

文章编号:1005-6947(2006)06-0466-03

· 简要论著 ·

乙酰肝素酶 2 蛋白的表达与胰腺癌浸润、转移的关系及其意义

张水军, 郭文治, 赵永福, 史冀华, 郑守华, 宋燕, 翟文龙

(郑州大学第一附属医院 外科, 河南 郑州 450052)

摘要:为探讨乙酰肝素酶 2 (Hpa2) 蛋白与胰腺癌浸润、转移的关系及其临床病理意义, 笔者应用免疫组织化学染色法检测 26 例胰腺癌组织中 Hpa2 蛋白的表达和微血管密度 (MVD)。结果显示 Hpa2 蛋白在正常胰腺组织中不表达, 而在胰腺癌组织中的阳性率为 69.23% (18/26), 在癌旁组织中阳性率为 33.33% (7/21), 两者差异有显著性 ($P < 0.05$)。癌组织 MVD 为 19.47 ± 5.14 , 癌旁组织 MVD 为 14.17 ± 5.84 , 差异亦有显著性 ($P < 0.05$)。胰腺癌组织中 Hpa2 蛋白的表达和 MVD 分别与患者的年龄、性别、肿瘤直径无关 ($P > 0.05$), 但与肿瘤的临床分期、包膜是否完整、是否有淋巴结转移有关 ($P < 0.05$)。Hpa2 表达阳性组的 MVD [$(20.84 \pm 4.99)/HP$] 高于 Hpa2 表达阴性组 MVD [$(16.39 \pm 4.26)/HP$] ($P < 0.05$)。提示 Hpa2 蛋白可能参与胰腺癌的发生和发展过程, 对判断胰腺癌的浸润、转移有一定的参考价值。

关键词: 胰腺肿瘤/病理学; 肿瘤浸润; 肿瘤转移; 乙酰肝素酶 2 蛋白

中图分类号: R735.9; R73-37

文献标识码: B

胰腺癌是一种临床表现隐匿、进展迅速、预后差的消化道恶性肿瘤, 临床上确诊时 75% 以上患者已属中晚期, 胰腺癌的手术切除率低, 对化疗、放疗不敏感, 术后 5 年生存率仍在 5% 左右。乙酰肝素酶 2 (Heparanase 2, Hpa2) 是一种 β -D-葡萄糖醛酸酯酶, 属糖苷内切酶, 参与多种生理病理过程。Hpa2 定位于 10q²³⁻²⁴, 分 Hpa2a, Hpa2b, Hpa2c, 各自编码 480, 534, 592 个氨基酸残基的蛋白质, 在正常胰腺组织中不表达。随着对肿瘤研究的深入, Hpa2 与肿瘤浸润、转移及血管生成的关系渐被重视, 并成为肿瘤研究的热点。本实验采用免疫组织化学 (免疫组化) 染色方法检测 26 例胰腺癌组织中 Hpa2 蛋白的表达和微血管密度 (micro-vessel density, MVD), 研究 Hpa2 与胰腺癌浸润、转移的关系。

1 材料与方 法

1.1 标本及其相关资料

收稿日期:2005-10-31; 修订日期:2006-05-17。

作者简介:张水军,男,河南洛阳人,郑州大学第一附属医院教授,主要从事肝胆胰方面的研究。

通讯作者:张水军 E-mail:zhangshuijun@zzu.edu.cn。

收集 1999—2003 年本院普外科手术切除且经病理证实的原发性胰腺癌存档蜡块 26 例, 其中 21 例带有癌旁组织 (距肿瘤 2 cm 以远的胰腺组织, 无癌组织病理证实)。本组男 10 例, 女 16 例; 年龄 34~74 (平均 54.3) 岁。肿瘤直径 0.5~5 cm; 其中直径 < 2 cm 者 5 例, 直径 \geq 2 cm 21 例。按国际抗癌联盟 (UICC) 1997 年对胰腺癌的分期标准, I~II 期 9 例, III~IV 期 17 例。另正常胰腺组织 2 例, 取自胰腺外伤患者。

1.2 方 法

标本均为石蜡包埋的存档蜡块。每一个标本连续切片 4 张, 厚 4 μ m。切片经脱蜡、水化处理后行 SABC 法免疫组化染色; 操作严格按照试剂盒说明书进行。羊抗人 Hpa2 多克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品, 工作浓度 1:100; 鼠抗人 CD34 单克隆抗体为 Sigma 公司产品, 工作浓度 1:100。用已知阳性的结肠癌组织切片作为阳性对照, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替一抗设为阴性对照。

1.3 结果判定

1.3.1 Hpa2 的表达 Hpa2 的表达定位于肿瘤细

胞的胞浆中,呈棕黄色或棕褐色,团块状。排除背景染色,根据在高倍视野(HP×200)下阳性细胞占细胞总数的百分比来判定:0%~10%为(-);11%~25%为(+);26%~50%为(++);>50%为(+++)^[1]。

1.3.2 MVD计数 按Weidner等^[2]方法计数MVD。在排除非特异性染色情况下,任何被CD34染成棕黄或棕褐色分界清楚的细胞或内皮细胞簇均作为1个血管计数。在低倍光镜下随机选择视野,然后在高倍视野(HP×200)下计数3个视野内的微血管数,求其均数作为MVD的值。

1.4 统计学处理

计数资料用 χ^2 检验或Fisher's确切概率计算法;计量资料用t检验。 $\alpha=0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 Hpa2蛋白和MVD在胰腺癌组织和癌旁组织中的表达

Hpa2在正常胰腺组织中不表达,而在癌组织和癌旁组织中有不同程度的表达。在癌组织中Hpa2的阳性率为69.23%(18/26),在癌旁组织中阳性率为33.33%(7/21);两者差异有显著性($P < 0.05$)。MVD在癌组织中为 19.47 ± 5.14 ,在癌旁组织中为 14.17 ± 5.84 ,差异亦有显著性($P <$

0.05);在正常胰腺组织中为 13.23 ± 3.58 。

2.2 Hpa2蛋白的表达与临床病理因素的关系

胰腺癌组织中Hpa2蛋白的表达与患者的年龄、性别、肿瘤的直径无关($P > 0.05$),但与肿瘤的临床分期、包膜完整与否、是否有淋巴结转移有关($P < 0.05$);肿瘤临床分期高(17/26),包膜不完整(16/26),有淋巴结转移(18/26)者的Hpa2表达明显高于分期低(9/26),包膜完整(10/26)和无淋巴结转移(8/26)者(表1)。

2.3 MVD与临床病理因素的关系

在胰腺癌组织中的MVD与患者的年龄、性别、肿瘤的直径无关($P > 0.05$),但与肿瘤的临床分期、包膜完整与否、是否有淋巴结转移有关($P < 0.05$);肿瘤临床分期高 21.34 ± 4.62 ,包膜不完整 21.38 ± 4.84 ,有淋巴结转移 21.06 ± 4.71 者的MVD明显高于分期低 15.92 ± 4.26 ,包膜完整 16.41 ± 4.16 和无淋巴结转移 15.88 ± 4.36 者(表1)。

2.4 Hpa2蛋白表达与MVD的关系

18例Hpa2阳性表达组(18/26)的MVD为 20.84 ± 4.99 高于8例Hpa2阴性表达组(8/26)的 16.39 ± 4.26 ,两者差异有显著性($P < 0.05$)(表2)。

表1 Hpa2蛋白的表达和MVD与临床病理资料的关系

临床病理资料	Hpa2表达(例数)		P值	MVD	t值	P值
	阳性(+~+++)	阴性				
年龄(岁)	<60	11	0.683	20.71 ± 5.65	1.466	0.156
	≥ 60	7		17.78 ± 3.99		
性别	男	5	0.189	20.5 ± 6.32	0.803	0.430
	女	13		18.83 ± 4.34		
肿瘤直径(cm)	<2	3	0.060	18.04 ± 4.2	0.944	0.354
	≥ 2	15		20.11 ± 5.49		
临床分期	I+II	3	0.008	15.92 ± 4.26	2.921	0.007
	III+IV	15		21.34 ± 4.62		
肿瘤包膜	完整	4	0.026	16.41 ± 4.16	2.680	0.013
	不完整	14		21.38 ± 4.84		
淋巴结转移	有	16	0.003	21.06 ± 4.71	2.648	0.014
	无	2		15.88 ± 4.36		

表2 Hpa2 与 MVD 的关系

Hpa2	例数	MVD 值
阳性 (+ ~ + + +)	18	20.84 ± 4.99
阴性	8	16.39 ± 4.26

注: $t = 2.189, P < 0.05$

3 讨论

Hpa2 蛋白通过切断细胞表面和细胞外基质中硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 (HSPGs) 上的硫酸乙酰肝素 (HS) 侧链, 使间质屏障功能降低, 从而利于肿瘤细胞的扩散、转移, 并释放出结合在 HS 上的碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF), 促进血管生长, 为肿瘤的浸润、转移提供了物质基础与通道, 使其在多种生理和病理过程中起重要作用, 尤其在肿瘤的生长、扩散、转移中起重要作用。

近年来关于肿瘤浸润转移的研究较多, 且较为深入, 如冯延平等^[3] 通过腺病毒介导的生长抑素受体 2 (SSTR-2) 基因对胰腺癌 BxPC-3 细胞浸润、转移。通常将肿瘤的临床分期高低、肿瘤包膜完整与否、是否有淋巴结转移作为肿瘤侵袭性的指标, 但缺乏一定的量化标准。本研究结果表明, Hpa2 蛋白在临床分期高、肿瘤包膜不完整、有淋巴结转移的胰腺癌组织的表达明显高于低分期、肿瘤包膜完整、无淋巴结转移者, 提示 Hpa2 蛋白可能参与胰腺癌的浸润、转移过程, 与胰腺癌的侵袭性有关。本结果与诸多研究结果相一致。EI 等^[4] 运用逆转录酶链反应 (RT-PCR) 检测 55 例肝细胞肝癌 (HCC) 的 Hpa mRNA 表达水平, 发现在 Hpa 阳性表达组中, 85% 的肿瘤呈高度、中度侵袭性, 该比例远高于 Hpa 阴性组; Hpa 的表达水平与肿瘤的浸润程度呈明显的正相关。Koliopanos 等^[5] 研究发现, 胰腺癌组织中 Hpa mRNA 含量为正常组织的 30.2 倍, 且其表达与术后生存率之间有着明显的负相关性。离体培养的胰腺癌细胞经全长 Hpa 转染后, 侵袭转移性明显增高, 系因胰腺癌组织中 Hpa 过度表达从而增加肿瘤细胞侵袭能力所致。

目前认为 bFGF 在血管生成中发挥重要作用, 而 Hpa2 通过降低细胞间屏障功能并释放出大量

的 bFGF, 在肿瘤的浸润、转移中发挥作用。Vlodavsky 等^[6] 认为 Hpa 通过两种方式促进血管生长: (1) 直接方式, 即 Hpa 直接作用于内皮细胞以生芽方式促进血管生成; (2) 间接方式, 即通过血管内皮细胞释放 HS-bFGF 复合物和产生 HS 降解片段, 促进 bFGF 活性, 间接诱发血管生长。Bentolila 等^[7] 进行的体外实验证明 PI-88 在体外具有很好的抑制血管生成和抑制 Hpa 活性的作用, 证实了 Hpa 具有促进血管生成的作用。本研究中胰腺癌组织的 MVD 与肿瘤的临床分期、包膜完整与否、是否有淋巴结转移有关, 且 Hpa2 蛋白阳性组的 MVD 显著高于 Hpa2 蛋白阴性组的 MVD, 进一步说明 Hpa2 蛋白在胰腺癌肿瘤血管生成过程中所起的重要作用。

因此笔者认为, Hpa2 蛋白可能参与胰腺癌的发生、发展过程, 并与肿瘤的浸润、转移有关, 可望作为判断胰腺癌浸润、转移的参考指标。

参考文献:

- [1] Kleeff J, Ishiwata T, Kumbasar A, *et al.* The cell-surface heparan sulfate proteoglycan glypican-1 regulates growth factor action in pancreatic carcinoma cells and is overexpressed in human pancreatic cancer [J]. *Clin Invest*, 1998, 102 (9): 1662 - 1673.
- [2] Weidner N, Folkman J, Pozza F, *et al.* Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma [J]. *Natl Cancer Inst*, Dec 1992, 84 (24): 1875 - 1887.
- [3] 冯延平, 高军, 黄涛, 等. 生长抑素受体基因对胰腺癌细胞侵袭转移影响的研究 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14 (11): 724 - 728.
- [4] Osama N, El-Assal, Akira Y, *et al.* The clinico-pathological significance of heparanase and basic fibroblast growth factor expressions in hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7 (5): 1299 - 1305.
- [5] Koliopanos A, Friess H, Kleeff J, *et al.* Heparanase expression in primary and metastatic pancreatic cancer [J]. *Cancer Res*, 2001, 61 (12): 4655 - 4659.
- [6] Vlodavsky I, Elkin M, Pappo O, *et al.* Mammalian heparanase as mediator of tumor metastasis and angiogenesis [J]. *Isr Med Assoc J*, 2000, 2 (Suppl): 37 - 45.
- [7] Bentolila A, Vlodavsky I, Ishai-Michaeli R, *et al.* Poly (N-acryl amino acids): a new class of biologically active polyanions [J]. *Med Chem*, 2000, 43 (13): 2591 - 2600.