

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.05.015

· 临床研究 ·

食管癌组织 P110 α 和 pAKT 蛋白的表达及其临床意义

王卫峰¹, 何靖康¹, 秦正红², 王进², 鄒君超², 韩蓉² (1. 苏州大学附属第一医院胸外科, 江苏苏州 215006; 2. 苏州大学衰老与神经疾病实验室, 江苏苏州 215006)

[摘要] **目的:**探讨食管癌组织中 P110 α 、pAKT 的表达与食管癌临床病理特征之间的关系。**方法:**收集 2010 年 5 月至 2011 年 5 月苏州大学附属第一医院 76 例患者的食管癌组织标本, 25 例正常对照食管黏膜组织标本来自解放军第 101 医院病理科。免疫组织化学 SP 法检测食管癌及正常食管黏膜组织中 P110 α 及 pAKT 的表达水平。**结果:**76 例食管癌组织 pAKT 表达阳性率为 72.4% (55/76)、P110 α 表达阳性率为 57.9% (44/76), 均明显高于对照组 ($P_{\text{pAKT}} = 0.001, P_{\text{P110}\alpha} = 0.025$)。食管癌组织中 pAKT、P110 α 的高表达与食管癌淋巴结转移相关 ($P_{\text{pAKT}} = 0.017, P_{\text{P110}\alpha} = 0.009$), 与其他临床病理特征无关。食管癌组织中 pAKT 与 P110 α 双阳性率为 52.6% (40/76), 两者的表达呈正相关 ($r = 0.486, P = 0.001$)。**结论:**食管癌组织中 P110 α 、pAKT 表达与淋巴结转移相关, 有可能成为临床检测食管癌淋巴结转移的生物指标。

[关键词] 食管癌; P110 α ; pAKT; 免疫组织化学

[中图分类号] R735.1; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)05-0539-04

Expressions of P110 α and pAKT proteins in esophageal carcinoma tissues and their clinical significance

WANG Wei-feng¹, HE Jing-kang¹, QIN Zheng-hong², WANG Jin², WU Jun-chao², HAN Rong² (1. Department of Chest Surgery, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu, China; 2. Laboratory of Aging and Nervous Diseases, Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the relationship between the expression levels of P110 α and pAKT in esophageal carcinoma (EC) tissues with clinical features of EC. **Methods:** EC tissues from 76 patients and esophageal tissues from 25 normal controls were collected from the Department of Pathology, No. 101 Hospital of PLA during May 2010 to May 2011. The expression levels of P110 α and pAKT in EC and normal esophageal tissues were detected by SP immunohistochemistry. **Results:** The positive rates of pAKT and P110 α in the EC group were 72.4% (55/76) and 57.9% (44/76), respectively, which were significantly higher than those in the control group ($P_{\text{pAKT}} = 0.001, P_{\text{P110}\alpha} = 0.025$). The high level of protein expressions of pAKT and P110 α were correlated with lymph node metastasis of EC ($P_{\text{pAKT}} = 0.017, P_{\text{P110}\alpha} = 0.009$). However, no correlation was found with other clinical pathological features. The double positive rate of pAKT and P110 α expression in EC was 52.6% (40/76). The expression of pAKT was found in a positive correlation with P110 α ($r = 0.486, P = 0.001$). **Conclusion:** P110 α and pAKT expressions in EC are correlated with lymph node metastasis, and P110 α and pAKT might be used as markers of lymph node metastasis in EC.

[Key words] esophageal carcinoma; P110 α ; pAKT; immunohistochemistry

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(5): 539-542]

[基金项目] 江苏省“六大人才高峰”项目资助 (No. 200967)。Project supported by the “Six Talent Peaks” Project of Jiangsu Province (No. 200967)

[作者简介] 王卫峰 (1979 -), 男, 湖南省沅江市人, 硕士, 主治医师。主要从事食管肿瘤的临床及基因治疗方向的研究。E-mail: carzydoctor-wang@gmail.com

[通信作者] 何靖康 (HE Jing-kang, corresponding author), E-mail: jkhe001@163.com

食管癌是消化系统的常见肿瘤,我国食管癌的病死率居世界首位。虽然近年随着诊疗水平的提高,食管癌患者的病死率有所下降,但其发病率和病死率仍然维持着水平。PI3K/AKT 通路是目前研究较多的重要信号通路之一,其在细胞生长、凋亡、骨架重构等方面都起着重要的作用^[1],不仅如此,该通路还在多种肿瘤发生、发展中发挥重要作用。由癌基因 *PIK3CA* 编码的蛋白 P110 α 是该通路中 PI3K 的催化亚单位^[1], AKT 是通路下游靶分子,在通路调节下磷酸化而活化并产生后续生物效应, P110 α 和磷酸化 AKT 表达的增高均可提示通路处于活化状态。所以,本研究检测食管癌 P110 α 和 pAKT 的表达水平作为体现 PI3K/AKT 通路活化的标志,并结合临床病理特征,探讨其相互关系。

1 材料与方法

1.1 标本及主要试剂

本实验所用 76 例新鲜食管癌组织标本取自 2010 年 5 月至 2011 年 5 月苏州大学附属第一医院心胸外科行手术治疗的患者,手术取下标本后 10 min 内取样。标本随即放入液氮中保存,此后转移至 -80°C 超低温冰箱保存。所有患者术前均未进行放疗或化疗,并经术后病理学确诊,有完整的临床资料,主要包括有无淋巴结转移、肿瘤浸润深度和有无远处转移等。25 例石蜡包埋正常食管组织标本由解放军第 101 医院病理科提供。

P110 α 单克隆抗体[PI3 Kinase p110 α (C73F8) Rabbit mAb #4249], pAKT 单克隆抗体[Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP[®] Rabbit mAb #4060]为美国 Cell Signaling Technology 公司产品,国产羊抗鼠兔通用抗体为太阳公司产品,SP 试剂盒、DAB 显色剂均为美国 Zymed 公司产品。

1.2 免疫组化方法测定石蜡组织测定 pAKT 水平及 P110 α 水平

采用免疫组化 SP 法常规操作技术,用 PBS 代替一抗作为阴性对照,已知的阳性标本作为阳性对照。pAKT、P110 α 一抗工作液稀释液分别为 1:50 和 1:400。

pAKT 染色评分采用 T-J Kim 等^[2]所采用的标准:0,无染色;+,小于 50% 面积染色,不论强弱;++,大于或等于 50% 弱染色;+++ ,大于或等于 50% 强染色。评分为 0 及 + 的,作为阴性表达计;染色评分为 ++ 及 +++ 的作为阳性表达计。P110 α 阳性判断参考

Massion 等^[3]方法:每张切片随机观察 10 个高倍视野($\times 100$),计数阳性细胞,并取平均值;按阳性细胞占总细胞数的百分比分为 4 级:0,阳性细胞数少于 5%;+,阳性细胞数 5% ~ 20%;++,阳性细胞数 20% ~ 35%;+++ ,阳性细胞数大于 35%。染色评分为 0 及 + 的,作为阴性表达计;染色评分为 ++ 及 +++ 的,作为阳性表达计。

1.3 统计学处理

采用 SPSS18.0 软件分析,计数资料用卡方检验和 Fisher 确切检验法,相关分析采用卡方相关分析及 Spearman 相关分析,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 pAKT 和 P110 α 在食管癌组织中的表达

对 76 例食管癌石蜡标本及 25 例对照组石蜡标本切片染色,逐一观察,结果(图 1)可见,阳性细胞染色呈黄色至棕褐色, pAKT 及 P110 α 阳性着色部位均主要位于细胞质内。76 例食管癌 pAKT 表达阳性率为 72.4% (55/76), P110 α 表达阳性率为 57.9% (44/76),明显高于对照组阳性率($P_{\text{pAKT}} = 0.001, P_{\text{P110}\alpha} = 0.025$)。pAKT 与 P110 α 双阳性率为 52.6% (40/76),两者的高表达具有一致性($r = 0.486, P = 0.001$)。

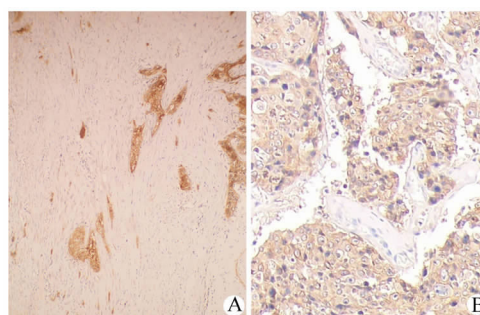


图 1 pAKT (A)、P110 α (B)在食管癌组织中的表达(SP, $\times 100$)
Fig.1 Expressions of pAKT (A) and P110 α (B) in esophageal carcinoma tissues (SP, $\times 100$)

2.2 食管癌中 pAKT、P110 α 阳性表达与其临床病理特征间的关系

76 例食管癌中有淋巴结转移的 27 例,其中 pAKT 阳性 24 例,阳性率为 88.9%; P110 α 阳性的有 21 例,阳性率 77.8%,两者的高表达与淋巴结转移显著相关($P_{\text{pAKT}} = 0.017, P_{\text{P110}\alpha} = 0.009$)。但两者的表达与患者性别、肿瘤大小、TNM 分期等无明显相关性(表 1, 2)。

表 1 P110 α 表达与食管癌临床病理特征的相关性
Tab.1 Correlation between expression of P110 α and clinical characteristics of esophageal carcinoma

Group	P110 α (+)	P110 α (-)	<i>P</i>
Age (t/a)			
≤45	12	9	0.935
>45	32	23	
Sex			
Male	28	22	0.643
Female	16	10	
Type			
Squamous carcinoma	42	32	0.506(<i>F</i>)
Adenocarcinoma	2	0	
Tumor size (d/cm)			
<3	10	11	0.513
3-5	27	16	
>5	7	5	
Lymphnode metastasis			
+	21	6	0.009
-	23	26	
Distance metastasis			
+	3	0	0.259(<i>F</i>)
-	41	32	
TNM type			
I	5	8	0.534(<i>F</i>)
II	25	17	
III a	7	4	
III b	5	3	
IV	2	0	

3 讨论

目前已知 PI3K/AKT 是一个重要的信号调节通路,对多种生物学过程,如细胞凋亡、新陈代谢、细胞增殖、细胞生长、细胞骨架重构等均有调节作用。PI3Ks 是一个酪氨酸激酶家族系列,由独立的调节和催化亚单位组成杂合二聚体(异二聚体),由 PIK3CA 编码的蛋白 P110 α 是其催化亚单位,p85 是其调节亚单位^[4]。受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)或者 RAS(rat sarcoma protein)蛋白在细

胞膜汇聚激活 PI3K,将 4、5-二磷酸磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate, PIP2)合成为第二信使 3、4、5-三磷酸磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate, PIP3)。在细胞膜上,PIP3 将 AKT 和磷酸肌醇依赖的激酶 1(3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1, PDK1)锚合在一起,使 AKT 聚集在细胞膜,Thr308 和 Ser473 两个位点磷酸化而被激活^[1,5],激活的 AKT 作用于 3 β -糖原合酶激酶^[6]、Bcl-xL/Bcl-2 相关死亡促进因子^[7]、小鼠双微体基因^[8]、p21^[9]、caspase-9^[10]、叉头转录因子^[11-12]和 mTOR^[13]等靶蛋白,以产生后续生物学作用。

表 2 pAKT 表达与食管癌临床病理特征的相关性
Tab.2 Correlation between expression of pAKT and clinical characteristics of esophageal carcinoma

Group	pAKT (+)	pAKT (-)	<i>P</i>
Age (t/a)			
≤45	15	6	0.910
>45	40	15	
Sex			
Male	37	13	0.659
Female	18	8	
Type			
Squamous carcinoma	53	21	1(<i>F</i>)
Adenocarcinoma	2	0	
Tumor size (d/cm)			
<3	12	9	0.112
3-5	35	8	
>5	8	4	
Lymphnode metastasis			
+	24	3	0.017
-	31	18	
Distance metastasis			
+	3	0	0.556(<i>F</i>)
-	52	21	
TNM type			
I	7	6	0.548(<i>F</i>)
II	31	11	
III a	9	2	
III b	6	2	
IV	2	0	

PI3K/AKT 通路在肿瘤形成中所起到基础性重要作用^[14-18]。根据 PI3K/AKT 信号通路机制, 引起 pAKT 增高的因素有 p85 受到抑制、第 10 染色体同源丢失性磷酸酶 - 张力蛋白基因(phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten, PTEN)失活、P110 α 表达增高。本研究结果显示, 食管癌 P110 α 高表达与 pAKT 的高表达两者具有一致性, 提示高表达的 P110 α 可促使下游靶分子 AKT 磷酸化, 但不是唯一因素。

有报道^[19]发现, 在乳腺癌中 PI3K 信号通路的激活可以增加淋巴结的侵袭性。Nakanishi 等^[20]在肝癌中也发现此特性。本研究发现, 食管癌中 AKT 磷酸化、P110 α 高表达与淋巴结转移存在相关性, 表明食管癌中活化的 PI3K/AKT 通路可促进肿瘤淋巴结转移, 是促进肿瘤进展、恶化的主要信号通路之一。综上, PI3K/AKT 通路活化与食管癌进展期密切相关, P110 α 、pAKT 高表达与淋巴结转移有密切关联, 将来有可能成为临床上检测淋巴结转移、提供肿瘤预后的潜在分子生物学指标。

[参 考 文 献]

- [1] Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway [J]. Science, 2002, 296(5573): 1655-1657.
- [2] Kim TJ, Lee JW, Song SY, et al. Increased expression of pAKT is associated with radiation resistance in cervical cancer [J]. Br J Cancer, 2006, 94(11): 1678-1682.
- [3] Massion PP, Taflan PM, Shyr Y, et al. Early involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in lung cancer progression [J]. Am Respir Crit Care Med, 2004, 170(10): 1088-1094.
- [4] Carpenter CL, Auger KR, Chanudhuri M, et al. Phosphoinositide 3-kinase is activated by phosphopeptides that bind to the SH2 domains of the 85-kDa subunit [J]. J Biol Chem, 1993, 268(13): 9478-9483.
- [5] Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(7): 489-501.
- [6] Cross DA, Alessi DR, Cohen P, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B [J]. Nature, 1995, 378(6559): 785-789.
- [7] Datta SR, Dudek H, Tao X, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell intrinsic death machinery [J]. Cell, 1997, 91(2): 231-241.
- [8] Zhou BP, Liao Y, Xia W, et al. HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation [J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(11): 973-982.
- [9] Rossig L, Jadidi AS, Urbich C, et al. Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells [J]. Mol Cell Biol, 2001, 21(16): 5644-5657.
- [10] Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation [J]. Science, 1998, 282(5392): 1318-1321.
- [11] Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor [J]. Cell, 1999, 96(6): 857-868.
- [12] Rena G, Guo S, Cichy SC, et al. Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B [J]. J Biol Chem, 1999, 274(24): 17179-17183.
- [13] Inoki K, Corradetti MN, Guan KL. Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease [J]. Nat Genet, 2005, 37(1): 19-24.
- [14] Shayesteh L, Lu Y, Kuo WL, et al. PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer [J]. Nat Genet, 1999, 21(9): 99-102.
- [15] Ma YY, Wei SJ, Lin YC, et al. PIK3CA as an oncogene in cervical cancer [J]. Oncogene, 2000, 19(23): 2739-2744.
- [16] Kita D, Yonekawa Y, Weller M, et al. PIK3CA alterations in primary (de novo) and secondary glioblastomas [J]. Acta Neuro-pathol, 2007, 113(3): 295-302.
- [17] Kato S, Lida S, Higuchi T, et al. PIK3CA mutation is predictive of poor survival in patients with colorectal cancer [J]. Int J Cancer, 2007, 121(8): 1771-1778.
- [18] Yamamoto H, Shigematsu H, Nomura M, et al. PIK3CA mutations and copy number gains in human lung cancers [J]. Cancer Res, 2008, 68(17): 6913-6921.
- [19] Akagi I, Masao M, Hiroshi M, et al. Overexpression of PIK3CA is associated with lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Int J Oncol, 2009, 34(3): 767-775.
- [20] Nakanishi K, Sakamoto M, Yasuda J, et al. Critical involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in anchorage-independent growth and hematogenous intrahepatic metastasis of liver cancer [J]. Cancer Res, 2002, 62(10): 2971-2975.

[收稿日期] 2012 - 04 - 16

[修回日期] 2012 - 08 - 19

[本文编辑] 韩丹, 周玲琳