DOI:10.16016/j.1000-5404.201411121

论著

胰腺癌组织中硫酸软骨素蛋白多糖4的表达及其临床意义

孙 靖,卢乐乐,赖洁娟,张玉君,陈美玲,白莲花,张雷达 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所)

[摘要] **目的** 探讨硫酸软骨素蛋白多糖4(chondroitin sulfate proteoglycan 4,CSPG4)在胰腺癌(pancreatic carcinoma)中的表达及其临床意义。**方法** 收集2007年6月至2010年6月西南医院肝胆外科的胰腺导管腺癌及正常胰腺组织(距肿瘤边缘>2 cm)标本各160例,其中男性124例,女性36例;年龄33~75(56.98±10.75)岁。应用免疫组织化学染色法检测其中CSPG4的表达,分析CSPG4的表达与临床病理参数的相关性;采用Kaplan-Meier法分析胰腺癌中CSPG4的表达与患者预后的关系,Cox回归模型分析胰腺癌患者预后的影响因素。**结果** 胰腺导管腺癌组织中CSPG4的阳性表达率显著高于正常胰腺组织(46.25% *vs* 10.00%,$P<0.01$)。胰腺癌中CSPG4的表达与有无淋巴结转移或血管侵犯、肿瘤T分期、TNM分期显著相关($P<0.01$)。胰腺癌中CSPG4阳性表达患者术后总生存率显著低于阴性表达者($P<0.01$)。CSPG4的表达是影响胰腺癌患者预后的独立危险因素之一($P<0.01$)。**结论** CSPG4在胰腺导管腺癌中异常高表达,其表达水平是评估患者预后的独立预测指标,提示CSPG4可能成为胰腺癌治疗的一个新靶点。

[关键词] 胰腺癌;硫酸软骨素蛋白多糖4;免疫组织化学;预后
[中图法分类号] R343;R730.23;R735.9 [文献标志码] A

Prognostic significance of chondroitin sulfate proteoglycan 4 over-expression in pancreatic cancer patients

Sun Jing, Lu Lele, Lai Jiejuan, Zhang Yujun, Chen Meiling, Bai Lianhua, Zhang Leida (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression and clinical significance of chondroitin sulfate proteoglycan 4 (CSPG4) in pancreatic cancer. **Methods** The expression of CSPG4 was detected by immunohistochemical staining in 160 pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) samples and 160 adjacent normal samples. The correlation between CSPG4 expression and clinicopathologic features of patients with pancreatic cancer was analyzed. Kaplan-Meier method was used to evaluate the impact of CSPG4 expression on postoperative survival of the patients with pancreatic cancer. Cox univariate and multivariate prognostic analysis was utilized to explore the prognostic factors of the patients with pancreatic cancer. **Results** The positive rate of CSPG4 expression was significantly higher in PDAC samples than in adjacent normal samples (46.25% *vs* 10.00%, $P<0.01$). Remarkable correlations were found between the CSPG4 expression and the lymph node metastasis, vessel invasion, T staging as well as TNM staging (all $P<0.01$). The overall survival of CSPG4-positive patients was much lower than that of CSPG4-negative patients ($P<0.01$). The CSPG4 expression was one of independent risk factors which could significantly affect the prognosis of patients with pancreatic cancer ($P<0.01$). **Conclusion** CSPG4 is over-expressed in PDAC, and is an independent predictor to assess the prognosis of patients with pancreatic cancer.

[通信作者] 张雷达,E-mail:zldtmmu@126.com
白莲花,E-mail:qqg63@outlook.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150312.1030.007.html(2015-03-12)

[**Key words**] pancreatic cancer; chondroitin sulfate proteoglycan 4; immunohistochemistry; prognosis

Corresponding author: Zhang Leida, E-mail: zldtmmu@126.com; Bai Lianhua, E-mail: qqg63@outlook.com

胰腺癌(Pancreatic cancer)是一种侵袭性、致死性极强的消化道恶性肿瘤[1]。目前全世界每年约有330 300人死于该疾病[2],居恶性肿瘤死亡原因的第4位[3]。胰腺癌起病隐匿,早期诊断困难,进展迅速,早期便可发生邻近脏器的侵犯及远处转移,具有极为恶性的生物学特征[4]。近年来,尽管胰腺癌的诊断技术和治疗方法有所改进,但患者的预后并未发生明显改善,其中位生存时间仍不足6个月[5],而5年生存率仅为6%[3]。

硫酸软骨素蛋白多糖4(chondroitin sulfate proteoglycan 4,CSPG4),又名NG2,是一种系统发育中高度保守的Ⅰ型跨膜糖蛋白[6-7]。研究表明,CSPG4异常高表达于人类黑色素瘤中,可促进肿瘤细胞的生长、黏附、运动和侵袭等恶性生物学行为[7],并参与新生血管形成[8]。之前虽已有报道证实胰腺癌中存在CSPG4的表达[6],但其表达的临床意义及其与胰腺癌发生、发展的关系目前尚不清楚。本研究检测胰腺导管腺癌和正常胰腺组织中CSPG4的表达,结合患者临床资料,分析CSPG4的表达与胰腺癌患者临床病理特征的相关性,探讨其对患者预后的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 患者资料 收集2007年6月至2010年6月于我科手术切除并经病理检查确诊的胰腺导管腺癌及正常胰腺组织(距肿瘤边缘>2 cm)标本各160例。所有患者术前均未接受化疗、放疗或免疫治疗,且临床病理资料完整。其中男性124例,女性36例;年龄33~75(56.98±10.75)岁,胰头癌142例,胰体尾癌18例;肿瘤大小:直径≤2 cm 62例,>2 cm 98例;分化程度:高分化18例,中分化100例,低分化42例;浸润深度:T1~T2期92例,T3~T4期68例;有淋巴结转移50例,无淋巴结转移110例;有血管侵犯38例,无血管侵犯122例;按美国癌症联合委员会(AJCC)胰腺癌TNM分期标准(2010版):Ⅰ期74例,Ⅱ~Ⅲ期86例。所有患者均签署知情同意书。

1.1.2 主要试剂 兔抗人NG2 Chondroitin Sulfate Proteoglycan多克隆抗体购自美国Millipore公司;EnVision™二抗显色试剂盒购自美国Dako公司;山羊血清购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色 采用EnVision™二步法,所有标本经固定、包埋后,行4 μm连续切片。经常规脱蜡、水化后,3%过氧化氢37 ℃孵育30 min,枸橼酸钠(0.01 mol/L,pH=6.0)抗原修复(120 ℃,3 min);10%山羊血清封闭后(37 ℃,30 min),滴加1∶150兔抗人CSPG4一抗,4 ℃孵育过夜。次日滴加EnVision™抗鼠/兔通用型二抗,37 ℃孵育60 min;DAB显色,苏木精复染后,脱水、透明,中性树胶封片。用磷酸盐缓冲液(PBS)替代一抗作阴性对照。

1.2.2 免疫组化染色结果评价 2位研究者采用双盲法对染色结果进行独立观察评价。结果判定采用半定量法,根据显微镜下染色强度进行分类:细胞未着色记为阴性(-);淡黄色记为弱阳性(+);棕黄色记为阳性(++);棕褐色记为强阳性(+++)。为便于统计分析,将(-)定义为阴性表达;(+)、(++)、(+++)定义为阳性表达。

1.2.3 随访 160例患者中失访2例、围手术期死亡4例,余154例纳入随访。采用电话或门诊随访的方式,自手术之日起每3个月随访1次直至患者死亡或2013年6月30日。总生存时间定义为自手术之日起至出现与胰腺癌相关的死亡的时间。死于其他原因或在随访期内生存的病例作为截尾事件处理。全部患者随访2~54个月,中位随访时间14个月。

1.3 统计学分析

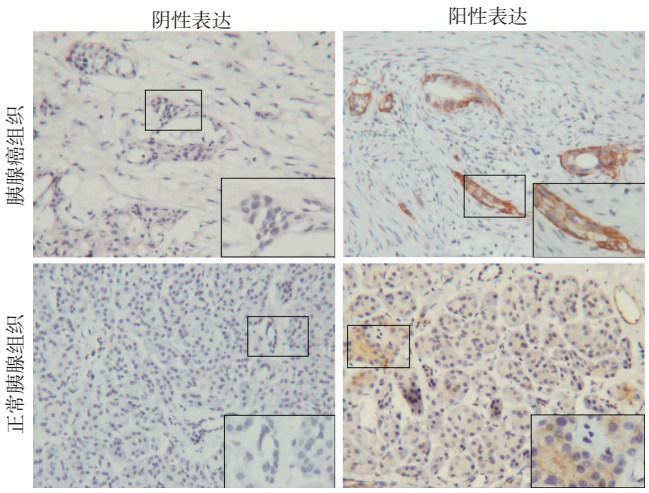
采用SPSS 19.0统计软件。采用χ^2检验比较胰腺癌与癌旁正常胰腺组织中CSPG4的表达差异,并分析胰腺癌中CSPG4的表达与其临床病理参数的关系,实验数据以百分比形式表示;应用Kaplan-Meier曲线分析胰腺癌中CSPG4的表达与患者术后生存的关系,并进行log-rank检验,实验数据以$\bar{x}\pm s$形式表示;运用Cox风险回归模型进行单因素、多因素分析胰腺癌患者预后的影响因素。

2 结果

2.1 CSPG4在胰腺导管腺癌及正常胰腺组织中的表达

160例胰腺导管腺癌组织中,CSPG4阴性表达86例,阳性74例,阳性率46.25%,且阳性染色主要位于肿瘤细胞的细胞膜及细胞质(细胞质为主),多呈灶状分布,以棕黄色或棕褐色着色为主;160例正常胰腺组织中,CSPG4阴性表达144例,阳性16例,阳性率

10.00%,且阳性染色主要位于腺泡细胞及导管上皮细胞的细胞膜及细胞质(细胞质为主),多呈弥漫分布,以淡黄色着色为主(图 1)。胰腺癌组织中 CSPG4 阳性表达率显著高于正常胰腺组织,且差异具有显著性($\chi^2=52.004$,$P<0.01$)。



方框中为局部放大 400 倍

图 1 免疫组化检测 CSPG4 在胰腺导管腺癌及正常胰腺组织中的表达 (EnVision™ ×200)

2.2 CSPG4 表达与胰腺癌患者临床病理参数的关系

160 例胰腺癌组织中,CSPG4 的表达与有无淋巴结转移或血管侵犯、肿瘤 T 分期、TNM 分期显著相关($P<0.01$);而与患者年龄、性别、肿瘤直径、肿瘤部位及分化程度无明显相关($P>0.05$,表 1)。

2.3 CSPG4 表达与胰腺癌患者术后生存的关系

Kaplan-Meier 生存分析显示胰腺癌组织中 CSPG4 阴性表达者术后平均生存时间明显高于 CSPG4 阳性表达者[(21.85±12.16) *vs* (8.94±4.97)个月],且差异具有显著性($P<0.01$,图 2)。

胰腺癌组织中 CSPG4 阴性表达者 1 年生存率(75.60% *vs* 20.70%)、2 年生存率(34.50% *vs* 0)、3 年生存率(17.40% *vs* 0)及中位生存时间(20 个月 *vs* 9 个月)明显高于 CSPG4 阳性表达者,且差异具有显著性($P<0.01$)。

2.4 胰腺癌患者预后的影响因素

应用 Cox 比例风险回归模型进行单因素预后分析,结果显示 CSPG4 表达($P<0.01$)、有无血管侵犯($P<0.01$)或淋巴结转移($P<0.01$)、肿瘤部位($P<0.05$)、分化程度($P<0.05$)、T 分期($P<0.01$)及 TNM 分期($P<0.01$)均是胰腺癌患者预后的影响因素;而患者年龄、性别及肿瘤直径均不是胰腺癌患者预后的影响因素($P>0.05$)。将单因素分析结果中影响患者预后的因素全部纳入 Cox 比例风险回归模型,进行多因素预后分析,结果显示 CSPG4 表达($P<0.01$)、有无淋巴结转移($P<0.01$)及肿瘤分化程度($P<0.05$)是影响胰腺癌患者预后的独立危险因素(表 2)。

表 1 160 例胰腺癌中 CSPG4 的表达与患者临床病理参数的关系[(例)%]

临床病理参数	*n*	CSPG4 的表达		χ^2	*P*
		阴性($n=86$)	阳性($n=74$)		
年龄					
≤65 岁	118	58(49.15)	60(50.85)	3.822	>0.05
>65 岁	42	28(66.67)	14(33.33)		
性别					
男	124	64(51.61)	60(48.39)	1.013	>0.05
女	36	22(61.11)	14(38.89)		
肿瘤直径					
≤2 cm	62	38(61.29)	24(38.71)	2.315	>0.05
>2 cm	98	48(48.98)	50(51.02)		
肿瘤部位					
胰头	142	80(56.34)	62(43.66)	3.401	>0.05
胰体尾	18	6(33.33)	12(66.67)		
分化程度					
高分化	18	10(55.56)	8(44.44)	0.862	>0.05
中分化	100	56(56.00)	44(44.00)		
低分化	42	20(47.62)	22(52.38)		
淋巴结转移					
无	110	68(61.82)	42(38.18)	9.217	<0.01
有	50	18(36.00)	32(64.00)		
血管侵犯					
无	122	74(60.66)	48(39.34)	9.854	<0.01
有	38	12(31.58)	26(68.42)		
T 分期					
T1~T2 期	92	62(67.39)	30(32.61)	16.204	<0.01
T3~T4 期	68	24(35.29)	44(64.71)		
TNM 分期					
Ⅰ期	74	54(72.97)	20(27.03)	20.465	<0.01
Ⅱ~Ⅲ期	86	32(37.21)	54(62.79)		

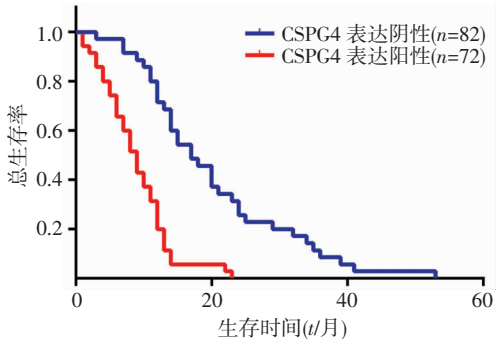


图 2 154 例胰腺癌中 CSPG4 表达与患者术后生存的 Kaplan-Meier 生存曲线

表2 154例胰腺癌患者预后影响因素的单因素及多因素分析

变量	*n*	单因素分析		多因素分析	
		死亡危险比(95% *CI*)	*P*	死亡危险比(95% *CI*)	*P*
年龄					
≤65岁	112	1.0	>0.05	—	—
>65岁	42	0.832(0.569~1.218)		—	
性别					
男	120	1.0	>0.05	—	—
女	34	1.018(0.685~1.513)		—	
肿瘤直径					
≤2 cm	60	1.0	>0.05	—	—
>2 cm	94	1.191(0.845~1.678)		—	
肿瘤部位					
胰头	136	1.0	<0.05	1.0	>0.05
胰体尾	18	1.864(1.089~3.190)		1.622(0.919~2.862)	
分化程度					
高分化	18	1.0		1.0	
中分化	96	2.157(1.205~3.862)	<0.05	2.158(1.161~4.012)	<0.05
低分化	40	2.372(1.243~4.526)	<0.01	2.410(1.236~4.698)	<0.05
淋巴结转移					
无	106	1.0	<0.01	1.0	<0.01
有	48	2.392(1.651~3.464)		2.258(1.350~3.778)	
血管侵犯					
无	116	1.0	<0.01	1.0	>0.05
有	38	2.129(1.449~3.126)		1.134(0.675~1.906)	
T分期					
T1~T2期	86	1.0	<0.01	1.0	>0.05
T3~T4期	68	1.807(1.288~2.534)		1.800(0.857~3.781)	
TNM分期					
Ⅰ期	70	1.0	<0.01	1.0	>0.05
Ⅱ~Ⅲ期	84	1.987(1.406~2.807)		0.454(0.200~1.033)	
CSPG4表达					
阴性	82	1.0	<0.01	1.0	<0.01
阳性	72	4.949(3.331~7.352)		4.477(2.920~6.864)	

3 讨论

CSPG4由15号染色体上的cspg4基因编码[9],是一种表达于人体内多种细胞表面的Ⅰ型跨膜糖蛋白[7]。CSPG4由1个核心蛋白和硫酸软骨素侧链构成[10]。20世纪70年代末,CSPG4最早被发现表达于人类黑色素瘤细胞表面[11],同期研究者发现鼠类中存在其同源蛋白—神经/胶质抗原2(NG2)[12],且两者均在系统发育中高度保守[6-7]。

CSPG4在人体正常组织中表达量低且分布局限[6],主要存在于血管周细胞及多能干细胞或祖细胞(间充质干细胞、造血干细胞等)表面,可参与血管生成,并调节干细胞或祖细胞的分化、干性维持及自我更新[7-8]。CSPG4阳性的多能干细胞或祖细胞在终末分化阶段停止表达该蛋白,而在多种肿瘤中却出现了CSPG4的异常高表达,包括黑色素瘤、乳腺癌、神经胶质瘤及儿童急性白血病等[7],且CSPG4主要分布于肿瘤微环境中的血管周细胞、肿瘤干细胞或祖细胞以及某些其他的肿瘤细胞表面[6]。CSPG4可促进黑色素瘤细胞的增殖、黏附、运动、生存、化疗抵抗及上皮-间质转化(EMT)等恶性生物学行为,进而促进肿瘤的恶性进展[7,13]。

本研究显示,胰腺导管腺癌中CSPG4阳性表达率显著高于正常胰腺组织($P<0.01$);CSPG4的表达与有无淋巴结转移或血管侵犯、肿瘤T分期、TNM分期显著相关($P<0.01$)。提示CSPG4可能参与胰腺癌的发生、发展,与胰腺癌的恶性进展程度密切相关。胰腺癌中CSPG4阴性患者术后总生存率显著高于阳性者($P<0.01$);且该蛋白的表达是影响胰腺癌患者预后的独立危险因素。提示胰腺癌中CSPG4的表达对患者术后生存具有重要的评估作用,并可能成为判断胰腺癌患者预后的独立预测指标。Hsu等[14]在乳腺

癌中的研究表明,CSPG4 高表达患者术后总生存时间及无瘤生存时间显著低于阴性或低表达者,且 CSPG4 的高表达是乳腺癌患者预后的独立影响因素,这与我们的研究结果相似。

CSPG4 促进肿瘤恶性进展的机制尚不完全清楚,有研究证实它可与 PDGFAA、(bFGF)、MMP、Ⅱ、Ⅴ、Ⅵ型胶原蛋白等结合,调节整联蛋白和受体酪氨酸激酶(RTK)等生长因子受体的活性,进而促进 FAK、PI3K/AKT 和 ERK1,2 等与肿瘤细胞黏附、生长、运动及生存相关的信号通路的激活[6-7]。因此,CSPG4 可能通过上述机制促进胰腺癌细胞的增殖、黏附、侵袭、转移等恶性生物学行为,在胰腺癌的发生及恶性进展中发挥重要作用,从而影响患者的生存及预后。至于该蛋白与肿瘤恶性进展相关的其他机制还有待于进一步研究。

胰腺癌对放化疗均不敏感,手术切除是目前唯一有效的治疗方法;但大多数患者确诊时已属中晚期而丧失根治性手术切除的时机,手术切除率低(不足20%),因此迫切需要探寻一种新的胰腺癌治疗方法[15-16]。研究证实,CSPG4 已作为治疗靶点而被应用于黑色素瘤[17]、乳腺癌[18]及恶性间皮瘤[19]的靶向治疗,并取得一定的疗效。针对该蛋白的特异性单克隆抗体可阻滞肿瘤细胞中与生长、黏附、运动及生存相关的信号通路[6],抑制肿瘤的进展、复发、转移[7]及新生血管形成[20],从而延长患者的生存时间[21]。另外,针对该靶点的靶向治疗尚未发现明显的毒副作用[7]。因此,CSPG4 在胰腺癌的治疗方面具有广阔的应用前景,有望成为胰腺癌靶向治疗的新靶点。

参考文献:

[1] Abel E V, Simeone D M. Biology and clinical applications of pancreatic cancer stem cells[J]. Gastroenterology, 2013, 114(6): 1241-1248.

[2] Bochatay L, Girardin M, Bichard P, *et al*. Pancreatic cancer in 2014: screening and epidemiology[J]. Rev Med Suisse, 2014, 10(440): 1582-1585.

[3] Siegel R, Ma J, Zou Z, *et al*. Cancer statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1): 9-29.

[4] Hidalgo M. Pancreatic cancer[J]. N Engl J Med, 2010, 362(17): 1605-1617.

[5] Yeo T P, Lowenfels A B. Demographics and epidemiology of pancreatic cancer[J]. Cancer J, 2012, 18(6): 477-484.

[6] Wang X, Wang Y, Yu L, *et al*. CSPG4 in cancer: multiple roles[J]. Curr Mol Med, 2010, 10(4): 419-429.

[7] Price M A, Colvin-Wanshura L E, Yang J, *et al*. CSPG4, a potential therapeutic target, facilitates malignant progression of melanoma[J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2011, 24(6): 1148-1157.

[8] Huang F J, You W K, Bonaldo P, *et al*. Pericyte deficiencies lead to aberrant tumor vascularizaton in the brain of the NG2 null mouse[J]. Dev Biol, 2010, 344(2): 1035-1046.

[9] Nishiyama A, Dahlin K J, Prince J T, *et al*. The primary structure of NG2, a novel membrane-spanning proteoglycan[J]. J Cell Biol, 1991, 114(2): 359-371.

[10] 胡钰彬, 江松敏. 硫酸软骨素蛋白聚糖4在肿瘤免疫治疗中的作用[J]. 医学分子生物学杂志, 2013, 10(4): 226-232.

[11] Wilson B S, Imai K, Natali P G, *et al*. Distribution and molecular characterization of a cell-surface and a cytoplasmic antigen detectable in human melanoma cells with monoclonal antibodies[J]. Int J Cancer, 1981, 28(3): 293-300.

[12] Stallcup W B. The NG2 proteoglycan: past insights and future prospects[J]. J Neurocytol, 2002, 31(6/7): 423-435.

[13] Yang J, Price M A, Li G Y, *et al*. Melanoma proteoglycan modifies gene expression to stimulate tumor cell motility, growth, and epithelial-to-mesenchymal transition[J]. Cancer Res, 2009, 69(19): 7538-7547.

[14] Hsu N C, Nien P Y, Yokoyama K K, *et al*. High chondroitin sulfate proteoglycan 4 expression correlates with poor outcome in patients with breast cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 441(2): 514-518.

[15] Li C, Heidt D G, Dalerba P, *et al*. Identification of pancreatic cancer stem cells[J]. Cancer Res, 2007, 67(3): 1030-1037.

[16] 中华医学会外科学分会胰腺外科学组, 胰腺癌诊治指南(2014版)[J]. 中华消化外科杂志, 2014, 12(11)831-837.

[17] Yu L, Favoino E, Wang Y, *et al*. The CSPG4 specific monoclonal antibody enhances and prolongs the effects of the BRAF inhibitor in melanoma cells[J]. Immunol Res, 2011, 50(2/3): 294-302.

[18] Wang X, Osada T, Wang Y, *et al*. CSPG4 protein as a new target for the antibody-based immunotherapy of triple-negative breast cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 2010, 102(19): 1496-1512.

[19] Rivera Z, Ferrone S, Wang X, *et al*. CSPG4 as a target of antibody-based immunotherapy for malignant mesothelioma[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(19): 5352-5363.

[20] Ozerdem U, Stallcup W B. Pathological angiogenesis is reduced by targeting pericytes *via* the NG2 proteoglycan[J]. Angiogenesis, 2004, 7(3): 269-276.

[21] Poli A, Wang J, Domingues O, *et al*. Targeting glioblastoma with NK cells and mAb against NG2/CSPG4 prolongs animal survival[J]. Oncotarget, 2013, 4(9): 1527-1546.

(**收稿**:2014-11-07;**修回**:2014-12-12)

(编辑 王 红)