

胆管癌中 IMP3 的表达与临床因素及术后生存率的相关性

高园园, 邵文雨, 陆 森, 黄新立*, 张 峰

(南京医科大学第一附属医院肝脏外科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究胰岛素样生长因子 II mRNA 结合蛋白 3(IMP3)在胆管癌中的表达及其临床意义。方法:免疫组化检测 54 例胆管癌组织、癌旁组织以及正常组织中 IMP3 蛋白的表达水平。Western blot 检测不同病理分级中 IMP3 的表达,其中 I 级 5 例、II 级 4 例、III 级 5 例。real-time PCR 检测 17 例胆管癌组织、癌旁组织以及正常组织中 IMP3 mRNA 表达水平。随访统计 47 例胆管癌术后患者长期生存情况。结果:IMP3 在癌组织中呈高表达,阳性率达 81.84%,而在癌旁和正常组织中均为阴性。不同病理分级中,IMP3 表达量有显著差异,分级越高,IMP3 表达量越高。RT-PCR 结果显示 IMP3 的 mRNA 在癌组织中表达升高,与蛋白表达水平一致。47 例术后随访发现 IMP3 阴性组术后长期生存明显高于 IMP3 阳性组($P < 0.01$)。结论:IMP3 可以作为胆管癌诊断新的标志物,病理分级越高,恶性程度越高,表达量越高;胆管癌中 IMP3 高表达提示不良预后。

[关键词] 胰岛素样生长因子 II mRNA 结合蛋白 3;胆管癌

[中图分类号] R735.8

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)06-792-05

doi:10.7655/NYDXBNS20130615

Expression of IMP3 in cholangiocarcinoma in relation to clinical factors and postoperative survival rate

Gao Yuanyuan, Shao Wenyu, Lu Sen, Huang Xinli*, Zhang Feng

(Department of Liver Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:**To investigate the expression of insulin-like growth factor II mRNA binding 3 (IMP3) and its clinical significance. **Methods:**Paraffin sections of tumor tissues, pericarcinomatous tissues and normal tissues from 54 patients with cholangiocarcinoma were examined for expression of IMP3 by immunohistochemistry. Detect IMP3 expression by Western blot in different pathological grades, including five cases of grade I, 4 cases of grade II and 5 cases of grade III. Tumor tissues, pericarcinomatous tissues and normal tissues from 17 patients with cholangiocarcinoma were examined for expression level of IMP3 mRNA by quantitative real time PCR. Follow and count long-term survival of 47 patients with post-operation of cholangiocarcinoma. **Results:**IMP3 expression was positive in 81.84% of cholangiocarcinoma, negative in pericarcinomatous tissues and normal tissues. Significant differences of IMP3 expression among different pathological grades, the higher grade, the higher IMP3 expression levels. The mRNA level of IMP3 was also increased in tumor tissues, and there was correlation with protein level. The follow up of forty-seven postoperative cases found the postoperative long-term survival of IMP3 negative group was significantly higher than that of the IMP3-positive group ($P < 0.01$). **Conclusion:**IMP3 can be used as a new marker for the diagnosis of cholangiocarcinoma, higher pathological grade, the higher degree of malignancy, the higher expression level. The overexpression of IMP3 suggests poor prognosis.

[Key words] insulin-like growth factor II mRNA binding3; cholangiocarcinoma

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(6):792-796]

胆管癌是起自于胆管上皮细胞的一种恶性肿瘤,其病理类型可分为肝内胆管癌和肝外胆管癌^[1]。

由于胆管癌很难早期诊断,大部分患者失去早期治疗的机会,自然病程不超过 12 个月^[2]。近年来,尽管有报道称肝外胆管癌的发生率和病死率均有所下降,但肝内胆管癌的发生率和病死率均在不断上升^[3]。目前对于胆管癌的诊断主要依赖影像学;手术切除是胆管癌的首选有效治疗方式^[4]。因此研究与

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81273262)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: huangxinli@njmu.edu.cn

胆管癌发生、发展及预后相关的分子标志物,对其诊断、治疗以及预后判断具有重要意义。

胰岛素样生长因子 II mRNA 结合蛋白 3(IMP3) 通过其特异 mRNA 识别和结合位点同胰岛素样生长因子 II (IGF II)mRNA 相结合,通过调节 IGF II mRNA 的运输、翻译及稳定性来调节细胞的极性、运动和增殖^[5-7]。IMP3 仅在人胚胎中表达,在正常成年机体内不表达^[8]。但最近研究发现,IMP3 在胰腺癌、食管癌、肝细胞肝癌、三阴性乳腺癌、子宫内膜癌、骨肉瘤等多种恶性肿瘤中高表达,而且可以作为多种肿瘤诊断和预后判断的分子标志物^[9-15]。然而 IMP3 在胆管癌中的表达情况未见报道,本研究首次对 IMP3 在胆管癌中的表达水平、机制以及其临床意义进行了研究。

1 对象和方法

1.1 对象

收集 2008~2010 年在南京医科大学第一附属医院肝脏外科接受手术治疗的原发性胆管癌病例 54 例:15 例肝外胆管癌、39 例肝内胆管癌。所有患者术前均无明显黄染、均未行放疗。54 例石蜡固定组织由病理科提供、17 例冰冻组织由组织库提供。石蜡标本的 HE 染色切片均由本院有经验病理科医生阅片确认,肝内、肝外转移均视为转移;病理分级、肿瘤分期均按照现行国际标准^[16-17]。对 54 例进行长达 3 年的随访,7 例中途遗失,47 例随访信息完整。所有资料均得到伦理委员会审批。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化

一抗(Abcam 公司,美国)。石蜡固定标本,6 μm 切片,经二甲苯脱蜡,梯度酒精水化。经 0.01 mol/L 柠檬酸,100℃,10 min 抗原修复。3%的双氧水消除内源性过氧化物酶活性,一抗(1:100 稀释)4℃ 孵育过夜,PV9000 室温孵育,DAB 显色,苏木素复染。5%胎牛血清代替一抗为阴性对照。结果由南京医科大学第一附属医院病理科 2 位医生读片。依据细胞着色强度和着色细胞数量判定:-为阳性细胞数 < 5%;+ 为 5%~25%肿瘤细胞弱染色;++ 为 25%~50%肿瘤细胞中度染色;+++ 为 >50%肿瘤细胞强染色(-判定为阴性,+、++ 或 +++ 都判定为阳性)。

1.2.2 蛋白提取及 Western blot 检测

参照蛋白提取试剂盒(碧云天公司)说明书进行。60 μg 蛋白上样后 80 V 电泳,蛋白弥散后改为 100 V 继续电泳,共约 2 h。250 mA,恒流湿转,65 min。

转膜结束后 5% BSA 封闭 2 h,加入一抗(Abcam 公司,美国)后 4℃ 冰箱过夜。TBST 洗膜 3 遍,每次 15 min。然后加入二抗后 37℃ 恒温箱孵育,TBST 洗膜 3 遍,每次 15 min。显影液显影,凝胶成像仪获取图像。

1.2.3 real-time PCR

总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒(大连宝生物公司)。反转录 PCR 引物由英潍捷基公司合成。IMP3 上游引物:5'-ACGAAATATCCCGCCTCATTTAC-3',下游引物:5'-GCAGTTTCCGAGTCAGTGTTCA-3',β-actin 上游引物:5'-ACTGGAACGGTGAAGGTGAC-3',下游引物:5'-AGAGAAGTGGGGTGGCTTTT-3'。由 ABI StepOnePlus™ PCR 仪完成扩增。反应条件:95℃ 30 s 预变性,PCR 反应,95℃ 1 s,60℃ 30 s 共 40 个循环。结果采用相对定量法分析。

1.3 统计学方法

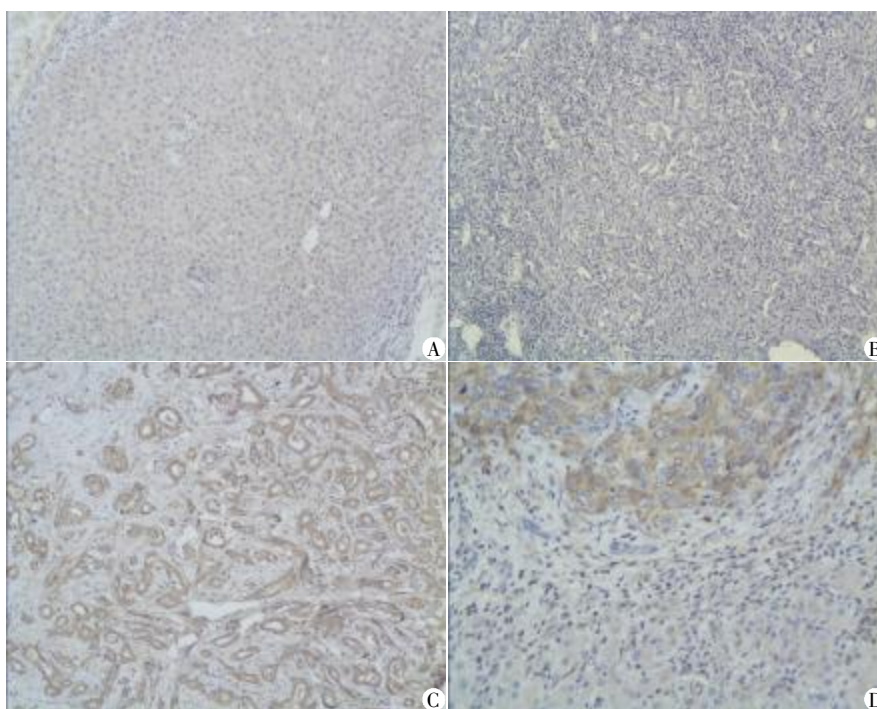
采用 SPSS16.0 软件进行分析,各组间 IMP3 表达阳性率的比较采用四格表 χ^2 检验。不同 IMP3 表达组之间的生存分析采用 Kaplan-Meier 分析 Log-rank 检验;Western blot 图片用 Image-J 测灰度值;Western blot 结果和 RT-PCR 结果均采用 Graphpad Prism5 软件,行单因素方差分析检验作图。所有检验均以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IMP3 蛋白在胆管癌中的表达

免疫组化检测了 54 例胆管癌、癌旁组织以及部分正常组织中 IMP3 的表达。54 例癌组织标本,IMP3 免疫染色阴性 10 例,阴性率 18.51%;着色阳性的癌组织有 44 例,阳性率 81.48%。癌旁组织及正常组织均未发现阳性着色。IMP3 着色主要定位于细胞浆(图 1)。

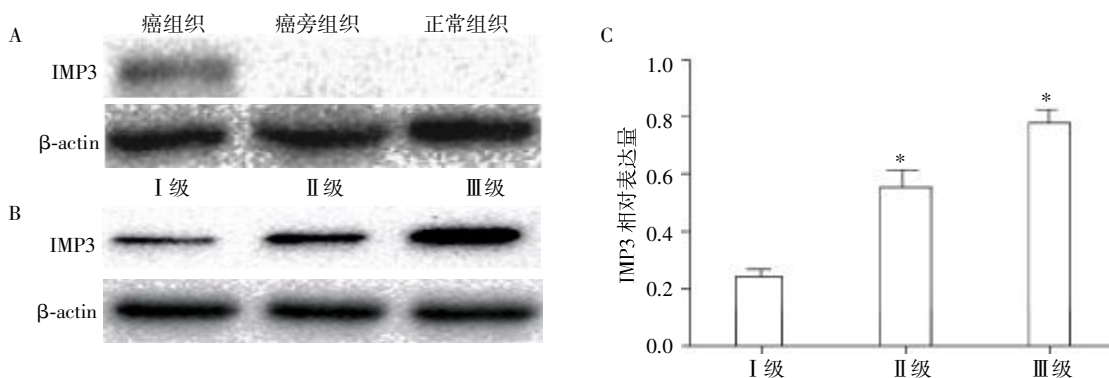
为进一步确认免疫组化的结果,Western blot 检测了从组织中提取的蛋白,结果显示癌组织中 IMP3 表达明显,癌旁和正常组织均为阴性(图 2 A)。分别从 5 例 I 级、4 例 II 级、5 例 III 级胆管癌组织中提取蛋白,经 Western blot 检测显示,不同病理级别中 IMP3 表达量有显著差异,病理分级越高,IMP3 表达量越高(图 2B、2C)。运用 Image-J 分别测得目的蛋白和内参蛋白的灰度值。目的蛋白同内参蛋白的灰度值之比作单因素方差分析,具有统计学意义($P < 0.001$)。各组具体数据如下:I 级 0.240 ± 0.057 ;II 级 0.558 ± 0.105 ;III 级 0.781 ± 0.081 。



A: 正常胆管组织($\times 10$); B: 胆管癌组织染色阴性($\times 10$); C: 癌组织着色阳性($\times 100$); D: 癌组织和癌旁组织对照, 癌旁组织阴性($\times 100$)。

图1 IMP3在胆管癌中的表达

Figure 1 Expression of IMP3 in cholangiocarcinoma



A: 不同组织中 IMP3 蛋白表达差异, 癌组织中表达明显, 癌旁和正常组织均为阴性; B: 胆管癌不同病理分级中的表达差异; C: 不同病理分级之间的 IMP3 相对表达量, 与 I 级比较, * $P < 0.05$ ($n = 5$)。

图2 Western blot 检测组织中 IMP3 表达

Figure 2 Detection of IMP3 in tissues by Western blot

2.2 IMP3 mRNA 在胆管癌组织中表达

从 17 例手术切除冰冻保存组织中提取 RNA, real-time PCR 检测 IMP3 mRNA 表达。结果显示: 癌组织中 IMP3 mRNA 的表达量明显高于癌旁和正常组织 ($P = 0.019$, 图 3)。

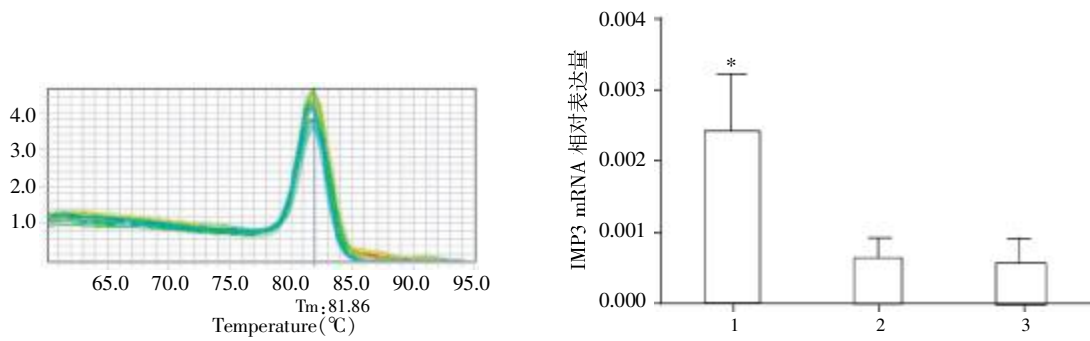
2.3 胆管癌中 IMP3 的表达与术后生存率

IMP3 的表达与胆管癌患者的年龄、性别、肿瘤大小无明显相关性 ($P > 0.05$); 而与肿瘤病理分级、肿瘤分期和是否发生转移相关 ($P < 0.05$, 表 1)。对 47 例患者长达 3 年的随访数据显示: 最短生存时间 3

个月, 最长 36 个月, 中位生存时间 12 个月, 平均生存时间 13.3 个月, 可信区间为 (13.3 ± 9.57) 个月。IMP3 阳性组患者的术后 2 年生存率比阴性组差, 差异具有显著性 ($P < 0.05$, 表 2)。通过 Kaplan-Meier 生存分析表明, 阳性组术后生存率明显低于阴性组 (图 4)。

3 讨论

本研究中, IMP3 在胆管癌中表达明显高于癌旁和正常组织, 而且其高表达与胆管癌患者不良预后



A: Real-time PCR 扩增 IMP3 cDNA 的熔解曲线。B: IMP3 mRNA 的表达水平, 1: 肿瘤组织; 2: 癌旁组织; 3: 正常组织; 与正常组织比较, * $P < 0.05$ ($n=17$)。

图 3 Real-time PCR 检测胆管癌中 IMP3 的 mRNA 表达水平
Figure 3 Detection of IMP3 mRNA in cholangiocarcinoma by real-time PCR

表 1 各 IMP3 表达与胆管癌患者临床因素关系
Table 1 Expression of IMP3 in cholangiocarcinoma in relation to clinical factors

临床因素	n	阳性率(%)	P 值
年龄(岁)			
>55	30	23 (76.66)	0.506
≤55	24	21 (91.30)	
性别			
女	21	15 (71.42)	0.247
男	33	29 (87.87)	
肿瘤大小(cm)			
>5	28	22 (78.57)	0.64
≤5	26	22 (84.61)	
病理分级			
低	28	20 (71.40)	0.048
高	26	24 (92.30)	
肿瘤分期			
I~II	29	19 (65.51)	0.001
III~IV	25	25 (100.00)	
转移			
否	23	14 (60.86)	0.003
是	31	30 (96.77)	

表 2 IMP3 不同程度表达与患者 2 年生存关系
Table 2 Different levels of IMP3 in relation to 2 years survival rate

IMP3	生存时间(月)		n	2 年生存率(%)	P 值
	≥24	<24			
阴性	9	1	10	90.00	<0.001
阳性	4	33	37	10.81	

有显著相关。real-time PCR 对癌组织、癌旁组织以及正常组织中的 IMP3 mRNA 检测显示, 癌组织中蛋白的高表达同 mRNA 的高表达有一定相关性。而癌旁组织和正常组织中 IMP3 的 mRNA 也出现低表达, 这一现象说明 IMP3 的表达不仅有基因转录调

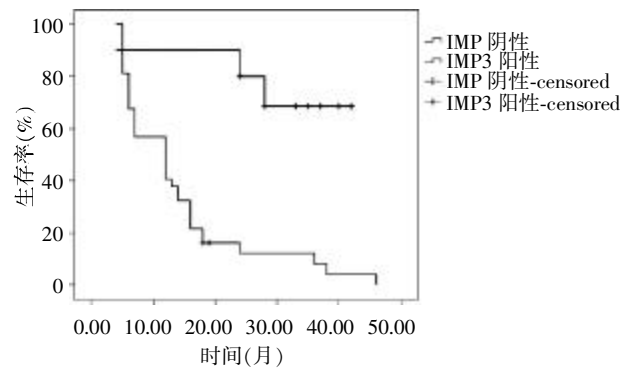


图 4 47 例术后患者 Kaplan-Meier 生存分析
Figure 4 Survival analysis of 47 cases of postoperative patients by Kaplan-Meier

控的参与, 还有其他机制参与 IMP3 的表达调控, 其具体机制还需要进一步研究探索。

目前已知 IMP3 在多种肿瘤中高表达, 可以作为一种新的诊断和判断预后的分子标志物^[9,18]。IMP3 在 97% 的胰腺癌组织和 79% 的胰腺重度不典型增生组织中高表达。而且 IMP3 的表达量同病理分级有一定相关性, 病理分级越高, 恶性程度越高, 表达量越高^[10]。这与本实验研究的结果相符, 提示 IMP3 可用于胆管癌病理分级的判定。在胰腺腺癌穿刺诊断中, IMP3 同目前已经明确的标志物之间没有显著差异^[19]。本实验结果提示, IMP3 在胆管癌诊断困难时, 可以用于肿瘤良恶性的鉴别。对食管癌、胃肠道恶性肿瘤的研究显示: IMP3 不仅可以作为一项新的肿瘤标志物区别良恶性肿瘤, 而且可以作为影响预后的独立因素^[14,20-21]。通过对 377 例原发性肝细胞肝癌的研究, IMP3 的阳性率为 67.6% (255/377), IMP3 高表达提示早期复发, 5 年生存率明显降低^[8]。本研究通过对 47 例胆管癌术后患者长达 3 年的随访, 结果显示 IMP3 阴性组长期生存率明显高于阳性组, 两年生存率在 IMP3 阴性组中高达 90%, 而在

阳性组中则仅为 10.8%, 具有显著差异(表 2)。本研究中, IMP3 阳性表达率 81.48%, 在胆管癌诊断的特异性同胰腺癌相似, 同时, IMP3 同肿瘤的病理分级、肿瘤分期和是否存在转移有一定相关性, 病理分级越高, 分期越晚, 有转移, 则表达量越高。但 IMP3 在胆管癌中的具体机制还需要进一步研究来揭示。

[参考文献]

- [1] Ishak KG, Anthony PP, Sobin LH, et al. Histological typing of tumours of the liver[M]. WHO International Histological Classification of Tumours. Berlin: Springer Verlag, 1994: 1-37
- [2] Carriaga MT, Henson DE. Liver, gallbladder, extrahepatic bile ducts, and pancreas [J]. *Cancer*, 1995, 75(1): 171-190
- [3] Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, et al. Cholangiocarcinoma [J]. *Lancet*, 2005, 366(9493): 1303-1314
- [4] Poultsides GA, Zhu AX, Choti MA, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Surg Clin North Am*, 2010, 90(4): 817-837
- [5] Nielsen J, Christiansen J, Lykke-Andersen J, et al. A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development [J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(2): 1262-1270
- [6] Liao B, Hu Y, Herrick D J, et al. The RNA-binding protein IMP-3 is a translational activator of insulin-like growth factor 2 leader-3 mRNA during proliferation of human K562 leukemia cells [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(18): 18517-18524
- [7] Vikesaa J, Hansen TV, Jonson L, et al. RNA-binding IMPs promote cell adhesion and invadopodia formation [J]. *EMBO J*, 2006, 25(7): 1456-1468
- [8] Mueller-Pillasch F, Pohl B, Wilda M, et al. Expression of the highly conserved RNA binding protein KOC in embryogenesis [J]. *Mech Dev*, 1999, 88(1): 95-99
- [9] Yaniv K, Yisraeli JK. The involvement of a conserved family of RNA binding proteins in embryonic development and carcinogenesis [J]. *Gene*, 2002, 287(1-2): 49-54
- [10] Yantiss RK, Yisraeli JK, et al. KOC (K homology domain containing protein overexpressed in cancer): a novel molecular marker that distinguishes between benign and malignant lesions of the pancreas [J]. *Am J Surg Pathol*, 2005, 29(2): 188-195
- [11] Jeng YM, Chang CC, Hu FC, et al. RNA-binding protein insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 expression promotes tumor invasion and predicts early recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2008, 48(4): 1118-1127
- [12] Li C, Zota V, Woda BA, et al. Expression of a novel oncofetal mRNA-binding protein IMP3 in endometrial carcinomas: diagnostic significance and clinicopathologic correlations [J]. *Mod Pathol*, 2007, 20(12): 1263-1268
- [13] Do SI, Kim YW, Park HR, et al. Expression of insulin-like growth factor-II mRNA binding protein 3 (IMP3) in osteosarcoma [J]. *Oncol Res*, 2008, 17(6): 269-272
- [14] Lu D, Vohra P, Chu PG, et al. An oncofetal protein IMP3: a new molecular marker for the detection of esophageal adenocarcinoma and high-grade dysplasia [J]. *Am J Surg Pathol*, 2009, 33(4): 521-525
- [15] Samanta S, Sharma VM, Khan A, et al. Regulation of IMP3 by EGFR signaling and repression by ERbeta; implications for triple-negative breast cancer [J]. *Oncogene*, 2012, 44(31): 4689-4697
- [16] Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48 900 necropsies [J]. *Cancer*, 1954, 7(3): 462-503
- [17] Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM [J]. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17(6): 1471-1474
- [18] Jiang Z, Chu PG, Woda BA, et al. Analysis of RNA-binding protein IMP3 to predict metastasis and prognosis of renal-cell carcinoma: a retrospective study [J]. *Lancet Oncol*, 2006, 7(7): 556-564
- [19] Wachter DL, Schlabrakowski A, Hoegel J, et al. Diagnostic value of immunohistochemical IMP3 expression in core needle biopsies of pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Am J Surg Pathol*, 2011, 35(6): 873-877
- [20] Chen Z, Xing X, Li B, et al. Overexpression of IMP3 is an independent prognostic factor for esophageal squamous cell carcinoma [J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2010, (23): 3583-3587
- [21] Jeng YM, Wang TH, Lu SH, et al. Prognostic significance of insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 expression in gastric adenocarcinoma [J]. *Br J Surg*, 2009, 96(1): 66-73

[收稿日期] 2013-02-27