

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X·2008·06·014

· 临床研究 ·

磷酸化 mTOR 在胆囊癌中的表达及其临床意义

刘兆龙¹, 韩策然¹, 阎波^{1*}, 罗芸蓀¹, 王永兵¹, 宋安¹, 朱振亚¹, 于观贞²(1. 上海市浦东新区人民医院 普外科, 上海 201200; 2. 第二军医大学 长征医院 肿瘤科, 上海 200003)

[摘要] 目的: 探讨磷酸化雷帕霉素哺乳动物靶标(phosphorylate-mammalian target of rapamycin, p-mTOR)在人胆囊癌组织中的表达及其临床意义。方法: 应用组织芯片技术和免疫组织化学(EnVision)方法检测来自上海市浦东新区人民医院外科和第二军医大学长征医院肿瘤科2004-2007年间6例慢性胆囊炎、7例癌旁组织和59例胆囊癌组织中p-mTOR的表达, 并分析其与胆囊癌浸润深度、分化、Nevin分期等病理特征之间的相关性。结果: p-mTOR在慢性胆囊炎组织、癌旁组织和癌组织中表达的阳性率分别为0.0和47.5%, 表达差异有统计学意义($P < 0.01$)。p-mTOR在分化高、中和低/未分化的胆囊癌组织中阳性表达率分别为21.4%、48.1%和66.7% ($P < 0.01$); 在浸润至黏膜层/肌层、浆膜层和周围组织的胆囊癌组织中, p-mTOR的阳性表达率分别为30.0%、35.7%和71.4% ($P < 0.01$); p-mTOR在I/II期、III/IV期和V期胆囊癌组织中的阳性表达率分别为11.1%、46.4%和66.7%, 呈明显上升趋势($P < 0.01$)。结论: p-mTOR的表达与人胆囊癌的浸润深度、组织分化和Nevin分期密切相关, p-mTOR可能参与人胆囊癌的发生发展过程。

[关键词] 磷酸化雷帕霉素哺乳动物靶标; 胆囊癌; 组织芯片

[中图分类号] R735.8; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2008)06-0571-04

Expression of activated mTOR in gallbladder carcinoma tissue and its clinical significance

LIU Zhao-long¹, HAN Ce-ran¹, YAN Bo^{1*}, LUO Yun-bao¹, WANG Yong-bing¹, SONG An¹, ZHU Zhen-ya¹, YU Guan-zhen²(1. Department of General Surgery, People's Hospital of Pudong New Area, Shanghai 201200, China; 2. Department of Oncology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of phosphorylate-mammalian target of rapamycin, p-mTOR, in human gallbladder carcinoma and its clinical significance. **Methods:** Six chronic cholecystitis tissues, 7 adjacent gallbladder carcinoma tissues and 59 gallbladder carcinoma tissues, obtained from Department of General Surgery, People's Hospital of Pudong New Area and Department of Oncology of Changzheng Hospital from 2004 to 2007, were evaluated by immunohistochemistry and tissue microarray for p-mTOR expression. The correlations among p-mTOR expression with gallbladder carcinoma invasion, differentiation and Nevin stage were analyzed. **Results:** The positive rates of p-mTOR in chronic cholevstitis, adjacent-neoplastic gallbladder carcinoma and gallbladder carcinoma tissue were 0, 0 and 47.5%, respectively ($P < 0.01$). The positive rates of p-mTOR in with well-, moderately- and poorly-differentiated gallbladder carcinoma tissues were 21.4%, 48.1% and 66.7%, respectively; there were a significant differences among the three groups ($P < 0.01$). The positive rates in gallbladder carcinoma tissue with mucosa and muscle invasion, serous membrane invasion and peripheral tissue invasion were 30%, 35.7% and 71.40%, respectively ($P < 0.01$). The positive rates in I/II, III/IV and V stage gallbladder carcinoma tissues were 11.1%, 46.4% and 66.7%, respectively, showing a significant increasing trend ($P < 0.01$). **Conclusion:** The expression of p-mTOR is closely related with low differentiation, invasion and clinical stage (Nevin stage) of gallbladder carcinoma and may participate in the development and progression of gallbladder carcinoma.

[Key words] phosphorylate mammalian target of rapamycin (p-mTOR); gallbladder neoplasms; tissue microarray

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(6): 571-574]

[作者简介] 刘兆龙(1976-),男,上海市人,硕士,主治医师,主要从事肿瘤分子生物学方面的研究;韩策然(1959-),男,上海市人,医学学士,主任医师,主要从事肝胆外科微创外科临床与基础研究。两者同为第一作者

* Corresponding author. E-mail: bo_yan@smmail.cn

胆囊癌是胆道系统常见的恶性肿瘤,恶性程度和病死率较高;缺乏早期症状,早期诊断较困难;易发生早期转移,一旦发现多为晚期,丧失了手术切除时机。化疗是胆囊癌重要的辅助治疗手段,目前临床用于治疗胆囊癌的化疗药物主要包括:丝裂霉素、5-FU、吉西他滨、铂类药物等。但人们发现胆囊癌对这些化疗药物的敏感性仅为 10%~24%,致使胆囊癌患者预后不良,其 1 年生存率不及 20%。化疗药物的低敏感性是胆囊癌患者生存率较低的重要原因。目前靶向治疗成为人们治疗肿瘤的热点,因此,寻找肿瘤分子标记物为临床诊断和治疗胆囊癌提供了新的策略。雷帕霉素哺乳动物靶标(mammalian target of rapamycin, mTOR)磷酸化酶,简称 mTOR 磷酸化酶,是新近发现的一个重要靶点。该基因介导的通路在多种肿瘤中高度激活,调控细胞增殖、凋亡、转录、翻译、代谢等重要的生物学过程^[1],抑制该信号通路已成为肿瘤预防和靶向治疗热点。然而, mTOR 的活化形式即磷酸化 mTOR (phosphorylate-mTOR, p-mTOR)与胆囊癌之间的关系少见报道。本研究探讨 p-mTOR 在胆囊癌中的表达及其与临床病理参数的关系,旨在为临床诊断和治疗胆囊癌提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 组织标本的收集和试剂

收集上海市浦东新区人民医院外科及第二军医大学长征医院肿瘤科 2004-2007 年存档的 59 例胆囊癌石蜡标本,男性 21 例(35.6%),女性 38 例(64.4%)。其中,60 岁以下 21 例(35.6%),60 岁及 60 岁以上 38 例(64.4%),平均年龄(64.9 ± 5.4)岁。病理诊断结果经两名以上病理医师确认。随机选取其中 7 例癌旁组织(离胆囊癌边缘 0.5 cm 以上)、另取 6 例慢性胆囊炎标本(上海第二军医大学尸检标本)为对照标本。

抗 p-mTOR 抗体购自美国 CST 公司(dilution, 1:100; clone49F9)。EnVision 免疫组织化学试剂盒购自丹麦 Dako 公司。

1.2 组织芯片的制备

首先根据苏木精-伊红(H-E)染色切片选取存档组织蜡块,然后在 H-E 染色切片上进行定位,选取具有代表性的慢性胆囊炎、癌旁、癌组织位点共 137 个(慢性胆囊炎 12 个,癌旁 7 个,癌组织 118 个)。应用组织芯片构建仪(Beecher Instruments, Sliver Spring, MD),取样针直径 1.5 mm,点间间距为 0.5 mm,制作成组织芯片蜡块,以 4 m 厚度连续切

片,贴附于 1% 多聚赖氨酸处理的载玻片上,取一张进行 H-E 染色供形态学观察^[2]。

1.3 p-mTOR 免疫组织化学染色

石蜡切片经柠檬酸高温修复,将切片放入有枸橼酸缓冲液(pH=6.0)的容器中,置微波炉中加热,温度在 92~97℃,10 min 后取出,自然冷却到室温。加内源性过氧化酶阻断剂,在 35℃ 的恒温箱孵育 10 min;正常动物非免疫血清,在 35℃ 的恒温箱孵育 10 min;加第一抗体,在 4℃ 冰箱中过夜,PBS 替代一抗作阴性对照。加生物素标记的第二抗体,在 35℃ 的恒温箱孵育 10 min;加链亲和素-一过氧化酶溶液,在 35℃ 的恒温箱孵育 10 min;DAB 溶液显色,苏木精复染,透明,封片。

1.4 免疫组化染色结果判定标准

p-mTOR 定位于细胞质和(或)细胞核,阳性染色为淡黄色、棕黄色或棕褐色。采用二级计分法:根据阳性细胞所占 5 个以上高倍镜视野比例计数:<5% 为 0 分;5%~25% 为 1 分;26%~50% 为 2 分;>50% 为 3 分。染色强度分类:淡黄色为 1 分;黄或深黄色为 2 分;褐或棕褐色为 3 分。两者计分相乘大于 1 分为阳性。

1.5 统计学处理

采用 SPSS11.0 软件, χ^2 检验和 Fisher 确切概率法分析。 $P \leq 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 组织芯片的成功制备

成功制备胆囊癌组织芯片(H-E 染色),含 133 个位点,共有 4 个点组织脱落,用普通切片补充,其余位点组织结构保存良好。

2.2 p-mTOR 在慢性胆囊炎、胆囊癌旁和胆囊癌组织中的表达

p-mTOR 阳性染色主要定位于细胞质,部分位于细胞核,阳性染色呈淡黄色、棕黄色或棕褐色,在肿瘤组织中呈弥漫或片状分布(图 1)。在 6 例慢性胆囊炎和 7 例癌旁组织中 p-mTOR 表达缺失。在 59 例胆囊癌组织 p-mTOR 阳性表达率为 47.5%(28/59),p-mTOR 在胆囊癌组织与慢性胆囊炎、胆囊癌相应的癌旁组织中表达的差异有显著统计学意义($P < 0.01$,表 1)。

2.3 胆囊癌组织 p-mTOR 表达与临床病理参数的关系

分析胆囊癌 p-mTOR 的表达与临床病例特征之间的关系(表 2)发现,p-mTOR 表达与患者的性别和年龄无关($P > 0.05$),而与胆囊癌的浸润深度、组

组织分化和 Nevin 分期密切相关 ($P < 0.05$)。p-mTOR 在分化高、中和低/未分化的胆囊癌组织中阳性表达率分别为 21.4% (3/14)、48.1% (13/27) 和 66.7% (12/18), 提示 p-mTOR 的表达与分化程度呈负相关 ($P < 0.01$); 在浸润至黏膜层/肌层、浆膜层和周围组织的胆囊癌组织中, p-mTOR 的阳性表达率分别为 30% (3/10)、35.7% (10/28) 和 71.40% (15/21), 提示 p-mTOR 的表达与胆囊癌浸润程度正相关 ($P < 0.01$); p-mTOR 在 I/II 期、III/IV 期和 V 期胆囊癌组织中的阳性表达率分别为 11.1% (1/9)、46.4% (13/28) 和 66.7% (14/21), 呈明显上升趋势 ($P < 0.01$)。

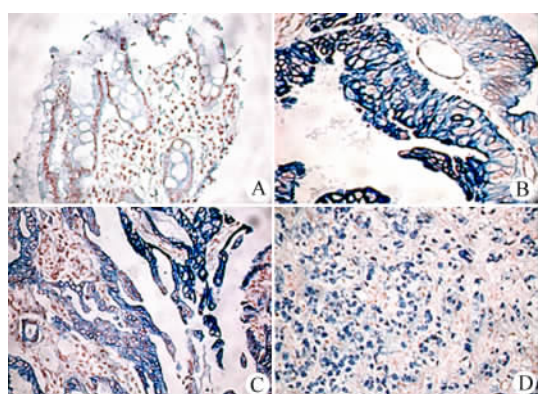


图 1 正常胆囊组织、胆囊癌组织中 p-mTOR 的表达 ($\times 200$)

Fig. 1 Expression of p-mTOR in normal gallbladder and gallbladder carcinoma tissue by immunohistochemistry ($\times 200$)

A: Normal gallbladder tissue; B: Well-differentiated gallbladder carcinoma tissue; C: Moderately-differentiated gallbladder carcinoma tissue; D: Poorly-differentiated gallbladder carcinoma tissue

表 1 胆囊癌、癌旁和慢性胆囊炎组织中 p-mTOR 的阳性表达

Tab. 1 Expression of p-mTOR in gallbladder carcinoma, adjacent gallbladder and chronic cholecystitis tissue

Group	Case	Positive expression [n (%)]
Chronic cholecystitis	6	0(0)
Adjacent tissue	7	0(0)
Gallbladder carcinoma	59	28(47.5)**

** $P < 0.01$ vs chronic cholecystitis or adjacent tissue

3 讨论

胆囊癌为胆道最常见恶性肿瘤,以腺癌为主。随着胆囊炎、胆囊结石发病率的上升,胆囊癌的发病率也在逐渐增加,但致病原因目前尚不清楚。多种信号

通路参与了肿瘤的发生发展,PI3K/Akt 是细胞生长的重要信号, Akt 可通过 mTOR、P21Cip1/WAF1、GSK3、TSC2、Foxo 家族等多种作用底物,促进肿瘤细胞的生长、细胞侵袭和转移,抵抗化疗和放疗中细胞的凋亡^[3,4]。mTOR 信号通路与肿瘤的发生发展密切相关,在肝癌、直肠和结肠癌、前列腺癌、子宫内膜癌、甲状腺癌、肾上腺髓质瘤组织中呈现高表达^[5,6],利用 mTOR 抑制剂可显著抑制肿瘤细胞株的生长^[7]。但目前关于 mTOR 与胆囊癌的关系少见报道。本研究选取信号通路中的核心分子 p-mTOR,利用免疫组化和组织芯片技术观察 p-mTOR 在胆囊癌中的表达,以探讨其与临床病理参数的关系。

表 2 胆囊癌组织 p-mTOR 阳性表达与临床病理参数的关系

Tab. 2 Relationship between p-mTOR expression and clinicopathological characteristics of 59 patients with gallbladder carcinoma

Characteristics	Case	Positive expression [n (%)]	P
Gender			
Male	21	10(47.6)	
Female	38	18(47.4)	
Age			
<60	21	11(52.4)	
≥ 60	38	17(44.7)	
Differentiation			
Well	14	3(21.4)	<0.01
Moderate	27	13(48.1)	
Poor	18	12(66.7)	
Invasion depth			
Mucosa, muscle	10	3(30.0)	<0.01
Serous membrane	28	10(35.7)	
Peripheral tissue	21	15(71.4)	
Nevin stages			
I, II	9	1(11.1)	<0.01
III, IV	28	13(46.4)	
V	21	14(66.7)	

mTOR 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,属于磷酸肌醇激酶族成员,相对分子质量 289 000,含 2 549 个氨基酸,由 PI3K/Akt 信号通路活化,继而磷酸化

下游的 p70s6k 和 4E-BP1,调控蛋白转录和细胞增殖^[8-10]。mTOR 的活化形式为磷酸化 mTOR(p-mTOR)。以往研究发现,不同恶性肿瘤组织中 p-mTOR 的阳性表达率不同,在肝癌中为 15%,而在胃癌中高达 60%^[11]。Faried 等^[12]发现 p-mTOR 是子宫颈癌的一个重要的预后指标,是治疗子宫颈癌的重要靶标。Herberger 等^[13]同样发现,p-mTOR 是胆道肿瘤的一种预后指标,p-mTOR 阳性的肿瘤患者比阴性的患者生存期明显缩短。这说明 p-mTOR 的表达与否与肿瘤患者的预后和对靶向治疗的敏感性密切相关。本研究发现,p-mTOR 在胆囊癌中的阳性表达率为 47.5%,而在非肿瘤组织中表达呈缺失状态,提示 mTOR 的活化状态(p-mTOR)在胆囊癌的发生过程中起了非常重要的作用。进一步分析显示 p-mTOR 的表达随浸润深度的增加和肿瘤进展逐步增加,表明 p-mTOR 的过度表达同样与肿瘤的进展高度相关。上述结果提示 p-mTOR 在胆囊癌发生发展过程中发挥了极其重要的作用。

去分化是癌细胞恶性程度的重要标志。分化程度越差预示恶性程度高、耐药的可能性大以及预后不良。Boone 等^[14]发现 p-mTOR 的表达与食管鳞状细胞癌分化程度相关,与食管鳞状细胞癌不良预后有关。本研究显示随着分化程度下降,p-mTOR 的表达率呈上升趋势,而且高、中以及低和未分化之间差别具有统计学意义。该项数据再次表明 p-mTOR 是判断胆囊癌恶性程度的一项重要指标,预示不良转归。

本研究证实 p-mTOR 在胆囊癌的发生发展中起到极其重要的作用,可能成为胆囊癌诊断和预后的重要指标,其过表达预示着胆囊癌患者的恶性程度和不良转归。此外,本研究进一步为研制 mTOR 抑制剂应用于胆囊癌的临床治疗提供了实验依据。

[参 考 文 献]

[1] Kwon YS, Hong HS, Kim JC, *et al.* Inhibitory effect of rapamycin on corneal neovascularization *in vitro* and *in vivo*[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(2): 454-460.
 [2] Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, *et al.* Tissue microarrays

for high-throughput molecular profiling of tumor specimens [J]. Nat Med, 1998, 4(7): 844-847.
 [3] Shinohara M, Chung YJ, Saji M, *et al.* Akt in thyroid tumorigenesis and progression [J]. Endocrinology, 2007, 148 (3): 942-947.
 [4] 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.
 [5] Pantuck AJ, Seligson DB, Klatt T, *et al.* Prognostic relevance of the mTOR pathway in renal cell carcinoma; implications for molecular patient selection for targeted therapy [J]. Cancer, 2007, 109 (11):2257-2267.
 [6] Sieghart W, Fuereder T, Schmid K, *et al.* Mammalian target of rapamycin pathway activity in hepatocellular carcinomas of patients undergoing liver transplantation [J]. Transplantation, 2007, 83 (4):425- 432.
 [7] Yang Q, Guan KL. Expanding mTOR signaling [J]. Cell Res, 2007, 17(8): 666-681.
 [8] Law BK. Rapamycin: an anti-cancer immunosuppressant[J]? Crit Rev Oncol Hematol, 2005, 56(1): 47-60.
 [9] Sandsmark DK, Pelletier C, Weber JD, *et al.* Mammalian target of rapamycin: master regulator of cell growth in the nervous system [J]. Histol Histopathol, 2007, 22(8): 895-903.
 [10] Tee AR, Blenis J. mTOR, translational control and human disease [J]. Semin Cell Dev Biol, 2005, 16(1): 29-37.
 [11] Lang SA, Gaumann A, Koehl GE, *et al.* Mammalian target of rapamycin is activated in human gastric cancer and serves as a target for therapy in an experimental model [J]. Int J Cancer, 2007, 120(8): 1803-1810.
 [12] Faried LS, Faried A, Kanuma T, *et al.* Expression of an activated mammalian target of rapamycin in adenocarcinoma of the cervix: a potential biomarker and molecular target therapy [J]. Mol Carcinog, 2008, 47(6): 446-457.
 [13] Herberger B, Puhalla H, Lehnert M, *et al.* Activated mammalian target of rapamycin is an adverse prognostic factor in patients with biliary tract adenocarcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13 (16): 4795-4799.
 [14] Boone J, Ten Kate FJ, Offerhaus GJ, *et al.* mTOR in squamous cell carcinoma of the oesophagus: a potential target for molecular therapy [J]? J Clin Pathol, 2008, 61(8): 909-913.

[收稿日期] 2008 - 08 - 23 [修回日期] 2008 - 10 - 10
 [本文编辑] 王 莹

