

## 临床细胞生物学

## *Gankyrin*在甲状腺乳头状癌的表达及临床意义

徐锦叶<sup>1</sup> 沈沁彦<sup>1</sup> 邢萍<sup>1</sup> 赖永锋<sup>1</sup> 金晓燕<sup>2</sup> 梁勇<sup>2,3\*</sup>(<sup>1</sup>温州医科大学第一临床学院, 温州 325000; <sup>2</sup>台州学院附属市立医院肿瘤外科, 台州 318000;<sup>3</sup>台州学院医学院, 台州 318000)

**摘要** 采用荧光定量PCR、Western blot及免疫组化方法对比研究gankyrin mRNA及蛋白在甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)、桥本氏甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis, HT)及正常甲状腺组织中的表达情况, 分析gankyrin蛋白表达与PTC临床病理特征的关系, 探讨gankyrin基因对PTC发生发展的影响。结果显示, PTC及HT样本中gankyrin mRNA及蛋白水平的表达量均高于正常对照组, 有统计学显著意义( $P < 0.01$ ); PTC组及HT组间的表达无统计学差异( $P > 0.05$ ); 临床特征分析表明, gankyrin蛋白表达在PTC中的表达与患者的性别、年龄、TNM分期等无关, 而与是否合并HT有关。Gankyrin基因在PTC及HT中的高表达说明其在这两种关系密切的疾病中扮演着重要的角色, 提示其与PTC的分子机制有关。

**关键词** gankyrin; 甲状腺乳头状癌; 桥本氏甲状腺炎

## The Clinical Significance of *Gankyrin* Expression in Papillary Thyroid Carcinoma

Xu Jinye<sup>1</sup>, Shen Qinyan<sup>1</sup>, Xing Ping<sup>1</sup>, Lai Yongfeng<sup>1</sup>, Jin Xiaoyan<sup>2</sup>, Liang Yong<sup>2,3\*</sup>(<sup>1</sup>The First Affiliated Hospital, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China; <sup>2</sup>Department of Oncologic Surgery, the Affiliated Municipal Hospital, Taizhou University, Taizhou 318000, China; <sup>3</sup>Medical School, Taizhou University, Taizhou 318000, China)

**Abstract** In this research, we evaluated the relationship between gankyrin expression and clinicopathologic parameters in papillary thyroid carcinoma (PTC), exploring its effect on PTC using fluorescence quantitative PCR, Western blot and immunohistochemistry to investigate mRNA and protein levels of gankyrin in PTC, Hashimoto's thyroiditis (HT) and normal thyroid tissues. The results showed that both the mRNA and protein levels of gankyrin expression in PTC and HT were obviously higher than that in normal thyroid tissues ( $P < 0.01$ ), whereas the differences of gankyrin expression were not significant between PTC and HT ( $P > 0.05$ ). In addition, gankyrin was over-expressed in PTC with coexisting of HT compared with PTC without HT. The high level of gankyrin expression in both PTC and HT suggests that gankyrin plays an important role in the occurrence and development of these two closely related diseases and it is probably a molecular mechanism of PTC.

**Key words** gankyrin; papillary thyroid carcinoma; hashimoto's thyroiditis

收稿日期: 2014-04-16 接受日期: 2014-08-05

国家自然科学基金项目(批准号: 81072209)、2014年浙江省自然科学基金项目(批准号: Y14H160128)、2012年卫生部医药卫生科技发展研究中心课题(批准号: 2012FZ013)和2012年浙江省医学会临床科研基金项目(批准号: 2012ZYC-A100)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0576-88665191, E-mail: liangyu@gmail.com

Received: April 16, 2014 Accepted: August 5, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81072209), the Natural Science Foundation of Zhejiang (Grant No.Y14H160128), Development Center for Medical Science and Technology, Ministry of Health (Grant No.2012FZ013) and Zhejiang Medical Association Clinical Research Foundation (Grant No.2012ZYC-A100)

\*Corresponding author. Tel: +86-576-88665191, E-mail: liangyu@gmail.com

网络出版时间: 2014-12-02 16:40 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.12.0131.html>

甲状腺癌是近20多年发病率增长最快的实体恶性肿瘤,年均增长6.2%,居女性常见恶性肿瘤的第5位。以女性多见,男:女比例约为1:3<sup>[1]</sup>。据美国国立癌症研究院预计,2013年美国将有60 220例新诊断的甲状腺癌患者,其中女性就有45 130例。在甲状腺癌的病理分型中,甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)占有所有甲状腺癌的80%~90%<sup>[2]</sup>。桥本氏甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis, HT)是一种自身免疫性疾病,是甲状腺最为常见的炎症性疾病<sup>[3]</sup>,占我国甲状腺疾病的20%~25%。关于PTC与HT关系的研究颇多<sup>[4]</sup>,但一直存在争议,因此研究两者共同的分子机制改变是非常有必要的。

Gankyrin属于锚蛋白家族成员,是26S蛋白酶体的19S调节颗粒的一个非催化亚基。研究表明,gankyrin主要通过负向调控核磷酸(retinoblastoma, Rb)和p53这两个关键的抑癌基因发挥其促进恶性肿瘤细胞的增殖、抑制凋亡的生物学功能<sup>[5]</sup>。同时,gankyrin也可参与调控一些肿瘤相关的炎症信号通路促进肿瘤的发生发展<sup>[6]</sup>。本研究通过对比研究gankyrin mRNA及蛋白在PTC、HT及正常甲状腺组织中的表达情况,探讨gankyrin与PTC发生发展的关系,为PTC分子机制的进一步研究及PTC与HT关系研究提供新的依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 组织标本 收集2013年2月~12月台州市立医院肿瘤外科手术标本,PTC组织65例,癌旁正常甲状腺组织55例,26例HT来源于结节性甲状腺肿周边组织。所有标本均由病理科证实,患者术前均未接受过激素治疗或放化疗。PTC中男性14例,女性51例,年龄范围为19岁至71岁,中位年龄44岁。术中切取的标本一半用10%的甲醛固定,用于免疫组织化学检测;另一半新鲜标本放于-80℃冰箱,用于RT-PCR及Western blot检测。组织标本使用经医院伦理委员会批准。

1.1.2 主要器材及试剂 德国Leica显微图象分析系统;Real-time PCR采用ABI公司的StepOne PCR仪;垂直电泳槽及转膜槽为北京六一仪器厂产品;美国GE公司的ImageQuant LAS 4000 mini凝胶成像仪;兔抗人gankyrin多克隆抗体购自Santa Cruze公司;GAPDH单克隆抗体购自Cell Signaling公司;二步法

超敏免疫组化检测试剂盒及DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥生物科技有限公司;所有引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成;Trizol RNA提取试剂购自Invitrogen公司;Quant cDNA第一链合成试剂盒、RealMasterMix(SYBR Green)试剂盒均由天根生物科技有限公司提供;T-PER组织总蛋白提取试剂购自Thermo Fisher公司;SDS-PAGE凝胶配制试剂盒购自碧云天生物科技有限公司。

### 1.2 方 法

1.2.1 实时荧光定量PCR 取-80℃保存的PTC、HT及正常甲状腺组织,每例标本约35 mg,Trizol试剂提取总RNA,紫外分光光度计测定RNA的纯度比值和浓度,要求 $D_{260/280}$ 的值为1.8~2.0,琼脂糖凝胶电泳验证提取的RNA完整。采用天根Quant cDNA第一链合成试剂盒合成cDNA(20 μL反应体系)。Real-time PCR采用RealMasterMix(SYBR Green)试剂盒,20 μL总反应体系。反应混合物包含2.5×RealMasterMix/20×SYBR Solution混合液9 μL、上下游引物各0.5 μL(10 μmol/L)、cDNA 2 μL及超纯水9 μL。*GAPDH*为内参,对gankyrin基因进行PCR,独立实验重复3次。PCR反应条件为:预变性95℃ 2 min;95℃ 15 s,58℃ 30 s,68℃ 60 s,40个循环。引物基因序列如下:*GAPDH*(NM\_002046.5)上游引物为:5'-CAT CAG CAA TGC CTC CTG CAC-3',下游引物为:5'-TGA GTC CTT CCA CGA TAC CAA AGT T-3';gankyrin(NM\_002814.3)上游引物为:5'-AGC AGC CAA GGG TAA CTT GA-3',下游引物为:5'-TAC TTG CTC CTT GGG ACA CC-3'。产物长度分别为86 bp和155 bp,反应结果后由系统自动计算相对定量结果。

1.2.2 Western blot 取-80℃保存的PTC、HT及正常甲状腺组织,每例约40 mg,匀浆器在冰上充分研磨,每1 mg组织加入20 μL T-PER溶液(含1% PMSF)提取组织总蛋白,冰上放置30 min,12 000 r/min离心5 min,吸取上清液。BCA法检测蛋白浓度,取35 μg总蛋白进行电泳。SDS-PAGE凝胶的分离胶浓度为12%,浓缩胶浓度为5%,电泳结束后,湿转法将蛋白转移至0.2 μm的PVDF膜上,10%脱脂奶粉封闭1.5 h,分别加抗人gankyrin(1:200)、GAPDH(1:1 000)4℃孵育过夜。TBST洗涤,二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG抗体(1:10 000),室温孵育1.5 h,ECL显色,ImageQuant LAS 4000 mini凝胶成像仪自动曝光,

计算机软件分析实验结果, 检测 $D$ 值, 进行独立重复实验3次。

**1.2.3 免疫组织化学** 免疫组化检测石蜡标本PTC、HT及正常甲状腺组织*gankyrin*蛋白的分布情况。10%甲醛浸泡, 脱水后常规石蜡包埋, 4  $\mu\text{m}$ 连续切片, 二甲苯脱蜡, 梯度酒精去二甲苯, PBS洗涤, 滴加3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 室温静置10 min以灭活内源性过氧化物酶, PBS洗涤, 枸橼酸钠缓冲溶液(pH6.0)中高压加热法修复抗原, 5%山羊血清封闭20 min, 滴加*gankyrin*抗体(1:100) 4  $^\circ\text{C}$ 过夜, 以PBS代替一抗作为阴性对照, 用已知阳性片作为阳性对照, 37  $^\circ\text{C}$ 复温45 min, PBS洗涤, 滴加二抗(辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG抗体) 37  $^\circ\text{C}$  1.5 h, PBS清洗后DAB显色, 显微镜下判断染色情况, 自来水冲洗, 苏木精复染2 min, 盐酸酒精分化, 自来水冲洗, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 封片, 镜检, 显微图象分析系统拍照。实验结果判断标准参照Carcangiu等<sup>[7]</sup>半定量评分方法, 根据阳性细胞着色强度和阳性细胞数量计分, 阳性着色强度按无色、淡棕色、棕黄色和棕褐色分别记为0、1、2、3分; 再在高倍镜(40 $\times$ )下对每张切片随机选取5个高倍镜视野, 计数500个细胞/视野, 共计2 500个, 阳性细胞数按<5%、5%~35%、36%~70%和>70%分别记为0、1、2、3分。取两项评分的乘积进行综合评分,  $\leq 1$ 分为阴性、2~3分为弱阳性、4~5分为中度阳性、 $\geq 6$ 分为强阳性。合并阴性和弱阳性作为阴性表达标准, 中度阳性和强阳性作为阳性表达标准。

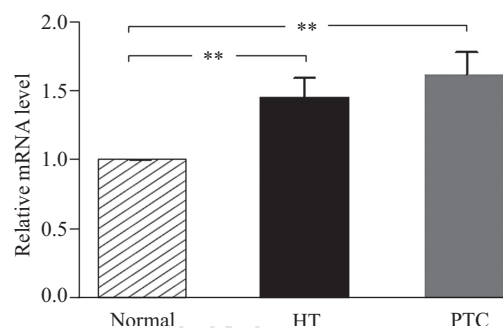
### 1.3 统计学分析

统计学分析均采用SPSS 17.0统计软件。不同甲状腺组织免疫组化结果的两两比较及甲状腺乳头状癌组织中*gankyrin*蛋白表达与临床病理参数间的关系采用 $\chi^2$ 检验检测。计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 多样本比较采用单因素方差分析, 组间比较采用SNK检验,  $P<0.05$ 为差异有统计学意义,  $P<0.01$ 为差异有显著的统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 *Gankyrin*在不同甲状腺组织中的mRNA表达情况

荧光定量PCR检测*gankyrin*基因在PTC、HT及正常甲状腺组织的表达情况。荧光定量PCR体系的确立: PCR扩增效率恒定, 扩增曲线达到平台期, Ct



Normal: 正常甲状腺组织; PTC: 甲状腺乳头状癌; HT: 桥本氏甲状腺炎。 \*\* $P<0.01$ 。

Normal: normal thyroid tissue; PTC: papillary thyroid carcinoma; HT: Hashimoto's thyroiditis. \*\* $P<0.01$ .

**图1 *Gankyrin* mRNA在三组不同甲状腺组织的相对表达量**  
Fig.1 The relative mRNA levels of *gankyrin* in three different thyroid tissues

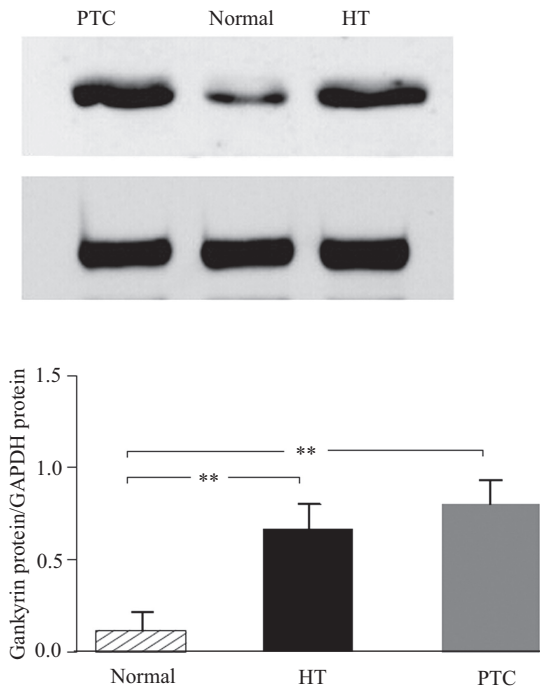
值稳定, 重现性好, Melt曲线显示特异性单峰, 无引物二聚体产生, *GAPDH*及*gankyrin*的退火温度分别为83.65  $^\circ\text{C}$ 和82.31  $^\circ\text{C}$ 。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算PTC及HT中*gankyrin* mRNA的相对表达量, 对照组为正常甲状腺组织。实验结果显示, PTC及HT相对表达量分别为 $1.6134\pm 0.1592$ 、 $1.4464\pm 0.1342$ , 均高于正常甲状腺组, 差异有统计学意义( $P<0.01$ ), 而PTC与HT组的表达量之间无明显差别( $P>0.05$ )(图1)。

### 2.2 *Gankyrin*在三组不同甲状腺组织中的蛋白表达情况

**2.2.1 Western blot实验结果** Western blot检测PTC、HT及正常甲状腺组织*gankyrin*的相对蛋白表达量分别为 $0.8029\pm 0.1292$ 、 $0.6622\pm 0.1433$ 、 $0.1177\pm 0.0882$ , PTC及HT组的蛋白相对表达量均高于正常甲状腺组, 差异有显著的统计学意义( $P<0.01$ ), 而PTC与HT组表达无明显差别( $P>0.05$ )(图2)。

**2.2.2 免疫组化实验结果** 免疫组化检测PTC、HT及正常甲状腺组织的蛋白表达情况。实验结果显示, *gankyrin*蛋白在PTC及HT中的胞浆胞核均有表达, 但以胞浆为主(图3A~图3C、图3A'~图3C')。PTC中, 阳性表达率高达85.2%(56/65), *gankyrin*蛋白在桥本氏腺炎组织的淋巴细胞及嗜酸性变细胞都有分布, 阳性表达率为80.8%, 正常甲状腺组的阳性表达率为14.5%(8/55)。采用 $\chi^2$ 检验进行组间比较, 与Western blot及PCR实验结果一致的是, PTC及HT的表达率均显著高于正常甲状腺组, 差异有显著的统计学意义( $P<0.01$ )。PTC与HT组间无明显差异





Normal: 正常甲状腺组织; PTC: 甲状腺乳头状癌; HT: 桥本氏甲状腺炎。 \*\* $P < 0.01$ 。

Normal: normal thyroid tissue; PTC: papillary thyroid carcinoma; HT: Hashimoto's thyroiditis. \*\* $P < 0.01$ 。

图2 Western blot检测gankyrin蛋白在三组不同甲状腺组织的表达情况

Fig.2 Expression of gankyrin in three different thyroid tissues determined by Western blot

( $P > 0.05$ )(表1)。

### 2.3 Gankyrin表达与PTC临床特征的关系

65例甲状腺乳头状癌组织的临床特征如表2所示。通过免疫组化结果分析了gankyrin蛋白表达与PTC病人临床特征的关系后发现, gankyrin的表达与PTC病人的性别、年龄、肿瘤大小、淋巴结转移及TNM分期1、2期和3、4期间无明显相关。但是, 23例合并HT的PTC组织阳性率高于未合并HT的PTC组织, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(表2)。

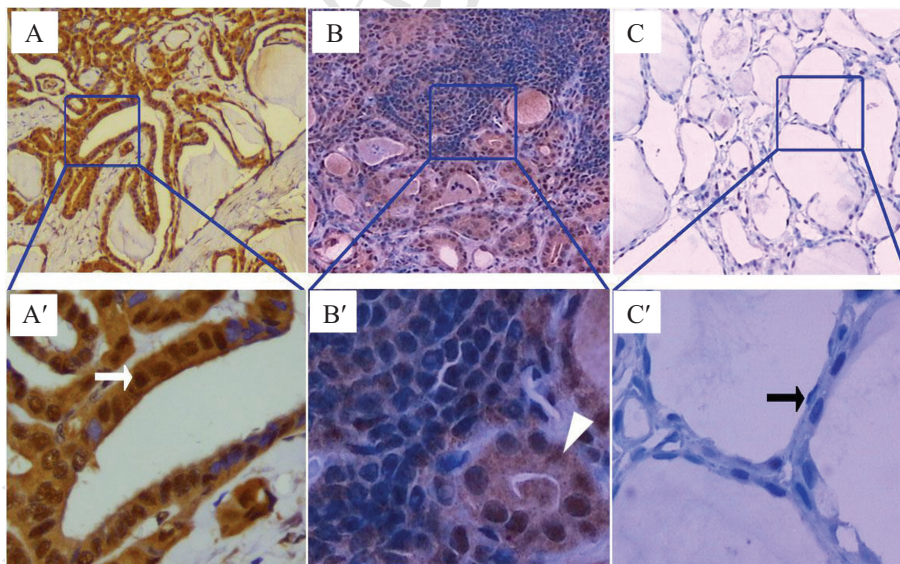
表1 Gankyrin在三种不同甲状腺组织中的表达及两两之间的比较

Table 1 Expression of gankyrin in three different thyroid tissues and comparison between each two groups

组别 Groups	阳性 Positive	阴性 Negative	$\chi^2$	$P$ 值 $P$ value
PTC tissue	56	9	61.379	0.000**
Normal thyroid tissue	8	47		
PTC tissue	56	9	0.013	0.748
HT tissue	21	5		
HT tissue	21	5	33.686	0.000**
Normal thyroid tissue	8	47		

\*\* $P < 0.01$ . PTC: 甲状腺乳头状癌; HT: 桥本氏甲状腺炎。

\*\* $P < 0.01$ . PTC: papillary thyroid carcinoma; HT: Hashimoto's thyroiditis.



A, A': 甲状腺乳头状癌组织中gankyrin蛋白阳性表达(白色箭头所示); B, B': 桥本氏甲状腺炎中出现的嗜酸性变细胞(三角型)及淋巴细胞中gankyrin的表达量均有所增加; C, C': 正常甲状腺滤泡组织中gankyrin表达(黑色箭头所示)。A~C: 100 $\times$ ; A'~C': 400 $\times$ 。

A, A': papillary carcinoma showing strong gankyrin expression (white arrow); B, B': Hashimoto's thyroiditis showing increased gankyrin expression in areas of Hürthle cell changes (triangle-like symbol) and lymphocytes; C, C': the gankyrin expression in normal follicular cells is noted by the black arrow. A~C: 100 $\times$ ; A'~C': 400 $\times$ 。

图3 Gankyrin在三种不同甲状腺组织中免疫组化结果

Fig.3 Immunohistochemical analysis of three different thyroid tissues stained for gankyrin expression

表2 *Gankyrin*与甲状腺乳头状癌临床病理特征的关系

变量	例数	阳性	阴性	$\chi^2$	<i>P</i> 值
Variables	<i>n</i>	Positive	Negative	$\chi^2$	<i>P</i> value
Sex					
Male	14	13	1	0.147	0.702
Female	51	43	8		
Age (year)					
<45	37	33	4	0.204	0.651
≥45	28	23	5		
Tumor size					
≤2 cm	54	47	7	0.000	1.000
>2 cm	11	9	2		
Lymphatic metastasis					
Y	42	36	6	0.000	1.000
N	23	20	3		
TNM stages					
I+II	45	40	5	0.323	0.520
III+IV	20	16	4		
Concurrent HT					
Y	23	23	0	4.056	0.044*
N	42	33	9		

HT代表桥本氏甲状腺炎。\**P*<0.05。

HT represent Hashimoto's thyroiditis. \**P*<0.05.

### 3 讨论

PTC是甲状腺癌最为常见的病理类型,近年来其发病率呈不断上升的趋势,因此越来越引起人们的关注。目前关于PTC的分子机制研究取得了许多新的进展,如发现PTC与常见的细胞增殖分化相关的细胞通路如Notch、PI3K/AKT信号通路、细胞代谢相关因子(如LKB1)以及诸多肿瘤相关因素(如肿瘤坏死因子等)均存在明确的关系<sup>[8-10]</sup>。此外,PTC发生与其自身微环境的关系亦十分密切。HT是甲状腺最为常见的炎症,其与PTC的关系一直是研究的热点。已有研究表明,PTC与HT有着一些共同的组织病理及分子机制改变<sup>[11]</sup>,提示两种疾病间存在紧密的联系,但是具体机制尚未明确,因此探究PTC与HT间共同的分子机制改变是非常有必要的。

*Gankyrin*又称为PSMD10、p28、Nas6p,属于锚蛋白家族成员,是26S蛋白酶体的19S调节颗粒的一个非催化亚基,包含7个锚蛋白重复序列,定位在人染色体xq22.3,最初由Tanaka和他的同事纯化并描述<sup>[12]</sup>。2000年,日本学者Higashitsuji比较肝癌组织与正常肝组织的cDNA中证明其癌基因的角色,并命名为Gann ankyrin repeats(*gann*在日语的意思是cancer)<sup>[5]</sup>。多个研究表明,*gankyrin*的主要功能是与细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)及鼠双微体基因表达产物MDM2相结合,

介导Rb和P53的降解,促进恶性肿瘤细胞的增殖、抑制其凋亡<sup>[12]</sup>。同时也有研究表明,*gankyrin*可通过参与调控NF- $\kappa$ B等肿瘤炎症相关信号通路促进肿瘤的发生发展<sup>[6]</sup>。目前,*gankyrin*在肝癌、胃癌、口腔癌、食管癌、肉瘤、乳腺癌、胰腺癌及大肠癌等肿瘤中均有研究报道,但其在PTC的研究,国内外尚未见相关研究报道。

本实验同时采用荧光定量PCR、Western blot及免疫组化方法对比研究*gankyrin* mRNA及蛋白在PTC、HT及正常甲状腺组织中的表达情况。荧光定量PCR及Western blot实验结果显示,*gankyrin*基因在PTC中的mRNA及蛋白水平均明显高于正常的甲状腺组织。免疫组化检测发现,*gankyrin*蛋白在PTC的胞浆胞核中均有分布,65例甲状腺乳头状癌中阳性表达率高达85.2%(56/65),明显高于正常甲状腺组织(14.5%),与肝癌、大肠癌、乳腺癌等肿瘤研究报道一致<sup>[13-15]</sup>。*Gankyrin* mRNA及蛋白在PTC中表达均明显升高,提示*gankyrin*基因在PTC的发生发展中扮演着重要的角色。现在已经证明,*gankyrin*主要通过调控Rb及p53这两个关键的抑癌基因发挥其调控细胞周期和抑制细胞凋亡的生物学功能。*Gankyrin*功能发现的最初线索是其C-端结构域有可以与Rb蛋白结合活性的LXCXE模体<sup>[16]</sup>。而随后的研究发现,*gankyrin*对

Rb的调控主要与其N-端多个氨基酸残基竞争性替代(细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂)p16<sup>INK4A</sup>与CDK4(细胞周期蛋白依赖性激酶)结合位置有关。Gankyrin通过桥梁作用使得CDK4与Rb相连接,激活CDK4,使得Rb蛋白磷酸化,释放出转录因子E2F,诱导DNA合成增加,促进细胞周期从G<sub>1</sub>期进入S期,同时加速Rb被泛素蛋白酶体降解<sup>[17]</sup>,抑制细胞凋亡。此外,gankyrin表达增高后,可以通过激活MDM2而负性调控P53的功能。siRNA干扰下调gankyrin基因表达后,细胞免疫共沉淀发现MDM2/P53复合物显著降低。进一步的研究结果显示,gankyrin能够与MDM2 N-端RING结构域结合,促进MDM2与P53结合,并招募MDM2/P53复合物至26S蛋白酶体,加快P53的降解,导致P53依赖的下游凋亡与抗凋亡蛋白比例失调,抑制肿瘤细胞凋亡<sup>[18]</sup>。Gankyrin在PTC发生发展的作用是否与通过调控Rb及P53促进肿瘤细胞增殖、抑制凋亡有关,还值得更深一步的研究。

Gankyrin在HT中检测结果显示,其mRNA及蛋白均高于正常的甲状腺组织。免疫组化结果表明,gankyrin蛋白在HT的淋巴细胞及嗜酸性粒细胞都有分布。Gankyrin在HT组中的高表达,提示gankyrin与甲状腺炎症反应关系密切。此前也有研究表明,在小鼠肝炎肝硬化模型中gankyrin表达明显升高<sup>[19]</sup>。目前已有研究报道,gankyrin参与调控一些肿瘤炎症相关信号通路。Higashitsuji等<sup>[6]</sup>在肝癌细胞的研究中发现,gankyrin可以与NF-κB亚单位p65(RelA)直接相结合负向调控NF-κB的转录活性。gankyrin过表达以后,NF-κB的基础表达量及TNFα诱导表达的NF-κB表达量均出现下调,gankyrin下调后则出现升高的状态,提示gankyrin除了作为癌基因之外,在炎症及免疫反应中也扮演着重要的角色。Zheng等<sup>[20]</sup>在胆囊癌的研究中表明,gankyrin能增加STAT3的磷酸化水平后促进其向核内的转入,抑制STAT3信号通路,导致肿瘤发生及转移减弱。进一步的研究发现,gankyrin基因沉默后,STAT3的上游基因IL-6表达量明显减少,质粒转录IL-6后可以修复gankyrin基因沉默后的胆囊癌细胞的增殖转移功能。gankyrin在HT的高表达提示其在HT中扮演重要的角色,但到底是炎症反应促进了gankyrin的高表达还是gankyrin高表达后调控炎症信号通路促进炎症的发生仍需进一步的研究。

此外,本实验对比研究了gankyrin基因在PTC与

HT组(未合并PTC)的表达情况。从现有样本量看,无论是采用荧光定量PCR、Western blot及免疫组化结果,gankyrin在PTC组均有高于HT组的趋势,但是统计学结果显示则无明显差别( $P>0.05$ ),考虑这可能与本实验检测的样本量较少有关。

值得注意的是,免疫组化结果分析gankyrin表达与PTC临床病理特征关系中发现,合并HT的PTC组织中gankyrin表达阳性率(100%)明显高于不伴HT的PTC组,而与患者年龄、性别、淋巴结转移及TNM分期无关。Gankyrin在PTC及HT表达的同向改变,提示gankyrin是PTC与HT的共同发病机制,其可能在PTC与HT中起着纽带作用,进一步证明了两种疾病间存在着紧密的关系。

综上所述,gankyrin基因在PTC中的高表达说明gankyrin可能通过控制细胞周期及抑制细胞凋亡促进PTC发生发展。而其在HT的同向改变为HT与PTC之间的密切关系提供了新的证据,其是否通过影响肿瘤相关炎症信号通路促进HT向PTC演变以及该因子在PTC发生发展的具体作用机制值得更深一步的研究。

### 参考文献 (References)

- 1 Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59(4): 225-49.
- 2 Kim DW, Choo HJ, Lee YJ, Jung SJ, Eom JW, Ha TK. Sonographic features of cervical lymph nodes after thyroidectomy for papillary thyroid carcinoma. *J Ultrasound Med* 2013; 32(7): 1173-80.
- 3 Zhang L, Li H, Ji QH, Zhu YX, Wang ZY, Wang Y, *et al.* The clinical features of papillary thyroid cancer in Hashimoto's thyroiditis patients from an area with a high prevalence of Hashimoto's disease. *BMC Cancer* 2012; 12(1): 610.
- 4 Lee JH, Kim Y, Choi JW, Kim YS. The association between papillary thyroid carcinoma and histologically proven Hashimoto's thyroiditis: A meta-analysis. *Eur J Endocrinol* 2013; 168(3): 343-9.
- 5 Higashitsuji H, Liu Y, Mayer RJ, Fujita J. Extra view the oncoprotein gankyrin negatively regulates both p53 and RB by enhancing proteasomal degradation. *Cell Cycle* 2005; 4(10): 1335-7.
- 6 Higashitsuji H, Higashitsuji H, Liu Y, Masuda T, Fujita T, Abdel-Aziz HI, *et al.* The oncoprotein gankyrin interacts with RelA and suppresses NF-κB activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 363(3): 879-84.
- 7 Carcangiu ML, Chambers JT, Voynick IM, Pirro M, Schwartz PE. Immunohistochemical evaluation of estrogen and progesterone receptor content in 183 patients with endometrial carcinoma. Part I: Clinical and histologic correlations. *Am J Clin Pathol* 1990; 94(3): 247-54.
- 8 杨晶金,姚军,沈峰清,陈佳玉,杨林军,张强,等. Notch-1



- 信号通路及甲状腺乳头状癌的关系. 中国细胞生物学学报 (Yang Jingjin, Yao Jun, Shen Fengqing, Chen Jiayu, Yang Linjun, Zhang Qiang, *et al.* The relationship of Notch-1 signaling pathway with human papillary carcinoma of thyroid. Chinese Journal of Cell Biology) 2012; 34(2): 120-6.
- 9 沈峰清, 姚 军, 杨晶金, 杨林军, 金晓燕, 梁 勇. LKB1在甲状腺乳头状癌中表达及意义. 医学研究杂志 (Shen Fengqing, Yao Jun, Yang Jingjin, Yang Linjun, Jin Xiaoyan, Liang Yong. LKB1 expression in human papillary carcinoma of thyroid and its biological significance. Journal of Medical Research) 2013; 42(1): 26-30.
- 10 赖永锋, 邢 萍, 徐锦叶, 权明明, 金晓燕, 杨晶金, 等. DcR3在甲状腺乳头状癌中的表达及临床意义. 中国细胞生物学学报 (Lai Yongfeng, Xing Ping, Xu Jinye, Quan Mingming, Jin Xiaoyan, Yang Jingjin, *et al.* The clinical significance of DcR3 expression in papillary thyroid carcinoma. Chinese Journal of Cell Biology) 2013; 35(12): 1772-8.
- 11 Liotti F, Visciano C, Melillo RM. Inflammation in thyroid oncogenesis. *Am J Cancer Res* 2012; 2(3): 286-97.
- 12 Lozano G, Zambetti GP. Gankyrin: An intriguing name for a novel regulator of p53 and RB. *Cancer Cell* 2005; 8(1): 3-4.
- 13 Umemura A, Itoh Y, Itoh K, Yamaguchi K, Nakajima T, Higashitsuji H, *et al.* Association of gankyrin protein expression with early clinical stages and insulin-like growth factor-binding protein 5 expression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 47(2): 493-502.
- 14 Kim YH, Kim JH, Choi YW, Lim SK, Yim H, Kang SY, *et al.* Gankyrin is frequently overexpressed in breast cancer and is associated with ErbB2 expression. *Exp Mol Pathol* 2013; 94(2): 360-5.
- 15 Tang S, Yang G, Meng Y, Du R, Li X, Fan R, *et al.* Overexpression of a novel gene gankyrin correlates with the malignant phenotype of colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* 2010; 9(2): 88-95.
- 16 Krzywda S, Brzozowski AM, Higashitsuji H, Fujita J, Welchman R, Dawson S, *et al.* The crystal structure of gankyrin, an oncoprotein found in complexes with cyclin-dependent kinase 4, a 19 S proteasomal ATPase regulator, and the tumor suppressors Rb and p53. *J Biol Chem* 2004; 279(2): 1541-5.
- 17 Dawson S, Higashitsuji H, Wilkinson AJ, Fujita J, Mayer RJ. Gankyrin: A new oncoprotein and regulator of pRb and p53. *Trends Cell Biol* 2006; 16(5): 229-33.
- 18 Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, *et al.* *In vivo* activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 2004; 303(5659): 844-8.
- 19 Park TJ, Kim HS, Byun KH, Jang JJ, Lee YS, Lim IK. Sequential changes in hepatocarcinogenesis induced by diethylnitrosamine plus thioacetamide in Fischer 344 rats: Induction of gankyrin expression in liver fibrosis, pRB degradation in cirrhosis, and methylation of p16INK4a exon 1 in hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog* 2001; 30(3): 138-50.
- 20 Zheng T, Hong X, Wang J, Pei T, Liang Y, Yin D, *et al.* Gankyrin promotes tumor growth and metastasis through activation of IL-6/STAT3 signaling in human cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2014; 59(3): 935-46.