

网络出版时间: 2017-1-20 11:13 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170120.1113.051.html>

◇ 临床医学研究 ◇

UL16 结合蛋白在胰腺癌中的表达及其临床意义

朱兴兴^{1,2} 陈炯^{1,2} 徐弘^{1,2} 胡丕波^{1,2}, 赵金钱^{1,2}

摘要 目的 检测 UL16 结合蛋白(ULBP)在胰腺癌患者中的表达及其临床意义。方法 免疫组化分析 ULBP 在 62 例胰腺癌组织和 62 例癌旁组织的表达,ELISA 法检测 62 例胰腺癌患者外周血中 ULBP 的表达和 35 例健康对照者中 ULBP 和 CA19-9 的表达。ROC 曲线和 Logistic 回归分析比较 ULBP 和 CA19-9 对胰腺癌患者的诊断价值。结果 ULBP1 和 ULBP2 在胰腺癌组织中的表达均高于癌旁组织($\chi^2 = 7.352, P = 0.007; \chi^2 = 11.648, P = 0.001$)。s-ULBP2 在胰腺癌患者外周血中的含量高于健康对照者;s-ULBP2 与 CA19-9 联合后对胰腺癌的诊断价值高于单独 CA19-9。结论

ULBP1 和 ULBP2 在胰腺癌组织中的表达升高且 ULBP1 的表达阳性率和胰腺癌组织的临床病理资料有关。ULBP2 在胰腺癌患者外周血中的表达量高于健康对照者且 ULBP2 和 CA19-9 联合后能够提高 CA19-9 单独用于胰腺癌的诊断价值。

关键词 胰腺癌;NKG2D;ULBP

中图分类号 R 735.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)02-0232-04

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.02.018

由于缺乏早期诊断及有效的治疗方法,胰腺癌的死亡率很高。如果不接受任何治疗的话,胰腺癌患者的 5 年生存率不到 5%。美国癌症调研组预测在 2016 年美国人群中会有 53 070 人患上胰腺癌,其中 41 780 人会死于该疾病^[1]。2010 年中国前十位致死性癌症排行显示:胰腺癌致死性在男性和女性人群中分别处于第 6 位和第 7 位^[2]。目前胰腺癌的治疗仍以手术为主,但即使经过积极的治疗后,胰腺癌的 5 年生存率也只有 25%~35%^[3]。所以仍然需要寻找对胰腺癌更有效的早期诊断、术前病情评估以及治疗的方法。免疫治疗是癌症治疗研究中的热

点及核心。NK 细胞表面活化性受体(natural killer cell activating receptor, NKG2D)是一种广泛表达于 NK 细胞、NKT 细胞、CD8⁺ T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞等免疫细胞表面的蛋白^[4]。UL16 结合蛋白(unique long 16-binding proteins, ULBP)是 NKG2D 的一种配体,研究^[5]表明 ULBP 蛋白参与了胃癌、肺癌及宫颈癌的机体对肿瘤的免疫过程。ULBP 分为表达于组织细胞膜上的 m-ULBP(membrane ULBP)和血液中游离的 s-ULBP(soluble ULBP)^[6]。该研究通过检测 ULBP 在胰腺癌组织及癌旁组织的表达,筛选出差异性表达的 ULBP 后,分析这种差异表达与胰腺癌患者临床资料的关系;再检测胰腺癌患者和健康对照者外周血中 ULBP 的含量,以 CA19-9 为参照分析 ULBP 对胰腺癌诊断的价值;从而了解 ULBP 在胰腺癌组织中的表达情况,为进一步研究胰腺癌的免疫治疗和诊断提供研究思路与依据。

1 材料与方法

1.1 标本 人胰腺癌组织蜡块标本和癌旁蜡块标本各 62 例(距离癌组织 > 1 cm)。组织均取自 2013 年 1 月~2016 年 1 月安徽医科大学附属省立医院普外科收治后经手术治疗且病理证实为胰腺癌的组织。其中男 35 例,女 27 例;年龄 24~81(61.32 ± 14.86)岁,所有患者术前未进行放化疗。同时收集这 62 例胰腺癌患者的临床资料,包括年龄、性别、病历资料、CA19-9 值等。从 2015 年 5~6 月体检中心的健康人群中随机抽取 35 例,其中男 20 例,女 15 例;年龄 35~72(58.32 ± 16.71)岁。分别抽取 35 例健康对照者和 62 例胰腺癌患者的外周血,2 000 r/min 离心 15 min,取上层血浆置于 -80 °C 备用。肿瘤分期参照美国癌症联合委员会 TNM 分期手册第七版。

1.2 主要试剂 免疫组化用兔抗人 ULBP1、ULBP2、ULBP3 多克隆抗体购自美国 Novus Biologicals 公司;相应二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;ULBP1、ULBP2 和 ULBP3 ELISA 检测试剂盒购自美国 R&D system 公司;CA19-9 ELISA 检测

2016-09-18 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:10080703038)

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

作者简介:朱兴兴,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

试剂盒购自上海恒远生物技术发展有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫组化 4 μm 厚的连续组织切片经脱蜡后放置于 pH 6 的环境中微波修复 10 min 再向切片上滴加 3% H_2O_2 和山羊血清等待 20 min 以封闭非特异性蛋白并消除内源性过氧化物酶活性,再分别滴加一抗 ULBP1 (1:100)、一抗 ULBP2 (1:100) 和一抗 ULBP3 (1:100) 常温下过夜,随后加入二抗,加入适量 DAB 染液后苏木精复染,最后酒精脱水、甲醛透明并封片。每一步操作之后均用 PBS 洗净玻片上的试剂残留后再加入下一种试剂。读片由两位经验丰富的病理科医师采用半定量法评估结果。首先根据染色程度分为 0 分(未着色)、1 分(淡黄色)、2 分(黄色)、3 分(棕黄色)。然后随机选取 6 个高倍镜视野进行阳性百分比估计,分为 0 分(无细胞着色)、1 分(10% 左右细胞着色)、2 分(11% ~ 40% 细胞着色)、3 分(超过 40% 细胞着色)。每张切片的最终得分为两项结果的乘积 ≥ 4 分的为阳性。

1.3.2 ELISA 法检测 采取 62 例胰腺癌患者和 35 例健康对照的血浆,室温溶解至液体后按照 ELISA 试剂盒说明依次进行操作,然后把试剂板放置酶标仪中设置波长为 450 nm,读取各孔板的 OD 值,然后再用 Excel 绘制标准曲线,按照曲线方程计算出各样本浓度值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,

定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组均数间比较采用 t 检验,胰腺癌组和健康对照组的阳性表达率比较选用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法,采用 ROC 曲线和 Logistic 回归分析 s-ULBP 和 CA19-9 的诊断价值。

2 结果

2.1 胰腺癌组织标本及癌旁 ULBP 的表达情况及其与胰腺癌临床病理参数的关系 m-ULBP 在胰腺癌中的表达见图 1。其中 m-ULBP1 在胰腺癌组织和癌旁组织中的阳性表达率分别为 56.5% (35/62) 和 32.3% (20/62),两者差异有统计学意义 ($\chi^2 = 7.352, P = 0.007$); m-ULBP2 在胰腺癌组织和癌旁组织中的阳性表达率分别为 64.5% (40/62) 和 33.9% (21/62),两者差异有统计学意义 ($\chi^2 = 11.648, P = 0.001$); m-ULBP3 在胰腺癌组织和癌旁组织中的阳性表达率分别为 33.9% (21/62) 和 29.0% (18/62),两者差异无统计学意义。进而分析 m-ULBP1 和 m-ULBP2 与胰腺癌患者临床资料的关系,结果提示 m-ULBP2 阳性表达率和胰腺癌组织的临床 TNM 分期、神经侵犯和肿瘤组织的分化程度差异有统计学意义 ($P = 0.017, 0.036, 0.008$),见表 1。

2.2 s-ULBP 在胰腺癌患者外周血中的含量及其临床意义 ELISA 检测结果显示 s-ULBP1 在胰腺癌患者外周血及健康对照者的外周血中无明显差异; s-ULBP2 在胰腺癌患者的外周血中的含量和健康对

表 1 ULBP1 和 ULBP2 的表达与胰腺癌患者临床资料之间的相关分析(n)

临床病理参数	n	ULBP1		P 值	ULBP2		P 值
		阴性(n=27)	阳性(n=35)		阴性(n=22)	阳性(n=40)	
性别							
男	35	17	18	0.185	7	28	0.066
女	27	10	17		15	12	
年龄(岁)							
<60	33	14	19	0.377	12	21	0.071
≥ 60	29	13	16		10	19	
肿瘤部位							
胰头	32	13	19	0.487	7	25	0.154
胰尾	30	14	16		15	15	
TNM 分期							
I ~ II	38	12	26	0.117	10	28	0.017
III	24	15	9		12	12	
神经侵犯							
无	34	16	18	0.265	14	20	0.036
有	28	11	17		8	20	
组织分化							
低-中	37	17	22	0.050	12	27	0.008
高	25	10	13		10	13	

照者中的含量差异有统计学意义 [(124.74 ± 9.24) pg/ml vs (65.39 ± 5.23) pg/ml, $P = 0.013$]; 而 s-ULBP3 在胰腺癌患者和健康对照者中外周血的含量几乎测不出。再利用 CA19-9 作为参照, ROC 曲线和 Logistic 回归进一步分析 s-ULBP2 对胰腺癌诊断的价值。结果表明虽然 s-ULBP2 单独用于胰腺癌的诊断价值不如 CA19-9 [AUC = 0.75 (95% CI: 0.643 ~ 0.856), AUC = 0.84 (95% CI: 0.761 ~ 0.917)], 但 s-ULBP2 与 CA19-9 联合后能够提高 CA19-9 的诊断价值 [AUC = 0.88 (95% CI: 0.807 ~ 0.943)], 见图 2。

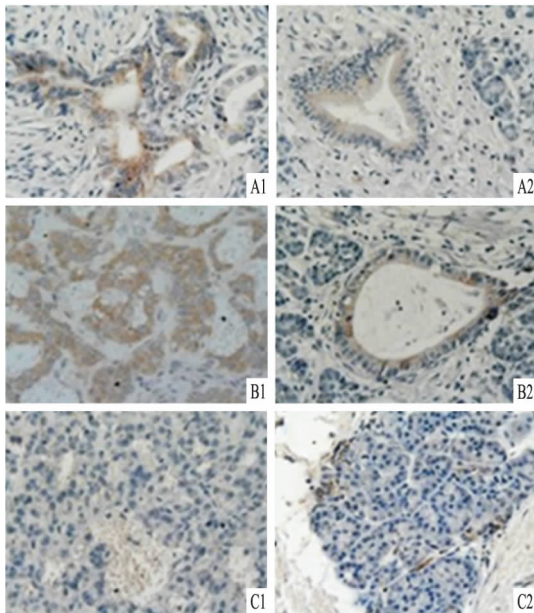


图1 ULBP在胰腺癌组织及癌旁组织的表达 DAB × 400 A: ULBP1; B: ULBP2; C: ULBP3; 1: 胰腺癌组织; 2: 癌旁组织

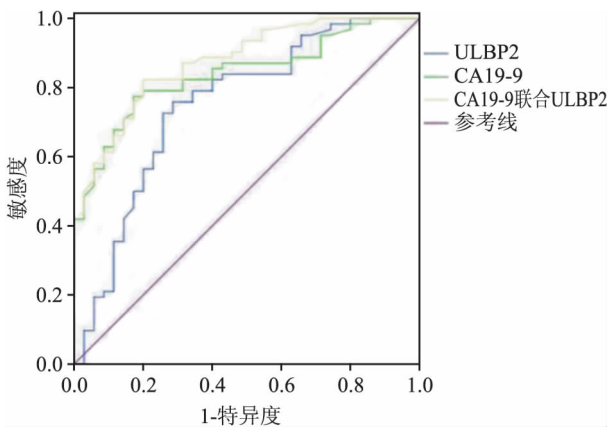


图2 Logistic 回归分析和 ROC 曲线共同分析 ULBP2 和 CA19-9 对胰腺癌的诊断价值

3 讨论

本实验通过免疫组化法检测了 m-ULBP 在胰腺癌组织和癌旁组织的表达, 结果显示 m-ULBP1 和 m-ULBP2 在胰腺癌组织中的表达和癌旁组织的表达差异有统计学意义, 进一步分析这两种蛋白表达与患者临床资料数据的关系, 结果显示 m-ULBP2 与肿瘤组织的 TNM 分期、神经侵犯和肿瘤组织的分化程度差异有统计学意义。本实验还对胰腺癌患者外周血中 s-ULBP 的含量进行了检测并与健康对照者外周血中的含量进行了对比, 结果表明只有 s-ULBP2 在胰腺癌患者外周血中的含量高于健康对照者。随后为分析 s-ULBP2 对胰腺癌的诊断意义并与 CA19-9 进行对比, 结果表明 s-ULBP2 对胰腺癌患者的诊断意义不如 CA19-9, 但是如果联合 CA19-9 和 s-ULBP2 时就会提高 CA19-9 对胰腺癌的诊断价值。

在人类中, 目前研究显示其有两大类配体即 MICA/B 和 ULBP, 但这些配体在正常细胞上几乎不表达。当组织受到病毒感染、恶变、缺血等刺激时, NKG2D 的配体在这些组织中的表达会升高。NKG2D 能介导免疫细胞与表达相应配体的肿瘤细胞结合, 从而发挥免疫细胞对肿瘤组织的细胞毒性作用。有研究^[7]表明 NK 细胞能够在体外诱导甲状腺肿瘤细胞凋亡。当阻断了 NK 细胞表面上 NKG2D 的表达后这种诱导凋亡作用消失, 并且这种效应和甲状腺肿瘤细胞表面表达的 ULBP2 相关。研究^[8]报道 ULBP1 在宫颈癌组织中表达升高, 而且 ULBP1 阳性表达的宫颈癌患者的无瘤生存率会升高。这些研究意味着 ULBP 的表达可能是机体自我保护的一种机制。本研究显示 ULBP1 和 ULBP2 在胰腺癌组织中的表达升高。而且 ULBP1 的表达和肿瘤组织的神经侵犯、组织分化的病理行为差异有统计学意义, 这意味着 ULBP1 和 ULBP2 在胰腺癌中的高表达可能参与了免疫细胞的细胞毒性作用, 而且 ULBP1 的阳性表达情况可能是一种对胰腺癌患者病情评估的指标。

ULBP 不仅表达于恶性肿瘤患者的组织中, 而且也存在于患者外周血中。外周血中的来源目前研究^[9]表明可能和免疫细胞和肿瘤细胞之间的接触有关, 也和一些金属蛋白酶如 MMP-9、MMP-14 和内质网蛋白 5 等小分子有关。血液中 ULBP 虽然不能介导免疫细胞的细胞毒性作用, 但有研究^[10-11]表明外周血中 s-ULBP2 的含量测定有助于早期慢性淋

巴瘤和小细胞型肺癌的诊断,而且也有学者证明了 s-ULBP2 联合巨噬细胞抑制因子 1 含量的测定能提高胰腺癌的诊断准确率。本实验结果表明外周血中 s-ULBP2 的含量测定可以提高 CA19-9 对胰腺癌诊断的价值。

综上所述,本实验证明了 m-ULBP1 和 m-ULBP2 在胰腺癌组织中的表达高于癌旁正常组织,并且 m-ULBP1 的表达与肿瘤组织的神经侵犯和组织分化程度以及 TNM 分期有关。s-ULBP2 能够提高 CA19-9 对胰腺癌的诊断价值。但是 ULBP 是否参与免疫细胞对胰腺癌细胞的免疫杀伤作用以及其是否能作为术前评估胰腺癌患者病情的指标还需进一步研究。

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2016 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(1):7-30.
- [2] Chen W, Zheng R, Zhang S, et al. Report of cancer incidence and mortality in China, 2010 [J]. *Ann Transl Med*, 2014, 2(7):61.
- [3] Mitchem J B, Hamilton N, Gao F, et al. Long-term results of resection of adenocarcinoma of the body and tail of the pancreas using radical antegrade modular pancreatosplenectomy procedure [J]. *J Am Coll Surg* 2012, 214(1):46-52.
- [4] Vivier E, Raulet D H, Moretta A, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells [J]. *Science*, 2011, 331(6013):44-9.
- [5] Lanier L L. NKG2D receptor and its ligands in host defense [J]. *Cancer Immunol Res*, 2015, 3(6):575-82.
- [6] Zhang J, Basher F, Wu J D. NKG2D ligands in tumor immunity: two sides of a coin [J]. *Front Immunol* 2015, 6:97.
- [7] Wennerberg E, Pfefferle A, Ekblad L, et al. Human anaplastic thyroid carcinoma cells are sensitive to NK cell-mediated lysis via ULBP2/5/6 and chemoattract NK cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(22):5733-44.
- [8] Cho H, Chung J Y, Kim S, et al. MICA/B and ULBP1 NKG2D ligands are independent predictors of good prognosis in cervical cancer [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14:957.
- [9] Huergo-Zapico L, Acebes-Huerta A, López-Soto A, et al. Molecular bases for the regulation of NKG2D ligands in cancer [J]. *Front Immunol* 2014, 5:106.
- [10] Yamaguchi K, Chikumi H, Shimizu A, et al. Diagnostic and prognostic impact of serum-soluble UL16-binding protein 2 in lung cancer patients [J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(8):1405-13.
- [11] Nüchel H, Switala M, Sellmann L, et al. The prognostic significance of soluble NKG2D ligands in B-cell chronic lymphocytic leukemia [J]. *Leukemia*, 2010, 24(6):1152-9.

Expression and clinical significance of UL16 binding proteins in pancreatic carcinoma

Zhu Xingxing^{1,2}, Chen Jiong^{1,2}, Xu Hong^{1,2}, et al

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

Abstract Objective To investigate the expression and clinical significance of UL16 binding proteins (ULBP) in pancreatic cancer. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the expressions of ULBP in tumor tissues and adjacent non-tumor tissues from a total of 62 patients with pancreatic carcinoma. ELISA was used to detect the expression of ULBP in patients with pancreatic cancer and healthy people. Then ROC curve and Logistic regression analysis were taken to analyze the diagnostic value of ULBP, compared with carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9).

Results The positive expression rates of ULBP1 and ULBP2 were higher in tumor tissues than in adjacent non-tumor tissues ($\chi^2 = 7.352, P = 0.007; \chi^2 = 11.648, P = 0.001$). The level of ULBP2 in the peripheral blood of pancreatic cancer patients was higher than healthy people. Besides, the diagnostic value of the combination of ULBP2 and CA19-9 was higher than CA19-9 alone. **Conclusion** Up-regulated ULBP2 is significantly correlated with the clinical TNM stage of pancreatic cancer patients, peri-neural invasion of tumor tissue and the differentiated degree of cancer cells. The combinational diagnosis of ULBP2 and CA19-9 is better than CA19-9 alone.

Key words pancreatic carcinoma; NKG2D; ULBP