

Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白的检测对 甲状腺腺瘤患者及临床意义

何逸飞,王奇金*

(长海医院内分泌科,上海 200433)

摘要: 本研究旨在探讨甲状腺腺瘤患者 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白 Wnt-1, β -catenin 的检测及临床意义。采用 RT-PCR 方法检测 Wnt-1, β -catenin mRNA 表达情况,采用 Western blot 和免疫组化方法检测 Wnt-1, β -catenin 蛋白表达情况。结果显示,与对照组相比,疾病组 Wnt-1, β -catenin mRNA 和蛋白的表达量均升高。肿瘤组织中,疾病组的 Wnt-1 蛋白表达阳性率和 β -catenin 蛋白表达阳性率均高于对照组。结果表明,Wnt-1 表达与甲状腺腺瘤患者肿瘤直径密切相关。 β -catenin 表达也与甲状腺腺瘤患者肿瘤直径密切相关。甲状腺腺瘤患者 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白 Wnt-1, β -catenin 蛋白表达上调,且其表达与肿瘤生物学状态密切相关。

关键词: 甲状腺腺瘤; Wnt/ β -catenin; 信号通路; Wnt-1 蛋白; β -catenin 蛋白

中图分类号:R736.1 文献标识码:A

Detection and clinical significance of Wnt/ beta -catenin signaling related proteins in patients with thyroid adenoma

HE Yifei, WANG Qijin

(Department of Endocrinology, Changhai Hospital, Shanghai 200433, China)

Abstract: The aim of this study was to evaluate the expressions of Wnt/ β -catenin signal pathway related protein in thyroid cancer and their clinical significance. Quantitative real-time PCR was performed to assess mRNA levels of Wnt-1, β -catenin. Western blot assays and immunohistochemistry were performed to assess protein levels of Wnt-1, β -catenin. The results showed that, compared with the control group, the expression of Wnt-1, beta -catenin mRNA and protein increased in the disease group. In the tumor tissue, the positive rate of Wnt-1 protein expression and the positive rate of the expression of beta -catenin protein in the disease group were higher than those in the control group. The results showed that the expression of Wnt-1 was closely related to tumor diameter in patients with thyroid adenoma. The expression of beta -catenin is also closely related to tumor diameter in patients with thyroid adenoma. The expressions of Wnt/ β -catenin signaling pathway related proteins Wnt-1, β -catenin are increased in patients with thyroid cancer, which may play an important role in the occurrence and development of thyroid cancer.

Key words: thyroid cancer; Wnt/ β -catenin; signal pathway; Wnt-1 protein; β -catenin protein

甲状腺腺瘤在人群中有很高的发病比例,随着目前人群健康体检的重视,使得甲状腺腺瘤的检出率逐年提高。据统计结果表明,甲状腺腺瘤在全球以每年 4% 发病率的趋势增长^[1]。目前甲状腺腺瘤的发病机制及诊断是研究的热点。近年来,经典 Wnt/ β -catenin 信号通路对癌干细胞的影响成为热点^[2-4]。较多研究表明^[5-7], Wnt/ β -catenin 信号通路

参与调节结直肠癌、前列腺癌、乳腺癌肿瘤等疾病的发生、发展。但有关 Wnt/ β -catenin 信号通路在甲状腺腺瘤发病机制中的研究较少。因此,本研究拟探讨甲状腺腺瘤患者 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白 Wnt-1, β -catenin 的检测及临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集我院 2016 年 1 月~2017 年 1 月 60 例甲状腺腺瘤患者,纳入标准:①经术前 CT

核素扫描、颈部超声及穿刺组织后病理检查证实为单发甲状腺腺瘤;②所有患者均未经任何药物治疗。排除标准:①临床资料不完整者,伴有其他恶性疾病者;②未获得患者知情同意者。同时选取我院同期 60 例健康体检者作为对照组,且该 60 例健康体检者自愿接受免费组织穿刺病理检查并签署知情同意书。疾病组 60 例,男 31 例,女 29 例,年龄 21~87 岁,平均 57.7 ± 2.8 岁。对照组 60 例,男 30 例,女 30 例,年龄 20~85 岁,平均 57.9 ± 3.0 岁。两组的一般资料有可比性。本研究通过我院伦理委员会审核。

1.2 主要仪器和试剂 TGL-16G-A 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);7300 型实时荧光定量 PC 电子天平 R 仪(美国 Applied Biosystems 公司);EL204-(上海特勒-托多利多仪器有限公司)。

1.3 RT-PCR 检测 Wnt-1、 β -catenin mRNA 表达水平 提取组织总 RNA,测定 RNA 纯度和浓度,取 $1 \mu\text{g}$ 进行逆转录,生成 cDNA。采用 SYBR green 染料法进行定量检测,Wnt-1、 β -catenin 及 GAPDH(内参)扩增引物序列如下:Wnt-1:上游引物 5'-CTG-CAGAGCATGGACTCGTC-3',下游引物 5'-CCGTT-GAAGAGAGTGGAGTG-3', β -catenin:上游引物 5'-TACTCACGC CTCGAAACCT-3',下游引物 5'-GTC TGCTTTCCTCCCTGATG-3',GAPDH:上游引物 5'-CCTAGTTCGTCATGGGTGTGAACCA-3,下游引物 5'-GCCAGTAGAGGCAGGGATGATGTTTC-3,扩增条件及计算方法参考文献^[8]。

1.4 Western blot 检测 Wnt-1、 β -catenin 蛋白的表达水平 常规方法提取组织总蛋白,二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)方法测定蛋白质含量后,进行凝胶电泳,每孔上样 $20 \mu\text{g}$,电转至聚偏氟乙烯薄膜(polyvinylidene fluoride,PVDF)上后,3%的脱脂奶封闭 2 h,分别孵育 Wnt-1、 β -catenin(目的蛋白)和内参蛋白一抗,4℃孵育过夜,TBST 洗膜,孵育二抗后显影^[9-10]。

1.5 统计学分析 采取 SPSS 17.0 软件。对于正态分布和偏态分布数据资料,分别以均值 \pm 标准差和中位数($P_{25} - P_{75}$)表示。正态分布数据两组间比较采用两独立样本 t 检验,偏态分布两组间比较则应用 Mann-Whitney U 法。率的比较采用卡方检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测 Wnt-1、 β -catenin mRNA 表达水

平结果 采用 RT-PCR 方法检测两组研究对象组织中 Wnt-1、 β -catenin mRNA 表达水平,甲状腺腺瘤组 Wnt-1、 β -catenin mRNA 表达量高于对照组 Wnt-1、 β -catenin mRNA 表达量,差异有统计学意义($P < 0.05$),具体见表 1。

表 1 RT-PCR 检测 Wnt-1、 β -catenin mRNA 表达水平结果($n=60$)

组别	相对 mRNA 表达水平	
	Wnt-1	β -catenin
甲状腺腺瘤组	7.2 ± 1.8^a	6.2 ± 1.8^a
对照组	2.8 ± 1.4	4.8 ± 1.4

与对照组相比,^a $P < 0.05$

2.2 Western blot 检测 Wnt-1、 β -catenin 蛋白表达水平结果 采用 Western blot 方法检测两组研究对象组织中 Wnt-1、 β -catenin 蛋白表达水平,甲状腺腺瘤组 Wnt-1、 β -catenin 蛋白表达量高于对照组 Wnt-1、 β -catenin 蛋白表达量,差异有统计学意义($P < 0.05$),具体见表 2 和图 1。

表 2 Western blot 检测 Wnt-1、 β -catenin 蛋白表达水平结果($n=60$)

组别	相对蛋白表达水平	
	Wnt-1	β -catenin
甲状腺腺瘤组	$0.71(0.42 \sim 1.17)^a$	$0.73(0.40 \sim 1.08)^a$
对照组	$0.29(0.17 \sim 0.57)$	$0.48(0.21 \sim 0.62)$

与对照组相比,^a $P < 0.05$

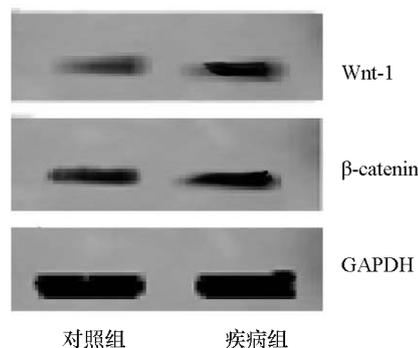


图 1 Wnt-1、 β -catenin 蛋白的表达

2.3 Wnt-1、 β -catenin 表达与甲状腺腺瘤患者临床病理学特征关系分析

甲状腺腺瘤患者肿瘤组织 Wnt-1 阳性率 65.00%(39/60)高于对照组 Wnt-1 阳性率 21.67%(13/60),差异有统计学意义($P < 0.05$)。甲状腺腺

瘤患者肿瘤组织 β -catenin 阳性率 61.67% (37/60) 高于对照组 β -catenin 阳性率 20.00% (12/60), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。统计分析证实 Wnt-1 表达与甲状腺腺瘤患者肿瘤直径密切相关, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 β -catenin 表达也与甲状腺腺瘤患者肿瘤直径密切相关, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。具体见表 3。

表 3 甲状腺腺瘤患者 Wnt-1、 β -catenin 表达与患者临床病理学特征关系分析(例,%)

临床病理学特征	n	Wnt-1 表达		β -catenin 表达	
		阳性例数(n)	阳性率	阳性例数(n)	阳性率
性别					
男性	30	20	66.67%	19	63.33%
女性	30	19	63.33%	18	60.00%
肿瘤直径(cm)					
≤4	28	10	35.71%	12	42.86%
>4	32	29	90.63% ^a	20	62.50% ^a

与肿瘤直径(cm) ≤4 比较, ^a $P < 0.05$

3 讨 论

甲状腺腺瘤是起源于甲状腺滤泡细胞的良性肿瘤, 目前认为本病多为单克隆性, 是由与甲状腺癌相似的刺激所致, 好发于甲状腺功能的活跃期。甲状腺腺瘤有癌变的可能, 并可引起甲状腺功能亢进症, 对患者的生活质量和生命健康影响较大, 因此研究甲状腺腺瘤的发病机制, 对于甲状腺腺瘤的临床诊断, 以及对于甲状腺腺瘤新治疗药物的研究均具有非常重要的意义。

Wnt/ β -catenin 信号通路中的 β -catenin 蛋白是一种多功能的细胞浆蛋白质, 在疾病状态下, 由于体内环境的变化, 游离的 β -catenin 蛋白进入细胞核, 参与调节相关基因的表达^[11-13]。本研究结果提示, 甲状腺腺瘤患者 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白 Wnt-1, β -catenin 蛋白表达上调, 甲状腺腺瘤组肿瘤组织 Wnt-1, β -catenin 表达阳性率高于对照组 Wnt-1, β -catenin 表达阳性率, Wnt-1 表达与甲状腺腺瘤患者肿瘤直径密切相关, β -catenin 表达也与甲状腺腺瘤患者肿瘤直径密切相关, 结果提示, Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白 Wnt-1, β -catenin 蛋白表达水平与甲状腺腺瘤疾病的生物学状态密切相

关, Wnt/ β -catenin 信号通路的激活可能在甲状腺腺瘤的发生、发展过程中起重要作用。

综上所述, 甲状腺腺瘤患者 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白 Wnt-1, β -catenin 蛋白表达上调, 且其表达与甲状腺腺瘤的肿瘤生物学状态密切相关, 为今后通过阻断 Wnt/ β -catenin 信号通路为措施的靶向治疗甲状腺腺瘤提供了实验依据。

参考文献:

- [1] MUHAMMAD AI, 刘嫣方, 林江, 等. 甲状腺乳头状癌线粒体 DNA D 环区基因突变的临床意义[J]. 江苏大学学报(医学版), 2017, 27(1):31-5.
- [2] 邓群力, 莫逸, 刘康龙. 29 例甲状腺癌相关异时性多原发癌临床分析[J]. 标记免疫分析与临床, 2017, 24(5):568-71.
- [3] MAC DONAL BT, TAMA K, He X, et al. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms and diseases [J]. Dev Cell, 2016, 17(1): 9-26.
- [4] 黄晴, 汤春辉. PCI-24781 抑制上皮性卵巢癌 SKOV-3 细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路的研究[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(20):3072-5.
- [5] 韩昕健, 郝伟, 孙秀燕, 等. CD36 在糖尿病肾病患者肾组织中的表达及调控 Wnt/ β -catenin 信号通路对人肾小管上皮细胞增殖凋亡的实验研究[J]. 东南大学学报(医学版), 2017, 36(5):704-10
- [6] 冯晓灵, 刘丹. 白头翁皂苷 D 对人乳腺癌 MCF-7 细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响[J]. 东南大学学报(医学版), 2017, 36(3):379-83.
- [7] MA YM, Z GH, Fu XS, et al. Wnt signaling may be activated in a subset of Peutz-Jeghers syndrome polyps closely correlating to LKB1 expression[J]. Oncol Rep, 2010, 23(6): 1569-76.
- [8] XU HT, WEI Q, LIU Y, et al. Overexpression of axin downregulates TCF-4 and inhibits the development of lung cancer[J]. Ann Surg Oncol, 2007, 14(11): 3251-9.
- [9] BU XM, ZHAO CH, DAI XW. Aberrant expression of Wnt antagonist SFRP1 in pancreatic cancer[J]. Chin Med J, 2008, 121(10): 952-5.
- [10] ZOU HZ, MOLINA JR, HARRINGTON JJ, et al. Aberrant methylation of secreted frizzled-related protein genes in esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus[J]. International Journal of Cancer, 2005, 116(4): 584-91.
- [11] 聂松. 比较甲状腺肿瘤侧叶次全切除术与全切除术对喉返神经的损伤率[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(3):383-5.
- [12] 陆瑜, 湛业荣, 胡曙东, 等. 不同 b 值磁共振弥散加权成像在甲状腺结节良恶性鉴别诊断中的价值[J]. 江苏大学学报(医学版), 2017, 27(3):257-60.
- [13] 马朝, 张伟, 梅思斌, 等. 糖皮质激素联合抗甲状腺素药物治疗 Graves 病的 Meta 分析[J]. 中国现代应用药理学, 2016, 33(10):1318-23.

(本文编辑:秦旭平)