

硼替佐米联合 5-氮杂胞苷对甲状腺未分化癌细胞增殖、侵袭能力及 miR-124、miR-7、IL-11 表达的影响

罗雨, 钱易, 黄海, 钱伟峰

(南京医科大学附属苏州医院, 江苏 苏州 215000)

摘要: [目的] 探讨硼替佐米联合 5-氮杂胞苷对甲状腺未分化癌细胞增殖、侵袭能力及 miR-124、miR-7、白细胞介素-11(IL-11)水平的影响。[方法] 计算硼替佐米和 5-氮杂胞苷的 IC_{50} 值, 检测硼替佐米(Bor 组)和 5-氮杂胞苷(5-Aza 组)单独和联合使用(5-Aza+Bor 组)对甲状腺未分化癌细胞 ARO 细胞活力、凋亡率、迁移和侵袭能力的影响, 并检测各组 miR-124、miR-7、IL-11 水平。采用 CCK-8 和流式细胞术检测细胞凋亡情况。采用细胞划痕实验和 Transwell 法分析细胞迁移和侵袭情况, 采用 qPCR 法检测 miRNA 和 mRNA 水平, WB 法检测蛋白的相对表达水平。[结果] 硼替佐米和 5-氮杂胞苷的 IC_{50} 值分别为 110 ng/ml 和 5.5 μ mol/L。培养 24 h 后 Bor 组和 5-Aza 组的细胞活力显著低于 Control 组, 而细胞凋亡率显著高于 Control 组, 且 5-Aza+Bor 组细胞活力 (0.44 ± 0.08) 显著低于 Bor 组和 5-Aza 组 ($F=5.142, 4.456; P$ 均 < 0.001), 而凋亡率 ($19.78\% \pm 1.67\%$) 显著高于 Bor 组和 5-Aza 组 ($F=6.664, 6.582; P$ 均 < 0.001)。作用 24 h 后, 5-Aza+Bor 组的迁移 ($31.78\% \pm 2.28\%$) ($F=10.455, 9.832; P$ 均 < 0.001) 和侵袭率 ($28.74\% \pm 2.15\%$) ($F=11.135, 10.739; P$ 均 < 0.001) 均显著低于 Bor 组和 5-Aza 组。5-Aza+Bor 组的 miR-124、miR-7 水平显著高于 Bor 组和 5-Aza 组 ($P < 0.01$), Bor 组和 5-Aza 组 IL-11 显著低 Control 组 ($P < 0.01$), 5-Aza+Bor 组的 IL-11 显著低于 Bor 组和 5-Aza 组 ($P < 0.01$)。[结论] 硼替佐米与 5-氮杂胞苷联合使用与单独使用相比, 可进一步的抑制甲状腺未分化癌细胞增殖、迁移和侵袭, 并促进其凋亡, 可能与其可上调 miR-124、miR-7 水平和抑制 IL-11 的表达有关。

关键词: 甲状腺肿瘤; 硼替佐米; 5-氮杂胞苷; miR-124; miR-7; 白细胞介素-11

中图分类号: R736.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2019)06-0498-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.06.B003

Effects of Bortezomib Combined with 5-azacytidine on Proliferation, Invasion and miR-124, miR-7 and IL-11 Expression in Thyroid Undifferentiated Cancer Cells

LUO Yu, QIAN Yi, HUANG Hai, QIAN Wei-feng

(Suzhou Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Suzhou 215000, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effects of bortezomib combined with 5-azacytidine on proliferation, invasion and miR-124, miR-7 and interleukin-11(IL-11) levels in thyroid undifferentiated cancer cells. Methods] The IC_{50} values of bortezomib and 5-azacytidine was calculated, respectively. The effects of bortezomib (Bor group) and 5-azacytidine (5-Aza group) alone or in combination(5-Aza+Bor group) on ARO cell viability, apoptosis rate, migration and invasion were detected. The levels of miR-124, miR-7, and IL-11 in each group were examined. Apoptosis in cell viability were detected by CCK-8 and flow cytometry. Migration and invasion were detected by cell scratch assays and Transwell assay, miRNA and mRNA levels was detected by qPCR, and relative expression levels of proteins was detected by WB. [Results] After 24 h of culture, the cell viability of the Bor group and the 5-Aza group was significantly lower than that of the control group, and the apoptosis rate was significantly higher than that of the control group, and the 5-Aza+Bor cell viability (0.44 ± 0.08) was significantly lower than that of the Bor group and 5-Aza group ($F=5.142, 4.456; P$ 均 < 0.001). The apoptotic rate ($19.78\% \pm 1.67\%$) was significantly higher than that in the Bor group and the 5-Aza group ($F=6.664, 6.582; P$ 均 < 0.001). After 24 h, the migration ($31.78\% \pm 2.28\%$) and the invasive rate ($28.74\% \pm 2.15\%$) in the 5-Aza+Bor group were significantly lower than those in the Bor group and the 5-Aza group ($F=10.455, 9.832, P$ 均 $< 0.001; F=11.135, 10.739, P$ 均 < 0.001). The levels of miR-124 and miR-7 in 5-Aza+Bor group were significantly higher than those in Bor group and 5-Aza group ($P < 0.01$). The IL-11 of the Bor group and the 5-Aza group were significantly lower in the control group ($P < 0.01$), and the IL-11 in the 5-Aza+Bor group was significantly lower than that in the Bor group and the 5-Aza group ($P < 0.01$). [Conclusion] The combination of bortezomib and 5-azacytidine can further inhibit the proliferation, migration and invasion of thyroid undifferentiated cancer cells and promote their apoptosis, which may be related to the up-regulation of miR-124. The level of miR-7 is related to the inhibition of IL-11 expression.

Subject words: thyroid cancer; bortezomib; 5-azacytidine; miR-124; miR-7; interleukin-11

通信作者: 钱伟峰, 主任医师, 博士; 南京医科大学附属苏州医院普外科, 江苏省苏州市姑苏区

道前街 26 号 (215000); E-mail: qwf1010@163.com

收稿日期: 2019-02-14; **修回日期:** 2019-04-09

甲状腺癌在内分泌肿瘤和头颈部肿瘤中具有较高的发病率,甲状腺癌有不同的分型,其中甲状腺未分化癌恶性程度较高,手术治疗或化疗后易出现复发和转移,预后较差^[1]。5-氮杂胞苷主要治疗肠癌或乳腺癌等,最近的研究显示其对于甲状腺癌也具有较好的抑制作用^[2]。硼替佐米联合治疗多发性骨髓瘤在临床应用广泛,研究认为硼替佐米对于多种肿瘤细胞具有细胞毒作用^[3]。近年来研究发现 miRNA 在肿瘤的发生和发展中起着重要作用,过往研究显示 miR-124 和 miR-7 在肿瘤中起着抑癌作用,可以抑制癌细胞的凋亡、迁移和侵袭^[4,5]。最近有研究发现白细胞介素 11(interleukin 11,IL-11)具有促进甲状腺癌细胞迁移和侵袭的作用^[6]。联合化疗方法是治疗恶性肿瘤的方法之一,本研究发现硼替佐米联合 5-氮杂胞苷可更有效的抑制甲状腺癌未分化细胞癌的增殖和侵袭能力,并显著上调 miR-124 和 miR-7 的表达,抑制 IL-11 的水平,可能作为甲状腺未分化细胞癌的治疗新策略,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 试剂

甲状腺未分化细胞癌细胞 ARO 来自山东省千佛山医院。5-氮杂胞苷购自 Sigma(美国)。注射用硼替佐米购自西安杨森。CCK-8 试剂盒购自 Dojindo(日本)。凋亡试剂盒购自 BD Pharmingen(美国)。Trans-well 小室购自 Millipore(美国)。流式细胞仪 Becton Dickerson(美国)。IL-11 一抗以及二抗均购买于 Abcam 公司(美国)。miR-124、miR-7 和 IL-11 的引物由 Genewiz(苏州,中国)设计和合成。PVDF 膜购买于 Bio-Rad(美国)。逆转录试剂盒 TaKaRa 和 SYBR Prellix Ex TaqTM 实时 PCR 试剂盒购自 TaKaRa(日本)。

1.2 细胞分组与培养

ARO 细胞系在含有 10% 的胎牛血清的 DMEM 培养基中培养,培养条件为 37℃,5% 的 CO₂。首先将 ARO 细胞在不同浓度的 5-氮杂胞苷和硼替佐米中培养并通过 CCK-8 法计算半数抑制率。将细胞分为 4 组,即对照组(control)、5-氮杂胞苷组(5-Azacitidine,5-Aza)、硼替佐米组(Bortezomib,Bor)以及硼替佐米联合 5-氮杂胞苷组(5-Aza+ Bor),5-Aza

组培养液中 5-氮杂胞苷浓度为 46ng/ml,Bor 组硼替佐米 110ng/ml,5-Aza+ Bor 组培养液中同时含有硼替佐米和 5-氮杂胞苷 110ng/ml 和 46ng/ml,培养 24h。

1.3 细胞活力

CCK-8 法被应用于测定细胞活力。将细胞接种于 96 孔板,加入 10μl CCK-8 试剂并在 37℃,5% 的 CO₂ 中培养 4h。使用酶标仪(ELX 800,Bio-Tek,USA)测量每个孔在 450nm 处的吸光度(OD)。

1.4 细胞凋亡

将细胞重悬至 4×10⁵ 个细胞/ml 的浓度,分在 200μl 细胞溶液中别加入 5μl 膜联蛋白 PE 和 10μl 的-7 氨基放线菌 D,室温孵育 10 min,应用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.5 细胞迁移和侵袭能力

细胞划痕实验和 Trans-well 用于检测细胞迁移和侵袭能力,分别检测 24h 后细胞的迁移率和侵袭率。

1.6 Western blot

细胞裂解后收集总蛋白,BCA 法用于检测蛋白浓度,SDS-PAGE 凝胶并用于电泳并通过 PVDF 膜进行转膜,入 IL-11 一抗,室温震荡 2h,后在 4℃ 孵育过夜,加入二抗,GAPDH 作为内参。

1.7 qPCR

qPCR 用于检测 miR-124、miR-7 和 IL-11 的 mRNA 水平,细胞裂解后收集总 mRNA,通过在 95℃ 下激活 DNA 聚合酶 5 min 进行 PCR,然后进行 40 个循环的两步 PCR(95℃ 10s 和 60℃ 30s),最终延伸 72℃ 下 10min,保持在 4℃,U6 和 GAPDH 分别作为内参,使用 2^{-ΔΔCT} 法分析 mRNA 水平。

1.8 统计学处理

数据以均值±标准差(SD)表示,所有检测作复孔,n=3。统计分析使用 SPSS 19(SPSS,Inc.,Chicago,IL,USA),采用单因素方差分析(ANOVA)以评估组间差异。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 硼替佐米以及 5-氮杂胞苷的 IC₅₀ 值

硼替佐米和 5-氮杂胞苷的 IC₅₀ 值分别为 110ng/ml 和 46ng/ml,见 Figure 1。

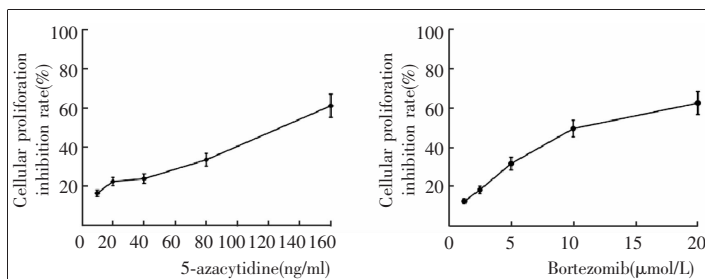
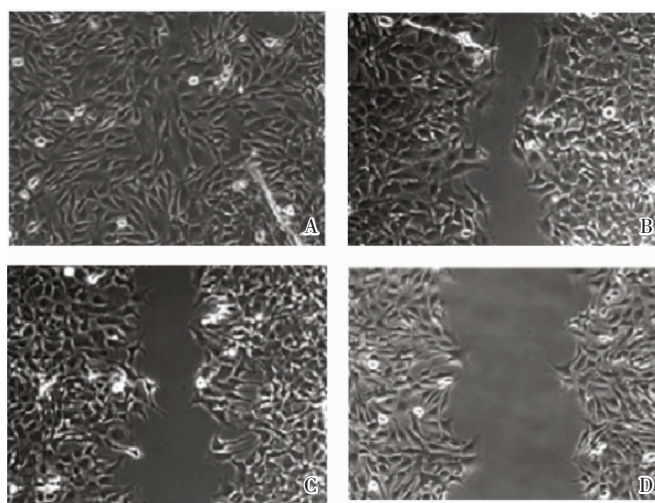


Figure 1 IC₅₀ values of bortezomib and 5-azacytidine



(A: Control group, B: Bor group, C: 5-Aza group, D: 5-Aza+Bor group)

Figure 2 Effects of bortezomib and 5-azacytidine on cell migration

Table 1 Effects of bortezomib and 5-azacytidine on cell viability (OD)

Time (h)	Control	Bor	5-Aza	5-Aza+ Bor
12	0.42±0.06	0.35±0.05	0.30±0.04	0.23±0.03
24	0.78±0.10	0.62±0.10 ^a	0.57±0.09 ^a	0.44±0.08 ^{abc}
48	1.25±0.14	0.97±0.18 ^a	0.91±0.19 ^a	0.72±0.12 ^{abc}

Note: a, $P < 0.05$ vs Control group; b, $P < 0.05$ vs Bor group; c, $P < 0.05$ vs 5-Aza group

Table 2 Effects of bortezomib and 5-azacytidine on cell apoptosis (%)

Time (h)	Control	Bor	5-Aza	5-Aza+ Bor
12	5.06±0.16	8.14±0.31	8.84±0.33	11.67±0.94
24	5.34±0.24	12.64±0.78 ^a	13.58±0.80 ^a	19.78±1.67 ^{abc}
48	5.72±0.29	16.96±1.42 ^a	17.47±1.32 ^a	28.67±1.94 ^{abc}

Note: a, $P < 0.05$ vs Control group; b, $P < 0.05$ vs Bor group; c, $P < 0.05$ vs 5-Aza group

Table 3 Effects of bortezomib and 5-azacytidine on miR-124, miR-7 and IL-11 expression

Index	Control	Bor	5-Aza	5-Aza+ Bor
miR-124	1.24±0.09	2.16±0.21	2.34±0.25	4.05±0.47
miR-7	1.18±0.13	2.21±0.24 ^a	2.56±0.23 ^a	4.26±0.45 ^{abc}
IL-11 mRNA	7.57±0.42	5.32±0.41 ^a	5.16±0.44 ^a	3.04±0.36 ^{abc}
IL-11 protein	8.84±0.55	5.93±0.56 ^a	5.57±0.52 ^a	3.26±0.34 ^{abc}

Note: a, $P < 0.05$ vs Control group; b, $P < 0.05$ vs Bor group; c, $P < 0.05$ vs 5-Aza group

2.2 硼替佐米以及 5-氮杂胞苷对细胞活力的影响

Bor 组和 5-Aza 组的细胞活力显著低于 control 组 ($P < 0.01$), 并且 5-Aza+ Bor 细胞活力显著低于 Bor 组和 5-Aza 组 ($P < 0.01$)。Loewe 等效线法分析两者具有协同作用, 见 Table 1。

2.3 硼替佐米以及 5-氮杂胞苷对细胞凋亡的影响

Bor 组和 5-Aza 组细胞凋亡率显著高于 control 组 ($P < 0.01$), 且 5-Aza+ Bor 细胞凋亡率显著高于 Bor 组和 5-Aza 组 ($P < 0.01$), 见 Table 2。

2.4 硼替佐米以及 5-氮杂胞苷对细胞迁移的影响

处理 24h 后, Bor 组和 5-Aza 组的迁移率分别为 $70.56\% \pm 2.96\%$ 和 $67.04\% \pm 3.26\%$, 5-Aza+Bor 组的侵袭率为 $31.78\% \pm 2.28\%$, 显著低于 Bor 组和 5-Aza 组 ($F=10.455, 9.832$; P 均 < 0.001), 见 Figure 2。

2.5 硼替佐米以及 5-氮杂胞苷对细胞侵袭的影响

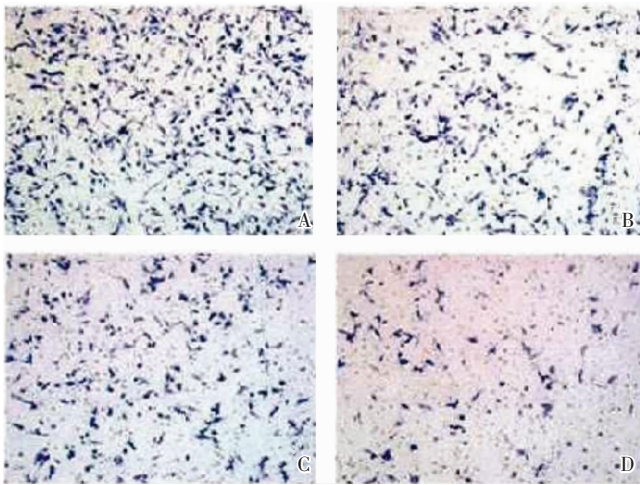
Bor 组和 5-Aza 组的侵袭率分别为 $61.56\% \pm 2.66\%$ 和 $60.04\% \pm 2.74\%$, 5-Aza+Bor 组的侵袭率为 $28.74\% \pm 2.15\%$, 显著低于 Bor 组和 5-Aza 组 ($F=11.135, 10.739$; P 均 < 0.001), 见 Figure 3。

2.6 硼替佐米以及 5-氮杂胞苷对 miR-124、miR-7 和 IL-11 的影响

硼替佐米以及 5-氮杂胞苷可显著上调 miR-124、miR-7 水平 ($P < 0.01$), 5-Aza+ Bor 组的 miR-124、miR-7 水平显著高于 Bor 组和 5-Aza 组 ($P < 0.01$)。Bor 组和 5-Aza 组 IL-11 显著低于 control 组 ($P < 0.01$), 5-Aza+Bor 组的 IL-11 显著低于 Bor 组和 5-Aza 组 ($P < 0.01$), 见 Table 3。

3 讨论

甲状腺癌在女性中的发病率是男性的 2~4 倍, 并且最近研究发现其发病率有上升的趋势, 甲状腺癌的发病受多种因素的共同



(A:Control group,B:Bor group,C:5-Aza group,D:5-Aza+Bor group)

Figure 3 Effects of bortezomib and 5-azacytidine on cell invasion

调节,如环境、辐射、内分泌以及遗传均有关系,并且在甲状腺癌的发病早期,其病情进展极为缓慢,难以发现,而在发现时大多处于晚期并且合并淋巴或远端转移,研究发现甲状腺癌具有极高的淋巴转移或血行转移发生率,而发生淋巴转移的患者其术后的复发率上升一倍,单纯的手术治疗已不能满足需求,使用化疗药物辅助治疗是解决方法之一^[7]。

5-氮杂胞苷可以掺入细胞的DNA中使基因沉默,从而将细胞阻滞在S期,抑制细胞增殖,是细胞周期抑制药物,最近有研究显示5-氮杂胞苷可以显著抑制甲状腺癌细胞的增殖^[8]。硼替佐米可以抑制26S蛋白酶体糜蛋白酶的活性,破坏细胞内环境引起细胞死亡,在治疗多发性骨髓瘤等血液恶性肿瘤中具有广泛的应用,硼替佐米对甲状腺癌也具有一定的治疗效果^[9]。本研究中主要探究5-氮杂胞苷和硼替佐米联合对甲状腺未分化癌细胞的生物学影响结果显示硼替佐米和5-氮杂胞苷单独使用均可显著的抑制甲状腺未分化癌细胞增殖、迁移和侵袭,并且促进其凋亡,硼替佐米和5-氮杂胞苷联合使用可进一步加剧其对增殖、迁移和侵袭的抑制作用,并进一步促进凋亡,与单独使用相比差异显著。既往研究发现硼替佐米联合其他化疗药物可抑提高抗肿瘤功能^[10],5-氮杂胞苷联合化疗药物对于软骨肉瘤、急性髓细胞白血病具有更好抑癌效果^[11,12]。这提示对于甲状腺未分化细胞癌,使用硼替佐米联合5-氮杂胞苷具有更好的抑制细胞增殖、迁移和侵袭的效果。

为进一步分析硼替佐米和5-氮杂胞苷联合使用抑制甲状腺未分化细胞癌的作用机理,我们分别检测了单独使用和联合使用下miR-124、miR-7、IL-11的水平。大量研究显示miRNA在肿瘤的发生发展中起重要作用,研究发现miR-124在宫颈癌、膀胱癌等患者血清中均显著下调,并且过表达miR-124可通过调节基因的表达显著抑制肿瘤的发生和发展,现阶段关于miR-124在甲状腺癌中的研究较少^[13,14]。miR-7上调可抑制肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭,最新的研究发现miR-7可通过抑制PAK1以及CKS2的表达抑制甲状腺癌细胞的上皮间充质转化^[15,16]。最新的研究显示IL-11可通过上调PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路激活促进甲状腺未分化癌细胞的上皮间充质转化^[17]。蒋玉娥等^[18]研究也显示IL-11具有促进甲状腺未分化癌侵袭迁移的作用。本研究结果显示硼替佐米以及5-氮杂胞苷可显著上调miR-124、miR-7水平,并且联合作用组的miR-124、miR-7水平显著高于单独作用组。硼替佐米或5-氮杂胞苷单独作用可显著低IL-11、联合干预可进一步的抑制IL-11的水平。提示对于甲状腺未分化癌细胞、硼替佐米联合5-氮杂胞苷可能通过上调miR-124、miR-7水平和抑制IL-11的表达起到抗肿瘤的作用。

综上所述,硼替佐米联合5-氮杂胞苷联合使用与单独使用相比,可进一步的抑制甲状腺未分化癌细胞增殖、迁移和侵袭,并促进其凋亡,这可能与其可以更显著的上调miR-124、miR-7水平和抑制IL-11的表达有关。关于硼替佐米联合5-氮杂胞苷对于甲状腺癌的作用还需要动物实验进一步验证,其机理也有待于进一步研究,以期甲状腺未分化癌的治疗提供新的可能性。

参考文献:

- [1] Alsaif O,Farrar WB,Bloomston M,et al. Long-term efficacy of lymph node reoperation for persistent papillary thyroid cancer[J]. J Clin Endocrinol Metab,2010,95(5):2187-2194.
- [2] Vitale G,Dicitore A,Pepe D,et al. Synergistic activity of everolimus and 5-aza-2'-deoxycytidine in medullary thyroid carcinoma cell lines [J]. Mol Oncol,2017,11 (8): 1007-1022.
- [3] Tsumagari K,Abd ZE,Sholl AB,et al. Bortezomib sensi-

- tizes thyroid cancer to BRAF inhibitor in vitro and in vivo [J]. *Endocr Relat Cancer*,2018,25(1):99–109.
- [4] Liu F,Hu H,Zhao J,et al. miR-124-3p acts as a potential marker and suppresses tumor growth in gastric cancer[J]. *Biomed Rep*,2018,9(2):147–155.
- [5] Zeng J,Cai S. Breviscapine suppresses the growth of non-small cell lung cancer by enhancing microRNA-7 expression[J]. *J Biosci*,2017,42(1):1–9.
- [6] Lim JH. Inhibition of the interleukin-11-STAT3 axis attenuates hypoxia-induced migration and invasion in MDA-MB-231 breast cancer cells[J]. *Korean J Physiol Pharmacol*,2014,18(5):391–396.
- [7] Staniforth JUL,Erdirmanne S,Eslick GD. Thyroid carcinoma in Graves' disease:A meta-analysis [J]. *Int J Surg*,2016,27(6):118–125.
- [8] Militello KT,Simon RD,Mandarano AH,et al. 5-azacytidine induces transcriptome changes in Escherichia colivia DNA methylation-dependent and DNA methylation-independent mechanisms[J]. *BMC Microbiol*,2016,16(1):130–133.
- [9] Yoo JY,Jaime-Ramirez AC,Bolyard C,et al. Bortezomib treatment sensitizes oncolytic HSV-1-treated tumors to NK cell immunotherapy[J]. *Clin Cancer Res*,2016,22(21):5265–5276.
- [10] Zhang W,Cheng H,Tang GS,et al. Effect of Bruton's tyrosine kinase inhibitor combined with bortezomib on human multiple myeloma cells and its mechanism[J]. *Journal of Second Military Medical University*,2016,37 (11):1325–1332.[张雯,程辉,唐古生,等.布鲁顿酪氨酸激酶抑制剂联合硼替佐米对人多发性骨髓瘤细胞作用及其机制[J]. *第二军医大学学报*,2016,37(11):1325–1332.]
- [11] Ahrens TD,Timme S,Hoeppner J,et al. Selective inhibition of esophageal cancer cells by combination of HDAC inhibitors and Azacytidine[J]. *Epigenetics*,2015,10(5):431–445.
- [12] Ohanian M,Garcia-Manero G,Levis M,et al. Sorafenib combined with 5-azacytidine(AZA) in older patients with untreated FLT3-ITD mutated acute myeloid leukemia (AML)[J]. *Am J Hematol*,2018,93(9):1136–1141.
- [13] Liu S,Song L,Zeng S,et al. MALAT1-miR-124-RBG2 axis is involved in growth and invasion of HR-HPV-positive cervical cancer cells[J]. *Tumour Biol*,2016,37(1):633–640.
- [14] Wan HY,Li QQ,Zhang Y,et al. MiR-124 represses vasculogenic mimicry and cell motility by targeting amotL1 in cervical cancer cells[J]. *Cancer Lett*,2014,355(1):148–158.
- [15] Yue K,Wang X,Wu Y,et al. microRNA-7 regulates cell growth,migration and invasion via direct targeting of PAK1 in thyroid cancer [J]. *Mol Med Rep*,2016,14(3):2127–2134.
- [16] Hua K,Jin J,Zhang H,et al. MicroRNA-7 inhibits proliferation,migration and invasion of thyroid papillary cancer cells via targeting CKS2 [J]. *Int J Oncol*,2016,49 (4):1531–1540.
- [17] Zhong Z,Hu Z,Jiang Y,et al. Interleukin-11 promotes epithelial-mesenchymal transition in anaplastic thyroid carcinoma cells through PI3K/Akt/GSK3 β signaling pathway activation[J]. *Oncotarget*,2016,7(37):59652–59663.
- [18] Jiang YE,Zhong ZM,Chen X,et al. Effects of interleukin 11 on invasion and migration of thyroid undifferentiated carcinoma [J]. *Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*,2018,4(4):286–291.[蒋玉娥,钟兆铭,陈雪,等. 白细胞介素 11 对甲状腺未分化癌侵袭迁移能力的影响 [J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*,2018,4(4):286–291.]