

Relation between E-cadherin expressions in papillary thyroid carcinoma with some prognostic factors

Jalali Nadoushan MR.* MD, Davati A.¹ MD, Hassanpour M.² MD

*Department of Pathology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

¹Department of Social Medicine and Health, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

²School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

Abstract

Aims: Thyroid cancer is the most common endocrine malignancy; and papillary carcinoma is the most common thyroid cancer. There are different biologic markers which are used for prognosis determination one of which is a cell binding molecule, E-cadherin. . The purpose of this study was to determine the frequency of E-cadherin expression in papillary thyroid cancer and its relation with gender, tumor size, and lymph nodes involvement.

Methods: This study was performed on 73 tissue samples from patients with papillary thyroid cancer who referred to Mostafa Khomeini Hospital in Tehran, Iran (2005- 2008). The method of staining for determination of E-cadherin expression was immunohistochemistry. We evaluated the size of tumor, lymph nodes involvement, and their relation with E-cadherin expression.

Results: The mean age was 41.85 ± 16.65 years. 67% of samples were positive for E-cadherin and 21.9% had lymph nodes involvement. The mean size of patients' tumor was 3.86 ± 2.38 cm. There was not any significant relationship between E-cadherin expression and tumor size and gender but there was a significant and reverse relationship between E-cadherin expression and lymph nodes involvement ($P < 0.05$).

Conclusion: Concerning the role of the E-cadherin in patient prognosis, it seems that as proportion of E-cadherin decreases in tumor cells, the probability of lymph nodes involvement increases. More studies in this area with patients' follow-up are recommended.

Keywords: Prognosis, Cadherinz, Papillary Carcinoma Thyroid

بررسی ارتباط بین بیان پروتئین ای - کادهرین در کارسینوم پاپیلری تیروئید با برخی عوامل مؤثر بر پیش‌آگهی آن

محمد رضا جلالی ندوشن * MD

گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

علی دواتی MD

گروه بهداشت و پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

مهری حسن پور MD

دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

چکیده

اهداف: سرطان تیروئید شایع‌ترین بدخیمی اندوکراین و کارسینوم پاپیلری شایع‌ترین سرطان تیروئید است. مارکرهای بیولوژیک مختلفی از جمله E-کادهرین که یک پروتئین اتصال سلولی است در تعیین پیش‌آگهی بیماران مورد استفاده می‌باشد. هدف از انجام این مطالعه تعیین فراوانی بیان ای-کادهرین در سرطان تیروئید و ارتباط آن با برخی عوامل مؤثر بر پیش‌آگهی بود.

روش‌ها: این بررسی بر روی ۷۳ نمونه بیماران مبتلا به سرطان پاپیلری تیروئید (۱۳۸۷-۱۳۸۴) مراجعه کننده به بیمارستان شهید مصطفی خمینی تهران انجام گرفت. از روش رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی برای بررسی بیان ای-کادهرین استفاده شد. اندازه تومور، درگیری غدد لنفاوی و رنگ پذیری با ای-کادهرین تعیین شد.

یافته‌ها: میانگین سنی بیماران $۱۶/۶۵ \pm ۴۱/۸۵$ سال بود. ۶۷٪ نمونه‌ها از نظر ای-کادهرین مثبت بودند و ۲۱/۹٪ از بیماران درگیری غدد لنفاوی داشتند. میانگین اندازه تومور، $۲/۳۸ \pm ۳/۸۶$ سانتی متر بود. بین بیان ای-کادهرین و جنس و اندازه تومور ارتباط معناداری به دست نیامده اما بین بیان ای-کادهرین و درگیری غدد لنفاوی، ارتباط معنادار معکوس وجود داشت ($p < ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: در مورد نقش ای-کادهرین در پیش‌آگهی بیماری، به نظر می‌رسد که هرچه میزان بیان ای-کادهرین در تومور کمتر شود، درگیری غدد لنفاوی افزایش می‌یابد و در این زمینه پی‌گیری بیماران توصیه می‌شود. **کلید واژه‌ها:** پیش‌آگهی، کادهرین‌ها، کارسینوم پاپیلری تیروئید

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۵

*نویسنده مسئول: Jalalindooshan@yahoo.com

مقدمه

سرطان تمایز یافته تیروئید ۱-۲٪ بدخیمی‌های انسان را شامل می‌شود و بروز سالانه آن برای زن‌ها ۲-۳/۸ و در مردها ۲/۶-۱/۲ در هر ۱۰۰۰۰۰ تخمین زده می‌شود که شیوع آن در دهه‌های اخیر افزایش یافته است [۱]. شایع‌ترین فرم سرطان تیروئید کارسینوم پاپیلری است که در مقایسه با نوع دیگر تمایز یافته یعنی کارسینوم فولیکولر شیوع آن در سال‌های اخیر به طور معناداری

افزایش یافته است [۲]. پیش‌آگهی بیماران بستگی به اندازه تومور، جنس، سن بیمار در زمان تشخیص، وجود متاستاز در عقده لنفاوی، تهاجم به کپسول و گسترش به سایر نسوج دارد [۳]. خانواده‌های متعددی از مولکول‌های چسبندگی شامل کادهرین‌ها، اینتگرین‌ها، مولکول‌های چسبندگی مرتبط با خانواده ایمونوگلوبولین‌ها و سلکتین شناخته شده‌اند که در فرآیند متاستاز می‌توانند مؤثر باشند. براساس یک فرضیه فقدان یا کاهش بیان این مولکول‌ها موجب افزایش متاستاز می‌گردد. از این رو می‌توان از این مولکول‌ها به عنوان مارکر متاستاز و در نتیجه پیش‌آگهی بد استفاده کرد [۴، ۷].

از جمله مولکول‌های چسبندگی سلولی، کادهرین‌ها هستند. ای-کادهرین از پروتئین‌های متعلق به خانواده مولکول‌های اتصال سلولی وابسته به کلسیم هست که در تمایز و ساختمان بافتی نقش دارد [۴، ۵]. کمبود ای-کادهرین در پیشرفت تومور بسیار مؤثر است و کمبود آن شاید با تهاجم بسیاری از تومورهای انسانی مرتبط باشد. سلول‌های بدن در نقاط مختلف بدن رنگ پذیری و بروز یکنواخت ای-کادهرین را به شکل رنگ پذیری غشاء سلولی نشان می‌دهند. عملکرد ای-کادهرین وابسته به مولکول کاتنین است که ۳ جزء آلفا، بتا و لامبدا دارد [۸، ۵].

ژن ای-کادهرین روی کروموزوم ۱۶ q۲۲ قرار دارد و وزن آن ۱۲۰ کیلوالتون است [۹]. کمپلکس زیر غشایی کادهرین‌ها به همراه سایر پروتئین‌ها در شکل‌گیری اسکلت سلول نقش دارند. نه تنها ای-کادهرین حرکت سلولی را محدود می‌کند، بلکه رونویسی فاکتور بتاکاتنین که فاکتور مهمی در تکثیر است را نیز مهار می‌کند [۸].

ای-کادهرین نقش محوری در ساخت اپی‌تلیوم اولیه در طی نمو ایفا می‌کند و کاهش تنظیم آن با متاستاز کارسینوم‌ها مرتبط می‌باشد [۹، ۱۰].

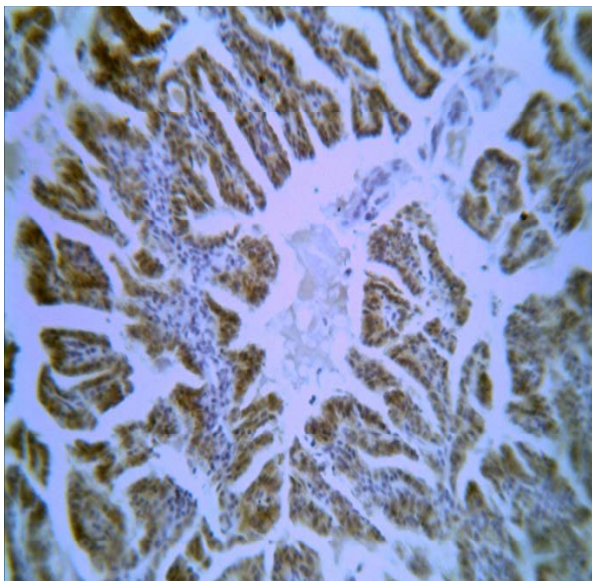
اکثر مطالعات انجام شده از جمله مطالعه ای که توسط لیا ولوکوجی انجام شده بیانگر ارتباط معکوسی بین بیان ای-کادهرین و متاستاز به غدد لنفاوی گردنی است [۱۱، ۱۲]. ولی مطالعه دیگری که توسط اسلاوینسکا انجام شده است بیانگر عدم امکان پیش‌بینی متاستاز با بیان ای-کادهرین در سلول‌های تومورال می‌باشد [۱۳].

از این رو در این مطالعه ارتباط میان بیان ای-کادهرین و فاکتورهای اندازه تومور و متاستاز به غده لنفاوی بعنوان فاکتورهای مهم در پیش‌آگهی، مورد ارزیابی قرار گرفت.

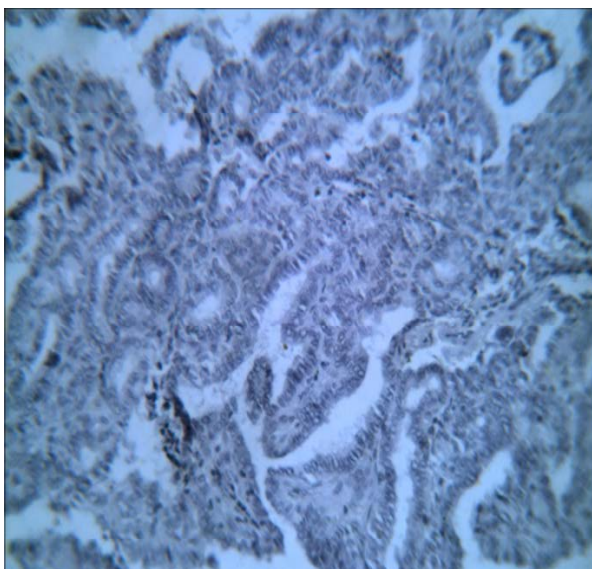
روش‌ها

این مطالعه از نوع توصیفی و مقطعی بر روی ۷۳ نمونه بیمار که شامل کلیه بیماران مراجعه کننده به بیمارستان شهید مصطفی خمینی تهران از سال ۱۳۸۴ تا ۱۳۸۷ که با تشخیص نهایی سرطان پاپیلری تیروئید بستری

مثبت از نظر-کادهرین تعیین گردید (شکل ۱ الف وب). لازم به ذکر است شمارش سلولها بدون اطلاع از سایر فاکتوره شامل جنس، اندازه تومور و متاستاز به عقده لنفاوی انجام گردید.



شکل ۱ الف) بیان مثبت ای-کادهرین در سلول های تومورال در تومور با نمای پاپیلاری



شکل ۱ ب) عدم بیان مارکر مورد بررسی در سلول های تومورال

بعد از جمع آوری اطلاعات با نرم افزار آماری SPSS و آزمون های کای دو و من ویتنی و سایر آزمون های مربوطه، تجزیه و تحلیل صورت گرفت. در تمام بررسی ها، $p < 0.05$ به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد.

نتایج

این مطالعه بر روی ۷۳ نمونه سرطان پاپیلری تیروئید صورت گرفت. میانگین سنی افراد مورد مطالعه $41/85 \pm 16/65$ سال

گردیده بودند انجام گردید. اطلاعات دموگرافیک مربوط به سن و جنس از پرونده بیماران استخراج شد. سپس نمونه های حاصل از جراحی تیروئیدکتومی و برداشت عقده های لنفاوی گردنی، برش داده شد و مشخصات ماکروسکوپی به ویژه اندازه تومور (قطر حداکثر) تعیین گردید. سپس برش هایی با ضخامت ۲ میلی متر از مناطق مختلف تومور و تمام عقده های لنفاوی گردنی تهیه شده و پردازش بافتی به روش اتوماتیک با دستگاه پردازنده بافت صورت گرفته است (Leica, Germany). پس از پردازش بافت از نمونه ها بلوک پارافینی تهیه گردید و از بلوک های پارافینی برش های سه میکرونی تهیه شد و با رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین تشخیص نوع تومور و میزان متاستاز به عقده لنفاوی داده شد.

علاوه بر این یک برش با ضخامت ۳ میکرون طی مراحل زیر جهت بررسی ای-کادهرین به وسیله روش ایمنوهیستوشیمی رنگ آمیزی گردید. ابتدا به مدت یک ساعت لام در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. بعد از ذوب پارافین، لام ها در سه ظرف گزیلول، هر کدام به مدت ده دقیقه و پس از آن در سه ظرف الکل به غلظت های ۱۰۰، ۹۶، و ۷۰٪ و در هر ظرف به مدت پنج دقیقه گذاشته شدند. سپس روی لام ها پراکسید هیدروژن سه درصد به مدت ده دقیقه ریخته و با آب شستشو داده شدند. در مرحله بعد روی لام ها بافر سترات با pH: ۶ ریخته و در اتوکلاو ۱۲۶ درجه سانتی گراد و فشار ۱۵ اتمسفر به مدت یک دقیقه قرار داده شد. پس از شستشوی لام ها با بافر TBS با pH: ۷/۲-۷/۶ یک قطره محلول بلوک پراکسیداز روی لام ها ریخته و بعد از گذشت پنج دقیقه، دو بار لام ها با بافر TBS و هر بار به مدت پنج دقیقه، شستشو داده شدند. بعد از این زمان، سطح لام ها را با محلول بلوک کننده پروتئین به مدت پنج دقیقه پوشانده شده و بعد از این مدت مجدداً دو بار و هر بار سطح لام ها به مدت پنج دقیقه با بافر TBS شستشو داده شدند. این اعمال جهت حذف آنتی بادی های اضافی می باشد. در مرحله بعد، سطح لام ها را با آنتی بادی ای-کادهرین پوشانده و به مدت یک ساعت آنتی بادی روی بافت نگه داشته شد. بعد از این زمان، سطح لام دو بار و هر بار پنج دقیقه با بافر TBS شستشو داده شدند. سپس، لام ها در رنگ هماتوکسیلین به مدت یک دقیقه قرار داده شدند و نهایتاً مرحله آب گیری بافت ها با الکل به غلظت ۷۰، ۹۶ و ۱۰۰٪ انجام گردید. سپس لام ها را در دو ظرف گزیلول قرار داده و شفاف کردن لام ها صورت گرفت. سپس نمونه ها از نظر مثبت بودن ای-کادهرین با میکروسکوپ نوری بررسی شدند. به وسیله میکروسکوپ نوری، در پرسلولترین کانون بدون نکروز و خونریزی ۱۰۰۰ سلول تومورال شمارش گردیده و درصد سلول های تومورال

بود، جوان ترین بیمار ۱۳ سال و مسن ترین آن ها ۸۰ سال داشت. از نظر فراوانی جنسی ۶۵ نفر زن (۸۹٪) و ۸ نفر (۱۱٪) مرد بودند.

در بررسی انجام شده در مورد اندازه تومور، میانگین حداکثر قطر تومور افراد مورد مطالعه $3/86 \pm 2/38$ سانتی متر بود، کمترین اندازه قطر تومور ۱ سانتی متر و بیشترین قطر ۱۴ سانتی متر بود. از نظر درگیری غدد لنفاوی، ۵۷ نفر (۷۸/۱٪) بدون متاستاز به غدد لنفاوی بودند و ۱۶ نفر (۲۱/۹٪) متاستاز غدد لنفاوی داشتند.

نتیجه بررسی نشان داده که بیان ای-کادهرین در ۶۷٪ نمونه ها مثبت و در ۳۳٪ مابقی منفی بود. اندازه تومور در گروه ای-کادهرین مثبت $3/3 \pm 3/66$ و در گروه ای-کادهرین منفی $2/1 \pm 4/46$ بود.

آزمون من ویتنی نشان داد که ارتباط معنی داری بین بیان ای-کادهرین و اندازه تومور وجود ندارد. همچنین با کمک آزمون کای دو بین بیان ای-کادهرین و جنس بیماران ارتباط معنی داری یافت نشد ولی ارتباط معنی داری بین بیان ای-کادهرین و درگیری غدد لنفاوی وجود داشت ($P < 0/05$). فراوانی بیان ای-کادهرین بر اساس غدد لنفاوی درگیر و جنسیت در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

جدول (۱) فراوانی وجود ای-کادهرین بر اساس غدد لنفاوی درگیر و جنس

	ای-کادهرین	مثبت	منفی
غدد لنفاوی	با متاستاز	۴	۱۲
	بدون متاستاز	۴۵	۱۲
جنسیت	مرد	۴	۴
	زن	۴۵	۲۰

بحث

مطالعه حاضر بر روی ۷۳ نمونه از سرطان پاپیلری تیروئید انجام گردیده است. نتایج حاصل از آنالیز آماری نشان داد که بین جنس و اندازه تومور با بروز ای-کادهرین ارتباط معنی داری وجود ندارد. اما بین بروز آن و درگیری غدد لنفاوی ارتباط معنی داری وجود داشت. بروز ای-کادهرین در ۶۷٪ نمونه ها مثبت و در ۳۳٪ نمونه ها بروز ای-کادهرین منفی بود.

در مطالعه ای که توسط لیا وای انجام گردید ۴۲ بیمار سرطان فولیکولر تیروئید و ۵۴ سرطان پاپیلری تیروئید از لحاظ بیان ای-کادهرین به وسیله رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی ارزیابی شدند. نتایج نشان داد میزان بیان ای-کادهرین در سرطان پاپیلری متاستاتیک نسبت به نوع بدون متاستاز کمتر است که در مطالعه ما نیز چنین ارتباط معنی داری بین بیان ای-کادهرین و متاستاز به غدد لنفاوی یافت شد [۱۱].

در مطالعه دیگری که توسط نیکیل بی انجام شد، ۴۷

بیمار سرطان پاپیلری تیروئید و ۱۱ بیمار گواتر ارزیابی شدند. روش رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی بود. این مطالعه نشان داد که میزان بروز ای-کادهرین در سرطان پاپیلری اولیه ۹۱٪ و در سرطان پاپیلری متاستاتیک ۵٪ بوده که این مسئله نشان می دهد که متاستاز با کاهش بیان ای-کادهرین ارتباط دارد که یافته های حاصل از مطالعه ما نیز چنین بوده است [۱۴].

در مطالعه دیگری که توسط لاکو جی و همکارانش انجام شد ۸۴ بیمار مبتلا به سرطان پاپیلری تیروئید مورد ارزیابی قرار گرفتند که نتایج این مطالعه نیز نشان می دهد که عدم بیان ای-کادهرین در تومورهای با درجه تمایز کمتر دیده شد و بین کاهش بیان یا عدم بیان ای-کادهرین و گسترش لنفاوی تومور و متاستاز دور دست ارتباط معناداری وجود داشت که این مسئله نتایج حاصل از مطالعه ما را تأیید می کند [۱۲].

مطالعه دیگری تحت عنوان ارزش پیش آگهی ای-کادهرین انجام شده است. در این مطالعه ۱۱۳ بیمار که به دلیل سرطان پاپیلری تیروئید جراحی شدند درگیری غدد لنفاوی و متاستاز با کاهش بیان یا عدم بیان ای-کادهرین ارتباط معنی داری داشت که این مسئله نتایج حاصل از مطالعه ما را تأیید می کند [۱۵].

مطالعه دیگری نیز توسط شوآمام جی انجام شد نتایج نشان داد که بیان ای-کادهرین در بافت نرمال تیروئید بالا اما در سرطان های تمایز یافته کم و در سرطان های غیر تمایز یافته وجود نداشت [۱۶].

در مطالعه دیگری که توسط اسلاوینسکا انجام شده است تعداد ۱۲۲ نمونه از انواع تومورهای تیروئید مورد بررسی قرار گرفته اند. نتیجه مطالعه این بوده است که استفاده از ای-کادهرین برای پیش بینی احتمال متاستاز کمک کننده نیست که این نتیجه گیری با مطالعه ما همخوانی ندارد. از آن جا که تومورهای مختلف تیروئید مشی بیولوژیک متفاوت با هم دارند و در این مطالعه یک نتیجه گیری کلی شده است این نتیجه نمی تواند نتیجه مطالعه ما را نقض نماید [۱۳].

با توجه به اینکه در تمام مطالعات ذکر شده بین متاستاز به غده لنفاوی و بروز ای-کادهرین ارتباط معنی دار وجود دارد، ولی مزیت مطالعه ما در این است که ارتباط با اندازه تومور را نیز بررسی نموده که بیانگر عدم ارتباط است. به نظر می رسد بیان ای-کادهرین می تواند نقش کلیدی در متاستاز داشته باشد و در صورتی که بیان آن در تومور کاهش نیابد، علی رغم افزایش اندازه تومور احتمال متاستاز افزایش نمی یابد.

از آن جا که ای-کادهرین یک مولکول چسبندگی است، تغییر در بیان آن می تواند همراه با اختلال در چسبندگی سلول ها به یکدیگر و در نتیجه امکان جدا شدن سلول تومورال از توده اصلی و تهاجم آن به عروق لنفاوی و

7- Erdem H, Gündogdu C, Sipal S. Correlation of E-cadherin, VEGF, COX-2 expression to prognostic parameters in papillary thyroid carcinoma. *Exp Mol Pathol*. 2011;90(3):312-7.

8- Nathke IS, Hinck L, Swedlow JR, Papkoff J, and Nelson WJ. Defining interactions and distributions of cadherin and catenin complexes in polarized epithelial cells. *J Cell Biol*. 1994; 125(6):1341-52.

9- Chen CL, Liu SS, Ip SM, Wong LC, Ng TY, Ngan HY. E-cadherin expression is silenced by DNA methylation in cervical cancer cell lines and tumours. *Eur J Cancer*. 2003; 39(4):517-23.

10- Poser I, Dominguez D, de Herreros AG, Varnai A, Buettner R, Bosserhoff AK. Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail. *J Biol Chem*. 2001; 276(27):24661-6.

11- Liu Y, Jiang C, Tan Y. [Pathological study on the expression of cell adhesion molecules and metastasis suppressor gene in thyroid follicular carcinoma and papillary carcinoma]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 2002; 31(4):322-6.

12- Laco J, Ryska A, Cap J, Celakovsky P. Expression of galectin-3, cytokeratin 19, neural cell adhesion molecule and E-cadherin in certain variants of papillary thyroid carcinoma. *Cesk Patol*. 2008; 44(4):103-7.

13- Slowinska-Klencka D, Sporny S, Stasikowska-Kanicka O, Popowicz B, Klencki M. E-cadherin expression is more associated with histopathological type of thyroid cancer than with the metastatic potential of tumors. *Folia Histochem Cytobiol*. 2012;50(4):519-26.

14- Nikiel B, Chekan M, Jaworska M, Jarzab M, Maksymiuk B, Lange D. [Expression of the selected adhesive molecules (cadherin E, CD44, LGAL3 and CA50) in papillary thyroid carcinoma]. *Endokrynol Pol*. 2006;57(4):326-35.

15- Walgenbach S, Sternheim E, Bittinger F, Gorges R, Andreas J, Junginger T. [Prognostic value of e-cadherin in papillary thyroid carcinoma]. *Chirurg*. 1998; 69(2):186-90.

16- Scheumman GF, Hoang-Vu C, Cetin Y, et al. Clinical significance of E-cadherin as a prognostic marker in thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80(7):2168-72.

متاستاز به عقده لنفاوی فراهم گردد.

نتیجه گیری

ای-کاده‌رین می‌تواند مارکر مؤثری جهت تعیین پیش بینی احتمال متاستاز به عقده های لنفاوی و پیش آگهی سرطان پاپیلری تیروئید باشد. به طوری که کاهش بیان ای-کاده‌رین باعث افزایش احتمال متاستاز به عقده لنفاوی می‌گردد. از این رو انجام مطالعات آینده نگر پیگیری بیماران از لحاظ عود و متاستاز می‌تواند نتایج بهتری را نشان دهد.

تشکر و قدردانی: این مقاله حاصل پایان نامه دانشجویی مصوب شورای پژوهشی دانشگاه شاهد می‌باشد.

منابع:

1- Agate L, Lorusso L, Elisei R. New and old knowledge on differentiated thyroid cancer epidemiology and risk factors. *J Endocrinol Invest*. 2012;35(6 Suppl):3-9.

2- Ceresini G, Corcione L, Michiara M, Sgargi P, Teresi G, Gilli A, et al. Thyroid cancer incidence by histological type and related variants in a mildly iodine-deficient area of Northern Italy, 1998 to 2009. *Cancer*. 2012 ;118(22):5473-80.

3- Geraldo MV, Fuziwara CS, Friguglietti CU, Costa RB, Kulcsar MA, Yamashita AS, et al. MicroRNAs miR-146-5p and let-7f as prognostic tools for aggressive papillary thyroid carcinoma: a case report. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2012;56(8):552-7.

4- Christofori G, Semb H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci*. 1999; 24(2):73-6.

5- Rodrigo JP, Dominguez F, Alvarez C, Herrero A, Suarez C. Expression of E-cadherin, CD44s, and CD44v6 in laryngeal and pharyngeal carcinomas. *Am J Otolaryngol*. 2003; 24(6):384-9.

6- Liu Z, Kakudo K, Bai Y, Li Y, Ozaki T, Miyauchi A, et al. Loss of cellular polarity/cohesiveness in the invasive front of papillary thyroid carcinoma, a novel predictor for lymph node metastasis; possible morphological indicator of epithelial mesenchymal transition. *J Clin Pathol*. 2011;64(4):325-9.