

Piwi2基因在肝癌组织中mRNA及蛋白的表达

贾慧丽, 徐芸

贾慧丽, 徐芸, 郑州大学第一附属医院消化内科 河南省郑州市 450052

作者贡献分布: 本文文献检索、实验设计、实验操作、资料分析及论文撰写由贾慧丽完成; 选题、指导及审校由徐芸完成。

通讯作者: 徐芸, 教授, 450052, 河南省郑州市, 郑州大学第一附属医院消化内科. xuyun@medmail.com.cn

收稿日期: 2012-07-23 修回日期: 2012-11-06

接受日期: 2012-11-23 在线出版日期: 2012-12-08

Clinical significance of expression of Piwi2 in hepatocellular carcinoma

Hui-Li Jia, Yun Xu

Hui-Li Jia, Yun Xu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Yun Xu, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. xuyun@medmail.com.cn

Received: 2012-07-23 Revised: 2012-11-06

Accepted: 2012-11-23 Published online: 2012-12-08

Abstract

AIM: To investigate the mRNA and protein expression of Piwi2 in hepatocellular carcinoma (HCC), and to analyze their clinical significance.

METHODS: Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot were used to detect the expression of Piwi2 mRNA and protein in 70 surgical HCC specimens and matched tumor-adjacent non-cancerous specimens.

RESULTS: The relative expression level of Piwi2 mRNA was significantly higher in HCC than in tumor-adjacent non-cancerous tissue (0.91 ± 0.04 vs 0.32 ± 0.04 , $t = 37.240$, $P < 0.05$). Piwi2 mRNA expression in HCC was correlated with tumor differentiation, intrahepatic invasion and metastasis. The protein expression of Piwi2 in HCC was also significantly higher than that in tumor-adjacent non-cancerous tissues. Piwi2 protein expression in HCC was correlated with intrahepatic invasion and metastasis. There was a significant correlation between the mRNA and protein expression of Piwi2 ($\chi^2 = 13.113$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Piwi2 may be used as a novel biomarker for detection and therapy of HCC.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Piwi2; RT-PCR; Western blot

Jia HL, Xu Y. Clinical significance of expression of Piwi2 in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(34): 3385-3389

摘要

目的: 检测肝癌组织中Piwi2基因mRNA和蛋白的表达, 进而探讨Piwi2基因在临床诊断中的意义。

方法: 采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和Western blot印迹技术, 检测了70例肝癌及其对应癌旁组织中Piwi2基因mRNA及其蛋白的表达并结合临床资料进行分析。

结果: Piwi2 mRNA在肝癌中的表达量相对值高于癌旁的肝脏组织的表达量(0.91 ± 0.04 vs 0.32 ± 0.04 , $P < 0.05$)。Piwi2基因mRNA的表达与患者的肝内转移、分化程度及癌栓等病理因素方面的差异有统计学意义($P < 0.05$)。蛋白在肝癌中的表达均高于对应的癌旁组织。Piwi2的蛋白质表达与患者的肝内转移及癌栓等病理因素方面的差异有统计学意义($P < 0.05$)。Piwi2基因mRNA的表达与Piwi2的蛋白质的表达有相关性($P < 0.05$)。

结论: Piwi2有可能成为肝癌的检测及治疗的一种分子标志物。

关键词: 肝癌; Piwi2基因; RT-PCR; 免疫印迹法

贾慧丽, 徐芸. Piwi2基因在肝癌组织中mRNA及蛋白的表达. *世界华人消化杂志* 2012; 20(34): 3385-3389

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3385.asp>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是常见的恶性肿瘤之一, 其发病机制与癌基因的激活有关。Piwi2属于PIWI家族, 为一候选癌基因, 在

■背景资料

肝细胞癌(HCC)是世界上最常见的恶性肿瘤之一。在我国, 每年约有300 000人死于HCC, 约占全世界HCC年死亡率的50%。HCC的发生与癌基因的激活有关, 寻找肝细胞癌分子靶点, 为临床有效治疗提供分子基础, 成为本研究领域的热点问题。Piwi2属于PIWI家族, 为一候选癌基因, 在人类的许多肿瘤中表达, 而在HCC中的研究, 国内外尚未见文献报道。

■同行评议者

李刚, 教授, 北京大学医学部生物化学与分子生物学系

■ 相关报道

有研究报道Piwil2在结肠癌的发生、发展中起重要的作用。

人类的许多恶性肿瘤中高表达^[1-4]。而在HCC组织中, Piwil2基因mRNA及蛋白的表达及其相关性, 文献鲜见报道。我们采用反转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)和Western blot印迹技术, 对70例HCC及其对应的癌旁组织中Piwil2基因mRNA及蛋白的表达进行检测与分析, 并探讨其与HCC发生、发展的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 70例HCC及其癌灶旁(>2 cm)的非癌组织, 均经病理学证实, 分别来自2011-01/2012-03郑州大学第一附属医院手术切除标本。所用患者术前均未实施过其他治疗。70例患者中男53例, 女17例, 年龄22-78岁, 中位年龄45岁; 54(54/70)例为乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染者。

1.2 方法

1.2.1 组织总RNA及组织蛋白的提取: 取100 mg组织在研钵中, 加入液氮研磨成粉末, 加入1 mL的TRIzol, 按照说明书提取样本总RNA。紫外分光光度仪测定其吸光度(A)值, 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。取100 mg组织在研钵中, 加入液氮, 研磨至粉末, 将粉末转入EP管, 加入1 mL的RIPA(组织/细胞裂解液)和10 μ L的苯甲基硫酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF), 之后按照RIPA裂解液说明书提取组织蛋白, Bradford法测蛋白浓度。

1.2.2 反转录-聚合酶链反应: 取 $A_{260/280}$ 为1.8-2.0的2 μ g总RNA, 按照TIANScript试剂盒说明, 合成cDNA。以 β -肌动蛋白(actin)作为内参照, 进行PCR扩增。引物设计参考文献[5], Piwil2引物序列: 上游5'ATCTATATCTGGCTGCTCCTC3', 下游5'GATGCAAGATGTGTCCTGAC3', 扩增长度303 bp。 β -actin引物序列: 上游5'CACGATGGAGGGGCCGACTCATC3', 下游5'TA-AAGACCTCTATGCCAGT3'。RT-PCR反应体系为25 μ L: TakaRa Taq HS 0.25 μ L, 10 \times PCR缓冲液5 μ L, dNTP Mixture 4 μ L, 上下游引物各0.5 μ L, 模板2 μ L, 其余补水至25 μ L。循环参数: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 46 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35个循环, 72 $^{\circ}$ C终延伸7 min。取PCR产物5 μ L, 2%琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察并照相。用去离子水作阴性对照。使用Quantity-one软件, 计算各个样本Piwil2表达水平, 表达量的相对值(relative expression value) = 待测基因扩增条带的灰度值/

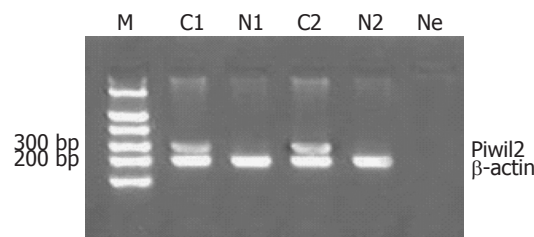


图1 RT-PCR分析Piwil2在肝癌及其对应癌旁组织中的表达。M: marker DL-600; C: 肝癌; N: 肝癌对应的癌旁组织; Ne: 阴性对照(去离子水)。

β -actin基因扩增条带的灰度值。

1.2.3 Western blot免疫印迹: 取30 μ g的组织总蛋白, 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 半干法转膜, 5%的脱脂奶粉封闭1 h。加入1:100的1 \times TBST稀释的Piwil2一抗(美国Santa Cruz公司羊抗人多克隆抗体), 4 $^{\circ}$ C过夜。1 \times TBST洗膜3次, 每次10 min。加入1:400的1 \times TBST稀释的二抗(北京索莱宝公司兔抗羊IgG-HRP), 室温1 h。1 \times TBST洗膜3次, 每次10 min。暗室加入ECL发光剂曝光, 显影。使用Quantity-one软件计算各个样本Piwil2蛋白表达水平。

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件进行统计学处理, 数据采用表示mean \pm SD, 对HCC和对应的癌旁组织中的mRNA和蛋白表达量进行配对 t 检验。对临床病理因素间的关系进行 χ^2 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HCC及对应的癌旁组织中Piwil2基因mRNA及蛋白的表达 在HCC中均可检测到Piwil2基因mRNA的表达, 而在对应的癌旁组织中基本不表达, 其表达量的相对值为 0.32 ± 0.04 , 低于HCC中 0.91 ± 0.04 , 两组比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。RT-PCR结果见图1。在HCC中均可检测到Piwil2的表达, 而在在对应的癌旁组织中基本不表达。两组比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。Western blot印迹结果见图2。在70例肝癌标本中14例对应的癌旁组织中出现Piwil2基因的表达。

2.2 HCC中Piwil2基因mRNA及蛋白表达与临床病理特征的关系 Piwil2基因mRNA的表达与患者的肝内转移、分化程度及癌栓等病理因素有关($P<0.05$); Piwil2蛋白表达与患者的肝内转移及癌栓等病理因素有关($P<0.05$); 两者均与患者的年龄、性别、肿瘤大小无关($P>0.05$, 表1, 2)。

2.3 HCC中Piwil2基因mRNA与蛋白表达的相关性 在70例HCC中, Piwil2 mRNA阳性表达大多

表 1 HCC中Piwil2中mRNA表达与临床病理特征的关系

临床病理特征	n	Piwil2		阳性率(%)	χ^2 值	P值
		表达	缺失			
性别						
男	53	40	13	75.4	1.748	0.186
女	17	10	7	58.8		
年龄(岁)						
<45	50	35	15	70.0	0.175	0.676
≥45	20	15	5	75.0		
肿瘤直径(cm)						
≥10	20	13	7	65.0	0.567	0.451
<10	50	37	13	74.0		
乙型肝炎表面抗原						
+	54	40	14	74.1	0.810	0.368
-	16	10	6	62.5		
组织分型						
肝细胞型	49	32	17	65.3	3.000	0.083
非肝细胞型	21	18	3	85.7		
门静脉癌栓						
有	55	43	12	78.2	5.736	0.017
无	15	7	8	46.7		
肝内转移						
有	53	42	11	79.2	6.534	0.011
无	17	8	9	47.1		
分化程度						
低分化	52	41	11	78.8	5.452	0.020
中高分化	18	9	9	50.0		

■创新盘点

本研究采用RT-PCR及Western blot方法检测Piwil2在HCC中的表达, 分析其与临床病理参数的关系, 以期为肝细胞癌的诊断、治疗及预后提供参考依据。

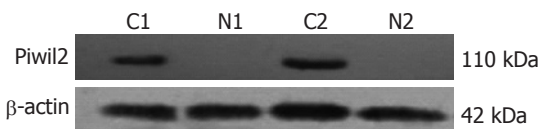


图 2 Western blot印迹分析Piwil2在肝癌及其对应癌旁组织中的表达. C: 肝癌; N: 肝癌对应的癌旁组织.

伴蛋白阳性表达, 两者具有相关性($\chi^2 = 13.113$, $P < 0.01$, 表3).

3 讨论

肿瘤的发生发展是多因素、多阶段、多基因改变的病理过程, 其中抑癌基因功能的丧失和癌基因激活是癌变的分子基础^[6-8]. Piwil2属于Argonaute家族的PIWI亚家族, 位于染色体8p21.3, 大约有23个外显子编码973个氨基酸^[9]. Lee等^[10]研究发现, Piwil2通过激活内源性RNAi机制, 作用于Stat3/Bcl-XL和Stata3/CyclinD1两个重要的细胞信号通路, 抑制细胞凋亡, 调控细胞周期, 在肿瘤发生、发展中起着重要的作用.

国内外许多研究表明, Piwil2基因在人类多种肿瘤中表达. 而在肝癌组织表达鲜见报道. 刘

巧等^[11]通过研究发现Piwil2在宫颈癌和宫颈上皮内瘤变的阳性表达率显著高于正常宫颈组织. 殷德涛等^[12]通过研究60例甲状腺乳头状发现, Piwil2参与了甲状腺乳头状癌的发生发展、与甲状腺乳头状癌的浸润和颈淋巴转移有关. 曹正国等^[13]研究发现Piwil2与膀胱癌的发生发展有关. Liu等^[14]发现Piwil2在乳腺中表达, 可望成为一个分子标志物. Li与Oh等^[15,16]发现Piwil2在结肠癌的发生、发展中起着重要的作用.

我们采用RT-PCR及Western blot法检测了70例HCC及其对应的癌旁非癌组织中Piwil2基因的表达, 发现在HCC组织中Piwil2基因的表达明显高于对应的非癌组织($P < 0.05$). 我们还发现在患者的肝内转移、分化程度及癌栓等病理因面的差异有统计学意义($P < 0.05$). 提示Piwil2基因的mRNA表达与HCC的恶性程度及预后有关. 另外, 70例HCC中均出现Piwil2蛋白的表达, 而在对应的非癌组织中, 56例蛋白表达明显下降或缺失($P < 0.05$). 后续的实验将进一步揭示其Piwil2基因在肝癌中的生物学作用及发生机制.

本研究表明, Piwil2在HCC中具有类似癌基

■同行评价

本文研究了肝癌组织中Piwil2基因mRNA和蛋白质水平的表达,并对其与肿瘤发生的相关性进行了分析,具有一定理论价值。

表 2 HCC中Piwil2中蛋白表达与临床病理特征的关系

临床病理特征	n	Piwil2		阳性率(%)	χ^2 值	P值
		表达	缺失			
性别						
男	53	38	15	71.7	2.053	0.152
女	17	9	8	53.0		
年龄(岁)						
<45	50	37	13	74.0	3.370	0.053
≥45	20	10	10	50.0		
肿瘤直径(cm)						
≥10	20	11	9	55.0	1.871	0.171
<10	50	36	14	72.0		
乙型肝炎表面抗原						
+	54	34	20	63.0	1.871	0.171
-	16	13	3	81.3		
组织分型						
肝细胞型	49	32	17	65.3	0.250	0.617
非肝细胞型	21	15	6	71.4		
门静脉癌栓						
有	55	41	14	74.5	6.375	0.012
无	15	6	9	40.0		
肝内转移						
有	53	40	13	75.5	6.862	0.009
无	17	7	10	41.2		
分化程度						
低分化	52	36	16	69.2	0.400	0.527
中高分化	18	11	7	61.1		

表 3 HCC中Piwil2 mRNA和蛋白表达的相关性

蛋白	mRNA		合计
	表达	缺失	
表达	40	10	50
缺失	7	13	20
合计	47	23	70

$\chi^2 = 13.113, P < 0.01$.

因的作用. 检测Piwil2的表达, 对HCC的早期诊断和预后的判定, 提供一定的依据和新的思路.

4 参考文献

- Liu X, Sun Y, Guo J, Ma H, Li J, Dong B, Jin G, Zhang J, Wu J, Meng L, Shou C. Expression of hiwi gene in human gastric cancer was associated with proliferation of cancer cells. *Int J Cancer* 2006; 118: 1922-1929
- Qiao D, Zeeman AM, Deng W, Looijenga LH, Lin H. Molecular characterization of hiwi, a human member of the piwi gene family whose overexpression is correlated to seminomas. *Oncogene* 2002; 21: 3988-3999
- Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, Carmell
- MA. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature* 2006; 442: 199-202
- Minematsu T, Suzuki M, Sanno N, Takekoshi S, Teramoto A, Osamura RY. PTTG overexpression is correlated with angiogenesis in human pituitary adenomas. *Endocr Pathol* 2006; 17: 143-153
- Nikpour P, Forouzandeh-Moghaddam M, Ziaee SA, Dokun OY, Schulz WA, Mowla SJ. Absence of PIWIL2 (HILI) expression in human bladder cancer cell lines and tissues. *Cancer Epidemiol* 2009; 33: 271-275
- Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 192-198
- Riley LB, Desai DC. The molecular basis of cancer and the development of targeted therapy. *Surg Clin North Am* 2009; 89: 1-15, vii
- 樊嘉, 邱双健. 肿瘤微环境的研究动态与展望. *中华医学杂志* 2008; 88: 505-507
- Ye Y, Yin DT, Chen L, Zhou Q, Shen R, He G, Yan Q, Tong Z, Issekutz AC, Shapiro CL, Barsky SH, Lin H, Li JJ, Gao JX. Identification of Piwil2-like (PL2L) proteins that promote tumorigenesis. *PLoS One* 2010; 5: e13406
- Lee JH, Schütte D, Wulf G, Füzesi L, Radzun HJ, Schweyer S, Engel W, Nayernia K. Stem-cell protein Piwil2 is widely expressed in tumors and inhibits apoptosis through activation of Stat3/Bcl-XL pathway. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 201-211
- 刘巧, 雷蕾, 冯定庆, 周颖, 曹振平, 徐嵘嵘, 凌斌. Pi-

- wil2在宫颈癌组织中的表达和意义. 中国临床保健杂志 2010; 13: 366-368
- 12 殷德涛, 李红强, 王勇飞, 曹胜利, 周玉冰, 郑立运, 江金花, 王庆端. PiWil2在甲状腺乳头状癌中的表达及其与侵袭转移的关系. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志 2011; 46: 237-239
- 13 曹正国, 田超, 蒋茂林, 董晓程, 吴宝国, 黎建欣, 黄洪才. PIWIL2在人膀胱移行细胞癌肿瘤干细胞样细胞中的表达及意义. 国际泌尿系统杂志 2011; 31: 722-726
- 14 Liu JJ, Shen R, Chen L, Ye Y, He G, Hua K, Jarjoura D, Nakano T, Ramesh GK, Shapiro CL, Barsky SH, Gao JX. Piwil2 is expressed in various stages of breast cancers and has the potential to be used as a novel biomarker. *Int J Clin Exp Pathol* 2010; 3: 328-337
- 15 Li D, Sun X, Yan D, Huang J, Luo Q, Tang H, Peng Z. Piwil2 modulates the proliferation and metastasis of colon cancer via regulation of matrix metalloproteinase 9 transcriptional activity. *Exp Biol Med* (Maywood) 2012; 237: 1231-1240
- 16 Oh SJ, Kim SM, Kim YO, Chang HK. Clinicopathologic Implications of PIWIL2 Expression in Colorectal Cancer. *Korean J Pathol* 2012; 46: 318-323

编辑 李军亮 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJG 成功通过评审被 PMC 收录

本刊讯 PubMed Central(PMC)是由美国国家医学图书馆(NLM)下属国家生物技术信息中心(NCBI)创立的开放存取(Open Access)的生物医学和生命科学全文数据库. 此数据库只收录采取国际同行评审制度评议的期刊, 并对收录期刊有较高的科学、编辑及数据文件质量要求.

截至目前, 我国只有两本期刊被PMC收录. 《浙江大学学报B》(英文版)(*Journal of Zhejiang University Science B*)是我国第一本通过PMC评审并于2006-03-15被收录的期刊. 《世界胃肠病学杂志》(英文版)(*World Journal of Gastroenterology, WJG*)第二本通过PMC评审并于2009-03-26被收录, 全文免费向公众开放, 见: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/tocrender.fcgi?journal=818&action=archive> (WJG编辑部主任: 程剑侠 2009-03-26)