

胰腺癌上调因子在卵巢癌中水平变化及其与TLR4/MyD88通路的关系

周彩虹¹ 周彩霞^{2*}

(¹山东省东营市东营区人民医院妇产科, 东营 257000; ²东营市第二人民医院妇产科, 东营 257335)

摘要 该文探讨了胰腺癌上调因子(PAUF)在卵巢癌中的表达水平, 及其与TLR4/MyD88信号通路在卵巢癌中的关系。选取2014年10月至2016年5月在我院就诊的卵巢癌患者共217例, 纳入卵巢癌组, 另随机选取同期诊断为卵巢良性肿瘤的45例患者纳入卵巢良性肿瘤组和52例健康人群纳入对照组。采用免疫组织化学染色法检测受试者卵巢组织中的PAUF、TLR4和MyD88表达水平。比较三组PAUF、TLR4和MyD88的表达水平; 分析PAUF和TLR4、MyD88之间存在的相关性; 分析卵巢癌患者中影响PAUF、TLR4和MyD88表达水平的因素。结果显示, 卵巢癌患者组织中的PAUF、TLR4和MyD88水平均显著高于良性肿瘤组和对照组($P < 0.05$); 卵巢癌组织中PAUF与TLR4表达水平呈正相关($r = 0.521$, $P < 0.001$), 且PAUF与MyD88表达也成正相关($r = 0.581$, $P < 0.001$); 卵巢癌组织PAUF水平与肿瘤种类、FIGO分期和肿瘤分化程度有关($P < 0.05$), 但与患者年龄无关($P > 0.05$); 而癌组织中TLR4水平只与肿瘤的分化程度有关($P < 0.05$), MyD88表达水平只与癌症种类有关($P < 0.05$)。由此说明, 卵巢癌患者组织中的PAUF表达水平显著升高, 与TLR4和MyD88表达成正相关。PAUF可能通过参与TLR4/MyD88信号通路, 参与了卵巢癌的发生发展。

关键词 卵巢癌; 胰腺癌上调因子; Toll样受体-4; 髓样分化因子88

The Expression Dynamics of PAUF in Ovarian Cancer and Its Relationship with TLR4/MyD88 Signaling Pathway

Zhou Caihong¹, Zhou Caixia²

(¹Obstetrics and gynecology department, The People's Hospital of Dongying District, Dongying 257000, China;

²Obstetrics and gynecology department, The Second People's Hospital of Dongying, Dongying 257335, China)

Abstract The expression dynamics of pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor (PAUF) in ovarian cancer and to explore its potential relationship with TLR4/MyD88 signaling pathway in ovarian cancer are discussed in this paper. A total of 217 patients with ovarian cancer in our hospital from October 2014 to May 2016 were involved in the ovarian cancer group. Meanwhile, another 45 patients with ovarian benign tumor were assigned into the benign group and another 52 health persons were assigned into the control group. The expression level of PAUF, TLR4 and MyD88 in the ovarian organism were measured by immunohistochemical staining (IHC). The expression level of PAUF, TLR4 and MyD88 were compared among three groups. The relationship between PAUF and TLR4 or MyD88 were analyzed. The clinical factors affecting PAUF, TLR4 and MyD88 expression were analyzed. The results indicated that PAUF, TLR4 and MyD88 were significantly highly expressed in tissues from

收稿日期: 2018-11-05 接受日期: 2019-01-28

*通讯作者。Tel: 0546-8982146, E-mail: zhoul33@163.com

Received: November 5, 2018 Accepted: January 28, 2019

*Corresponding author. Tel: +86-546-8982146, E-mail: zhoul33@163.com

网络出版时间: 2019-05-10 16:25:48

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190510.1625.024.html>

ovarian cancer group when compared to benign tumor group and control group ($P<0.05$). The positive correlation between PAUF and TLR4 ($r=0.521$, $P<0.001$) or MyD88 ($r=0.581$, $P<0.001$) were observed. PAUF expression were affected by tumor types, FIGO classification and cell differentiation ($P<0.05$). But TLR4 expression was only affected by cell differentiation ($P<0.05$) and tumor types had effect on MyD88 expression ($P<0.05$). The results indicated that PAUF was highly expressed in tissues from patients with ovarian cancer, and its expression was positively correlated with TLR4 and MyD88 expression. Thus, PAUF might be involved in TLR4/MyD88 signaling pathway in the incidence and development of ovarian cancer.

Keywords ovarian cancer; pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor (PAUF); Toll-like receptor 4 (TLR4); myeloid differentiation factor 88 (MyD88)

卵巢癌(ovarian cancer)是一种常见的妇科肿瘤,其发病率位列妇科肿瘤第三位,但由于其初期症状不明显,患者发现时往往较晚,因此其死亡率却居所有妇科肿瘤中首位^[1]。Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)是一种参与非特异性免疫的重要蛋白质,可以识别源于微生物的具有保守结构的分子,同时激活机体的免疫细胞应答。近年来的研究指出,TLR4/MyD88信号通路能够通过刺激促炎因子的释放,参与卵巢癌的发生和发展^[2]。而胰腺癌上调因子(pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor, PAUF)是一种最近发现的癌基因,其通过参与多种癌症相关的信号通路调控癌细胞的增殖、迁移等,在消化系统肿瘤和乳腺癌中都有高表达^[3],而研究也指出PAUF是TLR4的内源性受体之一^[4]。但PAUF在乳腺癌的发生和发展中的机制是否与TLR4/MyD88信号通路相关尚不清楚。所以,本次研究对健康人群、卵巢良性肿瘤和卵巢癌患者卵巢组织中PAUF、TLR4和MyD88的表达水平进行检测,探讨PAUF与TLR4/MyD88信号通路在卵巢癌中的相关性,为卵巢癌治疗提供新的研究方向。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2014年10月至2016年5月在我院就诊的卵巢癌患者共217例,年龄29~74岁,平均 54.59 ± 9.38 岁,纳入卵巢癌组。入组标准:(1)符合2016年美国肿瘤综合协作网(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)公布的《卵巢癌临床实践指南》中的卵巢癌的诊断标准^[5];(2)患者为首次发现卵巢癌;(3)患者血清标本、卵巢癌组织标本收藏完整,可用于实验,病史保存完整;(4)患者出院后有定期进行随访,资料完整。排除标准:(1)合并有输卵管癌、子

宫内膜癌、宫颈癌等其他妇科肿瘤;(2)合并有其他器官、系统严重疾病、恶性肿瘤等;(3)患者相关标本或病史不完整;(4)患者为宫颈癌复发。另外,随机选取同期以疑似卵巢肿瘤住院后经组织学检查确诊为卵巢良性肿瘤的患者45例纳入良性肿瘤组,年龄28~78岁,平均 55.22 ± 10.93 岁。另52例经组织学诊断为正常卵巢上皮组织的病例纳入对照组,年龄27~74岁,平均 54.02 ± 9.74 岁。所有受试者入组前均被告知本次研究,并签署知情同意书。本次研究经我院伦理委员会审核通过。3组受试者一般资料比较,如年龄、月经情况等,差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 免疫组织化学法检测PAUF、TLR4和MyD88蛋白表达

采取免疫组织化学染色法(Immunohistochemical staining, IHC)检测组织中PAUF、TLR4和MyD88的表达水平。一抗采用小鼠抗人PAUF多克隆抗体(Novus公司,货号MAB7777)、兔抗人TLR4多克隆抗体(StrssMarq公司,货号SPC-200D-ALP)、山羊抗人MyD88多克隆抗体(Abcam公司,货号ab28763)及兔抗人IgG多克隆抗体(Abcam公司,货号ab2410),工作浓度均为1:100。标本采用3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色法,使用TripleStain IHC试剂盒(Abcam公司,货号ab183288),严格遵循试剂盒说明书对组织切片进行染色。处理后组织切片置于光学显微镜下,以VIS(visiopharm integrator system)成像软件,在20倍镜下扫描组织切片,测定DAB染色强度得分(0~3)。总蛋白定量=染色强度得分×染色细胞的比例,总蛋白定量值范围为0~300。对每位受试者的3张组织切片进行检测,取3者的平均值为该受试者的组织PAUF、TLR4和MyD88表达水平。

1.3 RT-PCR法检测PAUF、TLR4和MyD88表达

使用软件设计PAUF、TLR4和MyD88上下游引

表1 RT-PCR过程中引物序列
Table 1 Primer sequence in RT-PCR process

基因名称 Gene name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	长度(bp) Length (bp)
<i>PAUF</i>	F: CGC TAG CTC GAT GCT GCA TCA R: CGA TGC TAC GCT TAG CGT ATG	136
<i>TLR4</i>	F: CAT GAG CGC TGA AGT GGT GA R: CGA TCG ATA ATG GTG AGA CC	149
<i>MyD88</i>	F: CGA TAG TTG GCA CGT CGT GG R: GTA GTC GAG TGC GCA TGA CA	121

物序列, 选取长度小于150 bp的片段。RNA的提取: 将各组60 mg的组织加入离心管以后, 加入Trizol试剂, 研磨后离心取上清, 后加入氯仿继续离心取上清, 加入异丙醇, 吸取上清取沉淀, 后用DEPC水溶解, 于PCR扩增仪中扩增。上样: 将50× TAE稀释为1× TAE溶液作为溶剂, 称取0.52 g琼脂糖, 加入到1× TAE溶液当中。之后微波炉加热煮沸, 后加入4 μL的核酸染料, 摇晃混匀。最后将琼脂糖凝胶水平放入电泳槽, 依次加入6 μL的 DNA maker以及目的基因PCR扩增产物, 引物序列见表1。

1.4 统计学分析

采用SPSS 22.0软件进行数据统计和分析。正态分布的计量资料采用均数±标准差的形式表示, 多组间采用One-Way ANOVA进行比较, 两两组间差异采用Tukey HSD Post-hoc检验; 非正态分布的计量资料采用秩和检验。计数资料采用频数(率)的形式表示, 组间采用卡方检验进行比较。PAUF与TLR4、MyD88的相关性采用Pearson's相关分析进行研究。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 比较三组PAUF、TLR4和MyD88蛋白表达的情况

三组受试者组织中PAUF、TLR4和MyD88表

达水平均存在显著差异($P < 0.05$)。卵巢癌患者组织中的PAUF、TLR4和MyD88水平均显著高于良性肿瘤组和对照组($P < 0.05$), 但良性肿瘤组和对照组中的PAUF、TLR4及MyD88表达水平未见显著异常($P > 0.05$)(表2)(图1)。

2.2 比较三组PAUF、TLR4和MyD88 mRNA表达情况

三组受试者组织中PAUF、TLR4和MyD88 mRNA表达水平均存在显著差异($P < 0.05$)。卵巢癌患者组织中的PAUF、TLR4和MyD88 mRNA水平均显著高于良性肿瘤组和对照组($P < 0.05$), 但良性肿瘤组和对照组中的PAUF、TLR4及MyD88表达水平未见显著异常($P > 0.05$)(表3)。

2.3 卵巢癌组织中PAUF和TLR4、MyD88表达水平的相关性

卵巢癌组织中PAUF与TLR4表达水平呈正相关($r = 0.521, P < 0.001$), 且PAUF与MyD88表达也成正相关($r = 0.581, P < 0.001$)(图2和图3)。

2.4 卵巢癌组PAUF、TLR4和MyD88表达水平与患者临床病理参数的关系

卵巢癌组织PAUF水平与肿瘤种类、FIGO分期和肿瘤分化程度有关($P < 0.05$), 但与患者年龄无关($P > 0.05$)。而癌组织中TLR4水平只与肿瘤的分化程度有关($P < 0.05$), MyD88表达水平只与癌症种类有

表2 PAUF、TLR4和MyD88在三组受试者组织中表达水平的比较
Table 2 Comparison of expression levels of PAUF, TLR4 and MyD88 in tissues

名称 Name	卵巢癌组($n=217$) Ovarian cancer group ($n=217$)	良性肿瘤组($n=45$) Benign tumor group ($n=45$)	对照组($n=52$) Control group ($n=52$)	F 值 F value	P 值 P value
PAUF	174.86±24.38 [#]	117.83±25.67	115.77±38.01	152.53	<0.001
TLR4	143.84±25.11 [#]	84.10±15.68	85.71±6.68	241.95	<0.001
MyD88	141.49±19.17 [#]	85.65±10.83	85.39±9.82	365.16	<0.001

* $P < 0.05$, 与对照组相比; [#] $P < 0.05$, 与良性肿瘤组相比。

* $P < 0.05$ compared with the control group; [#] $P < 0.05$ compared with the benign tumor group.

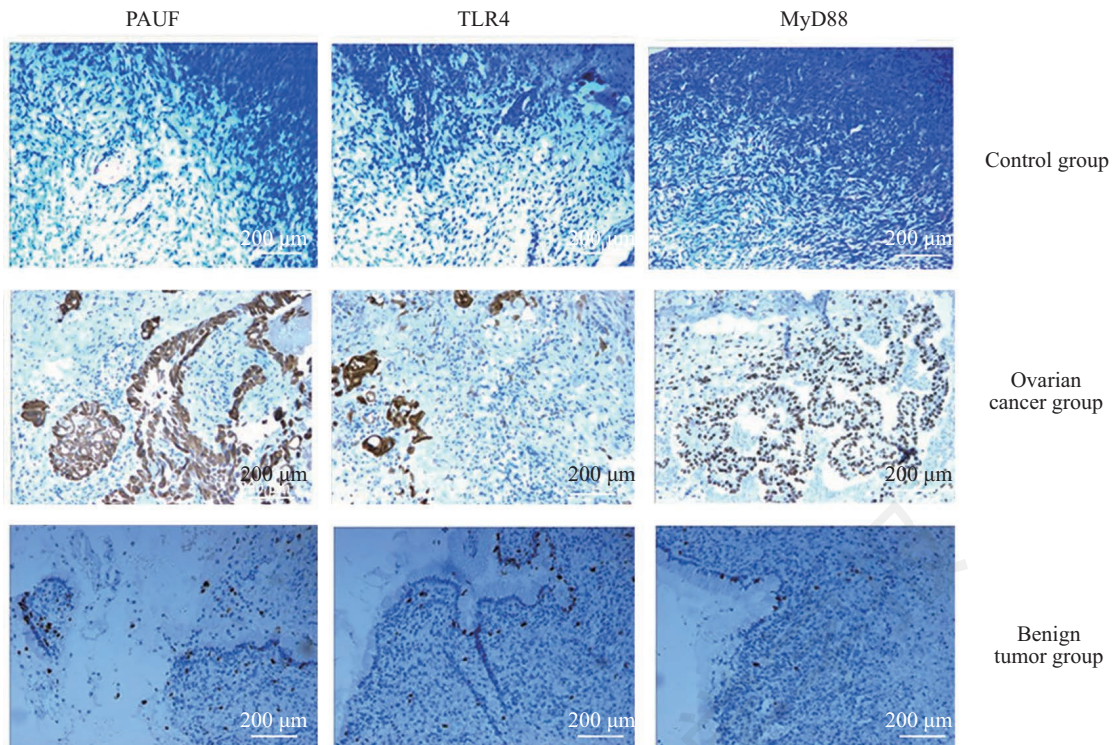


图1 三组PAUF、TLR4和MyD88免疫组织化学染色结果图

Fig. 1 Immunohistochemical staining results of PAUF, TLR4 and MyD88 in three groups

表3 PAUF、TLR4和MyD88 mRNA在三组受试者组织中表达水平的比较

Table 3 Comparison of expression levels of PAUF, TLR4 and MyD88 mRNA in tissues

名称	卵巢癌组(n=217)	良性肿瘤组(n=45)	对照组(n=52)	F 值	P 值
Name	Ovarian cancer group (n=217)	Benign tumor group (n=45)	Control group (n=52)	F value	P value
PAUF	14.32±3.33* [#]	6.11±1.23	5.62±1.06	200.95	<0.001
TLR4	7.36±0.72* [#]	2.01±0.41	2.12±0.44	129.62	<0.001
MyD88	9.52±2.85* [#]	3.06±0.76	2.94±0.63	152.53	<0.001

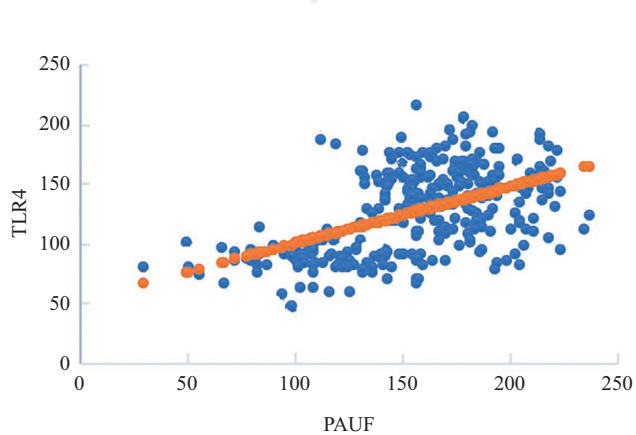
* $P < 0.05$, 与对照组相比; [#] $P < 0.05$, 与良性肿瘤组相比。* $P < 0.05$ compared with the control group; [#] $P < 0.05$ compared with the benign tumor group.

图2 卵巢癌组织中PAUF和TLR4表达的相关性

Fig.2 The correlation of PAUF and TLR4 expression in ovarian cancer

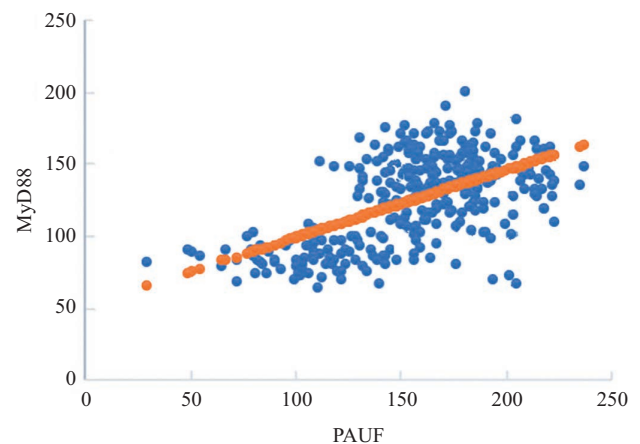


图3 卵巢癌组织中PAUF和MyD88表达的相关性

Fig.3 The correlation of PAUF and MyD88 expression in ovarian cancer

表4 卵巢癌组织PAUF、TLR4和MyD88表达水平与患者临床病理参数的关系

Table 4 Relationship between the expression of PAUF, TLR4 and MyD88 and clinical features in ovarian cancer

临床参数 Cinical parameter	样本数量 Sample number	蛋白表达水平 Protein expression level		
		PAUF	TLR4	MyD88
Age (year)				
<50	101	173.38±43.29	141.49±21.37	140.93±12.47
≥50	116	179.93±39.82	144.53±18.49	142.33±14.58
Tumor type				
Serous carcinoma	154	180.39±32.10	140.92±20.46	139.40±13.71
Others	63	170.82±22.38*	144.29±18.49	144.39±14.22*
FIGO stage				
I, II stage	139	172.09±35.19	143.48±19.83	141.37±17.47
III, IV stage	78	182.20±32.48 [#]	142.30±20.16	143.37±20.11
Differentiation degree				
Highly and moderately differentiated	97	169.33±32.94	136.59±21.03	143.58±19.36
Poorly differentiated	120	183.21±41.17 ^{&&}	146.44±19.84 ^{&&}	142.04±15.35

* $P<0.05$, 与浆液性癌组比较; [#] $P<0.05$, 与I、II期比较; ^{&&} $P<0.01$, 与高中分化组比较。

* $P<0.05$ compared with serous carcinoma group; [#] $P<0.05$ compared with I, II stage group; ^{&&} $P<0.01$ compared with Highly and moderately differentiated group.

关($P<0.05$)(表4)。

3 讨论

卵巢癌是一种非常常见的妇科肿瘤,其发病率位列所有妇科肿瘤第三。早期卵巢癌的治疗效果较好,五年生存率可达80%以上,但由于该病发病初期无明显的症状,多数患者往往发现时都已处于较晚的临床分期,治疗效果和预后较差,统计表明晚期卵巢癌患者的生存率仅为20%左右^[6-7]。

PAUF是一种近来新发现的癌基因,其最早被发现于胰腺癌组织中有高表达,因而得名^[8]。近期的研究表明,除了胰腺癌,PAUF在消化道肿瘤(包括胃癌、结肠癌等)、乳腺癌等肿瘤中都有明显高表达^[9-10]。研究表明,PAUF通过激活多种信号通路调控癌细胞的增殖、黏附、迁移等生物活动。PAUF可以激活CXCR4信号通路增强胰腺癌细胞的迁徙能力,其亦可活化 β -catenine信号通路促进癌细胞的增殖^[11]。此外,PAUF还可通过激活TLR2、TLR4介导的MEK/ERK信号通路促进肿瘤细胞的合成^[12]。TLR2和TLR4都属于Toll样受体,是一组模式识别受体,能够与微生物的某些保守序列特异性结合,激活之后的信号通路,通过信号级联放大,启动机体的特异性免疫应答。TLR蛋白的信号通路传导途径主要分为两种,以是否需要MyD88作为区分,分为

MyD88依赖途径和MyD88非依赖途径。大部分的TLR蛋白均通过MyD88依赖途径进行信号传导,从而激活NF- κ B和MAPK信号通路,参与调节细胞增殖、分化、凋亡等生物学活动^[13]。既往的研究表明,TLR蛋白,特别是TLR4以及MyD88均在卵巢组织中显著高表达;且TLR4/MyD88通路与卵巢癌紫杉醇耐药机制有直接的关系^[14]。实验证实,敲除TLR4能够增强紫杉醇对MyD88⁺卵巢癌细胞的杀伤作用^[15]。

我们的研究结果证实,PAUF作为TLR4的一种内源配体,在卵巢癌组织中的表达水平显著增高。这提示,PAUF也参与了卵巢癌的发生和发展。因此,我们进一步研究了PAUF的表达水平与TLR4/MyD88信号通路的关系,结果显示,在卵巢癌组织中,PAUF表达与TLR4和MyD88表达呈正相关,提示PAUF在卵巢癌中对TLR4/MyD88信号通路起到正向调节作用。相关基础研究证实,在树突细胞中,PAUF通过TLR通路激活细胞成熟,PAUF还能促进成熟树突细胞产生IL-23等炎症因子^[12]。另一方面,我们的研究结果提示,TLR4和MyD88表达与卵巢癌的FIGO分期和分化程度无关,但PAUF表达水平能够一定程度上预测卵巢癌的FIGO分期和肿瘤细胞分化程度。与TLR4或MyD88相比,PAUF可能是一个更好的肿瘤生物学预测指标。在未来的研究中,我们希望通过激活或抑制卵巢癌细胞中PAUF的表

达, 检测PAUF在卵巢癌细胞增殖、分化、迁移、凋亡等中的作用以及PAUF在卵巢癌化疗耐药性机制中的影响, 寻找改善卵巢癌化疗耐药性的作用靶点, 为卵巢癌的治疗提供新的方向。

综上所述, 卵巢癌患者组织中的PAUF表达水平显著升高, 与TLR4和MyD88表达呈正相关, 且卵巢癌患者PAUF的表达水平与肿瘤类型、FIGO分期和癌细胞分化程度均有关。PAUF可能通过参与TLR4/MyD88信号通路, 参与了卵巢癌的发生和发展, 但具体机制还需要进一步的基础研究来阐明。

参考文献 (References)

- 1 Di Lorenzo G, Ricci G, Severini GM, Romano F, Stefania Biffi F. Imaging and therapy of ovarian cancer: clinical application of nanoparticles and future perspectives. *Theranostics* 2018; 8(16): 4279-94.
- 2 Block MS, Vierkant RA, Rambau PF, Winham SJ, Wagner P, Traficante N, *et al.* MyD88 and TLR4 expression in epithelial ovarian cancer. *Mayo Clin Proc* 2018; 93(3): 307-20.
- 3 Cho JH, Kim SA, Park SB, Kim HM, Song SY. Suppression of pancreatic adenocarcinoma upregulated factor (PAUF) increases the sensitivity of pancreatic cancer to gemcitabine and 5FU, and inhibits the formation of pancreatic cancer stem like cells. *Oncotarget* 2017; 8(44): 76398-407.
- 4 Song J, Lee J, Kim J, Jo S, Kim YJ, Baek JE, *et al.* Pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor (PAUF) enhances the accumulation and functional activity of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in pancreatic cancer. *Oncotarget* 2016; 7(32): 51840-53.
- 5 Morgan RJ Jr, Armstrong DK, Alvarez RD, Bakkum-Gamez JN, Behbakht K, Chen LM, *et al.* Ovarian cancer, version 1.2016, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2016; 14(9): 1134-63.
- 6 Baek MH, Kim DY, Kim SO, Kim YJ, Park YH. Impact of beta blockers on survival outcomes in ovarian cancer: a nationwide population-based cohort study. *J Gynecol Oncol* 2018; 26(6): e82.
- 7 Laufleur J, Hefler-Frischmuth K, Grimm C, Schwameis R, Gensthaler L, Reiser E, *et al.* Prognostic value of serum creatinine levels in patients with epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res* 2018; 38(9): 5127-30.
- 8 Song H, Song J, Kim YJ, Jeong HH, Min HJ, Koh SS. DCPPI is the mouse ortholog of human PAUF that possesses functional analogy in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 493(4): 1498-503.
- 9 Sasahira T, Kurihara M, Nishiguchi Y, Nakashima C, Kirita T, Kuniyasu H. Pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor has oncogenic functions in oral squamous cell carcinoma. *Histopathology* 2017; 70(4): 539-48.
- 10 Choi CH, Chung JY, Park HS, Jun M, Lee YY, Kim BG, *et al.* Pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor expression is associated with disease-specific survival in cervical cancer patients. *Hum Pathol* 2015; 46(6): 884-93.
- 11 Gao CC, Xu XL, Li F, Gong BG, Liu S, Cui YQ, *et al.* Silencing pancreatic adenocarcinoma upregulated factor (PAUF) increases the sensitivity of pancreatic cancer cells to gemcitabine. *Tumour Biol* 2016; 37(6): 7555-64.
- 12 Kang TH, Kim YS, Kim S, Yang B, Lee JJ, Lee HJ, *et al.* Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor serves as adjuvant by activating dendritic cells through stimulation of TLR4. *Oncotarget* 2015; 6(29): 27751-62.
- 13 Li J, Yang F, Wei F, Ren X. The role of toll-like receptor 4 in tumor microenvironment. *Oncotarget* 2017; 8(39): 66656-67.
- 14 Li Z, Block MS, Vierkant RA, Fogarty ZC, Winham SJ, Visscher DW, *et al.* The inflammatory microenvironment in epithelial ovarian cancer: a role for TLR4 and MyD88 and related proteins. *Tumour Biol* 2016; 37(10): 13279-86.
- 15 Cai G, Ma X, Chen B, Huang Y, Liu S, Yang H, *et al.* Galecin-3 induces ovarian cancer cell survival and chemoresistance via TLR4 signaling activation. *Tumour Biol* 2016; 37(9): 11883-91.