

## TWEAK/Fn14 蛋白在胰腺癌组织中的表达\*

魏瑗琳, 郭强, 龚姝<sup>△</sup>

四川大学华西医院 胰腺外科(成都 610041)

**【摘要】** 目的 通过检测并比较肿瘤坏死因子样凋亡弱诱导剂(TWEAK)和人成纤维细胞生长因子诱导型14(Fn14)在正常胰腺组织、慢性胰腺炎及胰腺癌组织中的表达,分析探讨 TWEAK/Fn14 通路在胰腺癌发展过程中的作用。方法 收集在四川大学华西医院胰腺外科行手术治疗、切除的胰腺组织标本,并经病理检查证实,胰腺癌标本 50 例,慢性胰腺炎标本 40 例,正常胰腺组织标本 30 例。采用免疫组化检测胰腺组织中 TWEAK 和 Fn14 的表达,并分析 TWEAK 表达与胰腺癌临床病理特征的关系。结果 TWEAK 阳性表达率在胰腺癌为 36.0% (18/50),高于慢性胰腺炎 17.5% (7/40)及正常胰腺组织 13.3% (4/30),组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),表达强度亦为胰腺癌组织 > 慢性胰腺炎 > 正常胰腺组织( $P < 0.05$ )。Fn14 在胰腺癌组织(4.0%)和正常胰腺组织(7.0%)阳性表达率低,胰腺炎组织中未发现阳性表达。TWEAK 阳性表达率和高表达率在 II 期患者中随着肿瘤疾病分级增加而增加( $P < 0.05$ )。而各病理分级中,TWEAK 阳性表达率、高表达率和 EI 评分的差异均无统计学意义。结论 TWEAK/Fn14 参与了胰腺癌的发生发展过程。TWEAK 在胰腺癌中高表达,Fn14 呈低表达。

**【关键词】** 肿瘤坏死因子样凋亡弱诱导剂 人成纤维细胞生长因子诱导型 14 胰腺癌

**Expression of TWEAK/Fn14 in Pancreatic Cancer** WEI Ai-lin, GUO Qiang, GONG Shu<sup>△</sup>. Department of Pancreatic Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

<sup>△</sup> Corresponding author, E-mail: gdy-29@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of tumor necrosis factor-related weak inducer of apoptosis (TWEAK)/fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14) on the proliferation and growth of pancreatic cancer. **Methods** Human pancreatic cancer (50 cases), chronic pancreatitis (40 cases) and normal pancreatic tissues (30 cases) were collected in West China Hospital from January 2012 to December 2013. TWEAK and Fn14 expressions in these tissues were checked with hematoxylin-eosin (HE) staining and immunohistochemistry method. Relationship between TWEAK expression and clinicopathological features of pancreatic cancer was analyzed. **Results** TWEAK expression rate was 36% (18/50) in pancreatic cancer, higher than that in chronic pancreatitis (17.5%, 7/40) and normal pancreatic tissues (13.3%, 4/30) ( $P < 0.05$ ). Expression intensity of TWEAK in three groups was also obviously ( $P < 0.05$ ). The expression rate of Fn14 was 4.0% in pancreatic cancer, 7.0% in normal pancreatic tissues, and 0% in chronic pancreatitis. TWEAK positive expression rate and high expression rate in pancreatic cancer were higher in IIB group ( $P < 0.05$ ). Pathological grade was not related to TWEAK expression. **Conclusion** TWEAK/Fn14 involved in the progression of pancreatic cancer. In the tissue of pancreatic cancer, TWEAK was highly expressed, and Fn14 was lowly expressed.

**【Key words】** TWEAK Fn14 Pancreatic cancer

胰腺癌是一种常见的消化系统恶性肿瘤,其发病率每年呈上升趋势。据最新中国癌症数据统计,中国胰腺癌新发病例数为 90 100 人/年,患病死亡人数高达 79 400 人/年<sup>[1]</sup>。慢性胰腺炎被确认为胰腺癌发病的危险因素之一<sup>[2-3]</sup>,由其发展为胰腺癌的概率是未曾患慢性胰腺炎患者的 7 倍<sup>[4]</sup>。在慢性炎症发展过程中,细胞因子、氧自由基和一些炎性因子介导的信号通路不仅能加速细胞分裂,并且还可通过降低肿瘤抑制因子的功能刺激致癌基因的表达,这些因素都可能

导致胰腺组织恶性化<sup>[5-6]</sup>。

肿瘤坏死因子样凋亡弱诱导剂(TWEAK)是肿瘤坏死因子超家族成员之一。TWEAK 与人成纤维细胞生长因子诱导型 14(Fn14)相结合组装形成复合体(Fn14 是 TWEAK 唯一的结合受体),通过经典核转录因子  $\kappa$ B (nuclear transcription factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 等途径进一步激活下游信号通路,调节相关生物学特性<sup>[7]</sup>。TWEAK 在正常组织中的表达量极低,在损伤组织中的表达上调,在组织急性损伤组织修复中起重要作用<sup>[8-10]</sup>,但在一些慢性疾病如炎性肠病中则具有一定程度的恶化炎性反应并长期维持病理状态的特点<sup>[11]</sup>。TWEAK mRNA 在神经胶质瘤<sup>[12]</sup>、乳腺癌<sup>[13]</sup>、结直

\* 四川省科技厅科技支撑计划项目(No. 2014FZ0088)资助

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail: gdy-29@163.com

肠癌<sup>[14]</sup>等许多人类肿瘤组织样本中均有表达。然而针对 TWEAK 和 Fn14 信号通路在胰腺肿瘤形成过程中的作用的研究相对较少。因此,本研究拟通过检测并比较 TWEAK 和 Fn14 在正常胰腺组织、慢性胰腺炎及胰腺癌组织中的表达,分析探讨 TWEAK/Fn14 通路在胰腺癌发展过程中的作用。

## 1 资料和方法

### 1.1 研究对象

纳入 2012 年 1 月至 2013 年 12 月在四川大学华西医院胰腺外科行手术治疗的患者为研究对象。组织标本均为手术切除的胰腺组织,共 120 例,并经病理学检查证实,其中 50 例患者标本为胰腺导管腺癌,患者术前均未接受放疗,疾病临床分期根据 AJCC/TNM 分期。40 例患者标本为慢性胰腺炎,30 例患者标本为正常胰腺组织(胰腺正常组织来源:腹部外伤脾脏破裂需行脾切除患者,靠近脾门处的部分胰腺组织;早期十二指肠乳头腺癌行十二指肠切除术,术后标本中的胰头部分胰腺组织;胰腺黏液性囊腺瘤或胰岛素瘤旁正常胰腺组织;部分组织为胰腺外伤患者,术后病理证实为正常胰腺组织)。收集患者一般临床病理资料。该研究通过四川大学伦理委员会批准,所有受试对象均签署知情同意书。

### 1.2 主要试剂及仪器

TWEAK 兔抗人多克隆抗体(ab37170)、Fn14 兔抗人单克隆抗体(ab109365)为 Abcam 公司产品;浓缩型 DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),PBS 磷酸盐缓冲液、EDTA 抗原修复液、柠檬酸盐缓冲液(自配),哈瑞式苏木素染色液、中性树胶(北京 Solarbio 公司),Leica 组织切片机(德国莱卡公司),全自动组织脱水机(美国 OXIS 公司),组织包埋机(德国 MicroM 公司),光学显微镜(日本奥林帕斯公司),电热恒温水浴箱(上海医用恒温设备厂)。

### 1.3 免疫组化检测标本组织 TWEAK 和 Fn14 蛋白的表达

将实验用玻片进行防脱片处理,每例组织石蜡标本 4  $\mu$ m 连续切片;60  $^{\circ}$ C 烤片 30 min;常规二甲苯脱蜡;梯度酒精脱水;3%  $H_2O_2$  中 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min;抗原修复;抗原封闭,用 10% 山羊血清 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min;加入一抗(1:1 000)4 $^{\circ}$ C 孵育,用 PBS 缓冲液代替一抗做阴性对照;加入经生物素标记的对应的二抗(1:2 000);滴加适量新鲜配置的 DAB 工作液,显微镜下控制显色时间;复染细胞核;脱水封片;常规脱水、透明、中性树胶封片。

实验结果由两位病理科医师独立进行观察判断。用细胞定位(细胞膜、细胞质)、强度及分布评估免疫组化染色结果。TWEAK 和 Fn14 的表达结果判定参考 MARÉCHAL 等<sup>[15]</sup>的免疫组化评分方法,统计阳性染色细胞范围(extent, E)及阳性染色强度(intensity, I)等评分。每例标本取 3 张切片,每张切片随机取 5 个视野,每个视野计数 100 个细胞,终取平均值。细胞浆或细胞核膜呈棕黄色为阳性染色,并计算阳性率。低倍镜下行 E 评分:阳性染色细胞数 < 20%、

20%~50%、51%~90%、>90% 分别记为 0 分、1 分、3 分、6 分。高倍镜下行 I 评分:无、弱(浅黄色)、中(中黄色)、强(深棕色)分别记为 -、+、++、+++;分别用 0 分、1 分、3 分、6 分评定。两者之和(EI 评分,即表达强度)0~<6 分为低表达,≥6 分为高表达。

### 1.4 统计学方法

阳性表达率等分类变量采用卡方检验或 Fisher 精确概率法,连续变量非正态分布采用秩和检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 患者一般临床病理资料

50 例首次诊断胰腺癌患者,男性:女性为 34:16,平均年龄 63(31~79)岁,术前无放、化疗病史。其中,32 例行胰十二指肠切除术、18 例患者行胰体尾切除术。TNM 肿瘤分期 I B 期患者 3 例,II A 期患者 28 例,II B 期患者 16 例,III 期患者 3 例;高分化患者 5 例,中分化患者 18 例,低分化患者 27 例。

### 2.2 胰腺正常组织、慢性胰腺炎组织及胰腺癌组织中 TWEAK 和 Fn14 的表达

见表 1 及图 1。TWEAK 阳性染色主要分布于细胞膜和细胞浆,正常胰腺组织 TWEAK 阳性表达率及表达强度均低于慢性胰腺炎和胰腺癌组织,3 组间差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。TWEAK 在胰腺癌组织中有 36.0%(18/50)呈阳性表达,而在慢性胰腺炎及正常胰腺组织中的阳性表达率分别为 17.5% 和 13.3% ( $P = 0.035$ );胰腺癌组织 TWEAK 表达的 EI 总分中位数高于慢性胰腺炎组织和正常胰腺组织( $P = 0.001$ )。18 例 TWEAK 阳性表达的胰腺癌组织中有 16 例为高表达;而在 7 例 TWEAK 阳性表达的慢性胰腺炎组织中有 5 例为高表达;仅有 1 例正常胰腺组织中发现 TWEAK 高表达。

由表 1 及图 2 可见,Fn14 在胰腺癌组织仅有 4.0%(2/50)呈阳性表达,而在慢性胰腺炎组织中未发现 Fn14 阳性表达,正常胰腺组织中 Fn14 的阳性表达率为 6.7%(2/30)。Fn14 阳性表达率及表达强度由于例数太少,不作统计比较。

### 2.3 人胰腺癌组织中 TWEAK 的表达与临床病理特征的关系

如表 2 所示,I B 期和 III 期组织中未见 TWEAK 阳性表达;而 28 例 II A 期患者病理标本中 TWEAK 阳性表达有 7 例(25.0%);II B 期标本中 TWEAK 阳性表达率为 68.8% ( $P = 0.003$ )。II B 期组织的高表达率为 62.5%,高于 II A 期,差异有统计学意义( $P = 0.006$ )。而 EI 评分结果差异无统计学意义。

病理分级方面,高分化胰腺癌组织中发现 1 例 TWEAK 阳性表达,EI 评分中位数为 1.12 分,高表达率为 6.3%;而中分化胰腺癌组织中 TWEAK 阳性表达率为 55.6%(10/18),EI 评分中位数为 4.05 分,高表达率为 56.3%;低分化胰腺癌组织中 TWEAK 阳性表达率为 25.9%(7/27),EI 评

分中位数为 3.93 分,高表达率为 37.5%。所有指标统计结果差异均无统计学意义。

表 1 TWEAK 和 Fn14 在各组织中的表达

Table 1 The expressions of TWEAK and Fn14 in pancreatic tissues

Group	n	TWEAK			Fn14		
		Positive expression/case (%)	EI score [median (range)]	High expression/case (%)	Positive expression/case (%)	EI score [median (range)]	High expression/case
Pancreatic cancer	50	18 (36.0)	3.06 (0-12)	16 (88.9)	2 (4.0)	0.06 (0-2)	0
Chronic pancreatitis	40	7 (17.5)	1.03 (0-7)	5 (71.4)	0	0	0
Normal pancreatic tissues	30	4 (13.3)	0.50 (0-7)	1 (25.0)	2 (6.7)	0.02 (0-4)	0

EI: Extent and intensity

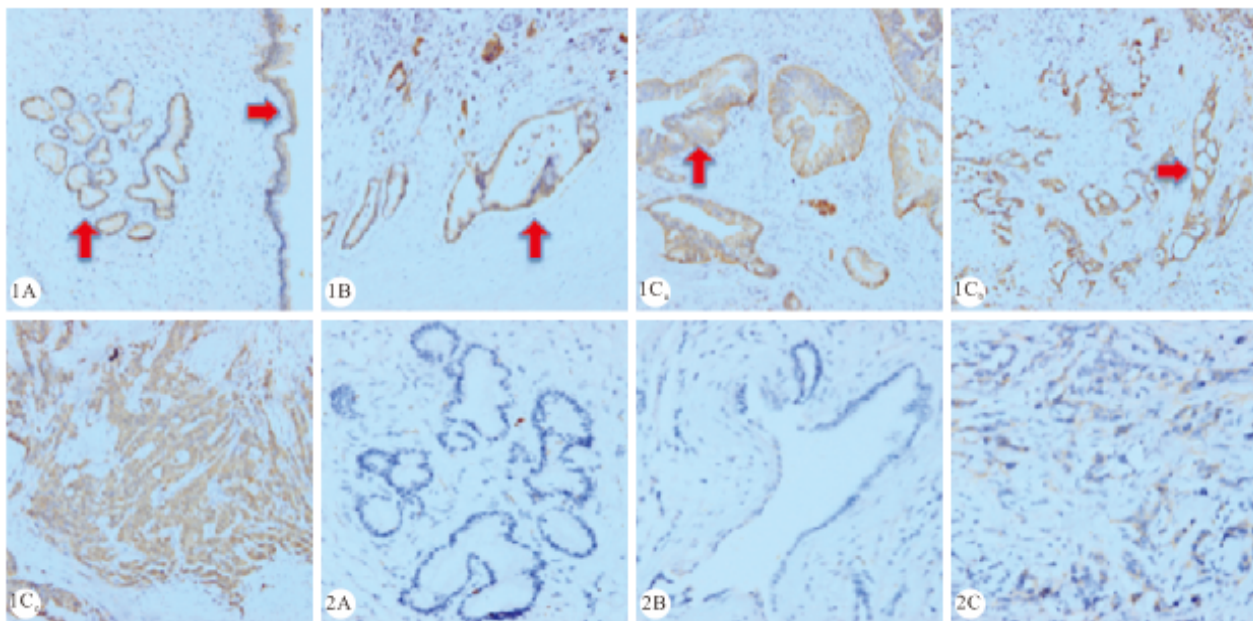


图 1 胰腺正常组织、慢性胰腺炎及胰腺癌组织 TWEAK 的表达(↑导管上皮阳性表达)。IHC × 200

图 2 胰腺正常组织、慢性胰腺炎及胰腺癌组织 Fn14 的表达。IHC × 400

及胰腺癌组织 Fn14 的表达。IHC × 400

Fig 1 The expression of TWEAK in pancreatic tissues (↑ positive expression in pancreatic ductal epithelium). IHC × 200

Fig 2 The expression of Fn14 in pancreatic tissues. IHC × 400

及胰腺癌组织 Fn14 的表达。IHC × 400

A: Normal pancreatic tissue; B: Chronic pancreatitis; C: Pancreatic Cancer; a: High differentiation; b: Middle differentiation; c: Low differentiation

表 2 人胰腺癌组织中 TWEAK 的表达与胰腺癌临床病理特征的关系

Table 2 The correlation between the expression of TWEAK and clinicopathological characteristics of pancreatic cancer

Characteristic	n	TWEAK positive expression/case (%)	P	TWEAK EI score [median (range)]	P	TWEAK high expression/case (%)	P
Stage			0.003		0.051		0.006
I B	3	0 (0)		0		0	
II A	28	7 (25.0)		2.18 (0-6)		6 (37.5)	
II B	16	11 (68.8)		4.25 (4-12)		10 (62.5)	
III	3	0 (0)		0		0	
Pathological grade			0.094		0.112		0.123
High differentiation	5	1 (20.0)		1.12 (0-2)		1 (6.3)	
Middle differentiation	18	10 (55.6)		4.05 (2-12)		9 (56.3)	
Low differentiation	27	7 (25.9)		3.93 (2-12)		6 (37.5)	

### 3 讨论

治疗疗效较差,长期 5 年生存率仅 6%左右<sup>[16]</sup>。目前,外科手术依然是治疗胰腺癌唯一有效的方法,随着对胰腺癌相关基因及分子信号通路研究的不断深入,以此为基础针对恶性

与其他消化系统恶性肿瘤相比,胰腺癌不易早期发现,

肿瘤细胞内特定分子位点的靶向治疗的抗肿瘤药物研发已经成为治疗胰腺癌新的方向<sup>[17]</sup>。TWEAK/Fn14 通路对胰腺癌的发生、发展的调控作用机制、信号传导通路等尚不清楚,有待于进一步研究。本研究关键在于探讨 TWEAK/Fn14 通路在胰腺癌发生、发展中的作用机制,揭示其作用途径,探索将 TWEAK/Fn14 通路作为胰腺癌基因治疗新策略的可行性。

本研究结果显示,在本中心患者标本胰腺癌组织中 TWEAK 阳性表达率近 36.0%,而 Fn14 阳性表达率仅为 4.0%。TWEAK 和 Fn14 的结合存在两种形式:①配体依赖的相互作用,即通过异质六聚体的形式,高浓度的 TWEAK 与低浓度 Fn14 相互结合;②不依赖配体的相互作用,即配体 TWEAK 的浓度远低于受体 Fn14 的浓度<sup>[7]</sup>。在这种情况下,游离的受体 Fn14 激活下游通路发挥生物学作用。我们的结果可能从另一侧面说明 TWEAK 和 Fn14 的结合方式是配体依赖的相互作用。

由于 TWEAK 在炎症反应中的特殊作用,本研究检测了慢性胰腺炎组织标本中的 TWEAK 和 Fn14 的表达,结果发现,慢性胰腺炎组织中 TWEAK 的阳性表达率为 17.5%,高于正常胰腺组织中 TWEAK 阳性表达率(13.3%),差异有统计学意义。慢性胰腺炎是由各种原因引发的胰腺实质弥漫性或局限性炎症,由于炎症持续不断的发展,可引起胰腺组织坏死、纤维化、腺泡和胰岛细胞萎缩消失,导致胰腺结构和功能不可逆损害,并常伴胰腺弥漫性钙化、胰腺导管内结石或假性囊肿形成,临床上表现为进行性内分泌、外分泌功能衰退。病理学上慢性胰腺炎表现为导管改变、小叶周围纤维化和最终全小叶瘢痕形成<sup>[18]</sup>。由此我们推断,在胰腺癌肿瘤环境中,TWEAK/Fn14 在一定机制下促进了导管上皮细胞的增殖分化;而在慢性胰腺炎中,TWEAK/Fn14 的表达却促进了导管上皮细胞的凋亡。两种作用机制可能并不相同,但需要分子学上的实验证据支持。

本研究结果显示,TWEAK 蛋白阳性表达率、高表达率和 EI 评分在高分化、中分化、低分化胰腺癌肿瘤组织中差异无统计学意义。临床上Ⅲ期患者的手术指征把握较谨慎,故本研究纳入病例中Ⅲ期病患较少,并未在收入组织中检测出 TWEAK 的阳性表达。但在Ⅱ期患者中,TWEAK 阳性表达率、高表达率随着临床分期增加而增高。说明胰腺癌组织中 TWEAK 表达水平在中分化肿瘤中表达最高,随着病程进展而明显增加。因此,TWEAK 有望成为疾病分级评判及治疗预后效果评价的指标。

综上,TWEAK 在胰腺癌中存在,TWEAK/Fn14 信号通路在胰腺癌发生发展过程中可能扮演着重要角色。TWEAK 在胰腺癌导管细胞中高表达,Fn14 呈低表达,二者的结合方式可能是高配体浓度、低受体浓度的作用方式。慢性胰腺炎和胰腺癌中 TWEAK 发挥生物学作用机制可能不相同。检测胰腺癌组织中 TWEAK 的表达可能对判断肿瘤进程及其预后有一定的临床指导意义。该信号通路在胰腺癌细胞中的作用机制及下游信号通路仍需要在体内和体外

实验中得到进一步认证。

## 参 考 文 献

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE PD, *et al.* Cancer statistics in China, 2015. *CA Cancer J Clin*,2016,66(2):115-132.
- [2] LOWENFELS AB, CAVALLINI G, AMMANN R, *et al.* pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. *N Engl J Med*, 1993,328(20):1433-1437.
- [3] MALKA D, MAIRE F, RUFAT P, *et al.* Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. *Gut*,2002,51(6):849-852.
- [4] BRACCI PM, HASSAN MM, GUPTA S, *et al.* Pancreatitis and pancreatic cancer in two large pooled case-control studies. *Cancer Causes Control*,2009,20(9):1723-1731.
- [5] BALKWILL F, MANTOVANI A. Inflammation and cancer; back to Virchow? *Lancet*,2001,357(9255):539-545.
- [6] FARROW B, EVERS BM. Inflammation and the development of pancreatic cancer. *Surg Oncol*,2002(10):153-169.
- [7] CHICHEPORTICHE Y, BOURDON PR, XU H, *et al.* TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem*,1997,272(51):32401-32410.
- [8] BURKLY LC, MICHAELSON JS, ZHENG TS. TWEAK/Fn14 pathway: an immunological switch for shaping tissue responses. *Immunol Rev*,2011,244(1):99-114.
- [9] WINKLES JA. The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting. *Nat Rev Drug Discov*,2008,7(5):11-25.
- [10] BURKLY LC, DOHI T. TWEAK/Fn14 pathway in tissue remodeling: for better or for worse. *Adv Exp Med Biol*,2011(691):305-322 [2016-11-24]. [http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4419-6612-4\\_32](http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4419-6612-4_32). doi: 10.1007/978-1-4419-6612-4\_32.
- [11] DOHI T, BURKLY LC. WEAK/Fn14 pathway as an aggravating and perpetuating factor in inflammatory diseases: focus on inflammatory bowel diseases. *J Leukoc Biol*,2012,92(2):748-764.
- [12] TRAN NL, MCDONOUGH WS, DONOHUE PJ, *et al.* The human Fn14 receptor gene is up-regulated in migrating glioma cells *in vitro* and overexpressed in advanced glial tumors. *Am J Pathol*,2003,162(4):1313-1321.
- [13] ZHAO H, LANGERÖD A, JI Y, *et al.* Different gene expression patterns in invasive lobular and ductal carcinomas of the breast. *Mol Biol Cell*,2004,15(6):2523-2536.
- [14] KAWAKITA T, SHIRAKI K, YAMANAKA Y, *et al.* Functional expression of TWEAK in human colonic adenocarcinoma cells. *Int J Oncol*,2005,26(1):87-93.
- [15] MARÉCHAL R, DEMETTER P, NAGY N, *et al.* High expression of CXCR4 may predict poor survival in resected pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer*,2009,100(9):1444-1451.
- [16] RYAN DP, HONG TS, BARDEESY N. Pancreatic adenocarcinoma. *N Engl J Med*,2014,371(11):1039-1049.
- [17] VINCENT A, HERMAN J, SCHULICK R, *et al.* Pancreatic cancer. *Lancet*,2011,378(9791):607-620.
- [18] 郑建明. 胰腺炎的病理. *现代消化及介入诊疗*,2007,12(3):163-167.

(2016-07-11 收稿,2016-10-22 修回)

编辑 沈进