

## CTGF、PCNP 在胰腺癌中表达意义的探讨

胡 鹏<sup>1</sup>, 张雷达<sup>2△</sup>

(1. 兰州军区兰州总医院肝胆外科, 兰州 730050; 2. 第三军医大学西南医院肝胆外科, 重庆 400038)

**[摘要]** **目的** 探讨结缔组织生长因子(CTGF)、PCNP 在胰腺癌组织中的表达水平及意义。**方法** 采用免疫组织化学法与蛋白质免疫印迹法检测 39 例胰腺癌及癌旁组织中 CTGF 和 PCNP 的表达情况, 分析其与临床病理因素的关系。**结果** CTGF、PCNP 在胰腺癌中的阳性表达率均显著高于癌旁组织和正常胰腺组织, 差异有统计学意义( $\chi^2=60.41, 51.46$ , 均  $P<0.01$ ); CTGF、PCNP 的阳性表达率分别与 TNM 分期、淋巴结转移明显相关( $P<0.05$ )。**结论** CTGF、PCNP 在胰腺癌组织中表达明显上升, 且两者的表达水平与肿瘤的分期、淋巴结转移状况有着明显的相关性。

**[关键词]** 胰腺肿瘤; 结缔组织生长因子; PCNP**[中图分类号]** R657.5**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)30-4213-03

## The study for the expression of CTGF, PCNP and their significance in pancreatic cancer

Hu Peng<sup>1</sup>, Zhang Leida<sup>2△</sup>

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Region, Lanzhou, Gansu 730050, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital of the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the expression of connective tissue growth factor(CTGF) and PEST containing nuclear protein(PCNP) and their significance in pancreatic cancer. **Methods** The expressions of CTGF and PCNP proteins were tested by immunohistochemistry and Immunofluorescence in 39 cases of pancreatic carcinomas and adjacent paracancerous tissues. **Results** The positive rate of CTGF and PCNP in pancreatic carcinomas was significantly higher than adjacent paracancerous tissues( $\chi^2=60.41, 51.46$ , all  $P<0.01$ ). The differences of the expression of CTGF and PCNP in pancreatic carcinoma of tumor differentiation, TNM stage and lymph node metastasis was significant ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The expression of CTGF and PCNP in the pancreatic cancer was obviously increased, and the level of CTGF, PCNP had remarkable connection with the stages of tumor and the condition of lymph node metastasis.

**[Key words]** pancreatic neoplasms; connective tissue growth factor; PEST containing nuclear protein

胰腺癌是消化道中比较常见的一种恶性肿瘤, 具有极高的病死率、极短的存活期, 转移扩散速度快、发现时已为晚期, 早期的典型症状缺少、位置极其隐蔽这三大特点<sup>[1]</sup>。目前, 世界各地的胰腺癌发病率都有所上升。结缔组织生长因子(CTGF)是即刻早期 CCN 基因家族的成员之一, 据目前大量研究显示, 其是参与肿瘤生长、皮肤失调、肾病、血管新生及骨生成等病理过程或生物行为的一种调控多功能信号分子<sup>[2]</sup>。PCNP(PEST-containing nuclear protein)是含 PEST 序列的一种新核蛋白, 大部分活跃于细胞核内, 是存在泛素化作用的一种蛋白连接酶, 参与细胞周期等的调控<sup>[3]</sup>。本研究旨在通过对胰腺癌组织中 CTGF 和 PCNP 与相关因素的关系, 以及表达差异的研究, 探讨早期诊断、筛查、治疗胰腺癌的新思路。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2011~2014 年 39 例胰腺癌患者在兰州军区兰州总医院肝胆外科、第三军医大学西南医院肝胆外科接受手术治疗切除的胰腺癌、癌旁组织(距离癌组织大于 5 cm 以外的癌旁组织)、正常胰腺组织标本各 39 个。术前均无有关放化疗的记录, 术后被证实为胰腺导管腺癌的患者。依据国际抗癌联盟提出的胰腺癌 TNM 分期标准对所有入选患者进行分期。入组的胰腺癌患者的临床资料, 见表 1。

## 1.2 方法

**1.2.1 制备石蜡切片** (1) 在 4% 磷酸盐联合多聚甲醛(POM)缓冲液中加入磷酸盐缓冲液(PBS)洗净过的组织固定 12 h; (2) 将固定液倒去, 接着分别进行 3 次蒸馏水、2 次 50%

的乙醇充分冲洗, 然后用 70% 的乙醇(1 d)、80% 的乙醇(过夜)、95% 的乙醇(3 h)、无水乙醇 I 及 II(各 2 h)进行逐级脱水处理; (3) 用等量的无水乙醇和二甲苯混合液静置 45 min 后, 再用 I、II 级二甲苯静置 30 min; (4) 于恒温箱内浸入石蜡。58℃, 石蜡二甲苯(1:1)中静置 45 min, I、II、III 级石蜡中泡 2.5 h 后, 包埋于 III 级石蜡中; (5) 修整组织后切片(5~7 μm); (6) 在 50℃ 温水中展开石蜡块后, 将载玻片捞片处理干净, 可将组织黏附于载玻片上; (7) 68℃ 恒温箱内进行 2 h 的烤片。

表 1 入组患者临床资料

分类	入组者(n=39)
年龄( $\bar{x}\pm s$ , 岁)	53.1±11.1
性别(男/女)	24/15
BMI( $\bar{x}\pm s$ , kg/m <sup>2</sup> )	22.2±2.0
空腹血糖( $\bar{x}\pm s$ , mmol/L)	5.1±1.0
肿瘤部位	
胰头/胰尾	21/18
组织分型	
低分化/中、高分化	19/20
分期	
I、II 期/III、IV 期	24/15
淋巴结转移	
有/无转移	14/25

**1.2.2 ABC 法的应用** 烘烤及浸泡后脱蜡、乙醇逐级水化、用甲醇或去离子水进行阻断、抗原修复、用山羊血清液封闭、用

BSA 稀释后静置、再次稀释、孵育、DAB 显色、苏木精复染、常规脱水至透明后切片、封片。

**1.2.3 设立对照的免疫组织化学** 阳性对照为已知的胰腺癌呈阳性的切片, 阴性对照为经 PBS 孵育的胰腺癌阳性切片。比较胰腺癌、癌旁组织、正常胰腺组织的 CTGF、PCNP 阳性表达差异, 并分析在胰腺癌组织中 CTGF、PCNP 阳性表达与临床特征之间的关系。

**1.2.4 Western blot 检测 CTGF 和 PCNP 蛋白的表达** 加入蛋白裂解液及 PMSF, 冰上放置 30 min, 4 °C 下 12 000 r/min 离心 40 min, 取上清液。用 Bradford 法对上清液进行蛋白定量。取 40 μg 蛋白样品, 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 100 V 转移 1 h 至硝酸纤维素薄膜, 放入封闭液中 37 °C 封闭 2 h; 一抗 4 °C 过夜。反复洗膜后, 加入二抗孵育, 室温轻摇 1 h, 洗膜后作 ECL 化学发光, X 光显影。图像经扫描仪扫描后, 用图像分析软件 Band Scan 5.0 进行吸收度积分值分析, 计算目的蛋白与内参照 GAPDH 蛋白表达量的吸收度积分值之比作为目的蛋白表达量的相对含量, 实验重复 3 次。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 *t* 检验比较。等级相关检验采用 Spearman 相关检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 CTGF、PCNP 在胰腺癌、癌旁组织、正常胰腺组织中的表达比较** 分组的胰腺癌、癌旁组织、正常胰腺组织各 39 个标本中的 CTGF、PCNP 阳性表达率提示 CTGF、PCNP 在胰腺癌中的阳性表达率均显著高于癌旁组织和正常胰腺组织, 差异有统计学意义( $\chi^2 = 60.41, 51.46$ , 均  $P < 0.01$ ), 见图 1~4, 表 2。

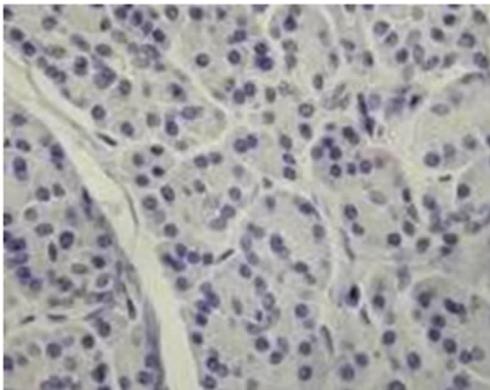


图 1 CTGF 在胰腺癌癌旁组织中的阴性表达(×400)

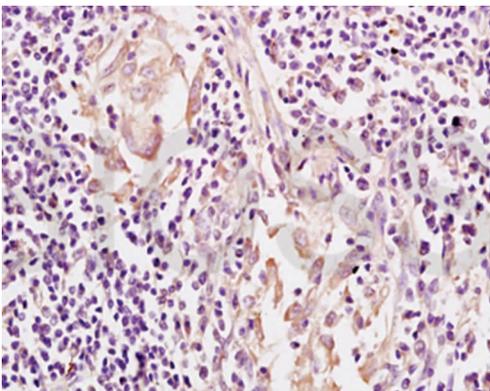


图 2 CTGF 在胰腺癌组织中的阳性表达(×400)

**2.2 CTGF 和 PCNP 蛋白的表达检测** CTGF 和 PCNP 在胰腺癌中的表达均显著高于癌旁组织和正常胰腺组织, 见图 5。

**2.3 CTGF、PCNP 阳性表达率与临床特征相关性** 在胰腺癌组织中 CTGF、PCNP 阳性表达率与患者的临床特征包括肿瘤

部位、组织分型、分期及淋巴结转移状况的相关性, 见表 3。结果提示, CTGF 阳性表达率在不同的分期、有无淋巴结转移上差异有统计学意义( $\chi^2 = 6.290, 5.636, P < 0.05$ ); PCNP 的阳性表达率在不同的分期、有无淋巴结转移的差异有统计学意义( $\chi^2 = 7.313, 5.911, P < 0.05$ )。

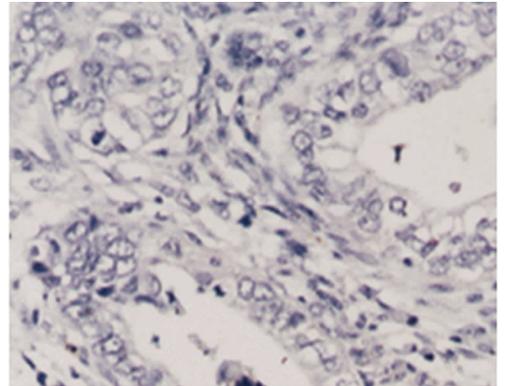


图 3 PCNP 在胰腺癌癌旁组织中的阴性表达(×400)

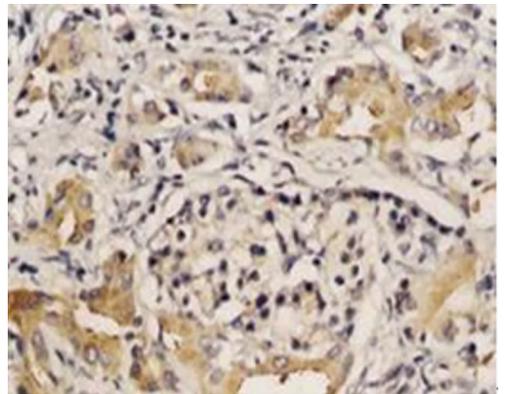


图 4 PCNP 在胰腺癌组织中的阳性表达(×400)

表 2 CTGF、PCNP 在胰腺癌、癌旁组织和正常胰腺组织中的表达(n)

指标	n	CTGF 阳性率	PCNP 阳性率
胰腺癌	39	31	30
癌旁组织	39	6	7
正常胰腺组织	39	1	2
$\chi^2$		60.41	51.46
P		<0.01	<0.01

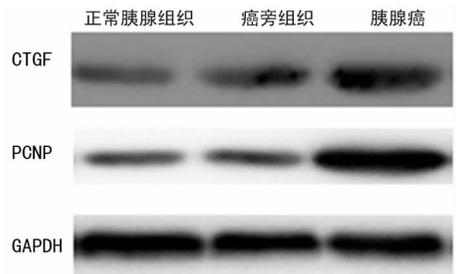


图 5 各组的 CTGF 和 PCNP 蛋白的表达

表 3 CTGF、PCNP 阳性表达率与临床特征相关性分析

项目	CTGF			PCNP		
	阳性	$\chi^2$	P	阳性	$\chi^2$	P
肿瘤部位						
胰头	18/21			16/21		
胰尾	13/18	1.082	0.300	14/18	0.014	0.910

续表 3 CTGF、PCNP 阳性表达率与临床特征相关性分析

项目	CTGF			PCNP		
	阳性	$\chi^2$	<i>P</i>	阳性	$\chi^2$	<i>P</i>
组织分型						
低分化	16/19			14/19		
中、高分化	15/20	0.507	0.480	16/20	0.219	0.640
分期						
I、II 期	16/24			15/24		
III、IV 期	15/15	6.290	0.012	15/15	7.313	0.007
淋巴结转移						
无	17/25			16/25		
有	14/14	5.636	0.018	14/14	5.911	0.015

### 3 讨 论

胰腺癌是目前已知的恶性度最高的肿瘤之一,它缺乏有效的早期诊断手段,患者化疗和放疗的疗效不佳,外科切除率和总体生存率都很差,病死率接近 100%,总体 5 年生存率小于 5%<sup>[4]</sup>。因此,探索胰腺癌新的有效诊断和治疗靶分子显得尤为重要。近年研究人员对胰腺癌发生、发展机制的研究有了较大的进步,但是胰腺癌在其发生、发展过程中有多种基因参与,且他们的信号传导途径和作用机制仍不清楚。因此,继续发现胰腺癌相关基因及蛋白,为胰腺癌的生物治疗与早期诊断提供新的靶点和途径,胰腺癌的发病机制研究仍然是重点。

CTGF 是即刻早期 CCN 基因的一位家族成员,最早发现于人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的培养基中。其有多种细胞(如内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞)合成,致使器官出现纤维化等的一种细胞因子<sup>[5]</sup>。据研究报告,CTGF 的表达水平与肝癌的复发和转移<sup>[6]</sup>,黑色素瘤的侵袭力<sup>[7]</sup>,宫颈癌的发展<sup>[8]</sup>,乳腺癌的骨转移<sup>[9-10]</sup>,神经胶质瘤的发展<sup>[11]</sup>,胃癌的淋巴结转移和低存活率有关<sup>[12]</sup>。在各种肿瘤中 CTGF 基因的表达有着不同的差异性,CTGF 可能在不同肿瘤的发生、发展中有着不同的功能。还有学者发现,CTGF 可以促进胰腺癌细胞生长,采用 CTGF 抗体治疗能抑制其生长<sup>[13]</sup>。PCNP 是含 PEST 序列的一种新核蛋白,细胞核内是其主要的活动场所,PCNP 有泛素化作用,PCNP 在信号调控、转录调节、基因表达、转移、分化、凋亡以及细胞增殖中参与调控工作<sup>[14-15]</sup>。

本研究结果显示,胰腺癌组织中 CTGF 和 PCNP 的阳性表达率显著高于癌旁组织( $P < 0.05$ );CTGF 和 PCNP 蛋白表达与肿瘤的分化程度、TNM 分期及淋巴结转移明显相关( $P < 0.05$ )。在胰腺癌组织中 CTGF 表达的研究中发现,CTGF 高表达的患者胰腺癌分化程度较低、有淋巴结转移和临床分期相对较晚的特征,而其高表达与患者的年龄、性别之间没有明显的关系,这些说明 CTGF 在胰腺癌的恶化过程中也可能起促进作用。

综上所述,胰腺癌组织内存在 CTGF 和 PCNP 的异常表达,且在胰腺癌发病中有着关键性的作用<sup>[16]</sup>。对于早期诊断和筛选胰腺癌,CTGF 是蛋白分子有效的标记物,也是治疗胰腺癌的一个新靶点,这提供了治疗胰腺癌及其预后检测的一个新思路。

### 参考文献

[1] Lee SY, Lloyd WR, Chandra M, et al. Characterizing human pancreatic cancer precursor using quantitative tissue optical spectroscopy [J]. *Biomed Opt Express*, 2013, 4 (12):2828-2834.  
 [2] Youns M, Efferth T, Hoheisel JD. Transcript profiling identifies novel key players mediating the growth inhibitory effect of NS-398 on human pancreatic cancer cells[J].

*Eur J Pharmacol*, 2011, 650(1):170-177.  
 [3] Kessel KA, Habermehl D, Jager A, et al. Development and validation of automatic tools for interactive recurrence analysis in radiation therapy: optimization of treatment algorithms for locally advanced pancreatic cancer[J]. *Radiat Oncol*, 2013(8):138.  
 [4] 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.  
 [5] 郭世奎, 龚昆梅, 肖乐, 等. 胰腺癌相关信号转导通路研究新进展[J]. *中国肿瘤临床与康复*, 2010(6):563-565.  
 [6] Zeng ZJ, Yang LY, Ding X, et al. Expressions of cysteine-rich61, connective tissue growth factor and Nov genes in hepatocellular carcinoma and their clinical significance [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(23):3414-3418.  
 [7] Kubo M, Kikuchi K, Nashiro K, et al. Expression of fibrogenic cytokines in desmoplastic malignant melanoma[J]. *Br J Dermatol*, 1998, 139(2):192-197.  
 [8] Wong YF, Cheung TH, Tsao GS, et al. Genome-wide gene expression profiling of cervical cancer in Hong Kong women by oligonucleotide microarray[J]. *Int J Cancer*, 2006, 118(10):2461-2469.  
 [9] Kang Y, Siegel PM, Shu W, et al. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone[J]. *Cancer Cell*, 2003, 3(6):537-549.  
 [10] Shimo T, Kubota S, Yoshioka N, et al. Pathogenic role of connective tissue growth factor(CTGF/CCN2) in osteolytic metastasis of breast cancer[J]. *J Bone Miner Res*, 2006, 21(7):1045-1059.  
 [11] Pan LH, Beppu T, Kurose A, et al. Neoplastic cells and proliferating endothelial cells express connective tissue growth factor (CTGF) in glioblastoma[J]. *Neurol Res*, 2002, 24(7):677-683.  
 [12] Koliopanos A, Friess H, di Mola FF, et al. Connective tissue growth factor gene expression alters tumor progression in esophageal cancer[J]. *World J Surg*, 2002, 26(4):420-427.  
 [13] Eguchi D, Ikenaga N, Ohuchida K, et al. Hypoxia enhances the interaction between pancreatic stellate cells and cancer cells via increased secretion of connective tissue growth factor[J]. *J Surg Res*, 2013, 181(2):225-233.  
 [14] Mori T, Li YY, Hata H, et al. N1RF is a ubiquitin lipase that is PCNP, a PEST-containing nuclear protein [J]. *FEBS Lett*, 2004, 577(1/3):209-214.  
 [15] Huang WW, Yang JS, Pai SJ, et al. Bufalin induces G(0)/G(1) phase arrest through inhibiting the levels of cyclin D, cyclin E, CDK2 and CDK4, and triggers apoptosis via mitochondrial signaling pathway in T24 human bladder cancer cells[J]. *Mutat Res*, 2012, 732(1/2):26-33.  
 [16] Song WF, Wang L, Huang WY, et al. MiR-21 upregulation induced by promoter zone histone acetylation is associated with chemoresistance to gemcitabine and enhanced malignancy of pancreatic cancer cells [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(12):7529-7536.