文章编号:1000-5404(2014)12-1317-05

论著

G蛋白偶联雌激素受体1、表皮生长因子受体和趋化因子受体1在甲状腺乳头状癌中的表达及意义

唐 萃,杨 磊,王 旋,杨俊艳,刘智敏 (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室,分子医学与肿瘤研究中心)

[摘要] **目的** 探讨G蛋白偶联雌激素受体1(G protein -coupled estrogen receptor1,GPER1)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)和趋化因子受体1(chemokine receptor1,CXCR1)在甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma,PTC)组织中的表达及意义。**方法** 甲状腺乳头状癌68例、结节性甲状腺肿42例,采用免疫组织化学S-P法检测GPER1、EGFR和CXCR1的表达,分析其与患者临床病理特征的关系,以及三者间表达的相关性。**结果** 在PTC组织中,GPER1、EGFR和CXCR1的表达阳性率分别为76.5%、66.2%、64.7%,明显高于结节性甲状腺肿组的21.4%、16.7%和11.9%($P<0.01$);GPER1、EGFR和CXCR1在PTC中的表达与颈部淋巴结转移相关($P<0.05$),而与其他临床病理特征(年龄、性别、肿瘤大小及TNM分期)无相关性($P>0.05$);在PTC及PTC淋巴转移癌组织中,GPER1与EGFR的表达呈显著正相关($r=0.262$,$P=0.031$;$r=0.542$,$P=0.002$)、GPER1与CXCR1的表达也呈显著正相关($r=0.276$,$P=0.025$;$r=0.483$,$P=0.006$)。**结论** GPER1、EGFR和CXCR1的两两共表达与PTC的发生、发展密切相关,三者间可能存在一种相互作用。

[关键词] 甲状腺乳头状癌;G蛋白偶联雌激素受体1;表皮生长因子受体;趋化因子受体1
[中图法分类号] R730.23;R730.43;R736.1 [文献标志码] A

Expression and significance of GPER1, EGFR and CXCR1 in papillary thyroid carcinoma

Tang Cui, Yang Lei, Wang Ni, Yang Junyan, Liu Zhimin (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Molecular Medicine and Cancer, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To evaluate the expression and significance of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER1), epidermal growth factor receptor (EGFR) and chemokine receptor 1 (CXCR1) in papillary thyroid carcinoma (PTC) tissues. **Methods** The expression levels of GPER1, EGFR and CXCR1 were analyzed in 68 cases of papillary thyroid carcinoma and 42 cases of nodular goiter using immunohistochemistry (S-P) assay. Their correlations with the clinicopathological features were examined. **Results** The positive expression rates of GPER1, EGFR and CXCR1 in the PTC tissue specimens were 76.5%, 66.2% and 64.7%, respectively. In the nodular goiter group, the positive expression rates of GPER1, EGFR and CXCR1 were 21.4%, 16.7% and 11.9%, respectively, which were significantly lower than those of the PTC group ($P<0.01$). Their expression displayed no significant association with clinicopathological parameters age, sex, tumor size and TNM stage ($P>0.05$), except lymph node metastasis ($P<0.05$). GPER1 expression was positively correlated with EGFR expression ($r=0.262$, $P=0.031$; $r=0.542$, $P=0.002$) and CXCR1 expression ($r=0.276$, $P=0.025$; $r=0.483$, $P=0.006$) in PTC and lymph node metastatic carcinoma. **Conclusion** The expression of GPER1, EGFR and CXCR1 is associated with the development in PTC, and their correlations might have prognosis assessment value.

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81272937,81072183);重庆市自然科学基金重点项目(CSTC2011BA5038);重庆医科大学重点科研项目(XBZD201002)
[通信作者] 刘智敏,E-mail:liuzm9999@yahoo.com.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140313.1307.002.html(2014-03-13)

[**Key words**] papillary thyroid carcinoma; G protein-coupled estrogen receptor 1; epidermal growth factor receptor; chemokine receptor 1

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81072183; 81272937), the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2011BA5038) and the Key Project of Scientific Research of Chongqing Medical University (XBZD201002). Corresponding author: Liu Zhimin, E-mail: liuzm9999@yahoo.com.cn

甲状腺癌(thyroid carcinoma,TCa)是内分泌系统最常见的恶性肿瘤,亦是近年来全球增长速度最快的恶性肿瘤之一,其最常见的类型为甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma,PTC),约占全部TCa的80%[1]。PTC分化较好,但仍有约50%的高分化PTC患者伴有颈部淋巴结转移,严重影响其预后。G蛋白偶联雌激素受体1(G protein-coupled estrogen receptor1,GPER1),即G蛋白偶联受体30(G protein-coupled receptor 30,GPR30),是一种新型的雌激素受体,能介导17-β-雌二醇(E_2)的非基因组信号,参与肿瘤细胞的迁移、增殖、粘附、侵袭等[2-3]。

最新研究表明,GPER1通过激活表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)通路在子宫内膜癌、乳腺癌、甲状腺癌细胞中发挥作用[4]。GPER1-EGFR通路介导膜雌激素信号间接诱导IL-8的分泌,而IL-8进一步积累可能直接激活趋化因子受体1(chemokine receptor1,CXCR1),最终导致肿瘤细胞的迁移和侵袭能力增强[5]。本研究采用免疫组织化学法检测人甲状腺乳头状癌中GPER1和EGFR的表达,并联合检测CXCR1的表达,探讨其在人甲状腺乳头状癌侵袭、转移等生物学特性的相关性,为PTC的早期发现及预后评估提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集重庆医科大学附属第二医院普外科2009年2月-2011年10月手术后经病理诊断为PTC的组织标本共68例,其中男性14例,女性54例,年龄12~79岁,平均43岁。无淋巴结转移者(颈清标本病理证实)28例,有淋巴结转移者40例,取颈部转移淋巴结组织31例。依据国际抗癌联盟(UICC)TNM分期标准,其中Ⅰ期28例,Ⅱ期12例,Ⅲ期28例,Ⅳ期0例。患者术前均未接受过放射、化学治疗。同期设结节性甲状腺肿42例作为对照组。

1.2 主要试剂

兔抗人GPER1多克隆抗体(ab39742)购自Abcam公司,兔抗人EGFR多克隆抗体(bs1533)购自Bioworld公司,兔抗人CXCR1多克隆抗体(bs-1009R)购自博奥森公司,羊抗兔IgG-HRP(sc-2030)购自Santa Cruz公司,S-P免疫组化试剂盒、DAB试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 免疫组织化学

采用S-P法测定GPER1、EGFR及CXCR1。标本均经10%甲醛固定,石蜡包埋,4 μm连续切片。每例石蜡切片经常规脱蜡、水化、抗原修复;3%过氧化氢室温孵育30 min,阻断内源性过氧化物酶活性;山羊血清封闭30 min;滴加1∶200稀释的兔抗人GPER1、1∶50稀释的兔抗人EGFR和1∶100稀释的兔抗人CXCR1,4 ℃孵育过夜;滴加生物素标记的羊抗兔IgG 37 ℃孵育30 min;辣根酶标记链霉卵白素工作液,37 ℃孵育15 min。DAB显色,复染,脱水,透明,封片。用PBS替代一抗作阴性对照。

1.4 结果判定

400倍显微镜下每张切片选取5个高倍视野,阳性细胞为胞浆、胞膜染色为黄色或棕褐色颗粒。免疫组化结果判定根据阳性细胞百分率及显色深浅。阳性细胞的百分率:<5%为0、6%~25%为1、>25%~50%为2、>50%~75%为3、>75%为4。显色深浅:不显色或显色不清为0、浅黄色为1、棕黄色为2、深褐色为3。采用Remmele半定量评分,阳性细胞百分率和显色深浅的乘积0~1分为(-)、2~4分为(+)、5~8分为(++)、>9分为(+++)。为便于统计,+~++视为低表达,+++视为高表达。

1.5 统计学分析

应用SPSS 18.0统计软件对实验数据进行统计学处理。采用χ^2检验和Spearman等级相关分析。

2 结果

2.1 GPER1、EGFR和CXCR1在结节性甲状腺肿及PTC组织中的表达

GPER1、EGFR和CXCR1的表达主要定位于胞质和胞膜(图1),其在结节性甲状腺肿组的阳性率分别为21.4%、16.7%和11.9%,在PTC组中的阳性率分别为76.5%、66.2%、64.7%,均显著高于结节性甲状腺肿组($P<0.01$)。见表1。

2.2 GPER1、EGFR和CXCR1与PTC患者临床病理特征的关系

在68例PTC组织中,GPER1、EGFR及CXCR1的表达与患者淋巴结转移有关($P<0.05$),与年龄、性别、肿瘤直径及TNM分期无明显差异($P>0.05$)。见表2。

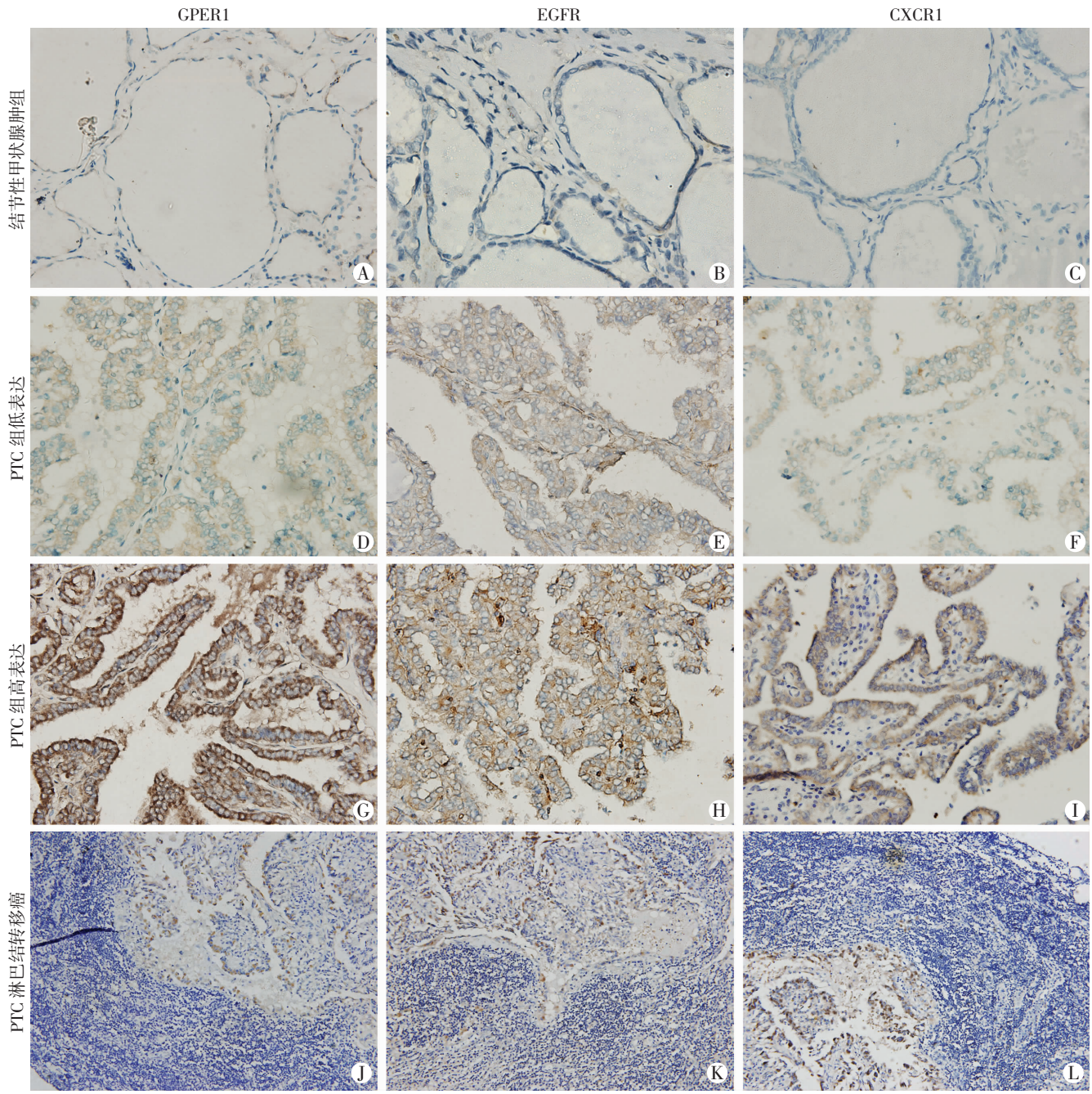
2.3 GPER1、EGFR和CXCR1在PTC及PTC颈部转移淋巴结组织中表达的相关性

经Spearman等级相关分析显示,在68例PTC组织中,

GPER1 与 EGFR、CXCR1 的表达呈正相关($r = 0.262$, $P = 0.031$; $r = 0.276$, $P = 0.025$)。见表 3。在 31 例 PTC 颈部转移淋巴结组织中,GPER1 与 EGFR、CXCR1 的表达呈显著正相关($r = 0.542$, $P = 0.002$; $r = 0.483$, $P = 0.006$)。见表 4。

表 1　GPER1、EGFR 和 CXCR1 在结节性甲状腺肿及 PTC 组织中的表达

组别	n	GPER1			EGFR			CXCR1		
		阳性例数(%)	χ^2	P	阳性例数(%)	χ^2	P	阳性例数(%)	χ^2	P
结节性甲状腺肿组	42	9(21.4)	31.843	0.000	7(16.7)	25.533	0.000	5(11.9)	29.303	0.000
PTC 组	68	52(76.5)			45 (66.2)			44 (64.7)		



A-F(×400);G-L:(×200);A、D、G、J:GPER1;B、E、H、K:EGFR;C、F、I、L:CXCR1

图 1　免疫组织化学观察结节性甲状腺肿、PTC 中 GPER1、EGFR 和 CXCR1 的表达(S-P)

表2 GPER1、EGFR和CXCR1在PTC中的表达与临床病理特征的关系

临床参数	n	GPER1			EGFR			CXCR1		
		阳性例数(%)	χ^2	P	阳性例数(%)	χ^2	P	阳性例数(%)	χ^2	P
年龄(岁)										
<45	38	28(73.7)	0.372	0.542	25(65.8)	0.006	0.939	21(55.3)	3.363	0.067
≥45	30	24(76.7)			20(66.7)			23(76.7)		
性别										
男性	14	10 (71.4)	0.249	0.618	8(57.1)	0.643	0.423	11(78.6)	1.484	0.223
女性	54	42(77.8)			37(65.5)			33(61.1)		
肿瘤直径(cm)										
<3	40	29(72.5)	0.851	0.356	24(60.0)	1.656	0.198	23(57.5)	2.209	0.137
≥3	28	23(82.1)			21(75.0)			21(75.0)		
TNM分期										
Ⅰ、Ⅱ期	40	30(75.0)	0.117	0.733	25(62.5)	0.587	0.444	24(60.0)	0.942	0.332
Ⅲ、Ⅳ期	28	22(78.6)			20(71.4)			20(75.0)		
淋巴结转移										
无转移	28	17(60.7)	6.568	0.010	14(50.0)	5.565	0.018	13(46.4)	6.963	0.008
有转移	40	35(87.5)			31(77.5)			31(77.5)		

表3 GPER1、EGFR和CXCR1在PTC组织中表达的相关性分析

GPER1	EGFR			r	P	CXCR1			r	P
	阴性	低表达	高表达			阴性	低表达	高表达		
阴性	9	5	2			10	5	1		
低表达	9	20	5	0.262	0.031	9	17	6	0.276	0.025
高表达	5	6	7			5	8	5		

表4 GPER1、EGFR和CXCR1在PTC颈部转移淋巴结组织中表达的相关性分析

GPER1	EGFR		r	P	CXCR1		r	P
	阴性	阳性			阴性	阳性		
阴性	3	1	0.542	0.002	3	1	0.483	0.006
阳性	3	24			4	23		

3 讨论

全世界每年有超过2亿人患有甲状腺增生性疾病(TPD),包括腺癌、腺瘤和甲状腺肿[6]。近年来,甲状腺癌的发病率呈逐年上升趋势,尤以甲状腺乳头状癌的升高最为明显。大量流行病学研究表明:甲状腺癌的发病存在明显的性别倾向,在PTC中,女性的发病率几乎是男性的3倍,且以育龄期女性发病率增加为主,女性绝经后其发病率逐渐下降[1],提示雌激素与甲状腺癌的发生、发展密切相关。早期研究认为,雌激素通过与雌激素受体ERα结合发挥生物学功能。体外实验观察到E_2能够促进TCa细胞的增殖、粘附、迁移和侵袭,经典的雌激素拮抗剂他莫昔芬、ICI182780则对这一过程有抑制作用[6-7]。临床随机试验显示他莫昔芬可降低雌激素敏感性乳腺癌风险,减少复发,延长患者的生存期[8-9]。最新研究表明,在多种肿瘤细胞中,抗雌激素剂对GPER1有激活作用[10-11]。不同于核受体ERα、ERβ,GPER1可以介导E_2通过非基因组雌激素信号通路迅速激活ERK1/2[12],参与肿瘤细胞的生物学进程,而GPER1介导E_2主要通过激活EGFR发挥作用[13-14]。本课题组前期研究证实,雌二醇通过GPER1可激活ERK1/2、PI3K-Akt通路,诱导甲状腺未分化癌细胞的增殖。Chandra等[15]通过体内外实验表明雌激素拮抗剂可以阻断GPER1-EGFR信号的激活,抑制肿瘤增殖。Venkatakrishnan等[16]报道EGFR参与CXCR1/CXCR2信号的激活,促进肿瘤生成和进展。其分子机制可能是:E_2与GPER1结合活化G蛋白,诱导细胞表面肝素结合性表皮生长因子(HB-EGF)的释放,反式激活EGFR,刺激ERK1/2、PI3K-Akt通路[17],促进NF-κB核转位及靶基因IL-8的表达,其下游因子CXCR1/CXCR2进一步被激活,最终使肿瘤细胞的侵袭性增加。基于这一假说,我们检测了GPER1、EGFR、CXCR1在甲状腺肿瘤组织中的表达情况,结果显示GPER1、EGFR及CXCR1在PTC组中表达阳性率明显高于结节性甲状腺肿组($P<0.01$)。三者的表达主要定位于胞膜和胞质,符合先前的报道[18-19]。

早期出现颈部淋巴结转移和远处转移,是TCa的主要不良预后因素。在TCa病理分类中,分化型的PTC数量最多,恶性程度较低,但仍有相当一部分患者较早的发生局部侵犯和转移,且术后转移复发的病例时有报道[7]。本研究中,GPER1、EGFR和CXCR1的表达与PTC患者有无颈部淋巴结转移显著相关($P<0.05$),而与其他重要的临床病理指标(年龄、性别、肿

瘤大小及TNM分期)均无明显关联。因此我们推测,过表达的GPER1、EGFR及CXCR1影响PTC细胞的侵袭和转移,可能对监测PTC淋巴结转移有重要意义。

有研究发现GPER1与卵巢癌、子宫内膜癌的预后密切相关,而并非乳腺癌的独立预后因子[20]。Fujiwara等[4]证实GPER1-EGFR信号通路能够促进卵巢癌细胞增殖,GPER1和EGFR的共同表达与其不良预后有关。EGFR位于正常及恶性上皮细胞膜表面,与配体结合二聚化后能引导下游的磷酸化,导致细胞增殖。EGFR高表达可能与一些肿瘤的预后密切相关,目前被认为是基于抗体治疗中的一个分子靶点[19]。CXCR1属G-蛋白偶联受体家族成员,是IL-8的受体之一,二者结合后通过G蛋白激活第2信使调节传递反应信号。相对高表达的CXCR1结合IL-8,提高癌细胞转移能力,导致预后不良[5]。通过等级相关分析我们发现,在PTC和PTC颈部转移淋巴结组织中,GPER1与EGFR、CXCR1的表达均呈显著正相关($P<0.05$),这表明三者之间可能存在一种相互协同作用,共同参与PTC的发生、发展过程。

综上所述,本研究结果显示GPER1、EGFR和CXCR1在PTC中的过表达与淋巴结转移显著相关,三者之间呈正相关,提示其表达情况可能作为监测PTC发展的指标。目前有关TCa中雌激素结合蛋白的表达及作用机制在国内外并无一致结论[12,21],其原因可能是雌激素可以通过不同受体和多通路发挥作用。进一步研究GPER1/EGFR/CXCR1串扰通路的作用机制以及与其他雌激素相关因子的关系,可能为PTC的临床治疗和预后评估提供更多理论依据。

参考文献:

[1] Rahbari R, Zhang L, Kebebew E. Thyroid cancer gender disparity [J]. Future Oncol, 2010, 6(11): 1771-1779.

[2] Fraser S P, Ozerlat-Gunduz I, Onkal R, *et al*. Estrogen and non-genomic upregulation of voltage-gated Na(+) channel activity in MDA-MB-231 human breast cancer cells: role in adhesion[J]. J Cell Physiol, 2010, 224(2): 527-539.

[3] He Y Y, Cai B, Yang Y X, *et al*. Estrogenic G protein-coupled receptor 30 signaling is involved in regulation of endometrial carcinoma by promoting proliferation, invasion potential, and interleukin-6 secretion *via* the MEK/ERK mitogen-activated protein kinase pathway [J]. Cancer Sci, 2009, 100(6): 1051-1061.

[4] Fujiwara S, Terai Y, Kawaguchi H, *et al*. GPR30 regulates the EGFR-Akt cascade and predicts lower survival in patients with ovarian cancer[J]. J Ovarian Res, 2012, 5(1): 35.

[5] Jiang Q F, Wu T T, Yang J Y, *et al*. 17β-estradiol promotes the invasion and migration of nuclear estrogen receptor-negative breast cancer cells through cross-talk between GPER1 and CXCR1[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2013, 138: 314-324.

[6] Rajoria S, Suriano R, Shanmugam A, *et al*. Metastatic phenotype is regulated by estrogen in thyroid cells[J]. Thyroid, 2010, 20(1): 33-41.

[7] 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.

[8] Glaeser M, Niederacher D, Djahansouzi S, *et al*. Effects of the antiestrogens tamoxifen and raloxifene on the estrogen receptor transactivation machinery[J]. Anticancer Res, 2006, 26(1B): 735-744.

[9] Early Breast Cancer Trialists´Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials[J]. Lancet, 2005, 365(9472): 1687-1717.

[10] Ignatov A, Ignatov T, Roessner A, *et al*. Role of GPR30 in the mechanisms of tamoxifen resistance in breast cancer MCF-7 cells[J]. Breast Cancer Res Treat, 2010, 123(1): 87-96.

[11] Kang L, Zhang X, Xie Y, *et al*. Involvement of estrogen receptor variant ER-alpha36, not GPR30, in nongenomic estrogen signaling [J]. Mol Endocrinol, 2010, 24(4): 709-721.

[12] Kumar A, Klinge C M, Goldstein R E. Estradiol-induced proliferation of papillary and follicular thyroid cancer cells is mediated by estrogen receptors alpha and beta[J]. Int J Oncol, 2010, 36(5): 1067-1080.

[13] Filardo E J, Quinn J A, Sabo E. Association of the membrane estrogen receptor, GPR30, with breast tumor metastasis and transactivation of the epidermal growth factor receptor[J]. Steroids, 2008, 73(9/10): 870-873.

[14] Revankar C M, Cimino D F, Sklar L A, *et al*. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling[J]. Science, 2005, 307(5715): 1625-1630.

[15] Chandra V, Fatima I, Saxena R *et al*. Anti-tumorigenic action of 2-[piperidinoethoxyphenyl]-3-[4-hydroxyphenyl]-2H-benzo(b)pyran: evidence for involvement of GPR30/EGFR signaling pathway[J]. Gynecol Oncol, 2013, 129(2): 433-442.

[16] Venkatakrishnan G, Salgia R, Groopman J E. Chemokine receptors CXCR-1/2 activate mitogen-activated protein kinase *via* the epidermal growth factor receptor in ovarian cancer cells[J]. J Biol Chem, 2000, 275(10): 6868-6875.

[17] 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.

[18]. Ohshiro K, Schwartz A M, Levine P H, *et al*. Alternate estrogen receptors promote invasion of inflammatory breast cancer cells via nongenomic signaling[J]. PLoS One, 2012, 7(1): e30725.

[19] Hong L, Han Y, Zhang H, *et al*. High expression of epidermal growth factor receptor might predict poor survival in patients with colon cancer: a meta-analysis[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2013, 17(4): 348-351.

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

[21] 李飞, 罗浩军, 罗平, 等. 雌激素受体GPR30、ERα和PR在甲状腺癌组织中的表达及相关性[J]. 第三军医大学学报, 2011, 3(16): 1691-1694.

(**收稿**:2013-10-11;**修回**:2014-01-16)

(编辑 王 红)