

C-myb 和 p53 在甲状腺乳头状癌中的表达及临床意义

刘福学^{1,2}, 夏青生², 邱杰³, 刘晓露³, 李圆³

(1. 潍坊医学院, 山东 潍坊 261053; 2. 青岛市市立医院东院区, 山东 青岛 266000;

3. 青岛大学附属医院, 山东 青岛 266000)

摘要: [目的] 探讨甲状腺乳头状癌中 C-myb、p53 的表达及其临床意义。[方法] 采用免疫组化(SP)法研究 38 例甲状腺乳头状癌及癌旁组织, 22 例甲状腺腺瘤及腺瘤周围组织中 C-myb、p53 的表达。[结果] C-myb 在甲状腺乳头状癌组织、甲状腺腺瘤、癌旁组织及腺瘤周围组织中表达的阳性率分别为 86.8%、63.6%、10.5%、4.5%; p53 则分别为 81.6%、22.7%、0、0。C-myb、p53 蛋白在甲状腺乳头状癌、癌旁组织、甲状腺腺瘤及腺瘤周围组织中表达差异均有统计学意义($P < 0.05$)。[结论] C-myb、p53 在甲状腺组织中的异常表达与甲状腺乳头状癌发生发展相关。

关键词: C-myb; p53; 甲状腺肿瘤; 乳头状癌; 腺瘤; 免疫组织化学

中图分类号: R736.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2015)04-0320-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2015.04.B013

Expressions of C-myb and p53 in Papillary Thyroid Cancer and Their Clinical Significance

LIU Fu-xue^{1,2}, XIA Qing-sheng², QIU Jie³, et al.

(1. Weifang Medical College, Weifang 261053, China; 2. Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266000, China; 3. The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expressions of C-myb and p53 in papillary thyroid cancer (PTC) and their significance. [Methods] Immunohistochemical staining (SP) was used to detect the expressions of C-myb and p53 in tissues of 38 cases with PTC and cancer adjacent, and 22 cases with adenoma and adenoma adjacent. [Results] The positive expression rate of C-myb was 86.8%, 63.6%, 10.5% and 4.5% in PTC, adenoma, cancer adjacent tissues and adenoma adjacent tissues respectively, and that of p53 was 81.6%, 22.7%, 0 and 0 respectively. There was significant difference of C-myb or p53 among various thyroid tissues ($P < 0.05$). [Conclusion] The abnormal expressions of C-myb and p53 in thyroid tissues play important roles in carcinogenesis of PTC.

Subject words: C-myb; p53; thyroid neoplasms; papillary carcinoma; adenoma; immunohistochemistry

甲状腺乳头状癌是甲状腺癌中最常见的病理类型, 占甲状腺癌的 80%~90%。由于甲状腺乳头状癌的病因不明确, 加上近年来分子生物学的快速发展, 所以对甲状腺乳头状癌分子方面的研究成了本领域研究的热点。C-myb 是一种核内癌基因, 编码的蛋白属于核转录因子, 通过调节靶基因的转录调节细胞周期、抑制细胞分化及细胞的凋亡^[1]。p53 基因

是目前发现的较强的抑癌基因, 有“基因卫士”之称, 通过抑制与 DNA 复制相关的细胞基因或基因产物诱导细胞生长阻滞, 介导细胞凋亡、细胞分化及 DNA 的修复。两种基因表达的蛋白都与细胞周期相关。当两种基因过表达时导致细胞过度增殖, 肿瘤形成。近年来关于 C-myb 及 p53 与肺癌、乳腺癌、结肠癌等肿瘤关系已有报道, 本研究采用免疫组化的方法对 38 例甲状腺乳头状癌及癌旁组织, 22 例甲状腺腺瘤及腺瘤周围组织中 C-myb、p53 表达情况进行检测, 分析 C-myb、p53 在甲状腺乳头状癌中的临床意义。

基金项目: 青岛市科技局项目 (13-1-4-166-jch)

通讯作者: 邱杰, 副主任医师, 硕士生导师, 博士; 青岛大学附属医院耳鼻喉科, 山东省青岛市江苏路 16 号 (266000); E-mail: wfqpeter2000@aliyun.com

收稿日期: 2014-12-23; **修回日期:** 2015-02-04

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2013 年 9 月至 2014 年 8 月在青岛大学附属医院耳鼻喉科就诊,行甲状腺手术切除的患者 60 例,其中甲状腺乳头状癌 38 例,甲状腺腺瘤 22 例。所有病例临床资料完整,术前均未行放疗、化疗及内分泌治疗。38 例甲状腺乳头状癌中,男性 13 例,女性 25 例,平均年龄 50 岁;22 例甲状腺腺瘤中,男性 8 例,女性 14 例,平均年龄 34 岁。对甲状腺乳头状癌按美国癌症联合委员会 (AJCC)2010 年新修订的甲状腺癌肿瘤 TNM 分期:Ⅰ期 27 例,Ⅱ期 6 例,Ⅲ期 3 例,Ⅳ期 2 例。所有标本均经 10%中性福尔马林溶液固定,常规石蜡包埋,切片,HE 染色,所有病例临床相关资料及切片经复查病理诊断无误。

1.2 免疫组化试剂

鼠抗人 C-myb 单克隆抗体、鼠抗人 p53 单克隆抗体、柠檬酸组织抗原修复液(100×)、二氨基联苯胺 (DAB) 显色剂及配套 SP 超敏试剂盒购于福州迈新生物技术公司。以 PBS 代替一抗作阴性空白对照。

1.3 实验方法

本研究采用链霉抗生物素蛋白—过氧化物酶 (SP) 法,石蜡包埋组织采取 4 μ m 连续切片,常规脱蜡、水化,取适量 pH6.0 柠檬酸盐缓冲液(1:100,工作液)浸没切片高温高压 1.5min 进行抗原修复,3%过氧化氢室温孵育 10min,封闭内源性过氧化物酶活性后 PBS 冲洗,加 C-myb 和 p53 一抗工作液,4℃冰箱过夜后,PBS 冲洗,滴加与一抗对应的二抗,室温孵育 10min 后,PBS 冲洗。DAB 显色,清水冲洗。苏木素复染,盐酸分化,氨水返蓝,乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,用预实验中已知的阳性切片为阳性对照,以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 判断标准

切片的结果有两位病理科医生采用盲法独立阅片观察 10 个有代表性的高倍视野 ($\times 40$),计数 1 000 个细胞,对免疫组化染色中细胞内出现棕黄色颗粒进行半定量评估,两者结果不一致时,经商讨达成一致。C-myb 的阳性细胞染色定位于细胞质,p53 定位表达于细胞核。C-myb 以细胞质呈浅黄、棕黄或棕褐色的细小颗粒作为阳性细胞,

p53 以细胞核出现棕黄或棕褐色的细小颗粒作为阳性细胞。依据阳性细胞数来计算评分:染色范围:0 分为全片未见染色或阳性细胞数少于 5%,1 分为阳性细胞数在 6%~25%,2 分为阳性细胞数在 26%~50%,3 分为阳性细胞数在 51%~75%,4 分为阳性细胞数在 75%以上;按照染色程度评分:0 分为阴性,1 分为弱阳性,2 分为中阳性,3 分为强阳性。评分标准:每张切片的染色范围(阳性细胞占总细胞数) $\times$ 每张切片的染色强度。相乘之后得出分数,0 分为阴性(-),1 分弱阳性(+),2~5 分为阳性(++),6~12 分为强阳性(+++)。

1.5 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件,阳性率的比较采用 χ^2 检验。当 $1 \leq T < 5$ 时,进行校正 χ^2 检验;当 $T < 1$ 时进行 Fisher's 确切概率计算。两蛋白之间的相关性采用非参数 Pearson 等级相关检验分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 C-myb、p53 在甲状腺组织中的表达

C-myb 在癌组织、腺瘤、癌旁组织及腺瘤周围组织中表达的阳性率分别为 86.8%、63.6%、10.5%、4.5%,p53 阳性率则分别为 81.6%、22.7%、0、0,由此看出 C-myb、p53 在癌组织阳性表达率高于在腺瘤、癌旁组织及腺瘤周围组织表达,两蛋白在乳头状癌、腺瘤、癌旁组织及腺瘤周围组织之间的差异均有统计学意义 (C-myb: $\chi^2=63.123, P=0.000$;p53: $\chi^2=74.409, P=0.000$)(Table 1, Figure 1~4)。

Table 1 The expressions of C-myb, p53 in various thyroid tissues

Tissues	N	C-myb		p53	
		Positive case	Positive rate(%)	Positive case	Positive rate(%)
Papillary thyroid cancer	38	33	86.8	31	81.6
Adenoma	22	14	63.6	5	22.7
Tissue adjacent to cancer	38	4	10.5	0	0
Tissue adjacent to adenoma	22	1	4.5	0	0

2.2 甲状腺乳头状癌中 C-myb 与 p53 的相关性及其与临床资料的关系

应用非参数 Pearson 等级相关检验分析,在甲状腺乳头状癌中 C-myb 与 p53 表达呈正相关 ($r=$

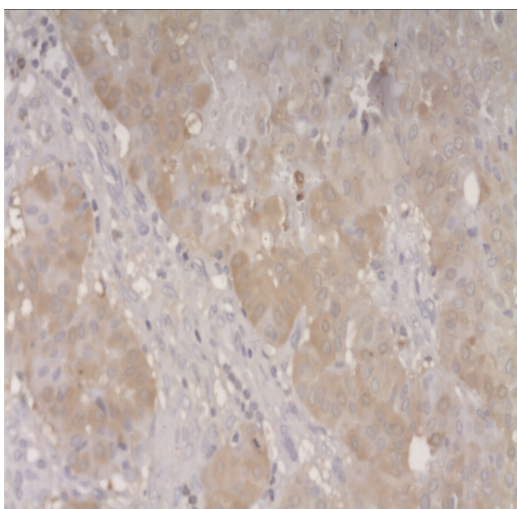


Figure 1 The expression of C-myb in adenoma

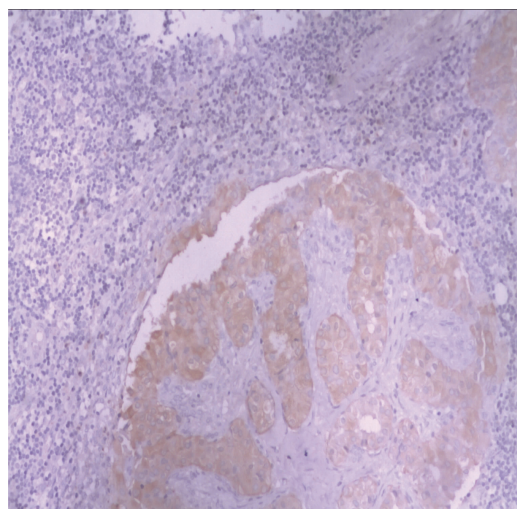


Figure 2 The expression of C-myb in papillary thyroid cancer

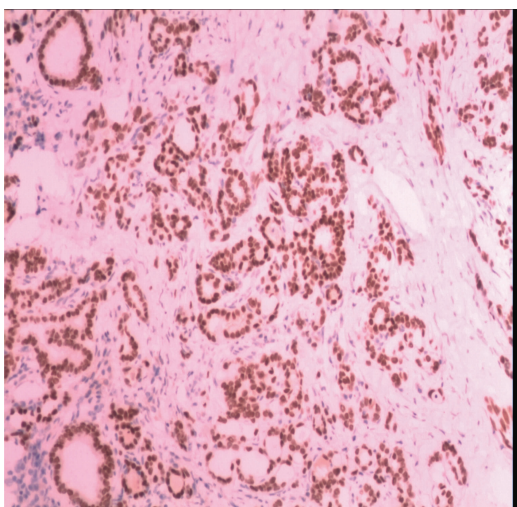


Figure 3 The expression of p53 in adenoma

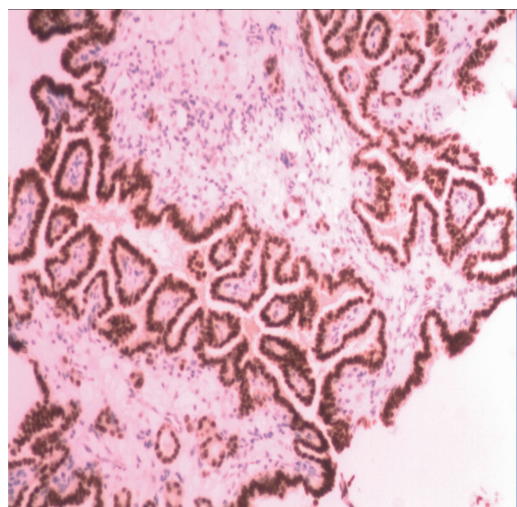


Figure 4 The expression of p53 in papillary thyroid cancer

0.171, $P=0.029$)。C-myb、p53 在甲状腺乳头状癌的表达在不同年龄、性别、癌组织大小、肿瘤位置及临床分期的患者间差异无统计学意义 ($P>0.05$), 而在有无淋巴结转移患者间差异有统计学意义 ($P<0.05$) (Table 2)。

3 讨 论

C-myb 是一种与细胞增殖及分化相关的核转录因子, 最初是于 1941 年分离得到的禽类成髓细胞

瘤病毒 (avian myeloblastosis virus, AMV) 的转化基因, 位于 6 号染色体 6p24^[2], 有 1 914 个碱基对编码组成, 其编码产物为 637 个氨基酸的 C-myb 蛋白。C-myb 包含 3 个功能区: 氨基端的 DNA 结合结构域 (DNA binding domain, DBD)、中部的转录激活结构域 (transactivation domain, TAD) 以及羧基端的负调节结构域 (negative regulatory domain, NRD)。C-myb 的氨基端协同进行 DNA 结合, 与其他相关因子调节、影响细胞的生长和分化^[3]。在 DBD 下游存在一个转录激活结构域, 该结构域长度为 52 个氨基酸

Table 2 The relationship of C-myb, p53 and clinical data

Clinicopathological factors	N	C-myb			p53		
		Positive case	χ^2	P	Positive case	χ^2	P
Gender							
Male	13	12	0.630	0.427	11	0.121	0.728
Female	25	21			20		
Age(years)							
≥45	16	15	0.346	0.556	13	0.002	0.964
<45	22	18			18		
Diameter of tumor(cm)							
≤1	27	22	1.005	0.316	20	1.983	0.159
>1	11	11			11		
Location of tumor							
Upper and lower pole and isthmus	23	20	0.010	0.979	22	5.490	0.190
Middle of thyroid	15	13			9		
Clinical stages							
I	27	23	5.089	0.829	22	2.017	0.569
II	6	5			4		
III	3	3			3		
IV	2	2			2		
Lymphatic metastasis							
Yes	31	30	10.193	0.001	29	12.011	0.001
No	7	3			2		

(275~327 位氨基酸),通过 Wnt-1 信号介导 HIPK2、TAK1、NLK 的磷酸化抑制活性,Pin1 特异性识别结合磷酸化的丝氨酸(Ser)/苏氨酸(Thr) 蛋白基序,改变蛋白质构象,增加自身活性调节其转录的功能^[4,5],另外,在 C-myb 的另一端 C 段含有一个可以结合亮氨酸的负调控区。在未成熟的细胞中,C-myb 基因 mRNA 的水平在增殖态和静止态细胞中都保持高水平^[6-8],在分化成熟的细胞,C-myb 蛋白表达很弱或完全不表达。C-myb 蛋白的过表达能够抑制细胞分化使细胞进入无限的增殖周期,这一点基本被认同。王果等^[9]在对急性早幼粒细胞白血病发病过程的研究中发现,C-myb 过表达能够抑制 NB4 的分化。对于 C-myb 基因怎么被激活,最近在乳腺癌及直肠癌的研究中被阐明,在乳腺癌细胞中第一段内衰减序列被雌激素激活的雌激素受体(ER)所逆转^[10,11],打开对 C-myb 基因表达的阻断,C-myb 的高表达又抑制了细胞的进一步分化,促进了乳腺癌的发生发展^[11]。李凯等^[12]在对乳腺癌的研究中进一步验证了 C-myb 的持续表达能抑制分化,促进 C-myb 在乳腺癌中被激活而起作用。C-myb 在直肠癌细胞第一段内发生

突变,从而在细胞分化时 C-myb 克服了此种转录阻碍机制,高表达并抑制分化,参与了直肠癌的发生发展^[13],C-myb 基因的激活目前认为可以由过高表达、结构改变、基因重排等原因引起。C-myb 基因在正常细胞中有 80 个基因的靶点,大部分是被正向调控的,但少数也被 C-myb 抑制,它们和 C-myb 相互作用,参与了细胞的分化、增殖及存活,当 C-myb 被激活过表达后,使得细胞向恶性转化变为可能。本实验结果显示 C-myb 在甲状腺乳头状癌表达阳性率为 86.8%,明显高于甲状腺腺瘤、癌旁组织及腺瘤周围组织,这与孙志敏等^[14]在对 90

例甲状腺肿瘤的研究结果一致。表明 C-myb 和甲状腺乳头状癌的进展相关。

在人类 50% 的肿瘤中都能够发现 p53 突变型,是常见的抑癌基因,mtp53 蛋白的构象改变、稳定性增加、半衰期延长,在恶性细胞中容易堆积可高达 100 倍,能够用免疫组织化学方法检测。mtp53 高表达使 p53 基因由抑癌基因转为癌基因,导致肿瘤发生^[15-17]。p53 基因的表达异常可以导致胃癌、肝癌、胆总管癌等的发生发展^[18]。白兰等^[19]研究表明 p53 基因在甲状腺乳头状癌中的表达明显高于甲状腺腺瘤,这与本实验结果一致,表明了 p53 在甲状腺乳头状癌发生、发展过程中发挥作用。

本研究还阐明了 C-myb、p53 在甲状腺乳头状癌中的表达与年龄、性别、癌组织大小、肿瘤位置及临床分期无明显关系,而与淋巴结转移有一定的关系,表明 C-myb、p53 可能共同作用导致甲状腺乳头状癌的发生发展。最新的研究也表明,C-myb 在鼻咽癌的发生及转移中发挥作用。虽然两种基因蛋白在甲状腺乳头状癌的相互作用机制还没有被阐明,但是不影响 C-myb、p53 作为肿瘤标志物在甲状腺乳

头状癌诊断中的应用。

参考文献:

- [1] Ramsay RG, Gonda TJ. MYB function in normal and cancer cells[J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(7): 523-534.
- [2] Fan C, Wang LH, Jiao BH. C-myb transcription factor cell proliferation and differentiation[J]. *The Chemistry of Life*, 2011, 31(5): 697-700. [范晨, 王梁华, 焦炳华. C-myb 转录因子与细胞增殖分化[J]. *生命的化学*, 2011, 31(5): 697-700.]
- [3] Biedenkapp H. Viral myb oncogene encodes a sequence specific DNA-binding activity[J]. *Nature*, 1988, 335(6193): 835-837.
- [4] Kanei-Ishii C, Ninomiya-Tsuji J, Tanikawa J, et al. Wnt-1 signal induces phosphorylation and degradation of C-myb protein via TAK1, HIPK2, and NLK[J]. *Genes Dev*, 2004, 18(7): 816-829.
- [5] Pani E, Menigatti M, Schubert S, et al. Pin1 interacts with C-myb in a phosphorylation-dependent manner and regulates its transactivation activity[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1783(6): 1121-1128.
- [6] Nunn MF, Seeburg PH, Moscovici C, et al. Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene[J]. *Nature*, 1983, 306(5941): 391-395.
- [7] Leprince D, Gegonne A, Coll J, et al. A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26[J]. *Nature*, 1983, 306(5941): 395-397.
- [8] Duprey SP, Boettiger D. Developmental regulation of C-myb in normal myeloid progenitor cells[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1985, 82(20): 6937-6941.
- [9] Wang G, Deng WL, Zhang J, et al. C-myb role on the pathogenesis of acute early young granulocyte leukemia process[J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Edition)*, 2013, 33(11): 1475-1479. [王果, 邓望龙, 张济, 等. C-myb 在急性早幼粒细胞白血病发病过程中的作用[J]. *上海交通大学学报 (医学版)*, 2013, 33(11): 1475-1479.]
- [10] Dubik D, Dembinski TC, Shiu RPC, et al. Stimulation of c-myc oncogene expression associated with estrogen induced proliferation of human breast cancer cells[J]. *Cancer Res*, 1987, 47(24 Pt 1): 6517-6521.
- [11] Drabsch Y, Hugo H, Zhang R, et al. Mechanism of and requirement for estrogen-regulated MYB expression in estrogen-receptor-positive breast cancer cells[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2007, 104(34): 13762-13767.
- [12] Li K, Zhou WH, Liu Q, et al. C-myb, BCL-2 and ER expression and clinicopathological characteristics in breast cancer tissue and the relationship between the prognosis [J]. *China's Modern General Surgery*, 2011, 14(1): 33-37. [李凯, 周文红, 刘奇, 等. C-myb、bcl-2 和 ER 在乳腺癌组织中的表达与临床病理特征及预后的关系[J]. *中国现代普通外科进展*, 2011, 14(1): 33-37.]
- [13] Hugo H, Cures A, Suraweera N, et al. Mutations in the MYB intron I regulatory sequence increase transcription in colon cancers[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2006, 45(12): 1143-1154.
- [14] Sun ZN. Thyroid papillary carcinoma C-myb correlation analysis, PCNA expression and cervical lymph node metastases[D]. Kunming: Kunming Medical University Institute of Clinical Oncology, 2013. [孙志敏. 甲状腺乳头状癌 C-myb、PCNA 表达与颈部淋巴结转移相关性分析[D]. 昆明: 昆明医科大学临床肿瘤学院, 2013.]
- [15] Tong YP. P53 expression in esophageal cancer and its relationship with lymph node metastasis [J]. *The Aerospace Medical Journal*, 2014, 25(5): 599-600. [童永平. p53 在食道癌中的表达及与淋巴结转移的关系[J]. *航空航天医学杂志*, 2014, 25(5): 599-600.]
- [16] Quiros RM, Ding HG, Gattuso P, et al. Evidence that one subset of anaplastic thyroid carcinomas are derived from papillary carcinomas due to BRAF and p53 mutations [J]. *Cancer*, 2005, 103(11): 2261-2268.
- [17] Zhang LH, Hou ZJ. Progress in the study of P53 gene in lung cancer [J]. *Journal of Clinical Pulmonary Medicine*, 2006, 11(1): 59-60. [张丽华, 侯振江. P53 基因在肺癌研究中的进展[J]. *临床肺科杂志*, 2006, 11(1): 59-60.]
- [18] Li WJ, Pan QJ, Li MY. P53 gene and its function is reviewed[J]. *Biotechnology Communications*, 2014, 25(2): 284-285. [李文娟, 潘庆杰, 李美玉. p53 基因及其功能研究进展[J]. *生物技术通讯*, 2014, 25(2): 284-285.]
- [19] Bai L, Liu JW, Liu WS. P53 expression in thyroid papillary carcinoma[J]. *Chinese Journal of Misdiagnostics*, 2011, 11(36): 8923-8924. [白兰, 刘静伟, 刘文书. P53 在甲状腺乳头状癌中的表达[J]. *中国误诊学杂志*, 2011, 11(36): 8923-8924.]
- [20] Wang W, Wu S, Shi Y, et al. C-myb regulates cell growth and DNA damage repair through modulating MiR-143[J]. *FEBS Lett*, 2015. [Epub ahead of print]