

TRAP1 蛋白在甲状腺乳头状癌中的表达及意义^{*}

梁慧玲^{1**}, 贺晓燕^{2***}, 杨文秀³, 王 龙², 杨 勇²

(1. 贵州医科大学, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学附属肿瘤医院 病理科, 贵州 贵阳 550003; 3. 贵州医科大学附院 病理科, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 探讨肿瘤坏死因子受体相关蛋白1 (TRAP1) 在甲状腺乳头状癌 (PTC) 组织中的表达及其与临床病理特征的关系。方法: 采用免疫组织化学法测定 PTC 组织 ($n=76$)、甲状腺腺瘤组织 ($n=40$) 及结节性甲状腺肿组织 ($n=40$) 中 TRAP1 蛋白表达, 同时比较 TRAP1 蛋白在 3 种甲状腺组织中阳性表达率和相对表达量; 分析 TRAP1 蛋白表达与 PTC 临床病理特征 (性别、年龄、淋巴结转移、累及甲状腺被膜、累及腺叶数及肿瘤直径) 的关系。结果: TRAP1 蛋白在 3 种甲状腺组织中的阳性表达率为 PTC > 甲状腺腺瘤 > 结节性甲状腺肿, 但仅 PTC 与甲状腺腺瘤或结节性甲状腺肿比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); TRAP1 蛋白在 PTC、甲状腺腺瘤及结节性甲状腺肿组织中的相对表达量中位数和四分位数间距 (IQR) 分别为 4 (2.25 ~ 5.00) 分、0.00 (0.00 ~ 3.00) 分、0.00 (0.00 ~ 2.00) 分, TRAP1 蛋白表达与 PTC 患者性别、年龄、是否淋巴结转移、累及甲状腺腺叶数、甲状腺被膜侵犯、肿瘤直径无明显关系 ($P > 0.05$)。结论: TRAP1 蛋白在 PTC 中高表达, 但其表达水平与临床病理无关。

[关键词] 甲状腺乳头状癌; 肿瘤坏死因子相关受体蛋白1; 免疫组织化学; 病理学; 基因表达

[中图分类号] R736.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2017)12-1407-05

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.12.010

The Expression and Significances of TRAP1 Protein in Papillary Thyroid Cancer

LIANG Huiling¹, HE Xiaoyan², YANG Wenxiu³, WANG Long², YANG Yong²

(1. Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Pathology, the Affiliated Tumor Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550003, Guizhou, China;

3. Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the expression of tumor necrosis factor receptor associated protein 1 (TRAP1) in papillary thyroid cancer (PTC) and the correlation between TRAP1 expression and clinical and pathological feature of PTC. **Methods:** Immunohisto-chemistry method was used to observe protein expression of TRAP1 in 76 cases of PTC, 40 cases of thyroid adenoma and 40 cases of nodular goiter tissues. **Results:** The positive rate of TRAP1 from high to low was PTC, thyroid adenoma and nodular goiter tissues, but only the differences between PTC and the other two tissues were significant ($P < 0.01$). the expression of TRAP1 relative quantity was 4 (IQR: 2.25 ~ 5.00), 0 (IQR: 0 ~ 3.00) and 0 (IQR: 0 ~ 2.00) respectively. In addition, there was no correlation between TRAP1 expression level and gender, age, lymph node metastasis, involvement of the thyroid gland leaf number, invasion of thyroid capsule and the tumor size ($P > 0.05$). **Conclusion:** There is a significantly high expression of TRAP1 in the PTC, but its expression level is not related to clinical and pathological feature of PTC.

^{*} [基金项目] 贵州省科学技术基金 [黔科合 J 字 (2012) 2036 号]

^{**} 贵州医科大学 2015 级硕士研究生

^{***} 通信作者 E-mail: hexiaoyan25@sina.com

网络出版时间: 2017-12-18 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20171218.2311.015.html>

[Key words] papillary thyroid cancer; tumor necrosis factor receptor associated protein 1; immunohistochemistry; pathology; gene expression

甲状腺癌是内分泌系统最常见的恶性肿瘤之一, 80% ~ 90% 的甲状腺癌为甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)。近 30 年来, 全球甲状腺癌的发病呈逐年上升趋势。虽然大部分 PTC 主要表现为惰性生长, 且经手术治疗后的 5 年生存率高达 95% 或以上^[1], 但是, 仍有小部分 PTC 表现为侵袭性的生物学行为及临床特点, 对放射性碘治疗及化学疗法不敏感, 且容易发生远处转移及扩散。因此, 深入了解 PTC 的发生、发展及其影响因素, 对寻找 PTC 的防治新靶点具有重要意义。肿瘤坏死因子受体相关蛋白 1(tumor necrosis factor receptor-associated protein 1, TRAP1) 也称热休克蛋白 75(HSP75), 是线粒体热休克蛋白 90(HSP90) 家族的重要成员, 研究证明, TRAP1 的异常表达与结肠癌、肾癌、食管癌、卵巢癌等多种肿瘤的发生、发展密切相关, 且干预 TRAP1 的表达可以使肿瘤细胞发生特异性死亡, 而对肿瘤周围正常组织没有影响^[2]; 因此, 靶向抑制 TRAP1 的表达有望成为治疗或干预肿瘤生长的重要靶点, 但国内外关于 TRAP1 与 PTC 关系的研究未见报道, 本研究观察了 TRAP1 蛋白在 PTC、甲状腺腺瘤、结节性甲状腺肿组织中的阳性表达率和相对表达水平的同时, 探讨 TRAP1 蛋白表达与 PTC 临床病理特征(性别、年龄、淋巴结转移、是否累及甲状腺被膜、累及腺叶数及肿瘤直径)的关系, 为临床靶向治疗 PTC 提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

收集 2013 年 1 月 ~ 2014 年 7 月的 PTC 病理切片 76 例、甲状腺腺瘤病理切片 40 例、结节性甲状腺肿病理切片 40 例, 所有病理切片均参照 WHO 关于甲状腺肿瘤的分类及诊断标准。76 例 PTC 患者, 男 17 例, 女 59 例; 14 ~ 70 岁, 中位年龄 39 岁; 侵及甲状腺被膜 26 例, 未侵及甲状腺被膜者 50 例; 淋巴结转移者 28 例, 无淋巴结转移者 48 例。

40 例甲状腺腺瘤患者, 男 6 例, 女 34 例, 18 ~ 49 岁, 中位年龄 32 岁。40 例结节性甲状腺肿患者, 男 8 例, 女 32 例, 22 ~ 55 岁, 中位年龄 36 岁。所有患者术前均无化疗、放疗及其他肿瘤治疗。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色 用 10% 中性福尔马林固定, 石蜡包埋, 3 μm 厚连续切片、脱蜡。免疫组织化学染色采用第二代聚合酶两步法(PV), TRAP1 抗体效价为 1:150, 以乳腺癌作为阳性对照, 以 PBS 代替一抗作为阴性对照, 具体操作按试剂盒说明书进行, 所有抗体均购自美国 ORIGENE 公司。

1.2.2 结果判读 切片的观察均由两名病理科副主任及以上医师独立完成。TRAP1 以细胞胞质出现棕黄色颗粒为阳性染色, 判定标准根据阳性细胞的染色强度和范围综合评分参考文献[3]: (1) 按染色强度分为未着色为 0 分、淡黄色为 1 分、棕黄色为 2 分、棕褐色为 3 分; (2) 按阳性细胞所占比例分为无阳性细胞为 0 分、阳性细胞数 1% ~ 25% 为 1 分、26% ~ 50% 为 2 分、51% ~ 75% 为 3 分、76% ~ 100% 为 4 分; 将两项评分结果相加后, 认定 0 ~ 3 分为(-), 4 ~ 7 分为(+).

1.3 观察指标

比较 TRAP1 蛋白在 PTC、甲状腺腺瘤、结节性甲状腺肿 3 类组织中的阳性表达率和相对表达量, 分析 TRAP1 蛋白表达与 PTC 临床病理特征(性别、年龄、淋巴结转移、累及甲状腺被膜、累及腺叶数及肿瘤直径)的关系。

1.4 统计学方法

数据采用 SPSS 22.0 软件进行分析, TRAP1 蛋白在 3 组组织中的阳性率用率(%)表示, 数据比较采用 χ^2 检验; 免疫组织化学计分统计资料不符合正态分布时, 采用中位数和四分位数间距(IQR)进行描述, 数据比较采用秩和检验, 分析 TRAP1 与 PTC 临床病理特征的关系用 Fisher 确切概率法, 均以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TRAP1 蛋白表达

TRAP1 蛋白在 3 种组织中的阳性表达率 PTC > 甲状腺腺瘤 > 结节性甲状腺肿, 但仅 PTC 与甲状腺腺瘤或结节性甲状腺肿比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 1。TRAP1 蛋白在 PTC、甲状腺腺瘤及结节性甲状腺肿组织中的相对表达量的中位数和 IQR 分别为 4 (2.25 ~ 5.00) 分、0.00 (0.00 ~ 3.00) 分、0.00 (0.00 ~ 2.00) 分, 见图 1; 提示 TRAP1 蛋白在 PTC 组织中的表达显著高于甲状腺腺瘤及结节性甲状腺肿组织。

表 1 TRAP1 蛋白在 3 种甲状腺组织中的表达

Tab. 1 Positive expression rate of TRAP1 protein in three kinds of thyroid tissues

组别	TRAP1 蛋白 (n, %)	
	阳性	阴性
PTC	54 (71.05)	22 (28.95)
甲状腺腺瘤	6 (15.00) ⁽¹⁾	34 (85.00) ⁽¹⁾
结节性甲状腺肿	4 (10.00) ⁽¹⁾	36 (90.00) ⁽¹⁾

⁽¹⁾ 与 PTC 组比较, $P < 0.01$

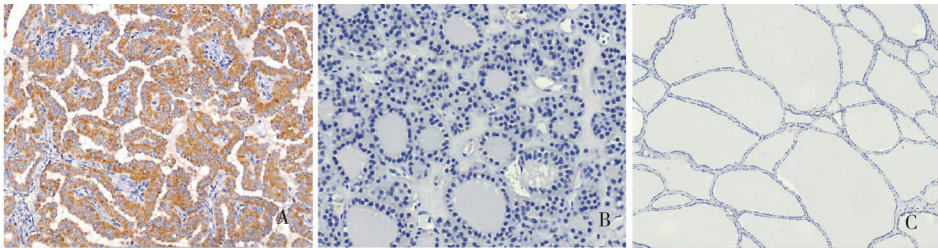
2.2 TRAP1 蛋白表达与 PTC 患者临床病理特征的关系

结果显示, TRAP1 蛋白表达与 PTC 患者性别、年龄、是否淋巴结转移、累及甲状腺腺叶数、甲状腺被膜侵犯、肿瘤直径无明显关系 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 TRAP1 表达与 PTC 临床病理特征的关系

Tab. 2 The correlation between TRAP1 expression and clinical and pathological feature of PTC

临床病理参数	TRAP1 (n, %)		P
	阳性	阴性	
性别			
男	14 (82.35)	3 (17.65)	0.196
女	40 (67.80)	19 (32.20)	
年龄 (岁)			
≥45	27 (81.82)	6 (18.18)	0.058
<45	27 (62.80)	16 (37.20)	
淋巴结转移			
有	20 (74.07)	7 (25.93)	0.296
无	34 (69.39)	15 (30.61)	
累及腺叶数			
单个	37 (75.51)	12 (24.49)	0.186
多个	17 (62.96)	10 (37.04)	
累及甲状腺被膜			
是	18 (64.29)	10 (35.71)	0.231
否	36 (75.00)	12 (25.00)	
肿瘤直径 (cm)			
≤2	22 (64.71)	12 (35.29)	0.199
>2	32 (76.20)	10 (23.80)	



注: A 为结节性甲状腺肿组织 (PV, ×100), B 为甲状腺腺瘤组织 (PV, ×200), C 为 PTC 组织 (PV, ×200)

图 1 TRAP1 蛋白在 3 种甲状腺组织中的表达

Fig. 1 The expression of TRAP1 protein in three kinds of thyroid tissues

3 讨论

TRAP1 是 Hsp90 的家族成员之一, 是一类高度保守的分子伴侣, 参与信号转导、蛋白质折叠、蛋白质降解等过程^[4]。成熟的 TRAP1 蛋白由 645 个氨基酸组成, 其发挥生物学功能的主要结构为具有特殊构像的 ATP 结合域, 此区域可以与 γ -磷酸基

团相结合, 进而发挥作用^[5]。TRAP1 在人类癌症发生发展过程中起着关键作用^[6-7]。近年来, 对人类多种恶性肿瘤的研究表明, TRAP1 具有抗凋亡、调控细胞周期、调节细胞新陈代谢和蛋白质平衡等多种功能^[8-9]。然而, TRAP1 蛋白异常表达介导肿瘤发生发展的分子机制尚不十分清楚。现有研究认为分子机制主要包括: (1) TRAP1 通过调节线粒体功能调节肿瘤细胞的能量代谢, 主要表现为

TRAP1 高表达可以使线粒体分裂蛋白 Drp1 下调,融合蛋白 Mfn1、Mfn2 上调,使线粒体形态趋于融合,维持细胞能量代谢的稳定^[10];TRAP1 还与亲环素 D(CypD)相互作用抑制线粒体膜通透性转换孔(MPTP)的开放(CypD 是 MPTP 的组分之一,MPTP 的开放是线粒体凋亡途径的关键环节^[11]);TRAP1 过表达可以抑制活性氧的产生及细胞色素 C 的释放,维持线粒体膜电势的稳定及线粒体的完整性^[11];(2)TRAP1 可以与细胞内多种蛋白相结合,抑制肿瘤细胞周期进展,防止细胞凋亡,主要表现为 TRAP1 通过与 PTEN 诱导激酶 1(PINK1)相互作用并使 TRAP1 磷酸化增强而抑制细胞死亡^[12],在内质网内与调节蛋白亚单位 TBP7 相互作用,调节核编码蛋白质的泛素化/降解^[8,13];TRAP1 还可以与钙结合蛋白 Sorcin 相互作用抑制肿瘤细胞凋亡,并认为这与肿瘤细胞耐药性的产生相关^[11]。此外,还有研究发现,BRAF 通路和 Akt/p70S6K 通路也参与了 TRAP1 对肿瘤发生、发展的调控^[14-16]。在大部分人类恶性肿瘤中 TRAP1 表达水平上调^[17-18],如 Han 等^[19]通过检测 TRAP1 在胃癌及癌旁正常组织中的 mRNA 及蛋白表达水平,并分析 TRAP1 的表达与恶性生物学行为之间的关系,结果显示 TRAP1 在胃癌组织中的表达无论在蛋白水平还是在 mRNA 水平均显著高于癌旁正常组织,且 TRAP1 高表达与淋巴结转移、远处器官转移及较高的 TNM 分期等恶性生物学行为相关。Min 等^[20]收集韩国东亚大学医学中心 2002-2011 年的结直肠癌手术标本共 714 例,利用免疫组化法检测组织内 TRAP1 蛋白表达水平,分析其与临床病理特征之间的关系,发现结肠癌组织中 TRAP1 阳性表达率为 79%,且其高表达与原发肿瘤分期(Tn)及较短的生存时间相关。但是,据相关文献报道,TRAP1 在一些少数恶性肿瘤组织中的表达水平随着肿瘤级别的增加反而下调,如 Matassa 等^[21]研究 TRAP1 在卵巢癌组织发生、发展中的作用,发现 TRAP1 与肿瘤细胞级别、分期、较短的生存时间呈负相关,且沉默 TRAP1 使肿瘤细胞对铂类化合物的耐药性增加,由此可见,对于 TRAP1 在肿瘤发生、发展过程中起癌基因样作用还是抑癌基因样作用尚有争议,仍需进一步的研究。

本研究观察 TRAP1 在 PTC、甲状腺腺瘤、结节

性甲状腺肿组织中的表达,结果显示 TRAP1 蛋白在 PTC、甲状腺腺瘤、结节性甲状腺肿组织中的阳性率分别为 71.1%、15.0%、10.0%,TRAP1 蛋白在 PTC 组织中的表达水平明显高于甲状腺腺瘤及结节性甲状腺肿组织($P < 0.01$),提示 TRAP1 的高表达可能与 PTC 的发生、发展有关。本研究进一步分析 TRAP1 与 PTC 各临床病理特征间的关系,发现 TRAP1 高表达与患者性别、年龄、肿瘤直径、淋巴结转移、累及腺叶数、甲状腺被膜侵犯及肿瘤直径均无关。提示 TRAP1 蛋白在 PTC 组织中高表达,TRAP1 高表达可能在 PTC 的发生、发展过程中起一定的作用,但其促进 PTC 发生的机制及其是否可能成为预测 PTC 侵袭性生物学行为的指标仍需进一步的研究。

目前,PTC 的治疗方法主要以手术治疗为主,术后再进行 I¹³¹ 治疗和 TSH 抑制治疗。但是,I¹³¹ 治疗过程中可能出现骨髓抑制、急性甲状腺危象等并发症,长期的 TSH 抑制疗法也会影响骨骼及心血管等系统,而出现相应并发症,因此,寻找对 PTC 肿瘤细胞具有特异性杀伤作用而不产生明显副作用的治疗靶点非常迫切。本研究结果提示,TRAP1 可能就是 PTC 肿瘤治疗的一个新靶点,下一步课题组将通过干扰 TRAP1 的 ATP 酶活性,观察是否可以使肿瘤细胞死亡,且不损伤正常的细胞和组织。

4 参考文献

- [1] 庄新所. 186 例外科治疗甲状腺乳头状癌患者生存分析[J]. 中国地方病防治杂志, 2015 (5):423-424.
- [2] 沈培亮,刘兆国,孙丽华,等. 肿瘤治疗新靶点 TRAP1 研究进展[J]. 中国药理学通报, 2016 (4):459-463.
- [3] Gao JY, Song BR, Peng JJ, et al. Correlation between mitochondrial TRAP-1 expression and lymph node metastasis in colorectal cancer[J]. World J Gastroenterol, 2012 (41):5965-5971.
- [4] Matassa DS, Amoroso MR, Maddalena F, et al. New insights into TRAP1 pathway[J]. Am J Cancer Res, 2012 (2):235-248.
- [5] Dario C, Gary S, Jane B, et al. TRAP-1, the mitochondrial Hsp90[J]. Biochimica et Biophysica Acta Molecular Cell Research, 2012 (3):767-773.
- [6] Amoroso MR, Matassa DS, Sisinni L. TRAP1 revisited; no-

- vel localizations and functions of a 'next-generation' biomarker (review) [J]. *International Journal of Oncology*, 2014 (3):969–977.
- [7] Rasola A, Neckers L, Picard D, et al. Mitochondrial oxidative phosphorylation TRAP1 (1) ped in tumor cells [J]. *Trends In Cell Biology*, 2014 (8):455–463.
- [8] Amoroso MR, Matassa DS, Laudiero G, et al. TRAP1 and the proteasome regulatory particle TBP7/Rpt3 interact in the endoplasmic reticulum and control cellular ubiquitination of specific mitochondrial proteins [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2012 (4):592–604.
- [9] Matassa DS, Amoroso MR, Agliarulo I, et al. Translational control in the stress adaptive response of cancer cells: a novel role for the heat shock protein TRAP1 [J]. *Cell Death and Disease*, 2013(1):1–10.
- [10] Chae YC, Caino MC, Lisanti S, et al. Control of tumor bioenergetics and survival stress signaling by mitochondrial Hsp90s [J]. *Cancer Cell*, 2012 (3):331–344.
- [11] Altieri DC, Stein GS, Lian JB, et al. TRAP-1, the mitochondrial Hsp90 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012 (3):767–773.
- [12] Zhang L, Karsten P, Hamm S, et al. TRAP1 rescues PINK1 loss-of-function phenotypes [J]. *Human Molecular Genetics*, 2013 (14):2829–2841.
- [13] Maddalena F, Sisinni L, Lettini G, et al. Resistance to paclitaxel in breast carcinoma cells requires a quality control of mitochondrial antiapoptotic proteins by TRAP1 [J]. *Molecular Oncology*, 2013 (5):895–906.
- [14] Condelli V, Piscazzi A, Sisinni L, et al. TRAP1 is involved in BRAF regulation and downstream attenuation of ERK phosphorylation and cell cycle progression: a novel target for BRAF-mutated colorectal tumors [J]. *Cancer Res*, 2014 (22):6693–6704.
- [15] Condelli V, Maddalena F, Sisinni L, et al. Targeting TRAP1 as a downstream effector of BRAF cytoprotective pathway: a novel strategy for human BRAF-driven colorectal carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2015 (26):22298–22309.
- [16] Agliarulo I, Matassa DS, Amoroso MR, et al. TRAP1 control cell migration of cancer cells in metabolic stress conditions: Correlations with AKT/p70S6K pathways [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015 (10):2570–2579.
- [17] Agorreta J, Hu J, Liu D, et al. TRAP1 regulates proliferation, mitochondrial function, and has prognostic significance in NSCLC [J]. *Molecular Cancer Research*, 2014 (5):660–669.
- [18] Giuseppe P, Tiziana N, Giuseppe P, et al. TRAP1 regulates cell cycle and apoptosis in thyroid carcinoma cells [J]. *Endocrine-Related Cancer*, 2016 (23):600–709.
- [19] Han P, Wang QL, Zhang X. Expression of TRAP1 in gastric cancer tissue and its correlation with malignant biology [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2016 (1):67–71.
- [20] Min GP, Hyong JK, Mee SR. Clinicopathologic significance of TRAP1 expression in colorectal cancer: a large scale study of human colorectal adenocarcinoma tissues [J]. *Diagnostic Pathology*, 2017(12):1–8.
- [21] Matassa DS, Amoroso MR, Lu H, et al. Oxidative metabolism drives inflammation-induced platinum resistance in human ovarian cancer [J]. *Cell Death Differ*, 2016 (9):1542–1554.
- (2017-10-14 收稿, 2017-11-30 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 丁廷森

