

PIAS3 在结肠癌组织和细胞中的表达及意义

李和平, 熬建萍, 杨 政

(解放军第二七三医院, 新疆 库尔勒 841000)

摘要: [目的] 观察 PIAS3 在结肠癌组织及细胞中的表达, 探讨 PIAS3 在结肠癌发生发展中的作用。[方法] 采用免疫组织化学染色法检测 60 例结肠癌及同源癌旁组织中 PIAS3 蛋白的表达, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)、Western blot 检测人结肠癌 SW480、SW620 及 COLO205 细胞株中 PIAS3 mRNA 及蛋白表达水平。[结果] 结肠癌组织中 PIAS3 蛋白表达显著高于癌旁正常组织 ($\chi^2=8.543, P=0.006$); 且表达强度随肿瘤病理分化程度的降低、Dukes 分期的增高及肿瘤体积的增大而逐渐增高, 差异有统计学意义 (P 均 <0.05); PIAS3 在结肠癌 SW480、SW620 及 COLO205 细胞株中均有表达, 其中 COLO205 细胞株中 PIAS3 蛋白及 mRNA 表达高于 SW480 和 SW620 细胞株 ($P<0.05$)。[结论] PIAS3 的表达水平以及活性与结肠癌的发生发展有关, 可能为结肠癌的早期诊断及靶向治疗提供新的分子靶点。

主题词: PIAS3; 结肠肿瘤; 免疫组织化学; COLO205 细胞

中图分类号: R735.3⁺5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2017)02-0106-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.02.B006

Expression of PIAS3 in Colon Cancer and its Significance

LI He-ping, AO Jian-ping, YANG Zheng

(The PLA 273 Hospital, Korla 841000, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression of PIAS3 in colon cancer and its significance. [Methods] The expression of PIAS3 protein was detected by immunohistochemistry (IHC) in 60 samples of colon cancer tissue and corresponding adjacent normal colon tissue. PIAS3 protein and mRNA were detected in human cancer cell lines SW480, SW620 and COLO205 by qRT-PCR and Western blot, respectively. [Results] The expression level of PIAS3 protein was significantly higher in colon cancer tissue than that in adjacent non-cancer tissues ($\chi^2=8.543, P=0.006$). The expression of PIAS3 was closely correlation with differentiation, Dukes stage and size of colon cancer ($P<0.05$). The positive expression of PIAS3 was observed in SW480, SW620 and COLO205 cells, the level of expression in COLO205 cells was higher than that in others ($P<0.05$). [Conclusion] The expression of PIAS3 may be related to the occurrence and development of colonic neoplasm, and it might be a new biomarker or target for diagnosis and treatment of colon cancer.

Subject words: PIAS3; colonic neoplasm; immunohistochemistry; Western blot; COLO205 cell

结肠癌是常见的恶性肿瘤之一, 具有发病率高及死亡率高等特点, 在发达国家, 男性结肠癌在恶性肿瘤总发病率中居第 3 位, 而女性结肠癌的发病率在恶性肿瘤中仅次于乳腺癌, 位居第 2 位, 其死亡率也高居第 2 位^[1]。STAT3 信号转导通路直接影响细胞的增殖、分化和凋亡, 异常活化的 STAT3 参与多种

恶性肿瘤的发生发展, 与肿瘤的治疗及预后也密切相关^[2]。PIAS3 最初被证实为 STAT3 的特异性抑制因子, 通过调控 STAT3 信号转导通路影响肿瘤的生物行为^[3]。近年来研究表明, PIAS3 具有调控 JAK/STAT3^[4]、PI3-K/Akt^[5]等信号通路及蛋白质泛素化降解途径^[6]等多种生物学功能, 与肝癌、胃癌、结直肠癌、乳腺癌、肺癌、肾癌、皮肤癌及黑色素瘤等恶性肿瘤的发生发展密切相关^[7]。本研究旨在观察 PIAS3 在结肠癌组织及细胞中的表达, 分析 PIAS3 在结肠

通讯作者: 李和平, 主治医师, 硕士; 解放军第二七三医院消化内科, 新疆库尔勒市铁门关路(841000); E-mail: lhp828800@163.com
收稿日期: 2016-08-31; **修回日期:** 2016-10-30

癌发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集解放军第二七三医院检验病理科 2013 年 7 月至 2015 年 12 月结肠癌切除组织标本 60 例及同源癌旁正常组织 60 例,患者术前均未接受放疗及化疗。病理诊断结果经病理科复核确认为结肠腺癌及癌旁正常组织。肿瘤组织按 WHO 结肠癌组织学分类及分级标准进行分类。男性 33 例,女性 27 例;年龄 45~70 岁,平均年龄 64 岁;有淋巴结转移 33 例,无淋巴转移 27 例。

1.2 细胞及试剂

所有标本均为石蜡包埋的存档标本,切片厚 4 μ m。PIAS3 Polyclonal Antibody(13486-1-AP)购自 Proteintech 公司,PIAS3 免疫组化试剂盒购自 Santa cruz 公司。人结肠癌细胞株 SW480(来源于结肠癌组织,Dukes B 期)、SW620(来源于淋巴组织,Dukes C 期)及 COLO205(来源于腹水组织,Dukes D 期)均购自中国科学院上海生物细胞库。PIAS3 及 18S 核糖体 RNA 引物由上海生工设计合成。TRIzol 试剂、抗 β -Actin 兔多克隆抗体、HiFi-MMLV 二步法 RT-PCR 试剂盒、UltraSYBR Mixture (With ROX)等试剂均购自北京康为世纪公司。

1.3 方法

1.3.1 结肠癌组织免疫组织化学染色(IHC)

将病理切片行二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,以 3%过氧化氢灭活内源性过氧化物酶,10mmol/L 枸橼酸盐溶液(pH=6.0)抗原热修复,羊血清工作液封闭阻断非特异性结合位点,37℃,孵育 10min,滴加 1:600 稀释的兔抗人 PIAS3 一抗,4℃冰箱孵育 24h,PBS 冲洗 3 次。加生物素标记的二抗,37℃,孵育 1h,DAB 显色,苏木素复染细胞核,中性树胶封片。以 PBS 代替一抗作阴性对照。文献已证实乳腺癌组织表达 PIAS3,因此选用乳腺癌组织作为阳性对照。

1.3.2 IHC 染色结果及判断标准

PIAS3 的阳性染色呈棕黄色小片段或散在分布,染色结果根据染色强度和阳性细胞百分比评分进行半定量分析,同时根据 PIAS3 阳性信号积分光密度值(IOD)进行定量分析。染色强度:0 分:无染

色,1 分:淡黄色染色,2 分:棕黄色染色,3 分:棕黑色染色;阳性细胞:0 分:<5%,1 分:5%~25%,2 分:26%~50%,3 分:50%~75%;4 分:>75%。将两者评分相乘,0~4 分为低表达,5~12 分为高表达。

1.3.3 结肠癌细胞株培养

人结肠癌 SW480、SW620 及 COLO205 细胞株在含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,隔 2d 换液,用胰酶消化传代,取对数生长期细胞进行实验。

1.3.4 qRT-PCR 检测人结肠癌细胞株中 PIAS3 mRNA 表达

胰酶消化收集各组细胞,按照 TRIzol 试剂说明书提取三种细胞总 RNA,紫外分光光度计检测其浓度及纯度。用 HiFi-MMLV Two Step RT-PCR Kit 逆转录合成 cDNA 第一链。反应条件为:42℃孵育 50min,70℃孵育 15min。qRT-PCR 中所用引物序列如下:PIAS3:上游引物 5'-ACTACATgAgTACCCAC-CTgCCTTC-3',下游引物 5'-CCAAgggCATCCT-gTTCATCTA-3',18S 核糖体 RNA:上游引物 5'-TTTgCgAgTACTCAACACCAACATC-3',下游引物 5'-gAgCATATCTTCggCCCACAC-3'。实时荧光定量 PCR 反应体系 20 μ l,内含 2xUltraSYBR Mixture (With ROX)10 μ l,Forward Primer 0.5 μ l,Reverse Primer 0.5 μ l,Template DNA 2 μ l,RNase-Free Water 7 μ l,反应条件如下:95℃ 10min,95℃ 15s,60℃ 1min,40 个循环。每个样品设 3 个平行反应,同时进行内参 18S 核糖体 RNA 的实时荧光定量 PCR。结果采用荧光定量 Bio-RAD icycler iQ5 software 进行定量分析。

1.3.5 Western blot 法检测人结肠癌细胞株中 PIAS3 蛋白表达

收集各组细胞,按 RIPA 蛋白裂解液说明提取三种细胞总蛋白质,以 BCA 法绘制标准曲线,计算蛋白质浓度。灌制 10%的 SDA-PAGE 凝胶,上样量为 80 μ g/孔,110V 恒压 80min 将蛋白转于 PVDF 膜上,TBST 缓冲液封闭 2h,一抗 PIAS3(1:800 稀释)、 β -actin(1:1000 稀释),4℃孵育过夜,二抗 3ml 孵育 1h。二氨基联苯胺(DAB)显色。用 Bio-RAD 多功能凝胶成像系统采集图像,Alpha-View 软件分析,以目的条带与 β -actin 的 A 值之比来表示目的蛋白的相对表达量。

1.4 统计学处理

采用 SPSS16.0 统计软件进行统计学分析。数据

分析采用两独立样本的 t 检验、 χ^2 检验、秩和检验、Fisher 精确概率等分析方法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 PIAS3 蛋白在结肠癌及癌旁正常组织中的表达

免疫组织化学染色结果显示,结肠癌及癌旁正常组织中 PIAS3 表达均阳性,呈棕黄色小片状或散在分布,主要位于细胞浆,部分分布在细胞核(Figure 1)。60 例结肠癌组织中 PIAS3 蛋白低表达 21 例,高表达 39 例;60 例癌旁正常组织中 PIAS3 蛋白低表达 37 例,高表达 23 例;PIAS3 蛋白在结肠癌组织中的表达强度高于癌旁正常组织($\chi^2=8.543$, $P=0.006$)。免疫组化染色结果经 PIAS3 阳性信号积分光密度值分析验证,结肠癌组织和癌旁正常组织中 PIAS3 蛋白表达值分别为: 3354.62 ± 573.18 和 2685.05 ± 803.46 , 差异有统计学意义($t=5.47$, $P<0.001$)。

2.2 PIAS3 表达与结肠癌临床病理特征的关系

结肠癌组织中 PIAS3 蛋白的表达强度随肿瘤分化程度降低、Dukes 分期增高及肿瘤体积的增大呈逐渐增高趋势,不同分化程度、Dukes 分期及瘤体大小的结肠癌组织中 PIAS3 蛋白表达强度差异有统计学意义 (P 均 <0.05),而与患者的性别、年龄及是否有淋巴结转移无明显相关性(Table 1)。阳性信号积分光密度值定量分析与半定量分析结果一致,不同肿瘤大小、分化程度及 Dukes 分期者 PIAS3 积分光密度值差

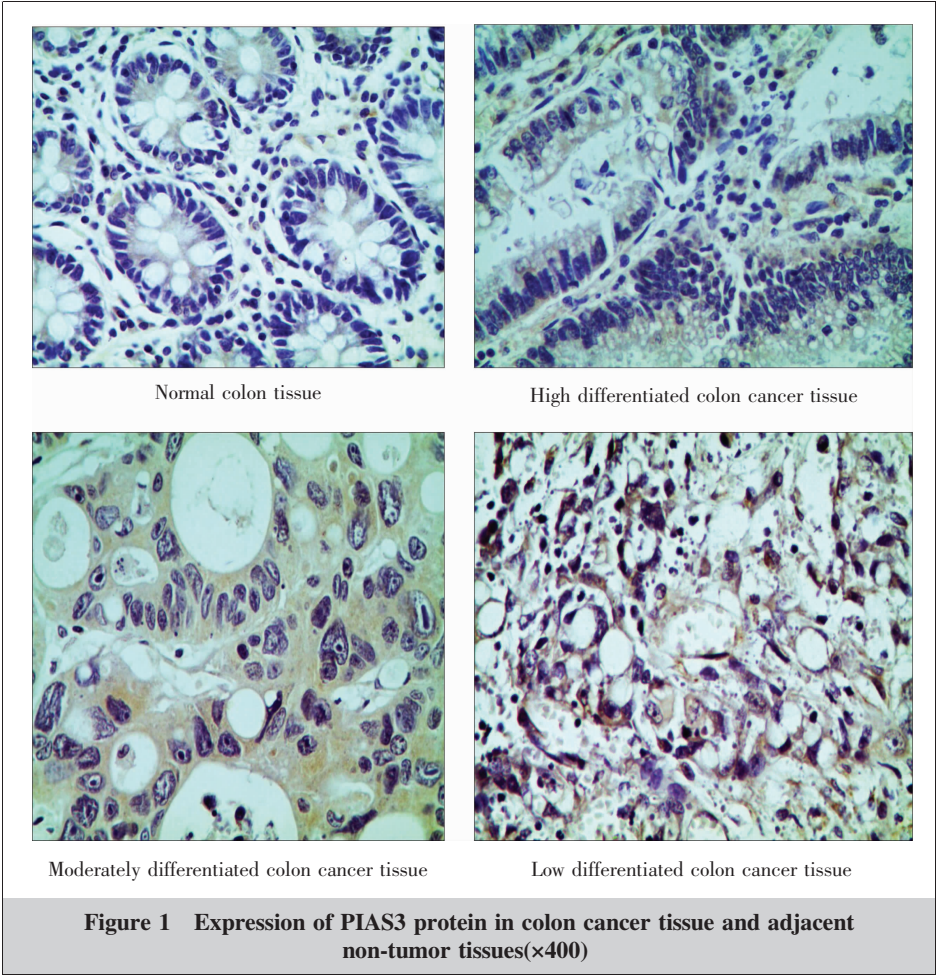


Figure 1 Expression of PIAS3 protein in colon cancer tissue and adjacent non-tumor tissues(×400)

Table 1 Relationship between PIAS3 protein expression and clinicopathological features in colon cancer

Clinicopathological features	PIAS3 expression		P	PIAS3 IOD	P
	Low	High			
Age(years)					
<60	9	14	0.781	3242.44±641.71	0.464
≥60	12	25		3440.39±518.12	
Gender					
Male	14	19	0.227	3297.22±526.45	0.321
Femae	7	20		3453.75±660.90	
Tumor size(cm)					
<5	11	6	0.006	3148.99±622.96	0.013
≥5	10	33		3611.86±493.72	
Lymph node metastasis					
Yes	15	18	0.102	3476.11±466.53	0.286
No	6	21		3195.75±674.94	
Differentiated degree					
High	9	6	0.021	2873.21±723.27	0.024
Moderately	8	13		3214.13±271.65	
Low	4	20		3676.50±245.74	
Dukes stage					
A~B	13	9	0.004	3118.31±532.10	0.002
C~D	8	30		3663.62±483.64	

异有统计学意义(P 均 <0.05)。

2.3 PIAS3 在结肠癌细胞株中的表达

qRT-PCR 检测结果显示,PIAS3 mRNA 在 SW480、SW620 及 COLO205 细胞株中表达均呈阳性,其相对表达量分别为: 0.0025 ± 0.0005 、 0.0017 ± 0.0001 、 0.0049 ± 0.0001 ,其中 COLO205 细胞株中的 PIAS3 mRNA 表达水平高于其他两组细胞株,差异有统计学意义($P<0.05$),而 SW480、SW620 两种细胞株间的相对表达量差异无统计学意义 ($P>0.05$)。Western blot 检测三种细胞系中 PIAS3 蛋白的表达水平与 qRT-PCR 检测结果一致,SW480、SW620 和 COLO205 的相对灰度值分别为: 35.30 ± 1.32 、 29.66 ± 1.41 和 48.95 ± 2.20 ,PIAS3 蛋白在 COLO205 株中的表达明显高于 SW480 与 SW620 细胞株,差异有统计学意义($P<0.05$),而在 SW480 与 SW620 细胞株中的表达差异无统计学意义($P>0.05$)(Figure 3)。

3 讨论

人类 PIAS3 基因定位于 1 号染色体长臂 (1q21),编码的 PIAS3 由 628 个氨基酸组成,分子量大约为 68kD^[3]。早期研究表明 PIAS3 为 STAT3 信号转录因子的特异性抑制剂,通过抑制 STAT3 与 DNA 结合,参与调控肿瘤细胞的增殖、血管生成及免疫监视等功能^[8]。PIAS3 在人体多数正常组织细胞中都有表达,如胃、食管、肺、结肠和前列腺等^[7]。当前,PIAS3 在恶性肿瘤组织中表达的研究结论报道并不一致,Wang 等^[7]研究表明,在人类脑肿瘤、乳腺癌、肺癌、肝癌、胃癌、结直肠癌、肾癌、皮肤鳞状细胞癌和黑色素瘤等多种恶性肿瘤组织中 PIAS3 表达水平较正常组织高。另有研究证实,在肿瘤组织或细胞中,PIAS3 表达较正常组织明显降低,甚至出现缺失现象^[8],如胃癌^[9]、脑胶质瘤^[10,11]等,这仍需进一步研究论证。

从 PIAS3 发现至今,人们对其认识已从单纯的 STAT3 信号转录因子的特异性抑制剂,拓展为可调控多条信号通路、蛋白质泛素化降解途径及免疫应答等多种生物功能的重要因子。JAK/STAT3 信号转导通路与细胞的增殖、分化和凋亡密切相关,也是肿瘤发生发展的重要途径,异常活化的 STAT3 可引起细胞的异常增殖及恶性转化,正常情况下,PIAS3 羧

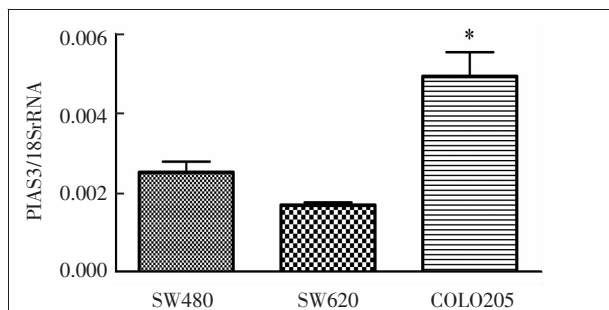


Figure 2 Expression of PIAS3 mRNA in colon cancer cell lines

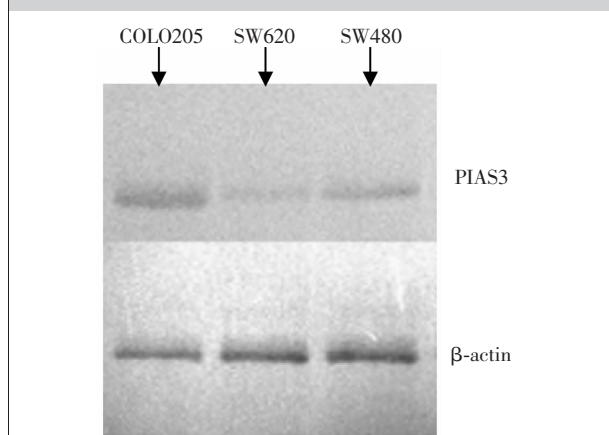


Figure 3 Expression of PIAS3 protein in different colon cancer cell lines

基末端的酸性区域能特异地与 STAT3 的 rPP-C8 区域结合,从而抑制肿瘤细胞的增殖,促进凋亡^[4,12]。PI3K/Akt 信号通路与肿瘤细胞的生长增殖及侵袭转移密切相关^[13],PIAS3 可抑制 Akt 的磷酸化,使 PI3K/Akt 失活,从而抑制肿瘤细胞生长^[5]。PIAS3 同时具有 SUMO-E3 连接酶的活性,可介导多种蛋白质发生泛素化^[14],通过泛素化作用,对肿瘤细胞的生长增殖及能量代谢发挥负性调控作用,新近的研究表明,PIAS3 在胃癌及肺鳞状细胞癌中的表达水平与两种肿瘤的生存率密切相关^[15,16]。

本研究证实,PIAS3 在结肠癌组织中的表达主要定位于细胞浆,部分位于细胞核,结肠癌组织中的表达强度显著高于同源正常结肠组织,且表达强度随着分化程度的降低和 Dukes 分期的增高及肿瘤体积的增大而逐渐增高,这也进一步证实了我们初期的研究结果以及该基因可能在结肠癌的发生发展中发挥重要作用的假设^[17]。对来源于不同组织且 Dukes 分期不同的三种结肠癌细胞株中 PIAS3 表达情况检测证实,PIAS3 在 COLO205 细胞株中的表达

水平明显高于 SW480 和 SW620 细胞株, 其结论与结肠癌组织免疫组化分析结果基本一致, 即 PIAS3 在结肠癌中的表达与肿瘤分化程度和 Dukes 分期关系密切, 而与是否有淋巴转移无关。PIAS3 可能通过 JAK/STAT3、PI3-K/Akt 信号通路或蛋白质泛素化降解途径等多种机制参与并调控结肠癌的发生和发展, 虽然调控的具体机制还需进一步研究, 但本研究证实, PIAS3 与结肠癌病理分化程度和 Dukes 分期及肿瘤体积的大小关系密切, 深入研究 PIAS3 的生物学行为和作用机理, 有望为结肠癌的早期诊断及靶向治疗提供新的分子靶点。

参考文献:

- [1] Jemal A, Bay F, Center MM, et al. Global cancer statistics, 2011[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 62(2): 69-90.
- [2] Dai X, Ahn KS, Kim C, et al. Ascochlorin, an isoprenoid antibiotic inhibits growth and invasion of hepatocellular carcinoma by targeting STAT3 signaling cascade through the induction of PIAS3[J]. Mol Oncol, 2015, 9(4): 818-833.
- [3] Chung CD, Liao J, Liu B, et al. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3[J]. Science, 1997, 278(5344): 1803-1805.
- [4] Hsiao HH, Liu YC, Yang MY, et al. Decreased expression of PIAS1 and PIAS3 in essential thrombocythemia patients[J]. Genet Mol Res, 2013, 12(4): 5617-5622.
- [5] Gata Y, Osaki T, Naka T, et al. Overexpression of PIAS3 suppresses cell growth and restores the drug sensitivity of human lung cancer cells in association with PI3-K/Akt inactivation[J]. Neoplasia, 2006, 8(10): 817-825.
- [6] Liu S, Fan Z, Geng Z, et al. PIAS3 promotes homology-directed repair and distal non-homologous end joining[J]. Oncol Lett, 2013, 6(4): 1045-1048.
- [7] Wang L, Banerjee S. Differential PIAS3 expression in human malignancy[J]. Oncol Rep, 2004, 11(6): 1319-1324.
- [8] Brantley EC, Nabors LB, Gillespie GY, et al. Loss of protein inhibitors of activated STAT-3 expression in glioblastoma multiforme tumors: implications for STAT-3 activation and gene expression [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(15): 4694-4704.
- [9] Liu LM, Yan MG, Yang DH, et al. PIAS3 expression in human gastric carcinoma and its adjacent non-tumor tissues[J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2011, 35(5): 393-398.
- [10] Pan TH, Wang YY, Zhang SG, et al. Research on the effects of PIAS3 expression on the invasion of glioma TJ905 cells[J]. Chinese Journal of Surgery, 2011, 49(5): 440-444. [潘天鸿, 王颖毅, 张曙光, 等. 探讨 PIAS3 表达水平对胶质瘤 TJ905 细胞侵袭作用的影响 [J]. 中华外科杂志, 2011, 49(5): 440-444.]
- [11] Ji H, Wang DL. PIAS3 expression in human brain gliomas [J]. Journal of Third Military Medical University, 2007, 29: 1240. [纪华, 王东林. PIAS3 在人脑胶质瘤中的表达 [J]. 第三军医大学学报, 2007, 29: 1240.]
- [12] Fernandes A, Hamburger AW, Gerwin BI, et al. ErbB-2 kinase is required for constitutive stat 3 activation in malignant human lung epithelial cells[J]. Int J Cancer, 1999, 83(4): 564-570.
- [13] Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, et al. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN[J]. Cell, 1998, 95(1): 29-39.
- [14] Schmidt D, Muller S. PIAS/SUMO: new partners in transcriptional regulation [J]. Cell Mol Life Sci, 2003, 60(12): 2561-2574.
- [15] Li J, Cui J, Zhang J, et al. PIAS3, an inhibitor of STAT3, has intensively negative association with the survival of gastric cancer[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(1): 682-689.
- [16] Abbas R, McColl KS, Kresak A, et al. PIAS3 expression in squamous cell lung cancer is low and predicts overall survival[J]. Cancer Med, 2015, 4(3): 325-332.
- [17] Li H, Gao H, Bijukchhe SM, et al. PIAS3 may represent a potential biomarker for diagnosis and therapeutic of human colorectal cancer [J]. Med Hypotheses, 2013, 81(6): 1151-1154.