

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.01.017

人胰腺癌组织中 PFKFB3 表达及其与 MVD 相关性的研究*

胡 伟 陆晔斌 宋 堃 刘杰仁 孙维佳[△]

(中南大学湘雅医院普外科 湖南 长沙 410000)

摘要 目的:检测人胰腺癌组织 6 磷酸果糖激酶 2/ 果糖双磷酸酶 2 同工酶 3(PFKFB3)的表达及微血管密度(MVD),并探讨二者临床意义和相关性。**方法:**采用免疫组化 SP 法检测 41 例胰腺癌组织和 11 例癌旁组织石蜡块中 PFKFB3 的表达情况,并对 CD34 标记阳性的血管进行微血管密度计数,分析 PFKFB3、MVD 与胰腺癌临床病理特征的相关性及二者之间的相关性。**结果:**胰腺癌组织和癌旁组织中 PFKFB3 的阳性表达率分别为 63.41%和 9.09%,胰腺癌组织显著高于癌旁组织($P<0.01$);PFKFB3 呈阳性和阴性表达的胰腺癌组织 MVD 值分别为 (49.12 ± 12.04) 、 (35.40 ± 8.12) ,两者比较差异有统计学意义($P<0.01$)。PFKFB3 表达与胰腺癌的分化程度显著相关($P=0.035$),MVD 与胰腺癌 TNM 分期及淋巴结转移显著相关($P<0.05$)。Spearman 等级相关分析显示:胰腺癌 PFKFB3 表达与 MVD 值呈显著正相关($r=0.551$, $P<0.01$)。**结论:**胰腺癌组织中 PFKFB3 呈高表达,可能通过促进血管生成,在胰腺癌的发生发展、转移过程中发挥重要作用,并可能作为胰腺癌预防、治疗和预后评估的参考指标。

关键词:胰腺癌;PFKFB3;微血管密度;血管生成

中图分类号:R735.9 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2015)01-72-04

Study on the PFKFB3 Expression in Pancreatic Cancer and the Correlation with Microvessel Density*

HU Wei, LU Ye-bin, SONG Kun, LIU Jie-ren, SUN Wei-jia[△]

(Department of General Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan, 410000, China)

ABSTRACT Objective: To detect the expression of PFKFB3 and microvessel density (MVD) in human pancreatic cancer tissues and investigate the clinical significance and correlation of PFKFB3 with MVD. **Methods:** The expressions of PFKFB3 in 41 cases of pancreatic cancer and 11 cases of para-carcinoma tissues were detected by immunohistochemical SP method and CD34 positive vessels considered as MVD in those tissues were counted. Then relationships between expression of PFKFB3 and MVD, correlation of PFKFB3 with clinical characteristics, MVD with clinical characteristics were analyzed respectively. **Results:** The positive expression rate of PFKFB3 in pancreatic tissue and para-carcinoma tissue were 63.41% and 9.09%, which was significantly higher in the pancreatic tissue ($P<0.01$); the MVD of pancreatic tissue with positive and negative PFKFB3 expression were (49.12 ± 12.04) , (35.40 ± 8.12) respectively ($P<0.01$). The expression of PFKFB3 was significantly related to the differentiation degree of pancreatic tissue ($P=0.035$), MVD was related to both TNM stage and lymph node metastasis of pancreatic tissue ($P<0.05$). Spearman correlation analysis showed that the expression of PFKFB3 was positively correlated with MVD($r=0.551$, $P<0.01$). **Conclusions:** The up-regulation of PFKFB3 expression may play an important role in the tumor genesis and development of pancreatic cancer through promoting the angiogenesis. PFKFB3 could be used as a reference index of the prevention, treatment and prognostic prediction of pancreatic cancer tissue.

Key words: Pancreatic cancer; PFKFB3; Microvessel density; Angiogenesis

Chinese Library Classification(CLC): R735.9 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)01-72-04

前言

胰腺癌是一种发病隐匿,进展迅速,预后很差的消化道恶性肿瘤,发病率呈逐年上升趋势^[1-3]。虽然,目前的外科手术及辅助治疗水平都显著提高,但胰腺癌的预后仍不容乐观,其 5 年生存率低于 5%^[4]。新生血管形成在胰腺癌的生长、侵袭和转移过程中发挥重要作用。在血管内皮细胞出芽过程中,PFKFB3 基因过表达能够使细胞表型向尖端细胞表型转化,从而促进

血管出芽、分支与形成;敲除该基因后导致尖端细胞活性减弱,血管内皮细胞出芽及形成明显减少^[5,6]。但国内文献尚未见报道 PFKFB3 在胰腺癌中表达情况及其与血管形成的关系。本研究拟通过免疫组织化学的方法检测 PFKFB3 在胰腺癌中的表达,并分析其与肿瘤微血管密度(MVD)之间的关系,以期对胰腺癌的预防和治疗提供更多的线索。

1 资料与方法

* 基金项目:中南大学研究生自主创新课题基金项目(2013zzts322)

作者简介:胡伟(1982-),男,硕士研究生,胆胰外科,E-mail: huwei1125@163.com,电话:13787108850

[△]通讯作者:孙维佳,教授,博士生导师,E-mail: sunweijia2009@126.com

(收稿日期:2014-06-14 接受日期:2014-07-10)

1.1 临床资料

胰腺癌标本来源于 2010 年 11 月至 2013 年 5 月在中南大学湘雅医院行胰腺癌切除的患者,其中男性 28 例,女性 13 例;年龄 35-77 岁,中位年龄 54.4 岁。所有患者术前均未接受任何针对肿瘤的治疗(包括放化疗、免疫治疗等)。所有标本术后均病理证实为胰腺腺癌,高分化 8 例,中分化 18 例,低分化 15 例。按照 2002 版国际抗癌联盟(UICC)TNM 分期标准: I - II 期 29 例,III - IV 期 12 例。另取胰腺癌旁组织 11 例,病理学检查证实无癌细胞。

1.2 试剂与方法

兔抗人 PFKFB3 多克隆抗体、鼠抗人 CD34 单克隆抗体分别购自武汉 Proteintech 生物技术公司产品、北京中杉生物技术有限公司。抗体工作浓度分别为 1:200,1:100。所有胰腺癌组织和对照胰腺组织标本均经 10%甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,4 μ m 厚切片,免疫组化 SP 法具体步骤详见说明书。PBS 代替一抗作阴性对照,以试剂盒所附阳性切片作阳性对照。

1.3 结果判断标准

以胞质或胞核出现棕黄色颗粒为 PFKFB3 阳性反应,阴性对照为淡兰染。高倍镜下($\times 400$)随机观察 5 个视野,染色结果采用半定量积分法^[7],根据阳性细胞比率:阳性细胞数 $\leq 5\%$ 为 0 分,6%~25%为 1 分,26%~50%为 2 分,51%~75%为 3 分,>75%为 4 分。根据染色强度:基本不着色或与背景着色一致为 0 分;浅棕黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。阳性细胞

百分比与染色强度之积,阴性表达为 0~3 分,记作 "-";阳性表达为 4~12 分,记作 "+";参照 Weidner 等^[8]的报道以 CD34 染色判定 MVD 计数。每一个染成棕色与周围组织区分开的内皮细胞或内皮细胞簇作为一个血管。在 100 倍视野下全面观察切片以确定瘤内血管分布最高密度区。然后在 400 倍视野下选取最高血管密度区,记录 5 个视野内的微血管数,取平均数作为该病例 MVD 值。阅片采用双盲法,每张切片均由 2 名病理医师观察,分别记录。

1.4 统计学处理

数据采用 SPSS19.0 进行统计分析。两组计量资料的均数比较采用 t 检验,计数资料比较采用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法,两变量的相关性分析采用 Spearman 等级相关分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PFKFB3、MVD 在胰腺癌组织及癌旁组织中的表达

PFKFB3 主要表达于肿瘤的胞浆,部分定位于胞核。在 41 例胰腺癌标本中,PFKFB3 蛋白的阳性表达率为 63.41% (26/41);而在癌旁组织中,PFKFB3 阳性表达率仅 9.09%(1/11),显著低于胰腺癌组织($P<0.01$),见表 1、图 1。同时,胰腺癌组织及癌旁组织中 MVD 值分别为 44.10 ± 12.59 、 23.90 ± 10.37 ,胰腺癌组织显著高于癌旁组织中,见表 1、图 2。

表 1 胰腺癌组织及癌旁组织中 PFKFB3 的表达及 MVD 值比较

Table 1 Comparison of the PFKFB3 expression and MVD between human pancreatic cancer tissue and para-carcinoma tissue

Group	n	PFKFB3		Positive ratio	MVD ($\bar{x} \pm s$)
		-	+	%	
Pancreatic cancer	41	15	26	63.41	44.10 ± 12.59
Para-carcinoma tissue	11	10	1	9.09	23.90 ± 10.37

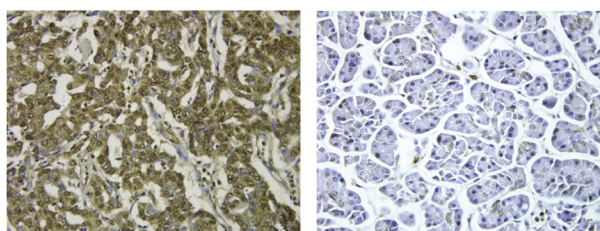


图 1 PFKFB3 在胰腺癌(图左)和癌旁组织中的表达(图右)($\times 400$)

Fig. 1 PFKFB3 expression in human pancreatic cancer tissue (left) and para-carcinoma tissue (right)($\times 400$)

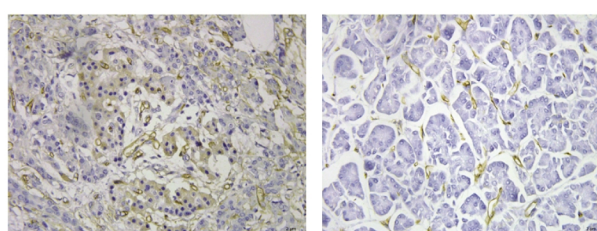


图 2 CD34 在胰腺癌(图左)和癌旁组织中的表达(图右)($\times 400$)

Fig. 2 CD34 expression in human pancreatic cancer tissue (left) and para-carcinoma tissue (right) (400 $\times$)

2.2 PFKFB3 表达及 MVD 与胰腺癌临床病理特征的关系

PFKFB3 表达与胰腺癌分化级别显著相关($P=0.035$),低分化胰腺癌组织中 PFKFB3 的阳性表达率最高;MVD 与胰腺癌 TNM 分期及淋巴结转移显著相关 ($P<0.05$),PFKFB3 表达及 MVD 与胰腺癌患者的性别、年龄、肿瘤大小均无明显相关性,见表 2。

2.3 胰腺癌组织 PFKFB3 表达与 MVD 的相关性

为了探讨胰腺癌组织 PFKFB3 表达与 MVD 的相关性,我

们进一步分析了上述两种蛋白的免疫组化的实验结果。PFKFB3 呈阳性表达的胰腺癌组织 MVD 值显著高于 PFKFB3 呈阴性表达的胰腺癌组织($P<0.01$),见表 3;采用 Spearman 等级相关分析,结果显示胰腺癌组织 PFKFB3 表达与 MVD 呈显著正相关($r=0.551$, $P<0.01$)。

3 讨论

PFKFB 家族 (PFK-2/FBPase-2) 有四种同工酶,分别是

表 2 胰腺癌组织中 PFKFB3 表达、MVD 与临床病理特征的关系

Table 2 Relationship between expression of PFKFB3, MVD and clinical pathological characteristics of pancreatic cancer

Clinical pathological characteristics	n	PFKFB3		χ^2	P	MVD ($\bar{x} \pm s$)		P
		-	+			Counts		
Gender								
Male	28	9	19			43.29± 11.74		
Female	13	6	7	0.751	0.386	45.85± 14.60		0.551
Age								
≤ 60 years	26	11	15			43.96± 11.59		
> 60 years	15	4	11	1.120	0.290	43.33± 14.58		0.929
Tumor size								
≤ 4cm	15	6	9			40.07± 9.2		
> 4cm	26	9	17	0.119	0.730	46.42± 13.78		0.121
Degree of differentiation								
High differentiation	8	6	2			39.87± 6.66		
Low and moderate differentiation	33	9	24	4.432	0.035	45.12± 13.52		0.296
Clinical stage								
I + II stage	29	11	18			40.59± 9.46		
III + IV stage	12	4	8	1.495	0.221	52.58± 15.40		0.039
Lymph node metastasis								
No	23	11	12			37.78± 9.01		
Yes	18	4	14	1.856	0.173	52.17± 12.03		< 0.01

表 3 不同 PFKFB3 表达强度的胰腺癌组织 MVD 值的比较

Table 3 Comparison of the MVD between positive and negative PFKFB3 expression of pancreatic cancer

Group	Number	MVD ($\bar{x} \pm s$)	P value
PFKFB3			
Positive	26	49.12± 12.04	< 0.01
Negative	15	35.40± 8.12	

PFKFB1-4, 虽然都具有高度同源性核心序列催化区域(> 85), 但每一种同工酶因围绕活性催化部位的 N 端和 C 端调节区域和残基高度不同而存在不同的调节和动力学性质^[9,10]。PFKFB 是一种双功能酶, 其中 PFKFB3 几乎没有磷酸酶活性而只有激酶活性(激酶磷酸酶比 740:1)。糖代谢途径的第二步关键酶 6 磷酸果糖激酶 1(PFK-1)受到变构激活剂 2, 6 二磷酸果糖的控制(F2,6BP), 而 PFKFB3 催化 6 磷酸果糖(F6P)导致 2, 6 二磷酸果糖、乳酸等生成增多^[10]。Yalcin 等^[11]研究了 HCT116 等细胞系, 发现 PFKFB3 也存在于细胞核中, 其异位表达增加多种细胞周期蛋白的表达, 包括 Cdk-1、Cdc25C、cyclinD3, 能够减少细胞周期促进肿瘤细胞增殖。

既往研究发现 PFKFB3 在肺癌、肾癌、胃癌、前列腺癌、结肠癌、乳腺癌等实体肿瘤中呈明显高表达^[12,13]。体外实验显示 PFKFB3 基因沉默后能降低血管内皮细胞迁移和增殖, 并在血管内皮细胞球体实验中损害血管出芽。PFKFB3 基因敲除的新生小鼠视网膜血管内皮细胞血管出芽、分支和生长抑制^[5], 而嵌合体马赛克小鼠 PFKFB3 基因敲除的血管内皮细胞与野生型血管内皮细胞相比不能形成新生血管^[15]。PFKFB3 抑制剂 3PO (3-(3-吡啶基)-1-(4-吡啶基)-2-丙烯-1-酮)通过抑制内皮细胞

增殖和迁移, 可抑制内皮细胞球状体、斑马鱼胚胎、新生小鼠视网膜出芽性血管生成, 并可减少 Notch 或 VEGFR1 阻滞所诱导的血管过度分支, 同时放大 VEGF 阻滞的抗血管生成作用^[16]。此外, PFKFB3 也可以通过其他机制影响血管生成, 如糖酵解终产物乳酸通过激活 HIF-1 α 及 VEGFR2 上调^[17,18]或通过 PHD2(脯氨酸羟化酶)的抑制激活促血管生成的 NF- κ B/IL-8 途径, 进而刺激血管生成^[19]。

本研究通过免疫组化方法发现胰腺癌组织 PFKFB3 蛋白的阳性表达率为 63.41%(26/41), 显著高于癌旁组织(9.09%), 且与胰腺癌患者的性别、年龄及肿瘤大小无关, 而与胰腺癌的分化程度显著相关, 分化程度低胰腺癌组织 PFKFB3 的表达水平显著高于高分化的胰腺癌组织。这些结果提示 PFKFB3 的高表达与胰腺癌的侵袭性和转移性有关, 并可能作为判断胰腺癌生长、浸润及转移能力的重要指标, 这与既往 PFKFB3 在神经胶质细胞瘤中的研究结果是一致的^[14]。此外, 胰腺癌组织 PFKFB3 表达与 MVD 值显著相关, 而胰腺癌组织 MVD 值亦明显高于癌旁组织, 与其 TNM 分期及淋巴结转移显著相关。由此可见, PFKFB3 高表达可能具有促进胰腺癌血管生成的作用, 进而介导胰腺癌的发生发展。

综上所述,PFKFB3 高表达可能通过促进血管生成在胰腺癌的发生发展、转移过程中发挥重要作用,并与胰腺癌的恶性程度及预后不良有关,可能作为胰腺癌预防、治疗和预后评估的参考指标,但 PFKFB3 高表达对胰腺癌血管生成的作用及其具体机制尚有待于进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008[J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58(2): 71-96
- [2] Siegel R, Ward E, Brawley O, et al. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(4): 212-236
- [3] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013[J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11-30
- [4] Hidalgo M. Pancreatic cancer [J]. N Engl J Med, 2010, 362(17): 1605-1617
- [5] De Bock K, Georgiadou M, Schoors S, et al. Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting[J]. Cell, 2013, 154(3): 651-663
- [6] Eelen G, Cruys B, Welte J, et al. Control of vessel sprouting by genetic and metabolic determinants [J]. Trends Endocrinol Metab, 2013, 24(12): 589-596
- [7] Reiser-Erkan C, Erkan M, Pan Z, et al. Hypoxia-inducible proto-oncogene Pim-1 is a prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Cancer Biol Ther, 2008, 7(9): 1352-1359
- [8] Weidner N, Semple J P, Welch W R, et al. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma[J]. N Engl J Med, 1991, 324(1): 1-8
- [9] Rider M H, Bertrand L, Vertommen D, et al. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis [J]. Biochem J, 2004, 381(Pt3): 561-579
- [10] Yalcin A, Telang S, Clem B, et al. Regulation of glucose metabolism by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases in cancer [J]. Exp Mol Pathol, 2009, 86(3): 174-179
- [11] Yalcin A, Clem B F, Simmons A, et al. Nuclear targeting of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) increases proliferation via cyclin-dependent kinases[J]. J Biol Chem, 2009, 284(36): 24223-24232
- [12] Atsumi T, Chesney J, Metz C, et al. High expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase (iPFK-2; PFKFB3) in human cancers[J]. Cancer Res, 2002, 62(20): 5881-5887
- [13] Bobarykina A Y, Minchenko D O, Opentanova I L, et al. Hypoxic regulation of PFKFB-3 and PFKFB-4 gene expression in gastric and pancreatic cancer cell lines and expression of PFKFB genes in gastric cancers[J]. Acta Biochim Pol, 2006, 53(4): 789-799
- [14] Kessler R, Bleichert F, Wamke J P, et al. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB3) is up-regulated in high-grade astrocytomas[J]. J Neurooncol, 2008, 86(3): 257-264
- [15] Schoors S, Cantelmo A R, Georgiadou M, et al. Incomplete and transitory decrease of glycolysis: A new paradigm for anti-angiogenic therapy?[J]. Cell Cycle, 2013, 13(1): 16-22
- [16] Schoors S, De Bock K, Cantelmo A R, et al. Partial and Transient Reduction of Glycolysis by PFKFB3 Blockade Reduces Pathological Angiogenesis[J]. Cell Metab, 2014, 19(1): 37-48
- [17] Hunt T K, Aslam R S, Beckert S, et al. Aerobically derived lactate stimulates revascularization and tissue repair via redox mechanisms [J]. Antioxid Redox Signal, 2007, 9(8): 1115-1124
- [18] Sonveaux P, Copetti T, De Saedeleer C J, et al. Targeting the lactate transporter MCT1 in endothelial cells inhibits lactate-induced HIF-1 activation and tumor angiogenesis[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33418
- [19] Vegran F, Boidot R, Michiels C, et al. Lactate influx through the endothelial cell monocarboxylate transporter MCT1 supports an NF-kappaB/IL-8 pathway that drives tumor angiogenesis [J]. Cancer Res, 2011, 71(7): 2550-2560

(上接第 65 页)

- Zhou Hua-jian, Li Shao-guang, Yang Xiao-yun, et al. Efficacy and safety of lipo- prostaglandin E1 for treatment of viral hepatitis hyperbilirubinemia[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2005, 7: 909-911
- [10] 郑明华, 杨新军, 徐叶进, 等. 前列腺素 E1 脂微球载体制剂治疗对肝衰竭患者生存的影响 --- 中国 9 个相关研究的 Meta 分析[J]. 实用医学杂志, 2007, 23(9): 1299-1302
- Zheng Ming-hua, Yang Xin-jun, Xu Ye-jin, et al. Influence of Lipo prostaglandinE1 on the survival of patients with liver failure---Nine Chinese Meta-analysis of studies [J]. Chinese Practical Medicine, 2007, 23(9): 1299-1302
- [11] 何清, 王松, 张琴, 等. 前列腺素 E1 脂微球载体注射液治疗病毒性肝炎的有效性和安全性评价 [J]. 中国循证医学杂志, 2007, 10: 728-736
- He Qing, Wang Song, Zhang Qin, et al. Evaluation of the efficacy and safety of Lipo prostaglandinE1 injection in the treatment of viral hepatitis[J]. Chinese Evidence -Based Medicine, 2007, 10: 728-736
- [12] Ishibe A, Togo S, Kumamoto T, et al. Prostaglandin E1 prevents liver failure after excessive hepatectomy in the rat by up-regulating Cyclin C, Cyclin D1, and Bclxl[J]. Wound Repair Regen, 2009, 17(1): 62-70
- [13] 吴连春. 前列地尔的临床应用进展 [J]. 河北联合大学学报 (医学版), 2013, 15(2): 185-187
- Wu Lian-chun. Clinical progress of applied alprostadil [J]. Hebei United University (Medical Sciences), 2013, 15(2): 185-187
- [14] Togo S, Chen H, Takahashi T, et al. Prostaglandin E1 improves survival rate after 95% hepatectomy in rats[J]. J Surg Res, 2008, 146(1): 66-72
- [15] North TE, Babu IR, Vedder LM, et al. PGE2-regulated wnt signaling and N-acetylcysteine are synergistically hepatoprotective in zebrafish acetaminophen injury [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(40): 17315-17320
- [16] Cavar I, Kelava T, Vukojević K, et al. The role of prostaglandin E2 in acute acetaminophen hepatotoxicity in mice [J]. Histol Histopathol, 2010, 25(7): 819-830