

乙酰肝素酶与甲状腺乳头状癌淋巴结转移的相关性研究*

Effect of Heparanase on Lymphatic Metastasis of Papillary Thyroid Neoplasms

杨传家¹, 宫建^{2**}, 吴锋³, 王国锋⁴, 许维雪¹, 刘臻¹, 崔东旭^{1**}

YANG Chuan-jia¹, GONG Jian², WU Feng³, WANG Guo-feng⁴, XU Wei-xue¹, LIU Zhen¹, CUI Dong-xu¹

(1. 中国医科大学附属盛京医院胰腺甲状腺外科, 辽宁沈阳 110004; 2. 沈阳药科大学生命科学与生物制药学院临床药学教研室, 辽宁沈阳 110016; 3. 大连市第六人民医院 ICU 科, 辽宁大连 116000; 4. 中国医科大学附属第四医院心内科, 辽宁沈阳 110004)

(1. Department of Pancreatic and Thyroid, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang, Liaoning, 110004, China; 2. Department of Clinical Pharmacy, School of Life Science and Biopharmaceutics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang, Liaoning, 110016, China; 3. Intensive Care Unit, Sixth Hospital of Dalian, Dalian, Liaoning, 116000, China; 4. Department of Cardiology, the Fourth Hospital, China Medical University, Shenyang, Liaoning, 110004, China)

摘要:【目的】通过研究乙酰肝素酶(HPA)含量与微淋巴管密度的关系,探讨 HPA 在甲状腺乳头状癌淋巴结转移中的作用。【方法】采用 Envision 免疫组织化学两步法检测 150 例甲状腺乳头状癌和 200 例结节性甲状腺肿患者乙酰肝素酶、D2-40 的表达情况,计算乙酰肝素酶平均光密度值与 D2-40 阳性标记的微淋巴管密度,分析乙酰肝素酶含量与微淋巴管密度间的关系,同时与结节性甲状腺肿患者微淋巴管密度和乙酰肝素酶含量分别进行比较。【结果】甲状腺乳头状癌患者微淋巴管密度和乙酰肝素酶含量明显高于结节性甲状腺肿患者 ($P < 0.01$),癌组织乙酰肝素酶含量与微淋巴管密度呈正相关关系 ($P < 0.01$)。【结论】甲状腺乳头状癌患者乙酰肝素酶与微淋巴管形成有密切关系,乙酰肝素酶可作为其临床疗效判断和新药研发的参考指标。

关键词: 甲状腺癌 淋巴结转移 微淋巴管 乙酰肝素酶

中图分类号:R736.1 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2015)01-0044-04

Abstract:【Objective】By studying the relationship between heparanase (HPA) content and micro-lymphatic vessel density, we investigated the effect of heparanase on lymphatic metastasis of papillary thyroid cancer.【Methods】Heparanase and D2-40 levels were detected in 150 specimens of papillary thyroid cancer and 200 of nodular goiter by Envision immunohistochemistry.

Micro-lymphatic vessels were identified immunohistochemically as D2-40-positive. The relationship between micro-lymphatic vessel density and heparanase levels was analyzed.【Results】Micro-lymphatic vessel density and heparanase levels in patients with papillary thyroid cancer were significantly higher than those in nodular goiter patients ($P < 0.01$). The content of heparanase was positively related with the micro-lymphatic vessel density in tumor tissues (P

收稿日期:2014-05-12

修回日期:2014-05-18

作者简介:杨传家(1981-),男,主治医师,讲师,主要从事甲状腺疾病相关的研究。

* 中国医大盛京医院科学研究基金项目(M996)和国家自然科学基金项目(81072182)资助。

** 通讯作者:崔东旭(1964-),男,教授,主要从事胰腺及甲状腺相关的研究;宫建(1979-),男,讲师,主要从事药物流行病学及甲状腺相关疾病的研究。

<0.01). **【Conclusion】**The metastasis process of papillary thyroid cancer is associated with heparanase levels. Heparanase may be a potential marker on the therapeutic effect and new drugs for papillary thyroid cancer in the future.

Key words: thyroid carcinoma, lymph node metastasis, micro-lymphatic vessel, heparanase

0 引言

【研究意义】甲状腺癌是头颈部最常见的恶性肿瘤之一,近年来发病率逐年上升^[1,2],其中乳头状甲状腺癌是最常见的病理分型,且易发生颈部淋巴结转移^[3]。探查乳头状甲状腺癌颈部淋巴结转移的标记物,将有助于甲状腺乳头状癌治疗的疗效评价和新药研发。**【前人研究进展】**乙酰肝素酶(Heparanase, HPA)是哺乳动物体内唯一能切割细胞外基质中硫酸乙酰肝素侧链的内切性糖苷酶,对肿瘤的生长分化、侵袭转移具有重要的作用。乳头状甲状腺癌的生长分化、侵袭转移直接影响患者的治疗和预后。对甲状腺疾病住院患者的基础研究证实^[4~6],乳头状甲状腺癌淋巴结转移与微淋巴管密度密切相关,D2-40可作为疗效判断的标记物,但HPA在其中的作用和表达情况,目前尚不明了^[7]。**【本研究切入点】**阐明HPA与乳头状甲状腺癌淋巴结转移的关系,为以HPA为靶点的抗癌药物研究提供依据。**【拟解决的关键问题】**通过研究乙酰肝素酶的表达与微淋巴管生成之间的关系,探讨HPA在乳头状甲状腺癌淋巴结转移中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象

自2011年5月至2013年8月,从沈阳市某三级甲等医院抽样选取乳头状甲状腺癌患者150例,设为病例组,其中男62例,女88例,年龄(46.4±7.4)岁,淋巴结转移51例,无淋巴结转移99例;患者术前无甲状腺外侵犯及远处转移,且未采取任何抗肿瘤治疗措施。选取同期组织学类型经病理证实为结节性甲状腺肿的患者200例,设为对照组,其中男100例,女100例,年龄(47.2±10.7)岁。研究方案获得医院伦理道德委员会同意,研究对象事先告知并由患者或其家属签署知情同意书。

1.1.2 试剂

兔抗人HPA多克隆抗体(博士德生物工程有限公司);mAbD2-40、PV9000检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);苏木精-伊红(HE)染色试剂;0.01%磷酸盐缓冲液(PBS)。

1.2 方法

1.2.1 HPA和D2-40的检测方法

收集研究对象手术过程中切除的组织,常规福尔马林固定、取材、石蜡包埋并切片(3 μm)。经烤片、脱蜡后,分别进行HE染色及免疫组织化学染色。为保证切片着色时间的一致性,以每10张切片为一组进行染色操作。镜下观察乳头状甲状腺癌组织中心区、边缘区、癌旁组织及结节性甲状腺肿。以世界卫生组织2000年病理分型标准为甲状腺乳头状癌分类,并由诊断经验丰富的病理医生再次确认。

采用Envision免疫组织化学两步法分别检测HPA和D2-40的表达^[5],主要步骤:石蜡切片常规脱蜡水化,微波修复后置于3% H₂O₂中30 min,室温下血清封闭30 min,用以阻断内源性过氧化物酶;然后滴加一抗(HPA或D2-40)孵育过夜;次日晨,用0.01% PBS洗3次,每次5 min;清洗后用辣根酶标记的羊抗小鼠IgG使之发生多聚体反应,再次用0.01% PBS洗3次;最后用二氨基联苯胺(DAB)显色,并用蒸馏水终止反应,进而用苏木素复染并常规脱水、透明、封片,光镜下观察。每次染色均设阳性和阴性对照。

1.2.2 判断方法

HPA阳性染色为细胞浆或细胞核着色,棕黄色着色为阳性;D2-40阳性染色为细胞浆着色,棕黄色着色为阳性。400倍光镜下观察切片,每例患者选取5张切片,每张切片随机选择5个视野,以图象分析系统(MetaMorph / DP10 / BX41, UIC / OLYMPUS, US / JP)计算HPA平均光密度值,以D2-40阳性标记的微淋巴管数目计算平均微淋巴管密度(MVD)值。

1.2.3 统计学分析

数据用SPSS16.0统计软件进行分析。计量资料以均数±标准差表示,计数资料以绝对数表示。实验组与对照组HPA、MVD的比较采用Student's t检验,各部位淋巴结转移与未转移患者HPA、MVD的比较采用重复测量方差分析,并依据Mauchly球形检验结果使用Greenhouse-Geisser ε系数校正自由度;HPA与MVD的相关性分析采用偏相关系数表示;P<0.05认为差别具有统计学意义。

2 结果与分析

2 组患者甲状腺组织中 HPA 表达均为阳性,微淋巴管标记清晰,其数目和分布在 2 组间差异明显;肿瘤细胞无染色。甲状腺乳头状癌组织中心区、癌旁组织微淋巴管分布较稀疏,癌组织边缘区微淋巴管分布较密集,结节性甲状腺肿患者各部位的微淋巴管分布亦较稀疏。

甲状腺乳头状癌患者 MVD 值和 HPA 含量均明显高于结节性甲状腺肿患者(甲状腺乳头状癌:MVD, 8.64 ± 4.97 ; HPA, 0.28 ± 0.09 ; 结节性甲状腺肿:MVD, 3.23 ± 1.33 ; HPA, 0.15 ± 0.06 ; 均 $P < 0.01$)。MVD 值:转移与否主效应 $F = 10.27, P < 0.01$; 部位主效应 $F = 10.27, P < 0.01$; 转移与否与部位交互作用 $F = 224.40, P < 0.01$ 。HPA 含量:转移与否主效应 $F = 16.37, P < 0.01$; 部位主效应 $F = 13114.15, P < 0.01$; 转移与否与部位交互作用 $F = 637.63, P < 0.01$ 。

甲状腺乳头状癌淋巴结转移的患者各部位间比较,MVD 值和 HPA 含量差别均有统计学意义(转移:MVD, $F = 229.83, P < 0.01$; HPA, $F = 652.09, P < 0.01$; 未转移:MVD, $F = 86.23, P < 0.01$; HPA, $F = 220.70, P < 0.01$); 未转移的患者各部位间比较,MVD 值和 HPA 含量差别亦均有统计学意义,其中边缘区 MVD 值和 HPA 含量均明显高于中心区和癌旁组织(均 $P < 0.01$)。

甲状腺乳头状癌淋巴结转移的患者与未转移的患者间比较,中心区 MVD 值和 HPA 含量差别均无统计学意义(MVD, $t = 0.97, P = 0.34$; HPA, $t = 1.67, P = 0.11$),边缘区 MVD 值和 HPA 含量均明显升高(MVD, $t = 6.08, P < 0.01$; HPA, $t = 8.96, P < 0.01$),癌旁组织 MVD 值和 HPA 含量差别均无

表 1 甲状腺乳头状癌患者组织中微淋巴管密度及乙酰肝素酶的比较

Table 1 Comparison of the micro-lymphatic vessel density and heparanase levels in papillary thyroid cancer patients with lymph node metastasis

指标 Index	淋巴结转移 Lymph node metastasis	例数 Number	中心区 Central zone	边缘区 Marginal zone	癌旁组织 Pericarcinous tissue
微淋巴管密度 Micro-lymphatic vessel density	转移 Metastasis	51	5.6391 ± 1.3836	$17.3325 \pm 2.2269^*$	$5.9093 \pm 1.3599^\#$
	未转移 Non-metastasis	99	5.1597 ± 1.3124	$12.4932 \pm 2.1319^{*\Delta}$	$5.3066 \pm 1.7043^\#$
乙酰肝素酶 Heparanase	转移 Metastasis	51	0.2313 ± 0.0186	$0.4355 \pm 0.0214^*$	$0.2063 \pm 0.0169^{*\#}$
	未转移 Non-metastasis	99	0.2210 ± 0.0149	$0.3547 \pm 0.0276^{*\Delta}$	$0.2104 \pm 0.0183^\#$

注:中心区、边缘区、癌旁组织三个部位间比较:*,与中心区比较 $P < 0.01$;#,与边缘区比较 $P < 0.01$ 。淋巴结转移与未转移患者间比较: $\Delta, P < 0.05$ 。

Note:Comparison among the central zone, marginal zone, and the pericarcinous tissue:*, compared with the central zone, $P < 0.01$;#, compared with the pericarcinous zone, $P < 0.01$. Comparison between the patients with lymph node metastasis and without lymph node metastasis: $\Delta, P < 0.05$.

统计学意义(MVD, $t = 1.07, P = 0.29$; HPA, $t = -0.64, P = 0.53$)(表 1)。

甲状腺乳头状癌患者 HPA 含量与 MVD 值呈正相关关系($r = 0.99, P < 0.01$)。

3 讨论

乳头状甲状腺癌若出现周围侵袭则预后很差^[8],严重影响患者的生存质量。MVD 是肿瘤淋巴管生成状态的指标之一,与周围侵袭、淋巴结转移密切相关。本研究中甲状腺乳头状癌患者 MVD 值明显高于结节性甲状腺肿,提示癌组织新生淋巴管较多,且癌组织边缘区新生淋巴管明显高于癌组织中心区和癌旁组织。

乙酰肝素酶广泛存在于细胞膜和细胞外基质中,并保持稳定水平,以调节乙酰肝素生成和降解平衡,维持机体细胞和组织正常的增生、分化、黏附及迁移^[9]。如果 HPA 增多,乙酰肝素侧链将被水解,肿瘤组织会进一步生长转移。研究发现甲状腺乳头状癌患者 HPA 含量明显高于结节性甲状腺肿,提示乙酰肝素平衡关系被打破。HPA 通过破坏细胞外基质和基底膜,降低细胞间质屏障功能,促进肿瘤细胞侵入基质和血管壁。本研究中癌组织边缘区乙酰肝素酶明显高于癌组织中心区和癌旁组织,且发生淋巴结转移的患者较未转移的患者含量增多,提示癌组织边缘区基质稳定状态破坏严重,进而促进了微淋巴管形成,肿瘤组织出现明显的扩散和转移。HPA 与 MVD 的相关性分析进一步验证这一点,相关性分析结果也提示 HPA 的表达与微淋巴管生成密切相关,一方面 HPA 过量表达,加大基质稳定状态的破坏程度,使新生淋巴管增多,加速肿瘤的发展和侵袭;另一

方面,肿瘤的发展促进了微淋巴管的形成,进一步破坏了乙酰肝素平衡网络,形成了恶性循环^[4]。

鉴于 HPA 在肿瘤侵袭转移与微淋巴管生成方面的作用,以 HPA 为靶点的抗癌药物的研究将是肿瘤治疗的热点^[10]。研究表明,肝素酶抑制剂可以抑制口腔上皮癌 KB 细胞的增殖和侵袭迁移,当肝素酶抑制剂与化疗药物联合使用时,化疗药物抗肿瘤侵袭转移的能力增强^[11];此外,群体药代动力学研究表明 HPA 抑制剂在抗肿瘤治疗方面已经进入 III 期临床实验^[12],可见 HPA 可能将成为甲状腺乳头状癌患者治疗的切入点之一。

总之,甲状腺乳头状癌 HPA 的含量与 MVD 关系密切,抑制甲状腺乳头状癌 HPA 的产生可能成为其治疗的一个靶点;同时,HPA 可作为甲状腺乳头状癌治疗的疗效评价和新药研发的参考指标。但 HPA 与 MVD 相互作用的途径尚需进一步研究证实。

参考文献:

- [1] Bahl M, Sosa J A, Nelson R C, et al. Trends in incidentally identified thyroid cancers over a decade: A retrospective analysis of 2,090 surgical patients[J]. *World J Surg*, 2014, 38(6): 1312-1317.
- [2] 陈素秀, 费正华, 蒋亦燕. 温州市居民 1997—2008 年甲状腺癌患病分析[J]. *中国公共卫生*, 2010, 26(3): 353-354.
Chen S X, Fei Z H, Jiang Y Y. Prevalence of thyroid cancer among residents of Wenzhou city, 1997 to 2008 [J]. *Chinese Journal of Public Health*, 2010, 26(3): 353-354.
- [3] Witt R L. Initial management of thyroid cancer[J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 2008, 17(1): 71-91.
- [4] 杨传家, 宫建, 李景姝, 等. D2-40 在甲状腺乳头状癌淋巴结转移中的作用[J]. *中国医学工程*, 2013, 21(4): 1-2.
Yang C J, Gong J, Li J S, et al. Relationship between D2-40 and lymphatic metastasis in papillary thyroid cancer [J]. *China Medical Engineering*, 2013, 21(4): 1-2.
- [5] 杨传家, 宫建, 周晓明, 等. 三级甲等医院甲状腺疾病住院患者的临床特征分析[J]. *实用药物与临床*, 2012, 15(4): 193-195.
Yang C J, Gong J, Zhou X M, et al. Clinical features of hospitalized patients with thyroid disease from a grade third-class A hospital[J]. *Practical Pharmacy and Clinical Remedies*, 2012, 15(4): 193-195.
- [6] 王海涛, 宫建, 杨传家, 等. 三级甲等医院甲状腺疾病手术患者抗生素药物利用分析[J]. *中国公共卫生*, 2013, 29(5): 736-737.
Wang H T, Gong J, Yang C J, et al. Drug utilization studies of antibacterial in patients with peroperative thyroid diseases surgery from a third-grade class-A hospital [J]. *Chinese Journal of Public Health*, 2013, 29(5): 736-737.
- [7] Xu X, Quiros R M, Maxhimer J B, et al. Inverse correlation between heparan sulfate composition and heparanase-1 gene expression in thyroid papillary carcinomas: A potential role in tumor metastasis[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(16 Pt 1): 5968-5979.
- [8] Kim G R, Kim M H, Moon H J, et al. Sonographic characteristics suggesting papillary thyroid carcinoma according to nodule size[J]. *Ann Surg Oncol*, 2012, 20(3): 906-913.
- [9] Higashi N, Waki M, Sue M, et al. Heparanase-mediated cleavage of macromolecular heparin accelerates release of granular components of mast cells from extracellular matrices[J]. *Biochem J*, 2014, 458(2): 291-299.
- [10] Sanderson R D, Iozzo R V. Targeting heparanase for cancer therapy at the tumor-matrix interface[J]. *Matrix Biol*, 2012, 31(5): 283-284.
- [11] 徐锦程, 李阳, 刘浩, 等. 肝素酶抑制剂 OGT2115 对口腔癌 KB 细胞侵袭迁移的影响[J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(4): 525-530.
Xu J C, Li Y, Liu H, et al. Invasion and migration effects of heparanase inhibitor OGT2115 on oral cancer cell[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2013, 29(4): 525-530.
- [12] Hudachek S F, Eckhardt S G, Hicks B, et al. Population pharmacokinetic model of PI-88, a heparanase inhibitor [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2010, 65(4): 743-753.

(责任编辑:米慧芝)