



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.11.024  
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.11.024  
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(11):1618-1621.

· 简要论著 ·

# Smad4 蛋白在结节性甲状腺肿与甲状腺癌并存组织中的表达及其影响

刘楠楠<sup>1</sup>, 姜晶<sup>2</sup>, 张继红<sup>2</sup>, 王立英<sup>3</sup>, 李玉林<sup>4</sup>

(1. 北华大学基础医学院 病理教研室, 吉林 吉林 132013; 2. 北华大学附属医院 病理科, 吉林 吉林 132011; 3. 北华大学基础医学院 生理教研室, 吉林 吉林 132013; 4. 吉林大学基础医学院 病理生物学教育部重点实验室, 吉林 长春 130021)

## 摘要

**目的:** 研究结节性甲状腺肿与甲状腺癌并存病变组织中 Smad4 蛋白的表达及其影响。

**方法:** 采用免疫组化 SP 法对结节性甲状腺肿并存甲状腺癌组织 84 例、结节性甲状腺肿并存甲状腺瘤 50 例组织及相应的 40 例结节性甲状腺肿组织中的 Smad4 进行检测。

**结果:** Smad4 蛋白在甲状腺癌、甲状腺瘤、结节性甲状腺肿组织中的阳性表达率分别为 52.38%、74.00%、82.50%，甲状腺癌组织阳性表达率低于甲状腺瘤及结节性甲状腺肿者阳性表达率 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。Smad4 蛋白在乳头状癌、滤泡状癌、未分化癌的阳性表达率分别为 57.45%、58.33%、23.08%，未分化癌 Smad4 蛋白阳性表达率低于乳头状癌及滤泡状癌者表达率 ( $P < 0.05$ )。

**结论:** 检测 Smad4 蛋白表达对阐述结节性甲状腺肿与甲状腺癌并存病变的生物学行为及评估其预后具有重要意义。

## 关键词

甲状腺肿瘤; 甲状腺疾病; Smad4 蛋白

中图分类号: R653.2

结节性甲状腺肿属于临床常见病, 但其病因复杂, 多病并存, 互相影响, 关系密切。甲状腺肿瘤是颈部最常见肿瘤, 近年来甲状腺癌的发病率有所上升, 国内外研究中, 对于结节性甲状腺肿合并甲状腺癌的发生情况均有报道, 发生率为 3%~14%<sup>[1-3]</sup>, 合并甲状腺瘤的发生率高达 45%<sup>[4]</sup>。随着肿瘤分子生物学研究的进展, 对肿瘤分子水平的认识逐步深入, 细胞内信号转导已成为普遍关注的生物学问题。Smad4 是一种抑癌基因, 主要参与转化生长因子 (TGF- $\beta$ ) 超家族的细胞内信号转导, TGF- $\beta$  超家族能抑制上皮细胞的增殖, 具有潜在的肿瘤抑制功能<sup>[5]</sup>。但是, 目前对 Smad4 在结节性甲状腺肿与甲状腺癌并存组织中表达的

研究尚未见报道。本研究采用免疫组化 SP 法检测 Smad4 蛋白在结节性甲状腺肿与甲状腺癌并存组织中表达状况, 探讨在结节性甲状腺肿病理基础上发展为甲状腺癌的作用与可能的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

兔抗人 Smad4 单克隆抗体 (浓缩型, 工作液 1:100), 由英国 Abcam 公司提供; 链霉素抗生素蛋白-过氧化物酶免疫组化试剂盒 (SP) 及对二甲氨基偶氮苯 (DAB) 显色试剂盒, 由北京中杉金桥生物技术开发公司提供。

### 1.2 方法

免疫组化染色采用常规 SP 法, 按照试剂盒说明书步骤严格操作。一抗为兔抗人 Smad4 单克隆抗体, 二抗为生物素羊抗兔 IgG, DAB 显色, 苏木素复染, 脱水, 透明, 封片。阴性对照采用正常血清替代 I 抗进行同步染色, 以已知阳性 Smad4 反应

**基金项目:** 吉林市科技局计划基金资助项目 (201536069)。

**收稿日期:** 2015-08-12; **修订日期:** 2015-10-13。

**作者简介:** 刘楠楠, 北华大学基础医学院讲师, 主要从事甲状腺肿瘤方面的研究。

**通信作者:** 王立英, Email: ly741023@126.com

为阳性对照。

### 1.3 材料

选择北华大学附属医院病理科外科切除手术标本,病例资料完整,病理诊断明确,其中结节性甲状腺肿与甲状腺癌并存84例,男22例,女62例;年龄29~73岁,平均年龄(53±10.7)岁。按组织学分类,乳头状癌47例,滤泡状癌24例,未分化癌13例。结节性甲状腺肿与甲状腺瘤并存50例,男17例,女33例,年龄32~68岁,平均年龄(51±8.6)岁。并选择相应的40例结节性甲状腺肿组织进行对照研究。所有标本组织手术切除后立刻采用10%中性福尔马林液固定,石蜡包埋,连续切片,厚4 μm,HE染色,光镜观察,经专业人员阅片复诊,选择适当部位白片备行免疫组化染色。

### 1.4 组织病理学观察

复习选择所研究病例的临床及病理资料。病理诊断标准参照结节性甲状腺肿、甲状腺瘤的组织学诊断标准<sup>[6]</sup>。甲状腺癌参照2004年WHO内分泌器官肿瘤病理学分类(简称WHO分类)形态学标准<sup>[7]</sup>。

### 1.5 结果判定

Smad4蛋白以细胞质与(或)细胞核内沉积黄色或棕黄色颗粒为阳性细胞。每例病变随机观察5个视野(×400),每个视野观察200个细胞,根据阳性细胞所占百分比判断表达强度,取其平均值,无阳性细胞或阳性细胞数<10%为阴性(-),≥10%为阳性表达。阳性细胞数为10%~50%记为弱阳性(+);阳性细胞数为51%~75%记为中度阳性(++);阳性细胞数>75%为强阳性(+++)。

### 1.6 统计学处理

应用统计软件SPSS 17.0进行统计学分析,阳

性率之间的比较采用 $\chi^2$ 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 病理组织学特征

**2.1.1 结节性甲状腺肿** 由大、中、小三种滤泡组成。大滤泡,腔高度扩张,含大量胶质,上皮多呈矮立方或扁平状;中、小滤泡,腔内含少量胶质,滤泡甚小者不含胶质,上皮呈高立方或柱状;少数滤泡上皮呈乳头状增生。

**2.1.2 甲状腺瘤** 主要为滤泡性腺瘤,与正常滤泡大小近似,滤泡腔内含有胶质,上皮呈立方状;或多数由小滤泡组成,腔内多不含胶质;或瘤细胞呈梁索状、团片状排列,滤泡腔多不完整。

**2.1.3 甲状腺癌** (1)乳头状癌:滤泡由纤维血管及癌细胞组成,其乳头分支较多,癌细胞呈立方状或柱状,核呈毛玻璃状或透明状,可见核沟及核假包涵体;(2)滤泡状癌:由分化不同的滤泡组成,高分化型,滤泡较规则,上皮异形性较低,瘤细胞侵犯包膜及血管。低分化型,滤泡较少,形态不规则,瘤细胞呈实性团片状,异形性明显,核分裂象较多;未分化癌:由小圆形、小梭形细胞组成,呈弥漫性分布。

### 2.2 免疫组化染色结果

**2.2.1 Smad4蛋白在相关甲状腺组织中的表达定位** Smad4蛋白阳性颗粒呈黄色或棕黄色,在胞质与胞核着色,呈弥漫性或灶状,少数间质细胞亦可呈阳性表达。结节性甲状腺肿、甲状腺瘤及甲状腺癌均有Smad4蛋白阳性表达,但前两者良性病变组织Smad4蛋白阳性表达显著高于后者恶性病变组织(图1)。

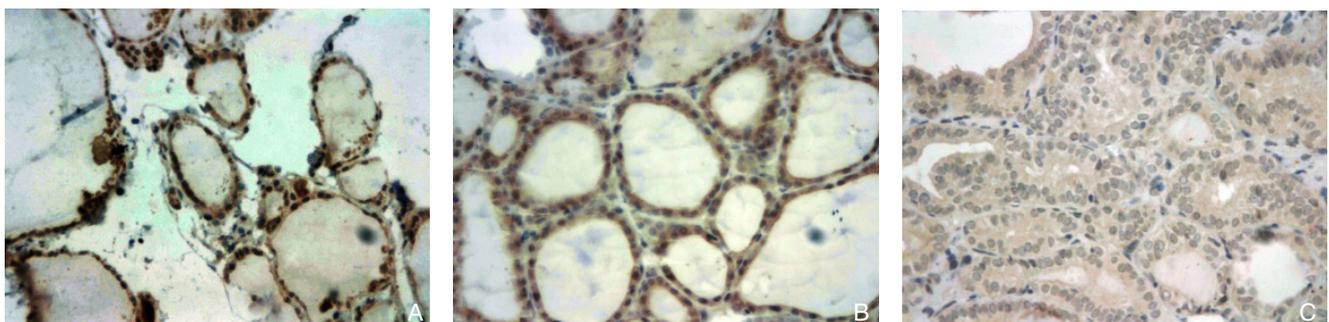


图1 Smad4蛋白在各组中的表达(SP法×400) A:结节性甲状腺肿;B:甲状腺腺瘤;C:甲状腺滤泡状癌

### 2.2.2 Smad4 蛋白阳性表达率在各组中的比较

Smad4 蛋白在结节性甲状腺肿、甲状腺瘤、甲状腺癌组织中的阳性表达率分别为 82.50%、74.00%、52.38%。Smad4 蛋白在甲状腺癌组织阳性表达率低于甲状腺瘤及结节性甲状腺肿者阳性表达率 ( $P < 0.05$  或  $0.01$ ) (表 1)。

表 1 Smad4 蛋白在结节性甲状腺肿、甲状腺瘤、甲状腺癌组织中的表达 [n (%)]

组别	n	阴性率	阳性率	$\chi^2$	P
结节性甲状腺肿	40	7 (17.50)	33 (82.50)	10.444	0.001 <sup>1)</sup>
甲状腺瘤	50	13 (26.00)	37 (74.00)	6.127	0.013 <sup>2)</sup>
甲状腺癌	84	40 (47.62)	44 (52.38)	—	—

注: 1) 与甲状腺瘤比较,  $P < 0.01$ ; 2) 甲状腺癌比较,  $P < 0.05$

2.2.3 Smad4 蛋白在甲状腺癌各类型中的表达差异 乳头状癌 47 例, 呈阳性表达 27 例, 其阳性表达率为 57.45%; 滤泡状癌 24 例, 呈阳性表达为 14 例, 其阳性表达率为 58.33%; 未分化癌 13 例, 呈阳性表达为 3 例, 其阳性表达率为 23.08%。未分化癌 Smad4 蛋白阳性表达率低于乳头状癌及滤泡状癌者表达率 ( $P < 0.05$ ) (表 2); 乳头状癌与滤泡状癌之间无统计学差异 ( $\chi^2 = 0.005$ ,  $P = 0.943$ )。

表 2 Smad4 蛋白在甲状腺癌各类型中的表达 [n (%)]

组别	n	阴性率	阳性率	$\chi^2$	P
乳头状癌	47	20 (42.55)	27 (57.45)	4.812	0.028
滤泡状癌	24	10 (41.67)	14 (58.33)	4.220	0.040
未分化癌	13	10 (76.92)	3 (23.08) <sup>1)</sup>	—	—

注: 1) 未分化癌与乳头状癌及滤泡状癌比较,  $P < 0.05$

## 3 讨论

### 3.1 结节性甲状腺肿与甲状腺癌

碘缺乏是结节性甲状腺肿的病因, 碘缺乏导致垂体产生 TSH 增加, 其长期刺激导致甲状腺滤泡上皮增生, 胶质贮积, 使甲状腺呈弥漫性肿大, 随着疾病的进展演变为结节性甲状腺肿<sup>[3,8]</sup>。而甲状腺组织部分滤泡上皮增生或乳头状增生、腺瘤样增生, 最终演变为滤泡状癌或乳头状癌<sup>[9]</sup>, 乳头状癌是最常见的甲状腺恶性肿瘤<sup>[10]</sup>。近年来, 结节性甲状腺肿与甲状腺癌并存的状况并非少见, 而对于甲状腺结节其发生恶变的诊断又比较困难<sup>[11]</sup>, 结节

性甲状腺肿是甲状腺癌的癌前病变<sup>[12]</sup>。表明结节性甲状腺肿与甲状腺癌有着密切的因果关系。因此, 对于探讨结节性甲状腺肿与甲状腺癌并存的病变组织中分子机制的研究至关重要。

### 3.2 Smad4 与肿瘤

Smad4 蛋白作为序列保守的 Smads 蛋白家族成员之一, 其重要的功能是参与 TGF- $\beta$  超家族细胞内信号转导。迄今为止, Smads 家族成员可分为 3 类<sup>[13]</sup>。而在 TGF- $\beta$  / Smads 信号通路中, Smad4 是将上游信号传入细胞核所必需的, 之后 Smads 复合物与一些辅助因子共同调控基因表达<sup>[14]</sup>, Smad4 在 TGF- $\beta$  信号传递过程中发挥重要作用<sup>[15-16]</sup>。研究证实, R-Smad 与 Smad4 的突变或失活可以导致 TGF- $\beta$  生长抑制作用消失<sup>[17-19]</sup>。已有研究<sup>[20-23]</sup>显示, 某些 Smad 基因失活, 异常表达, 以及由于泛素化等原因所致 Smad 蛋白的功能消失和许多人类肿瘤的发生发展有关。

### 3.3 Smad4 与甲状腺癌及分化

Smad4 表达缺失或突变使细胞逃避了 TGF- $\beta$  的抑制作用, 促进了癌前病变的发生及其向癌转化, 并影响癌细胞的生物学行为<sup>[24]</sup>。本免疫组化显示, Smad4 蛋白在结节性甲状腺肿、甲状腺瘤组织均有较强的阳性表达, 而在甲状腺癌组织阳性表达明显下降, 有些病例甚至无表达, 这提示 Smad4 蛋白表达减少或缺失可能在甲状腺癌的发生机制中具有一定作用, 而这可能是通过 TGF- $\beta$  / Smad 途径实现的。本研究显示, 未分化癌 Smad4 蛋白的阳性表达显著低于滤泡状癌及乳头状癌, 说明随着恶性程度的增高, Smad4 蛋白的阳性表达随之降低, 提示 Smad4 蛋白的异常表达可能参与甲状腺癌细胞的分化, 并与恶性程度有关, 这反映了 Smad4 蛋白在甲状腺癌细胞的分化机制中可能具有重要影响。结节性甲状腺肿与甲状腺癌并存是一个连续的病理过程, 其病程越长, 癌变的机会就可能越多。本研究结果提示, 在结节性甲状腺肿阶段就可能出现 TGF- $\beta$  / Smad4 通路中信号的转导受到一定影响, 最终导致滤泡上皮增生与分化异常。因此, 若能积极防治结节性甲状腺肿, 减少其发生, 可能降低甲状腺癌的发病机会。

综上所述, Smad4 在 TGF- $\beta$  超家族成员的信号转导中起重要的介导作用, TGF- $\beta$  信号转导通路异常, 可促进结节性甲状腺肿发展为甲状腺

癌。检测Smad4蛋白表达对阐述结节性甲状腺肿与甲状腺癌并存的生物学行为具有重要意义, 为临床评估其预后和防治提供新的途径。

#### 参考文献

- [1] Moon WJ, Jung SL, Lee JH, et al. Benign and malignant thyroid nodules: US differentiation--multicenter retrospective study[J]. *Radiology*, 2008, 247(3):762-770.
- [2] 黄鹏, 常实, 江小林, 等. CD147 检测对细针穿刺细胞学可疑恶性的甲状腺结节的诊断价值[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(5):591-595.
- [3] 杨炜, 姚丹. 结节性甲状腺肿与甲状腺癌并存的诊断与治疗[J]. *医学综述*, 2014, 20(7):1312-1314.
- [4] 牛伟新, 秦新裕, 戈少云. 结节性甲状腺肿伴发肿瘤的临床病理分析[J]. *中国临床医学*, 2000, 7(1):12-13.
- [5] Javelaud D, Alexaki VI, Mauviel A. Transforming growth factor-beta in cutaneous melanoma[J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2008, 21(2):123-132.
- [6] 武汉医学病理学研究会, 中山医科大学病理学教研室. *外科病理学*[M]. 武汉: 湖北人民出版社, 1983:1296-1298,1313-1315.
- [7] Delellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, et al. WHO classification of tumours. Pathology and genetics of tumors of the breast and female genetic organs[M]. Lyon:IARC Press, 2004:57-72.
- [8] 吴唯, 钱立元, 吴君辉, 等. 结节性甲状腺肿合并甲状腺癌的诊断和治疗[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(5):596-600.
- [9] 米泰宇, 刘开坤. 结节性甲状腺肿合并甲状腺癌的临床分析[J]. *中国普通外科杂志*, 2011, 20(9):979-983.
- [10] 吴雪, 赵永捷. 分化型甲状腺癌合并慢性甲状腺炎临床病理分析[J]. *中国普通外科杂志*, 2013, 22(11):1501-1503.
- [11] 卢丽萍, 何小乔, 邓英. 结节性甲状腺肿合并甲状腺癌的超声诊断及误诊分析[J]. *中国现代医生*, 2010, 48(20):74-75.
- [12] 张效志, 胡石甫, 黄涛. 结节性甲状腺肿合并甲状腺癌35例手术治疗体会[J]. *哈尔滨医药*, 2010, 30(5):1.
- [13] Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signaling[J]. *Nature*, 2003, 425(6958):577-584.
- [14] Kalo E, Buganim Y, Shapira KE, et al. Mutant p53 attenuates the SMAD-dependent transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) signaling pathway by repressing the expression of TGF-beta receptor type II[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(23):8228-8242.
- [15] Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors[J]. *Genes Dev*, 2005, 19(23):2783-2810.
- [16] Shen XC, Yang YP, Xiao TT, et al. Protective effect of oxymatrine on myocardial fibrosis induced by acute myocardial infarction in rats involved in TGF-β1-Smads signal pathway[J]. *J Asian Nat prod Res*, 2011, 13(3):215-224.
- [17] Han G, Wang XJ. Roles of TGFβ signaling Smads in squamous cell carcinoma[J]. *Cell Biosci*, 2011, 1:41. doi: 10.1186/2045-3701-1-41.
- [18] Qiu W, Schönleben F, Li X, et al. Disruption of transforming growth factor beta-Smad signaling pathway in head and neck squamous cell carcinoma as evidenced by mutations of SMAD2 and SMAD4[J]. *Cancer Lett*, 2007, 245(1/2):163-170.
- [19] Wang LH, Kim SH, Lee JH, et al. Inactivation of SMAD4 tumor suppressor gene during gastric carcinoma progression[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(1):102-110.
- [20] Kloth JN, Kenter GG, Spijker HS, et al. Expression of Smad2 and Smad4 in cervical cancer: absent nuclear Smad4 expression correlates with poor survival[J]. *Mod Pathol*, 2008, 21(7):866-875.
- [21] Ungefroren H, Groth S, Sebens S, et al. Differential roles of Smad2 and Smad3 in the regulation of TGF-β1-mediated growth inhibition and cell migration in pancreatic ductal adenocarcinoma cells: control by Rac1[J]. *Mol Cancer*, 2011, 10:67. doi: 10.1186/1476-4598-10-67.
- [22] Gao S, Alarcón C, Sapkota G, et al. Ubiquitin ligase Nedd4L targets activated Smad2/3 to limit TGF-beta signaling[J]. *Mol Cell*, 2009, 36(3):457-468.
- [23] Maliekal TT, Antony ML, Nair A, et al. Loss of expression, and mutations of Smad 2 and Smad 4 in human cervical cancer[J]. *Oncogene*, 2003, 22(31):4889-4897.
- [24] 韩慧珍, 郭宝良, 邹庞, 等. Smad4 siRNA对乳腺癌细胞侵袭力和 MMP-9表达的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2012, 21(5):544-548.

( 本文编辑 宋涛 )

本文引用格式: 刘楠楠, 姜晶, 张继红, 等. Smad4蛋白在结节性甲状腺肿与甲状腺癌并存组织中的表达及其影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(11):1618-1621. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.11.024  
 Cite this article as: LIU NN, JIANG J, ZHANG JH, et al. Expression and influence of Smad4 protein in tissues of nodular goiter with concomitant thyroid carcinoma[J]. *Chin J Gen Surg*, 2015, 24(11):1618-1621. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.11.024