

NIS 的表达与甲状腺癌的相关性分析

马伟¹ 苏鹏程² (通讯作者) 艾力·赛丁²

1.石河子大学医学院, 新疆 石河子 832001

2.新疆维吾尔自治区人民医院乳腺、甲状腺科, 新疆 乌鲁木齐 830001

摘要:目的:通过研究甲状腺癌分子水平特征,研究其发病机制并找到有效的治疗方法。通过免疫组化法对甲状腺癌的组织及正常甲状腺组织中 NIS 蛋白的检测,明确 NIS 的表达与甲状腺癌的相关性,为甲状腺癌的诊断、治疗、预后提供临床指导意义。方法:选取在我院 2019 年 10 月至 2020 年 8 月收治的符合甲状腺癌诊断标准并具有完整临床病理资料的患者 50 例(男性 27 例,女性 23 例;年龄 9~80 岁,中位年龄 65 岁),将以上病例的正常甲状腺组织作为对照。对所有病例的临床病理资料进行回顾性分析,通过免疫组织化学方法处理,检测 NIS 蛋白在甲状腺癌组织及正常甲状腺组织中的表达情况,并比较其差异。结果:免疫组化结果显示:1.在 50 例甲状腺癌患者中,均未出现 NIS 阴性表达;甲状腺癌组织 NIS 蛋白弱阳性表达有 49 例(98%),在甲状腺癌旁组织中,NIS 蛋白弱阳性表达有 9 例(18%),弱阳性表达率甲状腺癌显著高于甲状腺癌旁组织,差异具有统计学意义($P < 0.05$);2.在 50 例甲状腺癌患者中,甲状腺癌组织 NIS 蛋白阳性表达有 1 例(2%),在甲状腺癌旁组织中,NIS 蛋白阳性表达有 14 例(28%),阳性表达率甲状腺癌显著低于甲状腺癌旁组织,差异具有统计学意义($P < 0.05$);3.在 50 例甲状腺癌患者中,NIS 蛋白强阳性表达有 0 例(0%),在甲状腺癌旁组织中,NIS 蛋白强阳性表达有 27 例(54%),强阳性表达率甲状腺癌显著低于甲状腺癌旁组织,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。4.甲状腺癌 NIS 蛋白强阳性表达显著低于甲状腺癌旁组织。甲状腺癌 NIS 免疫组织化学染色产物主要定位于细胞质,且呈弥漫性、棕褐色深染;正常甲状腺 NIS 阳性产物定位于细胞膜和细胞质,呈淡黄色、分散性着色。结论:甲状腺癌中 NIS 蛋白表达弱阳性率显著高于甲状腺癌旁组织,而强阳性率明显低于甲状腺癌旁组织;甲状腺癌中 NIS 蛋白表达强阳性率较甲状腺癌旁组织显著降低;NIS 功能蛋白定位于细胞膜,在不同甲状腺疾病组织中的表达水平有所差异。

关键词:甲状腺癌;钠碘转运体;放射性碘治疗

引言

甲状腺是成年人最大的内分泌腺,其分泌受到神经、内环境和免疫系统等众多因素的影响,因而其生理病理较为复杂。甲状腺癌是一种常见的内分泌恶性肿瘤,甲状腺癌发病率较往年明显增高^[1]。其治疗方式主要是通过手术治疗,目前其术后预后相对较好,但仍然有部分病例术后治疗无效,而且手术为甲状腺癌治疗的最有效方法,一旦手术失败,意味着几乎失去了治疗机会^[2]。放射性碘治疗是指利用甲状腺聚集的放射性碘放出射线,慢慢地破坏产生甲状腺激素的细胞,长时间的照射使得甲状腺组织腺体逐渐被破坏,同时也被无功能的结缔组织取代,从而降低甲状腺的分泌功能。放射性碘破坏肿瘤细胞最重要的原因是肿瘤细胞必须具有吸收碘的能力。然而,甲状腺摄碘能力下降,这使得放射性碘治疗难以发挥作用。甲状腺及一些其他组织中的碘的转运主要是由钠碘转运体(sodium iodide symporter, NIS)介导,NIS 是一种介导碘转运的膜蛋白,起着“碘泵”的作用。在甲状腺组织中,甲状腺对碘的摄取是甲状腺激素合成的第一步,碘通过与甲状腺球蛋白结合,储存在甲状腺组织中。碘通过 NIS 转运到甲状腺组织,而甲状腺组织具有聚碘能力^[3]。近年来,关于 NIS 与甲状腺癌关系的研究称为国内外众多学者研究热点,但由于各种原因,仍未确切明了。本研究主要是通过免疫组化法对甲状腺癌的癌组织及正常甲状腺组织中 NIS 蛋白的检测,明确 NIS 的表达与甲状腺癌的相关性,为甲状腺癌的诊断、治疗、预后提供临床指导意义。

1 研究对象与方法

1.1 研究对象

选取在我院 2019 年 10 月至 2020 年 8 月收治的符合甲状腺癌诊断标准并具有完整临床病理资料的患者 50 例(男性 27 例,女性 23 例;年龄 9~80 岁,(中位年龄 65 岁),将以上病例的正常甲状腺组织作为对照。所有患者在术前均未接受手术或药物等任何治疗。所有标本采集均由同一人在手术室现场收集,并获得患者及家属的同意,均签署知情同意书。所有标本均由 2 位病理医师分别作出诊断。取后的标本置于 10% 甲醛溶液中固定用于免疫组化染色。

1.2 试剂及仪器

试剂:无水乙醇、二甲苯、EDTA 抗原修复液、兔二抗、鼠二抗、DAB、BSA、苏木素、中性树胶。仪器:组织脱水机、

组织包埋机、病理切片机、组织摊片机、烤箱、载玻片及盖玻片、显微镜、成像系统等。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫组织化学染色

从病理组织蜡块中取切片,石蜡切片置于 65℃ 烘箱中烘烤 2h,脱蜡至水,用 PBS 冲洗三次,每次 5 min。切片置于 EDTA 抗原修复液中高压修复,高压 10min 后停止。自然冷却后 PBS 洗 3 次,每次 5 min。切片放入 3% 过氧化氢溶液,室温下孵育 10 min,以阻断内源性过氧化物酶。PBS 洗 3 次,每次 5 min,甩干后 5% BSA 封闭 20 min(封闭电荷)。去除 BSA 液,每张切片加入 50 μl 稀释的一抗覆盖组织,4℃ 过夜。PBS 洗 3 次,每次 5 min。去除 PBS 液,每张切片加 50 μl-100 μl 相应种属的二抗,37℃ 孵育 30min。PBS 洗 3 次,每次 5min。去除 PBS 液,每张切片加 50-100 μl 新鲜配制 DAB 溶液,显微镜控制显色。显色完全后,蒸馏水或自来水冲洗,苏木素染液复染,1% 盐酸酒精分化(1s),自来水冲洗,氨水返蓝,流水冲洗。切片经过梯度酒精(70-100%)10min 一个梯度,脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封固。

1.3.2 免疫组织化学结果判读

阳性细胞判断标准是细胞膜和(或)细胞质出现浅黄色至棕褐色颗粒。采用半定量方法判定 NIS 蛋白的表达等级。具体来说,即分别对镜下阳性细胞的百分比和染色强度给予评分。阳性细胞百分比:0%计为 0 分,1%~25%计为 1 分,26%~50%计为 2 分,51%~75%计为 3 分,76%~100%计为 4 分;阳性着色强度:无色计为 0 分,淡黄色计为 1 分,棕黄色计为 2 分,棕褐色计为 3 分。两者计分相乘即为表达等级:0 分为阴性(-),1~4 分为弱阳性(+),5~8 分为阳性(++),9~12 分为强阳性(+++)。

1.4 统计学方法

本实验数据使用 SPSS 21.0 统计软件进行数据处理,所有数据首先进行正态性和方差齐性检验,符合正态分布的计量资料采用均数±标准差来表示,不符合正态分布以 M(P25, P75)表示,采用分类变量进行卡方检验。率的比较采用 Fisher 精确概率检验或卡方检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病理形态

免疫组织化学染色检测结果显示, 正常甲状腺 NIS 阳性产物定位于细胞膜和细胞质, 呈淡黄色、分散性着色, NIS 蛋白表达平均积分为 3 分; 在甲状腺癌 NIS 免疫组织化学染色产物主要定位在细胞质, 且呈弥漫性、棕褐色深染; 见图 1。

2.2 NIS 在甲状腺癌与甲状腺癌旁组织中的表达

在 50 例甲状腺癌患者中, 甲状腺癌旁组织和甲状腺癌均未出现 NIS 阴性表达; 甲状腺癌组织 NIS 蛋白弱阳性表达有 49 例 (98%), 在甲状腺癌旁组织中, NIS 蛋白弱阳性表达有 9 例 (18%), 弱阳性表达率甲状腺癌显著高于甲状腺癌旁组织, 差异具有统计学意义 ($\chi^2=65.68, P<0.05$); 2. 在 50 例甲状腺癌患者中, 甲状腺癌组织 NIS 蛋白阳性表达有 1 例 (2%), 在甲状腺癌旁组织中, NIS 蛋白阳性表达有 14 例 (28%), 阳性表达率甲状腺癌显著低于甲状腺癌旁组织, 差异具有统计学意义 ($\chi^2=13.26, P<0.05$); 3. 在 50 例甲状腺癌患者中, NIS 蛋白强阳性表达有 0 例 (0%), 在甲状腺癌旁组织中, NIS 蛋白强阳性表达有 27 例 (54%), 强阳性表达率甲状腺癌显著低于甲状腺癌旁组织, 差异具有统计学意义 ($\chi^2=36.99, P<0.05$)。

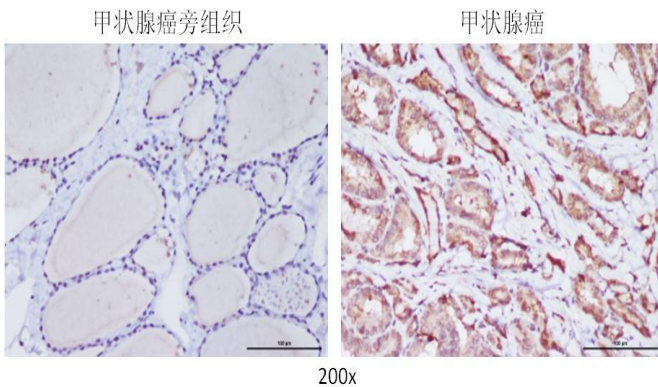


图 1 免疫组织化学检测 NIS 蛋白在不同甲状腺组织中的表达 (×200)

表 1 NIS 蛋白在不同甲状腺组织的表达 (n%)

甲状腺组织	n (例)	NIS 蛋白			
		-	+	++	+++
甲状腺癌旁组织	50	0 (0.0)	9 (18)	14 (28)	27 (54)
甲状腺癌	50	0 (0.0)	49 (98)	1 (2)	0 (0.0)
χ^2			65.68	13.26	36.99
P			0.00	0.00	0.00

3 讨论

甲状腺癌既往主要是通过手术治疗, 后来出现了放射性碘治疗及近些年出现的免疫疗法、人工智能等新兴疗法。一般对于未发生转移、早期具有手术机会的患者均应尽早行手术治疗, 手术范围包括全甲状腺切除及中央淋巴结的切除。放射性碘治疗主要是对术后残留癌组织及转移灶的治疗, 是根据甲状腺组织相对于其他组织对碘的摄取能力强。甲状腺累积碘的能力为治疗剂量的碘提供了一种有效的手段来靶向和破坏碘转运分化的甲状腺癌及其转移, 摄入碘的细胞通过碘发射的 γ 射线用于 ^{131}I 核素扫描^[4]。NIS 在甲状腺癌的放射性碘治疗中起着至关重要的作用, 在甲状腺癌中 NIS 持续生成。促甲状腺激素是甲状腺中 NIS 的主要调节因子^[5-6], 通过对 NIS 的分析可以为甲状腺癌的治疗提供更准确、正确的方法, 有学者建议对肿瘤组织 NIS 蛋白的免疫组化分析, 在复发和转移的情况下作为放射性碘治疗的必要手段^[7]。因此, 本研究是通过免疫组织化学研究 NIS 的表达。

本研究表明 NIS 在甲状腺癌免主要定位在细胞质, 属于非功能定位, 在细胞膜上未表达导致组织摄取碘的能力丢失。可能原因是①NIS 未成熟或错误修饰, 尤其是 N-端氨基酸,

如氨基化和糖基化等一系列复杂的翻译后修饰, 导致缺乏运输到细胞膜上的信号, 造成 NIS 蛋白在细胞质积累, 导致其表达降低或缺失^[8]。②垂体肿瘤转化基因结合因子的减少, 降低 NIS 在细胞内的定位, 从而减少碘的摄取^[9]。③NIS 蛋白在细胞内的重新分布造成的。Smith 等^[10]研究发现垂体肿瘤转化基因结合因子过量表达会导致 NIS 从质膜重新分布到细胞内囊泡中, 从而摄取碘的能力。在 NIS 的调节机制中, 自身调节是一个很重要的机制, 当甲状腺内碘浓度达到较高水平时, 减少了酪氨酸的有机化, 血液中的 TH 含量减少, 称为急性 Wolff-Chaikoff 效应, 尽管血浆碘浓度持续较高, 但仍恢复正常器官化(逃避急性 Wolff-Chaikoff 效应)。在分子水平上, 碘过量会通过改变 NIS mRNA 的分子结构稳定性对甲状腺产生有害影响^[11-12]。蛋白质之间的相互作用, 也是 NIS 调节的一种, 如垂体肿瘤转化基因结合因子能够促进 NIS 在细胞内的定位, 从而减少碘的摄取, 垂体肿瘤转化基因结合因子与甲状腺癌的转移也密切相关^[13]。Roepke 等人^[14]研究发现 KCNQ1 - KCNE2 K+通道对甲状腺细胞刺激 TSH 合成, 当 KCNE2 受损时, 甲状腺中碘的含量明显提升, 由此可知 K+通道对 NIS 有影响。同时 Abbott 等人^[15]的研究发现 Na⁺偶联肌醇转运与 KCNQ1 和 KCNE2 也相互作用, 与 NIS 为同一家族成员。虽然 NIS 对 I 碘的亲合力较低, 但当 Na⁺结合时, NIS 的亲合力明显增加。以上研究均表明 NIS 与各种通道相互作用、相互调节^[16]。

根据本次研究结果, NIS 甲状腺癌组织 NIS 蛋白弱阳性率 98%, 在甲状腺癌旁组织 18%, 弱阳性表达率甲状腺癌显著高于甲状腺癌旁组织; 甲状腺癌组织 NIS 蛋白阳性率 2%, 在甲状腺癌旁组织 28%, 阳性表达率甲状腺癌显著低于甲状腺癌旁组织; NIS 蛋白强阳性率 0%, 甲状腺癌旁组织 54%, 强阳性表达率甲状腺癌显著低于甲状腺癌旁组织。阳性表达率、强阳性表达率甲状腺癌组织显著低于癌旁甲状腺组织, 与许建林等人^[17]的研究结果略有不同。NIS 作为甲状腺癌治疗的关键部分, NIS 已经被导入到各种癌细胞中^[18], 使其易受放射性碘的破坏, 研究其在原发肿瘤中的表达能够有助于预测治疗效果、预后及转移。当 NIS 免疫染色阳性意味着原发肿瘤转移和复发, 但并不明确 NIS 是否在细胞基底膜上表达, 且 NIS 免疫染色阴性不能预测其转移。但是 NIS 在原发性肿瘤中的表达不能作为预后标志物。在放射碘治疗甲状腺癌的过程中, NIS 的持续生成为其复发及转移的治疗提供了通道^[19]。但是对于晚期甲状腺癌对 NIS 的表达有所降低, 因而对碘摄取能力下降, 有文献报道^[20]一些晚期甲状腺癌 3-5 年内死亡。NIS 的甲状腺癌患者中的表达被广泛研究, 但是至今未明确。有研究发现, NIS 在不同甲状腺组织中表达不同, 在正常甲状腺组织中表达水平低^[21-22], 与 NIS 的表达调控有关。在癌组织中, 虽然 NIS 表达较多, 但主要在细胞质中表达。因此, 要提高甲状腺癌放射治疗的效率, 并使放射性碘能够用于甲状腺癌的诊断和治疗, 改进针对质膜的 NIS 是不够的。相反, 提高 NIS 的表达水平应该仍然是这一领域的主要目标。

综上所述, 放射性碘治疗是甲状腺癌术后综合治疗的一个重要方法, 而其预后差或发生术后转移的原因之一是甲状腺摄取碘的能力下降。因此, 仍有必要对甲状腺癌进行深入的研究, 以了解 NIS 表达在治疗反应、肿瘤行为和预后中的作用。此外, 了解 NIS 表达分析的优势和局限性, 并评估研究 NIS 表达的更好、更有用的方法也很重要, 将是今后研究的方向。

参考文献

[1] Siegel R, Miller K, Jemal A, et al. Cancer Statistics, 2017 [J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(1): 7-30.
 [2] Tiedje VI, Schmid KW, Weber F, et al. Differentiated thyroid cancer [J]. Der Internist, 2015, 56(2): 153-166.
 [3] Baumann E. Ueber das normale Vorkommen von Jod im Thierkörper. (I. Mittheilung) [J]. Biological Chemistry, 1896, 21(4): 319-330.

- [4]Maxon HR, Thomas SR, Samaratunga RC. Dosimetric calculations in the radioiodine treatment of macrometastases and micrometastases from differentiated thyroid cancer[J]. *Thyroid*, 1997, 7(2):183-187.
- [5]Levy O, Dai G, Riedel C, Ginter CS, et al. Characterization of the thyroid Na⁺/I⁻symporter with an anti-COOH terminus antibody[J]. *PNAS*, 1997, 94(11):5568-5573.
- [6]Kogai T, Endo T, Saito T, et al. Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium/iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells[J]. *Endocrinology*, 1997, 138(6):2227-2232.
- [7]Kim S, Chung JK, Min HS, et al. Expression patterns of glucose transporter-1 gene and thyroid specific genes in human papillary thyroid carcinoma[J]. *Nucl Med Mol Imaging*, 2014(48):91-97.
- [8]Castro MR, Bergert ER, Beito TG, et al. Development of monoclonal antibodies against the human sodium iodide symporter: immunohistochemical characterization of this protein in thyroid cells[J]. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999, 84(8):2957-2962.
- [9]Dohan O, Baloch Z, Banreivi Z, et al. Rapid communication: predominant intracellular overexpression of the Na(+)/I(-) symporter (NIS) in a large sampling of thyroid cancer cases[J]. *J. Clin. Endocrinol Metab*, 2001, 86(6):2697-2700.
- [10]Smith VE, Read ML, Turnell S, et al. A novel mechanism of sodium iodide symporter repression in differentiated thyroid cancer[J]. *J Cell Sci* 2009;122(Pt18) 3393-3402.
- [11] Leoni SG, Kimura ET, Santisteban P, et al. Regulation of thyroid oxidative state by thioredoxin reductase has a crucial role in thyroid responses to iodide excess[J]. *Mol Endocrinol*, 2011, 25(11):1924-1935.
- [12] Serrano-Nascimento C, Calil-Silveira J, Nunes MT. Posttranscriptional regulation of sodium-iodide symporter mRNA expression in the rat thyroid gland by acute iodide administration[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010, 298(4):C893-99.
- [13] Boelaert K, Smith VE, Stratford AL, et al. PTTG and PBF repress the human sodium iodide symporter. *Oncogene*, 2007, 26(30):4344-4356.
- [14]Roepke T K, King EC, Reyna-Neyra A, et al. Kcne2 deletion uncovers its crucial role in thyroid hormone biosynthesis[J]. *Nature Medicine*, 2009, 15(10):1186-1194.
- [15]Abbott GW, Tai KK, Neverisky DL, et al. KCNQ1, KCNE2, and Na⁺-coupled solute transporters form reciprocally regulating complexes that affect neuronal excitability[J]. *ence Signaling*, 2014, 7(315):ra22.
- [16] Nicola JP, Carrasco N, Mario Amzel L. Physiological sodium concentrations enhance the iodide affinity of the Na⁺/I⁻symporter[J]. *Nat Commun*, 2014, 5(3):3948.
- [17]许建林, 梁晓燕, 南永刚, 等. NIS 蛋白在良恶性甲状腺疾病中的表达[J]. *现代肿瘤医学*, 2015, 000(018):2580-2583.
- [18]Dohan O, De La Vieja A, Paroder V, et al. The sodium / iodide symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance[J]. *Endocr Rev*, 2003, 24(1):48-77.
- [19]Morari EC, Marcello MA, Guilhen ACT, et al. Use of sodium iodide symporter expression in differentiated thyroid carcinomas[J]. *Clinical Endocrinology*, 2011, 75(2):247-254.
- [20]Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for adult patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: the American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer[J]. *Thyroid*, 2016, 26(1):131-133.
- [21]Peyrottes I, Navarro V, Ondo-Mendez A, et al. Immunoanalysis indicates that the sodium iodide symporter is not overexpressed in intracellular compartments in thyroid and breast cancers[J]. *European Journal of Endocrinology*, 2009, 160(2):215-225.
- [22]Wapnir IL, Matt VDR, Kent N, et al. Immunohistochemical Profile of the Sodium/Iodide Symporter in Thyroid, Breast, and Other Carcinomas Using High Density Tissue Microarrays and Conventional Sections[J]. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2003, 88(4):1880-1888.
- 作者简介: 通讯作者: 苏鹏程, E-mail: drsupengcheng@163.com.
- 项目基金: 新疆维吾尔自治区自然科学基金科研项目—“甲状腺微小癌生物学特性与不同碘摄入水平的相关性研究” 资助研究(项目编号: 2017D01C121)