

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.04.006  
文章编号: 1005-8982 (2019) 04-0028-05

## HMGB1 和 HIF1a 在乳头状甲状腺癌中的表达及意义

龚龙<sup>1</sup>, 易春华<sup>1</sup>, 周明<sup>1</sup>, 郑建伟<sup>2</sup>

(1. 华中科技大学同济医学院附属荆州医院, 湖北 荆州 434020; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院, 湖北 武汉 430030)

**摘要:目的** 探讨高迁移率族蛋白 1 (HMGB1) 和缺氧诱导因子 1a (HIF1a) 在乳头状甲状腺癌 (PTC) 中的表达及与临床病理特征的关系。**方法** 采用免疫组织化学法检测 120 对 PTC (肿瘤组) 及其相应癌旁组织 (非癌组织组) 中 HMGB1 与 HIF1a 的表达, 比较两组 HMGB1 与 HIF1a 蛋白表达的差异, 并分析其表达水平与 PTC 患者临床病理特征的关系。**结果** PTC 组织中 HMGB1 阳性表达率高于癌旁组织 ( $P < 0.05$ ); PTC 组织中 HIF1a 阳性表达率高于癌旁组织 ( $P < 0.05$ )。PTC 组织中 HMGB1 与 HIF1a 的表达呈正相关 ( $P < 0.05$ )。HIF1a 和 HMGB1 在不同肿瘤直径、肿瘤数量、淋巴结转移情况及临床分期比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) **结论** HMGB1、HIF1a 与 PTC 增殖和转移相关, 可能是 PTC 发生、发展的重要分子, 进一步研究两者的关系可能为抑制肿瘤增殖、转移提供潜在的分子靶点。

**关键词:** 甲状腺肿瘤; 腺癌, 乳头状; 高迁移率族蛋白 1/ 高迁移族蛋白类; 缺氧诱导因子 1,  $\alpha$  亚基; 肿瘤转移; 细胞增殖

中图分类号: R 736.1

文献标识码: A

## Expression and significance of HMGB1 and HIF1a in papillary thyroid carcinoma

Long Gong<sup>1</sup>, Chun-hua Yi<sup>1</sup>, Ming Zhou<sup>1</sup>, Jian-wei Zhen<sup>2</sup>

(1. Jingzhou Central Hospital of Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Jingzhou, Hubei 434020, China; 2. Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression of high mobility group protein 1 (HMGB1) and hypoxia inducible factor 1A (HIF1a) in papillary thyroid carcinoma and its significance. **Methods** The expression of HMGB1 and HIF1a in 120 patients with papillary thyroid carcinoma (tumor group) and its corresponding para-cancerous tissue (non-cancerous tissue group) was detected by immunohistochemistry. The difference between the expression of HMGB1 and HIF1a in the two groups was compared, and the relationship between the expression of the two groups and the pathological features of the patients with papillary thyroid carcinoma was analyzed. **Results** The positive expression rates of HMGB1 in PTC tissues and adjacent tissues were 65% and 35%, respectively. The difference was statistically significant by  $\chi^2$  test ( $\chi^2 = 8.067, P = 0.005$ ), the positive expression rate of HMGB1 in PTC tissues was higher than that in adjacent tissues. The positive expression rates of HIF1a in PTC tissues and adjacent tissues were 59.2% and 40.8%, respectively. The positive expression rate of PTC was higher than that of adjacent tissues ( $\chi^2 = 9.6$ ,

$P = 0.002$ ). Correlation analysis showed that HMGB1 was positively correlated with HIF1a expression in PTC tissues ( $r = 0.495, P = 0.014$ ). The expression of HMGB1 in patients with different tumor sizes, tumor numbers, lymphatic metastases and clinical stages were statistical different ( $P < 0.05$ ). Similarly, the high expression of HIF1a was also significantly different from patients with different tumor size, tumor number, lymphatic metastasis and clinical stage ( $P < 0.05$ ). There were significant differences in tumor size, tumor number, lymphatic metastasis and clinical stage ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** HMGB1 and HIF1a are associated with proliferation and metastasis of papillary thyroid carcinoma. It may be an important molecule in the development of papillary thyroid carcinoma. The further study of the relationship may provide a potential molecular target for inhibiting tumor proliferation and metastasis.

**Keywords:** thyroid neoplasms; adenocarcinoma; thyroid cancer, papillary; HMGB1 protein; hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit; neoplasm metastasis; cell proliferation

乳头状甲状腺癌 (papillary thyroid carcinoma, PTC) 是最常见的甲状腺癌, 肿瘤细胞分化程度和有淋巴结转移是 PTC 预后的重要因素<sup>[1-2]</sup>。肿瘤微环境是肿瘤生长和转移的重要影响因素, 而缺氧是众多实体肿瘤微环境的显著特点<sup>[3]</sup>。本研究采用免疫组织化学法检测 PTC 组织及其癌旁组织中缺氧诱导因子 1a (hypoxia-inducible factor 1-alpha, HIF1a) 和高迁移率族蛋白 1 (high mobility group box-1 protein, HMGB1) 表达情况, 分析 HIF-1 $\alpha$  和 HMGB1 与 PTC 临床病理特征的关系, 旨在为进一步研究 HMGB1 和缺氧在 PTC 细胞发生、发展过程中的作用和机制提供临床证据。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2008 年 1 月—2017 年 10 月经华中科技大学同济医学院附属荆州医院甲状腺外科术后确诊的 120 例患者的癌组织及相应癌旁组织石蜡标本, 所有标本经 HE 染色证实为 PTC。其中, 男性 36 例, 女性 84 例; 年龄 31 ~ 76 岁, 平均 46.9 岁。患者术前均未行放化疗, 统计淋巴结转移及甲状腺癌临床分期情况。其中, 有淋巴结转移 38 例, 无淋巴结转移 82 例。按照国际抗癌协会联盟的 TNM 分期: I、II 期 77 例, III、IV 期 43 例。

### 1.2 试剂

兔抗人 HMGB1 及 HIF-1 $\alpha$  多克隆抗体购自英国 ABCAM 公司, 兔 SP 免疫组织化学试剂盒 [北京中杉金桥生物技术有限公司 (SP-9001)], DAB 显示剂 (武汉博士德生物工程有限公司)。

### 1.3 免疫组织化学

切取石蜡切片, 每张切片厚约 5  $\mu$ m, 采用 SP 法

检测 PTC 组织及相应癌旁组织中 HIF-1 $\alpha$ 、HMGB1 蛋白的表达 (HIF1a 一抗工作浓度为 1 : 100; HMGB1 一抗工作浓度为 1 : 100)。所有操作步骤严格按照试剂盒说明书进行, 以 PBS 替代一抗作为阴性对照, 试剂公司提供的阳性着色图片作为阳性对照。

### 1.4 结果判定

根据 REMMELE 等<sup>[4]</sup>提出的免疫反应评分 (immunoreactive score, IRS) 进行染色反应的评价: IRS = 染色强度  $\times$  阳性细胞百分率。染色强度 0 为阴性, 1 为弱, 2 为中度, 3 为强。阳性细胞百分率 0% 为阴性, >0% ~ 10% 为 1; >10% ~ 50% 为 2; >50% ~ 80% 为 3; >80% 为 4。IRS 评分 0 ~ 12 分, 评分 >4 分定义为蛋白阳性表达。

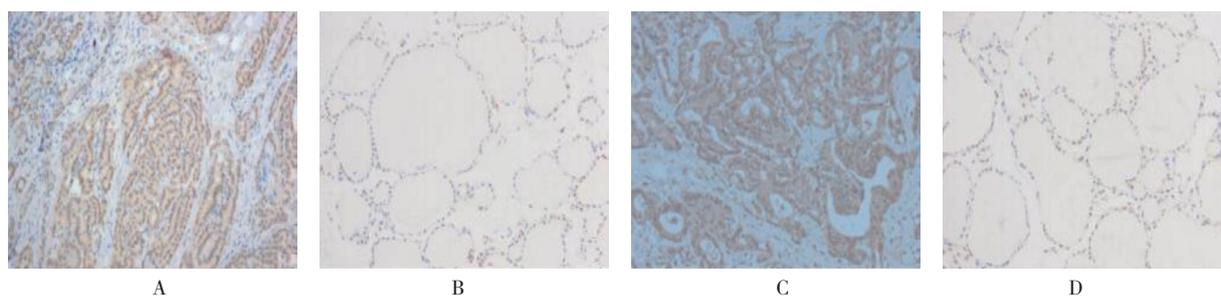
### 1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 16.0 统计软件。计数资料以率 (%) 表示, 比较用  $\chi^2$  检验; 变量之间的相互关系采用 Spearman 相关分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HIF-1 $\alpha$ 和 HMGB1 蛋白在 PTC 及其癌旁组织中的表达

免疫组织化学染色显示, PTC 组织中, HMGB1 阳性呈棕色或褐色, 主要定位于细胞核和细胞质 (见附图 A)。而癌旁组织中, HMGB1 主要表达于细胞核中, 表达较 PTC 组织减少, 且染色减弱 (见附图 B)。同样地, PTC 组织中 HIF1a 阳性呈棕色或褐色颗粒, 主要定位于细胞核和细胞质 (见附图 C)。而癌旁组织中, HIF1a 主要表达于细胞核中, 表达较 PTC 组织减少, 且染色减弱 (见附图 D)。



A: HMGB1 在 PTC 组织中的表达; B: HMGB1 在癌旁组织中的表达; C: HIF1a 在 PTC 组织中的表达; D: HIF1a 在癌旁组织中的表达

附图 HMGB1、HIF1a 在 PTC 及其癌旁组织中的表达 (SP 法 × 200)

## 2.2 PTC 组织中 HMGB1 与 HIF1a 表达的相关性

HMGB1 在 PTC 组织及癌旁组织中的阳性表达率分别为 65.0% 和 35.0%，经  $\chi^2$  检验，差异有统计学意义 ( $\chi^2=8.067$ ,  $P=0.005$ )，PTC 组织阳性表达率高于癌旁组织；HIF1a 在 PTC 组织及癌旁组织中的阳性表达率分别为 59.2% 和 40.8%，经  $\chi^2$  检验，差异有统计学意义 ( $\chi^2=9.630$ ,  $P=0.002$ )，PTC 组织阳性表达率高于癌旁组织。相关性分析显示，PTC 组织标本中 HMGB1 与 HIF1a 的表达呈正相关 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

## 2.3 PTC 组织中 HMGB1、HIF1a 表达水平与临床病理特征的关系

HIF1a 和 HMGB1 在不同肿瘤直径、肿瘤数量、淋巴结转移情况及临床分期方面比较，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 1 PTC 组织中 HMGB1 与 HIF1a 表达的相关性 例

HIF1a	HMGB1		合计	$r_s$ 值	$P$ 值
	阳性	阴性			
阳性	65	13	78	0.495	0.014
阴性	6	36	42		
合计	71	49			

表 2 PTC 组织中 HMGB1、HIF1a 表达水平与临床病理特征的关系 例

因素	例数	HIF1a		$\chi^2$ 值	$P$ 值	HMGB1		$\chi^2$ 值	$P$ 值
		低	高			低	高		
性别									
男	36	10	26	1.179	0.278	11	25	2.249	0.134
女	84	32	52			38	46		
年龄									
<45 岁	55	17	38	0.747	0.387	19	36	1.662	0.197
≥ 45 岁	65	25	40			30	35		
肿瘤直径									
<2 cm	77	32	45	4.063	0.044	38	39	6.452	0.011
≥ 2 cm	43	10	33			11	32		
肿瘤数量									
单发	50	24	26	6.367	0.012	26	24	4.424	0.035
多发	70	18	52			23	47		
淋巴结转移情况									
无转移	82	35	47	6.719	0.010	39	43	4.851	0.028
有转移	38	7	31			10	28		
临床分期									
I、II 期	77	33	44	5.831	0.016	37	40	4.635	0.031
III、IV 期	43	9	34			12	31		

### 3 讨论

组织缺氧是多数实体肿瘤常见的病理生理特征,越来越多人认识到其在肿瘤进展的不同阶段中起关键作用<sup>[5]</sup>。肿瘤对缺氧的适应主要受缺氧诱导因子(HIF-1 $\alpha$  和 HIF-2 $\alpha$ ) 的调节, HIF-1 $\alpha$  与肿瘤启动子有关,被认为是一个促肿瘤因子,而 HIF-2 $\alpha$  则被证实是肿瘤抑制基因<sup>[6]</sup>。迄今为止,已有多项研究发现 HIF-1 $\alpha$  在卵巢、食管、头颈部、乳腺癌、前列腺癌、膀胱癌及口腔上皮等肿瘤中过表达<sup>[7-11]</sup>。此外,最近一些研究检测了甲状腺癌组织中 HIF-1 $\alpha$  的表达<sup>[12-13]</sup>。然而, HIF-1 $\alpha$  与炎症效应因子在 PTC 的发生、发展中的关系研究甚少,其相关机制有待进一步研究。

HMGB1 蛋白是一种丰富的非组蛋白染色体结合蛋白。其能稳定核小体结构并参与 DNA 的复制、转录及修饰<sup>[11]</sup>。在非恶性细胞中, HMGB1 主要存在于细胞核内。在肿瘤细胞中, HMGB1 表达增多,且可转位至细胞质和细胞外空间中<sup>[14]</sup>。HMGB1 参与炎症因子的表达和释放,以及肿瘤的发生、发展,而 HIF-1 $\alpha$  可能是 HMGB1 表达及细胞亚定位的重要调节因子<sup>[15]</sup>。QIU 等<sup>[16]</sup>发现缺氧诱导 HMGB1 表达,进而通过 ERK/JNK 信号通路调控成骨细胞上皮间质转化。CHENG 等<sup>[17]</sup>还发现缺氧诱导 HMGB1 转位的释放,进而通过 TLRs 促进促炎细胞因子产生。而 PTC 中缺氧与 HMGB1 的相互表达及作用方式还未见报道。

在本研究中,笔者通过免疫组织化学法检测 HIF-1 $\alpha$ 、HMGB1 在 PTC 及癌旁组织中的表达,发现这两者在 PTC 中表达升高,主要定位于细胞核和细胞质。进一步分析发现, HMGB1 和 HIF1 $\alpha$  在 PTC 组织中的表达与肿瘤直径、肿瘤个数、淋巴转移及临床分期有关。提示两者可能参与 PTC 发生、发展过程。通过相关性分析显示, PTC 组织标本中 HMGB1 与 HIF1 $\alpha$  的表达呈正相关,提示 HIF1 $\alpha$  可能调控 PTC 细胞中 HMGB1 的表达,进而参与 PTC 的恶性过程。

尽管笔者在 PTC 临床样本中研究了 HIF-1 $\alpha$  与 HMGB1 的表达及其相关性,但还需要更多的细胞学实验来深入研究两者的调节机制及可能的信号通路。同时进一步研究两者如何参与 PTC 的发生、发展,如肿瘤的增殖、血管生成、迁移及转移等,以期以 HMGB1 为 PTC 诊断及治疗的分子靶点提供更进一步

的理论基础。

#### 参 考 文 献:

- [1] LEE Y S, LIM Y S, LEE J C, et al. Clinical implication of the number of central lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma: preliminary report[J]. *World J Surg*, 2010, 34(11): 2558-2563.
- [2] LEE Y S, KIM Y, JEON S, et al. Cytologic, clinicopathologic, and molecular features of papillary thyroid carcinoma with prominent hobnail features: 10 case reports and systematic literature review[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(7): 7988-7997.
- [3] HUANG Y, LIN D, TANIGUCHI C M. Hypoxia inducible factor (HIF) in the tumor microenvironment: friend or foe[J]. *Sci China Life Sci*, 2017, 60(10): 1114-1124.
- [4] REMMELE W, STEGNER H E. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue[J]. *Pathologe*, 1987, 8(3): 138-140.
- [5] ALMENDROS I, GOZAL D. Intermittent hypoxia and cancer: Undesirable bed partners[J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2018, 256: 79-86.
- [6] MURUGESAN T, RAJAJEYABALACHANDRAN G, KUMAR S, et al. Targeting HIF-2 $\alpha$  as therapy for advanced cancers[J]. *Drug Discov Today*, 2018, 23(7): 1444-1451.
- [7] QIN J, LIU Y, LU Y, et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha promotes cancer stem cells-like properties in human ovarian cancer cells by upregulating SIRT1 expression[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): DOI: 10.1038/s41598-017-09244-8.
- [8] TANG N N, ZHU H, ZHANG H J, et al. HIF-1 $\alpha$  induces VE-cadherin expression and modulates vasculogenic mimicry in esophageal carcinoma cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(47): 17894-17904.
- [9] LIU J, ZHANG C, ZHAO Y, et al. Parkin targets HIF-1 $\alpha$  for ubiquitination and degradation to inhibit breast tumor progression[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1823.
- [10] LI X D, ZI H, FANG C, et al. Association between HIF1A rs11549465 polymorphism and risk of prostate cancer: a meta-analysis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(27): 44910-44916.
- [11] ZHANG H, LU C, FANG M, et al. HIF-1 $\alpha$  activates hypoxia-induced PFKFB4 expression in human bladder cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 476(3): 146-152.
- [12] WANG N, DONG C R, JIANG R, et al. Overexpression of HIF-1 $\alpha$ , metallothionein and SLUG is associated with high TNM stage and lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 7(1): 322-330.
- [13] KOPEREK O, AKIN E, ASARI R, et al. Expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha in papillary thyroid carcinoma is

- associated with desmoplastic stromal reaction and lymph node metastasis[J]. *Virchows Arch*, 2013, 463(6): 795-802.
- [14] TESAROVA P, KALOUSOVA M, ZIMA T, et al. HMGB1, S100 proteins and other RAGE ligands in cancer-markers, mediators and putative therapeutic targets[J]. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2016, 160(1): 1-10.
- [15] VENEREAU E, de LEO F, MEZZAPELLE R, et al. HMGB1 as biomarker and drug target[J]. *Pharmacol Res*, 2016, 111: 534-544.
- [16] QIU Y, CHEN Y, ZENG T, et al. High-mobility group box-B1 (HMGB1) mediates the hypoxia-induced mesenchymal transition of osteoblast cells via activating ERK/JNK signaling[J]. *Cell Biol Int*, 2016, 40(11): 1152-1161.
- [17] CHENG Y, XIONG J, CHEN Q, et al. Hypoxia/reoxygenation-induced HMGB1 translocation and release promotes islet proinflammatory cytokine production and early islet graft failure through TLRs signaling[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2017, 1863(2): 354-364.

(李科 编辑)