

Pim-3在食管鳞癌组织中mRNA和蛋白的表达及其意义

赵辉, 刘宇琼, 李惠翔

■背景资料

Pim-3的表达能抑制癌细胞增殖和诱导细胞凋亡。另外, Pim-3在胰腺癌、结肠癌及胃癌等其他肿瘤中的作用也有详细的研究, 这些研究大多数都表明原癌基因Pim-3在这些相应的肿瘤中呈现高表达。

赵辉, 刘宇琼, 李惠翔, 郑州大学基础医学院病理教研室 河南省郑州市 450052

刘宇琼, 李惠翔, 郑州大学第一附属医院病理科 河南省开封市 475000

病理重点实验室 河南省郑州市 450052

赵辉, 副主任医师, 主要从事消化系统肿瘤的研究。

作者贡献分布: 此课题由李惠翔设计; 研究过程由赵辉与刘宇琼操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由李惠翔提供; 数据分析由赵辉与刘宇琼完成; 本论文写作由赵辉、刘宇琼及李惠翔完成。

通讯作者: 李惠翔, 教授, 450052, 河南省郑州市建设东路1号, 郑州大学第一附属医院病理科。lslbjys@126.com

电话: 0371-66658175

收稿日期: 2010-04-30 修回日期: 2010-08-13

接受日期: 2010-08-17 在线出版日期: 2010-10-08

Significance of Pim-3 expression in esophageal squamous cell carcinoma

Hui Zhao, Yu-Qiong Liu, Hui-Xiang Li

Hui Zhao, Yu-Qiong Liu, Hui-Xiang Li, Department of Pathology, Basic Medical College of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Hui Zhao, Department of Thoracic Surgery, Huaihe Hospital, Henan University, Kaifeng 475000, Henan Province, China

Yu-Qiong Liu, Hui-Xiang Li, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University; Henan Key Laboratory of Tumor Pathology, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Professor Hui-Xiang Li, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 1 East Jianshe Road, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. lslbjys@126.com

Received: 2010-04-30 Revised: 2010-08-13

Accepted: 2010-08-17 Published online: 2010-10-08

Abstract

AIM: To investigate the significance of Pim-3 mRNA and protein expression in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC).

METHODS: The expression of Pim-3 mRNA and protein in 45 normal esophageal mucosal specimens, 45 ESCC specimens and 22 tumor-adjacent mucosal specimens was detected by *in situ* hybridization and immunohistochemistry, respectively.

RESULTS: The positive rates of Pim-3 mRNA expression were 0.00% (0/45), 22.73% (5/22) and 82.22% (37/45) in normal esophageal mu-

cosa, tumor-adjacent mucosa and ESCC tissue, respectively, with a significant difference among the three groups ($\chi^2 = 67.450, P < 0.01$). Similar results were obtained for Pim-3 protein expression: the positive rates of Pim-3 protein expression were 0.00% (0/45), 18.18% (4/22) and 75.56% (34/45) in normal esophageal mucosa, tumor-adjacent mucosa and ESCC tissue, respectively, with a significant difference among the three groups ($\chi^2 = 60.326, P < 0.01$). The expression of Pim-3 mRNA and protein was significantly associated with TNM stage and lymph node metastasis in ESCC (both $P < 0.05$). A positive correlation was noted between the expression of Pim-3 mRNA and protein ($\gamma_p = 0.547, P < 0.01$).

CONCLUSION: High expression of Pim-3 mRNA and protein may be closely related to the occurrence and development of ESCC.

Key Words: Pim-3; Esophageal squamous cell carcinoma; *In situ* hybridization; Immunohistochemistry

Zhao H, Liu YQ, Li HX. Significance of Pim-3 expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(28): 2976-2980

摘要

目的: 探讨食管鳞癌组织中Pim-3 mRNA和蛋白的表达及其意义。

方法: 应用原位杂交和免疫组织化学法分别检测45例正常食管黏膜组织、22例癌旁不典型增生组织及45例食管鳞癌组织中Pim-3 mRNA和蛋白的表达。

结果: 在食管鳞癌癌变过程中Pim-3在正常黏膜组织、癌旁不典型增生组织及癌组织中mRNA的表达分别为0.00%(0/45)、22.73%(5/22)、82.22%(37/45), 组间比较有明显差异($\chi^2 = 67.450, P < 0.01$)。此外, 对应的蛋白表达的阳性率依次为0.00%(0/45)、18.18%(4/22)、75.56%(34/45), 组间比较有明显差异($\chi^2 = 60.326, P < 0.01$); 食管鳞癌组织之间Pim-3 mRNA和蛋白的表达在不同TNM分

■同行评议者

李瑗, 教授, 广西肿瘤研究所

期及有无淋巴结转移中的差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$). Pim-3 mRNA和蛋白的表达具有明显的正相关关系($\gamma_p = 0.547, P < 0.01$).

结论: 食管鳞癌组织中Pim-3 mRNA和蛋白的高表达可能与食管鳞癌发生发展密切相关.

关键词: Pim-3; 食管鳞癌; 原位杂交; 免疫组织化学

赵辉, 刘宇琼, 李惠翔. Pim-3在食管鳞癌组织中mRNA和蛋白的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2010; 18(28): 2976-2980
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2976.asp>

0 引言

Pim-3最初在鼠嗜铬细胞瘤细胞系PC12细胞发现, 并被鉴定为诱导去极化的基因KID-1^[1], 因为KID-1与表达丝氨酸/苏氨酸激酶活性的原癌基因Pim家族具有高度的同源性, 因而命名为Pim-3^[2]. 近来研究显示, 激活的Pim激酶在恶性肿瘤的发病机制中起着十分重要的作用^[3], 与肿瘤的发生发展关系十分密切^[4]. 迄今为止, Pim-3在食管鳞癌发生发展中的作用国内外尚未见报道. 本研究采用原位杂交和免疫组织化学两种方法联合检测了食管癌高发区河南安阳的食管癌患者手术切除的癌组织Pim-3 mRNA和蛋白的表达情况, 旨在进一步探讨Pim-3在食管鳞癌发生发展中的作用, 为寻找检测食管鳞癌的新的分子标记奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 45例标本分别取自无坏死癌灶、癌旁3 cm以内及远端正常黏膜组织(经HE染色证实, 癌旁组织中22例有中-重度以上不典型增生或原位癌), 经40 g/L多聚甲醛固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 连续切片, 切片厚度4-6 μm , 分别用于HE、免疫组织化学及原位杂交染色. 所有标本均取自食管癌高发区河南省安阳市肿瘤医院, 所有病例术前均无化疗、放疗及免疫治疗史. 兔抗人多克隆抗体Pim-3(sc-98959)购自美国Santa Cruz公司, SP免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥生物技术开发公司. 原位杂交预杂交液、SA-Bio-AP、BCIP/NBT均购自武汉博士德生物技术有限公司. 原位杂交5'端生物素标记、全硫代修饰探针由北京奥科生物技术有限公司合成. Pim-3探针序列: ACTTCGGTTCGGGTGC-GCTG.

1.2 方法

1.2.1 原位杂交染色和免疫组织化学: 45例均经

组织学证实为鳞状细胞癌. 其中组织学分级 I 级18例, II级13例, III级14例; 伴淋巴结转移者21例, 无淋巴结转移者24例; 浸润黏膜下层或浅肌层者17例, 浸润深肌层或外膜层者28例; TNM分期(按1997年UICC的TNM分期): I-II期19例, III-IV期26例. 原位杂交具体程序如下: 标本经新鲜配制的二甲苯脱蜡, 梯度酒精脱水后, 用新鲜配制的0.5% H_2O_2 室温处理30 min, 以灭活内源性过氧化物酶; 3%柠檬酸新鲜配制蛋白酶(0.01 g/L), 37 $^{\circ}\text{C}$, 10 min, 消化标本DNA结合蛋白; 每张玻片滴加20 μL 不含探针的预杂交液(42 $^{\circ}\text{C}$), 预杂交4 h; 加含探针(1 ng/L)的杂交液, 42 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒内杂交12 h; 0.1 \times 标准柠檬酸盐42 $^{\circ}\text{C}$ 洗后, 加SA-Bio-AP 37 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 漂洗后加BCIP/NBT, 避光显色2-4 h. 以不含探针的标本作阴性对照, 以已知阳性结果的乳腺癌组织作阳性对照. 免疫组织化学采用SP法, Pim-3抗体稀释, 稀释倍数均为1:150, DAB显色, 苏木素复染. 染色步骤严格按说明书进行, 以PBS液代替一抗作为阴性对照, 以已知阳性的胰腺癌组织作阳性对照.

1.2.2 原位杂交染色及免疫组织化学结果判定: Pim-3 mRNA阳性信号呈棕紫蓝色颗粒样物质, 位于细胞质内; 蛋白阳性信号呈浅黄色至棕黄色颗粒, 也位于细胞质内. 高倍镜下随机选取5个视野(每个视野观察细胞数不少于200个), 按阳性细胞所占百分比及着色深浅进行结果判定. 采用9分评分制: 按照阳性细胞比例 $\leq 10\%$ 为1分, 10%-50%为2分, $>50\%$ 为3分; 按染色强弱: 阴性为0分; 淡黄(蓝)色染色为1分; 中度黄(蓝)色染色为2分, 棕黄(紫蓝)色染色为3分. 然后按照“阳性细胞得分 \times 染色强弱得分”计总分, 总分 <3 为阴性, 总分 ≥ 3 为阳性^[5,6].

统计学处理 应用SPSS13.0统计学软件, 行 χ^2 检验和Spearman相关系数分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 Pim-3 mRNA及蛋白在食管鳞癌组织、癌旁不典型增生组织及正常黏膜组织中的表达 原位杂交结果显示, Pim-3 mRNA主要定位于细胞质中, 呈蓝紫色颗粒(图1). Pim-3 mRNA在食管鳞癌组织中高表达, 其阳性率为82.22%, 显著高于癌旁不典型增生组织和正常食管上皮组织中Pim-3 mRNA的表达(阳性率分别为22.73%和0.00%, 表1), 3组之间表达的差异具有统计学意义($\chi^2 = 67.450, P < 0.05$). 此外, Pim-3蛋白定

■研究前沿

近来研究显示, 激活的Pim激酶在恶性肿瘤的发病机制中起着十分重要的作用, 与肿瘤的发生发展关系十分密切. 迄今为止, Pim-3在食管鳞癌发生发展中的作用国内外尚未见报道. 关于Pim-3与恶性肿瘤关系的研究已成为热点.

■相关报道

Fujii等研究Pim-3在肝癌组织和细胞中的表达, 结果表明, Pim-3蛋白在肝癌组织中有表达, 而在正常组织中无表达.

■创新盘点

本文首次联合采用原位杂交和免疫组织化学两种方法检测了食管癌高发区河南安阳的食管癌患者手术切除的癌组织Pim-3 mRNA和蛋白的表达情况。

表 1 Pim-3在食管鳞癌组织、癌旁不典型增生组织及正常黏膜组织中mRNA及蛋白的表达

分组	n	Pim-3 mRNA			Pim-3蛋白		
		阳性表达n(%)	χ^2 值	P值	阳性表达n(%)	χ^2 值	P值
正常黏膜上皮组织	45	0(0.00)	67.450	0.000	0(0.00)	60.326	0.000
非典型增生组织	22	5(22.73)			4(18.18)		
食管鳞癌组织	45	37(82.22)			34(75.56)		

表 2 Pim-3 mRNA及蛋白表达与食管鳞癌临床病理学特征的关系

病理特征	n	Pim-3 mRNA			Pim-3蛋白		
		阳性表达n(%)	χ^2 值	P值	阳性表达n(%)	χ^2 值	P值
组织学分级							
I	18	15(83.33)	0.372	0.830	14(77.78)	0.190	0.909
II	13	10(76.92)			10(76.92)		
III	14	12(85.71)			10(71.43)		
浸润深度							
浅层	17	12(70.59)	2.530	0.112	13(76.47)	0.012	0.911
深层	28	25(89.29)			21(75.00)		
淋巴结转移							
无	24	17(70.83)	4.564	0.033	14(58.33)	8.259	0.004
有	21	20(95.24)			20(95.24)		
TNM分期							
I、II	19	12(63.16)	8.177	0.004	11(57.89)	5.554	0.018
III、IV	26	25(96.15)			23(88.46)		

表 3 Pim-3 mRNA及蛋白在食管鳞癌中的表达及相关性分析

Pim-3 mRNA表达	n	Pim-3蛋白表达		γ_p 值	P值
		+	-		
+	37	32	5	0.547	0.000
-	8	2	6		

位于细胞胞质中,呈浅黄色至棕黄色颗粒(图2)。Pim-3蛋白高表达于食管鳞癌组织,阳性率高达75.56%,显著高于癌旁不典型增生组织和正常食管上皮组织中Pim-3蛋白的表达(阳性率分别为18.18%和0.00%,表1),3组之间表达的差异具有统计学意义($\chi^2 = 60.326, P < 0.05$)。

2.2 Pim-3 mRNA及蛋白表达与食管鳞癌临床病理学特征的关系 利用SPSS13.0统计学处理软件分析Pim-3 mRNA及蛋白表达与食管鳞癌临床病理学特征的关系。结果表明, Pim-3 mRNA及蛋白表达与淋巴结转移和TNM分期具有明显的相关性($P < 0.05$),但与组织学分级、浸润深度无关($P > 0.05$,表2)。

2.3 Pim-3 mRNA及蛋白在食管鳞癌组织中表达的相关性分析 在45例食管鳞癌组织中, Pim-3

mRNA阳性表达37例中,其蛋白表达阳性占32例,而Pim-3 mRNA表达阴性的8病例中,其蛋白表达阴性占6例。Pim-3 mRNA及蛋白在食管鳞癌组织中的表达强度呈正相关关系($\gamma_p = 0.547, P = 0.000$,表3)。

3 讨论

丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶Pim是一种原癌基因^[7],其蛋白激酶家族主要有3个成员,包括: Pim-1, Pim-2和Pim-3^[3],在人类中他们至少由6个翻译变体组成,即Pim-1短的同聚物(Pim1S)、Pim-1长的同聚物(Pim1L)、Pim-2短的同聚物(Pim2S)、Pim-2中的同聚物(Pim1M)、Pim-2长的同聚物(Pim2L)和Pim-3。由于Pim家族具有诱导细胞周期进程、促进细胞增殖和细胞凋亡、抑制细胞黏附,抑制细胞迁移等作用,因而在肿瘤的发生、发展及转移中发挥重要作用。其中Pim-3是近年来发现其与肿瘤关系十分密切的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族的成员之一,迄今为止,在国内外尚未见Pim-3在食管鳞癌中的作用报道。因此本研究通过原位杂交和免疫组织化学两种技术研究Pim-3 mRNA和蛋白在食管

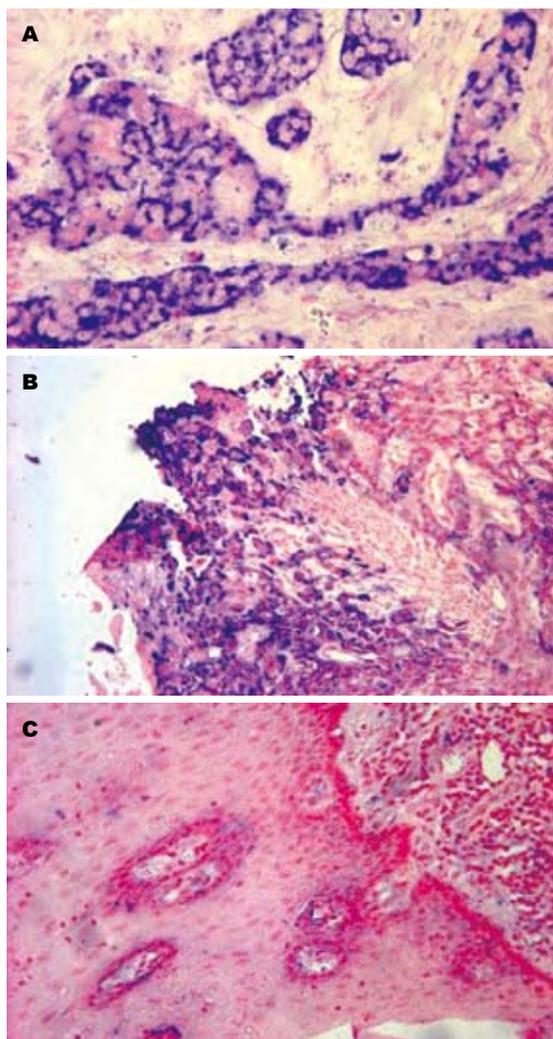


图 1 原位杂交检测Pim-3 mRNA在各组织中的表达($\times 200$). A: 食管鳞癌组织; B: 癌旁不典型增生组织; C: 正常食管组织.

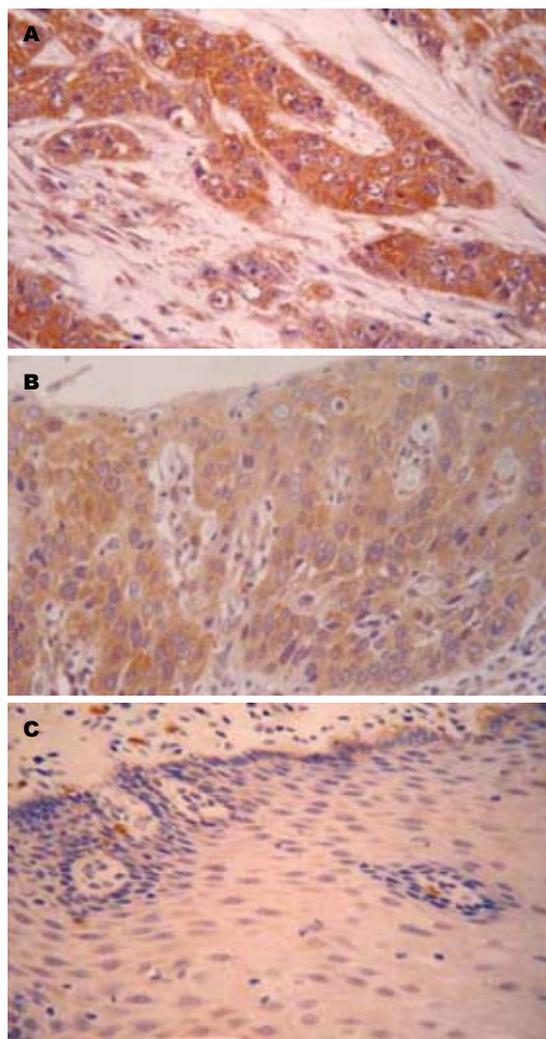


图 2 免疫组织化学检测Pim-3蛋白在各组织中的表达($\times 200$). A: 食管鳞癌组织; B: 癌旁不典型增生组织; C: 正常食管组织.

■应用要点
联合检测Pim-3 mRNA和蛋白表达可望成为食管鳞癌早期诊断、判断预后的分子指标之一.

鳞癌组织中的表达, 初步探讨其在食管鳞癌发生发展中的可能作用.

近来越来越多的研究显示Pim-3在肿瘤的发生发展中具有十分重要的作用. Fujii等^[8]研究Pim-3在肝癌组织和细胞中的表达, 结果表明, Pim-3蛋白在肝癌组织中有表达, 而在正常组织中无表达, 此外我们在体外利用RNA干扰技术干扰肝癌细胞株HepG2中Pim-3的表达, 发现下调Pim-3的表达能抑制肝癌细胞增殖和诱导细胞凋亡. 另外, Pim-3在其他肿瘤中的作用也有详细的研究, 如胰腺癌^[9]、结肠癌^[10]及胃癌^[4]等. 这些研究大多数都表明原癌基因Pim-3在这些相应的肿瘤中呈现高表达, 提示Pim-3与肿瘤的发生发展关系极其密切. 本实验研究结果显示, Pim-3 mRNA和蛋白在正常食管组织、食管癌旁不典型增生组织及食管鳞癌组织中的表达依次升高, 三者的表达差异有统计学意义, 但值得注意的

是在正常食管组织中未检测到Pim-3的表达, 这一结果提示Pim-3高表达的肿瘤其恶性程度更高. 研究结果还显示, Pim-3 mRNA及蛋白表达与淋巴结转移和TNM分期具有明显的相关性 ($P < 0.05$), 这可能提示了Pim-3在食管鳞癌组织中的异常高表达与预后有关, Pim-3基因在食管鳞癌中表达可作为判断食管癌患者预后的一项指标, 这有利于我们进一步地了解食管鳞癌的生物行为, 为食管癌的早期诊断和治疗提供一个新的分子靶点. 进一步分析实验结果, 我们发现采用原位杂交和免疫组织化学法分别检测Pim-3 mRNA与蛋白在食管鳞癌组织中的阳性表达结果是一致的, Pim-3 mRNA表达阳性率与Pim-3蛋白表达的结果之间呈正相关 ($\gamma_p = 0.547$, $P < 0.05$), 提示应用简易的免疫组织化学法检测食管鳞癌组织中Pim-3蛋白表达水平可能可以间接反映出Pim-3的mRNA水平, 该研究为Pim-3

■同行评价

本文新颖性和科学性较好,有一定的临床参考价值.

作为食管鳞癌分子治疗靶点提供理论依据.

总之,我们采用了原位杂交及免疫组织化学法检测了食管鳞癌组织中Pim-3 mRNA及蛋白的表达,初步证明了Pim-3的高表达可能是导致食管鳞癌发生发展的作用机制之一,但Pim-3确切的作用机制目前尚不完全清楚.后续我们将进一步从体外探讨Pim-3在食管鳞癌细胞中的作用,我们坚信对Pim-3基因深入、广泛的研究,了解其在食管鳞癌的作用机制,将能够为肿瘤的预后评估及临床治疗提供理论依据.

4 参考文献

- 1 Feldman JD, Vician L, Crispino M, Tocco G, Marcheselli VL, Bazan NG, Baudry M, Herschman HR. KID-1, a protein kinase induced by depolarization in brain. *J Biol Chem* 1998; 273: 16535-16543
- 2 Konietzko U, Kauselmann G, Scafidi J, Staubli U, Mikkers H, Berns A, Schweizer M, Waltreit R, Kuhl D. Pim kinase expression is induced by LTP stimulation and required for the consolidation of enduring LTP. *EMBO J* 1999; 18: 3359-3369
- 3 Amaravadi R, Thompson CB. The survival kinases Akt and Pim as potential pharmacological targets. *J Clin Invest* 2005; 115: 2618-2624
- 4 Zheng HC, Tsuneyama K, Takahashi H, Miwa S, Sugiyama T, Popivanova BK, Fujii C, Nomoto K, Mukaida N, Takano Y. Aberrant Pim-3 expression is involved in gastric adenoma-adenocarcinoma sequence and cancer progression. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134: 481-488
- 5 郝宝岚, 李珊珊, 张红燕, 闫爱华, 任秀花. EphA2基因在食管癌组织中的表达及其意义. *中国肿瘤临床* 2006; 33: 555-558
- 6 高冬玲, 李晟磊, 赵志华, 赵秋民, 刘宗文, 陈奎生, 张云汉. 食管鳞癌组织中RECK和MMP-9基因mRNA检测与分析. *中国肿瘤临床* 2008; 35: 748-751
- 7 van Lohuizen M, Verbeek S, Krimpenfort P, Domen J, Saris C, Radaszkiewicz T, Berns A. Predisposition to lymphomagenesis in pim-1 transgenic mice: cooperation with c-myc and N-myc in murine leukemia virus-induced tumors. *Cell* 1989; 56: 673-682
- 8 Fujii C, Nakamoto Y, Lu P, Tsuneyama K, Popivanova BK, Kaneko S, Mukaida N. Aberrant expression of serine/threonine kinase Pim-3 in hepatocellular carcinoma development and its role in the proliferation of human hepatoma cell lines. *Int J Cancer* 2005; 114: 209-218
- 9 Li YY, Popivanova BK, Nagai Y, Ishikura H, Fujii C, Mukaida N. Pim-3, a proto-oncogene with serine/threonine kinase activity, is aberrantly expressed in human pancreatic cancer and phosphorylates bad to block bad-mediated apoptosis in human pancreatic cancer cell lines. *Cancer Res* 2006; 66: 6741-6747
- 10 Popivanova BK, Li YY, Zheng H, Omura K, Fujii C, Tsuneyama K, Mukaida N. Proto-oncogene, Pim-3 with serine/threonine kinase activity, is aberrantly expressed in human colon cancer cells and can prevent Bad-mediated apoptosis. *Cancer Sci* 2007; 98: 321-328

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJC, WJGE, WJGO, WJGS, WJH, WJR 6 本期刊 被 PMC 收录

本刊讯 我们于2010-08-17收到PubMed Central(PMC)的通知,经过美国国立医学图书馆机构咨询委员会The Literature Selection Technical Review Committee评定,决定WJC, WJGE, WJGO, WJGS, WJH, WJR 6本期刊被PMC收录. PMC是一个提供生命科学期刊文献的全文数据库,他是由隶属美国国立医学图书馆(National Library of Medicine)的国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)所创建与管理的.(常务副总编辑:张海宁 2010-08-17)