

STAT3、NCK1 和 VEGF 在甲状腺乳头状癌中的表达及临床意义

李佳楠¹, 陈春悠²

(1.华北理工大学口腔医学院,河北 唐山 063000;

2.唐山市工人医院头颈外科,河北 唐山 063000)

摘要:目的 研究 STAT3、NCK1、VEGF 在甲状腺乳头状癌中的表达情况及临床意义。方法 收集 2019 年 9 月—2020 年 12 月在唐山市工人医院头颈外科病理诊断明确的甲状腺乳头状癌组织 63 例,甲状腺腺瘤组织 32 例,正常甲状腺组织 20 例。使用免疫组织化学法检测 STAT3、NCK1、VEGF 的表达水平,分析不同甲状腺组织中 STAT3、NCK1、VEGF 蛋白表达情况,以及甲状腺乳头状癌中 STAT3、NCK1、VEGF 蛋白与临床病理的关系。结果 甲状腺乳头状癌中 STAT3、NCK1、VEGF 阳性表达率高于甲状腺腺瘤和正常甲状腺组织,差异有统计学意义($P<0.05$);而甲状腺腺瘤和正常甲状腺组织中 STAT3、NCK1、VEGF 阳性表达率比较,差异无统计学意义($P>0.05$);STAT3 阳性表达与肿瘤直径、是否伴有颈部淋巴结转移相关($P<0.05$),而与性别、年龄、病灶数、是否侵犯甲状腺外被膜、是否合并桥本甲状腺炎无关($P>0.05$);NCK1 阳性表达与是否伴有颈部淋巴结转移相关($P<0.05$),而与性别、年龄、肿瘤直径、病灶数、是否侵犯甲状腺外被膜、是否合并桥本甲状腺炎无关($P>0.05$);VEGF 阳性表达与肿瘤直径、是否侵犯甲状腺外被膜和是否伴有颈部淋巴结转移相关($P<0.05$),而与性别、年龄、病灶数、是否合并桥本甲状腺炎无关($P>0.05$)。Spearman 秩相关性分析显示,甲状腺乳头状癌中 STAT3 与 NCK1 的表达呈正相关($r=0.483, P<0.05$);STAT3 与 VEGF 的表达呈正相关($r=0.584, P<0.05$);NCK1 与 VEGF 的表达呈正相关($r=0.477, P<0.05$)。结论 STAT3、NCK1、VEGF 存在协同作用,共同促进了甲状腺乳头状癌的血管生成和颈部淋巴结转移过程。

关键词: 甲状腺乳头状癌;STAT3;NCK1;VEGF;肿瘤血管生成;颈部淋巴结转移

中图分类号:R736.1

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2022.05.023

文章编号:1006-1959(2022)05-0094-04

Expression of STAT3, NCK1 and VEGF in Papillary Thyroid Carcinoma and its Clinical Significance

LI Jia-nan¹, CHEN Chun-you²

(1.School of Stomatology, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, Hebei, China;

2.Head and Neck Surgery, Tangshan Workers' Hospital, Tangshan 063000, Hebei, China)

Abstract: **Objective** To study the expression of STAT3, NCK1 and VEGF in papillary thyroid carcinoma and its clinical significance. **Methods** Sixty-three cases of papillary thyroid carcinoma, 32 cases of thyroid adenoma, and 20 cases of normal thyroid tissue were collected from September 2019 to December 2020 in Tangshan Workers' Hospital. The expression levels of STAT3, NCK1 and VEGF were detected by immunohistochemistry. The expression of STAT3, NCK1 and VEGF in different thyroid tissues was analyzed, and the relationship between STAT3, NCK1 and VEGF in papillary thyroid carcinoma and clinical pathology was analyzed. **Results** The positive expression rates of STAT3, NCK1 and VEGF in papillary thyroid carcinoma were higher than those in thyroid adenoma and normal thyroid tissue, and the difference was statistically significant ($P<0.05$); while there was no significant difference in the positive expression rates of STAT3, NCK1 and VEGF between thyroid adenoma and normal thyroid tissues ($P>0.05$). STAT3 positive expression was correlated with tumor diameter and cervical lymph node metastasis ($P<0.05$), while was not related to gender, age, number of lesions, invasion of thyroid envelope, and hashimoto thyroiditis ($P>0.05$). The positive expression of NCK1 was correlated with cervical lymph node metastasis ($P<0.05$), while was not related to gender, age, tumor diameter, number of lesions, invasion of thyroid envelope, and hashimoto thyroiditis ($P>0.05$). The positive expression of VEGF was correlated with tumor diameter, invasion of thyroid envelope and cervical lymph node metastasis ($P<0.05$), was no correlation with gender, age, number of lesions and hashimoto thyroiditis ($P>0.05$). Spearman rank correlation analysis showed that STAT3 was positively correlated with NCK1 expression in papillary thyroid carcinoma ($r=0.483, P<0.05$); STAT3 was positively correlated with VEGF expression ($r=0.584, P<0.05$); NCK1 was positively correlated with VEGF expression ($r=0.477, P<0.05$). **Conclusion** STAT3, NCK1 and VEGF have a synergistic effect, which together promote the angiogenesis and cervical lymph node metastasis process of thyroid papillary carcinoma.

Key words: Papillary thyroid carcinoma; STAT3; NCK1; VEGF; Tumor angiogenesis; Cervical lymph node metastasis

对于手术难以根除的难治型甲状腺癌,积极寻找特异性高、灵敏度强的分子标记物是十分必要的。STAT3 属于信号转导和转录活化因子(signal transducer and activators of transcription, STATs) 家族成员,作为原癌基因可以加速癌细胞增殖,延缓癌细胞凋亡,帮助癌细胞逃脱免疫识别,诱导肿瘤血管生成

并参与恶性肿瘤的侵袭和转移过程。非催化区域酪氨酸激酶 1 (non-catalytic region of the tyrosine kinase adaptor protein 1, NCK1) 是一种信号内接头蛋白,参与细胞骨架重构,并与恶性肿瘤的侵袭和转移等过程密切相关。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 不仅参与肿瘤微血管的生成过程,还参与恶性肿瘤淋巴管生成等过程。本研究主要 STAT3、NCK1、VEGF 在甲状腺乳头状癌中的表达水平、相关性以及与甲状腺临床病理特征之间的关系,现报道如下。

作者简介:李佳楠(1996.4-),男,河北唐山人,硕士研究生,主要从事口腔颌面外科学研究

通讯作者:陈春悠(1962.1-),男,河北唐山人,硕士,教授,硕士生导师,主要从事头颈外科学的研究

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 标本来源 收集 2019 年 9 月-2020 年 12 月唐山市工人医院头颈外科病理诊断明确的甲状腺乳头状癌组织 63 例、甲状腺腺瘤组织 32 例、正常甲状腺组织(选取距离肿瘤病灶大于 2 cm,经病理证实无异常的甲状腺组织)20 例。所有病例临床资料完整,病理诊断明确,且取材前无其他头颈部肿瘤史及放化疗史,均为第 1 次接受甲状腺外科手术。

1.1.2 实验试剂 兔抗人 STAT3 多克隆抗体、兔抗人 NCK1 多克隆抗体、兔抗人 VEGF 多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司;DAB 试剂盒、PV6000 通用型试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法 采用免疫组化 SP 法染色,具体实验操作步骤按试剂说明书操作。阳性对照以试剂公司提供的阳性切片作为标准,阴性对照以 PBS 液代替一抗作为标准。

1.3 结果判读 STAT3、NCK1 的表达主要定位于细胞质,其次为细胞核;VEGF 的表达定位于细胞质,表现为弥散的颗粒状染色。采用双盲法由 2 名病理科医生在 400 倍高倍镜下随机选取 5 个不少于 100 个细胞的视野,取其平均值。评判标准^[1]:阴性(-):基本无着色;弱阳性(+): $\leq 10\%$ 的细胞呈现不同程度的细胞质着色;阳性(++): $10\% \sim 30\%$ 的细胞呈现强的棕褐着色的细胞质着色,或 $\leq 70\%$ 的细胞呈现弱或中等强度的细胞质着色;强阳性(+++): $> 30\%$

的细胞呈现强的棕褐着色的细胞质着色或 $> 70\%$ 的中等强度细胞质着色。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 25.0 统计软件进行数据处理,对实验结果进行统计分析。计数资料以 $[n(\%)]$ 表示,采用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法;采用 Spearman 秩相关性分析甲状腺乳头状癌中 STAT3、NCK1、VEGF 蛋白表达的关系。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同甲状腺组织中 STAT3、NCK1、VEGF 蛋白表达情况比较 甲状腺乳头状癌中 STAT3、NCK1、VEGF 阳性表达率高于甲状腺腺瘤和正常甲状腺组织,差异有统计学意义($P < 0.05$);而甲状腺腺瘤和正常甲状腺组织中 STAT3、NCK1、VEGF 阳性表达率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

2.2 甲状腺乳头状癌中 STAT3、NCK1、VEGF 蛋白与临床病理的关系 STAT3 阳性表达与肿瘤直径、是否伴有颈部淋巴结转移相关($P < 0.05$),而与性别、年龄、病灶数、是否侵犯甲状腺外被膜、是否合并桥本甲状腺炎无关($P > 0.05$);NCK1 阳性表达与是否伴有颈部淋巴结转移相关($P < 0.05$),而与性别、年龄、肿瘤直径、病灶数、是否侵犯甲状腺外被膜、是否合并桥本甲状腺炎无关($P > 0.05$);VEGF 阳性表达与肿瘤直径、是否侵犯甲状腺外被膜和是否伴有颈部淋巴结转移相关($P < 0.05$),而与性别、年龄、病灶数、是否合并桥本甲状腺炎无关($P > 0.05$),见表 2。

表 1 不同甲状腺组织中 STAT3、NCK1、VEGF 蛋白表达情况比较 $[n(\%)]$

组织	n	STAT3 阳性	NCK1 阳性	VEGF 阳性
甲状腺乳头状癌	63	41(65.08)	45(71.43)	50(79.37)
甲状腺腺瘤	32	9(28.13)	10(31.25)	7(21.88)
正常甲状腺组织	20	5(25.00)	6(30.00)	4(20.00)

表 2 甲状腺乳头状癌中 STAT3、NCK1、VEGF 蛋白与临床病理的关系 $[n(\%)]$

临床特征	n	STAT3 阳性	χ^2	P	NCK1 阳性	χ^2	P	VEGF 阳性	χ^2	P
性别			0.870	0.351		0.175	0.676		/	0.350
男	22	16(72.73)			15(68.18)			16(72.73)		
女	41	25(60.98)			30(73.17)			34(82.93)		
年龄(岁)			0.401	0.527		0.516	0.473		/	0.311
≥ 55	17	10(58.82)			11(64.71)			12(70.59)		
< 55	46	31(67.39)			34(73.91)			38(82.61)		
肿瘤直径(cm)			5.043	0.025		1.260	0.262		4.076	0.044
> 1	35	27(77.14)			27(77.14)			31(88.57)		
≤ 1	28	14(50.00)			18(64.29)			19(67.86)		
病灶数			0.357	0.550		3.380	0.066		0.378	0.539
单发	34	21(61.67)			21(61.76)			26(76.47)		
多发	29	20(68.97)			24(82.76)			24(82.76)		

表2(续)

临床特征	n	STAT3 阳性	χ^2	P	NCK1 阳性	χ^2	P	VEGF 阳性	χ^2	P
颈部淋巴结转移			9.483	0.002		10.676	0.001		7.497	0.006
是	31	26(83.87)			28(90.32)			29(93.55)		
否	32	15(46.88)			17(53.13)			21(65.63)		
侵犯甲状腺外被膜			0.031	0.860		1.006	0.316		/	0.047
是	41	27(65.95)			31(75.61)			36(87.80)		
否	22	14(63.64)			14(63.64)			14(63.64)		
合并桥本甲状腺炎			2.582	0.108		2.481	0.115		/	0.441
是	13	6(46.15)			7(53.85)			9(69.23)		
否	50	35(70.00)			38(76.00)			41(82.00)		

2.3 甲状腺乳头状癌中 STAT3、NCK1、VEGF 蛋白表达的相关性分析 甲状腺乳头状癌中 STAT3 与 NCK1 的表达呈正相关($r=0.483, P<0.05$); STAT3 与 VEGF 的表达呈正相关($r=0.584, P<0.05$); NCK1 与 VEGF 的表达呈正相关($r=0.477, P<0.05$)。

3 讨论

恶性肿瘤的生长发育过程中往往由于空间有限而伴随着缺氧、高压、高渗等环境,在这种恶劣环境中,肿瘤微血管生成和抑制的平衡关系被打破,癌细胞内各种调节血管内皮生长的基因开始表达并参与到肿瘤微血管生成的过程中,为肿瘤提供血液和氧气,使得肿瘤体积不断增大。同时,肿瘤微血管生成也是恶性肿瘤侵袭和转移行为的基础^[2,3]。肿瘤微血管的形成与恶性肿瘤的不良生物学行为和预后直接相关,因此研究肿瘤微血管生成的相关调节因子,以及其可能存在的作用机制对于患者预后的评估和未来肿瘤治疗靶点的探索有着积极意义。

VEGF 在肿瘤血管生成的过程中扮演着不可或缺的角色。头颈部肿瘤,如下咽癌^[4]、口腔癌^[5]、甲状腺癌^[6],因其生长空间有限,使得局部缺氧环境更容易形成,最终造成肿瘤微血管的形成。在目前已知的肿瘤微血管形成的过程中,肿瘤血管内皮细胞通过自分泌和旁分泌 VEGF,进而参与诱导肿瘤内部形成新生微血管,并造成血管内皮生长和抑制的失衡。此外,新生微血管的形成造成肿瘤内部微环境改变,形成缺氧环境,缺氧诱导因子活化后使得 VEGF 的转录程度进一步增强,加剧了肿瘤微血管的生成,从而使得肿瘤不断获取养分而生长发育^[7]。VEGF 不仅参与调控肿瘤微血管的生成过程,还参与肿瘤的转移过程。同时,VEGF 可以协同 VEGF-C 通过直接和间接的方式促进肿瘤细胞通过微淋巴管转移至全身。另外,VEGF 通过增加淋巴管上皮的通透性和改变细胞粘附性等手段促进恶性肿瘤通过淋巴管转移,参与其转移过程^[8,9]。NCK1 定位于人的染色体 3q22.3,位于细胞质中,是一种信号转导和转化蛋白。NCK1 具有 Src 同源性 2 和 3 结构域,即 SH2

和 SH3 结构域,而 SH2 和 SH3 结构域也赋予了 NCK1 参与细胞骨架重构、细胞分裂增殖和迁移过程的能力^[10-12]。Morris DC 等^[13]研究发现,NCK1 作为原癌基因可以促进乳腺癌的侵袭和肺转移等过程,当 NCK1 被抑制表达时,乳腺癌细胞的侵袭性降低。Xia P 等^[14]通过免疫组化、Western blot、ELISA 检测等手段证实了 NCK1 参与调节宫颈鳞癌微血管生成的过程,其通过上调 VEGF 的表达,从而诱导宫颈癌肿瘤微血管的形成,使肿瘤侵袭和转移行为获得养分支持。STATs 家族存在于细胞浆中,是一类具有信号转导和转录调控功能的蛋白家族。STAT3 作为原癌基因,在正常组织中的激活受到严格把控,而在恶性肿瘤中,STAT3 持续的激活可以诱导 Bcl-2、c-Myc 和 Bcl-XL 过度表达,导致肿瘤细胞持续增殖,也可以参与肿瘤细胞逃避免疫识别、促进血管生成过程中关键基因的转录^[15,16]。伍婧等^[17]研究发现,结肠癌中 STAT3 与 VEGF 的表达明显升高,且与结肠癌的血管生成密切相关。

本研究通过免疫组化法检测并比较了 STAT3、NCK1、VEGF 在甲状腺乳头状癌、甲状腺腺瘤和正常甲状腺组织中的表达水平,结果发现甲状腺乳头状癌中 STAT3、NCK1、VEGF 阳性表达率高于甲状腺腺瘤和正常甲状腺组织,差异有统计学意义($P<0.05$),提示三者可以作为鉴别不典型甲状腺良恶性肿瘤的指标。通过对甲状腺乳头状癌中 STAT3、NCK1、VEGF 蛋白与临床病理的关系进行分析,结果发现甲状腺乳头状癌中肿瘤直径越大,STAT3 和 VEGF 的表达越显著,说明二者参与了甲状腺乳头状癌的生长发育过程中,并在其过程中起到了促进作用。而 VEGF 的表达情况还与癌灶是否侵犯甲状腺外被膜相关,表明 VEGF 与甲状腺乳头状癌的侵袭性密切相关,随着甲状腺癌的不断进展,VEGF 的表达水平不断升高,最终导致癌灶向外侵袭,并突破被膜侵犯周围肌肉和神经组织。此外,STAT3、NCK1、VEGF 均与甲状腺乳头状癌患者的颈部淋巴结转移密切相关,提示三者均参与了甲状腺乳头状

癌颈部淋巴结转移的过程,检测三者的表达水平对鉴别患者是否发生颈部淋巴结转移有重要意义。甲状腺癌多来源于甲状腺滤泡上皮恶变,在恶变的过程中伴随着血管生成和抑制功能的失调,其中异常表达的 VEGF 在诱导肿瘤新生血管形成的过程中起到了关键作用^[18,19]。Zhang F 等^[20]研究发现,在结直肠癌中 NCK1 是 STAT3 的一个下游信号分子,在 STAT3 的调控下,NCK1 高表达并且参与促进了结直肠癌血管生成过程。本研究结果发现,甲状腺乳头状癌中 STAT3 与 NCK1 的表达呈正相关 ($r=0.483, P<0.05$);STAT3 与 VEGF 的表达呈正相关($r=0.584, P<0.05$);NCK1 与 VEGF 的表达呈正相关($r=0.477, P<0.05$),提示在甲状腺癌进展过程中 STAT3、NCK1、VEGF 的表达同样存在较强的相关性,由此可以推断,STAT3 和 NCK1 作为癌基因相互作用,可以诱导 VEGF 表达,促使肿瘤微血管形成;同时三者还可通过协同作用,以直接或间接的方式促使甲状腺乳头状癌通过淋巴管向颈部转移,导致患者不良预后。

综上所述,STAT3、NCK1 与 VEGF 三者在甲状腺乳头状癌中的表达水平高于甲状腺腺瘤和正常甲状腺组织,可为临床鉴别不典型甲状腺良恶性肿瘤提供思路。此外,STAT3 和 NCK1 不仅能诱导 VEGF 的表达,促进肿瘤血管生成,三者还可协同参与甲状腺乳头状癌的生长发育,侵犯甲状腺外被膜和颈部淋巴结转移过程。

参考文献:

- [1]《免疫组织化学检测技术共识》编写组.免疫组织化学检测技术共识[J].中华病理学杂志,2019,48(2):87-91.
- [2]Maeda-Otsuka S,Kajihara I,Tasaki Y,et al.Hypoxia accelerates the progression of angiosarcoma through the regulation of angiosarcoma cells and tumor microenvironment [J].J Dermatol Sci,2019,93(2):123-132.
- [3]Wang HF,Wang SS,Zheng M,et al.Hypoxia promotes vasculogenic mimicry formation by vascular endothelial growth factor A mediating epithelial-mesenchymal transition in salivary adenoid cystic carcinoma[J].Cell Prolif,2019,52(3):e12600.
- [4]Hong YM,Gan WG,Xu ZH.Significance of the expression of integrin β_1 , VEGF and MVD in hypopharyngeal squamous cell carcinoma[J].Genet Mol Res,2014,13(3):6455-6465.
- [5]Aggarwal S,Devaraja K,Sharma SC,et al.Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with oral squamous cell carcinoma and its clinical significance [J].Clin Chim Acta,2014(436):35-40.
- [6]Selemetjev S,Doric I,Paunovic I,et al.Coexpressed High Lev-

els of VEGF-C and Active MMP-9 Are Associated With Lymphatic Spreading and Local Invasiveness of Papillary Thyroid Carcinoma[J].Am J Clin Pathol,2016,146(5):594-602.

- [7]郭秉楠,燕亮,许铁.缺氧对骨髓源性抑制性细胞向肿瘤相关巨噬细胞分化的影响[J].江苏医药,2020,46(11):1094-1097,1101.
- [8]Pang L,Wang J,Fan Y,et al.Correlations of TNM staging and lymph node metastasis of gastric cancer with MRI features and VEGF expression[J].Cancer Biomark,2018,23(1):53-59.
- [9]Salajegheh A,Pakneshan S,Rahman A,et al.Co-regulatory potential of vascular endothelial growth factor-A and vascular endothelial growth factor-C in thyroid carcinoma [J].Hum Pathol,2013,44(10):2204-2212.
- [10]Fanelli M,Camperchioli A,Petrella L,et al.Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 2 (NCK2) pathways as factor promoting aggressiveness in ovarian cancer [J].Int J Biol Markers,2018,33(1):124-131.
- [11]Lettat M,Kliche S,Kabelitz D,et al.The adapter proteins ADAP and Nck cooperate in T cell adhesion [J].Mol Immunol,2014,60(1):72-79.
- [12]Alfaidi M,Bhattarai U,Orr AW.Nck1, But Not Nck2, Mediates Disturbed Flow-Induced p21-Activated Kinase Activation and Endothelial Permeability [J].J Am Heart Assoc,2020,9(11):e016099.
- [13]Morris DC,Popp JL,Tang LK,et al.Nck deficiency is associated with delayed breast carcinoma progression and reduced metastasis[J].Mol Biol Cell,2017,28(24):3500-3516.
- [14]Xia P,Huang M,Zhang Y,et al.NCK1 promotes the angiogenesis of cervical squamous carcinoma via Rac1/PAK1/MMP2 signal pathway[J].Gynecol Oncol,2019,152(2):387-395.
- [15]Mohassab AM,Hassan HA,Abdelhamid D,et al.STAT3 transcription factor as target for anti-cancer therapy [J].Pharmacol Rep,2020,72(5):1101-1124.
- [16]王亦如,杨梦莹,阳志军.基于生物信息学分析 STAT3、Grim19 在卵巢癌中的表达及临床意义[J].华中科技大学学报(医学版),2020,49(3):266-274.
- [17]伍婧,邓伟英,胡斌,等.STAT3 与 VEGF 蛋白在结肠癌中的表达及对血管生成的影响[J].中国临床研究,2017(2):208-210.
- [18]韩婧,康骅.甲状腺癌的发病现状及影响因素[J].实用预防医学,2018,25(7):894-897.
- [19]中华人民共和国国家卫生健康委员会.甲状腺癌诊疗规范(2018 年版)[J].中华普通外科学文献(电子版),2019,13(1):1-15.
- [20]Zhang F,Lu YX,Chen Q,et al.Identification of NCK1 as a novel downstream effector of STAT3 in colorectal cancer metastasis and angiogenesis[J].Cell Signal,2017(36):67-78.

收稿日期:2021-11-14;修回日期:2021-12-06

编辑/杜帆