

甲状腺乳头状癌中 FMNL2 和 EMT 相关蛋白的表达及其临床意义

曹学全 章辉 卢洪胜 戴岳楚 魏科娜 杨朝晖 范广民 顾华敏

【摘要】 目的 探讨同源形成素样蛋白 2(FMNL2)和上皮间质转化(EMT)相关蛋白 E-钙粘素、波形蛋白在甲状腺乳头状癌(PTC)中联合表达的临床意义。方法 采用免疫组化 En Vision 法检测 80 例 PTC 和 30 例相应癌旁组织中 FMNL2、E-钙粘素和波形蛋白的表达差异,并分析 PTC 组织 FMNL2、E-钙粘素和波形蛋白之间表达及与临床病理特征及指标相互之间的关系。结果 FMNL2、波形蛋白在 PTC 组织中阳性表达率分别为 61.25%(49/80)和 76.25%(61/80),癌旁组织分别为 13.33%(4/30)和 20.00%(6/30),差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),而 E-钙粘素在 PTC 组织中的阳性表达率为 32.50%(26/80),显著低于癌旁组织的 80.00%(24/30),差异有统计学意义($P < 0.05$)。包膜有无侵犯、淋巴结是否转移及不同临床分期者间 FMNL2、E-钙粘素和波形蛋白表达差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。淋巴结转移灶中 FMNL2 和波形蛋白表达均高于原发灶($P < 0.05$),而淋巴结转移灶中 E-钙粘素表达低于原发灶($P < 0.05$)。PTC 组织中 FMNL2 表达与 E-钙粘素表达呈负相关($r = -0.325, P < 0.05$),FMNL2 表达与波形蛋白表达呈正相关($r = 0.340, P < 0.05$)。结论 PTC 组织中 FMNL2、波形蛋白阳性表达明显升高,而 E-钙粘素表达下调,FMNL2 表达与 EMT 相关蛋白表达密切相关,提示 3 者异常表达可能联合参与 PTC 的发生、发展过程。

【关键词】 甲状腺乳头状癌 同源形成素样蛋白 2 E-钙粘素 波形蛋白 上皮间质转化

Expression of FMNL2 and EMT-related proteins in papillary thyroid carcinoma and its clinical significance CAO Xuequan, ZHANG Hui, LU Hongsheng, et al. Department of Pathology, Taizhou Central Hospital, Taizhou Enze Medical Center, Affiliated to Taizhou University, Taizhou 318000, China

【Abstract】 Objective To investigate the clinical significance of expression of formin-like protein 2(FMNL2) and epithelial mesenchymal transformation (EMT)-related proteins (E-cadherin) and (Vimentin) in thyroid papillary carcinoma (PTC). Methods The expression of FMNL2, E-cadherin and Vimentin in 80 samples of PTC and 30 samples of corresponding adjacent tissues were detected by immunohistochemical En Vision method, and the correlations among the expression of FMNL2, E-cadherin and Vimentin in PTC and their relationship with the clinicopathological features were analyzed. Results The positive rates of FMNL2 and Vimentin in PTC tissues were 61.25% (49/80) and 76.25% (61/80), respectively, those in adjacent tissues were 13.33% (4/30) and 20.00% (6/30), there were significant differences between them ($P < 0.05$); while the positive expression rate of E-cadherin in PTC tissue was 32.50% (26/80), which was significantly lower than that of adjacent tissue (80.00%, 24/30, $P < 0.05$). The expressions of FMNL2, E-cadherin and Vimentin were significantly correlated with the capsule invasion, lymph node metastasis and clinical stages ($P < 0.05$). The expressions of FMNL2 and Vimentin in metastatic lymph nodes were higher than those in primary tumor ($P < 0.05$), while the expression of E-cadherin in metastatic lymph nodes was lower than that in primary tumor ($P < 0.05$). The expression of FMNL2 in PTC tissues was negatively correlated with the expression of E-cadherin ($r = -0.325, P < 0.05$), and the expression of FMNL2 was positively correlated with the expression of Vimentin ($r = 0.340, P < 0.05$). Conclusion The expression of FMNL2 and Vimentin in PTC tissues is significantly up-regulated, but the expression of E-cadherin is down-regulated in PTC. The expression of FMNL2 is closely correlated with the expression of EMT-related proteins. Abnormal expression of

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.1.2018-1837

基金项目:台州学院校立科研项目(2017PY040)

作者单位:318000 台州市中心医院(台州学院附属医院)病理科(曹学全、章辉、卢洪胜、魏科娜、杨朝晖、范广民、顾华敏),肿瘤外科(戴岳楚)

通信作者:卢洪胜, E-mail:luhongsheng00@163.com

FMNL2 and EMT-related proteins may be involved in the occurrence and progression of PTC.

【Key words】 Papillary thyroid carcinoma Formin-like protein 2 E-cadherin Vimentin Epithelial mesenchymal transition

甲状腺癌是内分泌系统最常见的恶性肿瘤,在过去几十年中其发病率已经增加了 3 倍,超过四分之三是甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)^[1-2]。PTC 的发病机制尚不完全清楚,研究与 PTC 发生、发展有关的基因具有重要意义。上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)是恶性肿瘤发生浸润转移的细胞学基础,在 EMT 过程中,肿瘤细胞表现为上皮标志物如 E-钙粘素等表达下降,细胞黏附减弱,间质标志物如波形蛋白等表达增加^[3]。同源形成素样蛋白 2(formin-like protein 2, FMNL2)是近年来发现与转移相关的一种新基因,属于形成素同源蛋白家族成员之一。FMNL2 可作为 Rho 家族鸟苷三磷酸酶的效应分子,并在致癌中发挥重要作用。FMNL2 在肺癌、恶性黑色素瘤等多种恶性肿瘤中表达增加,并且与侵袭、转移呈正相关^[4-6]。关于 PTC 组织中 FMNL2 表达的临床意义及与 EMT 相关蛋白关系的研究鲜见文献报道,本研究采用免疫组化 En Vision 法检测 FMNL2、E-钙粘素和波形蛋白在 PTC 和相应癌旁组织中的表达差异,分析 FMNL2 和 EMT 相关蛋白的关系及对 PTC 发生、发展的可能作用机制,为 PTC 的分子靶向治疗提供新思路。

1 对象和方法

1.1 对象 选取 2017 年 1 月至 2018 年 1 月我院住院行手术切除 PTC 标本 80 例,术后均经病理检查证实为 PTC。所有患者术前均未接受放疗、化疗及生物学治疗。80 例 PTC 患者中,男 26 例,女 54 例;年龄 21~77 (45.37±12.04)岁,其中 <45 岁 42 例,≥45 岁 38 例。肿瘤直径 ≤2cm 56 例, >2cm 24 例;伴有包膜侵犯 28 例,无包膜侵犯 52 例;伴有淋巴结转移 47 例,无淋巴结转移 33 例;参照 2010 年第 7 版美国癌症联合委员会(AJCC)/国际抗癌联合会(UICC)制定的甲状腺癌分期标准进行 TNM 分期: I~II 期 53 例, III~IV 期 27 例。同时选取其中 30 例患者距离肿瘤 2cm 的相应癌旁组织(经病理检查为正常甲状腺组织)作为对照组。

1.2 主要试剂 FMNL2 兔抗人多克隆抗体购自英国 Abcam 公司, E-钙粘素和波形蛋白鼠抗人单克隆抗体购自福州迈新生物技术有限公司, EnVision 通用试剂盒及二氨基联苯胺(DAB)均购自广州基因公司。

1.3 免疫组化方法 应用免疫组化 En Vision 法检测

FMNL2、E-钙粘素和波形蛋白的表达。严格按照试剂盒说明书操作,石蜡切片常规脱蜡至水。3% H₂O₂ 室温孵育 10min, 0.1mmol/L 枸橼酸盐缓冲液微波修复, 3% BSA 封闭 30min, 分别滴加一抗(FMNL2 抗体浓度为 1:200, E-钙粘素和波形蛋白均为 1:100)4℃过夜, 滴加二抗(En Vision 免疫组化检测试剂), DAB 显色, 苏木素复染, 盐酸分化、乙醇及二甲苯脱水和树胶封固, 显微镜下观察。以 PBS 代替一抗作阴性对照, 用已知阳性组织作阳性对照。

1.4 结果判定 以细胞质或细胞膜出现淡黄色或棕黄色颗粒为阳性, FMNL2 和波形蛋白均定位于细胞质, E-钙粘素定位于细胞质或细胞膜。在光学显微镜下, 每张切片随机选取至少 5 个高倍视野(×400), 观察并记录每张切片的染色强度和面积, 通过半定量积分法进行判定。染色强度: 无显色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分。阳性细胞数的百分比: 阳性细胞数百分比 ≤5% 为 0 分; 6%~10% 为 1 分; 11%~20% 为 2 分; 21%~50% 为 3 分; >50% 为 4 分。细胞染色强度与阳性细胞百分比计分的乘积为每例的最终积分。<3 分为阴性, ≥3 分为阳性。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件。计数资料组间比较采用 χ^2 检验, PTC 中 FMNL2、E-钙粘素和波形蛋白之间表达的相关性采用 Spearman 等级相关分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PTC 和癌旁组织中 FMNL2、E-钙粘素和波形蛋白的表达 FMNL2、波形蛋白在 PTC 组织中阳性表达率分别为 61.25%(49/80)和 76.25%(61/80), 癌旁组织分别为 13.33%(4/30)和 20.00%(6/30), 差异均有统计学意义($\chi^2=20.064, 28.994$, 均 $P<0.05$); 而 E-钙粘素在 PTC 组织中的阳性表达率为 32.50%(26/80), 显著低于癌旁组织的 80.00%(24/30), 差异有统计学意义($\chi^2=19.855, P<0.05$)。见图 1(见插页)。

2.2 PTC 组织中 FMNL2、E-钙粘素和波形蛋白表达与临床病理特征的关系 FMNL2、波形蛋白表达在包膜有无侵犯、淋巴结是否转移及不同临床分期者间的差异均有统计学意义(均 $P<0.05$), 而在不同年龄、性别和肿瘤直径者中的差异均无统计学意义(均 $P>0.05$);

E-钙粘素在包膜侵犯、淋巴结转移及Ⅲ~Ⅳ期 PTC 者中阳性表达率低,在无包膜侵犯、无淋巴结转移及Ⅰ~Ⅱ期 PTC 者中阳性表达率高,差异均有统计学意义(均

$P < 0.05$),而在不同年龄、性别和肿瘤直径者中的表达差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。见表 1。

表 1 PTC 组织中 FMNL2、E-钙粘素和波形蛋白的表达与临床病理特征的关系

临床病理因素	n	FMNL2 阳性[n(%)]	χ^2 值	P 值	E-钙粘素阳性[n(%)]	χ^2 值	P 值	波形蛋白阳性[n(%)]	χ^2 值	P 值
性别										
男	26	15(57.69)	0.205	0.650	10(38.46)	0.624	0.430	19(73.08)	0.214	0.644
女	54	34(62.96)			16(29.63)			42(77.78)		
年龄										
<45 岁	42	25(59.52)	0.111	0.739	15(35.71)	0.416	0.519	31(73.81)	0.291	0.589
≥45 岁	38	24(63.16)			11(28.95)			30(78.47)		
肿瘤直径										
≤2cm	56	33(58.93)	0.544	0.461	19(33.93)	0.174	0.677	41(73.21)	0.950	0.330
>2cm	24	16(66.67)			7(29.17)			20(83.33)		
包膜侵犯										
是	28	23(82.14)	7.923	0.005	3(10.71)	9.320	0.002	27(96.42)	9.686	0.002
否	52	26(50.00)			23(44.23)			34(65.38)		
淋巴结转移										
是	47	36(76.60)	11.305	0.001	8(17.02)	11.582	0.001	43(91.49)	14.612	0.000
否	33	13(39.39)			18(54.55)			18(54.55)		
TNM 分期										
Ⅰ~Ⅱ期	53	25(47.17)	13.117	0.000	24(45.28)	11.697	0.001	34(64.15)	12.694	0.000
Ⅲ~Ⅳ期	27	24(88.89)			2(7.41)			27(100.00)		

2.3 PTC 原发灶和淋巴结转移灶中 FMNL2、E-钙粘素和波形蛋白的表达情况 47 例原发灶组织中 FMNL2 阳性表达率为 76.60%(36/47),对应淋巴结转移灶组织中的阳性表达率为 100.00%(47/47),淋巴结转移灶中 FMNL2 表达明显高于原发灶($\chi^2=9.553, P < 0.05$);淋巴结转移灶组织中波形蛋白阳性表达率为 100.00%(47/47),高于原发灶的 91.49%(43/47),差异有统计学意义($\chi^2=4.178, P < 0.05$);淋巴结转移灶组织中 E-钙粘素阳性表达率为 4.25%(2/47),低于原发灶的 17.02%(8/47),差异有统计学意义($\chi^2=4.028, P < 0.05$)。

2.4 PTC 组织中 FMNL2、E-钙粘素和波形蛋白表达的相关性 PTC 组织中 FMNL2、波形蛋白表达与 E-钙粘素表达均呈负相关($r=-0.325, -0.554$, 均 $P < 0.05$), FMNL2 表达与波形蛋白表达呈正相关($r=0.340, P < 0.05$)。见表 2、3。

3 讨论

据报道,EMT 和基质金属蛋白酶(matrix metallo-proteinase, MMPs)是造成肿瘤细胞侵袭和转移的原因^[7]。EMT 在胚胎发育过程中是一种从上皮细胞向间充质细胞表型转化的重要表型,与肿瘤的侵袭和转移密切相

表 2 PTC 组织中 FMNL2、波形蛋白表达与 E-钙粘素表达的相关性

E-钙粘素	FMNL2		r 值	P 值	波形蛋白		r 值	P 值
	阳性	阴性			阳性	阴性		
阳性	10	16	-0.325	0.004	11	15	-0.554	0.000
阴性	39	15			50	4		

表 3 PTC 组织中 FMNL2、波形蛋白表达的相关性

FMNL2	波形蛋白		r 值	P 值
	阳性	阴性		
阳性	43	6	0.340	0.002
阴性	18	13		

关^[8]。EMT 的特征是上调间充质细胞特异性标记蛋白,包括 N-钙黏着蛋白和波形蛋白,以及下调上皮细胞特异性标记蛋白,如 E-钙粘素, MMPs 和细胞外基质蛋白分泌增多,基底膜和细胞外基质被破坏,从而细胞获得运动迁移能力^[9]。本研究结果显示,PTC 组织中波形蛋白阳性表达显著高于癌旁正常组织($P < 0.05$),而 E-钙粘素在 PTC 组织中表达下调,明显低于癌旁正常组织($P < 0.05$),提示 EMT 相关蛋白(波形蛋白和 E-钙粘素)异常表达可能在 PTC 发生过程中起作用。进一步研

究发现,波形蛋白在 PTC 包膜侵犯、淋巴结转移、Ⅲ~Ⅳ期及淋巴结转移灶组织中阳性表达率高,而在 PTC 无包膜侵犯、无淋巴结转移、Ⅰ~Ⅱ期及原发灶组织中阳性表达率低,差异有统计学意义,而 E-钙粘素表达情况则相反,表明 EMT 相关蛋白表达状态改变可能参与 PTC 的局部浸润、淋巴结转移及临床进展的过程。

FMNL2 编码蛋白质是进化上保守 formin 家族的蛋白质成员,这些蛋白质是细胞骨架的调节剂。FMNL2 具有影响肌动蛋白聚合和肌动蛋白丝形成的结构域,是建立在迁移和侵袭过程中调节细胞边缘突起的肌动蛋白聚集因子^[10-11]。在生理和病理情况下,FMNL2 在细胞生长过程中发挥关键作用,如丝状体形成、细胞迁移、胞质分裂、细胞黏附、细胞极性和肿瘤进展等^[12]。有文献报道,FMNL2 具有 Rho 家族鸟苷三磷酸酶结构域,细胞运动时可形成伪足,在结直肠癌细胞侵袭转移过程中起重要作用^[13]。荧光定量聚合酶链反应结果证实,FMNL2 mRNA 水平在舌鳞状细胞癌中显著升高,且其高表达与淋巴结转移和晚期肿瘤密切相关,表明 FMNL2 作为转移的正调控因子。多因素分析显示 FMNL2 表达具有独立的预后意义^[14]。本研究采用免疫组化 En Vision 法检测 PTC 和相应癌旁正常组织中 FMNL2 的表达情况,结果显示,PTC 组织中 FMNL2 蛋白阳性表达率明显高于癌旁正常组织($P<0.05$),并且 PTC 随着包膜侵犯、淋巴结发生转移及临床分期增加,FMNL2 蛋白阳性表达率进一步升高($P<0.05$),表明 FMNL2 表达升高可能与 PTC 的发生、侵袭和转移有关,本研究结果与上述文献报道一致。为了进一步显示 FMNL2 在 PTC 转移中的作用,本研究检测了原发灶和对应淋巴结转移灶中 FMNL2 的表达差异,发现淋巴结转移灶组织中 FMNL2 表达明显高于原发灶($P<0.05$),提示 FMNL2 表达升高可能会导致原发灶的一些癌细胞容易发生转移。

Li 等^[15]发现,FMNL2 通过 Smad3 效应分子或者 MAPK/MEK 信号通路参与 TGF- β 诱导的 EMT,进而促进结直肠癌细胞侵袭和转移。本研究还分析 FMNL2 与 EMT 相关蛋白的相关性,发现 FMNL2、波形蛋白表达与 E-钙粘素表达均呈负相关,FMNL2 表达与波形蛋白表达呈正相关,提示在 PTC 组织中,FMNL2 表达与 EMT 相关蛋白表达密切相关,FMNL2 过表达可能与 EMT 的发生有关。综合上述研究结果,FMNL2 和 EMT 相关蛋白异常表达可能联合参与 PTC 的发生、恶性进展过程,为 PTC 的靶向治疗和预后判断提供新思路。

4 参考文献

- [1] Xue S, Wang P, Liu J, et al. Prophylactic central lymph node dissection in cN0 patients with papillary thyroid carcinoma: A retrospective study in China[J]. *Asian J Surg*, 2016,39(3): 131-136.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017[J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(1): 7-30.
- [3] Kim M, Lira J, Yang Y, et al. N-myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) suppresses the epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells via STAT3/Snail signaling[J]. *Cancer Lett*, 2014, 354(1):33-42.
- [4] Meng Q, Ren M, Li Y, et al. LncRNA-RMRP Acts as an oncogene in lung cancer[J]. *PLoS One*, 2016,11(12):e0164845.
- [5] Gardberg M, Heuser VD, Koskivuo I, et al. FMNL2/FMNL3 formins are linked with oncogenic pathways and predict melanoma outcome[J]. *J Pathol Clin Res*, 2016, 2(1):41-52.
- [6] Ren XL, Qiao YD, Li JY, et al. Cortactin recruits FMNL2 to promote actin polymerization and endosome motility in invadopodia formation[J]. *Cancer Lett*, 2018, 419:245-256.
- [7] Li D, Qu C, Ning Z, et al. Radiation promotes epithelial-to-mesenchymal transition and invasion of pancreatic cancer cell by activating carcinoma-associated fibroblasts[J]. *Am J Cancer Res*, 2016, 6(10): 2192-2206.
- [8] Heeg S, Das KK, Reichert M, et al. ETS-Transcription Factor ETV1 Regulates Stromal Expansion and Metastasis in Pancreatic Cancer[J]. *Gastroenterology*, 2016, 151(3): 540-553.
- [9] Wang QS, Kong PZ, Li XQ, et al. FOXF2 deficiency promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of basal-like breast cancer[J]. *Breast Cancer Res*, 2015,17: 30.
- [10] Ghorbanpour E, Pasalar P, Yazdani S, et al. FMNL2 with Functions Related to the Cytoskeleton is Partially Regulated by PAX6 [J]. *J Ophthalmic Vis Res*, 2017, 12(4):407-412.
- [11] Kage F, Steffen A, Ellinger A, et al. FMNL2 and -3 regulate Golgi architecture and anterograde transport downstream of Cdc42 [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):9791.
- [12] Eisenmann KM, Harris ES, Kitchen SM, et al. Dia-interacting protein modulates formin-mediated actin assembly at the cell cortex[J]. *Curr Biol*, 2007, 17(7): 579-591.
- [13] Zeng Y, Xie H, Qiao Y, et al. Formin like2 regulates Rho/ROCK pathway to promote actin assembly and cell invasion of colorectal cancer[J]. *Cancer Sci*, 2015, 106(10):1385.
- [14] Yan G, Wang X, Yang M, et al. Long non-coding RNA TUG1 promotes progression of oral squamous cell carcinoma through upregulating FMNL2 by sponging miR-219[J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(9):1899-1912.
- [15] Li Y, Zhu X, Zeng Y, et al. FMNL2 enhances invasion of colorectal carcinoma by inducing epithelial-mesenchymal transition [J]. *Mol Cancer Res*, 2010, 8(12):1579-1590.

(收稿日期:2017-11-01)

(本文编辑:严玮雯)