

ZNF703 和 CD44v6 在甲状腺乳头状癌中的表达和意义

孙莎莎¹, 邱杰², 赵涵², 张文伟², 臧传善², 楚庆刚¹

(1. 潍坊医学院研究生院, 山东 潍坊 261053; 2. 青岛大学附属医院, 山东 青岛 266003)

摘要: [目的] 探讨 ZNF703 和 CD44v6 在甲状腺乳头状癌中的表达和临床意义。[方法] 应用免疫组化方法(SP 法)检测 ZNF703 和 CD44v6 蛋白在甲状腺乳头状癌组织(40 例)、配对癌旁正常甲状腺组织(40 例)和结节性甲状腺肿组织(30 例)中的表达, 并探讨其与甲状腺乳头状癌临床病理特征的关系。[结果] (1) ZNF703 和 CD44v6 在甲癌组(67.5%、75.0%)的表达均高于癌旁组(7.5%、10.0%)和结甲组(30.0%、13.3%), 差异均有统计学意义(P 均 <0.05)。 (2) 甲状腺癌组织中 ZNF703 和 CD44v6 的表达与肿瘤分期 (TNM 分期) 和淋巴结转移有关 ($P<0.05$); ZNF703 和 CD44v6 的表达与患者的年龄和性别无关 ($P>0.05$); ZNF703 表达与肿瘤直径有关 ($P<0.05$), 直径 >1 cm 组较直径 ≤ 1 cm 组的表达阳性率高; CD44v6 表达与肿瘤直径无关 ($P>0.05$)。 (3) ZNF703 和 CD44v6 蛋白在甲状腺癌组织中的表达呈正相关 ($r=0.462, P<0.05$)。 [结论] ZNF703 和 CD44v6 的表达与甲状腺乳头状癌的癌变、肿瘤分期和淋巴转移具有相关性, 联合检测可能对甲状腺癌的诊疗和预后评估具有指导意义。

关键词: ZNF703; CD44v6; 甲状腺乳头状癌; 免疫组化

中图分类号: R736.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2018)04-0303-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2018.04.B003

Expression of ZNF703 and CD44v6 Proteins in Papillary Thyroid Carcinoma and Their Clinical Significance

SUN Sha-sha¹, QIU Jie², ZHAO Han², et al.

(1. Postgraduate College, Weifang Medical College, Weifang 261053, China; 2. The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression and clinical significance of ZNF703 and CD44v6 proteins in papillary thyroid carcinoma. [Methods] The expressions of ZNF703 and CD44v6 proteins were detected in 40 samples of papillary thyroid carcinoma, 40 samples of corresponding normal thyroid tissues and 30 samples of nodular goiter tissues by immunohistochemistry (streptavidine-peroxidase method), and its relationship with the clinicopathological features was analyzed. [Results] The expressions of ZNF703 and CD44v6 proteins in the papillary thyroid carcinoma (67.5%, 75.0%) were significantly high than those in the corresponding normal thyroid tissues (7.5%, 10.0%) and nodular goiter tissues (30.0%, 13.3%) (all $P<0.05$). The expressions of ZNF703 and CD44v6 proteins in the papillary thyroid carcinoma were correlated with lymph node metastasis and TNM stage ($P<0.05$), and were not correlated with the gender and age of patients ($P>0.05$). The expression of ZNF703 proteins was correlated with the diameter of tumor ($P<0.05$); the positive rate of ZNF703 in diameter >1 cm group was higher than that in diameter ≤ 1 cm group. The expression of CD44v6 proteins in the papillary thyroid carcinoma was not correlated with the tumor size ($P>0.05$). There was a positive correlation between the expression of ZNF703 and CD44v6 protein in papillary thyroid cancer ($r=0.462, P<0.05$). [Conclusion] The expression of ZNF703 and CD44v6 is correlated with clinical stages and lymphatic metastasis of thyroid papillary carcinoma, and combined detection of two proteins may be of value in the diagnosis and prognosis of thyroid cancer.

Subject words: ZNF703; CD44v6; papillary thyroid carcinoma; immunohistochemistry

甲状腺癌(thyroid carcinoma, TC)约占全身恶性

肿瘤的 3%, 且近年来有逐渐增长的趋势^[1]。甲状腺癌以甲状腺乳头状癌(papillary carcinoma of thyroid, PTC)最多见, 预后也最好, 约占甲状腺癌的 85%, 在某些碘摄入量高的地区, 其发病率甚至可占到甲状

通讯作者: 邱杰, 副主任医师, 博士; 青岛大学附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 山东省青岛市市南区江苏路 16 号(266003), E-mail: wfqjpeter2000@163.com

收稿日期: 2017-10-26; **修回日期:** 2017-12-29

腺癌的 90% 以上。有大量文献报道, 锌指蛋白 703 (zinc finger protein 703, ZNF703) 和 CD44v6 在多种恶性肿瘤的发生、转移和预后方面发挥重要作用。本文应用免疫组化的方法, 研究甲状腺疾病患者组织中的 ZNF703 和 CD44v6 的表达情况及两者之间的相关性, 以期进一步探索该两种蛋白在甲状腺乳头状癌患者的诊治中的指导意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集青岛大学附属医院 2016 年 7 月至 2017 年 7 月行甲状腺切除患者的手术标本, 所有患者临床资料完整。将所有患者分为 3 组, 甲状腺乳头状癌 (甲癌组) 40 例、配对癌旁正常组织 (癌旁组) (取自距癌灶边缘 >0.8cm 的距离, 且术后病理证实为正常甲状腺组织) 40 例、结节性甲状腺肿 (结甲组) 30 例。其中, 甲癌组和癌旁组中男性 10 例, 女性 30 例; 年龄 49~67 岁, ≥ 55 岁 20 例, < 55 岁 20 例, 平均 49.8 ± 13.4 岁。结甲组中男性 9 例, 女性 21 例, 年龄 20~65 岁, 平均 43.8 ± 11.9 岁。甲癌组 TNM 分期采用美国癌症联合委员会 (American Joint Committee on Cancer, AJCC) 颁布的第 8 版甲状腺癌 TNM 分期, I、II 期 22 例, III、IV 期 18 例; 有淋巴结转移者 22 例, 无淋巴结转移者 18 例; 肿瘤直径 >1cm 者 17 例, 直径 ≤ 1 cm 者 23 例。以上所有甲状腺疾病患者均经我院病理科确诊, 并且参与实验的患者均签署知情同意书。

1.2 纳入标准

(1) 术前无放疗、化疗或甲状腺手术史; (2) 无桥本甲状腺炎 (hashimoto thyroiditis, HT) 病史 (有文献证实, HT 患者、HT 合并 PTC 患者中相同肿瘤标志物的阳性表达情况存在明显差异, HT 组相对低表达^[2]); (3) 无乳腺、子宫相关疾病病史 (有文献证实 CD44v6 在乳腺癌、子宫内膜癌中高表达^[3,4], 为保证实验结果的准确性, 入组患者中剔除乳腺癌、子宫内膜癌); (4) 无内分泌相关疾病病史 (甲状腺功能与激素水平相关, 为保证结果准确性, 入组患者中剔除内分泌相关疾病患者); (5) 无其他恶性肿瘤病史; (6) 无严重的心脑血管疾病; (7) 各项临床资料完整。

1.3 主要试剂

兔抗人锌指蛋白 703 抗体 (1:100) 购自北京博

奥森生物技术有限公司, 小鼠抗人 CD44v6 单克隆抗体 (1:200) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司, SP 试剂盒和 DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.4 免疫组化技术

实验采用 SP 法, 即链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结法。将蜡块连续切成 $4\mu\text{m}$ 厚度, 置于 68°C 烤片机烤片 20min; 常规二甲苯脱蜡、梯度酒精脱水; 阻断灭活内源性过氧化物酶 ($3\% \text{H}_2\text{O}_2$ 孵育后 PBS 冲洗); 抗原修复 (标本置于 pH 为 6.0 的枸橼酸缓冲液中); 血清工作液封闭 30min; 分别滴加 ZNF703 (1:100) 和 CD44v6 (1:200) 同时用 PBS 做阴性对照, 4°C 孵育过夜; 滴加通用型 IgG, 置于 37°C 温箱孵育 30min; 滴加辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素工作液, 置于 37°C 温箱 15min; DAB/ H_2O_2 反应染色; 苏木素复染; 脱水、干燥、封片。

1.5 结果判定

切片染色结果由两名高年资病理科医师进行双盲阅片。ZNF703 主要在细胞核和细胞质中表达; CD44v6 主要在细胞膜中表达。每个免疫组化切片随机选取 5 个高倍视野 ($\times 400$) 并取平均值, 通过计算阳性细胞表达百分比和阳性细胞显色程度, 进行 ZNF703 和 CD44v6 表达结果评分。阳性细胞百分比评分标准: $< 5\%$ 计 0 分, $5\% \sim 25\%$ 计 1 分, $25\% \sim 50\%$ 计 2 分, $50\% \sim 75\%$ 计 3 分, $> 75\%$ 计 4 分; 阳性细胞显色程度评分标准: 不显色或显色不清计 0 分, 浅黄色计 1 分, 棕黄色计 2 分, 深褐色计 3 分。采用 Remmele 半定量方法, 阳性细胞百分比和显色程度的乘积, 0~1 分计 (-), 2~4 分计 (+), 5~8 分计 (++), > 9 分计 (+++), (+)~(+++) 为阳性表达。

1.6 统计学处理

采用 SPSS22.0 对实验数据进行统计学处理, 计数资料采用 χ^2 检验; 两变量间的相关性分析采用 Spearman 等级相关分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ZNF703 和 CD44v6 在不同甲状腺组织中的表达

ZNF703 的阳性表达定位于细胞核和细胞质。免疫组化结果显示, 其在不同甲状腺组织中均有表达 (Figure 1)。阳性表达率: 甲癌组为 67.5% (27/40), 癌

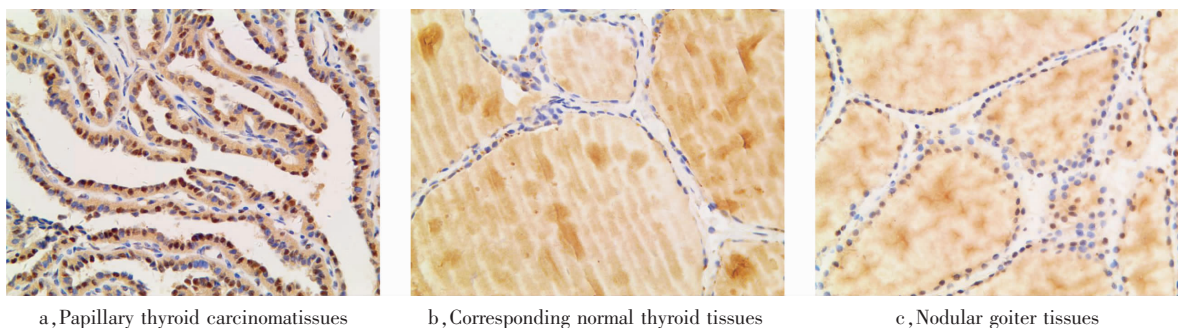


Figure 1 The expression of ZNF703 in different thyroid tissues($\times 400$)

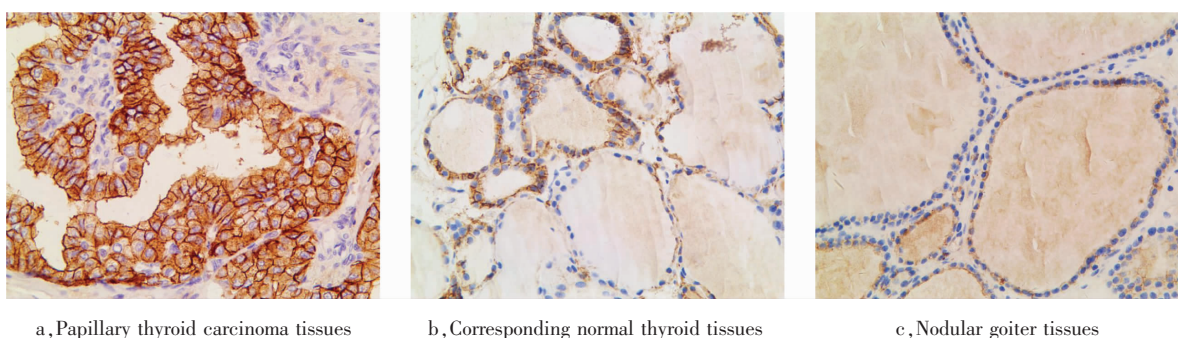


Figure 2 The expression of CD44v6 in different thyroid tissues($\times 400$)

旁组为 7.5% (3/40), 结甲组为 30.0% (9/30), 三组间差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

CD44v6 的阳性表达定位于细胞膜 (Figure 2)。阳性表达率: 甲癌组为 75.0% (30/40), 癌旁组为 10.0% (4/40), 结甲组为 13.3% (4/30), 三组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见 Table 1。

2.2 甲状腺癌组织中 ZNF703 和 CD44v6 表达与临床病理特征的关系

ZNF703 和 CD44v6 的表达均与肿瘤分期、淋巴结转移有关 ($P < 0.05$), 均与患者性别、年龄无关 ($P > 0.05$); ZNF703 的表达与肿瘤直径相关 ($P < 0.05$), 而 CD44v6 表达与肿瘤直径无关 ($P > 0.05$)。见 Table 2。

2.3 ZNF703 和 CD44v6 在甲状腺乳头状癌组织中的表达相关性

Spearman 等级相关分析显示, ZNF703 和 CD44v6 在甲状腺乳头状癌组织的表达呈正相关 ($r = 0.462, P < 0.05$)。见 Table 3。

Table 1 The expressions of ZNF703 and CD44v6 in different thyroid tissues

Group	n	ZNF703		CD44v6	
		Positive	Negative	Positive	Negative
Papillary thyroid cancer	40	27	13	30	10
Corresponding normal thyroid tissues	40	3	37	4	36
Nodular goiter	30	9	21	4	26
χ^2	—	45.579		31.999	
P	—	<0.01		<0.01	

3 讨论

随着科技的进步, 甲状腺癌的诊断率逐渐增高, 大多数患者经过积极的手术治疗都能获得较好的预后, 但是患者仍存在复发的风险, 据统计, 约有 20% 的患者面临二次手术。因此, 早发现、早诊断、早治疗的重要性就更加显著。积极探索发现与甲状腺癌相关的新的蛋白及不同蛋白间的相关性, 将有助于甲状腺癌的早期诊断。

锌指蛋白 (ZNF) 是一类具有手指状结构域的转录因子, 其基因位于 8 号染色体, 根据其保守结构域的不同, 可以分为 C2H2 型、C4 型和 C6 型。其可以选择性结合特异的靶结构, 使锌指蛋白在基因的表

Table 2 The relationship of ZNF703 and CD44v6 expression with clinicopathological features of papillary thyroid carcinoma

Index	n	ZNF703				CD44v6			
		Positive case	Positive rate(%)	χ^2	P	Positive case	Positive rate(%)	χ^2	P
Gender									
Male	10	8	80.0	0.95	0.33	9	90.0	1.600	0.206
Female	30	19	63.3			21	70.0		
Age(years)									
<55	20	12	60.0	1.026	0.311	14	70.0	0.533	0.465
≥55	20	15	75.0			16	80.0		
Clinical stages									
I, II	22	11	50.0	6.825	0.009	13	59.1	6.599	0.01
III, IV	18	16	88.9			17	94.4		
Lymphatic metastasis									
Yes	22	18	56.3	4.569	0.033	20	90.9	6.599	0.01
No	18	9	50.0			10	55.6		
Diameter of tumor(cm)									
≤1.0	23	12	52.2	5.794	0.016	15	65.2	2.762	0.097
>1.0	17	15	88.2			15	88.2		

Table 3 The relationship between ZNF703 and CD44v6 expression

ZNF703	CD44v6		Total	r	P
	Negative	Positive			
Negative	7	6	13	0.462	0.003
Positive	3	24	27		
Total	10	30	40		

达调控、细胞分化、胚胎发育等生命过程中发挥重要作用。目前 ZNF 已被证实存在肺癌、胆管癌等的组织中有较高表达^[5,6]。而锌指蛋白 703(ZNF703)是锌指蛋白家族新发现的蛋白因子,有研究表明,ZNF703 可以和人体组织内的相关蛋白组成复合物,从而发挥其调控细胞增殖、分化和周期的作用^[7]。人体 CD44 是一种细胞表面跨膜糖蛋白,主要参与异质性黏附,即肿瘤细胞与宿主细胞和宿主基质的黏附,在肿瘤细胞的增殖和浸润转移中发挥作用。其基因位于 11 号染色体短臂,由 20 个高度保守的外显子组成,依据外显子转录方式的不同分为组成型外显子(C)和变异型拼接外显子(V)两大类。而 CD44v6 被证实在胃癌和乳腺癌等中具有较高的表达^[8]。

本实验结果提示,ZNF703 在癌旁组(7.5%)、结甲组(30.0%)和甲癌组(67.5%)的阳性表达率和显色程度逐渐增加,且差异具有统计学意义。Zhang 等^[9]对 127 例乳腺癌患者组织内的 ZNF703 进行检测发现,其在癌灶中的表达阳性率高达 91.3%。Yang 等^[10]

研究发现,在头颈部鳞状细胞癌中,癌组织和癌旁组织中 ZNF703 的阳性率(48.6%、11.6%)差异有统计学意义。同时,本实验结果提示,CD44v6 在癌旁组(10.0%)、结甲组(13.3%)和甲癌组(75.0%)的阳性表达率和显色程度逐渐增加,且差异具有统计学意义。Monteiro 等^[11]和 Wu 等^[12]研究发现口腔癌和甲状腺癌组织中的 CD44v6 呈高表达。综上,ZNF703 和 CD44v6 在甲状腺癌中呈高表达,且随

着癌变的过程进展,其表达也逐渐增强。因此,早期检测甲状腺癌可以患者组织中的 ZNF703 和 CD44v6 表达情况将有利于提高早期甲状腺癌的诊断率。

此外,实验结果提示,甲状腺癌组织中 ZNF703 和 CD44v6 的表达均与淋巴结转移、分期有关,在有淋巴结转移患者、分期较高患者的甲状腺组织出现更高表达(淋巴结转移:ZNF703 81.8%、CD44v6 91.0%;Ⅲ~Ⅳ期 ZNF703 88.9%、CD44v6 94.4%)。肿瘤直径在 ZNF 蛋白表达过程中,提示差异有统计学意义,在 CD44v6 中差异无统计学意义。CD44v6 的表达与肿瘤直径无关,该结果与现有文献结论有差异,考虑可能与本实验例数少,实验操作者技术不够熟练有关。ZNF703 和 CD44v6 的表达情况均与患者的性别和年龄无关。Okayama 等^[13]研究发现 CD44v6 在胃癌组织中高表达,且阳性表达与肿瘤分期和淋巴结转移呈正相关,与患者的年龄、性别无关。Reynisdottir 等^[14]在基因水平对乳腺癌患者病变组织中的 ZNF703 表达情况进行研究,证明 ZNF703 高表达的患者预后更差。Yang 等^[15]利用细胞系模型,对 120 例胃癌患者的病变组织进行研究发现 ZNF703 在发生转移的胃癌组织中有更高的表达。综上,ZNF703 和 CD44v6 表达程度越高的患者,提示发生肿瘤转移和复发的可能性更大。

最后,本实验结果提示 ZNF703 和 CD44v6 在甲

状腺癌组织中的表达呈正相关 ($r=0.462, P=0.003$)。ZNF 是含有锌指结构的 DNA 结构域, 该结构域与 DNA 双螺旋结构相结合, 其次, 某些 ZNF 还可以识别 RNA。ZNF 主要位于细胞核和细胞质中, 而 CD44v6 是位于细胞膜上的一种表明跨膜糖蛋白。依据两种蛋白位于细胞内的位置和其各自的功能, 推断两种蛋白在甲状腺癌组织中的表达可能存在协调作用, 共同促进了甲状腺癌的发生、发展。

综上所述, ZNF703 和 CD44v6 在甲状腺癌组织中高达表达, 且两者之间存在正相关关系, 因此, 联合检测将有助于提高早期甲状腺癌的诊断率。

参考文献:

- [1] Siraj AK, Hussain AR, Alrasheed M, et al. Demethylation of TMS1 gene sensitizes thyroid cancer cells to TRAIL-induced apoptosis[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2011, 96(1): E215-E224.
- [2] Shi YQ, Qu J, Wang XY, et al. Expression of RAS, Gal-3, CK-19 and its clinical significance in patients with Hashimoto's thyroiditis complicated with papillary thyroid carcinoma [J]. Internal Medicine of China, 2017, 12(2): 161-163, 170.[石毅琼, 瞿旻, 王昕钰, 等. 桥本甲状腺炎合并乳头状甲状腺癌患者 RAS、Gal-3 和 CK-19 的表达及临床意义[J]. 内科, 2017, 12(2): 161-163, 170.]
- [3] Huang W, Meng G, Chen Q. Expression and clinical significance of OPN, CD44v6 and CD10 in human breast cancer [J]. Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2016, 32(1): 23-28.[黄雯, 孟刚, 陈青. 乳腺癌中 OPN、CD44v6 及 CD10 的表达及其临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2016, 32(1): 23-28.]
- [4] Lin RF. Expression and clinical significance of COX-2, CD44V6 and Bcl-2 in human endometrial cancer tissue[J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2013, 20(15): 1172-1174.[林瑞芳. 人子宫内膜癌组织 COX-2 和 CD44V6 及 Bcl-2 表达临床意义分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2013, 20(15): 1172-1174.]
- [5] Baykara O, Dalay N, Kaynak K, et al. ZNF703 Overexpression may act as an oncogene in non-small cell lung cancer[J]. Cancer Med, 2016, 5(10): 2873-2878.
- [6] Li K, Wang J, Han J, et al. Overexpression of ZNF703 facilitates tumorigenesis and predicts unfavorable prognosis in patients with cholangiocarcinoma [J]. Oncotarget, 2016, 7(46): 76108-76117.
- [7] Sircoulomb F, Nicolas N, Ferrari A, et al. ZNF703 gene amplification at 8p12 specifies luminal B breast cancer[J]. Embo Molecular Medicine, 2011, 3(3): 153-166.
- [8] Xie JW, Chen PC, Zheng CH, et al. Evaluation of the prognostic value and functional roles of CD44v6 in gastric cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2015, 141(10): 1809-1817.
- [9] Zhang X, Mu X, Huang O, et al. Luminal breast cancer cell lines overexpressing ZNF703 are resistant to Tamoxifen through activation of Akt/mTOR signaling [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e72053-e72053.
- [10] Yang H, Jiang WQ, Cao Y, et al. Elevated ZNF703 Protein expression is an independent unfavorable prognostic factor for survival of the patients with head and neck squamous cell carcinoma[J]. Dis Markers, 2015, 2015(7): 640263.
- [11] Monteiro L, Delgado M, Ricardo S, et al. Prognostic significance of CD44v6, p63, podoplanin and MMP-9 in oral squamous cell carcinomas[J]. Oral Dis, 2016, 22(4): 303-312.
- [12] Wu G, Zhou Y, Li T, et al. Immunohistochemical levels of matrix metalloproteinase-2 and CD44 variant 6 protein in the diagnosis and lateral cervical lymph node metastasis of papillary thyroid carcinoma.[J]. J Int Med Res, 2013, 41(3): 816-824.
- [13] Okayama H, Kumamoto K, Saitou K, et al. CD44v6, MMP-7 and nuclear Cdx2 are significant biomarkers for prediction of lymph node metastasis in primary gastric cancer[J]. Oncol Rep, 2009, 22(4): 745-755.
- [14] Reynisdottir I, Arason A, Einarsdottir BO, et al. High expression of ZNF703 independent of amplification indicates worse prognosis in patients with luminal B breast cancer [J]. Cancer Med, 2013, 2(4): 437-446.
- [15] Yang G, Ma F, Zhong M, et al. ZNF703 acts as an oncogene that promotes progression in gastric cancer[J]. Oncol Rep, 2014, 31(4): 1877-1882.