

肝再生磷酸酶-3在甲状腺乳头状癌中的表达及意义

秦瑞浩,沈美萍*,屠燕

(南京医科大学第一附属医院普外科,江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**观察肝再生磷酸酶-3(phosphatase of regenerating liver 3,PRL-3)在甲状腺乳头状癌中的表达情况,并分析PRL-3的表达与各种临床病理特征的关系及意义。**方法:**应用 real-time PCR 及免疫组化 SP 法探索 PRL-3 mRNA 及蛋白在甲状腺乳头状癌原发灶、癌旁组织、淋巴结转移灶中的表达情况。**结果:**PRL-3 mRNA 在原发灶及淋巴结转移灶中的表达均明显高于癌旁组织($P < 0.05$),PRL-3 蛋白的阳性率在原发灶及淋巴结转移灶高于癌旁组织 ($P < 0.05$)。原发灶组织中 PRL-3 的阳性率在有淋巴结转移组高于无淋巴结转移组 ($P < 0.05$),肿瘤直径 > 2 cm 的阳性率高于肿瘤直径 ≤ 2 cm ($P < 0.05$)。**结论:**PRL-3 与甲状腺乳头状癌的肿瘤大小及淋巴结转移密切相关。PRL-3 在甲状腺乳头状癌中的高表达可以预测淋巴结转移,有望成为预测甲状腺乳头状癌淋巴结转移的分子标志物。

[关键词] 甲状腺乳头状癌;肝再生磷酸酶-3;淋巴结转移

[中图分类号] Q786;R736.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)03-342-04

doi:10.7655/NYDXBNS20130311

Expression and Significance of PRL-3 in thyroid papillary carcinoma

Qin Ruihao, Shen Meiping*, Tu Yan

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate expression and significance of PRL-3 in thyroid papillary carcinoma and its relationship with clinicopathologic features. **Methods:** The expression of PRL-3 in primary thyroid papillary carcinoma, the adjacent non-tumor tissues and lymph node metastasis of the thyroid papillary cancer (LMNs) were detected by Real-time PCR and SP immunohistochemistry. **Results:** The transcription expression of PRL-3 mRNA was higher in primary thyroid papillary carcinoma or LMNs than in the adjacent non-tumor tissues ($P < 0.05$). The positive expression rates of PRL-3 were also higher in primary thyroid papillary carcinoma and LMNs than in the adjacent non-tumor tissues ($P < 0.05$). The positive rates of PRL-3 protein were higher in primary thyroid papillary carcinoma with lymph node metastasis than in primary thyroid papillary carcinoma without lymph node metastasis ($P < 0.05$). The positive rates of PRL-3 were higher in tumor of size > 2 cm than in tumor of size ≤ 2 cm ($P < 0.05$). **Conclusion:** The expression of PRL-3 is closely related to the tumor size and lymph node metastasis. The high expression of PRL-3 in PTC may forecast the lymph node metastasis, and it may be a molecular marker to predict lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma.

[Key words] thyroid papillary carcinoma; PRL-3; lymph node metastasis

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(3): 342-345]

甲状腺癌是最常见的内分泌恶性肿瘤之一,分为4种类型,包括乳头状癌、滤泡状癌、髓样癌、未分化癌,其中乳头状癌最为常见,占总数的70%~80%,虽然乳头状癌具有生长缓慢,预后较好等特点,但是乳头状癌容易出现淋巴结转移,且淋巴结转移是乳

头状癌治疗的关键和影响复发的主要因素,因此深入研究与淋巴结转移的相关基因及其机制成为甲状腺乳头状癌研究的一项重要内容。肝再生磷酸酶-3(phosphatase of regenerating liver 3,PRL-3)是肝再生磷酸酶家族的一员,目前已证实其与多种癌的发生、发展及转移密切相关,尤其在肿瘤转移中有重要作用。但PRL-3在甲状腺乳头状癌内的研究尚未有报道,本文用 real-time PCR 及免疫组化2种方法检测 PRL-3 mRNA 和蛋白在甲状腺乳头状癌原发灶、

[基金项目] 江苏省科技厅国际科技合作计划国际产学研合作项目(BZ2009053)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: nj_shenmp@sina.com

癌旁组织、淋巴结转移灶中的表达情况,目的在于探讨 PRL-3 在甲状腺乳头状癌中的表达及与淋巴结转移的关系,并分析其与各种临床特征之间的关系及意义。

1 材料和方法

1.1 材料

real-time PCR 标本:选取南京医科大学第一附属医院 2009~2010 年 32 例甲状腺乳头状癌患者的组织标本,标本用液氮保存,包括 32 个原发灶组织,32 个癌旁组织及 16 个淋巴结转移灶组织。

免疫组化标本:另选取南京医科大学第一附属医院 2009~2010 年 60 例甲状腺乳头状癌患者的组织标本,标本用石蜡保存,包括 60 个原发灶组织,60 个癌旁组织,28 个淋巴结转移灶组织,其中女 46 例,男 14 例,年龄在 11~70 岁。

所有标本统计资料完整,经患者知情同意后取得,所有患者术前未经任何治疗,均经组织病理学确诊。

TRIzol、逆转录试剂盒、SYBR Green 荧光染料试剂盒(TaKaRa 公司,日本),PCR 引物(Invitrogen 公司,美国),PRL-3 兔抗人多克隆抗体(Abcam 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 real-time PCR 法

按 TRIzol 试剂盒说明方法提取组织总 RNA,紫外分光光度法测定 RNA 纯度及浓度, RNA 纯度在 1.8~2.0 最佳,1.2%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。引用文献 PRL-3 引物^[1],PRL-3 上游引物序列 5'-GGGACTTCTCAGGTCGTGTC-3',下游引物序列 5'-AGCCCCGTACTTCTTCAGGT-3',产物片段大小为 198 bp。选人的 GAPDH 为内参,GAPDH 上游引物序列 5'-GACCTGACCTGCCGTCTA-3',下游引物序列 5'-AGGAGTGGGTGTCGCTGT-3',产物大小 148bp。普通 PCR 检测最佳退火温度及最佳循环数以优化 PCR 条件,降低引物二聚体的生成。荧光定量 PCR 步骤严格按照荧光定量 PCR 试剂盒说明书进行,荧光定量 PCR 反应条件:94°C 5 min,94°C 30 s,60°C 30 s,72°C 30 s,共 39 个循环。

1.2.2 免疫组化 SP 法

组织标本均经 10%中性福尔马林液固定,石蜡包埋,4 μm 厚切片,抗原经 EDTA pH8.0 高压锅煮沸抗原修复,DAB 显色,苏木精对比染色,中性树脂封固^[2]。免疫组化整个步骤按照试剂盒说明书进

行,缓冲液代替一抗做阴性对照,结肠癌组织做阳性对照。

免疫组化结果判定:PRL-3 蛋白免疫组化染色阳性信号定位于胞浆,呈棕黄色。PRL-3 的染色评分标准如下:未染色或肿瘤细胞染色<10%为 0 分,≥10%肿瘤细胞呈淡染为 1 分,≥10%肿瘤细胞呈中等染色为 2 分,≥10%肿瘤细胞呈强染色为 3 分。0 分和 1 分为阴性表达,2 分和 3 分为阳性表达^[3]。

1.3 统计学方法

统计学软件采用 SPSS18.0,得到 real-time PCR 结果后先计算各样本的 ΔCT 值, $\Delta CT = (CT_{\text{待测样本}} - CT_{\text{内参}})$,然后计算 $2^{-\Delta\Delta CT}$,统计学方法采用配对样本 *t* 检验,免疫组化采用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 real-time PCR 结果

32 例患者的原发灶与其癌旁组织相比,原发灶的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值为 3.139 ± 3.201 ,癌旁的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值为 1.326 ± 1.023 ,其中 23 例 PRL-3 mRNA 在原发灶高于其癌旁组织,配对样本 *t* 检验 $t = 3.464$, $P = 0.002$,差异有统计学意义。16 例患者的淋巴结转移灶与其癌旁相比,淋巴结转移灶的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值为 2.500 ± 2.396 ,癌旁的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值为 0.999 ± 0.638 ,其中的 12 例 PRL-3 mRNA 在淋巴结转移灶高于其癌旁组织,配对样本 *t* 检验 $t = 2.600$, $P = 0.02$,差异也有统计学意义。16 例患者的原发灶与淋巴结转移灶之间无统计学差异。

2.2 PRL-3 在癌旁、原发灶、淋巴结转移灶中表达

PRL-3 阳性表达呈棕黄色颗粒,主要定位于细胞胞浆,PRL-3 癌旁组织、原发灶及淋巴结转移灶中的阳性率依次升高,分别是 16.7%(10/60)、45.0%(27/60)、64.3%(18/28),原发灶及淋巴结转移灶中的阳性率高于癌旁组织,差异有统计学意义($P < 0.05$),原发灶与淋巴结转移灶之间无统计学差异(表 1)。PRL-3 在癌旁组织虽有 10 例表达,但为散在阳性,其余呈阴性表达,而在乳头状癌原发灶及淋巴结转移灶中多呈弥漫阳性(图 1)。

2.3 PRL-3 的表达与各种临床参数的关系

进一步对 PRL-3 的表达与淋巴结转移及各种临床参数进行分析,将原发灶按有无淋巴结转移分为有淋巴结转移组 28 例,无淋巴结转移组 32 例,结果表明有淋巴结转移组阳性率为 67.9%(19/28),无淋巴结转移组阳性率为 25.0%(8/32),两者之

表1 PRL-3在甲状腺乳头状癌原发灶、癌旁组织、淋巴结转移灶的表达情况

Table 1 The expression of PRL-3 protein in primary thyroid papillary carcinoma, the adjacent non-tumor tissues and lymph node metastasis

组织类型	n	PRL-3 表达		阳性率(%)
		阳性	阴性	
癌旁组织	60	10	50	16.7
原发灶	60	27	53	45.0*
淋巴结转移灶	28	18	10	64.3*

与癌旁组织比较, * $P < 0.05$ 。

间差异有统计学意义($P < 0.05$, 表2)。另外对其他临床参数进行了统计分析, 结果 PRL-3 的表达与患者的年龄、性别、临床分期无关, 而肿瘤直径 > 2 cm 的原发灶的阳性率 74.1% (20/27) 明显高于肿瘤直径 ≤ 2 cm 的阳性率 21.2% (7/33) ($P < 0.05$, 表2), 差异有统计学意义。

3 讨论

肝再生磷酸酶(PRL)属于酪氨酸磷酸酶家族的成员, 其中包括 PRL-1、PRL-2、PRL-3, 2001年

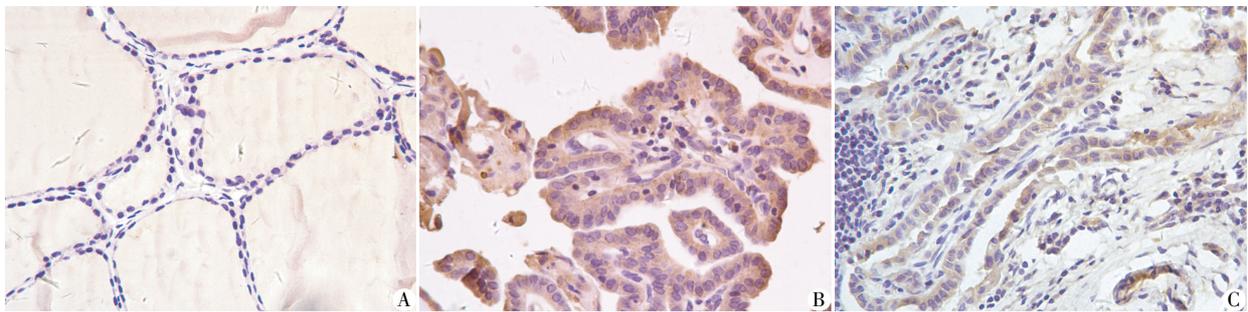


图1 免疫组化检测 PRL-3 在甲状腺癌旁组织(A)、原发灶(B)、淋巴结转移灶(C)中的表达(SP, $\times 400$)

Figure 1 The expression of PRL-3 protein in adjacent non-tumor tissues(A), primary thyroid papillary carcinoma(B), the lymph node metastasis(C) of the thyroid papillary cancer by immunohistochemistry(SP, $\times 400$)

表2 PRL-3在甲状腺乳头状癌的表达与临床病理特征之间的关系

Table 2 Relationship between PRL-3 expression in primary thyroid papillary carcinoma and clinic pathologic features of PTC

临床参数	n	PRL-3 表达		阳性率(%)	P 值
		阳性	阴性		
年龄					
<45 岁	26	12	14	46.2	0.875
≥ 45 岁	34	15	19	44.1	
性别					
男	14	6	8	42.9	0.854
女	46	21	25	45.7	
肿瘤直径					
≤ 2 cm	33	7	26	21.2	< 0.001
> 2 cm	27	20	7	74.1	
淋巴结转移					
无	32	8	24	25.0	0.001
有	28	19	9	67.9	
临床分期					
I、II 期	45	17	28	37.8	0.051
III、IV 期	15	10	5	66.7	

Saha 等^[4]在对结肠癌研究表明 PRL-3 在结肠癌肝转移中高表达, 而在正常结肠黏膜上皮及结肠癌

原发灶中低表达或不表达, 因此证明 PRL-3 与结肠癌转移密切相关。从此 PRL-3 与肿瘤的相关性研究开始受到了广泛的关注, 研究发现 PRL-3 在卵巢癌^[5]、肝内胆管癌^[6]、食管癌^[7]等多种肿瘤中高表达。且实验证明下调 PRL-3 表达后降低了肿瘤细胞的侵袭和移动能力^[8]。在肝细胞癌、胃癌的研究中还发现 PRL-3 的高表达与预后不良相关^[9-10]。PRL-3 的高表达与胃癌的复发也有相关性^[11]。本研究在 mRNA 及蛋白水平检测了 PRL-3 在甲状腺乳头状癌原发灶、癌旁组织及淋巴结转移灶中的表达情况, 研究结果表明, 在甲状腺乳头状癌中 PRL-3 mRNA 及蛋白在原发灶及淋巴结转移灶中的表达都明显高于癌旁组织, 首次证明了 PRL-3 在甲状腺乳头状癌中呈高表达。

甲状腺乳头状癌容易出现淋巴结转移, 有文献报道肿瘤的淋巴结转移与 PRL-3 表达存在密切相关性^[13]。本实验结果表明有淋巴结转移组 PRL-3 表达的阳性率明显高于无淋巴结转移组, 提示 PRL-3 与甲状腺乳头状癌的淋巴结转移也有密切联系。我们又进一步分析了 PRL-3 表达与临床特征的关系, 实验结果显示 PRL-3 的表达与年龄、性别及临床分期无相关性, 而肿瘤直径 > 2 cm 的原发灶的阳性率

明显高于肿瘤直径 ≤ 2 cm 的阳性率,差异有统计学意义,这提示 PRL-3 的表达与肿瘤的大小存在相关性。以往在黑色素瘤实验动物模型中发现 PRL-3 的表达与肿瘤大小相关,而体外细胞实验未发现 PRL-3 的表达与肿瘤细胞的增殖相关,因此推测 PRL-3 促进肿瘤生长可能与其促进肿瘤血管生成有关^[8]。在肺癌的研究中发现,PRL-3 通过增强 RhoA、RhoC 活性及 ERK 的磷酸化促进了 VEGF 的表达,从而诱导了肿瘤微血管的生成^[13],但到目前为止 PRL-3 促进肿瘤生长和转移的机制尚不完全清楚。鼻咽癌研究中发现 PRL-3 在临床 III、IV 期表达的阳性率高于 I、II 期,差异有统计学意义^[14],而本实验结果中显示 PRL-3 的表达与甲状腺乳头状癌临床分期无相关性,分析原因可能与临床病例数较少有关。

近年 PRL-3 作为一种肿瘤的靶向治疗位点受到了广泛关注,在食管癌、胃癌研究中发现下调 PRL-3 表达后明显降低了肿瘤细胞的增殖和侵袭性,PRL-3 抑制剂 1-4-溴-2-苯亚甲基绕丹宁同样降低了肿瘤细胞的侵袭性,且促进了肿瘤细胞的凋亡^[12,15],这些结果表明 PRL-3 有望成为肿瘤治疗的靶点,且随着 PRL-3 抑制剂的研究,PRL-3 作为靶点在以后的肿瘤治疗中有可能发出重要作用。目前甲状腺乳头状癌主要通过手术、放射性碘及内分泌治疗,PRL-3 抑制剂的研究可能为甲状腺乳头状癌治疗提供又一个新的选择,尤其在伴有淋巴结转移患者术后复发的预防方面,值得进一步研究。

[参考文献]

[1] Matsukawa Y, Semba S, Kato H, et al. Constitutive suppression of PRL-3 inhibits invasion and proliferation of gastric cancer cell in vitro and in vivo [J]. *Pathobiology*, 2010, 77(3): 155-162

[2] 刘柳, 沈美萍, 马晔. 血管内皮生长因子-C 在分化型甲状腺癌中的表达及意义 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2012, 32(5): 686-689

[3] Wang L, Peng L, Dong B, et al. Overexpression of phosphatase of regenerating liver-3 in breast cancer: association with a poor clinical outcome [J]. *Ann Oncol*, 2006, 17(10): 1517-1522

[4] Saha S, Bardelli A, Buckhaults P, et al. A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer [J]. *Science*, 2001, 294(5545): 1343-1346

[5] Ren T, Jiang B, Xing X, et al. Prognostic significance of phosphatase of regenerating liver-3 expression in ovarian cancer [J]. *Pathol Oncol Res*, 2009, 15(4): 555-560

[6] Xu Y, Zhu M, Zhang S, et al. Expression and prognostic value of PRL-3 in human intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Pathol Oncol Res*, 2010, 16(2): 169-175

[7] Liu YQ, Li HX, Lou X, et al. Expression of phosphatase of regenerating liver 1 and 3 mRNA in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2008, 132(8): 1307-1312

[8] Qian F, Li YP, Sheng X, et al. PRL-3 siRNA inhibits the metastasis of B16-BL6 mouse melanoma cells in vitro and in vivo [J]. *Mol Med*, 2007, 13(3-4): 151-159

[9] Mayinuer A, Yasen M, Mogushi K, et al. Upregulation of protein tyrosine phosphatase type IVA member 3 (PTP4A3/PRL-3) is associated with tumor differentiation and a poor Prognosis in Human Hepatocellular Carcinoma [J]. *Ann Surg Oncol*, 2013, 20(1): 305-317

[10] Dai N, Lu AP, Shou CC, et al. Expression of phosphatase regenerating liver 3 is an independent prognostic indicator for gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(12): 1499-1505

[11] Bilici A, Ustaalioglu BB, Yavuzer D, et al. Prognostic significance of high phosphatase of regenerating liver-3 expression in patients with gastric cancer who underwent curative gastrectomy [J]. *Dig Dis Sci*, 2012, 57(6): 1568-575

[12] Ooki A, Yamashita K, Kikuchi S, et al. Phosphatase of regenerating liver-3 as a convergent therapeutic target for lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(3): 543-554

[13] Ming J, Liu N, Gu Y, et al. PRL-3 facilitates angiogenesis and metastasis by increasing ERK phosphorylation and up-regulating the levels and activities of Rho-A/C in lung cancer [J]. *Pathology*, 2009, 41(2): 118-126

[14] Zhou J, Wang S, Lu J, et al. Over-expression of phosphatase of regenerating liver-3 correlates with tumor progression and poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(8): 1879-1886

[15] Ooki A, Yamashita K, Kikuchi S, et al. Therapeutic potential of PRL-3 targeting and clinical significance of PRL-3 genomic amplification in gastric cancer [J]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 122

[收稿日期] 2012-11-19