技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)09-1377-04

应用组织芯片检测 Pin1 在肝炎、肝硬化、肝细胞性肝癌组织中的表达

许晓梅[1],胡怀东[1],廖 勇[2],张大志[1]

(1.重庆医科大学附属第二医院感染科,重庆 400010;2.美国得克萨斯大学 MD 安德森癌症中心,美国 77030)

【摘 要】目的:利用组织芯片技术检测肽基脯氨酰顺反异构酶(Peptidyl-proplyl isomerase 1,pin1)在正常、肝炎、肝硬化及肝癌组织中的表达,了解 pin1 在肝细胞性肝癌发生、发展不同阶段的表达情况及与临床病理参数的关系。方法:用免疫组织化学染色法在组织芯片上同时检测 10 例 HBsAg 阳性病毒性肝炎、40 例肝硬化、19 例肝细胞性肝癌及 34 例正常肝组织中 pin1 的表达情况,并分析 pin1 在不同肝脏疾病组织中的表达差异。结果:pin1 在 HBsAg 阳性病毒性肝炎、肝硬化、肝细胞性肝癌及正常肝组织中的阳性表达率分别为 80%(8/10)、82.5%(33/40)、100%(19/19)、55.8%(19/34),肝细胞性肝癌组织中的阳性表达率明显高于 HBsAg 阳性病毒性肝炎、肝硬化及正常肝组织,同时肝癌中 pin1 的表达强度也明显高于 HBsAg 阳性病毒性肝炎、肝硬化和正常肝组织($P<0.001$),而在 HBsAg 阳性病毒性肝炎、肝硬化和正常肝组织中 pin1 阳性表达率及表达强度均无差异无统计学意义($P>0.001$);肝细胞性肝癌组织中 pin1 的表达与病理分级、有无淋巴结转移及临床分期无相关性($P>0.05$)。结论:pin1 参与了 HBsAg 阳性病毒性肝炎,肝硬化到肝细胞性肝癌的疾病进展过程,在肝细胞性肝癌的发生和发展中发挥了一定作用。

【关键词】pin1;HBsAg 阳性病毒性肝炎;肝硬化;肝细胞性肝癌;组织芯片

【中国图书分类法分类号】R51 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-07-28

作者介绍:许晓梅(1984-),女,硕士,

研究方向:病毒性肝炎的发病机理及治疗研究。

通讯作者:张大志,男,教授,E-mail: dzhzhang@yahoo.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30872250)。

集落性生长,维持粒细胞系和单核细胞系的存活,促进生长,诱导分化和增强功能等。研究发现,在复发性和多发性鼻息肉患者血清中,GM-CSF 显著升高,比较术前术后水平也无明显差异,因此考虑复发性鼻息肉与 GM-CSF 及 EOS 密切相关[7]。

随着对鼻息肉发病机制的逐渐明确,其免疫治疗也显示了良好的前景。CFP 是结核分枝杆菌培养上清中的一种分泌蛋白混合物,这些蛋白在所有的卡介苗菌株和绝大部分非结核分枝杆菌中都没有表达,是强 T 细胞抗原。它能刺激机体产生特异性的细胞免疫应答,使单个核细胞出现增殖反应和产生 IFN-γ。目前,在结核病的诊治中研究较多[8],在变应性疾病的研究当中,尚属于起步阶段。

本研究通过测定 CFP 干预后淋巴细胞的增殖情况,结果表明 CFP 浓度为 10 μg/ml 时,细胞增殖最明显。我们以此浓度为干预浓度,检测 CFP 作用前后,鼻息肉患者外周血单个核细胞培养上清液中 IL-4、IFN-γ、GM-CSF 水平。结果显示,经 GFP 作用后,IL-4、GM-CSF 水平下降,明显低于干预前,而 IFN-γ 较干预前水平升高,与对照组相比差异无显著性。表明 CFP 能抑制 Th2 细胞活化,促进 Th1 细胞功能,从而纠正 Th1 和 Th2 细胞因子网络失平衡状态。CFP 的这种免疫调节作用,为探索治疗鼻息肉,尤其是复发性鼻息肉的免疫药物提供了理论依据,但其确切的作用机制和如何优化给药还有待于进一步研究和探讨。

参 考 文 献

[1] Dillon D C, Alderson M R, Day C H, et al. Molecular and immunological characterization of Mycobacteritun tubelculosisCFP-10.an immunodiagnostic antigen missing in Mycobacterimn bovis BCG[J]. J Clin Micobiol, 2000, 38(9): 3285-3290.

[2] 董 震.慢性鼻及鼻窦炎的病理本质及对策[J].中国医学文摘耳鼻咽喉科学,2006,21(3):139.

[3] 闫 舒,李 娜,杨艳华,等.鼻息肉的组织病理学特征及其发病机制[J].山东大学耳鼻喉眼学报,2008,22(1):52-54.

[4] 田从哲,檀艳丽,高水平,等.鼻息肉中 IgE 及 IL-5 与 EOS 浸润的相关性研究[J].临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2007,21:916.

[5] 陈 嵘,史剑波,许 庚,等.鼻息肉组织 T 淋巴细胞 IFN-γ、IL-4 的表达[J].中国病理生理杂志,2003,19(12):1623-1626.

[6] 任秀敏,何 强,蒋新霞.白介素 4,白介素 5 在鼻息肉及鼻息肉病组织中的表达[J],河北医药,2009,31(22):3036-3038.

[7] 薛卫国,梅栩斌,逄明杰.GM-CSF 及 EOS 与复发性鼻息肉的关系探讨[J].医学临床研究,2004,21(1):51-52.

[8] 谢 婷,李文桂.结核分枝杆菌 CFP10 研究进展[J].中国病原生物学杂志,2007,2(3):228-229.

(责任编辑:关蕴良)

Expression of the Pin1 in the hepatitis, cirrhosis and hepatocelluar carcinoma tissues and its relationship with hepatitis B virus by tissue microarray

XU Xiao-mei, et al

(*Department of Infectious Disease, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: By using tissue microarray technique to detect the expression of peptidyl-proplyl isomerase 1 (pin1) in human hepatitis B, cirrhosis, hepatocelluar carcinoma(HCC) and normal liver tissue, discussing its role in different stage of oncogenesis of HCC, and its relationship with clinicopathological parameter. *Methods*: Immunohistochemistry was used to detect the expression of pin1 in 10 cases of hepatitis B, 40 cases of cirrhosis, 19 cases of HCC and 34 cases of normal liver tissue. *Results*: The positive expression rate and intensity of pin1 was stronger in the HCC than that in the hepatitis B, cirrhosis and normal liver tissue ($P<0.001$), but there was no significant difference in the latter three tissues ($P>0.001$). The expression of pin1 was not correlated with clinicopathological parameter ($P>0.05$). *Conclusion*: pin1 plays a pivotal role in different stages of HCC.

【Key words】Pin1; Hepatitis B; Cirrhosis; Hepatocelluar carcinoma; Tissue microarray

肝细胞性肝癌是最常见的 10 种恶性肿瘤之一，在我国占居民恶性肿瘤死亡的第二位，我国是肝炎大国，大部分肝细胞性肝癌由 HBV 或 HCV 感染后的慢性肝炎或肝硬化发展而来，手术切除和肝移植是治疗肝细胞性肝癌的两种有效方式，但仅适用于小部分早期肝癌患者。因此了解肝细胞性肝癌的发病机制可以为如何防止 HBV 或 HCV 感染后的高危人群进展为肝癌及其治疗提供有效的依据和措施。肽基脯氨酰顺反异构酶(Peptidyl-proplyl isomerase 1, pin1)在超过 50%人肝癌细胞中过表达，并用 RNA 干扰的方法证实它与肝癌的发生相关[1]。但最近的研究表明 pin1 在肝硬化组织中的表达较肝癌组织高，而肝硬化一直被认为是肝癌的癌前病变[2]。但是 pin1 是否参与了 HBsAg 阳性病毒性肝炎、肝炎后肝硬化到肝癌的发生发展及其在疾病发展各个阶段的表达情况尚不清楚。本文利用组织芯片技术和免疫组织化学染色法检测 pin1 在 HBsAg 阳性病毒性肝炎，肝炎后肝硬化，肝细胞性肝癌及正常肝脏组织中的表达情况，一方面了解 pin1 在 HBsAg 阳性病毒性肝炎、肝炎后肝硬化、肝细胞性肝癌疾病进展过程中的作用，另一方面了解 pin1 与肝细胞性肝癌临床病理参数的关系。以期为临床有效评估肝细胞性肝癌的发生发展及早期诊断提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

肝脏疾病组织芯片购自陕西超英生物公司，芯片编号 LV805, LV482。其中肝癌组织 40 点(每例 2 点)，肝硬化组织 40 点，HBsAg 阳性病毒性肝炎 10 点，正常肝组织及癌旁正常肝组织 38 点。入组病例中 19 例肝细胞性肝癌，40 例肝硬化，10 例 HBsAg 阳性病毒性肝炎，34 例正常及癌旁正常肝组织。即用性非生物素免疫组化 EliVisionTM plus 试剂盒，DAB 显色试剂盒购自福州迈新生物公司，鼠抗人 pin1 单克隆抗体购自 R&D 公司。

1.2 免疫组织化学染色(EliVision 法，DAB 显色)

60℃烤片 30 min，常规脱蜡水化，以 0.01 mol/L CB(pH 6.0)高压 2 min 修复抗原，冷却至室温，PBS 洗 5 min × 2 次；3% H_2O_2- 甲醇封闭内源性过氧化物酶，室温 10 min，PBS 洗 5 min × 2 次；滴加鼠抗人 pin1 单克隆抗体(抗体稀释度为 1:100)，4℃ 冰箱过夜；0.1%Tween-20 PBS 洗 5 min × 3 次；滴加酶标抗鼠/兔聚合物，室温孵育 30 min；0.1% Tween-20 PBS 洗 5 min × 3 次；DAB 显色，蒸馏水洗终止显色；苏木素复染、水洗、分化后充分水洗返蓝；常规脱水透明，中性树胶封片；PBS 代替一抗为阴性对照，同时每张切片设置自身对照。

1.3 结果判定

镜下根据染色细胞着色强度强度进行评判：不着色为阴性(-)、着浅棕色为弱阳性(+)、着棕色棕色为阳性(++)、着棕褐色为强阳性(+++)。

1.4 统计学分析

以 SPSS18.0 统计软件进行统计学分析。组间 pin1 阳性表达率、表达强度比较及其与肝癌各临床病理参数间的关系采用 Kruskal-Wallis 和 Mann-Whitney 非参数检验，多重比较时用 Bonferroni 法校正 P 值。相关性分析用 spearman 等级相关，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Pin1 在 HBsAg 阳性病毒性肝炎、肝硬化、肝细胞性肝癌组织及正常肝组织中的表达

Pin1 在 HBsAg 阳性病毒性肝炎、肝硬化、肝细胞性肝癌及正常肝组织中均有表达，HBsAg 阳性病毒性肝炎及正常肝组织中几乎全在胞浆表达，肝硬化和肝细胞性肝癌组织中主要位于胞浆，部分位于胞核。

2.2 Pin1 在 HBsAg 阳性病毒性肝炎、肝硬化、肝细胞性肝癌及正常肝组织中阳性表达率及表达强度比较

Pin1 在 HBsAg 阳性病毒性肝炎、肝硬化、肝细胞性肝癌及正常肝组织中阳性表达率不同，分别为 80%(8/10)、82.5%(33/40)、100%(19/19)及 55.8%(19/34)，差异有统计学意义($P<0.05$)，其中肝细胞性肝癌组织中 pin1 阳性表达率与正常肝组织相比明显升高，差异有统计学意义($P<0.001$)，肝细胞

性肝癌与 HBsAg 阳性病毒性肝炎、肝硬化组织相比 pin1 阳性表达率差异无统计学意义（$P>0.001$），HBsAg 阳性病毒性肝炎、肝硬化及正常肝组织中 pin1 的阳性表达率差异无统计学意义（$P>0.001$）。进一步对各组之间 pin1 表达强度进行比较，HBsAg 阳性病毒性肝炎、肝硬化、肝细胞性肝癌及正常肝组织中 pin1 表达强度不同，差异有统计学意义（$P<0.05$），pin1 的表达强度与正常、HBsAg 阳性病毒性肝炎、肝硬化、肝细胞性肝癌的肝脏疾病进展程度之间成显著正相关（$r=0.648$，$P<0.01$）。Pin1 在肝细胞性肝癌组织中的表达强度明显高于 HBsAg 阳性病毒性肝炎、肝硬化及正常肝组织，呈阳性或强阳性表达，差异有统计学意义（$P<0.001$），而 HBsAg 阳性病毒性肝炎、肝硬化及正常肝组织中 pin1 的表达强度无明显差异，HBsAg 阳性病毒性肝炎、肝硬化组织中呈弱阳性或阳性表达，正常肝组织中不表达或弱阳性表达，差异无统计学意义（$P>0.001$）（表 1）。

2.3 肝细胞性肝癌组织中 pin1 表达强度与临床病理参数的关系

肝细胞性肝癌组织中 pin1 的表达强度与病理分级、有无淋巴结转移及临床分期均无关（$P>0.05$）（表 2）。

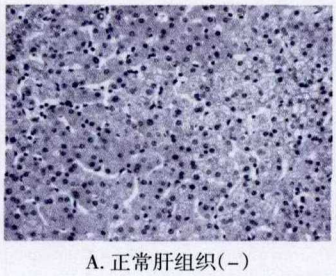
3 讨 论

Pin1 是第一个被发现的在酵母和人细胞分裂中所必需的一种高度保守、特异的肽基脯氨酰顺反异构酶，可特异性催化已磷酸化的丝（苏）脯氨酰基序发生顺反异构，这种构型的改变在催化活性、蛋白的去磷酸化、蛋白和蛋白之间的相互作用、亚细胞的定位、细胞信号转导途径和生长的调控中起着重要作用[3]。Pin1 在正常组织中呈阴性或弱阳性表达，在一些癌前病变和未成熟组织中表达异常，研究显示 pin1 在前列腺癌、卵巢癌、子宫颈癌等许多肿瘤组织中呈过度表达，是多个致癌信号通路的关键效应分子，可加强和催化多种致癌信号，使其无限放大，最终引起细胞的转化和增殖失控，被称为肿瘤发生发展的催化分子[4,5]。肝细胞性肝癌中 pin1 过度表达，并且与 β－连环素（β－catenin）及细胞周期素（CyclinD1）的过度表达相关，诱导 pin1 的表达可以导致肝细胞发生癌变，而用 RNA 干扰技术抑制 pin1 的表达可以抑制肝细胞性肝癌的发生，逆转肝癌细胞的恶性表型，阻止细胞从 G_1 期进入 S 期，从而使其停留在 G_0/G_1 期[1]。另外的研究显示 pin1 在肝硬化组织和门脉癌栓中的表达比肝癌原发灶强，而肝硬化一直被认为是肝癌的癌前病变，门脉癌栓被认为是肝癌进一步发展转移的结果，提示 pin1 可能参与了肝癌的发生、发展[2]。但是 pin1 在肝癌的发生、发展各阶段的表达情况究竟如何尚不清楚。本研究利用组织芯片技术检测了 pin1 在 HBsAg 阳性病毒性肝炎、肝硬化、肝细胞性肝癌及正常肝组织中的表达情况，免疫组化结果显示，pin1 在 HBsAg 阳性病毒性肝炎、肝硬化、肝细胞性肝癌及正常肝组织中均有表

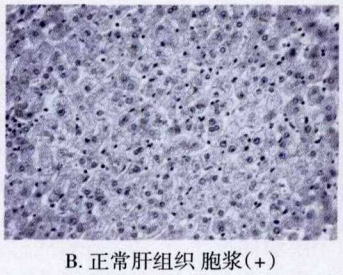
表 1 正常、肝炎、肝硬化及肝细胞性肝癌组织中 pin1 的表达情况

诊断	例数	表达强度				阳性率(%)
		－	＋	＋＋	＋＋＋	
正常	34	15	19	0	0	55.9
肝炎	10	2	7	1	0	80
肝硬化	40	7	31	2	0	82.5
肝癌	19	0	1	13	6	100 *

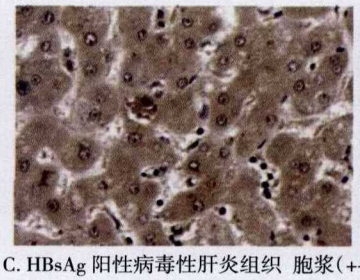
注：*$P<0.001$，与正常组比较；多重比较 $P<0.001$ 为差异有统计学意义



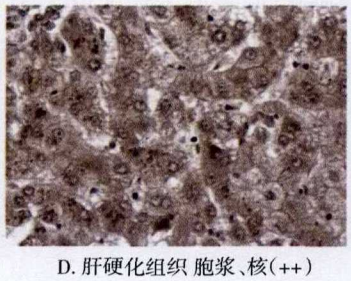
A. 正常肝组织（－）



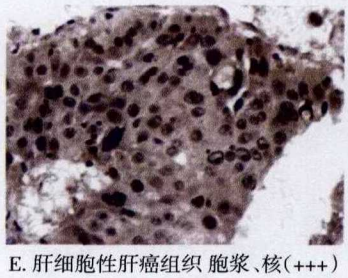
B. 正常肝组织 胞浆（＋）



C. HBsAg 阳性病毒性肝炎组织 胞浆（＋＋）



D. 肝硬化组织 胞浆、核（＋＋）



E. 肝细胞性肝癌组织 胞浆、核（＋＋＋）

图 1 肝细胞性肝癌、肝硬化、HBsAg 阳性病毒性肝炎及正常肝组织中 pin1 表达情况（SP×200）

表 2 肝细胞性肝癌组织中 pin1 表达强度与临床病理参数的关系

项目	例数	表达强度			P值
		+	++	+++	
病理分级					0.391
Ⅰ	5	0	4	1	
Ⅱ	9	0	5	4	
Ⅲ	5	1	3	1	
淋巴结转移					0.367
无	9	0	6	3	
有	10	1	7	2	
临床分期					0.367
Ⅱ	9	0	6	3	
Ⅲ	10	1	7	2	

达，阳性表达率分别为 80%(8/10)、82.5%(33/40)、100%(19/19)、55.9%(19/34)，其中肝细胞性肝癌组织中的阳性表达率明显高于正常肝组织，而与 HBsAg 阳性病毒性肝炎、肝硬化组织无显著差异，但是在表达强度上肝细胞性肝癌组织明显高于 HBsAg 阳性病毒性肝炎、肝硬化组织，肝细胞性肝癌组织中呈强阳性或阳性表达，而在 HBsAg 阳性病毒性肝炎、肝硬化组织中均呈阳性或弱阳性表达，在正常肝组织中不表达或呈弱阳性表达。另外 pin1 的表达强度与正常、HBsAg 阳性病毒性肝炎、肝硬化、肝细胞性肝癌疾病进展程度成正相关，并且在正常、HBsAg 阳性病毒性肝炎、肝硬化、肝细胞性肝癌组织中表达有逐渐增高的趋势，提示 pin1 参与了 HBsAg 阳性病毒性肝炎、肝硬化，肝细胞性肝癌的疾病进展过程，并且在肝细胞性肝癌的发生中起到了一定作用。

虽然 pin1 在乳腺癌、前列腺癌、食管鳞癌及非小细胞肺癌中与临床分期，有无淋巴结转移及预后密切相关[6-9]。但我们的研究显示，尽管 pin1 在肝细胞性肝癌组织中呈强阳性表达，但与病理分级、有无淋巴结转移及临床分期无关，提示在不同类型的肿瘤中，pin1 可能通过不同的作用机制对细胞的生物学行为产生不同的影响。但这种结果也可能是病例数较少，尤其是早期和高分化的肝细胞性肝癌例数少的缘故。

本研究发现 pin1 在肝细胞性肝癌组织中表达增强，并且在 HBsAg 阳性病毒性肝炎、肝硬化、肝细胞性肝癌组织中表达有逐渐增强的趋势，提示其可能参与了慢性肝脏疾病到肝细胞性肝癌的发生发展过程。这不仅为肝癌的发病机制提供了线索，而且动态监测 pin1 的变化可能有助于疾病的早期诊断及预后评估，对肝细胞性肝癌的诊断和治疗也具有一定的意义。HBV 感染是是肝细胞性肝癌常见的致病因素，25%的慢性乙型肝炎或肝硬化患者最终会发展为肝细胞性肝癌，最近有学者通过免疫共沉淀发现，HBV 编码的乙型肝炎病毒 x 蛋白(HBx)可以同 pin1 结合，pin1 可以稳定 HBx 的表达导致肝细胞性肝癌的发生，肝细胞性肝癌组织中 pin1 与 HBx 呈正相关[10]。但是 pin1 是否在 HBV 感染后的病毒性肝炎、肝硬化、肝细胞性肝癌的疾病发生发展过程中发挥作用及在此过程中 pin1 与 HBV 的相互关系尚不清楚。我们将进一步对肝炎、肝硬化到肝细胞性肝癌发生发展过程中 pin1 与 HBV 的关系进行研究。

参 考 文 献

[1] Pang R W, Lee T K, Man K, et al. pin1 expression contributes to hepatic carcinogenesis[J]. J Pathol, 2006, 210(1): 19-25.

[2] 杨盛力，张万广，陈孝平，等.Pin1 在肝硬化和肝癌组织中的表达及其与乙型肝炎病毒 X 蛋白的关系[J].腹部外科，2007，20(4)：240-242.

[3] Lu K P, Hanes S D, Hunter T. A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis[J]. Nature, 1996, 380(6574): 544-547.

[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] Ryo A, Liou Y C, Lu K P, 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.

[6] Wulf G M, Wulf G G, Lee S W, 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.

[7] Ayala G, Wang D, Frolov A, et al. The prolyl isomerase Pin1 is a novel prognostic marker in human prostate cancer[J].Cancer Res, 2003, 63(19): 6244-6251.

[8] Fukuchi M, Fukai Y, Kimura H, et al. Prolyl isomerase Pin1 expression predicts prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma and correlates with cyclinD1 expression[J]. Int J Oncol, 2006, 29(2): 329-334.

[9] He J, Zhou F, Shao K, et al. Overexpression of Pin1 in non-small cell lung cancer (NSCLC) and its correlation with lymph- node metastases[J]. Lung Cancer, 2007, 56(1): 51-58.

[10] Pang R, Lee T K, Poon R T, et al. Pin1 interacts with a specific serine-proline motif of hepatitis B virus X-protein to enhance hepatocarcinogenesis[J]. Gastroenterology, 2007, 132(3): 1088-1103.

(责任编辑：关蕴良)