

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202626025

· 论 著 ·

TGFB1-TGF- β /Smad 信号在甲状腺乳头状癌 侵袭相关表型中的表达特征

刘华盛¹, 葛平江¹, 傅向军², 彭树文³, 黄杰波³, 王俊文³, 张芳³, 周熠星³, 欧维健³

(1. 南方医科大学附属广东省人民医院 广东省医学科学院 耳鼻咽喉头颈外科, 广东 广州 510080; 2. 广东省第二人民医院 耳鼻咽喉头颈外科, 广东 广州 510317; 3. 广州市番禺区中医院 耳鼻咽喉头颈外科, 广东 广州 511400)

摘 要: **目的** 探讨 TGFB1-TGF- β /Smad 信号在甲状腺乳头状癌(PTC)中的表达特征。**方法** 收集 31 例 PTC 患者的癌组织及配对癌旁组织,采用实时荧光定量 PCR(qPCR)检测 TGFB1 mRNA 表达水平,采用 Western blot 分析 TGF- β 1 蛋白整体表达情况,并通过免疫组化结合 QuPath 软件对 TGF- β 1 及其下游分子 p-Smad2/3 的组织定位及表达强度进行定量分析。根据术后病理结果进行腺外侵犯(ETE)及淋巴结转移(LNM)分层,并在癌组织-癌旁组织配对基础上分别进行分层内配对比较及分层间组间比较。**结果** qPCR 结果显示,TGFB1 mRNA 在 PTC 肿瘤组织中的表达显著高于配对癌旁组织($P < 0.05$),该差异在 ETE 及 LNM 各分层内均可重复,但分层组间(No-ETE vs. ETE 和 N0 vs. N1)比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。Western blot 结果显示,TGF- β 1 蛋白整体表达水平在癌与癌旁组织间差异无统计学意义($P > 0.05$),提示其蛋白表达与 mRNA 水平存在不一致性。免疫组化结果显示,TGF- β 1 主要定位于癌组织细胞胞浆,其表达水平在癌组织中显著高于癌旁组织($P < 0.05$),在 ETE 及 LNM 各分层内均呈相似趋势。p-Smad2/3 在癌组织中呈明显核定位增强,提示 TGF- β /Smad 信号通路在肿瘤层面处于激活状态。进一步分层分析发现,p-Smad2/3 核定位增强现象在 No-ETE 分层中表现更明显,在 N0 分层中亦呈相似趋势,而在 ETE 及 N1 样本内,该差异趋于减弱或表现不稳定;分层组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** PTC 组织中 TGFB1 转录水平升高,TGF- β 1 表达增强,p-Smad2/3 核定位状态在不同侵袭相关分层中呈现差异性变化,提示 TGF- β /Smad 信号在 PTC 侵袭过程中可能具有阶段相关的调控特征。

关 键 词: 甲状腺乳头状癌;TGFB1;p-Smad2/3;TGF- β /Smad 信号通路;腺外侵犯;淋巴结转移

中图分类号:R739.91

Expression characteristics of TGFB1-TGF- β /Smad signaling in invasion-related phenotypes of papillary thyroid carcinoma

LIU Huasheng¹, GE Pingjiang¹, FU Xiangjun², PENG Shuwen³, HHUANG Jiebo³, WANG Junwen³,
ZHANG Fang³, ZHOU Yixing³, OU Weijian³

(1. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Guangdong Second Provincial General Hospital, Guangzhou 510317, China; 3. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Panyu Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 511400, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression characteristics of TGFB1-TGF- β /Smad signaling in papillary thyroid carcinoma (PTC). **Methods** Cancer tissues and paired adjacent non-cancerous tissues were collected from 31 patients with PTC. The expression level of TGFB1 mRNA was detected using real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR), and the overall expression of TGF- β 1 protein was evaluated by Western blot. The tissue localization and expression intensity of TGF- β 1 and its downstream molecule p-Smad2/3 were quantitatively analyzed by immunohistochemistry combined with QuPath software. Samples were stratified into extrathyroidal extension (ETE) and

基金项目:国家自然科学基金(82071028)。
第一作者简介:刘华盛,男,在读硕士研究生,主任医师。
通信作者简介:葛平江,男,博士,主任医师。

lymph node metastasis (LNM) groups according to the postoperative pathological results, and comparisons were conducted both within and between stratified groups based on the paired cancer tissue and adjacent non-cancerous tissue. **Results** The qPCR results indicated that the expression of TGF β 1 mRNA in PTC cancer tissues was significantly higher than that in the paired adjacent tissues ($P < 0.05$), and this difference was consistently observed within ETE and LNM subgroups, whereas no significant differences were found between stratified subgroups (No-ETE vs ETE and N0 vs N1) ($P > 0.05$). Western blot analysis showed no statistically significant difference in the overall expression level of TGF- β 1 protein between the cancer and adjacent tissues ($P > 0.05$), suggesting a discrepancy between the protein expression and mRNA level. The immunohistochemical results revealed that TGF- β 1 was mainly localized in the cytoplasm of cancer cells and was significantly elevated in cancer tissues compared with adjacent tissues ($P < 0.05$), with a similar trend within each of the ETE and LNM subgroups. p-Smad2/3 showed a significantly enhanced nuclear localization in cancer tissues, indicating that the TGF- β /Smad signaling pathway was activated at the tumor level. Further subgroup analysis revealed that the enhanced nuclear localization of p-Smad2/3 was more pronounced in the No-ETE subgroup and showed a similar trend in the N0 subgroup, while in the ETE and N1 subgroups, this difference tended to weaken or become unstable; there was no statistically significant difference between the subgroups ($P > 0.05$). **Conclusions** The transcriptional level of TGF β 1 in PTC tissues is elevated, and the expression of TGF- β 1 is enhanced. The nuclear localization status of p-Smad2/3 shows differential changes in different invasion-related stratifications, suggesting that the TGF- β /Smad signaling may have stage-related regulatory characteristics during the invasion process of PTC.

Keywords: Papillary thyroid carcinoma; TGF β 1; p-Smad2/3; TGF- β /Smad signaling pathway; Extrathyroidal extension; Lymph node metastasis

甲状腺乳头状癌 (papillary thyroid carcinoma, PTC) 是最常见的分化型甲状腺癌, 整体预后相对良好。然而, 一旦发生腺外侵犯 (extrathyroidal extension, ETE) 或淋巴结转移 (lymph node metastasis, LNM), 其局部复发及远期转移风险显著增加, 已成为影响患者预后评估和术后管理的重要因素^[1-2]。在临床实践中, ETE 不仅直接关系肿瘤分期和手术范围的选择, 也是决定放射性碘治疗及随访策略的重要病理依据之一^[3]。尽管 ETE 和 LNM 在 PTC 侵袭分级中具有明确的临床意义, 但其发生发展的分子机制尚未完全阐明, 亟需从分子层面进一步探索与侵袭相关的关键调控通路及潜在标志物。

上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 被认为是肿瘤细胞获得迁移和侵袭能力的重要生物学过程, 其异常激活与多种实体瘤的侵袭进展密切相关^[4-5]。转化生长因子 (transforming growth factor, TGF) 信号通路是一条由 TGF- β 超家族配体、跨膜丝氨酸/苏氨酸激酶受体及下游 Smad 等信号分子组成的细胞信号转导通路, TGF- β 1 是由 TGF β 1 基因表达出的功能性蛋白质亚型。既往研究表明, TGF- β 信号通路可通过诱导 EMT 相关转录程序, 促进肿瘤细胞浸润和转移^[6], 但该通路在 PTC 侵袭过程中的激活特征及其阶段性变化仍缺乏系统认识^[7]。本研究基于临床甲状腺乳头状癌组织样本, 分析 TGF β 1 在不同侵袭分层中的表达特征, 并结合蛋白表达及组织定位结果, 探讨其在 PTC

侵袭过程中的潜在作用, 为 PTC 侵袭风险评估提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 临床样本来源与伦理

本研究收集 PTC 患者手术切除的癌组织及相应癌旁组织作为研究对象。所有样本均来源于广州市番禺区中医院耳鼻咽喉头颈外科, 样本采集时间为 2025 年 1 月—2025 年 6 月。共纳入 31 例经术后病理证实的 PTC 患者, 其中男 8 例, 女 23 例; 年龄 16~69 岁, 以 55 岁及以下为主 (28 例)。根据术后病理报告进行侵袭相关分层分析, 其中 ETE 阳性 13 例, 阴性 18 例; LNM 阳性 16 例 (N1), 阴性 15 例 (N0)。

由同一手术团队在保证病理诊断需要的前提下, 在手术过程中于肿瘤实质区域及距离肿瘤边缘一定范围的癌旁甲状腺组织中各取一块新鲜组织。所有癌旁组织均经术后病理证实不含肿瘤成分。本研究方案经广州市番禺区中医院医学伦理委员会审核批准 (伦理批准号: 2024117), 所有入组患者均签署书面知情同意书。研究过程严格遵循《赫尔辛基宣言》及相关伦理学规范。

1.2 RNA 提取及 TGF β 1 的 qPCR 检测

术中切取的癌组织与癌旁新鲜组织样本, 立即置于 RNA 样本保存液 (RNA Sample Preservation

Solution, Absin, ABS9268) 中低温保存, 以确保 RNA 的稳定性。使用 RNA 提取液 (Servicebio, G3013-100 mL) 提取总 RNA, 并采用 NanoDrop 2000 分光光度计检测 RNA 浓度及纯度。总 RNA 采用 HiScript III All-in-one RT SuperMix 反转录试剂盒 (Vazyme, R323-01) 进行逆转录反应, 合成 cDNA。实时荧光定量 PCR 使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (Vazyme, Q711-02) 进行扩增。本研究检测基因为 *TGFB1*, 内参基因为 *GAPDH*。所有引物均由厂家合成, 其序列及扩增片段长度如下: *TGFB1*: F-CAG-CAACAATTCCTGGCGATA, R-GCTAAGCGGAAA-GC-CCTCAAT (139 bp); *GAPDH*: F-TGCACCACCAA-CT-GCTTAG, R-GAGGCAGGGATGATGTTC (176 bp)。qPCR 结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算相对表达量, 用于后续统计分析。

1.3 TGF- β 1 的 Western blot 蛋白表达分析

使用与 qPCR 实验相同来源的癌组织与癌旁新鲜组织样本进行 TGF- β 1 蛋白水平检测。根据样本完整性, 纳入具有完整配对信息的 PTC 病例进行 Western blot 分析。组织样本在冰浴条件下加入 RIPA 裂解液充分匀浆, 并加入蛋白酶抑制剂防止蛋白降解。裂解液于 4℃ 离心后收集上清, 采用 BCA 法测定蛋白浓度并统一上样量。等量蛋白样本经 SDS-PAGE 电泳分离后转膜至 PVDF 膜。膜在室温下使用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 随后于 4℃ 条件下孵育 TGF- β 1 一抗 (Servicebio, GB111876-100, 1:5000), 内参蛋白为 β -actin (Servicebio, GB15001, 1:5000)。随后孵育相应 HRP 标记二抗并采用化学发光法显影。蛋白条带灰度值采用 ImageJ 软件进行定量分析, 计算目标蛋白与内参蛋白的比值, 并进一步计算癌组织/癌旁组织比值用于后续统计分析。

1.4 免疫组化染色及定量分析

对前述 PTC 组织切片分别采用 TGF- β 1 抗体和 p-Smad2/3 抗体进行免疫组化染色。所用一抗包括: TGF- β 1 抗体 (Boster, 货号 BA1395, 稀释比 1:200) 和 p-Smad2/3 抗体 (Boster, 货号 A00019-2, 稀释比 1:50)。所有抗体稀释比例均依据厂家说明书并结合预实验条件确定。切片经常规脱蜡、水化、抗原修复及内源性过氧化物酶封闭后, 加入相应一抗于湿盒中孵育, 随后采用 HRP 标记二抗及 DAB 显色体系进行信号可视化, 并以苏木素进行核复染。染色完成后对切片进行全景扫描, 用于后续定量分析。

免疫组化定量分析采用 QuPath 软件 (v0.6.0) 完成。首先在每张切片中确认同时包含癌组织与癌旁组织区域, 并在两类区域内随机选取多个非连续的代表性检测区域, 在保证组织结构完整并避免坏死及明显伪影的前提下进行测量。由于 TGF- β 1 为分泌型蛋白, 其免疫反应主要定位于细胞胞浆区域, 因此以胞浆 DAB 光密度作为定量指标, 分别计算癌组织与癌旁组织区域的均值和中位数值以反映整体表达水平。

1.5 统计学方法

所有统计分析均在 R 软件 (version 4.3.2) 中完成。连续变量根据数据分布特征以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示。对于 qPCR 结果, 在配对比较中进一步计算效应量 r 值以评估差异的生物学意义。Western blot 和免疫组化分析中, 首先计算目标蛋白与内参蛋白的灰度比值, 并进一步计算癌组织与癌旁组织的比值或 $\log_2(T/N)$ 值, 以反映相对表达变化。对于免疫组化定量结果, 分别计算基于均值和基于中位数的 DAB 光密度指标, 以评估不同组织区域的表达水平。肿瘤组织与对应癌旁组织之间的配对比较采用 Wilcoxon 配对秩和检验; 不同侵袭分层组间比较采用 Wilcoxon 秩和检验。所有统计检验均为双侧检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TGFB1 在 PTC 组织与癌旁组织中的 qPCR 表达特征

31 例 PTC 组织与癌旁组织的配对 qPCR 数据分析显示, *TGFB1* 在癌组织中的 mRNA 表达水平显著高于对应的癌旁组织。Wilcoxon 配对秩和检验结果提示该差异具有统计学意义 ($V = 487, P < 0.05$)。进一步按侵袭特征进行分层分析, 经 Wilcoxon 配对秩和检验发现, 在 ETE 阳性组 ($n = 13$) 与 ETE 阴性组 ($n = 18$) 中, *TGFB1* 在癌组织中均显著高于癌旁组织 ($V = 91, P < 0.05$)。其中, ETE 阳性组中 *TGFB1* 的上调趋势在配对样本间表现出更为一致的方向性。按 LNM 状态分层后, 在 N0 组 ($n = 15$) 和 N1 组 ($n = 16$) 中, *TGFB1* 均呈现癌组织高于癌旁组织的表达特征, 差异均具有统计学意义 ($V = 134, P < 0.05$)。见图 1。

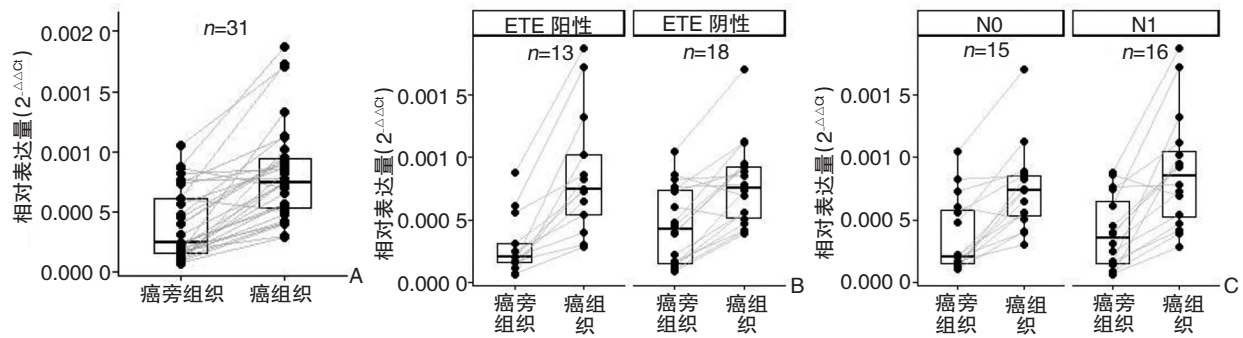


图1 TGFβ1在配对PTC样本及不同侵袭分层中的表达特征 A: TGFβ1在PTC组织与癌旁组织中的配对表达分析($P < 0.05$); B: ETE状态分层下TGFβ1在PTC组织与癌旁组织的配对表达分析($P < 0.05$); C: LNM状态分层下TGFβ1在PTC组织与癌旁组织的配对表达分析($P < 0.05$)

为评估TGFβ1是否能够区分不同侵袭分层,进一步采用Wilcoxon秩和检验对组间差异进行比较(表1)。以肿瘤端表达值(Tumor-only)为指标时,TGFβ1在ETE阳性与阴性之间的肿瘤表达差异无统计学意义($P = 0.953$),N1与N0之间差异无统计学意义($P = 0.379$)。以 $\log_2(T/N)$ 作为相对上调幅度指标时,ETE分层呈现一定差异趋势($P = 0.125$),而LNM分层未观察到明显差异($P = 0.770$)。

表1 TGFβ1在不同侵袭分层中的组间比较结果 (例)

分层因素	阳性	阴性	指标	W	r	P
ETE	13	18	肿瘤区	119	0.014	0.953
			$\log_2(T/N)$	156	0.280	0.125
LNM	16	15	肿瘤区	97	-0.163	0.379
			$\log_2(T/N)$	112	-0.057	0.770

注:TGF(转化因子);ETE(腺外侵犯);LNM(淋巴结转移)。下同。

2.2 TGF-β1在PTC组织中的Western blot蛋白表达特征

为从蛋白水平进一步评估TGF-β1在PTC中的表达变化,对31例具有完整配对信息的患者癌组织与对应癌旁组织进行Western blot检测。结果显示,TGF-β1蛋白在癌组织与癌旁组织中均可检测到,但不同样本之间表达强度存在明显差异(图2)。在部分病例的癌组织中TGF-β1蛋白表达高于对应癌旁组织,而在另一些病例中则呈现相反或变化不明显的趋势,提示TGF-β1蛋白表达具有较强的个体异质性。

进一步对TGF-β1蛋白条带进行定量分析,结果显示,整体样本中TGF-β1蛋白在癌组织与癌旁组织之间的差异无统计学意义($V = 312, P > 0.05$),见图3。

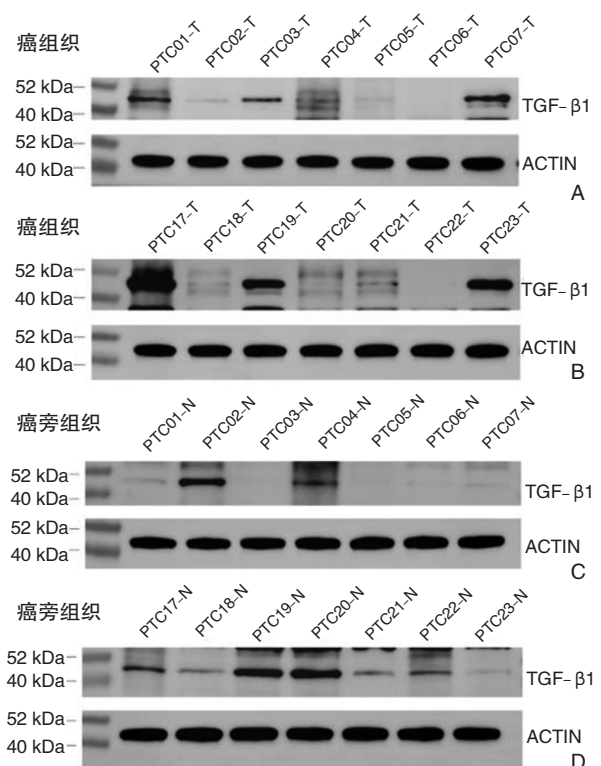


图2 Western blot显示TGF-β1在PTC组织与癌旁组织中的代表性蛋白表达条带 A、B: PTC组织; C、D: 癌旁组织

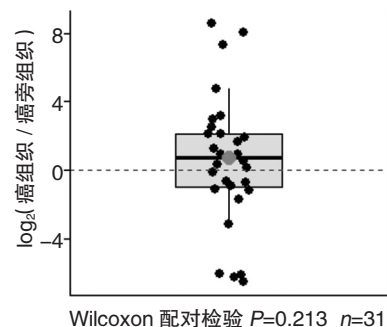


图3 TGF-β1在配对PTC组织与癌旁组织中的 $\log_2(T/N)$ 分布

2.3 TGF- β 1 在 PTC 组织中的免疫组化表达特征

TGF- β 1 免疫组化切片见癌组织区域的胞浆有中强度的 DAB 染色,细胞核大部分为苏木素蓝染,并可见弱强度的 DAB 染色。相比之下,癌旁组织区域未观察到 DAB 染色信号,细胞核为清晰可见的苏木素蓝染。此种表现符合分泌型蛋白因子 TGF- β 1 在胞浆定位聚集(图 4)。定量分析结果显示,癌组织中 TGF- β 1 的胞浆 DAB 光密度显著高于对应的癌旁组织(图 5)。Wilcoxon 配对秩和检验结果提示,两者差异具有统计学意义($P < 0.05$),表明 TGF- β 1 在 PTC 组织中普遍呈现上调趋势。

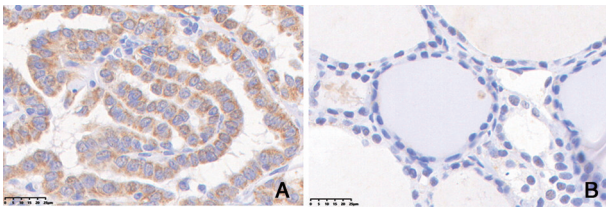


图 4 TGF- β 1 在 PTC 组织与癌旁组织中的免疫组化表达特征 (DAB+苏木素 $\times 800$) A: 癌组织; B: 癌旁组织 注: 图 A、B 来自同一切片。

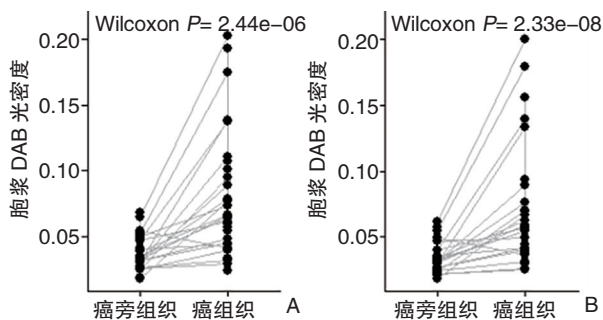


图 5 TGF- β 1 在 PTC 组织与癌旁组织中免疫组化定量分析 A: 基于均值; B: 基于中位数值

2.4 TGF- β 1 在不同侵袭分层中的免疫组化定量分析

进一步结合侵袭相关病理特征对 TGF- β 1 的免疫组化结果进行分层分析。按 ETE 状态分层分析,在 No-ETE 组和 ETE 组内,癌组织区域 TGF- β 1 的 DAB 光密度均显著高于对应癌旁组织区域(Wilcoxon 配对秩和检验, P 均 < 0.05 ,图 6)。然而,不同 ETE 分层之间癌组织区域 TGF- β 1 的表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。在按 LNM 状态分层分析时,同样观察到两组内癌组织 TGF- β 1 表达水平均显著高于癌旁组织(Wilcoxon 配对秩和检验, P 均 < 0.05 ,

图 7),而不同 LNM 分层之间癌组织区域 TGF- β 1 的表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。

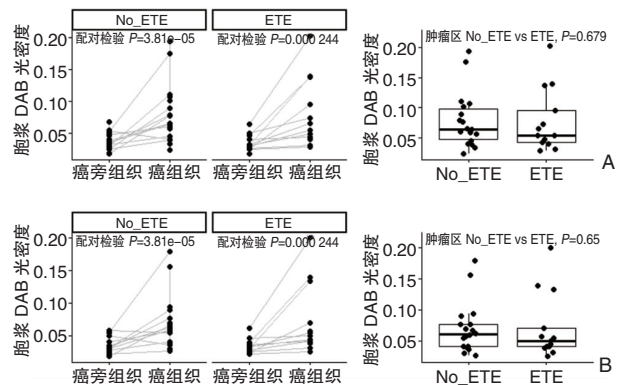


图 6 ETE 分层内及分层间的 TGF- β 1 免疫组化定量分析 A: 基于均值; B: 基于中位数值 注: 左侧为分层内癌组织 vs. 癌旁组织的表达差异分析,右侧为分层间癌组织的表达差异分析。下同。

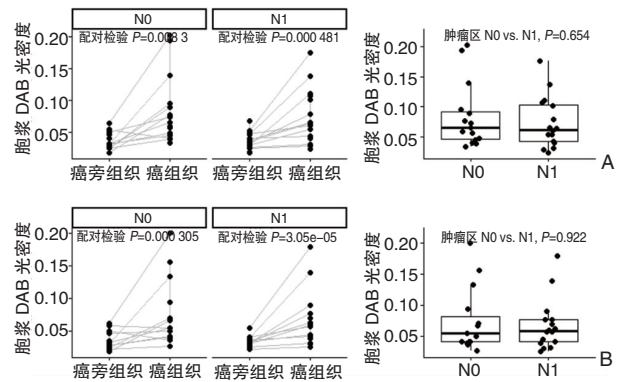


图 7 LNM 分层内及分层间的 TGF- β 1 免疫组化定量分析 A: 基于均值; B: 基于中位数值

2.5 p-Smad2/3 在 PTC 组织中的免疫组化表达特征

为进一步评估 TGF- β /Smad 信号通路的激活状态,对 TGF- β 1 经典下游分子 p-Smad2/3 进行免疫组化检测。切片见癌组织区域的细胞核及胞浆均为中强度 DAB 染色。相比之下,癌旁组织区域呈现腺泡内弱 DAB 染色,腺泡外周的细胞核为弱或无 DAB 阳性染色以及大部分苏木素蓝染(图 8)。提示 p-Smad2/3 在 PTC 组织中完成磷酸化后,从胞浆聚集到核转位的变化,证明其参与下游转录调控。定量分析结果表明,癌组织中 p-Smad2/3 的核 DAB 光密度显著高于对应的癌旁组织,差异具有统计学意义(Wilcoxon 配对秩和检验, $P < 0.05$,图 9)。

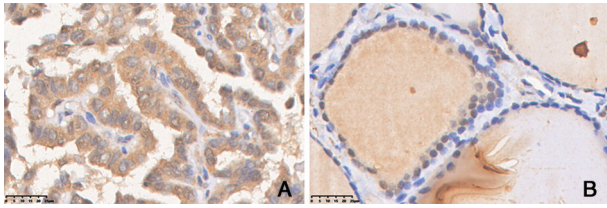


图8 p-Smad2/3 在癌组织与癌旁组织中的免疫组化表达特征 (DAB+苏木素 $\times 800$) A: 癌组织; B: 癌旁组织 注: 图A、B来自同一切片。

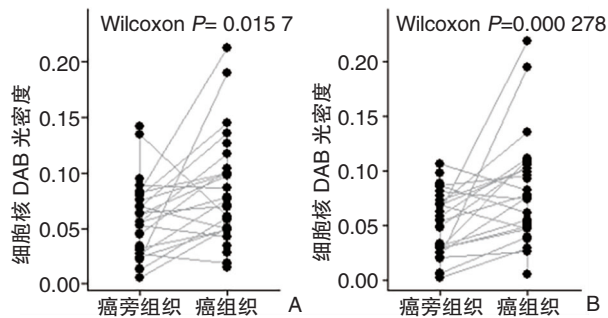


图9 p-Smad2/3 在癌组织与癌旁组织中的免疫组化定量分析 A: 基于均值; B: 基于中位数值

2.6 p-Smad2/3 在不同侵袭分层中的免疫组化定量分析

p-Smad2/3 免疫组化定量按 ETE 分层分析, 在 No-ETE 组中, 癌组织区域 p-Smad2/3 的核 DAB 光密度较对应癌旁组织显著升高 (P 均 < 0.05), 而在 ETE 组中, 癌组织区域 p-Smad2/3 虽仍高于癌旁组织, 但差异减弱, 仅在中位数值分析中差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 均值分析未见显著差异 ($P = 0.244$), 见图 10。进一步比较不同 ETE 分层之间癌组织区域 p-Smad2/3 的核表达水平, 差异无统计学意义 (P 均 > 0.05)。

按 LNM 分层分析, N0 组中癌组织区域 p-Smad2/3 的核 DAB 光密度较癌旁组织升高, 其中中位数分析差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 而均值分析差异无统计学意义 ($P = 0.0833$)。相比之下, N1 组中癌组织区域 p-Smad2/3 的核表达升高在均值与中位数值分析中均未显示出一致的显著性 (图 11)。在癌组织区域中直接比较 N0 与 N1 两组时, p-Smad2/3 的核表达差异无统计学意义 (P 均 > 0.05)。

p-Smad2/3 核定位增强的定量分析显示分层内显著, 分层间未分化; 分层内 No-ETE 组差异比 ETE 组更显著。免疫组化图像显示不同侵袭表型的 PTC 样本中 p-Smad2/3 的亚细胞定位存在差异 (图 12)。PTC10 可见 ETE (+) & LNM (-) 表型, p-Smad2/3 主要表现为胞浆染色, 核定位信号相对有限。PTC20 可见 ETE (-) & LNM (+) 表型, 可观察到 p-Smad2/3 胞浆表达增强并伴随核转位增加, 显示分层内 No-ETE 组差异比 N1 组更显著。PTC05 可见 ETE (-) & LNM (-) 无侵袭表型中, p-Smad2/3 整体 DAB 染色信号较弱, 胞浆及细胞核内均未见明显增强表达, 提示其处于 p-Smad2/3 低激活状态, 并未出现 p-Smad2/3 核转位。

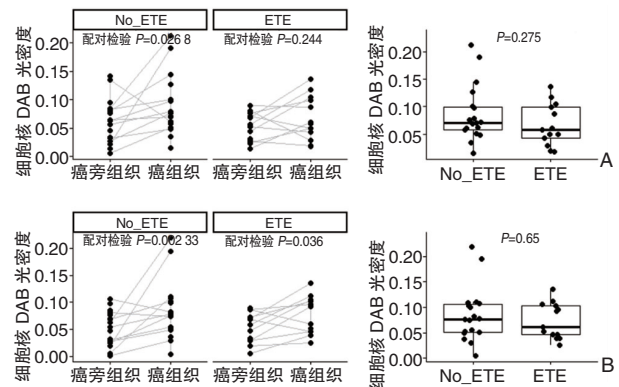


图10 ETE 分层内及分层间的 p-Smad2/3 免疫组化定量分析 A: 基于均值; B: 基于中位数值 注: 左侧为分层内癌组织 vs. 癌旁组织的表达差异分析, 右侧为分层间癌组织的表达差异分析。下同。

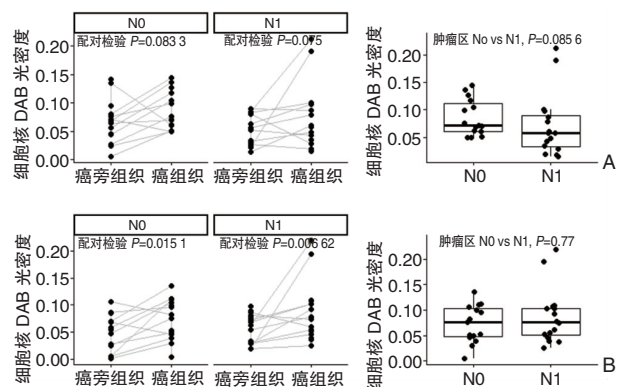


图11 LNM 分层内及分层间的 p-Smad2/3 免疫组化定量分析 A: 基于均值; B: 基于中位数值

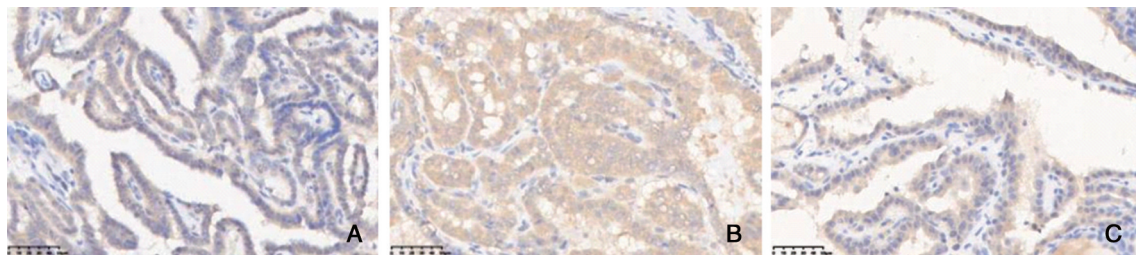


图 12 3 例具有不同侵袭状态的 PTC 组织,在同一癌组织区域获取 p-Smad2/3 的代表性图像 (免疫组化 $\times 400$) A: PTC10, ETE(+)&LNM(-); B: PTC20, ETE(-)&LNM(+); C: PTC05, ETE(-)&LNM(-)

3 讨论

TGF- β 信号通路是 EMT 最经典、研究最充分的上游调控轴之一,在多种实体瘤的侵袭、转移及肿瘤微环境重塑中发挥核心作用^[8-12]。在 PTC 中,TGF- β /Smad 信号既被认为具有抑癌与促侵袭的双重效应,也被认为其功能随肿瘤分期、分化状态及分子背景而发生转变^[13-16]。近年来,EMT 逐渐被重新认识为一种具有高度可塑性的连续谱过程 (epithelial-mesenchymal plasticity, EMP),而非简单的“开/关”式转变,这一理论为解释肿瘤侵袭过程中信号通路的阶段性差异提供了重要框架^[11,13-14]。

3.1 TGF β 1 上调的普遍性与分层特征

本研究显示,TGF β 1 在肿瘤组织中的 mRNA 表达显著高于对应癌旁组织,且该配对差异在 ETE 与 LNM 各分层内均可重复。然而,在不同侵袭分层之间的直接组间比较中,并未观察到统计学显著差异。这提示,TGF β 1 的转录上调是一种在不同侵袭背景下普遍存在的表达特征,而非随侵袭分层发生显著分化的表达变化。

既往研究指出,TGF- β 信号在多种实体瘤中常呈现广泛激活状态,其表达增强并不总是与侵袭终点呈线性对应关系,而更多体现为肿瘤-间质互作及 EMT 相关转录程序的整体参与^[8-9,11-12]。在 PTC 中,TGF β 1 亦被报道在不同侵袭分型中普遍表达增强^[6-7]。本研究结果与上述观察一致,即 TGF β 1 的升高在不同侵袭分层内均可观察到,但其表达水平本身不足以区分 ETE 或 LNM 分层。因此,从当前样本与统计结果出发,TGF β 1 更可能反映 PTC 中一种广泛存在的转录激活状态。

3.2 TGF- β 1 蛋白表达的层级差异

本研究中,TGF β 1 在 qPCR 层面呈一致上调,而 Western blot 整体差异无统计学意义,提示其蛋白层

面的变化未呈现与转录水平完全一致的表达模式。既往研究指出,TGF- β 1 作为分泌型细胞因子,其表达调控涉及转录、翻译、潜伏复合体形成及微环境释放等多个层级,因此 mRNA 水平与组织总蛋白检测结果之间可能存在一定差异^[8-10]。

此外,组织匀浆层面的 Western blot 检测反映的是整体组织平均信号,而免疫组化能够保留空间分布信息,更适于观察局部区域的表达。已有研究报道,在 TGF- β 相关肿瘤研究中,整体蛋白检测与组织定位分析结果可能存在层级差异^[8-10,17]。本研究亦观察到,尽管 Western blot 未显示整体差异,免疫组化仍在癌组织区域胞浆层面呈现增强。

需要指出的是,本研究在不同侵袭分层之间未观察到肿瘤区 TGF- β 1 表达的统计学差异。因此,从当前数据出发,TGF- β 1 蛋白的表达增强更可能体现为 PTC 组织层面的普遍特征,而其与侵袭分层的直接关联尚需进一步研究。

3.3 p-Smad2/3 核表达与侵袭分层差异模式

本研究显示,p-Smad2/3 在 PTC 组织中核表达显著增强,提示 TGF- β /Smad 信号在肿瘤层面处于活化状态。进一步结合侵袭分层分析可以得出,在 No-ETE 与 N0 分层内,癌组织相较癌旁组织的核表达差异表现较为稳定,而在 ETE 与 N1 分层中,该差异在不同统计指标下趋于减弱或不一致。

从临床病理角度看,No-ETE 与 N0 通常代表尚未形成 ETE 或 LNM 的侵袭背景,而 ETE 与 N1 则反映侵袭已形成的状态。在这一框架下,本研究所观察到的分层内差异稳定性变化,提示 TGF- β /Smad 信号的活化可能在侵袭尚未形成阶段表现更为明确,而在侵袭已形成后呈现调控复杂化或表达异质性增加的趋势。

在 EMP 理论框架下,信号通路活化程度并非必然随侵袭程度线性增强,而可能随着微环境改变及进展状态发生动态调整。因此,本研究所观察到“分

层内显著、分层间未分化”的结果,在分子生物学层面具有一定合理性。

需要强调的是,本研究未在不同侵袭分层之间观察到 p-Smad2/3 核表达的统计学差异,因此上述解释仍属于基于表达模式的推测,其阶段性调控意义仍需在更大样本及功能实验中进一步验证。

3.4 TGF-β/Smad 轴在 PTC 侵袭中的整体定位与临床意义

综合本研究的多层级表达结果可以看到,TGF-β/Smad 轴在 PTC 组织中呈现较为一致的活化特征:TGFβ1 在转录水平普遍升高,p-Smad2/3 在核定位层面显著增强,而这种差异在各侵袭分层内部均可观察到。然而,在不同侵袭分层之间的直接比较中,无论是转录水平、蛋白表达还是下游信号读出,均未形成统计学显著差异。

这一结果提示,TGF-β/Smad 信号更可能构成 PTC 侵袭相关的共性分子背景,而非单一决定 ETE 或 LNM 分型差异的表达变量。换言之,该通路的活化状态可能参与侵袭表型的形成过程,但其表达水平本身不足以作为侵袭分层的独立区分指标。

从临床角度看,ETE 尤其是微小 ETE 的预后意义在既往研究中存在一定差异^[18-21],单一分子指标难以替代传统病理分层。本研究结果更倾向于将 TGF-β/Smad 轴理解为侵袭相关的参与性调控通路,而其在风险评估或干预策略中的潜在价值,仍需进一步探讨。

3.5 局限性与未来研究方向

本研究仍存在一定局限性。首先,样本量相对有限,且为单中心横断面观察设计,难以对信号活化状态与侵袭进展之间的时间序列关系进行推断。其次,本研究主要基于表达水平与组织定位分析,尚未结合体外或体内功能实验验证 TGF-β/Smad 信号在不同侵袭背景下的动态调控作用。此外,尽管本研究观察到分层内差异稳定性的变化,但不同侵袭分层之间未达到统计学显著分化,因此关于阶段相关调控模式的解释仍需在更大样本及多中心队列中加以验证。未来研究可进一步结合功能干预实验、信号通路抑制模型及更多下游指标,系统评估 TGF-β/Smad 轴在 PTC 侵袭形成过程中的具体作用。

参考文献:

[1] Yin DT, Yu K, Lu RQ, et al. Prognostic impact of minimal extra-

thyroidal extension in papillary thyroid carcinoma[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(52):e5794.

- [2] Ali KM, Awany S, Ibrahim DA, et al. Role of P53, E-cadherin and BRAF as predictors of regional nodal recurrence for papillary thyroid cancer[J]. *Ann Diagn Pathol*, 2019, 40:59-65.
- [3] Liu L, Oh C, Heo JH, et al. Clinical significance of extrathyroidal extension according to primary tumor size in papillary thyroid carcinoma[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2018, 44(11):1754-1759.
- [4] Allgayer H, Mahapatra S, Mishra B, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and cancer metastasis: the status quo of methods and experimental models 2025[J]. *Mol Cancer*, 2025, 24(1):167.
- [5] Mortezaee K, Majidpoor J, Kharazinejad E. Epithelial-mesenchymal transition in cancer stemness and heterogeneity: updated[J]. *Med Oncol*, 2022, 39(12):193.
- [6] Xiang J, Lv N, Yin S, et al. TGF-β induces EMT in thyroid cancer cells by regulating transcription factors[J]. *Thyroid Res*, 2025, 18(1):25.
- [7] Peres KC, Teodoro L, Amaral LHP, et al. Clinical utility of TGFβ1 and its receptors (TGFβR1 and TGFβR2) in thyroid nodules: evaluation based on single nucleotide polymorphisms and mRNA analysis[J]. *Arch Endocrinol Metab*, 2021, 65(2):172-184.
- [8] David CJ, Massagué J. Contextual determinants of TGFβ action in development, immunity and cancer[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(7):419-435.
- [9] Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF-β and the TGF-β family: Context-dependent roles in cell and tissue physiology[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, 8(5):a021873.
- [10] Seoane J, Gomis RR. TGF-β family signaling in tumor suppression and cancer progression[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2017, 9(12):a022277.
- [11] Pastushenko I, Blanpain C. EMT transition states during tumor progression and metastasis[J]. *Trends Cell Biol*, 2019, 29(3):212-226.
- [12] Brabletz T, Kalluri R, Nieto MA, et al. EMT in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(2):128-134.
- [13] Fontana R, Mestre-Farrera A, Yang J. Update on epithelial-mesenchymal plasticity in cancer progression[J]. *Annu Rev Pathol*, 2024, 19:133-156.
- [14] Pastushenko I, Brisebarre A, Sifrim A, et al. Identification of the tumour transition states occurring during EMT[J]. *Nature*, 2018, 556(7702):463-468.
- [15] Schubert L, Mariko ML, Clerc J, et al. MAPK pathway inhibitors in thyroid cancer: Preclinical and clinical data [J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15(3):710.
- [16] Riescoe-Eizaguirre G, Rodríguez I, De la Vieja A, et al. The BRAFV600E oncogene induces transforming growth factor beta secretion leading to sodium iodide symporter repression and increased malignancy in thyroid cancer[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(21):8317-8325.
- [17] Luo K. Signaling cross talk between TGF-β/Smad and other signaling pathways[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2017, 9(1):

a022137.

- [18] Almeida MFO, Couto JS, Ticiy ALT, et al. The impact of minimal extrathyroidal extension in the recurrence of papillary thyroid cancer patients[J]. Arch Endocrinol Metab, 2020, 64(3): 251-256.
- [19] Baloch ZW, Asa SL, Barletta JA, et al. Overview of the 2022 WHO classification of thyroid neoplasms [J]. Endocr Pathol, 2022, 33(1): 27-63.
- [20] Diker-Cohen T, Hirsch D, Shimon I, et al. Impact of minimal extra-thyroid extension in differentiated thyroid cancer: Systematic review and meta-analysis [J/OL]. J Clin Endocrinol Metab, 2018, Epub ahead of print. PMID: 29506045.
- [21] Bouzouane N, Roy P, Decaussin-Petrucci M, et al. Prognostic impact of microscopic extra-thyroidal extension (mETE) on disease

free survival in patients with papillary thyroid carcinoma (PTC) [J]. Cancers (Basel), 2022, 14(11): 2591.

(收稿日期: 2026-01-21)

本文引用格式: 刘华盛, 葛平江, 傅向军, 等. TGFB1-TGF- β /Smad 信号在甲状腺乳头状癌侵袭相关表型中的表达特征[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2026, 32(2): 70-78. DOI: 10. 11798/j. issn. 1007-1520. 202626025

Cite this article as: LIU Huasheng, GE Pingjiang, FU Xiangjun, et al. Expression characteristics of TGFB1-TGF- β /Smad signaling in invasion-related phenotypes of papillary thyroid carcinoma[J]. Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg, 2026, 32(2): 70-78. DOI: 10. 11798/j. issn. 1007-1520. 202626025

· 消息 ·

《中国耳鼻咽喉颅底外科杂志》2026 年征订启事

《中国耳鼻咽喉颅底外科杂志》是中华人民共和国教育部主管、中南大学及中南大学湘雅医院主办、国内外公开发行的医学学术性期刊,是中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊、中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)。本刊以耳鼻咽喉颅底外科工作者为主要读者对象,重点报道耳鼻咽喉颅底外科领域内领先的科研成果、基础理论研究及先进的临床诊疗经验。本刊设有述评、专家论坛、专家笔谈、论著、临床报道、病案报道、技术与方法、综述等栏目。本刊为双月刊,定价 30.00 元,全年 180.00 元,全国各地邮局均可订阅,邮发代号 42-171。本刊编辑部可免费为读者代办邮购。通讯地址:湖南省长沙市湘雅路 87 号中南大学湘雅医院《中国耳鼻咽喉颅底外科杂志》编辑部(湘雅医院内),邮编:410008,投稿网址: <http://www.xyosbs.com>, Email: xyent@126.com, 电话: 0731-84327210。欢迎踊跃投稿、积极订阅。