

ENO1 在胰腺上皮内瘤变和胰腺导管腺癌中的表达

王磊¹, 毕蓉蓉², 尹航¹, 袁平³

(1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院, 上海 200011; 2. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032; 3. 上海交通大学医学院附属瑞金医院, 上海 200011)

摘要: [目的] 检测烯醇化酶-1(ENO1)在人和大鼠胰腺上皮内瘤变(PanIN)和胰腺导管腺癌组织中的表达情况。[方法] 收集病理科存档人组织标本, 胰腺导管腺癌 18 例, PanIN 4 例, 正常胰腺组织 7 例, 免疫组化检测 ENO1 蛋白表达。SD 大鼠 20 只采用胰腺包埋种植 7,12-二甲基苯并蒽(DMBA)诱导法, 建立大鼠 PanIN 和胰腺导管腺癌模型, Real-time PCR 检测 ENO1 mRNA 表达, 免疫组化和免疫印迹检测 ENO1 蛋白表达。[结果] ENO1 蛋白在人 PanIN(9.63±1.80)和胰腺导管腺癌组织(12.14±2.71)中的表达均显著高于人正常胰腺组织($P<0.01$)。与造模后大鼠正常胰腺比较, ENO1 mRNA 在大鼠 PanIN-3($P<0.01$)和胰腺导管腺癌组织($P<0.001$)中表达显著增加, 在大鼠 PanIN-2($P<0.001$)、PanIN-3($P<0.01$)和 PDAC($P<0.001$)组织中, ENO1 蛋白表达呈进行性升高。[结论] ENO1 在 PanIN 和胰腺导管腺癌的表达显著增高, 在胰腺上皮的癌变过程中可能发挥重要作用。

关键词: 胰腺上皮内瘤变; 胰腺导管腺癌; 烯醇化酶-1; 7,12-二甲基苯并蒽

中图分类号: R735.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2019)04-0335-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.04.B010

Expression of ENO1 in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia and Pancreatic Ductal Adenocarcinoma

WANG Lei¹, BI Rong-rong², YIN Hang¹, YUAN Ping³

(1. Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200011, China; 2. Longhua Hospital Affiliated to the Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China; 3. Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200011, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression of enolase 1 (ENO1) in pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) and pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) tissues from human and rats. [Methods] Eighteen tissue samples of PDAC, 4 samples of PanIN and 7 samples of human normal pancreas tissue were collected, the expression of ENO1 protein was detected by immunohistochemistry. The rat model of PanIN and PDAC was induced by implantation with 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA) into pancreas in 20 adult male SD rats. The expression levels of ENO1 mRNA and protein in rat PanIN and PDAC tissues were detected by real-time PCR, immunohistochemistry and Western-blot, respectively. [Results] The expression of ENO1 protein in human PanIN ($P<0.01$) and PDAC ($P<0.001$) tissues was significantly higher than that in normal human pancreatic tissues. The expression of ENO1 mRNA was significantly increased in rat DMBA-induced PanIN-3($P<0.01$) and PDAC($P<0.001$), and the expression of ENO1 protein was also significantly increased in rats PanIN-2 ($P<0.001$), PanIN-3 ($P<0.01$) and PDAC tissues ($P<0.001$) compared to normal rat pancreas. [Conclusion] ENO1 expression is upregulated in PanIN and PDAC, indicating that ENO1 may be involved in the process of pancreatic epithelial carcinogenesis.

Subject words: pancreatic intraepithelial neoplasia; pancreatic ductal adenocarcinoma; enolase 1; 7,12-dimethylbenzanthracene

胰腺癌具有起病隐匿, 早期发生转移, 恶性程度

高等生物学特性, 造成胰腺癌早期诊断困难, 临床治疗效果差。胰腺癌近年来发病率不断增高, 5 年生存率不足 4%, 是目前预后最差的恶性肿瘤^[1,2]。

通信作者: 王磊, 主治医师, 博士; 上海交通大学医学院附属第九人民医院消化内科, 上海市黄浦区制造局路 639 号(200011); E-mail: wanglei197886@sina.com

收稿日期: 2018-01-28; **修回日期:** 2018-02-23

胰腺上皮内瘤变(pancreatic intraepithelial neo-

plasia, PanIN)是胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)的主要癌前病变^[3,4],针对 PanIN 开展研究可以阐明 PDAC 早期的发生发展机制,对 PDAC 的早期诊断也具有重要意义。近年的研究发现烯醇化酶-1(enolase1, ENO1)在 PDAC 中的表达增高,参与调控 PDAC 的增殖、迁移等多种生物学功能^[5-7],但是 ENO1 在 PanIN 中的表达情况和作用尚不明确。本研究拟进一步研究 ENO1 在 PanIN 和 PDAC 的表达情况,探讨 ENO1 在胰腺上皮癌变过程中的作用。

1 材料与方 法

1.1 一般材料

人 PanIN 和 PDAC 组织标本取自病理科存档蜡块,采集时间期限为 2010 年 1 月至 2016 年 12 月,经手术病理诊断的病例。PDAC 病例共 18 例,其中男性 12 例,女性 6 例,平均年龄 67.8 ± 13.2 岁, TNM 分期 II 期 5 例, III 期 13 例; PanIN 病例 4 例均为 PanIN-3,其中男性 1 例,女性 3 例,平均年龄 70.1 ± 8.5 岁;正常胰腺组织 7 例,其中男性 3 例,女性 4 例,平均年龄 62.6 ± 12.3 岁。全部病例均为初发病例,均无术前放疗或化疗史。

雄性清洁级 SD 大鼠 20 只,体重 100~110g,购自中科院上海实验动物中心,在标准饲养条件下进行饲养。7,12-二甲基苯并蒽(DMBA):美国 Sigma 公司;鼠抗人 ENO1 抗体;英国 Abcam 公司;两步法免疫组化试剂盒:丹麦 Dako Envision 公司;反转录试剂盒:Takara 公司;Real-Time quantitative PCR 试剂盒:Takara 公司;PVDF 膜:美国 Millipore 公司。

1.2 方 法

1.2.1 大鼠 PanIN 和 PDAC 模型的建立

手术大鼠当日晨起禁食禁水,称重后盐酸氯胺酮 100mg/kg 肌肉注射麻醉,沿腹部正中线切口切开逐层解剖进腹,在胰腺体部用显微手术剪剪开胰腺被膜,再将剪开处周围胰腺被膜进行荷包缝合。以 10mg/100g 体重剂量将事先分装好的 DMBA 颗粒植入荷包内,确认无 DMBA 漏出后逐层关腹。术后 1 个月处死大鼠,剪取 DMBA 包埋种植周围部分胰腺组织, PBS 漂洗后, 4%多聚甲醛固定 24h,石蜡包埋,

连续切片后行常规 HE 染色。所有 HE 染色组织切片由专业胰腺病理医师独立单盲读片,根据 PanIN 分级标准^[3,4],对所有胰腺组织进行分级,每例切片以片中出现的最高级别病变作为诊断。其余样本置于 -80°C 冰箱内保存。

1.2.2 免疫组化和结果评定

大鼠和人 PanIN、PDAC 组织切片水化后,在柠檬酸钠中 99°C 水浴修复抗原, 3% H_2O_2 10min 去除内源性过氧化物酶, 10% 正常羊血清 37°C 孵育 30min, 滴加 1:400 稀释的一抗 ENO1 抗体,湿盒内 4°C 孵育过夜;二抗 37°C 孵育 30min; DAB(1:50 配制)显色 10min,苏木素衬染细胞核,梯度酒精脱水。以 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。使用光学显微镜和显微图像分析系统,单盲评价大鼠模型和人胰腺组织免疫组化结果,肿瘤细胞胞浆或胞核有棕黄色染色者为阳性细胞,每例组织标本分别计数 3 个高倍视野细胞,计数阳性细胞百分率。评定染色强度为 0~4 分,阳性细胞比例 $<25\%$ 为 1 分, $25\% \sim 50\%$ 为 2 分, $50\% \sim 75\%$ 为 3 分, $75\% \sim 100\%$ 为 4 分,以染色强度和阳性细胞比例的积分乘积作为免疫组化积分。

1.2.3 Real-time PCR

组织 RNA 抽提后进行总 RNA 的鉴定,逆转录成 cDNA, RT 程序: 30°C 10min; 42°C 60min; 99°C 5min; 5°C 5min。SYBR GREEN 荧光染料法行 Real-time PCR 检测,反应条件: 94°C , 5min; 94°C , 30s; 62°C , 30s; 72°C , 30s; 40 循环; 72°C , 7min。ENO1 引物上游 5'-ACTGCTATTGGGAAAGCTGGCTAC-3', 下游 5'-CACTGTGAGATCATCCCCACTAC-3'; β -actin: 上游 5'-CCAAGGCCAACCGGAGAAGATGAC-3', 下游 5'-AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC-3'。

1.2.4 Western-blot

组织加入裂解液匀浆抽提蛋白质。Bio-Rad 蛋白定量法定量,将蛋白终浓度调整到 $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$, SDS-PAGE 制胶,将样品上样电泳;电泳结束后转膜, PVDF 膜用封闭液封闭 4°C 过夜,一抗鼠抗人 ENO1 抗体孵育 2h,洗膜后二抗孵育 2h, ECL 试剂盒进行化学发光检测。

1.3 统计学处理

数据分析采用 SPSS19.0 统计软件,采用方差分析进行各组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 PanIN 和 PDAC 造模结果

大鼠手术切口均未发生感染,愈合良好。模型大鼠毛色暗淡,体重增加较缓慢。手术后实验观察期内共死亡 3 只(15%)。组织病理学观察发现各例胰腺组织中均有明显的炎性细胞浸润和广泛的间质结缔组织增生,并出现不同程度的导管上皮增生,其中部分导管上皮细胞异形增生明显,突破基底膜形成 PDAC。病理判读模型大鼠共形成 PanIN 12 例(71%) (其中 1 级 4 例,2 级 3 例,3 级 5 例),PDAC 为 3 例(18%),另有 2 例为正常导管上皮。

2.2 ENO1 在人 PanIN 和 PDAC 组织中的表达

免疫组化结果提示,ENO1 蛋白主要表达于人

胰腺导管上皮细胞的胞浆和胞核,少量表达于细胞膜,除上皮细胞表达外,其间质中的纤维、血管壁肌层以及炎症细胞也部分表达(Figure 1A)。与人正常胰腺组织 ENO1 表达积分 5.21 ± 2.19 相比,人 PanIN 组织的 ENO1 表达积分为 9.63 ± 1.80 ,显著高于人正常胰腺组织 ($P < 0.01$);人 PDAC 组织的 ENO1 表达积分为 12.14 ± 2.71 ,显著高于人正常胰腺组织 ($P < 0.001$),人 PanIN 和 PDAC 组织之间的 ENO1 表达积分差异无统计学意义(Figure 1B)。

2.3 ENO1 在大鼠 PanIN 和 PDAC 模型组织中的表达

和造模后大鼠正常胰腺比较,ENO1 mRNA 在大鼠 PanIN 和 PDAC 组织中的表达增加,其中在 PanIN-3 ($P < 0.01$) 和 PDAC 组织 ($P < 0.001$) 中的表达增加差异有统计学意义。免疫组化结果提示,ENO1

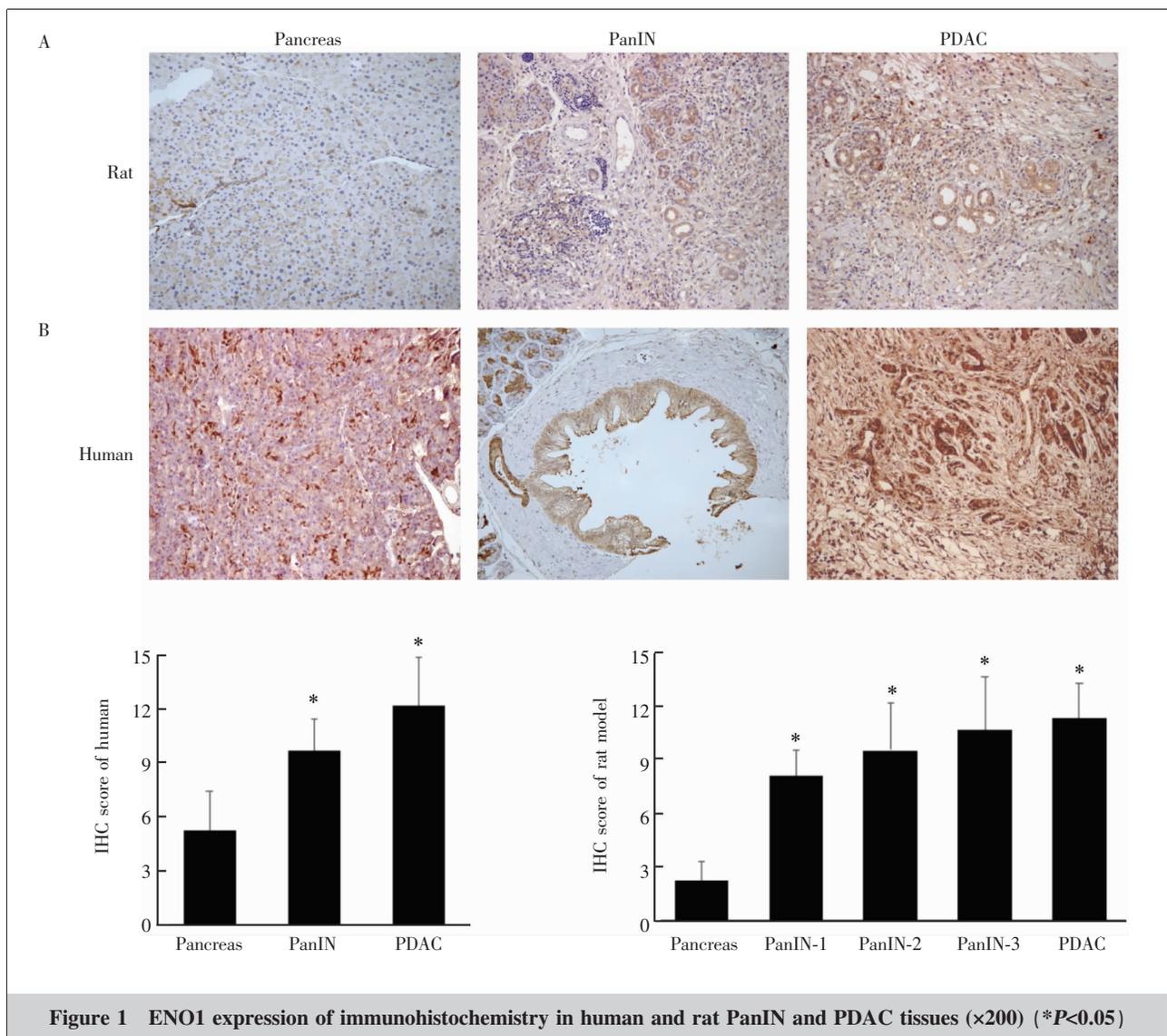
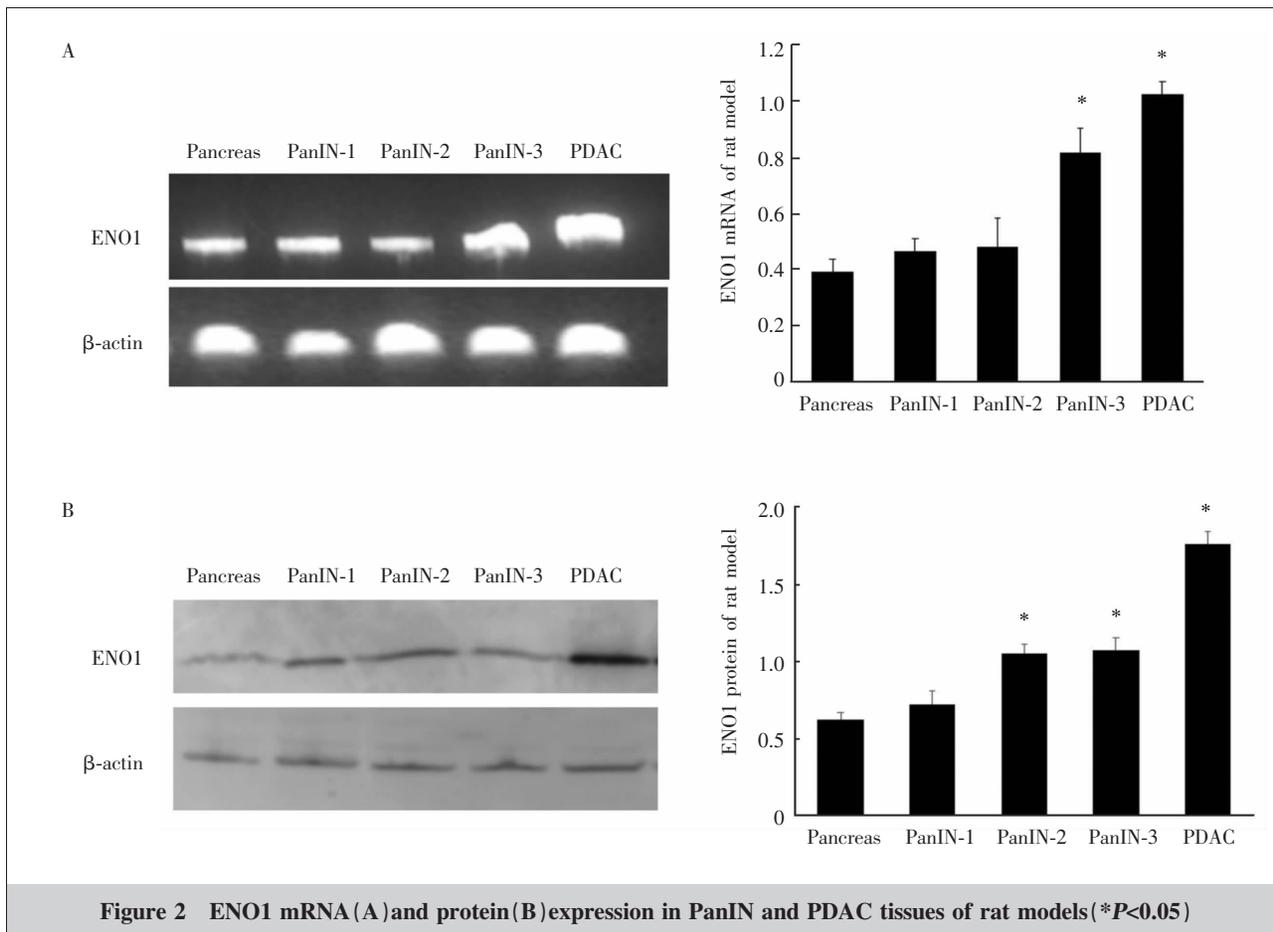


Figure 1 ENO1 expression of immunohistochemistry in human and rat PanIN and PDAC tissues ($\times 200$) ($*P < 0.05$)



蛋白主要表达于大鼠胰腺导管上皮细胞胞浆，少量表达于细胞核，同时也表达于部分炎症细胞及纤维组织。ENO1 蛋白免疫组化表达积分在正常大鼠胰腺组织较低为 1.5 ± 0.71 ，在大鼠的 PanIN-1、PanIN-2、PanIN-3 和 PDAC 组织中，ENO1 蛋白表达积分呈进行性显著升高 ($P < 0.05$) (Figure 1A, 1B)。Western-blot 结果提示与造模后大鼠正常胰腺比较，ENO1 蛋白在大鼠 PanIN-2 ($P < 0.001$)、PanIN-3 ($P < 0.01$) 和 PDAC ($P < 0.001$) 组织中表达均显著升高 (Figure 2B)。

3 讨论

80%~90%的胰腺癌为起源于胰腺导管上皮的 PDAC，近年来的研究认识到胰腺导管腺癌与胃癌、大肠癌等上皮来源的肿瘤相类似，同样具有从正常上皮到上皮过度增生，再发展到上皮不典型增生直至癌的多阶段逐级癌变的病理学过程。PanIN 的概念在 1994 年被首次提出，2003 年美国 Johns Hop-

kins 医院完整提出了 PanIN 的病理分级诊断标准：PanIN1、PanIN2、PanIN3，并得到了国际上的广泛认可，其反映了 PDAC 发生的渐进演变过程，被认为是 PDAC 最主要的癌前病变之一^[3,4]。

由于临床上确诊的 PDAC 病例绝大多数已处于中晚期，获得人的 PanIN 标本进行研究极为困难，因此需要建立符合人类 PDAC 病理生物学特征的早期胰腺导管腺癌动物模型。在本研究中，我们采用了前期建立的 DMBA 胰腺局部包埋种植诱导的方法，建立了 PanIN 和早期 PDAC 大鼠模型^[8-10]。既往研究证明，大鼠 DMBA 诱导的大鼠 PanIN 和胰腺癌表达细胞角蛋白 19、20 等导管上皮细胞标志物，因此为 PDAC。同时具有高达 90% K-ras 基因突变发生率，也同时存在 p53、p16 等基因突变，并且不诱导其他脏器肿瘤，可以较好的模拟人 PDAC 的发生发展过程^[11-14]。DMBA 诱导胰腺癌的具体机制目前了解并不深入，但是相关研究认为可能与 Notch 信号通路的激活，以及 smad 4、cyclin D1 等细胞信号传导有关^[15]。

ENO1 是一种多功能蛋白，目前研究发现其可

以表达于细胞表面,也可以以胞浆蛋白广泛存在,或以核 DNA 结合蛋白的形式出现。在细胞表面,ENO1 作为纤维蛋白溶酶原的受体可以激活纤维蛋白酶原系统,通过参与细胞外基质和基底膜重塑来促进肿瘤细胞侵袭和转移;还可作为一种自身抗原参与肿瘤细胞的免疫调节。在胞浆中,ENO1 作为糖酵解反应的关键酶之一参与调节细胞糖代谢过程,维持细胞 ATP 水平,保证细胞的存活及其生理功能的执行。在细胞核中,由 ENO1 基因编码的另外一种 c-myc 启动子结合蛋白(c-myc promoter binding protein-1,MBP-1),能与 C-mycP2 启动子结合,负向调控 C-myc 的表达^[5,6,16]。

我们在既往研究中利用差异蛋白质组学技术,筛选发现 ENO1 在 PDAC 的表达显著增高^[17]。其他研究也发现 ENO1 基因和蛋白在多种胰腺癌细胞株和胰腺癌组织中的表达显著增高,并且在慢性胰腺炎组织中的表达极低^[7]。在本研究中我们发现,在 DMBA 诱导的大鼠各级别 PanIN 和人 PanIN 组织中,ENO1 表达均显著增高,分别与大鼠和人 PDAC 组织的表达水平接近。由于受人 PanIN 标本来源困难所限,本研究未观察 ENO1 在人各级别 PanIN 的表达情况。

本研究结果提示 ENO1 增高是从胰腺正常上皮发展到 PDAC 过程中的早期事件,在促进 PanIN 的形成和发展中可能发挥重要作用。ENO1 参与 PanIN 发生的具体机制,干预 ENO1 表达在 PanIN 形成中无作用,需要在后续研究中进一步明确。

参考文献:

[1] Chen W,Zheng R,Baade PD,et al. Cancer statistics in China,2015 [J]. CA Cancer J Clin,2016,66(2):115-132.

[2] Chari ST,Kelly K,Hollingsworth MA,et al. Early detection of sporadic pancreatic cancer:summative review [J]. Pancreas,2015,44(5):693-712.

[3] Hruban RH,Adsay NV,Albores-Saavedra J,et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia:a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions [J]. Am J Surg Pathol,2001,25(5):579-586.

[4] Hruban RH,Takaori K,Klimstra DS,et al. An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms [J]. Am J Surg Pathol,2004,28(8):977-987.

[5] Principe M,Ceruti P,Shih NY,et al. Targeting of surface

alpha-enolase inhibits the invasiveness of pancreatic cancer cells [J]. Oncotarget,2015,6(13):11098-11113.

[6] Capello M,Ferri-Borgogno S,Riganti C,et al. Targeting the Warburg effect in cancer cells through ENO1 knock-down rescues oxidative phosphorylation and induces growth arrest [J]. Oncotarget,2016,7(5):5598-5612.

[7] Cappello P,Rolla S,Chiarle R,et al. Vaccination with ENO1 DNA prolongs survival of genetically engineered mice with pancreatic cancer [J]. Gastroenterology,2013,144(5):1098-1106.

[8] Wang L,Liu HL,Yuan P,et al. Rat model of pancreatic intraepithelial neoplasia and carcinoma induced by DMBA [J]. Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science),2008,28(2):145-147.[王磊,刘海林,袁平,等. DMBA 诱导建立大鼠胰腺上皮内瘤变和胰腺癌模型[J]. 上海交通大学学报医学版,2008,28(2):145-147.]

[9] Rivera JA,Graeme-Cook F,Werner J,et al. A rat model of pancreatic ductal adenocarcinoma;targeting chemical carcinogens [J]. Surgery,1997,122(1):82-90.

[10] Osvaldt AB,Wendt LR,Bersch VP,et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia and ductal adenocarcinoma induced by DMBA in mice [J]. Surgery,2006,140(5):803-809.

[11] Z'graggen K,Warshaw AL,Werner J,et al. Promoting effect of a high-fat/high-protein diet in DMBA-induced ductal pancreatic cancer in rats [J]. Ann Surg,2001,233(5):688-695.

[12] Wendt LR,Osvaldt AB,Bersch VP,et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia and ductal adenocarcinoma induced by DMBA in mice:effects of alcohol and caffeine [J]. Acta Cir Bras,2007,22(3):202-209.

[13] Bersch VP,Osvaldt AB,Edelweiss MI,et al. Effect of nicotine and cigarette smoke on an experimental model of intraepithelial lesions and pancreatic adenocarcinoma induced by 7,12-dimethylbenzanthracene in mice [J]. Pancreas,2009,38(1):65-70.

[14] Boros LG,Lerner MR,Morgan DL,et al. [1,2-13C2]-D-glucose profiles of the serum,liver,pancreas,and DMBA-induced pancreatic tumors of rats[J]. Pancreas,2005,31(4):337-343.

[15] Kimura K,Satoh K,Kanno A,et al. Activation of Notch signaling in tumorigenesis of experimental pancreatic cancer induced by dimethylbenzanthracene in mice [J]. Cancer Sci,2007,98(2):155-162.

[16] Song Y,Luo Q,Long H,et al. Alpha-enolase as a potential cancer prognostic marker promotes cell growth,migration,and invasion in glioma [J]. Mol Cancer,2014,13:65.

[17] Wang L,Liu HL,Li Y,et al. Proteomic analysis of pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic carcinoma in rat models[J]. World J Gastroenterol,2011,17(11):1434-1441.