



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.11.014
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.11.014
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(11):1571-1576.

· 基础研究 ·

活化细胞黏附分子在甲状腺癌中的表达及其临床意义

黄荣金¹, 林炳煌¹, 王进胜¹, 何清安¹, 杨艺宏²

(泉州医学高等专科学校附属人民医院 1. 普通外科 2. 病理科, 福建泉州 362000)

摘要

目的: 研究活化细胞黏附分子 (ALCAM) 在甲状腺癌组织中表达及其临床意义。

方法: 免疫组织化学法检测 52 例甲状腺癌组织及对应癌旁正常甲状腺组织中 ALCAM 的表达, 比较 ALCAM 在两种组织中表达的差异, 并分析其表达与甲状腺癌患者临床病理因素及预后的关系。

结果: ALCAM 在甲状腺癌组织中的阳性表达率明显高于癌旁正常甲状腺组织 (71.2% vs. 34.6%, $P < 0.05$), 但在 ALCAM 在甲状腺癌组织中表达越低, 甲状腺癌组织病理分化程度越低, 患者 5 年总生存率越低 (均 $P < 0.01$)。

结论: ALCAM 表达增高可能参与甲状腺癌发生发展进程, 然而, 在恶性度高、预后差的甲状腺癌的肿瘤组织中 ALCAM 表达反而降低的原因推测可能与其脱落释放入血有关。

关键词

甲状腺肿瘤; 活化白细胞黏附分子; 预后

中图分类号: R736.1

Expression and clinical significance of activated-leukocyte adhesion molecule in thyroid carcinoma

HUANG Rongjin¹, LIN Binghuang¹, WANG Jinsheng¹, HE Qing'an¹, YANG Yihong²

(1. Department of General Surgery 2. Department of Pathology, Affiliated People's Hospital, Quanzhou Medical College, Quanzhou, Fujian 362000, China)

Abstract

Objective: To investigate the expression of activated-leukocyte adhesion molecule (ALCAM) in thyroid cancer tissue and the clinical significance.

Methods: ALCAM expressions in 52 samples of paired thyroid cancer and adjacent normal thyroid tissues were detected by immunohistochemical staining. The ALCAM expression difference between the two types of tissues was compared, and relations of ALCAM expression with clinicopathologic features and prognosis of the thyroid cancer patients were analyzed.

Results: The positive ALCAM expression rate in thyroid cancer tissue was significantly higher than that in adjacent normal thyroid tissue (71.2% vs. 34.6%, $P < 0.05$), but in thyroid cancer tissue, the lower ALCAM expression was associated with poorer histopathological differentiation of the thyroid cancer, and shorter 5-year overall survival of the patients (both $P < 0.01$).

Conclusion: Increased ALCAM expression may be involved with the occurrence and development of

基金项目: 福建省卫生厅青年科研课题基金资助项目 (2013-2-130)。

收稿日期: 2015-08-18; 修订日期: 2015-10-13。

作者简介: 黄荣金, 泉州医学高等专科学校附属人民医院主治医师, 主要从事甲状腺、乳腺肿瘤基础与临床方面的研究。

通信作者: 黄荣金, Email: hrongjin2008@126.com

thyroid cancer. However, the phenomenon of ALCAM expression contrarily reduced in tumor tissues from highly malignant and poor prognostic thyroid cancer is speculated to be related to its detachment and release into the circulation.

Key words Thyroid Neoplasms; Activated-Leukocyte Cell Adhesion Molecule; Prognosis
CLC number: R736.1

甲状腺癌是近年来发病率上升最快的恶性肿瘤之一，其绝大部分为分化型乳头状癌和滤泡状癌，生存率高、预后良好。但仍有部分分化差甲状腺癌或未分化甲状腺癌具有侵袭转移性构成此类肿瘤患者最主要死亡原因。因而区分预后差的侵袭性甲状腺癌尤其关键，可以指导患者积极外科手术后的进一步干预包括确定是否需要¹³¹I核素治疗或外放疗等。近年来寻找蛋白标志物提供早期诊断及判断不良预后有助于甲状腺恶性肿瘤全面有效的治疗方案^[1]。

活化白细胞黏附分子（ALCAM）是目前研究的热点，其具有不同的生理功能，深入研究表明ALCAM在多种恶性肿瘤异常表达，其不同表达水平预示不良预后^[2]。然而，研究甲状腺癌组织中ALCAM的表达及其临床意义却有限。本研究利用免疫组织化学方法检测ALCAM在甲状腺癌和癌旁正常甲状腺组织中的表达情况，并分析其与临床病理相关参数和患者生存率等的关系，评估其作为蛋白标志物用于侵袭性甲状腺癌区分和预后判断。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选自泉州医学高等专科学校附属人民医院2006年2月—2008年10月间行手术治疗且术后病理组织学确诊为甲状腺癌的52例患者。术后随访来自患者临床随访记录及电话随访，资料完整。生存期从手术之日起开始计算，终止日期为死亡期，随访期间死于其他原因、失访或研究截止仍存活者均计为删失数据，截止日期为2013年3月30日，随访时间为7~85个月，中位随访时间为62个月。同时收集相应患者的正常甲状腺组织作对照。本研究获泉州医学高等专科学校附属人民医院伦理委员会批准，所有患者均签署知情同意书。

本组患者年龄最大74岁，最小18岁，中位

年龄48岁。病例分组其中<45岁22例，≥45岁30例；女36例，男16例；按肿瘤大小，<4 cm者35例，≥4 cm者17例；组织病理学为分化型乳头状癌及分化型滤泡状癌41例，低分化滤泡状癌或髓样癌及未分化癌11例；颈部淋巴结转移者21例，无颈部淋巴结转移31例；甲状腺癌临床分期采用2002年国际抗癌联盟（UICC）提出的TNM分期法，分为TNM I~II期38例与TNM III~IV期14例两组。

1.2 主要试剂

采用免疫组化Elivision™Plus法检测甲状腺癌标本ALCAM蛋白的表达。鼠抗人ALCAM/CD166（克隆号：MOG/07），购自美国Abcam公司；DAB酶底物显色剂及Elivision Plus检测试剂盒为福州迈新公司产品。

1.3 试验方法

所有患者的手术标本经10%福尔马林固定，石蜡包埋，4 μm连续切片，分别做常规HE染色及免疫组化染色（Elivision™Plus法）。免疫组化染色严格按试剂盒说明方法操作。石蜡切片脱蜡水化，采用高压锅法抗原修复，3% H₂O₂孵育，生物素阻断剂阻断。加入一抗ALCAM单克隆抗体，工作浓度为1:200，二抗孵育，DBA显色、脱水、透明、封片。用已知的阳性切片作阳性对照，用PBS代替一抗作为阴性对照。

1.4 结果判断

由2名高年资病理医师独立观察。随机采集10个代表性的视野计数，取平均数值。阳性细胞具备：细胞结构清晰，阳性染色定位准确，着色明显高于背景。采用半定量方法计算免疫组织化学积分及细胞阳性染色强度，评分标准：ALCAM免疫组化染色以细胞膜或细胞质中出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性显色^[3]。依着色深浅分为：0分（无色）、1分（淡黄色）、2分（棕黄色）、3分（棕褐色）；再按阳性细胞所占百

分比分为:0分(阴性)、1分(1%~20%)、2分(21%~50%)、3分(51%~80%)、4分(>80%);据两者乘积得分(immunoreactive score, IRS)划分等级分为低表达组(0~6分)和高表达组(7~12分)。

1.5 统计学处理

应用IBM SPSS Statistics 20软件包统计学分析。ALCAM蛋白在甲状腺癌及相对应癌旁正常甲状腺组织表达差异的比较采用 χ^2 检验;组间ALCAM蛋白表达与甲状腺癌临床病理参数特征采用McNemar检验;Kaplan-Meier法构建生存曲线,不同生存曲线的差异性检验采用Log-rank对数秩检验。检验水准均为 $\alpha=0.05$,双向 P 值, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学染色结果

ALCAM免疫组织化学染色阳性定位于细胞膜或细胞浆上,呈棕黄色颗粒状染色,本实验未区分ALCAM细胞膜和细胞浆染色。在癌旁正常甲状腺上皮组织,ALCAM呈阴性或弱阳性表达(IRS中位数=3),主要为细胞膜表达(图1A);而甲状腺癌组织可见胞膜或胞浆阳性染色,细胞间质未见阳性结果(IRS中位数=6)(图1B-D)。ALCAM在甲状腺癌上皮组织中的胞膜胞浆表达阳性率为71.2%(37/52),对照组中阳性率为34.6%(18/52),甲状腺癌上皮组织ALCAM表达阳性率高于对照组,差异有统计学意义($\chi^2=13.931$, $P<0.01$)。

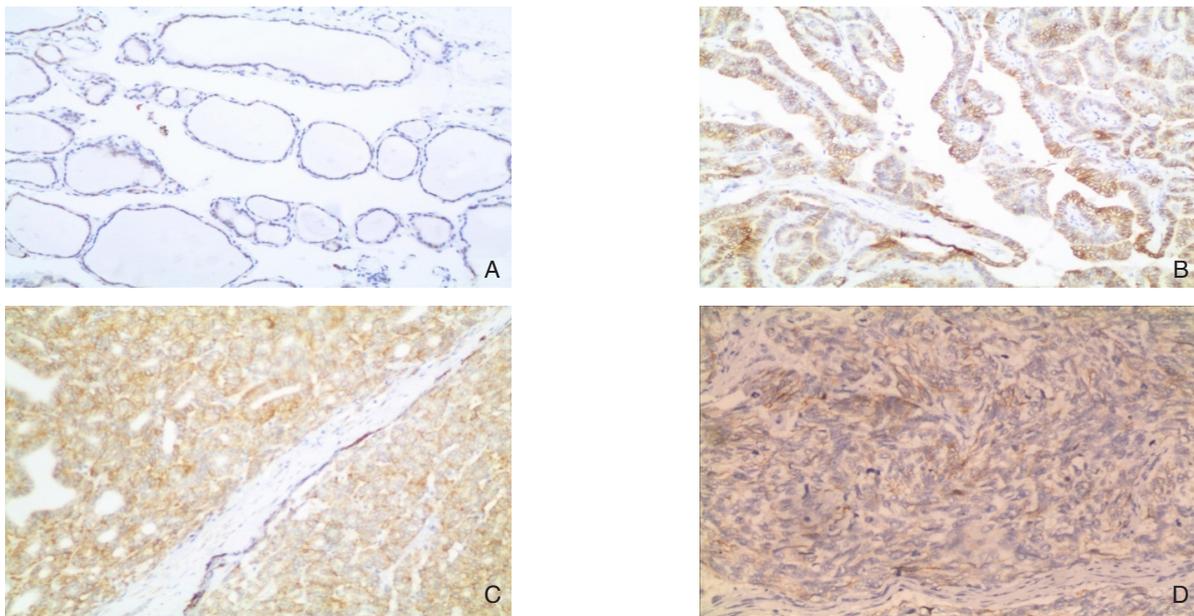


图1 免疫组化检测 ALCAM 蛋白表达($\times 100$) A: 癌旁甲状腺上皮组织; B: 分化型甲状腺乳头状癌组织; C: 分化型甲状腺滤泡状癌组织; D: 未分化甲状腺癌组织

Figure 1 Immunohistochemical staining for ALCAM protein expression ($\times 100$) A: Adjacent normal thyroid cancer tissues; B: Differentiated thyroid papillary carcinoma; C: Differentiated thyroid follicular carcinoma; D: Undifferentiated thyroid carcinoma

2.2 甲状腺癌组织中 ALCAM 表达与临床病理特征的关系

甲状腺癌上皮组织ALCAM的表达水平在患者年龄、性别、肿瘤大小、有无淋巴结转移及不同临床分期组之间差异均无统计学意义(均 $P>0.05$);组织病理为分化型乳头状癌及分化型滤

泡状癌组织中ALCAM的高表达率明显高于低分化滤泡状癌或髓样癌及未分化癌组患者(56.1% vs. 18.2%),差异有统计学意义($P<0.05$)(表1)。

2.3 甲状腺癌 ALCAM 表达与患者生存时间的关系

甲状腺癌患者不同ALCAM表达组之间的5年总生存率差异有统计学意义($\chi^2=18.995$,

$P=0.000$) (表2) (图2); ALCAM低表达组甲状腺癌患者的生存率明显低于ALCAM高表达组 (51.04% vs. 79.69%, $P<0.01$)。

表1 ALCAM表达与甲状腺癌临床病理参数的关系 [n(%)]
Table 1 Relations of ALCAM expression with clinicopathologic factors of thyroid cancer [n(%)]

临床因素	n	ALCAM 蛋白表达		χ^2	P
		高表达	低表达		
年龄 (岁)					
< 45	22	10 (45.5)	12 (54.5)	0.148	0.700
≥ 45	30	15 (50.0)	15 (50.0)		
性别					
男	16	6 (37.5)	10 (62.5)	2.207	0.137
女	36	19 (52.8)	17 (47.2)		
大小 (cm)					
< 4	35	20 (57.1)	15 (42.9)	3.525	0.060
≥ 4	17	5 (29.4)	12 (70.6)		
分化程度					
高分化组	41	23 (56.1)	18 (43.9)	4.995	0.025
低分化或未分化组	11	2 (18.2)	9 (81.8)		
淋巴结转移					
无	31	14 (45.2)	17 (54.8)	0.893	0.345
有	21	11 (52.4)	10 (47.6)		
临床分期 (UICC)					
I~II 期	38	16 (42.1)	22 (57.9)	2.016	0.156
III~IV 期	14	9 (64.3)	5 (35.7)		

表2 ALCAM表达与甲状腺癌患者总生存率的关系

Table 2 Relationship between ALCAM expression and overall survival of thyroid cancer patients

ALCAM 蛋白	中位数			
	估计	SE	95% CI 下限	95% CI 上限
高表达	79.698	2.773	74.263	85.134
低表达	51.043	3.479	44.225	57.861
整体	67.064	3.432	60.338	73.790

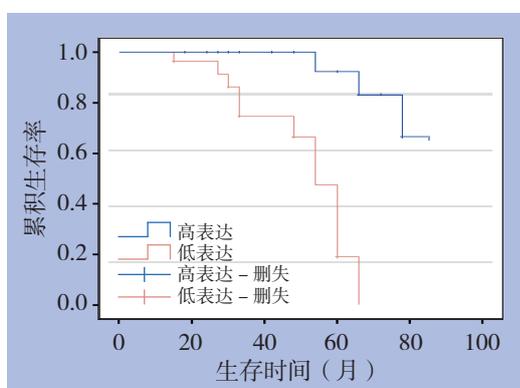


图2 不同 ALCAM 表达水平的甲状腺癌患者术后生存曲线
Figure 2 Postoperative survival curves of thyroid cancer patients with different ALCAM expression levels

3 讨论

人类ALCAM属于免疫球蛋白基因超家族的成员,是染色体3q13.1q13.2基因编码的I型跨膜糖蛋白,其DNA基因长度大于200 kb,含16个外显子,驱动子含有NF- κ B和AP-1结合序列,其中NF- κ B为对ALCAM表达起正调控作用,AP-1家族特别是Fra-2对ALCAM表达起负调控作用。ALCAM结构包括500个氨基酸组成的细胞外功能区、22个氨基酸组成的跨膜功能区和34个氨基酸短肽组成的细胞浆功能区。ALCAM胞外功能区含2个可变型(V)和3个恒定型(C)的免疫球蛋白样区域(VVC2C2C2),介导ALCAM-ALCAM同嗜及ALCAM-CD6异嗜相互作用。既往研究^[4]证实ALCAM的结构特点在人类组织中发挥多种重要的生理功能,而异常表达的ALCAM亦在多种恶性肿瘤的发生发展中起关键作用。

本研究结果显示,ALCAM在甲状腺癌组织表达阳性率明显高于对应的癌旁正常甲状腺组织,这与Miccichè等^[5]研究结果一致,并且他们报道了癌旁正常甲状腺组织与不同甲状腺癌类型的不同表达模式差异。这些提示ALCAM在甲状腺癌组织的异常表达可能参与肿瘤发生发展进程。但是本研究未发现ALCAM表达与肿瘤T分期和(或)肿瘤直径大小的相关性。ALCAM是否参与甲状腺癌细胞的增殖尚需进一步研究。Jeziarska等^[6]在乳腺癌细胞株中下调ALCAM基因表达,结果抗凋亡因子BCL-2水平下降,而凋亡因子PARP羧基端的催化结构域(89 kD)、活化caspase-7和自噬相关基因Beclin1、MAP1LC3均有上升;这提示ALCAM高表达可起到抑制细胞凋亡和自我吞噬,从而参与肿瘤细胞增殖;近期Rauch等^[7]在血液单核细胞的体外试验证实这观点。而最新的研究^[8-10]表明多种肿瘤干细胞高表达ALCAM,他们的体外细胞成瘤试验和体内诱导肿瘤生成试验进一步印证了异常高表达ALCAM是恶性肿瘤发生的一个重要因素。

同时本研究表明,组织病理为分化型乳头状癌及分化型滤泡状癌组织中ALCAM的高表达率明显高于低分化滤泡状癌或髓样癌及未分化癌组患者,进一步的生存分析显示ALCAM低表达与甲状腺癌患者的总生存时间密切相关。实验结果提示ALCAM低表达预示肿瘤分化差和不良预后。

Chaker等^[11]研究了甲状腺良性肿瘤与恶性肿瘤组织中ALCAM表达差异, 胞膜胞浆不同表达模式及生存分析得出结果与本研究的没有根本性差别。但是本研究的结果未显示ALCAM与甲状腺癌颈部淋巴结转移存在相关性, 本研究样本量没有足够大可能是一个原因, 而既往研究对于ALCAM在肿瘤侵袭转移中的作用仍有争议。

关于高表达ALCAM肿瘤细胞更容易发生侵袭转移机制主要可能通过浓度依赖调控MT1-MMP/MMP14的表达影响pro-MMP-2向MMP-2的转变, 而肿瘤的侵袭转移往往伴随着MMP的激活和蛋白水解^[12]; 也有学者^[13-14]提出了与血管形成及 α -连环蛋白丧失导致ALCAM/CD166胞浆定位而使肿瘤更具侵袭性。但是目前更多机制研究支持本研究结果, ALCAM在肿瘤中表达降低更易发生侵袭转移, 与预后差、化疗抵抗及复发和死亡等相关。在乳腺癌中, Milde-Langosch等^[15]研究提示ALCAM表达下调与Fra-2上调相关, 而Fra-2高表达可促进乳腺癌的侵袭转移; King等^[16]报道了由于驱动子多个片段DNA甲基化导致ALCAM基因表达的缺失, 从而削弱循环肿瘤细胞间的黏附性, 可能因此促进乳腺癌发生转移。在卵巢癌和甲状腺癌中, 体外细胞株试验发现ALCAM经过调控ADAM17/TACE介导蛋白水解产生ALCAM脱落片段引起肿瘤组织中ALCAM膜表达下降或缺失, 该脱落片段含有大部分ALCAM胞外结构域包括配体结合区域和寡糖链结合区域而在肿瘤侵袭转移中发挥作用, 同时通过RNAi沉默ADAM17/TACE表达可上调ALCAM表达导致肿瘤细胞能动性下降, 因此肿瘤细胞株低表达ALCAM而ADAM17/TACE介导蛋白水解产生ALCAM脱落片段增加预示更容易侵袭转移及预后差^[5,17-18]; 本研究结果亦提示低表达ALCAM预后差, 且是低分化或未分化甲状腺癌相关指标; 最近在多种不同恶性肿瘤患者的血清中发现了可溶性ALCAM (sALCAM) 显著高于正常对照组, 进一步研究发现血清sALCAM水平升高肿瘤更具侵袭转移性, 其分化程度更差^[19-21]; 据此笔者认为甲状腺组织低表达ALCAM及血清sALCAM升高与侵袭转移性更强、分化程度更差的甲状腺肿瘤相关。

综上, 本研究初步证实ALCAM低表达是甲状腺癌未分化或低分化密切相关, 并且低表达是甲

状腺癌患者总生存时间的不良预后因素, 亦可作为潜在的临床有用的诊断和预后生物标志物, 比如术前针吸活检可以进行评估, 以确定它是否提高这种方法的诊断准确率。今后进一步的研究重点包括ALCAM在甲状腺肿瘤干细胞中作用、可能用于治疗ALCAM抗体及ALCAM在肿瘤侵袭转移中与其他黏附分子的相互调控。

参考文献

- [1] 裴波, 尚艺泰, 寸英丽. 甲状腺癌肿瘤干细胞的研究进展[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(5):723-727.
- [2] Weidle UH, Eggle D, Klostermann S, et al. ALCAM/CD166: cancer-related issues[J]. Cancer Genomics Proteomics, 2010, 7(5):231-243.
- [3] Hein S, Müller V, Köhler N, et al. Biologic role of activated leukocyte cell adhesion molecule overexpression in breast cancer cell lines and clinical tumor tissue[J]. Breast Cancer Res Treat, 2011, 129(2):347-360.
- [4] Chitteti BR, Bethel M, Kacena MA, et al. CD166 and regulation of hematopoiesis[J]. Curr Opin Hematol, 2013, 20(4):273-280.
- [5] Micciché F, Da Riva L, Fabbi M, et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule expression and shedding in thyroid tumors[J]. PLoS One, 2011, 6(2):e17141. doi: 10.1371/journal.pone.0017141.
- [6] Jezierska A, Matysiak W, Motyl T. ALCAM/CD166 protects breast cancer cells against apoptosis and autophagy[J]. Med Sci Monit, 2006, 12(8):BR263-273.
- [7] Rauch SJ, Rosenkranz AC, Böhm A, et al. Cholesterol induces apoptosis-associated loss of the activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) in human monocytes[J]. Vascul Pharmacol, 2011, 54(3/6):93-99.
- [8] Rajasekhar VK, Studer L, Gerald W, et al. Tumour-initiating stem-like cells in human prostate cancer exhibit increased NF-kappaB signalling[J]. Nat Commun, 2011, 2:162.
- [9] Jiao J, Hindoyan A, Wang S, et al. Identification of CD166 as a surface marker for enriching prostate stem/progenitor and cancer initiating cells[J]. PLoS One, 2012, 7(8):e42564. doi: 10.1371/journal.pone.0042564.
- [10] Zhang WC, Shyh-Chang N, Yang H, et al. Glycine decarboxylase activity drives non-small cell lung cancer tumor-initiating cells and tumorigenesis[J]. Cell, 2012, 148(1/2):259-272.
- [11] Chaker S, Kak I, MacMillan C, et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule is a marker for thyroid carcinoma aggressiveness and disease-free survival[J]. Thyroid, 2013, 23(2):201-208.
- [12] Lunter PC, van Kilsdonk JW, van Beek H, et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166/MEMD), a novel actor

- in invasive growth, controls matrix metalloproteinase activity[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(19):8801-8808.
- [13] King J, Ofori-Acquah S, Stevens T, et al. Potential role for activated leukocyte cell adhesion molecule and neural cadherin in metastasis to the lung microcirculation[J]. *Chest*, 2004, 125(5 Suppl):150S-151S.
- [14] Burkhardt M, Mayordomo E, Winzer KJ, et al. Cytoplasmic overexpression of ALCAM is prognostic of disease progression in breast cancer[J]. *J Clin Pathol*, 2006, 59(4):403-409.
- [15] Milde-Langosch K, Janke S, Wagner I, et al. Role of Fra-2 in breast cancer: influence on tumor cell invasion and motility[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2008, 107(3):337-347.
- [16] King JA, Tan F, Mbeunkui F, Chambers Z, et al. Mechanisms of transcriptional regulation and prognostic significance of activated leukocyte cell adhesion molecule in cancer[J]. *Mol Cancer*, 2010, 9:266. doi: 10.1186/1476-4598-9-266.
- [17] Rosso O, Piazza T, Bongarzone I, et al. The ALCAM shedding by the metalloprotease ADAM17/TACE is involved in motility of ovarian carcinoma cells[J]. *Mol Cancer Res*, 2007, 5(12):1246-1253.
- [18] Gilsanz A, Sánchez-Martín L, Gutiérrez-López MD, et al. ALCAM/CD166 adhesive function is regulated by the tetraspanin CD9[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(3):475-493.
- [19] Witzel I, Schröder C, Müller V, et al. Detection of activated leukocyte cell adhesion molecule in the serum of breast cancer patients and implications for prognosis[J]. *Oncology*, 2012, 82(6):305-312.
- [20] Chaker S, Kashat L, Voisin S, et al. Secretome proteins as candidate biomarkers for aggressive thyroid carcinomas[J]. *Proteomics*, 2013, 13(5):771-787.
- [21] Carbotti G, Orengo AM, Mezzananza D, et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule soluble form: a potential biomarker of epithelial ovarian cancer is increased in type II tumors[J]. *Int J Cancer*, 2013, 132(11):2597-2605.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 黄荣金, 林炳煌, 王进胜, 等. 活化细胞黏附分子在甲状腺癌中的表达及其临床意义[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(11):1571-1576. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.11.014

Cite this article as: HUANG RJ, LIN BH, WANG JS, et al. Expression and clinical significance of activated-leukocyte adhesion molecule in thyroid carcinoma[J]. *Chin J Gen Surg*, 2015, 24(11):1571-1576. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.11.014

本刊 2016 年各期重点内容安排

本刊 2016 年各期重点内容安排如下, 欢迎赐稿。

第 1 期 肝脏移植及肝脏外科消融、微创手术

第 2 期 胆管细胞癌基础与临床

第 3 期 胰腺手术的规范化与个体化方案

第 4 期 胃肠道微创手术及新技术

第 5 期 乳腺、甲状腺肿瘤基础与临床研究

第 6 期 主动脉瘤与主动脉夹层的外科处理

第 7 期 肝细胞癌基础与临床研究

第 8 期 胆道外科疾病的微创治疗

第 9 期 胰腺肿瘤的基础与临床研究

第 10 期 消化道肿瘤及胃肠外科疾病

第 11 期 乳腺、甲状腺及内分泌外科

第 12 期 血管外科疾病及其他

中国普通外科杂志编辑部