

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2020.11.1222

· 论 著 ·

胰腺导管腺癌组织中法尼醇 X 受体的表达及其与患者临床病理特征和预后的关系

倪晨明¹, 倪灿荣², 郑楷炼¹, 金 钢^{1*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)长海医院肝胆胰外科, 上海 200433

2. 海军军医大学(第二军医大学)长海医院病理科, 上海 200433

[摘要] **目的** 观察胰腺导管腺癌组织中法尼醇 X 受体(FXR)/核因子受体 1H4(NR1H4) mRNA 和蛋白的表达状况, 分析其与患者临床病理特征及预后的关系。**方法** 选取 2013 年至 2016 年海军军医大学(第二军医大学)长海医院胰腺经外科手术切除的胰腺导管腺癌组织标本 176 例, 同时收集患者临床病理资料。将 176 例胰腺导管腺癌组织标本制作成组织芯片, 用 RNAscope 原位杂交技术和 NR1H4 探针检测胰腺导管腺癌组织芯片中 NR1H4 mRNA 的表达, 用多聚物二步法的免疫组织化学(IHC)技术检测 FXR/NR1H4 蛋白的表达。采用 χ^2 检验分析 FXR/NR1H4 mRNA 和蛋白表达与临床病理特征的关系, 以 Kaplan-Meier 生存分析和 Cox 比例风险回归模型研究 FXR/NR1H4 mRNA 和蛋白表达与预后的关系。**结果** 176 例胰腺导管腺癌组织中, RNAscope 原位杂交技术所测的 NR1H4 mRNA 阳性表达率为 68.75% (121/176), IHC 技术所测的 FXR/NR1H4 蛋白阳性表达率为 77.27% (136/176)。FXR/NR1H4 mRNA 和蛋白表达均与肿瘤临床分期 ($\chi^2=5.391, P=0.020$; $\chi^2=4.108, P=0.042$)、肿瘤分化程度 ($\chi^2=6.560, P=0.010$; $\chi^2=4.969, P=0.026$) 有关, 蛋白的表达也与肿瘤大小有关 ($\chi^2=4.957, P=0.026$); 两者与患者性别、年龄、神经浸润、肿瘤部位、淋巴结转移均无关 (P 均 >0.05)。Kaplan-Meier 生存分析结果显示, FXR/NR1H4 mRNA 和蛋白高表达的患者无进展生存期及总生存期均短于低表达的患者 (P 均 <0.05)。Cox 比例风险回归分析结果显示, FXR/NR1H4 蛋白高表达为胰腺导管腺癌患者无进展生存期 ($RR=1.701, 95\% CI 1.235\sim 2.432, P<0.05$) 和总生存期 ($RR=2.356, 95\% CI 1.983\sim 2.832, P<0.05$) 的独立危险因素。**结论** RNAscope 原位杂交技术与 IHC 技术可以相互印证, 保证检测结果的可靠性。胰腺导管腺癌组织中 FXR/NR1H4 的表达与患者的临床分期和分化程度有关, 其高表达是影响患者预后的独立危险因素。

[关键词] 胰腺肿瘤; 法尼醇 X 受体; 核因子受体 1H4; 预后; 临床病理特征; 原位杂交; RNAscope; 免疫组织化学

[中图分类号] R 735.9

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2020)11-1222-07

Expression of farnesol X receptor in pancreatic ductal adenocarcinoma and its relationship with clinicopathological features and prognosis

NI Chen-ming¹, NI Can-rong², ZHENG Kai-lian¹, JIN Gang^{1*}

1. Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Changhai Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. Department of Pathology, Changhai Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To observe the expressions of farnesol X receptor (FXR)/nuclear factor receptor 1H4 (NR1H4) mRNA and protein in pancreatic ductal adenocarcinoma tissues, and to analyze their correlations with clinicopathological features and prognosis. **Methods** A total of 176 pancreatic ductal adenocarcinoma specimens were collected from Changhai Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University) from 2013 to 2016. The clinicopathological data of the patients were collected. All the specimens were made into tissue microarray. The expression of NR1H4 mRNA was

[收稿日期] 2019-08-07 [接受日期] 2020-02-21

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81672830), 海军军医大学(第二军医大学)精准医学转化应用研究专项(2017JZ41)。Supported by General Program of National Natural Science Foundation of China (81672830) and Precision Medicine Transformation and Application Program of Naval Medical University (Second Military Medical University) (2017JZ41).

[作者简介] 倪晨明, 硕士, 主治医师. E-mail: smmuhero@163.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31161628, E-mail: drchjg@163.com

detected by RNAscope *in situ* hybridization and *NR1H4* probe, and FXR/NR1H4 protein was detected by polymer two-step immunohistochemistry. Chi-square test was used to analyze the relationship between the expression levels of FXR/NR1H4 mRNA and protein and clinicopathological features. Kaplan-Meier survival analysis and Cox regression model were used to study the relationship between the expression levels of FXR/NR1H4 mRNA and protein and patient prognosis. **Results** The positive rate of *NR1H4* mRNA detected by RNAscope *in situ* hybridization was 68.75% (121/176), and that of FXR/NR1H4 protein detected by immunohistochemistry was 77.27% (136/176). FXR/NR1H4 mRNA and protein expression levels were correlated with clinical stage ($\chi^2=5.391$, $P=0.020$; $\chi^2=4.108$, $P=0.042$) and differentiation ($\chi^2=6.560$, $P=0.010$; $\chi^2=4.969$, $P=0.026$); and the protein expression was also related to tumor size ($\chi^2=4.957$, $P=0.026$). No correlations were found between FXR/NR1H4 expression and the patient gender, age, nerve invasion, tumor location or lymph node metastasis (all $P>0.05$). Kaplan-Meier survival analysis showed that the progression-free survival and overall survival of patients with high expression levels of FXR/NR1H4 mRNA and protein were shorter than those with low expression levels ($P<0.05$). Cox regression analysis showed that high expression of FXR/NR1H4 protein was an independent risk factor of progression-free survival ($RR=1.701$, 95% CI 1.235-2.432, $P<0.05$) and overall survival of patients ($RR=2.356$, 95% CI 1.983-2.832, $P<0.05$). **Conclusion** RNAscope *in situ* hybridization and immunohistochemistry can confirm each other to ensure the reliability of the detection results. The expression of FXR/NR1H4 is related to the clinical stage and differentiation of pancreatic ductal adenocarcinoma, and its high expression is an independent risk factor of prognosis.

[Key words] pancreatic neoplasms; farnesol X receptor; nuclear factor receptor 1H4; prognosis; clinicopathological features; *in situ* hybridization; RNAscope; immunohistochemistry

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2020, 41(11): 1222-1228]

法尼醇 X 受体 (farnesol X receptor, FXR) 又称核因子受体 1H4 (nuclear factor receptor 1H4, NR1H4), 与人类肿瘤的发生有关, 但关于其在胰腺癌中的作用研究结果并不一致。Lee 等^[1]研究发现 FXR/NR1H4 过表达促进胰腺癌发生和淋巴结转移, 与患者预后差相关。Hu 等^[2]从 mRNA 和蛋白水平发现 FXR/NR1H4 在胰腺癌组织中的表达高于癌旁组织, 是一个不良的预后因素。但 Giaginis 等^[3]的研究结果显示 FXR/NR1H4 具有抗肿瘤作用且与预后好有关。

为了提高研究结果的可靠性, 本研究采用美国 ACD 公司新型 RNAscope 2.5 mRNA 原位杂交 (*in situ* hybridization, ISH) 技术和免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 技术分别检测 176 例人胰腺导管腺癌组织芯片中 FXR/NR1H4 mRNA 和蛋白的表达状态, 优化实验条件并进行互相印证, 进一步探讨 FXR/NR1H4 在胰腺导管腺癌组织中的表达及其与患者临床病理特征和预后的关系。

1 材料和方法

1.1 组织标本 选取 2013 年至 2016 年海军军医大学 (第二军医大学) 长海医院胰腺外科手术切除的胰腺导管腺癌组织标本 176 例, 同时收集患者临床

病理资料。176 例患者中男 108 例, 女 68 例; 年龄为 32~75 岁, 平均年龄 (60.6±11.5) 岁。其中高分化或中分化标本 110 例, 低分化或未分化标本 66 例; 按照国际抗癌联盟 TNM 分期标准, I、II 期标本 138 例, III、IV 期标本 38 例。纳入标准: (1) 10% 甲醛溶液固定的石蜡包埋 (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) 胰腺导管腺癌组织标本; (2) 经病理学确诊为胰腺导管腺癌; (3) 临床病理资料完整; (4) 术前未行放射和化学治疗; (5) 无其他原发性肿瘤。其中 48 例胰腺导管腺癌病例有配对的癌旁胰腺组织 (距癌组织边缘 1~1.5 cm) 和正常胰腺组织 (经病理学检查证实无癌细胞)。

1.2 组织芯片制作 将 FFPE 胰腺导管腺癌组织标本常规制成 H-E 切片, 确定具有代表性的肿瘤组织及癌旁组织, 然后应用 Quick-Ray 预铸蜡块模块 (孔径 1.5 mm, 阵列 10×9) 和手工组织芯片制作枪 (韩国 UniTMA 公司) 制备组织芯片。

1.3 试剂与耗材 NR1H4 单克隆抗体 (货号: ab187735; 稀释比例 1 : 200)、NR1H4 多克隆抗体 (货号: ab235094; 稀释比例 1 : 1 000)、羊抗鼠 IgG-FITC (稀释比例 1 : 500) 均购自英国 Abcam 公司, NR1H4 多克隆抗体 (货号: 25055-1-AP; 稀释比例 1 : 100) 购自美国 Proteintech 公

司, FXR单克隆抗体(货号: SC-25309; 稀释比例 1 : 30) 购自美国 Santa Cruz 公司; RNAscope® *NR1H4* mRNA 探针(货号: 494541)、RNAscope® 2.5 HD 检测试剂盒(棕色, 货号: 322310)、阳性对照探针 Hs-PPIB(货号: 313901)、阴性对照探针 DapB(货号: 310043)、RNAscope® 多通道二代荧光 HRP-C1、TSA® Plus-Cyanine 5、RNAscope® 多通道二代荧光 HRP 阻断剂均购自美国 ACD 公司。DAPI(货号: ab104139) 购自英国 Abcam 公司。

1.4 IHC 方法和评分 IHC 采用超敏低背景的多聚物二步法, 分别采用 4 种 FXR/NR1H4 一抗进行检测。切片常规脱蜡至水, 热诱导抗原修复, 阻断内源性过氧化物酶, 分别加入适当稀释的一抗和多聚物二抗进行孵育, DAB 显色, 苏木精衬染, 中性树胶封片, 显微镜下观察。由 2 位病理科医师(1 位主治医师、1 位副主任医师) 分别独立对 FXR/NR1H4 染色强度及范围进行评分。染色强度: 无染色为 0 分, 浅黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分; 染色范围: <5% 为 0 分, 5%~25% 为 1 分, >25%~50% 为 2 分, >50%~75% 为 3 分, >75% 为 4 分。取两者评分的乘积为最终总评分, 其中 <4 分为低表达, ≥4 分为高表达。

1.5 RNAscope ISH 方法和评分 先对切片进行 RNAscope 质量控制检测, 结果显示 176 例样本均符合质量控制要求。RNAscope ISH 操作步骤详见 ACD 公司推荐操作流程和文献[4], 简述如下: 切片常规脱蜡至水, 100 °C 靶标修复 25 min; 用 Immedge™ 阻水笔在组织周围画阻水圈; 蛋白酶消化; 阻断内源性过氧化物酶; 滴加 *NR4H1* RNAscope® 探针, 杂交过夜; 依次 40 °C 30 min、40 °C 15 min、40 °C 30 min、40 °C 15 min、室温 30 min、室温 15 min 放大杂交信号; DAB 显色 10 min, 衬染, 中性树胶常规封片, 显微镜下观察。RNAscope ISH 结果分为 5 个级别: 0 分(阴性, 无色或 <1 点/细胞, 40 倍视野), 1 分(1~3 点/细胞, 20~40 倍视野), 2 分(4~10 点/细胞, 无或极少数点簇, 20~40 倍视野), 3 分(>10 点/细胞, <10% 的阳性细胞有点状团簇, 20 倍视野), 4 分(>10 点/细胞, ≥10% 的阳性细胞有点状团簇, 20 倍视野)。其中 0 分和 1 分为低表达, 2~4 分为高表达。

1.6 RNAscope ISH 和 IHC 荧光双重标记 操作

步骤详见 ACD 公司推荐操作流程和文献[4], 简述如下: 切片脱蜡水化后靶标修复, 蛋白酶消化; 阻断内源性过氧化物酶; 滴加 NR1H4 单克隆抗体; 滴加 *NR1H4* RNAscope® 探针, 杂交过夜; 杂交信号放大(40 °C 30 min、40 °C 15 min、40 °C 30 min); 荧光信号放大(先后加入 RNAscope® 多通道二代荧光 HRP-C1、TSA® Plus-Cyanine 5、RNAscope® 多通道二代荧光 HRP 阻断剂); 加入羊抗鼠 IgG-FITC; 加入 DAPI 孵育 30 s; 用 Prolong Gold 防淬灭封片, 4 °C 避光保存。在荧光显微镜下观察 RNAscope ISH 和 IHC 定位情况。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件和 R 3.5.1 软件进行统计学分析。计数资料以例数和百分数表示, 组间比较采用 χ^2 检验。采用 Spearman 秩相关分析探讨 2 种检测方法的相关性。采用 Kaplan-Meier 生存分析和 Cox 比例风险回归模型研究 FXR/NR1H4 mRNA 和蛋白表达与预后的关系。检验水准(α) 为 0.05。

2 结果

2.1 RNAscope ISH 和 IHC 染色质量与共定位 分别采用 RNAscope ISH 和 IHC 对胰腺导管腺癌组织中 FXR/NR1H4 的 mRNA 和蛋白进行染色, 发现 *NR1H4* mRNA 呈细胞质内局灶性和散在性颗粒状染色, FXR/NR1H4 蛋白呈细胞核和(或)细胞质型染色, 前者的背景染色较后者低, 分辨率优于后者(图 1A、1B)。应用 176 例胰腺导管腺癌组织芯片进行 RNAscope ISH 和 IHC 荧光双重标记, 结果显示 mRNA 的定位较蛋白更准确(图 1C~1F), 两者共阳性率为 67.05%(118/176)。

2.2 *NR1H4* mRNA 在胰腺导管腺癌中的表达 176 例胰腺导管腺癌组织中 *NR1H4* mRNA 总体阳性表达率为 68.75%(121/176), 其中 39 例 *NR1H4* mRNA 高表达。对 48 例胰腺导管腺癌病例的癌组织、配对癌旁胰腺组织和正常胰腺组织进行 RNAscope ISH 检测, 发现 *NR1H4* mRNA 在胰腺导管腺癌、间质、癌周组织呈不同程度表达, 并且在癌组织中的阳性表达率(66.67%, 32/48) 高于癌旁胰腺组织(31.25%, 15/48) 和正常胰腺组织(16.67%, 8/48), 差异均有统计学意义($\chi^2=12.05$ 、24.69, P 均 <0.01)。

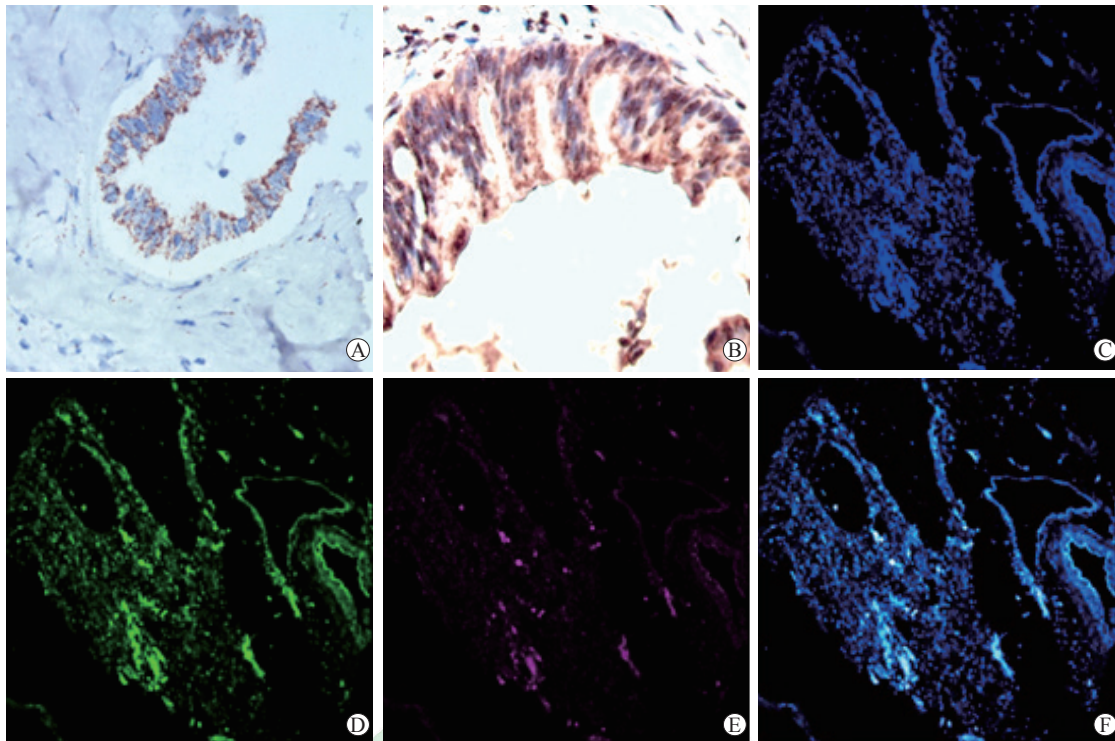


图 1 RNAscope ISH 和 IHC 检测胰腺导管腺癌石蜡切片中 FXR/NR1H4 mRNA 和蛋白的表达

Fig 1 FXR/NR1H4 mRNA and protein expression in paraffin sections of pancreatic ductal adenocarcinoma detected by RNAscope ISH and IHC

A: *NR1H4* mRNA expression detected by RNAscope ISH; B: FXR/NR1H4 protein expression detected by IHC; C-F: Co-localization of FXR/NR1H4 mRNA and protein (C: DAPI; D: FXR protein, FITC-yellowish green; E: *NR1H4* mRNA, Cyanine 5-fuchsia; F: FXR/NR1H4 mRNA and protein co-expression). ISH: *In situ* hybridization; IHC: Immunohistochemistry; FXR: Farnesol X receptor; NR1H4: Nuclear factor receptor 1H4; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; FITC: Fluorescein isothiocyanate. Original magnification: $\times 200$ (A), $\times 400$ (B-F)

2.3 FXR/NR1H4 蛋白在胰腺导管腺癌中的表达 采用 4 种不同的抗体对 176 例胰腺导管腺癌组织中的 FXR/NR1H4 进行 IHC 检测, 结果显示以 ab187735、ab235094、25055-1-AP、SC-25309 抗体检测的阳性率分别为 68.75% (121/176)、75.57% (133/176)、73.30% (129/176)、71.02% (125/176), 总体阳性率为 77.27% (136/176), 其中 89 例 FXR/NR1H4 蛋白高表达。对 48 例胰腺导管腺癌病例的癌组织、配对癌旁胰腺组织和正常胰腺组织进行 IHC 检测, 发现 FXR/NR1H4 蛋白在癌组织、癌旁非肿瘤组织中呈不同程度表达, 并且在癌组织中的阳性表达率 (75.00%, 36/48) 高于癌旁胰腺组织 (35.42%, 17/48) 和正常胰腺组织 (20.83%, 10/48), 差异均有统计学意义 ($\chi^2=15.21$ 、28.22, P 均 <0.01)。

2.4 FXR/NR1H4 mRNA 和蛋白在胰腺导管腺癌中表达的一致性 176 例胰腺导管腺癌组织中, RNAscope ISH 检测 121 例 *NR1H4* mRNA 阳性、55 例阴性,

IHC 检测 136 例 FXR/NR1H4 蛋白阳性、40 例阴性。其中 RNAscope ISH 和 IHC 检测结果均为阳性 118 例、均为阴性 37 例, 一致率为 88.07% (155/176); RNAscope ISH 检测阳性而 IHC 检测阴性 3 例, IHC 检测阳性而 RNAscope ISH 检测阴性 18 例。Spearman 秩相关分析结果显示, *NR1H4* mRNA 表达水平与 FXR/NR1H4 蛋白表达水平呈正相关 ($r=0.307$, $P<0.01$)。

2.5 FXR/NR1H4 mRNA 和蛋白表达与胰腺导管腺癌患者临床病理特征的关系 由表 1 可见, FXR/NR1H4 mRNA 和蛋白表达均与肿瘤临床分期 ($\chi^2=5.391$, $P=0.020$; $\chi^2=4.108$, $P=0.042$)、肿瘤分化程度 ($\chi^2=6.560$, $P=0.010$; $\chi^2=4.969$, $P=0.026$) 有关, 蛋白的表达也与肿瘤大小有关 ($\chi^2=4.957$, $P=0.026$); 两者与患者性别、年龄、神经浸润、肿瘤部位、淋巴结转移均无关 (P 均 >0.05)。

表1 FXR/NR1H4 mRNA和蛋白表达与胰腺导管腺癌患者临床病理特征的关系

Tab 1 Relationship between expression of FXR/NR1H4 mRNA and protein and clinicopathological features of pancreatic ductal adenocarcinoma patients

Factor	N	NR1H4 mRNA				FXR/NR1H4 protein (total)			
		Negative	Positive	χ^2 value	P value	Negative	Positive	χ^2 value	P value
		N=55	N=121			N=40	N=136		
Age (year)				0.478	0.489			0.780	0.377
≤60	86	29	57			22	64		
>60	90	26	64			18	72		
Gender				3.074	0.079			1.629	0.202
Male	108	39	69			28	80		
Female	68	16	52			12	56		
Tumor maximum diameter (cm)				0.420	0.517			4.957	0.026
≤4	58	20	38			19	39		
>4	118	35	83			21	97		
Tumor site				1.214	0.270			2.889	0.089
Pancreatic head	112	35	77			30	82		
Pancreatic body and tail	64	20	44			10	54		
Clinical stage				5.391	0.020			4.108	0.042
I - II	138	49	89			36	102		
III - IV	38	6	32			4	34		
Differentiation				6.560	0.010			4.969	0.026
Well or moderate	110	42	68			31	79		
Poor or undifferentiated	66	13	53			9	57		
Nerve infiltration				2.964	0.085			3.451	0.063
Positive	165	49	116			35	130		
Negative	11	6	5			5	6		
Lymph node infiltration				0.033	0.855			2.490	0.114
Positive	128	40	88			33	95		
Negative	48	15	33			7	41		

FXR: Farnesol X receptor; NR1H4: Nuclear factor receptor 1H4

2.6 FXR/NR1H4 mRNA和蛋白表达与胰腺导管腺癌患者预后的关系 Kaplan-Meier生存分析结果显示,FXR/NR1H4 mRNA和蛋白高表达的患者无进展生存期及总生存期均短于低表达的患者(P 均 <0.01 ,图2)。Cox比例风险回归模型分析结果(表2)显示,癌组织的分化程度和FXR/NR1H4蛋白的表达水平是胰腺导管腺癌患者无进展生存期的独立危险因素(P 均 <0.05),远处转移和FXR/NR1H4蛋白的表达水平是总生存期的危险因素(P 均 <0.05)。

3 讨论

FXR/NR1H4是一种核受体,在胆汁酸代谢、脂质/胆固醇和葡萄糖稳态相关基因的转录调控中起着关键作用,研究表明FXR/NR1H4在多种正常组织和肿瘤组织中表达^[5-12]。本研究收集了176例

胰腺导管腺癌样本,采用ACD公司RNAscope 2.5 mRNR ISH和IHC技术分别检测胰腺导管腺癌组织芯片中FXR/NR1H4 mRNA和蛋白的表达,并互相印证。RNAscope具有灵敏度高、特异性强、稳定性高、可视性与定量分析、非常适合FFPE组织切片检测、不限物种应用和多重标记等特点^[13-14]。IHC方法的影响因素很多,主要有组织固定、前处理方式(抗原修复)、一抗的选择和检测方法的灵敏性等,本研究中IHC采用超敏低背景的多聚物二步法,并使用了不同公司生产、不同克隆号的4种FXR/NR1H4一抗。RNAscope ISH结果显示NR1H4 mRNA呈细胞质内局灶性和散在性颗粒状染色,IHC结果显示FXR/NR1H4蛋白呈细胞核和(或)细胞质型染色,前者的背景染色较后者低,分辨率优于后者。通过对176例胰腺导管腺癌组织芯片进行RNAscope ISH和IHC荧光双重标记,结

果显示 mRNA 的定位较蛋白更准确, 其共阳性率达 67.05% (118/176)。RNAscope ISH 和 IHC 检测结果均为阳性 118 例、均为阴性 37 例, 一致率为 88.07% (155/176); Spearman 秩相关分析结果

显示, *NR1H4* mRNA 表达水平与 FXR/NR1H4 蛋白表达水平呈正相关 ($r=0.307, P<0.01$)。上述研究表明, RNAscope ISH 和 IHC 检测结果一致性较高, 可以互相印证, 使研究结果更可靠。

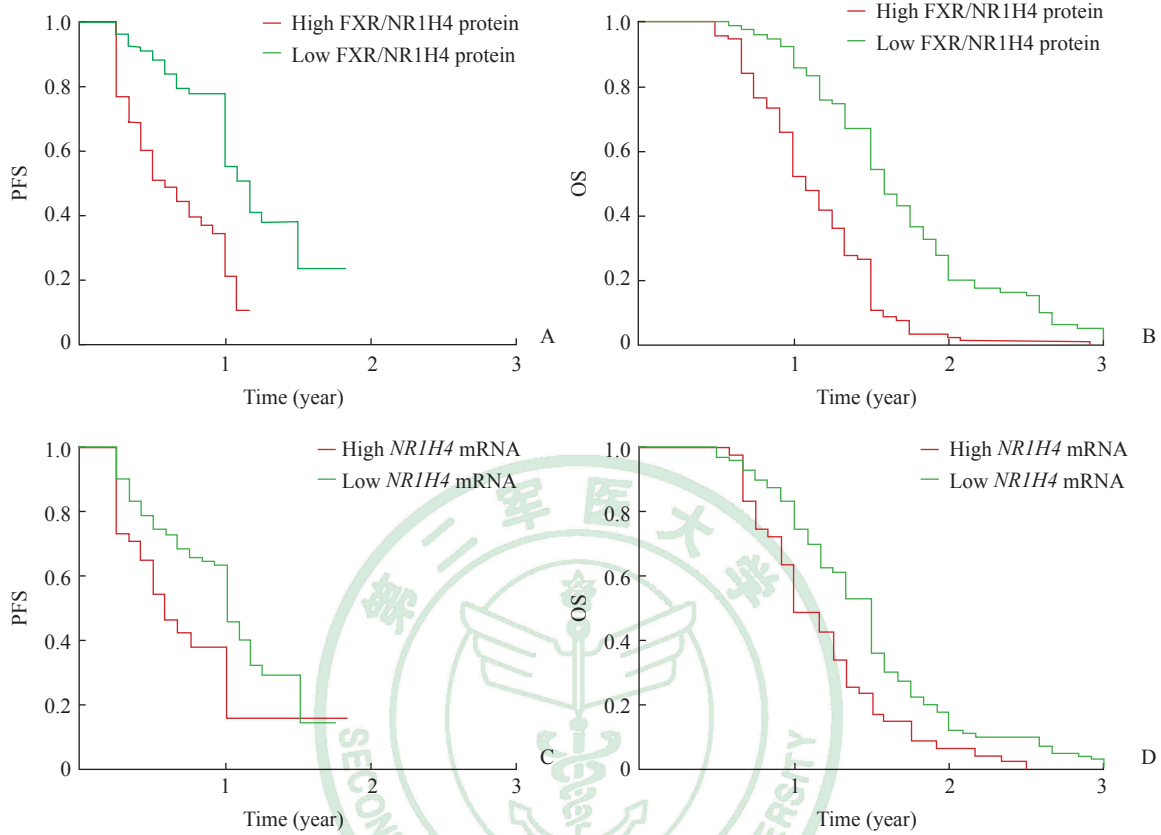


图 2 FXR/NR1H4 mRNA 和蛋白高表达与低表达的胰腺导管腺癌患者的 Kaplan-Meier 生存分析

Fig 2 Kaplan-Meier survival analysis of pancreatic ductal adenocarcinoma patients with high or low expression levels of FXR/NR1H4 mRNA and protein

A: High expression of FXR/NR1H4 protein is correlated with poor PFS ($P<0.01$); B: High expression of FXR/NR1H4 protein is associated with poor OS ($P<0.01$); C: High expression of *NR1H4* mRNA is associated with poor PFS ($P<0.01$); D: High expression of *NR1H4* mRNA is associated with poor OS ($P<0.01$). FXR: Farnesol X receptor; NR1H4: Nuclear factor receptor 1H4; PFS: Progression-free survival; OS: Overall survival

表 2 胰腺导管腺癌患者预后危险因素的 Cox 比例风险回归分析结果

Tab 2 Cox regression analysis of prognostic risk factors in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma

Clinicopathological factor	PFS			OS		
	RR	95% CI	P value	RR	95% CI	P value
Poor differentiation or undifferentiation	3.401	(1.753, 5.794)	<0.01	1.521	(0.731, 1.795)	0.152
Clinical stage I + II				0.896	(0.533, 2.561)	0.973
Distant metastasis				1.644	(1.165, 1.979)	0.041
Lymph node infiltration	1.738	(0.790, 2.805)	0.242			
FXR/NR1H4 protein expression	1.701	(1.235, 2.432)	0.028	2.356	(1.983, 2.832)	0.028

FXR: Farnesol X receptor; NR1H4: Nuclear factor receptor 1H4; PFS: Progression-free survival; OS: Overall survival; RR: Relative risk; CI: Confidence interval

FXR/NR1H4 抗原在胰腺导管腺癌细胞中呈不同程度的细胞核、细胞质和核质表达, 以细胞

核表达为主, 其次为核质; 而在癌旁胰腺组织和正常胰腺组织中则主要表达在细胞质, 且表达量

较低^[1,2,5,10]。王维斌等^[10]认为FXR/NR1H4在正常胰腺组织中普遍低表达,而在胰腺癌细胞中呈不同程度的胞质和细胞核高表达,胰腺胰岛细胞中亦呈普遍高表达,胰腺神经组织呈阴性。Giaginis等^[3]的IHC结果显示,60.0%(33/55)的胰腺癌组织中FXR/NR1H4表达阳性,呈细胞核和(或)细胞质型染色,其中27例(49.1%)FXR/NR1H4高表达,癌旁非肿瘤部位FXR/NR1H4表达阴性。本研究采用48例胰腺导管腺癌组织及配对的癌旁胰腺组织和正常胰腺组织观察FXR/NR1H4 mRNA和蛋白在不同胰腺细胞的表达情况,结果表明FXR/NR1H4 mRNA和蛋白在癌组织中的阳性表达率高于癌旁胰腺组织和正常胰腺组织,与上述研究结果基本一致。

关于FXR/NR1H4在肿瘤中的作用目前报道结果并不一致。在胰腺癌中,有研究发现FXR/NR1H4在癌组织中高表达并导致癌症的发生和发展^[1-2],也有学者认为FXR/NR1H4具有抑制肿瘤生长的作用^[3]。王维斌等^[10]研究结果显示FXR/NR1H4在胰腺癌组织中呈不同程度的高表达,与胰腺癌组织病理G分期密切相关($P<0.01$),并且FXR/NR1H4高表达患者生存时间较表达患者长($P<0.05$)。本研究结果表明胰腺导管腺癌组织中FXR/NR1H4 mRNA和蛋白表达与肿瘤临床分期、分化程度有关($P<0.05$),蛋白表达也与肿瘤大小有关($P<0.05$),而与性别、年龄、神经浸润、肿瘤部位、淋巴结转移均无关($P>0.05$)。Kaplan-Meier生存分析结果显示,FXR/NR1H4 mRNA和蛋白高表达的患者无进展生存期及总生存期均短于低表达的患者(P 均 <0.05);Cox比例风险回归模型显示,FXR/NR1H4蛋白高表达是影响预后的独立危险因素($P<0.05$)。上述结果与Lee等^[1]和Hu等^[2]的研究结果一致,表明FXR/NR1H4高表达的患者预后差、生存期短。

综上所述,RNAScope ISH可与IHC技术互相印证,保证检测结果的可靠、精准。FXR/NR1H4在胰腺导管腺癌中的表达与肿瘤临床分期和分化程度有关,其高表达是影响胰腺导管腺癌患者预后的独立危险因素。

[参考文献]

- [1] LEE J Y, LEE K T, LEE J K, LEE K H, JANG K T, HEO J S, et al. Farnesoid X receptor, overexpressed in pancreatic cancer with lymph node metastasis promotes cell migration and invasion[J]. Br J Cancer, 2011, 104: 1027-1037.
- [2] HU H, WU L L, HAN T, ZHUO M, LEI W, CUI J J,

et al. Correlated high expression of FXR and Sp1 in cancer cells confers a poor prognosis for pancreatic cancer: a study based on TCGA and tissue microarray[J]. Oncotarget, 2017, 8: 33265-33275.

- [3] GIAGINIS C, KOUTSOUNAS I, ALEXANDROU P, ZIZI-SERBETZOGLOU A, PATSOURIS E, KOURAKLIS G, et al. Elevated farnesoid X receptor (FXR) and retinoid X receptors (RXRs) expression is associated with less tumor aggressiveness and favourable prognosis in patients with pancreatic adenocarcinoma[J]. Neoplasma, 2015, 62: 332-341.
- [4] WANG F, FLANAGAN J, SU N, WANG L C, BUI S, NIELSON A, et al. RNAscope[®]: a novel *in situ* RNA analysis platform for formalin-fixed paraffin-embedded tissues[J]. J Mol Diagn, 2012, 14: 22-29.
- [5] PELLICCIARI R, COSTANTINO G, FIORUCCI S. Farnesoid X receptor: from structure to potential clinical applications[J]. J Med Chem, 2005, 48: 5383-5403.
- [6] ZHU Y, LI F, GUO G L. Tissue-specific function of farnesoid X receptor in liver and intestine[J]. Pharmacol Res, 2011, 63: 259-265.
- [7] CIPRIANI S, MENCARELLI A, PALLADINO G, FIORUCCI S. FXR activation reverses insulin resistance and lipid abnormalities and protects against liver steatosis in Zucker (*fa/fa*) obese rats[J]. J Lipid Res, 2010, 51: 771-784.
- [8] HAGEMAN J, HERREMA H, GROEN A K, KUIPERS F. A role of the bile salt receptor FXR in atherosclerosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30: 1519-1528.
- [9] CHAWLA A, REPA J J, EVANS R M, MANGELSDORF D J. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files[J]. Science, 2001, 294: 1866-1870.
- [10] 王维斌,董良博,赵邦博,卢军,赵玉沛.法尼醇X受体表达与胰腺癌患者预后及病理分期相关[J].基础医学与临床,2018,38:394-399.
- [11] WANG Y D, CHEN W D, MOORE D D, HUANG W. FXR: a metabolic regulator and cell protector[J]. Cell Res, 2008, 18: 1087-1095.
- [12] KIM K H, CHOI S, ZHOU Y, KIM E Y, LEE J M, SAHA P K, et al. Hepatic FXR/SHP axis modulates systemic glucose and fatty acid homeostasis in aged mice[J]. Hepatology, 2017, 66: 498-509.
- [13] DUNCAN D J, SCOTT M, SCORER P, BARKER C. Assessment of PD-L1 mRNA and protein expression in non-small cell lung cancer, head and neck squamous cell carcinoma and urothelial carcinoma tissue specimens using RNAscope and immunohistochemistry[J/OL]. PLoS One, 2019, 14: e0215393. doi: 10.1371/journal.pone.0215393.
- [14] FEDERMANN B, FRAUENFELD L, PERTSCH H, BORGMANN V, STEINHILBER J, BONZHEIM I, et al. Highly sensitive and specific *in situ* hybridization assay for quantification of *SOX11* mRNA in mantle cell lymphoma reveals association of *TP53* mutations with negative and low *SOX11* expression[J]. Haematologica, 2020, 105: 754-764.