

文章编号 1006-8147(2018)01-0043-04

论 著

胰腺导管腺癌中腺苷酸激酶4的表达及临床意义

李辰运, 孙彤, 卓娜, 田晶

(天津医科大学第二医院超声科, 天津 300211)

摘要 目的:探讨腺苷酸激酶4(AK4)在胰腺导管腺癌组织中的表达及其临床意义。方法:回顾性分析76例接受胰腺癌根治手术治疗的胰腺癌患者的临床与随访资料。采用免疫组织化学法检测76例胰腺癌组织和对应的癌旁组织中AK4的表达,分析其与临床病理学特征及预后的关系。结果:AK4的阳性表达主要在细胞浆内,呈棕黄色颗粒。AK4在胰腺癌和癌旁组织中的阳性表达率分别为78.9%(60/76)和38.2%(29/76),前者表达率显著高于后者,差异有统计学意义($P<0.05$)。AK4的异常表达与肿瘤分期、淋巴结转移、神经受侵、脉管内瘤栓相关($P<0.05$)。生存分析提示在胰腺导管腺癌中AK4高表达的患者生存时间明显短于低表达的患者($P<0.05$)。结论:胰腺导管腺癌组织中存在AK4表达水平的上调,AK4的表达可能提示胰腺癌患者分期较晚和预后不良。

关键词 胰腺癌;免疫组织化学;腺苷酸激酶4;生存预后

中图分类号 R735.9

文献标志码 A

Expression of AK4 in pancreatic ductal carcinoma and its clinical significance

LI Chen-yun, SUN Tong, ZHUO Na, TIAN Jing

(Department of Ultrasound, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

Abstract **Objective:** To explore the expression of AK4 in pancreatic ductal carcinoma and its clinical significance. **Methods:** The clinical and follow-up data of 76 patients with pancreatic ductal carcinoma who underwent radical surgery were retrospectively analyzed. Immunohistochemistry was used to detect the expression of AK4 in 76 cases of pancreatic cancer and its adjacent tissues, and the relationship of AK4 with clinicopathological features and prognosis was analyzed. **Results:** The positive expression of AK4 mainly was in the cytoplasm, presenting brownish yellow granules. AK4 in pancreatic ductal adenocarcinoma tissues or paracancerous tissue were 78.9% (60/76) and 38.2% (29/76), and the positive rate in pancreatic ductal adenocarcinoma tissues was significantly higher than that in paracancerous tissue. The difference was statistically significant ($P<0.05$). The abnormal expression of AK4 was correlated with the tumor stage, lymph node metastasis, neural invasion, and the vascular tumor embolus ($P<0.05$). Survival analysis suggested that the survival time of patients with AK4 high expression in pancreatic duct adenocarcinoma was significantly shorter than those with low expression ($P<0.05$). **Conclusion:** Up-regulation of AK4 expression in pancreatic ductal carcinoma tissues, is associated with the tumor stage, lymph node metastasis, nerve invasion, and the vascular tumor thrombus, which might indicate the late stage and poor prognosis for the patients with pancreatic ductal carcinoma.

Key words pancreatic ductal carcinoma; immunohistochemistry; adenylate kinase4; prognosis

胰腺癌是消化道恶性肿瘤中恶性程度最高、预后最差的恶性肿瘤之一,已经取代肝癌成为新的癌中之王。胰腺癌起病隐匿,发展较快,易发生转移,手术切除率低,预后极差,5年生存率不足5%^[1-4]。而突破诊治胰腺癌的关键在于:立足基础研究,深入理解胰腺癌发生发展的机制,从而寻找有效的诊治手段。胰腺癌的发生、发展是一个极其复杂的过程,是多种因素共同作用的结果。85%以上的胰腺癌来源于胰腺导管上皮细胞,因此研究导管腺癌对胰腺癌的诊疗意义较大。胰腺癌的发病率近

年来呈上升趋势,2017年美国将会有53 670例新发病患,死亡人数将达到43 090人^[1]。作为唯一可治愈胰腺癌的方法,根治性手术切除的机会在胰腺癌病患中的比例很低^[2]。嗜神经浸润是胰腺癌生物学特性之一,与其不良预后有关^[3]。本研究通过回顾性分析接受胰腺癌根治手术治疗的76例胰腺导管腺癌患者的临床病理特点与随访资料,以免疫组织化学的方法检测胰腺导管腺癌组织中腺苷酸激酶4(adenylate kinase 4, AK4)蛋白的表达,探讨AK4蛋白在胰腺导管腺癌组织中的表达及临床意义,进而为胰腺癌患者的靶向治疗提供理论依据。

作者简介 李辰运(1981-),男,主治医师,硕士,研究方向:胰腺超声;通信作者:田晶, E-mail: 27973780@qq.com。

1 资料和方法

1.1 临床资料 收集2012年1月–2016年7月期间天津医科大学第二医院76例胰腺导管腺癌患者手术切除的组织标本,分析其临床病理资料。患者均行根治性手术切除治疗,全部病例均经病理证实,术前未行化疗或放疗,具有完整的病例资料。收集患者的一般临床资料,包括性别、年龄、肿瘤位置、肿瘤大小、手术方式、CA19-9、黄疸等。76例病例中男性45例,女性31例;年龄43~62岁,中位年龄(53.6±5.75)岁;肿瘤:≤2 cm者13例,>2 cm者63例;组织学分化程度:中高分化腺癌34例,中低分化腺癌42例;肿瘤分期:I期3例,II期55例,III期18例,本组入选无IV期病例;淋巴结转移:阴性者57例,阳性者19例;神经受侵34例;脉管内瘤栓者23例。

比较分析不同组患者的临床病理学特征,包括:分化程度、淋巴结转移、血管受侵、脉管内瘤栓、神经受侵、肿瘤分期。肿瘤分期根据2010年第7版UICC和AJCC胰腺癌分期进行TNM分期。随访:以电话和查阅病历的方式随访。随访起始时间为手术时间,随访截止时间为2017年6月或患者死亡时间。统计学比较两组患者一般临床资料和临床病理学资料及分析预后影响因素。

1.2 试剂 AK4为兔抗人单克隆抗体,购自武汉爱博泰克生物科技有限公司(Catalog No:A2050),稀释浓度为1:200,免疫组化二步法检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司(pv6002,通用型二抗)。

1.3 方法 胰腺导管腺癌组织进行福尔马林固定,石蜡包埋,标本进行5 μm切片,行AK4免疫组化染色。免疫组织化学采用SP二步法,DAB显色。染色切片于显微镜高倍镜下(400倍)随机计数5个视野,计数100个肿瘤细胞,根据肿瘤细胞阳性染色百分率和染色强度综合评价免疫组化结果。

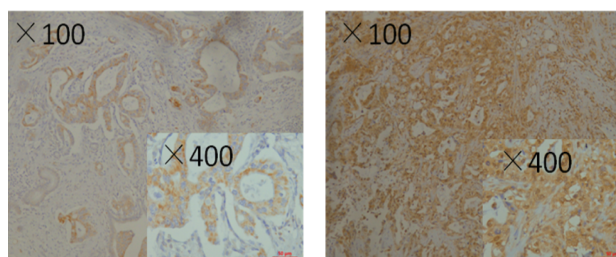
1.4 免疫组化染色结果的判定 AK4蛋白表达主要定位于肿瘤细胞的胞浆,也有不同程度的胞核着色,呈棕黄色颗粒状。结果判定:阳性细胞方面:阳性肿瘤细胞数<10%记0分;肿瘤细胞阳性百分率为10%~30%记1分;肿瘤细胞阳性百分率为30%~70%记2分;肿瘤细胞阳性百分率>70%记3分。同时对阳性着色的肿瘤细胞的膜、浆染色强度进行评价:阴性记0分,弱阳性记1分,中度阳性记2分,强阳性记3分;计分范围为0~9分。实际结果根据阳性细胞百分率分值和染色强度分值之积的分值判断高表达(4~9分)或低表达(0~3分)。每个病例

观察5个高倍视野,在不知病理分级与临床资料的情况下由两位经验丰富的病理科医师读片,采用双盲法判断结果。

1.5 统计学方法 采用SPSS18.0软件。两组计数资料采用 χ^2 检验。生存率的计算采用Kaplan-meier法,生存曲线的比较采用Log-rank检验。检验水准以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

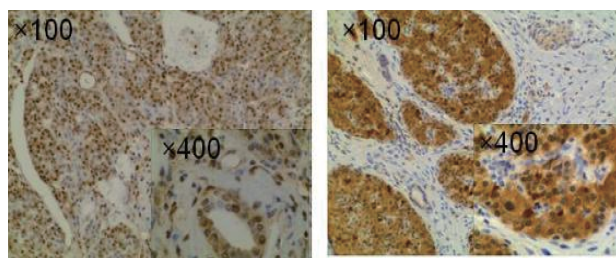
2.1 AK4在胰腺导管腺癌组织中的表达 76例原发性胰腺导管腺癌组织中有60例(78.9%)AK4蛋白高表达,76例癌旁组织(距离肿瘤组织3~5 mm处的胰腺正常组织)中仅29例(38.2%)AK4呈高表达,免疫组织化学的染色结果分别见图1和图2。胰腺导管腺癌与癌旁组织阳性率比较($\chi^2=26.05172$, $P<0.001$),其表达差异有统计学意义。



左侧低表达,右侧高表达

图1 AK4在胰腺导管腺癌组织中的表达

Fig 1 Expression of AK4 in pancreatic ductal carcinoma tissues



左侧低表达,右侧高表达

图2 AK4在胰腺导管腺癌旁组织中的表达

Fig 2 Expression of AK4 in pancreatic tissues adjacent to ductal carcinoma

2.2 胰腺导管腺癌组织AK4的表达与临床病理特征和预后的相关性 如表1所示,AK4的异常表达与胰腺导管腺癌分期、淋巴结转移、神经受侵、脉管内瘤栓相关($P<0.05$),与患者的性别、年龄、分化程度、肿瘤大小无关。图3示患者预后生存分析结果,AK4均与患者预后明显相关($P<0.05$):AK4高表达的胰腺导管腺癌患者术后中位生存期明显短于AK4低表达的胰腺导管腺癌患者 [(12.20±0.870)个月 vs (18.30±4.168)个月]。

表 1 76 例胰腺导管腺癌 AK4 表达与临床病理特征的关系

Tab 1 The relationships between AK4 expression and clinicopathologic features in pancreatic ductal carcinoma

临床病理特征	例数	AK4 高表达	χ^2	<i>P</i>
性别			0.074	0.786
男	45	36		
女	31	24		
年龄			0.091	0.763
>60 岁	42	35		
≤60 岁	34	25		
分化程度			0.429	0.512
中高分化	34	28		
中低分化	42	32		
肿瘤大小			0.039	0.844
≤2 cm	13	10		
>2 cm	63	50		
肿瘤分期			4.739	0.029
I / II	58	42		
III	18	18		
IV	0			
淋巴结转移			5.172	0.023
有	19	19		
无	57	41		
神经受侵			5.536	0.019
有	34	31		
无	42	29		
脉管内瘤栓			7.887	0.005
有	33	29		
无	43	31		

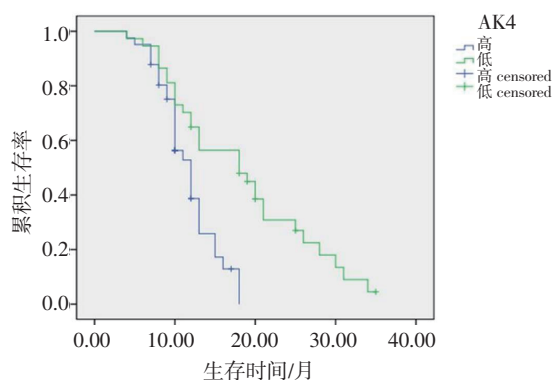


图 3 AK4 与胰腺导管腺癌患者术后预后相关性分析

Fig 3 Analysis of correlation between AK4 expression and postoperative prognosis of patients with pancreatic ductal carcinoma

3 讨论

腺苷酸激酶是多种生物活细胞中高能磷酸化转移反应中的一种关键调节酶,在腺嘌呤核苷酸代谢和体内稳态中发挥重要作用,通过催化互变现

象反应:ATP + AMP \rightleftharpoons 2 ADP。目前,研究报道的 AK 共有 9 种,为 AK1-9,进一步发现 AK5、AK7、AK8 和 AK9 定位在细胞质中,而 AK6 和 AK9 定位表达在细胞核中,AK2 定位在线粒体中膜间空间,而线粒体基质中则存在着 AK3 和 AK4。AK1 的缺乏会导致血液病^[5],AK2 对 D 黑色素的生长至关重要,而遗传的 AK2 缺乏会导致网状的发育障碍和神经性耳聋^[6-7]。到目前为止,多项研究已报道了 AK 的结构和功能,并报告说它们在细胞能量代谢中起着重要作用^[8-12]。而其中的 AK4 在线粒体基质中被定位并被认为是参与渗透压、耐药、恶性肿瘤转化和 ATP 调节的一种关键酶。早期有文献报道了铁的整合剂去铁胺用于治疗肝细胞癌,发现去铁胺能提高 AK4 的表达水平,但具体机制不明确^[13]。既往文献报道已经克隆了编码人类和小鼠 AK4 基因 cDNAs^[12,14],并且 AK4 的表达模式已广泛应用于小鼠组织中^[9],但是,即使在线粒体基质中检测到了 AK4,AK4 却没有显示任何酶活性。随后有文献报道,未激活的 AK4 与线粒体内膜蛋白 ANT 相互作用^[15]。与此相反,另一项研究证实 AK4 的激活是需要应用 AMP:GTP 和 AMP:ATP 作为其底物的^[16]。因此,AK4 是否显示了经典的酶活性目前还是存在争议的。另一项功能研究表明,AK4 可能参与氧化应激反应,显示它是由 4 种不同类型的药物,包括四氯化碳等肝毒性的药物所控制的一种蛋白质^[17-18]。有趣的是,一项单中心研究发现,AK4 能促进肺癌的恶性进展^[19]。此外,据报道,在肾胚细胞 HEK293 和肝细胞中 AK4 是一个有价值的标记物^[20]。最近,Lanning 等^[21]发现 AK4 是细胞内 ATP 水平的关键调节器,通过筛选 RNA 干扰(RNAi)库,目标是超过 1 000 个核 dna 编码的基因,这些基因的蛋白质产物局限于线粒体。

然而,AK4 功能的分子基础仍有待确定。2016 年的一篇较为权威的文献利用 AK4 小干扰 RNA (siRNA),在 HeLa 细胞中结合核糖核酸(shRNA)质粒,进而降低 AK4 表达水平,发现 AK4 降表达后能提高 ATP 产量、抑制肿瘤细胞增殖、提高抗癌药物的敏感性等,并进一步在体内实验中证实了这些结论;同时,在代谢组学分析方面,证实 AK4 降表达后增加了诸如富马酸酯和苹果酸盐等在内的三羧酸循环中间产物,而 AK4 过度表达则能降低它们的表达水平;电子显微镜检测到 AK4 降表达的细胞中线粒体数目的增加;在基因组学研究中,利用微阵列分析检测 TCA 循环中两种关键酶的基因表达,发现琥珀酸脱氢酶 A (SDHA) 和 oxoglutarate 脱氢酶 L (OGDHL)的水平增加^[22]。这些发现为针对 AK4 进行

有效的抗癌疗法奠定了分子生物学的理论基础。

目前,经过文献检索,关于 AK4 的相关报道国内仅有两篇文献,均证实 AK4 是一种细胞压力反应蛋白,均能对细胞进行低氧应激保护,还都发现 AK4 表达升高能促进细胞生长及发育^[23-24]。在机制上进行分析研究发现,利用 AK4-FLAG 的相互结合和相互作用,通过对这种复合物的免疫共沉淀及质谱分析,明确了线粒体内膜蛋白 ANT 与 AK4 的互相影响,而后再进一步通过反向的免疫共沉淀实验得出了可靠的结论,即证实了 AK4 与 ANT 的相互作用和机制^[23-24]。

本项研究表明 AK4 在胰腺导管腺癌中的异常表达与胰腺癌分期、淋巴结转移、神经受侵和脉管内瘤栓相关,并且其表达与患者预后明显相关。这可能揭示在胰腺导管腺癌组织中 AK4 通过相应机制参与胰腺导管腺癌的发生发展,产生了一系列的生物学效应,可能与淋巴结转移、神经受侵、脉管内瘤栓等密切相关,促进胰腺导管腺癌的侵袭转移,进而导致患者预后不良。

胰腺导管腺癌早期症状不典型、不特异^[3],其恶性程度很高,与其具有嗜神经生长的生物学特性有关。结合我们的结果可以表明,在胰腺导管腺癌组织中 AK4 基因的激活,可能通过一定的调控机制而促进胰腺腺癌的神经过润。由此可见,胰腺导管腺癌中 AK4 是一个重要的调节因素,随着对其作用机制的深入研究,可能会成为胰腺导管腺癌治疗的一个新靶点。

参考文献:

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2017[J]. *CA Cancer J Clin*, 2017,67(1):7
- [2] Sun Q M, Zhou H, Binmadi N O, et al. Hypoxia-inducible Factor-1-mediated Regulation of Semaphorin 4D Affects Tumor Growth and Vascularity[J]. *J Biol Chem*, 2009,284(46):32066
- [3] Kang F W, Yin G, Lin Q, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α overexpression indicates poor clinical outcomes in tongue squamous cell carcinoma[J]. *Exp Ther Med*, 2013,5(1):112
- [4] Xu L F, Ni J Y, Sun H L, et al. Effects of hypoxia-inducible factor-1 α silencing on the proliferation of CBRH-7919 hepatoma cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2013,19(11):1749
- [5] Qualtieri A, Pedace V, Bisconte M G, et al. Severe erythrocyte adenylate kinase deficiency due to homozygous a ->G substitution at codon 164 of human AK1 gene associated with chronic haemolytic anaemia[J]. *Br J Haematol*, 1997,99(4):770
- [6] Lagresle-Peyrou C, Six E M, Picard C, et al. Human adenylate kinase 2 deficiency causes a profound hematopoietic defect associated with sensorineural deafness[J]. *Nat Genet*, 2009,41(1):106
- [7] Pannicke U, Hoenig M, Hess I, et al. Reticular dysgenesis (aleukocytosis) is caused by mutations in the gene encoding mitochondrial adenylate kinase 2[J]. *Nat Genet*, 2009, 41(1):101
- [8] Fujisawa K, Murakami R, Horiguchi T, et al. Adenylate kinase isozyme 2 is essential for growth and development of *Drosophila melanogaster*[J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2009, 153(1):29
- [9] Miyoshi K, Akazawa Y, Horiguchi T, et al. Localization of adenylate kinase 4 in mouse tissues[J]. *Acta Histochem Cytochem*, 2009,42(2):55
- [10] Noma T. Dynamics of nucleotide metabolism as a supporter of life phenomena[J]. *J Med Invest*, 2005,52(3/4):127
- [11] Tanimura A, Horiguchi T, Miyoshi K, et al. Differential expression of adenine nucleotide converting enzymes in mitochondrial intermembrane space: a potential role of adenylate kinase isozyme 2 in neurophil differentiation[J]. *PLoS One*, 2014,9(2):e89916
- [12] Yoneda T, Sato M, Maeda M, et al. Identification of a novel adenylate kinase system in the brain: cloning of the fourth adenylate kinase[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1998, 62(2):187
- [13] Yamasaki T, Terai S, Sakaida I. Deferoxamine for advanced hepatocellular carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2011,365(6):576
- [14] Xu G P, Stevens J, White R. characterization of human adenylate kinase 3(AK3)cDNA and mapping of the AK3 pseudogene to an intron of the NF1 gene[J]. *Genomics*, 1992,13(3):537
- [15] Liu R J, Stroem A L, Zhai J J, et al. Enzymatically inactive adenylate kinase 4 interacts with mitochondrial ADP/ATP translocase[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009,41(6):1371
- [16] Panayiotou C, Solaroli N, Johansson M, et al. Evidence of an intact Nterminal translocation sequence of human mitochondrial adenylate kinase 4[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010,42(1):62
- [17] Yamamoto T, Kikkawa R, Yamada H, et al. Investigation of proteomic biomarkers in in vivo hepatotoxicity study of rat liver: toxicity differentiation in hepatotoxicants[J]. *J Toxicol Sci*, 2006,31(1):49
- [18] Fustin J M, Doi M, Yamada H, et al. Rhythmic nucleotide synthesis in the liver: temporal segregation of metabolites[J]. *Cell Rep*, 2012, 1(4):341
- [19] Jan Y H, Tsai H Y, Yang C J, et al. Adenylate kinase-4 is a marker of poor clinical outcomes that promotes metastasis of lung cancer by downregulating the transcription factor ATF3[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(19):5119
- [20] Kong F Z, Binas B, Moon J H, et al. Differential expression of adenylate kinase 4 in the context of disparate stress response strategies of HEK293 and HepG2 cells[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2013, 533(1/2):11
- [21] Lanning N J, Looyenga B D, Kauffman A L, et al. A mitochondrial RNAi screen defines cellular bioenergetic determinants and identifies an adenylate kinase as a key regulator of ATP levels[J]. *Cell Rep*, 2014,7(3):907
- [22] Fujisawa K, Terai S, Takami T, et al. Modulation of anti-cancer drug sensitivity through the regulation of mitochondrial activity by adenylate kinase 4[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016,35:48
- [23] 刘如娟. 人源腺苷酸激酶 4 结构和功能的研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2008
- [24] 孔凡志, 杨焕民. 腺苷酸激酶 4 对细胞低氧应激保护与增殖的调控研究[J]. *畜牧与兽医*, 2012, 62(s1):292

(2017-07-10 收稿)