

雌激素受体 α 、 β 及基质金属蛋白酶-9 在人甲状腺乳头状癌中的表达及意义

陈素琴,袁海洪,冯立新

(天津市武清区人民医院病理科,天津 301700)

摘要:**目的** 研究雌激素受体 α (ER α)、雌激素受体 β (ER β) 及基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 在人甲状腺乳头状癌 (PTC) 组织中的表达及意义。**方法** 应用免疫组织化学法的 Elivision 两步法检测 ER α 、ER β 和 MMP-9 在 200 例 PTC 和 100 例结节性甲状腺肿 (NTG) 中的表达。**结果** ER α 在 PTC 中阳性表达率为 56.00% (112/200), 在 NTG 中的阳性表达率为 8.00% (8/100), 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); ER β 在 PTC 中的阳性表达率为 70.00% (140/200), 在 NTG 中的阳性表达率为 58.00% (58/100), 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); MMP-9 在 PTC 中的阳性表达率为 82.00% (164/200), 在 NTG 中的阳性表达率为 65.00% (65/100), 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。在 PTC 中, ER α 表达与性别有关 ($P < 0.01$), MMP-9 的表达与包膜侵犯、淋巴结转移及 TNM 分期有关 ($P < 0.05$)。ER α 和 MMP-9 的表达呈正相关 ($P < 0.01$), ER β 和 MMP-9 的表达呈负相关 ($P < 0.01$)。**结论** ER α 、ER β 及 MMP-9 与 PTC 的发生发展有关, 且 ER α 和 ER β 都与 MMP-9 的表达相关, 三者之间的相关性可以为进一步研究 PTC 提供一定的基础。

关键词: 甲状腺肿瘤; 雌激素受体 α ; 雌激素受体 β ; 基质金属蛋白酶-9

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.06.028

The expression and significance of ER α , ER β and MMP-9 in papillary thyroid carcinoma

CHEN Suqin, YUAN Haihong, FENG Lixin

(Department of Pathology, The People's Hospital of Wuqing District, Tianjin 301700, China)

Abstract:**Objective** To investigate the expression and biological significances of estrogen receptor α (ER α) and β (ER β) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in papillary thyroid carcinoma (PTC). **Methods** Elivision two-step immunohistochemical staining was performed to detect the expressions of ER α , ER β and MMP-9 in 200 cases of PTC and 100 cases of nodular thyroid goiter (NTG). **Results** The positive rate of ER α was 56.00% (112/200) in PTC, and 8.00% (8/100) in NTG, and there was a significant difference between them ($P < 0.01$). The positive rate of ER β was 70.00% (140/200) in PTC, however, which was 58.00% (58/100) in NTG, and there was a significant difference between them ($P < 0.01$). The positive rate of MMP-9 was 82.00% (164/200) in PTC, meanwhile, which was 65.00% (65/100) in NTG, and there was a significant difference between them ($P < 0.01$). In PTC, the expression of ER α was significantly correlated with gender ($P < 0.01$), and the expression of MMP-9 was significantly correlated with degree of capsule invasion, lymph node metastasis and TNM staging ($P < 0.05$). Correlative analysis showed that there was a positive correlation between ER α and MMP-9 ($P < 0.01$), and a negative correlation between ER β and MMP-9 ($P < 0.01$). **Conclusions** The expressions of ER α , ER β and MMP-9 are related to the occurrence and development of PTC, and ER α and ER β are correlated

基金项目:天津市武清区科技发展计划项目(WQKJ201616)

- [8] RAMPRASAD M, BHATTACHARYYA SS, BHATTACHARYYA A. Thyroid disorders in pregnancy [J]. Indian J Endocrinol Metab, 2012, 16(Suppl 2):S167-170.
- [9] 史良凤, 张进安. 甲状腺功能减退症筛查的共识与分歧[J]. 中国实用内科杂志, 2014, 34(4):321-324.
- [10] 邹冬冬, 温艳丽, 赵楠, 等. 妊娠前半期甲状腺功能减退症的临床流行病学调查[J]. 中国妇幼保健, 2013, 28(33):5512-5515.
- [11] FERREIRA A, ALHO I, CASIMIRO S, et al. Bone remodeling markers and bone metastases: From cancer research to clinical implications[J]. Bonekey Rep, 2015, 4(8):668-674.
- [12] 董春丽, 王树云, 王俊婷. 妊娠女性超声骨密度和骨代谢的临床研究[J]. 河北医药, 2015, 37(12):1800-1802.
- [13] CLEARY-GOLDMAN J, MALONE FD, LAMBERT-MESSERLIAN G, et al. Maternal thyroid hypofunction and pregnancy outcome [J]. Obstet Gynecol, 2008, 112(1):85-92.
- [14] MANNISTO T, MENDOLA P, GREWAL J, et al. Thyroid diseases and adverse pregnancy outcomes in a contemporary US cohort [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2013, 98(7):2725-2733.
- [15] 梁利波, 吕瑞雪, 黄亨建, 等. 血清 TSH 和 FT4 二维复合参考区间在亚临床甲状腺功能减退诊断中的应用[J]. 四川大学学报(医学版), 2014, 45(2):278-280.

(收稿日期:2017-01-10, 修回日期:2018-04-09)

with MMP-9 expression. The correlation among the three can provide a basis for further research of PTC.

Keywords: Thyroid neoplasms; Estrogen receptor alpha; Estrogen receptor beta; Matrix metalloproteinase 9

甲状腺肿瘤占有所有肿瘤的1%,其中大部分为内分泌恶性肿瘤^[1],并且其发生率在近几年快速增加^[2],尤其是甲状腺乳头状癌(PTC)^[1]。PTC的男女发病率之比为1:4,提示雌激素在PTC的发生发展中可能具有重要作用,雌激素经典的信号通路是由两个细胞内受体介导的,即雌激素受体 α (ER α)和雌激素受体 β (ER β)。而基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的表达异常与人类恶性肿瘤的浸润与转移密切相关^[3]。为了研究ER α 、ER β 对人类PTC中癌细胞的迁移和侵袭的影响,我们采用免疫组织化学(免疫组化)法检测ER α 、ER β 和MMP-9在200例PTC组织和100例结节性甲状腺肿(NTG)中的表达,探讨三者与PTC临床病理特征之间的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2003年6月至2016年7月间天津市武清区人民医院病理科常规外检的200例PTC和100例NTG患者切除的组织包埋块。其中PTC患者中男性47例,女性153例;年龄范围25~60岁,中位年龄45岁;肿瘤 ≥ 2 cm者86例,<2 cm者114例;有包膜侵犯者107例,无包膜侵犯者93例;有淋巴结转移者79例,无淋巴结转移者121例;根据TNM分期:I~II期134例,III~IV期66例。所有病例在肿瘤切除前均未进行放疗和化疗。所有病例均经两位副主任医师以上病理医师阅片明确诊断为PTC和NTG。

本研究经天津市武清区人民医院医学伦理委员会批准,患者及其近亲属知情同意。

1.2 研究方法 免疫组化Elivision两步法 将准备好的石蜡组织块,切成石蜡切片,置于67℃烘箱中,烘片2 h,脱蜡至水,用pH 7.4的PBS冲洗3次,每次3 min。取一定量pH 6.0柠檬酸盐缓冲液,加入微波盒中,微波加热至沸腾,将脱蜡水化后的组织切片置于耐高温塑料切片架上,放入已沸腾的缓冲液中,中档微波处理10 min,取出微波盒流水自然冷却,从缓冲液中取出玻片,先用蒸馏水冲洗两次,之后用PBS冲洗2次,每次3 min。每张切片加1滴3%双氧水,室温下孵育10 min,以阻断内源性过氧化物酶的活性。PBS冲洗3次,每次3 min。除去PBS液,每张切片加1滴相应的第一抗体,室温下孵育2 h。PBS冲洗3次,每次5 min。除去PBS液,每张切片加1滴聚合物增强剂(试剂A),室温下孵育20 min。PBS冲洗3次,每次3 min。除去

PBS液,每张切片加1滴酶标抗鼠/兔聚合物(试剂B),室温下孵育30 min。PBS冲洗3次,每次5 min。除去PBS液,每张切片加1滴新鲜配制的DAB液,显微镜下观察5 min。苏木素复染,0.1%盐酸分化,自来水冲洗,蓝化,切片经梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封固,晾干后观察。

1.3 材料与试剂 单克隆兔抗人ER α 抗体为abcam公司产品,工作液浓度为1:100;单克隆兔抗人ER β 抗体为abcam公司产品,工作液浓度为1:200;单克隆兔抗人MMP-9抗体为abcam公司产品,工作液浓度为1:200。即用型第二代免疫组化Elivision plus广谱试剂盒,购自福州迈新生物技术开发有限公司。操作严格按照试剂盒说明书进行,用已知阳性切片做阳性对照,以PBS代替一抗作阴性对照。

1.4 结果判定 ER α 蛋白主要表达于细胞核,ER β 蛋白主要表达于细胞核和细胞质,MMP-9主要表达于细胞质和细胞膜,以出现棕黄色颗粒染色为阳性。根据细胞染色强度和染色细胞所占面积两者积分之和对组织切片中各点评分。染色强度定性积分:不着色为0,浅黄色为1,棕黄色为2,棕褐色为3;染色面积定量积分:无着色或<5%为0,5%~<24%为1,25%~<50%为2, $\geq 50\%$ 为3;两种积分相加为该点得分。两项得分相加为总积分,依照0为-,1~2为+,3~4为++,5~6为+++ ,进行半定量判断;>2(++和+++)为阳性, ≤ 2 (-和+)为阴性进行定性判断。

1.5 统计学方法 应用SPSS 19.0统计软件包进行数据分析。计数资料用例(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。采用Spearman等级相关分析进行相关性研究。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ER α 、ER β 和MMP-9在PTC组织及NTG组织中的表达 ER α 阳性着色位于细胞核(图1),ER β 阳性着色位于细胞核和细胞质(图2),MMP9阳性着色位于细胞质和细胞膜(图3)。

在PTC及NTG组织中,ER α 的阳性表达率分别为56.00%(112/200)和8.00%(8/100),其差异有统计学意义($P < 0.01$);ER β 的阳性表达率分别为70.00%(140/200)和58.00%(58/100),其差异有统计学意义($P < 0.01$);MMP-9的阳性表达率分别为82.00%(164/200)和65.00%(65/100),其差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表1。

表1 PTC 和 NTG 组织中 ERα、ERβ 和 MMP-9 的
阳性表达率的比较/例(%)

组别	例数	ERα(+)	ERβ(+)	MMP-9(+)
PTC	200	112(56.00)	140(70.00)	164(82.00)
NTG	100	8(8.00)	58(58.00)	65(65.00)
χ ² 值		64.000	4.278	10.665
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

注:ERα 为雌激素受体 α、ERβ 为雌激素受体 β、MMP-9 为基质金属蛋白酶-9、PTC 为人甲状腺乳头状癌、NTG 为结节性甲状腺肿

2.2 在 PTC 中 ERα、ERβ 和 MMP-9 的表达与临床病理特征间的关系 在 PTC 中,ERα 蛋白的阳性表达率与患者的性别有关,其在女性患者中的表达明显高于男性患者($P < 0.01$)。MMP-9 的阳性表达率与肿瘤的包膜侵犯有关,在已侵犯肿瘤包膜的肿瘤中的表达高于无包膜侵犯的肿瘤($P < 0.01$)。MMP-9 的阳性表达率与是否有淋巴结转移有关,在有淋巴结转移组中的表达阳性率高于无淋巴结转移组($P < 0.05$)。MMP-9 的阳性表达率还与 TNM 分期有关,随着 TNM 分期的进展呈上升趋势,在 I 和 II 期中的表达阳性率低于 III 和 IV 期($P < 0.05$)。ERα 蛋白的阳性表达率与肿瘤大小、包膜侵犯、淋巴结转移及 TNM 分期无关($P > 0.05$)。ERβ 蛋白的阳性表达率与患者性别、肿瘤大小、包膜侵犯、淋巴结转移及 TNM 分期无关($P > 0.05$)。MMP9 的阳性表达率与患者性别和肿瘤大小无关($P > 0.05$)。见表 2。

表2 PTC 中 ERα、ERβ 和 MMP-9 的表达与临床病理特征间的关系

临床特征	例数	ERα			ERβ			MMP-9		
		阳性率/%	χ ² 值	P 值	阳性率/%	χ ² 值	P 值	阳性率/%	χ ² 值	P 值
性别			12.020	0.001		0.478	0.489		0.447	0.504
男	47	34.04			65.96			78.72		
女	153	62.75			71.24			83.01		
肿瘤大小			1.221	0.269		2.627	0.105		0.032	0.858
≥2 cm	86	60.47			63.95			82.56		
<2 cm	114	52.63			74.56			81.58		
包膜侵犯			1.357	0.244		0.920	0.338		11.676	0.001
阳性	107	59.81			72.90			90.65		
阴性	93	51.61			66.67			72.04		
淋巴结转移			3.013	0.083		0.726	0.394		5.484	0.019
阳性	79	49.37			73.42			89.87		
阴性	121	60.33			67.77			76.86		
TNM 分期			1.498	0.221		2.481	0.115		5.297	0.021
I 和 II 期	134	52.99			66.42			77.61		
III 和 IV 期	66	62.12			77.27			90.91		

注:ERα 为雌激素受体 α、ERβ 为雌激素受体 β、MMP-9 为基质金属蛋白酶-9、PTC 为人甲状腺乳头状癌

2.3 在 PTC 中 ERα、ERβ 和 MMP-9 之间的相关关系 Spearman 等级相关分析显示,在 PTC 组织中,ERα 蛋白的阳性表达率和 MMP-9 蛋白的阳性表达率呈正相关关系($r = 0.573, P < 0.01$),ERβ 蛋白的阳性表达率和 MMP-9 蛋白的阳性表达率呈负相关关系($r = -0.520, P < 0.01$)。

3 讨论

雌激素受体在甲状腺组织中的表达首次报道于 1981 年,Molteni 等^[4]通过使用符号定向图(SDG)法证实甲状腺乳头状癌组织中有雌激素受体表达。目前国内外研究对于 PTC 和 NTG 组织中 ERα 和 ERβ 的表达仍有争议,有大量的证据表明 PTC 和 NTG 组织中存在 ERα 和 ERβ 的表达,但仍有个别研究在 PTC 和 NTG 中未检测到 ERα 和 ERβ 的表达^[5]。

这种争议可能是因为雌激素受体的亚细胞定位判断的不同引起的,另外则是采用不同的实验方法、技术及统计方法等因素造成的。本研究中运用免疫组化的方法,结果显示在 PTC 和 NTG 中,ERα 表达于细胞核,而 ERβ 则表达于细胞核和细胞质中。

有研究显示 ERα 与 ERβ 对细胞的生存和增殖有相反的作用,ERα 具有促进细胞增殖和抑制细胞凋亡的作用,而 ERβ 却显示了在分化和促进细胞凋亡中的作用^[6]。本研究中 ERα 在 PTC 中的表达远远高于其在 NTG 中的表达,与 Chen 等^[6]研究一致。这进一步表明在 PTC 中,ERα 是一个重要的细

胞增殖指标,它的高表达刺激了肿瘤细胞的生长。本研究中 ER β 在 PTC 中的表达高于其在 NTG 中的表达,与 Chen 等^[6] 研究结果不同,这可能是因为 ER β 亚细胞定位的不同所引起,Chen 等^[6] 对 ER β 的结论是基于其在细胞核的表达,而本研究中其主要在细胞核和细胞质同时表达。在浸润性食管癌中 ER β 在细胞质的表达明显高于在非浸润性食管癌;在乳腺癌中,ER β 细胞核的高表达时,其内分泌治疗有效,预后相对较好^[7]。因此推测 ER β 在不同部位的表达其作用是不同的。

PTC 存在明显性别差异,本研究显示 ER α 在女性中的表达明显高于男性。Zhang 等^[8] 研究发现,雌激素可以促进人甲状腺癌乳头状细胞株 (BCPAP) 和正常甲状腺细胞株生长,并且雌激素能够促进甲状腺癌细胞的粘连、侵袭和转移。但是本研究 PTC 中 ER α 和 ER β 的表达与 PTC 患者的肿瘤大小、包膜侵犯、淋巴结转移状况及 TNM 分期无关,与 Huang 等^[9] 报道结论相一致,推测 ER α 和 ER β 仅仅参与了雌激素促进 PTC 发生的过程中,而没有或很少参与其进展。

肿瘤细胞浸润转移的关键步骤之一是细胞外基质的降解,MMP-9 是重要的细胞外基质降解酶,能通过促进血管生成和降解细胞外基质,使肿瘤发生浸润、转移^[3]。在本研究中,MMP-9 蛋白在 PTC 中高表达,且在已侵犯肿瘤包膜的肿瘤中的表达高于无包膜侵犯的肿瘤,在无淋巴结转移组中的表达阳性率高于有淋巴结转移组,随着 TNM 分期的进展呈上升趋势,在 I 和 II 期中的表达阳性率低于 III 和 IV 期。有研究证实,在雌激素受体阳性的乳腺癌细胞中,ER α 表达水平与 MMP-9 呈正相关^[10];有学者发现 ER 激动剂能够通过 ER α 依赖通路促进卵巢癌细胞转移,通过 ER β 抑制其转移^[11]。本研究结果中 MMP-9 与 ER α 蛋白的阳性表达呈显著正相关,与 ER β 蛋白的阳性表达呈显著负相关。尽管本研究与已有的文献报道的发生部位不同,但相应地可以因此推测,ER α 和 ER β 在 PTC 肿瘤细胞的浸润转移机制类似于卵巢癌。当然具体的通路还需要进一步研究。

本研究结果证实,在 PTC 中,ER α 对 PTC 的发

生发展有重要的促进作用,ER β 的亚细胞定位对其在 PTC 中所起的作用非常重要,而这两者与 MMP-9 之间存在着紧密的联系,或许可以为 PTC 的个体化治疗提供新的线索。

(本文图 1~3 见插图 6-2)

参考文献

- [1] JUAN YH, HSUAN HF, NG KK, et al. Chain of rings: a radiographic sign of papillary thyroid cancer[J]. Acta Clin Belg, 2015, 70(2):124-126.
- [2] 张振华, 苏自杰, 阙云珍, 等. 全腔镜下甲状腺癌根治术对甲状腺癌疗效及术后并发症的影响[J]. 安徽医药, 2017, 21(11): 2009-2012.
- [3] 黄培, 李道明, 黄器伟, 等. 高迁移率族蛋白 B1、基质金属蛋白酶-9 和血管内皮生长因子-C 在甲状腺乳头状癌中的表达及意义[J]. 中华内分泌外科杂志, 2013, 7(4):265-268.
- [4] MOLTENI A, WARPEHA RL, BRIZIO-MOLTENI L, et al. Estradiol receptor-binding protein in head and neck neoplastic and normal tissue[J]. Arch Surg, 1981, 116(2): 207-210.
- [5] MISHRA AK, ABRAHAMSSON A, DABROSIN C. Fulvestrant inhibits growth of triple negative breast cancer and synergizes with tamoxifen in ER α positive breast cancer by up-regulation of ER β [J]. Oncotarget, 2016, 7(35):56876-56888.
- [6] CHEN GG, VLANTIS AC, ZENG Q, et al. Regulation of cell growth by estrogen signaling and potential targets in thyroid cancer [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2008, 8(5):367-377.
- [7] YAN M, RAYOO M, TAKANO EA, et al. Nuclear and cytoplasmic expressions of ER β 1 and ER β 2 are predictive of response to therapy and alters prognosis in familial breast cancers[J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2011, 126(2):395-405.
- [8] ZHANG L, CHENG X, GAO Y, et al. Curcumin inhibits metastasis in human papillary thyroid carcinoma BCPAP cells via down-regulation of the TGF- β /Smad2/3 signaling pathway [J]. Exp Cell Res, 2016, 341(2): 157-165.
- [9] HUANG Y, DONG W, LI J, et al. Differential expression patterns and clinical significance of estrogen receptor- α and β in papillary thyroid carcinoma[J]. BMC Cancer, 2014, 14:383.
- [10] KUNDU P, LI M, LU R, et al. Regulation of transcriptional activation function of rat estrogen receptor α (ER α) by novel C-terminal splice inserts[J]. Mol Cell Endocrinol, 2015, 401:202-212.
- [11] MUNGENAST F, THALHAMMER T. Estrogen biosynthesis and action in ovarian cancer[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2014, 5:192.

(收稿日期:2017-07-03,修回日期:2018-03-16)