基础研究 文章编号:0253-3626(2011)04-0437-03

FEZ1基因在甲状腺乳头状癌中的表达及其意义

原志庆[1],陈晓磊[3],李 娜[2],贺国洋[2],王 霞[2],杨慧林[2],郑丽丽[1]
(1.郑州大学第一附属医院内分泌科,郑州 450052;2.新乡医学院病理学教研室,新乡 453003;
3.河南省漯河市第三人民医院骨科,漯河 462600)

【摘 要】目的:探讨肿瘤抑制基因 FEZ1 在甲状腺乳头状癌(Papillary thyroid cancer,PTC)中的表达及其与 PTC 临床病理特征之间的关系。方法:采用原位杂交(Insitu hybridization,ISH)技术和免疫组织化学(Immunohistochemistry,IHC)检测 30 例正常甲状腺组织、30 例 PTC 组织和 30 例 PTC 组织中 FEZ1 mRNA 和蛋白的表达情况,并分析其与 PTC 临床病理参数的关系。结果:FEZ1 mRNA 和蛋白在正常甲状腺组织中的阳性表达率均显著高于甲状腺腺瘤(P均<0.05)和 PTC 组织(P均<0.05);FEZ1 mRNA 和蛋白在Ⅰ、Ⅱ期 PTC 组织中的阳性表达率均显著高于Ⅲ、Ⅳ期 PTC 组织中的阳性表达率(P均<0.05);无淋巴结转移组中的 FEZ1 mRNA 和蛋白阳性表达率亦均显著高于伴淋巴结转移组(P均<0.05)。PTC 中 FEZ1 mRNA 和蛋白的表达呈正相关关系(P<0.05)。结论:FEZ1 基因的表达缺失或下调与 PTC 的发生与演进存在密切关系。

【关键词】甲状腺乳头状癌;FEZ1;免疫组织化学;原位杂交;甲状腺腺瘤
【中国图书分类法分类号】R322.5 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-01-18

Expression and significance of FEZ1 in papillary thyroid carcinoma

YUAN Zhi-qing, et al
(*Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital, Zhengzhou University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate expression of tumor suppressor gene FEZ1 and whether there is a correlation between FEZ1 expression and clinicopathological features of papillary thyroid carcinoma. *Methods*: The expression of FEZ1 mRNA and protein in 30 cases of normal thyroid and 30 cases of adenomas and 30 cases of papillary thyroid carcinoma were detected by in situ hubridyzation (ISH) and immuno-histochemistry (IHC) methods. *Results*: The positive expression rate of FEZ1 mRNA and protein in normal thyroid were significantly higher than that in adenomas (P<0.05) and papillary thyroid cancer (P<0.05). The positive expression rate of FEZ1 mRNA and protein in clinical pathology stage of Ⅰ and Ⅱ was significantly higher than that in clinical pathology stage of Ⅲ and Ⅳ (P<0.05). The positive expression rate of FEZ1 mRNA and protein in lymphotic metastasis negative group were significantly higher than that in lymphotic metastasis positive group (P<0.05). *Conclusion*: The non-expression or low expression of FEZ1 gene may be relation with the occurrence and progression of papillary thyroid cancer.

【Key words】papillary thyroid cancer; FEZ1; immuno-histochemistry; in situ hubridyzation; thyroid adenoma

甲状腺乳头状癌(Papillary thyroid cancer,PTC)是常见的内分泌肿瘤,我国 PTC 发病率也在逐年增加[1],引起 PTC 的原因尚不十分清楚,近年来的研究证实,抑癌基因的失活,是肿瘤发生发展过程中重要的分子遗传学改变,引起了人们的高度重视。FEZ1/LZTS1 基因是近年来发现的 1 个抑癌基因,编码 1 个亮氨酸拉链蛋白,与依赖 cAMP 激活的转录因子 5 的 DNA 结构域有很大相似性,是富含亮氨酸重复序列超家族蛋白之一[2]。鉴于 FEZ1 基因在一些恶性肿瘤中表现为肿瘤抑制作用,但其在 PTC 中的作用尚不明确,因此,本研究采用原位杂交(Insitu hybridization,ISH)和免疫组织化学(Immunohistochemistry,IHC)技术检测正常甲状腺、甲状腺腺瘤和 PTC 组织中 FEZ1 mRNA 和蛋白的表达,探讨其在 PTC 发生发展过程中的作用。

作者介绍:原志庆(1957-),男,教授,博士,
研究方向:内分泌的防治疾病。
通信作者:郑丽丽,女,教授,Email:Zhengli1012@126.com。
基金项目:河南省科技创新计划科技创新杰出青年资助项目
(编号:94100510007)。

1 材料和方法

1.1 标本收集及处理

收集河南省肿瘤医院病理科 2006 年 1 月~2009 年 12 月手术切除甲状腺腺瘤和 PTC 石蜡包埋标本各 30 例,术前未经过任何治疗,随机选取甲状腺瘤旁组织 30 例(病理证实为非肿瘤组织)作为对照组。30 例 PTC 患者中Ⅰ、Ⅱ期 13 例,Ⅲ、Ⅳ期 17 例;以肿瘤的最大径代表肿瘤的大小,30 例 PTC 肿瘤的最大径从 0.48 cm 到 5 cm,平均值为 2.04 cm;其中 14 例淋巴结转移阴性,16 例淋巴结转移阳性。所有标本常规石蜡包埋制成 4 μm 厚切片,其中 1 张切片 HE 染色进行病理形态

学观察，其余切片用于 ISH 和 IHC 染色。

1.2　主要试剂

免疫组化试剂盒（PV9000）、DAB 显色剂、氨丙基三乙氧硅烷（3 aminopmpltriethoxsilane，APES）购自北京中杉金桥生物技术有限公司；FEZ1 鼠多克隆抗体购自美国 santa cruz 公司；焦碳酸二乙脂（Diethylyprocarbonate，DEPC）购自美国 Fluka 公司；人 ISH 检测试剂盒（MK2210h）购自武汉博士德生物工程有限公司；ISH 探针 5'端生物素标记、全硫代修饰由上海英潍捷基生物公司合成，FEZ1 探针序列：5'-caatcagc-tagaaatgggctccgagaag-3'。

1.3　IHC 染色

采用免疫组化 SP 法，染色步骤：切片常规脱蜡入蒸馏水，PBS 清洗，抗原修复，3%过氧化氢清除内源性过氧化物酶，PBS 清洗，滴加正常山羊血清封闭，加Ⅰ抗（1:50 稀释），4℃冰箱过夜，PBS 清洗，滴加Ⅱ抗工作液，PBS 清洗，滴加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液，PBS 清洗，DAB 显色。苏木素复染，脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。PBS 代替Ⅰ抗作阴性对照。

1.4　IHC 结果判定

FEZ1 阳性显色为棕黄色颗粒，主要位于细胞质，少部分位于细胞核；参照有关文献[3]，在高倍视野下（400×）随机选取 5 个视野（每个视野观察不少于 200 个细胞），按阳性细胞所占的百分比及着色强度进行结果判定：①按着色强度评分：0 分为无着色；1 分为浅黄色；2 为黄色；3 分为棕黄色。②按阳性细胞数占同类细胞数的百分比评分：0 分为阴性，1 分为阳性细胞数≤10%，2 分为阳性细胞数 11%～50%，3 分为阳性细胞数 51%～75%，4 分为阳性细胞数 >75%。取①、②两项评分的乘积作为总积分，0～3 分为阴性（-），3 分以上为阳性（+）。

1.5　ISH 染色

标本经新鲜配制二甲苯脱蜡，梯度酒精脱水后，用新鲜配制的体积分数 0.5%H_2O_2 室温处理 30 min，以灭活内源性过氧化物酶，质量分数 3%柠檬酸新鲜配制蛋白酶，37℃，10 min，消化标本 DNA 结合蛋白，每张玻片滴加 20 μl 不含探针的预杂交液，40℃预杂交 4 h，加含探针的杂交液 20 μl，40℃杂交过夜，杂交后洗涤，滴加生物素化过氧化物酶，PBS 清洗，DAB 显色，苏木素复染，脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。以不含探针的标本作阴性对照。

1.6　ISH 结果判定

FEZ1 阳性信号为棕黄色颗粒，定位于细胞质；参照文献[4]，原位杂交的阳性计算方法为：于高倍镜下（×400）随即选取 10 个视野（每个视野观察细胞数不少于 100 个），阳性细胞数 <30%、30%~70%、>70%分别记 1、2、3 分。阳性着色强度：杂交信号强度可分为弱（+）、中（++）、强（+++）三级，分别记 1、2、3 分：1 分为弱阳性（+）：细胞浆内可见浅黄色颗粒，明显高于背景底色。2 分为阳性（++）：细胞浆内见黄色颗粒。3 分为强阳性（+++）：细胞浆内有大量棕黄色颗粒。上述 2 种记分相乘，<2 分者为阴性，≥2 分者为阳性。

1.7　统计学处理

实验结果应用 SPSS16.0 统计分析软件进行分析，计数资料采用 χ^2 检验和费歇尔精确检验，检验水准 α=0.05，相关性分析采用 Kappa 相关分析。

2　结　果

2.1　FEZ1 蛋白在 PTC、甲状腺腺瘤及正常甲状腺组织中的表达

FEZ1 蛋白阳性表达呈棕黄色颗粒，主要位于细胞质，少数位于细胞核。在甲状腺腺瘤和 PTC 组织中亦以胞质着色为主，但常常表现为淡染或无着色（见图 1）。FEZ1 蛋白在正常甲状腺组织中的阳性表达率显著高于甲状腺腺瘤中的阳性表达率（χ^2=5.963，P=0.015），亦显著高于其在PTC 组织中的阳性表达率（χ^2=13.017，P = 0.000），FEZ1 蛋白的阳性表达率在甲状腺腺瘤与PTC组织中相比，差异无统计学意义（P>0.05）（见表 1）。

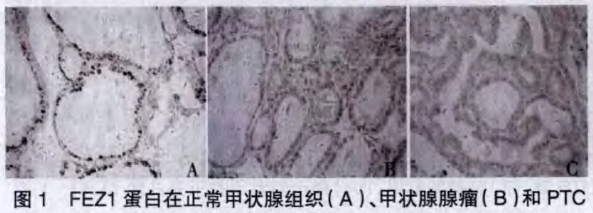


图 1　FEZ1 蛋白在正常甲状腺组织（A）、甲状腺腺瘤（B）和 PTC（C）中的表达（ICH ×400）

表 1　FEZ1 蛋白在正常甲状腺组织、甲状腺腺瘤和 PTC 组织中的表达

组别	例数	FEZ1蛋白		阳性率（%）	χ^2	P
		阳性例数	阴性例数			
正常甲状腺	30	27	3	90.00		
甲状腺腺瘤	30	19	11	63.33	12.900	0.002
PTC	30	14	16	46.67		

2.2　PTC 组织中 FEZ1 蛋白的表达与其临床病理特征的关系

FEZ1 蛋白在Ⅰ、Ⅱ期 PTC 组织中的阳性表达率显著高于其在Ⅲ、Ⅳ期中的阳性表达率；FEZ1 蛋白在无淋巴结转移组中的阳性表达率显著高于淋巴结转移组（P<0.05），提示说明 FEZ1 蛋白表达与 PTC 的临床分期及淋巴结转移之间存在相关性（见表 2）。

表 2　PTC 组织中 FEZ1 蛋白的表达与临床病理特征的关系

组别	例数	FEZ1蛋白		阳性率（%）	χ^2	P
		阳性例数	阴性例数			
肿瘤大小						
≤2 cm	7	3	4	42.86	0.053	1.000
>2 cm	23	11	12	47.83		
临床分期						
Ⅰ、Ⅱ期	17	11	6	64.70	5.129	0.033
Ⅲ、Ⅳ期	13	3	10	23.08		
淋巴结转移						
阴性	14	10	4	71.40	6.467	0.026
阳性	16	4	12	25.00		

2.3 FEZ1 mRNA 在 PTC、甲状腺腺瘤及正常甲状腺组织中的表达

FEZ1 mRNA 在正常甲状腺胞质中强染色，呈棕黄色颗粒，在甲状腺腺瘤和 PTC 组织中亦以胞质着色为主，但常常表现为淡染或无着色（见图 2）。FEZ1 mRNA 在正常甲状腺组织中的阳性表达率显著高于甲状腺腺瘤中的阳性表达率（χ^2=5.455，P=0.020），亦显著高于其在 PTC 组织中的阳性表达率（χ^2=10.800，P=0.001），FEZ1 mRNA 的阳性表达率在甲状腺腺瘤与 PTC 组织中相比，无显著性差异（P>0.05）（见表 3）。



图 2 FEZ1 mRNA 在正常甲状腺组织（A）、甲状腺腺瘤（B）和 PTC（C）中的表达（ICH ×400）

表 3 FEZ1 mRNA 在正常甲状腺组织及甲状腺腺瘤和 PTC 组织中的表达

组别	例数	FEZ1 mRNA 阳性例数	FEZ1 mRNA 阴性例数	阳性率（%）	χ^2	P
正常甲状腺	30	26	4	86.67		
甲状腺腺瘤	30	18	12	60.00	10.862	0.004
PTC	30	14	16	46.67		

2.4 PTC 组织中 FEZ1 mRNA 的表达与其临床病理特征的关系

FEZ1 mRNA 在Ⅰ、Ⅱ期 PTC 组织中的阳性表达率显著高于其在Ⅲ、Ⅳ期 PTC 组织中的阳性表达率（P<0.05），FEZ1 mRNA 在无淋巴结转移组中的阳性表达率显著高于伴淋巴结转移组中的阳性表达率（P<0.05）说明 FEZ1 mRNA 表达与 PTC 的临床分期和淋巴结转移之间存在相关性（见表4）。

表 4 PTC 组织中 FEZ1 mRNA 的表达与临床病理特征的关系

组别	例数	FEZ1 mRNA 阳性例数	FEZ1 mRNA 阴性例数	阳性率（%）	χ^2	P
肿瘤大小						
≤2 cm	7	3	4	42.86	0.053	1.000
>2 cm	23	11	12	47.83		
临床分期						
Ⅰ、Ⅱ期	17	11	6	64.70	5.129	0.033
Ⅲ、Ⅳ期	13	3	10	23.08		
淋巴结转移						
阴性	14	11	3	78.60	10.736	0.003
阳性	16	3	13	18.80		

2.5 PTC 组织中 FEZ1 蛋白与 FEZ1 mRNA 表达的相关性分析

在 14 例 FEZ1 蛋白阳性表达的标本中，FEZ1 mRNA 阳性表达的标本有 12 例，其符合率高达 85.71%；相关性分析显示 FEZ1 蛋白的表达和 FEZ1 mRNA 的表达呈正相关（P<0.05），说明在 PTC 癌组织中 FEZ1 蛋白的低表达可能是由于在 mRNA 水平的转录活性降低所致（见表 5）。

表 5 PTC 组织中 FEZ1 蛋白与 FEZ1 mRNA 表达的关系

FEZ1蛋白	FEZ1 mRNA +	FEZ1 mRNA −	合计	K	P
+	12	2	14	0.625	0.000
−	2	14	16		
合计	14	16	30		

3 讨 论

甲状腺癌是最常见的头颈部恶性肿瘤，也是近年来发病率增加最快的恶性肿瘤之一。PTC 是最常见的组织类型，占甲状腺癌的 59.9%~89.0%，其病因不详，可能是多种机制作用的结果[5]。因此对 PTC 发生的分子机理的研究已经越来越受到人们的关注。FEZ1 基因是 Ishii 等人于 1999 年利用微卫星技术对原发性食管癌进行研究时所发现。近年来研究发现 FEZ1 在许多正常组织中普遍表达，而在许多人类肿瘤包括膀胱移行细胞癌、前列腺癌、肺癌、乳腺癌、胃癌等组织中都存在异常表达[2,6,7]。有关 FEZ1 基因的突变已经在包括乳腺癌、前列腺癌、食管癌、胃癌在内的几种实体肿瘤中被报道[1,6]，并认为 FEZ1 在细胞周期中通过 cAMP 依赖激酶高磷酸化，使细胞产生 G_2/M 期阻滞，抑制细胞的生长，抑制肿瘤的发生。另外，其与微管组分有关，在 S-G_2/M 期与 P34cdc2 相互作用抑制生长，通过调节有丝分裂异常，导致细胞生长失控。本研究检测了 30 例正常甲状腺组织、30 例甲状腺腺瘤和 30 例 PTC 组织中 FEZ1 蛋白和 mRNA 的表达，结果显示 30 例正常甲状腺组织中 FEZ1 蛋白和 mRNA 的表达均显著高于甲状腺腺瘤和 PTC 组织中的表达（P < 0.05），说明 FEZ1 的表达降低或缺失是 PTC 发生过程中的早期分子事件。Ishii 等[8]构建了 Tet 诱导的 FEZ1 蛋白表达载体，将 FEZ1 转染入 FEZ1 阴性表达的 MCF-7 乳腺癌细胞中，发现与对照组相比实验组细胞生长明显下降。动物实验也发现转染了 FEZ1 的MCF-7 细胞的肿瘤形成能力明显下降。

Vecchione 等[9,10]检测了胃癌、膀胱移行细胞癌中 FEZ1 蛋白的表达，结果发现所有的细胞系中几乎均不能检测到该蛋白的表达。Nonaka 等[2]分析了 103 例原发性肺癌样本中 FEZ1 蛋白的表达，结果发现 27 例（26%）FEZ1 蛋白表达缺失，43 例（42%）表达下降。以上研究均显示 FEZ1 蛋白在各种恶性上皮性肿瘤中表达缺失或下降的频率高达 50%以上，说明 FEZ1 蛋白在多种人类肿瘤中起作用。虽然 FEZ1 蛋白并不具有组织器官特异性的表达缺失，但是在多种恶性肿瘤中具有如此高的表达缺失和下调率说明该蛋白在维持正常细胞生理过程中具有非常重要的作用。

本研究亦分析了 FEZ1 蛋白和 mRNA 的表达与患者肿瘤大小、临床分期和淋巴结转移等主要临床病理学特征间的关系，结果显示 FEZ1 蛋白和 mRNA 的表达与 PTC 的临床分期和淋巴结转移显著相关（P<0.05），与肿瘤大小无关，这一结果进一步提示 FEZ1 的表达缺失或下降与 PTC 的发生、发展存在密切关系。相关性分析显示 FEZ1 蛋白和 FEZ1 mRNA

基础研究 文章编号：0253-3626（2011）04-0440-04

老年大鼠胼胝体额区有髓神经纤维与髓鞘改变的研究

徐 瑆[1]，兰 欢[2]，卢 伟[3]，唐 勇[3]

（1. 泸州医学院组织胚胎学教研室，泸州 646000；2. 泸州医学院心肌电生理学研究室，泸州 646000；
3. 重庆医科大学基础医学院组织胚胎学教研室，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨老年大鼠胼胝体额区有髓神经纤维、髓鞘的结构变化和髓鞘碱性蛋白（Myelin basic protein，MBP）的表达变化，以及二者间的关系。方法：运用透射电子显微镜和新的体视学方法分别对年轻组和老年组雌性 Long-Evans 大鼠胼胝体额区有髓神经纤维和髓鞘进行定量研究，运用 Western blot 对年轻组和老年组大鼠胼胝体额区 MBP 表达进行定量研究。结果：与年轻组相比，老年组胼胝体额区体积存在显著性降低，有髓神经纤维总体积显著性下降，21.5 kD MBP 表达量显著性降低。21.5 kD MBP 的表达降低与有髓神经纤维总体积、髓鞘总体积的降低之间呈正相关。结论：胼胝体存在显著性老年萎缩，胼胝体额区有髓神经纤维和 MBP 的老年改变可能与老年大脑额叶功能下降有关。

【关键词】胼胝体额区；髓鞘碱性蛋白；有髓神经纤维；体视学；老年改变

【中国图书分类法分类号】R322.81；R329.54 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-12-11

Myelin in the frontal region of corpus callosum in old rats

XU Qiang, et al

(*Department of Histology and Embryology, Luzhou Medical College*)

【Abstract】*Objective*: To explore the age-related changes of the myelinated fibers, myelin sheath and the expression of myelin basic protein in the frontal region of the corpus callosum in old rats, and their relationship. *Methods*: The myelinated fibers and sheathes in the frontal region of corpus callosum of young and old-aged female Long-Evans rats were quantitatively studied using electron microscope and unbiased stereological techniques. Myelin basic proteins in the frontal region of corpus callosum of young and

作者介绍：徐 瑆（1978-），男，硕士，助教，研究方向：神经生物学，老年衰老。

通信作者：唐 勇，男，教授，Email：ytang062@yahoo.com.cn。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：30572075）；重庆市自然科学基金资助项目（编号：2005BB5034）；泸州医学院青年基金资助项目（编号：201017）。

的表达呈正相关（$P<0.05$），说明在 PTC 组织中 FEZ1 蛋白的低表达可能是由于在 mRNA 水平的转录活性降低所致，但由于本实验中无其它组织类型，因此 FEZ1 的表达在其他类型的 PTC 中是否存在组织类型特异性还有待于增加其它组织类型的样本进一步观察。

目前为止，FEZ1 基因表达减少或缺失的原因还不清楚，Ishii 等[8]在对前列腺癌，食管癌和乳腺癌等多种上皮肿瘤进行分析时发现 2 个食管癌以及 1 个前列腺癌细胞株中该基因存在点突变，同时他们还发现在乳腺癌细胞株中有单一重排和等位基因的缺失，因此该基因的失活可能包括基因的缺失或突变，但其失活的确切机制还有待于进一步研究。

参 考 文 献

[1] Hegedus L. Clinical practice: The thyroid nodule[J]. N Engl J Med, 2004, 351(17): 1764-1771.

[2] Nonaka D, Fabbri A, Roz L, et al. Reduced FEZ1/LZTS1 expression and outcome prediction in lung cancer[J]. Cancer Res, 2005, 65(4): 1207-1212.

[3] 许良中，杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准[J]. 中国癌症杂志，1996，4(6)：229-231.

[4] 尹 磊，张功员，刘 键，等. 食管鳞状细胞癌组织中 EGF 蛋白和 mRNA 的表达[J]. 郑州大学学报，2007，42(6)：1099-1101.

[5] 许 敬，葛明华，凌志强，等. 甲状腺乳头状癌中 TSHR 基因启动子区 5'-CpG 岛甲基化研究[J]. 肿瘤，2010，30(8)：696-699.

[6] Vecchione A, Galetti T P, Gardiman M, et al. Collecting duct carcinoma of the kidney: an immunohistochemical study of 11 cases[J]. Bmc Urol, 2004, 9(4): 11.

[7] Hosseini H A, Ahani A, Galehdari H, et al. Frequent loss of heterozygosity at 8p22 chromosomal region in diffuse type of gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(24): 3354-3358.

[8] Ishii H, Vecchione A, Murakumo Y, et al. FEZ1/LZTS1 gene at 8p22 suppresses cancer cell growth and regulates mitosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(18): 10374-10379.

[9] Vecchione A, Croce C M, Baldassarre G, et al. Fez1/Lzts1 a new mitotic regulator implicated in cancer development[J]. Cell Div, 2007, 24(2): 24.

[10] Vecchione A, Ishii H, Baldassarre G, et al. Fez1/LZTS1 is down-regulated in high-grade bladder cancer, and its restoration suppresses tumorigenicity in transitional cell carcinoma cells[J]. Am J Pathol, 2002, 160(4): 1345-1352.

（责任编辑：关蕴良）