

网络出版时间: 2020-7-15 9:02 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200713.1200.029.html>

CD155 蛋白在胰腺癌组织和细胞系中的表达及其临床意义

周海波^{1,2}, 陈 炯^{1,2}, 鄢高华^{1,2}, 胡丕波^{1,2}, 何俊飞^{1,2}

摘要 目的 研究 CD155 蛋白在胰腺导管腺癌组织和癌旁正常组织以及在胰腺癌细胞系中的表达及其临床意义。方法 采用免疫组织化学方法检测 92 例胰腺导管腺癌配对的石蜡包埋组织和癌旁正常组织中 CD155 蛋白的表达情况, 并研究 CD155 与胰腺导管腺癌患者临床病理参数之间的关系, 同时利用 Western blot 和 qRT-PCR 法检测正常胰腺细胞 (HPDE6-C7) 和 3 株胰腺癌细胞 (Panc-1、BxPC-3、AsPC-1) 中 CD155 的表达情况。结果 免疫组化结果显示, CD155 主要表达于胰腺导管腺癌组织的细胞膜上, CD155 在胰腺导管腺癌组织中阳性表达率为 65.22% (60/92), 而在癌旁正常组织中阳性表达率为 38.04% (35/92), 两组阳性表达的差异有统计学意义 ($\chi^2 = 13.60, P < 0.01$); CD155 表达与分化程度 ($P < 0.001$)、神经浸润 ($P < 0.001$)、淋巴结转移 ($P = 0.001$) 均有相关性; Western blot 及 qRT-PCR 结果显示 3 株胰腺癌细胞中 CD155 蛋白及 mRNA 的表达量均高于正常胰

腺细胞, 其差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 CD155 的表达与胰腺导管腺癌的分化程度、神经浸润及淋巴结转移均相关, CD155 的检测有助于胰腺导管腺癌患者病情的严重程度评估, 同时鉴于 CD155 在胰腺癌细胞中的高表达, 利用 CD155 与免疫细胞活化性受体 DNAM-1 结合, 启动免疫细胞对胰腺癌的活化杀伤作用, 为胰腺癌的免疫治疗提供新思路。

关键词 CD155; 胰腺癌; 免疫组织化学; Western blot; qRT-PCR

中图分类号 R 735.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)08-1294-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.08.029

胰腺癌是一种恶性程度高的消化系统肿瘤, 早期无特异性症状, 大多数患者在临床确诊时已处于晚期阶段, 虽然目前胰腺癌的治疗手段有了进步, 但其 5 年生存率仅有 9%, 胰腺癌已成为全球第 7 大致死癌症^[1-2]。CD155 蛋白 (又称人类脊髓灰质炎病毒受体, poliovirus receptor, PVR) 是 Nectin 样分子家族中的第 5 个成员, 也属于免疫球蛋白超家族成员, 是 DNAX 辅助分子-1 (DNAX accessory molecule-1, DNAM-1) 的配体, 研究表明其在结肠癌、肺癌多种恶性肿瘤中高表达, 与肿瘤的进展、侵袭、转移及

2020-04-02 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81071985); 安徽省国际科技合作项目 (编号: 1008070038)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院¹ 普外科、² 肝胆胰外科实验室, 合肥 230001

作者简介: 周海波, 男, 硕士研究生;

陈 炯, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: ch_jiong@126.com

in 86 diabetic patients (166 eyes), and 26 diabetic patients (26 eyes) who had no eye fundus changes after FFA examination were included in the experimental group, and 15 patients (25 eyes) with age and sex matching without fundus disease were selected as the control group for OCTA examination. Two examination images were obtained, as well as a series of parameters such as blood flow density of 300 μm paracentral fovea (FD-300), central fovea shallow layer, deep blood flow density and surrounding area of optic disc blood flow density. **Results** FFA was consistent with OCTA diagnosis DR ($\text{Kappa} = 0.514, P < 0.001$). Based on FFA, foveal avascular zone change was found in 74 eyes, macular edema was found in 59 eyes, retinal microhemangioma was found in 138 eyes, retinal neovascularization was found in 112 eyes, nonperfused areas was found in 115 eyes. Based on OCTA, the above fundus diseases were found in 81, 52, 125, 103, 101 eyes, with no statistically significant difference ($P > 0.05$). Compared with the control group, the density of FD-300, the blood flow density in the shallow layer, the density of the blood flow in the central fovea concave depression and the surrounding area of optic disc decreased, with statistically significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion** FFA and OCTA were generally consistent in diagnosing diabetic retinopathy, while OCTA can detect the changes of partial blood flow parameters of DR without detecting macular and optic disc lesions in FFA, providing a new index for early DM patients without changes of fundus.

Key words diabetic retinopathy; fundus fluorescein angiography; optical coherence tomography angiography

预后等有关^[3]。但是关于 CD155 蛋白的表达与胰腺癌组织之间的关系,目前国内外文献报道较少。该研究运用免疫组织化学法检测胰腺导管腺癌及其癌旁组织中 CD155 蛋白的表达情况,并分析其与临床病理资料的关系,采用 Western blot 及 qRT-PCR 法分析胰腺正常细胞及胰腺癌细胞株中的 CD155 蛋白及 mRNA 的表达,旨在探讨 CD155 表达与胰腺癌组织的相关性及其临床意义。

1 材料与方法

1.1 病例资料 人正常胰腺细胞株 HPDE6-C7 及胰腺癌细胞株 Panc-1、BxPC-3、AsPC-1(中科院上海细胞库)。收集安徽医科大学附属省立医院普外科在 2016 年 1 月~2019 年 10 月间接收的实施根治性手术切除并经病理证实为胰腺导管腺癌的组织及其对应的癌旁组织(距离癌组织 >2 cm)各 92 例。被研究者临床资料完整,术前无放化疗。其中:男 56 例,女 36 例;年龄 40~79(61.43±9.05)岁,<60 岁 38 例,≥60 岁 54 例;胰头癌、胰体尾癌分别为 53、39 例;高、中+低分化分别为 35、57 例;TNM 分期参照 AJCC 分期第 7 版,其中 I~II 期 54 例,III~IV 38 例;淋巴结转移及未转移分别为 50、42 例;神经侵犯 55 例,未被侵犯 37 例。本实验均得到医院伦理委员会的批准及患者的知情同意。

1.2 主要试剂 胎牛血清(杭州四季青公司);RPMI1640 培养基、DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司);TRIzol 试剂(美国 Invitrogen 公司);逆转录试剂盒(美国 Thermo 公司);CD155 一抗(美国 CST 公司);二抗、免疫组化试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 胰腺正常细胞(HPDE6-C7)、胰腺癌细胞(BxPC-3、AsPC-1)使用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基培养,胰腺癌细胞(Panc-1)使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养。4 种细胞均静置于 37℃、5% CO₂ 条件下恒温培养 2~3 d 换液传代。

1.3.2 Western blot 从培养基中分别收取胰腺正常细胞及 3 株胰腺癌细胞,加入 RIPA 细胞裂解液提取蛋白,按照 1:4 加入 5× 上样缓冲液。沸水浴加热 10 min 冷却后上样,SDS-PAGE 电泳分离蛋白质,半干转法将蛋白质转移至 PVDF 膜;5% 脱脂奶粉封闭;滴加稀释过的 CD155 一抗 4℃ 过夜;加入适当稀释度的辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗,

室温孵育 2 h 后 PBST 洗涤 3 次,随后加入 ECL 曝光显影并使用 Image J 软件进行条带分析。

1.3.3 qRT-PCR 按照 TRIzol 试剂盒提取胰腺正常细胞及 3 株胰腺癌细胞的 RNA,根据逆转录试剂盒说明书操作合成 cDNA。使用 qPCR 试剂盒进行扩增反应,反应体系为 10 μl。以 β-actin 为内参,上游引物:5'-CCCTGGAGAAGAGCTACGAG-3',下游引物:5'-GGAAGGAAGGCTGGAAGAGT-3';CD155 上游引物:5'-CCAGTGAGCACTCAGGTACA-3',下游引物:5'-GTCTGTGGATCCTGGGAAGA-3'。采用 2^{-ΔΔCt} 计算 mRNA 表达量,实验重复 6 次。

1.3.4 免疫组化 石蜡包埋标本 3 μm 连续切片,脱蜡后柠檬酸盐高压修复,缓慢冷却至室温,然后使用内源性过氧化物酶阻断剂消除内源性过氧化物酶活性(30 min),PBS 冲洗 3 次,再滴加一抗 CD155 (1:200) 4℃ 过夜,次日室温下放置 30 min,PBS 冲洗 3 次,随后滴加二抗孵育 30 min,PBS 冲洗 3 次,加入适量 DAB 显色,自来水冲洗,苏木精复染,烤箱烘干,最后中性树脂封片。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 20.0 进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间差异的比较采用 *t* 检验,四组均数比较采用方差分析及两两比较的 SNK 检验,Pearson 卡方检验分析 CD155 的表达与患者临床病理资料间的关系 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD155 蛋白在正常胰腺细胞及 3 株胰腺癌细胞中的表达 Western blot 结果提示 CD155 蛋白在正常胰腺细胞和胰腺癌细胞中均有表达,但是在胰腺正常细胞中表达较低,HPDE6-C7、Panc-1、AsPC-1、BxPC-3 中 CD155 平均灰度值分别为 (0.27 ± 0.03)、(1.15 ± 0.08)、(0.82 ± 0.06)、(0.63 ± 0.03),四组之间差异有统计学意义 (*F* = 135.99, *P* < 0.01),在胰腺癌细胞中由低到高的顺序为 BxPC-3、AsPC-1、Panc-1,与 HPDE6-C7 比较,差异有统计学意义 (*t* = 15.59、15.50、17.08, *P* < 0.01)。见图 1、2。

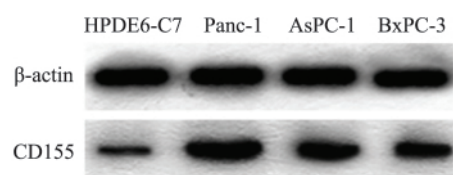


图 1 胰腺正常细胞和 3 株胰腺癌细胞中 CD155 蛋白表达情况

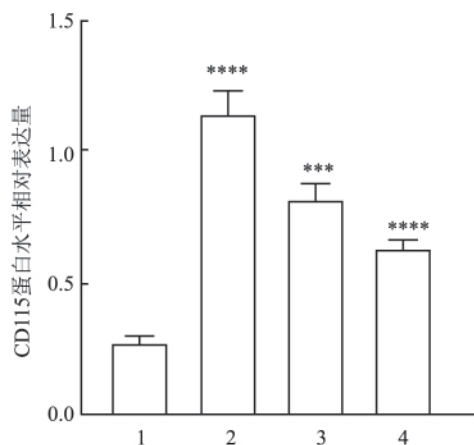


图2 胰腺正常细胞和3株胰腺癌细胞中CD155蛋白表达量

1: HPDE6-C7; 2: Panc-1; 3: AsPC-1; 4: BxPC-3; 与HPDE6-C7比较, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

2.2 CD155 mRNA在正常胰腺细胞及3株胰腺癌细胞中的表达差异 PCR结果显示CD155 mRNA在正常胰腺细胞及3株胰腺癌细胞均有表达, HPDE6-C7、Panc-1、AsPC-1、BxPC-3中CD155 mRNA平均表达水平分别为(1.00 ± 0.15)、(5.02 ± 0.39)、(2.79 ± 0.28)、(1.67 ± 0.06), 四组之间差异有统计学意义($F = 295.82$, $P < 0.05$)。与正常胰腺细胞HPDE6-C7比较, 胰腺癌细胞(BxPC-3、AsPC-1、Panc-1)中mRNA表达量均比正常胰腺细胞高, 其差异有统计学意义($t = 10.38, 14.13, 17.08$, $P < 0.01$), 且mRNA结果与Western blot中CD155蛋白表达结果相一致。见图3。

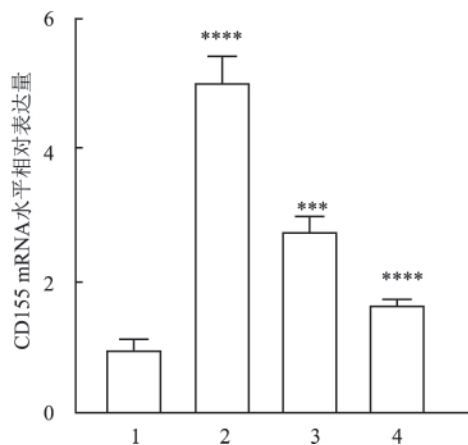


图3 胰腺正常细胞和3株胰腺癌细胞中CD155 mRNA表达量

1: HPDE6-C7; 2: Panc-1; 3: AsPC-1; 4: BxPC-3; 与HPDE6-C7比较, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

2.3 CD155蛋白在胰腺导管腺癌和癌旁正常组织中的表达 免疫组化结果显示CD155蛋白主要表

达在胰腺导管腺癌组织的细胞膜上, 胰腺导管腺癌组织中阳性表达率为65.22% (60/92), 癌旁组织中阳性表达率为38.04% (35/92), 其差异有统计学意义($\chi^2 = 13.60$, $P < 0.01$)。见图4。

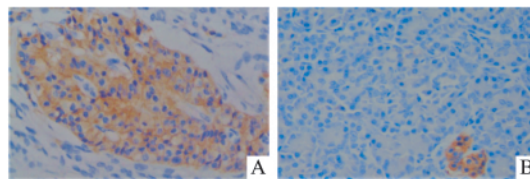


图4 CD155蛋白在胰腺导管腺癌和胰腺癌组织中表达情况 ×200

A: 胰腺导管腺癌; B: 癌旁组织

2.4 CD155蛋白的表达与胰腺导管腺癌临床资料的相关性 CD155蛋白的表达与胰腺导管腺癌的分化程度、神经浸润、淋巴结转移有关($\chi^2 = 12.451, 16.614, 10.551$, $P < 0.05$), 而与患者的性别、年龄、肿瘤位置、TNM分期等无关。见表1。

表1 胰腺导管腺癌组织中CD155蛋白的表达与临床病理关系 (n)

参数	n	CD155 阳性 (n = 60)	CD155 阴性 (n = 32)	χ^2 值	P值
性别					
男	56	36	20	0.055	0.085
女	36	24	12		
年龄(岁)					
<60	38	25	13	0.009	0.923
≥60	54	35	19		
肿瘤位置					
胰头	53	35	18	0.037	0.847
胰体尾	39	25	14		
分化程度					
高	35	15	20	12.451	<0.001
中+低	57	45	12		
TNM分期					
I~II	54	33	21	0.972	0.324
III~IV	38	27	11		
神经浸润					
有	55	45	10	16.614	<0.001
无	37	15	22		
淋巴结转移					
有	50	40	10	10.551	0.001
无	42	20	22		

3 讨论

DNAM-1(又称DNAX辅助因子-1、CD226)是一种分子量为65 000的免疫球蛋白样跨膜糖蛋白,可表达于NK细胞、T淋巴细胞、单核细胞和一部分B细胞的表面,CD155作为DNAM-1的配体,可分为膜

表达型(mCD155)和可溶型(sCD155)两种形式;有研究^[3-5]报道 DNAM-1 受体与靶细胞膜表面配体 CD155 结合后可促使免疫细胞(如 NK 细胞、T 细胞)活化,释放穿孔素和颗粒酶等细胞毒性分子并诱导靶细胞的凋亡,CD155 由于其突出的免疫功能,最近在肿瘤免疫学领域备受关注,与健康组织相比,CD155 在人类恶性肿瘤中高表达,可与活化或抑制性受体结合参与免疫功能调节。

CD155 与多种肿瘤的发生、发展紧密相连。Triki et al^[6]对 158 例乳腺癌标本通过免疫组化发现 CD155 在乳腺癌中呈现高表达,其主要表达于细胞膜和细胞质中,细胞膜上 CD155 表达与 NK 细胞浸润有关,并且细胞膜上高表达 CD155 的乳腺癌组织 NK 细胞浸润的密度越高,相比较细胞膜上低表达 CD155 的乳腺癌患者,具有更好的预后和更高的生存率。Kearney et al^[7]发现健康患者来源的 NK 细胞杀伤急性髓系白血病(AML)细胞需依赖 CD155 与 DNAM-1 的结合,当 AML 细胞不表达或低表达 CD155 时,不能促使 NK 细胞活化,降低了 NK 细胞裂解靶细胞的能力,而高表达 CD155 的 AML 细胞, NK 细胞对其杀伤作用强,当使用硼替佐米上调低 CD155 表达的 AML 细胞,增强了 NK 细胞杀伤 AML 细胞的杀伤能力,这表明 CD155 的表达高低直接影响到 DNAM-1 依赖的 NK 细胞对 AML 细胞的杀伤作用的强弱。虽然这些研究显示 CD155 高表达是诱导肿瘤凋亡的有利因素,但是也有研究表明抑制 CD155 的表达而发挥抗肿瘤作用。Zheng et al^[8]用免疫组织化学方法检测了 97 例结肠癌组织和癌旁正常组织的 CD155 表达情况,结果表明 CD155 在结肠癌中的表达比癌旁组织高,同时 Western-blot 方法也证实了结肠癌组织和细胞中 CD155 的高表达,分析与临床病理间的关系发现 CD155 的表达与结肠癌 AJCC 分期和转移相关,表明 CD155 的过度表达与结肠癌的进展有关,进一步的实验研究显示 CD155 基因敲除能抑制结肠癌细胞的增殖、侵袭、转移以及促进结肠癌细胞的凋亡,其可能通过上调促凋亡分子和抑制抗凋亡分子的表达而发挥作用。上述的这些研究结果表明 CD155 的表达在不同肿瘤中发挥着重要的免疫功能,CD155 可能成为肿瘤治疗的新靶点,这为治疗胰腺癌提供了新思路,或许能够调控 CD155 的表达来探索胰腺癌治疗的新方法。

本研究通过免疫组化法检测了 92 例胰腺导管腺癌组织和及其配对的癌旁正常组织中 CD155 的表达情况,结果显示胰腺导管腺癌组织中 CD155 表

达高于癌旁正常组织,主要表达于胰腺导管腺癌组织的细胞膜上。为了验证 CD155 在胰腺癌中的转录和翻译水平,本课题组设计了 Western blot 和 qRT-PCR 两项实验来检测胰腺癌细胞系和正常胰腺细胞 CD155 的表达,结果显示胰腺癌细胞系中 CD155 蛋白和 mRNA 水平均高于正常胰腺细胞,其结果与免疫组化的结果相一致。进一步分析显示 CD155 蛋白表达与胰腺导管腺癌的分化程度、神经侵犯及淋巴结转移均有相关性,而与患者其它临床资料无相关性。有研究^[9-10]表明癌症患者中 DNAM-1 受体表达降低或 sCD155 表达增加,降低了免疫细胞对肿瘤细胞的杀伤作用。Lee et al^[11]发现双阴性 T 细胞能通过 DNAM-1 与急性髓系白血病表面的 CD155 结合而发挥抗肿瘤作用,当阻断 DNAM-1 受体后,其杀伤肿瘤细胞的能力降低。这表明 DNAM-1 与 CD155 的有效结合是免疫细胞杀伤肿瘤细胞的所依赖的途径。根据这些研究者的发现,所以本研究推测胰腺癌患者中可能也出现 DNAM-1 的减少,导致机体内免疫细胞不能充分与胰腺癌表面的高表达的 CD155 结合,或者因 sCD155 的增多,与 mCD155 竞争结合 DNAM-1 受体,使活化的免疫细胞减少,从而降低了对肿瘤细胞的杀伤,使得胰腺癌得以进展。本实验结果提示 CD155 在胰腺癌中的高表达可能与胰腺癌的发生、发展及预后存在一定的相关性,CD155 的检测可能有助于评估胰腺癌患者的临床病情。

综上,本研究表明 CD155 蛋白在胰腺导管腺癌中高表达,且与胰腺导管腺癌的分化程度、神经浸润及淋巴结转移有相关性,这些结果提示 CD155 可能参与了胰腺癌的发生、发展,提示 CD155 可能是预测胰腺癌预后的生物学标志物,同时因其的免疫功能,CD155 有望成为胰腺癌治疗的新靶点。课题组后期将通过体外细胞阻断实验研究免疫细胞是否通过 CD155/DNAM-1 途径杀伤胰腺癌细胞,进一步阐述 CD155 高表达在胰腺癌中的作用。

参考文献

- [1] Rawla P, Sunkara T, Gaduputi V. Epidemiology of pancreatic cancer: global trends, etiology and risk factors [J]. *World J Oncol* 2019, 10(1): 10-27.
- [2] Siegel RL, Miller KD. Cancer statistics, 2019 [J]. *CA Cancer J Clin* 2019, 69(1): 7-34.
- [3] Gao J, Zheng Q, Xin N, et al. CD155, an onco-immunologic molecule in human tumors [J]. *Cancer Sci* 2017, 108(10): 1934-8.

- [4] Xiong P , Sang H W , Zhu M. Critical roles of co-activation receptor DNAM-1 accessory molecule-1 in natural killer cell immunity [J]. *Immunology* 2015 , 146(3) : 369 – 78.
- [5] Morisaki T , Onishi H. Cancer immunotherapy using NKG2D and DNAM-1 systems [J]. *Anticancer Res* 2012 , 32(6) : 2241 – 2.
- [6] Triki H , Charfi S , Bouzidi L , et al. CD155 expression in human breast cancer: Clinical significance and relevance to natural killer cell infiltration [J]. *Life Sci* 2019 , 231 : 116543.
- [7] Kearney C J , Ramsbottom K M , Voskoboinik I , et al. Loss of DNAM-1 ligand expression by acute myeloid leukemia cells renders them resistant to NK cell killing [J]. *Oncoimmunology* 2016 , 5(8) : e1196308.
- [8] Zheng Q , Wang B , Gao J , et al. CD155 knockdown promotes apoptosis via AKT/Bcl-2/Bax in colon cancer cells [J]. *J Cell Mol Med* 2018 , 22(1) : 131 – 40.
- [9] Sanchez-Correa B , Valhondo I , Hassouneh F , et al. DNAM-1 and the TIGIT/PVRIG/TACTILE Axis: novel immune checkpoints for natural killer cell-based cancer immunotherapy [J]. *Cancers* , 2019 , 11(6) : 877.
- [10] 张 章. DNAM-1 和 NKG2D 配体表达增强 NK 细胞杀伤结肠癌细胞作用研究 [D]. 陕西: 第四军医大学 2011.
- [11] Lee J , Minden M D , Chen W C , et al. Allogeneic human double negative T cells as a novel immunotherapy for acute myeloid leukemia and its underlying mechanisms [J]. *Clin Cancer Res* 2018 , 24(2) : 370 – 82.

Expression of CD155 protein in pancreatic cancer tissues and cell lines and its clinical significance

Zhou Haibo^{1,2} , Chen Jiong^{1,2} , Wu Gaohua^{1,2} , et al

(¹ Dept of General Surgery ,² Laboratory of Hepatopancreatobiliary Surgery ,
The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medicine University , Hefei 230001)

Abstract Objective To study the expression and clinical significance of CD155 protein in pancreatic ductal adenocarcinoma tissues and adjacent normal tissues , as well as in pancreatic cancer cell lines. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the expression of CD155 in paraffin-embedded tissues and non-carcinoma adjacent tissues from 92 cases of pathologically confirmed pancreatic ductal adenocarcinoma. And the relationship between CD155 and clinical pathological parameters was analyzed. Western blot and qRT-PCR methods were also used to detect the expression of CD155 in normal pancreatic cells (HPDE6-C7) and three pancreatic cancer cells (Panc-1 , BxPC-3 , AsPC-1) . **Results** The results of immunohistochemistry showed that CD155 was mainly expressed on the cell membrane of pancreatic ductal adenocarcinoma tissues. The positive expression rate of CD155 in pancreatic ductal adenocarcinoma tissues was 65. 22% (60/92) , while the positive expression rate in normal tissues adjacent to the cancer was 38. 04% (35/92) , the difference in positive expression between the two groups was statistically significant ($\chi^2 = 13. 60$, $P < 0. 01$) ; The expression of CD155 was related to the degree of pancreatic ductal adenocarcinoma differentiation ($P < 0. 001$) , neural infiltration ($P < 0. 001$) , and lymph node metastasis ($P = 0. 001$) ; Western blot and qRT-PCR results showed that the expression levels of CD155 protein and mRNA in three pancreatic cancer cells were higher than those in normal pancreatic cells , and the differences were statistically significant compared with normal pancreatic cells ($P < 0. 01$) . **Conclusion** The expression of CD155 is correlated with the degree of pancreatic ductal adenocarcinoma differentiation , nerve invasion and lymph node metastasis. The detection of CD155 is used to evaluate the severity of pancreatic ductal adenocarcinoma patients. At the same time , CD155 is highly expressed in pancreatic cancer cells. It may be possible to use CD155 to bind to the immune cell activating receptor DNAM-1 to initiate the activation and killing effect of immune cells on pancreatic cancer and provide new ideas for immunotherapy of pancreatic cancer.

Key words CD155; pancreatic cancer; immunohistochemistry; Western blot; qRT-PCR