

- [13] 张涛, 卢林. 帕瑞昔布钠超前镇痛联合 PCIA 应用于腹腔镜直肠癌根治术老年患者镇痛效果研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2017, 26(20): 2259-2261.
- [14] 孙亚超, 孙振强, 王琦三. 结直肠癌患者围术期加速康复外科应用研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2018, 25(7): 494-498.
- [15] 车彦鹏, 张晓旭, 林婷婷. 加速康复外科对胃肠道手术患者的应用与效果分析[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2017, 38(21): 2559-2561.
- [16] 李畅, 杜敏, 辛雪琳. 结肠癌病人应用加速康复外科护理的意义研究[J]. 中国医药导刊, 2017, 19(1): 91-92.
- [17] 陈松耀, 陈创奇. 加速康复外科对胃肠手术后胃肠功能的影响[J/OL]. 消化肿瘤杂志(电子版), 2017, 9(2): 86-91. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7402.2017.02.002.
- [18] 王鸿波, 王文娟, 单世生, 等. 腹腔镜直肠癌加速康复外科中规范营养支持治疗的应用[J]. 中国现代普通外科进展, 2017, 20(4): 320-321.
- [19] 廖萍, 张红菊, 冯毅, 等. 加速康复外科护理对直肠癌患者术后康复与营养状况的影响[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2017, 24(2): 231-234.
- (收稿日期: 2019-10-21, 修回日期: 2019-11-27)

引用本文: 侯卫东, 禹远远, 李会敏, 等. 甲状腺乳头状癌中紧密连接蛋白-1 的表达与临床意义[J]. 安徽医药, 2022, 26(1): 136-139. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2022.01.031.



◇临床医学◇

甲状腺乳头状癌中紧密连接蛋白-1 的表达与临床意义

侯卫东¹, 禹远远¹, 李会敏¹, 刘艳晓¹, 刘艳锋²

作者单位:¹平顶山市第一人民医院内分泌代谢科, 河南 平顶山 467099; ²中国人民解放军联勤保障部队第九八九医院平顶山医疗区病理科, 河南 平顶山 467099

摘要: **目的** 探讨甲状腺乳头状癌(PTC)组织中紧密连接蛋白-1(Claudin-1)的表达与临床意义。**方法** 收集2017年1月至2019年10月平顶山市第一人民医院和中国人民解放军联勤保障部队第九八九医院平顶山医疗区甲状腺手术存档标本共计271例。采用免疫组化EliVision两步法检测116例PTC、145例甲状腺良性病变(BTL)和10例甲状腺滤泡癌中Claudin-1的表达状况,并分析其表达与PTC病人临床病理特征之间的关系。**结果** 在116例PTC中Claudin-1高表达率为97.4%;在145例BTL中高表达率为11.7%;在10例滤泡癌中高表达率为10.0%。此外, Claudin-1在16例有PTC转移的淋巴结中全部高表达(100%),并且与甲状腺内原发癌灶的表达一致;在40例肿瘤周围的正常甲状腺组织中全部不表达。Claudin-1表达在PTC与BTL($\chi^2=189.282$)、PTC与滤泡癌的比较($\chi^2=71.810$),均差异有统计学意义(均 $P<0.001$)。Claudin-1的表达与病人性别、年龄、癌结节长径与数目、淋巴结转移及TNM分期无关($P>0.05$)。Claudin-1诊断PTC的灵敏度为97.4%, Claudin-1在PTC分别与BTL和滤泡癌的鉴别诊断中的特异度为88.3%和90.0%。**结论** Claudin-1有助于PTC分别与BTL和滤泡癌的鉴别诊断; Claudin-1的高表达可能是PTC肿瘤细胞黏附性强的关键因素。

关键词: 甲状腺肿瘤; 癌, 乳头状; 甲状腺良性病变; 诊断, 鉴别; 紧密连接蛋白-1

Expressions and clinical significance of claudin-1 in papillary thyroid carcinoma

HOU Weidong¹, YU Yuanyuan¹, LI Huimin¹, LIU Yanxiao¹, LIU Yanfeng²

Author Affiliations: ¹Department of Endocrinology, Pingdingshan Municipal First People's Hospital, Pingdingshan, Henan 467099, China; ²Department of Pathology, Pingdingshan Medical District, 989 Hospital of PLA Joint Logistic Support Force, Pingdingshan, Henan 467099, China

Abstract: **Objective** To investigate the expression and clinical significance of claudin-1 in papillary thyroid carcinoma (PTC). **Methods** From January 2017 to October 2019, 271 archived thyroid surgery specimens in Pingdingshan First People's Hospital and Pingdingshan Medical District of the 989 Hospital of the joint logistics support force of the Chinese PLA were collected. The expressions of claudin-1 in 116 cases of PTC, 145 cases of benign thyroid lesions (BTL) and 10 cases of follicular thyroid carcinoma were detected by immunohistochemical MaxVision method, and the relationship between them and the clinical pathological characteristics was analyzed. **Results** The high expression rate of claudin-1 in 116 cases of PTC was 97.4%. The high expression rate of claudin-1 in 116 cases of BTL was 11.7%. The high expression rate of claudin-1 in 10 cases of follicular thyroid carcinoma was 10.0%. In addition, claudin-1 was highly expressed in all 16 lymph nodes with PTC metastasis, which was consistent with the expression of PTC in thyroid. No expression of claudin-1 was found in the normal thyroid tissues around 40 cases of tumors. The expression of claudin-1 in PTC and BTL was significantly different ($\chi^2=189.282, P<0.001$), the expression of claudin-1 in PTC and follicular carcinoma was still statistically sig-

nificant($\chi^2 = 71.810, P < 0.001$). The expression of claudin-1 was not related with age, gender, number and diameter of tumor nodules, lymph node metastasis, and TNM staging ($P > 0.05$). The sensitivity of claudin-1 in the diagnosis of PTC was 97.4%. The specificity of claudin-1 was 88.3% in the differential diagnosis of PTC and BTL, and 90.0% in the differential diagnosis of PTC follicular carcinoma.

Conclusion Claudin-1 is helpful for the differential diagnosis of PTC and BTL, as well as PTC and follicular carcinoma. The overexpression of claudin-1 may be the key factor of strong adhesion of PTC tumor cells.

Key words: Thyroid neoplasms; Carcinoma, papillary; Benign thyroid lesions; Diagnosis, differential; Claudin-1 antigen

甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)是最常见的内分泌恶性肿瘤,发病率高。病理检查依据形态学进行诊断,主要观察分支复杂的乳头状结构和特征性细胞核改变。然而,在某些情况下可以观察到病理形态的重叠,比如一些甲状腺良性病变(benign thyroid lesions, BTL)亦可呈乳头状或假乳头状增生、少数滤泡亚型 PTC 与甲状腺滤泡癌颇为相似,当细胞核的特征不典型时鉴别诊断常会存在一定困难。在这些病变中使用 galectin-3、HBME-1 (Hector Battifora mesothelial 1) 和 cytokeratin-19 鉴别诊断价值有限^[1],也没有达成免疫组化专家共识或指南,因此,有必要寻找其他免疫组化标志物作为辅助检查手段。

细胞紧密连接不仅参与了细胞物质流动的调节,还具有细胞增殖、基因转录、肿瘤抑制和维持上皮细胞极性的功能^[2-3]。甲状腺单层滤泡上皮细胞的极性排列,以及滤泡腔与滤泡外之间的屏障作用都是由于紧密连接的存在^[4]。截至目前,在人体组织中共发现 27 种紧密连接跨膜蛋白 Claudin 家族成员^[5],不同 Claudin 成员在不同肿瘤的表达各异。Claudin-1 在细胞紧密连接中发挥着骨架蛋白的作用,被认为是负责上皮细胞屏障功能完整性最重要的蛋白质^[2],其异常表达与多种恶性肿瘤的生存期短有显著相关性^[6-7],但在 PTC 组织中研究较少,并且混杂其他组织学类型的甲状腺癌,国内鲜见报道。本研究拟通过免疫组化染色法探讨 PTC 组织中 Claudin-1 的鉴别诊断价值,以及与 PTC 侵袭转移能力的相关性,为临床提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究收集 2017 年 1 月至 2019 年 10 月平顶山市第一人民医院和中国人民解放军联勤保障部队第九八九医院平顶山医疗区甲状腺手术存档标本共计 271 例。其中 PTC 116 例,男女比例为 1:3.6;中位年龄 47.5 岁(年龄范围 18~69 岁),<55 岁者占 79.3%;肿瘤中位长径 5 mm(长径范围 1~28 mm)。术后肿瘤分期参照 AJCC 第八版 TNM 分期进行。145 例 BTL 病人中,男 42 例,女 103 例,男女比例为 1:2.5;中位年龄 50.0 岁(年龄范围 22~81 岁),<55 岁者占 71.7%。甲状腺滤泡癌 10 例,男 4

例,女 5 例,男女比例为 1:2.5;中位年龄 53.0 岁(年龄范围 40~76 岁),<55 岁者占 50.0%。PTC 组与 BTL 组、滤泡癌组病人性别($\chi^2=2.86, P=0.240$)和年龄($\chi^2=5.10, P=0.078$)分布差异无统计学意义。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求,所有病人或其近亲属均签署知情同意书。

1.2 方法 所有标本经 3.7% 中性甲醛固定,常规石蜡切片,HE 染色,光镜下复核诊断。免疫组化染色采用 pH 9.0 的 EDTA 高温高压抗原修复法和 EliVision-2 染色法。免疫组化使用的一抗为 Claudin-1(多克隆)。实验操作步骤和结果判定参照试剂说明书进行。使用已知阳性对照片做阳性对照, PBS 代替一抗做阴性对照,对照片与研究标本在同一条件下进行染色。免疫组化使用的抗体和 EliVision-2 试剂盒购自福州迈新生物公司。

1.3 免疫组化结果判定 Claudin-1 阳性表达定位于细胞膜。评分标准参照 Sinicrope 1995 年首次应用的由 Tanaka 于 2000 年改良的定量记分法^[8],低倍镜下观察整张免疫组化染色切片,选取有代表性的不同区域进一步高倍放大,随机观察至少 5 个高倍视野(长径 550 μm),综合判断高倍镜下染色强度评分和阳性细胞百分比评分。按染色强度评分:无染色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;按阳性细胞百分比评分: $\leq 5\%$ 为 0 分,6%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分,51%~75% 为 3 分,>75% 为 4 分,百分比不同时取平均值。染色强度得分和阳性细胞百分比得分相乘,0 分为(-),1~2 分为(+),3~4 分为(++),>4 分为(+++);其中(-)和(+)为低表达,(++)和(+++)为高表达。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 26.0 统计软件对实验数据进行分析。分类数据采用率或百分数表示,并采用 χ^2 检验(必要时连续性校正)或 Fisher 确切概率法进行比较,以双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。按照临床流行病学诊断试验研究评价计算方法,计算 Claudin-1 诊断 PTC 的灵敏度和特异度。

2 结果

2.1 Claudin-1 的表达 Claudin-1 在 PTC、BTL 与滤泡癌比较中均差异有统计学意义($P < 0.001$),见表 1。此外, Claudin-1 在肿瘤周围的正常甲状腺组织中全

部不表达;在16例有PTC转移的淋巴结中全部高表达(100%),并与甲状腺内原发癌灶的表达一致。

表1 紧密连接蛋白-1(Claudin-1)在甲状腺乳头状癌(PTC)、甲状腺良性病变(BTL)及滤泡癌中的表达

组别	例数	Claudin-1 表达				高表达率 /%
		-	+	++	+++	
PTC	116	1	2	101	12	97.4
BTL	145	102	26	17	0	11.7
结节性甲状腺肿	96	76	13	7	0	7.3
桥本甲状腺炎	31	17	8	6	0	19.4
滤泡性腺瘤	18	9	5	4	0	22.2
滤泡癌	10	7	2	1	0	10.0

注:BTL、结节性甲状腺肿、桥本甲状腺炎、滤泡性腺瘤和滤泡癌高表达率分别与PTC比较, $\chi^2=189.28、170.03、91.67、72.89、71.81$,均 $P<0.001$ 。

2.2 Claudin-1 的表达与临床病理参数的关系 Claudin-1 的高表达率在不同性别、年龄、癌结节长径、癌结节数目、淋巴结转移和TNM分期组间比较均差异无统计学意义($P>0.05$),见表2。

表2 紧密连接蛋白-1(Claudin-1)的表达与甲状腺乳头状癌(PTC)临床病理参数的关系/例(%)

参数	例数	Claudin-1 高表达/%	χ^2 值	P 值
性别			<0.001	>0.999
男	25	24(96.0)		
女	91	89(97.8)		
年龄			<0.001	>0.999
<55岁	92	90(97.8)		
≥55岁	24	23(95.8)		
肿瘤长径			0.010	0.920
≤10 mm	99	97(98.0)		
>10 mm	17	16(94.1)		
癌结节数目			0.465	0.495
单个	79	78(98.7)		
多个	37	35(94.6)		
淋巴结转移			—	0.550 ^①
是	39	39(100.0)		
否	77	74(96.1)		
TNM分期			—	>0.999 ^①
I~II期	110	107(97.3)		
III~IV期	6	6(100.0)		

注:①表示Fisher确切概率法。

2.3 Claudin-1 表达的灵敏度和特异度评价 Claudin-1 诊断PTC的灵敏度为97.4%(113/116),Claudin-1 在PTC分别与BTL和滤泡癌的鉴别诊断中的特异度为88.3%(128/145)和90.0%(9/10)。

3 讨论

本研究回顾性分析了271例甲状腺良恶性病变

组织中Claudin-1的表达情况,并分析了Claudin-1的表达与PTC侵袭转移能力的相关性。我们发现Claudin-1在PTC组织中的表达与在BTL和甲状腺滤泡癌中的表达差异有统计学意义;Claudin-1表达与PTC的淋巴结转移和TNM分期等不相关。

在当前的研究中,Claudin-1在PTC中的高表达率(97.4%)显著高于BTL(11.7%),在PTC分别与结节性甲状腺肿、桥本甲状腺炎、滤泡性腺瘤和滤泡癌比较,仍表现差异有统计学意义($P<0.001$),呈现胞膜阳性表达模式。在所检测病例的淋巴结转移性PTC癌灶中全部高表达,并与同一病人甲状腺内的原发癌灶表达一致。同时,研究表明正常甲状腺滤泡上皮细胞不表达Claudin-1。

以往的多项研究也对各种甲状腺病变中的Claudin-1进行过免疫组化染色评估。Nemeth等^[9]通过定量评估的方法来测定甲状腺肿瘤组织中Claudin-1阳性区域,结果显示在PTC组织中肿瘤细胞胞膜强烈表达Claudin-1,而在甲状腺滤泡性腺瘤和滤泡癌组织中表达微弱或阴性,单独用Claudin-1区分PTC和滤泡性肿瘤有100%的特异度和70.3%的灵敏度。Abd El Atti等^[10]研究发现Claudin-1可用于PTC和其他滤泡性结节的鉴别,与CD56(Claudin-1+/CD56-)联合后诊断PTC具有更高的特异度(100%)和敏感度(81.3%)。Tzelepi等^[4]研究也发现Claudin-1在PTC中高表达(敏感度93%)。这些研究结果均与我们的研究结果相似。因此,Claudin-1免疫组化染色在区分PTC和BTL及滤泡癌方面具有重要参考价值,可作为PTC的诊断性标志物。高灵敏度和特异度使得Claudin-1在PTC转移灶的判断中又具有特殊意义,即在颈部淋巴结转移癌中Claudin-1阴性应谨慎考虑PTC,需与甲状腺转录因子1(TTF-1)和甲状腺球蛋白(Tg)联合应用以确定是否为PTC转移。需要指出的是文献中Claudin-1表达率的不同可能在很大程度上受到截点值标准和一抗稀释浓度的影响。

紧密连接Claudin-1是调节细胞间黏附的关键蛋白。Claudin-1表达的减弱或缺失可能导致细胞间黏附性丧失,造成细胞紧密连接功能失常和极性消失,可能会增加营养物质和其他生长因子向肿瘤细胞扩散,从而诱导肿瘤细胞恶性转化、增殖和获得转移潜能^[3,6,11]。相反,Claudin-1的过度表达能抑制癌细胞的分离,从而抑制肿瘤细胞迁移、入侵和转移^[3,12-17]。因此,目前认为Claudin蛋白是与肿瘤关系最为密切的紧密连接蛋白。虽然Claudin-1已经在多种恶性肿瘤中被研究,但其预后作用并未完全阐明。Pyo等^[6]关于Claudin-1在各种恶性肿瘤中

的预后作用的荟萃分析显示,Claudin-1的低表达与乳腺癌、结直肠癌、食管癌、胆囊癌、头颈部癌和肺癌的生存期短显著相关,而与宫颈癌、肝癌或胃癌的生存期短无关。

另外,根据Pyo等^[6]的研究结果,Claudin-1的低表达与甲状腺癌的无病生存期短显著相关。Tzelepi等^[4]对Claudin在不同甲状腺癌类型中的总体表达情况进行了深入研究,结果显示Claudin-1在去分化的甲状腺癌中表达减少,单变量分析显示Claudin-1表达的减少或丧失与无病生存期短之间存在相关性。在本研究中显示Claudin-1高表达几乎发生在所有的PTC病例中,即使在PTC的淋巴结转移灶内癌细胞仍然高表达Claudin-1,并且在形态学上癌细胞仍具有很强的黏附性(形成乳头状或腺管样结构),这一发现进一步表明PTC中Claudin-1高表达可能具有抑制肿瘤细胞分离的作用。因此,高表达Claudin-1可能是PTC总体预后很好的重要因素之一。此外,Claudin-1高表达可作为PTC复发的重要预测指标^[4,9],以及潜在的药物治疗靶点^[11-12,18-20]。

总之,在临床实践中检测Claudin-1对不典型PTC病例的确诊具有重要参考价值,并且具有高度的敏感性和特异性,可作为PTC与TBL和滤泡癌鉴别诊断的首选抗体,有助于提高正确诊断率。在判断颈部淋巴结转移性肿瘤的原发部位时,联合检测Claudin-1、Tg和TTF-1有助于确定转移性PTC。Claudin-1高表达可能是PTC总体预后很好的关键因素之一。

参考文献

- [1] SUREN D, YILDIRIM M, SAYINER A, et al. Expression of claudin 1, 4 and 7 in thyroid neoplasms [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(5): 3722-3726.
- [2] SCHNEEBERGER EE, LYNCH RD. The tight junction: a multifunctional complex [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 286(6): C1213-1228.
- [3] RUNKLE EA, MU D. Tight junction proteins: from barrier to tumorigenesis [J]. *Cancer Lett*, 2013, 337(1): 41-48.
- [4] TZELEPI VN, TSAMANDAS AC, VLOTINOU HD, et al. Tight junctions in thyroid carcinogenesis: diverse expression of claudin-1, claudin-4, claudin-7 and occludin in thyroid neoplasms [J]. *Mod Pathol*, 2008, 21(1): 22-30.
- [5] MINETA K, YAMAMOTO Y, YAMAZAKI Y, et al. Predicted expansion of the claudin multigene family [J]. *FEBS Lett*, 2011, 585(4): 606-612.
- [6] PYO JS, KIM NY, CHO WJ. Prognostic role of Claudin-1 immunohistochemistry in malignant solid tumors: a meta-analysis [J]. *J Pathol Transl Med*, 2019, 53(3): 173-179.
- [7] 陈茹, 黄益灯. Claudin-1和Claudin-7与头颈部恶性肿瘤的关系[J]. *国际耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2017, 41(1): 15-18.
- [8] TANAKA K, IWAMOTO S, GON G, et al. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(1): 127-134.
- [9] NEMETH J, NEMETH Z, TATRAI P, et al. High expression of claudin-1 protein in papillary thyroid tumor and its regional lymph node metastasis [J]. *Pathol Oncol Res*, 2010, 16(1): 19-27.
- [10] ATTI R MABD EL, SHASH LS. Potential diagnostic utility of CD56 and claudin-1 in papillary thyroid carcinoma and solitary follicular thyroid nodules [J]. *J Egypt Natl Canc Inst*, 2012, 24(4): 175-184.
- [11] SINGH AB, SHARMA A, DHAWAN P. Claudin family of proteins and cancer: an overview [J]. *J Oncol*, 2010, 2010541957.
- [12] CHAO YC, PAN SH, YANG SC, et al. Claudin-1 is a metastasis suppressor and correlates with clinical outcome in lung adenocarcinoma [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 179(2): 123-133.
- [13] CHANG TL, ITO K, KO TK, et al. Claudin-1 has tumor suppressive activity and is a direct target of RUNX3 in gastric epithelial cells [J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(1): 255-265, e3. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.08.044.
- [14] BHAT AA, SYED N, THERACHIYIL L, et al. Claudin-1, a double-edged sword in cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(2): 21020569. DOI: 10.3390/ijms21020569.
- [15] DU Y L, LIANG Y, CAO Y, et al. LncRNA XIST Promotes migration and invasion of papillary thyroid cancer cell by modulating miR-101-3p/CLDN1 axis [J]. *Biochem Genet*, 2021, 59(2): 437-452.
- [16] HUCZ J, KOWALSKA M, JARZAB M, et al. Gene expression of metalloproteinase 11, claudin 1 and selected adhesion related genes in papillary thyroid cancer [J]. *Endokrynol Pol*, 2006, 57 Suppl A: 18-25.
- [17] ZWANZIGER D, BADZIONG J, TING S, et al. The impact of CLAUDIN-1 on follicular thyroid carcinoma aggressiveness [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2015, 22(5): 819-830.
- [18] HASHIMOTO Y, OKADA Y, SHIRAKURA K, et al. Anti-claudin antibodies as a concept for development of claudin-directed drugs [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2019, 368(2): 179-186.
- [19] HASHIMOTO Y, FUKASAWA M, KUNIYASU H, et al. Claudin-targeted drug development using anti-claudin monoclonal antibodies to treat hepatitis and cancer [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2017, 1397(1): 5-16.
- [20] MORIN PJ. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(21): 9603-9606.

(收稿日期:2020-08-24,修回日期:2020-09-11)