

胰腺导管内乳头状黏液性肿瘤组织 DNMT1 和 HDAC1 的表达及意义

王伟¹, 满晓华¹, 高 军¹, 高 丽², 龚燕芳¹, 李兆申^{1*}

1. 第二军医大学长海医院消化内科, 上海 200433
2. 第二军医大学长海医院病理科, 上海 2004333

[摘要] **目的:**观察胰腺导管内乳头状黏液性肿瘤(IPMNs)组织 DNA 甲基化转移酶 1(DNMT1)和组蛋白去乙酰化酶(HDAC1)的表达,探讨其可能的临床意义。**方法:**免疫组织化学 SP 法检测 DNMT1、HDAC1 蛋白在 48 例 IPMNs 和 54 例胰腺导管腺癌(PDAC)组织中的表达并进行统计学分析。**结果:**DNMT 和 HDAC1 阳性表达率在由正常胰腺导管→IPMA, IPMB→IPMC→PDAC 的逐级进展过程中均逐渐升高,二者在 IPMNs 不同亚型中均有阳性表达。**结论:**DNMT1 和 HDAC1 高表达是胰腺癌的早期事件,二者的表达水平能够反映 IPMNs 的恶性进展,但不能作为 IPMNs 的组织分型标志。**[关键词]** 胰腺导管内乳头状黏液性肿瘤;DNA 甲基化转移酶;组蛋白去乙酰化酶;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(2008)11-1303-04

Expression of DNA methyltransferase 1 and histone deacetylase 1 proteins in intraductal papillary mucinous neoplasms

WANG Wei¹, MAN Xiao-hua¹, GAO Jun¹, GAO Li², GONG Yan-fang¹, LI Zhao-shen^{1*}

1. Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:**To investigate the expression of DNA methylation transferase 1 (DNMT1) and histone deacetylase 1 (HDAC1) proteins in intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMNs) and its possible clinical significance. **Methods:** The presence of DNMT1 and HDAC1 proteins in the 48 IPMNs and 54 pancreatic ductal adenocarcinomas (PDACs) were examined using SP immunohistochemical method and were statistically analyzed. **Results:** The expression levels of both DNMT1 and HDAC1 increased in a malignancy-dependent manner:normal pancreatic ductal →IPMA, IPMB → IPMC → PDAC. And both of them were positive in IPMNs of different subtypes. **Conclusion:** Higher expression of DNMT1 and HDAC1 is an early event of pancreatic malignancy. Expression of them can reflect the malignancy transformation of IPMNs, but can not be used for histological typing of IPMNs. **[KEY WORDS]** intraductal papillary mucinous neoplasms; DNA methylation transferase; histone deacetylase; immunohistochemistry [Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(11):1303-1306]

胰腺导管内乳头状黏液性肿瘤(intraductal papillary mucinous neoplasms, IPMNs)是最近几年被认识的一种胰腺囊性肿瘤,按组织异型程度可将其分为:IPMN 腺瘤(IPMN adenoma, IMPA), IPMN 交界瘤(IPMN borderline, IPMB), IPMN 黏液癌(IPMN carcinoma, IPMC)^[1-2];依据乳头状结构的不同特征又可将其分为不同亚型:胃型、肠型、胰胆管型和嗜酸细胞型^[3-4],体现了 IPMNs 组织起源的多样性。病理学家提出 IPMNs 是胰腺肿瘤发生、发展过程中的重要阶段:IPMNs 在组织结构及细胞形态

上呈现出逐渐增加的异型表现,而在分子病理变化上,IPMNs 和胰腺上皮内瘤变(pancreatic intraepithelial neoplasias, PanINs)及胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)之间存在相似性^[5-9]。另外,IPMNs 每种亚型具有各自的分子及病理特征^[10-16],这些证据充分说明了胰腺肿瘤组织起源及分子病理机制的多样性。为了更好地揭示 IPMNs 的发病机制及生物学特征,必须深入探讨 IPMNs 不同亚型的特点及其所蕴含的分子病理变化。近年来,DNA 甲基化和组蛋白去乙酰化作用被

[收稿日期] 2008-04-27 **[接受日期]** 2008-07-13

[作者简介] 王伟,硕士. E-mail:smmuww1981@yahoo. cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-25070552, E-mail:zhshli@81890. net

证实在肿瘤发生中起到重要作用^[17-20],我们前期研究发现该机制中的 2 个关键酶 DNMT1 和 HDAC1 其蛋白表达在正常胰腺导管→PanIN-1A→PanIN-1B→PanIN-2→PanIN-3→PDAC 的逐级进展过程中随组织异型程度增加而逐渐升高。但其在 IPMNs 中的作用尚未见报道。本研究通过免疫组化方法检测 DNMT1 和 HDAC1 蛋白在 IPMNs 及胰腺癌中的表达,进一步揭示 DNA 甲基化和组蛋白乙酰化在此类胰腺囊性肿瘤发生机制中的作用,为胰腺癌早期诊断提供新线索。

1 材料和方法

1.1 组织标本 10 例尸解正常胰腺、48 例 IPMNs 及 54 例胰腺癌标本来自长海医院病理科。IPMNs 组:男 25 例,女 23 例,年龄 25~88 岁,中位年龄 64 岁;其中 IPMA 18 例,IPMB 10 例,IPMC 20 例;胃型 16 例,肠型 20 例,胰胆管型和嗜酸细胞型各 6 例。胰腺癌组:男 41 例,女 13 例,年龄 27~80 岁,中位年龄 60.5 岁。上述标本类型及分级均由病理医生参照 WHO 胰腺疾病分类标准证实。

1.1.1 分级标准 正常:单层立方或低柱状上皮,胞质嗜酸或嗜碱性,细胞无异型;IPMA:形成规则的乳头结构,细胞核无明显异型,核分裂几乎不存在;交界瘤:不规则的乳头结构,细胞中度异型,胞核形状不一,核分裂多见;IPMC:重度细胞异型,上皮出现不规则的芽突或间桥特征,同时根据是否累及导管周围胰腺组织,可将 IPMC 分为浸润癌和非浸润癌。

1.1.2 分型标准 胃型:上皮由透明或轻度嗜酸的立方或柱状细胞形成,细胞核呈圆形或卵圆形;细胞排列少有假复层结构出现,类似于胃小凹上皮,表现为轻度异型。肠型:上皮由嗜酸暗细胞或柱状透明细胞形成,细胞核呈卵圆形或梭形;细胞排列常出现

假复层结构,形成类似于结肠绒毛状腺瘤的绒毛状或乳头状结构,常表现为中度到重度异型。胰胆管型:复杂的乳头状结构被覆核大、偏心的立方细胞,类似于胆道乳头状肿瘤,表现为重度异型。嗜酸细胞型:又称为“导管内嗜酸性乳头状瘤”(intraductal oncocytic papillary neoplasm,IOPN),罕见,常为重度异型。

1.2 主要试剂 多克隆抗 DNMT1 抗体购自 Abcam 公司;多克隆抗 HDAC1 抗体购自 Cell Signaling 公司;通用型二抗及 DAB 显色试剂均购自上海长岛生物技术有限公司。

1.3 免疫组化方法及结果判定 石蜡标本 4 μm 连续切片,每例用 PBS 代替一抗作阴性对照,分别用已知 DNMT1 和 HDAC1 阳性表达组织作阳性对照,行 SP 法染色。抗 DNMT1、HDAC1 抗体分别作 1 : 200、1 : 400 稀释,4℃ 过夜。DNMT1 和 HDAC1 均呈细胞核阳性表达,染色为棕黄色颗粒状,胞膜、胞质均不着色。每例标本统计至少 5 个高倍视野下阳性细胞个数,计算阳性率。

1.4 统计学处理 不同病变组之间 DNMT1、HDAC1 阳性率比较采用 SPSS 13.0 统计软件进行 Mann-Whitney U 或 Kruskal-Wallis 检验。

2 结果

2.1 DNMT1 在不同胰腺组织中的表达 DNMT1 在正常胰腺导管上皮中不表达,在 IPMA 中开始出现弱阳性表达。随组织异型程度增加,DNMT1 表达逐渐增强(图 1)。比较各组 DNMT1 表达阳性率时发现:IPMA 组(3%)高于正常组(0),与 IPMB(6%)组无明显差异;IPMC(33%)组高于 IPMB 和 IPMA 组($P<0.05$);PDAC(57%)组高于 IPMC 组($P<0.05$)。DNMT1 在 IPMNs 不同亚型中均有阳性表达,且其阳性表达率与亚型并无相关性。

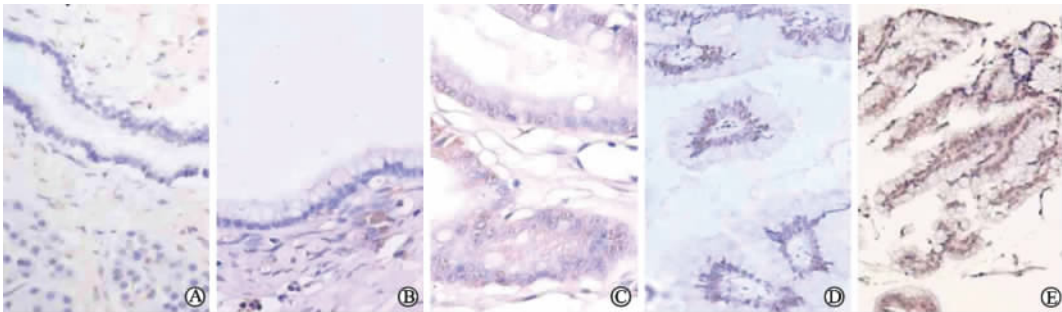


图 1 DNMT1 在不同胰腺组织中的表达

Fig 1 Expression of DNMT1 in various pancreatic tissues

A:Normal pancreatic duct; B:Intraductal papillary mucinous neoplasms (adenoma); C:Intraductal papillary mucinous neoplasms (borderline); D:Intraductal papillary mucinous neoplasms (carcinoma); E:Pancreatic ductal adenocarcinoma. Original magnification:×200

2.2 HDAC1 在不同胰腺组织中的表达 与 DNMT1 表达情况相似,HDAC1 在正常胰腺导管上皮中不表达,在 IPMA 中开始出现弱阳性表达。随组织异型程度增加,HDAC1 表达逐渐增强(图 2)。比较各组 HDAC1 表达阳性率发现:IPMA 组(5%)高

于正常组(0),与 IPMB(7%)组无明显差异;IPMC(34%)组高于 IPMB 和 IPMA 组($P<0.05$);PDAC(82%)组高于 IPMC 组($P<0.05$)。HDAC1 在 IPMNs 不同亚型中均有阳性表达,且其阳性表达率与亚型并无相关性。

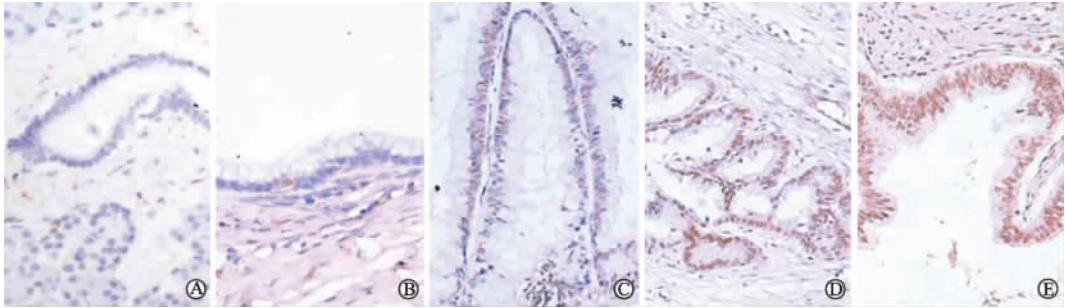


图 2 HDAC1 在不同胰腺组织中的表达

Fig 2 Expression of HDAC1 in various pancreatic tissues

A: Normal pancreatic duct; B: IPMA; C: IPMB; D: IPMC; E: PDAC. Original magnification: $\times 200$

3 讨 论

基因组总体甲基化水平降低造成的基因组不稳定性以及启动子区 DNA 高甲基化与组蛋白去乙酰化协同作用所导致的基因转录抑制参与了多种肿瘤的发生、发展。我们前期研究发现 DNMT1、HDAC1 蛋白阳性表达率在正常组织→PanINs→导管腺癌逐级递增,提示 DNMT1 和 HDAC1 的表达水平能够反映胰腺癌的进展情况。

在不同类型的胰腺肿瘤中 IPMNs 具有与一般胰腺肿瘤不同的分子及病理特征。本研究通过免疫组化方法检测 DNMT1 和 HDAC1 蛋白在不同胰腺组织(正常、IPMNs 及 PDAC)中的表达发现, DNMT1 和 HDAC1 在正常胰腺导管中呈阴性表达,其表达水平升高最早可见于 IPMA,这说明 DNMT1 和 HDAC1 表达增强是胰腺癌发生的早期事件;并且在由正常胰腺导管→IPMA, IPMB→IPMC→PDAC 过程中,伴随组织异型程度增加 DNMT1 和 HDAC1 表达水平均逐渐升高,具有一致的表达趋势,再次证实二者的表达水平能够反映胰腺癌的恶性进展。

另外,由于 IPMNs 不同亚型具有各自的分子及病理特征,如胃型病理分级主要为腺瘤,其进展为浸润癌的发生率较低;肠型病理分级主要为交界瘤和原位癌,其进展为浸润癌的发生率较高^[12-13]。许多针对 IPMNs 中黏蛋白(Mucins,反映组织起源的分

子标志物)表达谱的研究亦证明,不同亚型在 MUC1、MUC2 和 MUC5AC 的表达上存在一定的排他性,胃型: MUC1(−), MUC2(−), MUC5AC(+);肠型: MUC1(−), MUC2(+), MUC5AC(±);胰胆管型: MUC1(+), MUC2(−), MUC5AC(±)^[14-16]。这意味着这些不同类型的 IPMNs 组织起源不同,其发展为胰腺癌的分子机制也不尽相同。新近,针对 IPMNs 中 DNA 甲基化及乙酰化的研究发现,胃型和肠型中 MUC2 和 MUC5 启动子区甲基化状态不同^[21],胃型中 MUC2 启动子区高甲基化, MUC2 阴性表达;反之,肠型中 MUC2 阳性表达。本研究发现,作为调节甲基化的关键 DNMT1 在 IPMNs 不同亚型中均有阳性表达,并且其阳性率随组织异型程度增加而逐渐增强。特别是在胃型和肠型中并未出现类似于 MUC2 的表达情况,这说明 MUC2 在 IPMNs 中由启动子区甲基化状态不同所致的不同表达状态与 DNMT1 的表达水平无关, DNMT1 不具有类似黏蛋白能区分 IPMNs 不同亚型的作用。

总之,本研究再次证实 DNMT1 和 HDAC1 的表达水平能够反映胰腺的恶性行为,IPMNs 不同亚型中二者的表达情况提示 DNA 甲基化和组蛋白乙酰化异常在胰腺不同类型肿瘤形成中均发挥了重要作用。深入研究甲基化和去乙酰化在胰腺肿瘤形成中的机制,将有助于揭示胰腺癌的发病机制。

[参考文献]

[1] Kloppel G, Solcia E, Longnecker D S, Capella C, Sobin S H. Histological typing of tumours of the exocrine pancreas[M]// World Health Organization International Classification of Tumors. 2nd ed. Berlin: Springer, 1996; 11-20.

[2] Tanaka M, Chari S, Adsay V, Fernandez-del C, Falconi M, Shimizu M, et al. International consensus guidelines for management of intraductal papillary mucinous neoplasms and mucinous cystic neoplasms of the pancreas[J]. Pancreatology, 2006, 6: 17-32.

[3] Takaori K. Current understanding of precursors to pancreatic cancer[J]. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2007, 14: 217-223.

[4] 王伟, 李兆申, 高军. 胰腺导管内乳头状黏液性肿瘤研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16: 2025-2030.

[5] Yoshizawa K, Nagai H, Sakurai S, Hironaka M, Morinaga S, Saitoh K, et al. Clonality and k-ras mutation analyses of epithelia in intraductal papillary mucinous tumor and mucinous cystic tumor of the pancreas[J]. Virchows Arch, 2002, 441: 437-443.

[6] Biankin A V, Kench J G, Dijkman F P, Biankin S A, Henshall S M. Molecular pathogenesis of precursor lesions of pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Pathology, 2003, 35: 14-24.

[7] Segara D, Biankin A V, Kench J G, Langusch C C, Dawson A C, Skalicky DA, et al. Expression of HOXB2, a retinoic acid signaling target in pancreatic cancer and pancreatic intraepithelial neoplasia[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11: 3587-3596.

[8] Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S. Prevalence of FOXP3+ regulatory T Cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12: 5423-5434.

[9] Takaori K. Current understanding of precursors to pancreatic cancer[J]. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2007, 14: 217-223.

[10] Moriya T, Kimura W, Semba S, Sakurai F, Hirai I, Ma J, et al. Biological similarities and differences between pancreatic intraepithelial neoplasias and intraductal papillary mucinous neoplasms[J]. Int J Gastrointest Cancer, 2005, 35: 111-120.

[11] Adsay N V, Merati K, Andea A, Sarkar F, Hruban R H, Wilentz R E, et al. The Dichotomy in the preinvasive neoplasia to invasive carcinoma sequence in the pancreas; differential expression of MUC1 and MUC2 supports the existence of two separate pathways of carcinogenesis[J]. Mod Pathol, 2002, 15: 1087-1095.

[12] Adsay N V, Merati K, Basturk O, Iacobuzio-Donahue C, Levi E, Cheng J, et al. Pathologically and biologically distinct types of epithelium in intraductal papillary mucinous neoplasms; delineation of an “intestinal” pathway of carcinogenesis in the pancreas[J]. Am J Surg Pathol, 2004, 28: 839-848.

[13] Ban S, Naitoh Y, Mino-Kenudson M, Sakurai T, Kuroda M, Koyama I, et al. Intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) of the pancreas; its histopathological difference between two major types [J]. Am J Surg Pathol, 2006, 30: 1561-1569.

[14] Yonezawa S, Nakamura A, Horinouchi M, Sato E. The expression of several types of mucin is related to the biological behavior of pancreatic neoplasms[J]. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2002, 9: 328-341.

[15] Levi E, Klimstra D S, Adsay N V, Andea A, Basturk O. MUC1 and MUC2 in pancreatic neoplasia[J]. J Clin Pathol, 2004, 57: 456-462.

[16] Yamasaki H, Ikeda S, Okajima M, Miura Y, Asahara T, Kohno N, et al. Expression and localization of MUC1, MUC2, MUC5AC and small intestinal mucin antigen in pancreatic tumors[J]. Int J Oncol, 2004, 24: 107-113.

[17] Saito Y, Kanai Y, Sakamoto M, Saito H, Ishii H, Hirohashi S. Expression of mRNA for DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins and DNA methylation statuses on CpG islands and pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis[J]. Hepatology, 2001, 33: 561-568.

[18] De Ruijter A J, van Gennip A H, Caron H N, Kemp S, van Kuilenburg A B. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family[J]. Biochem J, 2003, 370: 737-749.

[19] Sato N, Matsubayashi H, Abe T, Fukushima N, Goggins M. Epigenetic down-regulation of CDKN1C/p57KIP2 in pancreatic ductal neoplasms identified by gene expression profiling[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11: 4681-4688.

[20] Kurdistani S K. Histone modifications as markers of cancer prognosis; a cellular view[J]. Brit J Cancer, 2007, 97: 1-5.

[21] Yonezawa S, Horinouchi M, Osako M, Kubo M, Takao S, Arimura Y, et al. Gene expression of gastric type mucin (MUC5AC) in pancreatic tumors; its relationship with the biological behavior of the tumor[J]. Pathol Int, 1999, 49: 45-54.

[本文编辑] 孙 岩

欢迎订阅

《第二军医大学学报》

ISSN 0258-879X
CN 31-1001/R

上海市翔殷路 800 号 (邮编: 200433) 邮发代号: 4-373

JOURNAL OF MEDICAL COLLEGES OF PLA

ISSN 1000-1948
CN 31-1002/R

上海市翔殷路 800 号 (邮编: 200433) 邮发代号: 4-725