

MUC4 mRNA 在胰腺癌患者外周血单个核细胞中的表达及临床意义

李晓辉[#], 熊炯炘, 王春友

(华中科技大学 同济医学院 附属协和医院胰腺外科中心, 武汉 430022)

摘要: 目的 研究 *MUC4* mRNA 在人胰腺癌患者外周血单个核细胞中的表达及临床意义。方法 采用逆转录实时 PCR 法检测 20 例胰腺癌、12 例慢性胰腺炎患者及 8 例健康志愿者外周血单个核细胞中 *MUC4* mRNA 的表达。结果 *MUC4* mRNA 在慢性胰腺炎患者及健康志愿者外周血单个核细胞中无表达, 20 例胰腺癌患者中有 12 例表达, 其阳性表达率 (60%) 明显高于慢性胰腺炎组及健康对照组 (P 均 < 0.01)。 *MUC4* mRNA 阳性表达率有随胰腺癌临床分期增加而逐渐增高的趋势, 在临床 TNM III ~ IV 期中的阳性表达率 (76.92%) 明显高于 I ~ II 期 (28.57%) ($P < 0.05$)。结论 胰腺癌患者外周血 *MUC4* mRNA 的表达与临床分期具有高度相关性, 可用于胰腺癌的早期诊断和鉴别诊断。

关键词: 胰腺癌; *MUC4*; mRNA; 诊断; 标志物

中图分类号: R543.4; R543.5; Q786 文献标识码: A 文章编号: 1000-503X(2005)05-0624-04

Clinical Significance of the Expression of *MUC4* mRNA in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Pancreatic Cancer Patients

Li Xiao-hui[#], Xiong Jiong-xin, Wang Chun-you

(Department of Pancreatic Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract: Objective To explore the expression and clinical significance of *MUC4* mRNA in peripheral blood mononuclear cells of pancreatic cancer patients. **Methods** The expression of *MUC4* mRNA in peripheral blood mononuclear cells of pancreatic cancer patients were detected with reverse transcription realtime PCR. **Results** Expression of *MUC4* mRNA was not detected in the peripheral blood mononuclear cells of chronic pancreatitis patients and normal healthy people, but was observed in those of pancreatic cancer patients. The positive expression rate of *MUC4* mRNA in pancreatic cancer patients was 60%, which was significantly higher than those of chronic pancreatitis patients and normal healthy people ($P < 0.01$). The positive expression rate of *MUC4* mRNA increased with the development of clinical stage, and the positive expression rate in stage of III - IV (TNM system) was 76.92%, which was significantly higher than that of I - II stage ($P < 0.01$). **Conclusions** Expression of *MUC4* mRNA is highly correlated with the clinical stage in pancreatic cancer patients. Detecting the expression of *MUC4* mRNA in peripheral blood mononuclear cells of pancreatic cancer patients may be helpful for the early diagnosis and differential diagnosis.

Key words: pancreatic cancer; *MUC4*; mRNA; diagnosis; marker

Acta Acad Med Sin, 2005,27(5):624 - 627

[#]Corresponding author Tel: 027-85726273, E-mail: lxh007xp@tom.com

胰腺癌恶性程度高, 早期即可有局部浸润及淋巴结转移, 手术切除率低, 预后极差, 其临床症状及 CT 等影像学检查易与慢性胰腺炎, 尤其是胰头的炎性包块混淆, 使临床医生难以抉择。因此, 迫切需要一种能早期诊断胰腺癌及鉴别胰腺癌与慢性胰腺炎的手段和指标。黏蛋白 (mucin, MUC) 是一类高分子量、高度糖基化蛋白, 其重要成员 MUC4 与乳腺癌、食管癌等多种类型肿瘤关系密切^[1,2]。有研究证实, MUC4 蛋白在胰腺癌组织中高表达, 而在慢性胰腺炎及正常胰腺组织中不表达^[3]。由于在乳腺癌患者外周循环中检测到 MUC 的表达^[4], 因此通过研究 MUC4 mRNA 在胰腺癌外周血中的表达情况, 可为胰腺癌的早期诊断和鉴别诊断及预后评价提供帮助。

对象和方法

对象及分组 2003 年 10 月~2004 年 10 月在武汉协和医院胰腺外科中心行根治性胰十二指肠切除, 经术后病理证实为胰头导管腺癌的胰腺癌患者 20 例 (胰腺癌组), 其中男 12 例, 女 8 例, 年龄 25~66 岁, 平均 (48.6±8.7) 岁。术前均未经过任何化疗和放疗。高分化腺癌 6 例, 中分化腺癌 6 例, 低分化腺癌 8 例; TNM 临床分期, I~II 期 7 例, III~IV 期 13 例; 伴淋巴结及单个转移灶转移者 13 例。

慢性胰腺炎组 12 例, 其中, 男 8 例, 女 4 例, 年龄 35~62 岁, 平均 (42.8±9.1) 岁, 本组患者因具有疑似胰腺癌临床症状收治于本中心, 术中或术后病理证实为慢性胰腺炎, 患者可伴有胰管结石或胰腺钙化, 但不伴其他系统肿瘤性疾病。

健康对照组 8 例, 其中, 男 5 例, 女 3 例, 年龄 21~56 岁, 平均 (39.2±11.7) 岁, 均为志愿者, 无其他疾病。

主要试剂 MUC4 上游引物: 5'-GTCAATGCCCACGCCTAT-3'; 下游引物: 5'-ACGGGTTGGAATCGTAAGTC-3', 扩增片段长度为 431 bp。内参照 β -actin 上游引物: 5'-AGCAGAGAATGGAAAGTCAAA-3'; 下游引物: 5'-ATGCTGCTTACATGTCTCGAT-3', 扩增片段长度为 266 bp。均由上海博亚生物工程公司合成。

方法 每例患者术前及健康志愿者均于清晨抽取外周静脉血, 用淋巴细胞分离液分离出单个核细胞, 加入 TRIzol 溶液提取总 RNA 进行逆转录实时 PCR, 扩增结果直接经电脑得出 Ct 值。同时记录每

例血清标本 CA199 水平。

结果判断 Ct 值为每个反应管内的荧光强度达到系统认为有目的 DNA 合成时的循环数 (相对于阴性对照), 以 Ct<45 为阳性结果, Ct \geq 45 为阴性结果; CA19-9 以 >37 U/ml 为阳性结果, \leq 37 U/ml 为阴性结果。

统计学处理 采用 SAS 8.1 统计分析软件进行数据分析, 包括单项有序卡方检验和 Fisher's 精确概率检验, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

结 果

MUC4 mRNA 在胰腺癌、慢性胰腺炎患者及健康志愿者外周血中的表达 MUC4 mRNA 在慢性胰腺炎患者及健康志愿者外周血单个核细胞中无表达, 20 例胰腺癌患者中有 12 例表达, 其阳性表达率 (60%) 明显高于慢性胰腺炎组及健康对照组 (P 均 < 0.01)。

MUC4 mRNA 的表达与胰腺癌临床病理特征的关系 MUC4 mRNA 阳性表达率有随胰腺癌临床分期增加而逐渐增高的趋势, 在临床 TNM III~IV 期中的阳性表达率 (76.92%) 明显高于 I~II 期 (28.57%) ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 MUC4 mRNA 的表达与胰腺癌临床病理特征的关系

Table 1 Correlation between MUC4 mRNA expression and clinical features of pancreatic cancer

| Items | MUC4 mRNA (n) | | Positive rate (%) |
|------------------|---------------|---|-------------------|
| | + | - | |
| Age (yr) | | | |
| > 50 | 7 | 4 | 63.64 |
| < 50 | 5 | 4 | 55.56 |
| Sex | | | |
| Male | 7 | 5 | 58.33 |
| Female | 5 | 3 | 62.5 |
| Pathologic grade | | | |
| High | 3 | 3 | 50.00 |
| Middle | 4 | 2 | 66.67 |
| Low | 5 | 3 | 62.5 |
| Clinical stage | | | |
| I - II | 2 | 5 | 28.57 |
| III - IV | 10 | 3 | 76.92* |
| Metastasis | | | |
| Negative | 3 | 4 | 42.86 |
| Positive | 9 | 4 | 69.23 |

* $P < 0.05$ compared with I - II group

MUC4 mRNA 与 CA199 在胰腺癌早期诊断中的意义 在 20 例胰腺癌患者中, 12 例 MUC4 mRNA 表达为阳性, 18 例 CA199 表达为阳性。在 12 例慢性胰腺炎患者中, 均无 MUC4 mRNA 表达, 3 例 CA199 表达为阳性。MUC4 mRNA 的敏感性为 60%, 特异性为 100%, CA199 敏感性为 90%, 特异性为 75%。MUC4 mRNA 联合 CA199 串联模式早期诊断胰腺癌的敏感性为 65%, 特异性为 100%; 并联模式早期诊断胰腺癌的敏感性为 95%, 特异性为 75% (表 2)。

表 2 MUC4 mRNA 联合 CA199 在胰腺癌早期诊断中的作用
Table 2 Role of MUC4 mRNA associated with CA199 in early diagnosis of pancreatic cancer

| Items | | Pancreatic cancer (n) | Chronic pancreatitis (n) |
|-----------|-------|-----------------------|--------------------------|
| MUC4 mRNA | CA199 | | |
| + | - | 1 | 0 |
| - | + | 7 | 3 |
| + | + | 11 | 0 |
| - | - | 1 | 9 |
| Total | | 20 | 12 |

讨 论

胰腺癌的早期诊断, 术前进行与症状、影像学检查易混淆的慢性胰腺炎的鉴别诊断及判断患者预后是临床上亟待解决的问题, 虽然 CA199 已广泛用于临床上胰腺癌的早期诊断、监测复发及预测预后, 但作为过筛标记物, 由于 CA199 在其他一些肿瘤, 甚至良性疾病中也会升高, 所以其价值受到限制, 常需多个标志物的联合检测, 以增加诊断的敏感性和特异性。

MUC 是由多种分泌上皮分泌的高分子量、高度糖基化蛋白, 在正常情况下能促进上皮细胞的更新和分化, 对上皮组织有润滑和保护作用, 一旦瘤变或者癌变, 其表达的质和量将出现异常。研究证实, 上皮细胞的恶性转变过程中多伴有 MUC 异常糖基化, 表明 MUC 在肿瘤的发生、发展及生物学特性中具有重要作用。MUC4 基因位于 3q29, 编码的跨膜型黏蛋白在人体中分布广泛^[5], 其在肿瘤发生、发展和侵袭转移等生物学特性中的作用与其特殊的蛋白质结构有关。MUC4 α 为胞外结构, 可干扰整合素和钙粘蛋白介导的细胞与细胞、细胞与基质之间的粘附作用, 使肿瘤细胞在组织中的粘附性迅速下降,

甚至消失, 并可通过遮蔽细胞表面的抗原蛋白, 干扰细胞毒细胞等免疫细胞对肿瘤细胞的识别和杀伤作用, 从而促进瘤细胞转移^[6-9]; MUC4 β 为跨膜部分, 含有 3 个 EGF 样结构域, 可结合并激活 ErbB2, 从而抑制细胞凋亡, 促进其生长^[10]。ErbB2 基因编码的细胞膜受体糖蛋白的序列和结构与表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 非常相似, 且具有酪氨酸激酶活性。ErbB2 与配体结合后, 通过自身磷酸化激活胞内的磷酸酶 C- γ 、磷酸酰肌醇-3 激酶和 RasGTP 酶激活蛋白, 催化相应的底物, 调节细胞的生长及分化。有研究证实, 结肠癌中 MUC4 的过表达可诱导极化细胞中 ErbB2 由基底侧向顶端表达增加, 更易于两者结合^[11], 后者又可使 AKT 信号传导通路激活增加, 从而增加肿瘤细胞的抗凋亡作用^[12]。

80%~90% 的胰腺外分泌肿瘤来源于导管细胞, 从上皮细胞的增生、发育不良, 发展至侵袭性导管癌的病变过程与结肠腺癌相似。研究证实, MUC4 在所有胰腺导管上皮内瘤 (pancreatic intraepithelial neoplasia, PanIN) 病变及侵袭性胰腺导管腺癌中均有表达, 且随着不典型程度增加, 其表达率也逐渐增高^[13]。另有少量研究发现, MUC4 mRNA 在正常胰腺、慢性胰腺炎组织中不表达, 而在胰腺癌组织及细胞株中呈高水平表达^[3]。

MUC 具有伴随癌细胞进入外周循环的作用, 研究显示, 在乳腺癌患者外周血单个核细胞中可检测到上皮源性的细胞角蛋白及 MUC1 的表达^[4]。在胰腺癌患者外周血中检测到 MUC4 mRNA 的表达也有少许报道^[14]。本研究在胰腺癌患者外周血单个核细胞中检测到 MUC4 mRNA 的表达, 而在慢性胰腺炎患者及正常健康人中没有检测到 MUC4 mRNA 的表达, 提示在临床工作中可通过对胰腺癌或疑似胰腺癌的患者进行术前抽血, 检查其外周血中是否有 MUC4 mRNA 表达, 早期或鉴别诊断胰腺癌。本研究还发现, MUC4 mRNA 的阳性表达率与胰腺癌患者的性别, 年龄及病理分化程度无关, 与临床分期高度相关, 但该结果需要进一步研究证实。此外, MUC4 mRNA 在有淋巴结转移的胰腺癌患者中表达率高于无淋巴结转移者, 但无统计学差异, 这可能是由于本研究例数较少的缘故。

本研究就结合 CA199 在诊断胰腺癌方面也作了一些初步工作, 结果发现, MUC4 mRNA 单独诊断胰腺癌的敏感性虽较 CA199 低, 但特异性达到了

100%，从而证实其是一个特异的诊断胰腺肿瘤的标志物。联合检测结果显示，MUC4 mRNA 联合 CA199 并联模式诊断胰腺癌较传统 CA199 在保证特异性的基础上，使敏感性从 90% 提高到 95%，优于 CA199 单个指标的检测结果。

综上所述，MUC4 mRNA 可在早期诊断胰腺癌、区分慢性胰腺炎及胰腺癌、提高胰腺癌的诊断正确性方面发挥重要作用。对 MUC4 基因的进一步研究有助于阐明胰腺癌的发生、发展机制，并为胰腺癌的诊断和治疗提供新的思路。

参 考 文 献

- Lopez-Ferrer A, Alameda F, Barranco C, *et al.* MUC4 expression is increased in dysplastic cervical disorders. *Hum Pathol*, 2001, 32(11):1197-1202
- Lee KT, Liu TS, Hanaoka J, *et al.* Analysis of MUC4 mucin expression in lung carcinoma cells and its immunogenicity. *Cancer*, 2001, 92(8):2148-2157
- Andrianifahanana M, Moniaux N, Schmied BM, *et al.* Mucin (MUC) gene expression in human pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a potential role of MUC4 as a tumor marker of diagnostic significance. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(12):4033-4040
- Mehes G, Witt A, Kubista E, *et al.* Circulating breast cancer cells are frequently apoptotic. *Am J Pathol*, 2001, 159(1):17-20
- Moniaux N, Escande F, Surinder K, *et al.* Alternative splicing generates a family of putative secreted and membrane-associated MUC4 mucins. *Eur J Biochem*, 2000, 267(14):4536-4544
- Komatsu M, Carraway CA, Fregien NL, *et al.* Reversible disruption of cell-matrix and cell-cell interactions by overexpression of sialomucin complex. *J Biol Chem*, 1997, 272(52):33245-33254
- Komatsu M, Yee L, Carraway KL. Overexpression of sialomucin complex, a rat homologue of MUC4, inhibits tumor killing by lymphokine-activated killer cells. *Cancer Res*, 1999, 59(9):2229-2236
- Komatsu M, Tatum L, Altman NH, *et al.* Potentiation of metastasis by cell surface sialomucin complex (rat MUC4), a multifunctional anti-adhesive glycoprotein. *Int J Cancer*, 2000, 87(4):480-486
- Komatsu M, Jepsen S, Arango ME, *et al.* MUC4/sialomucin complex, an intramembrane modulator of erbB2/HER2/Neu, potentiates primary tumor growth and suppresses apoptosis in a xenotransplanted tumor. *Oncogene*, 2001, 20(4):461-470
- Scott J, Masanobu K, Bushra H, *et al.* MUC4/sialomucin complex, the intramembrane erbB2 ligand, induces specific phosphorylation of erbB2 and enhances expression of p27^{kip}, but does not activate mitogen-activated kinase or protein kinase B/Akt pathways. *Oncogene*, 2002, 21(49):7524-7532
- Ramsauer VP, Carraway CA, Salas PJ, *et al.* MUC4/sialomucin complex, the intramembrane ErbB2 ligand, translocates ErbB2 to the apical surface in polarized epithelial cells. *J Biol Chem*, 2003, 278(32):30142-30147
- Schlieman MG, Fahy BN, Ramsamooj R, *et al.* Incidence, mechanism and prognostic value of activated AKT in pancreas cancer. *Br J Cancer*, 2003, 89(11):2110-2115
- Swartz MJ, Batra SK, Varshney GC, *et al.* MUC4 expression increase progressively in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol*, 2002, 117(5):791-796
- Ringel J, Faulmann G, Brandt R, *et al.* MUC4 mRNA in peripheral blood mononucleus cells (PBMC) as a potential tumor maker for pancreatic cancer. *Proc Am Assoc Cancer Res*, 2001, 42:616

(2005-05-09 收稿)