

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201706013

· 短篇论著 ·

HIF-1 α 、ER α 和 MMP-9 在甲状腺乳头状癌中的表达及临床意义

田 薇¹, 薛 刚¹, 吉建敏¹, 魏 洁¹, 吴靖芳²

(河北北方学院附属第一医院 1. 耳鼻咽喉头颈外科; 2. 形态学实验室, 河北 张家口 075000)

摘要: **目的** 探讨乏氧因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)、雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER α)与基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinases-9, MMP-9)在甲状腺乳头状癌中的表达及与临床因素的关系。**方法** 采用免疫组化技术对 88 例乳头状癌及癌旁组织中 HIF-1 α 、ER α 和 MMP-9 的表达情况进行检测,分析三者与临床参数的关系。**结果** 甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)组织中 HIF-1 α 、ER α 和 MMP-9 三者阳性率(70.45%、62.5%和 84.1%)均高于癌旁组织($P < 0.01$);PTC 组织中 HIF-1 α 、ER α 和 MMP-9 阳性率与淋巴结转移和临床分期有关。在淋巴结转移组和临床 III ~ IV 期病例 3 者阳性率均高于无淋巴结转移组和临床 I ~ II 期病例($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);ER α 阳性率在直径 > 2 cm 的病例高于直径 ≤ 2 cm 者($P < 0.05$);HIF-1 α 与 ER α 、HIF-1 α 与 MMP-9 阳性率呈正相关(均为 $P < 0.01$);ER α 阳性率与 MMP-9 也呈正相关($P < 0.01$)。**结论** 甲状腺乳头状癌中 HIF-1 α 、ER α 高表达可能通过 MMP-9 参与 PTC 的临床进程。

关键词: 乏氧因子-1 α ; 雌激素受体 α ; 基质金属蛋白酶 9; 甲状腺乳头状癌; 免疫组化

中图分类号: R736.1

文献标识码: A

[中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2017, 23(6): 559-562]

Expressions and clinical significances of HIF-1 α , ER α and MMP-9 in papillary thyroid carcinoma

TIAN Wei¹, XUE Gang¹, JI Jian-min¹, WEI Jie¹, WU Jing-fang²

(1. Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China; 2. Morphological Laboratory, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

Abstract: **Objective** To explore the expressions and clinical significances of hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1 α), estrogen receptor alpha (ER α) and matrix metalloproteinases-9 (MMP-9) in papillary thyroid carcinoma (PTC). **Methods** The expressions of above-mentioned factors in specimens of PTC and para-carcinoma thyroid tissues from 88 PTC patients were detected by immunohistochemical method (IHC). And the relationships among clinical parameters and their expressions were analyzed. **Results** The positive rates of HIF-1 α , ER α and MMP-9 proteins in PTC were 70.45%, 62.5% and 84.1% respectively, which were higher than those of the para-carcinoma tissues (all $P < 0.01$). And their positive rates in the specimens with lymph node metastasis or at clinical stage III ~ IV were higher than those without lymph node metastasis or at clinical stage I ~ II ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), which indicated that their positive rates were related to the lymph node metastasis and clinical stage of PTC. The positive rate of ER α in specimens with diameter more than 2 cm was higher than that in those with diameter equal to or less than 2 cm ($P < 0.05$). Their positive rates were positively correlated with each other (all $P < 0.01$). **Conclusion** Enhanced expressions of HIF-1 α and ER α may participate in the clinical course of PTC via the high expression of MMP-9.

Key words: Hypoxia inducible factor-1 alpha; Estrogen receptor alpha; Matrix metalloproteinases-9; Papillary thyroid carcinoma; Immunohistochemistry

[Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery, 2017, 23(6): 559-562]

基金项目: 张家口市科技攻关计划(1411043H, 1611055H)。
作者简介: 田薇, 女, 护士; 薛刚, 男, 主任医师; 田薇与薛刚对本文有同等贡献, 为并列第一作者。
通信作者: 吴靖芳, Email: wjfxg@163.com

甲状腺癌占内分泌肿瘤的 95% 左右, 是常见的内分泌系统恶性肿瘤。其中乳头状癌是最常见的病理类型, 占甲状腺癌的 80% 左右。淋巴结转移是影

响 PTC 患者预后的主要因素,中央区淋巴结转移高达 88.6%,且常伴有胸锁乳突肌与胸骨舌骨肌淋巴结转移^[1]。Jeon 等^[2]对 8808 例微小癌临床病理特征与预后分析发现转移淋巴结的病理检查有助于评价微小癌的风险。近年来甲状腺癌发病率增长迅速,尤其女性患者绝经前和青春期后为发病高峰。发病率是男性的 4 倍以上。提示雌性激素可能是影响甲状腺癌生长和进展的关键因素^[3-4]。雌激素主要通过雌激素受体(estrogen receptor, ER)途径发挥作用。ER 是雌激素依赖性核转录因子,有 ER α 和 ER β 两个亚型。流行病学研究表明,雌激素水平或雌激素相关分子增加对甲状腺癌的发展起着作用。ER α 刺激乳头状癌细胞增殖,而 ER β 与细胞凋亡有关^[5];ER β 低表达与甲状腺癌的不良预后有关^[6]。肿瘤细胞快速增殖使肿瘤组织内部形成相对缺氧区域,乏氧因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 alpha, HIF-1 α)是细胞在缺氧条件下产生的一种核转录因子,其活性在维持肿瘤细胞的能量代谢、新生血管形成,以及促进肿瘤增殖和转移中起重要作用。HIF-1 α 与乳腺癌的侵袭表型,如肿瘤大小、淋巴结转移有关^[7]。子宫内膜癌中 HIF-1 α 高表达也与 ER α 阳性有关^[8]。而甲状腺乳头状癌中 HIF-1 α 和 ER α 的关系未见报道。

1 材料方法

1.1 临床资料

对 2013 年 1 月~2015 年 12 月就诊于河北北方学院附属第一医院耳鼻咽喉头颈外科,并手术治疗的甲状腺癌患者,根据 2010 年 AJCC 肿瘤分期标准:选取甲状腺乳头状癌及癌旁组织各 88 例,男 18 例,女 70 例;年龄 23~75 岁,平均年龄(46.13 \pm 16.02)岁。临床 I~II 期 31 例,III~IV 期 57 例;有淋巴结转移患者 43 例,无淋巴结转移患者 45 例。所有患者术前均未行放疗或化疗等相关治疗。以上组织部分制作石蜡切片行免疫组化染色,以上病例切片均由两位病理教授确诊。

1.2 实验材料

兔 HIF- α 、ER α 和 MMP-9 多克隆抗体购于美国 Santa Cruz 生物技术公司,Streptavidin-HRP 试剂盒(康为世纪)的兔浓缩型 DAB 试剂盒购于中杉金桥试剂显色。

1.3 免疫组化方法

石蜡切片常规脱蜡至水,0.01 mol/L 的 PBS 洗

涤 3 min \times 3 次,pH 6.0 的枸橼酸缓冲液修复抗原,3%的 H₂O₂ 封闭 20 min 以消除内源性过氧化物酶滴加一抗(兔 HIF- α 、ER α 、MMP-9)工作浓度 1:100。4 $^{\circ}$ C 过夜,PBS 洗 3 min \times 3 次,滴加二抗(羊抗兔 IgG)37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,0.01 mol/L 的 PBS 洗涤 3 min \times 3 次,滴加三抗(辣根酶标记链霉卵白素)37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,PBS 洗 3 min \times 3 次,DAB 显色,苏木精复染,脱水,中性树胶封片。在光学显微镜下观察 HIF- α 、ER α 、MMP-9 在甲状腺乳头状癌及癌旁组织中的表达。

1.4 免疫组化结果判断

切片以 200 倍拍照,以细胞质或核内出现棕色颗粒为阳性染色细胞。染色结果判定标准参照向元梯等^[9]的方法,按着色强弱和阳性细胞率计分:①无着色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,黄褐色为 3 分;②阳性范围:阳性细胞 <5% 得 0 分,5%~25% 得 1 分,26%~50% 得 2 分,>50% 得 3 分。两者之和为该患者组织评分值, ≤ 2 分为阴性病例(-),3~4 分为阳性(+)病例,5~6 分为强阳性(++)病例。各组阳性病例(+~++)与总病例之比即该指标的表达阳性率。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 18.0 进行统计学分析,等级资料采用 Fisher's 精确检验以及 Speannan 等级相关分析。检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HIF-1 α 、ER α 和 MMP-9 在 PTC 组织及癌旁组织中的表达情况

PTC 组织中 HIF-1 α 、ER α 和 MMP-9 三者免疫阳性信号为棕黄色颗粒,位于胞浆或胞核。HIF-1 α 为核、浆阳性,阳性率 70.45% (62/88);ER α 和 MMP-9 为胞浆阳性;阳性率分别为 62.5% (55/88) 和 84.1% (72/88)。PTC 中 HIF-1 α 、ER α 和 MMP-9 阳性率明显高于癌旁组织($P < 0.01$),见表 1。

2.2 HIF-1 α 、ER α 和 MMP-9 与 PTC 临床病理特征的关系

PTC 组织中 HIF-1 α 、ER α 和 MMP-9 阳性率与淋巴结转移和临床分期有关。在淋巴结转移组和临床 III~IV 期病例三者阳性率均高于无淋巴结转移组和临床 I~II 期病例($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);除 ER α 阳性率在直径 >2 cm 的病例高于 ≤ 2 cm 外($P < 0.05$),三者与性别年龄和肿瘤直径无关,见表 2。

表 1 HIF-1 α 、ER α 和 MMP-9 在 PTC 与癌旁组织中的表达 (例)

参数	例数	HIF-1 α				ER α				MMP-9									
		+	~	++	-	χ^2	P	+	~	++	-	χ^2	P						
PTC	88	62			26	68.17	0.000	55			33	56.04	0.000	72			16	115.30	0.000
癌旁	88	8			80			9			79			5			83		

表 2 HIF-1 α 、ER α 和 MMP-9 与 PTC 临床病理参数的关系 (例)

参数	例数	HIF-1 α			ER α			MMP-9											
		+	~	++	χ^2	P	+	~	++	χ^2	P								
性别																			
男	18	10			2.413	0.15	9			1.509	0.277	12			3.492	0.086			
女	70	52					46					60							
年龄(岁)																			
<45	57	39			0.321	0.632	36			0.030	1.00	49			1.87	0.247			
\geq 45	31	23					19					23							
直径(cm)																			
\leq 2	29	19			0.507	0.620	13			5.764	0.02	21			2.572	0.143			
>2	59	43					42					51							
临床分期																			
I、II	31	17			5.607	0.027	14			6.139	0.021	20			7.919	0.003			
III、IV	57	45					41					52							

2.3 PTC 中 HIF-1 α 、ER α 与 MMP-9 的相关性分析

88 例 PTC 标本中, HIF-1 α 与 ER α 同时阳性 43 例, 同时阴性 18 例; HIF-1 α 和 MMP-9 同时阳性 60 例; 同时阴性 14 例, 见表 3。ER α 和 MMP-9 同时阳性 44 例; 同时阴性 14 例。Speannan 相关分析显示 HIF-1 α 和 ER α ($r = 0.5744, P = 0.001$)、HIF-1 α 和 MMP-9 ($r = 0.7739, P = 0.000$) 以及 ER α 和 MMP-9 ($r = 0.6123, P = 0.000$) 均呈正相关。

表 3 PTC 中 HIF-1 α 与 ER α 、MMP-9 的相关性 (例)

HIF-1 α	例数	ER α		MMP-9	
		阴性	阳性	阴性	阳性
阴性	26	18	12	14	12
阳性	62	15	43	2	60

3 讨论

缺氧是人类实体瘤常见的特征, 癌细胞适应缺氧微环境是癌症进展的关键步骤。HIF-1 α 和 DNA 结合蛋白是该过程的始动调节者之一^[10]。是参与肿瘤形成、进展和化疗抵抗常见的核转录因子, 上调几百种基因如缺氧、分化、再编程、胞外基质消化、迁移、侵袭、粘附等^[11]。Liu 等^[12] 研究表明 PTC 中 HIF-1 α 和 HIF-2 α 在 mRNA 和蛋白水平明显高于癌旁组织, 且与淋巴结转移和临床分期密切相关。本研究 HIF-1 α 也呈现相似的结果, 其阳性率为

70.45%, 与淋巴结转移和临床分期密切相关, 与 Liu 的免疫组化结果(HIF-1 α 阳性率为 73%) 相似。相关分析显示了 HIF-1 α 与 MMP-9 的正相关。研究数据表明姜黄素对缺氧有保护效果, Tan 等^[13] 发现姜黄素能有效抑制低氧诱导的甲状腺乳头状癌 K1 活性氧(ROS) 上调, 并降低 K1 细胞 HIF-1 α mRNA 和蛋白表达水平, 抑制 MMP-9 酶活性和降低 K1 细胞在缺氧条件下迁移能力。可见, HIF-1 α 在 PTC 中促淋巴结转移和不良进展部分通过上调 MMP-9 实现。

女性甲状腺癌患者发病率明显高于男性, 提示雌激素代谢所产生的氧化应激作用可导致甲状腺癌发生。Liu 等^[14] 报道联合检测血清性激素水平和相应受体在鉴别诊断和评估各种类型的甲状腺肿瘤的分化程度中有指导意义。本研究显示 PTC 中 ER α 阳性率 62.5%, 且与淋巴结转移和临床分期有关、直径 > 2 cm 的 PTC 也显示了较高的阳性率。Tafari 等^[15] 体外研究显示雌二醇促进甲状腺癌细胞增殖, 且该作用与 ER- α 正相关, 并通过 ERK1/2 上调 Bcl-2, 下调 Bax 实现。Magri 等^[16] 研究显示甲状腺癌组织 ER α 高表达, 而 ER β 几乎不表达; ER α 在通过活化 VEGF、MMP2、MMP9、 β -catenin 基因转录在甲状腺癌进程过程起了关键作用。笔者文中 ER α 阳性率的 MMP-9 呈正相关。Sumida 等^[17] 研究发现 ER α 阴性颌下腺癌 HSG 细胞, 增强 ER α 表达后, 雌激素通过上皮间质化及上调 MMP-2, MMP-9 表达促进 HSG 细胞侵袭。可见, 雌激素与 ER- α 结合可能通

过活化 MMP-9 导致 PTC 淋巴结转移和临床进展加快。

实验中还发现 HIF-1 α 和 ER α 呈正相关。近年研究发现 ER α 通过 HIF-1 α 加快乳腺癌进程。Yang 等^[7]研究表明乳腺癌 MCF-7 细胞 HIF-1 α 基因携带一个 ER 反应原件,雌激素通过 ER α 信号途径直接调节 HIF-1 α 转录。Wolff 等^[18]研究表明缺氧可以抑制 ER + 乳腺癌细胞 ER α 表达,敲低 HIF-1 α 表达水平也可抑制 ER α 表达。ER α 阳性乳腺癌与 HIF-1 α 协同促进乳腺癌进程,研究表明 ER α 和 HIF-1 α 共同调节组蛋白去甲基化酶 JMJD2B,促进乳腺癌细胞在乏氧和常氧情况下增殖^[19]。Tafani 等^[15]也证实通过 HIF-1 α 和 ER- α 交互作用,促进甲状腺癌增殖和侵袭表型。但王雪芹等^[20]研究显示子宫内膜样腺癌组织 HIF-1 α 与 ER α 呈负相关。

可见,甲状腺乳头状癌中 HIF-1 α 和 ER α 起了关键作用。二者相互作用通过下游基因如 MMP-9 促进 PTC 的进程,具体作用机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] 张海林,陈杰,黄文孝,等. 乳头状甲状腺癌胸锁乳突肌与胸骨舌骨肌之间淋巴结转移的临床特征分析[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2014,20(4): 301-304.

[2] Jeon MJ, Kim WG, Choi YM, et al. Features predictive of distant metastasis in papillary thyroid microcarcinomas [J]. *Thyroid*, 2016, 26(1): 161-168.

[3] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016,66(2):115-332.

[4] Raposo L, Morais S, Oliveira MJ, et al. Trends in thyroid cancer incidence and mortality in Portugal[J]. *Eur J Cancer Prev*, 2017, 26(2):135-143.

[5] Kavanagh DO, McLroy M, Myers E, et al. The role of oestrogen receptor α in human thyroid cancer: contributions from co-regulatory proteins and the tyrosine kinase receptor HER2[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2010, 17(1): 255-264.

[6] Heikkila A, Hagstrom J, Maenpaa H, et al. Loss of estrogen receptor Beta expression in follicular thyroid carcinoma predicts poor outcome[J]. *Thyroid*, 2013, 23(4): 456-465.

[7] Yang J, Altahan A, Jones DT, et al. Estrogen receptor- α directly regulates the hypoxia-inducible factor 1 pathway associated with antiestrogen response in breast cancer[J]. *Proc Natl Acad*

Sci USA, 2015, 112(49): 15172-15177.

[8] 黄玉秀,郑秀,刘林芳. 子宫内腺癌中 HIF-1 α 的表达及与 ER α 的关系[J]. 山西医科大学学报, 2007, 38(12):1115-1118.

[9] 向元佛,张碧波,吴娟,等. 鼻咽癌组织中乏氧诱导因子-1 α 和血管内皮生长因子的表达及其临床意义[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2016,22(4): 279-283.

[10] Sadri N, Zhang PJ. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression; prognostic and therapeutic targets in soft tissue sarcomas[J]. *Cancers (Basel)*, 2013, 5(2): 320-333.

[11] Hu H, Takano N, Xiang L, et al. Hypoxia-inducible factors enhance glutamate signaling in cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(19): 8853-8868.

[12] Liu YM, Ying SP, Huang YR, et al. Expression of HIF-1 α and HIF-2 α correlates to biological and clinical significance in papillary thyroid carcinoma [J]. *World J Surg Oncol*, 2016, 14(1): 30.

[13] Tan C, Zhang L, Cheng X, et al. Curcumin inhibits hypoxia-induced migration in K1 papillary thyroid cancer cells[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2015, 240(7): 925-935.

[14] Liu J, Chen G, Meng XY, et al. Serum levels of sex hormones and expression of their receptors in thyroid tissue in female patients with various types of thyroid neoplasms [J]. *Pathol Res Pract*, 2014, 210(12): 830-835.

[15] Tafani M, De Santis E, Coppola L, et al. Bridging hypoxia, inflammation and estrogen receptors in thyroid cancer progression [J]. *Biomed Pharmacother*, 2014, 68(1): 1-5.

[16] Magri F, Capelli V, Gaiti M, et al. ER- α and ER- β expression in differentiated thyroid cancer: relation with tumor phenotype across the TNM staging and peri-tumor inflammation [J]. *Endocrine*, 2015, 49(2): 429-435.

[17] Sumida T, Ishikawa A, Mori Y. Stimulation of the estrogen axis induces epithelial-mesenchymal transition in human salivary cancer cells [J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2016, 13(4): 305-310.

[18] Wolff M, Kosyna FK, Dunst J, et al. Impact of hypoxia inducible factors on estrogen receptor expression in breast cancer cells [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2017, 613(1): 23-30.

[19] Yang J, Jubb AM, Pike L, et al. The histone demethylase JMJD2B is regulated by estrogen receptor α and hypoxia, and is a key mediator of estrogen induced growth [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(16): 6456-6466.

[20] 王雪芹,王言奎,盛文旭,等. 子宫内膜样腺癌组织 HIF-1 α 和 VEGF 及 ER α 的表达 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010,17(7): 517-520.

(收稿日期:2017-03-12)