

ARH I 和 E 钙粘蛋白在乳头状甲状腺癌中的表达及意义

刘 雷,吴志宏,章载良,董 伟,雷 蕾
(解放军第九八医院,浙江 湖州 313000)

摘 要: [目的] 探讨 ARH I 蛋白及 E 钙粘蛋白在乳头状甲状腺癌中的表达及意义。 [方法] 56 例经病理确诊的乳头状甲状腺癌患者入组, 并取其距癌组织边缘>2cm 的正常甲状腺组织作为对照。采用免疫组化方法检测 ARH I 蛋白及 E 钙粘蛋白的表达。 [结果] ARH I 及 E 钙粘蛋白在乳头状甲状腺癌中的表达均显著低于正常甲状腺组织 (48.2% vs 80.4%, 51.8% vs 91.1%, P 均<0.05)。ARH I、E 钙粘蛋白在乳头状甲状腺癌中的表达与肿瘤大小、TNM 分期、淋巴结转移情况有关 (P <0.05)。ARH I 与 E 钙粘蛋白在乳头状甲状腺癌中的表达无明显相关性 ($Kappa=0.287, P=0.023$)。 [结论] ARH I、E 钙粘蛋白在乳头状甲状腺癌中表达降低, 提示其在乳头状甲状腺癌的发生发展、侵袭中可能发挥重要作用。

关键词: ARH I; E 钙粘蛋白; 乳头状甲状腺癌; 印迹抑癌基因

中图分类号: R736.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2014)04-0333-05

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2014.04.A013

Expression of ARH I and E-cadherin Proteins in Papillary Thyroid Carcinoma and Its significance

LIU Lei, WU Zhi-Hong, ZHANG Zai-Liang, et al.

(People's Liberation Army 98th Hospital, Huzhou 313000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of ARH I and E-cadherin proteins in papillary thyroid carcinoma (PTC) and its significance. [Methods] Fifty-six cases with PTC pathologically proved were enrolled, and their matched normal thyroid tissue (beyond 2.0cm from the tumor edge) as control group. Expression of ARH I and E-cadherin was detected by immunohistochemical staining. [Results] The expression of ARH I and E-cadherin in PTC were significantly lower than those in normal thyroid tissue (48.2% vs 80.4%, 51.8% vs 91.1%, all P < 0.05). Expressions of ARH I and E-cadherin were all related to tumor size, TNM staging and lymph node metastasis of PTC. There was a negative correlation between the ARH I and E-cadherin expression in PTC ($Kappa=0.287, P=0.023$). [Conclusions] ARH I and E-cadherin proteins are low-expression in PTC. They may play an important role in carcinogenesis, progress, invasion and lymph node metastasis of PTC.

Key words: ARH I; E-cadherin; papillary thyroid carcinoma; imprinted tumor suppressor gene

ARH I (aplasia ras homologue member I) 是 1999 年新发现的母源性抑癌印迹基因, 属 ras/rap 超家族成员, 与该家族成员有 50%~60% 的同源性并且具有相似的 GTP/GDP 结合域, 但与该家族其它成员不同, ARH I 发挥抑癌基因作用, 是该家族第一个被报道的肿瘤抑制基因^[1]。ARH I 基因编码的蛋白在人类正常组织中表达, 而在人卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、肝癌等多种肿瘤中表达下调或缺失, 提示其与肿

瘤的发生、发展可能有着密切的关系^[2,3]。E-钙粘蛋白(E-cadherin)是 Ca^{2+} 依赖性细胞粘附分子, 介导同型细胞间特异性粘附, 维持上皮组织结构和功能, 其结构异常或表达缺失可导致细胞间粘附紊乱, 与许多上皮组织恶性肿瘤的发生、发展、侵袭和淋巴结转移密切相关。本研究应用免疫组织化学的方法检测 ARH I 蛋白及 E 钙粘蛋白在乳头状甲状腺癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)及正常甲状腺组织中的表达与差异, 探讨两者与甲状腺癌的发生、发展、转移之间的关系。

收稿日期: 2013-11-05; 修回日期: 2013-12-01

基金项目: 浙江省湖州市自然科学基金项目(2012YZ15)

通讯作者: 吴志宏, E-mail: wz98cj@aliyun.com

1 资料与方法

1.1 标本及试剂

选择 2008 年 1 月至 2013 年 3 月于解放军第九八医院普外科行乳头状甲状腺癌根治术患者 56 例, 男性 22 例, 女性 34 例, 年龄 19~68 岁, 平均年龄 38 ± 7 岁, 中位年龄 43 岁, 大于 45 岁 25 例。所有患者均病理明确诊断为乳头状甲状腺癌, 术前未行任何放、化疗, 依 2002 年国际抗癌联盟 TNM 分期: I 期 27 例, II 期 14 例, III 期 12 例, IV 期 3 例。单侧癌 47 例, 双侧癌 9 例。伴颈部淋巴结转移者 11 例。取同一患者的正常甲状腺组织作为对照, 取自距癌组织边缘 2cm 的正常甲状腺组织。

鼠抗人 E 钙粘蛋白单克隆抗体、兔抗人 ARH I 多克隆抗体及链霉菌抗生素蛋白-过氧化物酶(SP) 试剂盒购自基因科技(上海)有限公司。

1.2 检测方法

HE 染色: 石蜡包埋标本以厚 $4\mu\text{m}$ 连续切片, 常规脱蜡水化, HE 染色常规病理形态学观察。

免疫组织化学染色: 组织蜡块经 $4\mu\text{m}$ 厚度连续切片后, 置烤箱 60°C 干燥, 贴附 40min; 脱蜡、水化; $3\%\text{H}_2\text{O}_2$, 37°C 孵育 10min, PBS(pH 7.4) 冲洗; 抗原修复: 置 0.01M 枸橼酸缓冲液(pH 6.0) 中煮沸(95°C , 20min), 自然冷却, 流动冷水加速冷却至室温(25°C), PBS(pH 7.4) 冲洗; 除去 PBS 液, 滴加山羊血清 37°C 孵育 15min, 以封闭正常生物素, 倾去不洗; 滴加一抗(阴性对照 PBS 代替一抗), 湿盒内 4°C 冰箱孵育过夜, 滴加生物素化二抗, 37°C 孵育 20min; 滴加辣根酶标记链酶卵白素工作液, 37°C 孵育 15min。PBS(pH 7.4) 冲洗 5min $\times$ 3 次。滴加新鲜配制的 DAB/ H_2O_2 溶液显色, 自来水充分冲洗, 苏木素复染, 盐酸酒精分化。95%、85%、75% 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。该公司提供的强阳性切片作为阳性对照, PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.3 结果判定

采用阳性细胞半定量法^[4], 以阳性细胞比例和染色强度评定阳性表达强度, 阳性细胞占整个癌细胞的百分比: $<5\%$ 为 0 分, $5\%\sim 25\%$ 为 1 分, $26\%\sim 50\%$ 为 2 分, $51\%\sim 75\%$ 为 3 分, $>75\%$ 为 4 分; 染色强度: 无着色计 0 分, 淡黄色计 1 分, 黄色计 2 分, 深棕黄色计 3 分。最终阳性判定标准: 两项得分相加, 0

分为阴性(-), 1~3 分为阳性(+), 4~6 分为中度阳性(++), ≥ 7 分为强阳性(+++)。

1.4 统计学处理

应用 SPSS13.0 统计软件, 计数资料采用卡方检验, 等级相关检验采用 Kappa 一致性检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 E 钙粘蛋白、ARH I 表达情况

E 钙粘蛋白定位于细胞膜, 在乳头状甲状腺癌中的表达阳性率为 $51.8\%(29/56)$, 明显低于其在正常甲状腺组织中的阳性表达率($91.1\%, 51/56$), 差异有显著性($P<0.01$), 见 Table 1, Figure 1、2。

ARH I 蛋白主要定位于细胞浆中, 在乳头状甲状腺癌中表达阳性率为 $48.2\%(27/56)$, 正常甲状腺组织中的阳性表达率为 $80.4\%(45/56)$, 有显著性差异($P<0.01$), 见 Table 2, Figure 3、4。

Table 1 The expression of E-cadherin in PTC and normal thyroid tissue

Group	N	Positive expression(%)	χ^2	P
Normal thyroid tissue	56	51(91.1)	21.18	0.0032
PTC	56	29(51.8)		

Table 2 The expression of ARH I protein in PTC and normal thyroid tissue

Group	N	Positive expression(%)	χ^2	P
Normal thyroid tissue	56	45(80.4)	12.60	0.0047
PTC	56	27(48.2)		

2.2 ARH I 蛋白及 E 钙粘蛋白表达与 PTC 临床病理特征的关系

ARH I 及 E 钙粘蛋白的异常表达与乳头状甲状腺癌患者的发病年龄、性别及肿瘤的多发性等无关($P>0.05$), 与临床分期、肿瘤体积、淋巴结转移等相关($P<0.05$)。见 Table 3。

2.3 E 钙粘蛋白及 ARH I 在乳头状甲状腺癌中表达的相关性

在 56 例乳头状甲状腺癌中, ARH I 阳性表达 27 例, 其中 E 钙粘蛋白阳性表达 18 例, 阴性 9 例; ARH I 阴性表达 29 例, 其中 E 钙粘蛋白阴性表达 18 例, 阳性 11 例。经 Kappa 一致性检验, 两者表达无明显相关性(Kappa 值为 0.287, $P=0.023$)。见 Table 4。

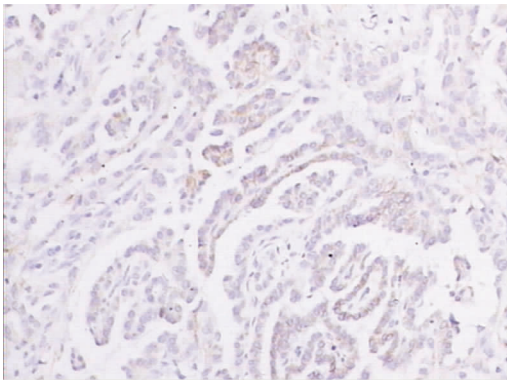


Figure 1 The expression of E-cadherin in PTC (20×)

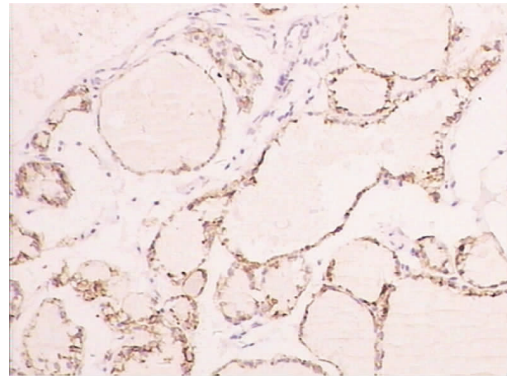


Figure 2 The expression of E-cadherin in normal thyroid tissue(20×)

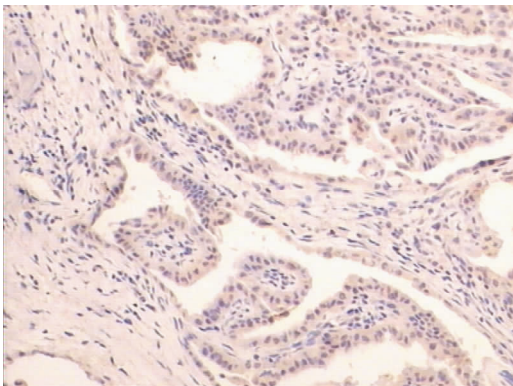


Figure 3 The expression of ARH I protein in PTC (20×)

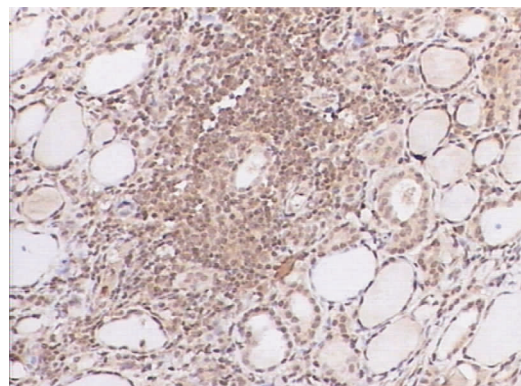


Figure 4 The expression of ARH I protein in normal thyroid tissue(10×)

Table 3 The relationships between ARH I ,E-cadherin expression and clinicopathological features of PTC

Pathological index	N	E-cadherin			ARH I		
		Positive expression(%)	χ^2	P	Positive expression(%)	χ^2	P
Age(year)							
<45	31	15(48.3)	0.323	0.182	17(54.8)	1.217	0.118
≥45	25	14(56.0)			10(40.0)		
Gender							
Male	22	11(50.0)	0.054	0.208	12(54.5)	0.582	0.192
Female	34	18(52.9)			15(44.1)		
Tumor size(cm)							
<1	34	23(67.6)	8.72	0.002	21(61.8)	6.359	0.017
≥1	22	6(27.2)			6(27.3)		
TNM stage							
I ~ II	41	25(61.0)	5.177	0.019	24(58.5)	6.526	0.013
III ~IV	15	4(13.3)			3(20.0)		
Lymph node metastasis							
No	45	27(55.6)	6.193	0.018	25(55.6)	4.942	0.021
Yes	11	2(18.1)			2(18.1)		
Multiple							
Unilateral	47	23(49.047)	0.3724	0.180	25(53.2)	1.790	0.074
Bilateral	9	4(44.4)			2(22.2)		

Table 4 The relationship between the expression of E-cadherin and ARH I in PTC

E-cadherin	ARH I		Total	Kappa	U	P
	+	-				
+	18	11	29	0.287	3.601	0.023
-	9	18	27			
Total	27	29	56			

3 讨论

E-钙粘蛋白(E-cadherin)是 Ca^{2+} 依赖性细胞粘附分子,为单链跨膜糖蛋白,主要功能是介导同型细胞间特异性粘附,并在维持上皮组织结构和功能中发挥重要作用。具有肿瘤转移抑制基因功能,其结构异常或表达缺失可导致细胞间粘附紊乱,与各种上皮性恶性肿瘤的分级、浸润深度和淋巴结转移密切相关。周新木等^[5]研究发现,E 钙粘蛋白在肝癌中表达下调与肝癌的脉管内癌栓、TNM 分期、转移、术后复发有关。

本研究应用免疫组化的方法检测 E 钙粘蛋白在乳头状甲状腺癌的表达,发现其在乳头状甲状腺癌中的表达明显低于正常甲状腺组织 (51.8% vs 91.1%)。在与不同临床病理特征相关性分析中,我们发现,E 钙粘蛋白的表达强度与患者的发病年龄、性别、肿瘤的多发性等无关 ($P>0.05$),在与临床分期、肿瘤体积、淋巴结转移等有关 ($P<0.05$)。与 ARH I 蛋白的表达结果一致。但 E 钙粘蛋白和 ARH I 蛋白在乳头状甲状腺癌中的表达的一致性分析结果显示,两者无明显相关性(Kappa 值 0.287, $P=0.023$),提示两者无明显的协同作用,可能与两者的生物学功能、作用机制不同有关。但不排除可能与本研究的样本量较小有关,可能需更大样本量的进一步研究来证实。

ARH I 是一种印迹抑癌基因,1999 年由 Yu 等^[1]用差异 PCR 的方法,从人卵巢和乳腺上皮细胞及其癌细胞中克隆出的一种新的候选抑癌基因。研究证实其在多种正常组织中均有表达,在卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、肝癌等多种恶性肿瘤中存在表达下调或缺失。Feng 等^[6]利用实时定量 PCR 的方法对 40 例卵巢癌患者手术组织标本进行研究发现 ARH I 基因表达缺失率达 88%。Hisatomi 等^[7]研究发现正常乳腺组织中均存在 ARH I 表达,在乳腺癌组织中表

达下调或缺失,提示 ARH I 在乳腺癌发病过程中起重要作用。Bao 等^[8]将含有 ARH I 基因的腺病毒载体(Ad/ARH I/GV16)的液体直接注射到裸鼠的人乳腺癌瘤体内,瘤体明显缩小 ($P<0.01$),表明 ARH I 基因的再表达在一定程度上能抑制肿瘤的生长。大量的研究证明^[8-10], ARH I 基因具有抑制细胞增殖、参与细胞信号转导、诱发细胞凋亡、负向调节机体生长和发育、促进细胞休眠等多种生物学功能。

本研究结果显示,ARH I 在乳头状甲状腺癌中表达下调,明显低于正常甲状腺组织,提示 ARH I 的异常表达与乳头状甲状腺癌的形成有着密切联系。分析发现,ARH I 在不同肿瘤大小、淋巴结转移、临床分期患者中表达存在显著性差异,瘤体大于 1cm 的患者 ARH I 蛋白表达明显低于瘤体小于 1cm 的患者 ($P<0.05$),伴有淋巴结转移的患者 ARH I 蛋白表达低于无淋巴结转移的患者,Ⅰ~Ⅱ期乳头状甲状腺癌患者 ARH I 蛋白表达明显高于Ⅲ~Ⅳ期患者。提示 ARH I 的异常表达在乳头状甲状腺癌的生长、侵袭、淋巴结转移方面发挥着重要的作用,表达水平越低可能提示甲状腺癌的高侵袭性及不良预后。检测 ARH I 的表达可能对甲状腺癌的临床治疗及预后判断有一定的价值。

有研究表明,ARH I 基因表达异常与该基因的杂合性丢失及启动子区甲基化有关^[11,12]。ARH I 是印迹抑癌基因,功能仅存的父源性等位基因序列丢失导致 ARH I 基因失活,增加肿瘤的易感性。Janssen 等^[13]在针对乳腺癌的研究中发现,41%的乳腺癌患者存在 ARH I 的杂合性丢失。有研究发现在 ARH I 基因表达缺失的肝癌组织标本中有 47.1%存在 ARH I 基因启动子区的甲基化,用去甲基化药物处理 ARH I 表达缺失的肝癌细胞株(Bel-7402, Bel7405, QGY-7703, Hep3B)后发现有 ARH I 基因的再表达。另有研究显示组蛋白的乙酰化的低表达影响了 ARH I 的正常转录,应用组蛋白脱乙酰抑制剂提高了 ARH I 的表达^[14]。

目前 ARH I 发生异常的失活机制尚不十分明确,有效地控制甲基化、调节 ARH I 的正常转录、恢复正常的基因印迹可能为乳头状甲状腺癌及其他恶性肿瘤的基因治疗提供了新的靶点。

本研究从不同年龄、性别、临床分期、淋巴结转

移、肿瘤多发性等方面揭示了 E 钙粘蛋白及 ARH I 的异常表达与乳头状甲状腺癌的发生、发展、侵袭的关系。两者的检测将对甲状腺癌患者治疗及预后的评估提供依据, 对其的深入研究可能为甲状腺癌及其他恶性肿瘤的临床检测、基因靶向治疗提供新的思路。

参考文献:

- [1] Yu Y, Xu F, Peng H, et al. NOEY2 (ARH I), an imprinted putative tumor suppressor gene in ovarian and breast carcinomas [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(1): 214-219.
- [2] Lu Z, Luo RZ, Lu Y, et al. The tumor suppressor gene ARH I regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells [J]. *Clin Invest*, 2008, 118(12): 3917-3929.
- [3] Zhao XH, Cai LX, Zhuo JX, et al. Overexpression of ARH I suppresses tumor angiogenesis in hepatocellular carcinoma[J]. *Chinese Journal of Hepatobiliary Surgery*, 2012, 18(9): 709-713. [赵晓海, 蔡柳新, 卓建新, 等. ARH I 基因过表达对肝细胞癌血管生成的影响[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2012, 18(9): 709-713.]
- [4] Kyo S, Sakaguchi J, Ohno S, et al. High twist expression is involved in infiltrative endometrial cancer and affects patient survival[J]. *Human Pathology*, 2006, 37(4): 431-438.
- [5] Zhou XM, Chen LR. Expression and clinical significance of GS, E-cadherin and β -catenin in hepatocellular carcinoma[J]. *Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2013, 22(2): 140-144. [周新木, 陈丽荣. GS、E-cadherin 和 β -catenin 在肝细胞癌中的表达及其临床意义[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2013, 22(2): 140-144.]
- [6] Feng W, Marquez RT, Lu Z, et al. Imprinted tumor suppressor genes ARH I and PEG3 are the most frequently down-regulated in human ovarian cancers by loss of heterozygosity and promoter methylation. [J]. *Cancer*, 2008, 112(7): 1489-1502.
- [7] Hisatomi H, Nagao K, Wakita K, et al. ARH I/NOEY2 inactivation may be important in breast tumor pathogenesis[J]. *Oncology*, 2002, 62(2): 136-140.
- [8] Bao JJ, Le XF, Wang RY, et al. Reexpression of the tumor suppressor gene ARH I induces apoptosis in ovarian and breast cancer cells through a caspase-independent calpain-dependent pathway [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(24): 7264-7272.
- [9] Li Q, Feng YJ, Yu YH, et al. GE7-transferring-system-mediated NOEY2 gene therapy for human ovarian epithelial carcinoma transplanted in omentum of nude mice[J]. *Current Advances in Obstetrics and Gynecology*, 2000, 9(5): 328-331. [李勤, 丰有吉, 郁茵华, 等. GE7 导入系统介导抑癌基因 NOEY2 体内导入治疗人上皮性卵巢癌裸鼠网膜移植瘤的研究 [J]. *现代妇产科进展*, 2000, 9(5): 328-331.]
- [10] Shi ZG, Zhou XY, Xu LZ, et al. NOEY2 gene mRNA expression in breast cancer tissue and its relation to clinicopathological parameters [J]. *Chinese Journal of Oncology*, 2002, 24(5): 475-478. [施宗高, 周晓燕, 许良中, 等. 乳腺癌组织中 NOEY2 基因的 mRNA 表达及其与临床病理的关系[J]. *中华肿瘤杂志*, 2002, 24(5): 475-478.]
- [11] Yuan J, Luo RZ, Fujii S, et al. Aberrant methylation and silencing of ARH I, an imprinted tumor suppressor gene in which the function is lost in breast cancers [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(14): 4174-4180.
- [12] Peng H, Xu F, Pershad R, et al. ARH I is the center of allelic deletion on chromosome 1p31 in ovarian and breast cancers[J]. *Int J Cancer*, 2000, 86(5): 690-694.
- [13] Janssen EA, vestad IT, Skaland I, et al. LOH at 1p31 (ARH I) and proliferation in lymph node-negative breast cancer [J]. *Cell Oncol*, 2009, 31(5): 335-343.
- [14] Zhang L, WANG PS, Wang XY, et al. Expression of tumor suppressor gene ARH I in ovarian tumor and the effects of histone heacetylase inhibitors (HDACIs) on ARH I [J]. *Journal of ShanDong University(Health Sciences)*, 2006, 44(12): 1276-1280. [张兰, 刘培淑, 王秀英, 等. 卵巢肿瘤组织中抑癌基因 ARH I 的表达及组蛋白去乙酰化酶抑制剂对其的影响[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2006, 44(12): 1276-1280.]