

鼻腔鼻窦鳞状细胞癌细胞中 PRL-3 表达的临床意义*

陆鸿略¹, 马桂琴¹, 岳卓立^{1△}, 康菲²

(承德医学院附属医院:1. 耳鼻咽喉科;2. 体检科, 河北承德 067000)

[摘要] **目的** 探讨促肝细胞再生磷酸酶-3(PRL-3)在鼻腔鼻窦鳞状细胞癌(SNSCC)中表达的临床意义。**方法** 采用免疫组织化学及逆转录 PCR(RT-PCR)方法检测 62 例 SNSCC 组织(SNSCC 组)中 PRL-3 蛋白的表达水平,并对 30 例鼻息肉患者(NP 组),以及 25 例正常鼻腔黏膜(对照组)做相同蛋白表达并进行对比。**结果** 在蛋白水平和基因水平检测,均发现 SNSCC 组中 PRL-3 的表达高于 NP 组及对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。PRL-3 的表达情况在不同的性别、年龄中差异无统计学意义($P > 0.05$),而随着 TNM 分期的增高,分化程度的降低及合并淋巴结转移,PRL-3 的表达明显增高($P < 0.05$)。**结论** PRL-3 的表达可以对 SNSCC 的增殖活性作很好的参照,表达强度可明显反映 SNSCC 细胞增殖活性,PRL-3 可能是 SNSCC 的一个独立预后指标,提示预后不良。

[关键词] 鼻腔;鼻窦;癌;鳞状细胞;促肝细胞再生磷酸酶-3

[中图分类号] R765.25

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)01-0081-03

Clinical significance of PRL-3 expression in sinonasal squamous cell cancer cells*

Lu Honglue¹, Ma Guiqin¹, Yue Zhuoli^{1△}, Kang Fei²

(1. Department of Otolaryngology; 2. Department of Physical Examination, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde, Hebei 067000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the clinical significance of PRL-3 expression in sinonasal squamous cell cancer(SNSCC). **Methods** The immunohistochemical method and RT-PCR were adopted to detect the PRL-3 protein expression level in 62 cases of SNSCC tissue (SNSCC group), 30 cases of nasal polyps(NP group) tissue and 25 cases of normal nasal mucosa tissue(control group). The obtained results were compared. **Results** Both in the protein level and gene level detection, the expression of PRL-3 in the SNSCC group was higher than that in the NP group and control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The expression of PRL-3 had no significant differences among different ages and between different genders($P > 0.05$), but with TNM stage increasing, differentiation degree decreasing and complicating lymph node metastasis, the expression of PRL-3 was significantly increased($P < 0.05$). **Conclusion** The PRL-3 expression can serve as good reference for the proliferation activity of SNSCC, its expressing intensity can obviously reflect the SNSCC cell proliferation activity, PRL-3 probably is an independent prognostic index of SNSCC, indicating poor prognosis.

[Key words] nasal cavity; paranasal sinus; carcinoma, squamous cell; regenerative liver phosphatase-3

促肝细胞再生磷酸酶-3(PRL-3)属于酪氨酸蛋白磷酸酶,它是目前发现的与恶性肿瘤细胞的转移相关的一个重要基因,它可以促进恶性肿瘤细胞的增殖黏附及迁移^[1]。目前,鲜见 PRL-3 在鼻腔鼻窦鳞状细胞癌(SNSCC)中的表达及意义的报道,其与 SNSCC 的生长、浸润和转移关系尚待研究。本研究就采用免疫组织化学及逆转录 PCR(RT-PCR)的方法检测 PRL-3 在 SNSCC 中的表达情况,分析 PRL-3 与 SNSCC 临床病理特征的关系,探讨 PRL-3 与 SNSCC 分化、转移及预后之间的关系,为临床早期诊断 SNSCC 提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院 2007 年 12 月至 2014 年 12 月手术切除或活检的 62 例 SNSCC 组织(SNSCC 组),30 例鼻息肉(NP 组)和 25 例接受中鼻甲部分切除术患者的切除中鼻甲黏膜组织(对照组)。其中,SNSCC 组男 39 例,女 23 例,年龄 32~77 岁;NP 组男 19 例,女 11 例,年龄 16~70 岁;对照组男 13 例,女 12 例,年龄 18~53 岁。SNSCC 组均未接受任何的放疗或免疫治疗。所有标本取材后平分为两份,一份送病理科做成石蜡块,另一份放入液氮中冰冻保存。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 鼠抗人 PRL-3 单克隆抗体,购自武汉博士德生物工程有限公司;羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG)/辣根酶标记二抗和二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;Trizol、逆转录试剂盒购自 Takara 公司;PCR 引物购自上海生工生物工程技术有限公司;50 bp DNA Ladder 购自北京天根生化有限公司。

1.2.2 免疫组织化学(SP 法)检测 PRL-3 的表达 取包埋石蜡块、4 μm 连续切片。按 SP 法试剂盒操作规程说明书进行免疫组织化学染色,切片常规脱蜡、水化,进行抗原修复,经 DAB 显色,苏木素复染后,脱水、封片。用已知阳性标本阳性对照,磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗做阴性对照。结果判定:PRL-3 阳性表达为在细胞膜及膜周细胞质中出现棕黄色颗粒,每张切片取 5~8 个高倍视野进行观察,每个视野的细胞计数为 100 个,取平均数,根据阳性细胞百分比来对 PRL-3 阳性细胞数进行判断, $\leq 25\%$ 为(-), $> 25\% \sim < 51\%$ 为(+), $51\% \sim 75\%$ 为(++), $> 75\%$ 为(+++)。

1.2.3 RT-PCR 法检测 PRL-3 的表达 冻存的 SNSCC 标本按

* 基金项目:承德市科学技术研究与发展计划项目(201601A047)。
△ 通信作者,E-mail:yuezhuoli@163.com。

作者简介:陆鸿略(1978—),主治医师,硕士,主要从事鼻部疾病的诊断与

Trizol 一步法,提取总 RNA,将 2 μg 总 RNA 为模板逆转录为 cDNA,以 cDNA 产物为模板,PRL-3 和 GAPDH 为引物,行 PCR 扩增。根据已知 PRL-3 基因序列,上游引物序列:5'-GGG ACT TCT CAG GTC GTG TC-3',下游引物序列 5'-AGC CCC GTA CTT CTT CAG GT-3'。 β -actin 上游引物序列 5'-AGC GAG CAT CCC CCA AAG TT-3',下游引物序列 5'-GGG CAC GAA GGC TCA TCA TT-3'。严格按照荧光定量 PCR 试剂盒说明书进行操作,荧光定量 PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,63 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,35 个循环。72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min,取 PCR 产物行质量分数 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,经溴化乙锭显影后,凝胶成像系统成像,并进行光密度半定量分析。目的基因的相对表达量以目的条带积分光密度(OD)值与内参照条带 OD 值的比值表示。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 进行描述分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料用率表示,组间采用

χ^2 检验(必要时用 Fisher 精确法)等级资料两组间比较用 Wilcoxon 秩和检验。检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

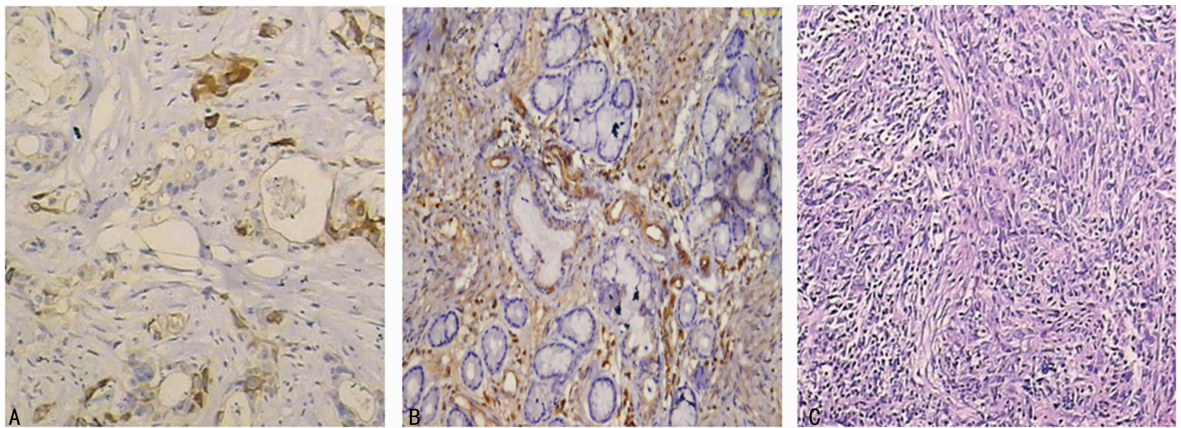
2 结果

2.1 PRL-3 蛋白在 3 组患者标本组织中的表达情况 PRL-3 蛋白在 SNSCC 组(75.81%)中的表达显著高于在对照组(20.00%)及 NP 组(40.00%)中的表达,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1、图 1。

表 1 PRL-3 蛋白在 3 组组织中的表达情况[n(%)]

组别	n	-	+	++	+++
对照组	25	20(80.00) ^a	5(20.00)	0(0) ^a	0(0) ^a
NP 组	30	18(60.00) ^a	10(33.33)	2(6.67) ^a	0(0) ^a
SNSCC 组	62	15(24.19)	10(16.13)	29(46.77)	8(12.90)

^a: $P<0.05$,与 SNSCC 组比较。



A:对照组;B:NP 组;C:SNSCC 组。

图 1 PRL-3 蛋白在 3 组组织标本中的表达情况(SP, $\times 200$)

2.2 PRL-3 蛋白在 SNSCC 组织中的表达与临床病理特征的关系 PRL-3 蛋白在 SNSCC 中的表达与病理分期、分化程度及合并淋巴结转移有关($P<0.05$),与性别、年龄无关($P>0.05$),见表 2。

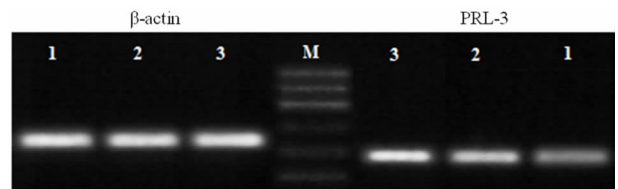
表 2 PRL-3 蛋白在 SNSCC 组织中的表达与临床病理特征的关系[n(%)]

临床病理参数	n	PRL-3 阳性	χ^2	P
性别			0.220	0.707
男	39	26(66.67)		
女	23	17(73.91)		
年龄(岁)			0.574	0.458
≤ 60	35	24(68.57)		
> 60	27	21(77.78)		
病理分期			3.858	0.046
I~II	50	37(74.00)		
III~IV	12	11(91.67)		
分化程度			4.912	0.027
高分化	8	4(50.00)		
中分化	32	22(68.75)		
低分化	22	20(90.90)		

续表 2 PRL-3 蛋白在 SNSCC 组织中的表达与临床病理特征的关系[n(%)]

临床病理参数	n	PRL-3 阳性	χ^2	P
淋巴结转移			10.892	0.000
有	13	13(100.00)		
无	49	33(67.35)		

2.3 RT-PCR 法检测 PRL-3 蛋白在 3 组组织中的表达 SNSCC 组中的 PRL-3 mRNA 相对表达量(0.89 ± 0.09)明显高于 NP 组(0.57 ± 0.06)及对照组(0.21 ± 0.02)($P<0.05$)。RT-PCR 反应后电泳结果见图 2。



M:100 bp DNA Marker;1.对照组;2.NP 组;3.SNSCC 组。

图 2 RT-PCR 检测 PRL-3 蛋白在 3 组组织中的表达

3 讨论

PRLs 属于一类酪氨酸蛋白磷酸酶,其家族包含 3 个亚型,即 PRL-1、PRL-2 和 PRL-3。而其中以 PRL-3 在肿瘤中的生物

活性最显著。PRL-3 位于染色体 8q24.3 上,含有 PTP 催化位点序列,其编码蛋白产物含有一个保守的 C-末端半胱氨酸 CAAX 残基-异戊烯化结构域^[2],此结构域内的 Cys104 和 Arg110 保守催化残基与 PRL-3 的酶活性有关。PRL-3 蛋白在人的骨骼肌、胰腺组织及心肌细胞中有不同程度的表达,而脑肺肝肾等组织鲜有表达^[3]。它具有促进细胞生长和增殖,增强恶性细胞迁移和浸润能力,还有促进细胞恶化及转移等多种功能^[4-7],具体作用机制包括以下几点:(1)PRL-3 可通过激活 Rho 信号转导途径,调控肿瘤细胞的侵袭和活性,促进肿瘤细胞的增殖及转移^[8-9];(2)PRL-3 可通过介导 ERK 信号转导通路,促进肿瘤血管的生成,从而促进肿瘤的生长及成熟,促进淋巴结转移及远处转移^[10-11];(3)PRL-3 可通过诱导促进血管内皮生长因子(VEGF)及其受体的过度表达,促进肿瘤的生长、侵袭及转移^[6,12];(4)PRL-3 还可通过调节其他癌症相关基因的表达来介导肿瘤的侵袭、转移^[13];(5)PRL-3 通过正调控 PI3K 细胞通路,抑制肿瘤细胞凋亡,促进肿瘤细胞分裂增殖,诱导肿瘤细胞生长。此外,PRL-3 还可通过调节 PI3K 通路促进肿瘤的侵袭及转移^[14];(6)PRL-3 可促进转移性肿瘤的形成^[15]。本研究显示,SNSCC 组织中的 PRL-3 的表达明显高于 NP 组织及正常鼻腔黏膜组织,而且与 SNSCC 的 TNM 分期、分化程度及淋巴结转移密切相关。此结果提示在 SNSCC 的发生、发展及转移过程中 PRL-3 可能发挥了重要的作用。因此,检测 PRL-3 可能对早期发现 SNSCC 具有重要的临床意义,同时,对 SNSCC 生物学行为、预后具有重要意义,有可能成为 SNSCC 治疗的靶点及预后标记物。

本研究对 PRL-3 高表达与 SNSCC 的发生、发展及转移的关系在分子水平上提供了一些理论基础,但其具体作用机制,尤其是 PRL-3 通过何途径促进 SNSCC 转移的,仍需进一步探讨。

参考文献

- [1] 孙振华,卜平.胃癌 PRL-3 与 Bmi-1mRNA 联合表达的数量分析及其意义[J].广东医学,2012,33(7):987-989.
- [2] 郭延林,朱彦君,伍青.PRL 的生物学功能及与肿瘤关系的研究进展[J].现代肿瘤医学,2013,21(3):659-662.
- [3] Leung WH, Queenie P, Lin WW, et al. PRL-3 mediates the protein maturation of ULBP2 by regulating the tyrosine phosphorylation of HSP60 [J]. J Immunol, 2015, 194 (6): 2930-2941.
- [4] Ooki A, Yamashita K, Kikuchi S, et al. Therapeutic potential of PRL-3 targeting and clinical significance of PRL-3 genomic amplification in gastric cancer [J]. BMC Cancer, 2011 (11): 122.
- [5] Xu YJ, Zhu MC, Zhang SH, et al. Expression and prognostic value of PRL-3 in human intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. Pathol Oncol Res, 2010, 16(2): 169-175.
- [6] 杨美兰,邓亚平,刘志红.PRL-3 和 VEGF 在结肠癌中表达的临床病理研究[J].现代生物医学进展,2012,12(3):485-488.
- [7] Guo K, Tang JP, Jie L, et al. Engineering the first chimeric antibody in targeting intracellular PRL-3 oncoprotein for cancer therapy in mice [J]. Oncotarget, 2012, 3(2): 158-171.
- [8] Mayinuer A, Yasen M, Mogushi KA, et al. Upregulation of protein tyrosine phosphatase type IVA member 3 (PTP4A3/PRL-3) is associated with tumor differentiation and a poor prognosis in human hepatocellular carcinoma [J]. Ann Surg Oncol, 2013, 20(1): 305-317.
- [9] Fiordalisi JJ, Dewar BJ, Graves LM, et al. Src-Mediated phosphorylation of the tyrosine phosphatase PRL-3 is required for prl-3 promotion of Rho activation, motility and invasion [J]. PLoS One, 2013, 8(5): 1-10.
- [10] Bilici A, Ustaalioglu BB, Yavuzer DA, et al. Prognostic significance of high phosphatase of regenerating liver-3 expression in patients with gastric cancer who underwent curative gastrectomy [J]. Dig Dis Sci, 2012, 57(6): 1568-1575.
- [11] Peng L, Xing X, Li W, et al. PRL-3 promotes the motility, invasion, and metastasis of LoVo colon cancer cells through PRL-3-integrin beta1-ERK1/2 and-MMP2 signaling [J]. Mol Cancer, 2009(8): 110.
- [12] Fiordalisi JJ, Keller PJ, Cox AD. PRL tyrosine phosphatases regulate Rho family GTPases to promote invasion and motility [J]. Cancer Res, 2006, 66(6): 3153-3161.
- [13] Fang XY, Song R, Chen W, et al. PRL-3 promotes the malignant progression of melanoma via triggering dephosphorylation and cytoplasmic localization of NHERF1 [J]. J Invest Dermatol, 2015, 135(9): 2273-2282.
- [14] 张建龙,张紫斐,张育超,等.PRL-3 调节 PI3K 信号通路在促进结肠癌细胞增殖侵袭中的作用[J].中山大学学报(医学科学版),2013,34(1):16-21.
- [15] Anna P, Katarzyna GU, Katarzyna N, et al. PRL-3 and E-cadherin show mutual interactions and participate in lymph node metastasis formation in gastric cancer [J]. Tumour Biology, 2014, 35(7): 6587-6592.

(收稿日期:2016-07-20 修回日期:2016-09-12)

(上接第 80 页)

oncological outcomes in patients with esophageal cancer [J]. Surg Endosc, 2012, 26(2): 381-390.

- [10] Mamidanna R, Bottle A, Aylin P, et al. Short-term outcomes following open versus minimally invasive esophagectomy for cancer in England: a population-based National study [J]. Ann Surg, 2012, 255(2): 197-203.

- [11] Ben-David K, Rossidis G, Zlotecki RA, et al. Minimally invasive esophagectomy is safe and effective following neoadjuvant chemoradiation therapy [J]. Ann Surg Oncol, 2011, 18(12): 3324-3329.

(收稿日期:2016-07-18 修回日期:2016-09-19)