

文章编号:1005-6947(2007)05-0438-04

· 基础研究 ·

Pin1 和周期素 D1 在胰腺癌中的表达及其意义

林美举^{1,2}, 吴河水¹, 张景辉¹, 张磊¹, 徐建波¹

(1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院 胰腺外科, 湖北 武汉, 430022; 2. 山东省烟台市烟台山医院 普通外科, 山东 烟台 264000)

摘要:目的 检测胰腺癌及癌旁组织中 Pin1 和周期素 D1 基因的表达,探讨 Pin1 在胰腺癌发病中所起的作用。**方法** 收集 27 例胰腺肿瘤组织及其相应的肿瘤旁组织标本,采用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应法(RQ-RT-PCR)检测胰腺良恶性肿瘤及肿瘤旁组织中 Pin1 和周期素 D1 mRNA 的表达,运用 Fisher 精确概率分析两者之间的相关性及其与肿瘤临床分期和病理特征的关系。**结果** 7 例胰腺囊腺瘤中周期素 D1 和 Pin1 的表达与肿瘤旁组织之间无显著性差异;而 20 例胰腺癌中周期素 D1 和 Pin1 的表达明显高于肿瘤旁组织[(2.78 ± 1.02) vs. (4.36 ± 1.27) 和 (5.48 ± 1.69) vs. (9.97 ± 1.86), $P < 0.05$]。Pin1 和周期素 D1 与肿瘤的临床分期和病理分化程度无明显的相关(组间差异均为 $P > 0.05$),但 Pin1 与周期素 D1 的表达有关($P < 0.01$)。**结论** 胰腺癌中 Pin1 的过表达可促进周期素 D1 表达,由此诱导了肿瘤的发生;Pin1 可能在胰腺癌中起着重要作用。

[中国普通外科杂志,2007,16(5):438-441]

关键词: 胰腺肿瘤; 基因, Pin1; 细胞周期素 D1; 逆转录聚合酶链反应

中图分类号:R735.9

文献标识码:A

Expression and clinical significance of Pin1 and cyclin D1 in pancreatic carcinoma

LIN Mei-ju^{1,2}, WU He-shui¹, ZHANG Jing-hui¹, ZHANG Lei¹, XU Jian-bo¹

(1. Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China; 2. Department of General Surgery, Yantai Hospital, Yantai, 264000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of Pin1 and cyclin D1 in human pancreatic carcinoma and to discuss its role in oncogenesis of pancreatic cancer. **Methods** The mRNA expression of Pin1 and cyclin D1 in pancreatic tumor tissues and corresponding adjacent nontumor tissues 27 patients was detected by the real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RQ-RT-PCR). The results of RQ-RT-PCR were analyzed by one-way ANOVA and Fisher's exact probabilities test. **Results** Cyclin D1 and Pin1 were overexpressed at mRNA level in pancreatic carcinoma tissues compared with their adjacent nontumor tissues. Cyclin D1 overexpression were found in 14 of 20 pancreatic carcinoma tissue specimens and Pin1 overexpression in 13 of 20 carcinoma tissue specimens. The expression of cyclin D1 and Pin1 in pancreatic cystadenoma tissues was not different than that of corresponding adjacent nontumor pancreatic tissue. Pin1 overexpression positively correlated with an increase in cyclin D1 levels as shown by Fisher's exact probabilities test. However, Pin1 and cyclin D1 expression was not correlated with clinical stage and pathological parameters. **Conclusions** The overexpression of Pin1 in pancreatic carcinoma tissues could promote cyclin D1 expression, which might be a critical event in oncogenesis of pancreatic carcinoma. Pin1 may play a key role in pancreatic carcinoma.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(5): 438-441]

收稿日期:2006-09-18; 修订日期:2007-01-22。

作者简介:林美举,男,山东烟台人,华中科技大学同济医学院附属协和医院硕士研究生(现为山东省烟台市烟台山医院医师),主要从事胰腺肿瘤方面的研究。

通讯作者:林美举 E-mail:Meiju-lin119@yahoo.com.cn

Key words: Pancreatic Neoplasms; Genes, Pin1; Cyclin D1; Reverse Transcriptasa Polymerase Chain

Reaction

CLC number: R735.9

Document code: A

Pin1 是人类多肽脯氨酰基顺/反异构酶,能特异性地催化磷酸化的丝/苏-脯氨酸基序发生异构,改变底物蛋白的构象,调节底物蛋白的功能。最近的研究显示,Pin1 在多种肿瘤组织中过表达,并能激活多条致癌通路^[1]。Pin1 作为肿瘤发生的催化分子,在胰腺癌中的表达和作用尚不清楚。本研究通过检测胰腺癌及癌旁组织中 Pin1 和周期素 D1 基因的表达,探讨 Pin1 在胰腺癌发病中的作用及可能机制。

1 材料和方法

1.1 标本来源

肿瘤组织来自华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科 2005 年 7 月—2006 年 1 月的手术患者:(1)胰腺癌组,20 例。男 12 例,女 8 例;年龄 34~82(平均年龄 56.7 岁)。(2)胰腺囊腺瘤组,7 例。男 4 例,女 3 例;年龄 41~73(平均年龄 53.2 岁)。所有患者均为初治,在手术前未进行化疗和放疗。对照组织为同一患者距离肿瘤边缘 2 cm 以上的切缘肿瘤旁组织,经病检证实无肿瘤细胞浸润。留取组织标本置液氮中冻存。

1.2 引物

PCR 引物序列根据 Primer 5.0 设计,并由上海博亚生物技术有限公司合成。 β -actin 引物:上游为 5'-AGCAGAGAATGGAAAGTCAAA-3',下游为 5'-ATGCTGCTTACATGTCTCGAT-3'。周期素 D1 引物:上游为 5'-CCGTCCATCGGAAGATC-3',下游为 5'-CCTCCTCCTCGCACTTCTGT-3'。Pin1 引物:上游为 5'-GACCCGAGATTCTCCCTT-3'下游为 5'-GAACACCCCTCCCACCACA-3'。

1.3 实时定量逆转录聚合酶链反应(real-time quantitative Reverse Transcription-polymerase chain reaction, RQ RT-PCR):

用 Trizol 试剂提取组织中总 RNA,紫外分光光度仪检测 RNA 含量与纯度。第一链 cDNA 合成反应体系为 2 μ g RNA,0.5 μ g Olig dT15,4 μ L 5 \times 缓冲液,2 μ L dNTPmix (10 mmol/L),25 U RNase,200 U MMLV 逆转录酶,总体积为 25 μ L,42 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;然后,对 PIN1 和 β -actin 进行实时荧光定量

PCR 反应扩增。体系包括:(1)10 \times 缓冲液 2.5 μ L;(2) dNTP (10 mmol/L) 1 μ L;(3) 荧光 (20 μ mol/L) 0.5 μ L;(4) Taq 酶(1 U/ μ l) 0.5 μ L;(5) 上游引物(20 μ mol/L) 0.5 μ L;(6) 下游引物(20 μ mol/L) 0.5 μ L;(7) cDNA 模板 2 μ L;(8) MgCl₂ (20 mmol/L) 2 μ L;(9) 蒸馏水加至 25 μ L。阴性对照用 1 μ L 蒸馏水代替 cDNA 模板。扩增条件:94 $^{\circ}$ C 变性 20 s,56 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s;共扩增 40 个循环。扩增结果采用 FTC2000 荧光 PCR 仪自带的实时荧光定量 PCR 分析程序分析 Ct 值,然后计算其相应的 Δ Ct 值(目的基因 PIN1 的 Ct 值减去内参 β -actin 的 Ct 值)。 Δ Ct 值的越小说明基因拷贝数越多。

1.4 统计学处理

采用 SPSS12.0 统计软件进行统计学处理。实验数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。用单因素方差分析和 Fisher 精确检验法进行比较。显著性水准为 0.05。

2 结果

2.1 胰腺肿瘤中周期素 D1 和 Pin1 mRNA 的表达

7 例胰腺囊腺瘤中周期素 D1 和 Pin1 的表达与肿瘤旁组织相比差异无显著性(5.24 \pm 1.62 vs. 4.36 \pm 1.27, $P > 0.05$; 8.98 \pm 1.89 vs. 9.97 \pm 1.86, $P > 0.05$);而 20 例胰腺癌中周期素 D1 和 Pin1 的表达较肿瘤旁组织明显升高($P < 0.05$) (表 1) (图 1),其中有 14 例癌组织周期素 D1 mRNA 的 Δ Ct 较肿瘤旁组织减少 2 个标准差以上,有 13 例癌组织 Pin1 mRNA 的 Δ Ct 较正常组织减少 2 个标准差以上。

表 1 胰腺良恶性肿瘤及瘤旁组织中周期素 D1 和 Pin1 mRNA 的表达(Δ Ct)

	组织例数	mRNA 的表达(Δ Ct)	
		周期素 D1	Pin1
瘤旁组织	27	4.36 \pm 1.27	9.97 \pm 1.86
胰腺囊腺瘤	7	5.24 \pm 1.62	8.98 \pm 1.89
胰腺癌	20	2.78 \pm 1.02	5.48 \pm 1.69

注:与瘤旁组织相比, $P < 0.05$

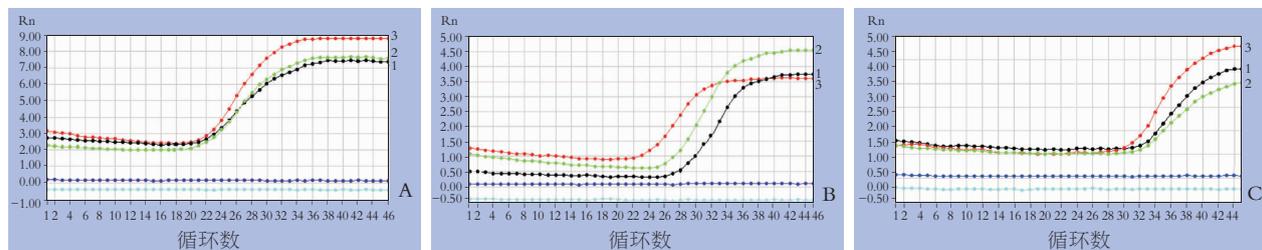


图1 PCR扩增曲线图 A: β -actin 扩增曲线;B:周期素 D1 扩增曲线;C:Pin1 扩增曲线 1:正常组织;2:胰腺良性肿瘤组织;3:胰腺癌组织

2.2 相关性分析结果

Fisher 精确分析显示, Pin1 和周期素 D1 与肿瘤的临床分期和病理分化程度无明显关系 (P 值均大于 0.05) (表 2), 但 Pin1 与周期素 D1 的表达密切相关 ($P < 0.01$) (表 3)。

表2 胰腺癌中 Pin1 和周期素 D1 的表达与临床分期和分化程度之间的关系

	周期素 D1				Pin1			
	高	低	合计	P	高	低	合计	P
淋巴转移								
无	3	3	6	0.429	2	4	6	0.232
有	11	3	14		11	3	14	
分化程度								
高分化	2	3	5	0.129	3	2	5	0.083
中低分化	12	3	15		10	5	15	

表3 胰腺癌中 Pin1 和周期素 D1 之间的关系

	周期素 D1 表达		P
	低	高	
Pin1 表达			
低	3	4	0.007
高	3	10	
合计	6	14	

注: Δ Ct 较肿瘤旁组织减少 2 个标准差以上为高表达, 否则为低表达

3 讨论

胰腺癌是一种恶性程度很高的肿瘤, 早期诊断困难, 临床确诊时大都已是晚期, 手术切除率低, 患病率与病死率几乎一致^[2]。随着分子生物学的深入, 从分子水平揭示胰腺癌发生发展过程中出现的标志物, 可能成为寻找胰腺癌早期诊断和治疗靶点的重要途径。

Pin1 是一种相对大分子质量 (18kD) 的多肽脯氨酰基顺/反异构酶, 其通过催化丝/苏-脯氨酸基序顺/反异构体相互转变, 使细胞周期中多种关键蛋白激酶发生空间构象的改变, 来调节蛋白分子活性, 促使细胞增殖^[1]。正常组织细胞中

Pin1 表达很低, 而肿瘤组织中 Pin1 表达明显增加。Pin1 表达增加造成细胞周期紊乱, 加快细胞的增殖, 促进肿瘤的发生, 因此, 被认为是肿瘤发生的催化分子^[1]。研究^[3]显示, 乳腺癌中的 Pin1 较正常乳腺组织高 10 倍。Bao 等^[4]发现在 2 041 例肿瘤样本和 609 例正常组织标本, 发现 63.3% 的 (38/60) 肿瘤 Pin1 的表达超过了正常组织的 10%, 其中包括前列腺癌、乳腺癌、结肠癌和黑色素瘤等。

本研究发现胰腺癌组织中 Pin1 的表达明显高于肿瘤旁组织, 其中 13/20 例 Pin1 mRNA 的 Δ Ct 值较正常组织减少 2 个标准差以上, 而表达最高者 Δ Ct 值仅为正常组织的 1/3。由此推测 Pin1 可能在胰腺癌的发病中起着重要作用。对乳腺癌^[3]和前列腺癌^[5]的研究显示, Pin1 在肿瘤中不仅表达增高, 而且与肿瘤的临床分期和预后密切相关。然而, 本研究结果显示 Pin1 的表达与胰腺癌的淋巴转移和分化程度并无明显关系。此结果可能主要是病例数较少, 尤其是早期和高分化的胰腺癌例数少的缘故。

目前研究最多的 Pin1 靶分子是周期素 D1, 它是 G_1 期最先被合成的周期素, 为细胞 G_1 期进入 S 期的一个重要调控因子, 形成周期素 D1-周期素依赖的蛋白激酶 4/6 (CDK4/6) 复合物, 通过激活 CDK4/6 等作用, 促进 DNA 合成, 加速细胞增殖^[6]。周期素 D1 的基因扩增和过度表达是人类肿瘤最常见的基因异常之一^[7]。本研究显示胰腺囊腺瘤中周期素 D1 的基因表达与肿瘤旁组织无明显区别; 胰腺癌组织中有 70.0% (14/20) 的呈周期素 D1 mRNA 高表达。

Fisher 精确分析显示周期素 D1 的上调与 Pin1 的高表达密切相关。在 Pin1 表达较高的肿瘤组织中周期素 D1 的表达也很高; 在 13 例 Pin1 高表达的组织中有 10 例周期素 D1 的表达也明显升高。在乳腺癌的研究中显示^[1], Pin1 通过 Ras/AP-1 和 β -连环素/T 细胞因子 (TCF) 信号转导途径, 增强周期素 D1 的转录。Pin1 能使

磷酸化的 c-Jun 丝 - 脯氨酸基序发生异构,增强 c-Jun 的活性;激活的 c-Jun 作用于周期素 D1 启动子的 AP - 1 位点,促进周期素 D1 的表达。Pin1 还能使 β - 连环素异构,导致 β - 连环素在细胞核内聚集,大量 β - 连环素作用于周期素 D1 启动子的 TCF 位点,提高了周期素 D1 的转录。已有的研究显示胰腺癌中 c-jun 和 β - 连环素的表达增加, β - 连环素核浆比例失调^[8-10]。故认为,胰腺癌中 Pin1 可能通过对 c-jun 和 β - 连环素的调节从而影响周期素 D1 的基因表达。

本实验结果可见,胰腺癌 Pin1 的过表达可能通过 Ras/AP - 1 和 β - 连环素/TCF 途径增强周期素 D1 的转录,使周期素 D1 基因扩增,促进细胞增殖,诱导了肿瘤的发生发展,有效地抑制 Pin1 表达或 Pin1 的功能可能成为胰腺癌治疗的新靶点。

参考文献:

[1] 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(5): 773 - 783.

[2] Regine WF, John WJ, Mohiuddin M. Current and emerging treatments for pancreatic cancer [J]. *Drugs Aging*, 1997, 11(4): 285 - 295.

[3] Wulf GM, Ryo A, Wulf GG, *et al.* Pin1 is overexpressed

in breast cancer and cooperates with Ras signaling in increasing the transcriptional activity of c-Jun towards cyclin D1 [J]. *EMBO J*, 2001, 20(13): 3459 - 3472.

[4] Bao L, Kimzey A, Sauter G, *et al.* Prevalent overexpression of prolyl isomerase Pin1 in human cancers [J]. *Am J Pathol*, 2004, 164(5): 1727 - 1737.

[5] Ayala G, Wang D, Wulf G, *et al.* The Prolyl Isomerase Pin1 is a novel prognostic marker in human prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(19): 6244 - 6251.

[6] Jiang W, Kahn SM, Zhou P, *et al.* Overexpression of cyclin D1 in rat fibroblasts causes abnormalities in growth control, cell cycle progression and gene expression [J]. *Oncogene*, 1993, 8(12): 3447 - 3457.

[7] Fu MF, Wang CG, LI ZP, *et al.* Minireview: Cyclin D1: Normal and Abnormal Functions [J]. *Endocrinology*, 2004, 145(12): 5439 - 5447.

[8] Meggiato T, Calabrese F, De Cesare CM, *et al.* C-JUN and CPP32 (CASPASE 3) in human pancreatic cancer: relation to cell proliferation and death [J]. *Pancreas*, 2003, 26(1): 65 - 70.

[9] Li YJ, Wei ZM, Meng YX, *et al.* Beta-catenin up-regulates the expression of cyclin D1, c-myc and MMP-7 in human pancreatic cancer: relationships with carcinogenesis and metastasis [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(14): 2117 - 2123.

[10] Qiao Q, Ramadani M, Gansauge S, *et al.* Reduced membranous and ectopic cytoplasmic expression of beta-catenin correlate with cyclin D1 overexpression and poor prognosis in pancreatic cancer [J]. *Int J Cancer*, 2001, 95(3): 194 - 197.

· 读者 · 作者 · 编者 ·

关于一稿两投和一稿两用问题处理的声明

近来本刊编辑部发现仍有个别作者一稿两投和一稿两用,为了维护本刊的声誉和广大读者的利益,本刊就一稿两投和一稿两用问题的处理声明如下。

1. 一稿两投和一稿两用的认定:凡属原始研究的报告,同语种一式两份投寄不同的杂志,或主要数据和图表相同、只是文字表达可能存在某些不同之处的两篇文稿,分别投寄不同的杂志,属一稿两投;一经为两杂志刊用,则为一稿两用。会议纪要、疾病的诊断标准和防治指南、有关组织达成的共识性文件、新闻报道类文稿分别投寄不同的杂志,以及在一种杂志发表过摘要而将全文投向另一杂志,不属一稿两投。但作者若要重复投稿,应向有关杂志编辑部作出说明。

2. 作者在接到收稿回执后满3个月未接到退稿通知,表明稿件仍在处理中,若欲投他刊,应先与本刊编辑部联系。

3. 编辑部认为文稿有一稿两投或两用嫌疑时,应认真收集有关资料并仔细核对后再通知作者,在作出处理决定前请作者就此问题作出解释。编辑部与作者双方意见发生分歧时,由上级主管部门或有关权威机构进行最后仲裁。

4. 一稿两投一经证实,则立即退稿,对该作者作为第一作者所撰写的论文,2年内将拒绝在本刊发表;一稿两用一经证实,将择期在杂志中刊出作者姓名、单位以及该论文系重复发表的通告,对该作者作为第一作者所撰写的论文,2年内拒绝在本刊杂志发表。本刊将就此事向作者所在单位和该领域内的其他科技期刊进行通报。