

程序性细胞死亡因子 4 在胰腺癌组织中的表达及临床病理学意义[△]

马 刚, 郭克建, 张 浩, 尾崎岩太*, 松桥幸子**, 郑新宇, 董 明[#]

(中国医科大学 附属第一医院普通外科, 沈阳 110001)

摘要: **目的** 探讨胰腺癌组织中程序性细胞死亡因子 4 (PDCD4) 的表达及临床病理学意义。**方法** 采用免疫组织化学方法检测 69 例胰腺癌石蜡标本中 PDCD4 表达, 同时采用 Western 印迹杂交方法检测其中 8 例冷冻保存的新鲜胰腺癌及癌旁正常胰腺组织中 PDCD4 蛋白的表达情况, 观察其与胰腺癌患者临床病理学参数之间的关系。**结果** Western 印迹分析结果显示, 同癌旁正常胰腺组织相比, 8 例胰腺癌组织中 PDCD4 蛋白表达均明显减弱或缺失。69 例胰腺癌中, PDCD4 低表达 (阳性细胞数 < 30%) 者占 52.2%。其中, 在中、低分化腺癌中, PDCD4 低表达者分别为 67.4% (15/23) 和 70% (14/20), 而高分化腺癌仅有 26.9% (7/26) 为低表达。相关分析显示, PDCD4 表达减弱或缺失与胰腺癌的不良分化相关 ($P < 0.01$), 而与患者的性别、年龄、肿瘤部位和 TNM 分期无关。**结论** PDCD4 蛋白在胰腺癌中多呈低表达, 并与胰腺癌的分化程度相关, 其在胰腺癌的发生、发展过程中可能起重要作用。

关键词: 胰腺癌; 程序性细胞死亡因子 4; 免疫组织化学

中图分类号: R735.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-503X(2005)05-0597-04

Expression of Programmed Cell Death 4 and Its Clinicopathological Significance in Human Pancreatic Cancer[△]

Ma Gang, Guo Ke-jian, Zhang Hao, Ozaki Iwata*, Matsuhashi Sachiko**, Zheng Xin-yu, Dong Ming[#]

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of programmed cell death 4 (PDCD4) protein and its clinicopathological significance in human pancreatic cancer. **Methods** Immunohistochemistry was used to examine the expression of PDCD4 protein in 69 specimens of pancreatic cancer and Western blot in 8 fresh specimens. **Results** The expression of PDCD4 protein was significantly lower in all 8 fresh pancreatic cancer tissues than that in non-cancerous tissues detected by Western blot. Compared with non-cancerous pancreatic tissue (> 80% of positive cells), low PDCD4 expression was shown in 69 pancreatic cancer tissues (< 30% of positive cells in 36 cases and 30%–80% of positive expression cells in 33 cases). In the 33 cases with 30% and 80% of positive expression cells, the expression rates of PDCD4 protein were 57.6%, 24.2%, and 18.2% in well, moderately, and poorly differentiated cancers, respectively. In the 36 cases less than 30% of positive expression cells, however, the expression rate of PDCD4 protein in well, moderately, and poorly differentiated cases were 19.4%, 41.7%, and 38.9%, respectively. 67.4% (15/23) of the moderately differentiated cases and 70% (14/20) of the poorly differentiated cases showed < 30% of positive expression cells. Only 26.9% (7/26) of the well differentiated cases, however, showed < 30% of positive expression cells, indicating that low PDCD4

[△]基金项目: 国家自然科学基金 (30371625) 资助 Supported by the National Natural Sciences Foundation of China (30371625); *Health Administration Center, Saga Medical School, Saga, Japan; **Division of Hepatology and Metabolism, Department of Internal Medicine, Saga Medical School, Saga, Japan; #Corresponding author Tel: 024-23256666-6237, E-mail: mingdong76@yahoo.com

expression was associated with histological grade ($P < 0.01$). There was no relationship between PDCD4 expression and other clinicopathological parameters including patients' sex, age, and TNM stage.

Conclusions Expression of PDCD4 protein is low in human pancreatic cancer and is correlated with the differentiation levels of human pancreatic cancer. PDCD4 may play an important role in the occurrence and development of pancreatic carcinomas.

Key words: pancreatic carcinoma; programmed cell death 4; immunohistochemistry

Acta Acad Med Sin, 2005,27(5):597-600

胰腺癌的发生是一个复杂的多阶段生物学过程,受细胞内多种肿瘤相关基因的调控。尽管胰腺癌的发病机制目前尚不清楚,但已有资料表明,凋亡机制的失活在其发生发展中起着重要作用。程序性细胞死亡因子4(programmed cell death 4, PDCD4)是一个新发现的细胞凋亡相关抑癌基因。最近有文献报道,肺癌组织中PDCD4的表达明显下降或缺失,并与肺癌的恶性程度及不良预后有关^[1]。本研究采用免疫组织化学方法和Western印迹杂交,检测了PDCD4蛋白在胰腺癌组织中的表达,探讨了其与肿瘤的分化程度和病理分期等临床病理学参数之间的关系。

材料和方法

标本采集 收集我科1990~2002年手术切除的胰腺癌标本69例,其中18例同时保存癌旁正常胰腺组织作为对照。每例标本经10%福尔马林固定,石蜡包埋,切成4 μm厚连续切片备免疫组织化学和病理分析用。有8例胰腺癌及癌旁正常胰腺组织标本在手术切除后立即取样,置液氮中冷冻保存。69例患者中,男46例,女23例,年龄30~76岁,平均(58.4 ± 10.8)岁。肿瘤部位:胰头癌57例,胰体和/或尾癌12例。分化程度:高分化腺癌26例,中分化腺癌23例,低分化腺癌20例。根据1997年国际抗癌协会(UICC)的TNM分期标准,I期18例,II期8例,III期34例,IV期9例。所有患者术前均未接受放疗和化疗。

主要试剂 兔抗人PDCD4多克隆抗体由日本佐贺大学医学部代谢内分泌研究室松桥幸子教授惠赠^[2]。即用型S-P试剂盒、3,3'-二氨基联苯胺(DAB)试剂盒均购自福州迈新公司。

免疫组织化学检测PDCD4蛋白表达 采用S-P免疫组织化学方法,按试剂盒说明书进行操作。具体步骤:石蜡切片常规二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,

PBS漂洗3次;浸入0.3%过氧乙酸阻断内源性过氧化酶15 min, PBS漂洗3次;滴加10%血清封闭液,37℃孵育30 min;弃血清,滴加1:1 000的兔抗人PDCD4多克隆抗体,4℃冰箱孵育过夜;PBS漂洗3次,滴加即用型生物素标记的二抗,37℃孵育30 min, PBS漂洗3次;滴加即用型S-P溶液,37℃孵育30 min, PBS漂洗3次后, DAB显色5 min, 苏木素复染1 min;常规乙醇脱水,二甲苯透明,封片。每例标本均用PBS代替一抗作阴性对照。结果判定:细胞浆的棕黄色颗粒着色为阳性结果。每张切片由2名病理科医生双盲计数至少5个高倍视野,阳性细胞数≥30%视为PDCD4高表达;阳性细胞数<30%为PDCD4低表达。

Western印迹检测PDCD4蛋白表达 按下述方法提取冷冻保存的8例胰腺癌及癌旁正常胰腺组织的蛋白质。适当体积裂解缓冲液[50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA, pH 8.0), 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF), 0.1% SDS, 1 mg/L 抑肽酶, 10 μg/ml 抑胃酶肽, 10 μg/ml 亮抑蛋白酶肽, 10 μg/ml 抑蛋白酶肽, 10 μg/ml 大豆胰蛋白酶抑制剂]超声裂解组织45 s, 4℃ 15 000 r/min离心20 min, 收集上清, -70℃保存。BCA定量试剂盒测定蛋白浓度, 每泳道上样40 μg蛋白, 经10%十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳, 电转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。封闭缓冲液[0.1 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷缓冲液盐水(TBS), 5% 脱脂奶粉, 0.1% 吐温20]封闭, 加入1:6 000稀释的兔抗人PDCD4抗体或1:1 000的β-actin抗体4℃孵育过夜。1:2 000稀释的酶标二抗室温孵育1 h, TBS洗净后, 增强化学发光剂(ECL)显色, 暗房中压片, 观察结果。

统计学处理 采用SPSS12.0统计软件包, 计数资料分析采用配对t检验, PDCD4表达与胰腺癌临床病理学指标间的相关性采用χ²检验, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

结 果

PDCD4 蛋白在正常胰腺和胰腺癌中的表达

Western 印迹分析：Western 印迹检测 8 例配对胰腺癌及癌旁正常胰腺组织的 PDCD4 蛋白表达情况结果显示，同癌旁正常胰腺组织相比，所有胰腺癌组织中 PDCD4 蛋白表达均明显减弱或缺失（图 1）。经与 β -actin 相对光密度值扫描分析比较，癌组织中

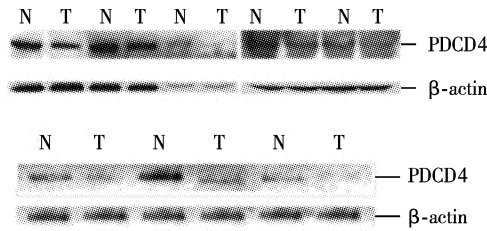


图 1 胰腺癌及癌旁正常胰腺组织中 PDCD4 蛋白表达
Fig 1 Expression of PDCD4 in pancreatic cancer and non-cancerous tissues by Western blot

N: non-cancerous tissue; T: tumor; PDCD4: programmed cell death 4

PDCD4 蛋白条带的吸光度值明显低于癌旁正常胰腺组织 ($t=4.393, P<0.01$)。

免疫组织化学染色：在正常胰腺组织中，阳性细胞比例均在 80% 以上（图 2）。在 69 例胰腺癌组织中，PDCD4 表达明显下降，且表达水平出现明显差异：52.2%（36 例）的病例阳性细胞数 < 30%，呈低表达；47.8%（33 例）的病例阳性细胞比例介于 30%~80% 之间（30%~50%，21 例；50%~80%，12 例），呈高表达。

PDCD4 蛋白表达与胰腺癌临床病理学指标之间的关系 PDCD4 表达水平在不同年龄、性别、肿瘤部位及 TNM 分期的各组间未见明显差异，而在不同分化程度癌组织之间差异显著（附表）。PDCD4 高表达主要见于高分化腺癌，占胰腺癌高表达者的 57.6%（19/33），而中、低分化腺癌分别占 24.2%（8/33）和 18.2%（6/33）。PDCD4 低表达患者中，高、中、低分化腺癌分别占 19.4%（7/36）、41.7%（15/36）和 38.9%（14/36）。在中、低分化腺癌中，PDCD4 低表达者分别为 67.4%（15/23）和 70%（14/20），而高分化腺癌仅有 26.9%（7/26）为低表达，明显低于中分化腺癌 ($\chi^2=7.234, P<0.01$) 和低分化腺癌 ($\chi^2=8.435, P<0.01$)。

附表 PDCD4 蛋白表达与胰腺癌临床病理学参数的关系
Table PDCD4 expression and clinicopathological characteristics

Parameters	n	PDCD4 expression (%)		χ^2	P
		+ ($\geq 30\%$)	- (< 30%)		
Overall	69	47.8 (33/69)	52.2 (36/69)		
Age (years)				0.560	0.454
< 65	45	51.1 (23/45)	48.9 (22/45)		
≥ 65	24	41.7 (10/24)	58.3 (14/24)		
Gender				2.352	0.125
Male	46	41.3 (19/46)	58.7 (27/46)		
Female	23	60.9 (14/23)	39.1 (9/23)		
Site				0.023	0.879
Head	57	49.1 (28/57)	50.9 (29/57)		
Body and/or tail	12	41.7 (5/12)	58.3 (7/12)		
TNM stage				1.972	0.578
I	18	38.9 (7/18)	61.1 (11/18)		
II	8	25.0 (2/8)	75.0 (6/8)		
III	34	52.9 (18/34)	47.1 (16/34)		
IV	9	66.7 (6/9)	33.3 (3/9)		
Grade				10.75	0.005
Well differentiated ¹	26	73.1 (19/26)	26.9 (7/26)		
Moderately differentiated ²	23	34.8 (8/23)	65.2 (15/23)		
Poorly differentiated ³	20	30.0 (6/20)	70.0 (14/20)		

1 and 2: $\chi^2=7.234, P=0.007$; 1 and 3: $\chi^2=8.435, P=0.004$; 2 and 3: $\chi^2=0.111, P=0.739$

讨 论

PDCD4 基因于 1995 年被克隆成功, 定位于染色体 10q24, 编码 185 个氨基酸。*PDCD4* 蛋白具有多个磷酸化位点, 可与蛋白激酶 C、脯氨酸激酶、酪氨酸激酶相结合。在细胞发生凋亡时, 可见 *PDCD4* 表达增加^[3-5]。Northern 印迹研究发现, 增殖前的鼠角化上皮细胞中 *PDCD4* mRNA 表达高于增殖后细胞^[6], 提示 *PDCD4* 能够抑制细胞的增殖和转化。在恶性转化的鼠上皮细胞系 JB6 RT101 中, *PDCD4* 表达减弱; 而在 *PDCD4* 过度表达者中形成的细胞克隆减少^[7]。上述研究结果说明, *PDCD4* 表达升高能够抑制肿瘤生长, 故 *PDCD4* 被认为是一种新的肿瘤抑制基因。关于 *PDCD4* 在肿瘤发生过程中的具体作用机制尚不清楚。Goke 等^[8]研究发现, *PDCD4* 可能作用于翻译启动因子 eIF4A 和 eIF4G, 抑制蛋白翻译, 从而在蛋白翻译水平抑制细胞生长。

Chen 等^[9]应用免疫组织化学方法研究了 124 例肺癌组织中 *PDCD4* 表达, 结果发现 83% 的病例表达下降或缺失, 该异常表达与肿瘤的恶性生物学行为密切相关。这表明 *PDCD4* 表达下降或缺失在恶性肿瘤的发生发展过程中可能起重要作用。本研究采用免疫组织化学方法检测了 69 例胰腺癌石蜡标本中 *PDCD4* 的表达, 同时应用 Western 印迹杂交方法检测了其中 8 例冷冻保存的新鲜胰腺癌及癌旁正常胰腺组织中 *PDCD4* 蛋白的表达情况, 结果显示胰腺癌中 *PDCD4* 表达明显低于癌旁正常胰腺组织, 表明 *PDCD4* 在胰腺癌的发生发展中起着一定作用。此外本研究发现, *PDCD4* 表达缺失与胰腺癌病理分级显著相关, 呈逐级递减趋势, 随着恶性度增高, *PDCD4* 表达明显下降, 尤其是中、低分化的胰腺癌, *PDCD4* 表达下降更加明显, 提示 *PDCD4* 的表达下降与胰腺癌的发生发展有关, *PDCD4* 可能参与了肿瘤的分化, 从而影响肿瘤的发展过程。本研究还提示, *PDCD4* 表达程度与胰腺癌临床分期无关, 这既可能说明胰腺癌 TNM 分期与 *PDCD4* 无关, 也

不排除本组样本量有限, 未能得出阳性结果。

综上所述, 本研究结果表明, *PDCD4* 在胰腺癌组织中呈低表达, 特别是与组织学低分化程度有关。*PDCD4* 作为一种抑癌基因, 可能在胰腺癌的发病过程中起重要作用。

(本文图 2 见插图第 2 页)

参 考 文 献

- 1 Chen Y, Knosel T, Kristiansen G, *et al.* Loss of *PDCD4* expression in human lung cancer correlates with tumor progression and prognosis. *J Pathol*, 2003, 200(5):640-646
- 2 Yoshinaga H, Matsushashi S, Fujiyama C, *et al.* Novel human *PDCD4* (H731) gene expressed in proliferative cells is expressed in the small duct epithelial cells of the breast as revealed by an anti-H731 antibody. *Pathol Int*, 1999, 49(12):1067-1077
- 3 Soejima H, Miyoshi O, Yoshinaga H, *et al.* Assignment of the programmed cell death 4 gene (*PDCD4*) to human chromosome band 10q24 by *in situ* hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 1999, 87(1-2):113-114
- 4 Matsushashi S, Yoshinaga H, Yatsuki H, *et al.* Isolation of a novel gene from a human cell line with Pr-28 mAb which recognizes a nuclear antigen involved in the cell cycle. *Res Commun Biochem Cell Mol Biol*, 1997, 1(1):109-120
- 5 Yoshinaga H, Matsushashi S, Ahanek J, *et al.* Expression and identification of H731 gene product in HeLa cells. *Res Commun Biochem Cell Mol Biol*, 1997, 1(1):121-131
- 6 Lankat-Buttgereit B, Goke R. Programmed cell death protein 4 (*PDCD4*): a novel target for antineoplastic therapy? *Biol Cell*, 2003, 95(8):515-519
- 7 Yang HS, Knies JL, Stark C, *et al.* *Pcd4* suppresses tumor phenotype in JB6 cells by inhibiting Ap-1 transactivation. *Oncogene*, 2003, 22(24):3712-3720
- 8 Goke A, Goke R, Knolle A, *et al.* DUG is a novel homologue of translation initiation factor 4G that binds eIF4A. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 297(1):78-82

(2005-04-04 收稿)