

血清 E-cadherin 在甲状腺乳头状癌中的表达及意义*

孙琳¹ 王冬梅² 张文静² 张静² 吴靖芳²

[摘要] 目的:通过对甲状腺乳头状癌、结节性甲状腺肿患者及正常人群血清 E-cadherin 浓度的测定,结合 E-cadherin 蛋白在乳头状癌、结节性甲状腺肿和癌旁正常组织中的检测,分析 E-cadherin 在甲状腺乳头状癌中的作用及意义。方法:采用 ELISA 法检测 E-cadherin 在 86 例甲状腺乳头状癌、16 例结节性甲状腺肿患者和 10 例正常人血清中的含量,并分析其与甲状腺乳头状癌临床病理特征的关系;应用 Western Blot 法检测 E-cadherin 蛋白在甲状腺乳头状癌、结节性甲状腺肿和癌旁正常组织中的含量。结果:甲状腺乳头状癌患者血清 E-cadherin 的含量明显高于结节性甲状腺肿患者和正常人($P < 0.05$),结节性甲状腺肿和正常人血清中 E-cadherin 的含量无明显差异($P > 0.05$)。E-cadherin 蛋白在乳头状癌组织中的含量明显低于结节性甲状腺肿、癌旁组织($P < 0.05$),结节性甲状腺肿、癌旁组织中含量无明显差异($P > 0.05$)。血清中 E-cadherin 的高水平表达与甲状腺乳头状癌的临床病理分期和淋巴结转移相关($P < 0.05$),而与患者的性别、年龄及肿瘤直径大小不相关($P > 0.05$)。结论:血清 E-cadherin 上调与甲状腺乳头状癌的临床病理分期和远处淋巴结转移相关。患者血清中 E-cadherin 含量的检测,在甲状腺乳头状癌诊疗及预后方面具有重要意义。

[关键词] 甲状腺乳头状癌;血清;E-钙黏连蛋白

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2017.02.010

[中图分类号] R736.1 [文献标志码] A

Expression and significance of serum E-cadherin in patients with papillary thyroid carcinoma

SUN Lin¹ WANG Dongmei² ZHANG Wenjing² ZHANG Jing² WU Jingfang²

(¹Department of Anatomy, Hebei North University, Zhangjiakou, 075000, China; ²Department of Histology and Embryology, Hebei North University)

Corresponding author: WU Jingfang, E-mail: xgwj@163.com

Abstract Objective: Experiments testing the concentration of serum E-cadherin were conducted through the patients with papillary thyroid carcinoma(PTC), nodular goiter and normal people. Combining the detection of E-cadherin protein in the tissues including papillary thyroid carcinoma, nodular goiter and normal thyroid tissues around adenoma, we analyze the effect and significance of E-cadherin in the papillary thyroid carcinoma. **Method:** The concentrations of E-cadherin in the serum of 86 cases of PTC patients, 16 cases of NG patients and 10 normal adults were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) method, and the relationships between the serum level and clinical pathology characteristics of thyroid papillary carcinoma were explored. Western blot were used to detect the content of E-cadherin protein in tissues including PTC, nodular goiter tissues and normal thyroid tissues around adenoma. **Result:** The results showed that content of serum E-cadherin in PTC were significantly higher than those in nodular goiter tissues and normal thyroid issues($P < 0.05$). There were no obviously differences between nodular goiter tissues and normal thyroid issues in the content of E-cadherin($P > 0.05$). The content of E-cadherin protein in the tissues of PTC was evidently lower than those in nodular goiter tissues and normal thyroid tissues around adenoma($P < 0.05$). There were no obviously differences between nodular goiter tissues and normal thyroid tissues around adenoma in the content of E-cadherin($P > 0.05$). The abnormal expression of serum E-cadherin was correlated with the lymph node metastasis and pathological stage of PTC($P < 0.05$). On the other hand, it is irrelevant to the gender, age and the tumor size of the patients($P > 0.05$). **Conclusion:** The up-regulation of serum E-cadherin is correlated with the lymph node metastasis and pathological stage of PTC. The detection of the serum E-cadherin content plays a vital role in the aspects of early-diagnosis and prognosis evaluation.

Key words papillary thyroid carcinoma; serum; E-cadherin

* 基金项目:河北省教育厅青年基金(No:QN2015204);河北省卫生厅医学研究课题(No:20130035);河北省重大医学科研课题(No:ZD2013052);河北北方学院青年基金项目(No:Q2014020);河北省教育厅重点项目(No:ZD2016094)

¹河北北方学院人体解剖学教研室(河北张家口,075000)

²河北北方学院组织胚胎学教研室

通信作者:吴靖芳, E-mail: xgwj@163.com

甲状腺癌在头颈部恶性肿瘤中居首位,甲状腺乳头状癌(papillary thyroid cancer,PTC)是甲状腺癌中最常见的病理类型,占甲状腺癌的 70%~80%^[1],其发病较隐匿,早期无明显症状,与良性肿瘤很难区分,且发生淋巴结转移早。甲状腺癌新增病例以微小癌(papillary thyroid microcarcinomas,PTMCs)为主,传统治疗策略是保守治疗,然而PTMC与远处转移有关^[2]。当前临床指南推荐以细针穿刺细胞学检查作为甲状腺癌最有效的诊断方法。但受到多种因素的影响,导致约 20%的甲状腺结节误诊或漏诊。因此,寻找准确的分子诊断技术对甲状腺癌的诊断很有必要。尽管甲状腺癌的预后良好,但约 5%的患者会出现转移性疾病,该群体缺乏具体的、有效的治疗方法^[3]。寻找有效的治疗靶点和靶向药物将有助于进一步提高该部分甲状腺癌的治疗效果。有的患者即使未检查出淋巴结转移灶但仍可能有潜在的转移病灶,目前的检测手段较难发现,肿瘤发生远处转移是影响其预后的重要因素,有淋巴结转移者是无淋巴结转移者复发率和死亡率的 30 倍^[4]。E-钙黏连蛋白(E-cadherin)是 Cadherin 家族中的一员,主要存在于上皮组织,能与细胞骨架相连接介导同型细胞间的黏附反应,发挥细胞间的黏附功能。在组织中 E-cadherin 含量减低能促进细胞的离散,与肿瘤细胞的转移密切相关^[5]。研究发现 E-cadherin 表达程度越低肿瘤的侵袭转移能力越强^[6],所以它在肿瘤的转移过程中扮演着非常重要的角色。本课题组前期研究发现用免疫组织化学法检测 PTC 中 E-cadherin 的含量明显低于正常甲状腺组织^[7]。目前 E-cadherin 在 PTC 患者血清中的研究还未见报道,本文通过 Western Blot、ELISA 技术检测 E-cadherin 的表达,分析其在 PTC 发生、发展中的作用,为 PTC 的诊疗及预后寻找特异性的分子诊断指标。

1 资料与方法

1.1 实验对象及分组

1.1.1 组织标本来源 收集 2013-01-01—2015-10-01 期间由河北北方学院附属第一医院手术切除并经病理诊断证实的 86 例 PTC 标本,16 例结节性甲状腺肿标本,10 例癌旁正常组织标本。取材后将组织标本直接放入液氮中保存备用。

1.1.2 组织标本分组 PTC 标本为乳头状癌组(PTC 组);结节性甲状腺肿为结甲组(nodular goiter,NG 组);癌旁正常组织为正常组(normal thyroid tissues,N 组)。

1.1.3 血液标本来源及分组 PTC 组和 NG 组的血液标本与组织标本患者来源相同,应用促凝管留

取 86 例 PTC 及 16 例 NG 患者血液 5 ml,低速离心收集血清,并收集 10 例健康体检者血清作为正常对照组。

1.2 实验主要试剂

兔抗人多克隆 E-cadherin 抗体(Santa cruz 公司),总蛋白提取试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司),ECL 发光试剂盒(Pierce 公司),人 E-cadherin ELISA 测定试剂盒(美国 ImmunoWay 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 Western Blot 称取甲状腺组织 100 mg,按照总蛋白提取试剂盒提取组织的蛋白,用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度,-20℃保存。取 30 μg 蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳,采用湿转法将蛋白分子转移到 PVDF 膜上进行免疫印迹。以 β-actin 作为内参在 ECL 化学发光成像仪(天能 5200)中拍照并分析。

1.3.2 ELISA 法 将收集好的血清按组分好室温融化,按照 ELISA 试剂盒要求稀释标准品(倍比稀释),每个浓度标准品设置 3 个复孔。待测样品 1:50 稀释每孔加样 100 μl,分别设标准孔、待测样品孔和空白孔,酶标板上覆膜,37℃温育 2.5 h 后洗涤液洗板 4 次。每孔加入 100 μl 生物素化的抗体,覆膜,室温孵育 1 h,洗板同前。每孔加入酶结合物工作液 100 μl,酶标板上覆膜,室温孵育 45 min,洗板同前。每孔加入显色剂 100 μl,避光,室温孵育 10~20 min,观察标准孔,根据标准孔颜色的变化每孔加 100 μl 终止液终止显色后立即在酶标仪上测量 450 nm 的吸收度值,记录。

1.4 统计学处理

实验结果应用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,Western Blot 及 ELISA 数据结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用 *q* 检验。

2 结果

2.1 Western Blot 结果

E-cadherin 在 PTC 组中的含量分别显著低于 NG 组和 N 组($P < 0.05$);E-cadherin 在 NG 组的含量与 N 组的含量之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。以 β-actin 作为内参,应用 Image J 软件计算各条带的灰度值并与相应 β-actin 的灰度值相比,从而反映各组甲状腺组织中 E-cadherin 蛋白的含量,见图 1~2。

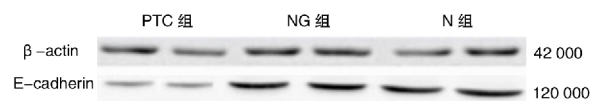


图 1 E-cadherin 蛋白在 PTC 组、NG 组和 N 组中的表达量

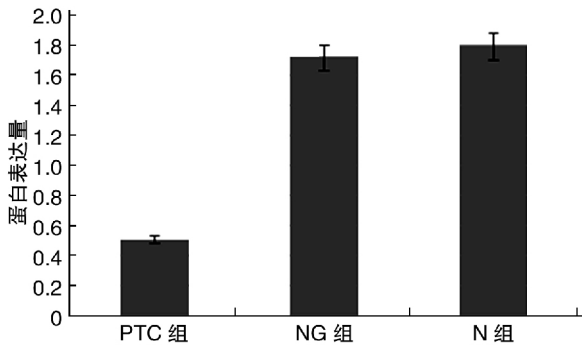


图 2 E-cadherin 蛋白在 PTC 组、NG 组和 N 组中的表达量

2.2 ELISA 结果

2.2.1 E-cadherin 在 PTC 组、NG 组及 N 组血清中的含量 PTC 组 E-cadherin 浓度为(0.049 ± 0.03)ng/ml,NG 组为(0.023 ± 0.01)ng/ml,N 组浓度为(0.021 ± 0.03)ng/ml,由此可见,E-cadherin 在 PTC 组患者血清中的表达显著高于 NG 组及 N 组($P < 0.01$),在 NG 组和 N 组中的含量差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 3。

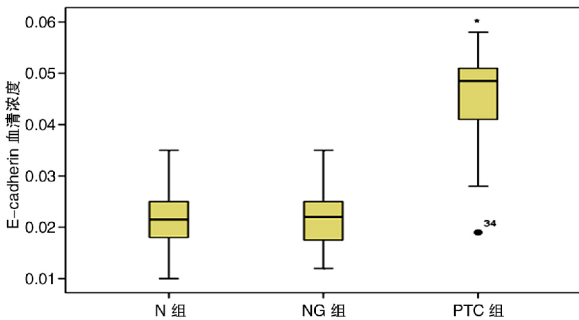


图 3 E-cadherin 在 PTC 组、NG 组和 N 组血清中的表达

2.2.2 PTC 患者血清中 E-cadherin 的表达与肿瘤临床病理特征的关系 PTC 患者血清中 E-cadherin 的异常升高与 PTC 临床病理分期及淋巴结转移有关($P < 0.05$),与患者的年龄、性别及肿瘤直径大小无关($P > 0.05$)。见表 2。

3 讨论

PTC 约占所有甲状腺癌的 80%,颈部淋巴结转移率为 20%~90%^[8-9]。PTC 淋巴结转移率高,此类患者术后复发、转移及再次手术的风险增大,淋巴结转移是影响预后的独立危险因素^[10]。E-cadherin 是上皮型钙黏蛋白,主要存在于人和动物的上皮细胞中,它是一种介导同型细胞间黏附的钙依赖性跨膜糖蛋白,是维持上皮细胞形态结构完整性和极性的重要分子。本实验通过检测 PTC 患者血清及组织中的 E-cadherin 的含量,探讨 E-cadherin 与 PTC 的关系及作用机制,为甲状腺癌的诊

表 2 血清 E-cadherin 的含量与 PTC 患者临床病理特征的关系 $\bar{x} \pm s$

病理特征	例数	E-cadherin/(ng · ml ⁻¹)
年龄/岁		
<45	37	0.047 ± 0.002
≥45	49	0.050 ± 0.004
性别		
男	30	0.048 ± 0.004
女	56	0.050 ± 0.003
肿瘤直径/cm		
<2	49	0.049 ± 0.004
≥2	37	0.049 ± 0.003
淋巴结转移		
有	33	0.050 ± 0.005
无	53	0.046 ± 0.006
临床病理分期		
I ~ II	57	0.047 ± 0.004
III ~ IV	29	0.050 ± 0.004

断和预后提供良好思路。

可溶性 E-cadherin 是细胞外基质碎片,由完整的 E-cadherin 蛋白分解后形成约 80 000 大小,在血清中能被检测到。在很多肿瘤的相关研究中均有血清中 E-cadherin 含量增高的报道,并认为血清中 E-cadherin 的高表达可以作为评价肿瘤的独立指标^[11-12]。本实验运用 ELISA 技术检测了 E-cadherin 在 PTC、NG 和正常人血清中的浓度,得知 PTC 患者血清中 E-cadherin 呈高表达,其浓度显著高于 NG 患者和正常人,统计学结果显示可溶性 E-cadherin 在血清中的高表达与 PTC 的临床病理分期和淋巴结转移相关。可溶性 E-cadherin 能够在细胞外基质环境和血液中扩散,作为一个旁分泌信号传递分子,可溶性 E-cadherin 激活或抑制多重信号途径并参与肿瘤生长的多个环节。Hu 等^[13]研究发现可溶性 E-cadherin 是一个强大的肿瘤因子,在肿瘤的发生、发展中起重要的作用。可溶性 E-cadherin 的产生提示细胞表面分子有严重功能障碍,逐渐损毁细胞间的黏附功能,从而降低细胞间的聚合,有利于肿瘤细胞的远处迁移。Liang 等^[14]在乳腺癌的研究中发现血清中可溶性 E-cadherin 的高水平表达与肿瘤的临床分期、预后和淋巴结转移呈正相关。在胃癌的研究中有学者发现可溶性 E-cadherin 在血清中的表达水平受多种因素的调节,完整的 E-cadherin 蛋白能被细胞角蛋白 7 降解形成片段,释放到细胞外基质中从而增强胃癌细胞的侵袭和迁移能力^[15]。Steinhusen 等^[16]报道癌症患者血清 E-cadherin 升高受凋亡细胞的增加、恶性细胞募集及蛋白水解酶活性的增强的影响,认为 E-cadherin 升高在肿瘤的进展中有指标性

意义。另有学者认为肿瘤进展到一定阶段正常的组织结构被破坏,基膜破损或缺失,肿瘤血管发生浸润都会引起 E-cadherin 更有效地释放到血液中^[17]。从而推测 PTC 在发展的过程中亦存在组织结构被破坏等现象,因而导致患者血清中 E-cadherin 水平明显升高,由此引发 E-cadherin 组织表达低而血清含量高的现象。Inge 等^[18]在研究中发现 E-cadherin 调节细胞的生存需要激活表皮生长因子受体(EGFR),提示 EGFR 和 E-cadherin 相互作用,E-cadherin 亦可通过与细胞中 E-cadherin 的相互作用促进细胞存活,用以重组 E-cadherin 作用于癌细胞,E-cadherin 的浓度为肿瘤患者血清中相等浓度,可阻止由于培养液中撤去血清所致的细胞凋亡,亦表明 E-cadherin 在癌症患者血清中存在可能与细胞生存和肿瘤进展有关。PTC 患者血清 E-cadherin 高水平表达的作用机制和意义还有待于进一步研究。

E-cadherin 在 PTC 组织中的表达,与本课题组既往的研究报道^[7]和刘岩等^[19]通过免疫组织化学方法得出的结果一致,E-cadherin 在 PTC 组织中的阳性表达率明显下降。E-cadherin 表达的降低使细胞间黏附功能减弱,有利于癌细胞脱离疾病原发灶而发生转移。本实验通过 Western 检测的 E-cadherin 蛋白结果与其一致。可见,血清中 E-cadherin 参与了 PTC 的发生、发展和转移。检测患者血清 E-cadherin 的含量可成为 PTC 早期诊断、预测转移的指标,为 PTC 的分子诊断提供了新的思路。

参考文献

[1] CHEN W, ZHENG R, ZHANG S, et al. Report of incidence and mortality in China cancer registries, 2009[J]. *Chin J Cancer Res*, 2013, 25:10-21.

[2] KIM W B. A closer look at papillary thyroid carcinoma[J]. *Endocrinol Metab (Seoul)*, 2015, 30:1-6.

[3] FALLAHI P, MAZZI V, VITA R, et al. New therapies for dedifferentiate papillary thyroid cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16:6153-6182.

[4] ULINSKI T, AOOUN B. Pediatric idiopathic nephrotic syndrome: Treatment strategies in steroid dependent and steroid resistant Forms[J]. *Curr Med Chem*, 2010, 17:847-853.

[5] 曾洲红,朱秀梅,袁夏华,等. COX-2、 β -catenin 及 E-cadherin 在乳腺肿瘤中的表达及相关性研究[J]. *当代医学*, 2012, 18(1):25-26.

[6] 刘娟,欧玉荣,景桂英,等. β -catenin 和 E-cadherin 在结直肠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(3):234-239.

[7] 孙琳,张文静,张静,等. 活化白细胞黏附分子、E-钙

黏蛋白和 β -连环蛋白在甲状腺乳头状癌中的表达及意义[J]. *解剖学报*, 2016, 47(2):221-226.

[8] CHOI Y, PARK K J, RYU S, et al. Papillary thyroid carcinoma involving cervical neck lymph nodes: correlations with lymphangiogenesis and ultrasound features[J]. *Endocr J*, 2012, 59:941-948.

[9] MOO T A, MCGILL J, ALLENDORF J, et al. Impact of prophylactic central neck lymph node dissection on early recurrence in papillary thyroid carcinoma [J]. *World J Surg*, 2010, 34:1187-1191.

[10] NIX P, NICOLAIDES A, COATESWORTH A P, et al. Thyroid cancer review: presentation and investigation of thyroid cancer[J]. *Int J Clin Pract*, 2005, 11: 1459-1463.

[11] OKUGAWA Y, TOIYAMA Y, INOUE Y, et al. Clinical significance of serum soluble E-cadherin in colorectal carcinoma [J]. *J Surg Res*, 2012, 175: 67-73.

[12] IACOPINO F, PINTO F, BERTACCINI A, et al. Soluble E-cadherin and IL6 serum levels in patients affected by prostate cancer before and after prostatectomy[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28: 370-374.

[13] HU Q P, KUANG J Y, YANG Q K, et al. Beyond a tumor suppressor: Soluble E-cadherin promotes the progression of cancer[J]. *Int J Cancer*, 2016, 138: 2804-2812.

[14] LIANG Z, SUN X Y, XU L C, et al. Abnormal expression of serum soluble E-cadherin is correlated with clinicopathological features and prognosis of breast cancer[J]. *Med Sci Monit*, 2014, 20:2776-2282.

[15] 张自森,张艳艳,韩仙芝,等. 胃癌组织中 E-cadherin 和血清中可溶性 E-cadherin 的表达[J]. *肿瘤基础与临床*, 2013, 26(4):290-293.

[16] STEINHUSEN U, WEISKE J, BADOCK V, et al. Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276:4972-4980.

[17] WEISS J V, KLEIN-SCORY S, KÜBLER S, et al. Soluble E-cadherin as a serum biomarker candidate: elevated levels in patients with late-stage colorectal carcinoma and FAP [J]. *Int J Cancer*, 2011, 128: 1384-1392.

[18] INGE L J, BARWE S P, D'AMBROSIO J, et al. Soluble E-cadherin promotes cell survival by activating epidermal growth factor receptor[J]. *Exp Cell Res*, 2011, 317:838-848.

[19] 刘岩,苗玉花,李晓明. EphA2/E-cadherin 在甲状腺乳头状癌中的表达及临床意义[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2015, 29(11):1020-1023.

(收稿日期:2016-09-26)