

[文章编号] 1007-385X(2003)04-0268-04

食管癌中 AKT 和 PTEN 蛋白表达及其临床相关性研究

蒋虹¹, 徐志飞¹, 邱秀华², 曹惠芳², 唐亮²(1. 第二军医大学附属长征医院胸心外科, 上海 200003; 2. 第二军医大学附属东方肝胆外科医院国际合作生物信号转导研究中心, 上海 200438)

[摘要] 目的: 探讨食管癌组织中 AKT 和 PTEN 的表达及其临床相关性。方法: 应用 Western blot 和免疫组织化学方法检测 42 例食管癌组织及其癌旁组织中 AKT, PTEN 蛋白的表达情况。结果: 食管癌组织中, AKT 蛋白水平高于癌旁组织($P < 0.01$), PTEN 蛋白水平低于癌旁组织($P < 0.01$), 二者呈负线性相关($r = -0.583, P < 0.01$)。AKT 蛋白表达在 III_b-IV 期、低分化、有淋巴结转移的食管癌中的表达高于 II-III_a 期、高分化、无淋巴结转移的食管癌($P < 0.01$), 而 PTEN 则完全相反($P < 0.01$)。二者的表达均与年龄、性别、肿瘤大小无关($P > 0.05$)。结论: AKT 蛋白的高表达在食管癌的发生、发展起重要作用, 而 PTEN 则抑制这一作用过程。

[关键词] 食管癌; AKT 蛋白; PTEN 蛋白

[中图分类号] R735.1 [文献标识码] A

Expression of AKT and PTEN Protein and Their Relationship with Clinic Characteristics of Esophageal Carcinoma

JIANG Hong¹, XU zhi-fei¹, QIU Xiu-hua², CAO Hui-fang², TANG liang²(1. Department of Chest Surgery, Chang Zheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. International Co-Operation Laboratory on Signal Transduction, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of AKT and PTEN protein and their relationship with clinic characteristics of esophageal carcinoma. **Methods:** Expression of AKT and PTEN protein was examined by Western Blot and immunohistochemical method in the esophageal carcinoma and normal esophageal (control) tissue of 42 patients. **Results:** In tumor specimen, expression of AKT protein was increased as compared with control tissue($P < 0.01$), while PTEN protein was reduced compared with control tissue($P < 0.01$). A negative correlation was observed between AKT and PTEN($r = -0.583, P < 0.01$). Protein level of AKT was higher in III_b-IV stage patients with low differentiation and lymph node metastasis than those with II-III_a stage, high differentiation and no lymph node metastasis($P < 0.01$). However, PTEN protein level was entirely contrary. Both of them were not related with age, sex and size of tumor($P > 0.05$). **Conclusions:** The hyperexpression of AKT may play an important role in the initiation and development of human esophageal carcinoma, while PTEN inhibit this process.

[Key words] esophageal carcinoma; AKT protein; PTEN protein

* 丝/苏氨酸激酶(serine/threonine kinase AKT, 又名蛋白激酶 protein kinase B PKB)与 10 号染色体缺失张力蛋白磷酸酶(phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten, PTEN)都是生物信号传导途径中的重要分子, 它们和磷脂酰肌醇-3-羟基激酶(phosphatidylinositol-3-kinase PI3K)构成重要的信号传导 PI3K/AKT 通路。为探讨其在食管癌发生、发展中的意

义, 我们对 42 例食管癌患者手术切除标本中 AKT 及 PTEN 的表达情况进行了检测。

1 材料与方法

[作者简介] 蒋虹(1972-), 男, 江苏丹阳人, 博士研究生, 主要从事胸部肿瘤研究

1.1 临床资料

收集上海长征医院 2001 年 6 月 ~ 11 月食管癌手术切除标本 42 例,均经病理证实。每例标本于手术切除后下 30 min 内取癌组织及其周围正常食管组织(距肿瘤边缘 8 cm),立即冻存于液氮中。患者中男性 27 例,女性 15 例,年龄 42 ~ 73 岁,TNM 分期 II 期 8 例,III_a期 10 例,III_b期 13 例,IV 期 11 例。肿瘤直径 < 3 cm 者 12 例,3 ~ 5 cm 者 19 例,> 5 cm 者 11 例。髓质型 15 例,蕈伞型 8 例,溃疡型 10 例,缩窄型 9 例。淋巴结转移阳性 25 例,阴性 17 例。

1.2 组织总蛋白提取和浓度测定

切取液氮保存的食管癌配对标本(癌组织和癌旁正常组织)各约 100 mg,参考《分子克隆实验指南》方法,提取组织总蛋白;蛋白定量试剂盒(promega 公司产品)测定提取蛋白的浓度。

1.3 Western blot 分析测定

每例标本取总蛋白 50 μg,经 10% 聚丙烯凝胶电泳分离后电转移至醋酸纤维膜(Schleicher&Schuell 公司产品),封闭后加一抗(兔抗 AKT 或兔抗 PTEN,Cell Signaling 公司产品,1:1 000),4℃ 孵育过夜,加二抗(辣根过氧化物酶结合羊抗兔抗体,Sigma 公司产品,1:1 000),室温孵育 1 h,杂交后 ECL 显色,感光胶片显影。用密度扫描仪(ZEISS 全自动图象分析仪,VIDAS 数据分析)测定条带的吸光度值 A,计算每一例癌组织与正常组织的比值,以此来反映各患者 AKT 和 PTEN 蛋白表达水平的差异。

1.4 免疫组织化学方法测定

食管癌 5 μm 石蜡切片,微波修复抗原,分别与一抗、二抗反应。DAB 显色,苏木素复染。结果判定:以细胞浆出现明显棕黄色颗粒为阳性细胞,每张切片选 5 个高倍视野(400 ×),计算每个视野着色细胞百分率取均值,≥25% 定为阳性。

1.5 统计学分析

Western blot 结果用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验并对 AKT 和 PTEN 的表达水平进行 Pearson 相关性检验。免疫组化结果用百分率(%)表示,采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 Western blot 显示蛋白的表达水平及其相关性

42 例患者食管癌组织中 AKT 蛋白水平明显高于癌旁正常组织($P < 0.01$,表 1,图 1),约为正常组织的 1.51 倍。PTEN 蛋白的表达水平则相反,癌旁正常组织高于癌组织,前者为后者的 1.35 倍(表 1,图 2)。Pearson 相关性检验显示 PTEN 与 AKT 的表达水平呈

负相关($r = -0.583, P < 0.01$)。

表 1 AKT 和 PTEN 蛋白在 42 例食管癌患者中表达水平 Western blot 检测结果

Tab.1 The result of protein expressions of AKT and PTEN in 42 patients with esophageal carcinoma by Western blot

Proteins	A	P
AKT		
K	132158.6 ± 12503.2	<0.01
L	87253.2 ± 8195.9	
PTEN		
K	111453.6 ± 10150.3	<0.01
L	150458.8 ± 19560.7	

K: Esophageal carcinoma; L: Esophageal tissue

图 1 AKT 蛋白在食管癌中表达的 Western blot 结果
Fig.1 AKT protein's expression in esophageal carcinoma by Western blot

K: esophageal carcinoma; L: esophageal tissue

图 2 PTEN 蛋白在食管癌中表达的 Western blot 结果
Fig.2 The expression of PTEN protein in esophageal carcinoma by Western blot

K: Esophageal carcinoma; L: Esophageal tissue

2.2 免疫组化显示蛋白在组织中的分布及阳性表达情况

AKT 和 PTEN 蛋白主要分布在食管癌细胞和正常细胞的胞浆内。AKT 在 42 例癌组织中阳性率 85.7% (36/42),在正常组织中阳性率 33.3% (13/42),二者差异显著($P < 0.01$;表 2,图 3A,B);PTEN 在 42 例癌组织中阳性表达率 47.6% (20/42),正常组织中阳性率 100% (42/42),二者相差显著($P < 0.01$;表 2,图 3C,D)。

表 2 AKT 和 PTEN 蛋白在 42 例食管癌患者中表达免疫组化结果

Tab.2 The result of protein expressions of AKT and PTEN in 42 patients with esophageal carcinoma by immunohistochemical method

Proteins	Positive percentage(%)	P
AKT		
K	85.7(36/42)	<0.01
L	33.3(13/42)	
PTEN		
K	47.6(20/42)	<0.01
L	100.0(42/42)	

K: Esophageal carcinoma; L: Esophageal tissue

2.3 蛋白表达与各临床病理指标的关系

AKT 和 PTEN 蛋白的表达与食管癌的临床病理分期有明显的相关性,Ⅲ_b-IV 期食管癌组织中,AKT 蛋白表达水平高于Ⅱ-Ⅲ_a期,差异显著($P < 0.01$),而 PTEN 蛋白表达水平低于Ⅱ-Ⅲ_a期,差异显著($P < 0.01$)。二者的表达与是否淋巴结转移、分化程度高低有明显相关。在有淋巴结转移、分化程度低的食管癌 AKT 蛋白表达明显高于无淋巴结转移、分化程度高的($P < 0.01$),而 PTEN 则相反,亦呈显著差异($P < 0.01$)。二者的表达均与年龄、性别、肿瘤的大小无关($P > 0.05$)。

图 3 食管癌组织中 AKT 和 PTEN 蛋白的免疫组织化学检测结果

Fig.3 The result of immunohistochemical assay of AKT and PTEN protein in the esophageal carcinoma tissue

A AKT(+),B AKT(-),C PTEN(+),D PTEN(-)

3 讨论

肿瘤的发生、发展过程中生物分子信号的传导起到了重要的纽带作用。丝/苏氨酸激酶通路便是其中重要的一种,细胞外生长信号通过 PI3K 作用产生 PIP₃ (磷脂酰-3-磷酸肌醇),后者激活 AKT,从而启动一系列与细胞凋亡、细胞周期调控、端粒酶活性、血管生成、细胞侵袭迁移相关的程序^[14]。Lee 等^[5]发现肺癌中 AKT 被激活,磷酸化的 AKT 对非小细胞肺癌的发生进展起重要作用。Arboleda 等^[6]发现在乳腺癌、卵巢癌细胞中 AKT 可引起细胞的黏附、运动、侵袭、转。我们的研究结果显示了食管癌组织中 AKT 蛋白的表达水平高于癌旁正常组织,为 1.51 倍,提示 AKT 的高表达在食管癌的发生过程中起作用。实验还发现 AKT 蛋白的表达与食管癌的临床病理分期、淋巴结转移、分化程度相关,Ⅱ-Ⅲ_a期、无淋巴结转移、高分化食管癌

组织 AKT 蛋白表达低于Ⅲ_b-IV 期、有淋巴结转移、低分化食管癌,证实了 AKT 有促进食管癌细胞黏附、侵袭、转移的作用。

PTEN 是位于 10 号染色体的具有双重特异性磷酸酶活性的磷酸酶,它通过对 PIP₃ 位脱磷酸使之失活,从而拮抗 PI3K 上调 AKT 的作用^[7-8]。近年来大量文献报道了 PTEN 与前列腺癌、肺癌、乳腺癌、结肠癌、子宫癌、胶质细胞瘤等的发生有关,是继 p53, Rb 以来最有影响的抑癌基因^[9]。我们的结果显示 PTEN 蛋白阳性表达水平在食管癌组织中明显低于癌旁正常组织,Ⅱ-Ⅲ_a期、无淋巴结转移、高分化食管癌组织表达阳性水平高于Ⅲ_b-IV 期、有淋巴结转移、低分化癌组织,与 Tachibana 等^[10]的结论一致,提示了 PTEN 参与了负性调控食管癌的发生发展及浸润转移过程。

我们的结果显示了 AKT 和 PTEN 的蛋白表达水平呈负线形相关,表明了二者在食管癌组织中表达趋势

的相反性,提示了它们在调节食管细胞的基因转录与表达、促进细胞的增殖分化过程中的拮抗作用,也从而证实了 PI3K/AKT 通路被 PTEN 负性调控^[8]。总之, AKT 蛋白和 PTEN 蛋白表达水平的变化对食管癌的发生发展起到了重要的调节作用,对今后食管癌的预防、检测、治疗都有一定的价值。

[参考文献]

[1] Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: A play in three Akts[J]. *Genes Dev*, 1999, 13(22): 2905-2927.

[2] Muise Helmericks RC, Grimes HL, Bellacosa A, *et al.* Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt- dependent pathway[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(45): 29864-29872.

[3] Hurt KJ, Musicki B, Palese M, *et al.* Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase mediates penile erection [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(6): 4061-4066.

[4] Kim D, KlmS, Koh H, *et al.* Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production[J]. *FASEB*, 2001, 15(11): 1953-1962.

[5] Lee SH, Kim HS, Park WS, *et al.* Non-small cell lung cancers frequently express phosphorylated Akt; an immunohistochemical study[J]. *APMIS*, 2002, 110(7-8): 587-592.

[6] Arboleda MJ, Lyons JF, Kabbinavar FF, *et al.* Overexpression of AKT2/protein kinase B(beta) leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(1): 196-206.

[7] Waite KA, Eng C. Protein PTEN: Form and function[J]. *Am J Hum Genet*, 2002, 70(4): 829-844.

[8] Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphated[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(22): 13375-13378.

[9] Ali IU, Schriml LM, Dean M. Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: A tumor suppressor with lipid phosphatase activity. *J Natl Cancer Inst*, 1999, 91(22): 1922-1932.

[10] Tachibana M, Shibakita M, Ohno S, *et al.* Expression and prognostic significance of PTEN product protein in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer*, 2002, 94(7): 1955-1960.

[收稿日期] 2003 -07 -16 [修回日期] 2003 -08 -20

· 研究简报 ·

[文章编号] 1007-385X(2003)04-0268-01

肽聚糖对环磷酰胺杀瘤和免疫抑制的调节作用研究

马西艺, 乐国伟, 施用晖, 代 卉 (江南大学食品学院营养与生物技术室, 江苏 无锡 214036)

生物治疗与化疗药物联合应用被认为是肿瘤治疗发展的方向。为探讨乳酸杆菌肽聚糖作为新的生物反应调节剂在肿瘤生物治疗中与化疗药物联合应用的效果及可行性,本研究通过乳酸杆菌肽聚糖(PG)和环磷酰胺(Cy)对免疫细胞功能的影响及荷瘤实验,研究两者杀瘤的协同作用,探讨其可能的作用机理。

CT26 结肠癌细胞以 2.5×10^6 /ml, 接种于 40 只 BALB/c 小鼠左后肢腋下, 每只 0.2 ml, 分成 4 组, 隔日腹腔注射。空白对照组注射无菌 PBS; Cy 组注射无菌 PBS; 低剂量 PG + Cy 组注射 PG 0.1 mg; 高剂量 PG + Cy 组注射 PG 0.5 mg。最后 2 天, 除对照组外, 各实验组均按 80 mg/kg 体重腹腔连续注射环磷酰胺 2 次, 试期 20 d。末次注射 18 h 测定瘤体重、进行瘤细胞 DNA 凝胶电泳。结果表明, 对照组瘤体重量达(2.228 ± 0.204) g, Cy 组的瘤体重量为(1.553 ± 0.402) g, 抑瘤率仅为 30.3%; 而低剂量和高剂量 PG + Cy 组的瘤体重量分别为(1.179 ± 0.308) g 和(0.845 ± 0.246) g, 抑瘤率达 47.1% 和 62.1%, 且差异极显著($P \leq 0.01$), 显示 PG 可协同 Cy 抑制肿瘤的生长, 并发现其效应主要通过诱导瘤细胞的凋亡而实现。

另设对照组、Cy 组和 PG + Cy 3 组, 采用 YAC - 1、L929、CT26 细胞培养, 脾细胞 DNA 凝胶电泳和流式细胞分析等研究对免疫细胞活性的影响。腹腔注射环磷酰胺引起脾淋巴细胞数(2.030 ± 0.741) $\times 10^7$ 、腹腔巨噬细胞数(9.238 ± 2.239) $\times 10^6$ 、PM Φ 吞噬率(20.9 ± 3.2)% 和吞噬指数(1.06 ± 0.08)极显著下降($P \leq 0.01$), 并诱导脾淋巴细胞凋亡; 而乳杆菌肽聚糖则可对抗环磷酰胺诱导的这种免疫抑制作用, 使其分别上升到(4.601 ± 0.840) $\times 10^7$ 、(29.271 ± 4.743) $\times 10^6$, 吞噬率为(51.0 ± 3.0)% 和吞噬指数为(5.16 ± 0.25)。同时发现, 腹腔注射 Cy 可显著($P \leq 0.05$)抑制 CTL、PM Φ 和极显著($P \leq 0.01$)抑制 NK 细胞的杀伤活性, 产生显著的细胞免疫抑制。而 PG 和 Cy 联合使用则可拮抗 Cy 的这种免疫抑制, 这可能是 PG 协同 Cy 抑制肿瘤生长的机理之一。结论: 化疗即降低机体免疫细胞数量, 又抑制其功能。PG 与 Cy 联合应用不仅可协同抑制肿瘤的生长, 还可拮抗环磷酰胺对机体免疫细胞的毒副作用。

[关键词] 肽聚糖; 环磷酰胺; 肿瘤; 免疫抑制; 拮抗
[中图分类号] R73 - 36*1; R392.12 [文献标识码] D
[收稿日期] 2003 -09 -15 [修回日期] 2003 -11 -15