

胰腺癌中 Ptch1、融合阻抑蛋白基因的表达及临床意义

李东伟 依马木买买提江·阿布拉 李海军 易超

摘要 目的 探讨 Patched1 (Ptch1)、融合阻抑蛋白 Su (Fu) 基因在胰腺癌中的表达及其与胰腺癌发生、发展的关系。方法 采用 RT-PCR、Western blot 法检测 56 例胰腺癌组织中 Ptch1、Su (Fu) 基因和蛋白的表达情况,并分析其与胰腺癌临床病理参数之间的关系。结果 RT-PCR 检测结果显示,Ptch1、Su (Fu) mRNA 在胰腺癌中相对表达量分别为 0.413 ± 0.045 、 0.376 ± 0.053 ,在癌旁组织中分别为 0.203 ± 0.013 、 0.214 ± 0.062 ($P < 0.05$)。Western blot 法检测结果显示,Ptch1、Su (Fu) 蛋白在胰腺癌中的相对表达量分别为 0.724 ± 0.021 、 0.625 ± 0.075 ,在胰腺癌旁组织中分别为 0.516 ± 0.098 、 0.413 ± 0.051 。胰腺癌组织中 Ptch1、Su (Fu) mRNA 与蛋白表达均高于癌旁组织。胰腺癌组织中 Ptch1、Su (Fu) mRNA 与蛋白表达与胰腺癌的分化程度和 TNM 分期明显相关 ($P < 0.05$),与患者年龄、性别、肿瘤直径、侵犯血管和神经无明显相关 ($P > 0.05$)。结论 胰腺癌组织中 Ptch1、Su (Fu) 蛋白呈高表达,Ptch1、Su (Fu) 蛋白的高表达可能与胰腺癌的发生及发展有关。

关键词 胰腺癌 Patched1 融合阻抑蛋白 Hedgehog 信号通路

中图分类号 R73 文献标识码 A DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.03.031

The Clinical Significance of Ptch1, Suppressor of Fused Expression in Human Pancreatic Carcinoma Tissue. Li Dongwei, Yimamumaimaitijiang · Abula, Li Haijun, et al. Department of General Surgery, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Area, Gansu 730050, China

Abstract Objective To investigate the relationship between Patched1 (Ptch1), Suppressor of fused expression and the development of human pancreatic cancer. **Methods** RT-PCR and Western blot were used to determine the expression of Ptch1, Su (Fu) in 56 cases of pancreatic cancer quantitatively. The relationship between the expression of Ptch1, Su (Fu) and the clinicopathological features of pancreatic cancer was analyzed. **Results** The expression of Ptch1, Su (Fu) mRNA in pancreatic cancer was 0.413 ± 0.045 , 0.376 ± 0.053 , and in pancreatic cancer adjacent tissue was 0.203 ± 0.013 , 0.214 ± 0.062 by RT-PCR detected ($P < 0.05$). The expression of Ptch1, Su (Fu) protein in pancreatic cancer was 0.724 ± 0.021 , 0.625 ± 0.075 , and in pancreatic cancer adjacent tissue was 0.516 ± 0.098 , 0.413 ± 0.051 by Western blot detected ($P < 0.05$). The expression of Ptch1, Su (Fu) mRNA and protein in pancreatic cancer tissue were both higher than pancreatic cancer adjacent tissue. The expression of Ptch1, Su (Fu) was significant associated with differentiation and TNM grade ($P < 0.05$), not age, gender, tumorous size and invasion to nerves ($P > 0.05$). **Conclusion** The Ptch1, Su (Fu) over-expressed in pancreatic cancer tissues and its abnormal expression may be involved in the oncogenesis and development of pancreatic cancer.

Key words Pancreatic cancer; Patched1; Suppressor of fused; Hedgehog pathway

胰腺癌是一种较常见、恶性程度极高的消化道肿瘤。因此,深入探讨胰腺癌发生、发展的机制,寻求新的治疗方法,具有重要意义。研究认为 Hedgehog (Hh) 信号通路与胰腺癌的发生和发展密切相关^[1]。本研究将初步探讨 Hedgehog 信号通路相关基因 Ptch1、Su (Fu) 在胰腺癌中的表达及临床意义。

材料与方法

1. 一般资料:收集新疆医科大学附属肿瘤医院 2010 年 2 月~2014 年 2 月胰十二指肠手术标本 56 例,术后经病理确诊全部为胰腺导管腺癌患者,手术后即刻切取胰腺癌组织和配对的癌旁组织(距癌 3cm 组织),置液氮贮存。56 例患者术前未经任何放疗或化疗,患者年龄 41~76 岁,平均年龄 56.4 岁,其中男性 40 例,女性 16 例。病理检查:高中分化腺癌 21 例,低分化腺癌 35 例;肿瘤 $\phi \leq 2\text{cm}$ 22 例, $> 2\text{cm}$ 34 例;按国际抗癌联盟 2002 年 TNM 分期标准进行分期, I 期 13 例, II 期 19 例, III 期 24 例;无侵犯血管和神经 29 例,有侵犯血管和神经 27 例。

基金项目:新疆医科大学科研创新基金资助项目(XJC2013108)

作者单位:730050 中国人民解放军兰州军区兰州总医院普通外科(李东伟);830006 乌鲁木齐,新疆医科大学附属肿瘤医院肝胆胰外科(依马木买买提江·阿布拉、李海军、易超)

通讯作者:依马木买买提江·阿布拉,电子信箱:emam107@163.com

com

2. 主要试剂:Trizol 试剂盒、两步法反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)试剂盒和 Western blot 试剂盒(宝生物工程大连有限公司),聚合酶链式反应(PCR)引物(生工生物工程上海有限公司)。兔抗人 Ptc1 多克隆抗体,购自 Santa Cruz 公司;兔抗人 Su(Fu)多克隆抗体,购自 Chemicon 公司;HRP 标记山羊抗兔 IgG 试剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

3. RT-PCR 检测 Ptc1、Su(Fu) 表达:将 -80℃ 冰箱保存的胰腺组织标本取出,用 Trizol 试剂提取组织 RNA,随机引物法合成 cDNA,扩增引物根据 GeneBank 序列 Ptc1(NM_000264.3)、Su(Fu)(NM_001178133.1)设计并合成引物,Ptc1 引物,上游:5'-CTCCTTTGCGGTGGACAA-3',下游:5'-CCTCAGCCTTATTCAGCATTTC-3',扩增片段 109bp;Su(Fu)引物,上游:5'-CTGGCAAAGACACAGAGCAGAT-3',下游:5'-GGTTGATTGGTGAAGGACAG-3',扩增片段 84bp;β-actin 引物,上游:5'-GGGACCTGACTGACTACCTC-3'下游:5'-CGT-CATACTCCTGCTTGCTG-3',扩增片段 543bp。PCR 扩增条件:94℃ 预变性 2min 后,94℃ 变性 30s,退火 40s,72℃ 延伸 30s,循环 30 次,再 72℃ 延伸 2min,退火温度分别是 54℃、57℃、56℃。

4. Western blot 法检测 Ptc1、Su(Fu) 蛋白表达:将 -80℃ 冰箱保存的胰腺组织标本取出,按胰腺组织样品和蛋白质裂解液(1:10)比例混合提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,取 50μg 蛋白样品,以 SDS-PAGE 进行分离,电转移到 PVDF 膜上,用封闭液室温下封闭 PVDF 膜 1h,分别加一抗,4℃ 过夜,用 1×TBST 漂洗,分别于相应的二抗孵育 30min 后洗膜。加入 ECL 化学发光试剂,用 Bio-Rad Chemi DOC MP 全能型成像系统拍照,并用软件 Image Lab 4.0 软件分析。

5. 统计学方法:应用 SPSS 18.0 统计软件分析。计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,配对的癌组织和癌旁组织 mRNA 和蛋白表达的比较采用配对样本 *t* 检验,mRNA 和蛋白表达水平与临床病理参数的关系采用两组独立样本的 *t* 检验和 χ^2 检验,所有检验均为双侧检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. RT-PCR 检测结果:胰腺癌组织和癌旁组织中 Ptc1 mRNA 的相对表达量分别为 0.413 ± 0.045 、 0.203 ± 0.013 ,胰腺癌组织和癌旁组织中 Su(Fu)

mRNA 的相对表达量分别为 0.376 ± 0.053 、 0.214 ± 0.062 ,胰腺癌组织中 Ptc1、Su(Fu) 的表达量分别是胰腺癌旁组织的 2.034 ± 0.143 、 1.757 ± 0.217 倍($P < 0.05$)。胰腺癌组织中 Ptc1、Su(Fu) mRNA 表达明显高于癌旁组织($P < 0.05$,图 1、图 2、表 1)。

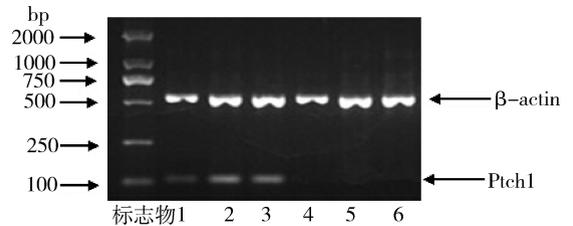


图 1 胰腺癌组织和癌旁组织 Ptc1 mRNA 表达的电泳图

1~3. 胰腺癌组织;4~6. 胰腺癌旁组织

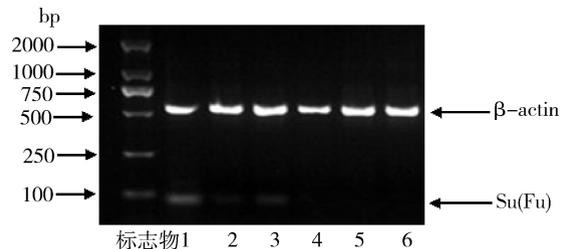


图 2 胰腺癌组织和癌旁组织 Su(Fu) mRNA 表达的电泳图

1~3. 胰腺癌组织;4~6. 胰腺癌旁组织

表 1 Ptc1、Su(Fu) mRNA 在胰腺癌组织和癌旁组织平均表达水平差异 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Ptc1/β-actin mRNA 的表达	Su(Fu)/β-actin mRNA 的表达
胰腺癌组织	0.413 ± 0.045	0.376 ± 0.053
胰腺癌旁组织	0.203 ± 0.013	0.214 ± 0.062
<i>P</i>	0.002	0.005

2. Western blot 法检测结果:胰腺癌组织和癌旁组织中 Ptc1 蛋白的相对表达量分别为 0.724 ± 0.021 、 0.516 ± 0.098 ,胰腺癌组织和癌旁组织中 Su(Fu) 蛋白的相对表达量分别为 0.625 ± 0.075 、 0.413 ± 0.051 ,胰腺癌组织中 Ptc1、Su(Fu) 的表达量分别是胰腺癌旁组织的 1.403 ± 0.121 、 1.513 ± 0.173 倍($P < 0.05$)。胰腺癌组织中 Ptc1、Su(Fu) 蛋白表达明显高于癌旁组织($P < 0.05$,表 2,图 3、图 4)。

3. 胰腺癌组织中 Ptc1、Su(Fu) mRNA 的表达与临床病理特征的关系:Ptc1、Su(Fu) mRNA 表达的阳性率在低分化胰腺癌组分别是 62.9%、65.7%,在

表 2 Ptch1、Su(Fu) 蛋白在胰腺癌组织和癌旁组织平均表达水平差异 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Ptch1/ β -actin	Su(Fu)/ β -actin
	蛋白的表达	蛋白的表达
胰腺癌组织	0.724 \pm 0.021	0.625 \pm 0.075
胰腺癌旁组织	0.516 \pm 0.098	0.413 \pm 0.051
<i>P</i>	0.009	0.010

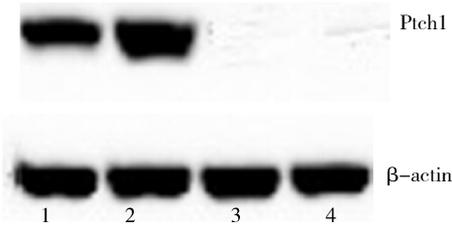


图 3 胰腺癌组织和癌旁组织 Ptch1 蛋白 Western blot 法检测图

1、2. 胰腺癌组织; 3、4. 胰腺癌旁组织

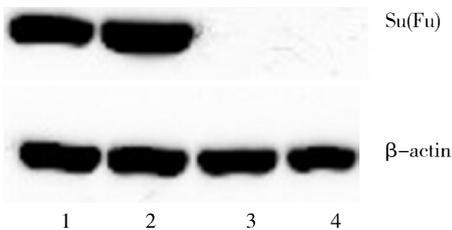


图 4 胰腺癌组织和癌旁组织 Su(Fu) 蛋白 Western blot 法检测图

1、2. 胰腺癌组织; 3、4. 胰腺癌旁组织

高中分化胰腺癌组分别是 28.6%、33.3%，在低分化胰腺癌组织 Ptch1、Su(Fu) mRNA 表达的阳性率明显高于高中分化胰腺癌组织 ($P < 0.05$)，Ptch1、Su(Fu) mRNA 表达的阳性率在 I 期、II 期胰腺癌组分别是 37.5%、46.9%，在 III 期胰腺癌组分别是 70.8%、75.0%，在 I 期、II 期胰腺癌组织 Ptch1、Su(Fu) mRNA 表达的阳性率明显低于 III 期胰腺癌组织 ($P < 0.05$)，说明胰腺癌组织中 Ptch1、Su(Fu) mRNA 表达与胰腺癌的分化程度和 TNM 分期明显相关 ($P < 0.05$)，与患者年龄、性别、肿瘤直径、侵犯血管和神经无明显相关 ($P > 0.05$)，表 3)。

4. 胰腺癌组织中 Ptch1、Su(Fu) 蛋白的表达与临床病理特征的关系：Ptch1、Su(Fu) 蛋白表达的阳性率在低分化胰腺癌组分别是 68.6%、71.4%，在高中分化胰腺癌组分别是 33.3%、38.1%，在低分化胰腺癌组织 Ptch1、Su(Fu) 蛋白表达的阳性率明显高于高中分化胰腺癌组织 ($P < 0.05$)，Ptch1、Su(Fu) 蛋白表达的阳性率在 I 期、II 期胰腺癌组分别是 34.4%、31.2%，在 III 期胰腺癌组分别是 66.7%、62.5%，在 I 期、II 期胰腺癌组织 Ptch1、Su(Fu) 蛋白表达的阳性率明显低于 III 期胰腺癌组织 ($P < 0.05$)，说明胰腺癌组织中 Ptch1、Su(Fu) 蛋白表达与胰腺癌的分化程度和 TNM 分期明显相关 ($P < 0.05$)，与患者年龄、性别、肿瘤直径、侵犯血管和神经无明显相关 ($P > 0.05$)，表 4)。

表 3 胰腺癌组织 Ptch1、Su(Fu) mRNA 的表达与临床病理特征的关系

临床特征	<i>n</i>	Ptch1 mRNA		<i>P</i>	Su(Fu) mRNA		<i>P</i>
		阳性	阴性		阳性	阴性	
年龄(岁)							
≤60	34	22	11	0.907	20	14	0.327
>60	22	15	7		10	12	
性别							
男性	40	23	17	0.932	19	21	0.799
女性	16	9	7		7	9	
分化程度							
高中分化	21	6	15	0.013	7	14	0.019
低分化	35	22	13		23	12	
肿瘤直径(cm)							
≤2	22	13	9	0.984	12	10	0.446
>2	34	20	14		15	19	
TNM 分期							
I、II	32	12	20	0.013	15	17	0.034
III	24	17	7		18	6	
侵犯血管和神经							
无	29	17	12	0.961	15	14	0.789
有	27	16	11		13	14	

表 4 胰腺癌组织 Ptch1、Su(Fu) mRNA 的表达与临床病理特征的关系

临床特征	n	Ptch1 蛋白		P	Su(Fu) 蛋白		P
		阳性	阴性		阳性	阴性	
年龄(岁)							
≤60	34	18	16	0.379	19	15	0.666
>60	22	9	13		11	11	
性别							
男性	40	19	11	0.094	17	13	0.665
女性	16	6	10		8	8	
分化程度							
高中分化	21	7	14	0.010	8	13	0.014
低分化	35	24	11		25	10	
肿瘤直径(cm)							
≤2	22	10	12	0.446	8	14	0.430
>2	34	19	15		16	18	
TNM 分期							
I、II	32	11	21	0.017	10	22	0.020
III	24	16	8		15	9	
侵犯血管和神经							
无	29	15	14	0.269	12	17	0.181
有	27	10	17		16	11	

讨 论

Hedgehog(Hh) 信号通路在细胞生长分化、脊椎动物胚胎发育中起重要作用。Hh 信号通路各组成部分的突变或异常激活会导致发育缺陷或肿瘤,包括小细胞肺癌、食管癌、胃癌、大肠癌、胰腺癌和前列腺癌等。研究表明,Hedgehog(Hh) 信号转导通路在人胰腺癌的发生、发展和恶性生物学特性的维持起着至关重要的作用^[2,3]。

Hedgehog 信号主要由 Hh 配体蛋白、Patched 和 Smo 两个跨膜蛋白受体、costal-2(cos2)(一种具有动力素样功能的蛋白)、融合蛋白 Fused、融合阻抑蛋白 Su(Fu)(suppressor of fused),以及下游转录因子 Ci 基因同源体相关产物-神经胶质瘤相关癌基因同源蛋白(glioma-associated oncogene homolog, Gli)组成^[4,5]。感受器蛋白 Patched 是膜受体,包括 Patched1 和 Patched2 两种亚型^[6]。当不存在 Hedgehog 蛋白时,Ptch1 抑制 Smo 的活性,使融合阻抑蛋白 Su(Fu)抑制末端神经胶质瘤相关癌基因同源蛋白(Gli)的活性,进而抑制下游基因的转录表达。当 Hedgehog 蛋白与 Ptch1 结合时,Ptch1 对 Smo 的抑制作用被解除,Smo 被激活,从而影响 Su(Fu)的功能,进入胞质,将信号下传,激活转录因子(Gli1、Gli2、Gli3),后者进入细胞核,直接启动 Ptch、Gli1、Wnt、EGF 等目的基因的表达。关于 Su(Fu)调节转录因子(Gli1、Gli2、Gli3)的机制,可能存在两种方式,一种是 Su(Fu)与 Gli 在细胞质结合,阻止 Gli 进入细胞核发挥转录活性;另一种是 Su(Fu)在细胞核内与其他蛋白结合,共同阻止 Gli 在细胞核发挥活性。

本研究采用 RT-PCR 和 Western blot 法检测结

果均显示,胰腺癌组织中 Ptch1、Su(Fu) mRNA 与蛋白表达均高于癌旁组织($P < 0.05$)。胰腺癌组织中 Ptch1、Su(Fu) mRNA 与蛋白表达均与胰腺癌的分化程度和 TNM 分期显著相关($P < 0.05$),与患者年龄、性别、肿瘤直径、侵犯血管和神经无关($P > 0.05$)。表明 Hedgehog 信号通路在胰腺癌恶性生物学特性的维持中起重要作用,Ptch1、Su(Fu) 基因的激活与胰腺癌的恶性程度高、分化增殖快有关。胰腺癌 Ptch1、Su(Fu) 基因的干预治疗能否抑制胰腺癌发生、发展,有待于进一步研究。

参考文献

- 姚捷,安勇,卫积书,等. Hedgehog 信号通路相关蛋白在人胰腺癌 SW1990 耐药株中的表达及意义[J]. 外科理论与实践,2012,17(3):248-251
- Onishi H, Morifuji Y, Kai M, et al. Hedgehog inhibitor decreases chemosensitivity to 5-fluorouracil and gemcitabine under hypoxic conditions in pancreatic cancer[J]. Cancer Sci, 2012, 103(7): 1272-1279
- Hao K, Tian XD, Yang YM, et al. Hedgehog signaling pathway regulates human pancreatic cancer cell proliferation and metastasis[J]. Oncol Rep, 2013, 29(3): 1124-1132
- Choi KS, Harfe BD. Hedgehog signaling is required for formation of the notochord sheath and patterning of nuclei pulposi within the intervertebral discs[J]. Pro Nati Acad Sci USA, 2011, 108(23): 9484-9489
- Ghanbari A, Khazaei M, Hashemi-Tabar M, et al. Sonic hedgehog inhibition induces mouse embryonic stem cells to differentiate toward definitive endoderm[J]. Indian J Exp Biol, 2013, 51(3): 201-207
- Lee Y, Miller HL, Russell HR, et al. Patched2 modulates tumorigenesis in patched1 heterozygous mice[J]. Cancer Res, 2006, 66(14): 6964-6971

(收稿日期:2015-03-26)

(修回日期:2015-04-07)