

# 伴淋巴结转移的甲状腺乳头状癌的蛋白质组学研究进展

马 丽, 杜国利\*

新疆医科大学第一附属医院内分泌科, 新疆 乌鲁木齐

收稿日期: 2023年2月13日; 录用日期: 2023年3月8日; 发布日期: 2023年3月15日

## 摘 要

甲状腺癌是内分泌系统最常见的恶性肿瘤, 发病率逐年增加, 但准确的术前诊断甲状腺癌仍然是一个挑战。甲状腺乳头状癌(PTC)是最常见的甲状腺癌, 淋巴结是否转移是选择手术方式的重要参数, 目前尚无理想的快速诊断PTC淋巴结转移的生物标志物。蛋白质组学为解决PTC目前的困境提供了希望, PTC的蛋白质组学研究结果越来越多地用于确定PTC的预后, 提高诊断的准确性, 或者被用作早期诊断标志物。本文详细介绍伴淋巴结转移的PTC的蛋白质组学研究进展。

## 关键词

甲状腺乳头状癌, 蛋白质组学, 淋巴结转移, 早期诊断标记物

# Research Progress of Papillary Thyroid Carcinoma with Lymph Node Metastasis by Proteomics

Li Ma, Guoli Du\*

Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang

Received: Feb. 13<sup>th</sup>, 2023; accepted: Mar. 8<sup>th</sup>, 2023; published: Mar. 15<sup>th</sup>, 2023

## Abstract

Thyroid cancer is the most common malignancy of the endocrine system and its incidence is increasing year by year, but accurate preoperative diagnosis of thyroid cancer remains a challenge.

\*通讯作者。

**Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most common thyroid cancer. Lymph node metastasis is an important parameter in the selection of surgical method. Currently, there is no ideal biomarker for the rapid diagnosis of PTC lymph node metastasis. Proteomics provides hope for solving the current dilemma of PTC. The results of proteomic studies of PTC are increasingly used to determine the prognosis of PTC, improve the accuracy of diagnosis, or be used as markers of early diagnosis. In this paper, advances in proteomics of PTC with lymph node metastasis are reviewed in detail.**

## Keywords

**Papillary Thyroid Carcinoma (PTC), Proteomics, Lymph Node Metastasis, Early Diagnostic Marker**

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

甲状腺癌(Thyroid carcinoma, TC)是人类最常见的内分泌恶性肿瘤,自1990年代中期以来,发病率急剧上升,占癌症诊断个数的2.1% [1]。癌症筛查的广泛实施和颈部超声或其他成像研究的广泛应用是造成这种现象的主要原因[2] [3]。最常见的TC是乳头状甲状腺癌(Papillary thyroid carcinoma, PTC),占全部患者的近80% [4]。尽管大多数PTC遵循惰性疾病过程[5],但仍有一小部分病例表现出更具生物学侵略性的特征,如早期转移和淋巴结受累[6]。PTC的主要转移部位是颈部淋巴结并且淋巴结转移提示疾病复发风险高且生存率低,美国甲状腺协会2015年《成人甲状腺结节和分化型甲状腺癌患者管理指南》建议颈部淋巴结转移是选择手术方式的重要参数[7]。实际上,很难在手术前准确确定PTC患者是否伴有颈部淋巴结转移。中央淋巴结是PTC最常见的淋巴结转移部位[8],然而B超或CT对淋巴结转移的诊断率较低[9],尤其是颈部中央区域淋巴结转移。Ito [10]等人指出超声诊断VI区淋巴结转移的敏感性仅为10.5%,即使在颈部外侧区域,敏感性也仅为27.2%。研究者[11]发现cN0 PTC患者淋巴结转移的真实率为60%~65%,即术前影像学检查未发现颈部淋巴结转移的比例相当大。为了解决这一难题,为了更好地选择最佳治疗方案,有必要在手术前寻找PTC淋巴结转移的生物标志物。

蛋白质被认为是大多数基因的最终基因产物,具有多种功能和三维结构。蛋白质组学的应用是全面分析蛋白质表达和/或丰度差异的可行方法。因此,蛋白质组学有潜力检测与特定表型相关的一组蛋白质,例如癌症。近些年来,随着蛋白质组学技术的快速发展,提供了相应的疾病蛋白质组学研究的技术支持。本文就蛋白质组学在筛选PTC早期诊断淋巴结转移中的应用价值作一综述。

## 2. 蛋白质组学常用技术

### 2.1. 双向差异凝胶电泳技术(Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis, 2D-DIGE)

2D-DIGE基于在等电聚焦之前用花青CyDye DIGE Fluor最小染料直接标记蛋白质上的赖氨酸基团,能够用不同的染料标记2~3个样品,并在同一块2D凝胶上对所有样品进行电泳。此功能可最大限度地减少实验中的光斑图案变异性和凝胶数量,同时提供简单、准确和可重现的光斑匹配。2D-DIGE的优势在于确定疾病样本和对照样本之间差异表达的蛋白质的统计意义。2D-DIGE减少了实验可变性并提高了定量精度,因为两个样品(或样品池)可以在单个2D凝胶上进行比较[12]。因此,可以确定其他方法可能

忽略的表达水平的主要和次要差异。然而, 2D-DIGE 的缺点有不能有效分离低丰度、疏水性、极酸和极碱性、分子量极高或者极低等蛋白。

## 2.2. 高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

高效液相色谱法是在色谱法的基础上进一步发展起来的, 以液体为流动相, 采用高压输注系统, 填充有双分散或双峰型微细或千兆孔固定相的色谱柱有助于流动相和固定相之间的快速传质, 从而可以在很短的时间内实现高分辨率分离[13]。该技术弥补了二维凝胶电泳不能分离疏水性蛋白的缺点, 且可以分离成分复杂的蛋白质样品。

## 2.3. 质谱技术(Mass Spectrometry, MS)

质谱法通常被认为是分离气相中带电物质的仪器技术。带电物质(离子)在离子源中产生。在某些情况下, 离子源还有助于将固相或液相分析物转移到气相中。气相离子随后被转移到质量分析仪中。质量分析仪根据质荷比( $m/z$ )在空间或时间上对离子进行分类。分离的离子由时域中的离子检测器检测[14]。由离子检测器产生的电信号随后被处理以产生质谱[15]。在诸多分析检测方法中, 质谱法被认为是一种高特异性和高灵敏度的通用方法, 已被广泛应用。

## 2.4. 蛋白定量技术

定量蛋白质组学是对一个基因组或复杂的混合系统中表达的所有蛋白质进行准确的定量和鉴定。目前定量蛋白质组学技术被分为标记策略和非标记策略[16], 其中标记策略分为体内标记(如 Stable isotope labeling with amino acids in cell culture, SILAC)和体外标记(如 isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ; Tandem Mass Tag, TMT), 非标记策略为非标记定量(Label free)蛋白质组学技术。

## 2.5. 蛋白质芯片技术

蛋白质芯片技术的机理是对载体进行特殊的化学处理, 然后将已知的蛋白质分子产物(如受体、配体、抗原、抗体、酶、细胞因子等)固定在载体上。根据这些生物分子的特性, 捕获可特异性结合的靶蛋白(存在于渗出液、细胞溶解液、分泌液、血清、血浆、淋巴、间质液、尿液等), 进行洗涤纯化, 确认并进行生化分析。最后, 可以获得重要的信息(如未知的蛋白质成分和序列) [17]。该技术具有高灵敏度, 高准确性和高效率的特点。

# 3. 蛋白质组学在多种转移性 PTC 样本中的研究

目前用于比较 PTC 是否存在淋巴结转移的蛋白质组学生物类型主要有甲状腺细针穿刺标本、肿瘤组织标本和血液标本。

## 3.1. 蛋白质组学在甲状腺细针穿刺标本中的研究

超声引导下细针穿刺活检(FNAB)是首选的组织取样方法[18], 细针穿刺标本操作简单、成本低、侵入性小, 但有时无法获得足够的肿瘤细胞、受血液中蛋白影响大、标本采集误差大, 常难以明确诊断。细针穿刺蛋白质组学分析可以找到潜在的标记物。林鹏等[8]人利用液相色谱串联质谱和质谱法分析筛选微小 PTC 有无淋巴结转移细针抽吸活检样品的蛋白质组学特征, 共对鉴定的 3391 个蛋白质组。生物信息学分析表明, 差异表达蛋白参与多种生物学功能, 转移相关途径。此外, 发现 IFN 刺激的基因 15 蛋白在淋巴结转移患者和非转移性 PTC 患者中有显著不同。用 shRNA 敲低 ISG15 后抑制异种移植肿瘤的生长。此研究为淋巴结转移性 PTC 提供了参考蛋白质组图谱。ISG15 可能是伴有淋巴结转移的 PTC 患者的

早期诊断标志物。Anthony K-C So 等[19]人利用蛋白质组学技术比较转移性和非转移性 PTC, 发现生物素酶在转移性癌中低表达, 同时利用免疫组化验证结果与蛋白质组学一致( $P = 0.001$ ), 这提示生物素酶总表达的缺失是 PTC 转移性的候选标志物。

### 3.2. 蛋白质组学在肿瘤组织标本中的研究

肿瘤组织蛋白丰度高, 可以直接比较分析, 众多学者偏爱标本类型, 但也有创伤性高、成本高、采集误差大的缺点。Martin Nipp 等[20]人采用基质辅助激光解吸/电离成像质谱法比较研究了转移性与非转移性 PTC 的蛋白质谱, 发现了 36 种质荷比蛋白质, 这些蛋白质专门区分转移性和非转移性肿瘤, 鉴定出硫氧还蛋白, S100-A10, S100-A6。此外, 通过免疫组化验证, 发现这三种蛋白的过表达与 PTC 中的淋巴结转移高度相关( $P < 0.005$ )。同时进行了富集通路分析, 并发现了这 3 种蛋白质与 TGF- $\beta$  依赖性上皮-间充质转化途径的密切关系。曹振等[21]人采用直接数据非依赖性采集蛋白质组学方法鉴定有无淋巴结转移的微小 PTC 肿瘤组织的差异蛋白, 结果伴有的淋巴结转移的微小 PTC 的蛋白质组学特征与不伴由淋巴结转移的微小 PTC 的蛋白质组学特征不同。生物信息学分析转移相关的差异蛋白主要富集于与线粒体功能障碍相关的类别中, 并且可能通过激活氧化磷酸化和 PI3K/AKT 信号通路来促进肿瘤进展。对这些差异蛋白的比较分析显示, 与肿瘤转移有明确联系的特定蛋白质的表达下调, 如 SLC25A15, DIRAS2, PLA2R1 和 MTARC1。詹少华等[22]人采用基于串联质谱标签的定量蛋白质组学方法, 对不同程度淋巴结转移的 PTC 肿瘤组织中差异表达的蛋白质进行鉴定。同时在另一个独立的癌症基因组图谱数据集中分析差异表达蛋白及其临床意义, 具有不同程度淋巴结转移的肿瘤组织中的蛋白质谱被清楚区分, 而正常组织中的蛋白谱显著相似。肿瘤组织中差异表达的蛋白质主要富集在与癌症病理特征相关的类别中, 包括细胞外基质、代谢和细胞生长。癌症基因组图谱数据集证实了六种差异表达蛋白(LAMC2、LAMB3、ATP5A1、MYO1G、S100A4 和 FAS)的表达模式。此外, LAMC2 和 MYO1G mRNA 在肿瘤组织中的表达水平升高与不利的变量呈正相关, 包括肿瘤大小较大、淋巴结转移、AJCC 分期高、BRAFV600E 突变和预后不良。戴佳琪等[23]人同样利用蛋白质组学技术筛选出转移性与非转移性 PTC 的差异蛋白, 并与 GEO 和 TCGA 数据集交叉验证差异表达蛋白, 得出 10 种蛋白与转移和分期显著相关。

### 3.3. 蛋白质组学在血液标本中的研究

生物液体标本具有低侵入性或非侵入性、低成本、易获得和广泛应用等特点, 有学者在血液标本中发现 PTC 伴颈部淋巴结转移的特异性标志物。罗丹等[1]人使用蛋白质组学技术比较了来自患有淋巴结转移的 PTC 患者、没有淋巴结转移的患者的血清纯化外泌体的蛋白质组谱。相对于没有淋巴结转移的 PTC 患者的血清外泌体, 发现有淋巴结转移的患者的血清外泌体中有 697 个差异表达蛋白。其中特定蛋白的高表达与癌症细胞的转移有明确的联系, 例如 SRC、TLN1、ITGB2 和 CAPNS1。进行了 Western blot 以检测单个样品中这些蛋白的表达, 与质谱结果一致。另外生物学途径分析表明, 与没有淋巴结转移的 PTC 患者相比, 淋巴结患者的血清外泌体中整合素信号异常激活。

这些发现表明细针穿刺抽吸液标本、肿瘤组织标本及血液标本的蛋白质组学分析可以用于识别与 PTC 是否伴有淋巴结转移相关的蛋白变化, 可用于发现潜在的应用于 PTC 分期分级的标记物, 可用于建立 PTC 蛋白表达谱的诊断模型用于那些细针穿刺细胞诊断不明确的病例术前诊断和疾病的早期诊断。

## 4. 小结

术前诊断 PTC 伴淋巴结转移的临床方法有限。虽然常规细针穿刺分析被认为是对良恶性特征不明确的甲状腺结节最准确、最经济的诊断方法, 但仍有 30%左右的病例不能明确诊断, 导致诸多患者遭受不



必要的手术。临床上,有必要寻找更敏感和可靠的肿瘤早期诊断标志物。理想的生物标志物应具有较高的敏感性和特异性,且使用方便、安全、经济。目前尚无理想的快速诊断 PTC 淋巴结转移的生物标志物。蛋白质组学为解决 PTC 目前的困境提供了希望,但同时 PTC 的蛋白质组学也存在局限性。PTC 的蛋白质组学研究结果被用于确定 PTC 的预后,提高诊断的准确性,或者被用作早期诊断标志物。然而,目前 PTC 的蛋白质组学研究仍存在许多不足,许多偏倚因素和混杂因素未被考虑,导致实验的可重复性较差;如多数的研究未考虑甲状腺组织之间的个体差异给研究结果带来的影响;此外,目前关于 PTC 的蛋白质组学研究均为实验性研究,应考虑进行大规模的前瞻性随机研究,以评估将这些标志物和诊断模型应用于一般人群的意义和可行性。此外,蛋白质组学研究操作复杂,研究成本高,重复性差,因此,蛋白质组学的研究对象仅限于较小的样本范围,多用于基础研究。目前,蛋白质组学在临床应用中仍然存在一定的困难。我们相信,随着研究技术的不断提高,蛋白质组学将为基础研究和临床应用做出巨大贡献。

### 参考文献

- [1] Luo, D., Zhan, S., Xia, W., Huang, L., *et al.* (2018) Proteomics Study of Serum Exosomes from Papillary Thyroid Cancer Patients. *Endocrine-Related Cancer*, **25**, 879-891. <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0547>
- [2] Vaccarella, S., Franceschi, S., Bray, F., *et al.* (2016) Worldwide Thyroid-Cancer Epidemic? The Increasing Impact of Overdiagnosis. *The New England Journal of Medicine*, **375**, 614-617. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1604412>
- [3] Wiest, P.W., Hartshorne, M.F., Inskip, P.D., *et al.* (1998) Thyroid Palpation versus High-Resolution Thyroid Ultrasonography in the Detection of Nodules. *Journal of Ultrasound in Medicine*, **17**, 487-496. <https://doi.org/10.7863/jum.1998.17.8.487>
- [4] Limaiem, F., Rehman, A., Anastasopoulou, C. and Mazzoni, T. (2022) Papillary Thyroid Carcinoma. StatPearls Publishing, Treasure Island.
- [5] Yip, L., Kelly, L., Shuai, Y., *et al.* (2011) MicroRNA Signature Distinguishes the Degree of Aggressiveness of Papillary Thyroid Carcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, **18**, 2035-2041. <https://doi.org/10.1245/s10434-011-1733-0>
- [6] Kuo, E.J., Goffredo, P., Sosa, J.A. and Roman, S.A. (2013) Aggressive Variants of Papillary Thyroid Microcarcinoma Are Associated with Extrathyroidal Spread and Lymph-Node Metastases: A Population-Level Analysis. *Thyroid*, **23**, 1305-1311. <https://doi.org/10.1089/thy.2012.0563>
- [7] Haugen, B.R., Alexander, E.K., Bible, K.C., *et al.* (2016) 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*, **26**, 1-133. <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0020>
- [8] Lin, P., Yao, Z., Sun, Y., Li, W., *et al.* (2019) Deciphering Novel Biomarkers of Lymph Node Metastasis of Thyroid Papillary Microcarcinoma Using Proteomic Analysis of Ultrasound-Guided Fine-Needle Aspiration Biopsy Samples. *Journal of Proteomics*, **204**, Article ID: 103414. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103414>
- [9] Feng, J.W., Ye, J., Wu, W.X., *et al.* (2020) Management of cN0 Papillary Thyroid Microcarcinoma Patients According to Risk-Scoring Model for Central Lymph Node Metastasis and Predictors of Recurrence. *Journal of Endocrinological Investigation*, **43**, 1807-1817. <https://doi.org/10.1007/s40618-020-01326-1>
- [10] Ito, Y., Tomoda, C., Uruno, T., *et al.* (2005) Ultrasonographically and Anatomopathologically Detectable Node Metastases in the Lateral Compartment as Indicators of Worse Relapse-Free Survival in Patients with Papillary Thyroid Carcinoma. *World Journal of Surgery*, **29**, 917-920. <https://doi.org/10.1007/s00268-005-7789-x>
- [11] Anastasilakis, A.D., Polyzos, S.A., Makras, P., *et al.* (2012) Papillary Thyroid Microcarcinoma Presenting as Lymph Node Metastasis—A Diagnostic Challenge: Case Report and Systematic Review of Literature. *Hormones (Athens)*, **11**, 419-427. <https://doi.org/10.14310/horm.2002.1373>
- [12] Tannu, N.S. and Hemby, S.E. (2006) Two-Dimensional Fluorescence Difference Gel Electrophoresis for Comparative Proteomics Profiling. *Nature Protocols*, **1**, 1732-1742. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.256>
- [13] Chen, H. and Horváth, C. (1995) High-Speed High-Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins. *Journal of Chromatography A*, **705**, 3-20. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)01254-C](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)01254-C)
- [14] Rozanova, S., Barkovits, K., Nikolov, M., *et al.* (2021) Quantitative Mass Spectrometry-Based Proteomics: An Overview. *Methods in Molecular Biology*, **2228**, 85-116. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1024-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1024-4_8)
- [15] Urban, P.L. (2016) Quantitative Mass Spectrometry: An Overview. *Philosophical Transactions: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, **374**, Article ID: 20150382. <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0382>

- 
- [16] Pappireddi, N., Martin, L. and Wühr, M. (2019) A Review on Quantitative Multiplexed Proteomics. *ChemBiochem*, **20**, 1210-1224. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800650>
- [17] Layton, C.J., McMahon, P.L. and Greenleaf, W.J. (2019) Large-Scale, Quantitative Protein Assays on a High-Throughput DNA Sequencing Chip. *Molecular Cell*, **73**, 1075-1082.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.02.019>
- [18] Bomeli, S.R., LeBeau, S.O. and Ferris, R.L. (2010) Evaluation of a Thyroid Nodule. *Otolaryngologic Clinics of North America*, **43**, 229-238. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2010.01.002>
- [19] So, A.K., Kaur, J., Kak, I., *et al.* (2012) Biotinidase Is a Novel Marker for Papillary Thyroid Cancer Aggressiveness. *PLOS ONE*, **7**, e40956. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040956>
- [20] Nipp, M., Elsner, M., Balluff, B., *et al.* (2012) S100-A10, Thioredoxin, and S100-A6 as Biomarkers of Papillary Thyroid Carcinoma with Lymph Node Metastasis Identified by MALDI Imaging. *Journal of Molecular Medicine (Berlin)*, **90**, 163-174. <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0815-6>
- [21] Cao, Z., Zhang, Z., Tang, X., *et al.* (2022) Comprehensive Analysis of Tissue Proteomics in Patients with Papillary Thyroid Microcarcinoma Uncovers the Underlying Mechanism of Lymph Node Metastasis and Its Significant Sex Disparities. *Frontiers in Oncology*, **12**, Article ID: 887977. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.887977>
- [22] Zhan, S., Wang, T., Li, J., *et al.* (2022) Asporin Interacts with HER2 to Promote Thyroid Cancer Metastasis via the MAPK/EMT Signaling Pathway. *Frontiers in Oncology*, **12**, Article ID: 762180. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.762180>
- [23] Dai, J., Yu, X., Han, Y., *et al.* (2020) TMT-Labeling Proteomics of Papillary Thyroid Carcinoma Reveal Invasive Biomarkers. *Journal of Cancer*, **11**, 6122-6132. <https://doi.org/10.7150/jca.47290>