

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.07.010
 View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.07.010>

甲状腺乳头状癌 B-raf 基因突变及 Caveolin-1 和 COX-2 蛋白表达的临床意义

张杰东¹, 朱传东², 刘杜先¹, 刘兰侠¹, 方媛³

(1. 东南大学附属第二医院病理科, 南京 210003; 2. 东南大学附属第二医院肿瘤科, 南京 210003;
 3. 南京医科大学附属南京医院病理科, 南京 210006)

[摘要] 目的: 研究甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)中B-raf基因突变率及小凹蛋白-1(Caveolin-1)、环氧酶-2(COX-2)蛋白表达水平, 探讨其临床意义。方法: 纳入82例PTC和30例结节性甲状腺肿患者病变标本, 应用实时荧光定量PCR检测B-raf基因突变率, 应用免疫组织化学SP法检测Caveolin-1, COX-2蛋白表达水平, 并分析上述B-raf基因突变率, Caveolin-1和COX-2蛋白表达水平之间的相关性及其与患者临床病理特征的关系。结果: B-raf基因在PTC及结节性甲状腺肿组织的突变率分别为68.29%和0($P<0.01$)。B-raf基因突变与PTC患者淋巴结转移、包膜侵犯密切相关($P<0.05$), 与患者性别、年龄、肿瘤大小、结节数目、TNM分期无关(均 $P>0.05$)。Caveolin-1及COX-2在PTC患者标本的表达水平分别为69.51%和79.27%, 明显高于结节性甲状腺肿组(23.33%, 13.33%; $P<0.01$), 其中Caveolin-1蛋白表达与PTC患者淋巴结转移相关($P<0.05$), COX-2与颈部淋巴结转移、包膜侵犯相关(均 $P<0.05$), 与其他临床病理特征无关。PTC中B-raf基因突变与Caveolin-1蛋白表达呈正相关($P<0.05$), B-raf基因突变与COX-2蛋白表达无关($P>0.05$)。结论: PTC中B-raf基因突变率较高, 同时Caveolin-1和COX-2蛋白表达水平均较高, 且B-raf基因突变与Caveolin-1表达密切相关, 共同参与PTC浸润及转移, 联合检测上述指标有助于提高PTC的早期诊断及预后评估。

[关键词] 甲状腺乳头状癌; B-raf基因突变; Caveolin-1; COX-2

Clinical significance of B-raf gene mutation and Caveolin-1 and COX-2 protein expressions in papillary thyroid carcinoma

ZHANG Jiedong¹, ZHU Chuandong², LIU Duxian¹, LIU Lanxia¹, FANG Yuan³

(1. Department of Pathology, Second Affiliated Hospital of Southeast University, Nanjing 210003;
 2. Department of Oncology, Second Affiliated Hospital of Southeast University, Nanjing 210003;
 3. Department of Pathology, Nanjing Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China)

收稿日期 (Date of reception): 2018-05-17

通信作者 (Corresponding author): 方媛, Email: fangyuan19850303@126.com

基金项目 (Foundation item): 江苏省自然科学基金(BK20170134); 南京市医学科技发展资金(QRX17154)。This work was supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20170134) and Nanjing Medical Science and Technology Development Foundation (QRX17154), China.

Abstract **Objective:** To study the clinical significance of B-raf gene mutation and Caveolin-1 and COX-2 expressions in papillary thyroid carcinoma. **Methods:** We collected tissue samples from 82 cases of papillary thyroid carcinoma and 30 cases of nodular goiter, and we applied Real time-PCR to detect B-raf gene mutation, IHC SP method was carried out to detect the expression level of Caveolin-1,COX-2 protein. Then we analyzed the correlation between B-raf gene mutation ratio with Caveolin-1 and COX-2 expression level, and also analyzed the correlation between above factors with clinical pathology factors statistically. **Results:** Firstly, the mutation rate of B-raf gene in papillary thyroid carcinoma and nodular goiter were 68.29% and 0 ($P<0.01$), and B-raf gene mutation in papillary thyroid carcinoma was closely related to lymph node metastasis, capsular invasion ($P<0.05$), while there was no relation with gender, age, size, number of tumor nodules and TNM stage ($P>0.05$). Secondly, the expression level of Caveolin-1 and COX-2 in papillary thyroid carcinoma were significantly higher(69.51%, 79.27%) than those in nodular goiter (23.33%, 13.33%; $P<0.01$); moreover, the Caveolin-1 protein expression was related with lymph node metastasis ($P<0.05$), and the COX-2 protein expression was related with lymph node metastasis and capsular invasion ($P<0.05$), while Caveolin-1 and COX-2 expression were both not related with other clinicopathological features. Thirdly, B-raf gene mutation in papillary thyroid carcinoma was positively related with Caveolin-1 expression ($P<0.05$), yet not related with COX-2 ($P>0.05$). **Conclusion:** The B-raf gene is highly mutated in papillary thyroid carcinoma, and there are also higher expression of Caveolin-1 and COX-2 in papillary thyroid carcinoma. All above factors are involved in the invasion and metastasis of papillary thyroid carcinoma, implying that combined detection of these three factors may improve the early diagnosis and prognosis assessment of papillary thyroid carcinoma.

Keywords papillary thyroid carcinoma; B-raf gene mutation; Caveolin-1; COX-2

甲状腺乳头状瘤(papillary thyroid carcinoma, PTC)是甲状腺最常见的恶性肿瘤，近年来发病率明显上升。B-raf基因突变被认为是PTC发生发展的重要分子事件，可作为PTC的独立预测因素^[1]。小凹蛋白-1(Caveolin-1)和环氧化酶-2(COX-2)参与多种肿瘤的发生发展和侵袭转移等^[2-3]。本研究旨在检测PTC中B-raf基因突变及Caveolin-1和COX-2蛋白表达，探讨三者在PTC中的临床病理意义。

1 材料与方法

1.1 材料

选取东南大学附属第二医院病理科2016年8月至2017年8月存档蜡块，所有病例诊断明确。病例组82例PTC，年龄17~74(平均40)岁，其中男20例，女62例。肿瘤最大径0.1~3.1(平均1.1)cm。经颈部淋巴结清扫病理证实，未转移者35例，转移者47例。按照TNM分期标准，I, II期者63例，III, IV期19例。所有病例为首次发病，且资料保存完整，所有患者术前未接受放、化疗等。同时，选取30例结节性甲状腺肿(nodular goiter,

NG)作为对照，年龄16~68(平均42)岁，其中男9例，女21例。本研究经东南大学附属第二医院伦理委员会审核批准，所有患者知情同意并签署知情同意书。

1.2 方法

B-raf基因突变的检测利用实时荧光定量PCR Taqman-ARMS探针法，检测组织中B-raf基因600密码子(V600E)的错义突变情况。选取手术切除并经病理证实的PTC及NG标本，经固定及石蜡包埋后切成5张10 μm厚的石蜡切片，并确保切片含有>70%的肿瘤组织。使用德国Qiagen公司的DNA提取试剂盒提取石蜡标本基因组DNA。参照厦门艾德生物医药科技有限公司的人类B-raf基因突变检测试剂盒进行。阴性质控标准品采用灭菌双蒸水。按照试剂盒说明书对收集信号进行分析，判断样本阳性为突变型，阴性为野生型。

免疫组织化学鼠抗人单克隆抗体Caveolin-1，COX-2和DAB显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。用磷酸盐缓冲液(PBS)替代一抗作为阴性对照。标本经4%中性甲醛固定，石

蜡包埋, 切片厚度为4 μm; 免疫组织化学采用SP法, 具体按试剂盒说明进行操作。结果判定:Caveolin-1阳性定位于细胞膜, COX-2阳性表达于细胞膜和/或细胞质, 采用半定量评分系统, 结合染色强度及阳性细胞百分比进行评分^[4-5]。染色强度分为: 0分(阴性), 1分(弱阳性), 2分(中等阳性)和3分(强阳性)。阳性细胞数所占百分比计分: 全阴性为0分, 阳性细胞数≤10%为1分, 阳性细胞数11%~50%为2分, 阳性细胞数51%~75%为3分, 阳性细胞数>75%为4分。染色强度与阳性细胞数所占百分比的乘积: 0~3分为(-), 4~5分为(+), 6~7分为(++) , >8分为(+++)。得分≤3为(-), >3分为(+)。所有免疫组织化学染色结果采用双盲法进行病理阅片。

1.3 统计学处理

应用SPSS 18.0统计软件进行分析。计数资料以率(%)表示, 采用 χ^2 检验, 两变量间的相关性采用Spearman分析。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 B-raf基因突变与临床病理特征的关系

30例NG均未检测出B-raf基因突变, 为野生型, 82例PTC中B-raf突变率为68.29%(图1), 差异有统计学意义($P<0.01$)。淋巴结转移组和包膜侵

犯组的B-raf基因突变率(80.85%, 85.19%)高于无淋巴结转移组、无包膜侵犯组(51.43%, 60.00%; $P<0.05$); B-raf基因突变率与性别、年龄、肿瘤直径、肿瘤数目、TNM分期无关($P>0.05$)。

2.2 Caveolin-1 和 COX-2 在 PTC 和 NG 中的表达

Caveolin-1和COX-2在30例NG中的阳性表达率分别为23.33%和13.33%, 在82例PTC中阳性表达率分别为69.51%和79.27%, 两组之间差异具有统计学意义($P<0.01$; 图2)。

2.3 Caveolin-1 和 COX-2 蛋白表达与 PTC 临床病理特征之间的关系

PTC中Caveolin-1的表达与颈部淋巴结转移和B-raf基因突变有显著相关性($P<0.05$), 与性别、年龄、肿瘤直径、肿瘤数目、包膜侵犯、TNM分期无相关性($P>0.05$); COX-2与颈部淋巴结转移、包膜侵犯相关($P<0.05$), 与性别、年龄、肿瘤直径、肿瘤数目、TNM分期、B-raf基因突变无明显相关性($P>0.05$; 表1)。

2.4 B-raf 基因突变与 Caveolin-1 和 COX-2 蛋白表达的相关性

Spearman相关性分析显示在PTC中B-raf基因突变与Caveolin-1蛋白的表达呈正相关($r=0.232$, $P=0.036$), B-raf基因突变与COX-2蛋白的表达无关($r=0.169$, $P=0.130$; 表2)。

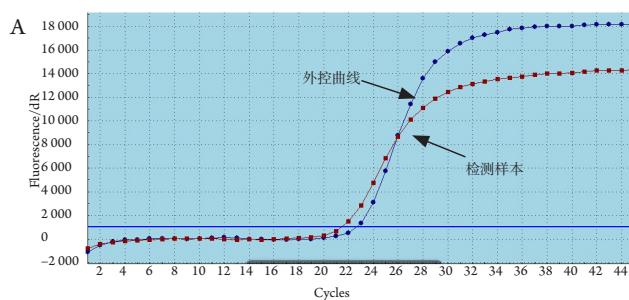
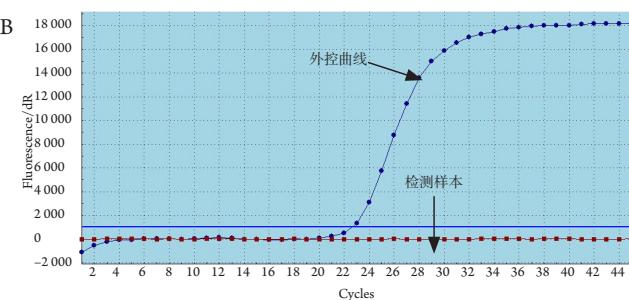


图1 B-raf基因RT-PCR扩增产物荧光曲线图

Figure 1 B-raf gene mutation RT-PCR amplification curve in PTC

(A)B-raf基因突变阳性; (B)B-raf基因突变阴性。

(A) Positive mutation of B-raf gene; (B) Negative mutation of B-raf gene.



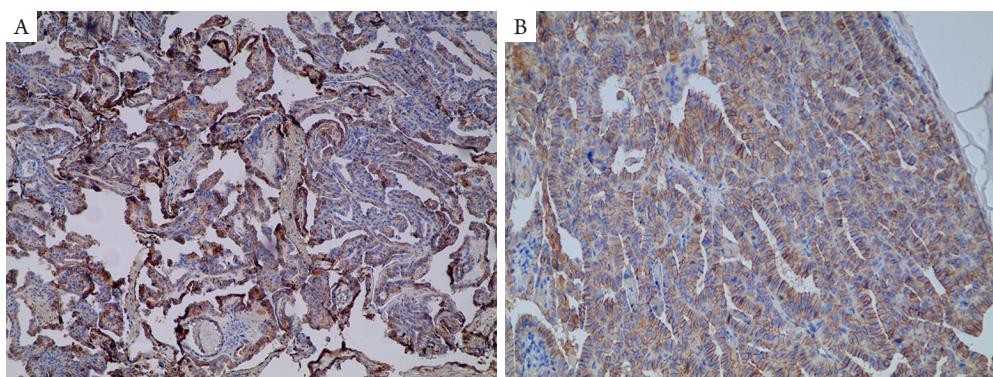


图2 免疫组织化学法检测PTC中Caveolin-1, COX-2的表达(SP, × 200)

Figure 2 Immunohistochemical methods showing the expression of Caveolin-1 and COX-2 in PTC (SP, × 200)

(A) PTC中Caveolin-1的表达; (B) PTC中COX-2的表达。

(A) Expression of Caveolin-1 in PTC; (B) Expression of COX-2 in PTC.

表1 Caveolin-1, COX-2蛋白表达与PTC临床病理特征的关系

Table 1 Correlation of Caveolin-1 and COX-2 protein expression with clinicopathologic features in PTC

病理特征	n	Caveolin-1/[例(%)]	χ^2	P	COX-2/[例(%)]	χ^2	P
性别			2.994	0.084		0.009	0.926
男	20	17 (85.00)			16 (80.00)		
女	62	40 (64.52)			49 (79.03)		
年龄/岁			2.069	0.150		0.065	0.799
≥40	46	29 (63.04)			36 (78.27)		
<40	36	28 (77.78)			29 (80.56)		
肿瘤最大径/cm			0.687	0.407		0.032	0.857
≥1	37	24 (64.87)			29 (78.38)		
<1	45	33 (73.33)			36 (80.00)		
肿瘤数目			0.746	0.388		0.042	0.838
单发	50	33 (66.00)			40 (80.00)		
多发	32	24 (75.00)			25 (78.13)		
淋巴结转移			12.635	<0.001		10.008	0.002
有	47	40 (85.11)			43 (91.49)		
无	35	17 (48.57)			22 (62.86)		
包膜侵犯			0.395	0.530		4.349	0.037
有	27	20 (74.07)			25 (92.59)		
无	55	37 (67.27)			40 (72.73)		
TNM分期			1.039	0.308		1.567	0.211
I, II	63	42 (66.67)			48 (76.19)		
III, IV	19	15 (78.95)			17 (89.47)		

表2 PTC中B-raf基因突变与Caveolin-1与COX-2蛋白表达的相关性**Table 2 Correlation of B-raf gene mutation with Caveolin-1 and COX-2 expression in PTC**

B-raf基因突变	n	Caveolin-1		r	P	COX-2		r	P
		+	-			+	-		
+	56	43	13	0.232	0.036	47	9	0.169	0.130
-	26	14	12			18	8		

3 讨论

甲状腺癌发病率在过去的10年中每年增长5%^[6]，乳头状癌是其最常见类型，外科手术是主要治疗方法，但是其广泛的局部浸润和远处转移使得预后较差^[7]。因此，加强检测PTC中的肿瘤标志物及判断侵袭转移，有助于早期诊断及提高预后。

B-raf基因是MAPK信号通路的重要蛋白激酶，参与调控蛋白的功能和表达水平，以及细胞生长、分化和凋亡等，B-raf基因突变致MAPK级联通路的激活，使细胞增殖、肿瘤发生。B-raf基因突变是甲状腺肿瘤中最常见的分子遗传学改变^[8]，在甲状腺癌中的突变率为29%~83%^[9]，通常在经典型和高细胞亚型中多发，而在良性病变中未发现突变。同时，有研究^[10-11]表明：B-raf基因突变是公认的PTC预后差的危险因素，并与PTC的相关病理特征相关。本研究结果分析显示：B-raf基因突变在PTC中发生率高，B-raf基因突变与PTC的淋巴结转移、包膜侵犯之间差异有统计学意义，进一步证明此观点，说明B-raf基因突变是PTC预后差的有效指标之一，临床应对此PTC伴有B-raf基因突变的病例积极治疗，以期改善预后。

Caveolin-1是细胞膜结构的重要组成部分，在人体多种细胞中广泛表达，是Caveolae家族的脚手架结构，参与膜泡转运、胆固醇平衡、细胞迁移和细胞内信号通路的调节^[12]，进而影响细胞的增殖、分化、转移等。在不同肿瘤发生中，可能起抑制作用，亦可能促进肿瘤发展。有研究^[13]表明：在乳腺、结肠、胃和肺癌中，Caveolin-1表达下调促进细胞增殖和减少细胞凋亡，而在前列腺癌，Caveolin-1的表达上调使其预后较差。Caveolin-1调控肿瘤细胞的增殖分化及侵袭迁移是通过多种信号传导通路，其中就有Caveolin-1沉默表达激活ERK1/2，PI3K-Akt通路来促进肿瘤的侵袭迁移^[14]。有研究^[15]表明：Caveolin-1可直接与PI3K结合而抑制PI3K/Akt信号转导通路。Du等^[16]发现Caveolin-1通过抑制BKCa通道进而抑制

乳腺癌MCF-7细胞的增殖和侵袭。以上研究表明Caveolin-1可作为一种抑癌基因抑制肿瘤的发生。但在某些肿瘤的研究^[12]中发现：肿瘤的恶性程度越高，侵袭转移范围越大，Caveolin-1的表达越高。Auzair等^[17]通过免疫组织化学染色法检测发现Caveolin-1高表达可作为在口腔鳞状细胞癌预后的一个独立因素，Caveolin-1表达增多，患者预后越差。同时，有研究^[18]发现：Caveolin-1通过增加IGF-1R的表达及活化PI3K/Akt和RAF/MEK/ERK途径抑制瘤细胞凋亡。目前，在甲状腺肿瘤中关于Caveolin-1和B-raf之间的研究尚无报道。本研究结果显示：Caveolin-1在PTC中高表达，与B-raf基因突变相关，与Janković等^[19]的结果一致，表明Caveolin-1能促进PTC的发生发展，其可能通过Caveolin-1表达提高激活PI3K/Akt信号转导通路而增强肿瘤的侵袭与转移能力。当发生B-raf基因突变时Caveolin-1蛋白表达更高，推测B-raf基因突变可能促进Caveolin-1蛋白表达，B-raf基因与Caveolin-1共同参与PTC的发生、发展。同时，本研究表明：Caveolin-1在有淋巴结转移组中的阳性表达显著高于无淋巴结转移组，提示其在PTC的浸润转移中扮演重要角色。

COX-2系膜结合蛋白，是前列腺素生成过程中的限速酶，在正常组织中甚少表达，在细胞接受相应刺激后开始合成，是一种反应性即刻反应蛋白。有报道^[20]指出：PI3K/Akt信号通路能调控COX-2的表达，COX-2作用于PI3K/Akt信号通路下游，高表达时增强Akt活性，进而促进细胞的增殖。谷化平等^[21]认为：COX-2能刺激肿瘤细胞增殖、抑制凋亡，在许多肿瘤组织中高表达。本实验发现：COX-2在PTC中高表达，且与淋巴结转移、包膜侵犯有关，与杜日昌等^[3]的研究一致，提示COX-2在PTC的发生发展及浸润转移过程中有促进作用。同时显示：COX-2高表达与B-raf基因高突变率无明显相关性，推测两者虽均参与了PTC的发生发展及浸润转移，但可能通过不同的信号通路调节。

综上所述，PTC中B-raf基因突变以及

Caveolin-1和COX-2的高表达，可作为评估PTC侵袭转移能力的重要指标，三者联合检测可提高诊断的准确性，从而为研究相应的靶向药物提供可靠的临床病理数据。

参考文献

1. Kim TH, Park YJ, Lim JA, et al. The association of the BRAF(V600E) mutation with prognostic factors and poor clinical outcome in papillary thyroid cancer: a meta-analysis[J]. *Cancer*, 2012, 118(7): 1764-1773.
2. Basu Roy UK, Henkhaus RS, Loupakis F, et al. Caveolin-1 is a novel regulator of K-RAS-dependent migration in colon carcinogenesis[J]. *Int J Cancer*, 2013, 133(1): 43-57.
3. 杜日昌, 李宇芳, 邱卫东, 等. 甲状腺乳头状癌中HIF-1 α 、VEGF、COX-2及VEGF-C表达与侵袭转移的关系[J]. 临床与实验病理学杂志, 2013, 29(9): 991-995.
DU Richang, LI Yufang, QIU Weidong, et al. Relationship between the expression of HIF-1 α , VEGF, COX-2 and VEGF-C and invasion, metastasis of human papillary thyroid carcinoma[J]. Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2013, 29(9): 991-995.
4. Zhao X, Yu G, Yu X, et al. Caveolin-1 is overexpressed in hypopharyngeal squamous cell carcinoma and correlates with clinical parameters[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(4): 2371-2374.
5. Qiu X, Mei J, Yin J, et al. Correlation analysis between expression of PCNA, Ki-67 and COX-2 and X-ray features in mammography in breast cancer[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(3): 2912-2918.
6. Torre LA, Sauer AM, Chen MS Jr, et al. Cancer statistics for Asian Americans, Native Hawaiians, and Pacific Islanders, 2016: converging incidence in males and females[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(3): 182-202.
7. Durante C, Haddy N, Baudin E, et al. Long-term outcome of 444 patients with distant metastases from papillary and follicular thyroid carcinoma: benefits and limits of radioiodine therapy[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(8): 2892-2899.
8. Witt RL, Ferris RL, Pribitkin EA, et al. Diagnosis and management of differentiated thyroid cancer using molecular biology[J]. *Laryngoscope*, 2013, 123(4): 1059-1064.
9. Şahpaz A, Önal B, Yeşilyurt A, et al. BRAF(V600E) mutation, RET/PTC1 and PAX8-PPAR Gamma rearrangements in follicular epithelium derived thyroid lesions-institutional experience and literature review[J]. *Balkan Med J*, 2015, 32(2): 156-166.
10. Liu S, Zhang B, Zhao Y, et al. Association of BRAFV600E mutation with clinicopathological features of papillary thyroid carcinoma: a study on a Chinese population[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(10): 6922-6928.
11. Xing M, Liu R, Liu X, et al. BRAF V600E and TERT promoter mutations cooperatively identify the most aggressive papillary thyroid cancer with highest recurrence[J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(25): 2718-2726.
12. Arpaia E, Blaser H, Quintela-Fandino M, et al. The interaction between caveolin-1 and Rho-GTPases promotes metastasis by controlling the expression of alpha5-integrin and the activation of Src, Ras and Erk[J]. *Oncogene*, 2012, 31(7): 884-896.
13. Quest AF, Gutierrez-Pajares JL, Torres VA. Caveolin-1: an ambiguous partner in cell signalling and cancer[J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(4): 1130-1150.
14. Song H, Cheng Y, Bi G, et al. Release of matrix metalloproteinases-2 and 9 by S-nitrosylated Caveolin-1 contributes to degradation of extracellular matrix in tPA-treated hypoxic endothelial cells[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0149269.
15. Kiss AL, Turi A, Müllner N, et al. Oestrogen-mediated tyrosine phosphorylation of caveolin-1 and its effect on the oestrogen receptor localisation: an in vivo study[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2005, 245(1/2): 128-137.
16. Du C, Chen L, Zhang H, et al. Caveolin-1 limits the contribution of BKCa channel to MCF-7 breast cancer cell proliferation and invasion[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(11): 20706-20722.
17. Auzair LB, Vincent-Chong VK, Ghani WM, et al. Caveolin 1 (Cav-1) and actin-related protein 2/3 complex, subunit 1B (ARPC1B) expressions as prognostic indicators for oral squamous cell carcinoma (OSCC)[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2016, 273(7): 1885-1893.
18. Tang W, Feng X, Zhang S, et al. Caveolin-1 confers resistance of hepatoma cells to anoikis by activating IGF-1 pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(3): 1223-1236.
19. Janković J, Tatić S, Božić V, et al. Inverse expression of caveolin-1 and EGFR in thyroid cancer patients[J]. *Hum Pathol*, 2017, 61: 164-172.
20. Chen W, Bai L, Wang X, et al. Acquired activation of the Akt/cyclooxygenase-2/Mcl-1 pathway renders lung cancer cells resistant to apoptosis[J]. *Mol Pharmacol*, 2010, 77(3): 416-423.
21. 谷化平, 黄勇, 尚培中. 环氧化酶-2和细胞周期素D1蛋白在胆管癌中的表达及其临床意义[J]. 实用癌症杂志, 2013, 28(2): 144-146.
GU Huaping, HUANG Yong, SHANG Peizhong. Expression and clinical significance of COX-2 and Cyclin D1 in cholangioncarcinoma[J]. The Practical Journal of Cancer, 2013, 28(2): 144-146.

本文引用: 张杰东, 朱传东, 刘杜先, 刘兰侠, 方媛. 甲状腺乳头状癌 B-raf 基因突变及 Caveolin-1 和 COX-2 蛋白表达的临床意义 [J]. 临床与病理杂志, 2018, 38(7): 1434-1439. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.07.010

Cite this article as: ZHANG Jiedong, ZHU Chuandong, LIU Duxian, LIU Lanxia, FANG Yuan. Clinical significance of B-raf gene mutation and Caveolin-1 and COX-2 protein expressions in papillary thyroid carcinoma [J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2018, 38(7): 1434-1439. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.07.010