

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.19.021

PPAR γ 与 MSX2 在甲状腺肿瘤术后患者骨代谢的作用机制研究邹 勇, 余昌文 Δ

(湖北省汉川市人民医院肿瘤科 431600)

摘要:目的 探讨过氧化物酶增殖物受体 γ (PPAR γ)与 MSX2/Hox8.1 蛋白(MSX2)在甲状腺肿瘤术后患者骨代谢过程中的作用。方法 治疗组 29 例甲状腺肿瘤术后患者行骨髓穿刺+活检术,对照组为 1:1 匹配非甲状腺肿瘤患者。两组进行骨组织 HE 染色,采用免疫组织化学半定量检测 PPAR γ 与 MSX2 水平,比较治疗组与对照组之间的差异。结果 HE 染色骨组织形态学显示,治疗组脂肪面积明显增多,骨小梁面积及宽度均减少,两组比较差异有统计学意义($t=2.293, 2.872, P<0.05$);免疫组织化学半定量结果显示,治疗组 PPAR γ 表达量高于对照组,MSX2 表达量低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 PPAR γ 与 MSX2 在甲状腺肿瘤术后骨代谢的过程中起到了重要作用,甲状腺肿瘤术后患者发生骨质疏松症可能与成脂肪作用被促进,成骨作用被抑制相关。

关键词:过氧化物酶增殖物受体 γ ; MSX2/Hox8.1 蛋白; 甲状腺肿瘤; 骨代谢

中图法分类号:R736.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)19-2916-03

Study on role of PPAR γ and MSX2 in bone metabolism after thyroid tumor operationZOU Yong, YU Changwen Δ

(Department of Oncology, Hanchuan Municipal People's Hospital, Hanchuan, Hubei 431600, China)

Abstract: Objective To investigate the role of PPAR γ and MSX2/Hox 8.1 protein (MSX2) in bone metabolism process after thyroid tumor operation. **Methods** Twenty-nine postoperative cases of thyroid tumor in the treatment group conducted bone marrow puncture plus biopsy, and the control group included 1:1 matched cases of non-thyroid tumor. The two groups conducted the bone tissue HE staining. The immunohistochemical method was adopted to semiquantitatively detect the levels of PPAR γ and MSX2. The differences between the treatment group and control group were compared. **Results** The bone histomorphometry by HE staining showed that visceral fat area in the treatment group was significantly increased, the bone trabecular area and width were decreased, the differences between the two groups were statistically significant ($t=2.293, 2.872, P<0.05$). The immunohistochemical semiquantitative result showed that the PPAR γ expression level in the treatment group was higher than that in the control group, while the MSX2 expression level was lower than that in the control group, the difference between the two groups was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** PPAR γ and MSX2 play an important role in bone metabolic process after thyroid tumor operation. The osteoporosis occurrence after operation in the patients with thyroid tumor may be associated with the adipogenesis being promoted and osteogenesis being inhibited.

Key words: PPAR γ ; MSX2; thyroid neoplasm; bone metabolism

甲状腺癌是内分泌系统最常见的恶性肿瘤,近年来,由于疾病诊断技术的提高以及公众对疾病认识的改善,大多数地区甲状腺癌发病率呈持续上升趋势^[1-2]。手术治疗是目前甲状腺癌常用的治疗方式之一^[3],而术后并发症的预防与治疗,是患者预后的关键因素。骨质疏松症是甲状腺手术后常见的并发症,可以引起骨折,严重影响患者生活质量与预后。

甲状腺激素对于骨代谢的影响是多通路进行的。适量的甲状腺激素可以通过胰岛素样生长因子-I(IGF-I)等途径促进骨形成^[4],而过量的甲状腺激素将影响正常骨代谢,导致骨量丢失^[5]。有研究证明,过氧化物酶增殖物激活受体 γ (PPAR γ)以及 wnt 通路中的 MSX2/Hox8.1 蛋白(MSX2)在骨代谢的过程中起到

重要作用^[6-8]。本文将对 PPAR γ 、MSX2 在甲状腺癌术后患者骨代谢中的作用进行探讨,为甲状腺癌术后骨质疏松的研究以及患者的治疗选择提供支持。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2010 年 1 月至 2015 年 12 月于本院行甲状腺癌切除术患者纳入治疗组。入组标准:(1)甲状腺癌全切术或次全切术患者;(2)使用稳定剂量左甲状腺素钠片治疗,抑制目标为促甲状腺激素(TSH) <0.5 mU/L 者;(3)规律随访,签署知情同意书行相关检查者。排除标准:(1)绝经期女性;(2)伴随骨转移的患者;(3)伴有甲状旁腺损伤的患者;(4)伴随其他骨代谢疾病患者;(5)应用影响骨代谢药物的患者。对照组为 1:1 匹配经病理科(由于病情需

要进行骨髓穿刺术,术后保留病理切片)诊断排除甲状腺癌,并且通过临床病历系统查询,排除其中具有影响骨代谢疾病、接受影响骨代谢治疗、绝经及肿瘤的患者。治疗组共 29 例患者,其中男 13 例,女 16 例;平均年龄(36.4±6.9)岁;病理分型:乳头状癌 17 例,滤泡样癌 6 例,髓样癌 5 例,未分化癌 1 例;患者平均左甲状腺素钠片治疗时间(4.62±1.83)个月。对照组匹配患者 29 例,其中男 11 例,女 18 例,平均年龄(31.7±8.3)岁。两组患者使用左甲状腺素钠片的例数与剂量差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 仪器与试剂 自动包埋仪、石蜡切片机、乙二胺四乙酸二钠、4%多聚甲醛、苏木素、伊红、二甲苯、乙醇、盐酸、氨水、PPAR γ 抗体(Santa Cruz Biotechnology 公司)、MSX2 抗体(Abcam 公司)、浓缩型二氨基联苯胺(DAB)试剂盒(北京中山生物技术有限公司)、光密度图像分析仪(德国 Leica Q550CW)、Qwin 图像分析软件。

1.3 方法 两组患者行骨髓穿刺术+活检术,留取骨组织标本,脱钙,石蜡包埋。

1.3.1 HE 染色流程 切片脱蜡至水化,染色、分化、反蓝:苏木精液染色 5 min→自来水洗 1 min→1%盐酸乙醇 1~2 s→水洗 1 min→1%氨水返蓝 10~30 s(以镜下观察为准,因多次使用,氨水水平降低,时间增加)→蒸馏水过洗 1 min→0.5%~1.0%乙醇伊红液染色 2 min。

1.3.2 免疫组织化学流程 (1)石蜡包埋的骨组织常规切片(防脱玻片),60℃烤箱 1 h,静置 30 min;(2)梯度乙醇脱蜡水化;(3)抗原修复 2 min;(4)3% H₂O₂ 封闭内源性过氧化物酶;(5)加 1:100 稀释一抗 4℃ 孵育过夜;(6)磷酸盐缓冲液(PBS)浸洗后加生物素化二抗;(7)PBS 浸洗后 DAB 显色;(8)苏木素复染;(9)脱水、封片。阴性对照采用 0.01 mol/L 的 PBS 代替一抗,其他步骤不变。

1.3.3 图像分析 HE 染色:对切片使用全自动图像数字化分析仪进行检测,测量及计算静态参数指标包括骨小梁面积百分数、骨小梁厚度。每张切片测量整个标本,在 10×10 倍镜下进行。免疫组织化学:在相同光源强度、10×40 倍镜下,采用盲法对免疫组织化学图片随机取图,4 张/标本。通过 Image Pro-Plus (IPP6.0)分析每张图片阳性区域吸光度(A)值,取其平均值代表该样本的 A 值。

1.4 统计学处理 所有数据应用 SPSS19.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用独立样本 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HE 切片结果 切片染色后,骨小梁被染成红色,细胞核被染成蓝色,脂肪细胞由于脂滴溢出,表现为圆形空泡,见图 1。治疗组脂肪面积明显增多,骨小梁面积及厚度均减少,对照组与其相反,见表 1。

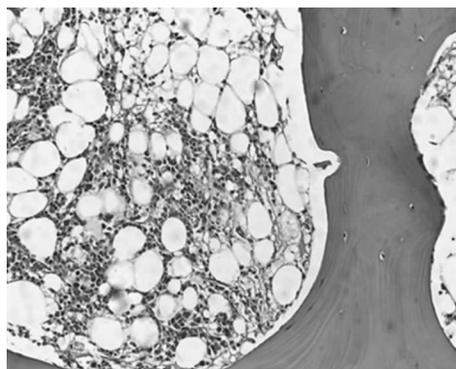


图 1 骨组织 HE 染色(10×10 倍)

表 1 两组骨小梁面积、厚度比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	骨小梁面积百分数(%)	骨小梁厚度(μm)
治疗组	29	21.67±2.65	65.20±6.66
对照组	29	25.59±5.32	72.94±5.47
合计	58	23.27±4.32	68.37±7.20
<i>t</i>		2.293	2.872
<i>P</i>		0.033	0.009

2.2 PPAR γ 免疫组织化学结果 骨组织中 PPAR γ 蛋白呈棕褐颗粒,主要位于细胞核,因 PPAR γ 蛋白表达量的多少,而呈现棕褐色颗粒多少不同及染色深浅不同。PPAR γ 蛋白表达量多者,平均积分光密度大,反之则平均积分光密度小,见图 2。治疗组 PPAR γ 平均积分光密度为(83.953±10.611)×10⁵,高于对照组的(73.624±10.766)×10⁵,差异有统计学意义($t=2.232, P<0.05$)。

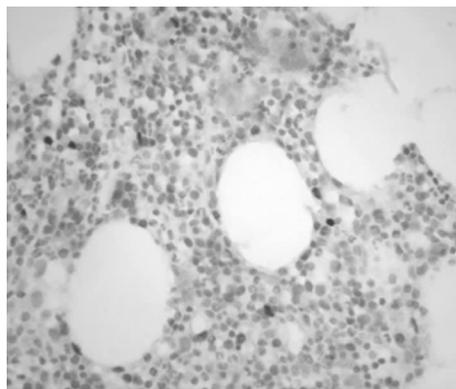


图 2 PPAR γ 免疫组织化学结果(10×20 倍)

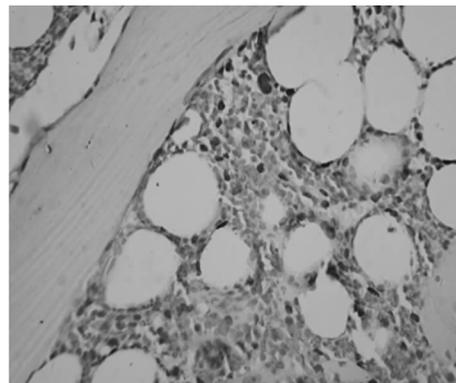


图 3 MSX2 免疫组织化学结果(10×20 倍)

2.3 MSX2 免疫组织化学结果 骨组织中 MSX2 蛋

白与 PPAR γ 相似,也呈棕褐颗粒并位于细胞核,见图 3。治疗组 MSX2 平均积分光密度为 $(41.053 \pm 9.602) \times 10^5$, 低于对照组的 $(52.179 \pm 9.240) \times 10^5$, 差异有统计学意义 ($t=1.581, P<0.05$)。

3 讨 论

骨髓基质干细胞(BMSC)具有多向分化潜能,在不同诱导体系中可分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞等多种细胞^[9]。正常骨代谢中存在着成骨和破骨之间的动态平衡,当破骨因素所起作用相对固定时,成骨作用的强弱决定了骨质疏松发生与否。而 BMSC 可以分化为成骨细胞,也可以分化为脂肪细胞,当成脂肪作用增强时,骨髓腔内脂肪细胞增多,势必引起髓腔内缺血缺氧,从而导致局部骨坏死、骨质疏松、骨折。PPAR γ 是 PPARs 的一个亚型,由配体启动后参与调节细胞的分化、增殖及凋亡,是脂肪分化的主要调控因子,可以促进 BMSC 向脂肪细胞分化^[10]。结合本研究中骨组织 HE 染色结果可以发现,脂肪空泡的面积增加,免疫组织化学中 PPAR γ 的表达增高,推测在甲状腺肿瘤术后患者的骨代谢过程中,BMSC 向脂肪细胞分化作用加强,这可能是导致患者后续发生骨质疏松的重要原因之一。

在骨形成的过程中 wnt 与 BMP 两大通路起到了重要作用,MSX2 可以抑制 MSCs 向成脂肪方向分化,上调 wnt 及其配体的表达,从而促进成骨、抑制成脂,双向上调该通路的成骨作用^[11]。结合本研究免疫组织化学结果可以发现,甲状腺肿瘤术后患者骨组织中 MSX2 的表达下降,并且低于对照人群,一定程度上可以推测,患者术后骨代谢的过程中成骨作用受到了抑制。

在甲状腺肿瘤术后患者中,成骨作用受到了一定程度上的抑制,而成脂肪作用则得到了一定的促进,这两方面综合因素可能是患者发生骨质疏松的重要原因,而 PPAR γ 和 MSX2 在此过程中起到了重要的作用。这两个蛋白表达的改变,提示甲状腺癌术后患者骨质疏松的发生,可能是骨代谢的动态平衡中成脂肪途径过度表达,成骨途径受到抑制的结果。这也提醒临床,患者在甲状腺手术后的治疗,可以从改善患者成脂肪途径和成骨途径动态平衡的药物着手。

当然,由于免疫组织化学检测更倾向于定性研究,近年来电脑软件的发展,可以通过光密度法对试验结果进行分析,但是其结果的精确性可能与绝对的定量研究存在一定程度上的差别。如果通过免疫组织化学法与定量聚合酶链反应(PCR)相结合,结果一致的话,可能更能使人信服。但是由于骨髓活检术所取得的标本量特别少,骨组织含有大量细胞外基质,如钙、胶原等,有效细胞很少,使骨组织 mRNA 的

以及纯度不能满足进一步检测的要求,故没有进行定量 PCR 的研究。后续也将进行更准确的定量研究进一步探讨该方面的机制。

参考文献

- [1] PELLEGRITI G,FRASCA F,REGALBUTO C, et al. Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors[J]. J Cancer Epidemiol, 2013,2013:965212.
- [2] SLIJEPCEVIC N,ZIVALJEVIC V,PAUNOVIC I, et al. Rising incidence of thyroid cancer in Serbia[J]. Hippokratia, 2016,20(1):9-13.
- [3] HADDAD R I,LYDIATT W M,BALL D W, et al. Anaplastic thyroid carcinoma, version 2. 2015 [J]. J Nation Compreh Cancer Network, 2015,13(9):1140-1150.
- [4] PEPENE C E,SECK T,DIEL I, et al. Effect of glucocorticoid-, parathyroid- and thyroid hormones excess on human iliac crest bone matrix insulin-like growth factor (IGF)- I in patients with osteoporosis[J]. Exp Clin Endocrinol Diabet, 2010,118(5):310-314.
- [5] KIM C W,HONG S,OH S H, et al. Change of bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in patients on suppressive levothyroxine therapy for differentiated thyroid carcinoma[J]. J Bone Metab, 2015, 22(3):135-141.
- [6] HARSLOF T,TOFTENG C L,HUSTED L B, et al. Polymorphisms of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) gene are associated with osteoporosis[J]. Osteoporos Int, 2011,22(10):2655-2666.
- [7] ZHANG Y,SHAO J,WANG Z, et al. Growth differentiation factor 11 is a protective factor for osteoblastogenesis by targeting PPARgamma[J]. Gene, 2015, 557(2): 209-214.
- [8] RUTKOVSKIY A,STENSLØKKEN K O,VAAGE I J. Osteoblast differentiation at a glance[J]. Med Sci Monit Basic Res, 2016,22(1):95-106.
- [9] KAGAMI H,AGATA H,INOUE M, et al. The use of bone marrow stromal cells(bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for alveolar bone tissue engineering: basic science to clinical translation[J]. Tissue Eng Part B Rev, 2014, 20(3): 229-232.
- [10] HUANG C,GOU S,WANG L, et al. MicroRNAs and peroxisome proliferator-activated receptors governing the differentiation of mesenchymal stem cells[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2016,11(3):197-207.
- [11] LERNER U H,OHLSSON C. The WNT system: background and its role in bone[J]. J Intern Med, 2015, 277(6):630-649.

(收稿日期:2018-01-10 修回日期:2018-04-23)