

## HSP70 与 TNF- $\alpha$ 在甲状腺癌组织中的表达及其与临床病理分期关系的研究

苏波<sup>1</sup>, 云鹏<sup>2</sup>, 张晓<sup>3\*</sup>, 刘燕青<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>长江大学医学院病理学教研室, <sup>2</sup>临床医学院内分泌科, 湖北 荆州 434023; <sup>3</sup>南京医科大学卫生部抗体技术重点实验室, 江苏 南京 210029; <sup>4</sup>长江大学临床医学院耳鼻喉头颈外科, 湖北 荆州 434023)

**[摘要]** 目的:探讨热休克蛋白70(heat shock protein 70, HSP70)与肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )在甲状腺癌组织中的表达及其与临床病理特征的关系。方法:采用 RT-PCR 以及 Western blot 技术检测对比 40 例甲状腺癌组织、20 例甲状腺良性病变组织以及 15 例正常甲状腺组织中 HSP70、TNF- $\alpha$  的表达情况,并分析 HSP70 表达水平与甲状腺癌临床病理学特征的关系。结果:3 组人群组织中 HSP70 mRNA 水平比较差异有统计学意义( $P < 0.001$ ),甲状腺癌组织中 HSP70 mRNA 水平显著高于正常甲状腺组织以及甲状腺良性病变组织( $P$  均  $< 0.05$ );HSP70 mRNA 的表达水平与甲状腺癌组织病理分级显著相关( $r_s = 0.810, P < 0.05$ );甲状腺癌组织中 HSP70 蛋白水平显著高于正常甲状腺组织( $P < 0.05$ );3 组人群中 TNF- $\alpha$  mRNA 水平比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),甲状腺癌组织中 TNF- $\alpha$  mRNA 水平显著高于正常甲状腺组织以及甲状腺良性病变组织( $P$  均  $< 0.05$ )。结论:HSP70、TNF- $\alpha$  在甲状腺癌组织中的表达升高,且 HSP70 与甲状腺癌组织病理分级明显相关,提示 HSP70 在甲状腺癌发生发展中发挥重要的作用。

**[关键词]** HSP70; TNF- $\alpha$ ; 甲状腺癌; 病理

**[中图分类号]** R736.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)12-1698-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20131211

### The expression of HSP70 and TNF- $\alpha$ in thyroid cancer tissues and its relationship with clinicopathological characteristics

Su Bo<sup>1</sup>, Yun Peng<sup>2</sup>, Zhang Xiao<sup>3\*</sup>, Liu Yanqing<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>Department of Pathology, <sup>2</sup>Endocrine Department of Clinic Medical College, Medicine School of Yangtze University, Jingzhou 434023; <sup>3</sup>Key Laboratory of Antibody Technique, Ministry of Health, NJMU, Nanjing 210029; <sup>4</sup>Otolaryngological Department of Clinic Medical College, Yangtze University, Jingzhou 434023, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the HSP70 and TNF- $\alpha$  levels in thyroid cancer tissues and its relationship with clinicopathological characteristics of patients. **Methods:** We used RT-PCR and Western blot to detect HSP70 and TNF- $\alpha$  expression in 40 cases of thyroid cancer, 20 cases of benign thyroid lesions and 15 cases of normal thyroid tissue and analyzed the relationship between HSP70 gene expression level and thyroid carcinoma pathological features. **Results:** The differences of the HSP70 mRNA levels among three groups were statistically significant ( $P < 0.001$ ), and the HSP70 mRNA levels in thyroid carcinomas were significantly higher than that in normal thyroid tissue and benign thyroid lesions ( $P < 0.05$ ); The HSP70 protein levels in thyroid carcinoma were significantly higher than that in normal thyroid tissue ( $P < 0.05$ ); HSP70 mRNA expression level was significantly correlated with the thyroid cancer histological grade ( $r_s = 0.810, P < 0.05$ ); The differences of TNF- $\alpha$  mRNA level among three groups were significant ( $P < 0.05$ ), and further study showed that thyroid carcinoma TNF- $\alpha$  mRNA levels were significantly higher than that in normal thyroid tissue as well as benign thyroid lesions ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Both HSP70 and TNF- $\alpha$  expression were increased in the thyroid carcinoma tissues, and the level of HSP70 expression was correlated with the thyroid cancer histological grade, suggesting that HSP70 plays a critical role in the thyroid cancer developing.

**[基金项目]** 南京医科大学科技发展基金(2011NJMU177)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: 1262620189@qq.com

[Key words] HSP70; TNF- $\alpha$ ; thyroid cancer; pathology

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(12): 1698-1701]

甲状腺癌是头颈部最常见的恶性肿瘤,多数呈低度恶性,大部分经外科手术和<sup>131</sup>I照射治疗后预后较好。甲状腺癌的组织起源不同,临床表现及生物学特征具有多样性,且其局部侵袭性和颈部淋巴结转移率较高,因此临床上对其生物学相关机制的探讨一直是甲状腺肿瘤研究领域中的重点<sup>[1]</sup>。热休克蛋白(HSPs)是细胞应激原如环境高温诱导下所生成的一组重要的蛋白质,具有多种生物学功能,与肿瘤的发生、发展及肿瘤耐药性的产生等都有密切联系<sup>[2-4]</sup>。HSP70 家族是细胞内含量最多的一种 HSPs, HSP70 作为一种重要的蛋白参与肿瘤细胞增殖的转录调控,近年来研究表明其在多种肿瘤中异常表达<sup>[4-5]</sup>。本研究对本院甲状腺癌患者的病理组织中的 HSP70 表达水平进行检测,旨在探讨其在甲状腺癌发生、发展中的作用,为评估甲状腺癌的浸润、转移等生物学行为和预后提供新的参考,现报道如下。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

选取 2011 年 3 月~2013 年 3 月本院甲状腺癌患者和甲状腺良性病变患者,共 60 例。其中,甲状腺癌 40 例,其中男 22 例,女 18 例,年龄 21~70 岁,平均(41.3 ± 11.1)岁;病理类型有乳头状癌 18 例、滤泡状癌 14 例和未分化癌 10 例。甲状腺癌分期按 2002 年 AJCC 标准;甲状腺良性病变 20 例,其中男 9 例,女 11 例,年龄 20~68 岁,平均(42.1 ± 12.1)岁;病理类型主要为结节性甲状腺肿。15 例癌旁正常组织取自甲状腺癌患者癌旁 2 cm 以上未受侵犯的组织,其中男 8 例,女 7 例,年龄 21~70 岁,平均(41.7 ± 12.0)岁。

RNA 提取试剂 TRIzol(Gibco 公司,美国);逆转录试剂盒(Fermentas 公司,美国);DNA Marker、PCR 试剂盒、焦碳酸二乙脂(DEPC)(生兴生化科技有限公司,南京)。兔抗人 HSP70、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )多克隆抗体(Santa 公司,美国),兔抗人  $\beta$ -actin(Sigma 公司,美国),辣根过氧化物标记的山羊抗兔抗体(联科生物技术有限公司,上海)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 RNA 提取及 RT-PCR

取约 100 mg 组织,加入 1 ml TRIzol,充分匀

浆,抽提总 RNA,所得 RNA 溶于 20  $\mu$ l DEPC 处理水。提取的总 RNA 经紫外分光光度计进行定量及检测纯度。按逆转录试剂盒说明书进行操作,产物-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后扩增 30 个循环,循环参数为:94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,57 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。RT-PCR 引物由上海英潍捷基公司合成,HSP70 基因的 mRNA 序列为 F:5'-GCCGCAAGTTCGCGCACCCGGTGGTGCAGT-CGGAC-3', R:5'-ACAGGCTGGTGAACCACTTCGTG-GAGGAGTTCAAG-3'; TNF- $\alpha$  的 mRNA 序列为 F:5'-CGGGACCTGGAGCTGGCCGAGGAG-3', R:5'-CTC-GACTCTCTATTGGTCCACC-AC-3'; 内参 GAPDH 引物 F:5'-GGTAAAGGTCCGTGTGAACG, R:5'-ACCA-TGTAGTTGAGGTCAATGAAGG3'。

#### 1.2.2 组织蛋白提取及 Western blot 检测

采用蛋白提取试剂盒(凯基生物,上海)提取甲状腺癌组织、良性病变组织及正常组织中总蛋白,10% SDS-PAGE 电泳,再进行转膜,用 50 g/L 脱脂奶粉封闭 1 h。然后与兔抗人 HSP70(1:250)、TNF- $\alpha$ (1:300)及  $\beta$ -actin(1:400)多克隆抗体结合,洗涤后与辣根过氧化物标记的山羊抗兔抗体(1:5 000)结合,洗涤后 DAB 显色,Image J 分析软件分析条带灰度,以管家基因  $\beta$ -actin 的密度比值表示蛋白的表达水平。

### 1.3 统计学方法

所有数据采用 SPSS17.0 软件进行统计分析,多组间比较用方差分析,两两比较采用 LSD 法检验,相关分析采用 Spearman 等级相关分析, $P \leq 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HSP70 mRNA 的表达水平及癌组织病理分级的相关性

HSP70 在正常甲状腺、甲状腺癌组织与甲状腺良性病变组织中表达差异具有统计学意义( $F = 51.891, P < 0.001$ )。进一步两两比较结果显示,甲状腺癌组织中 mRNA 表达水平显著增高于甲状腺良性病变组织以及正常甲状腺组织,差异均有统计学意义( $P < 0.001$ );而 HSP70 在甲状腺良性病变组织

中 mRNA 表达水平与正常组织比较差异无统计学意义( $P = 0.568$ , 图 1)。

HSP70 mRNA 表达水平与甲状腺癌分化程度显著正相关( $r_s = 0.810, P < 0.05$ ), 说明甲状腺癌分化愈差 HSP70 表达愈高(表 1)。

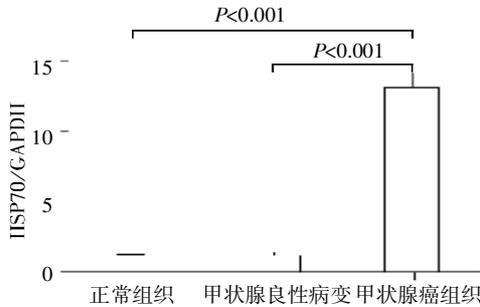


图 1 甲状腺癌组织、甲状腺良性病变组织以及正常甲状腺组织中 HSP70 mRNA 的表达

Figure 1 The mRNA level of HSP70 in thyroid cancer, benign thyroid lesions and normal thyroid tissue

表 1 HSP70 mRNA 表达水平与甲状腺癌分期的相关性

Table 1 The correlation between HSP70 mRNA level and stages of thyroid cancer

甲状腺癌分级	n	HSP70 mRNA 相对表达量
I	11	5.89 ± 1.11
II	13	10.85 ± 0.99
III	8	13.57 ± 1.18
IV	8	16.13 ± 1.21

$r_s = 0.810, P < 0.05$ .

### 2.2 HSP70 蛋白水平的表达情况

为了进一步验证上述结果, 我们通过 Western blot 方法对 3 组不同来源组织中 HSP70 蛋白水平进行检测。方差分析显示, 3 组人群组织中 HSP70 表达差异具有统计学意义( $F = 21.274, P < 0.001$ )。进一步两两比较结果显示, 与正常组织比较, 甲状腺良性病变组织中 HSP70 蛋白表达水平无显著变化( $P = 0.265$ ), 而在甲状腺癌组织中 HSP70 蛋白表达水平显著升高, 差异有统计学意义( $P = 0.012$ )(图 2)。

### 2.3 TNF- $\alpha$ 表达情况

采用 RT-PCR 与 Western blot 法对 3 组不同组织中 TNF- $\alpha$  的 mRNA 和蛋白水平进行检测, 结果显示, 与正常组织及甲状腺良性病变组织比较, 甲状腺癌组织中 TNF- $\alpha$  mRNA 与蛋白表达水平均显著升高, 提示甲状腺癌组织中增高的 HSP70 可能在促使机体产生大量的炎症因子 TNF- $\alpha$ (图 3)。

## 3 讨论

甲状腺癌为最常见的内分泌系统恶性肿瘤, 多

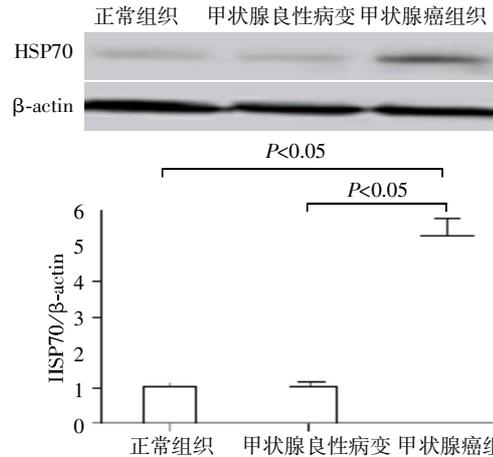


图 2 甲状腺癌组织、甲状腺良性病变组织以及正常甲状腺组织中 HSP70 蛋白水平的表达

Figure 2 The protein level of HSP70 in thyroid cancer, benign thyroid lesions and normal thyroid tissue

发于青壮年, 平均年龄在 40 岁左右, 男女比约为 1:2.5~3.0, 发病率约占全身恶性肿瘤的 1.5%<sup>[6]</sup>。按组织形态学甲状腺癌可分为乳头状甲状腺癌(PTC)、滤泡状甲状腺癌(FTC)、未分化甲状腺癌(ATC)和甲状腺髓样癌(MTC)。甲状腺癌的病因不是十分明确, 可能受饮食因素、雌激素分泌增加、遗传因素、其他甲状腺良性病变诱导产生等多因素的影响<sup>[6]</sup>。

HSPs 又被称为应激蛋白(stress protein, SP)。目前, 对于 HSPs 的分类主要是根据分子量的大小划分, 如 HSP90、HSP70、HSP60 以及小分子热休克蛋白(small heat shock proteins, sHSPs)等家族。其功能主要是在原核与真核生物细胞内起“分子伴侣”的作用, 协助多肽或蛋白质的转位、折叠以及装配, 具有维持蛋白的稳定、促进细胞的生存等功能, 且在细胞生长、发育、分化、基因转录等方面发挥重要作用。近年来, 大量的研究表明 HSPs 在肿瘤的发生、发展中有着极其重要的作用<sup>[7-8]</sup>。研究显示 HSP70 在肠癌、胃癌、肝癌等癌组织中高表达<sup>[9-11]</sup>, 然而甲状腺癌组织中 HSP70 表达的相关研究尚少报道。

本研究通过 40 例甲状腺癌组织、20 例良性病变组织及 15 例正常组织中 HSP70 mRNA 与蛋白表达情况进行了检测, 探讨其在甲状腺癌组织中的诊治意义。结果显示, HSP70 mRNA 与蛋白水平在甲状腺癌组织中的表达水平均显著高于良性病变与正常组织, 而甲状腺良性病变与正常组织之间无差异, 这就说明 HSP70 的表达水平可能与甲状腺癌的增殖能力和恶性程度有着密切的联系。这也与 HSP 家族蛋白在其他癌症组织中高表达的研究结果相一致<sup>[9-11]</sup>。为了进一步验证上述结果, 将 HSP70 的表

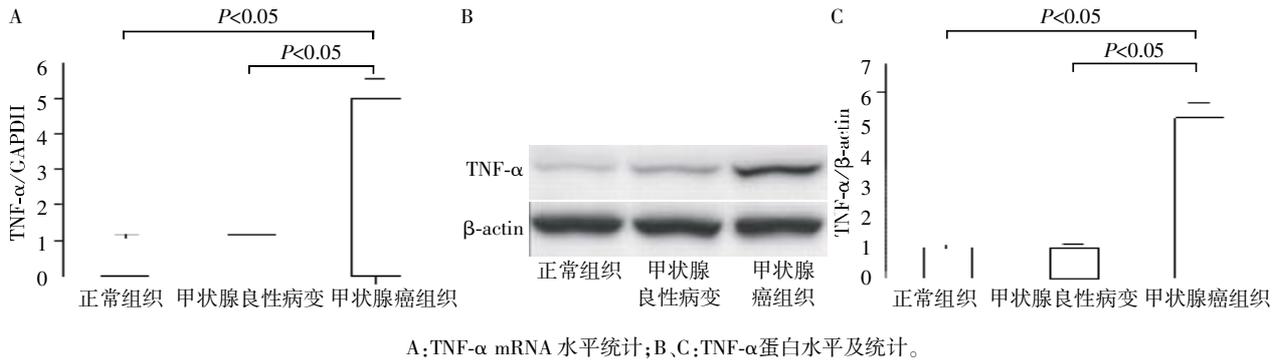


图 3 甲状腺癌组织、甲状腺良性病变组织以及正常甲状腺组织中 TNF- $\alpha$  的表达水平

Figure 3 The expression of TNF- $\alpha$  in thyroid cancer, benign thyroid lesions and normal thyroid tissue

达水平与甲状腺癌组织的病理分级进行相关性分析,结果发现 HSP70 mRNA 表达水平与甲状腺癌组织分级严重程度显著呈正相关。本结果首次提示了 HSP70 表达在甲状腺癌组织中的重要作用,即 HSP70 表达越高,肿瘤的分级越高。

大量临床和基础研究表明,应激状态下产生的 HSPs 会导致机体产生大量的炎症因子,故进一步检测了与肿瘤的发生发展有着密切关系的一类炎症因子 TNF- $\alpha$  的水平<sup>[12-13]</sup>。结果发现, TNF- $\alpha$  mRNA 与蛋白水平在甲状腺癌组织中的表达水平均显著高于良性病变与正常组织。本文推测,肿瘤的微环境产生高水平的 HSP70 可能通过刺激机体细胞产生大量的 TNF- $\alpha$  来参与机体的促肿瘤作用。本研究没有探讨 HSP70 在甲状腺癌组织分化的具体作用机制,有待进一步临床与基础研究的验证。

综上所述, HSP70 以及机体应激产生的炎症因子 TNF- $\alpha$  在甲状腺癌组织的发生、发展中起着重要的作用,检测甲状腺癌组织中的 HSP70 表达水平对患者诊断和临床个体化治疗具有一定的指导意义。

#### [参考文献]

[1] Ronald A, Delellis, Riardo V, et al. WHO classification [Z]. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs, 2004: 51-61

[2] Rozenberg P, Kocsis J, Saar M, et al. Elevated levels of mitochondrial mortalin and cytosolic HSP70 in blood as risk factors in patients with colorectal cancer [J]. Int J Cancer, 2013, 133(2): 514-518

[3] Zagouri F, Sergentanis TN, Gazouli M, et al. HSP90, HSPA8, HIF-1 alpha and HSP70-2 polymorphisms in breast cancer; a case-control study [J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(12): 10873-10879

[4] Hatfield MP, Lovas S. Role of Hsp70 in cancer growth

and survival [J]. Protein Pept Lett, 2012, 19(6): 616-624

[5] Dutta SK, Girotra M, Singla M, et al. Serum HSP70: a novel biomarker for early detection of pancreatic cancer [J]. Pancreas, 2012, 41(4): 530-534

[6] 刘长路, 吴岩, 毕立夫. 甲状腺癌流行现状及危险因素的研究进展 [J]. 中国地方病杂志, 2012, 31(2): 234-235

[7] Calderwood SK, Stevenson MA, Murshid A. Heat shock proteins, autoimmunity, and cancer treatment [J]. Autoimmune Dis, 2012, 2012: 486069

[8] Schmid TE, Multhoff G. Radiation-induced stress proteins—the role of heat shock proteins (HSP) in anti-tumor responses [J]. Curr Med Chem, 2012, 19(12): 1765-1770

[9] Rozenberg P, Kocsis J, Saar M, et al. Elevated levels of mitochondrial mortalin and cytosolic HSP70 in blood as risk factors in patients with colorectal cancer [J]. Int J Cancer, 2013, 133(2): 514-518

[10] Targosz A, Brzozowski T, Pierzchalski P, et al. Helicobacter pylori promotes apoptosis, activates cyclooxygenase (COX)-2 and inhibits heat shock protein HSP70 in gastric cancer epithelial cells [J]. Inflamm Res, 2012, 61(9): 955-966

[11] Rada A, Merentes E, Rodriguez M, et al. Human hepatoma cell line (HepG2) cellular response to hypothermic stress with recovery. Induction of Hsp70, Hsp60 and Hsf1 expression [J]. Invest Clin, 2010, 51(4): 479-488

[12] Lo SZ, Steer JH, Joyce DA. TNF- $\alpha$  renders macrophages resistant to a range of cancer chemo-therapeutic agents through NF- $\kappa$ B-mediated antagonism of apoptosis signaling [J]. Cancer Lett, 2011, 307(1): 80-92

[13] Schioppa T, Moore R, Thompson RG, et al. B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF- $\alpha$  during squamous carcinogenesis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(26): 10662-10667