

胰腺神经内分泌肿瘤术后预后不良与PGAM1表达水平的相关性研究

夏武政¹, 曾聪², 林叶¹, 侯宝华¹, 简志祥¹

(1. 广东省人民医院普通外科、广东省医学科学院, 广州 510080;
2. 华南师范大学医院, 广州 510630)

[摘要] **目的** 检测PGAM1在胰腺神经内分泌肿瘤患者中的表达情况,评估其与临床病理特征和预后的关系。**方法** 采用免疫组化方法对71例胰腺神经内分泌肿瘤患者肿瘤组织中PGAM1免疫反应性进行检测。分别用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)和Western blot检测肿瘤标本及其癌旁正常组织(n=24)的mRNA和蛋白水平。根据PGAM1免疫染色水平将胰腺神经内分泌肿瘤患者分为两组。分析研究PGAM1表达水平与患者临床病理特征和生存率的相关性。**结果** qRT-PCR($P=0.017$)和Western blot检测均显示胰腺神经内分泌肿瘤组织中PGAM1表达水平明显高于正常胰腺组织,71例胰腺神经内分泌肿瘤标本免疫组化染色显示PGAM1蛋白主要定位于细胞质,PGAM1表达水平增高与肿瘤体积增大相关($t=3.65, P=0.025$)。Kaplan-Meier生存曲线显示,PGAM1高表达的患者总生存率($P=0.019$)和无进展生存率($P=0.049$)均较低。**结论** PGAM1高表达可能是胰腺神经内分泌肿瘤患者的一个潜在的预测预后的生物标志物。

[关键词] 胰腺神经内分泌肿瘤;磷酸甘油酸变位酶1;预后

[中图分类号] R735.9 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.12019/j.issn.1671-5144.2019.06.009

High Expression of PGAM1 Correlates with Poor Prognosis in Patients with Pancreatic Neuroendocrine Tumors Underwent Curative Surgical Resection

XIA Wu-zheng¹, ZENG Cong², LIN Ye¹, HOU Bao-hua¹, JIAN Zhi-xiang¹

(1. General Surgery Department, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China; 2. School Hospital, South China Normal University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: Objective To identify overexpression of PGAM1 in patients with pancreatic neuroendocrine tumors (PNET) and evaluate its association with clinicopathological features and prognosis. **Methods** PGAM1 immunoreactivity in tumor tissues was determined by immunohistochemistry from 71 patients with PNET. The mRNA and protein levels were analyzed in cancer specimens and their corresponding para-tumor normal tissues (n=24) by qRT-PCR and Western blot, respectively. PNET patients were separated into two groups based on the immunostaining levels of PGAM1. Associations between PGAM1 levels and clinicopathological data, including patient survival, were investigated. **Results** Both qRT-PCR and Western blot assays showed that PGAM1 expression was increased in PNET tissues compared with normal pancreas tissues. Immunohistochemical staining of 71 cases of PNET specimens suggested that PGAM1 protein was mainly localized in the cytoplasm, and increased expression of PGAM1 was correlated with larger

[基金项目] 广东省科技计划资助项目(2016A020215126)

[作者简介] 夏武政(1983-),男,湖南株洲人,医学博士,主要研究方向为肝胆胰疾病的微创治疗和胰腺神经内分泌肿瘤的预防和治疗。

[通讯作者] 简志祥, Tel:020-83827812-60920; E-mail:jzx_118@163.com

tumor size ($t=3.65, P=0.025$). Kaplan-Meier survival curves indicated that patients with high expression of PGAM1 had a shorter overall survival ($P=0.019$) and poorer disease-free survival ($P=0.049$). **Conclusions** Our results suggested that PGAM1 may serve as a potential prognostic biomarker for PNET patients.

Key words: pancreatic neuroendocrine tumors (PNET); phosphoglycerate mutase 1 (PGAM1); prognosis

胰腺神经内分泌肿瘤 (pancreatic neuroendocrine tumors, PNET) 是起源于胰腺神经内分泌细胞的肿瘤。虽然 PNET 被认为是一种相对罕见的疾病,但在过去的 20 年中, PNET 的发病率一直在快速增长。PNET 占有胰腺肿瘤的 1%~3%, 是所有胃肠神经内分泌肿瘤中 5 年生存率最低的^[1-3]。虽然 PNET 与其他胃肠神经内分泌肿瘤具有共同的历史特点,但 PNET 在生物学行为、分子发病机制、临床特点以及对某些治疗的反应等方面存在诸多差异^[4-5]。相对于快速增长的发病率,我们目前对 PNET 分子病理学的认识还不足以对其进行最佳的临床治疗。由于 PNET 的异质性,其生物学和临床行为难以预测。此外,虽然一些靶向药物已被用于治疗 PNET,如依维莫司和舒尼替尼,但关键的目标分子尚未确定。

重新编程的能量代谢是癌症的一个特征,也是肿瘤形成的一个关键因素^[6]。Warburg 效应是指肿瘤细胞主要通过有氧糖酵解产生能量的现象,甚至在正常氧浓度的情况也是一样,是肿瘤细胞中最具特征和最重要的代谢变化之一^[7-8]。磷酸甘油酸突变酶 1 (phosphoglycerate mutase 1, PGAM1) 是一种代谢酶,在糖酵解后期催化 3-磷酸甘油酸转化为 2-磷酸甘油酸,从而推动糖酵解^[9]。PGAM1 是协调糖酵解和生物合成的关键酶。PGAM1 在乳腺癌^[10]、肺癌^[11]、肝癌^[12]和泌尿系肿瘤^[13]中均发现过表达。这种表达上升通常与存活率低有关。PGAM1 在 PNET 中的具体生物学作用尚未确定。在本研究中,我们评估了 71 例接受根治性手术切除的 PNET 患者肿瘤组织中 PGAM1 的表达水平。探讨 PGAM1 与临床病理特征及预后的关系。

1 方法

1.1 患者和标本

本研究选取 2000 年 1 月至 2016 年 7 月在广东省人民医院接受根治性手术切除的 71 例 PNET 患者的原发肿瘤组织及相应的癌旁正常组织。手术切除前未接受新辅助化疗、放疗或其他抗肿瘤辅助治疗的患者。手术中获取肿瘤组织。根据美国

癌症联合委员会 (AJCC) 第七版分期系统和世界卫生组织 2010 年神经内分泌肿瘤分类系统对肿瘤的分期和病理特征进行评估。本研究方案经医院伦理委员会批准,所有患者均签署知情同意书。

1.2 免疫组织化学

将手术切除的 PNET 标本用福尔马林固定并石蜡包埋,制成 4 微米厚的切片,采用标准方法进行染色。简单地说,切片在二甲苯中脱蜡,用分级乙醇再水合,然后用 0.3% 过氧化氢处理,用微波提取抗原。切片在 12% 的山羊血清中被阻断,然后在 4℃ 下用 PGAM1 抗体 (Sigma, 多克隆兔抗体, 1:100) 孵育过夜。在磷酸盐缓冲盐水中充分冲洗后,切片用二抗 (辣根过氧化物酶标记山羊抗兔) 染色。信号用 3,3'-二氨基苯并苯胺显色。PNET 标本中 PGAM1 的表达水平由两位研究者独立检测,他们根据细胞染色强度 (0、1、2、3) 和染色细胞百分比 (0~100%) 在随机选取的 10 个高功率场对切片进行评分。通过计算染色强度和染色程度的乘积,采用半定量免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 评分,得到每个标本最终的总分 (区间为 0~300 分),如我们之前的研究^[14]所述。以所有病例 IHC 法评分的中位数作为截断值,将所有患者分为低 PGAM1 表达组和高 PGAM1 表达组。

1.3 总 RNA 提取与实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

采用 Trizol 试剂 (Takara, 日本) 从 24 例患者的配对肿瘤组织和癌旁非癌组织标本中提取总 RNA。总 RNA 使用 PrimeScript RT 试剂盒 (Takara, 日本) 进行反转录和定量实时 PCR 在 SYBR Premix Ex Taq II (Takara, 日本) 下操作。以 GAPDH 为内控,检测 PGAM1 mRNA 水平,引物序列如下: PGAM1 正向: 5'-gtgcagaagagcgatccg-3', PGAM1 反向: 5'-CGGTTAGACCCCATAGTGC-3'; GAPDH 正向: 5'-gtcggaggcaacatc-3', GAPDH 反向: 5'-GTCCAAATGCGGGAACAG-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算对比 PGAM1 在肿瘤组织和癌旁组织中 RNA 的表达水平。

1.4 统计学分析

所有数据均采用 SPSS 17.0 统计软件包进行处理。为比较组间临床病理特征,分类变量采用

卡方检验或 Fisher 确切概率法,连续变量采用 t 检验。以 PGAM1 IHC 评分中位数值分层,生成总生存率 (overall survival, OS) 和无进展生存率 (progression-free survival, PFS) 或者无病生存率 (disease-free survival, DFS) 的 Kaplan-Meier 曲线,采用 log-rank 检验确定统计学意义。采用双侧检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PGAM1 在 PNET 标本的表达

我们首先进行 qRT-PCR 检测 PNET 组织和配对癌旁正常组织 ($n=24$, 新鲜冷冻组织) 中 PGAM1 的 mRNA 表达。结果显示 PNET 组织中 PGAM1 mRNA 表达显著升高 ($P=0.017$), 见图 1 (在肿瘤组织中, 相对于邻近的正常组织, 数据显示为多个。水平归一化为 GAPDH, 表示为 $-\Delta\Delta CT$)。接下来我们通过 IHC 法检测了 71 个 PNET 组织中 PGAM1 蛋白的表达情况。PGAM1 免疫染色阳性的代表性图

像如图 2 所示, 包括肿瘤细胞的弱、中、强表达。PGAM1 阳性免疫染色显示, PGAM1 主要定位于细胞质。总体上, 16 例 (22.5%) 全阴性表达 (评分=0), 26 例 (36.6%) 肿瘤细胞呈弥漫性阳性染色超过 80%, 5 例 (7.0%) 评分为 300 分 (100% 肿瘤细胞呈强染色)。最后, 采用 160 分的中位数将所有样本分为 PGAM1 低表达组 ($n=36$) 和 PGAM1 高表达组 ($n=35$)。

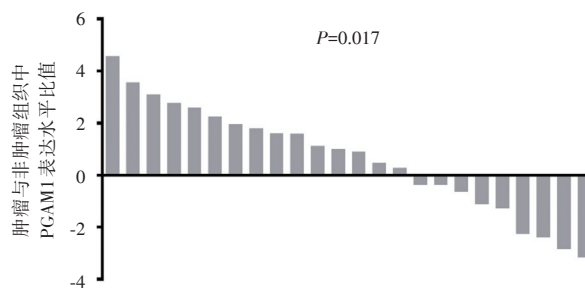
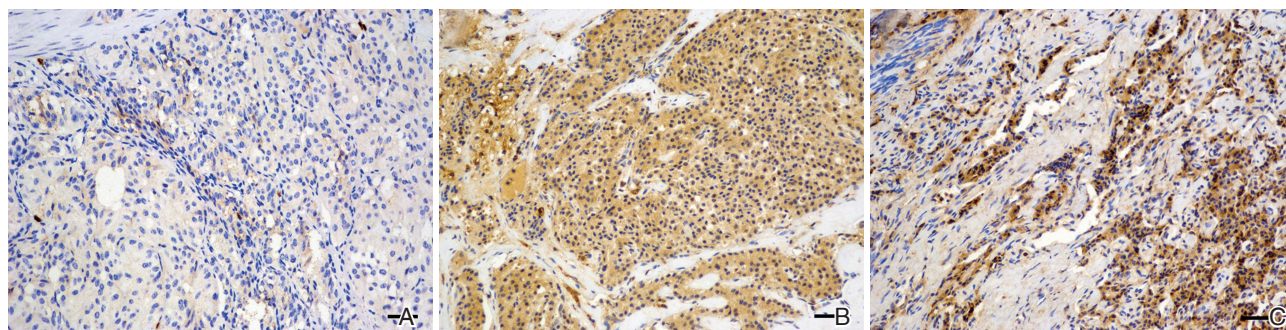


图 1 qRT-PCR 检测 24 对 PNET 组织中 PGAM1 mRNA 表达水平



A: PGAM1 弱表达; B: PGAM1 中表达; C: PGAM1 强表达

图 2 PNET 组织中具有代表性的 PGAM1 免疫组化表达图像

2.2 PGAM1 免疫组织化学表达水平与临床病理参数的关系

为了探讨 PGAM1 表达在 PNET 中的临床意义, 我们分析了 PGAM1 表达水平与相应患者临床病理特征的关系。如表 1 所示, PGAM1 在 PNET 中的表达与肿瘤大小相关 ($t=3.65, P=0.025$)。PGAM1 表达水平与其他临床病理特征无相关性。

2.3 PNET 患者 PGAM1 表达水平与预后的关系

根据 IHC 评分的中位数将患者分为两组。log-rank 检验的 Kaplan-Meier 曲线显示, 在所有患者中, 肿瘤标本 PGAM1 低表达的患者有较好的临床结局 (OS 的 $P=0.019$, DFS 的 $P=0.049$), 见图 3。由于 G1 (低分级) 和 G2 (中分级) 患者的临床病程比 G3 (高分级) 患者更加不可预测, 我们进一步分析了 PGAM1 表达水平在 G1 和 G2 患者中的预后价值。Kaplan-

Meier 曲线显示, 在 G1 和 G2 PNET 患者中, PGAM1 高表达组患者的 OS ($P=0.006$, log-rank 检验) 和 DFS ($P=0.014$, log-rank 检验) 明显较差, 见图 4。这些数据表明 PGAM1 表达水平可能是预测 PNET 患者预后的一个指标, 尤其是 G1 和 G2 的患者。

3 讨论

PNET 的发病率和患病率一直在稳步上升, 但 PNET 的进展和预后尚不清楚, 迫切需要为 PNET 的诊断、预后和治疗寻找新的分子靶点^[15]。在本研究中, 我们观察到 PGAM1 过表达与 PNET 不良预后之间存在很强的相关性, 提示 PGAM1 可能成为 PNET 新的预后标志物。

癌细胞的糖代谢与许多正常细胞的糖代谢不同, 即使在正常的氧浓度水平下, 癌细胞糖代谢的

表1 PGAM1 表达水平与临床特点的相关性

指标	PGAM1 表达水平		P值
	低(n=36)	高(n=35)	
年龄/岁	47.8±18.1	42.5±16.7	0.204
性别			0.111
女性	18	11	
男性	18	24	
肿瘤大小/cm	3.0±1.9	3.6±2.3	0.025
肿瘤功能			0.893
有功能	16	15	
无功能	20	20	
肿瘤位置			0.403
头/颈部	19	15	
体和(或)尾部	17	20	
肿瘤分化程度			0.662
高/中分化	33	31	
低分化	3	4	
Ki-67 指数/%			0.485
≤2	22	17	
3~20	12	14	
>20	2	4	
有丝分裂计数(每10个高倍镜)			0.937
<2	20	18	
2~20	12	13	
>20	4	4	
G分期			0.815
G1	17	14	
G2	14	16	
G3	5	5	

主要特征是存在较高的需氧糖酵解率。糖酵解的增强使癌细胞能够满足它们对能量和增殖所需的生物合成材料的需求。PGAM1在糖酵解中占据一个独特的步骤。PGAM1过表达已在多种肿瘤细胞中发现,并对肿瘤的进展提供代谢方面的支持^[18-20]。最近的一项研究表明,PGAM1在协调糖酵解和合成代谢的过程中发挥着有趣而重要的作用^[21]。Hitosugi等的研究表明,抑制PGAM1在癌细胞中的表达不仅使糖酵解、磷酸戊糖通路的量和生物合成显著降低,而且使细胞增殖和肿瘤生长减弱^[22]。因此,PGAM1是糖酵解和生物合成途径中的关键分子靶点。

我们发现PGAM1的表达水平与PNET的总生存期和无进展生存期密切相关。世界卫生组织(WHO)将PNET分为三类:低分级(G1)、中分级(G2)和高分级(G3)。大多数PNET为G1级或G2级,仅根据组织病理学标准预测G1、G2 PNET患者的预后及恶性潜能仍有困难^[23-24]。本研究还检测了PGAM1在G1/G2患者中的作用,发现高表达PGAM1的G1/G2患者预后较差。这一发现可能有助于识别G1/G2患者的高危个体,特别是那些具有相似临床病理特征的患者。

本研究存在一定的局限性。首先,这是一项回顾性研究。其次,本研究样本量不大,因为PNET是一种罕见的肿瘤,很难在一个中心获得一

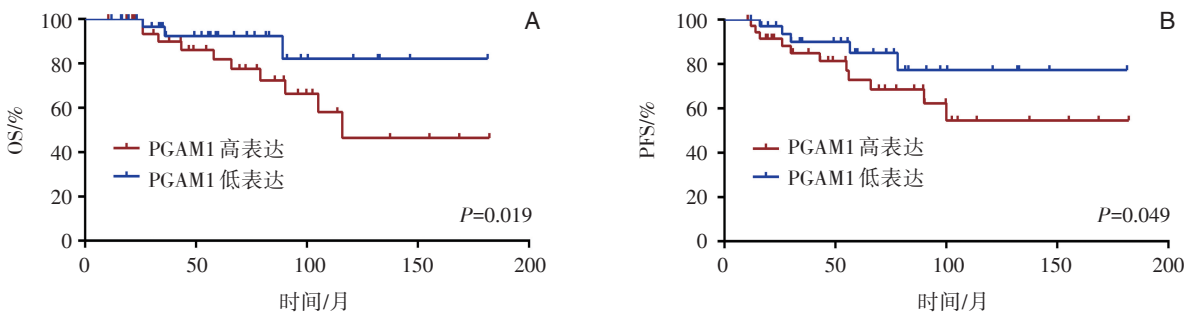


图3 不同的PGAM1表达水平患者的OS和DFS的Kaplan-Meier曲线

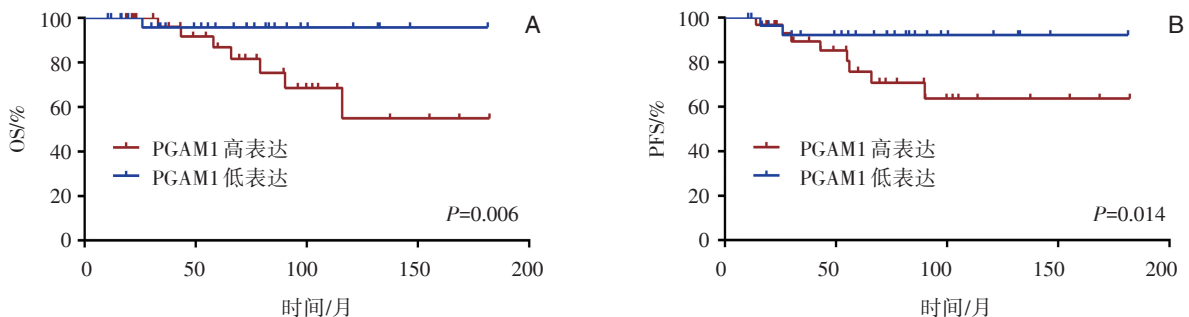


图4 不同PGAM1表达水平G1/G2患者的OS和DFS的Kaplan-Meier曲线

个大的队列。本研究的样本量难以达到Cox回归分析的标准建议。第三,收集患者的时间跨度长,随访项目也不是针对每一位患者都进行了长时间的标准化。上述限制对于单个中心来说是难以克服的。进一步的前瞻性多中心和分子机制的研究是必要的。

4 结 论

本研究首次将PGAM1表达水平作为PNET患者预后指标进行评估,结果表明PGAM1表达水平与PNET患者预后密切相关,需要进一步的研究来阐明其分子机制。

[参 考 文 献]

- [1] FISCHER L, KLEEFF J, ESPOSITO I, et al. Clinical outcome and long-term survival in 118 consecutive patients with neuroendocrine tumours of the pancreas [J]. *Br J Surg*, 2008, 95(5): 627-635.
- [2] YOUNG K, IYER R, MORGANSTEIN D, et al. Pancreatic neuroendocrine tumors: A review [J]. *Future Oncol*, 2015, 11(5): 853-864.
- [3] CORIAT R, WALTER T, TERRIS B, et al. Gastroenteropancreatic well-differentiated grade 3 neuroendocrine tumors: Review and position statement [J]. *Oncologist*, 2016, 21(10): 1191-1199.
- [4] RINDI G, BORDI C. Endocrine tumours of the gastrointestinal tract: Aetiology, molecular pathogenesis and genetics [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2005, 19(4): 519-534.
- [5] RINDI G, WIEDENMANN B. Neuroendocrine neoplasms of the gut and pancreas: New insights [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2011, 8(1): 54-64.
- [6] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: The next generation [J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674.
- [7] LIBERTI M V, LOCASALE J W. The Warburg effect: How does it benefit cancer cells? [J]. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41(3): 211-218.
- [8] WARD P S, THOMPSON C B. Metabolic reprogramming: A cancer hallmark even Warburg did not anticipate [J]. *Cancer Cell*, 2012, 21(3): 297-308.
- [9] VANDER HEIDEN M G, LOCASALE J W, SWANSON K D, et al. Evidence for an alternative glycolytic pathway in rapidly proliferating cells [J]. *Science*, 2010, 329(5998): 1492-1499.
- [10] CHEN S, CAI J, ZHANG W, et al. Proteomic identification of differentially expressed proteins associated with the multiple drug resistance in methotrexate-resistant human breast cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(1): 448-458.
- [11] SUN Q, LI S, WANG Y, et al. Phosphoglyceric acid mutase-1 contributes to oncogenic mTOR-mediated tumor growth and confers non-small cell lung cancer patients with poor prognosis [J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(6): 1160-1173.
- [12] REN F, WU H, LEI Y, et al. Quantitative proteomics identification of phosphoglycerate mutase 1 as a novel therapeutic target in hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Cancer*, 2010, 9: 81.
- [13] LI C, SHU F, LEI B, et al. Expression of PGAM1 in renal clear cell carcinoma and its clinical significance [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(8): 9410-9415.
- [14] LI D, ZHOU Y, LIU Y, et al. Decreased expression of LKB1 predicts poor prognosis in pancreatic neuroendocrine tumor patients undergoing curative resection [J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 1259-1265.
- [15] VIUDEZ A, de JESUS-ACOSTA A, CARVALHO F L, et al. Pancreatic neuroendocrine tumors: Challenges in an underestimated disease [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2016, 101: 193-206.
- [16] HAY N. Reprogramming glucose metabolism in cancer: Can it be exploited for cancer therapy? [J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(10): 635-649.
- [17] JIANG X, SUN Q, LI H, et al. The role of phosphoglycerate mutase 1 in tumor aerobic glycolysis and its potential therapeutic implications [J]. *Int J Cancer*, 2014, 135(9): 1991-1996.
- [18] PENG X C, GONG F M, CHEN Y, et al. Proteomics identification of PGAM1 as a potential therapeutic target for urothelial bladder cancer [J]. *J Proteomics*, 2016, 132: 85-92.
- [19] ZHANG D, WU H, ZHANG X, et al. Phosphoglycerate mutase 1 predicts the poor prognosis of oral squamous cell carcinoma and is associated with cell migration [J]. *J Cancer*, 2017, 8(11): 1943-1951.
- [20] WEN Y A, ZHOU B W, LV D J, et al. Phosphoglycerate mutase 1 knockdown inhibits prostate cancer cell growth, migration, and invasion [J]. *Asian J Androl*, 2018, 20(2): 178-183.
- [21] CHANETON B, GOTTLIEB E. PGAM1 glycolytic switch controls biosynthesis [J]. *Cancer Cell*, 2012, 22(5): 565-566.
- [22] HITOSUGI T, ZHOU L, ELF S, et al. Phosphoglycerate mutase 1 coordinates glycolysis and biosynthesis to promote tumor growth [J]. *Cancer Cell*, 2012, 22(5): 585-600.
- [23] LANDONI L, MARCHEGIANI G, POLLINI T, et al. The evolution of surgical strategies for pancreatic neuroendocrine tumors (Pan-NENs): Time-trend and outcome analysis from 587 consecutive resections at a high-volume institution [J]. *Ann Surg*, 2019, 269(4): 725-732.
- [24] SUGIMOTO M, TAKAGI T, SUZUKI R, et al. Pancreatic neuroendocrine tumor grade 1 patients followed up without surgery: Case series [J]. *World J Clin Oncol*, 2017, 8(3): 293-299.

[收稿日期] 2019-09-03