

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00846

胰腺导管腺癌组织中 PUMA、P53、Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达及临床意义

李 津¹, 邓静静², 满晓华³, 蒋 慧², 陈 颖², 徐晶晶², 郑建明^{2*}

- 1. 南京军区福州总医院传染科, 福州 350000
- 2. 第二军医大学长海医院病理科, 上海 200433
- 3. 第二军医大学长海医院消化科, 上海 200433

[摘要] **目的** 观察胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDA)组织中 PUMA、P53、Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达,探讨 PUMA 在 PDA 发生、发展中的作用及其与 P53、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的关系。**方法** 采用免疫组织化学 EnVision 方法检测 65 例 PDA 组织及配对癌旁组织中 PUMA、P53、Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达情况。**结果** PDA 中 PUMA 蛋白阳性表达率为 30.8%(20/65),明显低于相应癌旁组织 49.2%(32/65),差异有统计学意义($P<0.05$)。不同肿瘤大小及有、无淋巴结转移患者肿瘤组织 PUMA 表达差异有统计学意义($P<0.05$),而不同年龄、性别、肿瘤部位、分化程度、肿瘤分期和有无神经浸润患者 PUMA 表达差异无统计学意义。肿瘤组织 PUMA 蛋白表达与 P53、Bcl-2 蛋白表达均负相关($P=0.019, P=0.015$),而与 Bax 蛋白表达无相关性。**结论** PDA 组织中 PUMA 蛋白表达下调与肿瘤大小、淋巴结转移有关,PUMA 可能参与了 PDA 的发生、发展,其蛋白表达水平的检测可能有利于 PDA 预后判定。

[关键词] 胰腺导管腺癌;PUMA;P53;Bax;Bcl-2

[中图分类号] R 735.9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)08-0846-04

Expression of PUMA, P53, Bax and Bcl-2 proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma and the relevant clinical significance

LI Jin¹, DENG Jing-jing², MAN Xiao-hua³, JIANG Hui², CHEN Ying², XU Jing-jing², ZHENG Jian-ming^{2*}

- 1. Department of Infectious Diseases, Fuzhou General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command, Fuzhou 350000, Fujian, China
- 2. Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
- 3. Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To observe the expression of PUMA, P53, Bax and Bcl-2 protein in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDA), and to investigate the role of PUMA in tumorigenesis of PDA and its relationship with P53, Bax and Bcl-2 protein expression. **Methods** The expression of PUMA, P53, Bax and Bcl-2 protein was examined by immunohistochemical EnVision method in 65 PDA tissues and the corresponding adjacent tissues. **Results** The positive rate of PUMA protein expression was 30.8%(20/65) in the PDA tissues, which was significantly lower than that in the corresponding adjacent tissues (49.2%[32/65], $P<0.05$). The expression of PUMA protein was significantly correlated with the tumor size and lymph node metastasis ($P<0.05$), but not with patient's age, sex, tumor location, differentiation degree, tumor stage or neural invasion. PUMA expression was negatively correlated with P53 and Bcl-2 expression($P=0.019, P=0.015$), but was not correlated with Bax expression in PDA tissues. **Conclusion** Decreased PUMA protein expression is correlated with tumor size and lymph node metastasis in PDA patients, suggesting that PUMA protein might be involved in the tumorigenesis and development of PDA. Detection of PUMA protein expression may be used for predicting the prognoses of PDA patients.

[Key words] pancreatic ductal adenocarcinoma; p53 up-regulated modulator of apoptosis; P53; Bax; Bcl-2

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(8):846-849]

胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDA)是一种恶性程度高、进展迅速和预后极差的恶性肿瘤,5 年生存率不足 5%^[1],近年的发病率呈上升趋势。细胞凋亡受阻是 PDA 发生的重要机

制,而高侵袭、高转移和高耐药性等特性导致其治疗效果较差^[1-2]。

PUMA(p53 up-regulated modulator of apoptosis)基因是具有强大促凋亡作用的 Bcl-2 家族 BH-

[收稿日期] 2010-03-12 **[接受日期]** 2010-06-07

[作者简介] 李 津,硕士生. E-mail: jin334371@eyou.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81873689, E-mail: jmzheng1962@163.com

only 亚家族成员,它通过 p53 依赖性途径及非依赖性途径促进细胞凋亡,是 p53 介导的下游促凋亡基因^[2-4]。因此,本研究采用免疫组化方法观察 PDA 组织中 PUMA 蛋白的表达,并分析其与肿瘤恶性生物学行为及与 P53、Bax、Bcl-2 蛋白表达间的相关性,探讨其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 标本来源及一般资料

收集第二军医大学长海医院 2004 年 1 月至 2009 年 12 月间手术切除的 PDA 石蜡标本 65 例,相应的癌旁组织作为对照。65 例 PDA 患者,男 39 例,女 26 例,年龄 37~77 岁,平均(58.8±4.6)岁。其中中高分化 53 例,低分化 12 例;肿瘤发生于胰头部 47 例,胰体尾 18 例;根据 TNM 分期标准(2002 年 UICC 胰腺癌分期第 6 版),计有 I 期 13 例,II 期 15 例,III 期 33 例,IV 期 4 例。伴有胰周淋巴结转移 34 例,无淋巴结转移 31 例,远处转移 4 例(肝转移 3 例,大网膜转移 1 例);伴神经浸润 47 例,未见神经浸润 18 例。所有患者术前均未行放、化疗。65 例 PDA 及癌旁组织切片均由病理科专家 2 次阅片确定。癌旁组织均取自距离癌灶 2 cm 以上。所有标本均经 10% 中性甲醛固定,石蜡包埋,4 μm 连续切片。

1.2 免疫组织化学染色

兔抗人 PUMA 多克隆抗体为美国 Cell Signaling 公司产品,工作浓度 1:100;鼠抗人 p53、Bax 和 Bcl-2 抗体购自武汉博士德生物工程有限公司,二抗 EnVision 试剂盒购自 Dako 公司。采用免疫组化 EnVision 二步法,主要步骤:石蜡切片 4 μm,常规脱蜡水化,微波修复抗原,0.3% 过氧化氢阻断内源性过氧化物酶,室温下孵育 20 min,滴加非免疫动物的血清,室温下孵育 10 min,阻断非特异性抗原,滴加一抗 37℃ 孵育 40 min,再滴加二抗 EnVision 试剂,温箱孵育 30 min, DAB 显色;苏木精复染、分化、返蓝,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。实验中用 PBS 代替一抗作为阴性对照,用已知阳性鳞状细胞癌标本作为阳性对照。

1.3 结果判定标准

PUMA、Bax 和 Bcl-2 阳性判定标准以胞质内出现棕黄染色为阳性,P53 阳性为细胞核染成棕黄色。每例随机观察 5 个高倍视野,每个视野计数 200 个细胞,阳性细胞数 <10% 为阴性(-),10%~25% 为弱阳性(+),26%~50% 为中等阳性(++),> 50% 为强阳性(+++)。

1.4 统计学处理

应用 SPSS 11.0 统计软件,采用 χ^2 检验,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 PDA 及癌旁组织中 PUMA 蛋白表达

PUMA 在 PDA 和癌旁组织中表达主要位于胞质内,部分质、核内同时表达(图 1)。65 例 PDA 组织中 20 例表达阳性,阳性率 30.8%(20/65);癌旁组织中呈阳性表达的有 32 例,阳性率 49.2%(32/65)。PUMA 在 PDA 中的阳性率明显低于癌旁正常胰腺组织,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

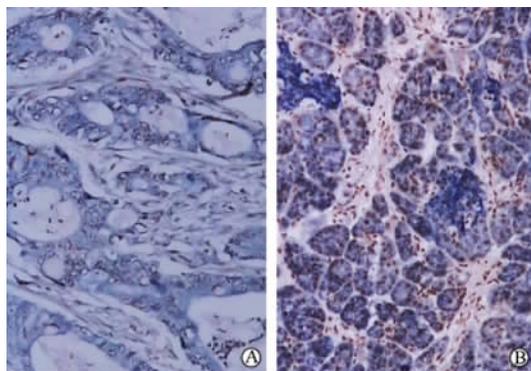


图 1 胰腺中分化导管腺癌(A)、癌旁(B)组织中 PUMA 蛋白的表达

Fig 1 Expression of PUMA protein in moderately differentiated PDA(A) and para-cancerous(B) tissues (EnVision staining)
Original magnification: ×200

2.2 PUMA 蛋白表达与 PDA 临床病理特征间的关系

结果(表 1)表明:不同肿瘤大小及有、无胰周淋巴结转移患者肿瘤组织 PUMA 表达差异有统计学意义($P < 0.05$),而不同年龄、性别、肿瘤部位、分化程度、肿瘤分期和有无神经浸润患者 PUMA 表达差异无统计学意义。

2.3 PDA 及癌旁组织中的 Bax、Bcl-2 和 P53 的表达

Bax 和 Bcl-2 蛋白表达主要位于细胞质中,65 例 PDA 组织中分别有 32 例和 27 例表达阳性,阳性表达率分别为 49.2%(32/65)和 41.5%(27/65),而癌旁组织中分别有 26 例和 17 例表达阳性,阳性表达率分别为 40.0%(26/65)和 26.2%(17/65)。经统计学分析,癌和癌旁组织中两者的表达率差异均无统计学意义;P53 在 PDA 组织中的表达主要位于胞核内,其阳性表达率为 47.7%(31/65),在癌旁组织中全为阴性表达,经统计学分析,两者差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1 PUMA 蛋白表达与 PDA 临床病理特征的关系

Tab 1 Relationship between PUMA protein expression and clinicopathological characteristics of PDA patients

Index	N	Expression of PUMA protein		χ^2	P
		+	-		
Age (year)					
≤60	38	13	25	0.509	0.476
>60	27	7	20		
Sex					
Male	39	13	26	0.301	0.583
Female	26	7	19		
Location					
Head of pancreas	47	15	32	0.105	0.746
Body/tail of pancreas	18	5	13		
Tumor size d/cm					
≤2	11	7	4	6.715	0.010
>2	54	13	41		
Tumor differentiation					
Well-moderate	53	17	36	0.230	0.632
Poor	12	3	9		
Tumor stage					
I-II	28	9	19	0.044	0.835
III-IV	37	11	26		
Neural infiltration					
+	47	16	31	0.854	0.356
-	18	4	14		
Lymph node metastasis					
+	34	6	28	5.763	0.016
-	31	14	17		

2.4 PDA 组织中 PUMA 与 Bax、Bcl-2 和 P53 蛋白表达间的相关性 结果(表 2)表明:PUMA 蛋白表达阳性的 20 例 PDA 组织中,Bax、Bcl-2、P53 阳性的分别为 7 例、4 例和 5 例,而 PUMA 蛋白表达阴性的 45 例 PDA 组织中,Bax、Bcl-2 和 P53 阳性的分别为 25 例、23 例和 26 例,经统计学分析表明,PUMA 与 Bcl-2 和 P53 蛋白表达均呈负相关性($P < 0.05$),而与 Bax 蛋白表达无相关性。

表 2 PUMA 与 Bax、Bcl-2 及 P53 表达的相关性

Tab 2 Relationship of PUMA expression with Bax, Bcl-2 and P53 protein expression

	Expression of PUMA protein		χ^2	P
	+	-		
Bax				
+	7	25	2.341	0.126
-	13	20		
Bcl-2				
+	4	23	5.519	0.019
-	16	22		
P53				
+	5	26	5.963	0.015
-	15	19		

3 讨论

人 PUMA 基因定位于 19q13.3-q13.4,由 4 个外显子和 3 个内含子组成,其 cDNA 全长 1.9 kb,编码 1 个全长为 193 个氨基酸残基的蛋白^[3-4]。许多恶性肿瘤存在 PUMA 蛋白的表达缺失,且 PUMA 表达缺失在不同肿瘤组织中意义不尽相同^[5-6]。Jansson 等^[5]在散发性大肠癌研究中发现,PUMA mRNA、蛋白在肿瘤组织中的表达与正常黏膜相比,既有上调也有下调,PUMA 上调可能是应答 DNA 损伤的结果,下调可能是 p53 基因突变的信号;PUMA 上调或下调与临床病理特征及预后间均无相关性,认为 PUMA 表达的改变在大肠癌的发生、发展中发挥次要作用。Karst 等^[6]应用组织芯片和免疫组化技术研究原发性和转移性恶性黑色素瘤及不典型增生组织的 PUMA 表达,发现原发性黑色素瘤的 PUMA 表达明显弱于不典型增生组织,而转移性黑色素瘤的 PUMA 表达明显弱于原发性黑色素瘤组织,提示肿瘤组织 PUMA 弱表达与预后不良正相关;进一步研究表明,外源性 PUMA 在人类黑色素瘤细胞中表达将导致显著的细胞凋亡,PUMA 表达可能是人类黑色素瘤预后的重要指标之一^[7]。但 Yoo 等^[8]在人胃癌标本中研究发现,癌组织中 PUMA 蛋白较癌旁正常黏膜组织呈高表达,基因突变分析显示,癌组织中没有 PUMA 基因突变,认为 PUMA 表达增强在胃癌发生中起重要作用。本研究结果显示,PUMA 在 PDA 组织中的阳性表达率明显低于癌旁正常胰腺组织,提示 PDA 组织中存在 PUMA 表达缺失;PUMA 蛋白表达与 PDA 肿瘤大小有关,这可能是由于 PUMA 具有促凋亡作用所致,高表达者肿瘤细胞凋亡加快,表达缺失者则肿瘤细胞凋亡减慢,从而造成肿瘤体积相对较大。

PUMA 可以通过 p53 依赖性途径以及 p53 非依赖性两条途径促进细胞凋亡^[9-10]。本研究结果显示,PUMA 表达阴性组 P53 及 Bcl-2 表达率显著高于 PUMA 表达阳性组,即 PUMA 与 P53 和 Bcl-2 表达间呈负相关性,说明在 PDA 组织中 PUMA 是依赖 p53 途径进行调节的,PUMA 可以与 Bcl-2 蛋白结合,中和 Bcl-2 的凋亡抑制作用^[11-12]。当 p53 突变后丧失了对 PUMA 的调节作用,引起 PUMA 表达减少或缺失,对 Bcl-2 蛋白的中和作用减弱或消失,从而使 Bcl-2 抑制凋亡的作用增强,提示 PDA 肿瘤细胞凋亡调节的机制可能是通过 P53 调节 PUMA

表达,再调节 Bcl-2,抑制凋亡活动这一途径。与 Bcl-2 抑制凋亡的作用相反,Bax 可促进细胞凋亡。Bcl-2/Bax 比率对细胞命运有决定作用。当 Bcl-2 过表达而 Bax 表达不足,则形成 Bcl-2/Bcl-2 同源二聚体,使细胞存活期延长;当 Bax/Bax 同源二聚体占优势时,则促进细胞凋亡^[13-14]。

本研究结果还发现,PUMA 表达水平与淋巴结转移有明显相关,淋巴结转移组 PUMA 表达率明显低于无淋巴结转移组,提示 PUMA 可能参与了对 PDA 的转移过程,这可能是由于 p53 突变后丧失了对 PUMA 的调节作用,引起 PUMA 表达减少或缺失,从而对 Bcl-2 蛋白的中和作用减弱或消失,使 Bcl-2 表达增强,肿瘤细胞因凋亡减少而易发生转移,这与既往报道的 p53 和 Bcl-2 高表达的肿瘤淋巴结转移率高是一致的^[15-16]。

[参考文献]

- [1] Perini M V, Montagnini A L, Jukemura J, Pentead S, Abdo E E, Patzina R, et al. Clinical and pathologic prognostic factors for curative resection for pancreatic cancer[J]. *HPB (Oxford)*, 2008,10:356-362.
- [2] Phillips D C, Garrison S P, Jeffers J R, Zambetti G P. Assays to measure p53-dependent and -independent apoptosis[J]. *Methods Mol Biol*, 2009,559:143-159.
- [3] Yu J, Zhang L, Hwang P M, Kinzler K W, Vogelstein B. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells[J]. *Mol Cell*, 2001,7:673-682.
- [4] Nakano K, Vousden K H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53[J]. *Mol Cell*, 2001,7:683-694.
- [5] Jansson A, Arbman G, Sun X F. mRNA and protein expression of PUMA in sporadic colorectal cancer[J]. *Oncol Rep*, 2004,12:1245-1249.
- [6] Karst A M, Dai D L, Martinka M, Li G. PUMA expression is significantly reduced in human cutaneous melanomas[J]. *Oncogene*, 2005,24:1111-1116.
- [7] Karst A M, Dai D L, Cheng J Q, Li G. Role of p53 up-regulated modulator of apoptosis and phosphorylated Akt in melanoma cell growth, apoptosis, and patient survival[J]. *Cancer Res*, 2006,66:9221-9226.
- [8] Yoo N J, Lee J W, Jeong E G, Lee S H. Immunohistochemical analysis of pro-apoptotic PUMA protein and mutational analysis of PUMA gene in gastric carcinomas[J]. *Dig Liver Dis*, 2007,39:222-227.
- [9] Callus B A, Ekert P G, Heraud J E, Jabbour A M, Kotevski A, Vince J E, et al. Cytoplasmic p53 is not required for PUMA-induced apoptosis[J]. *Cell Death Differ*, 2008,15:213-215.
- [10] Yu J. PUMA kills stem cells to stall cancer[J]? *Mol Cell Pharmacol (Windsor Mill)*, 2009,1:112-118.
- [11] Luo X, He Q, Huang Y, Sheikh M S. Transcriptional upregulation of PUMA modulates endoplasmic reticulum calcium pool depletion-induced apoptosis *via* Bax activation[J]. *Cell Death Differ*, 2005,12:1310-1318.
- [12] Liu F T, Newland A C, Jia L. Bax conformational change is a crucial step for PUMA-mediated apoptosis in human leukemia [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003,310:956-962.
- [13] Rezende A C, Vieira A S, Rogério F, Rezende L F, Boschero A C, Negro A, et al. Effects of systemic administration of ciliary neurotrophic factor on Bax and Bcl-2 proteins in the lumbar spinal cord of neonatal rats after sciatic nerve transection[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2008,41:1024-1028.
- [14] Morissette M C, Vachon-Beaudoin G, Parent J, Chakir J, Milot J. Increased p53 level, Bax/Bcl-x(L) ratio, and TRAIL receptor expression in human emphysema[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008,178:240-247.
- [15] Gansauge F, Gansauge S, Schmidt E, Müller J, Beger H G. Prognostic significance of molecular alterations in human pancreatic carcinoma—an immunohistological study [J]. *Langenbecks Arch Surg*, 1998,383:152-155.
- [16] Tomaszewska R, Karcz D, Stachura J. An immunohistochemical study of the expression of bcl-2 and p53 oncoproteins in pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic cancer[J]. *Int J Pancreatol*, 1999,26:163-171.

[本文编辑] 贾泽军