

[文章编号] 1007-385X(2006)06-0447-05

蛋白激酶 B 和 HIF-1 α 在胃癌中的表达及其临床意义

付金栋, 卢雪峰, 姜大磊, 高艳景, 季 锐, 许建民(山东大学 齐鲁医院消化科, 济南 250012)

[摘要] **目的:** 研究蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB)、缺氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor 1 α , HIF-1 α) 在胃癌中的表达及其临床意义。**方法:** RT-PCR 法检测 26 例胃癌及癌旁组织中 PKB1、PKB2、PKB3 及 HIF-1 α mRNA 表达, 免疫组化检测 64 例胃癌及 26 例癌旁组织中磷酸化蛋白激酶 B(phosphorylated PKB, pPKB) 蛋白和 HIF-1 α 蛋白的表达。**结果:** (1) 胃癌及相应癌旁正常组织中 PKB1、2、3 mRNA 的表达阳性率皆为 100%, 表达水平差异无显著性($P > 0.05$); 胃癌组织中 HIF-1 α mRNA 表达水平显著高于癌旁组织(1.36 ± 0.14 vs 0.54 ± 0.18 , $P < 0.05$)。(2) 胃癌组织中 pPKB、HIF-1 α 蛋白表达阳性率显著高于癌旁组织(χ^2 分别为 26.936、15.950, $P < 0.05$)。(3) 胃癌组织中 pPKB、HIF-1 α 蛋白表达率均与 TNM 分期、浸润深度、淋巴结转移、远处转移存在相关性($P < 0.05$)。**结论:** PKB 表达异常发生于翻译或翻译后水平; PKB、HIF-1 α 过表达于胃癌组织, 与胃癌细胞的增殖、凋亡和转移等密切相关。

[关键词] 缺氧诱导因子 1 α ; 蛋白激酶 B; 胃癌

[中图分类号] R735.2 [文献标识码] A

Expression of PKB and HIF-1 α in gastric cancer and its clinical significance

FU Jin-dong, LU Xue-feng, JIANG Da-lei, GAO Yan-jing, JI Rui, XU Jian-min (Department of Digestive Diseases, Qilu Hospital, Shandong University, Ji'nan 250012, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of protein kinase B(PKB) and hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) in gastric cancer and its clinical significance. **Methods:** RT-PCR was used to detect the expression of PKB1, PKB2, PKB3, and HIF-1 α mRNA in 26 patients with gastric cancer tissue samples and the corresponding para-cancer tissues. The expression of pPKB and HIF-1 α in 64 gastric carcinomas and 26 para-cancer tissue samples were evaluated by immunohistochemical methods. **Results:** (1) PKB1, PKB2, and PKB3 mRNA were positive in both gastric cancer and the corresponding adjacent normal tissues, with no significant difference($P > 0.05$). The expression of HIF-1 α mRNA in cancerous tissues was significantly higher than that in para-cancer tissues(1.36 ± 0.14 vs 0.54 ± 0.18 , $P < 0.05$). (2) The expression levels of pPKB and HIF-1 α proteins in cancerous tissues were higher than those in para-cancer tissues($\chi^2 = 26.936, 15.950$, $P < 0.05$). (3) The expression of pPKB and HIF-1 α were significantly associated with TNM stage, invasion depth, lymph node metastasis, and distant metastases($P < 0.05$). **Conclusion:** The abnormal expression of PKB is at the translation or post-translation level. PKB and HIF-1 α are overexpressed in gastric cancer tissues, which is correlated with cell proliferation, apoptosis, and metastasis of gastric cancer.

[Key words] hypoxia inducible factor-1 α ; protein kinase B(PKB); gastric cancer

[Chin J Cancer Biother, 2006, 13(6): 447-451]

蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB) 是一种在细胞的增殖、分化、存活和迁移过程中具有重要作用的蛋白激酶。PKB 可在 PI3K 的参与下生成磷酸化 PKB(phosphorylated PKB, pPKB) 而激活, pPKB 又进一步激活抗细胞凋亡机制、葡萄糖代谢及蛋白质合成等过程, 从而促进细胞的生长和增殖^[1]。缺氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor 1 α , HIF-1 α) 是机体维持氧自稳平衡的核心调控因子, 可调控一系列缺氧诱导基因的表达。缺氧以及非缺氧刺激可通过 PI3K/ PKB 相

关的途径诱导 HIF-1 α 的表达和活性^[2-3]。Kobayashi 等^[4]研究发现 PKB 过表达与胃癌的发生及侵袭密切相关, 但没有阐明具体的作用途径。HIF-1 α 在肺、前列腺、乳腺、结肠癌等多种肿瘤及局部和远处转移灶中过表达, 在癌前病变如结肠腺瘤、原位乳腺导管癌等中

[基金项目] 山东省卫生厅科技资助项目(2001CAICJB9)

[作者简介] 付金栋(1981-), 男, 山东省日照市人, 硕士研究生, 主要从事胃癌防治方面的研究

[通讯作者] 卢雪峰, E-mail: fjdice11@yahoo.com.cn

也有表达,但在大部分的正常组织中并无表达,说明 HIF-1 α 在肿瘤的形成及演变过程中发挥了重要的作用;Urano 等^[5] 研究证实各类胃黏膜病变中也存在 HIF-1 α 的表达,肠型胃癌及伴异型增生慢性萎缩性胃炎中 HIF-1 α 的阳性率显著高于慢性浅表性胃炎和伴肠化生慢性萎缩性胃炎。关于 HIF-1 α 与胃癌的发生及作用途径报道较少。本实验通过研究 PKB、pPKB、HIF-1 α 在胃癌中的表达,探讨 PKB、HIF-1 α 与胃癌发生的相关性。

1 材料与方法

1.1 研究对象与主要试剂

收集 2005 年 10 月至 2006 年 6 月于山东大学齐鲁医院胃镜室胃镜活检及普外科手术标本,其中手术 26 例取癌组织标本 26 份,癌旁组织标本 26 份;胃镜 38 例取癌组织 38 份,共计癌组织标本 64 份,癌旁组织标本 26 份。男性 44 例,女性 20 例,中位年龄 58.3 岁。所有患者术前皆未接受放、化疗治疗。标本置液氮中保存,取部分标本经 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,连续 4 μm 厚切片行组织病理学及免疫组化检查。

PKB1 引物序列(382),正义:5'-GCTGGACGAT-AGCTTGGA-3',反义:5'-GATGACAG ATAGCTGGTG-3';PKB2 引物序列(275),正义:5'-GGCCCCTG ATCA-GACTCTA-3',反义:5'-TCCTCAGTC GTGGAGGAGT-3';PKB 3 引物序列(328),正义:5'-GCAAGTGGAC GAGAATAAGTCTC-3',反义:5'-ACAATGCTGGGCT-CATGACTT CC-3'。HIF-1 α 引物序列(381),正义:5'-GACAACCACCTGAGGAGAG -3',反义:5'-GGCCTTAT-CAAGATG CGAAC-3'。 β -actin 引物序列(145),正义:5'-AGATCAAGATCATTGCTCCTCCTG-3',反义:5'-CATTTGCCG TGGACGATGGA-3'。PCR 引物及寡聚核苷酸(上海生物工程公司),Trizol 试剂(Invitrogen 公司),Trizol 试剂(Invitrogen 公司),兔抗人 pPKB 单克隆抗体(1:100,Cell Signaling 公司),小鼠抗人 HIF-1 α 单克隆抗体(1:50,Neomarkers 公司),通用型免疫组化试剂盒(北京晶美公司)。

1.2 RT-PCR 法检测 PKB1、PKB2、PKB3 及 HIF-1 α mRNA 的表达

取 26 份胃癌及癌旁组织生理盐水冲洗,按 Trizol 试剂说明书提取组织总 RNA,每份取总 RNA 4 μg ,Trizol 试剂逆转录合成 cDNA,PCR 扩增 PKB1、PKB2、PKB3、HIF-1 α ,同时扩增 β -actin 作为内参照,每个标本至少重复 3 遍。94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min 预变性后开始循环:94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,68 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,共 30 个循环,最后于 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳分

离。凝胶成像系统作密度指数分析,mRNA 相对表达量的判定:以各电泳条带密度指数与内参照 β -actin 密度指数之比来表示。

1.3 免疫组化检测 pPKB、HIF-1 α 蛋白表达

采用免疫组织化学过氧化物酶标记的链霉卵白素(S-P)法对 64 份胃癌标本及 26 份癌旁正常组织标本进行染色,光镜下以细胞质内棕黄色细颗粒为 pPKB 蛋白表达阳性;细胞核及胞质内棕黄色颗粒为 HIF-1 α 蛋白表达阳性。高倍镜下($\times 400$ 倍)对每张切片随机选择 5 个视野,每个视野计数 200 个细胞,共计 1 000 个。阳性细胞数 $< 10\%$ 为阴性(-),阳性细胞数 $\geq 10\%$ 为阳性(+)

1.4 统计学处理

应用 SPSS11.5 统计数据软件包行 χ^2 、 t 检验进行统计分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 PKB 三亚型和 HIF-1 α mRNA 在胃癌及癌旁组织中的表达

26 份胃癌及相应癌旁组织标本中 PKB1、PKB2、PKB3 mRNA 的表达阳性率皆为 100% (26/26),三者分别在胃癌及癌旁组织中的表达水平差异无显著性($P > 0.05$)。HIF-1 α mRNA 在癌组织及癌旁组织中的阳性表达率分别为 76.9% (20/26)、19.2% (5/26),差异有显著性($P < 0.05$)。HIF-1 α 在癌组织中的表达水平为 1.36 ± 0.14 ,癌旁组织中的表达水平为 0.54 ± 0.18 ,差异有显著性($t = 3.5959, P < 0.01$,图 1,表 1)。

2.2 胃癌及癌旁组织中 pPKB 和 HIF-1 α 蛋白的表达

pPKB、HIF-1 α 蛋白表达阳性细胞主要为肿瘤细胞,坏死边缘的瘤细胞阳性表达尤为强烈。胃癌组织 pPKB、HIF-1 α 表达的阳性率均显著高于癌旁组织($\chi^2 = 26.936, 15.950, P < 0.01$)。pPKB、HIF-1 α 表达的一致符合率为 36/64 (56.3%),($\chi^2 = 7.480, P < 0.01$,图 2,表 2)。

2.3 pPKB 和 HIF-1 α 蛋白表达与胃癌临床病理特征的关系

pPKB 蛋白阳性表达率与年龄、性别、肿瘤大小及病理分型无关;pPKB 蛋白阳性表达率与胃癌浸润深度($\chi^2 = 6.776, P < 0.05$)、TNM 分期($\chi^2 = 7.481, P < 0.01$)及有无淋巴结转移($\chi^2 = 9.267, P < 0.01$)及远处转移($\chi^2 = 4.912, P < 0.05$)显著相关。HIF-1 α 蛋白阳性表达率与年龄、性别、肿瘤大小及病理分型无关;HIF-1 α 蛋白阳性表达率与胃癌浸润深度($\chi^2 = 3.782, P < 0.05$)、TNM 分期($\chi^2 = 3.897, P < 0.05$)及有无淋巴结转移($\chi^2 = 6.448, P < 0.01$)及远处转移($\chi^2 =$

4.793, $P < 0.05$) 显著相关(表 3)。

3 讨论

PKB 基因有三种亚型, PKB1、PKB2 和 PKB3。近年来发现 PKB 活性异常不仅导致细胞恶性转化, 还与肿瘤细胞的侵袭转移行为相关, PI3K-pPKB 信号通路与人类肿瘤的发生发展密切相关。活化的 PKB 可磷

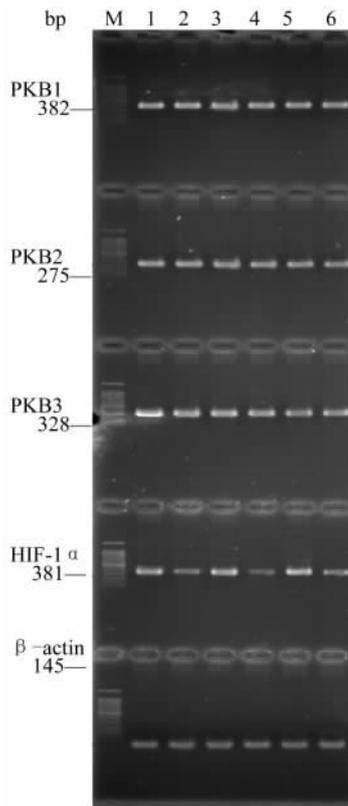


图 1 PKB1、PKB2、PKB3、HIF-1 α mRNA 在胃癌及癌旁组织中的表达

Fig. 1 Expression of PKB1, PKB2, PKB3, and HIF-1 α mRNA in gastric cancerous tissues and para-cancer tissues

1, 3, 5: Gastric cancer; 2, 4, 6: Para-cancer tissue

表 1 PKB 三亚型、HIF-1 α mRNA 在胃癌及癌旁组织的表达

Tab. 1 Expression of PKB1, PKB2, PKB3, and HIF-1 α mRNA in gastric cancer tissues and para-cancer tissues

Index	Cancer tissues	Para-cancer tissues
PKB1	1.67 \pm 0.11	1.62 \pm 0.13
PKB2	1.36 \pm 0.17	1.33 \pm 0.19
PKB3	1.31 \pm 0.16	1.30 \pm 0.14
HIF-1 α	1.36 \pm 0.14*	0.54 \pm 0.18

* $P < 0.05$ vs para-cancer tissues

表 2 pPKB 和 HIF-1 α 蛋白在胃癌及癌旁组织中的阳性表达率[n (%)]

Tab. 2 Expression of pPKB, HIF-1 α protein in gastric cancer tissues and para-cancer tissues[n (%)]

Groups	N	pPKB	HIF-1 α
Cancer tissues	64	48(75)**	42(65.6)**
Para-cancer tissues	26	10(15.4)	5(19.2)

** $P < 0.01$ vs para-cancer tissues

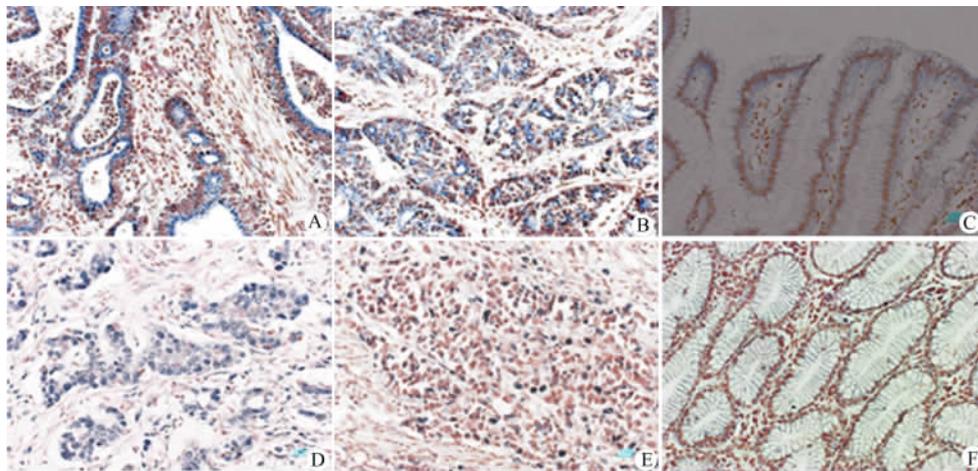


图 2 胃癌及癌旁组织 pPKB 和 HIF-1 α 蛋白的免疫组化检测(S-P 法, $\times 400$)

Fig. 2 Immunohistochemical analysis of pPKB, HIF-1 α expression in gastric cancer and para-cancer tissues(S-P, $\times 400$)

A: Expression of pPKB in well-differentiated gastric cancer tissues(+); B: Expression of pPKB in poor-differentiated gastric cancer tissues(+); C: Expression of pPKB in para-cancer tissues(-); D: Expression of HIF-1 α in well-differentiated gastric cancer tissues(+); E: Expression of HIF-1 α in poor-differentiated gastric cancer tissues(+);

F: Expression of HIF-1 α in para-cancer tissues(-)

表 3 pPKB、HIF-1 α 蛋白表达与胃癌临床病理特征的关系
Tab.3 Relationship between pPKB protein, HIF-1 α protein and clinicopathological characteristics of gastric cancer

Index	N	pPKB(n)		HIF-1 α (n)	
		+	-	+	-
Age(t/a)					
≥60	38	27	9	25	13
<60	26	19	7	17	9
Gender					
Male	44	33	11	29	15
Female	20	15	5	13	7
Tumor size(l/cm)					
≤5	35	25	10	23	12
>5	29	23	6	19	10
Histology					
Well/Moderate	47	34	13	32	15
Poor	17	14	3	10	7
Invasion depth					
T1/T2	30	18*	12	16*	14
T3/T4	34	30	4	26	8
TNM stage					
I + II	42	27*	15	24*	18
III + IV	22	21	1	18	4
Lymph node metastasis					
Absent	35	21**	14	19**	17
Present	29	27	2	23	5
Distant metastases					
Absent	49	33*	16	29*	20
Present	15	15	0	13	2

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compare between two index in the same group

酸化下游的酪氨酸和色氨酸残基,从而具有抑制细胞凋亡,促进细胞增殖、生长、运动和侵袭及血管生成等功能^[1,4]。缺氧不仅参与肿瘤血管形成,而且通过各种复杂的机制参与肿瘤细胞的各种生理活动,是肿瘤细胞生长、凋亡、转移和化疗耐受等的主要驱动力,在这一系列效应中起着关键作用的是 HIF-1 α 。PI3K/PKB可能是调控细胞内 HIF-1 α 表达和活化的一条重要信号途径^[6]。

Itoh 等^[7]研究发现在结肠癌细胞中 PKB 的表达与细胞的黏附、运动、侵袭、转移密切相关。Kobayashi 等^[8]在研究胃癌细胞时发现 PI3K-pPKB 信号通路阻断剂 LY294002 可明显抑制肿瘤细胞的生长,加速细胞的凋亡,且 HIF-1 α 的表达明显下降。在其他肿瘤如胰腺癌、甲状腺癌、大肠癌、卵巢癌和乳腺癌等也均发现 PKB 的过度活化,提示 PKB 在肿瘤细胞恶性行为中起重要的作用^[9-10,13]。本研究发现,PKB 三个亚型在胃癌和癌旁正常组织中的表达在基因水平无差异, HIF-1 α mRNA 则显著高于癌旁组织;胃癌中 pPKB、HIF-1 α 蛋白的阳性表达率显著高于癌旁组织,且两者的表达存在相关性,表明 PKB 的表达异常可能存在于翻译或翻译后水平。在胃癌的发生过程中 PI3K-pPKB 途径与 HIF-1 α 密切相关,PKB 的活化可促使 HIF-1 α 的活化及磷酸化,增加 HIF-1 α 的稳定性,激活下游的靶因子,从而导致肿瘤的发生。Malik 等^[11]研究显示 pPKB 与前列腺癌的发生及侵袭密切相关,与 Nam 等^[12]结果相同。本研究发现 pPKB、HIF-1 α 蛋白与肿瘤的浸润深度、TNM 分期、淋巴结转移及远处转移密切相关;与 Schlieman^[13]及 Chen^[14]结果相同。本实验发现癌旁组织中 pPKB 蛋白极少表达,且主要表达于癌旁肠上皮化生及不典型增生组织中,提示 pPKB、HIF-1 α 蛋白可能与胃癌的早期发生有关。

PKB、HIF-1 α 与胃癌的发生发展密切相关,PKB 可通过调节 HIF-1 α 的表达抑制细胞的凋亡,增强胃癌细胞的侵袭能力,促进胃癌的转移。通过 PKB 途径特异性阻断剂抑制 HIF-1 α 的表达,将对于胃癌的早期诊断和治疗提供重要的指导价值。

[参 考 文 献]

[1] Lee BL, Lee HS, Jung J, *et al.* Nuclear factor-kappaB activation correlates with better prognosis and Akt activation in human gastric cancer[J]. *Clin Cancer Res*,2005, 11(7): 2518-2525.

[2] Kasuno K, Takabuchi S, Fukuda K, *et al.* Nitric oxide induces hypoxia-inducible factor 1 activation that is dependent on MAPK and phosphatidylinositol 3-kinase signaling[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(4): 2550-2558.

[3] 张 琪. 缺氧诱导因子-1——肿瘤治疗的新靶点[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*,2003,10(4):298-300.

[4] Kobayashi I, Semba S, Matsuda Y, *et al.* Significance of Akt phosphorylation on tumor growth and vascular endothelial growth factor expression in human gastric carcinoma[J]. *Pathobiology*, 2006, 73(1): 8-17.

[5] Urano N, Fujiwara Y, Doki Y, *et al.* Overexpression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in gastric adenocarcinoma[J]. *Gastric Cancer*, 2006, 9(1): 44-49.

[6] Ruitter GA, Zerp SF, Bartelink H, *et al.* Anti-cancer alkyllysophospho- lipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway[J]. *Anticancer Drugs*, 2003, 14(2): 167-173.

- [7] Itoh N, Semba S, Ito M, *et al.* Phosphorylation of Akt/PKB is required for suppression of cancer cell apoptosis and tumor progression in human colorectal carcinoma[J]. *Cancer*, 2002, 94(12): 3127-3134.
- [8] Kobayashi I, Semba S, Matsuda Y, *et al.* Significance of Akt phosphorylation on tumor growth and vascular endothelial growth factor expression in human gastric carcinoma[J]. *Pathobiology*, 2006, 73(1): 8-17.
- [9] Kasuno K, Takabuchi S, Fukuda K, *et al.* Nitric oxide induces hypoxia-inducible factor 1 activation that is dependent on MAPK and phosphatidylinositol 3-kinase signaling[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(4): 2550-2558.
- [10] Schmitz KJ, Grabellus F, Callies R, *et al.* Relationship and prognostic significance of phospho-(serine 166)-murine double minute 2 and Akt activation in node-negative breast cancer with regard to p53 expression[J]. *Virchows Arch*, 2006, 448(1): 16-23.
- [11] Malik SN, Brattain M, Ghosh PM, *et al.* Immunohistochemical demonstration of phospho-Akt in high Gleason grade prostate cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(4): 1168-1171.
- [12] Nam SY, Lee HS, Jung GA, *et al.* Akt/PKB activation in gastric carcinomas correlates with clinicopathologic variables and prognosis [J]. *APMIS*, 2003, 111(12): 1105-1113.
- [13] Schlieman MG, Fahy BN, Ramsamooj R, *et al.* Incidence, mechanism and prognostic value of activated Akt in pancreas cancer[J]. *Br J Cancer*, 2003, 89(11): 2110-2115.
- [14] Chen WT, Huang CJ, Wu MT, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 α is associated with risk of aggressive behavior and tumor angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor[J]. *Jpn J Clin Oncol*. 2005, 35(4): 207-213.
- [收稿日期] 2006-09-22 [修回日期] 2006-10-20
[本文编辑] 郁晓路

· 简 讯 ·

肿瘤生物治疗国际研讨会暨第十届全国肿瘤生物治疗学术会议征文通知

由中国免疫学会肿瘤免疫和生物治疗分会和中国抗癌协会生物治疗专业委员会联合主办的“肿瘤生物治疗国际研讨会暨第十届全国肿瘤生物治疗学术会议”将于2007年11月在上海召开,诚邀国内各位专家与同行投稿和参加会议交流。会议期间将邀请肿瘤免疫学、免疫治疗和生物治疗领域的国内外著名专家介绍本领域新理论、新技术和应用现状以及发展趋势。

征文要求: 凡未在国内外公开刊物发表过的研究资料均可向会议投稿;本次会议采用网络投稿,请将800~1000字英文或中文摘要(小4字号,1.5倍行间距,A4页面1页)发送至会务联系人第二军医大学免疫学研究所内《中国肿瘤生物治疗杂志》编辑部韩丹(biotherapy2007@126.com;联系电话:021-55620605;传真:021-65382502)。来稿经专家评审后选择优秀论文作大会发言,所接受的论文摘要将录入会议文集。

征文主题:

1、肿瘤生物治疗(包括肿瘤免疫学)的新理论与新策略;2、肿瘤生物治疗的新技术;3、肿瘤生物治疗的临床应用与评价;4、细胞治疗(包括造血干细胞和骨髓移植);5、细胞因子治疗;6、抗体治疗;7、疫苗治疗;8、基因治疗;9、中药免疫调节治疗;10、与常规治疗相结合而组成的新疗法。

中国免疫学会肿瘤免疫和生物治疗分会
中国抗癌协会生物治疗专业委员会

第一届世界华人免疫学大会征文通知

The first World Chinese Conference on Immunology

由中国免疫学会主办、第二军医大学免疫学研究所承办,由第二军医大学曹雪涛、美国约翰霍普金斯大学医学院陈列平、美国MD安德森癌症中心刘勇军任共同主席的“第一届世界华人免疫学大会”(The first World Chinese Conference on Immunology)将于2007年7月12日-15日在上海召开,大会将邀请世界著名的免疫学家包括美国科学院院士、世界杰出华人免疫学家、国内著名免疫学学科带头人和免疫学实验室主任作专题报告,报告内容包括基础免疫学、临床免疫学和免疫学技术等领域的研究和应用新进展。大会将为从事免疫学研究的全球华人学者提供一个交流与合作的平台,为国内免疫学学者、学生提供及时了解免疫学国际前沿进展的机会。

征文要求: 凡未在国内外公开刊物发表过的研究资料均可向会议投稿;本次会议采用网络投稿,请将英文摘要(小4字号,1.5倍行间距,A4页面1页)发送至会务联系人第二军医大学免疫学研究所吴艳峰博士(immunology2007@126.com;联系电话:021-55620605;传真:021-65382502)。来稿经专家评审后选择优秀论文作会议发言,所接受的论文摘要将录入会议文集。

中国免疫学会