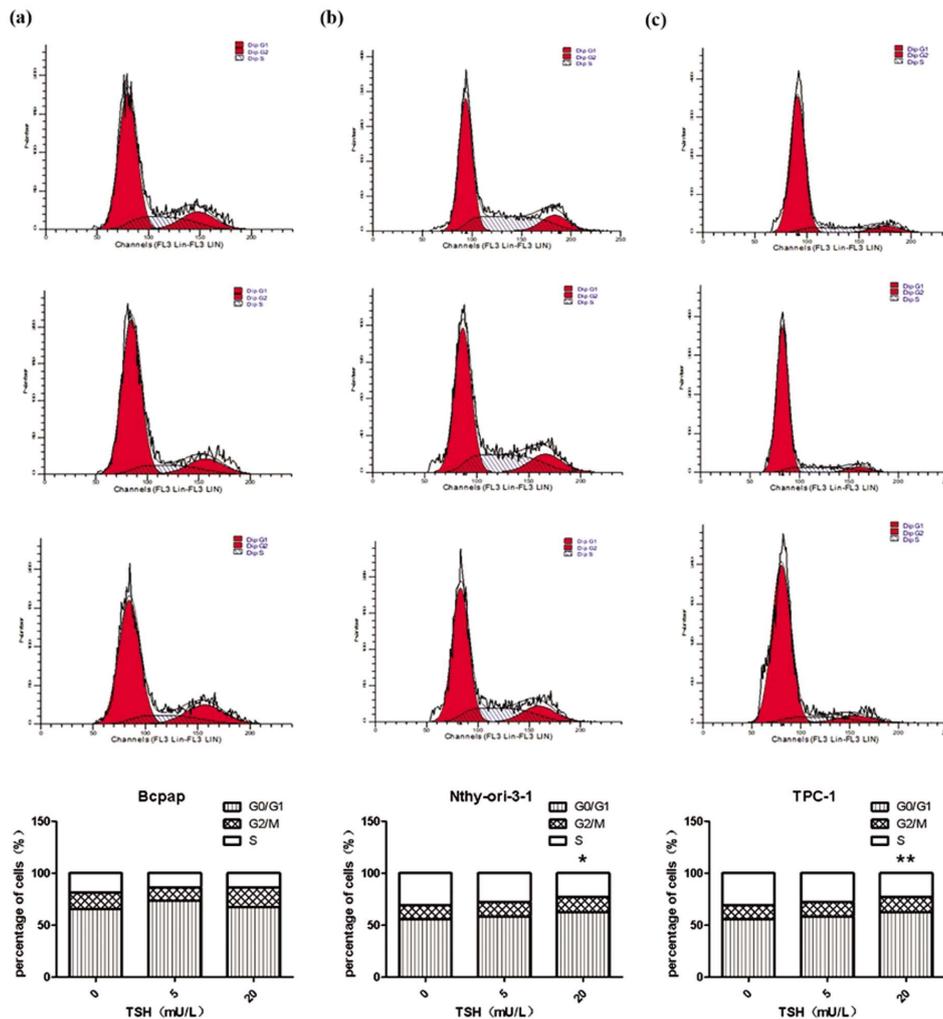


图 2 Bcpap(a)、Nthy-ori-3-1(b)和 TPC-1(c)细胞受到不同浓度 TSH 处理后的细胞周期。* 表示 $P < 0.05$; ** 表示 $P < 0.01$ 。

Fig. 2 Representative images of cell cycle of Bcpap (a), Nthy-ori-3-1 (b) and TPC-1 (c) cells treated with different concentrations of TSH ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$).

2.2 TSH 对 Nthy-ori-3-1 及 TPC-1 细胞中多种趋化因子存在调节作用

如上所述,在 Nthy-ori-3-1 和 TPC-1 细胞中,TSH 可抑制细胞活力,S+G2/M 比例降低。这表明 TSH 不仅能减缓甲状腺细胞的增殖能力,还能抑制癌细胞的增殖能力。为了探讨 TSH

可能的作用机制和靶点,我们对 TPC-1 细胞系进行了 TSH 处理后的 RNA 序列分析。结果显示,TSH 可以下调被认为是促癌因子的趋化因子 CXCL1、CXCL5、CXCL8、CCL2、CCL20 和 CCL28 的表达(图 3)。

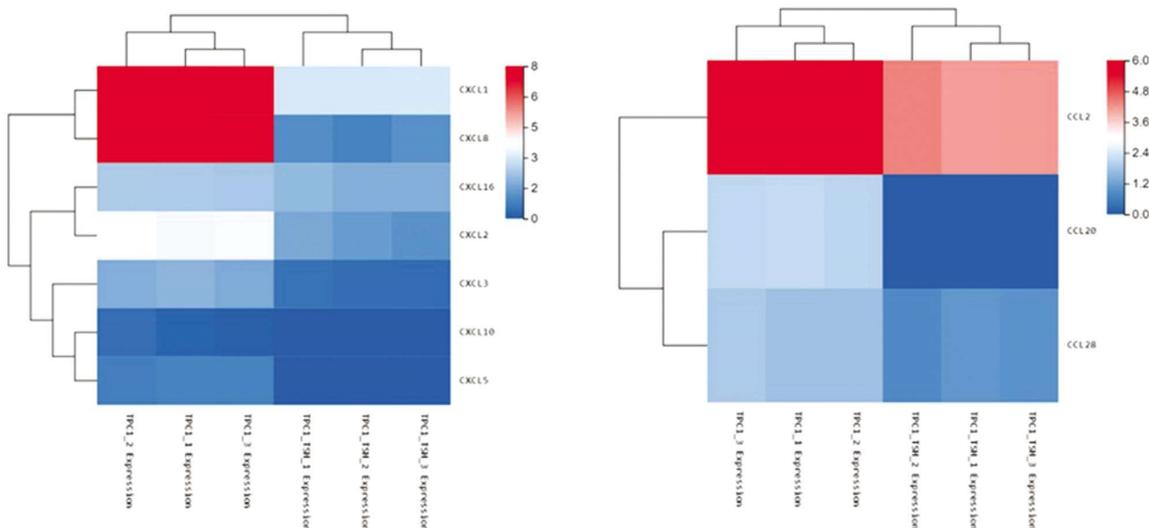


图 3 采用 RNA 组学检测 TPC-1 细胞系经 TSH 处理后部分趋化因子的 RNA 表达。

Fig. 3 The RNA seq analysis to detect the RNA expression of some chemokines in the TPC-1 cell line with/without TSH treatment.

越来越多的证据表明 CXCL8 和 CXCL12 与 PTC 的发展密切相关。我们采用了 ELISA 法检测 CXCL8 和 CXCL12 的表达水平。血清饥饿 2 小时后,分别给予 Bcpap、TPC-1 和 Nthy-ori-1 细胞不同剂量的 TSH(0 mU/L, 5 mU/L 和 20 mU/L)并孵育 72 小时。结果显示,TPC-1 和 Nthy-ori-3-1 细胞系中,TSH 处理组(5 mU/L 和 20 mU/L)较对照组的 CXCL8 表达下降($P < 0.05$)。Nthy-ori-3-1 细胞中,20 mU/L 浓度组的 CXCL12 表达降低($P < 0.05$)。与 CXCL8 和 CXCL12 相反,CXCL10 被认为是甲状腺癌的抗肿瘤趋化因子。ELISA 结果显示,TPC-1 和 Nthy-ori-3-1 细胞经 TSH 处理后 CXCL10 表达上调($P < 0.05$)。而在 Bcpap 中,CXCL8、CXCL10 和 CXCL12 的表达在 TSH 处理后没有显示出任何变化(图 4)。

进一步采用 qRT-PCR 检测 Nthy-ori-3-1 细胞中 CXCL8、CXCL10 和 CXCL12 的 mRNA 水平。正如我们预测的那样,与对照相比,两个 TSH 处理组 CXCL8 和 CXCL12 的转录水平下调,而 CXCL10 的转录水平上调,进一步支持了 ELISA 的结果(图 5)。

2.3 TSH 对 Nthy-ori-3-1、Bcpap 和 TPC-1 细胞中 BRAF/BRAF (V600E)的作用

分别用不同浓度的 TSH (0 mU/L、5 mU/L、20 mU/L 和 80 mU/L)处理 Bcpap、TPC-1 和 Nthy-ori-3-1 细胞 72h,然后进行 Western blot 检测。结果显示,与对照相比,Bcpap 中 BRAF (V600E)的表达在三组 TSH 不同浓度处理组中均显著降低,而 Nthy-ori-3-1 和 TPC-1 细胞中 BRAF 表达亦呈现相似的下降趋势($P < 0.05$)(图 6)。

2.4 TSH 对 Nthy-ori-3-1、Bcpap 和 TPC-1 细胞中 DACH1 的作用

DACH1 被认为是脑癌、乳腺癌、肝癌、前列腺癌和子宫癌等多种肿瘤的抑癌因子。根据 RNA 序列分析结果,DACH1 可能是 TSH 的靶点。因此,我们采用不同剂量的 TSH(0 mU/L, 5 mU/L 和 20 mU/L)作用 72h 后,用 Western Blot 检测 DACH1 的蛋白表达情况。结果显示,在 Nthy-ori-3-1 和 Bcpap 细胞中,与对照相比,TSH 以剂量依赖的方式上调了 DACH1 的表达,而在 TPC-1 细胞中 DACH1 表达量未见明显变化(图 7)。

3 讨论

本研究利用甲状腺细胞系 Nthy-ori-3-1 以及甲状腺癌细胞系 Bcpap 和 TPC-1 进行体外实验,我们发现与对照组相比,给予不同浓度 TSH 处理均可使 BRAF (V600E)/BRAF 表达显著下降、细胞增殖能力下降,但不同剂量的 TSH 处理组间差异无统计学意义。这些结果提示单独的 TSH 干预可能不会对甲状腺细胞的癌变及肿瘤进展产生显著的影响。这进一步说明 TSH 在甲状腺癌进程中可能并不起关键作用。目前尚不清楚我们以及其他一些基础实验结论与众多临床实验的结论不一致甚至相反的具体原因,但可能与如下几点因素有关。

首先,无论是 BTND 整体人群还是接受手术的 BTND 患者,自主性高功能甲状腺结节的比例都与年龄有关。然而,无论是手术还是非手术的 PTC 患者,自主性高功能甲状腺结节的发生率均不存在年龄依赖性分布,且 PTC 患者自主性高功能甲状腺结节的发生率明显低于 BTND 患者。在自主性高功能甲状腺结节队列中,TSH 水平与年龄呈负相关,将该队列划分为 BTND 或 PTC 亚组后,BTND 组的这一趋势仍然显著,而 PTC 组则不显著。事实上,据 NHANESIII 调查,PTC 患者的 TSH 水平与生活在碘含量丰富地区的一般人群的 TSH 分布相

似^[7,9]。因此,这些数据强烈提示与 BTND 患者相比,PTC 患者血清 TSH 水平降低有关。TSH 水平的升高并非 TSH 绝对值的升高,而主要是由于 BTND

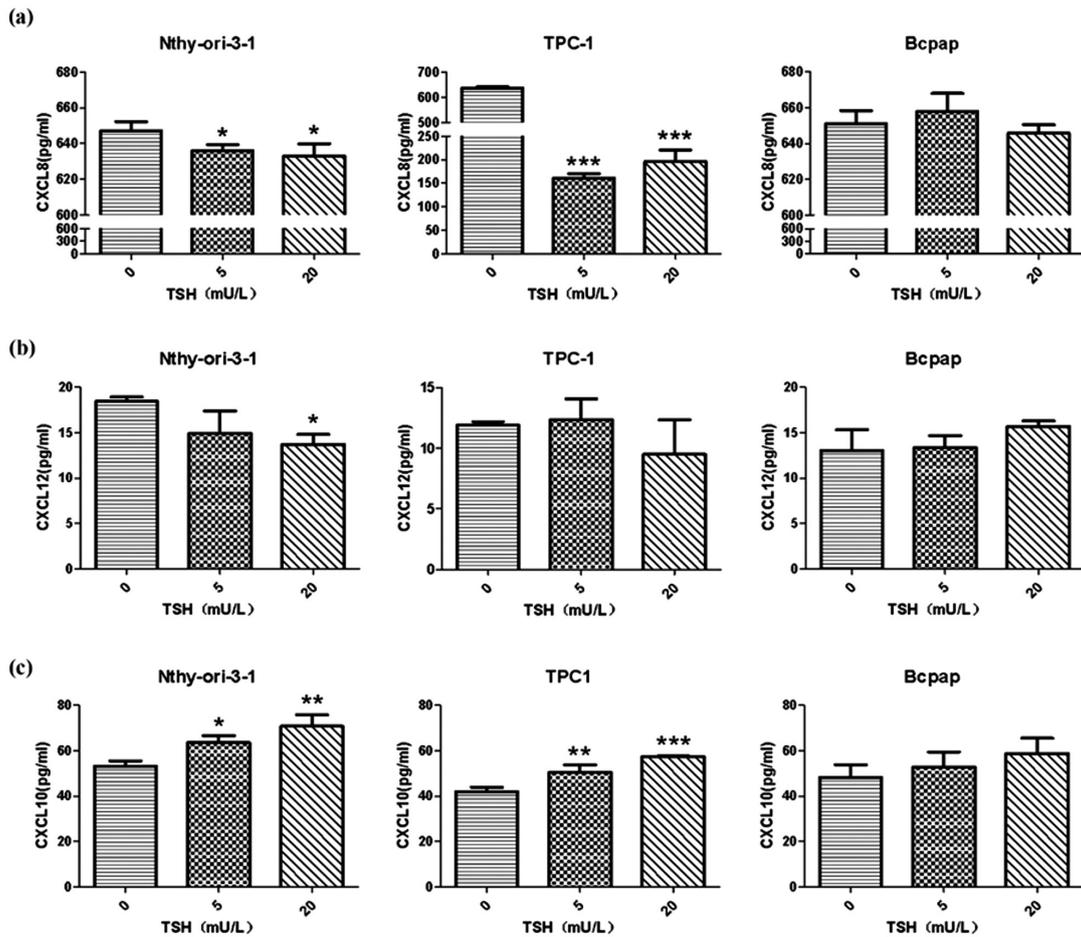


图 4 不同浓度 TSH 处理 Nthy-ori-3-1、TPC-1 和 Bcpap 细胞后的 CXCL8(a)、CXCL12(b)和 CXCL10(c)水平。* 表示 $P<0.05$; ** 表示 $P<0.01$; *** 表示 $P<0.001$ 。

Fig. 4 The levels of CXCL8 (a), CXCL12 (b) and CXCL10 (c) in the Nthy-ori-3-1, TPC-1 and Bcpap cells treated with different concentrations of TSH ($*P<0.05$; $**P<0.01$; $***P<0.001$).

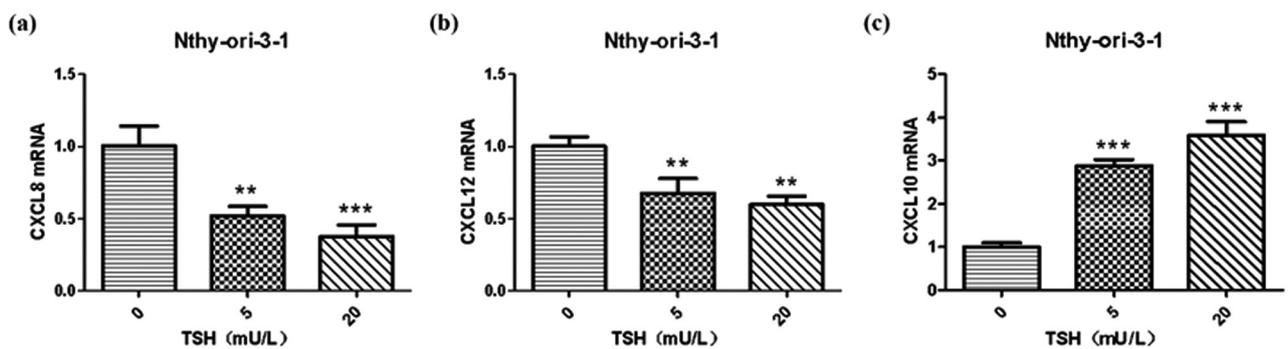


图 5 TSH 处理 Nthy-ori-3-1 细胞后 CXCL8(a)、CXCL12(b)和 CXCL10(c)的 mRNA 表达水平。** 表示 $P<0.01$; *** 表示 $P<0.001$ 。

Fig. 5 The mRNA expression of CXCL8 (a), CXCL12 (b) and CXCL10 (c) in Nthy-ori-3-1 cells treated with different concentrations of TSH ($**P<0.01$; $***P<0.001$).

其次,垂体肿瘤转化基因 1(Pttg1)可能会刺激转化活性的增加,诱导甲状腺上皮细胞的增生、增殖和去分化。在甲状腺恶性肿瘤中,Pttg1 在 mRNA 水平和免疫组化中均表达升高,这与淋巴结转移和远处转移有关。TSH-R 活化可能促进 Pttg1 的表达,但其表达主要受针对 PI3K/AKT 和 MAPK/ERK 信号通路的各种生长因子控制^[10]。T3 受体可以作为 PI3K 或 MAPK 信

号通路的下游抑制剂,直接介导 Pttg1-TSH 相互作用的抑制。此外,对小鼠模型的研究表明,甲状腺成纤维细胞生长因子受体的表达似乎受 T3 受体对其启动子的作用控制,T3 受体的突变形式直接激活 PI3K 信号,诱导甲状腺癌变^[11]。因此,临床指南推荐的甲状腺素治疗的有益作用也可能是通过肿瘤组织中的 T3 受体介导的,而不是通过抑制 TSH,血清 TSH 水平可能

只是激素对甲状腺组织影响的标志^[12,13]。

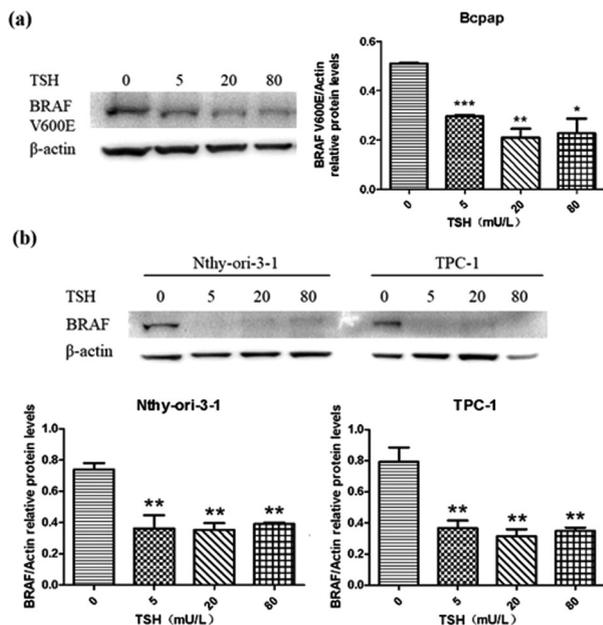


图 6 (a)不同浓度 TSH 处理 Bcpap 后, BRAF(V600E)的蛋白表达情况。(b)不同浓度 TSH 处理 Nthy-ori-3-1(左)和 TPC-1(右)细胞后, BRAF 的蛋白表达情况。* 表示 $P<0.05$; ** 表示 $P<0.01$; *** 表示 $P<0.001$ 。

Fig. 6 (a) BRAF V600E protein expression in Bcpap cells treated with TSH at different concentrations. (b) BRAF protein expression levels in nthy-ori-3-1 cell (left) and TPC-1 cell (right) treated with different concentrations of TSH ($*P<0.05$; $**P<0.01$. $***P<0.001$).

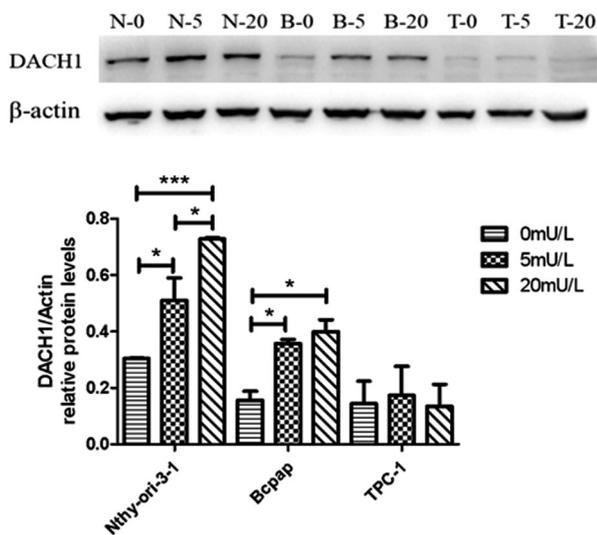


图 7 不同浓度 TSH 处理 Nthy-ori-3-1、Bcpap 和 TPC-1 细胞后 DACH1 的蛋白表达水平。* 表示 $P<0.05$; ** 表示 $P<0.01$; *** 表示 $P<0.001$ 。
Fig. 7 DACH1 expression in Nthy-ori-3-1, Bcpap and TPC-1 cells treated with different concentrations of TSH ($*P<0.05$; $**P<0.01$; $***P<0.001$).

再次, 研究发现其他生长因子, 如胰岛素样生长因子-1 (IGF-1), 在刺激甲状腺癌生长方面更有效^[14]。在大多数 FRTL-5 细胞中, TSH(cAMP)仅作为启动因子, 对胰岛素 /IGF-I 诱导的 PI3K 和 MAPK 通路激活和 DNA 合成进行扩大化。在 WRT 细胞中, TSH 和胰岛素 /IGF-I 分别激活 Ras 和 PI3K 通路并促进

DNA 合成。在原代培养的甲状腺细胞中, TSH 不激活 Ras 和 PI3K, 但 cAMP 必须通过 TSH 来维持其高水平, 从而使 cAMP 能直接控制 G1 期的进展, 而这一控制作用至少部分是通过 Cyclin D3 以 cAMP 依赖的方式激活后而实现的, 而 cyclin D3 则是在胰岛素 /IGF-I 反应中合成的。虽然不同细胞系的数据有差异, 目前可用的数据提示 TSH 需要与胰岛素 /IGF-I 合作才能发挥其增殖作用^[15], 但仍需更多的研究进行进一步验证。

最后, 我们当前研究中给予的 TSH 剂量是否过大从而导致 PTC 的增殖与生长受到抑制, 这也是一个需要进一步研究的问题。Fiore.E 及其团队的临床研究发现, PTC 的发病率与 TSH 浓度有关, TSH 在正常范围上限时 PTC 发生率最高, 而当 TSH 为 3.5-10 mU/L 时, PTC 发生率反而有所下降^[16]。因此, 我们假设 TSH 对 PTC 的增殖和生长可能存在剂量相关的拐点, 只有在适当的 TSH 范围内, TSH 才与 PTC 的发生存在正相关关系。

CXC 趋化因子是一种独特的细胞因子家族, 多项研究证实趋化因子与 PTC 的发生发展密切相关。CXC 趋化因子可以单独促进血管生成, 也可以直接、平行或连续地与其他血管生成因子相互作用。例如, CXCL8 通过自分泌和旁分泌途径维持内皮的血管生成表型^[17], CXCL10 则属于 CXC 趋化因子家族的血管抑制成员^[18]。本研究通过对 TPC-1 细胞株的 RNA-seq 分析显示, TSH 干预后 CXCL8 的表达显著增加。此外, CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL5、CCL2、CCL20 和 CCL28 也有类似的表达趋势。为了进一步验证 RNA 序列检测结果, 我们采用 ELISA 方法检测 TSH 干预对趋化因子 CXCL8、CXCL10 和 CXCL12 的影响。结果显示, 经 TSH 处理后, Nthy-ori-3-1 细胞系 CXCL8 和 CXCL12 的表达降低, CXCL10 的表达升高。同样, 在 TPC-1 细胞系中 CXCL8 减少而 CXCL10 增加。这些结果反映了 TSH 对 PTC 发生发展的作用可能是复杂且多面的。

本研究中还观察到在 Bcpap 细胞系中, TSH 还可上调 DACH1 的表达。在脑癌、乳腺癌、肝癌、前列腺癌和子宫内膜癌中可观察到 DACH1 的表达减少, 这与不良的临床预后和转移增加有关^[19-24]。基于本研究中所观察到的 TSH 对 PTC 细胞系 DACH1 表达的影响, 我们或许是首个观察到 TSH 对甲状腺癌具有抑癌作用这一现象的研究, 这也使得 TSH 在甲状腺癌发生发展中的作用更加复杂化。我们推测, 或许在甲状腺癌的病理进程中, TSH 同时具有促癌 (更确切的说可能是辅助别的因子来发挥促癌作用, 如 IGF-1) 和抑癌双重作用, 而其对于甲状腺癌发生和进展的作用向哪一方向发展则取决于促癌和抑癌之间的平衡向哪一方倾斜, 还有待进一步的研究进行探索和验证。

另外, 与其他大多数有关 TSH 及甲状腺细胞的体外实验不同的是, 本研究用于处理细胞的 TSH 为人源的垂体 TSH, 而非牛源 TSH; 并且本研究采用的是更接近人血清 TSH 浓度的处理浓度 (5 mU/L 和 20 mU/L), TSH 处理浓度的不同也可能是导致实验结果不同的原因之一^[25-27]。本研究的预实验中处理组设置了 5 mU/L、10 mU/L、20 mU/L 和 80 mU/L 这 5 个浓度梯度, 结果显示 10 mU/L 与 5 mU/L 浓度组结果相似, 20 mU/L 和 80 mU/L 浓度组结果无明显差异, 故最终筛选处理组浓度为 5 mU/L 和 20 mU/L。

这项研究有两个不可避免的局限性。首先, 本研究观察到

的 TSH 对甲状腺细胞的影响仅来自体外实验结果, 未在体内得到证实。因此, 我们将在未来开展动物实验进一步验证本研究中的结论。其次, 我们仅观察到了 TSH 对甲状腺癌细胞中 DACH1 表达的影响, 但本研究未评价 TSH 对其他潜在的致癌和抑癌蛋白的影响, 这有待于今后进一步的探索。

综上所述, 在这项使用不同的甲状腺细胞培养系统进行的体外研究中, 我们发现单独给予 TSH 干预对甲状腺和 PTC 细胞系的细胞周期和增殖没有积极作用。此外, 我们观察到 TSH 可能促进抑癌蛋白 DACH1 的表达, 提示 TSH 甚至可能对甲状腺癌的发生有抑制作用。然而, 这些结论还需要在动物实验中进行验证, 并且需要进行更多的研究来探究 TSH 对甲状腺细胞的更多潜在作用。

参 考 文 献(References)

- [1] Emdin C, Khera A, Kathiresan S. Mendelian Randomization [J]. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 2017, 318(19): 1925-1926
- [2] Mon S, Riedlinger G, Abbott C, et al. Cancer risk and clinicopathological characteristics of thyroid nodules harboring thyroid-stimulating hormone receptor gene mutations [J]. *Diagn Cytopathol*, 2018, 46(5): 369-377
- [3] Qu M, Wan S, Ren B, et al. Association between TSHR gene methylation and papillary thyroid cancer: a meta-analysis [J]. *Endocrine*, 2020, 69(3): 508-515
- [4] Kocsis-Deák B, Árvai K, Balla B, et al. Targeted Mutational Profiling and a Powerful Risk Score as Additional Tools for the Diagnosis of Papillary Thyroid Cancer[J]. *Pathology oncology research: POR*, 2020, 26(1): 101-108
- [5] Su X, Lin L, Weng J, et al. TSHR rs2288496 associated with thyroid hormone and predict the occurrence of lymph node metastasis of papillary thyroid cancer [J]. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*, 2019, 26(4): 461-470
- [6] Satta M A, De Rosa G, Testa A, et al. Thyroid cancer in suppressed contralateral lobe of patients with hot thyroid nodule[J]. *Eur J Cancer*, 1993, 29A(8): 1190-1192
- [7] Hollowell J, Staehling N, Flanders W, et al. Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III)[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(2): 489-499
- [8] Aoki Y, Belin R, Clickner R, et al. Serum TSH and total T4 in the United States population and their association with participant characteristics: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES 1999-2002)[J]. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association*, 2007, 17(12): 1211-1223
- [9] Surks M, Hollowell J. Age-specific distribution of serum thyrotropin and antithyroid antibodies in the US population: implications for the prevalence of subclinical hypothyroidism[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(12): 4575-4582
- [10] Sáez C, Martínez-Brocca M, Castilla C, et al. Prognostic significance of human pituitary tumor-transforming gene immunohistochemical expression in differentiated thyroid cancer [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(4): 1404-1409
- [11] Vlotides G, Eigler T, Melmed S. Pituitary tumor-transforming gene: physiology and implications for tumorigenesis [J]. *Endocr Rev*, 2007, 28(2): 165-186
- [12] Cooper D, Doherty G, Haugen B, et al. Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer [J]. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*, 2006, 16(2): 109-142
- [13] Pacini F, Schlumberger M, Dralle H, et al. European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium[J]. *Eur J Endocrinol*, 2006, 154(6): 787-803
- [14] Lv J, Liu C, Chen F, et al. M2-like tumour-associated macrophage-secreted IGF promotes thyroid cancer stemness and metastasis by activating the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Mol Med Report*, 2021, 24(2): 604
- [15] Smith T. Insulin-Like Growth Factor Pathway and the Thyroid[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12: 653627
- [16] Fiore E, Rago T, Provenzale M, et al. Lower levels of TSH are associated with a lower risk of papillary thyroid cancer in patients with thyroid nodular disease: thyroid autonomy may play a protective role[J]. *Endocrine-Related Cancer*, 2009, 16(4): 1251-1260
- [17] Mohammadi M, Kariminik A. CC and CXC chemokines play key roles in the development of polyomaviruses related pathological conditions[J]. *Virology*, 2021, 18(1): 111
- [18] Mikolajczyk T, Szczepaniak P, Vidler F, et al. Role of inflammatory chemokines in hypertension[J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 223: 107799
- [19] Wang J, Zou Y, Wu X, et al. DACH1 inhibits glioma invasion and tumor growth via the Wnt/catenin pathway [J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 5853-5863
- [20] Xu H, Yu S, Yuan X, et al. DACH1 suppresses breast cancer as a negative regulator of CD44[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 4361
- [21] Yu J, Jiang P, Zhao K, et al. Role of DACH1 on proliferation, invasion, and apoptosis in human lung adenocarcinoma cells[J]. *Curr Mol Med*, 2021
- [22] Riggs M, Lin N, Wang C, et al. DACH1 mutation frequency in endometrial cancer is associated with high tumor mutation burden[J]. *PloS one*, 2020, 15(12): e0244558
- [23] Dong B, Yi M, Luo S, et al. RDGN-based predictive model for the prognosis of breast cancer [J]. *Experimental hematology & oncology*, 2020, 9: 13
- [24] Zheng X, Liu Q, Yi M, et al. The regulation of cytokine signaling by retinal determination gene network pathway in cancer [J]. *OncoTargets and therapy*, 2018, 11: 6479-6487
- [25] Zou M, Baitei E, Al-Rijjal R, et al. TSH overcomes Braf(V600E)-induced senescence to promote tumor progression via downregulation of p53 expression in papillary thyroid cancer [J]. *Oncogene*, 2016, 35(15): 1909-1918
- [26] García I, Torres Demichelis V, Viale D, et al. CREB3L1-mediated functional and structural adaptation of the secretory pathway in hormone-stimulated thyroid cells[J]. *J Cell Sci*, 2017, 130(24): 4155-4167
- [27] Nagasaki S, Fukui M, Asano S, et al. Induction of adrenomedullin 2/intermedin expression by thyroid stimulating hormone in thyroid [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 395: 32-40