

骨髓 Pim-1 和 C-myc 表达在初诊多发性骨髓瘤中的临床意义

齐 晶 徐又海 汪兴洪

(皖南医学院附属弋矶山医院 血液内科,安徽 芜湖 241001)

【摘 要】目的: 探讨莫罗尼鼠白血病病毒前病毒整合基因-1(proviral integration of moloney murine leukemia virus ,Pim-1) 及 C-myc 在初诊多发性骨髓瘤(multiple myeloma ,MM) 发病机制中的可能作用。方法: 采用 RT-PCR 检测 22 例 MM 患者骨髓及 10 例非恶性血液病患者骨髓中 Pim-1 mRNA 及 C-myc mRNA 的表达水平。结果: 在初诊的多发性骨髓瘤患者中 Pim-1 和 C-myc 基因的表达显著高于对照组 ,二者比较有差异性($P < 0. 05$); Pim-1 和 C-myc 基因的表达成正相关($r = 0. 577$, $P < 0. 01$) 。结论: Pim-1 及 C-myc 基因的过度表达 在多发性髓瘤的发生发展中可能具有协同作用。

【关键词】Pim-1; C-myc; 原癌基因; 多发性骨髓瘤; RT-PCR

【中图分类号】R 733. 3 **【文献标识码】**A

【DOI】10. 3969/j. issn. 1002-0217. 2015. 02. 011

Expression of Pim-1 and c-myc in newly diagnosed multiple myeloma

QI Jing ,XU Youhai ,WANG Xinghong

Department of Hematology ,Yijishan Hospital ,Wannan Medical College ,Wuhu 241001 ,China

【Abstract】Objective: To explore the mechanisms of proviral integration site for moloney murine leukemia virus 1(Pim-1) and c-myc in the pathogenesis of multiple myeloma(MM) . **Methods:** Reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) was used to detect the Pim-1 mRNA and c-myc mRNA level in the bone marrow specimens from 22 newly diagnosed MM cases and 10 cases of non-hematological malignancies. **Results:** The level of Pim-1 mRNA and c-myc mRNA in newly diagnosed MM cases was significantly higher than that of control group($P < 0. 05$) and the Pim-1 mRNA expression was positively correlated with c-myc mRNA($r = 0. 577$, $P < 0. 01$) . **Conclusion:** Over-expression of Pim-1 and c-myc in MM indicates that the two proto-oncogenes may be synergetic effect in the pathogenesis and progression of this entity.

【Key words】Pim-1; c-myc; proto-oncogene; multiple myeloma; RT-PCR

收稿日期: 2014-08-17

作者简介: 齐 晶(1988-) ,女,住院医师 (电话) 18655306297 (电子信箱) yjsqijing@ 163. com;

汪兴洪,男,主任医师 (电子信箱) yjswangxinghong@ 163. com 通讯作者。

[4] Siegel R ,Naishadham D ,Jemal A. Cancer statistics 2012 [J]. CA Cancer J Clin 2012 ,62(1) : 10 - 29.

[5] Sobieski MA 2nd ,Graham JD ,Pappas PS ,et al. Reducing the effects of the systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass can single dose steroids blunt systemic inflammatory response syndrome [J]. ASAIO J 2008 ,54(2) : 203 - 206.

[6] 陶玲,卓文磊,杨帆. 培美曲塞联合铂类治疗非小细胞肺癌的 Meta 分析 [J]. 重庆医学 2012 ,41(1) : 44 - 46.

[7] 蔡蔚,蒋磊,孙静平等. 国产培美曲塞联合卡铂一线治疗老年 IV 期肺腺癌的临床研究 [J]. 临床肿瘤学杂志 2013 ,18(3) : 233 - 237.

[8] 王强,马玲,申红丽,等. 培美曲塞联合铂类一线治疗晚期 NSCLC 疗效与安全性 Meta 分析 [J]. 中华肿瘤防治杂志 2014 ,21(1) : 61 - 66.

[9] 戴宏宇,徐玲,夏春伟,等. 吉非替尼对比培美曲塞二线治疗晚期非鳞型非小细胞肺癌的随机对照临床研究 [J]. 中国肺癌杂志 2013 ,16(8) : 405 - 410.

[10] 赵利红,汪海岩,张德芳. 培美曲塞与吉非替尼二线治疗晚期非小细胞肺癌的临床对比分析 [J]. 中国肿瘤临床与康复 2013 ,20(11) : 1235 - 1238.

[11] 黄逸生,杨衿记,黄玉娟,等. 厄洛替尼二、三线治疗晚期非小细胞肺癌的临床研究 [J]. 中国肺癌杂志 2009 ,12(5) : 412 - 416.

[12] 程刚. 靶向治疗药物特罗凯的药代动力学优势 [J]. 中国肺癌杂志 2009 ,6(12) : 619 - 622.

[13] 毋永娟,崔荣,华云旗,等. 培美曲塞与厄洛替尼维持治疗晚期非小细胞肺癌的临床研究 [J]. 中国全科医学 2011 ,14(9) : 966 - 968.

[14] Douglas SL ,Daly BJ. The impact of patient quality of life and spirituality upon caregiver depression for those with advanced cancer [J]. Palliat Support Care 2012 ,Nov 27: 1 - 8. [Epub ahead of print]

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM) 是浆细胞异常增生导致的一种恶性克隆性疾病。其病因尚不明确,可能与原癌基因的激活导致的促进增殖、抑制凋亡以及多种信号通路导致的肿瘤血管新生、细胞核因子 κ B 受体活化因子(receptor activator of nuclear factor- κ B, RANK) /RANK 配基(RANK ligand, RANKL) /护骨素(Osteoprotegerin, OPG) 改变致溶骨破坏等相关^[1]。莫罗尼鼠白血病病毒前病毒整合基因(proviral integration of moloney murine leukemia virus, Pim) 和 C-myc 作为原癌基因已发现在多种肿瘤中不同程度的表达,并和预后相关。本文采用 RT-PCR 检测初诊的多发性骨髓瘤患者及正常对照组的 Pim-1、C-myc 基因的表达情况以及与临床分期、指标之间的联系,探讨其在多发性骨髓瘤发病机制中的可能作用。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选择2012年7月~2013年9月来本院就诊的22例初诊MM患者各2mL骨髓液标本用做MM组,其中男性12例、女性10例,年龄44~77岁,中位年龄58岁,IgG型13例、IgA型5例、轻链型2例、不分泌型2例;D-S分期:I期0例、II期2例、III期20例;A组18例、B组4例;选择2013年1~9月我院10例非恶性血液病患者,男性6例,女性4例,年龄37~66岁,中位年龄49岁,排除肿瘤、感染、免疫系统疾病等影响试验结果疾病的骨髓液作为正常对照组。

1.2 实验方法 ①抽取骨髓液2mL,EDTA-2K抗凝,利用淋巴细胞分离液分离单个核细胞,制成单个核细胞悬液,保存于-80℃冰箱备用。②提取单个核细胞中的总RNA,用分光光度计A260/A280的比值来判断RNA样品纯度,确保比值在1.8~2.0之间,并逆转录成cDNA。③选择GAPDH为内参照基因,Pim-1及C-myc核酸引物由DNASTAR软件设计,由上海生工生物公司合成(引物序列:Pim-1:F:5'-GCC CTG CTC AAG GAC ACC GT -3',R:5'-GGC GAC AGG CTG TGG AGG TG -3';C-myc:F:5'-CTA CCA GCA GCA GCA GCA GAG C-3',R:5'-CGT CCG GGT CGC AGA TGA A-3';GAPDH:F:5'-GTG GTC TCC TCT GAC TTC AAC A -3',R:5'-CCA CCA CCC TGT TGC TGT AG -3'),用于Pim-1和C-myc mRNA的PCR扩增。④反应体系为50 μ L:包括2 μ L cDNA,上、下游引物各1 μ L,25 μ L 2 \times PCR MIX,并加

入去核酸水至50 μ L。⑤反应条件为Pim-1 mRNA:95℃预变性5min;94℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸30s,循环30次;72℃再延伸10min。C-myc mRNA:95℃预变性15min,94℃变性60s,61℃退火60s,72℃延伸60s,循环26次;72℃再延伸10min。⑥利用1.5%琼脂糖凝胶电泳和Bio-Image Analysis System分析Pim-1和C-myc mRNA的表达和差异。

1.3 统计学处理方法 所有数据均用SPSS 16.0软件进行统计分析。数值变量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间比较采用 *t* 检验或秩和检验;两变量间相关性研究采用Pearson相关分析。以 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准, $P < 0.05$ 作为判定有统计学意义的依据。

2 结果

2.1 Pim-1 和 C-myc mRNA 的表达 用Bio-Rad凝胶成像系统分析Pim-1 mRNA和C-myc的相对表达量,结果以相对光密度值(relative optical density, ROD)表示,mRNA相对光密度值=目的基因条带光密度值/GAPDH条带光密度值,电泳结果如下。

图1中泳道2~6、8~9、11~12为MM组患者Pim-1 mRNA(356 bp)表达情况;泳道7、10为对照组Pim-1 mRNA表达情况;泳道2~12条带为GAPDH mRNA(136 bp),初诊MM组和治疗组患者的Pim-1扩增产物条带明显比对照组清晰。MM组患者中Pim-1 mRNA表达量为 0.692 ± 0.353 ;对照组中Pim-1 mRNA表达量为 0.361 ± 0.203 ;两组间比较差异有显著性($P < 0.05$),见表1。

表1 Pim-1 mRNA 的表达量

分组	例数	阳性数(%)	Pim-1 mRNA	t 值	P 值
MM组	22	13(59.1)	0.692 ± 0.353	2.750	0.009
对照组	10	2(20.0)	0.361 ± 0.203		

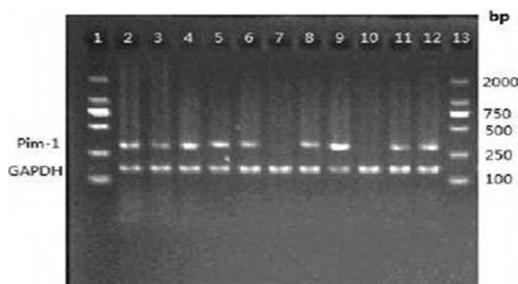


图1 Pim-1 mRNA RT-PCR 产物的条带

图2中泳道1、13为DNA Marker,泳道2~6、8~9、11~12条带为MM患者C-myc mRNA(268bp);泳道7、10为对照组C-myc mRNA;泳道2~12条带为GAPDH mRNA(136bp)。初诊MM组患者的C-myc扩增产物条带明显比对照组清晰。MM组患者中C-myc mRNA表达量为 0.605 ± 0.264 ;对照组C-myc mRNA表达量为 0.314 ± 0.035 ;两组间比较差异有显著性($P < 0.01$),见表2。

表2 C-myc mRNA 的表达量

分组	例数	阳性数(%)	C-myc mRNA 表达量	t 值	P 值
MM 组	22	14(63.6)	0.605 ± 0.264	3.086	0.004
对照组	10	2(20.0)	0.314 ± 0.035		

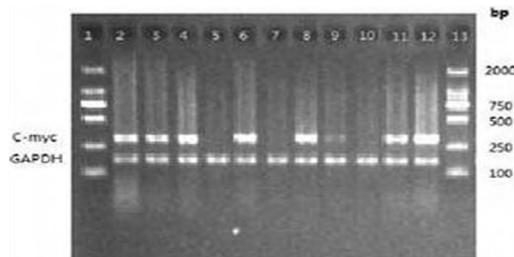


图2 C-myc mRNA RT-PCR 产物的条带

经SPSS软件分析,多发性骨髓瘤患者Pim-1 mRNA表达及C-myc RNA表达有显著正相关性,随着Pim-1 mRNA表达的上调C-myc mRNA的表达增强($r=0.577, P < 0.01$)。

2.2 Pim-1、C-myc mRNA 与 D-S 分期 入选本项研究的22位患者,按照D-S分期标准,Pim-1 mRNA表达量在Ⅲ期(0.803 ± 0.287)明显高于Ⅰ期或Ⅱ期($0.319 \pm 0.319; P < 0.05$),Pim-1 mRNA在B组(0.739 ± 0.392)和A组($0.682 \pm 0.356; P > 0.05$)的表达的差异无统计学意义。C-myc mRNA的表达在分期Ⅲ期患者中(0.694 ± 0.223)明显高于Ⅰ期或Ⅱ期组($0.302 \pm 0.136; P < 0.05$),C-myc mRNA在B组(0.598 ± 0.292)和A组($0.607 \pm 0.267; P > 0.05$)中表达的差异无统计学意义,见表3、4。

2.3 Pim-1 mRNA、C-myc mRNA 与临床指标的相关性分析 将MM常见指标Hb、白蛋白、 Ca^{2+} 、 β_2 -MG分别与Pim-1 mRNA和C-myc mRNA表达进行分析,分析结果见表5。经SPSS软件分析,Pim-1 mRNA与血清 β_2 -MG、 Ca^{2+} 呈正相关,与Hb呈负正相关,与白蛋白无直接相关性,而C-myc mRNA与血清 β_2 -MG呈正相关,与血红蛋白呈负相关,与其他各项指标无明显相关性。

表3 Pim-1 mRNA 表达量与患者的 D-S 分期、分组之间的关系

组别	例数	Pim-1 mRNA 表达量	t 值	P 值
分期				
Ⅰ或Ⅱ期	2	0.319 ± 0.319	-2.261	0.035
Ⅲ期	20	0.803 ± 0.287		
分组				
A 组	18	0.682 ± 0.356	0.555	0.585
B 组	4	0.739 ± 0.392		

表4 C-myc mRNA 表达量与患者的 D-S 分期、分组之间的关系

组别	例数	C-myc mRNA 表达量	t 值	P 值
分期				
Ⅰ或Ⅱ期	2	0.302 ± 0.136	2.408	0.026
Ⅲ期	20	0.694 ± 0.223		
分组				
A 组	18	0.607 ± 0.267	-0.060	0.953
B 组	4	0.598 ± 0.292		

表5 Pim-1 mRNA 和 C-myc 表达强度与临床指标的相关性

	临床指标	Hb	β_2 -MG	Alb	Ca^{2+}
Pim-1	相关系数(R)	-0.624	0.516	-0.199	0.609
	P 值	0.002	0.014	0.375	0.003
C-myc	相关系数(R)	-0.589	0.582	-0.180	0.398
	P 值	0.004	0.004	0.422	0.067

3 讨论

Pim最早是在研究莫罗尼鼠白血病前病毒诱导的淋巴瘤插入点时被发现的^[2],Pim-1是Pim家族的一个成员,它编码的蛋白是丝/苏氨酸激酶中的一种,主要涉及细胞周期的调节、蛋白质的转录与翻译、促凋亡、细胞代谢的调节及介导耐药蛋白的产生,与肿瘤的发生密切相关。人类的Pim-1位于染色体6p21.1~p21.31,大约有5000个碱基组成,包括6个外显子和5个内含子,Pim-1的启动子富含GC区而缺乏TATA和CAAT盒;作为一种原癌基因,它编码的蛋白具有丝/苏氨酸激酶活性,在多种血液系统肿瘤如白血病、T、B细胞淋巴瘤及多发性骨髓瘤细胞系中可有不同程度的表达^[3-5]。C-myc是一种多功能的原癌基因,位于人类染色体8q24上,其不仅具备转录因子的功能促进细胞增殖,还可以抑制细胞的分化、促进细胞周期的进展并抑制细胞的凋亡。已在小鼠浆细胞瘤和人类多发性骨髓瘤患者中也均发现C-myc的重排和过度表达,为预后不良的独立因素^[6]。

多种细胞因子如白介素家族、肿瘤坏死家族等可通过SATA3、SATA5等途径上调Pim-1和C-myc的表达^[7]。表达上调的Pim-1可以磷酸化促凋亡蛋白Bad S112位使其失活,阻止Bad蛋白与Bcl-2和Bcl-xl结合,间接增加Bcl-2、Bcl-xl的抗凋亡蛋白的活性导致肿瘤的发生^[8];同时通过STAT3介导的旁路增加Bcl-2和癌基因C-myc的合成,经Pim-1磷酸化后的C-myc,具有转录因子的活性从而促进骨髓瘤细胞增殖^[9]。多项研究表明^[10-11],Pim-1及C-myc两种原癌基因在T、B淋巴瘤、前列腺癌的发生过程中具有协同作用,且C-myc抑制剂10058-F4可同时降低C-myc和Pim-1的表达水平。本实验结果表明,初诊MM患者的Pim-1 mRNA和C-myc mRNA在初诊骨髓瘤患者表达强度显著高于对照组,且随着疾病的进展,在D-S分期中III期的表达明显高于I期或II期,但A组和B组中的分布无明显差异;且Pim-1 mRNA和C-myc mRNA的表达强度具有显著的正相关($r=0.577$, $P<0.01$),与文献报道基本相符。推测两者在多发骨髓瘤的发生发展中可能具有协同作用。此外,本研究还将Pim-1及C-myc的表达与MM患者血红蛋白、 Ca^{2+} 、 β_2 -MG、白蛋白等反应肿瘤负荷及预后的临床指标进行统计学分析。结果显示:Pim-1 mRNA与血清 β_2 -MG、 Ca^{2+} 呈正相关,与Hb呈负正相关,与白蛋白无直接相关性,而C-myc mRNA与血清 β_2 -MG呈正相关,与血红蛋白呈负相关,与其他各项指标无明显相关性。已有学者在套细胞淋巴瘤中发现Pim-1的高表达与患者的预后成负相关^[12],但目前仍不能确定Pim-1的表达可以作为MM独立的预后因素,这需要对大样本病例进行多因素回归分析来证实。

RANK/RANKL/OPG轴可影响破骨细胞的分化、发育和调节,在多发骨髓瘤骨病的发生发展中具有重要作用。而Kim等^[12]发现,Pim-1可通过激活NF- κ B和诱导钙调神经磷酸酶依赖的活化T细胞核因子1(nuclear factor of activated T cells, calcineurin-dependent 1, NFATc1)的表达调节RANKL诱导的破骨细胞生成。本实验结果初步显示Pim-1 mRNA与血清 Ca^{2+} 呈正相关,因此我们推测Pim-1是否参与多发骨髓瘤骨病的发生有待进一步

研究。

【参考文献】

- [1] 张建华,傅晋翔,张晓慧,等.破骨细胞在多发骨髓瘤发病中的作用[J].中华血液学杂志,2007,28(5):323-326.
- [2] Cuypers HT, Selten G, Quint W, et al. Murine leukemia virus-induced T-cell lymphomagenesis: integration of proviruses in a distinct chromosomal region[J]. Cell, 1984, 37(1):141-150.
- [3] Grundler R, Brault L, Gasser C, et al. Dissection of PIM serine/threonine kinases in FLT3-ITD-induced leukemogenesis reveals PIM1 as regulator of CXCL12-CXCR4-mediated homing and migration[J]. J Exp Med, 2009, 206(9):1957-1970.
- [4] 田荣华,应韶旭,李晓,等.PIM1表达与弥漫大B细胞淋巴瘤患者预后的关系[J].中国癌症杂志,2010,20(12):921-925.
- [5] HU Yulong, Passegue E, Fong S, et al. Evidence that the Pim1 kinase gene is a direct target of HOXA9[J]. Blood, 2007, 109:4732-4738.
- [6] 李大启,陈萍,邵建华,等.垂体瘤转化基因和C-myc基因在多发骨髓瘤中表达的研究[J].中国实验血液学杂志,2009,17(5):1238-1241.
- [7] Blanco-Aparicio C, Carnero A. Pim kinases in cancer: diagnostic, prognostic and treatment opportunities[J]. Biochem Pharmacol, 2013, 85(5):629-643.
- [8] Aho TL, Sandholm J, Peltola KJ, et al. Pim-1 kinase promotes inactivation of the pro-apoptotic Bad protein by phosphorylating it on the Ser112 gatekeeper site[J]. FEBS Lett, 2004, 571(1-3):43-49.
- [9] TIAN Ze, ZHAO Jianjun, Tai Yu-Tzu, et al. Investigational agent MLN9708/2238 targets tumor-suppressor miR33b in MM cells[J]. Blood, 2012, 120(19):3958-3967.
- [10] Möröy T, Verbeek S, MA A, et al. E mu Nand E mu L-myc cooperate with Emu pim-1 to generate lymphoid tumors at high frequency in double-transgenic mice[J]. Oncogene, 1991, 6(11):1941-1948.
- [11] Kim J, Roh M, Abdulkadir SA. Pim1 promotes human prostate cancer cell tumorigenicity and c-myc transcriptional activity[J]. BMC Cancer, 2010, 10:248.
- [12] Hsi ED, Jung SH, Lai R, et al. Ki67 and PIM1 expression predict outcome in mantle cell lymphoma treated with high dose therapy, stem cell transplantation and rituximab: a Cancer and Leukemia Group B 59909 correlative science study[J]. Leuk Lymphoma, 2008, 49(11):2081-2090.
- [13] Kim K, Kim JH, Youn BU, et al. Pim-1 Regulates RANKL-Induced Osteoclastogenesis via NF- κ B Activation and NFATc1 Induction[J]. J Immunol, 2010, 185(12):7460-7466.