DOI:10.16016/j.1000-5404.201603178

金属镉促进甲状腺未分化癌 FRO 细胞增殖的作用及机制

赵婷婷,朱 平,莫小梅,赵 乐,代宇婕,刘智敏 (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室)

[**摘要**] **目的** 探讨金属镉对甲状腺未分化癌 FRO 细胞增殖的影响及其作用机制。**方法** Western blot 法检测 FRO、MCF-7 和 MAD-MB-231 细胞中 G 蛋白偶联受体 1(G protein-coupled estrogen receptor,GPER1)表达水平。不同浓度(0、0.25、0.50、0.75、1.00 mmol/L)镉($CdCl_2$)处理 FRO、MCF-7 及 MAD-MB-231 细胞 48 h 后,MTT 法检测细胞增殖率。0.5 mmol/L 镉分别处理 FRO 细胞 0、5、10、15、30 min,Western blot 法检测 ERK1/2 和 Akt 的磷酸化水平。GPER1 抑制剂 G15 处理 FRO 细胞后,设计合成针对 GPER1 的小干扰 RNA(GPER-siRNA)并转染 FRO 细胞,采用 Western blot 再次检测 ERK1/2 和 Akt 磷酸化水平。分别用 GPER1 抑制剂 G15、ERK1/2 抑制剂(PD98059)和 PI3K-Akt 抑制剂(LY294002)、GPER-siRNA 处理 FRO 细胞,MTT 法检测细胞增殖率。**结果** GPER1 在 MAD-MB-231 细胞中表达水平明显低于 MCF-7、FRO 细胞。不同浓度 $CdCl_2$ 处理 FRO、MCF-7 及 MAD-MB-231 细胞 48 h 后,低浓度 $CdCl_2$ 促进 FRO、MCF-7 细胞增殖,对 MAD-MB-231 细胞增殖无显著影响;高浓度 $CdCl_2$ 对细胞均具有抑制作用。0.5 mmol/L $CdCl_2$ 处理 FRO 细胞不同时间后,ERK1/2 与 Akt 的磷酸化水平在 15 min 达最大值。GPER1 抑制剂 G15 处理 FRO 细胞,ERK1/2 与 Akt 的磷酸化水平显著降低($P<0.05$)。GPER1 的小干扰 RNA 干扰后,ERK1/2 与 Akt 的磷酸化水平明显降低($P<0.05$)。G15、PD、LY 和 GPER-siRNA 处理 FRO 细胞,细胞增殖率均显著下降。**结论** 金属镉通过 GPER1-ERK/Akt 信号通路促进 FRO 细胞的增殖。

[**关键词**] 镉;甲状腺未分化癌;GPER1;ERK1/2;PI3K-Akt

[**中图法分类号**] R363.13; R730.23; R736.1 [**文献标志码**] A

Role of cadmium in promoting proliferation in human anaplastic thyroid carcinoma FRO cells

Zhao Tingting, Zhu Ping, Mo Xiaomei, Zhao Le, Dai Yujie, Liu Zhimin (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of cadmium on the proliferation of anaplastic thyroid carcinoma FRO cells, and investigate the underlying mechanisms. **Methods** Western blotting was used to detect the expression of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER1) in FRO cells, MCF-7 cells and MAD-231 cells respectively. After the above cells were separately treated with different concentrations of $CdCl_2$ (0, 0.25, 0.50, 0.75 and 1.00 nmol/L) for 48 h, the cell viability was evaluated by MTT assay. The FRO cells were treated by 0.5 mmol/L $CdCl_2$ for 0, 5, 10, 15 or 30 min, the levels of phosphorylated ERK1/2 and Akt were analyzed by Western blot analysis. FRO cells were treated with G15 or transfected with the designed and synthesized RNA interference against GPER (GPER-RNAi), the levels of phosphorylated ERK1/2 and Akt were analyzed by Western blotting respectively. FRO cells were treated with GPER1 inhibitor G15, ERK1/2 inhibitor PD98059 (PD) and PI3K-Akt inhibitor LY294002 (LY), alone or in combination, and MTT assay was used to determine the cell proliferation. **Results** The expression level of

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81272937)

[**通信作者**] 刘智敏,E-mail:liuzm9999@aliyun.com

[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160620.1016.004.html(2016-06-20)

GPER1 was significantly lower in the MAD-MB-231 cells than in the MCF-7 and FRO cells. Low-dosed $CdCl_2$ treatment for 48 h promoted the proliferation of the FRO cells and MCF-7 cells, but had no effect on that of the MAD-MB-231 cells. However, $CdCl_2$ at high concentrations suppressed the cell proliferation in the 3 kinds of cells. After the cells were treated by 0.5 mmol/L $CdCl_2$ for different periods, the levels of phosphorylated ERK1/2 and Akt reached peak at 15 min in FRO cells, and the levels of phosphorylated ERK1/2 and Akt were decreased significantly in FRO cells ($P<0.05$) when the cells were treated with GPER1 inhibitor G15, transfected with GPER-siRNA, ERK1/2 inhibitor PD or Akt inhibitor LY. **Conclusion** Cadmium promotes the proliferation of anaplastic thyroid carcinoma FRO cells through GPER1-ERK/AKT pathway.

[**Key words**] cadmium; thyroid carcinoma; G protein-coupled estrogen receptor 1; ERK1/2; PI3K-Akt

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81272937). Corresponding author: Liu Zhimin, E-mail: liuzm9999@aliyun.com

近年学术界发现了一种新型的环境内分泌干扰物,称为金属类雌激素或金属类激素,常见的有镉、锑、钙、钴、铜、镍、铬、铅、汞和锡等[1]。这些金属类雌激素具有类雌激素作用,被发现与雌激素相关疾病如乳腺癌、子宫内膜移位、子宫肌瘤和子宫内膜癌等的发生有密切关系[2]。镉是其中具有代表性的一种。已有研究发现镉可以引起乳腺癌细胞 MCF-7 细胞 ERK 和 AKT 的快速激活,而对 MDA-MB-231 细胞无作用。甲状腺癌是最常见的内分泌肿瘤之一,而女性发病率明显高于男性[3]。雌激素能通过与细胞内雌激素受体的结合,促进肿瘤的发生[4]。G 蛋白偶联受体 1(G protein-coupled estrogen receptor, GPER1, 曾命名为 GPR30)是近年发现的一种新型雌激素膜性受体[5]。并且雌激素能通过 GPER1 途径促进甲状腺未分化癌细胞 FRO 的细胞增殖。目前对于镉是如何在甲状腺癌细胞中发挥类雌激素作用少见研究报道。本实验以甲状腺未分化癌 FRO 细胞为模型,探讨金属镉对甲状腺未分化癌 FRO 细胞增殖的影响及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

甲状腺未分化癌 FRO 细胞株、乳腺癌 MCF-7 细胞株及 MAD-MB-231 细胞株由香港中文大学外科实验室提供。Cd($CdCl_2$)、E_2(雌激素)、RPMI1640 培养基(不含酚红)、四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自美国 Sigma 公司。GPER1、GPER1 拮抗剂(G15)、PI3K-Akt 抑制剂(LY294002)和 ERK 抑制剂(PD98059)购自 Calbiochem 公司。SDS 配胶试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。β-actin 抗体、p-Akt 抗体、t-Akt 抗体购自 Santa Cruz 公司。GPER1 抗体购自 Abcam 公司。p-ERK1/2 抗体、t-ERK1/2 抗体购自 Cell signaling 公司,限制性内切酶购自 TaKaRa 公司,Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司。GPER-siRNA 序列由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用 RPMI1640 培养基(含 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素),于 37 ℃,5% CO_2 饱和湿度孵箱中常规贴壁传代培养 FRO 细胞,取对数生长期的细胞进行后续实验。

1.2.2 MTT 法 取对数生长期的细胞,经胰酶消化后制成单细胞悬液,以 5×10^3/孔接种于 96 孔培养板,待细胞完全贴壁后,用无血清、无酚红培养液培养 48 h,使细胞同步化,分别用 0.25、0.50、0.75、1.00 mmol/L $CdCl_2$ 处理 48 h,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μL,37 ℃孵育 4 h,吸去培养液,每孔加入 DMSO 150 μL,振荡 10 min,待紫色结晶完全溶解后,测定 D(490)值,重复 3 次,计算细胞增殖率。

1.2.3 GPER-siRNA 的构建和转染 根据 GenBank 中人 GPER mRNA(NM 001039966)全长序列,设计 siRNA 序列,命名为 GPER-siRNA(+),并同时设计阴性对照序列,命名为 GPER1-siRNA(-)。将 siRNA 的单链退火,与 pGenesil-1 质粒连接,转化 DH5α 感受态细胞,挑取单菌落提取质粒,用 Lipofectamine2000 转染,48 h 后用 $CdCl_2$ 处理细胞 15 min,提取蛋白进行 Western blot 检测。

1.2.4 免疫印记 根据不同实验要求,0.5 mmol/L $CdCl_2$ 处理 FRO 细胞不同时间(0、5、10、15、30 min)。将 GPER-siRNA(+)、GPER-siRNA(-)质粒转染 FRO 细胞 48 h。$CdCl_2$ 作用于分别加入 G15、PD98059、LY294002 以及转染 GPER-siRNA 的 FRO 细胞 15 min。分别处理 FRO 细胞后,取总蛋白 50 μg 进行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。湿转法将蛋白转移到 PVDF 膜上,5% 的脱脂奶粉封闭 1 h,加入一抗,4 ℃过夜。TBST 洗膜后加二抗,常温孵育 1 h,TBST 洗膜后,

用 ECL 发光法显色，Bio-Rad 凝胶成像系统采集图像。

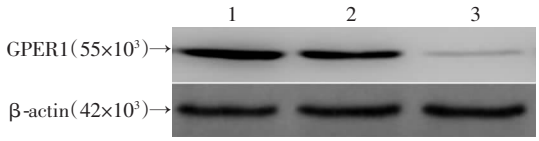
1.3 统计学方法

计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GPER1 在 MCF-7、MDA-MB-231、FRO 细胞中的表达

GPER1 在 MCF-7、FRO 细胞中表达明显高于 MDA-MB-231 细胞（图 1），MDA-MB-231 细胞可作为阴性对照组。



1：MCF-7；2：FRO；3：MDA-MB-231

图 1　GPER1 在 MCF-7、FRO、MDA-MB-231 中的表达

2.2 $CdCl_2$ 对 MCF-7、MDA-MB-231、FRO 细胞的影响

0、0.25、0.50、0.75、1.00 mmol/L $CdCl_2$ 分别处理人甲状腺未分化癌 FRO 细胞、乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞 48 h，MTT 法测细胞增殖率（图 2），结果表明低浓度 $CdCl_2$ 对 MCF-1、FRO 细胞有促进作用（$P<0.05$），但对 MDA-MB-231 细胞作用不显著。高浓度 $CdCl_2$ 对细胞均有抑制作用。

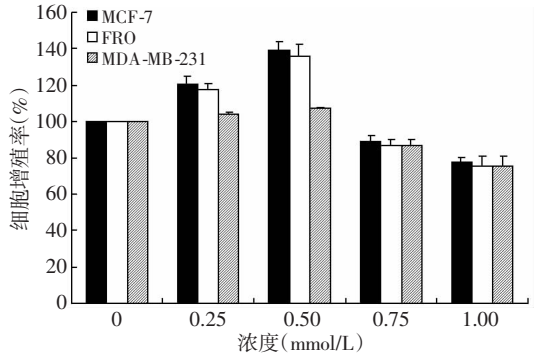
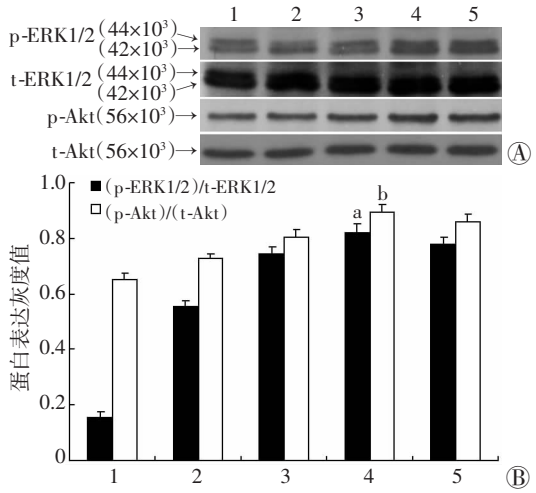


图 2　不同浓度 $CdCl_2$ 处理 MCF-7、FRO、MDA-MB-231 细胞对细胞增殖率的影响

2.3 $CdCl_2$ 促进 ERK1/2 和 Akt 磷酸化

0.5 mmol/L $CdCl_2$ 处理人甲状腺未分化癌 FRO 细胞 0、5、10、15、30 min，Western blot 法检测 ERK1/2 和 Akt 的磷酸化水平发现（图 3），随着 $CdCl_2$ 处理 FRO 细胞时间的增加，ERK1/2 和 Akt 的磷酸化水平逐渐增高，在 15 min 时 ERK1/2、Akt 的磷酸化水平达到峰值，随后降低。表明 $CdCl_2$ 在短时间内可促进 FRO 细胞 Akt 和 ERK1/2 磷酸化水平增高。

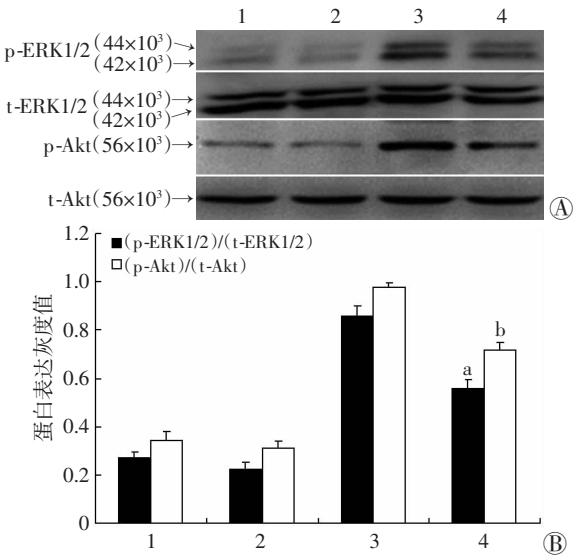


1：0 min；2：5 min；3：10 min；4：15 min；5：30 min；A：Western blot 检测；B：半定量分析 a：$P<0.05$，与 0 min 时（p-ERK1/2）/（t-ERK1/2）值比较；b：$P<0.05$，与 0 min 时（p-Akt）/（t-Akt）值比较

图 3　Western blot 检测 $CdCl_2$ 处理不同时间对 FRO 细胞 ERK1/2 和 Akt 蛋白磷酸化水平的影响

2.4 GPER1 抑制剂 G15 抑制 $CdCl_2$ 引起的 ERK1/2、Akt 磷酸化

用 GPER1 抑制剂 G15 处理 FRO 细胞，ERK1/2、Akt 磷酸化水平显著降低（$P<0.05$，图 4）。

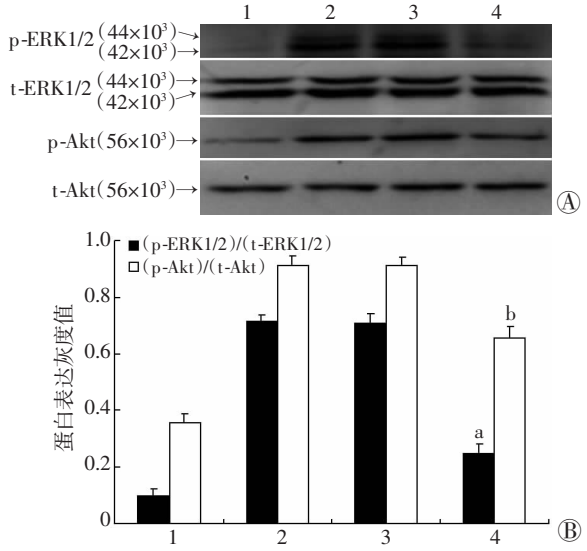


1：对照组；2：G15；3：$CdCl_2$；4：G15 + $CdCl_2$；A：Western blot 检测；B：半定量分析　a：$P<0.05$，与 $CdCl_2$ 处理组（p-ERK1/2）/（t-ERK1/2）值比较；b：$P<0.05$，与 $CdCl_2$ 处理组（p-Akt）/（t-Akt）值比较

图 4　Western blot 检测 G15 对 FRO 细胞 ERK1/2 和 Akt 蛋白磷酸化水平的影响

2.5 GPER-siRNA 干扰抑制 $CdCl_2$ 引起的 ERK1/2、Akt 磷酸化

将 GPER-siRNA(+)、GPER-siRNA(-)质粒转染 FRO 细胞 48 h,Western blot 检测 ERK1/2、Akt 的磷酸化水平。$CdCl_2$ 组、$CdCl_2$ + GPER-siRNA(+)组中 p-ERK1/2、t-ERK1/2 蛋白表达灰度值分别为 0.715 ± 0.023、0.248 ± 0.034,p-Akt、t-Akt 蛋白表达灰度值分别为 0.911 ± 0.033、0.658 ± 0.038。表明 GPER-siRNA干扰后,ERK1/2 与 Akt 的磷酸化水平明显降低($P<0.05$,图 5)。



1:对照组;2:$CdCl_2$;3:$CdCl_2$ + GPER-siRNA(-);4:$CdCl_2$ + GPER-siRNA(+);A: Western blot 检测;B:半定量分析
a:$P<0.05$,与 $CdCl_2$ 组(p-ERK1/2)/(t-ERK1/2)值比较;
b:$P<0.05$,与 $CdCl_2$ 组(p-Akt)/(t-Akt)值比较

图 5 Western blot 检测 GPER-siRNA 干扰对 FRO 细胞 ERK1/2 和 Akt 蛋白磷酸化水平的影响

2.6 ERK、AKT 和 GPER1 的抑制剂及 GPER-siRNA 干扰对 $CdCl_2$ 诱导的 FRO 细胞增殖的影响

G15、PD98059、LY294002、GPER-siRNA 均可抑制 $CdCl_2$ 诱导的 FRO 细胞增殖,增殖率由处理前的(140.67 ± 2.47)%分别降至(110.96 ± 2.62)%、(118.26 ± 4.07)%、(121.98 ± 2.65)%、(108.98 ± 3.65)%,表明 $CdCl_2$ 通过 GPER1 激活 ERK1/2、Akt 通路,促进 FRO 细胞增殖。

3 讨论

镉是一种重要的环境和工业毒物。研究发现镉与乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌等雌激素相关癌症的发生有密切关系,离体实验与体内实验均有研究显示镉具有类雌激素作用[6]。Brama 等[7]研究发现:镉能通过刺激 Akt、ERK1/2 和 PDGFRα 激酶促进乳腺癌细胞增殖。甲状腺癌是一种与雌激素相关的内分泌系统肿瘤。研究[8]表明,雌激素通过 GPER1 促进甲状腺未分化癌 FRO 细胞 Akt、ERK1/2 的磷酸化水平增高,诱导 FRO 细胞增殖。镉是通过怎么的途径促进甲状腺癌未分化癌 FRO 细胞的增殖目前尚少见研究。

本研究首先以 FRO、MCF-7 及 MDA-MB-231 细胞为研究对象,检测 3 种细胞中 GPERI 的表达,结果表明 GPER1 在 FRO、MCF-7 细胞中表达量较高,在 MDA-MB-231 中表达量相对较少。这与研究[9]结果一致。用不同浓度的 $CdCl_2$ 处理 3 种细胞,48 h 后测细胞增殖率,表明低浓度 $CdCl_2$ 促进 FRO、MCF-7 细胞增殖,对 MDA-MB-231 细胞无显著影响,高浓度对细胞均有抑制作用。高浓度镉对细胞抑制作用可能与镉引起的 DNA 氧化损伤和修复抑制有关[10]。研究[9]表明雌激素能够通过 GPER1-ERK/AKT 信号通路促进甲状腺癌 FRO 细胞增殖,那么镉在 FRO 细胞中是否有相似的信号通路? 本研究用 0.5 mmol/L $CdCl_2$ 处理 FRO 细胞不同时间,发现 $CdCl_2$ 可促进 ERK、AKT 磷酸化,且 15 min 时磷酸化水平最高。用 GPER1 抑制剂 G15 处理 FRO 细胞,ERK/AKT 磷酸化水平显著降低。证明 $CdCl_2$ 刺激 GPER1 介导的 ERK/AKT 的磷酸化作用。将 GPER-siRNA 转染至 FRO 细胞中干扰 GPER1 的表达,结果显示 ERK/AKT 的磷酸化水平显著降低,进一步证明 $CdCl_2$ 刺激 GPER1 介导的 ERK/AKT 的磷酸化作用。

为进一步证明金属镉通过 GPER1-ERK/AKT 信号通路促进甲状腺未分化癌 FRO 细胞增殖,分别用 GPER1 抑制剂 G15、ERK1/2 抑制剂 PD98059 和 PI3K-Akt 抑制剂 LY294002 及 GPER-siRNA 处理 FRO 细胞,MTT 法测细胞增殖率,结果表明 G15、PD98059、LY294002 和 GPER-siRNA 均可抑制镉诱导的 FRO 细胞增殖。

综上所述,金属镉通过 GPER1,促进人甲状腺未分化癌 FRO 细胞 ERK1/2、Akt 的磷酸化水平增高,诱导 FRO 细胞增殖。但金属隔是如何通过 GPER1-ERK/AKT 途径在细胞核中发挥作用从来促进细胞增殖本实验尚未涉及,这也是下一步的研究方向。镉的雌激素样作用需要引起高度关注,应特别加强对镉的雌激素样毒性及其机制的研究,以便采取更合理有效的预防措施,减少癌症的发生。

参考文献:

[1] Byrne C, Divekar S D, Storchan G B, *et al*. Metals and breast cancer[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2013, 18(1): 63-73. DOI: 10.1007/s10911-013-9273-9

[2] Silva N, Peiris-John R, Wickremasinghe R, *et al*. Cadmium a metalloestrogen: are we convinced? [J]. J Appl Toxicol, 2012, 32 (5): 318 - 332. DOI: 10.1002/jat.1771

[3] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62 (1): 10 - 29. DOI: 10.3322/caac. 20138

[4] Revankar C M, Cimino D F, Sklar LA, *et al*. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling[J]. Science, 2005, 307 (5715): 1625 - 1630.

[5] Vivacqua A, Bonofiglio D, Albanito L, *et al*. 17beta-estradiol, genistein, and 4-hydroxytamoxifen induce the proliferation of thyroid cancer cells through the g protein-coupled receptor GPR30[J]. Mol Pharmacol, 2006, 70 (4): 1414 - 1423.

[6] 李煌元, 吴思英, 张文昌, 等. 镉的雌性性腺生殖毒性研究现状[J]. 中国公共卫生, 2002, 18 (3): 379 - 381.

[7] Brama M, Gnessi L, Basciani S, *et al*. Cadmium induces mito- genic signaling in breast cancer cell by an ER-alpha- dependent mechanism[J]. Mol Cell Endocrinol, 2007, 264 (1/2): 102 - 108.

[8] 吴婷婷, 龙方懿, 刘智敏, 等. G 蛋白偶联受体在雌激素诱导人甲状腺未分化癌 FRO 细胞增殖中的作用及其机制[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33 (2): 164 - 168. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2011.02.027

[9] Liu Z, Yu X, Shaikh Z A. Rapid activation of ERK1/2 and AKT in human breast cancer cells by cadmium[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2008, 228 (3): 286 - 294. DOI: 10.1016/ j. taap. 2007. 12. 017

[10] Schwerdtle T, Ebert F, Thuy C, *et al*. Genotoxicity of soluble and particulate cadmium compounds: impact on oxidative DNA damage and nucleotide excision repair[J]. Chem Res Toxicol, 2010, 23 (2): 432 - 442. DOI: 10.1021/tx900444w

(**收稿**:2016-03-28;**修回**:2016-06-05)

(编辑 郭建秀)

《中华战创伤学》系列丛书内容简介

《中华战创伤学》是一部比较全面、系统地展示战创伤医学的大型系列学术专著。本套专著由国家“973”创伤和组织修复与再生项目首席科学家、全军战创伤专业委员会主任委员付小兵院士担任总主编,由德高望重的战创伤学专家王正国、卢世璧、程天民、盛志勇院士担任学术顾问,由全军战创伤专业委员会和中华医学会创伤学分会的著名专家担任各分卷主编,并由 500 多位战创伤医学专家教授和中青年技术骨干组成作者队伍,部分作者曾多次参加过局部战争战场救护和地震、雪灾、矿难等灾害医学救援。他们具有扎实的战创伤理论知识和丰富的创伤救治实际经验及新思维、新观念,按照系统工程的要求,全方位地把战创伤基础知识与临床实践经验与国内外最新的研究进展介绍给读者。

全书共 11 卷,35 篇 283 章,约 1 600 万字。第 1 卷战创伤学总论;第 2 卷颅脑战创伤;第 3 卷口腔颌面部战创伤;第 4 卷眼部战创伤;第 5 卷耳鼻咽喉头颈部战创伤;第 6 卷胸腹部战创伤;第 7 卷四肢、脊柱与骨盆战创伤;第 8 卷特殊致伤原因战创伤;第 9 卷特殊军事作业环境战创伤;第 10 卷战创伤修复再生与康复;第 11 卷战创伤护理与心理。主要介绍了战创伤学的发展历史、研究现状和展望,战创伤的基础和临床研究,战创伤救治的组织与管理、并发症的防治,战创伤预防控制措施,并比较全面、系统、详细地介绍了不同原因、不同部位、不同种类、不同环境、不同人群战创伤的流行病学、致伤机制、病理生理、临床特征与诊断,战创伤现场急救与转运、急症处理与伤情分级、后期治疗,战创伤修复与康复、护理与心理;为了做到平战结合、军地结合,还介绍了军事训练、军事交通、国防施工、灾害性创伤,以及大量群体伤的相关对策等内容。其内容主要来自作者长达数十年的战创伤教学、科研和临床工作积累的资料,其中不少内容是首次成书。

本专著作者群体实力雄厚、学术造诣精湛。其内容图文并茂,观点新颖权威,科学性、先进性、原创性、指导性强。以上特点铸就了本书较高的学术价值和社会价值,并彰显我国战创伤学领域的科研和临床诊疗水平,对开启战创伤学研究的新局面具有引领作用。本套书可作为从事战创伤研究的科研人员和临床各级医护工作者的重要工具书,也可作为战创伤救治培训教材。

本专著为 2015 年度国家出版基金资助项目,将于 2016 年由郑州大学出版社正式出版(全套定价 5 050.00 元,国际 16 开本,全精装彩色印制)。

联系人:李振川 **手机**:13613802207

地 址:郑州市大学路 40 号 **邮编**:450052

单 位:郑州大学出版社