

【文章编号】1007-9424(2006)05-0521-03

胰腺癌·临床研究

## TRAIL 受体在胰腺癌中的表达

公伟<sup>1</sup> 刘军<sup>1</sup> 梁飞<sup>2</sup> 许世峰<sup>1</sup> 杨凤辉<sup>1</sup> 周旭<sup>1</sup> 徐延田<sup>1</sup> 于光圣<sup>1</sup> 李光兵<sup>1</sup>

**【摘要】** 目的 研究肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)受体在胰腺癌中的表达及意义。方法 应用半定量 RT-PCR 法检测 TRAIL 受体(死亡受体 DR4、DR5 和诱骗受体 DcR1、DcR2) mRNA 在胰腺癌组织及正常胰腺组织中的表达。结果 死亡受体 DR4 和 DR5 在所有胰腺癌组织和正常胰腺组织中均有表达,且在胰腺癌组织中的表达明显强于在正常胰腺组织中的表达( $P < 0.01$ )。诱骗受体 DcR1 和 DcR2 在所有正常胰腺组织中均有表达,而在胰腺癌组织中仅有 18 例表达 DcR1,有 20 例表达 DcR2;诱骗受体 DcR1 和 DcR2 的表达水平在胰腺癌和正常胰腺组织中差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。胰腺癌组织中 DR5 的表达与肿瘤的分化程度和临床分期有关,分化程度越低,DR5 的表达量越低,Ⅲ、Ⅳ期肿瘤 DR5 的表达显著低于 I、II 期( $P < 0.05$ )。DR4、DcR1 及 DcR2 在胰腺癌组织中的表达与肿瘤的分化程度和临床分期无关( $P > 0.05$ )。结论 ①胰腺癌组织中普遍存在 TRAIL 受体的表达,并存在受体类型的表达差异,TRAIL 基因受体在胰腺癌凋亡的调控机理中可能发挥重要作用。②胰腺癌组织中 DR5 的表达与肿瘤的分化程度及恶性程度相关;死亡受体 DR4 及诱骗受体 DcR1 和 DcR2 不能作为判断胰腺癌分化程度及恶性程度的指标。

**【关键词】** 胰腺肿瘤 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体受体 逆转录聚合酶链反应

**【中图分类号】** R735.9 **【文献标识码】** A

**Expression of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptors in Pancreatic Cancer** GONG Wei\*, LIU Jun, LIANG Fei, XU Shi-feng, YANG Feng-hui, ZHOU Xu, XU Yan-tian, YU Guang-sheng, LI Guang-bing. \*Organ Transplantation Center, Shandong Provincial Hospital, Shandong University, Jinan 250021, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the expression and significance of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptors in pancreatic cancer. **Methods** Thirty-two samples of pancreatic cancer tissue were collected from year 2002 to 2004. All of them were verified by histopathology and there were 9 cases of well-differentiated, 12 of moderately differentiated, and 11 of poorly differentiated, in which 12 cases were in the stage of I or II and 20 in the stage of III or IV according to the TNM staging method. Eighteen normal pancreatic tissues were used as control group. The expressions of TRAIL receptors (death receptor 4, death receptor 5, decoy receptor 4 and decoy receptor 5) mRNA were assayed by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in the pancreatic cancer tissues and the normal pancreatic tissues. **Results** The expressions of death receptor 4 (DR4) and death receptor 5 (DR5) were detected in all the pancreatic cancer tissues and the normal pancreatic tissues and the levels of DR4 and DR5 were significantly higher than those of the normal pancreatic tissues ( $P < 0.01$ ). Decoy receptor 1 (DcR1) and decoy receptor 2 (DcR2) were also expressed in normal pancreatic tissues, whereas DcR1 and DcR2 were only expressed in 18 and 20 pancreatic cancer tissues, respectively. However, there were no significant difference of the expression of DcR1 and DcR2 between the pancreatic cancer tissues and the normal pancreatic tissues ( $P > 0.05$ ). The expression level of DR5 in pancreatic cancer tissue was correlated with tumor differentiation and clinical stage, and the levels in stage III and stage IV were significantly lower than those of stage I and stage II ( $P < 0.05$ ). The expressions of DR4, DcR1 and DcR2 were not correlated with tumor differentiation and clinical stage ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** ①The expression of TRAIL receptors in pancreatic cancer tissues is prevalent, but the types of receptors expressed in different tissues were also different. High expression of death receptors may play an important role in TRAIL receptors regulated pancreatic cancer apoptosis. ②The expression of DR5 is correlated with the differentiation degree of pancreatic cancer cell and clinical stage of tumor. The expressions of DR4, DcR1 and DcR2 should not be considered as related indexes of differentiation degree or clinical stage of

**【作者单位】** 1. 山东大学山东省立医院器官移植中心(济南 250021); 2. 山东大学山东省立医院普外科

**【作者简介】** 公伟(1975年-),男,山东省蒙阴县人,医学博士,主治医师,主要从事肝胆胰外科和肝脏移植的研究与临床工作。

pancreatic cancer.

**【Key words】** Pancreatic neoplasm Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor

Reverse transcription polymerase chain reaction

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)是肿瘤坏死因子家族成员,体内、外实验表明,TRAIL 可选择性地诱导某些肿瘤细胞凋亡,而对大多数正常细胞无明显的杀伤作用<sup>[1,2]</sup>。本研究采用半定量 RT-PCR 法检测 TRAIL 受体(死亡受体 DR4、DR5 和诱骗受体 DcR1、DcR2)在胰腺癌组织和正常胰腺组织中的表达情况,并探讨 TRAIL 与胰腺癌组织病理意义的关系。

## 1 资料和方法

### 1.1 临床资料

32 例胰腺癌组织为 2002~2004 年山东省立医院普外科手术标本,20 例正常胰腺组织来源于同期良性胰腺肿瘤切除距肿瘤边缘 2 cm 的正常组织,所有标本均在手术切除后迅速冻存于液氮中,然后置于-80℃低温保存。全部病例术前均未行放、化疗,术后均经病理检查证实。按组织学类型分级,

高、中、低分化胰腺癌分别为 9、12 及 11 例。根据 TNM 分期,Ⅰ、Ⅱ期 12 例,Ⅲ、Ⅳ期 20 例。

### 1.2 RT-PCR 方法检测胰腺癌组织及正常胰腺组织中 TRAIL 受体的表达

MMLV 逆转录酶及 Taq DNA 聚合酶为 Promega 公司产品。Alphaimager 2200 凝胶电泳扫描仪为美国 Alpha Innotech 公司产品。采用异硫氰酸胍法提取总 RNA,取 5 μl 总 RNA 逆转录合成 cDNA,5 μl cDNA 进行 PCR 反应。各引物序列见表 1。PCR 反应条件为:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,56℃(DR4、DcR1、β-actin)或 61℃(DR5、DcR2)退火 45 s,72℃延伸 45 s,循环 30 次,末次 72℃延长 7 min。反应结束后取 RT-PCR 产物 10 μl,加入 1.5% 琼脂糖凝胶中(含少量溴化乙啶),75 V 电泳 40 min;电泳结果用凝胶成像分析系统成像并测出 TRAIL 受体与 β-actin 的吸光度值,以 TRAIL 受体与 β-actin 吸光度值的比值表示 TRAIL 受体的相对表达强度。

表 1 TRAIL 受体及 β-actin 引物序列  
Table 1 The primer sequences of TRAIL receptor and β-actin

引物 Primer	上游引物 Sense	下游引物 Antisense	PCR 产物(bp) PCR product(bp)
DR4	5'-CTTCAAGTTTGTGTCGTCG-3'	5'-GAGCCGATGCAACAACAGAC-3'	525
DR5	5'-GCGGTCCTGCTGTTGGTCTC-3'	5'-GCTTCTGTCCACACGCTCAG-3'	567
DcR1	5'-ACATACTGGAGCCTGTAACC-3'	5'-GGTGATGAGAGGTAATGAG-3'	550
DcR2	5'-CTTTCCGGCGCGTTCATGTCCTTC-3'	5'-GTTTCTTCCAGGCTGCTTCCCTTGTAG-3'	464
β-actin	5'-CGCGGCTACAGCTTACCACG-3'	5'-GCGTACAGGCTTTGCGGATG-3'	298

### 1.3 统计学处理

数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 10.0 统计软件对相关数据进行独立样本的 *t* 检验和方差分析,检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 胰腺癌及正常胰腺组织中 TRAIL 受体的表达

死亡受体 DR4 和 DR5 在所有胰腺癌组织及正

常胰腺组织均有表达;诱骗受体 DcR1 和 DcR2 在所有正常胰腺组织中均有表达,而在胰腺癌组织仅有 18 例表达 DcR1,20 例表达 DcR2。半定量分析结果见表 2,DR4 及 DR5 在胰腺癌组织中有较高的表达,而在正常胰腺组织中呈中低水平表达。胰腺癌组织中的 DR4 及 DR5 表达量显著强于正常胰腺组织( $P<0.01$ );DcR1 及 DcR2 的表达水平在胰腺癌和正常胰腺组织中差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

表 2 胰腺癌与正常胰腺组织 TRAIL 受体的表达水平( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 2 The levels of TRAIL receptor expression in pancreatic cancer and normal pancreatic tissues ( $\bar{x} \pm s$ )

组织 Tissue	n	DR4	DR5	DcR1	DcR2
胰腺癌组织 Pancreatic cancer tissue	32	0.651±0.021*	0.881±0.009*	0.448±0.021	0.520±0.042
正常胰腺组织 Normal pancreatic tissue	20	0.364±0.012	0.431±0.021	0.518±0.039	0.468±0.051

与正常胰腺组织比较, \*  $P<0.01$

Compared with normal pancreatic tissue, \*  $P<0.01$

## 2.2 TRAIL 受体的表达与胰腺癌分化程度和临床分期的关系

结果见表 3。由表 3 可见,胰腺癌组织中 DR5 的表达与肿瘤的分化程度和临床分期有关,分化程

度越低,DR5 的表达量越低,Ⅲ、Ⅳ期肿瘤 DR5 的表达显著低于 I、II 期 ( $P < 0.05$ )。DR4、DcR1 及 DcR2 在胰腺癌中的表达水平与肿瘤分化程度及临床分期无关 ( $P > 0.05$ )。

表 3 TRAIL 受体表达水平与胰腺癌分化程度和临床分期的关系 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 The relationship between the expression of TRAIL receptor and differentiated degree of tumor and clinical stage of pancreatic cancer ( $\bar{x} \pm s$ )

临床病理特征 Clinicopathologic characteristics		n	DR4	DR5	DcR1	DcR2
肿瘤分化程度 Differentiated degree of tumor	高分化 Well-differentiated	9	0.652±0.021	0.867±0.004	0.532±0.011	0.561±0.019
	中分化 Moderately differentiated	12	0.654±0.019	0.856±0.005*	0.537±0.015	0.558±0.017
	低分化 Poorly differentiated	11	0.649±0.020	0.845±0.003*^	0.535±0.013	0.559±0.016
临床分期 Clinical stage	I、II	12	0.648±0.027	0.857±0.008	0.541±0.017	0.560±0.021
	Ⅲ、Ⅳ	20	0.653±0.031	0.848±0.002*	0.536±0.023	0.557±0.015

与高分化腺癌比较, \* $P < 0.05$ ; 与中分化腺癌比较,  $\Delta P < 0.05$ ; 与 I、II 期比较, # $P < 0.05$

Compared with well-differentiated, \* $P < 0.05$ ; Compared with moderately differentiated,  $\Delta P < 0.05$ ; Compared with stage I, II, # $P < 0.05$

## 3 讨论

TRAIL 又称 Apo-2L,是由 Wiley 等<sup>[1]</sup>于 1995 年发现并克隆成功的,它是继 TNF 和 FasL 之后发现的第 3 个 TNF 超家族中的凋亡分子。TRAIL 表达于人体多种正常组织,可以诱导转化细胞、肿瘤细胞和病毒感染细胞发生凋亡,而对正常细胞无明显的杀伤作用。TRAIL 通过与靶细胞膜相应的受体结合而发挥生理作用,目前发现 TRAIL 有两种特异性受体<sup>[3,4]</sup>:死亡受体 DR4、DR5 和诱骗受体 DcR1、DcR2。DR4 和 DR5 具有与 TNF 受体超家族其它成员类似的胞浆死亡区,与 TRAIL 特异性结合后可通过死亡结构域激发和传导凋亡信号,激活 caspase 蛋白酶解级联反应,导致细胞死亡。DcR1 和 DcR2 的胞外区均有 2 个与 DR4、DR5 高度同源的富含半胱氨酸的重复序列,但是 DcR1 无胞内区,DcR2 的胞内死亡区不完整,呈无功能的截断状态。因此,DcR1 和 DcR2 与 TRAIL 结合后都不能传导凋亡信号,其可溶性形式能与 DR4 和 DR5 竞争,同 TRAIL 结合,抑制配体介导的细胞凋亡。TRAIL 受体的发现揭示了一种新的细胞凋亡调控机理,即通过假受体竞争性抑制配体,从而诱导细胞凋亡。

本研究结果表明,死亡受体 DR4 和 DR5 在所有胰腺癌组织和正常胰腺组织均有表达;诱骗受体 DcR1 及 DcR2 在所有正常胰腺组织中均有表达,而在胰腺癌组织仅有 18 例表达 DcR1,20 例表达 DcR2。目前对 TRAIL 及其受体的表达,各家结果不一,但有一共同点,即对 TRAIL 敏感的肿瘤细

胞,也可能有诱骗受体的表达,而耐受 TRAIL 的细胞株,也有可能存在死亡受体的表达,表明了 TRAIL 受体系统作用的复杂性。

Ozawa 等<sup>[5]</sup>研究发现,胰腺癌组织中 DR4 和 DR5 的 mRNA 水平明显高于正常胰腺组织的表达,Ibrahim 等<sup>[6]</sup>也发现 5 种胰腺癌细胞株高水平表达诱导凋亡的 DR4 和 DR5。我们通过半定量分析表明,DR4 和 DR5 在胰腺癌组织中有较高的表达,而在正常胰腺组织中呈中低水平表达。胰腺癌组织中的 DR4 和 DR5 的表达量显著强于正常胰腺组织 ( $P < 0.01$ ),而 DcR1 及 DcR2 的表达水平在胰腺癌和正常胰腺组织中差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。提示死亡受体在胰腺癌的发生、发展中起重要作用;同时说明胰腺癌在受体水平上对 TRAIL 敏感。本研究证实,DR5 的表达与肿瘤的分化程度有关,但与 DR4 无关,因为 DR5 表达在不同分化程度的胰腺癌中存在明显差异,而 DR4 表达量相近。细胞分化高低是决定肿瘤恶性程度的直接因素,可间接解释 DR5 表达与胰腺癌临床病理分期的相关性。虽然 DR5 的表达量与胰腺癌的分化程度相关,但不能据此说明 DR5 可直接诱导自身胰腺癌细胞凋亡。另外,本研究表明,DR5 的表达水平与胰腺癌的临床分期有关,这也说明 DR5 的表达可能与肿瘤组织的浸润、转移有关。随着 TRAIL 基因所诱导的肿瘤细胞凋亡机理的发现,可能为胰腺癌提供一种新的治疗途径。

## 参 考 文 献

(下转第 530 页)

2 结果

术后病检示：胰头中分化腺癌侵及胰周脂肪，脂肪小肠断端、胃断端及胆管断端均未见癌，肠系膜上动脉见腺癌浸润。肝十二指肠韧带、胰周、腹腔干、肝总动脉旁及腹主动脉旁淋巴结未见癌转移。

患者术后 3 d 排气，第 4 d 开始进流质饮食并下床活动，术后彩超示腹主动脉及肠系膜上动脉吻合口血流通畅。患者术后 13 d 顺利出院，未发生并发症，口服肠溶阿斯林 25 mg 抗凝 1 个月。患者随访 14 个月，监测腹部 B 超和肿瘤标志物：AFP、CEA、CA19-9。11 个月时发现颈部出现多个淋巴结肿大，术后长期出现腹泻，对症治疗有所改善，仍存活。

3 讨论

Fortner<sup>[3]</sup> 提出胰头癌联合血管切除的区域性胰腺癌切除术 (regional pancreatectomy, RP) 后，提高了胰头癌的切除率。由于外科水平的提高，采用包括联合静脉切除的扩大胰头癌根治术并不增加手术的死亡率和并发症的发生率<sup>[4]</sup>。而过去一旦发现肿瘤与血管粘连或侵犯，则认为不能切除或不适合切除而放弃手术，使患者失去了根治性切除而获治愈的机会。

胰头癌最常侵犯的血管是肠系膜上静脉、门静脉，联合肠系膜上静脉和门静脉的胰头癌根治术已有较多报道<sup>[4,5]</sup>；累及肠系膜上动脉后并行切除重建肠系膜上动脉的 RP 尚不多，临床上认为胰头癌侵犯周围动脉应视为手术禁忌<sup>[2]</sup>。本例患者由于血管转位，肠系膜上静脉位于肠系膜上动脉的左侧，肠系膜上静脉未受到侵犯，故仅行肠系膜上动脉的切除，术后用低分子右旋糖苷和丹参抗凝，未发生血栓及肠缺血的情况，吻合口血流通畅。所以 RP 联合肠系膜上动脉或肠系膜上动脉、肠系膜上静脉、门静脉联合切除重建的 RP 在临床上是可行的。但要注意，术者要有熟练的血管外科技术，当联合血管切除重建时，应先重建动脉，以减少肠缺血时间。血管吻合时，血管阻断在 30 min 以内是安全的。陈明清等<sup>[6]</sup> 报道 2 例，采用与肝动脉进行吻合，此法需充分游离肝总动脉，且若因受累肠系膜上动脉较长而切除较长肠系膜上动脉后，则会导致吻合后张力较大，且两动脉口径较细和血液流速、流动方向等原因影响，并发血栓几率相对增高；

戈小虎等<sup>[7]</sup> 报道 4 例，采用 6 mm 的聚四氟乙烯人工血管代替肠系膜上动脉进行重建，人工血管发生血栓和远期不通畅度明显高于自身血管。本例肠系膜上动脉的切除重建采用与腹主动脉的端侧吻合，可切除足够长度受累的肠系膜上动脉，以保证根治术的彻底性；在血流流速、血流压力、流向等方面更符合生理状态；同时此种重建方式可利用血管吻合技巧，适度增大吻合口径，可明显降低吻合口痉挛及吻合口血栓的发生率。

胰头癌根治术是目前治疗胰头癌最有效的治疗手段，认真而完善的围手术期处理和良好的外科手术技术可以降低手术的死亡率和严重并发症的发生。根治性手术和姑息性切除的预后存在着显著的差异<sup>[8]</sup>。所以，RP 联合血管的切除重建对于提高手术切除率和根治性，提高患者的 5 年生存率是有意义的。

参 考 文 献

- 1 曾 勇, 王文涛, 严律南, 等. 提高胰腺癌治疗效果的探讨(附 5 年经验总结) [J]. 中华肝胆外科杂志, 2003; 9(3):131
- 2 严律南. 胰头癌扩大切除利弊的探讨 [J]. 中华肝胆外科杂志, 2002; 8(9):533
- 3 Fortner JG. Regional resection of cancer of the pancreas; a new surgical approach [J]. Surgery, 1973; 73(2):307
- 4 Fuhrman GM, Leach SD, Staley CA, et al. Rationale for en bloc vein resection in the treatment of pancreatic adenocarcinoma adherent to the superior mesenteric-portal vein confluence. Pancreatic Tumor Study Group [J]. Ann Surg, 1996; 223(2):154
- 5 Capussotti L, Massucco P, Ribero D, et al. Extended lymphadenectomy and vein resection for pancreatic head cancer: outcomes and implications for therapy [J]. Arch Surg, 2003; 138(12):1316
- 6 陈明清, 张国珠, 李云峰, 等. 胰腺癌根治术时受侵肠系膜上动脉的切除并重建二例报告 [J]. 中华普通外科杂志, 1999; 14(2):159
- 7 戈小虎, 陈福真, 赵大健, 等. 胰十二指肠联合血管切除和重建治疗胰头部恶性肿瘤 [J]. 中华普通外科杂志, 2004; 19(1):37
- 8 Lim JE, Chien MW, Earle CC. Prognostic factors following curative resection for pancreatic adenocarcinoma: a population-based, linked database analysis of 396 patients [J]. Ann Surg, 2003; 237(1):74

(2005-12-14 收稿, 2006-04-13 修回)

(本文编辑 蒲素清)

(上承第 523 页)

- 1 Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis [J]. Immunity, 1995; 3(6):673
- 2 Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, et al. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand [J]. J Clin Invest, 1999; 104(2):155
- 3 Liu W, Bodle E, Chen JY, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and chemotherapy cooperate to induce apoptosis in mesothelioma cell lines [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001; 25(1):111
- 4 Satoh K, Kaneko K, Hirota M, et al. Tumor necrosis factor-re-

lated apoptosis-inducing ligand and its receptor expression and the pathway of apoptosis in human pancreatic cancer [J]. Pancreas, 2001; 23(3):251

- 5 Ozawa F, Friess H, Kleeff J, et al. Effects and expression of TRAIL and its apoptosis-promoting receptors in human pancreatic cancer [J]. Cancer Lett, 2001; 163(1):71
- 6 Ibrahim SM, Ringel J, Schmidt C, et al. Pancreatic adenocarcinoma cell lines show variable susceptibility to TRAIL-mediated cell death [J]. Pancreas, 2001; 23(1):72

(2005-10-18 收稿, 2006-03-06 修回)

(本文编辑 蒲素清)