

# 弥漫硬化型和普通型甲状腺乳头状癌中黏蛋白 1 和 p63 蛋白的表达及意义

郝亚琳<sup>1</sup> 金城<sup>1</sup> 王家东<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:探讨黏蛋白 1(Muc1)和 p63 蛋白在弥漫硬化型甲状腺乳头状癌(DSVPTC)及普通型甲状腺乳头状癌(CPTC)中的表达及意义。方法:运用免疫组织化学(SP 法)检测 30 例 DSVPTC(实验组)、30 例 CPTC(对照组)中 Muc1 和 p63 蛋白的表达情况。结果:①实验组和对照组中 Muc1 的阳性表达率分别为 76.67%(23/30)和 53.33%(16/30),SP 染色表现为细胞膜或细胞质内棕黄色或棕褐色颗粒,2 组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );p63 在 2 组中的阳性表达率分别为 80%(24/30)和 43.33%(13/30),SP 染色表现为细胞核内棕黄色或棕褐色颗粒,2 组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。②实验组和对照组颈淋巴结转移率分别为 50%(15/30)和 20%(6/30),2 组之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。③所有病例中,有颈淋巴结转移组(21 例)和无颈淋巴结转移组(39 例)中 Muc1 的阳性表达率分别为 85.71%(18/21)、53.85%(21/39),2 组之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ );p63 的阳性表达率分别为 95.24%(20/21)、43.59%(17/39),2 组之间差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。④Spearman 等级相关分析显示,Muc1 和 p63 蛋白在实验组和对照组中的表达均呈正相关( $r = 0.530, 0.386$ ,均  $P < 0.05$ )。结论:①Muc1、p63 蛋白在 DSVPTC 中高表达,在 CPTC 中相对低表达;确诊时 DSVPTC 颈部淋巴结转移的发生率较 CPTC 高,提示 DSVPTC 是甲状腺乳头状癌(PTC)中恶性度较高的一种亚型。②Muc1、p63 的异常表达可能在促使 PTC 的进展和转移中有重要意义,可作为 PTC 恶性行为的预测因子。③Muc1 和 p63 协同作用可能共同促进了 PTC 恶性细胞的增殖和侵袭转移。

**[关键词]** 弥漫硬化型,普通型,甲状腺乳头状癌,黏蛋白 1,p63

**[中图分类号]** R739.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-1781(2013)09-0457-05

## Expression and clinical significance of Muc1, p63 protein in diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma and conventional papillary thyroid carcinoma

HAO Yalin JIN Cheng WANG Jiadong

(Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Renji Hospital, Medical College of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200001, China)

Corresponding author: WANG Jiadong, E-mail: drjiadongw@yahoo.com.cn

**Abstract Objective:** To investigate the expression and clinical significance of Muc1, p63 protein in diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma and conventional papillary thyroid carcinoma. **Method:** Immunohistochemistry(SP) was used to detect the expressions of Muc1, p63 protein in 30 samples of DSVPTC(experiment group) and 30 samples of CPTC(control group). Patients in two groups were matched in age, gender, tumor side, tumor size and date of diagnosis. **Result:** ①The positive rate of Muc1 in DSVPTC and CPTC was 76.67%(23/30) and 53.33%(16/30) respectively, immunohistochemical staining expressed as brown or tan particles in the membrane or the cytoplasm, with a significant difference between the two groups( $P < 0.05$ ). The positive rate of p63 in DSVPTC and CPTC was 80%(24/30) and 43.33%(13/30) respectively, immunohistochemical staining expressed as a brown or tan particles in the nuclei, with a significant difference between the two groups( $P < 0.05$ ). ②Cervical lymph node metastasis rate in DSVPTC and CPTC was 50%(15/30) and 20%(6/30) respectively, with a significant difference between the two groups( $P < 0.05$ ). ③In All cases, the positive rate of Muc1 in cervical lymph node metastasis group(21 cases) and without metastasis group(39 cases) was 85.71%(18/21) and 53.85%(21/39) respectively, with a significant difference between the two groups( $P < 0.05$ ); the positive rate of p63 was 95.24%(20/21) and 43.59%(17/39) respectively, with a significant difference between the two groups( $P < 0.01$ ). ④Spearman rank correlation analysis showed that expression of Muc1 and p63 were positively correlated in both groups( $r = 0.530, 0.386, P < 0.05$ ). **Conclusion:** ①There are high expression of Muc1 and p63 protein in DSVPTC, and relatively low expression in CPTC, DSVPTC have a higher rate of cervical lymph node metastasis at

<sup>1</sup>上海交通大学医学院附属仁济医院耳鼻咽喉头颈外科(上海,200001)  
通信作者:王家东,E-mail: drjiadongw@yahoo.com.cn

the time of being diagnosed, compared to the CPTC. These results show that DSVPTC is a more biologically aggressive variant of the PTC. ② Abnormal expression of Muc1 and p63 may be important to promote the progression and metastasis of PTC, thus they can be used as predictors of malignant behavior in PTC. ③ Muc1 and p63 may be synergistically promote proliferation and invasion metastasis of the PTC malignant cell.

**Key words** diffuse sclerosing variant, conventional, papillary thyroid carcinoma; Muc1; p63

弥漫硬化型甲状腺乳头状癌(diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma, DSVPTC)是甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)中一种罕见的病理类型,占 PTC 的 0.7%~5.3%<sup>[1]</sup>。与普通型甲状腺乳头状癌(conventional papillary thyroid carcinoma, CPTC)相比,有不同的临床病理特征,特点是甲状腺实质被灰白色质硬的组织广泛取代,切面常有砂砾感;具有硬化、大量淋巴细胞浸润、大量砂粒体、鳞状细胞化生和淋巴管内癌栓等。有关其免疫组织化学方面的研究目前国内罕有报道。黏蛋白 1(Muc1)是多功能的大相对分子质量糖蛋白,与恶性肿瘤关系密切。p63 蛋白是 p53 蛋白的同源蛋白,研究发现其不仅参与上皮组织的正常发生和分化,同时也在一些肿瘤的发生、发展中起一定作用。本实验检测 Muc1 和 p63 蛋白在 DSVPTC 及 CPTC 中的表达,比较这 2 种蛋白表达的差异,探讨 DSVPTC 的免疫组织化学特征并揭示其临床意义。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

从我科的甲状腺癌数据库中选取 2008-01—2010-12 期间行手术切除的 PTC 患者 570 例,每例均有完整的病理资料、临床资料及手术记录。对这些病例的苏木精-伊红染色切片光镜下观察形态、明确诊断并分型<sup>[2]</sup>。DSVPTC 的诊断标准如下:①肿瘤累及甲状腺的一叶或两叶;②大量微小乳头状结构出现在扩张的淋巴管样的囊腔内;③突出的鳞状上皮化生;④大量存在的砂粒体;⑤明显的淋巴细胞浸润;⑥广泛的间质纤维化。CPTC 的诊断标准如下:乳头由中央为纤维血管轴心、表面衬覆一层肿瘤性上皮所构成;典型的乳头较长,有复杂的分支;衬覆在乳头表面和肿瘤性滤泡的上皮细胞核具有特征性改变;核大、互相重叠在一起;核圆形或卵圆形,核边缘不规则,呈锯齿状或有皱褶,可出现与核长轴平行的核沟;核空淡,呈毛玻璃样;核仁小,不明显;核分裂象罕见或无;常存在同心圆层状结构的砂粒体。30 例 DSVPTC 为实验组,男 2 例,女 28 例;年龄 17~76 岁,平均(48.5±13.0)岁;平均癌灶大小 2.2 cm。另随机选取 30 例 CPTC 患者作为对照组,男 11 例,女 19 例;年龄 25~62 岁,平均(45.0±11.0)岁;平均癌灶大小 1.8 cm。全部病例均无术前放化疗史及免疫治疗史。

### 1.2 试剂

鼠抗人单克隆 p63 抗体、鼠抗人单克隆 Muc1 抗体均购自美国 Santa Cruz 公司,二抗为赛新公司即用型试剂盒(试剂 A: Post blocking; 试剂 B: poly-HRP 标记的二抗),DAB 显色试剂盒购自福州迈新生物技术有限公司,日本 OLYMPUS BX53 光学显微镜。

### 1.3 方法

**1.3.1 操作步骤** 采用 SP 法进行染色。一抗选用 Muc1 和 p63 单克隆抗体(稀释度 1:25),具体步骤严格按照试剂说明书进行。主要步骤:经再次确诊的石蜡标本行 4 μm 厚切片,60℃ 恒温箱烤片 60 min,脱蜡、水化,10 mmol/L 的枸橼酸盐缓冲液煮沸法抗原修复,自然冷却。3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 去离子水孵育 30 min 以减低非特异性染色,PBS 溶液冲洗 5 min×3 次。加一抗 4℃ 孵育过夜后 37℃ 复温 1 h,加 poly-HRP 标记的二抗 37℃ 孵育 30 min, DAB 显色 5 min;苏木精衬染,脱水、透明、封片、光镜观察。另选 2 种甲状腺癌各 2 片孵育一抗稀释液(3% BSA-PBST)作为阴性对照,以排除非特异性染色因素。

**1.3.2 p63 和 Muc1 在组织中表达的测定** Muc1 光镜下以在细胞膜和(或)细胞质中出现淡黄至棕褐色为阳性细胞标志,p63 光镜下以在细胞核中出现淡黄至棕褐色为阳性细胞标志。结果判定参照文献<sup>[3]</sup>:随机观察 5 个中倍镜下视野,每个视野计数 100 个细胞,算出各个视野中阳性细胞数的百分率进行计分。0~5% 计为 0 分,>5%~25% 计为 1 分,>25%~50% 计为 2 分,>50%~75% 计为 3 分,>75% 计为 4 分。染色强度则以阳性细胞呈现的染色特征为标准进行计分:细胞未染色计为 0 分,呈淡黄色计为 1 分,棕黄色计为 2 分,棕褐色计为 3 分。然后根据两者相加所得的总分进行结果判定:0~1 分为阴性(-),2~3 分为弱阳性(+),4~5 分为中度阳性(++),6~7 分为强阳性(+++)。所有判定均由 2 名实验者采用盲法(独立检测)进行检测。若有分歧,则在共览显微镜下共同观察解决。

### 1.4 统计学处理

采用 SAS 8.0 软件进行统计分析。计量数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,2 组间比较采用 *t* 检验,计数资料采用  $\chi^2$  检验。相关性用 Spearman 等级相关分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Mucl 在实验组和对照组中的表达

Mucl 在实验组和对照组中的表达见表 1 和图 1, 2 组间 Mucl 的总阳性表达率差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

2.2 p63 在实验组和对照组中的表达

p63 在实验组和对照组中的表达见表 2 和图 2, 2 组间 p63 的总阳性表达率差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

2.3 Mucl 和 p63 蛋白在实验组和对照组中表达的相关性

Mucl 和 p63 蛋白在实验组和对照组中表达的相关性见表 3。对照组和实验组中 Mucl 和 p63 的表达均呈正相关 ( $r = 0.386, 0.530$ , 均  $P < 0.05$ )。

2.4 实验组和对照组临床病理特征比较

2 组的年龄、肿瘤侧别、肿瘤大小均差异无统计学意义; 实验组颈淋巴结转移率为 50% (15/30), 对

照组颈淋巴结转移率为 20% (6/30), 2 组之间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

2.5 Mucl、p63 的异常表达与肿瘤颈淋巴结转移的关系

60 例 PTC 中, 有颈淋巴结转移组 (21 例) 和无颈淋巴结转移组 (39 例) Mucl 的阳性表达率分别为 85.71% (18/21)、53.85% (21/39); p63 的阳性表达率分别为 95.24% (20/21)、43.59% (17/39), 2 组之间均差异有统计学意义 ( $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ )。见表 5。

3 讨论

Mucl 是一种高度糖基化的高相对分子质量糖蛋白, 属于黏蛋白家族成员, 在人体内主要分布于上皮组织, 对黏膜有润滑作用, 防止组织脱水、细胞光解, 是保护上皮细胞免受外界侵袭的重要屏障<sup>[3]</sup>, 同时还具有调节细胞间相互作用, 介导细胞间信号转导并参与机体免疫调节等功能<sup>[4-6]</sup>。正常

表 1 Mucl 在实验组和对照组中的表达

例 (%)

组别	例数	Mucl				总阳性
		-	+	++	+++	
实验组	30	7(23.33)	2(6.67)	11(36.67)	10(33.33)	23(76.67) <sup>1)</sup>
对照组	30	14(46.67)	2(6.67)	9(30.00)	5(16.67)	16(53.33)

与对照组比较, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

表 2 p63 在实验组和对照组中的表达

例 (%)

组别	例数	p63				总阳性
		-	+	++	+++	
实验组	30	6(20.00)	6(20.00)	6(20.00)	12(40.00)	24(80.00) <sup>1)</sup>
对照组	30	17(56.67)	2(6.67)	4(13.33)	7(23.33)	13(43.33)

与对照组比较, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

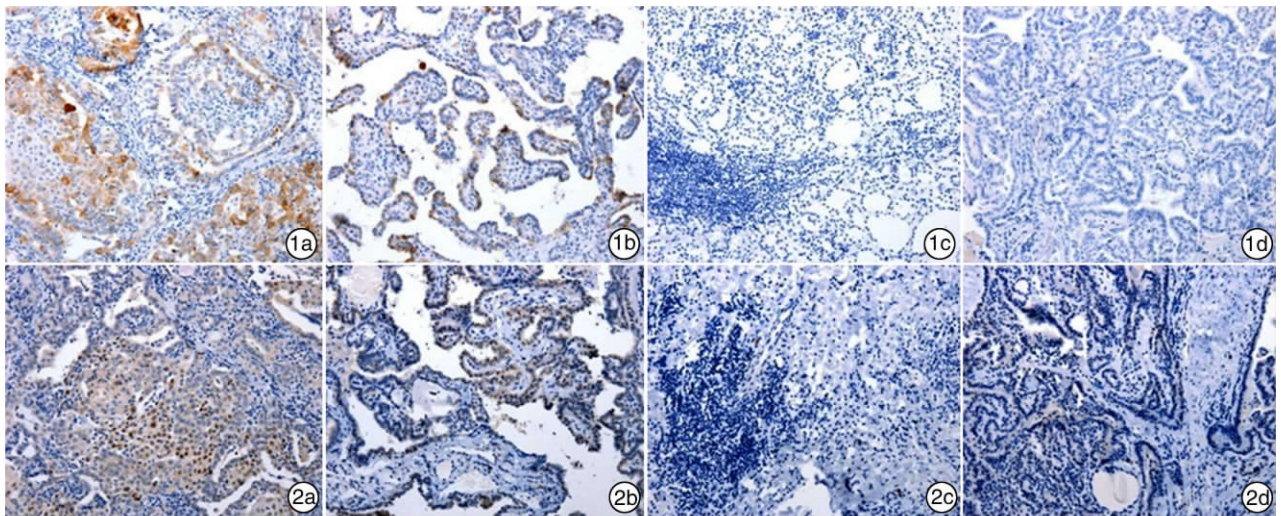


图 1 Mucl 的表达 1a: 在实验组阳性表达 SP 法  $\times 200$ ; 1b: 在对照组阳性表达 SP 法  $\times 200$ ; 1c: DSVPTC Mucl 阴性对照; 1d: CPTC Mucl 阴性对照; 图 2 p63 的表达 2a: 在实验组阳性表达 SP 法  $\times 200$ ; 2b: 在对照组阳性表达 SP 法  $\times 200$ ; 2c: DSVPTC p63 阴性对照; 2d: CPTC p63 阴性对照。

表 3 Muc1 和 p63 蛋白在实验组和对照组中表达的相关性

对照组/实验组	p63 的表达			
	-	+	++	+++
Muc1 的表达				
-	10/3	1/1	5/2	1/10
+	0/3	0/0	1/3	1/0
++	1/0	0/0	2/2	1/4
+++	3/1	1/1	1/4	2/6

表 4 实验组和对照组临床病理特征的比较

临床病理特征	实验组	对照组
性别		
男	2	11
女	28	19
平均年龄/岁	48.5	45
肿瘤平均大小/cm	2.2	1.8
肿瘤侧别		
单侧	27	25
双侧	3	5
颈淋巴结转移		
有	15	6
无	15	24

表 5 Muc1、p63 异常表达与肿瘤颈淋巴结转移的关系

例数	Muc1		p63	
	-	+~++++	-	+~++++
颈淋巴结转移				
有	21	3	18	1
无	39	18	21	22

情况下, Muc1 呈极性分布, 只在上皮细胞近管腔或腺腔面顶端表达, 血液内的抗体或主动免疫细胞无法接近。然而在肿瘤组织中, Muc1 糖链结构发生变化, 表现为糖基化不全, 细胞失去极性而导致抗原表位暴露, 从而诱发相应表位的免疫应答<sup>[3]</sup>。因此 Muc1 在肿瘤细胞表面呈均匀分布, 表达量较正常细胞显著升高<sup>[7]</sup>。He 等<sup>[8]</sup>研究发现, Muc1 在 PTC 的发生、发展中发挥着重要作用, 可作为乳头状癌的一个生物标志物。Patel 等<sup>[9]</sup>研究发现, 恶性程度较高的甲状腺癌细胞系的 Muc1 蛋白表达水平增加, 用抗 Muc1 抗体治疗后细胞株活力显著下降。因此认为 Muc1 可能在甲状腺癌的进展中发挥着重要作用。本研究结果表明, DSVPTC 中的 Muc1 阳性表达率显著高于 CPTC ( $P < 0.05$ ), 提示随着肿瘤恶性程度的升高, Muc1 的免疫原性增强,

细胞将产生更强的免疫应答反应, 预示着 DSVPTC 是较 CPTC 恶性度高的一种病理亚型。

p63 是与 p53 同源的核转录因子, 定位于染色体 3q27-3q29。通常认为 p63 表达于外胚层起源的多层上皮细胞。因此在良性上皮细胞中, 它在基底细胞、鳞状细胞和肌上皮细胞内表达; 在恶性上皮细胞中, 它通常在鳞状细胞癌中表达<sup>[10]</sup>。p63 的蛋白产物有 2 种: TA p63 具有类似 p53 的功能, ΔN p63 过表达则可能竞争 p53 的结合位点而抑制 p53 的转录活性, 从而抑制细胞凋亡, 起致癌作用<sup>[11]</sup>。在本研究中, 24 例 (80%) DSVPTC 中 p63 阳性表达, 主要表达于鳞状细胞巢和实性细胞巢内。实性细胞巢是一种非滤泡的多细胞结构, 在甲状腺中的发生率为 61%~89%, 可呈鳞状上皮样、颗粒状或微囊状结构<sup>[12]</sup>。13 例 (43.33%) CPTC 中 p63 阳性表达, 主要表达于局灶性的肿瘤细胞细胞核, 滤泡上皮来源的癌细胞仅散在阳性。2 组间 p63 的阳性表达率差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。这与 DSVPTC “突出的鳞状上皮化生” 的病理特征是相符的。Koo 等<sup>[10]</sup> 研究发现 p63 在 CPTC 中不表达。他们认为甲状腺滤泡上皮细胞起源于内胚层, 正常情况下 p63 在甲状腺滤泡细胞中不表达。本研究结果显示 13 例 (43.33%) CPTC 中 p63 阳性表达, 与 Koo 等的研究结果不一致, 原因在于 p63 不仅仅表达于鳞状上皮细胞, 可能在具有鳞化潜能的非鳞状上皮细胞内亦有表达。某些 CPTC 癌细胞被覆于乳头中轴的纤维结缔组织表面, 可见复层分布, 其中的少数癌巢鳞状化生, 这些病例均呈 p63 阳性。推测 p63 蛋白表达量的高低可能与细胞的分化程度相关, 表达量越高说明细胞分化越低, 恶性程度越高。提示 DSVPTC 较 CPTC 恶性度高。

本研究发现在 60 例 PTC 中, 伴颈部淋巴结转移组的 Muc1、p63 异常表达率均显著高于无颈淋巴结转移组, 说明 Muc1、p63 的异常表达可能在促使 PTC 的进展和转移中有重要意义, 可以作为 PTC 恶性行为的预测因子。进一步分析发现, 30 例 DSVPTC 中有 15 例伴有颈部淋巴结转移, 30 例 CPTC 中有 6 例伴有颈部淋巴结转移, 2 者相比差异有统计学意义, 表明 DSVPTC 在确诊时颈部淋巴结转移的发生率较高, 这与 Falvo 等<sup>[13]</sup>、Sywak 等<sup>[14]</sup> 的研究结果一致, 提示 DSVPTC 有侵犯淋巴结的特性。因此, 临床上对于此类患者在切除病灶的同时, 建议行改良颈部淋巴结清扫术。

恶性肿瘤的发生、发展是一个涉及多基因、多分子水平变化的多阶段过程。在其过程中不同功能的基因或分子对细胞所产生的影响协同地增加了细胞的癌变。有关 PTC 中 Muc1 和 p63 蛋白表达的相关性研究目前尚未见报道。本研究发现在



DSVPTC与CPTC组织中这2种蛋白的表达均呈正相关,提示在PTC的发生、发展和侵袭转移的复杂过程中二者可能具有协同作用。推测可能原因在于,癌变时Muc1构型发生改变,表达新的糖、肽抗原表位,细胞显示出较高的癌特异性和免疫原性,从而导致 $\Delta Np63$ 过度表达,抑制了野生型p53基因的功能,起到致癌作用。但是二者之间具体的调控机制尚有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] KUO C S, TANG K T, LIN J D, et al. Diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma with multiple metastases and elevated serum carcinoembryonic antigen level [J]. *Thyroid*, 2012, [Epub ahead of print].
- [2] DELELLIS R A, LLOYD R V, HEITZ P U, et al. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics, Tumours of Endocrine Organs[M]. Lyon: IARC Press, 2004: 51-91.
- [3] MORARI E C, SILVA J R, GUILHEN A C, et al. Muc-1 expression may help characterize thyroid nodules but does not predict patients' outcome[J]. *Endocrine Pathol*, 2010, 21: 242-249.
- [4] BRAYMAN M, THATHIAH A, CARSON D D. Muc1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2004, 2: 4-4.
- [5] LI Q, REN J, KUF E D. Interaction of human Muc1 and beta-catenin is regulated by Lck and ZAP-70 in activated Jurkat T cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 315: 471-476.
- [6] STEPENSKY D, TZEHOVAL E, VADAI E, et al. O-glycosylated versus non-glycosylated Muc1-derived peptides as potential targets for cytotoxic immunotherapy of carcinoma[J]. *Clin Exp Immunol*, 2006, 143: 139-149.
- [7] RINGEL J, LOHR M. The Muc gene family: their role in diagnosis and early detection of pancreatic cancer[J]. *Mol Cancer*, 2003, 2: 9-19.
- [8] HE F, LI H, LI W S, et al. Expression of mucin-1 and beta-catenin in papillary thyroid carcinoma and the clinical significance thereof[J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2009, 89: 393-396.
- [9] PATEL K N, MAGHAMI E, WREESMANN V B, et al. Muc1 plays a role in tumor maintenance in aggressive thyroid carcinomas[J]. *Surgery*, 2005, 138: 994-1001.
- [10] KOO J S, SHIN E, HONG S W. Immunohistochemical characteristics of diffuse sclerosing variant of papillary carcinoma: comparison with conventional papillary carcinoma[J]. *APMIS*, 2010, 118: 744-752.
- [11] TAN M, BIAN J, GUAN K, et al. p53CP is p51/p63, the third member of the p53 gene family: partial purification and characterization [J]. *Carcinogenesis*, 2001, 22: 295-300.
- [12] 钱敏飞,王家东. p63蛋白在甲状腺肿瘤中表达的意义[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2008, 22(19): 888-890, 893-893.
- [13] FALVO L, GIACOMELLI L, D'ANDREA V, et al. Prognostic importance of sclerosing variant in papillary thyroid carcinoma[J]. *Am Surg*, 2006, 72: 438-444.
- [14] SYWAK M, PASIEKA J L, OGILVIE T. A review of thyroid cancer with intermediate differentiation[J]. *J Surg Oncol*, 2004, 86: 44-54.

(收稿日期:2012-11-23)

## 海军总医院全军耳鼻咽喉头颈外科中心继续医学教育项目通知

海军总医院全军耳鼻咽喉头颈外科中心将于2013年举办下列国家级继续医学教育项目:①2013年5月26-30日,10月27日-11月1日在北京分别举办第15期和第16期《颞骨应用解剖与耳显微外科技术》学习班,项目编号[2013-07-01-003(国)],学分10分。②2013年6月上旬在四川绵阳举办《激光技术在耳鼻咽喉微创外科中的应用》学习班,项目编号[2013-07-01-032(国)],学分10分。③2013年9月中旬在石家庄市举办《咽喉返流及相关嗓音疾病的诊断和治疗》学习班,项目编号待定。欢迎垂询。联系方式:北京市海淀区阜成路6号海军总医院全军耳鼻咽喉头颈外科中心;邮编:100048;联系人:章榕,江平;联系电话:(010)66958315,66958308,66958267;传真:68780653;Email:ebhxx79@yahoo.com.cn。