

抑癌基因 PTEN 在甲状腺乳头状癌中的表达及临床意义 *

鲁金乐 赵雪松[△] 何国庆 聂春磊 孙 冰 于家伟

(哈尔滨医科大学第三附属医院 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要 目的 通过免疫组织化学方法检测 PTEN 基因在正常甲状腺组织、甲状腺良性肿瘤组织、甲状腺乳头状癌组织中的表达水平并进行比较,探讨其对甲状腺乳头状癌诊断和治疗的意义。方法 采用 SP 免疫组化方法,用已知阳性组织做阳性对照,以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗做阴性对照,分别作 HE 染色和免疫组织化学染色。结果 PTEN 蛋白在三组组织中的表达差异具有显著性($P<0.001$),正常甲状腺组织、甲状腺良性肿瘤组织中的阳性率分别为 100%和 82.5%,均显著高于甲状腺癌组织中的 45%($P<0.05$),即 PTEN 在甲状腺癌中表达显著降低,PTEN 在甲状腺乳头状癌淋巴结转移组和无淋巴结转移组阳性表达率分别为 15%和 60%,差异有显著性($\chi^2=10.91$ $P=0.001$),PTEN 在甲状腺乳头状癌在包膜侵犯组和无侵犯组的阳性表达率分别为 25.93%和 60.61%,差异有显著性($\chi^2=7.22$ $P=0.007$),PTEN 在甲状腺癌淋巴结转移组和包膜侵犯组的阳性表达强度显著低于无淋巴结转移和包膜侵犯组($P<0.01$),有统计学意义。结论 PTEN 基因表达的降低在甲状腺癌的发生和转移过程中起重要作用。

关键词 甲状腺乳头状癌 PTEN 基因 免疫组织化学技术 淋巴结转移

中图分类号 R736.1 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2012)21-4075-04

The Expression and Clinical Significance of Tumor-suppressor Genes PTEN in Thyroid Papillary Carcinoma*

LU Jin-le, ZHAO Xue-song[△], HE Guo-qing, NIE Chun-lei, SUN Bing, YU Jia-wei

(Harbin Medical University Third Affiliated Hospital 150040 Harbin China)

ABSTRACT Objective: To detect and analyse the expression of PTEN genes in normal thyroid, thyroid benign tumor tissue, and thyroid papillary carcinoma cancer tissue by immunohistochemical method. Meanwhile to investigate the thyroid papillary carcinoma diagnosis and treatment of significance. **Methods:** Adapt SP immunohistochemical method, took known positive tissue as positive control, took phosphate buffer (PBS) instead of antibodies as a negative control, all tissue were studied with HE dyeing and immunohistochemical staining. **Results:** In three groups, PTEN protein expressed in the organization with significant difference ($P<0.001$); the positive expression in normal thyroid and thyroid benign tumor tissue were 100% and 82.5% respectively which were significantly higher than the 45% of thyroid cancer group ($P<0.05$), namely the expression in the PTEN thyroid cancer significantly reduced; the expression rate of PTEN in thyroid papillary carcinoma lymph node metastasis group and without lymph node metastasis group were 15% and 60%, significantly (the chi-square = 10.91, $P = 0.001$). PTEN in thyroid papillary carcinoma in coating infringed group and no violation of the group positive expression rate were 25.93% and 60.61% and the difference was significantly (the chi-square = 7.22, $P = 0.007$). The strength of positive PTEN in thyroid cancer lymph node metastasis group and the infringement of coated positive were significantly lower than lymph node metastasis and coated infringed group ($P<0.01$) which reached a statistical significance. **Conclusion:** The reducing of the expression of PTEN gene plays a key role in thyroid cancer and the process of disease transfer.

Key words: Thyroid papillary carcinoma; PTEN genes; Immunohistochemical techniques; Lymph node metastasis

Chinese Library Classification: R736.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)21-4075-04

前言

PTEN 是由 Li 等在 1997 年发现的,它既具有脂质磷酸酶活性,又具有蛋白磷酸酶活性,同时是肿瘤抑制基因^[1-3],被誉为截止到今天为止第一个具有双重磷酸酶活性的抑癌基因。它的发现在肿瘤学引起了轰动,一度被认为是开启人类未知谜团的金钥匙。由于作用途径独特并且参与了多种人类肿瘤而受到广

泛的重视。本研究采用免疫组织化学 SP 法检测哈医大三院 2009-2010 年手术切除并经病理证实的观察组(甲状腺癌、甲状腺良性肿瘤)及对照组甲状腺正常组织中 PTEN 的表达水平,探讨其与甲状腺癌生物学行为关联性。

1 资料与方法

1.1 研究对象

* 基金项目:黑龙江省自然科学基金(D200833)

作者简介:鲁金乐(1985-),女,硕士,肿瘤学,研究方向:甲状腺肿瘤。电话:0451-86298067,18686761942,

E-mail: lujinle1985@163.com

△通讯作者:赵雪松,硕士生导师,0451-86298068

(收稿日期:2012-03-07 接受日期:2012-03-31)

收集我院头颈外科甲状腺病区 2009 年 -2010 年间甲状腺手术时切除的标本：其中 60 例甲状腺乳头状癌标本作为观察组，所有病人术前均未经放、化疗等任何治疗，甲状腺良性肿瘤组织 40 例（包括结节性甲状腺肿和甲状腺腺瘤）为一组，正常甲状腺组织 40 例为一组。以上标本均经病理检查证实，意见不统一时由两名医生综合鉴定。

1.2 实验方法

所有 140 例标本全部使用中性的 10% 福尔马林液固定，石蜡常规包埋，以 4 μ m 厚为标准连续切片，切片完毕后准备行免疫组化染色。

1.2.1 免疫组化染色 所用试剂为即用型鼠抗人 PTEN 单克隆抗体及 SP 试剂盒，两者来源均购于北京中杉金桥生物技术有限公司。DAB 显色剂（3,3'-二氨基联苯胺）、磷酸盐缓冲液（PBS）、柠檬酸缓冲液及其他免疫组化试剂均由哈尔滨医科大学附属肿瘤医院病理教研室提供。操作原理即用抗原抗体反应的原理，用已知抗体检测抗原。严格按照 SP 试剂盒说明书操作。所有切片均在哈医大三院病理实验室进行切片，完成免疫组化染色使用同一批号试剂。

1.2.2 结果判定 参考文献^[4]细胞质是 PTEN 染色阳性的部位，以细胞核内如果出现明显的黄色或棕黄色颗粒视为阳性细胞，结果的判断采用半定量积分的方式。随即寻找染色较为满意的

高倍视野 4-5 个，计数 100 个细胞 / 每个视野，阳性细胞所占比例 <5% 记为 0 分，6%-25% 记为 1 分，26%-50% 记为 2 分，51%-75% 记为 3 分，>75% 记为 4 分。染色强度：不染色 = 0 分，淡黄色 = 1 分，黄色 = 2 分，棕黄色 = 3 分。阳性细胞所占比例 \times 染色强度 = 细胞表达水平，0 分 = 阴性（-），1-4 分 = 弱阳性（+），5-8 分 = 中度阳性（++），9-12 分 = 强阳性（+++）；（-）-（+）视为阴性表达，（++）-（+++）视为阳性表达。为保证实验数据的准确性，需根据阳性细胞比例和染色深度进行综合评定。

1.3 统计学处理

PTEN 在所有组织中的表达水平采用非参数检验，PTEN 蛋白在不同临床病理特征中的表达差异采用 χ^2 检验。所有数据采用 SPSS18.0 统计软件处理，双侧检验， $\alpha=0.05$ 为检验水准， $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

根据实验数据，PTEN 在三组组织中的表达差异具有显著性（ $P<0.001$ ）；正常甲状腺组织、甲状腺良性肿瘤组织中的阳性率分别为 100% 和 82.5%，均显著高于甲状腺癌组织中的 45%（ $P<0.05$ ），即 PTEN 在甲状腺癌中表达显著降低。PTEN 在正常甲状腺组织也显著高于在甲状腺良性肿瘤中的表达（表 1，图 1）。

表 1 PTEN 在正常甲状腺组织、甲状腺良性肿瘤组织、甲状腺乳头状癌组织中的表达

Table 1 Expression of PTEN in normal thyroid tissue, thyroid benign tumor and thyroid papillary carcinoma tissue

Group	n	The expression of PTEN				Positive expression	χ^2	P
		-	+	++	+++			
Normal thyroid tissue	40	0	0	18	22	100		
Benign tumor of thyroid	40	1	6	28	5	82.5*	26.96	<0.001
Thyroid papillary carcinoma	60	18	15	10	17	45*#		

注：* 与正常甲状腺组织比较， $P<0.05$ 。

与甲状腺良性肿瘤比较， $P<0.05$ 。

Note: *comparison with normal thyroid tissue, $P<0.05$.

comparison with benign tumor of thyroid, $P<0.05$.

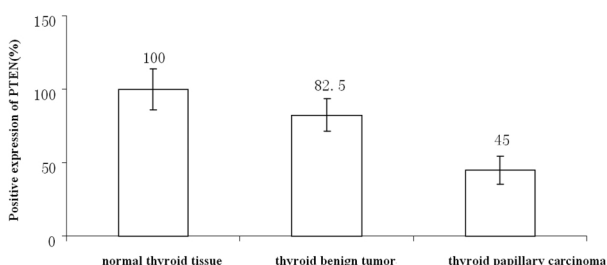


图 1 PTEN 在正常甲状腺组织、甲状腺良性肿瘤组织、甲状腺乳头状癌组织中的表达的比较

Fig.1 Comparison of the protein expression of PTEN in normal thyroid tissue thyroid benign tumor and thyroid papillary carcinoma tissue

60 例甲状腺癌组织在不同临床病理特征中的比较情况见表 2。PTEN 在甲状腺乳头状癌淋巴结转移组和无淋巴结转移组阳性表达率分别为 15% 和 60%，差异有显著性（ $\chi^2=10.91$ ，

$P=0.001$ ），PTEN 在甲状腺乳头状癌在包膜侵犯组和无侵犯组的阳性表达率分别为 25.93% 和 60.61%，差异有显著性（ $\chi^2=7.22$ ， $P=0.007$ ）。PTEN 在甲状腺癌淋巴结转移组和无淋巴结转移组的阳性表达强度显著低于无淋巴结转移和包膜侵犯组（ $P<0.01$ ），有统计学意义。PTEN 表达与年龄、性别、肿瘤大小关系不大（ $\chi^2=0.06$ ， $P=0.8$ ； $\chi^2=0.09$ ， $P=0.93$ ； $\chi^2=0.12$ ， $P=0.73$ ）。PTEN 在甲状腺癌淋巴结转移组和无淋巴结转移组的阳性表达强度显著低于无淋巴结转移和包膜侵犯组（ $P<0.01$ ）。

3 讨论

甲状腺肿瘤是头颈部肿瘤中最常见者。在内分泌系统中，甲状腺癌的患者数量比死于其他内分泌肿瘤的患者总和还多。但是甲状腺癌具有预后良好和相对于其他常见恶性肿瘤病死率少的特点，此两个特点在甲状腺癌流行病学的研究中导致了准确性差的结果。因此对甲状腺癌的诊断检测的改进成为迫

切的需求。甲状腺癌的诊断目前仍然依靠组织病理学,即取得病理组织后对本进行形态学研究。然而甲状腺癌的发生发展是一个复杂的过程,早期恶变微小癌与结节往往区分困难。而且形态学的检查往往与医师的经验密不可分,误诊性的发生不可避免。因而通过免疫学诊断方法引入到甲状腺癌的诊断成为研究的热点,灵敏度高、特异性强的肿瘤标志物有助于甲状腺癌的早期诊断,并为制定更合理的治疗方案提供帮助。伴随分

子生物学和免疫学在肿瘤学中的研究水平不断提高,人类对甲状腺癌发病机制从形态学的认识转变到基因的认识,在分子机制方面进行的研究不断深入,基因治疗被视为肿瘤生物学治疗中重中之重,已经取得了一定的效果,并已成为比较有价值的治疗选择。找到协助诊断、治疗、甚至判断预后的肿瘤标志物的愿望不久将会实现。

表 2 PTEN 在甲状腺乳头状癌中的表达与临床病理的关系分析

Table 2 Relationship between the expression of PTEN in thyroid papillary carcinoma and clinical pathological parameters

Clinical pathological features	Quantitation	PTEN (++~+++)		x ²	P
		Quantitation	Proportion(%)		
Age(years)					
<45	19	9	47.37	0.06	0.08
≥ 45	41	18	43.90		
Sex					
Male	13	6	46.15	0.00	90.93
Female	47	21	44.68		
Lymph nodes transfer information					
Without	40	24	60.00	10.91	0.001
With	20	3	15.00		
Envelope offended					
Without	33	20	60.61	7.22	0.007
With	27	7	25.93		
Tumor size(cm)					
<2	37	16	43.24	0.12	0.73
≥ 2	23	11	47.83		

注 $P<0.05$ 为有统计学意义。

Note: $P<0.05$ is statistical significance.

近年有关 PTEN 的研究为我们提高诊断率提供了一个新的方向,很多学者致力于该基因的研究。PTEN 基因即第 10 号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物基因。PTEN 基因沉默或失活在包括甲状腺在内的许多上皮性肿瘤中被发现^[4-6]包括 Cowden Disease、thyroid neoplasms、neuroglioma、cancer of endometrium、cancer of prostate、cancer of the liver and breast cancer。研究人员发现 PTEN 有如下功能^[7-10]对细胞周期的阻断作用,主要表现为 PTEN 对 P21、P27、P57 活性可进行特异性的调节,对凋亡加速的诱导作用,PTEN 参与调控细胞凋亡,主要是通过正性调控作用,其脂质磷酸酶活性可对 P13K / PIP3 / Akt 通路作用从而对细胞的分裂周期起作用^[11-13],对细胞迁移的抑制作用,粘附作用(整合素(integrin)和细胞外基质(ECM)的调节细胞生长增殖和细胞活性,局部粘连激酶(FAK)是 integrin-ECM 信号转导通路中关键的信号分子^[14-15]。

随着人们对 PTEN 基因的不断研究,普遍认为它在甲状腺癌的发生、发展及转移中存在不可忽视的作用。因而,对于这一基因的深入研究和全面认识,将有助于进一步了解甲状腺癌发生、发展、浸润和转移的机制,从而将为甲状腺癌的诊疗提供新

的思路为人类带来福音。本实验表明从三组实验获得的数据表明 PTEN 表达均逐渐下降,PTEN 低表达显示它与甲状腺癌的发生发展具有良好的相关性,提示 PTEN 有可能成为甲状腺癌恶性程度的潜在标志物。

综上所述,PTEN 蛋白表达低是甲状腺乳头状癌的发生、发展、转移应受到格外重视的分子机制之一^[16-20]。因此认为,PTEN 作为一个新发现的抑癌基因,在甲状腺癌的发生、发展中有重要的作用,可以作为判断甲状腺癌病程和预后的重要参考指标^[21]。但在临床应用尚需进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Li J, Yen C, Liaw D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mu-rated in human brain, breast, and prostate cancer[J]. Science, 1997,275:1943
- [2] Li DM, Sun H. TEP1, Encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor β [J]. Cancer Res, 1997,57:2124-2129
- [3] Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancer[J]. Nature Genet, 1997,15:356

- [4] Dahia FL. PTEN, an unique tumor suppressor gene [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2000,7(2):115-129
- [5] Lee J, Yang H, Georgescu M-M, et al. Crystal Structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association [J]. *Cell*, 1999,99:323-334
- [6] Valiente M, Andres-Pons A, Gomar B, et al. Binding of PTEN to specific PDZ domains contributes to PTEN protein stability and phosphorylation by microtubule-associated serine/threonine kinases [J]. *J Biol Chem*, 2005,280(32):28936-28943
- [7] 王亚明, 田增民. PTEN 肿瘤抑制基因和细胞间信号传导研究进展 [J]. *海军总医院学报*, 2004,9(17):167-172
Wang Ya-ming, Tian Zeng-ming. The Research on PTEN Tumor Suppressor Gene and Signal Transduction [J]. *Journal of Naval General Hospital*, 2004, 9(17):167-172
- [8] Liang-Ping W, Jessica L B, Charis E. PTEN blocks insulin-Mediate EST-2 Phosphorylation through Map kinase, Independent of the phosphoinositide 3-Kinase way [J]. *Hum Mol genet*, 2002,11(15):1687
- [9] Madeline B, Robert A M, Ian J P f, et al. Specific inhibition of PTEN expression reverses hyperglycemia in diabetic mice [J]. *Diabetes*, 2002,51(4):1028
- [10] Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ. Signaling through focal adhesion kinase [J]. *Prog Biophys Mol Bio*, 1999,71(34):435
- [11] Tomohiko M, Gregory S Taylor, Jack E D. PTEN and myotubularin: Novel phosphoinositide phosphatases [J]. *Annu Rev biochem*, 2001,70:24733
- [12] Raftopoulou M, Etienne- Manneville S, Self A, et al. Regulation of cell migration by the C2 domain of the tumor Suppressor PTEN [J]. *Science*, 2004,303(5661):1179
- [13] Oviler G, Tania Attie-Bitach, Jacqueline A, et al. Expression of PTEN tumor suppressor Protein during human development [J]. *Hum Mol Genet*, 2000,9(11):1633
- [14] Sansal I, Sellers WR. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway [J]. *J Clin Oncol*, 2004,22(14):2954-2963
- [15] Depowski PL, Rosenthal SL, Ross JS. Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer [J]. *Mod Pathol*, 2001,14(7):672-676
- [16] 钱光煜, 梁勇, 杨林军, 等. PTEN 异常表达及甲基化与 PTC 的关系 [J]. *医学研究杂志*, 2011, 3(40): 39-43
Qian Guang-yu, Liang Yong, Yang Lin-jun, et al. Protein Expression and Promoter Methylation of the PTEN Gene in Papillary Thyroid Carcinoma [J]. *Journal of Medical Research*, 2011, 3(40): 39-43
- [17] Wang MY, Lu KV, Zhu S, et al. Mammalian target of rapamycin inhibition promotes response to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors in PTEN-deficient and PTEN-intact glioblastoma cells [J]. *Cancer Res*, 2006,66(16):7864-7869
- [18] Wendel HG, Malina A, Zhao Z, et al. Determinants of sensitivity and resistance to rapamycin-chemotherapy drug combinations in vivo [J]. *Cancer Res*, 2006,66(15):7639-7646
- [19] Mellinghoff IK, Clouchesy TF, Mischel PS. PTEN mediated resistance to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors [J]. *Clin Cancer Res*, 2007,13(21):378-381
- [20] Lu CH, Wyszomierski SL, Tseng LM, et al. Preclinical testing of clinically applicable strategies for overcoming trastuzumab resistance caused by PTEN deficiency [J]. *Clin Cancer Res*, 2007,13(19):5883-5888
- [21] Ashford TP, Porter KR. Cytoplasmic component of the lysosomes [J]. *J Cell Biol*, 1962,12:198-202

(上接第 4068 页)

- [4] Palacios S, Henderson V W, Siseles N, et al. Age of menopause and impact of climacteric symptoms by geographical region [J]. *Climacteric*, 2010, 13: 419-428
- [5] Gold EB, Sternfeld R, Kelsey JL, et al. Relation of demographic and lifestyle factors to symptoms in a multi-racial /ethnic population of women 40~55 years of [J]. *Am J Epidemiol*, 2000, 152(5): 463-473
- [6] Hazel B, Nichols I, Amy Trentham-Dietz, et al. From menarche to menopause trends among US women born from 1912 to 1969 [J]. *Am J Epidemiol*, 2006, 164: 1003-1011
- [7] 李颖, 郁琦, 马良坤, 等. 北京市城区围绝经期妇女更年期症状分析 [J]. *生殖医学杂志*, 2008, 17(5): 329-334
Li Ying, Yu Qi, Ma Liang-kun, et al. Analysis of climacteric symptoms of perimenopausal women in Beijing city [J]. *Journal of Reproductive Medicine*, 2008, 17(5): 329-334
- [8] 聂广宁, 王小云, 杨洪艳, 等. 中国城市女性绝经年龄影响因素调查 [J]. *中国妇幼保健*, 2011, 26: 1191-1193
Nie Guang-yun, Wang Xiao-yun, Yang Hong-yan, et al. The research on the factors affecting the timing of natural menopause in Chinese city women [J]. *Maternal and Child Health Care of China*, 2011, 26: 1191-1193