

## 5-Aza-CdR对裸鼠皮下移植瘤组织中甲状腺乳头状癌细胞自噬和凋亡的影响及其机制

石玉宵, 刘美岚, 朱美霖, 魏枫

(内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院内分泌科, 内蒙古 包头 014010)

**[摘要]** **目的:** 探讨5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)对裸鼠皮下移植瘤组织中TPC-1细胞自噬和凋亡的影响,并阐明其作用机制。**方法:** 16只BALB/c雌性裸鼠右前腋下接种人甲状腺乳头状癌(PTC) TPC-1细胞建立移植瘤模型。成瘤后裸鼠随机分为对照组和实验组,每组8只,对照组裸鼠腹腔注射生理盐水,实验组裸鼠腹腔注射5-Aza-CdR,隔日给药1次,连续给药4周。观察2组裸鼠移植瘤生长情况,末次给药后处死裸鼠,称瘤体质量。HE染色观察2组裸鼠移植瘤组织病理形态表现,免疫组织化学染色检测2组裸鼠移植瘤组织中微管相关蛋白轻链3(LC3)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)和Bcl-2相关X蛋白(Bax)蛋白表达水平,实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法和Western blotting法检测2组裸鼠移植瘤组织中LC3、Beclin-1、Bcl-2、Bax、细胞外信号调节激酶激酶(MEK)、细胞外信号调节激酶1(ERK1)、细胞外信号调节激酶2(ERK2)、磷酸化ERK1(p-ERK1)、磷酸化ERK2(p-ERK2) mRNA和蛋白表达水平,并计算Bax/Bcl-2比值。**结果:** 与对照组比较,实验组裸鼠移植瘤体积和质量明显降低( $P<0.01$ )。对照组裸鼠癌细胞数量多,排列紧密,细胞形状不规则,细胞核染色清晰,细胞核大,细胞有重叠和分叶,可见明显的病理性核分裂象,符合PTC病理特点;实验组裸鼠癌细胞数目明显减少,排列稀疏,细胞核固缩且胞核不明显,结缔组织明显增多。与对照组比较,实验组裸鼠移植瘤组织中LC3B和Beclin-1 mRNA及蛋白表达水平明显升高( $P<0.05$ ), Bax/Bcl-2比值升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), MEK、ERK1/2及p-ERK1/2 mRNA和蛋白表达水平明显降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。**结论:** 5-Aza-CdR可抑制裸鼠皮下移植瘤组织中TPC-1细胞生长,诱导移植瘤细胞自噬并促进细胞凋亡,其机制可能与丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)/MEK/细胞外信号调节激酶(ERK)信号通路抑制有关。

**[关键词]** 甲状腺乳头状癌; 细胞自噬; 细胞凋亡; 移植瘤; 5-氮杂-2'-脱氧胞苷

**[中图分类号]** R736.1 **[文献标志码]** A

## Effects of 5-Aza-CdR on autophagy and apoptosis of papillary thyroid cancer cells in subcutaneous xenograft tumor tissue of nude mice and its mechanism

SHI Yuxiao, LIU Meilan, ZHU Meilin, WEI Feng

(Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital, Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014010, China)

**ABSTRACT** **Objective:** To discuss the effects of 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR) on autophagy and

**[收稿日期]** 2023-11-29

**[基金项目]** 内蒙古自治区科技厅科技计划项目(201802128)

**[作者简介]** 石玉宵(1995-),女,黑龙江齐齐哈尔市人,在读硕士研究生,主要从事甲状腺肿瘤发病机制方面的研究。

**[通信作者]** 魏枫,主任医师,硕士研究生导师(E-mail: 1135172562@qq.com)

apoptosis of the TPC-1 cells in subcutaneous xenograft tumor tissue of the nude mice, and to clarify its mechanism. **Methods:** Sixteen female BALB/c nude mice were inoculated with human papillary thyroid carcinoma (PTC) TPC-1 cells in the right axilla to establish the xenograft tumor model. After tumor formation, the mice were randomly divided into control group and experiment group ( $n=8$ ). The nude mice in control group were given an intraperitoneal injection of saline, while the nude mice in experiment group were given the intraperitoneal injection of 5-Aza-CdR, administered once every other day for four weeks. The growth status of xenograft tumor of the mice in both groups was observed, and the mice were sacrificed after the final administration and the tumor weights of the nude mice in two groups were detected. HE staining was used to observe the pathomorphology of xenograft tumor tissue of the nude mice in both groups; immunohistochemistry was used to detect the expression levels of microtubule-associated protein light chain 3 (LC3), B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), and Bcl-2-associated X protein (Bax) in xenograft tumor tissue of the nude mice in two groups; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting methods were used to detect the expression levels of LC3, Beclin-1, Bcl-2, Bax, mitogen-activated protein kinase kinase (MEK), extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1), extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2), phosphorylated EPK1 (p-ERK1), and phosphorylated EPK2 (p-ERK2) mRNA and proteins in xenograft tumor tissue of the nude mice in two groups. **Results:** Compared with control group, the tumor volume and weight of the nude mice in experiment group were significantly decreased ( $P<0.01$ ). The number of cancer cells of the nude mice in control group was high, and the cells were densely arranged, with irregular shapes, clear nuclear staining, large overlapping nuclei, and lobulation, showing significant pathological mitotic figures consistent with PTC pathological characteristics. The number of cancer cells of the nude mice in experiment group showed a significant decreasing trend, and the cells were sparse arrangement, nuclear shrinkage, and less distinct nuclei, with a significant increase in connective tissue. Compared with control group, the expression levels of LC3B and Beclin-1 mRNA and proteins in xenograft tumor tissue of the nude mice in experiment group were significantly increased ( $P<0.05$ ) and the ratio of Bax/Bcl-2 was increased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), while the expression levels of MEK, ERK1/2, and p-ERK1/2 mRNA and proteins were significantly decreased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). **Conclusion:** 5-Aza-CdR can inhibit the growth of TPC-1 cells in subcutaneous xenograft tumor tissue of the nude mice, induce the autophagy, and promote the apoptosis of the tumor cells. The mechanism may be related to the inhibition of the mitogen-activated protein kinase (MAPK)/MEK/extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathways.

**KEYWORDS** Papillary thyroid carcinoma; Cell autophagy; Apoptosis; Transplantation tumor; 5-aza-2'-deoxycytidine

甲状腺癌是最常见的内分泌肿瘤和头颈部肿瘤, 其中约 80% 为甲状腺乳头状癌 (papillary thyroid carcinoma, PTC) [1]。迄今为止, 甲状腺近全切除术联合放射性碘治疗仍是 PTC 患者的最佳初始治疗方案。尽管大多数 PTC 患者预后良好, 长期生存率较高, 但仍有相当比例的 PTC 患者出现复发或远处转移, 寻找新的治疗策略有重要意义。

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) /丝裂原活化蛋白激酶激酶 (mitogen-activated protein kinase kinase, MEK) /细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-

regulated kinase, ERK) 信号通路是所有 MAPK 信号转导通路中最重要的信号级联反应, ERK 的表达对细胞生长发育至关重要, 其过度激活在癌症的发生发展中起重要作用 [2]。PTC 组织中 ERK 基因高表达 [3]。MAPK/MEK/ERK 信号通路还参与细胞凋亡和自噬等多种过程。自噬作为 II 型程序性细胞死亡是一种进化上保守的分解代谢过程, 可调节细胞生长, 维持内环境稳态 [4]。自噬异常或减少则不能分解受损的细胞器和蛋白质, 导致癌症发生。微管相关蛋白轻链 3 (light chain 3, LC3) 和 Beclin-1 是自噬途径中的关键蛋白。Beclin-1 是启动自噬体形成的标志, 与细胞凋亡中 B 细胞淋巴瘤 2

(B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 家族的抗凋亡蛋白具有相同的BH3结构域, Bcl-2既可抑制促凋亡蛋白, 又可通过BH3结构域与Beclin-1共同调节自噬<sup>[5]</sup>。

5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR) 是美国食品药品监督管理局批准的DNA甲基转移酶抑制剂, 常用于治疗骨髓增生异常综合征和白血病, 最近也用于治疗实体瘤<sup>[6]</sup>。研究<sup>[7-9]</sup>显示: 5-Aza-CdR可诱导白血病细胞、肝癌细胞和胆管癌细胞发生凋亡和自噬。目前5-Aza-CdR对PTC细胞自噬影响的研究较少, 本研究建立TPC-1细胞裸鼠移植瘤模型, 探讨5-Aza-CdR是否通过MAPK/MEK/ERK信号通路影响细胞自噬和凋亡, 从而抑制肿瘤生长, 为临床PTC治疗提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物、细胞、主要试剂和仪器** TPC-1细胞株购自上海分子与细胞生物研究中心。4周龄BALB/c雌性裸鼠16只, 体质量(14.6±0.4)g, 购自浙江维通利华实验动物技术有限公司, 动物生产许可证号: SCXK(京)2019-0001。本研究遵循实验动物伦理原则, 在上海分子与细胞生物研究中心SPF级屏障系统中饲养裸鼠, 环境温度18℃~22℃, 恒湿45%~55%, 密闭无菌。5-Aza-CdR(货号HY-A0004)购自美国Sigma公司, 兔抗人单克隆LC3B(货号3868)、Beclin-1(货号3495)、MEK(货号8727T)、ERK1/2(货号4695T)和磷酸化ERK1/2(phosphorylated ERK1/2, p-ERK1/2)(货号4370S)抗体购自美国Cell Signaling Technology公司, 兔抗人甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)(货号AF7021)抗体购自江苏亲科生物研究中心有限公司, 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔预吸附IgG H&L(bs-0295G-HRP)二抗和兔抗人β-actin(bs-0061R)抗体购自北京博奥森生物技术有限公司, 兔抗人Bax(货号40635)和Bcl-2(货号40639)抗体购自美国SAB Biotherapeutics公司。超低温冰箱(-80℃)和Multiskan FC酶标仪购自美国赛默飞世尔科技公司, 7900HT实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)系统购自美国应用生物系统公司。

### 1.2 TPC-1细胞裸鼠皮下移植瘤模型的制备

TPC-1细胞株采用含10%胎牛血清的培养基培

养, 置于含5% CO<sub>2</sub>的37℃培养箱中。倒置显微镜下观察细胞生长情况, 隔日更换培养基。待细胞生长至覆盖培养瓶壁的80%~90%后传代, 取对数生长期细胞, 采用胰酶消化细胞, 调整细胞浓度为1×10<sup>7</sup> mL<sup>-1</sup>, 于裸鼠右前腋下接种, 200 μL/只。接种完毕后将裸鼠置于屏障系统中饲养, 待右前腋下出现直径3~5 mm肿块, 提示移植瘤模型建立成功。

**1.3 动物分组、给药方式和移植瘤生长情况** 成瘤后将裸鼠随机分为对照组和实验组, 每组各8只。对照组裸鼠腹腔注射生理盐水(200 μL/只), 实验组裸鼠腹腔注射5-Aza-CdR(200 μL/只, 1 μg·g<sup>-1</sup>), 隔日给药1次, 周期28 d。给药第0、7、14、21和28天采用游标卡尺测量2组裸鼠瘤体的长径和短径, 计算每组裸鼠瘤体长径和短径的平均值并计算移植瘤体积, 移植瘤体积=(长径×短径<sup>2</sup>)/2, 绘制瘤体体积变化曲线。末次给药后24 h, 采用颈椎离断法处死裸鼠, 剥离裸鼠肿瘤组织, 电子天平称取肿瘤质量, 计算2组裸鼠肿瘤平均质量。取每个瘤体的一部分组织采用石蜡包埋, 其余瘤体去除周围结缔组织和血凝块, 置于无酶EP管中, -80℃冰箱保存。

### 1.4 HE染色观察2组裸鼠移植瘤病理形态表现

将实验组和对照组裸鼠移植瘤组织标本浸泡于4%多聚甲醛固定液中, 随后进行组织脱水、透明、浸蜡、包埋和切片, 再经复水、染色、脱水和封闭, 显微镜下观察2组裸鼠肿瘤组织染色情况并采集图像。

### 1.5 RT-qPCR法检测2组裸鼠移植瘤组织中目的基因mRNA表达水平

取-80℃冰箱冻存的2组大鼠肿瘤组织40 mg, 每个样品加入800 μL TRIzol, 提取RNA并测定RNA浓度。按照反转录试剂盒操作说明进行反转录生成cDNA。反转录产物按照Magic SYBR Mixture试剂盒进行RT-qPCR扩增, 检测LC3-II、Beclin-1、Bcl-2、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)、MEK、ERK1、ERK2、磷酸化ERK1(phosphorylated ERK1, p-ERK1)和磷酸化ERK2(phosphorylated ERK2, p-ERK2)mRNA表达水平。PCR反应条件: 预变性95℃、10 min; 变性95℃、15 s; 退火60℃、60 s, 共40个循环; 总延伸75℃、5 min。引物序列: LC3-II上游引物序列5'-GTCAGCGTCTCCACA CCAATCTC-3', LC3-II下游引物序列5'-ACAA

TTTCATCCCGAACGTCTCCTG-3'; Beclin-1上游引物序列5'-ACATCTGGCACAGTGGACAGTTTG-3', Beclin-1下游引物序列5'-AGCATGGAGCAGCAACACAGTC-3'; Bax上游引物序列5'-TTCAGGGTTTCATCCAGGATCG-3', Bax下游引物序列5'-TTGAGACACTCGCTCAGCTTC-3'; Bcl-2上游引物序列5'-CCTGTGGATGACTGAGTACCTG-3', Bcl-2下游引物序列5'-GCCAGGAGAAATCAAACAGAGG-3'; MEK上游引物序列5'-TGGAGATGGCAGTTGGAAGAT-3', MEK下游引物序列5'-GAGGTCGGCTATCCATTCCAT-3'; ERK1上游引物序列5'-CATCTTCCCTGGCAAGCACTA-3', ERK1下游引物序列5'-AGTTTCGGGCCTTCATGTTG-3'; ERK2上游引物序列5'-CCTTCCAACCTGCTGCTCAA-3', ERK2下游引物序列5'-TTCTGTCAGGAACCTGTGTGA-3'; p-ERK1上游引物序列5'-TCAAGCCTTCCAACCTC-3', p-ERK1下游引物序列5'-GCAGCCCACAGACCAA-3'; p-ERK2上游引物序列5'-TCCCAAATCTGACTCCAAAG-3', p-ERK2下游引物序列5'-TCCAGCTCCAGTTC AAAGG-3'; GAPDH上游引物序列5'-AGAA GGCTGGGGCTCATTTG-3', GAPDH下游引物序列5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'。根据所得各组的循环阈值 (cycle threshold, CT), 以GAPDH为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因mRNA表达水平, 实验重复3次。

**1.6 免疫组织化学染色法检测2组裸鼠移植瘤组织中LC3B、Bax和Bcl-2蛋白表达水平** 石蜡包埋的甲状腺乳头状癌裸鼠移植瘤组织切成6 μm厚的切片。切片脱蜡后, 采用柠檬酸盐-乙二胺四乙酸进行抗原修复, 切片在3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>中室温孵育5 min抑制内源性过氧化物酶活性。抗原修复后, 采用5%牛血清白蛋白封闭液在室温封闭切片15 min。分别加入LC3B、Bax和Bcl-2一抗 (均为1:100稀释), 室温过夜。次日加入二抗 (1:200), 37℃孵育30 min; 采用3, 3'-二氨基联苯胺试剂盒显影, 显微镜下观察, 蒸馏水终止反应, 切片在室温下苏木素染色3 s, 梯度乙醇脱水后, 二甲苯透明, 最后采用中性树胶密封, 光学显微镜下观察。所有玻片在同一光源背景强度, 同一放大倍数下拍照。采用Image J图像分析系统进行半定量分析, 计算积分吸光度 (integrated A, IA)。采用Image

J图像分析系统进行半定量分析, 计算平均光密度 (average optical density, AOD) 值, AOD=累积光密度 (integrated optical density, IOD) 值/目的蛋白分布区域面积。

**1.7 Western blotting法检测2组裸鼠移植瘤组织中LC3B、Beclin-1、Bax、Bcl-2、MEK、ERK1/2和p-ERK1/2蛋白表达水平** -80℃冰箱中取出移植瘤组织, 加入放射免疫沉淀法裂解液, 在冰上使用玻璃匀浆器匀浆, 提取总蛋白, 二辛可宁酸蛋白定量法检测蛋白浓度, 加入溴酚蓝和抗氧化剂后100℃煮沸5 min。每孔上样量为20 μg蛋白, 浓缩胶19 mA, 40 min, 分离胶29 mA电泳, 待溴酚蓝染料电泳至凝胶底部时停止电泳。采用半干法转膜, 200 mA、90 min, 5%脱脂奶粉封闭90 min。加入LC3B、Beclin-1、Bax、Bcl-2、MEK、ERK1/2、p-ERK1/2、β-actin和GAPDH一抗4℃孵育过夜。第2天采用Tris缓冲盐Tween洗涤缓冲液 (Tris-buffered saline with Tween 20, TBST) 洗涤3次, 每次15 min, 加入二抗 (1:10 000) 室温孵育90 min, TBST缓冲液洗涤3次, 每次15 min。条带置入增强型化学发光试剂中, 采用Image J图像分析系统分析蛋白条带灰度值, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参条带灰度值。实验重复3次。

**1.8 统计学分析** 采用Graphpad Prism 9.5统计软件进行统计学分析。采用Shapiro-Wilk检验进行正态性检验, 2组裸鼠移植瘤组织中LC3- II、Beclin-1、Bax、Bcl-2、MEK、ERK1/2和p-ERK1/2 mRNA和蛋白及LC3B蛋白表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2组间样本均数比较采用两独立样本t检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 2组裸鼠移植瘤大体形态、瘤体积和瘤质量

对照组裸鼠移植瘤体呈多结节状, 包膜完整, 表面呈肉红色, 剖面呈鱼肉状, 见图1。实验组裸鼠移植瘤体积明显小于对照组 ( $P < 0.01$ ), 见图2和表1。末次给药后, 实验组裸鼠移植瘤质量明显低于对照组 ( $P < 0.01$ ), 见表1。

**2.2 2组裸鼠移植瘤组织病理形态表现** HE染色结果显示: 对照组裸鼠癌细胞数量多, 排列紧密, 细胞形状不规则, 细胞核染色清晰, 细胞核大, 有重叠和分叶, 可见明显病理性核分裂象, 符合PTC病理特点。实验组裸鼠癌细胞数量明显减少,

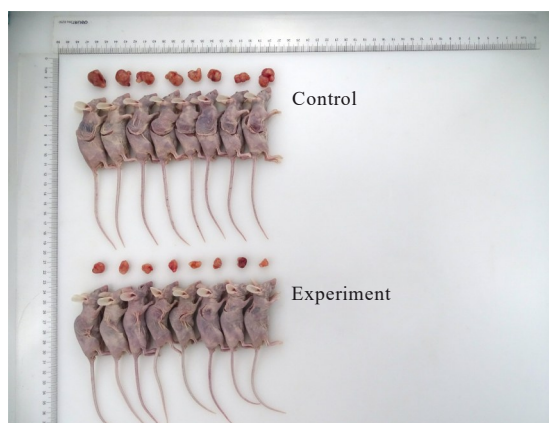


图1 2组荷瘤裸鼠皮下移植瘤大体形态表现

Fig. 1 Gross morphology of subcutaneous exnograf tumor of tumor-loaded nude mice in two groups

排列稀疏, 细胞核固缩且胞核不明显, 结缔组织明显增多。见图3。

2.3 2组裸鼠移植瘤组织中 LC3- II 和 Beclin-1 mRNA 表达水平及 Bax/Bcl-2 比值 与对照组比较, 实验组裸鼠移植瘤组织中 LC3- II 和 Beclin-1 mRNA 表达水平及 Bax/Bcl-2 比值明显升高 ( $P < 0.05$ )。见表2。

2.4 2组裸鼠移植瘤组织中 MEK、ERK1、ERK2、p-ERK1 和 p-ERK2 mRNA 表达水平 与对照组比

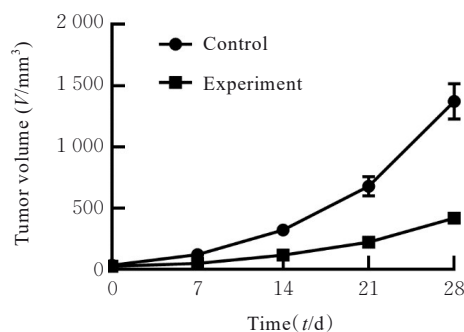


图2 2组裸鼠移植瘤体积

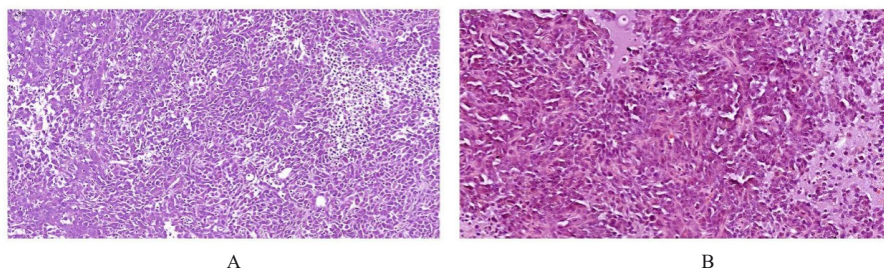
Fig. 2 Volumes of exnograf tumors of nude mice in two groups

表1 末次给药后2组裸鼠移植瘤体积和质量

Tab. 1 Volumes and weights of exnograf tumor of nude mice in two groups after last administration ( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

Group	Volume( $V/mm^3$ )	Weight( $m/g$ )
Control	$1372.09 \pm 407.96$	$1.33 \pm 0.46$
Experiment	$417.64 \pm 73.74$	$0.45 \pm 0.11$
<i>P</i>	$<0.01$	$<0.01$

较, 实验组裸鼠移植瘤组织中 MEK、ERK1、ERK2、p-ERK1 和 p-ERK2 mRNA 表达水平降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见表3。



A: Control group; B: Experiment group.

图3 2组裸鼠移植瘤组织病理形态表现(HE, ×200)

Fig. 3 Pathomorphology of exnograf tumor of nude mice in two groups (HE, ×200)

表2 2组裸鼠移植瘤组织中 LC3- II 和 Beclin-1 mRNA 表达水平及 Bax/Bcl-2 比值

Tab. 2 Expression levels of LC3- II and Beclin-1 mRNA, and ratios of Bax/Bcl-2 in exnograf tumor tissue of nude mice in two groups ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

Group	LC3- II mRNA	Beclin-1 mRNA	Ratio of Bax/Bcl-2
Control	$1.03 \pm 0.02$	$1.07 \pm 0.10$	$1.02 \pm 0.06$
Experiment	$8.41 \pm 2.92$	$1.65 \pm 0.32$	$2.89 \pm 0.82$
<i>P</i>	$<0.05$	$<0.05$	$<0.05$

2.5 2组裸鼠移植瘤组织中 LC3B、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平 免疫组织化学染色结果显示: LC3B、Bax 和 Bcl-2 蛋白主要在细胞质中表达, 阳性细胞呈棕黄色。与对照组比较, 实验组裸鼠移植瘤组织大部分细胞中 LC3B 和 Bax 表达呈阳性, LC3B 和 Bax 蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ ); Bcl-2 阳性细胞少见, Bcl-2 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ )。见图4和表4。

表3 2组裸鼠移植瘤组织中MEK、ERK1、ERK2、p-ERK1和p-ERK2 mRNA表达水平

Tab. 3 Expression levels of MEK, ERK1, ERK2, p-ERK1, and p-ERK2 mRNA in exnograf tumor tissue of nude mice in two groups (n=3,  $\bar{x}\pm s$ )

Group	MEK	ERK1	ERK2	p-ERK1	p-ERK2
Control	1.00±0.00	1.03±0.02	1.00±0.00	1.00±0.08	1.01±0.01
Experiment	0.27±0.27	0.62±0.18	0.46±0.14	0.54±0.15	0.36±0.32
P	<0.01	<0.05	<0.01	<0.01	<0.05

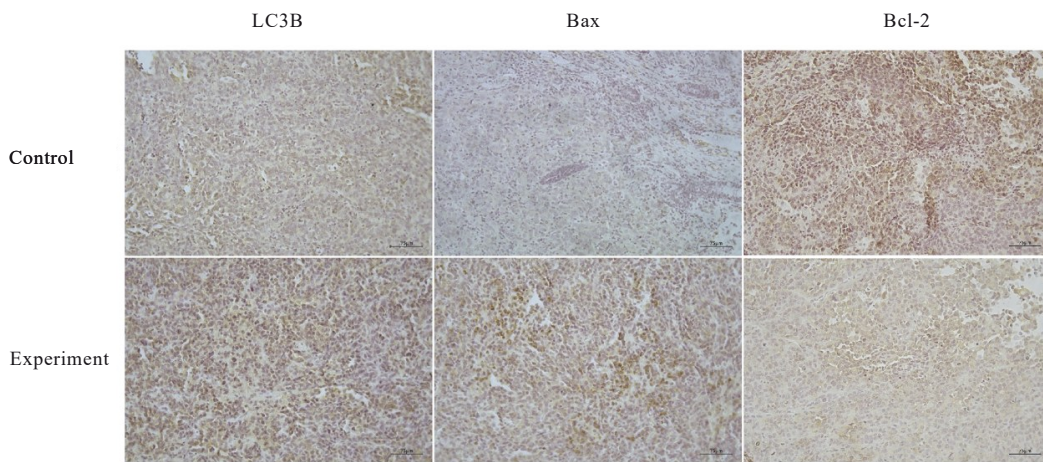


图4 2组裸鼠移植瘤组织中LC3B、Bax和Bcl-2蛋白表达情况(免疫组织化学, ×200)

Fig. 4 Expressions of LC3B, Bax, and Bcl-2 proteins in transplanted tumor tissue of nude mice in two groups (Immunohistochemistry, ×200)

表4 2组裸鼠移植瘤组织中LC3B、Bax和Bcl-2蛋白表达水平

Tab. 4 Expression levels of LC3B, Bax, and Bcl-2 proteins in exnograf tumor tissue of nude mice in two groups (n=3,  $\bar{x}\pm s$ )

Group	LC3B	Bax	Bcl-2
Control	11.52±1.54	12.63±1.73	17.43±9.49
Experiment	33.30±5.92	15.73±2.39	14.12±7.39
P	<0.05	<0.05	<0.01

2.6 2组裸鼠移植瘤组织中LC3B和Beclin-1蛋白表达水平及Bax/Bcl-2比值 与对照组比较, 实验组裸鼠移植瘤组织中LC3B和Beclin-1蛋白表达水平及Bax/Bcl-2比值明显升高 ( $P<0.01$ )。见图5。

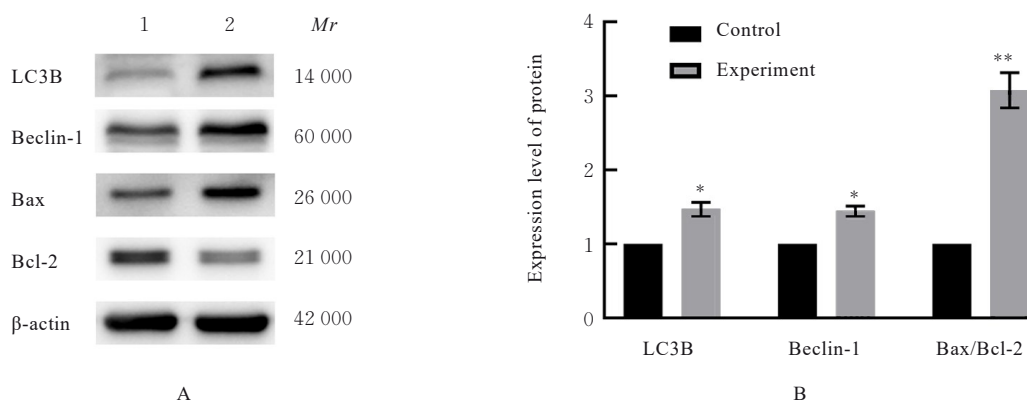
2.7 2组裸鼠移植瘤组织中MEK、ERK1/2和p-ERK1/2蛋白表达水平 与对照组比较, 实验组裸鼠移植瘤组织中MEK、ERK1/2和p-ERK1/2蛋白表达水平明显降低 ( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。见图6。

### 3 讨论

PTC患者一般预后良好, 但是有些PTC具有

高侵袭性和去分化倾向, 可能进展为低分化或未分化甲状腺癌, 预后不良<sup>[10]</sup>, 因此有必要寻找新的疗法。本研究结果显示: 随着5-Aza-CdR给药时间延长, TPC-1细胞移植瘤生长趋缓, 癌细胞数目减少, 细胞核出现固缩, 表明5-Aza-CdR可以有效抑制PTC移植瘤的生长。

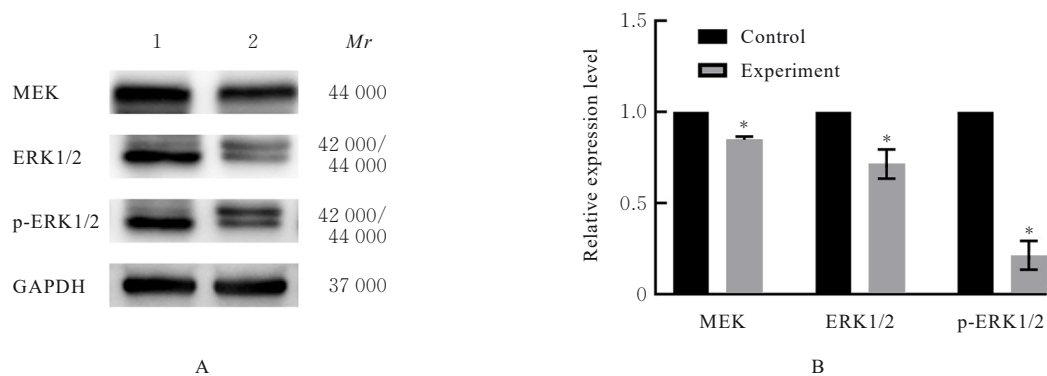
5-Aza-CdR是一种强效且特异性的DNA甲基转移酶抑制剂, 可以重新激活抑癌基因表达, 具有良好的抗肿瘤活性<sup>[11]</sup>。梁等<sup>[12]</sup>和ZHANG等<sup>[13]</sup>分别在乳腺癌细胞和膀胱癌细胞中发现5-Aza-CdR可以诱导细胞自噬, 发挥抗癌作用。自噬由一组自噬相关蛋白如自噬相关基因5 (autophagy-related gene 5, Atg5)、Beclin-1、P62和LC3等控制<sup>[14-16]</sup>。



Lane 1: Control group; Lane 2: Experiment group. \* $P < 0.01$  vs control group.

图5 2组裸鼠移植瘤组织中LC3B、Beclin-1、Bax和Bcl-2蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 5 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of LC3B, Beclin-1, Bax, and Bcl-2 proteins in exnograf tumor tissue of nude mice in two groups



Lane 1: Control group; Lane 2: Experiment group. \* $P < 0.01$  vs control group.

图6 2组裸鼠移植瘤组织中MEK、ERK1/2和p-ERK1/2蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 6 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of MEK, ERK1/2, and p-ERK1/2 proteins in exnograf tumor tissue of nude mice in two groups

自噬在各种肿瘤类型中频繁下调,表明其作为肿瘤抑制因子。Atg突变是最常见的自噬介导的致癌因素。Beclin-1是第一个被发现在癌症中存在突变的Atg基因,在77%卵巢癌和30%乳腺癌组织中呈单等位基因缺失<sup>[17]</sup>。本研究结果显示:5-Aza-CdR处理后移植瘤组织中Beclin-1和LC3B mRNA和蛋白表达水平明显升高,说明5-Aza-CdR促进了自噬的表达。

目前临床治疗癌症的手段主要还是通过细胞凋亡消除癌细胞。细胞凋亡是一系列复杂的形态学事件,如核固缩和核碎裂及质膜的起泡<sup>[18]</sup>。细胞凋亡途径的任何改变都会导致肿瘤发生<sup>[19]</sup>。通过内源性或外源性途径诱导癌细胞凋亡已成为许多抗癌治疗策略的关键<sup>[20]</sup>。QIU等<sup>[21]</sup>研究显示:在长期

微环境应激中,肝癌细胞出现Beclin-1的诱导表达,伴随促凋亡蛋白Bax的过表达和抗凋亡蛋白Bcl-2的低表达,促进肝癌细胞的自噬状态向凋亡转变,抑制细胞增殖。本研究结果显示:5-Aza-CdR处理后裸鼠移植瘤组织中Bax表达水平升高,Bcl-2表达水平降低,提示5-Aza-CdR促进了移植瘤内源性细胞凋亡途径的激活。

自噬和凋亡受多种信号通路的调节,MAPK/MEK/ERK信号通路是其中之一。MAPK/MEK/ERK信号通路在控制细胞存活和增殖的过程中起重要作用,其异常激活与细胞转化和癌变有关<sup>[22]</sup>,多种人体肿瘤已检测到该信号通路异常激活<sup>[23-24]</sup>。本研究结果显示:5-Aza-CdR处理后移植瘤组织中MEK、ERK1/2和p-ERK1/2 mRNA和蛋白表达水

平明显降低, 提示 5-Aza-CdR 通过抑制 MAPK/MEK/ERK 信号通路在诱导 PTC 细胞死亡中发挥作用。

综上所述, 5-Aza-CdR 可抑制 PTC 生长, 该抑制作用由细胞凋亡和自噬介导, 且依赖于 MAPK/MEK/ERK 通路下调。本研究结论深化了对 5-Aza-CdR 抗肿瘤作用的理解, 为将来 5-Aza-CdR 在治疗 PTC 中的临床应用提供了依据。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

石玉宵参与研究设计、实验操作、数据整理、统计分析和论文撰写, 刘美岚和朱美霖参与文献检索及论文修改, 魏枫参与文章实验设计、论文修改和论文审校。

#### [参考文献]

- [1] ZHU X Y, YAO J, TIAN W. Microarray technology to investigate genes associated with papillary thyroid carcinoma[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(5): 3729-3733.
- [2] 班碧秀, 孙志刚. ERK1/2信号通路与肿瘤关系的研究进展[J]. 内科, 2023, 18(5): 477-480.
- [3] 聂智梅, 胡晓东, 许怀瑾, 等. 甲状腺结节手术人群三酰甘油水平与甲状腺乳头状癌患病风险的相关性分析[J]. 解放军医学杂志, 2023, 48(5): 523-529.
- [4] XIA H J, GREEN D R, ZOU W P. Autophagy in tumour immunity and therapy [J]. Nat Rev Cancer, 2021, 21(5): 281-297.
- [5] XU H D, QIN Z H. Beclin 1, bcl-2 and autophagy[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1206: 109-126.
- [6] SALEH M H, WANG L, GOLDBERG M S. Improving cancer immunotherapy with DNA methyltransferase inhibitors [J]. Cancer Immunol Immunother, 2016, 65(7): 787-796.
- [7] LI L Z, LIU W J, SUN Q, et al. Decitabine downregulates TIGAR to induce apoptosis and autophagy in myeloid leukemia cells[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 8877460.
- [8] SALAMA B M, HELMY M W, FOUAD H, et al. The synergistic antitumor effect of decitabine and vorinostat combination on HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line *via* epigenetic modulation of autophagy-apoptosis molecular crosstalk[J]. Curr Issues Mol Biol, 2023, 45(7): 5935-5949.
- [9] WANG B, LI H B, YANG R, et al. Decitabine inhibits the cell growth of cholangiocarcinoma in cultured cell lines and mouse xenografts[J]. Oncol Lett, 2014, 8(5): 1919-1924.
- [10] FU Y T, ZHENG H B, ZHANG D Q, et al. MicroRNA-1266 suppresses papillary thyroid carcinoma cell metastasis and growth *via* targeting FGFR2[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(11): 3430-3438.
- [11] KULIS M, ESTELLER M. DNA methylation and cancer[J]. Adv Genet, 2010, 70: 27-56.
- [12] 梁文颖, 熊静波, 赵嘉佳. 5-氮杂-2'-脱氧胞苷诱导乳腺癌细胞自噬与DNA损伤相关联[J]. 肿瘤, 2012, 32(7): 495-500.
- [13] ZHANG H H, HUANG B, CAO Y H, et al. Role of 5-Aza-CdR in mitomycin-C chemosensitivity of T24 bladder cancer cells[J]. Oncol Lett, 2017, 14(5): 5652-5656.
- [14] WANG Z C, HUANG F Z, XU H B, et al. MicroRNA-137 inhibits autophagy and chemosensitizes pancreatic cancer cells by targeting ATG5 [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2019, 111: 63-71.
- [15] ZHANG W N, HE R, YANG W B, et al. Autophagic Schwann cells promote perineural invasion mediated by the NGF/ATG7 paracrine pathway in pancreatic cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2022, 41(1): 48.
- [16] ZHAO X, ZHANG Q, WANG Y Y, et al. Oridonin induces autophagy-mediated cell death in pancreatic cancer by activating the c-Jun N-terminal kinase pathway and inhibiting phosphoinositide 3-kinase signaling [J]. Ann Transl Med, 2021, 9(13): 1084.
- [17] WIJSHAKE T, ZOU Z J, CHEN B B, et al. Tumor-suppressor function of Beclin 1 in breast cancer cells requires E-cadherin [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2021, 118(5): e2020478118.
- [18] FENG S X, ZHA Z X, WANG Z, et al. Anticancer activity of oleiferoside B involving autophagy and apoptosis through increasing ROS release in MCF-7 cells and SMMC-7721 cells[J]. Nat Prod Res, 2021, 35(22): 4865-4869.
- [19] SINGH R, LETAI A, SAROSIEK K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(3): 175-193.
- [20] CARNEIRO B A, EL-DEIRY W S. Targeting apoptosis in cancer therapy [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2020, 17(7): 395-417.
- [21] QIU D M, WANG G L, CHEN L, et al. The expression of beclin-1, an autophagic gene, in hepatocellular carcinoma associated with clinical pathological and prognostic significance [J]. BMC Cancer, 2014, 14: 327.

- [22] GUO Y J, PAN W W, LIU S B, et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(3): 1997-2007.
- [23] CHEN C, WANG G. Mechanisms of hepatocellular carcinoma and challenges and opportunities for molecular targeted therapy [J]. *World J Hepatol*, 2015, 7(15): 1964-1970.
- [24] PASHIRZAD M, KHORASANIAN R, FARD M M, et al. The therapeutic potential of MAPK/ERK inhibitors in the treatment of colorectal cancer [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2021, 21(11): 932-943.