

Expression of somatostatin receptor in human thyroid carcinoma

PAN Wei-min^{1,2}, TAN Tian-zhi^{2*}, WU Hua¹, ZHANG Chun², GONG Ri-xiang³,
LIU Wei-ping⁴, SUN Long¹, SU Xin-hui¹, PENG Tian-xing¹, CHEN Gui-bing¹,
LUO Zuo-ming¹, YAN He-ping¹, WEI Ji-hong¹

(1. Department of Nuclear Medicine, the First Hospital of Xiamen, Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Xiamen 361003, China; 2. Department of Nuclear Medicine, 3. Department of Surgery, 4. Department of Pathology, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** To observe the expression of subtype 2 of somatostatin receptor (SSTR2) and other subtypes of somatostatin receptors (SSTRs) in thyroid tumor tissues and the adjacent tissues. **Methods** Oligonucleotide probes against for all types of SSTR and oligonucleotide probes especially against for SSTR2 were designed according to the gene structure of SSTR. The hybridization in situ was performed among both riboprobes and frozen slices of various types of thyroid tumors. The positive signal strength of mRNA expression, intensity of mRNA and signal strength were obtained based on the gray analysis of Mias image analyzer. **Results** The positive signals of SSTR2 were found in the cytoplasm of medullary thyroid carcinoma (MTC) cells and hürthle cell carcinoma (HCC) cells, but not in the cytoplasm, nor in the adjacent tissues of papillary thyroid carcinoma (PTC) and follicular thyroid carcinoma (FTC). The positive signals of SSTRs were found in both cytoplasm and the adjacent tissues of MTC, FTC, PTC and HCC, and the signals in tumor tissue were significantly stronger than those in the adjacent tissues ($P < 0.05$). **Conclusion** SSTR2 is only expressed in the tumor tissues of MTC and HCC. One or more types of SSTRs are expressed in all types of thyroid tumor tissues and the adjacent tissues, although the expression in the former is stronger than that in the latter.

[Key words] Thyroid neoplasms; Somatostatin receptor; In situ hybridization; Receptor scintigraphy

各型甲状腺肿瘤组织中生长抑素受体的表达

潘卫民^{1,2}, 谭天秩^{2*}, 吴 华¹, 张 春², 龚日祥³, 刘卫平⁴, 孙 龙¹, 苏新辉¹,
彭添兴¹, 陈贵兵¹, 罗作明¹, 严和平¹, 魏继红¹

(1. 福建医科大学附属厦门第一医院核医学科, 福建 厦门 361003; 2. 四川大学华西医院核医学科,
3. 普外科, 4. 病理科, 四川 成都 610041)

[摘要] **目的** 用原位杂交方法观察生长抑素受体在甲状腺肿瘤组织及癌旁组织中的表达。 **方法** 根据生长抑素受体 (SSTR) 亚型的基因结构设计两种 cDNA 探针: 针对各型生长抑素受体的寡核苷酸探针以及特异性针对二型生长抑素受体 (SSTR2) 的寡核苷酸探针序列, 并分别与各型甲状腺肿瘤组织及癌旁组织行原位杂交, 采用 Mias 图像分析仪进行灰度分析, mRNA 丰度以信号强度 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行 t 检验。 **结果** 甲状腺髓样癌组织中 SSTR 的表达明显高于癌周组织 ($P < 0.05$), SSTR2 仅在癌组织中有表达。 SSTR 在甲状腺乳头状癌组织中的表达明显高于癌周组织 ($P < 0.05$), SSTR2 在癌组织及癌周组织内均未见有表达。 滤泡性腺癌组织 SSTR 的表达明显高于癌周组织 ($P < 0.05$), 癌组织及癌周组织均未见有 SSTR2 表达。 嗜酸性细胞癌组织 SSTR 的表达明显高于癌周组织 ($P < 0.05$), SSTR2 仅在癌组织中有表达。 **结论** SSTR2 仅在 MTC 及 HCC 的肿瘤组织中有表达; 各型甲状腺肿瘤组织均表达除 SSTR2 之外的其他几型 SSTR 中的一种或数种, 且肿瘤组织中的表达强度明显高于邻近正常组织。 某些靶向生长抑素受体 (尤其是特异性靶向 SSTR2) 的化合物 (配体), 可能成为甲状腺肿瘤尤其是甲状腺髓样癌和嗜酸性细胞癌的特异性显像剂和靶向治疗载体。

[关键词] 甲状腺肿瘤; 生长抑素受体; 原位杂交; 受体显像

[作者简介] 潘卫民 (1966 -), 男, 湖北武汉人, 博士, 副主任医师, 副教授。 现在福建医科大学附属厦门第一医院核医学科工作。 研究方向: 肿瘤受体显像。 E-mail: pwnzj6671@gmail.com

[通讯作者] 谭天秩, 四川大学华西医院核医学科, 610041。 E-mail: ttz@mcwccums.com

[收稿日期] 2008-10-23 [修回日期] 2008-11-27

[中图分类号] R736.1 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2009)06-1085-04

生长抑素(somatostatin)是一种多肽类激素,广泛存在于机体的各种组织,它通过与靶组织细胞膜上的受体作用而发挥各种各样的生理功能^[1-4]。

国外文献报道,目前已克隆出 5 个亚型的生长抑素受体(somatostatin receptor, SSTR),其中,2 型受体与人工合成的生长抑素类似物如奥曲肽等的亲和力最强^[5],而且研究表明,生长抑素受体在很多肿瘤组织中有高表达^[6-11]。但是,对于生长抑素受体各亚型在各型甲状腺肿瘤中的表达情况,特别是 2 型生长抑素受体的表达,国外文献报道不一致^[12-13]。本研究用原位杂交方法观察 2 型生长抑素受体及其他亚型在各型甲状腺肿瘤组织及癌旁组织中的表达情况。

1 资料与方法

1.1 病例资料及标本来源 21 例甲状腺癌患者,其中甲状腺髓样癌(medullary thyroid carcinoma, MTC) 3 例,男 1 例,女 2 例,年龄 39 ~ 66 岁,平均(54.0 ± 13.7)岁;甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC) 8 例,男 3 例,女 5 例,年龄 20 ~ 67 岁,平均(42.8 ± 16.1)岁;甲状腺滤泡性腺癌(follicular thyroid carcinoma, FTC)9 例,男 3 例,女 6 例,年龄 19 ~ 72 岁,平均(41.3 ± 17.1)岁;嗜酸性细胞癌(hürthle cell carcinoma, HCC)1 例,女,67 岁。

甲状腺髓样癌、乳头状癌、滤泡性腺癌及癌旁组织标本均取自华西医院外科,并经病理检查确诊。标本收集后放在液氮中保存。

1.2 主要试剂 胃蛋白酶,预杂交液;寡核苷酸探针杂交液,封闭液,生物素化鼠抗地高辛,过氧化物酶(SABC-POD),生物素化过氧化物酶;多聚赖氨酸,焦碳酸二乙酯(DEPC),柠檬酸。

1.3 探针的设计及合成 根据生长抑素受体的基因结构设计 cDNA 探针。针对各型生长抑素受体的寡核苷酸探针序列:

- (1) 5'-GCAGC CAGCG CGCAC TGGAG GCGGC AGGAC-3';
- (2) 5'-GGGTT CAGAC AGCAG CTCTG CCAAG AAGTA-3';
- (3) 5'-GGATG TGAAA GTCTT CCAGA AGAAA TTCTT-3'。

针对 SSTR2 的寡核苷酸探针序列:

- (1) 5'-AGATG AACGT GAGGA CGGCG TTGCT TGTCA-3';
- (2) 5'-AGCTG CTTCT GCCCC ACTGG TTGCT CCGGA-3';
- (3) 5'-GGAAG CTCTT CTTGA AGTTG TCAGA CAAGA-3'。

两种探针均由武汉博士德生物技术有限公司合成。

1.4 实验方法

1.4.1 冰冻切片的制作 将组织从液氮中取出后,置于含

表 1 MTC 及其癌周组织 SSTR2 与 SSTR 的表达

例号	性别 年龄	癌组织	SSTR2 癌周组织	癌/癌周	癌组织	SSTR 癌周组织	癌/癌周
1	F/39	112	-	-	126	85	1.48
2	F/57	123	-	-	142	76	1.86
3	M/66	145	-	-	156	69	2.26
$\bar{x} \pm s$	-	126.00 ± 13.40	-	-	141.00 ± 12.20	76.60 ± 8.10	-

1/1000 DEPC 的 4% 多聚甲醛/0.1PBS (pH 7.2 ~ 7.4) 固定液中固定 60 min,蒸馏水充分洗涤后切成 20 μm 的冰冻切片。

1.4.2 原位杂交操作步骤 新鲜配制 0.5% H₂O₂ 甲醇室温处理 30 min 以灭活内源性的过氧化物酶;蛋白酶消化以暴露 mRNA 核酸片段,预杂交:在干的杂交盒底部加 2SSC 20 ml(含 DEPC),每张切片上加 20 μl 预杂交液,恒温箱 38℃,3 h;杂交:每张切片上加 20 μl 杂交液,恒温箱 41℃ 杂交过夜;杂交后洗涤:揭去盖玻片,37℃ 左右的 2SSC 洗涤 5 min,2 次;0.5SSC 洗涤 15 min;0.2 SSC 洗 15 min;滴加封闭液:37℃,30 min;滴加生物素化鼠抗地高辛:37℃,60 min;滴加 SABC:37℃,20 min;经 DAB 显色、苏木素复染后,酒精脱水,二甲苯透明,封片。

1.4.3 空白对照 选强表达的组织片,不加含探针的杂交液,其余操作步骤同前。

1.5 图像分析及结果判断 显微镜下观察,细胞核或细胞质中含黄色颗粒或斑块为阳性信号。采用 Mias 图像分析仪进行灰度分析,每张切片随机扫描 6 个视野,得到每张切片的平均目标灰度值。阳性信号强度 = 256 - 平均目标灰度值,即目标的平均灰度值越小,mRNA 表达的阳性强度越大。

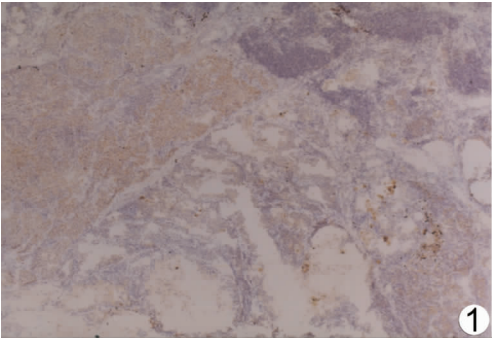


图 1 MTC 中 SSTR2 的表达 示癌细胞中含阳性表达信号:黄色颗粒或斑块(DAB + 苏木精染色,12 × 3.5)

1.6 统计学处理 mRNA 丰度以信号强度 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行 t 检验。

2 结果

表 2 FTC 及其癌周组织 SSTR 的表达

例号	性别/年龄	癌组织	癌周组织	癌/癌周
1	F/20	145	120	1. 21
2	F/24	136	101	1. 34
3	F/39	154	106	1. 45
4	F/42	138	121	1. 14
5	F/55	129	111	1. 16
6	M/39	168	106	1. 58
7	M/56	182	131	1. 38
8	M/67	124	109	1. 13
$\bar{x} \pm s$	-	147. 00 ± 19. 90	114. 70 ± 10. 01	-

2. 1 镜下观察 SSTR2:MTC 的癌细胞胞浆中见阳性信号,而 PTC、FTC 及其癌旁组织中均未见阳性信号;SSTRs: MTC、FTC、PTC 的癌细胞胞浆中均见阳性信号。

2. 2 MTC 癌组织中 SSTR2 及 SSTR 受体 mRNA 的表达 对 3 例患者的癌组织及癌周组织分别作 SSTR2 及 SSTR 原位杂交,结果表明:SSTR 的表达,癌组织明显高于癌周组织 ($P < 0. 05$);SSTR2 仅在癌组织中有表达 (表 1,图 1、2)。

2. 3 FTC 组织中 SSTR2 及 SSTR 受体 mRNA 的表达 对 8 例患者的癌组织及癌周组织分别作原位杂交,癌组织 SSTR 的表达明显高于癌周组织 ($P < 0. 05$,图 4);癌组织及癌周组织均未见有 SSTR2 表达 (表 2)。

2. 4 PTC 组织中 SSTR2 及 SSTR 受体 mRNA 的表达 对 9 例患者的癌组织及癌周组织分别作原位杂交,癌组织 SSTR 的表达明显高于癌周组织 ($P < 0. 05$);癌组织及癌周组织均未见有 SSTR2 表达 (表 3,图 3)。

2. 5 HCC 组织中 SSTR2 及 SSTR 受体 mRNA 的表达 对 1 例患者的癌组织及癌周组织分别作 SSTR2 及 SSTR 原位杂交,癌组织 SSTR 表达明显高于癌周组织 ($P < 0. 05$);SSTR2 仅在癌组织中有表达 (图 5)。

3 讨论

对于甲状腺乳头状癌和甲状腺滤泡型癌等分化型甲状腺癌患者,手术切除后的放射性碘去除治疗是一个重要的治疗手段。¹³¹I 全身扫描对于检测残留肿瘤组织和转移灶很有价值。由于甲状腺髓样癌和大多数嗜酸性细胞癌的癌细胞不能摄碘,使得¹³¹I 全身扫描及放射性碘去除治疗对其几乎没有价值,且后二者的临床分期及分级诊断也往往较为困难。

在 5 种亚型的 SSTR 中,SSTR2 与人工合成的生长抑素类似物如^{99m}Tc-Octreotid 及^{99m}Tc-RC-160 等的亲和力最强,其次为 SSTR3 和 SSTR5,而 SSTR1 和 SSTR4 的亲和力最低。但是,对于生长抑素受体各亚型,特别是 2 型受体在各型甲状腺肿瘤中的表达情况,文献报道不一致^[5]。Forssell-

Aronsson 等^[13]通过测定铟 [¹¹¹In] 标记的奥曲肽在各组织中的浓度以及肿瘤与血液中的比值,发现所有类型的甲状腺肿瘤都有 SSTR1、3、4、5 表达,而 2 型生长抑素受体在大多数甲状腺髓样癌细胞中有稳定表达,在嗜酸性细胞瘤和嗜酸性细胞癌细胞中有不稳定表达,在甲状腺乳头状癌和甲状

表 3 PTC 及其癌周组织 SSTR 的表达

例号	性别/年龄	癌组织	癌周组织	癌/癌周
1	F/19	149	113	1. 32
2	F/25	133	105	1. 26
3	F/36	148	112	1. 31
4	F/41	137	111	1. 23
5	F/47	134	104	1. 28
6	F/59	156	103	1. 52
7	M/26	168	119	1. 41
8	M/47	153	122	1. 25
9	M/72	169	126	1. 34
$\bar{x} \pm s$	-	149. 60 ± 13. 60	115. 00 ± 8. 50	-

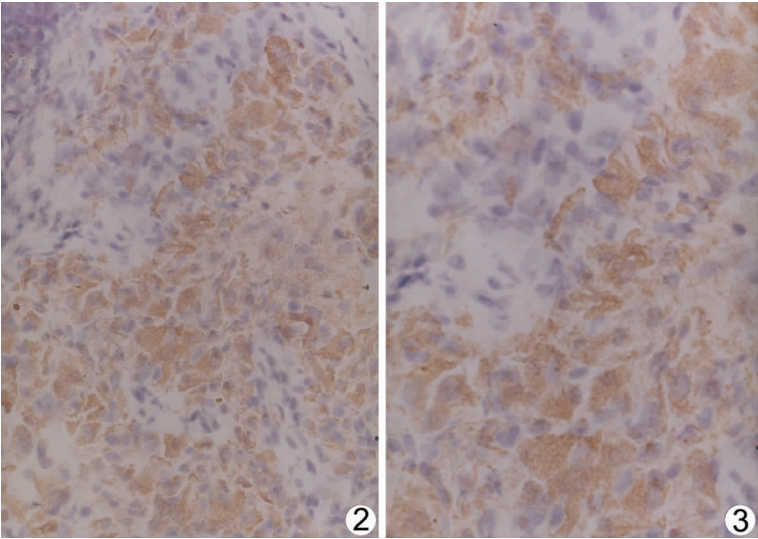


图 2 MTC 中 SSTR 的表达 高倍视野下示 MTC 癌组织中 SSTR 的表达高于癌周组织 (DAB + 苏木精染色,89 × 3. 5) 图 3 乳突状癌 SSTR 的表达 在 PTC 癌组织中有 SSTR 的表达,癌组织中含黄色颗粒或斑块之阳性表达信号 (DAB + 苏木精染色,132 × 3. 5)

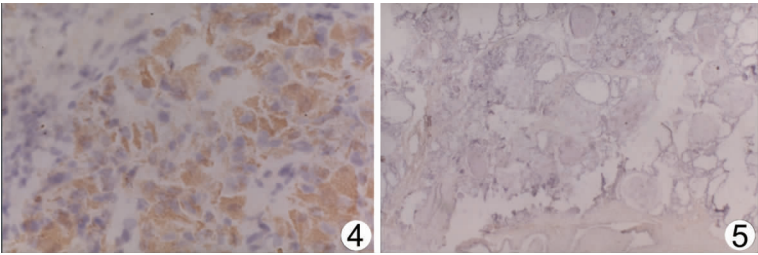


图 4 滤泡癌组织中 SSTR 的表达 高倍视野下示 FTC 癌组织中 SSTR 的表达 (DAB + 苏木精染色,151 × 3. 5) 图 5 HCC 中 SSTR2 的表达 HCC 癌组织中有 SSTR2 表达,低倍视野下示癌细胞中含黄色颗粒阳性表达信号 (DAB + 苏木精染色,10 × 3. 5)

腺滤泡型癌中没有表达。但是,他们随后又发现,用核糖核酸酶保护分析法,在所有类型的甲状腺肿瘤组织中都能检测到 SSTR2。

本研究采用针对 SSTR2 的 mRNA 特异序列的 cDNA 探针和针对各型受体 mRNA 共有序列的 cDNA 探针这两种探针,分别检测各型甲状腺肿瘤组织、癌旁组织及正常甲状腺组织的表达情况,发现 SSTR2 仅在 MTC 及 HCC 的肿瘤组织中有表达,而其他各型甲状腺肿瘤组织均表达除 SSTR2 之外的其他几型 SSTR 中的一种或数种,且肿瘤组织中的表达强度明显高于癌旁组织和正常组织。这表明生长抑素受体显像对各型甲状腺肿瘤都有较高的敏感性,而某些具有亚型特异性的生长抑素类似物作为显像剂,对甲状腺髓样癌和嗜酸性细胞癌将会有更高的特异性。另一方面,如能合成既具有一定的亚型特异性(与 SSTR2 有高亲和性)又含有络氨酸而易被治疗核素¹³¹I 标记的生长抑素类似物,则可能成为有价值的甲状腺髓样癌和嗜酸性细胞癌的靶向性核素治疗载体。

[参考文献]

- [1] Granata R, Trovato L, Destefanis S, et al. H9c2 cardiac muscle cells express all somatostatin receptor subtypes. *Journal of Endocrinological Investigation*, 2004, 27(9): RC24-27.
- [2] Kumar U. Expression of somatostatin receptor subtypes (SSTR1-5) in Alzheimer's disease brain: an immunohistochemical analysis. *Neuroscience*, 2005, 134(2): 525-538.
- [3] Zatelli MC, degli Uberti EC. Somatostatin signal transduction in thyroid parafollicular C cells. *Journal of Endocrinological Investigation*, 2004, 27(6 Suppl): 168-170.
- [4] Kimura N, Schindler M, Kasai N, et al. Immunohistochemical localization of somatostatin receptor type 2A in rat and human tissues. *Endocrine Journal*, 2001, 48(1): 95-102.
- [5] Selmer I, Schindler M, Allen JP, et al. Advances in understanding neuronal somatostatin receptors. *Regul Pept*, 2000, 90(1-3): 1-18.
- [6] Qiu CZ, Wang C, Huang ZX, et al. Relationship between somatostatin receptor subtype expression and clinicopathology, Ki-67, Bcl-2 and p53 in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 2006, 12(13): 2011-2015.
- [7] Kumar U, Grigorakis SI, Watt HL, et al. Somatostatin receptors in primary human breast cancer: quantitative analysis of mRNA for subtypes 1-5 and correlation with receptor protein expression and tumor pathology. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2005, 92(2): 175-186.
- [8] Reynaert H, Rombouts K, Vandermonde A, et al. Expression of somatostatin receptors in normal and cirrhotic human liver and in hepatocellular carcinoma. *Gut*, 2004, 53(8): 1180-1189.
- [9] Reynaert H, Rombouts K, Vandermonde A, et al. Localization and mRNA expression of somatostatin receptor subtypes in human prostatic tissue and prostate cancer cell lines. *Urologic Oncology*, 2002, 7(3): 91-98.
- [10] Hansson J, Bjartell A, Gadaleanu V, et al. Expression of somatostatin receptor subtypes 2 and 4 in human benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer. *Prostate*, 2002, 53(1): 50-59.
- [11] Klisovic DD, O'Dorisio MS, Katz SE, et al. Somatostatin receptor gene expression in human ocular tissues: RT-PCR and immunohistochemical study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2001, 42(10): 2193-2201.
- [12] Zatelli MC, Tagliati F, Taylor JE, et al. Somatostatin receptor subtypes 2 and 5 differentially affect proliferation in vitro of the human medullary thyroid carcinoma cell line tt. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2001, 86(5): 2161-2169.
- [13] Forssell-Aronsson EB, Nilsson O, Bejgard SA, et al. ¹¹¹In-DTPA-D-Phe1-Octreotide binding and somatostatin receptor subtypes in thyroid tumors. *J Nucl Med*, 2000, 41(4): 636-642.