文章编号:1000-5404(2011)16-1691-04

论著

雌激素受体 GPR30、ERα 和 PR 在甲状腺癌组织中的表达及相关性

李 飞,罗浩军,罗 平,杨光伦,涂 刚 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院内分泌乳腺外科)

[摘要] **目的** 探讨雌激素受体 GPR30、ERα 和 PR 在甲状腺癌组织中的表达及其相关性。**方法** 选取重庆医科大学附属第一医院病理科 2006－2009 年 101 例甲状腺癌组织标本,包括乳头状腺癌 83 例、滤泡状腺癌 9 例、髓样癌 6 例、未分化腺癌 3 例,患者年龄 45.9(9～93)岁;采用免疫组化 S-P 法检测甲状腺癌组织中 GPR30、ERα 和 PR 的表达,分析其与肿瘤临床病理特征之间,以及相互间的差异。**结果** 甲状腺癌组织中 GPR30、ERα 和 PR 主要表达于细胞质,少量表达于细胞核,阳性表达率分别为 78.2%、85.1%、79.2%;除在≥45 岁年龄组患者肿瘤中 ERα 表达率高于<45 年龄组外($r=-0.2383$,$P<0.05$),GPR30 和 ERα 的表达与患者年龄、性别、肿瘤大小、淋巴结转移、病理类型、TNM 分期等临床病理因子及患者 MACIS 预后评分无统计学差异($P>0.05$);GPR30 与 ERα($r=0.2518$)、PR($r=0.3207$)的表达呈正相关。**结论** 雌激素受体 GPR30 和 ERα 共同参与甲状腺癌的发生、发展,可能是潜在的治疗靶点。

[关键词] 甲状腺癌;雌激素受体;G 蛋白偶联受体 30;ERα;免疫组织化学
[中图法分类号] R736.1;R392.3;R730.23 [文献标志码] A

Expression of GPR30, ERα and PR in thyroid carcinoma tissues and their association with thyroid carcinoma

Li Fei, Luo Haojun, Luo Ping, Yang Guanglun, Tu Gang (Department of Endocrine and Breast Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To evaluate the expression of G-protein coupled receptor 30 (GPR30), estrogen receptor α (ERα) and progesterone receptor (PR) in thyroid carcinoma (TC) tissues, and to study their association with thyroid carcinoma. **Methods** Immunohistochemistry (S-P) assay was used to detect the expression of GPR30, ERα and PR in the paraffin-embedded TC tissue specimens from 101 patients (age at 45.9, 9-93 years). The specimens were collected in our hospital from 2006 to 2009 and included 83 cases of papillary adenocarcinoma, 9 cases of follicular adenocarcinoma, 6 cases of medullary carcinoma and 3 cases of undifferentiated carcinoma. The association of GPR30, ERα and PR expression with TC clinicopathologic features and the correlation among them were analyzed. **Results** GPR30, ERα and PR were expressed mainly in cytoplasm and rarely in cell nuclei, with positive expression rates of 78.2%, 85.1% and 79.2%, respectively. Their expression displayed no significant association with clinicopathological determinants (age, sex, tumor size, lymph node metastasis, pathologic subtype and TNM stage) and MACIS prognostic score ($P>0.05$), except that ERα had a higher positive expression rate in patients aged 45 years and older than in patients aged less than 45 years old ($r=-0.2383$, $P<0.05$). GPR30 expression was positively correlated with ERα expression ($r=0.2518$) and PR expression ($r=0.3207$). **Conclusion** As estrogen receptors, GPR30 and ERα both contribute to the development of TC and, therefore, may be potential therapy targets.

[**Key words**] thyroid carcinoma; estrogen receptor; GPR30; ERα; immunohistochemistry

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30872520), the Key Project of Scieuce and Technology Research of Ministry of Education (208113), the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2008BB5220), and the Project of Chongqing Municipal Education Committee (KJ080327).
Corresponding author: Tu Gang, E-mail: tugang68@126.com

甲状腺癌(thyroid carcinoma,TC)是常见的内分泌相关恶性肿瘤之一,在育龄期妇女,其发病率较男性及绝经后妇女明显增高,提示雌激素在其肿瘤生成和发展中具有重要作用[1]。雌激素受体(estrogen receptor,ER)在细胞分子水平上介导雌激素效应,核受体 ERα 作为转录调节因子已被广泛接受,G 蛋白偶联受体 30

[基金项目] 国家自然科学基金(30872520);教育部科学技术研究重点项目(208113);重庆市自然科学基金(CSTC2008BB5220);重庆市教委科技项目(KJ080327)
[通信作者] 涂 刚,E-mail: tugang68@126.com

(G protein-coupled receptor 30,GPR30)作为近年发现的又一种新型ER也被广泛认可[2-3],但它们在TN中的作用及其机制并不清楚。本实验通过免疫组织化学方法检测101例甲状腺癌组织中GPR30、ERα及其靶蛋白PR的表达,分析其与TC临床病理相关因子以及相互之间的相关性,探讨雌激素在甲状腺癌发生、发展中可能的作用。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取重庆医科大学附属第一医院病理科2006-2009年临床资料完整的存档石蜡包埋TC标本101例。所有患者于重庆医科大学附属第一医院行TC根治性切除手术。其中男性20例,女性81例,年龄45.9(9~93)岁。术后常规石蜡切片,HE染色,由2位高年资病理医师明确组织病理分型。包括乳头状腺癌(PTC)83例、滤泡状腺癌(FEC)9例、髓样癌(MTC)6例、未分化腺癌(UTC)3例。按国际抗癌协会联盟(UICC)的TNM肿瘤分期,分为Ⅰ期51例、Ⅱ期22例、Ⅲ期25例、Ⅳ期3例。

1.2 免疫组织化学S-P法染色

兔抗人GPR30多克隆抗体购自Abcam公司(ab12563),兔抗人ERα(bs-0725R)、PR(bs-0111R)多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司,免疫组化试剂盒(S-P 9001)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。免疫组化染色过程按照说明书进行:脱蜡、水化、抗原修复;3% H_2O_2阻断内源性过氧化物酶活性;山羊血清封闭抗原;滴加一抗(3种抗体工作浓度均为1∶200),37 ℃孵育2 h;滴加生物素标记羊抗兔IgG,37 ℃孵育15 min;加辣根酶标记链霉卵白素工作液,37 ℃孵育15 min;DAB显色、复染、分化、返蓝,脱水、透明、封固。PBS代替一抗作阴性对照。

结果评判及评分标准采用半定量方法[4-5],细胞膜、细胞质或细胞核有棕黄色颗粒分布为阳性细胞。①按显色细胞比例计分,每一标本选取5个400倍视野,计数阳性细胞数。阳性细胞百分率<5%为0分,5%~25%为1分,>25%~50%为2分,>50%~75%为3分,>75%为4分;②按细胞显色深浅计分,未显色为0分,浅黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。2项积分相乘,取5个视野平均分为该标本得分。按分数将表达程度分4个等级:1分为阴性(-),2~4分为低表达(+),5~8分为中表达(++),9分以上为高表达(+++),为便于统计分析,低、中、高表达均视为阳性。

1.3 统计学方法

采用SPSS 17.0统计软件进行分析,分类变量采用χ^2检验、Fisher精确概率检验,连续变量采用t检验、方差分析。

2 结果

2.1 GPR30、ERα和PR在甲状腺癌细胞中的表达

GPR30、ERα、PR在甲状腺癌细胞中的表达主要定位于细胞质,少量定位于细胞核(图1、2);其阳性率分别为78.2%、85.1%、79.2%。

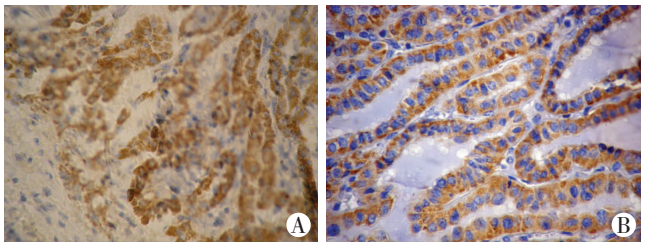


图1 免疫组化检测ER(A)、PR(B)在甲状腺乳头状癌中的表达 (S-P ×400)

2.2 GPR30、ERα和PR与临床病理特征的关系

GPR30、PR的表达与患者年龄、性别、肿瘤大小、淋巴结转移、病理类型及TNM分期无明显差异($P>0.05$);ERα在年龄≥45岁甲状腺癌患者的表达高于年龄<45岁($r=-0.238\ 3$, $P<0.05$),与上述其他因素也无统计学差异($P>0.05$)。见表1。

表1 TC中GPR30、ER和PR的表达与临床资料和病理特征的关系

参数	n	GPR30		阳性率(%)	ER		阳性率(%)	PR		阳性率(%)
		-	+		-	+		-	+	
年龄										
<45岁	51	13	38	74.5	11	40	78.4	13	38	74.5
≥45岁	50	9	41	82.0	4	46	92.0[a]	8	42	84.0
性别										
男性	20	6	14	70.0	5	15	75.0	5	15	75.0
女性	81	16	65	80.2	10	71	87.6	16	55	67.9
TNM分期										
Ⅰ、Ⅱ期	73	17	55	75.0	13	60	81.9	16	57	77.8
Ⅲ、Ⅳ期	28	5	23	82.1	2	26	92.8	5	23	82.1
病理类型										
PTC	83	17	66	79.5	12	71	85.5	17	66	79.5
FTC	9	2	7	77.8	1	8	88.9	2	7	77.8
MTC	6	2	4	66.7	2	4	66.7	1	5	83.3
UTC	3	1	2	66.7	0	3	100.0	1	2	66.7
淋巴结转移										
有	65	13	52	80.0	9	56	86.2	16	49	75.4
无	36	9	27	75.0	6	30	83.3	5	31	86.1

a: $P<0.05$, 与<45岁患者比较

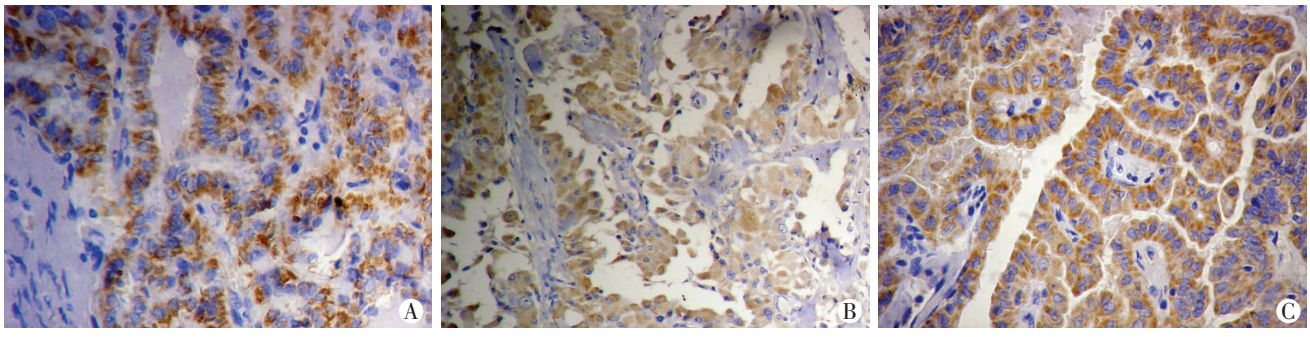


图2 免疫组化检测GPR30在甲状腺乳头状癌(A)、髓样癌(B)、滤泡状癌(C)中的表达 (S-P ×400)

2.3 TC中GPR30的表达与ERα和PR之间的关系

GPR30在TC中表达与ERα、PR呈正相关($r=0.251\ 8$, $P=0.011\ 4$; $r=0.320\ 7$, $P=0.001\ 3$, 表2)。

表2 TC中GPR30的表达与ER和PR的相关性

GPR30	ER		合计	PR		合计
	−	+		−	+	
+	8	71	79	11	68	79
−	7	15[a]	22	10	12[b]	22
合计	15	86	101	21	80	101

a: $r=0.2518$, $P=0.0114$, b: $r=0.3207$, $P=0.0013$

2.4 TC中GPR30、ERα和PR的表达与患者MACIS评分的关系

GPR30、ERα和PR的表达与患者MACIS评分各期无统计学差异($P>0.05$, 表3)。

表3 TC中GPR30、ER和PR的表达与MACIS评分的关系

参数	n	GPR30		阳性率	ER		阳性率	PR		阳性率
		−	+	(%)	−	+	(%)	−	+	(%)
Ⅰ(<6分)	75	18	57	76.0	14	61	81.3	18	57	76.0
Ⅱ(6~6.99分)	18	2	16	88.9	1	17	94.4	0	18	100
Ⅲ(7~8分)	6	1	5	83.3	0	6	100	2	4	66.7
Ⅳ(>8分)	2	1	1	50.0	0	2	100	0	2	100

3 讨论

流行病学调查显示,10岁以前人群TC的发病率并无性别差异,10岁以后女性发病率高于男性3~4倍,20~40岁的育龄期妇女成为TC发病的主要群体,女性绝经后这种差异又消失,提示内源性雌激素在TC发生中扮演着重要角色[1,6]。在细胞和分子水平,雌激素需与ERs结合,产生相关效应。ERα与雌激素结合后产生转录调节作用,PR即其靶基因之一。早期研究显示ERα在TC组织及细胞系中均有表达[7-8],且在TC组织中ERα及其靶基因PR在TC组织中的表达水平较正常甲状腺组织中更高[8]。雌二醇与ERα结合后可促进TC细胞(包括乳头状癌细胞系KAT5、滤泡样癌细胞系FRO和未分化癌细胞系ARO)生长[9]。他莫西芬则可抑制TC细胞生长、侵袭[10]。GPR30是一种新型ER,2008年被命名为GPER,主要通过反式激活表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)及第二信使等介导雌激素样物质快速反应和转录调节,其作用模式和效应与核受体ERα、β均有不同[2-3]。目前尚少见GPR30在TC组织中表达的报道。Vivacqua等[11]证实雌二醇和他莫西芬代谢产物均可通过GPR30信号通路促进不同TC细胞系增殖。吴婷婷等[12]证实E2通过GPR30激活ERK1/2、PI3K-Akt途径,诱导甲状腺未分化癌FRO细胞的增殖。本研究中,GPR30、ERα、PR在大部分不同病理类型的TC中均有表达,且GPR30与ERα共同表达比例较高,二者的表达具有显著相关性,且同时与PR的表达正相关,结合目前ERα与GPR30可能存在相互调节的认识[3],这2种ERs在雌激素对TC的影响中可能均具有一定作用。

目前,GPR30的亚细胞定位尚存在争议,但基本结论是其主要分布于内质网[2],最新研究提示其在雌激素刺激下可出现从胞膜到胞核的转位[11]。尽管不能准确反映其功能状态,本研究中GPR30表达于细胞质的特点与先前报道一致[5],也符合上述基本认识。ERα本是核受体,但与GPR30相似,其雌激素刺激性可在胞核与胞膜之间穿梭[11],因此其亚细胞定位与功能状态密切相关。本研究中,ERα及PR主要表达于细胞质,可能与其特定的功能状态有关,也可能与其突变体的出现有关[13]。

ERα是乳腺癌独立预后因子和临床常规检测项目。但TC,特别是分化型TC预后良好,患者预期寿命常以数十年记,很难在十余年内随访观察到不同表型TC患者复发和生存的差异。结合患者临床病理指标评估分化型TC患者预后是较合理的方式,其中MACIS评分法是最为可靠的方法之一。回顾性分析显示ERα的表达在单因素回归分析结果中是TC预后的独立预测因子,但在多因素回归中却不是[8,14]。本研究中,ERα的表达除与患者年龄有关联外,与TC常见临床病理指标之间无明显关联,与患者MACIS评分没有统计学关联,与先前研究结果基本一致[8,14-15],提示其在TC患者中预后价值有限。研究显示GPR30是卵巢癌和子宫内膜癌预后差的相关因素,但在乳腺癌中,目前研究均提示其并非独立预后因子[2]。本研究中GPR30的表达与患者MACIS评分也没有统计学关联,与TC重要的临床病理因子也无关联,提示GPR30可能也不是TC独立的预后因子。尽管细胞学研究反复证实了雌激素对TC增殖促进作用,但雌激素及ERs在TC进展中的作用于机制尚需进一步研究。

目前有关雌激素对TC影响的研究并没有一致结论,关于ERs在TC中的表达也存在较多争议,结果不一致的原因可能是检测方法和抗体的不同。本研究显示2种ER在TC中均有广泛表达,提示雌激素效应存在以及ERs作为TC治疗靶点的可能,但相关影响及其机制仍需进一步研究。

参考文献:

[1] Libutti S K. Understanding the role of gender in the incidence of thyroid cancer[J]. Cancer J, 2005, 11(2): 104-105.

[2] Maggiolini M, Picard D. The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor[J]. J Endocrinol, 2010, 204(2): 105-114.

[3] Prossnitz E R, Barton M. Signaling, physiological functions and clinical relevance of the G protein-coupled estrogen receptor GPER[J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2009, 89(3/4): 89-97.

[4] Leake R, Barnes D, Pinder S, *et al*. Immunohistochemical detection of steroid receptors in breast cancer: a working protocol. UK Receptor Group, UK NEQAS, The Scottish Breast Cancer Pathology Group, and The Receptor and Biomarker Study Group of the EORTC[J]. J Clin Pathol, 2000, 53(8): 634-635.
[5] Cheng S B, Graeber C T, Quinn J A. Retrograde transport of the transmembrane estrogen receptor, G-protein-coupled-receptor- 30 (GPR30/GPER) from the plasma membrane towards the nucleus[J]. Steroids, 2011.
[6] Chen G G, Vlantis A C, Zeng Q, *et al*. Regulation of cell growth by estrogen signaling and potential targets in thyroid cancer[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2008, 8(5): 367-377.
[7] Zeng Q, Chen G, Vlantis A, *et al*. The contributions of oestrogen receptor isoforms to the development of papillary and anaplastic thyroid carcinomas[J]. J Pathol, 2008, 214(4): 425-433.
[8] Kansakar E, Chang Y J, Mehrabi M, *et al*. Expression of estrogen receptor, progesterone receptor, and vascular endothelial growth factor-A in thyroid cancer[J]. Am Surg, 2009, 75(9): 785-789.
[9] Zeng Q, Chen G G, Vlantis A C, *et al*. Oestrogen mediates the growth of human thyroid carcinoma cells via an oestrogen receptor-ERK pathway[J]. Cell Prolif, 2007, 40(6): 921-935.
[10] Vogel V G, Costantino J P, Wickerham D L, *et al*. Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes: the NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 trial[J]. JAMA, 2006, 295(23): 2727-2741.
[11] Vivacqua A, Bonofiglio D, Albanito L, *et al*. 17beta-estradiol, genistein, and 4-hydroxytamoxifen induce the proliferation of thyroid cancer cells through the g protein-coupled receptor GPR30[J]. Mol Pharmacol, 2006, 70(4): 1414-1423.
[12] 吴婷婷, 龙方懿, 贾朝莉, 等. G蛋白偶联受体在雌激素诱导人甲状腺未分化癌FRO细胞增殖中的作用及其机制[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(2): 164-168.
[13] Rai D, Frolova A, Frasor J, *et al*. Distinctive actions of membrane-targeted versus nuclear localized estrogen receptors in breast cancer cells[J]. Mol Endocrinol, 2005, 19(6): 1606-1617.
[14] Cho M A, Lee M K, Nam K H, *et al*. Expression and role of estrogen receptor alpha and beta in medullary thyroid carcinoma: different roles in cancer growth and apoptosis[J]. J Endocrinol, 2007, 195(2): 255-263.
[15] Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, *et al*. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(1): 127-134.

(**收稿**:2011-01-19;**修回**:2011-02-24)
(编辑 张 维)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2011)16-1694-01

奥曲肽治疗肝硬化乳糜性腹水1例

杨 丽,郭 红,赵晓晏 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院消化内科)

[**关键词**] 奥曲肽;肝硬化;乳糜性腹水
[**中图法分类号**] R572.2 [**文献标志码**] B

1 临床资料

患者,男性,64岁,因"确诊肝硬化12年,黑便1 d,意识障碍1 h"于2010年5月11日入院。12年前患者诊断为酒精性肝硬化,2年前和1年前因食管胃底静脉曲张破裂出血,2次行内镜下食管静脉曲张套扎术,1年前患者出现乳糜性腹水,予以保肝、利尿、输注白蛋白等对症支持治疗,乳糜性腹水无明显好转,腹水生长速度快,需定期大量腹腔穿刺放液治疗,此次入院前1天患者自行腹腔穿刺放液5 000 ml,意识障碍1 h入院。患者有长期饮酒史,饮酒30$^+$年,1 d 500 g白酒,抽烟50$^+$年,1 d 10支。入院查体:T 36.5 ℃, P114/min, R18/min, BP 118/78 mmHg,慢性肝病病容,昏迷状态,呼之不应,全身皮肤巩膜无黄染,全身浅表淋巴结未扪及肿大,心肺无异常,腹膨隆,无压痛、反跳痛、肌紧张,肝脾扪诊不满意,移动性浊音阳性,双下肢无水肿。辅助检查:血常规示:WBC 5.14×10^9/L, N 83%, RBC 2.73×10^{12}/L, HGB 92 g/L, PLT 51×10^{12}/L。大便隐血阳性,肝功示:ALT 28 IU/L, AST 38 IU/L, ALB 35.1 g/L, TBIL 29.3 μmol/L, DBIL 11 μmol/L, Pre-ALB 106.9 g/L。肾功示:UREA 1703 mmol/L, CREA 111 μmol/L, UA 525 μmol/L, Na 132.1 mmol/L, K 4.63 mmol/L,凝血时间示:PT 14.5 s, APTT 27.8 s, INR 1.21. 血氨57.5 μmol/L。腹水示白色浑浊乳糜性腹水,腹水常规+生化示蛋白质为6.2 g/L,白细胞为3.6×10^6/L,李凡他(Rivalta)试验阳性,乳糜试验阳性。入院后予以抑酸、保肝、降低门静脉压力等对症支持治疗,患者神志清醒,入院后予以奥曲肽50 μg/h持续微泵输入降低门静脉压力,控制出血,前7天予以奥曲肽50 μg/h持续输注,随后予以25 μg/h持续泵入4 d,最后予以奥曲肽0.1 mg,皮下注射,3次/d治疗3 d。患者腹水由白色浑浊乳糜样腹水逐渐变黄、透明,腹水生长速度明显减慢,患者腹胀程度较之前明显好转出院。随访半年患者仍有腹水,但腹水生长速度较之前明显减慢,患者腹胀能忍受,不需要每周定期大量腹腔穿刺抽液。

2 讨论

乳糜性腹水指乳状或奶油状富含三酰甘油的腹腔渗液,白色不透明,是由胸导管、腹腔淋巴管及其分支的损伤、破裂或阻塞致淋巴液溢入腹腔形成的。乳糜性腹水发病率低,临床上少见,王秀茹[1]分析了我国247例乳糜性腹水病例,发现肝硬化引起的乳糜性腹水最常见,发病率约23.48%,其它病因包括肿瘤、结核、手术、肾病综合征、先天发育异常等。

(下转1704页)

[**通信作者**] 郭 红,电话:(023)68774404,E-mail: haojia2004@yahoo.com.cn