



· 论 著 ·

甲状腺乳头状癌中cortactin、N-WASP的表达及其与临床病理学特征的关系

文 铎, 刘琬琳, 曹一鸣, 渠 宁, 朱永学

复旦大学附属肿瘤医院头颈外科, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032

[摘要] **背景与目的:** 甲状腺乳头状癌是最常见的甲状腺癌病理类型。分析侵袭性伪足关键蛋白cortactin、N-WASP在甲状腺乳头状癌组织中的表达水平及其与临床病理学特征的关系。**方法:** 选取2015年1月—2017年12月复旦大学附属肿瘤医院病理科保存的甲状腺乳头状癌组织标本及对应癌旁组织89对, 采用免疫组织化学方法, 检测癌组织与癌旁组织中cortactin、N-WASP蛋白的表达情况并分析其与临床病理学特征之间的关系。**结果:** 癌组织中cortactin和N-WASP的阳性表达率分别为57.30%和59.55%, 高于癌旁组织的5.62%和7.87%, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。Cortactin的表达与甲状腺乳头状癌患者的年龄、性别、肿瘤大小无显著相关性 ($P>0.05$), 但与有无淋巴结转移有关, N-WASP与肿瘤大小、有无淋巴结转移有关 ($P<0.05$)。在有淋巴结转移的病例中, cortactin、N-WASP的阳性表达率均较高 ($P<0.05$)。**结论:** 甲状腺乳头状癌组织中与侵袭性伪足形成相关的cortactin、N-WASP呈高表达, 且与甲状腺乳头状癌的发病和淋巴结转移相关。Cortactin与N-WASP的表达水平呈正相关。

[关键词] Cortactin; N-WASP; 侵袭性伪足; 甲状腺乳头状癌; 临床病理学特征

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2019.09.002

中图分类号: R736.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2019)09-0688-05

The expressions of cortactin and N-WASP in thyroid papillary carcinoma and their significance WEN Duo, LIU Wanlin, CAO Yiming, QU Ning, ZHU Yongxue (Department of Head and Neck Surgery, Fudan University Shanghai Cancer Center; Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: ZHU Yongxue E-mail: jq_hai@126.com

[Abstract] **Background and purpose:** Papillary thyroid cancer (PTC) comprises the most part of thyroid cancer. The research aimed to study the expression levels of cortactin and N-WASP in PTC and their relationship with clinicopathological features. **Methods:** Tissues from 89 cases of PTC were collected at Department of Pathology in Fudan University Shanghai Cancer Center from Jan 2012 to Dec 2017. At the same time, 89 normal thyroid tissues were selected as controls. Immunohistochemistry was used to detect cortactin and N-WASP in cancer and adjacent tissues. The expression levels of cortactin and N-WASP proteins were measured, and analysis of their relationship with clinical features was performed. **Results:** The positive expression rates of cortactin and N-WASP in cancer tissues were 57.30% and 59.55%, respectively, which were higher than 5.62% and 7.87% in adjacent tissues ($P<0.05$). The expression of cortactin was not significantly associated with age, gender and tumor size in patients with PTC ($P>0.05$), but it was associated with lymph node metastasis. N-WASP was associated with tumor size and lymph node metastasis ($P<0.05$). The positive expression rates of cortactin and N-WASP were higher in patients with lymph node metastasis ($P<0.05$). **Conclusion:** Cortactin and N-WASP were highly expressed in PTC, and were associated with lymph node metastasis of PTC. Expression levels of cortactin and N-WASP were positively correlated in PTC.

[Key words] Cortactin; N-WASP; Invadopodia; Papillary thyroid carcinoma; Clinicopathological features

甲状腺癌是最常见的人类内分泌系统恶性肿瘤, 目前已成为女性第5大常见的恶性肿瘤

瘤, 其中又以甲状腺乳头状癌 (papillary thyroid carcinoma, PTC) 最为常见, 并且近年来, 其发病率呈递增趋势^[1]。尽管PTC的临床生物学行

基金项目: 国家自然科学基金 (81772854)。

通信作者: 朱永学 E-mail: jq_hai@126.com

为相对惰性, 经过合理的治疗后10年生存率可达90%以上, 但是由于其解剖位置与气管、食管、喉返神经、甲状旁腺等重要器官毗邻, 相当一部分晚期或复发的患者由于肿瘤的局部侵犯, 既无法获得良好的手术根治效果, 又不得不面对严重的术后并发症和器官功能丧失^[2]。因此早期诊断和高危人群的筛选一直以来都是PTC防治的关键, 而对PTC发病机制的认识则是协助临床医师进行人群风险评估和早期诊断的基础。

相关资料显示, 在肿瘤转移的早期和晚期阶段, 肿瘤细胞在穿越原发及继发脏器的基底膜进入肿瘤周围的实质组织时形成一种不对称的膜性突起结构——侵袭性伪足, 以降解和重塑肿瘤周围的细胞外基质^[3]。有研究团队发现, 非受体酪氨酸激酶Abl通过表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)-Src-Arg-cortactin信号通路, 调节cortactin的磷酸化和聚合, 促进侵袭性伪足成熟及细胞外基质的降解, 并增强乳腺癌细胞的侵袭与转移能力^[4]。另一个研究团队应用N-WASP敲除细胞及异种移植模型, 发现敲除N-WASP分子能明显减少体外培养肿瘤细胞侵袭性伪足的形成, 同时显著抑制敲除细胞移植模型中细胞突触的形成、穿膜和肺转移能力^[5]。但目前PTC中侵袭性伪足的关键蛋白cortactin和N-WASP的相关性研究相对较少。因此, 本研究探讨PTC组织中cortactin、N-WASP的表达水平及意义。

1 材料和方法

1.1 一般资料

将2015年1月—2017年12月复旦大学附属肿瘤医院头颈外科接诊的89例PTC患者纳入本研究, 其中男性21例, 女性68例, 年龄33~75岁, 平均年龄(51.34±8.77)岁。根据患者临床分期, I~II期45例, III~IV期44例。排除标准: 临床病理资料不完整。

1.2 方法

1.2.1 研究方法

选择89例PTC标本的石蜡包埋组织块, 分别切取癌组织和癌旁组织, 进行H-E染色及免疫组织化学染色确诊。同时对89例PTC患者的病理学

特征进行分析。

1.2.2 试剂来源

鼠抗人单克隆抗体Cortactin、鼠抗人单克隆抗体N-WASP试剂盒及DAB试剂盒均购自美国Abcam公司。免疫组织化学法检测cortactin、N-WASP的表达情况, 具体操作严格按照说明书进行。已知阳性反应片为阳性对照, PBS代替一抗为阴性对照。

1.2.3 免疫组织化学

石蜡包埋组织切片3~4 μm厚度。烤片: 将待做切片置于切片架上, 于60 °C恒温烤箱中至少烤1 h; 脱蜡: 切片放入盛有二甲苯的容器中脱蜡3次(即二甲苯I、II、III), 每次10 min; 水化: 切片经无水乙醇5 min, 95%乙醇2次(每次2 min), 85%乙醇2 min, 75%乙醇2 min, 自来水冲洗, ddH₂O洗2×2 min; 抗原修复: 根据抗体说明书推荐方法进行抗原修复, 常采用高压、微波(温度达到98~100 °C)或酶消化修复法, 室温自然冷却, 自来水冲洗, ddH₂O洗2×2 min, TBS洗涤2×2 min; 封闭: 滴加试剂B, 37 °C湿盒温育30 min; 加一抗: 滴加即用型一抗, 4 °C湿盒温育过夜; 洗涤: TBS-T洗涤3×5 min; 封闭: 滴加试剂B, 37 °C湿盒温育10 min; 加二抗: 滴加用抗体稀释液稀释的生物素化二抗, 37 °C湿盒中温育30 min; 洗涤: TBS-T洗涤3×5 min; 滴加试剂Tween20, 37 °C湿盒温育封闭20 min; 加辣根过氧化物酶标记链霉亲和素(horseradish peroxidase-streptavidin, HRP-SA): 滴加用抗体稀释液稀释的试剂E(1:50~1:200, 终浓度5~20 nmol/L), 37 °C湿盒中温育30 min; 洗涤: TBS-T洗涤3×5 min, TBS洗涤2×5 min; 显色: 应用DAB溶液显色; 复染: 自来水充分冲洗, 复染, 脱水, 透明; 封片: 待组织标本风干后, 用试剂缓冲甘油封固剂封片。采用试剂盒提供的阳性、阴性对照样本进行质控^[6]。

1.3 结果判断

Cortactin、N-WASP均以细胞的细胞质或细胞核出现浅黄色颗粒为阳性表达。每张切片随机选取5个高倍视野, 根据染色强度和着色细胞比

例进行评分:

① 染色强度: 不着色为0分, 浅黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分; ② 着色细胞比例: 无着色细胞为0分, 着色细胞比例 < 25%为1分, 25%~50%为2分, > 50%为3分。将染色强度和着色细胞比例得分相乘, 最终得分 ≤ 3分为阴性, > 3分为阳性^[6]。

1.4 统计学处理

采用SPSS 25.0统计软件进行分析。计数资料以n (%)表示, 采用χ²检验; 相关性分析采用Spearman分析, P < 0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PTC组织和癌旁组织中cortactin、N-WASP的表达

PTC组织中cortactin和N-WASP的阳性表达率分别为57.30%和59.55%, 显著高于癌旁组织的5.62%和7.87%, 差异有统计学意义 (P < 0.05, 图1, 表1)。

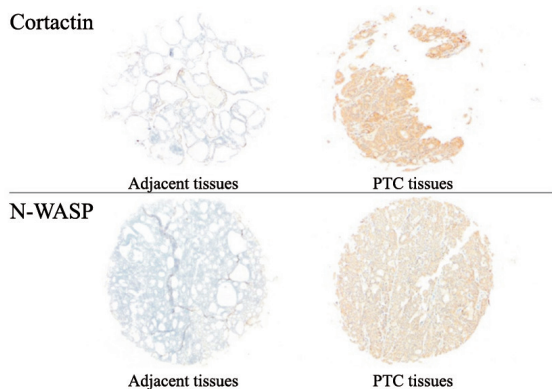


图 1 PTC组织与癌旁组织中cortactin和N-WASP蛋白表达的免疫组织化学图

Fig. 1 Schematic diagram of cortactin and N-WASP protein expressions in PTC and adjacent tissues

表 1 PTC组织和癌旁组织中cortactin、N-WASP的表达

Tab. 1 Expression levels of cortactin and N-WASP in PTC and adjacent tissues

Group	Number	Cortactin positive	N-WASP positive
PTC tissues	89	51 (57.30%)	53 (59.55%)
Adjacent tissues	89	5 (5.62%)	7 (7.87%)
χ ²		4.183	5.219
P value		<0.05	<0.05

2.2 Cortactin、N-WASP的表达与PTC临床病理学特征的关系

PTC中cortactin、N-WASP的表达与患者年龄、性别、肿瘤大小、TNM分期及有无淋巴结转移的相关性见表2~3。Cortactin的表达和年龄、性别、肿瘤大小、TNM分期无显著相关性 (P > 0.05), 但是与有无淋巴结转移有关 (P < 0.05), N-WASP与肿瘤大小、有无淋巴结转移有关 (P < 0.05)。在有淋巴结转移的病例中, cortactin和N-WASP的阳性表达率均较高 (P < 0.05)。

表 2 Cortactin的表达与PTC临床病理学特征的关系

Tab. 2 The relationship between cortactin expression and clinicopathological features of PTC

Clinicopathological feature	Cortactin expression		P value
	Negative	Positive	
Age/year			0.106
<55	20	24	
≥55	13	32	
Gender			0.684
Male	7	14	
Female	26	42	
Tumor size D/cm			0.239
≤1	14	31	
>1	19	25	
Focality			0.134
Multifocal	10	26	
Unifocal	23	30	
Laterality			0.354
Bilateral	12	26	
Unilateral	21	30	
Extrathyroidal extension			0.060
Yes	1	9	
No	32	47	
Lymph node metastasis			0.012*
Yes	14	39	
No	19	17	
TNM stage			0.564
I - II	18	27	
III - IV	15	29	

The P value was calculated by Pearson χ² test; *: P < 0.05

表3 N-WASP的表达与PTC临床病理学特征的关系

Tab. 3 The relationship between N-WASP expression and clinicopathological features of PTC

Clinicopathological feature	N-WASP expression		P value
	Negative	Positive	
Age/year			0.098
<55	18	26	
≥55	11	34	
Gender			0.654
Male	6	15	
Female	23	45	
Tumor size D/cm			0.035*
≤1	10	35	
>1	19	25	
Focality			0.086
Multifocal	8	28	
Unifocal	21	32	
Laterality			0.122
Bilateral	9	29	
Unilateral	20	31	
Extrathyroidal extension			0.106
Yes	1	9	
No	28	51	
Lymph node metastasis			0.001*
Yes	10	43	
No	19	17	
TNM stage			0.131
I - II	18	27	
III - IV	11	33	

The P value was calculated by Pearson χ^2 test; *: $P < 0.05$

2.3 PTC组织中cortactin、N-WASP相关性

Cortactin及N-WASP的共同表达率达47.19%，采用Spearman分析结果显示，两者显著相关($P < 0.05$, 表4)。

表4 PTC组织中cortactin与N-WASP的表达相关性

Tab. 4 The correlation between cortactin and N-WASP expression in PTC tissues

Cortactin	N-WASP		r
	Positive	Negative	
Positive	42	14	0.211*
Negative	18	29	

*: $P < 0.05$

3 讨论

肿瘤细胞从原发灶播散至继发脏器并最终形成临床可见的转移灶是一个多基因参与、连续多环节的动态变化过程,涉及肿瘤细胞的黏附、侵袭、细胞外基质的降解和重塑、新生肿瘤血管的发生以及机体免疫微环境的形成等诸多环节^[7-9]。在肿瘤转移的早期和晚期阶段,肿瘤细胞突破原发及继发脏器的基底膜、进入肿瘤周围的实质组织时常形成一种不对称的膜性突起结构——侵袭性伪足,以降解和重塑肿瘤周围的细胞外基质^[10]。

侵袭性伪足是肿瘤细胞形成的一种特殊的以cortactin为核心蛋白的富含肌动蛋白的膜突起性结构,主要介导细胞外基质的降解和重塑,调节肿瘤细胞的侵袭和转移能力^[4]。侵袭性伪足的膜性结构主要由流动性的脂质分子及其锚着的蛋白分子组成,具体有脂筏、肌动蛋白、Src受体酪氨酸蛋白(Src酪氨酸激酶蛋白家族)、黏附分子及蛋白水解酶等,可传导细胞运动并分泌具有降解细胞外基质的金属蛋白酶^[4, 11]。许多蛋白质涉及调节侵袭性伪足的形成,包括Rho家族GTPases Rac和Cdc42, P21激活的激酶的成员,细胞-基质黏附相关的蛋白质(Paxillin蛋白和N-WASP蛋白)^[12]。近年来,研究人员已经在来自许多不同组织类型(包括肝脏、乳腺、膀胱等)的肿瘤细胞中发现了侵袭性伪足形成的证据。有研究团队发现,cortactin分子中的N端和C端结构域能与Arp2/3复合体和N-WASP的SH3结构域结合,使cortactin蛋白分子中的Tyr421、466、482残基发生磷酸化,通过Nck1-N-WASP-Arp2/3信号通路调节侵袭性伪足的形成^[13-14]。Genna等^[15]研究发现,非受体酪氨酸激酶Pyk2可以通过EGFR-Pyk2-Src-Arg-cortactin信号通路,介导Abl相关基因(Arg)激活,直接或间接介导表皮生长因子诱导的cortactin的酪氨酸磷酸化和聚合,导致侵袭性伪足肌动蛋白聚合,促进侵袭性伪足成熟,增强乳腺癌细胞的侵袭和转移能力。WASP家族蛋白分子是细胞骨架调节分子Cdc42和Rho的感受器,其主要定位于脂筏,能通过活化Arp2/3引起actin分子在细胞内重排,

促进侵袭性伪足的快速形成和成熟^[16]。此外,有实验表明,敲除N-WASP后能明显减少体外培养肿瘤细胞侵袭性伪足的形成,同时显著抑制敲除细胞移植模型中细胞突触的穿膜能力^[5]。有研究团队利用actin与cortactin分子标记进一步证实侵袭性伪足主要存在于富血管区邻近的肿瘤边缘,并常伴有肿瘤局部组织胶原蛋白的降解^[14]。提示侵袭性伪足对肿瘤细胞侵袭和转移的调控至关重要。本研究将cortactin和N-WASP抗体联合应用于PTC组织的检测,观察两种指标联合应用的可能性。结果显示,癌组织中cortactin及N-WASP的阳性表达率分别为57.30%和59.55%,高于癌旁组织的5.62%和7.87%,差异有统计学意义($P<0.05$); Cortactin的阳性表达与淋巴结转移情况明显相关($P<0.05$), N-WASP与肿瘤大小、有无淋巴结转移有关($P<0.05$)。而且两者的共同表达率达47.19%,说明两者都在乳头状癌的肿瘤生物学行为中发挥作用,而且可能还有协同作用,应用于联合检测有一定的潜在可能。但是,因为本研究是回顾性研究,而且仅对石蜡包埋组织标本的蛋白水平进行了检测,所以在更深入分子水平的研究及前瞻性研究还有待下一步进行。

综上所述,PTC组织中侵袭性伪足关键蛋白cortactin、N-WASP的阳性表达率高,与癌旁组织有明显差异。Cortactin、N-WASP之间可能存在协同作用,与患者临床病理特征有一定关系,也与PTC的生物学行为密切相关。

[参 考 文 献]

- [1] LIM H, DEVESA S S, SOSA J A, et al. Trends in thyroid cancer incidence and mortality in the United States, 1974—2013 [J]. *JAMA*, 2017, 317(13): 1338–1348.
- [2] LIU R Q, WISEMAN S M. Quality indicators for thyroid cancer surgery: current perspective [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2016, 16(9): 919–928.
- [3] EDDY R J, WEIDMANN M D, SHARMA V P, et al. Tumor cell invadopodia: invasive protrusions that orchestrate metastasis [J]. *Trends Cell Biol*, 2017, 27(8): 595–607.
- [4] MADER C C, OSER M, MAGALHAES M A, et al. An EGFR–Src–Arg–cortactin pathway mediates functional maturation of invadopodia and breast cancer cell invasion [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(5): 1730–1741.
- [5] SIAR C H, RAHMAN Z A, TSUJIGIWA H, et al. Invadopodia proteins, cortactin, N-WASP and WIP differentially promote local invasiveness in ameloblastoma [J]. *J Oral Pathol Med*, 2016, 45(8): 591–598.
- [6] WEN D, LIAO T, MA B, et al. Downregulation of CSN6 attenuates papillary thyroid carcinoma progression by reducing Wnt/ β -catenin signaling and sensitizes cancer cells to FH535 therapy [J]. *Cancer Med*, 2018, 7(2): 285–296.
- [7] GASSER S, LIM L H K, CHEUNG F S G. The role of the tumour microenvironment in immunotherapy [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2017, 24(12): T283–T295.
- [8] MITTAL V. Epithelial mesenchymal transition in tumor metastasis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2018, 13: 395–412.
- [9] FAN J X, ZHENG D W, RONG L, et al. Targeting epithelial–mesenchymal transition: metal organic network nano–complexes for preventing tumor metastasis [J]. *Biomaterials*, 2017, 139: 116–126.
- [10] YAMADA K M, COLLINS J W, CRUZ WALMA D A, et al. Extracellular matrix dynamics in cell migration, invasion and tissue morphogenesis [J]. *Int J Exp Pathol*, 2019, 100(3): 144–152.
- [11] KNOFF J D, THOLEN S, KOCZOROWSKA M M, et al. The stromal cell–surface protease fibroblast activation protein–alpha localizes to lipid rafts and is recruited to invadopodia [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1853(10 Pt A): 2515–2525.
- [12] LAWSON C D, RIDLEY A J. Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion [J]. *J Cell Biol*, 2018, 217(2): 447–457.
- [13] JEANNOT P, BESSON A. Cortactin function in invadopodia [J]. *Small GTPases*, 2017: 1–15. [Epub ahead of print]
- [14] MARKWELL S M, AMMER A G, INTERVAL E T, et al. Cortactin phosphorylation by casein kinase 2 regulates actin–related protein 2/3 complex activity, invadopodia function, and tumor cell invasion [J]. *Mol Cancer Res*, 2019, 17(4): 987–1001.
- [15] GENNA A, LAPETINA S, LUKIC N, et al. Pyk2 and FAK differentially regulate invadopodia formation and function in breast cancer cells [J]. *J Cell Biol*, 2018, 217(1): 375–395.
- [16] MENG D F, XIE P, PENG L X, et al. CDC42–interacting protein 4 promotes metastasis of nasopharyngeal carcinoma by mediating invadopodia formation and activating EGFR signaling [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 21.

(收稿日期: 2019-07-24 修回日期: 2019-08-14)