

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.15.005

## Pim-1 在非小细胞肺癌中的表达及其与 c-Myc 的相关性

刘星宏,温桂兰<sup>△</sup>

(南昌大学第一附属医院呼吸与危重症医学科 330006)

**[摘要]** **目的** 研究原癌基因 Pim-1 在非小细胞肺癌及癌旁正常组织中的表达情况及其与 c-Myc 的相关性。**方法** 收集该院胸外科手术切除的非小细胞肺癌患者的肺癌及癌旁正常肺组织标本各 30 例,统计临床病例资料及跟踪后期病理结果,利用 RT-PCR、qRT-PCR 及免疫组织化学方法检测肺癌及癌旁正常组织中 Pim-1 mRNA、c-Myc 及 Pim-1 蛋白的表达,分析 Pim-1 表达与临床病理特征及 c-Myc 表达的相关性。**结果** 在非小细胞肺癌中 Pim-1 阳性率、mRNA 及蛋白表达量明显高于癌旁组织,mRNA 表达量分别为  $0.798 \pm 0.083$  和  $0.394 \pm 0.107$  ( $P < 0.01$ ),蛋白阳性例数分别为 18 例及 6 例 ( $P = 0.002$ )。Pim-1 蛋白的表达与非小细胞肺癌患者的年龄差距、性别差异、有无吸烟史、肿瘤病理类型及分化程度无关 ( $P > 0.05$ ),但与有无淋巴结转移及肿瘤的 TNM 分期有关 ( $P < 0.05$ ),有淋巴结转移及 TNM 分期升高,其表达量也随之上调。Pim-1 与 c-Myc 蛋白表达呈正相关,相关系数 ( $r$ ) 为  $0.433$  ( $P = 0.017$ )。**结论** Pim-1 在非小细胞肺癌组织中呈高表达趋势,且随着存在淋巴结的转移及 TNM 分期的升高,其表达也随之增加。

**[关键词]** 癌,非小细胞肺;原癌基因蛋白质 c-Pim-1;靶向治疗

**[中图分类号]**

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2015)15-2031-03

## The expression of Pim-1 in non-small cell lung cancer and its relationship with c-Myc

Liu Xinghong, Wen Guilian<sup>△</sup>

(Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expression of Pim-1 in non small cell lung cancer and adjacent normal tissues, and study the relationship between c-Myc and Pim-1 in the corresponding tissue gene expression. **Methods** Totally 30 cases of non small cell lung cancer tissue and adjacent normal lung tissues were collected by surgical operation in department of thoracic surgery. Clinical data were statisticed and tracking late pathologic results, using RT-PCR, qRT-PCR and immunohistochemical method to detect Pim-1 mRNA, c-Myc and Pim-1 protein expression in lung cancer and adjacent normal tissue, and to analyze the relationship between the expression of Pim-1 and c-Myc. **Results** The positive rate of Pim-1 mRNA and protein expression in non small cell lung cancer was obviously higher than that in adjacent normal tissue, the mRNA expression levels were  $0.798 \pm 0.083$  and  $0.394 \pm 0.107$  ( $P < 0.01$ ), the protein positive cases were 18 cases and 6 cases ( $P = 0.002$ ). The expression of Pim-1 protein had no relationship on age, gender, smoking history, pathological types and degree of differentiation of patients with non-small cell lung cancer ( $P > 0.05$ ), but had related to lymph node metastasis and TNM stages of tumor ( $P < 0.05$ ), with lymph node metastasis and TNM stages increases, its expression quantity also rise. There was a positive correlation between Pim-1 and c-Myc protein expression, correlation coefficient ( $r$ ) was  $0.433$  ( $P = 0.017$ ). **Conclusion** High expression of Pim-1 in non small cell lung cancer gene and is also increased with lymph node metastasis and TNM stages, Pim-1 and c-Myc expression has positive correlation, this could provide clues to the early diagnosis and prognosis evaluation of non small cell lung cancer, and also provides a new train of thought and to find a new target for gene therapy of lung cancer.

**[Key words]** carcinoma, non-small-cell lung; pro-oncogene proteins c-pim-1; targeted therapy

随着全球空气污染日趋严重,易感人群增多,以呼吸道为媒介而导致的肺部疾病日趋增多,其中以肺癌的发病率上升为主要体现。世界卫生组织 2003 年公布的数据显示,肺癌患者逐年增加,无论是发病率还是病死率来看,肺癌毫无疑问成为全球最常见、最主要的恶性肿瘤之一。原癌基因 Pim-1 是 Pim 基因家族(目前发现的有 Pim-1、Pim-2 和 Pim-3)中的一员,其过表达能够抑制细胞凋亡、促进细胞增殖、影响基因组稳定性。国内外已有多项研究证实 Pim-1 基因的表达上调与诸多实体瘤的发生、发展相关<sup>[1-4]</sup>,而在非小细胞性中的表达及其可能发挥的作用在国内外鲜有研究,研究已证实 c-Myc 蛋白在肺癌组织中过度表达,并与其恶变程度呈正相关<sup>[5]</sup>。鉴于对 c-Myc 基因目前研究相对更成熟,作用机制以及影响因素等方面探究得也相对明朗,本研究运用 RT-PCR、qRT-PCR 及免疫组织化

学方法从基因及蛋白两个水平上检测 Pim-1 在非小细胞肺癌组织中的表达,并进一步分析目的基因与肺癌临床病理特征之间的关系;再结合 c-Myc 这种目前研究较成熟的基因,通过分析两种原癌基因之间的相关性来初步探讨 Pim-1 在非小细胞肺癌发病机制中的作用及其与 c-Myc 表达的关系,为临床上早期诊断肺癌、评估预后及基因治疗方面,奠定实验基础、提供理论依据。

## 1 资料与方法

**1.1 标本来源** 选择 2011 年 1 月至 2012 年 1 月在本院胸外科行手术切除的非小细胞肺癌患者 30 例,收集病灶及癌旁正常肺组织(距离肿瘤边缘大于 5 cm)标本,确保患者术前均未接受手术、放疗及生物靶向治疗,且所有入选标本均经本院

病理科医生术后病理证实为非小细胞肺癌。所收集的标本临床病理特征,均由后期在病案室查看病历资料及病理科查看术后组织病理报告收集获取。

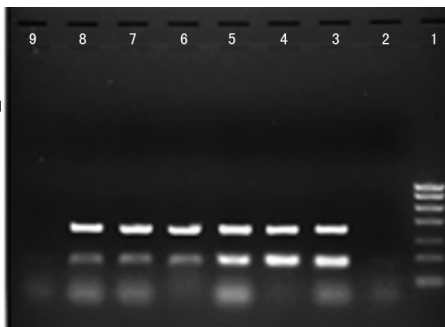
**1.2 试剂** 总 RNA 提取试剂 Trans Zol 试剂盒、重组核糖核酸酶抑制剂、M-MLV 第一链合成系统试剂盒及 PCR 扩增试剂盒为 Invitrogen 公司产品; qRT-PCR 染料购自 TaKaRa 公司;引物由 Invitrogen 公司合成。Pim-1、c-Myc 一抗抗体为北京博奥森公司产品; Two-Step IHC Detection Reagent 购自北京中杉金桥公司。

**1.3 方法** RT-PCR 及 qRT-PCR 均严格按照试剂盒逐步操作,设计合成的 Pim-1 引物:F:5'-GAG GTT GGG ATG CTC TTG TC-3';R:5'-GCG GAT GCC TGA GTA GAC C-3'。用  $OD \times mm(Pim-1)/OD \times mm(GAPDH)$  这一计算公式计算出目的基因 Pim-1 mRNA 的相对表达量;qRT-PCR 检测以 GAPDH 作为内参对照,以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示实验组目的基因的表达相对于对照的变化倍数,实验重复 3 次。免疫组织化学采用非生物素二步法,一抗浓度为 1:200,采用 DAB 显色,阳性染色如下:细胞核和(或)细胞质出现淡黄色至黄棕色或棕褐色。评分标准参照文献[6]中的方法。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计数资料以率表示,采用  $\chi^2$  检验或 Fisher's 确切概率法进行分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

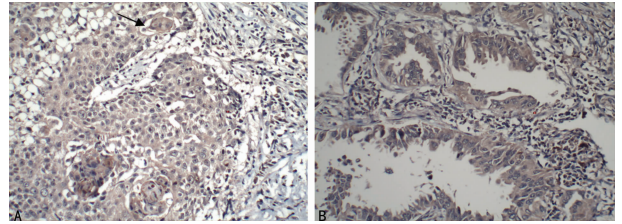
**2.1 Pim-1 mRNA 表达水平** 在非小细胞肺癌组织中 Pim-1 mRNA 表达量明显高于癌旁正常组织,30 例肺癌组织标本中 Pim-1 mRNA 表达阳性(图 1)21 例,相应癌旁组织阳性 7 例,阳性表达率分别为 70.0%和 23.3%,差异有统计学意义( $\chi^2 = 13.125, P = 0.000$ );同时 Pim-1 mRNA 相对表达量(OD 值检测)在非小细胞肺癌组织中( $0.798 \pm 0.083$ )也显著高于癌旁正常组织( $0.394 \pm 0.107$ ),其差异也有统计学意义( $t = 11.521, P < 0.01$ )。单因素方差分析的结果表明,非小细胞性肺癌中 Pim-1 基因的表达差异有统计学意义( $F = 2.16, P < 0.01$ ),Durmett-t 检验显示 Pim-1 基因在非小细胞肺癌中的表达水平( $7.648 \pm 1.231$ )与癌旁组织( $12.141 \pm 1.871$ )相比差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),免疫组化的结果显示(图 2):在 30 例非小细胞肺癌组织中 Pim-1 蛋白阳性表达 18 例,阳性率为 60%,差异有统计学意义( $\chi^2 = 10.000, P = 0.002$ )。



1:DNA Marker;2:阴性对照;3~5:肺癌组织;6~8:癌旁组织;9:空白。

图 1 RT-PCR 检测 Pim-1 mRNA 表达水平

**2.2 Pim-1 的表达与临床病理特征的关系** 采用 Fisher 确切概率法进行分析 Pim-1 表达与各病理特征间关系(表 1),肺癌中 Pim-1 的表达与患者年龄、性别、吸烟史、病理分化程度及类型等没有明显的联系( $P > 0.05$ ),与淋巴结转移及 TNM 分期关系密切,呈正相关( $P < 0.05$ )。

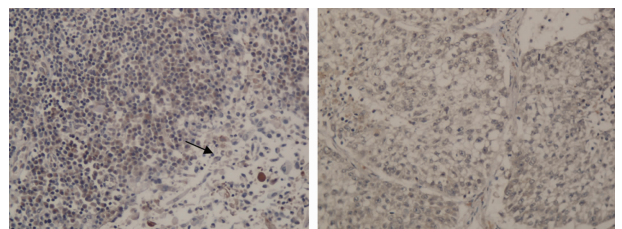


A:肺癌组织;B:癌旁组织。

图 2 Pim-1 的表达( $\times 200$ )

表 1 Pim-1 的表达与临床病理特征的关系

项目	n	mRNA 表达			P	蛋白表达			P
		阳性	阴性	阳性率		阳性	阴性	阳性率	
年龄(岁)					0.418				0.709
≥60	18	147	4	77.8%		10	8	55.6%	
<60	12	7	5	58.3%		8	4	66.7%	
性别					0.666				0.678
男	22	16	6	72.7%		14	8	63.6%	
女	8	5	3	62.5%		4	4	50.0%	
吸烟情况					0.389				0.102
有	21	16	5	76.2%		15	6	71.4%	
无	9	5	4	55.6%		3	6	33.3%	
病理类型					0.765				0.711
腺癌	12	9	3	75.0%		7	5	58.3%	
鳞癌	16	11	5	68.9%		10	6	62.5%	
其他	2	1	1	50.0%		1	1	50.0%	
分化程度					0.441				1.000
高中分化	17	13	4	76.5%		10	7	58.9%	
低分化	13	8	6	61.5%		8	5	61.5%	
淋巴结转移					0.046				0.060
有	15	14	2	93.3%		12	3	80.0%	
无	15	7	7	46.7%		6	9	40.0%	
TNM 分期					0.042				0.024
I~II 期	20	12	8	60.0%		9	11	45.0%	
III 期	10	9	1	90.0%		9	1	90.0%	



A:肺癌组织;B:癌旁组织。

图 3 两组标本中 c-Myc 的阳性表达( $\times 200$ )

**2.3 非小细胞性肺癌组织中 Pim-1 及 c-Myc 蛋白表达的呈正相关** 30 例标本中 c-Myc 阳性表达(图 3)20 例,阳性率为 66.7%,癌旁组织阳性表达 11 例,阳性率为 30.0%,差异有统计学意义( $\chi^2 = 8.076, P = 0.04$ )。结果证实 Pim-1 及 c-Myc 在非小细胞肺癌组织中存在表达,二者共同表达阳性例数为 15 例,共同表达阴性例数为 7 例,采用 Spearman 等级分析进行相

关性分析,  $r=0.433$ ,  $P<0.05$ , 具有正相关关系。

### 3 讨 论

**3.1 Pim-1 与非小细胞肺癌** Pim-1 蛋白隶属于丝氨酸/苏氨酸家族 3 个成员之一, 具有高保真性及自身组成性激活突变型<sup>[7-9]</sup>, 可编码 2 种不同的 Pim-1 蛋白产物, 在 3'-非编码区域存在活性因子聚集, 可以导致终止密码子的嵌入, 引起复制过程中的 A/U 富集平衡破坏, 使得原本较低水平的 Pim-1 表达上调<sup>[10-11]</sup>。研究发现, Pim-1 的磷酸化在细胞分型、分化和细胞凋亡中起着重要作用, 在抑制细胞凋亡和促进细胞增殖中也起着重要作用<sup>[12]</sup>。本研究发现在 mRNA 及蛋白水平非小细胞肺癌中癌组织 Pim-1 表达水平明显高于癌旁正常组织, 相关临床病理特征显示 Pim-1 蛋白表达量与患者的年龄、性别、吸烟史、肿瘤病理类型及分化程度等临床特征无关, 与有无淋巴结转移及肿瘤 TNM 分期关系密切, 且呈正相关关系, 因此作者推测 Pim-1 很可能在很大程度上参与了非小细胞肺癌的浸润和转移, 为临床预测预后提供理论依据。

**3.2 Pim-1 与 c-Myc 的协同作用** Pim-1 与 c-Myc 强大的联合作用效应最早是在淋巴瘤形成的研究中发现的, 随后发现 Pim-1 在人类前列腺癌组织中具有高表达, 并且其高表达能加强在人类前列腺癌细胞株中致癌效应<sup>[13]</sup>, 研究发现 Pim-1 与 c-Myc 共同作用参与前列腺癌的产生和进展, 其中可能的作用机制是 Pim-1 基因增强 c-Myc 的转录活性, 进而参与细胞增殖的调控。虽然 Pim-1 与 c-Myc 表达发挥致癌效应的分子学机制目前尚未明确, 但可以明确 c-Myc 磷酸化作用可以延长 Pim-1 半衰期<sup>[14]</sup>。此外, Pim-1 的高表达可以通过作为 c-Myc 基因的辅因子进而加强 c-Myc 的复制转录活性。本研究采用免疫组织化学法检测了在 30 例非小细胞肺癌中 Pim-1 与 c-Myc 的蛋白表达量。结果显示, c-Myc 蛋白在非小细胞肺癌组织中的表达量显著高于癌旁正常组织, 且 2 个基因存在正相关作用, 在 30 例非小细胞肺癌组织中, 18 例 Pim-1 表达阳性, 20 例 c-Myc 表达阳性, 其中 15 例二者均表达阳性, 7 例均表达阴性。因此作者推测二者在肺癌的发生、发展过程中关系密切, 且相互促进, 并进一步证实了 Pim-1 可能在非小细胞肺癌的发生发展过程中发挥了重要作用。

**3.3 Pim-1 可能成为非小细胞肺癌诊治的新靶点** Pim-1 在越来越多的肿瘤组织中被发现, 如胰腺癌、胃癌、结直肠癌等, 表明 Pim-1 在各种不同类型肿瘤中的表达相对稳定, 敏感性较高, 在某种情况下, 肿瘤中检测到 Pim-1 的表达往往提示预后不良<sup>[14]</sup>。近年来 Pim-1 的高表达影响肿瘤发生发展的分子学机制逐渐成为了研究热点。体外实验证实 Pim-1 过表达可以加强肿瘤的发生发展, 并能阻止药物诱导肿瘤细胞的凋亡能力<sup>[2-3]</sup>。本研究发现 Pim-1 在非小细胞肺癌中的表达量明显高于非癌变的正常组织, 与前人研究结果一致。说明 Pim-1 基因作为特异性的肿瘤标记物是可行的, 因此, 作者推测在非小细胞肺癌的早期发现、早期诊断中, Pim-1 也是一个潜在的、重要的、有效的肿瘤标记物。并且针对该基因的小分子化学药物抑制剂, 抑或相关的单克隆抗体等也能成为除放疗治疗方案以外重要的二、三线靶向治疗途径, 这可以为丧失了手术切除治疗机会的晚期肺癌患者带来福音。

### 参考文献

[1] Iwata H, Imamura S, Hori A, et al. Biochemical character-

ization of TAK-593, a novel VEGFR/PDGFR inhibitor with a two-step slow binding mechanism[J]. *Biochemistry*, 2011, 5(50):738-751.

- [2] Gutmann DA, Ward A, Urbatsch IL, et al. Understanding polyspecificity of multidrug ABC transporters; closing in on the gaps in ABCB1[J]. *Trends Biochem Sci*, 2010, 35(1):36-42.
- [3] 刘芳梅, 苑中甫. 人卵巢上皮性癌组织中 Pim-1 与 C-myc 的表达及其临床意义[J]. *肿瘤*, 2011, 31(1):69-73.
- [4] Guo S, Mao X, Chen J, et al. Overexpression of Pim-1 in bladder cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29(2):161.
- [5] 方娜, 绍睿, 陈德玉. PTTG, c-myc 和 P53 在非小细胞肺癌中的表达及意义[J]. *江苏大学学报: 医学版*, 2008, 18(2):131-134.
- [6] Qian KC, Wang L, Hickey ER, et al. Structural basis of constitutive activity and a unique nucleotide binding mode of human Pim-1 kinase[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(7):6130-6137.
- [7] Thomas M, Lange-Grünweller K, Weirauch U, et al. The proto-oncogene Pim-1 is a target of miR-33a[J]. *Oncogene*, 2012, 31(7):918-928.
- [8] Zhang T, Xu Y, Zhang XL, et al. A study on the expression of pim-1 & c-myc and their correlation in prostate cancer[J]. *J Clin Urol*, 2007, 22(2):178-182.
- [9] Kim KT, Carroll AP, Mashkani B, et al. MicroRNA-16 is down-regulated in mutated FLT3 expressing murine myeloid FDC-P1 cells and interacts with Pim-1[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9):e44546.
- [10] Wang Z, Bhattacharya N, Weaver M, et al. Pim-1: a serine/threonine kinase with a role in cell survival, proliferation, differentiation and tumorigenesis [J]. *J Vet Sci*, 2001, 2(3):167-179.
- [11] Roh M, Song C, Kim J, et al. Abdulkadir SA; Chromosomal instability induced by Pim-1 is passage-dependent and associated with dysregulation of cyclin B1[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(49):40568-40577.
- [12] Roh M, Franco OE, Hayward SW, et al. A role for polyploidy in the tumorigenicity of Pim-1-expressing human prostate and mammary epithelial cells[J]. *PLoS One*, 2008, 3(7):e2572.
- [13] Kim J, Roh M, Abdulkadir SA. Pim1 promotes human prostate cancer cell tumorigenicity and c-myc transcriptional activity[J]. *BMC Cancer*, 2010(10):248.
- [14] Kim J, Roh M, Abdulkadir SA. Pim1 promotes human prostate cancer cell tumorigenicity and c-MYC transcriptional activity[J]. *BMC Cancer*, 2010, 248(10):3349-3356.

(收稿日期:2014-11-08 修回日期:2015-02-16)