

pin1基因在非小细胞肺癌中的表达及其意义

刘群¹ 赖长城² 毛宇彬^{2*} 洪亮^{2△} 孙丽芳² 宋崑² 吴学记²

1. 福建医科大学附属厦门市第一医院呼吸内科, 福建厦门 361003;
2. 厦门大学生命科学学院生物医学系, 福建厦门 361003

[摘要] **背景与目的:** Pin是人类高度保守的特异性磷酸化肽基脯氨酰顺及异构酶,它作用于脯氨酸所形成的肽键,并且仅使磷酸化pSer/Thr-Pro发生异构化,这一磷酸化后调控机制能诱导磷酸蛋白的构象变化,使其发挥功能。近来的研究显示这种新的调控机制在许多生理过程中起重要的调节作用,一旦失调便导致一系列人类疾病。如癌症患者体内Pin1表达异常增高,并调控多种癌基因的信号通路。本研究探讨pin1基因在非小细胞肺癌(NSCLC)中的表达及其意义。**方法:**利用免疫组织化学方法、定量PCR方法分别检测肺癌组织和正常肺组织中Pin1基因在翻译水平和mRNA水平上的表达差异。**结果:**在蛋白质水平上,Pin1的表达在正常/癌两种不同的肺组织中,表达量差异有显著性;而在mRNA水平上,Pin1的表达量在正常/癌两种不同的肺组织中,差异无显著性。**结论:**Pin1在NSCLC组织中的表达,可能是在翻译水平受到了调控;我们的研究进一步证实:Pin1在NSCLC组织中存在蛋白水平的过量表达,这对利用Pin1作为NSCLC组织检测标志物提供了理论依据。

[关键词] 非小细胞肺癌; Pin1; 基因表达; 免疫组织化学; 实时定量PCR

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-3639(2008)08-0607-04

Expression of pin1 gene in lung cancer and its significance LIU Qun, LAI Chang-cheng, MAO Yubin, HONG Liang, SUN Li-fang, SONG Wei, WU Xue-ji (Department of Respiratory, The First Hospital of Xiamen, Fujian Medical University, Xiamen Fujian 361003, China)

Correspondence to: WU Xue-ji E-mail: wuxj@xmu.edu.cn

[Abstract] **Background and purpose:** Pin1 is a highly conservative enzyme that isomerizes only the phosphorylated Ser/Thr-Pro bonds in certain proteins, thereby inducing conformational changes. Recent results indicate that such conformational changes following phosphorylation are a novel signaling mechanism pivotal in regulating many cellular functions. Overexpression of Pin1 is prevalently found in human cancers. We studied expression of pin1 in non-small cell lung cancer and its implication in clinical. **Methods:** We detected the differential expression level of Pin1 protein in lung cancer specimen and normal lung tissues by immunohistochemical staining. Real-time quantitative PCR was also applied to detect the mRNA differential expression level in lung cancer tissues and normal lung tissues. **Results:** Pin1 protein is overexpressed in lung cancer at the protein level. On the other hand, the expression level of Pin1 mRNA in lung cancer tissue has no significant change compared with normal tissue. **Conclusion:** It demonstrated that the Pin1 expression in lung cancer might be regulated by translation mechanism. Our data implicate that Pin1 may serve as a valuable molecular marker for human cancer.

[Key words] non-small cell lung cancer; gene expression; immunohistochemical staining; real-time PCR

蛋白质Pro残基前Ser/Thr的可逆磷酸化,又称Pro介导的磷酸化,是一重要调控机制,它能调节细胞各种生命活动,如细胞增殖与分化^[1]。其失调能导致各种人类疾病,许多癌基因和抑

癌基因直接受Pro介导磷酸化的调控^[2]。同时,AD和相关疾病中神经纤维缠结的形成和神经退化也与其相关^[3]。

Pin1是人类高度保守的特异性磷酸化肽基脯氨酰顺及异构酶,Pin1的发现使人们对磷酸化依赖型构象变化的认识有了新的突破。Pin1能特

通讯作者: 吴学记 E-mail:wuxj@xmu.edu.cn

*: 现工作单位为厦门大学医学院基础医学部;

△: 现工作单位为华中科技大学同济医学院药学院。

异性催化磷酸化pSer/Thr-Pro的顺反异构, 而非磷酸化的Ser/Thr-Pro无此作用^[4]。这一新的磷酸化后调控机制能诱导磷酸蛋白的构象变化, 使其发挥功能。近来的研究显示, 这种新的调控机制在许多生理过程中起重要的调节作用, 一旦失调便导致一系列人类疾病^[5-7]。如癌症患者体内Pin1表达异常增高, 而在神经退行性AD患者体内则明显下降, 同时, Pin1缺失转基因鼠表现出与年龄相关的神经退化。大多数常见癌症, 如前列腺癌、乳腺癌、宫颈癌、脑癌、肺癌和结肠癌中Pin1均呈过量表达^[5,8]。Pin1还可通过多条途径促进细胞异常增殖和肿瘤发生, 因此被认为是肿瘤诊断和治疗的新的分子靶点。本研究探讨非小细胞肺癌肺癌(NSCLC)患者癌组织标本及正常组织中pin1基因的表达水平及其在NSCLC发生发展中的作用, 并以p53基因作为阳性表达的对照。

1 材料和方法

1.1 临床样品 收集2005年1月至2007年10月厦门市第一医院就诊的NSCLC患者74例, 均经病理组织学证实。其中I 5例, II 7例, III+IV 33例, T₁ 7例, T₂ 4例, T₃ 6例, T₄ 4例, T₁+T₂ 3例, T₃+T₄ 5例, 同期收集癌旁正常组织36例作为对照。

1.2 RNA提取 组织的全细胞RNA提取按Trizol试剂盒(GIBCO BRL Life Technologies)说明书进行。10 mg组织利用1 ml的Trizol溶液充分研磨后, 移入1.5 ml EP管中, 室温静置5 min。加入0.2 ml氯仿, 充分混匀, 室温静置5 min后在15 000 × g离心15 min。弃沉淀, 收集上层水相加入0.5 ml异丙醇, 混匀后放于-20 °C中1 h, 再经15 000 × g离心10 min。弃上清液, 留取沉淀。沉淀用1 ml新鲜75%乙醇(预冷)洗涤干燥后。溶于20 μl的DEPC水, 保存于-80 °C超低温冰箱中, 或立即用于逆转录。

1.3 引物设计 用于实时定量PCR(RT-PCR)分析的引物由Oligo Primer Analysis软件(5.0版)设计; 为避免基因组DNA的污染, 设计的引物至少跨越1个内含子。Pin1引物为: F: 5'-TGATCAACGGCTACATCCAG-3', R: 5'-CAAACGAGGCGTCTTCAAAT-3'。管家基因GAPDH引物为: F: 5'-CATGACAACTTTGGTATCGTG-3', R: 5'-

GTGTCGCTGTTGAAGTCAGA-3'。

1.4 实时定量PCR 实时定量PCR采用PROMEGA试剂盒, PCR反应溶液组为250 ng cDNA, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTP, 0.6 μmol/L引物, 1单位Taq聚合酶(Takara Bio Inc. Japan), 0.625 μl 1 × SYBR Green1荧光染料(Molecular Probes, Eugene, OR), 2.5 μl 10 × AmpliTaq 缓冲液至终体积25 μl。PCR反应循环为: 95 °C预热5 min, 95 °C变性30 s, 58 °C退火30 s, 72 °C延长1 min; 共计40个循环。癌组织Pin1的表达量大于或者等于相应癌旁组织(ΔCt值)1.8倍时候, 为“过表达”, 低于1.8倍时为“非过表达”。

1.5 免疫组化测定 Pin1抗血清由本实验室制备(1:300稀释), p53单抗购自Oncogene Research Products(1:500稀释)。

1.5.1 测定步骤 组织切片经脱蜡、水化; 用PBS、3% H₂O₂(80%甲醇)清洗后; 滴加正常山羊血清封闭液, 室温放置20 min。滴加一抗50 μl, 于4 °C过夜。滴加二抗40~50 μl, 室温温育2 h; DAB显色5~10 min, 在显微镜下掌握染色程度; 用苏木精复染2 min, 盐酸酒精分化; 自来水冲洗10~15 min后; 脱水、透明、封片、镜检。

1.5.2 光镜下半定量结果评定标准 参照许良忠^[9]的方法。染色强度分数标准为: 棕褐色3分; 棕黄色2分; 淡黄色1分; 无着色0分。所示在同样物镜下计数阳性细胞数: 一个视野内着色细胞>75为4分; 51%~75%为3分; 11%~50%为2分; ≤10%为1分; 阴性为0分。两项得分相乘: 0~3分为阴性表达“-”; 满3分为“+”; 4分为“++”; 5分以上为“+++”。

1.6 统计分析 免疫组化、实时定量PCR实验结果利用SPSS软件分析。用方差检验, 用校正t检验检测两组不同独立样品的表达性差异。

2 结果

2.1 Pin1蛋白在NSCLC组织中的表达 经免疫组化测定, Pin1蛋白在NSCLC、癌旁正常组织中的阳性表达见图1。在74例NSCLC组织中, Pin1蛋白的表达: -表达5例, +表达16例, ++表达29例, +++表达24例, 表达阳性率达93.2%(69/74); 在正常组织中仅为22.2%

[8/36 (-表达28例, +表达8例)], 两组间差异有显著性 ($F=12.088, P=0.001$)。由表1可见, Pin1蛋白在不同临床分期的NSCLC组织中的表达情况。

2.2 pin1基因在NSCLC组织和正常肺组织中mRNA水平的表达 实时定量PCR检测pin1在NSCLC组织中过表达12例, 非过表达20例, 过表达率37.5% (12/32); 在正常组织中过表达10例, 非过表达20例, 过表达率33.3% (10/30)。我们将NSCLC组织的每个 ΔCt 值与正常肺组织的每个 ΔCt 值, 用SPSS软件分析两

组不同样品的差异性。结果在16例NSCLC组织和16例正常肺组织中, pin1 mRNA的表达两组间差异无显著性 (表2)。

表1 Pin1蛋白在不同临床分期的NSCLC肺癌组织的表达

Tab.1 Correlation between Pin1 protein expression and clinical stage

Expression	Clinical stage								
	I	II	III+IV	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₁ +T ₂	T ₃ +T ₄
-	4	1	0	0	0	0	0	0	0
+	1	4	8	0	1	1	0	0	1
++	0	2	16	3	1	4	2	0	1
+++	0	0	9	4	2	1	2	3	3

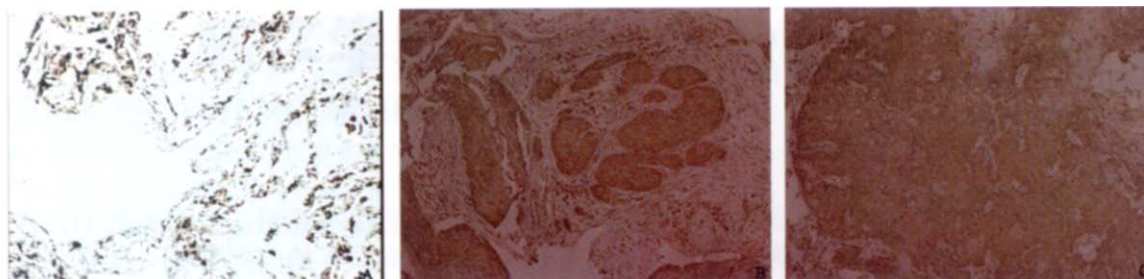


图1 非小细胞肺癌组织与癌旁正常组织免疫组化染色结果

Fig.1 Immunohistochemical staining result for Pin1 and P53 in normal lung tissue and NSCLC tissue

A: Normal lung tissue Pin1 immunostaining; B: NSCLC tissue with Pin1 immunostaining; C: NSCLC tissue with P53 immunostaining. ($\times 100$)

表2 pin1基因在肺癌组织中mRNA表达的t检验结果

Tab.2 The t-test for mRNA expression results of pin1 in NSCLC

	F test		Independent sample t test		
	F	P	t	P	s
Homoscedasticity	0.211	0.650	0.726	0.473	1.11802
Heteroscedasticity			0.726	0.474	1.11802

3 讨 论

在免疫组化分析中, 我们发现在NSCLC组织中Pin1蛋白表达阳性率高, 与癌旁正常肺组织中的表达差异有显著性。而从实时定量PCR的结果显示, 在mRNA水平, pin1基因在肺癌中的表达量和正常组织相比, 差异无显著性。在组织细胞中蛋白的表达需要经过转录和翻译两个步骤, 如果在转录水平受到调控, 那么NSCLC组织中pin1基因的mRNA量应该相应比正常组织中表达量要高, 但结果显示NSCLC组织中表达量与差异无显著性, 因此可能是在翻译水平上受到调控。

本研究中, 在NSCLC组织中Pin蛋白呈高表达, 这与Wulf等^[5]在乳腺癌、Ayala等^[10]在前列腺癌、Nakashima等^[11]在甲状腺癌、Pang等^[12]在肝癌中的研究结果一致。Bao等^[13]发现在人类的许多肿瘤组织中存在Pin1蛋白的过度表达, 其中还包括结肠癌、NSCLC、子宫颈

癌等。这表明Pin1蛋白高表达可能激活NSCLC某些肿瘤相关通路和相关因子, 从而参与NSCLC的发生。虽然在NSCLC组织存在Pin1蛋白的过表达, 但与患者的性别、年龄、地区、分区等临床病理学参数的相关性, 还需要更进一步的收集样例以进行研究。

[参 考 文 献]

- [1] Lu KP, Liou YC, Zhou XZ. Pinning down the proline-directed phosphorylation signaling [J]. Trends Cell Biol, 2002, 12: 164-172.
- [2] Lu KP. Prolyl isomerase Pin1 as a molecular target for cancer diagnostics and therapeutics [J]. Cancer Cell, 2003, 4: 175-180.
- [3] Geschwind DH. Tau phosphorylation, tangles, and neurodegeneration: the chicken or the egg [J]. Neuron, 2003, 40: 457-460.
- [4] Ranganathan R, Lu KP, Hunter T, et al. Structural and functional analysis of the mitotic peptidyl-prolyl isomerase Pin1 suggests that substrate recognition is phosphorylation dependent [J]. Cell, 1997, 89: 875-886.
- [5] Wulf GM, Ryo A, Wulf GG, et al. Pin1 is overexpressed in breast cancer and potentiates the transcriptional activity of phosphorylated c-Jun towards the cyclin D1 gene [J]. EMBO J, 2001, 20: 3459-3472.
- [6] Ryo A, Liou YC, Lu KP, et al. Prolyl isomerase Pin1: a catalyst for oncogenesis and a potential therapeutic target in cancer [J]. J. Cell Sci, 2003, 116: 773-783.
- [7] Liou YC, Sun A, Ryo A, et al. Role of the prolyl isomerase Pin1

- in protecting against age-dependent neurodegeneration [J]. Nature, 2003, 424: 556-561.
- [8] Ayala G, Wang D, Wulf G, et al. Pin1 is a novel prognostic marker in prostate cancer [J]. Cancer Res, 2003, 63: 6244-6251.
- [9] 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准 [J]. 中国癌症杂志, 1996, 6: 229-231.
- [10] Ayala G, Wang D, Wulf G, et al. (2003) Pin1 is a novel prognostic marker in prostate cancer [J]. Cancer Res. 63: 6244-6251.
- [11] Nakashima M, Meirmanov S, Naruke Y, et al. CyclinD1 overexpression in thyroid tumours from a radio-contaminated area and its correlation with Pin1 and aberrant β -catenin expression [J]. J Pathol, 2004, 202: 446-455.
- [12] Pang R, Yuen J, Yuen MF, et al. PIN1 overexpression and beta-catenin gene mutations are distinct oncogenic events in human hepatocellular carcinoma [J]. Oncogene, 2004, 23: 4182-4186.
- [13] Bao L, Kimzey A, Sauter G, et al. Prevalent overexpression of prolyl isomerase Pin1 in human cancers [J]. Am J Pathol, 2004, 164: 1727-1737.
- (收稿日期: 2008-04-23 修回日期: 2008-07-08)

肿瘤外科游离皮瓣学习班

——将于2008年10月16日在上海召开

长期以来, 恶性实体性肿瘤手术以局部根治性切除为主要原则, 尽管达到了良好的局部控制, 但是造成了明显的形体与功能毁损, 进而引发严重的心理创伤。随着对于肿瘤生物学行为的深入了解, 早期诊断水平的提高, 以及综合治疗的发展, 肿瘤外科治疗方式朝着多种形式发展, 在保证局部控制的前提下, 尽量恢复患者的形体与功能, 从而极大地改善患者的生活质量。

显微外科、整复技术的进步推动了这一领域的发展。其中以乳腺癌的游离皮瓣乳房重建技术、头面部肿瘤的游离皮瓣重建修复术为代表。这类手术往往需要借助于肿瘤外科与整形外科医生在全过程中相互配合, 也必须有手术室、病区护理人员的积极合作。

M.D. Anderson Cancer Center是美国排名第一的肿瘤中心, 复旦大学附属肿瘤医院与该中心结成姐妹医院后, 已在临床、科研领域开展卓有成效的合作。此次学习班将邀请该中心整形外科的Dr. Peirong Yu, Dr. David Chang, 来到我院进行手术演示和授课。两位教授为全美著名整形外科专家, 尤其擅长头颈、乳房的整复, 此次来访将充分展现游离皮瓣在乳腺癌、头面部肿瘤手术中的应用, 介绍游离皮瓣相关的手术前后的各种准备以及相关人员的培训。我院乳腺外科吴旻教授、头颈外科稽庆海教授将担任此次学习班的负责人。

本次肿瘤外科游离皮瓣学习班将于2008年10月16日至17日举办。16日全天由Dr. Peirong Yu, Dr. David Chang手术演示, 内容包括乳腺癌、头颈部肿瘤术后的修复重建。17日上午将安排教学查房与授课, 期间将有机会与各位专家充分交流。

我们希望通过此次学习班, 为大家提供一个充分了解、学习游离皮瓣重建、整复技术的机会, 为保证学习班的手术参观、查房质量, 我们将学员人数限定在20人, 欢迎各位同道踊跃报名。本次学习班暂不收取会务费, 住宿、交通等费用请自理, 会务组可帮助预定附近酒店。

注: 报名截止日期: 2008.9.15

联系人: 王宇

联系地址: 上海市东安路270号3号楼7楼, 200032

Email: neck130@hotmail.com

肿瘤外科游离皮瓣学习班会务组
复旦大学附属肿瘤医院乳腺外科
复旦大学附属肿瘤医院头颈外科
2008-08-01