

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.08.013

文章编号: 1005-8982(2016)08-0060-05

论著

## 趋化因子 CXCL14 在甲状腺乳头状癌中的表达水平及其临床意义

许静

(河北省唐山市工人医院 内分泌二科,河北 唐山 063000)

**摘要:目的** 探讨趋化因子 CXCL14 在甲状腺乳头状癌中的表达及其与临床病理的关系。**方法** 采用免疫组织化学方法、蛋白印迹法(Western blot)检测 120 例甲状腺乳头状癌、40 例结节性甲状腺肿及 40 例正常甲状腺组织中 CXCL14 的表达水平,并分析其与甲状腺乳头状癌的临床病理特征的关系。**结果** 免疫组织化学结果表明,甲状腺乳头状癌组织中 CXCL14 蛋白阳性率(20.83%)较结节性甲状腺肿(85.00%)、正常甲状腺组织(75.00%)明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。Western blot 结果表明,CXCL14 蛋白在甲状腺乳头状癌组织中的表达量为( $0.823 \pm 0.143$ ),明显低于结节性甲状腺肿组织( $1.211 \pm 0.012$ )和正常甲状腺组织( $1.219 \pm 0.004$ ),差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。CXCL14 蛋白的表达与甲状腺乳头状癌的包膜浸润、淋巴结转移、肿瘤临床分期及肿瘤分化有关( $P < 0.05$ )。CXCL14 高表达组的甲状腺乳头状癌患者的生存率明显高于 CXCL14 低表达组( $P < 0.05$ )。**结论** CXCL14 蛋白的表达可能成为判断甲状腺乳头状癌恶化程度及预后的指标。

**关键词:** 甲状腺乳头状癌;趋化因子 CXCL14;免疫组织化学法;蛋白印迹法

**中图分类号:** R736.1

**文献标识码:** A

## Expression and significance of CXCL14 protein in papillary thyroid carcinoma

Jing Xu

(Department of Endocrinology, the Workers Hospital of Tangshan, Tangshan, Hebei 063000, China)

**Abstract: Objective** To analyze the expression of chemokine CXCL14 in papillary thyroid carcinoma and its correlation with clinicopathologic parameters. **Methods** Immunohistochemistry and Western blot were used to assess the expression of CXCL14 protein in 120 cases of papillary thyroid carcinoma, 40 cases of nodular goiter and 40 cases of normal tissues, and its association with clinicopathologic parameters was analyzed. **Results** Immunohistochemistry showed that the expression of CXCL14 was positive in 20.83% of papillary thyroid carcinoma tissue, which was significantly higher than that in nodular goiter (85.00%) and normal tissue (75.00%) ( $P < 0.05$ ). Western blot showed that the relative amount of CXCL14 protein in papillary thyroid carcinoma tissue was ( $0.823 \pm 0.143$ ) significantly higher than in nodular goiter ( $1.211 \pm 0.012$ ) and normal tissues ( $1.219 \pm 0.004$ ) ( $P < 0.05$ ). The expression of CXCL14 was correlated with envelope invasion, lymph node metastasis, clinical stage and differentiation ( $P < 0.05$ ). The survival rate of patients with thyroid papillary carcinoma in high expression of CXCL14 was significantly higher than the low expression of CXCL14 ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** The expression of CXCL14 may be a marker for adjudging the malignancy and prognosis of papillary thyroid carcinoma.

**Keywords:** papillary thyroid carcinoma; CXCL14; immunohistochemistry; Western blot

甲状腺癌是内分泌肿瘤中最常见的,而甲状腺乳头状癌又占甲状腺癌的 80%以上<sup>[1]</sup>,因此尽早对

甲状腺乳头状癌患者进行诊治具有重要意义。肿瘤细胞的生长受到许多因素的影响,趋化因子与肿瘤

收稿日期:2015-11-25

的发生、发展、浸润及转移密切相关。[chemokine (C-X-C motif) ligand 14, CXCL14]是 CXC 趋化因子家族成员之一,在多种组织和细胞中均有表达。近期研究显示, CXCL14 在肾癌<sup>[2]</sup>、结直肠癌<sup>[3]</sup>、肺癌<sup>[4]</sup>、宫颈癌<sup>[5]</sup>、乳腺癌<sup>[6]</sup>中都呈低表达,而在部分骨肉瘤<sup>[7]</sup>、前列腺癌<sup>[8]</sup>、胰腺癌<sup>[9]</sup>中却高表达,在甲状腺乳头状癌中的作用报道较少。本研究应用免疫组织化学方法和蛋白印迹法(Western blot)检测 CXCL14 在甲状腺乳头状癌中的表达情况,统计学分析其与甲状腺乳头状癌患者临床病理特征及预后的相关性,为甲状腺乳头状癌的临床诊断及治疗提供理论依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 主要实验材料

选取 2003 年 2 月 -2004 年 10 月于唐山市工人医院行甲状腺切除的甲状腺乳头状癌组织 120 例,结节性甲状腺肿 40 例,正常甲状腺组织 40 例。甲状腺乳头状癌患者中,女性 68 例,男性 52 例;<45 岁 56 例, ≥45 岁 64 例;有包膜浸润的 65 例,无包膜浸润的 55 例;有转移者 70 例,无转移者 50 例;分化程度:低分化 64 例,高、中分化 36 例;按照 2002 年 UICC(国际抗癌联盟)的 TNM 进行分期: I ~ II 期 65 例, III ~ IV 期 55 例。所有标本的收集均征得患者及家属的同意,部分组织置于液氮中保存,用于 Western blot 检测,部分组织置于 10%甲醛溶液中固定,用于免疫组织化学法检测。全部标本均行常规 HE 染色,明确病理诊断,病历资料具有可比性。所有患者术前均无放疗或者化疗史。

### 1.2 主要实验试剂

免疫组织化学及 Western blot 试剂,兔抗人 CXCL14 多克隆抗体均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

### 1.3 实验方法及步骤

**1.3.1 免疫组织化学** 组织标本经常规脱水,石蜡包埋,4 μm 厚连续切片,二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水处理后,进行 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液及微波抗原修复。室温下湿盒中封闭 20 min,滴加 CXCL14 兔抗人多克隆抗体(1:100),置湿盒中 4℃冰箱中过夜。第 2 天滴加二抗,然后置湿盒内孵育 10 min,孵育完毕后进行二氨基联苯胺(DAB)显色,再进行苏木精复染,常规脱水,最后进行封片。结果判定:以染色强度和阳性细胞百分率相乘得出的饱和指数(saturation index, SI)进行评估。染色强度:无阳性染

色(0分),弱染(1分),中染(2分),强染(3分)。染色区域如下:肿瘤细胞 <25%(1分),25%~50%(2分),51%~75%(3分),>75%(4分)。该因子的表达水平由 SI 指数决定,SI 指数 ≥4 为肿瘤因子阳性表达,SI 指数 ≤3 为肿瘤因子阴性表达。以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照组。

**1.3.2 Western blot 方法** 取新鲜标本约 100 mg,用考马斯亮蓝试剂盒定量。取 50 μg 蛋白上样到配置好的 SDS-PAGE 凝胶,电泳,将凝胶上的蛋白电转移至聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF),用 5%脱脂奶粉封闭 1 h,加一抗 CXCL14 兔抗人多克隆抗体(1:100),室温孵育 2 h 后 4℃过夜,0.1% TBST 液洗 PVDF 膜 3 × 5 min,加入对应二抗,室温孵育 1 h 洗膜 3 × 5 min,洗膜后加入 ECL 发光液,曝光,显影,定影,对 X 光底片拍照保存。

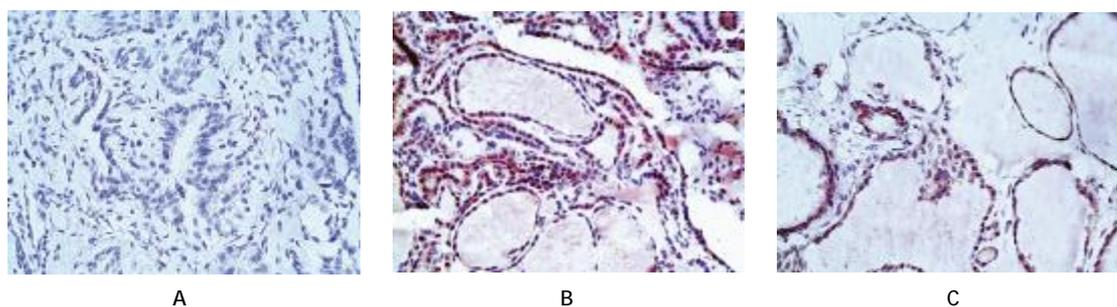
### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计量资料用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,计数资料 3 组间的比较先用  $\chi^2$  检验,在  $\chi^2$  检验有意义的基础上再行  $\chi^2$  分割法进行两两比较;多组计量资料的比较用方差分析,进一步两两比较用 SNK-*q* 检验的方法;生存分析用 Kaplan-Meier 法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CXCL14 在甲状腺乳头状癌、结节性甲状腺肿及正常甲状腺组织中的表达情况

免疫组织化学结果显示, CXCL14 阳性表达的甲状腺组织呈浅黄色、棕黄色或黄褐色(见图 1)。甲状腺乳头状癌、结节性甲状腺肿及正常甲状腺组织中 CXCL14 的阳性表达率分别为 20.83%(25/120)、85.00%(34/40) 和 75.00%(30/40), 3 组 CXCL14 阳性率的差异有统计学意义 ( $\chi^2=56.803, P < 0.05$ )。(见表 1)。甲状腺乳头状癌组 CXCL14 的阳性率明显低于结节性甲状腺肿组和正常甲状腺组,差异有统计学意义( $\chi^2=53.065$  和  $39.019, P < 0.01$ );结节性甲状腺肿组与正常甲状腺组 CXCL14 的阳性率比较,差异无统计学意义( $\chi^2=1.250, P > 0.01$ )(见表 1)。Western blot 结果显示(见图 2), CXCL14 蛋白在甲状腺乳头状癌组织中的表达量为(0.823 ± 0.143),明显低于结节性甲状腺肿组织(1.211 ± 0.012)和正常甲状腺组织(1.219 ± 0.004),差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而其在结节性甲状腺肿组与正常甲状腺组间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。



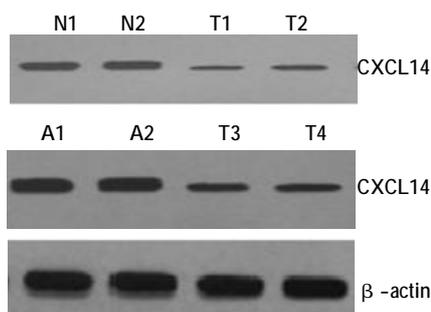
A: 甲状腺乳头状癌; B: 结节性甲状腺肿; C: 正常甲状腺组织  
图 1 免疫组织化学检测 CXCL14 在甲状腺组织中的表达 (× 200)

### 2.2 CXCL14 在甲状腺乳头状癌的表达与临床病理参数的关系

包膜浸润中两组 CXCL14 阳性率的差异有统计学意义 ( $\chi^2=8.709, P<0.01$ ), 无包膜浸润组 CXCL14 的阳性率明显高于有包膜浸润组; 淋巴转移中两组 CXCL14 阳性率的差异有统计学意义 ( $\chi^2=15.315, P<0.01$ ), 无淋巴结转移组的 CXCL14 阳性率明显高于淋巴结转移组; 临床分期中两组 CXCL14 阳性率的差异有统计学意义 ( $\chi^2=6.064, P<0.05$ ), I、II 期临床分期组 CXCL14 的阳性率明显高于 III、IV 期临床分期组; 分化程度中两组 CXCL14 阳性率的差异有统计学意义 ( $\chi^2=5.774, P<0.05$ ), 高、中分化组 CXCL14 的阳性率明显高于低分化组。CXCL14 的阳性率与患者的性别、年龄和发生部位无关, 组间比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。见表 2。

表 1 CXCL14 在甲状腺乳头状癌、结节性甲状腺肿及正常甲状腺组织中的表达情况

组别	例数	CXCL14		阳性率/%
		-	+	
甲状腺乳头状癌	120	95	25	20.83
结节性甲状腺肿	40	6	34	85.00
正常甲状腺	40	10	30	75.00



N: 正常甲状腺组织; A: 结节性甲状腺肿组织; T: 甲状腺乳头状癌组织

图 2 Western blot 检测 CXCL14 蛋白的表达

### 2.3 CXCL14 在甲状腺乳头状癌的表达与患者预后相关分析

对 120 例随访资料齐全的病例进行生存分析, 所有病例随访截止于 2014 年 5 月, 随访时间 120 个月, 绘制生存曲线 (见图 3)。CXCL14 低表达组共 95 例, 其中 36 例存活、59 例死亡, 其生存率为 37.89%; CXCL14 高表达组共 25 例, 其中 20 例存活、5 例死亡, 其生存率为 80%。CXCL14 高表达组病例的生存率明显高于 CXCL14 低表达组 ( $P<0.05$ )。

表 2 CXCL14 在甲状腺乳头状癌组织中的表达与临床病理特征的关系

项目	例数	CXCL14 例 (%)		$\chi^2$ 值	P 值
		阴性	阳性		
性别					
男性	52	45(86.54)	7(13.46)	3.024	0.082
女性	68	50(73.53)	18(26.47)		
年龄					
<45 岁	56	46(82.14)	10(17.86)	0.564	0.453
≥45 岁	64	49(76.56)	15(23.44)		
部位					
单侧	52	40(76.92)	12(23.08)	0.280	0.597
双侧或峡部	68	55(80.88)	13(19.12)		
淋巴结转移					
无	50	31(62.00)	19(38.00)	15.315	0.000
有	70	64(91.43)	6(8.57)		
临床分期					
I、II 期	65	46(70.77)	19(29.23)	6.064	0.014
III、IV 期	55	49(89.09)	6(10.91)		
包膜浸润					
否	55	37(67.27)	18(32.73)	8.709	0.003
是	65	58(89.23)	7(10.77)		
分化程度					
低分化	64	56(87.50)	8(12.50)	5.774	0.016
高、中分化	56	39(69.64)	17(30.36)		

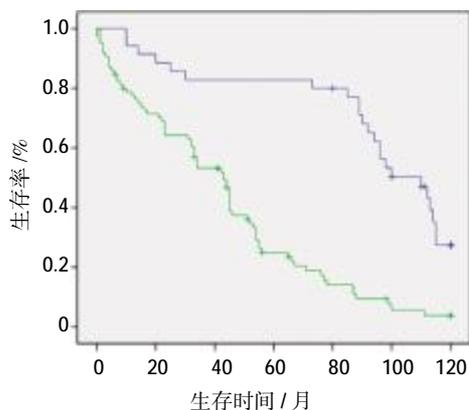


图 3 不同 CXCL14 表达的甲状腺乳头状癌患者的生存曲线

### 3 讨论

近年来,甲状腺癌患病率呈逐渐上升的趋势<sup>[10]</sup>,其发病机制非常复杂。越来越多的趋化因子及其受体被证实与肿瘤的发生、发展有关,随着研究的不断深入,有些趋化因子已经成为抗癌的治疗靶点。而 CXCL14 作为 CXC 趋化因子家族成员之一,其在甲状腺乳头状癌中的作用目前仍未明确。CXCL14 最初是由 Hromas 等<sup>[11]</sup>于 1999 年从人类乳腺和肾脏组织中分离出来的,属于肿瘤抑制基因。已有研究证实,它可以趋化单核细胞、B 细胞、树突状细胞和 NK 细胞<sup>[12]</sup>。CXCL14 参与调控体内许多生物学功能,如肿瘤相关血管的形成、炎症免疫反应、宿主对肿瘤特异性免疫的激活以及肿瘤的自分泌调节等<sup>[13]</sup>。作为一个多功能趋化因子的 CXCL14 与多种肿瘤的发生发展都密切相关。研究显示,CXCL14 在肾癌、结直肠癌、肺癌、宫颈癌组织中的表达减少或者缺失<sup>[2-5]</sup>。Gu 等<sup>[6]</sup>还发现,乳腺癌中 CXCL14 蛋白的表达与淋巴结转移具有负相关性。因此,CXCL14 在肿瘤增殖、转移等方面起着重要作用。本实验研究 CXCL14 在甲状腺乳头状癌中的表达情况,有助于进一步全面明确甲状腺乳头状癌的恶性生物学行为及机制,为甲状腺乳头状癌患者的早期诊断、合理治疗以及预后判断找到新的靶点。

本研究运用免疫组织化学及 Western blot 技术检测 CXCL14 蛋白在甲状腺乳头状癌组织、正常甲状腺组织及结节性甲状腺肿中的表达量,结果显示,该蛋白在甲状腺乳头状癌中的表达水平低于正常甲状腺组织和结节性甲状腺肿。这表明 CXCL14 蛋白可能在防止甲状腺乳头状癌的发生中起到作用。已

有研究证实,CXCL14 可以通过抑制微血管系统和血管平滑肌细胞的趋化来抑制肿瘤血管的形成,从而抑制肿瘤细胞的成瘤和转移<sup>[14]</sup>。

笔者还进一步对 CXCL14 蛋白的表达与甲状腺乳头状癌各临床病理指标的关系进行分析,结果显示,CXCL14 蛋白的阳性表达与甲状腺乳头状癌的包膜浸润、淋巴结转移、肿瘤临床分期及肿瘤分化有关。在无包膜浸润、无淋巴结转移、临床分期早和分化程度高的甲状腺乳头状癌组织中 CXCL14 表达相对增加。结果显示,CXCL14 与甲状腺乳头状癌的进展密切相关,与甲状腺乳头状癌的恶性程度呈负相关,可以抑制肿瘤的增殖、浸润以及转移。已有研究发现,在 CXCL14 阴性表达的人头颈部鳞状细胞癌系 PCI-16 中导入 CXCL14 基因会导致树突状细胞向肿瘤内部浸润的能力增强,抗肿瘤的免疫反应也随之增强<sup>[15]</sup>。因此,可以认为,CXCL14 可能是通过启动肿瘤免疫反应来抑制肿瘤的转移和浸润。生存分析结果显示,CXCL14 低表达组的甲状腺乳头状癌患者的生存率明显低于 CXCL14 高表达组,表明 CXCL14 低表达与甲状腺乳头状癌患者的预后差有关。

综上所述,本研究结果提示,CXCL14 可能是预测甲状腺乳头状癌恶性生物学行为的新标志,同时其基因也是抗肿瘤靶向治疗的一个新的突破点。检测肿瘤组织中 CXCL14 的表达水平对患者的早期诊断、合理治疗以及预后判断有一定的帮助。

### 参 考 文 献:

- [1] Costa S, Giugliano G, Santoro L, et al. Role of prophylactic central neck dissection in cN0 papillary thyroid cancer[J]. Acta Otorhinolaryngol Ital, 2009, 29(2): 61-69.
- [2] Hara T, Nakayama Y. CXCL14 and insulin action[J]. Vitam Horm, 2009, 80: 107-123.
- [3] 林刻智,林峰,郑双,等.趋化因子 CXCL14 在结直肠癌组织中的表达及其临床相关性研究[J].中国病理生理杂志,2014,30(2): 355-358.
- [4] Tessema M, Klinge DM, Yingling CM, et al. Re-expression of CXCL14, a common target for epigenetic silencing in lung cancer, induces tumor necrosis[J]. Oncogene, 2010, 29(37): 5159-5170.
- [5] Balkwill FR. The chemokine system and cancer[J]. J Pathol, 2012, 226(2): 148-157.
- [6] Gu XL, Ou ZL, Lin FJ, et al. Expression of CXCL14 and its anticancer role in breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 135(3): 725-735.

- [7] 卢金昌,王晋,雍碧城,等.趋化因子 CXCL14 在骨肉瘤中的表达及其与预后的关系[J]. J South Med Univ, 2013, 33(6): 798-803.
- [8] Song EY, Shurin MR, Tourkova IL, et al. Epigenetic mechanisms of promigratory chemokine CXCL14 regulation in human prostate Cancer Cells[J]. Cancer Research, 2010, 70(11): 4394-4401.
- [9] Wente MN, Mayer C, Gaida MM, et al. CXCL14 expression and potential function in pancreatic cancer[J]. Cancer Lett, 2008, 259(2): 209-217.
- [10] Maemura K, Natsugoe S, Takao S. Molecular mechanism of cholangiocarcinoma carcinogenesis [J]. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2014, 21(10): 754-760.
- [11] Hromas R, Broxmeyer HE, Kim C, et al. Cloning of BRAK, a novel divergent CXC chemokine preferentially expressed in normal versus malignant cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 255(3): 703-706.
- [12] Starnes T, Rasila KK, Robertson MJ, et al. The chemokine CXCL14 (BRAK) stimulates activated NK cell migration: Implications for the downregulation of CXCL14 in malignancy[J]. Exp Hematol, 2006, 34(8): 1101-1105.
- [13] Allinen M, Beroukhi R, Cai L, et al. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer[J]. Cancer Cell, 2004, 6(1): 17-32.
- [14] Maerki C, Meuter S, Liebi M, et al. Potent and broadspectrum antimicrobial activity of CXCL14 suggests an immediate role in skin infections[J]. J Immunol, 2009, 182(1): 507-514.
- [15] Shurin GV, Ferris RL, Tourkova IL, et al. Loss of new chemokine CXCL14 in tumor tissue is associated with low infiltration by dendritic cells (DC), while restoration of human CXCL14 expression in tumor cells causes attraction of DC both in vitro and in vivo[J]. J Immunol, 2005, 174(9): 5490-5498.

(张蕾 编辑)