

NJ001 特异性抗原在胰腺癌组织中表达的初步研究

吴蕾, 李大千, 荆俊鹏, 韦莉, 张洁心, 张燕, 张炳锋, 宋为娟, 张伟, 黄蕾, 徐建, 王芳, 潘世扬*

(南京医科大学第一附属医院检验学部, 江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**研究 NJ001 特异性抗原在胰腺癌患者组织中的表达情况, 探讨其与临床病理特征之间的关系及预后价值。**方法:**采用免疫组织化学方法对 89 例胰腺癌组织、17 例胰腺良性疾病组织中 NJ001 特异性抗原进行检测, 用半定量评分法判定结果, 同时结合患者的临床病例资料, 使用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法进行相关性分析。Kaplan-Meier 生存曲线评价该抗原的表达情况对预后的影响。**结果:**免疫组织化学结果显示, NJ001 特异性抗原在胰腺癌组织中表达高于胰腺良性疾病组织(77.5% vs 17.6%, $P < 0.001$)。进一步分析发现:低分化患者该抗原的阳性表达率高于高分化患者(83.0% vs 60.0%, $P = 0.027$);且在肿瘤浸润程度深、存在淋巴转移的患者中该抗原的阳性表达率分别高于浸润程度低、无淋巴转移者(82.2% vs 53.3%, $P = 0.037$; 91.1% vs 62.8%, $P = 0.002$), 差异有统计学意义。生存分析显示, 该抗原表达阳性的患者的生存时间短于表达阴性的患者($P = 0.036$)。**结论:**NJ001 特异性抗原的表达与胰腺癌的分化程度、浸润深度、淋巴结转移及预后密切相关, 该抗原有望成为检测胰腺癌进展的新的标志物。

[关键词] 胰腺癌; 抗体; 单克隆; 免疫组织化学; 预后

[中图分类号] R730.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)08-1127-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20150815

A preliminary study on NJ001 specific antigen expression in pancreatic cancer

Wu Lei, Li Daqian, Jing Junpeng, Wei Li, Zhang Jiexin, Zhang Yan, Zhang Bingfeng, Song Weijuan, Zhang Wei, Huang Lei, Xu Jian, Wang Fang, Pan Shiyang*

(Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To detect the NJ001 antibody specific antigen expression in pancreatic cancer (PCa), and to investigate its relationship with clinicopathological features and prognosis value. **Methods:** The expression of NJ001 antibody specific antigen was evaluated through immunohistochemical staining in 89 PCa and 17 benign pancreatic disease. The results were scored by semiquantitative analysis. We analyzed the correlation of the results with clinicopathological parameters, and statistical analysis was evaluated by chi-square test or Fisher exact test. We also assessed the prognosis value using Kaplan-Meier survival curves. **Results:** The expression of this specific antigen was significantly higher in PCa tissues compared with benign pancreatic diseases (77.5% vs 17.6%, $P < 0.001$). We further found that the positive rate of NJ001 specific antigen in poor differentiation PCa patients was higher than that of well differentiation patients (83.0% vs 60.0%, $P = 0.027$). Meanwhile, the positive rate in patients with deep depth of tumor invasion or lymph nodes metastasis was higher than that of low invasion cases or no metastasis cases, respectively (82.2% vs 53.3%, $P = 0.037$; 91.1% vs 62.8%, $P = 0.002$). Overall survival for patients with positive expression of the specific antigen was lower than that with negative expression ($P = 0.036$). **Conclusion:** The NJ001 antibody specific antigen expression in PCa was associated with differentiation, depth of invasion, lymph node metastasis and prognosis, suggesting the antigen may be a promising tumor marker for monitoring the development of PCa.

[Key words] pancreatic cancer; antibodies; monoclonal; immunohistochemistry; prognosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(08): 1127-1130]

[基金项目] 国家自然科学基金(81371894, 81201359, 81101322); 江苏省实验诊断学重点实验室(XK201114); 江苏高校优势学科建设工程基金项目; 教育部博导基金(20113234110012); 国家临床重点专科建设项目

*通信作者(Corresponding author), E-mail: sypan@njmu.edu.cn

胰腺癌是消化系统中一种恶性程度很高的肿瘤,发病率近年来不断升高^[1]。由于其早期无特异性临床症状,故多数胰腺癌患者确诊时,病期都较晚^[2]。尽管如今医疗技术较为进步,然而胰腺癌的5年生存率仍低于5%,确诊后平均生存时间仅5~8个月^[2-3]。前期本实验室成功制备了1株单克隆抗体NJ001,能识别NJ001特异性抗原,研究证实该抗原的表达与肺癌的分化程度和淋巴结转移密切相关,且对预后也有着重要的影响^[4-5]。本研究试图了解NJ001特异性抗原在胰腺癌组织中的表达情况及其与临床病理学特征的关系,并进一步探讨该抗原的表达对胰腺癌患者预后的影响。

1 对象和方法

1.1 对象

实验标本来源于南京医科大学第一附属医院2009—2014年行胰腺切除的手术患者(胰腺癌89例,胰腺良性疾病17例)。在89例胰腺癌患者中,男48例,女41例,中位年龄62岁。按照2014版AJCC癌症分期手册的标准进行TNM分期,I期11例,II期69例,III期4例,IV期4例,1例无分期资料;T₁、T₂共15例,T₃、T₄共73例,1例无浸润深度资料;无淋巴结转移者43例,有淋巴结转移者45例,1例无淋巴结转移资料。按照2004年WHO胰腺癌分类标准进行分化程度评估,高分化癌25例,低分化癌53例,无分化程度资料者11例。17例胰腺良性疾病包括12例胰腺浆液性囊腺瘤、2例胰腺假性囊肿和3例胰腺炎。术后电话或门诊随访胰腺癌患者,并记录随访资料,随访时间截至2014年12月,共获得45例患者完整随访资料。

1.2 方法

免疫组织化学染色具体流程按本实验室前期文章所述^[4]。以1%的PBS缓冲液代替一抗作为阴性对照,确诊胰腺癌切片作为阳性对照。单克隆抗体NJ001由本实验室自制;快捷型酶标羊抗鼠/兔IgG

聚合物购自福州迈新生物技术开发公司;DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

结果判定:根据肿瘤细胞内棕黄色阳性反应百分率和染色程度进行综合判定分析。阳性百分率为在高倍视野下每200个肿瘤细胞中阳性细胞所占百分比,随机做5次。阳性率计分标准:0分(阳性百分率0%),1分(1%~33%),2分(34%~66%),3分(67%~100%)。染色程度记分标准:无染色、浅黄色、棕黄色、棕褐色分别计为0、1、2、3分。两种方法得分的乘积为0、1、2、3、4、6、9。将得分结果分为-(0分)、+(1~2分)、++(3~4分)、+++ (6~9分)4个等级,其中++、+++判定为阳性表达。

1.3 统计学方法

应用SPSS16.0统计软件进行数据分析。计数资料采用 χ^2 检验或者Fisher确切概率法。生存分析采用Kaplan-Meier曲线法,两组生存期比较采用Log-rank检验。采用逐步引入剔除法进行多因素Cox比例风险模型分析。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

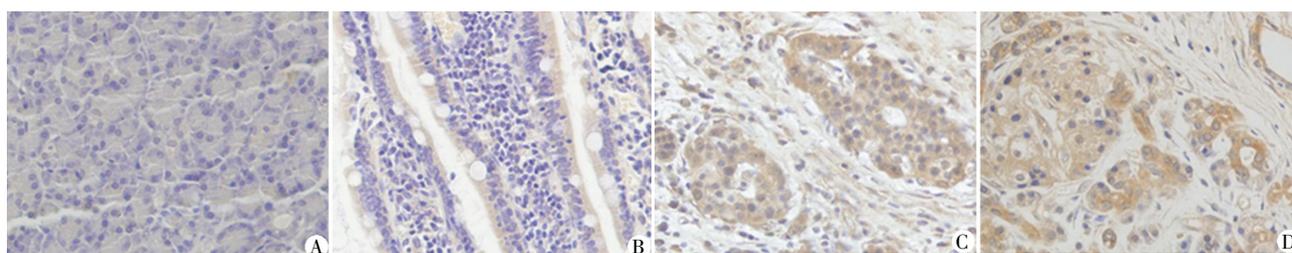
2 结果

2.1 NJ001特异性抗原在胰腺癌及胰腺良性疾病组织中的表达

相比于胰腺良性疾病,癌组织中表现较多棕黄色或棕褐色颗粒,显示NJ001特异性抗原表达明显增强(图1)。该抗原在89例胰腺癌及17例胰腺良性疾病中的阳性率分别为77.5%和17.6%,差异有统计学意义($P < 0.001$)。

2.2 NJ001特异性抗原的表达与胰腺癌临床病理特征的关系

NJ001特异性抗原表达阳性率在肿瘤低分化及高分化组中分别为83.0%、60.0%,浸润深度在T₁/T₂以及T₃/T₄组分别为53.3%、82.2%,无淋巴结转移及有淋巴结转移组阳性率分别为62.8%、91.1%,经 χ^2 检验均存在统计学差异(表1)。该抗原的表达情况与胰腺癌患者的年龄、性别、肿瘤直径无



A: 胰腺良性疾病组织, NJ001 特异性抗原表达为-; B、C、D: 胰腺癌组织, NJ001 特异性抗原表达分别为+、++、+++。

图1 NJ001 特异性抗原在胰腺癌及胰腺良性疾病中的表达(免疫组化染色, $\times 200$)

Figure 1 NJ001 specific antigen expression in pancreatic cancer and benign pancreatic disease (immunohistochemistry, $\times 200$)

明显关系。在 8 例 III/IV 期的胰腺癌患者中, 该抗原表达的阳性率为 100%, 但与 I/II 期相比, 无统计学差异。

表 1 NJ001 特异性抗原的表达与胰腺癌患者临床病理特征之间的关系

Table 1 Correlations of the NJ001 specific antigen expression with clinicopathological characteristics of pancreatic cancer

临床病理特征	例数	阳性例数	阳性率(%)	P 值
年龄(岁)				
≤62	48	36	75.0	0.536
>62	41	33	80.5	
性别				
女	41	29	70.7	0.156
男	48	40	83.3	
肿瘤直径(cm)				
≤3	37	28	75.7	0.533
>3	48	39	81.3	
分化程度				
高	25	15	60.0	0.027
低	53	44	83.0	
浸润深度				
T1/T2	15	8	53.3	0.037
T3/T4	73	60	82.2	
淋巴转移				
N0	43	27	62.8	0.002
N1	45	41	91.1	
临床分期				
I/II	80	60	75.0	0.190*
III/IV	8	8	100.0	

*: 采用 Fisher 确切概率法。

2.3 NJ001 特异性抗原的表达与胰腺癌患者预后的关系

随访至 2014 年 12 月 31 日, 随访终点为患者死亡, 随访期为 3 年, 共有 45 例资料完整的病例纳入研究。中位随访时间为 10.9(3.1~36.0) 个月。NJ001 特异性抗原阳性表达组及阴性表达组之间的生存时间有显著差异($P = 0.036$, 图 2), 阳性组($n=36$)的中位生存时间分别为 13.2 个月, 阴性组($n=9$)的平均生存时间为 6.7 个月。Cox 多因素回归模型表明, 淋巴结转移是影响患者独立的预后因素(风险比值为 2.74), 而 NJ001 特异性抗原未纳入模型中。

3 讨论

NJ001 是本实验室制备的 1 株针对非小细胞肺癌的单克隆抗体^[5]。前期实验证实该抗体所识别的特异性抗原与肺癌的诊断、发生、发展和预后相关^[4,6-7]; 肺癌组织中 NJ001 特异性抗原阳性表达率明显高

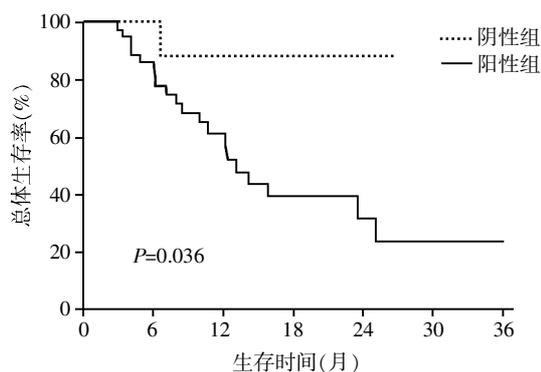


图 2 胰腺癌患者的生存曲线
Figure 2 Kaplan-Meier survival curve of pancreatic cancer patients

于肺部良性肿瘤(84.1% vs 8.7%), 且该抗原表达程度越高, 患者生存率越低^[4]; 肺癌患者外周血中 NJ001 抗体识别的特异性循环肿瘤细胞明显高于肺部良性疾病患者及健康人群^[7]。起源于同一胚层的肿瘤, 尤其分化程度较高的, 在组织学上十分相似, 单纯从组织形态上有时相当难以鉴别, 所以, 往往需借助于多种标志物的联合免疫组化染色来判别肿瘤的原发部位及生物学特性^[8-10]。肺和胰腺均起源于内胚层, 本研究进一步观察 NJ001 特异性抗原在胰腺组织中的表达情况。结果表明: NJ001 特异性抗原在大部分胰腺癌组织中表达水平较高, 而在胰腺良性疾病组织中表达较弱, 提示该抗原可能会影响胰腺癌的进展。进一步的分析证实, NJ001 特异性抗原的表达与胰腺癌的分化程度、浸润深度及淋巴转移有着密切的关系。因此, 该抗原的高表达可能提示肿瘤侵袭性与转移能力较强。

目前, 胰腺癌免疫组化的标志物有表皮生长因子受体(EGFR)、人类表皮生长因子受体 2(HER2)、基质金属蛋白酶 2(MMP2)和 P53 等。多数研究表明, 这些标志物在胰腺癌的阳性率为 60%~70%, 因在其他肿瘤也存在较高的表达, 故特异性不强^[11-14]。本研究发现, NJ001 特异性抗原在胰腺癌中阳性表达率为 77.5%, 而在胰腺良疾病的表达率仅为 17.6%, 且前期本课题组的实验已证实, 该抗原在除非小细胞肺癌以外的其他大多数恶性肿瘤中呈低表达或不表达状态, 提示该抗原对胰腺癌的诊断具有一定的临床意义。

通过对 45 例胰腺癌患者随访研究发现, NJ001 特异性抗原表达阳性的患者较阴性患者的生存期短, 且两者之间有统计学差异。值得注意的是, Cox 多因素回归模型表明, 淋巴结转移是影响患者独立的预后因素, 而 NJ001 特异性抗原未纳入模型中。

通过共线性分析未发现 NJ001 特异性抗原与淋巴结转移存在明显相关性。这一现象可能与随访的患者例数少、随访时间短有关,尤其是在随访患者中 NJ001 特异性抗原表达阴性的只有 9 例,其生存时间为 4.2~15.8 个月,平均生存时间为 6.7 个月,在随访期间仅 1 例死亡。因此,关于 NJ001 特异性抗原表达能否作为独立的生存预测因子尚需大样本进一步验证。

由于 NJ001 特异性抗原在胰腺癌中高表达,不仅和浸润深度、组织学分级以及淋巴转移有关,而且该抗原表达阳性往往提示着不良预后,说明该抗原在胰腺癌的发生和发展过程中发挥重要作用。检测该抗原的表达,不仅可以为胰腺癌免疫组化诊断提供重要手段,同时有可能成为判断胰腺癌恶性程度及评估预后的新指标。

[参考文献]

- [1] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010[J]. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60(5):277-300
- [2] Hidalgo M. Pancreatic cancer[J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(17):1605-1617
- [3] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics for hispanics/latinos, 2012[J]. *CA Cancer J Clin*, 2012, 62(5):283-298
- [4] 韩月,王芳,徐婷,等. Nj001 特异性抗原在胰腺癌中的表达及临床意义[J]. *中华检验医学杂志*, 2013, 36(10):895-898
- [5] Pan S, Wang F, Huang P, et al. The study on newly developed mcab nj001 specific to non-small cell lung cancer and its biological characteristics[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3):e33009
- [6] 彭夔,潘世扬,王芳,等. 非小细胞肺癌患者血清中 sp70 的检测及其临床意义[J]. *中华检验医学杂志*, 2012, 35(6):554-558
- [7] 凌芸,王芳,朱全,等. 非小细胞肺癌特异性循环肿瘤细胞的检测及其临床意义[J]. *中华检验医学杂志*, 2013, 36(11):1002-1007
- [8] Silverman JF, Zhu B, Liu Y, et al. Distinctive immunohistochemical profile of mucinous cystic neoplasms of pancreas, ovary and lung[J]. *Histol Histopathol*, 2009, 24(1):77-82
- [9] Sulzbacher S, Schroeder IS, Truong TT, et al. Activin a-induced differentiation of embryonic stem cells into endoderm and pancreatic progenitors-the influence of differentiation factors and culture conditions[J]. *Stem Cell Rev*, 2009, 5(2):159-173
- [10] Yasumoto M, Hamabashiri M, Akiba J, et al. The utility of a novel antibody in the pathological diagnosis of pancreatic acinar cell carcinoma[J]. *J Clin Pathol*, 2012, 65(4):327-332
- [11] 任新瑜,尹玉峰,高洁,等. 中国人群胰腺癌与胃癌 her2/neu 基因表达[J]. *协和医学杂志*, 2012, 3(1):21-25
- [12] Zhang L, Yuan SZ. Expression of c-erbB-2 oncogene protein, epidermal growth factor receptor, and tgf-beta1 in human pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2002, 1(4):620-623
- [13] Qi T, Han J, Cui Y, et al. Comparative proteomic analysis for the detection of biomarkers in pancreatic ductal adenocarcinomas[J]. *J Clin Pathol*, 2008, 61(1):49-58
- [14] Awaya H, Takeshima Y, Furonaka O, et al. Gene amplification and protein expression of egfr and her2 by chromogenic in situ hybridisation and immunohistochemistry in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the lung[J]. *J Clin Pathol*, 2005, 58(10):1076-1080

[收稿日期] 2015-01-03