

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.06.005
文章编号: 1005-8982(2019)06-0022-04

临床研究·论著

HSPA9、Beclin-1 在甲状腺滤泡癌中的表达及其相关性分析

蔺广荣, 刘克毅, 李纪男, 何转丽, 霍建平, 柴芳

(锦州医科大学附属第一医院 甲状腺外科, 辽宁 锦州 121001)

摘要:目的 探讨甲状腺滤泡癌(FTC)中热休克蛋白A9(HSPA9)、Beclin-1的表达及其与肿瘤发生、发展的关系。**方法** 选取57例FTC组织及其相应的癌旁组织,用免疫组织化学法检测HSPA9、Beclin-1蛋白的表达,分析HSPA9、Beclin-1表达与FTC患者临床病理特征的关系及其两者表达的相关性。**结果** FTC组织中HSPA9、Beclin-1的表达高于癌旁组织($P < 0.05$);不同病理类型、是否远处转移患者HSPA9阳性率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);不同病理类型患者Beclin-1阳性率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。FTC组织中HSPA9与Beclin-1呈正相关($P < 0.05$)。**结论** HSPA9、Beclin-1蛋白可能与FTC的发生、发展密切相关。

关键词: 甲状腺滤泡癌/甲状腺肿瘤;HSPA9/蛋白;Beclin-1/蛋白;免疫组织化学;甲状腺疾病
中图分类号: R736.1 **文献标识码:** A

Expression and correlation of HSPA9 and Beclin-1 in follicular thyroid carcinoma

Guang-rong Lin, Ke-yi Liu, Ji-nan Li, Zhuan-li He, Jian-ping Huo, Fang Chai

(Department of Thyroid Surgery, the First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning, 121001, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of HSPA9 and Beclin-1 in follicular thyroid carcinoma (FTC) and their roles in the occurrence and development of thyroid tumors. **Methods** Totally 57 cases of FTC tissue and corresponding adjacent tissues were selected, and the expression of HSPA9 and Beclin-1 protein were detected by immunohistochemistry method. The relationship between the expression of HSPA9, Beclin-1 and the clinicopathological features of the patients with FTC and the correlation between HSPA9 and Beclin-1 were analyzed. **Results** The expressions of HSPA9 and Beclin-1 in FTC were higher than those in normal tissues adjacent to cancer ($P < 0.05$); the positive rate of HSPA9 in patients with different pathological types and distant metastasis was significantly different ($P < 0.05$); the positive rate of Beclin-1 in patients with different pathological types was significantly different ($P < 0.05$). There was a positive correlation between the expression of HSPA9 and Beclin-1 in FTC ($P < 0.05$). **Conclusions** HSPA9 and Beclin-1 protein may be closely related to the occurrence and development of FTC.

Keywords: adenocarcinoma, follicular/ thyroid neoplasms; HSPA9 protein, human; Beclin-1/ proteins; immunohistochemistry; thyroid diseases

近年来,甲状腺癌的发病率快速上升,成为最常见的恶性肿瘤之一^[1]。其中甲状腺滤泡癌(follicular thyroid carcinoma, FTC)是继甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)之后的常见甲状腺癌,约占

10%,转运途径以血运转移为主,易发生远处转移,其侵袭性、转移率及病死率均高于PTC^[2]。根据侵袭程度分为广泛侵入型甲状腺滤泡癌(widely invasive follicular thyroid carcinoma, WIFTC)和微小侵入型

收稿日期: 2018-09-03

[通信作者]柴芳, E-mail: chailgr19910919@163.com; Tel: 0416-4197628

甲状腺滤泡癌(minimally invasive follicular thyroid carcinoma, MIFTC),两者预后差异明显^[3]。热休克蛋白A9(heat shock protein, HSPA9)是一种高度保守的分子伴侣蛋白,在肿瘤的侵袭、转移中发挥重要的作用^[4]。Beclin-1属于自噬相关蛋白,在细胞的自噬过程中起着重要的调控作用。笔者拟对HSPA9、Beclin-1蛋白在FTC中的表达情况进行分析,对其临床病理意义进行探讨,同时分析两者在FTC中表达的相关性,为临床寻求新的治疗靶点提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2000年1月—2017年12月锦州医科大学附属第一医院收治的FTC患者57例,取其癌组织及其癌旁组织(距病灶 ≤ 2 cm)。其中,男性18例,女性39例;年龄22~72岁,平均(49.5 \pm 18.1)岁。纳入标准:①病理诊断由2位高年资的病理医生共同确诊;②无甲状腺癌家族遗传史;③术前未行内分泌治疗及放化疗;④无合并桥本氏病等甲状腺相关疾病;⑤临床分期按照2010年美国癌症联合会分期。本研究经本院医学伦理委员会批准。

1.2 方法

采用免疫组织化学SABC法。组织经10%甲醛固定后脱水、包埋,切片厚度4 μ m,检测HSPA9、Beclin-1蛋白表达。一抗均按1:100稀释,按试剂盒说明书操作,微波修复,3%过氧化氢封闭内源性过氧化物酶,之后进行血清封闭。依次加入一抗、二抗及SABC,DAB显色,苏木精复染,常规脱水,透明,中性树胶封片。PBS取代一抗作为阴性对照。

1.3 主要试剂

兔抗人HSPA9(WL03209)、兔抗人Beclin-1(WL02237)单克隆抗体及即用型SABC免疫组织化学染色试剂盒购自沈阳万类生物科技有限公司。

1.4 判断标准

实验染色结果由2位经验丰富的病理科医生采用双盲法独立阅片。根据染色强度和阳性细胞百分比来评分。HSPA9及Beclin-1染色部位均为细胞质或细胞膜。以出现棕黄色颗粒沉淀为阳性表达。强度评分为0(无染色)、1(浅黄色)、2(棕黄色)及3分(棕褐色)。比例积分为0(<5%阳性细胞)、1(5%~<25%阳性细胞)、2(25%~<50%阳性细胞)、

3(50%~<75%阳性细胞)和4分(75%阳性细胞)。强度评分和比例积分相乘产生最终的染色评分:0分为阴性(-);1~4分为弱阳性(+);5~8分为阳性(++);9~12分为强阳性(+++)。在统计学分析中,(-)或(+)最后染色评分被合并为阴性表达,(++)或(+++)最后评分被合并为阳性表达。见图1、2。

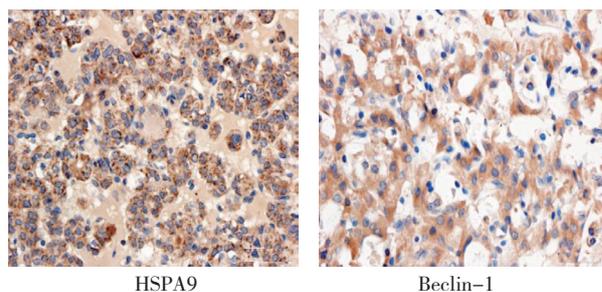


图1 FTC组织中HSPA9和Beclin-1的表达
(SABC \times 400)

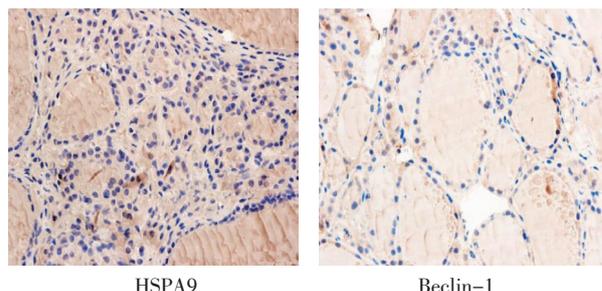


图2 癌旁组织中HSPA9和Beclin-1的表达
(SABC \times 400)

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 χ^2 检验或Fisher确切概率法,等级相关分析采用Spearman法检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FTC及其癌旁组织中HSPA9、Beclin-1蛋白阳性表达率比较

FTC组织中HSPA9阳性表达43例(75.44%),癌旁组织中HSPA9阳性表达9例(15.79%),经 χ^2 检验,差异有统计学意义($\chi^2=40.876$, $P=0.000$)。FTC组织中Beclin-1阳性表达35例(61.40%),癌旁组织中Beclin-1阳性表达10例(17.54%),经 χ^2 检验,差异有统计学意义($\chi^2=22.947$, $P=0.000$)。

2.2 HSPA9、Beclin-1 蛋白表达与 FTC 临床病理参数的关系

不同病理类型、是否远处转移患者的 HSPA9 阳性率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 不同病理类型患者的 Beclin-1 阳性率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见附表。

2.3 FTC 组织中 HSPA9 与 Beclin-1 蛋白表达的相关性

FTC 组织中 HSPA9 与 Beclin-1 共同阳性 34 例, 共同阴性 13 例, HSPA9 阳性而 Beclin-1 阴性 9 例, HSPA9 阴性而 Beclin-1 阳性 1 例。HSPA9 与 Beclin-1 蛋白表达呈正相关 ($r_s = 0.636, P = 0.000$)。

附表 HSPA9、Beclin-1 蛋白表达与 FTC 临床病理参数的关系 例 (%)

| 临床病理参数 | n | HSPA9 阳性表达 | χ^2 值 | P 值 | Beclin-1 阳性表达 | χ^2 值 | P 值 |
|----------|----|-------------|------------|-------|---------------|------------|-------|
| 年龄 | | | | | | | |
| <45 岁 | 22 | 18 (81.82) | 0.787 | 0.375 | 12 (54.55) | 0.711 | 0.399 |
| ≥ 45 岁 | 35 | 25 (71.43) | | | 23 (65.71) | | |
| 性别 | | | | | | | |
| 男 | 18 | 12 (66.67) | - | 0.333 | 11 (61.11) | 0.001 | 0.975 |
| 女 | 39 | 31 (79.49) | | | 24 (61.54) | | |
| 肿瘤直径 | | | | | | | |
| <3 cm | 22 | 17 (77.27) | 0.065 | 0.799 | 15 (68.18) | 0.695 | 0.405 |
| ≥ 3 cm | 35 | 26 (74.29) | | | 20 (57.14) | | |
| 临床分期 | | | | | | | |
| I、II 期 | 30 | 22 (73.33) | 0.151 | 0.697 | 10 (33.33) | 0.380 | 0.538 |
| III、IV 期 | 27 | 21 (77.78) | | | 25 (92.59) | | |
| 病理类型 | | | | | | | |
| MIFTC | 30 | 18 (60.00) | 8.147 | 0.004 | 13 (43.33) | 8.726 | 0.003 |
| WIFTC | 27 | 25 (92.59) | | | 22 (81.48) | | |
| 远处转移 | | | | | | | |
| 有 | 18 | 18 (100.00) | - | 0.002 | 12 (66.67) | 0.307 | 0.579 |
| 无 | 39 | 25 (64.10) | | | 23 (58.97) | | |

3 讨论

自噬是溶酶体介导的细胞内分解代谢过程, 在营养缺乏、缺氧和 DNA 损伤的情况下, 激活细胞自噬以促进细胞质组分的降解^[9]。目前越来越多的文献支持自噬在肿瘤的发生、发展过程中起重要的作用^[6-7]。自噬相关蛋白在参与调节自噬的启动、延长和成熟的过程中发挥重要作用。Beclin-1 是自噬通路的重要调节器, 与多种肿瘤的发生、发展相关。本研究发现, Beclin-1 在 FTC 中阳性表达 35 例 (61.40%), 癌旁组织中阳性表达 10 例 (17.54%), 两者比较有差异, 进而推测自噬参与 FTC 的发生, 这一点与既往研究一致^[8]。本研究还发现 27 例 WIFTC 患者中 Beclin-1 阳性表达 22 例 (81.48%), 30 例 MIFTC 患者中 Beclin-1 阳性表达 13 例 (43.33%), 两者比较有差异, 提示自噬可能参与 FTC 的发展。笔者推测肿瘤的生存状态与自

噬密切程度有关。随着肿瘤侵袭力的增强, 自噬可能帮助肿瘤细胞摆脱应激环境, 来促进肿瘤的生长。尽管没有发现 Beclin-1 的表达与远处转移存在相关性, 但是笔者考虑主要与纳入的研究对象例数有关。有研究表明, 自噬是髓样癌肿瘤细胞的生存机制^[9]。也有学者认为, 自噬活性的下降与 PTC 的发生与发展有关^[10]。笔者认为自噬在不同病理类型的甲状腺癌中的发病机制可能不同。目前自噬相关蛋白在 FTC 中研究较少, 还需要更多的研究验证自噬在 FTC 中的发病机制。

HSPA9 是热休克蛋白 70 的家族成员之一, 在细胞周期调控方面起着重要作用^[11-12]。本研究选取 18 例有转移的 FTC 患者, 结果阳性率为 100%。HSPA9 在 27 例 WIFTC 患者中阳性表达 25 例 (92.59%), 30 例 MIFTC 患者中阳性表达 18 例 (60.00%), 两者比较有差异。笔者推测, HSPA9 在 FTC 侵袭转移中扮演重要

的角色。STARENKI等^[13]用免疫组织化学法检测46例正常甲状腺组织和38例甲状腺髓样癌患者组织中HSPA9的表达情况,发现在癌组织中表达高于癌旁组织,认为HSPA9可作为甲状腺髓样癌的一个新治疗靶点。本研究发现,HSPA9在癌组织中表达高于癌旁组织,笔者认为HSPA9也可作为FTC的治疗靶点。康强等^[14]研究发现,通过siRNA沉默HSPA9表达可抑制人肝癌细胞HCCLM3增殖活性,认为HSPA9可以作为肝细胞癌潜在的治疗靶点。ANDO等^[15]发现,HSPA9不仅可作为胃癌的治疗靶点,而且是一个很好的评估胃癌预后的分子。HSPA9参与肿瘤的发生、发展,并有望成为多种肿瘤的治疗靶点。

HSPA9可通过Raf/Mek/Erk1/2信号通路来促进Bcl-2的表达^[16]。Bcl-2蛋白通过与自噬相关蛋白Beclin-1共有的BH3结构域相互作用,参与自噬的调控^[17]。笔者推测,HSPA9可能通过Raf/Mek/Erk1/2信号通路调节自噬活性,并参与FTC的发生、发展。有研究发现,HSPA9通过PI3K-Akt和JAK-STAT信号通路加速乳腺癌侵袭与转移^[18]。还有研究发现,HSPA9通过MAPK-ERK信号通路参与卵巢癌的发生、发展^[19]。由此可见,HSPA9参与肿瘤发生、发展的多个环节。

综上所述,本研究提示HSPA9和Beclin-1蛋白可能与FTC的发生、发展密切相关,为FTC提供新的治疗靶点,但其具体机制尚待进一步研究证实。

参 考 文 献:

- [1] 高明,郑向前. 甲状腺癌过去与未来十年[J]. 中国肿瘤临床, 2018, 45(1): 2-6.
- [2] de MELO T G, ZANTUT-WITTMANN D E, FICHER E, et al. Factors related to mortality in patients with papillary and follicular thyroid cancer in long-term follow-up[J]. J Endocrinol Invest, 2014, 37(12): 1195-1200.
- [3] DELELLIS R A, LLOYD R V, HEITZ P U. World health organization classification of tumours, pathology and genetics of tumours of endocrine organs[M]. Lyon: IARC Press, 2004: 147-166.
- [4] NIGAM N, GROVER A, GOYAL S, et al. Targeting mortalin by embelin causes activation of tumor suppressor p53 and deactivation of metastatic signaling in human breast cancer cells[J]. PLoS One, 2015, 10(9): DOI: 10.1371/journal.pone.0138192.
- [5] PLANTINGA T S, TESSELAAR M H, MORREAU H, et al. Autophagy activity is associated with membranous sodium iodide symporter expression and clinical response to radioiodine therapy in non-medullary thyroid cancer[J]. Autophagy, 2016, 12(7): 1195-1205.
- [6] ZHU L, LIU X, LI D, et al. Autophagy is a pro-survival mechanism in ovarian cancer against the apoptotic effects of euxanthone[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 103: 708-718.
- [7] TAN J, FU L, CHEN H, et al. Association study of genetic variation in the autophagy lysosome pathway genes and risk of eight kinds of cancers[J]. International Journal of Cancer, 2018, 143(1): 80-87.
- [8] YEŞİL C, KANDEMİR O, HAKSEVER H, et al. Is BECLIN-1 immunoreactivity more effective than HBME-1 in diagnosis of papillary thyroid cancer[J]. Acta Chirurgica Belgica, 2015, 115(4): 299-305.
- [9] GUNDARA J S, ZHAO J, GILL A J, et al. Noncoding RNA blockade of autophagy is therapeutic in medullary thyroid cancer[J]. Cancer Medicine, 2015, 4(2): 174-182.
- [10] YANG M, LU B, WU Y, et al. Expression of autophagy-associated proteins in papillary thyroid carcinoma[J]. Oncology Letters, 2017, 14(1): 411-415.
- [11] GAO Z, NIU X, ZHANG Q, et al. Mitochondria chaperone GRP75 moonlighting as a cell cycle controller to derail endocytosis provides an opportunity for nanomicrosphere intracellular delivery[J]. Oncotarget, 2017, 8(35): 58536-58552.
- [12] VAVILIS T, DELIVANOGLU N, AGGELIDOU E, et al. Oxygen-glucose deprivation (OGD) modulates the unfolded protein response (UPR) and inflicts autophagy in a PC12 hypoxia cell line model[J]. Cellular Molecular Neurobiology, 2016, 36(5): 701-712.
- [13] STARENKI D, HONG S K, LLOYD R V, et al. Mortalin (GRP75/HSPA9) upregulation promotes survival and proliferation of medullary thyroid carcinoma cells[J]. Oncogene, 2015, 34(35): 4624-4634.
- [14] 康强, 邹浩, 刘立鑫, 等. 沉默葡萄糖调节蛋白75对人肝癌细胞HCCLM3增殖和凋亡的影响[J]. 山东医药, 2017, 57(8): 32-34.
- [15] ANDO K, OKI E, ZHAO Y, et al. Mortalin is a prognostic factor of gastric cancer with normal p53 function[J]. Gastric Cancer, 2014, 17(2): 255-262.
- [16] YANG L, GUO W, ZHANG Q, et al. Crosstalk between Raf/MEK/ERK and PI3K/AKT in suppression of Bax conformational change by Grp75 under glucose deprivation conditions[J]. Journal of Molecular Biology, 2011, 414(5): 654-666.
- [17] 翟海程, 宋锦宁. 自噬相关蛋白在自噬与凋亡中的作用及研究进展[J]. 中华脑科疾病与康复杂志(电子版), 2013, 3(5): 333-337.
- [18] NA Y, KAUL S C, RYU J, et al. Stress chaperone mortalin contributes to epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis[J]. Cancer Research, 2016, 76(9): 2754-2765.
- [19] HU Y, YANG L, YANG Y, et al. Oncogenic role of mortalin contributes to ovarian tumorigenesis by activating the MAPK-ERK pathway[J]. Journal of Cellular Molecular Medicine, 2016, 20(11): 2111-2121.

(李科 编辑)