

分化型甲状腺癌中 Cyclin D1, Galectin-3 和 ki-67 的表达及其与侵袭的关系

何时知^{1a}, 房居高^{1a}, 陈佳铭^{1a}, 刘擘², 庄欢^{1a}, 沈茜茜^{1a}, 廉猛^{1a},
马泓智^{1a}, 侯丽珍^{1a}, 张雪^{1b}, 何小金^{1b}, 钟琦^{1a}

(1.首都医科大学附属北京同仁医院 a.耳鼻咽喉头颈外科;b.病理科,北京 100730;
2 河北医科大学第一医院 甲状腺外科,石家庄 050031)

摘要:[目的]检测分化型甲状腺癌患者中 Cyclin D1, Galectin-3 和 ki-67 表达,探讨其在分化型甲状腺癌局部侵袭中的临床意义.[方法]收集 40 例侵袭性分化型甲状腺癌(侵袭组)、30 例微小乳头状癌(非侵袭组)和 20 例结节性甲状腺肿(对照组)患者病例,利用免疫组化技术检测 Cyclin D1, Galectin-3 和 ki-67 在甲状腺病理切片中的表达.[结果]在侵袭组、非侵袭组和对照组中 Cyclin D1 表达的阳性率分别为:100%(40/40),53.3%(16/30)和 15%(3/20);Galectin-3 表达的阳性率分别为:37.5%(15/40),100%(30/30)和 0%(0/20);在侵袭组中 ki-67 增殖指数大于 1%病例占侵袭组总数的 50%,在非侵袭组中 ki-67 增殖指数大于 1%病例仅占非侵袭组总数的 13.3%.同非侵袭组相比较,侵袭组的 Cyclin D 阳性率明显增高($P < 0.01$),Galectin-3 阳性率明显减低($P < 0.01$),ki-67 阳性率升高($P < 0.01$),差异具有统计学意义.[结论]Cyclin D1, Galectin-3 和 ki-67 在侵袭性和非侵袭性分化型甲状腺癌中的表达差异有统计学意义,Cyclin D1 和 ki-67 高表达和 Galectin-3 低表达是分化型甲状腺癌局部侵袭的分子生物学特征之一.

关键词:分化型甲状腺癌;侵袭;Cyclin D1;Galectin-3;ki-67

中图分类号:R736.1

文献标志码:A

甲状腺癌是最常见的头颈部恶性肿瘤,其中包括乳头状癌和滤泡状癌在内的分化型甲状腺癌(differentiated thyroid carcinoma, DTC)约占甲状腺癌的 90%以上.分化型甲状腺癌是目前发病率上升速度最快的恶性肿瘤之一,生物学上属于低度恶性肿瘤,绝大多数 DTC 患者经过手术、放射性碘 131 和甲状腺素抑制治疗后预后良好,10 a 生存率可以达到 90%以上^[1].但约有 7%~16% DTC 患者伴有甲状腺外侵犯,侵犯包括喉、气管、下咽、食管等邻近的上呼吸消化道器官.出现腺体外侵犯的侵袭性分化型甲状腺癌(Invasive well-differentiated thyroid carcinoma, IWDTC)手术根治难度大,手术后生活质量受到严重影响,手术切缘阳性率高,10 a 生存率下降到 45%^[2],是困扰外科医生的临床难题.Galectin-3 是半乳糖凝集素家族的成员,由于其在甲状腺癌中呈现高表达而在正常甲状腺组织及良性肿瘤组织中不表达的特性,被认为是诊断分化型甲状腺癌最准确的分子标记物^[3].最近研究发现, Galectin-3 是 Wnt/ β -catenin 信号通路的关键调节因子,可以通过活化 Cyclin D1 的转录,调节细胞周期促进细胞增殖^[4].ki-67 作为增殖细胞表达的核抗原,是应用最广泛的评价肿瘤细胞增殖状态的生物学指标,临床多以其反应肿瘤细胞的增殖活性判断肿瘤的恶性程度和侵袭能力^[5].因此,通过研究分化型甲状腺癌患者 Cyclin D1, Galectin-3 和 ki-67 表达,分析其与肿瘤侵袭之间的关系,为探寻 IWDTC 的分子标志物提供临床依据.

收稿日期:2019-06-20; **修回日期:**2019-09-23.

基金项目:首都卫生发展专项项目(2018-2-2054);首都卫生发展科研专项项目(2018-1-2052)联合资助;北京市医院管理局“登峰”人才培养计划(DFL20180202).

作者简介:何时知(1980-),男,辽宁营口人,首都医科大学附属北京同仁医院主治医师,医学博士,主要研究方向为头颈肿瘤的基础和临床研究, E-mail: shizhi_he@163.com.

通信作者:房居高, E-mail: fangjugao@163.com.

1 资料与方法

1.1 研究对象

以2010年1月至2017年8月在首都医科大学附属北京同仁医院耳鼻咽喉头颈外科治疗的经病理检查明确的侵袭性分化型甲状腺癌患者为侵袭组,以同期收治的年龄、性别、放射接触史无统计学差异的甲状腺微小乳头状癌患者为非侵袭组,结节性甲状腺肿患者为对照组.根据2017年第8版AJCC指南^[6],侵袭性甲状腺癌的诊断标准为肿瘤浸润超出甲状腺包膜至喉、气管、食管或喉返神经,即T4a病变,不包括仅侵犯带状肌的腺外侵袭患者(T3b);甲状腺微小乳头状癌的诊断标准为肿瘤最大直径 <1 cm,且不伴有局部淋巴结转移和甲状腺外侵犯,即T1aN0病变.纳入标准为组织标本及临床资料完整,且经两位病理医师确诊,并且手术前未接受过放疗和化疗治疗的患者.最终纳入侵袭组40例患者,非侵袭组30例患者和对照组20例患者.侵袭组中38例为乳头状癌,2例为滤泡状癌,非侵袭组中30例为乳头状癌,两组均为分化型甲状腺癌患者.本研究符合医学伦理学标准,并经医院伦理委员会批准,所有患者均签署知情同意书.

1.2 研究方法

采用免疫组化法对临床收集的石蜡包埋保存的各组病理切片Cyclin D1, Galectin-3和ki-67的蛋白表达进行检测,具体操作按照试剂说明进行.Cyclin D1主要为胞核着色,个别病例胞核及胞质均有着色,细胞核呈棕黄色颗粒状或胞质呈均匀棕黄色为阳性,如仅有胞质着色视为阴性.Galectin-3主要为胞核着色.ki-67为细胞核蛋白,细胞核呈黄色或棕黄色为阳性.ki-67增殖指数为ki-67阳性肿瘤细胞占每个显微镜视野下全部肿瘤细胞的比例.以临床病理常用临界值1%作为样本阳性统计标准.

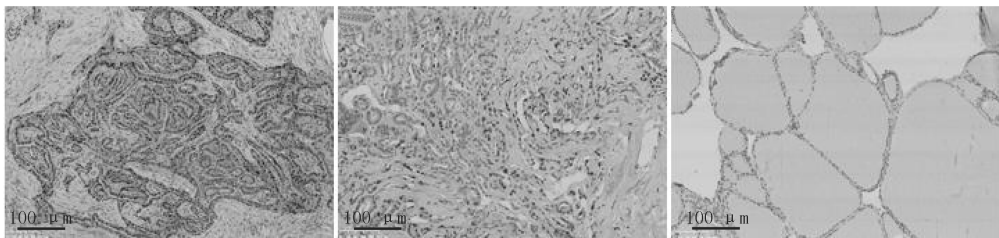
1.3 统计分析

采用SPSS17.0软件进行统计学分析,采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 Cyclin D1在各组样本中的表达

Cyclin D1在侵袭组中呈弥漫性强阳性表达(图1(a)),Cyclin D1阳性率为100%(40/40);在非侵袭组中呈中阳性表达(图1(b)),阳性率约为53.3%(16/30);而在对照组中少有表达(图1(c)),阳性率为15%(3/20).Cyclin D1在侵袭组与非侵袭组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),侵袭组与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),非侵袭组与对照组比较差异无统计学意义($P = 0.082$)(表1).



(a) 侵袭性分化型甲状腺癌

(b) 非侵袭性分化型甲状腺癌

(c) 结节性甲状腺肿

图1 Cyclin D1在各组样本中的表达

Fig.1 Expression of Cyclin D1 in different groups

2.2 Galectin-3在各组样本中的表达

Galectin-3在侵袭组中呈中阳性表达(图2(a)),阳性率为37.5%(15/40);Galectin-3在非侵袭组中呈弥漫性强阳性表达(图2(b)),阳性率为100%(30/30);Galectin-3在对照组中无表达(图2(c)),阳性率为0%(0/20).Galectin-3在侵袭组与非侵袭组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),侵袭组与对照组比较差异有统计学意义($P = 0.022$),非侵袭组与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)(表2).

2.3 ki-67在各组样本中的表达

在侵袭组(图3(a))中ki-67增殖指数大于1%病例数为20例,占侵袭组比例50%,在非侵袭组(图3

(b))中 ki-67 增殖指数大于 1% 病例数为仅为 4 例,仅占非侵袭组比例 13.3%。而在对照组中无 ki-67 增殖指数大于 1% 病例(图 3(c))。侵袭组同非侵袭组间差异有统计学意义($P < 0.01$)。

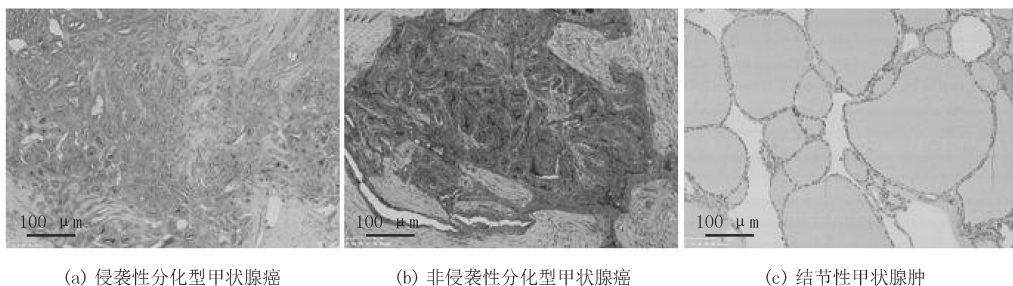


图 2 Galectin-3 在各组样本中的表达

Fig.2 Expression of Galectin-3 in different groups

表 1 Cyclin D1 表达与分组的关系

Tab.1 Analysis of Cyclin D1 in different groups

分组	χ^2	P
侵袭组与非侵袭组	23.333	0.000
侵袭组与对照组	38.095	0.000
非侵袭组与对照组	3.367	0.082

表 2 Galectin-3 表达与分组的关系

Tab.2 Analysis of Galectin-3 in different groups

分组	χ^2	P
侵袭组与非侵袭组	29.167	0.000
侵袭组与对照组	5.537	0.022
非侵袭组与对照组	40.000	0.000

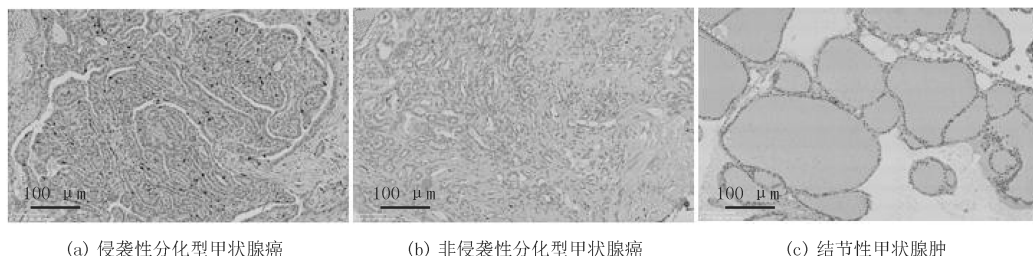


图 3 ki-67 在各组样本中的表达

Fig.3 Expression of ki-67 in different groups

3 讨 论

侵袭性分化型甲状腺癌的治疗策略不同于大多数的 DTC。提高术前诊断的准确性是提高侵袭性分化型甲状腺癌患者预后的关键。超声、增强 CT 或增强 MRI 等影像学手段受其空间分辨率的限制而提供的临床帮助有限,国外指南推荐的细针穿刺细胞或组织的 BRAF, RAS, RET/PTC 和 PAX8/PPAR γ 基因突变检测虽然具有有较高的特异性及阳性预测值,但其灵敏度及阴性预测值均较低并且联合检测费用高,实用性差^[7]。探寻更有效的术前评估手段从大多数预后较好的甲状腺癌中分辨出具有独特临床生物学行为的侵袭性亚型,有利于提高术前评估的准确性,更有助于提高 IWDTC 患者预后。通过分析侵袭性分化型甲状腺癌的免疫组化特点,希望找出相应的分子标志物,为术前准确评估提供更加有力的临床支持。

研究发现,Cyclin D1 在结节性甲状腺肿中表达比例偏低,在分化型甲状腺癌中表达比例明显高于结节性甲状腺肿,在侵袭性分化型甲状腺癌组的阳性率(100%)高于非侵袭组(53.3%),差异存在统计学意义,说明 Cyclin D1 蛋白与分化型甲状腺癌的发生有关,其表达比例与肿瘤恶性度成正比。ZHANG 等^[8] 研究发现 Cyclin D1 蛋白在甲状腺乳头状癌中表达明显高于结节性甲状腺肿和良性结节,虽然 Cyclin D1 蛋白表达与肿瘤大小无相关性,但是在转移淋巴结中表达明显高于原发灶,通过研究发现甲状腺癌细胞可能通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路导致 Cyclin D1 高表达从而促进甲状腺乳头状癌的淋巴结转移。TESHIMA 等^[9] 分析 102 例甲状腺肿瘤患者的临床病理特征,发现 Cyclin D1 高表达与肿瘤包膜外侵犯和淋巴结转移呈正相关,认为 Cyclin D1 可以作为甲状腺癌危险度评估的指标之一,Cyclin D1 的过表达提示乳头状甲状腺癌患

者高复发风险和不良预后.Cyclin D1是由定位于染色体11q13区的CCND1基因编码的蛋白质,是细胞周期素(Cyclins)家族的重要成员.细胞周期素在正常细胞周期调控和细胞癌变调控过程中发挥着重要作用.Cyclin D1是目前研究最多的亚型,主要在上皮细胞和间充质细胞中表达的.Cyclin D1与Rb蛋白产物结合,促进Rb的磷酸化,磷酸化的Rb释放出转录因子E2F,启动S期相关基因转录,促进细胞的分裂与转化.研究证实cyclinD-Rb-E2F通路的失控调节是人类多种肿瘤形成的核心,由于Cyclin D1基因扩增、染色体易位、转录增加等原因导致Cyclin D1过表达,使其降低对上游蛋白有丝分裂原的依赖,从而促进肿瘤细胞增殖^[10].本研究结果发现Cyclin D1在侵袭组中表达明显高于非侵袭组,说明Cyclin D1的过表达可能与分化型甲状腺癌的局部侵袭相关.

Galectin-3是半乳糖凝集素(Galectin)家族中的一员,广泛分布于在人体的上皮细胞和腺体的导管细胞.参与细胞间黏附、生长调节、细胞凋亡等许多重要生理活动,与肿瘤细胞的凋亡、黏附、侵袭和血管形成也密切相关.1995年XU等首次报道Galectin-3在甲状腺乳头状癌中强表达,在甲状腺良性肿瘤中不表达^[11].此后,国内外相继有大量研究证实了这一观点^[12].BARTOLAZZI等^[13]对多中心1099例甲状腺标本进行了回顾性研究,结果显示Galectin-3在97%的良性肿瘤中不表达,在3%的良性腺瘤中低表达,而Galectin-3在97%乳头状癌中高表达.由于Galectin-3在甲状腺癌中高表达而在正常甲状腺组织及腺瘤组织中不表达或低表达的特性,目前认为Galectin-3是诊断分化型甲状腺癌最准确的分子标记物之一,可用来提高甲状腺癌细针穿刺细胞学活检(fine needle aspiration biopsy, FNAB)的诊断正确率^[14].研究发现Galectin-3在甲状腺微小乳头状癌表达率高达100%,与既往的研究结果相一致.然而在侵袭性分化型甲状腺癌组, Galectin-3表达率降为37.5%,与非侵袭组相比有统计学差异.WEINBERGER等^[15]报道Galectin-3在PTC和甲状腺滤泡状癌中均高度表达,在甲状腺未分化癌中不表达,并且Galectin-3表达同临床分期具有相关性,早期甲状腺癌Galectin-3表达率为74%,而局部晚期患者表达率降为17%,认为Galectin-3在局部晚期甲状腺癌中低表达可能跟肿瘤去分化相关.有文献报道,在乳腺癌,皮肤鳞癌和前列腺癌等其他类型肿瘤中,转移性癌中Galectin-3表达低于非转移癌^[16].本研究发现Galectin-3在侵袭组中表达明显低于非侵袭组,提示Galectin-3的表达下调可能与分化型甲状腺癌局部侵袭性增强有关.

ki-67是增殖细胞表达的核抗原,反映细胞增殖活性,其表达量随细胞周期不同而变化.ki-67在G0期不表达,G1期和S早期低表达,M期达到高峰,分裂后期表达锐减.ki-67检测简单,重复性好,临床常以此来判断肿瘤的恶性程度和侵袭能力,是目前应用最广泛的评价肿瘤细胞增殖状态的生物学指标,但在甲状腺癌的诊断中报道较少.Tang等^[17]分析571例分化型甲状腺癌患者的临床病理资料,利用ROC曲线得出ki-67临界值为2.5%,ki-67阳性率大于2.5%的分化型甲状腺癌患者具有较晚的肿瘤分期和较高的局部复发率,但是曲线下面积仅为0.636,提示ki-67的诊断敏感性和特异性均较低,无法作为独立的预后指标.研究发现ki-67在甲状腺癌中表达率普遍偏低,非侵袭组中仅有13.3%(4/30)的病例ki-67阳性指数大于1%,而在侵袭组中50%(20/40)的病例ki-67阳性指数大于1%,存在统计学差异,提示ki-67表达与甲状腺癌的侵袭转移行为相关,但是具体的临界值界定需要大样本的临床病例进一步分析.

综上所述,本研究发现侵袭性分化型甲状腺癌中Cyclin D1和ki-67呈现表达比例增高,Galectin-3呈现表达比例降低.一方面提示Cyclin D1,Galectin-3和ki-67可作为甲状腺癌局部侵犯的分子标志物,对临床早期诊断侵袭性分化型甲状腺癌提供帮助;另一方面为寻找侵袭性分化型甲状腺癌生物学特性提供线索,为进一步研究分化型甲状腺癌的侵袭机制提供了有力的帮助.

参 考 文 献

- [1] CABANILLAS M E, MCFADDEN D G, DURANTE C. Thyroid cancer[J]. Lancet, 2016, 388(10061): 2783-2795.
- [2] KIM J W, ROH J L, GONG G, et al. Treatment outcomes and risk factors for recurrence after definitive surgery of locally invasive well-differentiated papillary thyroid carcinoma[J]. Thyroid, 2016, 26(2): 262-270.
- [3] DE ROSE F, BRAEUER M, BRAESCH-ANDERSEN S, et al. Galectin-3 targeting in thyroid orthotopic tumors opens new ways to characterize thyroid cancer[J]. J Nucl Med, 2019, 60(6): 770-776.
- [4] DAKENG S, DUANGMANO S, JIRATCHARIYAKUL W, et al. Inhibition of Wnt signaling by cucurbitacin B in breast cancer cells: reduction of Wnt-associated proteins and reduced translocation of galectin-3-mediated β -catenin to the nucleus[J]. J Cell Biochem, 2012, 113

- (1):49-60.
- [5] CALDARELLA A, CROCETTI E, PACI E. Ki67 in breast cancer: a useful prognostic marker[J]. *Ann Oncol*, 2014, 25(2):542-546.
- [6] TUTTLE R M, HAUGEN B, PERRIER N D. Updated American Joint Committee on Cancer/tumor-node-metastasis staging system for differentiated and anaplastic thyroid cancer (Eighth edition): what changed and why? [J]. *Thyroid*, 2017, 27(6):751-756.
- [7] 房居高, 杨帆. 甲状腺微小乳头状癌侵袭性的评估[J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2018, 25(8):403-405.
FANG J G, YANG F. The assesment of papillary thyroid microcarcinoma's aggressiveness. [J] *Chinese Archives of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 2018, 25(8):403-405.
- [8] ZHANG J, GILL A J, ISSACA J D, et al. The Wnt/ β -catenin pathway drives increased cyclin D1 levels in lymph node metastasis in papillary thyroid cancer[J]. *Hum Pathol*, 2012, 43(7):1044-1050.
- [9] TOSHIBA M, TOKITA K, RYO E, et al. Clinical impact of a cytological screening system using cyclin D1 immunostaining and genomic analysis for the diagnosis of thyroid nodules[J]. *BMC cancer*, 2019, 19(1):245-254.
- [10] GALBRAITH M D, BENDER H, ESPINOSA J M. Therapeutic targeting of transcriptional cyclin-dependent kinases[J]. *Transcription*, 2019, 10(2):118-136.
- [11] TANG W, HUANG C, TANG C. Galectin-3 may serve as a potential marker for diagnosis and prognosis in papillary thyroid carcinoma: a meta-analysis[J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 2(9):455-460.
- [12] WANG Q, SHEN Y, YE B, et al. Gene expression differences between thyroid carcinoma, thyroid adenoma and normal thyroid tissue[J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(6):3359-3369.
- [13] BARTOLAZZI A, SCIACCHITANO S, DALESSANDRIA C. Galectin-3: the impact on the clinical management of patients with thyroid nodules and future perspectives[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2):445-458.
- [14] TRIMBOLI P, VIRILI C, ROMANELLI F, et al. Galectin-3 performance in histologic a cytologic assessment of thyroid nodules: a systematic review and meta-analysis[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(8):1756-1767.
- [15] WEINBERGER P M, ADAM B L, GOURIN C G, et al. Association of nuclear, cytoplasmic expression of galectin-3 with beta-catenin/Wnt-pathway activation in thyroid carcinoma[J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2007, 133(5):503-510.
- [16] THIJSEN V L, HEUSSCHEN R, CAERS J, et al. Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1855(2):235-247.
- [17] TANG J, GUI C, QIU S, et al. The clinicopathological significance of Ki67 in papillary thyroid carcinoma: a suitable indicator[J]. *World J Surg Oncol*, 2018, 16(1):100-107.

Expression of Cyclin D1, Galectin-3 and ki-67 in differentiated thyroid cancer and its relation with invasion

He Shizhi^{1a}, Fang Jugao^{1a}, Chen Jiaming^{1a}, Liu Bo², Zhuang Huan^{1a}, Shen Xixi^{1a}, Lian Meng^{1a},
Ma Hongzhi^{1a}, Hou Lizhen^{1a}, Zhang Xue^{1b}, He Xiaojin^{1b}, Zhong Qi^{1a}

(1a. Department of Otolaryngology Head Neck Surgery; b. Department of Pathology, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100730, China; 2. Department of Thyroid Surgery, The First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression of Cyclin D1, Galectin-3 and ki-67 in differentiated thyroid cancer and its relation with invasion. [Methods] 40 patients of invasive well-differentiated thyroid cancer (invasion group), 30 patients of papillary thyroid micro-carcinoma (no-invasion group) and 20 patients of nodular goiter (control group) were recruited and studied. The expression of Cyclin D1, Galectin-3 and ki-67 were detected and analysed with immunohistochemistry methods. [Results] The result of immunohistochemistry staining displayed that the positive rate of Cyclin D1 were 100% (40/40), 53.3% (16/30) and 15% (3/20) in invasion group, no-invasion group and control group. The positive rate of Galectin-3 were 37.5% (15/40), 100% (30/30) and 0% (0/20) in invasion group, no-invasion group and control group. Ki-67 index of 50% (20/40) patients in invasion group were more than 1%, only 13.3% (4/30) patients in no-invasion group were more than 1%. It was confirmed with immunohistochemistry methods that Cyclin D1 and ki-67 positive rate of invasion group was obviously higher than that of no-invasion group and control group ($P < 0.01$), Galectin-3 positive rate of invasion group was obviously lower than that of no-invasion group ($P < 0.01$). [Conclusion] There are significantly differences in expressions of between invasive and non-invasive differentiated thyroid cancer. High expression of Cyclin D1 and ki-67, low expression of Galectin-3 were risk factors influencing extra-thyroidal invasion of differentiated thyroid cancer.

Keywords: differentiated thyroid carcinoma; invasion; Cyclin D1; Galectin-3; ki-67

[责任编辑 杨浦 王凤产]