

· 临床研究 ·

hENT-1 表达水平对胰腺癌吉西他滨辅助化疗的影响

陈垚宇¹, 王 喆², 王 昭², 荆 鑫², 张 强²

(1. 珠海市人民医院 普通外科, 广东 珠海 519000; 2. 内蒙古医科大学附属医院 肝胆胰脾外科)

摘要:目的:本研究探讨胰腺癌hENT-1表达水平对吉西他滨辅助化疗的影响。方法:利用胰腺癌组织切片,行hENT-1免疫组织化学实验,针对其染色强度、范围计算评分。追踪回访对应患者的预后情况后行统计学分析。结果:hENT-1高表达组与低表达组的OS为20个月对10个月,DFS为15个月对6个月。OS的独立预后因素是hENT-1表达水平、淋巴转移情况和病理分级。DFS的独立预后因素是hENT-1表达水平和病理分级。病人之间临床资料与hENT-1表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:胰腺癌细胞中hENT-1的表达水平可能影响吉西他滨辅助化疗敏感性,hENT-1高表达者使用吉西他滨辅助化疗后的OS及DFS较低表达者长。

关键词:人类平衡型核苷转运体-1;胰腺癌;吉西他滨;化疗

中图分类号:R735.9

文献标识码:B

文章编号:2095-512X(2021)06-0580-05

全世界每年因为胰腺癌而死亡的人数大于200,000例^[1]。我国最新的统计报告指出,每年发病人数接近10万人,其中男性和女性分别约为5.4万人和4.1万人。而死亡人数更达到了8.4万,男性约为4.8万和女性约为3.6万^[2]。其进展快且隐匿,许多病人发病早期没有任何症状,一旦出现腹痛、黄疸、贫血等症状时,病情可能达到晚期,从而丧失根治性手术机会,超过半数患者无法接受根治手术^[3]。由于该病恶性度高、预后极差,为防止癌细胞残留或癌症复发,术后应采取辅助化疗。临床上通常选用较5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)副作用少的吉西他滨(Gemcitabine, GEM)进行辅助化疗^[4,5]。随着临床应用,人们逐渐发现GEM辅助化疗个体间的效果不尽相同。一些胰腺癌组织对GEM化疗敏感性欠佳,可能导致部分病人仅获得有限的效果。因为hENT-1是介导GEM进入肿瘤细胞的主要运载体,所以部分学者认为其表达水平可能影响GEM辅助化疗敏感性^[6]。

人类平衡型核苷转运体-1(Human equilibrative nucleoside transporter-1, hENT-1)是具有疏水 α -螺旋结构的跨膜蛋白^[7,8]。该转运体除在许多正常组织中分布外,亦在肿瘤中差异表达^[21-25]。它不

仅帮助转运人体基本生理生化反应过程中所需物质,而且具备了转运核苷类药物的能力。亲水性核苷类药物GEM不能通过被动扩散的方式穿过细胞膜,所以需要依赖hENT-1进入胞浆^[9],以发挥抑制肿瘤生长效果。

理论上GEM可显著提高胰腺癌病人的总生存期及无病生存期。但临床上其疗效却有着明显的差异,GEM敏感性差是延长病人OS和DFS的主要困难。至此,全世界学者们都在研究造成其敏感性不一的原因。可惜,时至今日,有关hENT-1是否影响胰腺癌GEM辅助化疗敏感性的研究结论并未形成统一。如Farrell^[6]认为hENT-1表达水平与胰腺癌GEM辅助化疗敏感性相联系,可影响病人的OS以及DFS。但是,Poplin^[10]等学者则认为hENT1低表达对GEM化疗敏感性无影响,病人之间的OS未见明显差异。由于国内有关hENT-1的研究缺乏,且此研究区域暂无有关文献,故此次研究具有一定意义。

笔者对近5年附属医院胰腺癌GEM辅助化疗的患者采取回顾性分析,并经免疫组织化学手段测定胰腺癌组织中hENT1的表达水平,最后对相应预后情况作出对比分析。

收稿日期:2021-10-20;修回日期:2021-12-16

基金项目:内蒙古自治区自然科学基金项目(2019MS08013)

作者简介:陈垚宇(1992-)男,珠海市人民医院普外科住院医师。

通讯作者:张强,主任医师,E-mail: zhan.sk@qq.com 内蒙古医科大学附属医院肝胆胰脾外科,010050

1 试剂与仪器

1.1 试剂

PBS缓冲液、DAB显色液、中性树胶、乙醇、修复液、苏木素染色剂、兔多克隆抗hENT-1抗体等。

1.2 仪器

切片机、烤片机、展片台、光学显微镜、显微镜摄像系统、冰箱、温箱。

1.3 组织标本

近5年附属医院55例胰腺导管腺癌切片。

2 病例收集及观察指标

2.1 实验对象

入选标准:(1)行胰腺癌根治术后,病理学诊断为导管腺癌;(2)未行新辅助放、化疗;(3)经GEM为主辅助化疗;(4)满足免疫组织化学手段标本;(5)临床资料,如年龄、性别、民族、饮酒情况、肿瘤位置、肿瘤大小、病理级别、TNM分期、术式无明显缺失;(6)无较为严重的并发症;(7)随访至2020.01.01。

排除标准:(1)患有严重心、肺、脑、肾、免疫缺陷等基础疾病;(2)肿瘤晚期或TxNxM1,无法行根治术;(3)病人失访或拒绝规律随访病情。

2.2 观察指标

(1)经免疫组化后hENT-1的染色强度、范围;(2)总体生存期和无病生存期;(3)年龄、性别、民族等情况;(4)肿瘤位置及直径、术式、病理级别、TNM分期。

3 实验方法

3.1 制作胰腺癌切片

3.2 免疫组化染色

按顺序进行:脱蜡→水化→抗原修复→去除内源性过氧化物酶→封闭→孵育一抗→孵育二抗→DAB显色→苏木素复染→分化→返蓝→脱水→透明→封片。

3.3 免疫组织化学评分

将染色强度分为4级,利用同一切片中淋巴细胞的着色度进行标准化,3分即强着色,肿瘤细胞的染色程度高于淋巴细胞;2分即中等着色,两种细胞染色程度一致;1分即浅着色,肿瘤细胞的染色程度

弱于淋巴细胞;0分即无着色。而染色范围计分即评估单张切片范围内着色的肿瘤细胞占该切片总肿瘤细胞的比例,4分:>50%阳性,3分:26%~50%阳性;2分:11%~25%阳性;1分:≤10%阳性;0分:细胞呈阴性或比例<1%。最终,hENT-1染色水平评分由上述两项相加,强阳性(++):>7分;阳性(+):5~6分;弱阳性(+ -):3~4分;阴性(-):<2分。低表达组由阴性及弱阳性组组成,高表达组则由阳性及强阳性组组成。

4 医学统计学分析

利用统计学软件SPSS 20.0分析,正态分布数值以($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料采用方差分析或 t 检验。而计数资料应用卡方检验以及Fisher精确检验(当期期望值<5时)。以Kaplan-Meier生存曲线分析OS和DFS与hENT-1表达水平的相关性。病人的独立预后因素分别以Log-rank检验及Cox regression模型进行分析。检验水准为 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 即差异存在统计学意义。

5 结果

5.1 hENT-1表达水平与病人预后的单因素生存分析

经Kaplan-Meier分析后示,hENT-1高表达组与低表达组的中位OS分别是20个月对10个月(见图1),而DFS是15个月对6个月(见图2)。hENT-1高表达组的OS及DFS明显优于低表达组。

5.2 hENT-1表达水平与病人预后的多因素生存分析

经Cox regression分析临床资料中的变量后,其结果表明OS的独立预后因素是hENT-1表达水平、病理级别和淋巴转移情况($P < 0.05$)。DFS的独立预后因素是hENT-1表达水平和病理级别($P < 0.05$)。

5.3 临床资料与hENT-1表达水平

hENT-1表达水平分别与计量资料(病人年龄、肿瘤直径)经 t 检验后,暂无统计学意义($P > 0.05$),以及与计数资料(性别、民族、饮酒情况、肿瘤位置和病理等级)行 χ^2 检验差异无统计学意义($P > 0.05$)。因此,临床资料与hENT-1蛋白表达水平无相关性,暂不能认为其对hENT-1表达水平有影响。

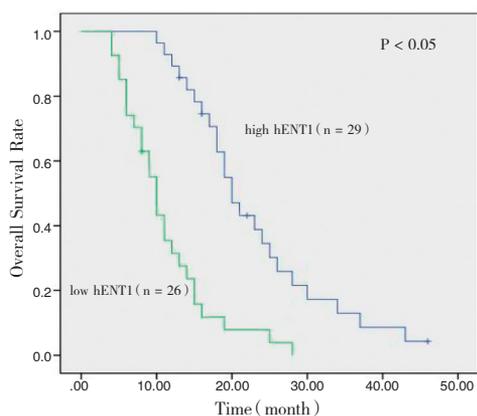


图1 hENT-1 表达水平与 OS 的 KM 生存曲线

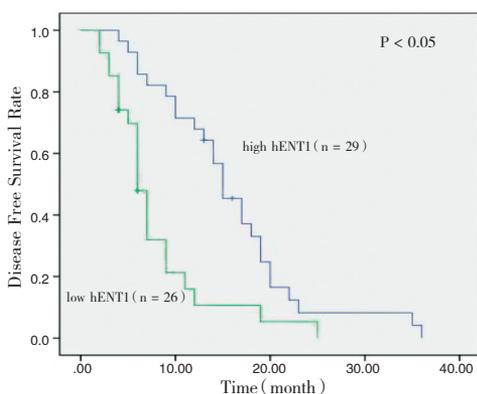


图2 hENT-1 表达水平与 DFS 的 KM 生存曲线

6 讨论

指南指出^[12], GEM 是胰腺癌辅助化疗的一线药物。基本生命功能平稳的病人术后应积极使用 GEM 辅助化疗。但是, 化疗前未知 GEM 化疗敏感情况时, 很难制订最佳的化疗方案。若有标记物能够预测胰腺肿瘤对 GEM 辅助化疗敏感性, 可为化疗药物选择提供思路, 从而制订个体治疗方案。本研究发现 hENT-1 高表达病人比低表达病人使用 GEM 辅助化疗生存期更长、敏感性更高, 对 GEM 耐药的可能性更低。而且, 在 GEM 辅助化疗下, 其 OS 的独立预后因素是 hENT-1 表达水平、病理级别和淋巴转移情况 ($P < 0.05$)。而 DFS 的独立预后因素是 hENT-1 表达水平和病理级别 ($P < 0.05$)。因此根据 hENT-1 表达水平预测胰腺癌术后 GEM 辅助化疗效果有一定意义。但是, 过往研究表明有争议发生。Faell^[6]等学者发现 GEM 组 hENT-1 表达与病人 OS 和 DFS 相关, 而 5-FU 组则未见相关性, 但该实验将免疫组化染色结果分为 3 个等级, 即 $> 50\%$ 肿瘤细

胞染色的为高染色; $< 50\%$ 染色者为无染色; 介于两者之间的为低染色。但上述分级方法忽略了染色强度深浅的情况。几年后, Marechal 等^[13]也发现接受 GEM 化疗的病人, hENT-1 高表达与更长的生存期显著相关 ($HR\ 0.34, P < 0.05$), 而未接受辅助化疗的病人以及其他化疗组无上述情况。而且, hENT-1 是 GEM 辅助化疗预后的独立影响因素。由于胰腺癌复发率高, 术后基本生命功能平稳的病人鲜有不进行辅助化疗的, 且不接受辅助化疗病人无法追踪, 所以本研究无法构建非化疗组, 该方向研究需等待下一阶段进行。Marechal^[13]及 Oba^[15]都认为 hENT-1 高表达病人更应选择 GEM 行辅助化疗, 因为高表达者获益更多。对于 hENT-1 低表达的病人, 有学者^[14]认为不应采取 GEM 作为化疗方案的主要药物, 因为低表达的病人术后使用 GEM 化疗所获得的效果欠佳。而 5-FU 相比之下具有更好的获益, 并且 ESPAC-3 试验^[14]亦证实这一点。

虽然 hENT-1 表达水平与胰腺癌 GEM 辅助化疗疗效具有相关性的观点获得以上研究支持, 但仍有不少学者对此作出反对。如 Fisher 等^[16]指出在 GEM 辅助化疗中, hENT-1 高表达水平者与 OS 无关, 无法作为主要标记物来预测该药化疗敏感性。Ormanns 等^[11]则利用 AIO-PK0104 的临床资料进行两次实验, 所有结果均无法支持 hENT-1 可以作为预测性生物标记物。除此之外, 一些学者^[17, 18]甚至怀疑 hENT-1 表达与 GEM 敏感性存在差异可能与免疫组化中所选择的 hENT-1 抗体种类有关, 如 SP120 兔抗体对测定的 hENT-1 表达水平可能存在缺陷。针对该情况, Kalloger 等^[19]认为 10D7G2 单克隆抗体和 SP120 多克隆抗体, 均可检测出 hENT-1 的表达水平。而且, 两者可相互补充某种有意义的信息, 令研究对象分层更加全面, 如疗效的分层。

本研究探讨胰腺癌 hENT-1 表达水平对吉西他滨辅助化疗的影响, 所入组的病人均接受胰腺癌根治术, 并排除了其他明显影响生存期的疾病。笔者认为同时使用 10D7G2 单克隆抗体和 SP120 多克隆抗体进行测定可以更全面地对病人 hENT-1 表达水平作出准确的评估。但是由于 10D7G2 国内无大量生产, 以至获取困难, 故本次研究仅选用 SP120 多克隆抗体。本次染色评分综合染色强度及范围, 可大大减少因显色条件差而产生的误判, 临床上采用该方法具有确切意义。本次研究所覆盖到的范围有限, 无法对全国不同地区人群展开研究。今后仍需各位学者进行更深一步探研。

7 结论

hENT-1 表达水平与 GEM 辅助化疗预后相关。hENT-1 高表达的病人比低表达者有更长的 OS 和 DFS, 说明高表达者的 GEM 敏感性更高。检测 hENT-1 表达水平具有预测吉西他滨疗效的意义。hENT-1 表达水平和病理级别共同影响病人的 OS 和 DFS, 却互不牵涉, 其机制暂不明确。年龄、性别、肿瘤位置及大小、术式、TNM 分期等暂未发现对 hENT-1 表达水平造成影响。

参考文献

- [1]Kamisawa T, Wood, Laura D, et al. Pancreatic cancer[J]. *Lancet*, 2016; **388**(10039):73-85
- [2]Zhang S, Sun K, Zheng R, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2015[J]. *Journal of the National Cancer Center*, 2021; **1**(1):2-11
- [3]李勃, 郭世伟, 蒋慧, 等. 胰腺癌手术切缘共识与争议[J]. *中国实用外科杂志*, 2019; **39**(09):983-987
- [4]Kurt E, Kurt M, Kanat O, et al. Phase II study of induction chemotherapy with gemcitabine plus 5-fluorouracil followed by gemcitabine-based concurrent chemoradiotherapy for unresectable locally advanced pancreatic[J]. *Cancer*. 2015; **92**(6):481-486
- [5]Ying K, Lei L, Tingting Z, et al. The progress of medical therapy in advanced pancreatic cancer[J]. *Journal of Modern Oncology*, 2015; **23**(11):1603-1606
- [6]Farrell JJ, Elsaleh H, Garcia M, et al. Human Equilibrative nucleoside transporter 1 levels predict response to gemcitabine in patients with pancreatic cancer[J]. *Gastroenterology*, 2009; **136**(1):187-95
- [7]Young JD, Yao SYM, Sun L, et al. Human equilibrative nucleoside transporter (ENT) family of nucleoside and nucleobase transporter proteins[J]. *Xenobiotica*, 2008; **38**(7):995-1021
- [8]Sundaram, M. Topology of a Human Equilibrative, Nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-sensitive Nucleoside Transporter (hENT1) Implicated in the Cellular Uptake of Adenosine and Anti-cancer Drugs[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001; **276**(48):45270-45275
- [9]Mackey JR, Mani RS, Selner M, et al. Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines[J]. *Cancer Research*, 1998; **58**(19):4349-4357
- [10]Poplin E, Wasan H, Rolfe L, et al. Randomized, multicenter, phase II study of CO-101 versus gemcitabine in patients with metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma: including a prospective evaluation of the role of hENT1 in gemcitabine or CO-101 sensitivity[J]. *J Clin Oncol*. 2013; **31**(35):4453-4461
- [11]Ormanns S, Heinemann VRaponi M. Human equilibrative nucleoside transporter 1 is not predictive for gemcitabine efficacy in advanced pancreatic cancer: translational results from the AIO-PK0104 phase III study with the clone SP120 rabbit anti body[J]. *Eur J Cancer*. 2014; **50**(11):1891-1899
- [12]Tempero MA, Malafa MP, Al HM, et al. Pancreatic adenocarcinoma, version 2.2017: clinical practice guidelines in oncology[J]. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, 2017; **15**(8):1028-1061
- [13]Marechal R, Bachet JB, Mackey JR, et al. Levels of gemcitabine transport and metabolism proteins predict survival times of patients treated with gemcitabine for pancreatic adenocarcinoma[J]. *Gastroenterology*. 2012; **143**(3):664-741
- [14]Greenhalf W, Ghaneh P, Neoptolemos JP, et al. European study group for pancreatic cancer. Pancreatic cancer hENT1 expression and survival from gemcitabine in patients from the ESPAC-3 trial[J]. *J Natl Cancer Inst*. 2014; **106**(1):1-10
- [15]Oba A, Ban D, Kifimura S. Clinical application of the biomarkers for the selection of adjuvant chemotherapy in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2016; **23**(8):480-488
- [16]Fisher SB, Patel SH, Bagci P, et al. An analysis of ERCC1, hENT1, RRM1 and RRM2 expression in resected pancreas adenocarcinoma: Implications for adjuvant treatment[J]. 2012; **30**(4_suppl):206
- [17]Sinn M, Riess H, Sinn BV, et al. Human equilibrative nucleoside transporter 1 expression analysed by the clone SP 120 rabbit antibody is not predictive in patients with pancreatic cancer treated with adjuvant gemcitabine- Results from the CONKO-001 trial[J]. *European Journal of Cancer*, 2015; **51**(12):1546-1554
- [18]Svrcek M, Jerme C, Raphael M, et al. hENT1 testing in pancreatic ductal adenocarcinoma: a comparison between the murine and the rabbit antibodies[J]. *Histopathology*, 2014; **66**(3):77-79
- [19]Kalloger SE, Riazy M, Tessier CB, et al. A predictive analysis of the SP120 and 10D7G2 antibodies for human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) in pancreatic ductal adenocarcinoma treated with adjuvant gemcitabine[J]. *The Journal of Pathology: Clinical Research*, 2017; **3**(3):179-190
- [20]Shimakata T, Kamoshida S, Kawamura J, et al. Immunohistochemical expression profiles of solute carrier transporters in alpha-fetoprotein-producing gastric cancer[J]. *Histopathology*, 2016; **69**(5):812-821
- [21]Liu Y, Zuo T, Zhu X, et al. Differential expression of hENT1 and hENT2 in colon cancer cell lines[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2017; **16**(1):270-276

穴位埋线主要的功能就是可以延长针刺的刺激时间^[11],起到“深邪远痹,深而留之”的作用。我们的研究结果显示,电针联合穴位埋线,可以有效延长对穴位的刺激时间^[12,13]。增加大脑的刺激信号,有助于脑部运动功能的重组,这可以加快病人脑部皮质的功能的恢复,促进蛋白合成和血管的生成,对于病人的下肢功能恢复有很大的帮助。国内学者王在意等^[14]认为,穴位埋线的主要机制为:(1)对穴位起到双重刺激的作用,延长作用时间;(2)可以促进身体的营养代谢;(3)改善炎症,调节局部血液循环;(4)穴位埋线可以在脑部重新建立兴奋区域,对病灶产生良性诱导。

此外,穴位的选择也是至关重要的。在本研究中主要取髌关、足三里、三阴交、太冲几个穴位进行治疗。髌关穴为足阳明胃经之要穴,主要可以促进下肢血气的运行。相比较单纯的电针治疗,穴位埋线的方法可以延长穴位的刺激时间,利于其下肢关键肌兴奋度的恢复。表面肌电图值不仅可以用于评估肌力,还可用于肢体运动功能测试及功能评价^[15,16]。

我们的研究也存在一定的局限性,研究的样本量较小、研究设计不是随机对照研究,这些都会对研究结果产生一定的影响。

4 结论

综上所述,电针联合穴位埋线相比单独电针疗法可以更有效改善脑卒中病人早期下肢运动功能的恢复,对脑卒中病人的康复治疗意义深远,值得临床进一步研究。

参考文献

- [1]南登崑.康复医学[M].北京:人民卫生出版社,2008,161
[2]王茂斌.脑卒中的康复医疗[M].北京:中国科学技术出版社,

2006,2-4

- [3]吴碧雯.巨刺法治疗脑卒中的系统评价[D].杭州:浙江中医药大学,2018
[4]甘佳乐,徐武清,刘敬霞,等.中医药治疗脑梗死研究进展[J].吉林中医药,2016;36(02):214-216
[5]庄朝安,叶晓倩,徐颖,等.应用德尔菲法筛选脑卒中肢体运动功能障碍适宜针刺穴组[J].世界中医药,2017;12(2):414-416
[6]中华医学会神经病学分会,中华神经外科学分会.各类脑血管疾病诊断要点[J].中华神经科杂志,1996;29(6):379-380
[7]国家中医药管理局脑病急症协作组.中风病诊断与疗效评定标准(试行)[J].北京中医药大学学报,1996;19(1):55-56
[8]Teasell R, Bitensky J, Salter K, et al. The role of timing and intensity of rehabilitation therapies[J].Top Stroke Rehabil, 2005;12(3):46-57
[9]Prado-Medeiros CL, Sousa CO, Souza AS, et al. Effects of the addition of functional electrical stimulation to groundlevel gait training with body weight support after chronic stroke[J].Rev Bras Fisioter, 2011;15(6):436-444
[10]张大威,叶祥明,林坚,等.下肢任务导向性训练对慢性期脑卒中患者步行能力的影响[J].中国康复医学杂志,2011;26(8):768-770
[11]姜军作,刘志诚.穴位埋线疗法的临床和机理研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2009;11(03):31-34
[12]王晓燕,鲁斌.穴位埋线疗法临床研究新进展[J].中医药导报,2015;21(22):92-95
[13]刘洁石,臧敬,乔彩虹.穴位埋线技术的发展暨与传统针刺对比[J].中国实用医药,2009;4(31):216-217
[14]王在意,周爱珍.穴位埋线疗法临床应用概述[J].辽宁中医药大学学报,2008;10(12):181-182
[15]周思红.离心收缩训练对肌肉力量和肌电图RMS脑值的影响[J].西安体育学院学报,2005(06):62-65+79
[16]侯文生,许蓉,郑小林,等.握力大小与前臂肌肉表面肌电活动模式的相关性研究[J].航天医学与医学工程,2007(04):264-268

(上接第 583 页)

- [22]Olaussen KA. Predictors of chemotherapy efficacy in non-small-cell lung cancer: a challenging landscape[J]. Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology, 2016;27(11):2004-2016
[23]Zhao HB, Zhang XF, Shi F, et al. Comparison of the expression of human equilibrative nucleotide transporter 1 (hENT1) and ribonucleotide reductase subunit M1 (RRM1) genes in seven

non-Hodgkin lymphoma cell lines[J]. Genetics and molecular research: GMR, 2016;15(2):1-2

- [24]Vincenzi B, Stacchiotti S, Collini P, et al. Human equilibrative nucleoside transporter 1 gene expression is associated with gemcitabine efficacy in advanced leiomyosarcoma and angiosarcoma[J]. British journal of cancer, 2017;117(3):340-346