

诱导受体 3 (DcR3) 在胆管癌中的表达及意义

李 坤 李世平[△] 魏发强 李俊杰

(潍坊医学院 山东 潍坊 261042)

摘要 目的:观察胆管癌组织及血清中诱导受体 3(decoy receptor 3,DcR3)蛋白的表达及其临床价值。**方法:**采用免疫组化 S-P 法检测 45 例胆管癌、15 例癌旁胆管正常组织中 DcR3 蛋白的表达,ELISA 法检测 31 例胆管癌及 18 例胆道良性疾病患者和 28 例正常人外周血清中 DcR3 的水平。**结果:**45 例胆管癌组织中 DcR3 阳性表达 29 例,阳性率为 64.4%,胆管正常组织中无阳性表达。DcR3 的表达与肿瘤临床分期、肿瘤浸润和转移有关 ($P<0.05$)。胆管癌患者及胆管良性疾病患者血清 DcR3 水平分别为 152.25 35.94 pg/ml,98.35 14.27 pg/ml,均高于正常人。胆管癌患者与胆道良性疾病患者血清 DcR3 水平相比差异有显著性($P<0.01$)。**结论:**DcR3 在胆管癌组织中表达增高。DcR3 的表达与胆管癌的发生、发展以及转移有关,可成为治疗胆管癌的一个新靶点。血清 DcR3 的检测对胆管癌的诊断有一定的临床价值。

关键词:诱导受体 3;胆管癌;ELISA;免疫组织化学

中图分类号: R735.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273 (2011) 03-915-03

The expression and value of DcR3 in cholangiocarcinoma

LI Kun LI Shi-ping[△] WEI Fa-qiang Li Jun-jie

(Weifang Medical University, Weifang, Shandong, 261042, China)

ABSTRACT Objective: To observe the expression of decoy receptor3(DcR3) in cholangiocarcinoma, and to investigate the value of serum concentration of DcR3 for the diagnosis of cholangiocarcinoma. **Methods:** The expression of DcR3 was examined by immunohistochemistry with SP staining method in 45 cases of cholangiocarcinoma, and 15 cases of bile duct normal tissue. The serum DcR3 concentration was measured using a DcR3 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in 31 cases of cholangiocarcinoma, 18 cases of bile duct benign disease while 28 healthy individuals as contrast. **Results:** The expression of DcR3 was detected in 29 out of the 45 cholangiocarcinoma cases with a positive rate of 64.4%, no expression of DcR3 was detected in bile duct normal tissue. The expression of DcR3 was correlated with TNM staging and lymph node metastasis ($P<0.05$), but not with age, tumor size, histologic grading ($P>0.05$). The serum DcR3 concentrations in patients with cholangiocarcinoma and in patients with bile duct benign disease is 152.25 35.94 pg/ml and 98.35 14.27 pg/ml, while the normal people is 95.01 10.03 pg/ml respectively. There was statistical difference in DcR3 concentration between cholangiocarcinoma patients and bile duct benign disease patients($P<0.01$). **Conclusions:** The expression of DcR3 increased in cholangiocarcinoma. The expression of DcR3 is closely related to cholangiocarcinoma occurrence, progression and metastasis. DcR3 can be a new target for the therapy of cholangiocarcinoma. The serum concentration of DcR3 has clinical value for the diagnosis of Cholangiocarcinoma.

Key words: Decoy receptor 3(DcR3); cholangiocarcinoma; Enzyme-linked immunosorbent assay; Immunohistochemistry

Chinese Library Classification(CLC): R735.8 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)03-915-03

1 资料与方法

1.1 临床资料

潍坊医学院附属医院普通外科 2006 年-2010 年手术切除并经病理证实为胆管癌标本 45 例;年龄 46-76 岁,男 25 例,女 20 例;高分化 16 例,中分化 17 例,低分化 12 例;I 期-II 期 28 例,III-IV 期 17 例。血清取自 2009 年至 2010 年附属医院胆管癌患者,于患者住院第二天晨或手术前抽取静脉血 3 ml,静置 1 h 左右,4℃ 2000 r/min 离心 10 min,离心后取血清,-80℃ 冰箱中保存、备用。共取得完整血清样本 31 例。收集同期手术的胆

总管结石并胆管炎良性疾病患者术前血清共 18 例。对照组:取自 15 例胆总管癌切除标本,距离癌组织边缘 >5 cm 的正常胆管组织,并经病理确认。血清对照组取自健康成年献血者 28 例。

1.1.2 试剂 抗 DcR3 兔多克隆抗体,工作浓度为 1:400,ELISA 法工作浓度为 1:1000,PV-9000 二步法免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒、DcR3 ELISA 试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 IHC 染色 抗 DcR3 兔单抗已知阳性组织切片作阳性对照,PBS 代替一抗作阴性常规脱蜡水化,3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶,高压修复抗原,加兔抗人 DcR3 多克隆抗体,孵育,加标记过氧化物酶的二抗孵育,冲洗后加二氨基联苯胺显色,苏木精复染,脱水,封片后光镜下观察。凡细胞质呈现明显的棕黄色者为阳性细胞。以着色细胞占视野细胞总数的多少分级 (-):阳

作者简介 李坤 (1983),女,硕士研究生,主要研究方向 肿瘤外科学。电话 15953647316,E-mail: yanlikun1125@163.com

[△] 通讯作者 李世平,E-mail: lishiping1963@yahoo.com.cn

(收稿日期 2010-11-05 接受日期 2010-11-30)

性细胞数少于 10 %;(+) :阳性细胞数 10% ~30 %; (++) :阳性细胞数 31 % ~60 %; (+++) :阳性细胞数在 60 %以上。

1.2.2 ELISA 按照试剂盒说明书进行配液,将抗人 DcR3 多抗和血清样本加入微孔板,加生物素 - 结合物孵育,洗板,加抗生物素蛋白链菌素 - 辣根过氧化物酶孵育,再洗板,加四甲基联苯胺显色。酶标仪测量吸光值,由标准曲线求出各血清样本浓度。

1.3 统计学分析

实验数据用 spss16.0 软件进行统计学分析, 计数资料用 χ^2

检验,计量资料用秩和检验,以 $P<0.05$ 判为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 胆管癌病变及癌旁正常组织中 DcR3 蛋白的表达

胆管癌旁正常组织中无阳性表达, 45 例胆管癌组织中 DcR3 阳性表达 29 例, 阳性率为 64.4 %。DcR3 的表达与肿瘤 TNM 分期及淋巴结有无转移呈正相关 ($P<0.05$),与患者性别、年龄、肿瘤部位及分化程度等无明显相关性 ($P>0.05$) (表 1)。

表 1 DcR3 的表达与肝外胆管癌临床病理特征的关系

Table 1 relationship between expression of DcR3 in tissue and clinicopathological factors in cholangiocarcinoma

linicopathological factors	n	expression of DcR3 in tumor tissue			
		-	+	χ^2	P
Sex					
male	25	9	16	0.005	0.994
female	20	7	13		
Age					
≤ 61	23	10	13	1.289	0.256
>61	22	6	16		
Tumor location					
hilar	18	8	10	1.237	0.539
middle common bile duct	12	3	9		
lower common bile duct	15	5	10		
TNM staging					
I - II	28	14	14	6.749	0.009
III-IV	17	2	15		
Grade of defferention					
well	16	6	10	3.163	0.206
moderately	17	2	15		
poorly	12	4	8		
lymph node metastasis					
1≤ N	26	5	21	7.162	0.007
N=0	19	11	8		

2.2 胆管良、恶性疾病患者血清 DcR3 水平

胆管癌患者血清 DcR3 水平 152.25 ± 35.94 pg/ml, 胆管良性疾病患者血清 DcR3 水平 98.35 ± 14.27 pg/ml, 正常人血清

DcR3 水平为 93.01 ± 10.03 pg/ml。胆管癌与胆管炎患者血清 DcR3 水平相比差异有显著性 ($P<0.01$),胆管炎与正常人血清 DcR3 水平无差异性 ($P>0.05$) (表 2)。

表 2 DcR3 血清各组表达之间的比较

Table 2 Comparision of serum concentration of DcR3 in every groups

groups	groups	n	serum concentration of DcR3($\bar{x}\pm s$)	P
cholangiocarcnoma		31	152.25 ± 35.94	0.000✕
benign group		18	98.35 ± 14.27	0.000☆
normal group		28	93.01 ± 10.03	0.321*

✕ There was statistical difference in DcR3 concentration between cholangiocarcinoma patients and bile duct benign disease patients ($P<0.01$), ☆ so as between cholangiocarcinoma and normal people. *No st statistical difference were observed between bile duct benign disease and normal people.

3 讨论

DcR3 又被称作 TR6 或者 M68, 是 1998 年 Pitti 等人^[1]在检查 EST(expressed Sequence tag 表达序列标签)数据库时发现的一组与 TNFR 基因超家族成员有同源性的 EST, 通过重叠序列, 从人胚胎肺中分离出一条新的全长 cDNA, 并把此 cDNA 编码的蛋白称为 DcR3。Bai 等^[2]研究发现其编码基因 M68 位于染色体 20q13.3, 它和另外 3 个基因共同构成一个与肿瘤发生密切相关的基因簇, 此区域在人类癌症产生过程中与基因的重组、扩增有密切关系。成熟的 TR6 分子质量为 35 kDa, cDNA 编码为约 1 kb 核苷酸, 无跨膜区, 为分泌性、可溶性多肽。DcR3 可以和 Fas-L, LIGHT, TLIA 等配体特异性结合, 竞争性地抑制配体与死亡受体(death receptor)的结合, 从而阻断该配体诱导产生的凋亡。在肿瘤的发生、发展以及免疫逃逸中发挥重要作用。研究发现多种恶性肿瘤中, DcR3 基因无论在基因水平还是在蛋白水平均出现过度表达, 且这种过度表达仅仅出现在肿瘤组织中, 临近的正常组织不表达或偶尔低表达。本实验免疫组化检测示 DcR3 在胆管癌组织中高表达, 且肿瘤临床分期越晚, 有淋巴结转移表达增高, 表明 DcR3 与胆管癌的恶性程度相关, 为胆管癌预后提供依据, 与国外文献报道基本一致^[1,2]。

Bai 等^[2]研究发现, DcR3 蛋白在恶性肿瘤中的过度表达可先于其基因扩增的出现, DcR3 蛋白的过度表达可能是原癌基因活化的早期事件, 与基因的选择性扩增有关。Tsuji^[3]等利用 RT-PCR 对胰腺癌细胞株和组织分析后发现, DcR3 mRNA 在胰腺癌细胞株和组织中都存在高表达, 并且与肿瘤对静脉的侵袭性呈正相关。Arakawa^[4]等分别用定量 PCR、定量 RT-PCR 和免疫组化技术分析了 46 例脑星形细胞瘤中 DcR3 DNA、mRNA 和 DcR3 蛋白的表达, 结果发现 86% 的瘤细胞中 DcR3 基因扩增同时伴随 DcR3 mRNA 和蛋白的高表达。安利峰等^[5]研究发现在肝癌及胃癌细胞系中 DcR3 mRNA 高表达而蛋白表达升高不明显。在胆管癌组织中 DcR3 蛋白与 DcR3 mRNA 的表达水平升高与否及其与胆管癌发病机制的关系有待进一步研究。

DcR3 是一种分泌蛋白, 研究发现在胃癌、肝癌、胆囊癌、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌等恶性肿瘤, 以及系统性红斑狼疮、类风湿关节炎等自身免疫性疾病患者中血清 DcR3 水平有不同程度升高, 其中以胃肠道肿瘤升高最显著。Wu^[6]等应用 Elisa 方法对 146 例肿瘤, 19 例急性感染和 29 例健康人的血清进行 TR6 检测, 结果显示, 肿瘤患者血清 82/146(56.2%), TR6 阳性, 其中 82/83(98.8%)为恶性肿瘤患者, 当肿瘤被切除后, 血清 TR6 浓度下降; 急性感染和健康人血清 47/48(97%)TR6 阴性, 提示血清 TR6 的检测将成为恶性病变有意义的诊断、治疗和判断预后的参数。本研究胆管癌血清 DcR3 水平与正常人和感染性疾病患者比较均显著升高, 提示胆管癌患者血清中 DcR3 的水平明显高于正常人。DcR3 有望成为新的胆管癌筛选标志物。杨梅松竹等^[7]发现肝癌患者血清 DcR3 与 AFP 联检诊断灵敏度可由单项检测的 82%和 76%提高到 93%。目前在胆管癌的实验室诊断中, 尚无明确诊断指标, 唯有血清标志物 CA19-9 应用较广泛, 还被用于评估肿瘤的治疗效果和复发情况。因此本文推测, 对高危人群以及胆管癌患者血清中的 CA19-9 与 DcR3 水平的联检, 对胆管癌的筛查、诊断和判断预后具有积极意义。

胆管癌对放疗、化疗不敏感, 目前未见标准的治疗方案。研

究发现 DcR3 的大量扩增的结肠癌患者对以 5-FU 为主的综合化疗不敏感, 从而对预后产生消极影响^[8]。Ouc 等^[9]报道了在人肝内胆管癌组织及细胞株中发现 Fas 和 FasL 的表达, Yamamoto 等^[10]研究发现胆管癌可通过 FasL 诱导活化淋巴细胞的凋亡以逃避免疫监视。DcR3 与 Fas 竞争性结合 FasL, 并以剂量依赖性方式阻断表达 Fas 的肿瘤细胞凋亡过程^[11], 抑制 FasL 诱导的细胞凋亡, 可能成为基因治疗的有用靶点。已有研究表明, 采用 RNA 干扰技术阻断 DcR3 基因表达, 或应用 DcR3 单克隆抗体中和对抗 DcR3 对肿瘤的抗凋亡作用及促血管生成等作用, 可对肿瘤的基因及抗体治疗提供有益的新策略^[12-14]。段伟宏等^[13]研究证明 DcR3 反义 RNA 有效降低肝癌中 DcR3 表达, 同时有较强的促凋亡作用, 与顺铂作用相似。本实验为胆管癌的免疫及靶向治疗提供思路。

参考文献(References)

- [1] Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, et al. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer [J]. *Nature*, 1998, 396(6712):699-703
- [2] Bai C, Connolly B, Metzker M L, et al. Overexpression of M68/DcR3 in human gastrointestinal tract tumors independent of gene amplification and its location in a four-gene cluster [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(3): 1230-1235
- [3] Tsuji S, Hosotani R, Yonehara S, et al. Endogenous decoy receptor 3 blocks the growth inhibition signals mediated by Fas ligand in human pancreatic adenocarcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2003; 106(1):17
- [4] Arakawa Y, Tachibana O, Hasegawa M, et al. Frequent gene amplification and overexpression of decoy receptor 3 in glioblastoma [J]. *Acta Neuropathol*, 2005; 109(3):294
- [5] 安利峰, 胜利, 史霖, 范桂香, 袁育康. DcR3 在消化系统肿瘤细胞中的表达 [J]. *肿瘤* 2008, 28 (12): 1039-1041
An Lifeng, Sheng Li, Shi Lin, et al. The expression of DcR3 in gastrointestinal tumors [J]. *Tumor*, 2008, 28 (12): 1039-1041 (In Chinese)
- [6] Wu Y, Han B, Sheng H, et al. Clinical significance of detecting elevated serum DcR3/TR6/M68 in malignant tumor patients [J]. *Int J Cancer*, 2003, 105(5): 724-732
- [7] 杨梅松竹, 陈昱, 党裔武, 等. 肝细胞癌患者血清 DcR3 水平与临床意义 [J]. *世界华人消化杂志* 2009, 17(20): 2042-2047
Song-Zhu Yangmei, Gang Chen, Yi-Wu Dang, et al. Clinical significance of elevated serum DcR3 in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009, 17(20): 2042-2047 (In Chinese)
- [8] Gabriele M, Felix B, Boulay, et al. DcR3 locus is a predictive marker for 5-fluorouracil based adjuvant chemotherapy in colorectal cancer [J]. *Int J Cancer*, 2002, 102(3): 254-257
- [9] Que FG, Phan VA, Celli A, et al. Cholangiocarcinoma express Fas ligand and disable the Fas receptor. *Hepatology*, 1999, 30: 1398-1404
- [10] Yamamoto K, Katayose Y, Suzuki M. Adenovirus expressing p27KIP1 induces apoptosis against cholangiocarcinoma cells by triggering Fas ligand on the cell surface [J]. *Hepatogastroenterology*, 2003, 50 (54): 1847-1853

(下转第 925 页)

- [11] Allison J, Thomas HE, Catterall T, et al. Transgenic expression of dominant-negative fas-associated death domain protein in B cells protects against fas ligand-induced apoptosis and reduces spontaneous diabetes in Nonbese diabetes mice [J]. J Immunol. 2005,175 (1): 293-301
- [12] Su X, Hu Q, Kristan JM, et al. Significant role for Fas in the pathogenesis of autoimmune diabetes [J]. J Immunol, 2000, 164(5): 2523-2532
- [13] Tsai S, Shameli A, Santamaria P. CD₈⁺T cells in type 1 diabetes[J]. Adv Immunol,2008,100: 79-124
- [14] Graser RT, DiLorenzo TP, Wang F, et al. Identification of a CD8⁺T cell that can independently mediate autoimmune diabetes development in the complete absence of CD4⁺T cell helper functions [J].J Immunol, 2000, 164(7):3913-3918
- [15] Nitta Y, Kawanoto S, Tashiro F, et al. IL-12 plays a pathologic role at the inflammatory loci in the development of diabetes in NOD mice[J]. J Autoimmune,2001,16(2):97-104
- [16] Alba A, Planas R, Clemente X, et al. Natural killer cells are required for accelerated type 1 diabetes driven by interferon-beta[J].2008,151 (3):467-475
- [17] Brauner H, Elemans M, Lemos S, et al. Distinct phenotype and function of NK cells in the pancreas of nonobese diabetic mice [J]. J Immunol,2010,184(5):2272-2280
- [18] Rodacki M, Svoren B, Butty V, et al. Altered natural killer cells in type 1 diabetic patients[J]. Diabetes, 2007, 56(1):177-185
- [19] Bour JH, Bluestone JA. B cell depletion: a novel therapy for autoimmune diabetes [J]. J Clin Invest, 2007, 117(12):3642-3645
- [20] 王卫民,张清贵,温孝刚等.谷氨酸脱羧酶抗体和血、尿 C 肽在糖尿病中的临床应用[J].中国医药导报. 2008, 5(5) 61-62
WANG Wei-min, ZHANG Qing-gui, WEN Xiao-gang, et al. Clinical Application of Glutamic acid decarboxylase antibody and C peptide in the blood or urine[J].China Medical Herald[J].2008,5(5):61-62
- [21] 周智广.1 型糖尿病发病机制与预防研究的新进展[J].中国糖尿病杂志.2009,17(9) 641-642
ZHOU Zhi-guang. New Developments about Pathogenesis and Prevention Research in Type 1 Diabetes [J].Chin J Diabetes,2009,17 (9):641-642

(上接第 917 页)

- [11] Victor J,Witcher DR.Becker GW, et al. Decoy receptor3 (DcR3) is proteolytically processed to a metabolic fragment having differential activities against Fas ligand and LIGHT [J]. Biochem Pharmacol. 2003,65:657-667
- [12] Wang Luping,Sunghee Kim,Jinguo Chen,et al.Decoy TR6 protects tumors cells from apoptosis [J].Proc Annu Meet Am Assoc.Cancer Res,2003,44:149
- [13] Bai J,Sui J,Demirjian A,et al.Predominant Bcl-XL knockdown disables antiapoptotic mechanisms:tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-based triple chemotherapy overcomes chemoresistance in pancreatic cancer cells in vitro [J].Cancer Res, 2005;65(6):2344
- [14] Shi G,Mao J,Yu G,et al.Tumor vaccine based on cell surface expression of DcR3/TR6[J].J Immunol,2005;174(8):472
- [15] 段伟宏,苏忠学,吴泰璜.DcR3 反义 RNA 与顺铂对肝癌细胞凋亡影响的比较[J].中国现代普通外科进展 2005,8(2) 90-93
Duan Wei-hong,SU Zhong-xue,WU Tai-huan,Comparison of cellular apoptosis processed by DcR3 anti-sense RNA and cisplatin in hepatocellular carcinoma [J] Chin J Curr Adv Gen Surg.2005.8(2): 90-93(In Chinese)