

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.01.011

PIK3CD 表达上调与胃癌临床病理特征及患者预后的相关性

乔世峰,李世正,佟鑫(辽宁医学院附属第一医院 胃肠外科,辽宁 锦州 121001)

[摘要] **目的:** 分析磷脂酰肌醇-3 激酶催化亚基 δ (phosphoinositide-3 kinase, catalytic subunit delta, PIK3CD) 表达与胃癌临床病理特征和患者预后的相关性。**方法:** 收集 2004 年 5 月至 2007 年 12 月在辽宁医学院附属第一医院胃肠外科行肿瘤切除并经病理证实的胃癌患者癌组织标本及相应癌旁组织标本各 86 例,采用免疫组织化学法检测 PIK3CD 蛋白在 86 例胃癌及癌旁组织中的表达;利用 χ^2 检验及 Spearman 相关性检验探讨 PIK3CD 表达与胃癌临床病理特征的关系;应用 Kaplan-Meier 方法分析 PIK3CD 表达与胃癌患者术后 5 年生存率及生存时间。**结果:** 相对于癌旁组织,PIK3CD 在胃癌组织中的表达明显上调 ($P=0.006$);PIK3CD 表达与胃癌浸润深度呈显著相关性 ($P=0.005$),与淋巴结阳性率 ($P=0.089$) 和临床分期 ($P=0.060$) 有相关趋势但无统计学意义,而与肿瘤大小、组织分化程度、淋巴结和远处转移等无相关性。高表达和低表达 PIK3CD 的患者术后 5 年累积生存率分别为 18.9% 和 60.6%,中位生存时间为 31.0 (95% CI: 23.9 ~ 38.1) 个月和 60.6 (95% CI: 53.8 ~ 67.4) 个月, Kaplan-Meier 分析显示其差异有显著统计学意义 ($\chi^2=19.791, P=0.000$)。多因素分析显示, PIK3CD 可作为一个独立的预后评估因素 ($P=0.000$)。**结论:** (1) 胃癌组织中 PIK3CD 表达的显著上调提示其具有潜在的促癌作用; (2) PIK3CD 表达上调与胃癌的浸润程度和患者生存时间相关,可作为胃癌预后不良评估的一个独立影响因素。

[关键词] 胃癌;磷脂酰肌醇-3 激酶催化亚基 δ ; 浸润; 预后

[中图分类号] R735.2; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2015)01-0062-05

Phosphoinositide-3 catalytic subunit delta in gastric cancer: possible correlations with clinicopathologic characteristics and prognosis

Qiao Shifeng, Li Shizheng, Tong Xin (Department of General Surgery, First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the correlation between the expression of phosphoinositide-3 kinase catalytic subunit delta (PIK3CD) and the clinicopathologic characteristics in gastric cancer tissues. **Methods:** A total of 86 paired tumorous and normal gastric tissue specimens were collected from gastric cancer patients who underwent surgical resection in the Department of Gastrointestinal Surgery, Liaoning Medical University-Affiliated First Hospital in Jinzhou between May 2005 and December 2007. The expression of PIK3CD at the protein level in these specimens was assessed by immunohistochemistry. The possible correlation between PIK3CD expression and the patients' clinicopathological characteristics and prognosis was analyzed by χ^2 and Spearman correlation test. The influence of PIK3CD on 5-year survival and survival length was analyzed by Kaplan-Meier test. **Results:** The immunoreactive PIK3CD protein signal in the tumor proper was significantly stronger in the tumor proper than in the matched adjacent tissue ($P=0.006$). The intensity of PIK3CD protein signal was positively correlated with infiltration ($P=0.005$), but not with sex, age, differentiation, clinical stage, lymph nodes metastasis and distance metastasis ($P>0.05$). The 5-year survival rate was 18.9% and 60.6% in patients with high and low levels of PIK3CD respectively ($P<0.05$). The median survival length was 31.0 (95% CI: 23.9 - 38.1) months in patients with high levels of PIK3CD and 60.6 (95% CI: 53.8 - 67.4) months in patients with low levels of PIK3CD ($\chi^2=19.791, P=0.000$). Elevated PIK3CD expression was an independent negative prognostic factor of gastric cancer ($P=0.000$). **Con-**

[基金项目] 辽宁省科学事业公益研究基金资助项目(No. 2014001014)。Project supported by the the Public Welfare Scientific Research Foundation of Liaoning Province (No. 2014001014)

[作者简介] 乔世峰(1966-),男,辽宁省大连市人,医学博士,主任医师,主要从事胃肠道肿瘤治疗研究, E-mail: shifengqiao2013@163.com

[通信作者] 乔世峰(Qiao Shifeng, Corresponding author), E-mail: shifengqiao2013@163.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20150205.1444.007.html>

clusion: PIK3CD may function as a pro-oncogene and an independent prognostic factor in patients with gastric cancer.

[**Key words**] gastric cancer; PIK3CD; infiltration; prognosis

[Chin J Cancer Biother, 2015, 22(1): 62-66]

胃癌是最常见的消化道恶性肿瘤之一,大多数胃癌确诊时已处于晚期,预后不良^[1],因此寻找影响胃癌预后的分子标志物对于研究胃癌发生的机制和靶向治疗具有重要的理论和现实意义。越来越多的研究^[2-4]表明,磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphoinositide 3-kinases, PI3K)的分子活化在包括胃癌在内的多种恶性肿瘤的发生发展中发挥着至关重要的作用。研究^[5-9]发现,PI3K 催化亚基 δ (phosphoinositide-3 kinase, catalytic subunit delta, PIK3CD)的靶向抑制能够有效削弱 PIK3CD 在 B 细胞淋巴瘤、成胶质细胞瘤、成神经细胞瘤、结直肠癌和肝癌中的促癌作用,但是其在胃癌中的作用尚不清楚。为此,本研究回顾性地分析了 PIK3CD 在 86 例胃癌组织中的表达模式,并对其表达水平与胃癌临床病理特征、生存状况和预后的相关性进行分析。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集 2004 年 5 月至 2007 年 12 月在辽宁医学院附属第一医院胃肠外科行肿瘤切除的胃癌患者癌组织标本及相应癌旁组织(距离癌灶边缘 5 cm)标本各 86 例,其中男性 67 例、女性 19 例,中位年龄 62 岁(34~84)岁,平均年龄(62.0±11.2)岁。肿瘤直径 <3 cm 33 例,≥3 cm 53 例;病理分级 I 级 1 例,II 级 42 例,III 级 43 例;淋巴结转移阳性率^[10]:0 级(0%)19 例,1 级(<40%)27 例,2 级(40~80%)23 例,3 级(>80%)17 例;按照第六版的 AJCC 的 TNM 分期:T 分期,T1 期 4 例,T2 期 6 例,T3 期 60 例,T4 期 16 例;N 分期,N0 期 19 例,N1 期 18 例,N2 期 25 例,N3 期 24 例;临床分期:I 期 6 例,II 期 29 例,III 期 45 例,IV 期 6 例。所有病例均经术前和术后病理切片确诊为腺癌,术前均未接受放疗和化疗。所有标本及临床资料的收集均经辽宁医学院附属第一医院医学伦理委员会批准,征得患者同意并签署知情同意书。

1.2 主要试剂

兔源抗人 PIK3CD 单克隆抗体购自美国 Epitomics 公司(货号:1575-1),二步法抗兔、鼠通用型免疫组化检测试剂盒(ChemMate™ EnVision+ /HRP)购自上海基因科技有限公司(货号:GK500705)。读片和图像采集使用德国 Leica 公司生产的 MZ7.5 型

显微镜(购自 Leica 公司)和 DM4000B 型数码摄影显微镜。

1.3 免疫组化法检测胃癌组织和癌旁组织中 PIK3CD 蛋白的表达

免疫组化方法参考文献[11],主要实验步骤为:组织切片在常规二甲苯脱蜡和水化后,使用 3% 过氧化氢处理 15 min 以封闭内源性的过氧化物酶,使用 5% 山羊血清处理 30 min 以封闭非特异性结合位点;在与鼠源性的 PIK3CD 单克隆抗体孵育过夜(稀释比例 1:100)之后,按照说明书所载,再与抗兔、鼠通用型免疫组化检测试剂孵育并用 DAB 染色、用苏木精复染,常规脱水透明后用中性树脂胶封片。用已知的 PIK3CD 阳性胃癌切片染色作阳性对照,用 PBS 代替一抗作阴性对照。

免疫组化染色结果判定^[12]:随机选取每张染色片的 5 个高倍视野(×400)进行观察,计算阳性细胞占总细胞数的百分率并进行积分:无阳性细胞计 0 分,阳性细胞百分率 <10% 计 1 分,10%~50% 计 2 分,51%~80% 计 3 分,>80% 计 4 分。同时按多数阳性细胞呈现的染色强度计分:无着色计 0 分,淡黄色计 1 分,棕黄色计 2 分,棕褐色计 3 分。最后计算染色强度积分与阳性细胞百分率积分的乘积,<6 分判为低表达,≥6 分判为高表达。病理阅片及染色积分判定由 2 名病理医师采用双盲评估法观察完成。

1.4 胃癌患者随访

所有患者均有完整的随访资料,手术后均顺利出院。术后 1 年内每隔 3 个月随访 1 次,第 2 年内每隔 6 个月随访 1 次,以后每年随访 1 次。随访的内容包括体格检查、胸片、化验分析、CT、超声以及胃镜检查等。术后总生存率是指从手术之日起至患者死亡或随访截止之日为止的时间。本研究的末次随访时间为 2013 年 11 月,中位随访时间为 48 个月(6~98 个月)。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,PIK3CD 蛋白表达与胃癌临床病理指标间的关系采用 χ^2 检验、相关分析采用 Spearman 检验,生存期比较采用 Kaplan-Meier 分析。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PIK3CD 蛋白在胃癌组织中的表达明显上调

免疫组化染色结果(图1)显示, PIK3CD 在癌旁组织和癌组织中的阳性表达以细胞质为主, 少量在细胞膜, 为棕黄色或棕褐色颗粒。PIK3CD 蛋白在胃癌组织中的阳性表达率为 61.6% (53/86), 明显高于癌旁组织的 40.7% (35/86) ($P=0.006$)。

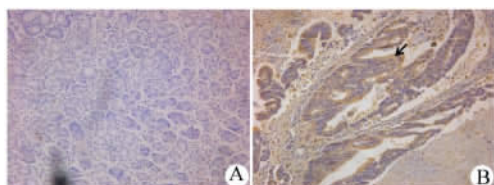


图1 胃癌和癌旁组织中 PIK3CD 蛋白的表达 (SP, $\times 100$)

Fig.1 Expression of PIK3CD in gastric cancer paracancerous tissues (SP, $\times 100$)

A: Paracancerous tissues; B: Gastric cancer tissues. Such as the arrow, the positive expression in cytoplasm

2.2 PIK3CD 蛋白表达上调与胃癌患者临床病理特征的关系

采用 χ^2 及 Spearman 检验分析 PIK3CD 蛋白的表达与胃癌患者临床病理指标之间的关系, 结果(表1)显示, PIK3CD 蛋白在胃癌患者的性别 ($P=0.877$)、年龄 ($P=0.552$)、肿瘤大小 ($P=0.079$)、分化程度 ($P=0.268$)、淋巴结阳性率 ($P=0.089$)、临床分期 ($P=0.060$)、淋巴结转移 ($P=0.809$) 和远处转移 ($P=0.257$) 无明显相关性, 而与浸润深度存在显著相关性 ($P=0.005$)。

2.3 胃癌组织中 PIK3CD 表达与胃癌患者生存期的关系

Kaplan-Meier 法生存分析(图2)发现, PIK3CD 蛋白在癌组织中高表达与患者生存时间缩短显著相关, 高表达和低表达 PIK3CD 的患者术后 5 年累积生存率分别为 18.9% 和 60.6%, 中位生存时间为 31.0 (95% CI: 23.9 ~ 38.1) 个月和 60.6 (95% CI: 53.8 ~ 67.4) 个月, 两者的术后生存率差异有显著的统计学意义 ($\chi^2=19.791, P=0.000$)。

2.4 PIK3CD 是胃癌患者预后不良独立影响因素

为了明确 PIK3CD 是否可以独立作为影响胃癌患者预后的因素, 应用 Cox 回归模型对可能影响胃癌患者预后的因素进行了分析(表2), 除 PIK3CD 的表达水平外, 还包括肿瘤大小、癌组织病理分级、

临床分期、浸润深度、淋巴结转移和远处转移。Cox 回归多因素分析显示, 除临床分期 ($P=0.047$)、浸润深度 ($P=0.004$) 和淋巴结转移 ($P=0.033$) 之外, PIK3CD 高表达也可以作为胃癌患者预后不良的独立影响因素 ($P=0.000$)。

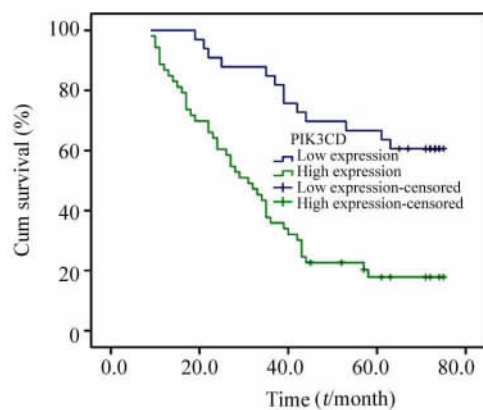


图2 胃癌患者不同 PIK3CD 表达的 Kaplan-Meier 生存曲线
Fig.2 Kaplan-Meier survival curve based on expression of PIK3CD in gastric cancer patients

3 讨论

胃癌是严重威胁我国人民身体健康的恶性肿瘤, 高发病率和 high 病死率是本病的主要特点。根治性、规范化外科手术水平已经达到前所未有的高度, 但仍无法显著提高胃癌患者 5 年生存率^[13]。近年来, 包括基于 VEGF 和 PI3K 等的新型靶向治疗为改善患者预后带来了希望。

PI3K 催化亚基包括 PIK3CA、PIK3CB、PIK3CG 和 PIK3CD, 其中 PIK3CA 主要表现为突变后的促癌作用, 而其他 3 种则表现为过表达性的促癌作用^[2, 14-16]。PIK3CD 在多种恶性肿瘤中的促癌作用已经引起了人们的关注^[5-9], 并且靶向 PIK3CD 的微小 RNA (MicroRNA) 和特异性抑制剂在相关肿瘤的体内外实验中都能够有效地抑制 PIK3CD 的促癌作用。本研究对胃癌组织切片进行的 PIK3CD 单克隆抗体免疫组化染色研究发现, PIK3CD 无论在癌旁组织还是癌组织中均以细胞质表达为主, 并且在癌组织中表达水平明显上调, 这与 PIK3CD 在其他恶性肿瘤中的表达规律相一致, 提示 PIK3CD 表达上调可能涉及胃癌的发生发展过程。为了了解 PIK3CD 表达上调与胃癌发生发展的相关性, 本实验使用 χ^2 检验、Kaplan-Meier 和多因素 Cox 回归方法分析了 PIK3CD 表达与胃癌临床病理特征及生存状况等预后指标的相关性, 结果发现: (1) 胃癌组织

表 1 胃癌组织中 PIK3CD 蛋白表达与患者临床病理特征的关系(n)

Tab. 1 Relationship between protein expression of PIK3CD and clinicpathologic features of gastric cancer(n)

Feature	N	Low expression	High expression	P/χ^2 value	Spearman rank correlation
Sex				0.87(0.024)	0.878
Male	67	26	41		
Female	19	7	12		
Age(t/a)				0.55(0.353)	0.558
≥60	58	21	37		
<60	28	12	16		
Tumor size(d/cm ²)				0.07(3.094)	0.080
≥3	53	15	38		
<3	33	4	29		
Differentiation				0.26(1.229)	0.273
Well-moderately	43	19	24		
Poorly	43	14	29		
Lymph node positive rate				0.08(6.522)	0.658
0(0)	19	9	10		
1(<40%)	27	11	16		
2(40% ~80%)	23	4	19		
3(>80%)	17	9	8		
TNM stage				0.06(7.416)	0.027
I	6	5	1		
II	29	13	16		
III	45	13	32		
IV	6	2	4		
Depth of invasion				0.005(12.984)	0.001
T1	4	4	0		
T2	6	4	2		
T3	60	23	37		
T4	16	2	14		
Lymphatic metastasis				0.809 (0.969)	0.361
N0	19	9	10		
N1	18	7	11		
N2	25	9	16		
N3	24	8	16		
Distant metastasis				0.257(1.285)	0.262
M0	80	32	48		
M1	6	1	5		

中表达的显著上调提示 PIK3CD 具有潜在的促癌作用;(2)PIK3CD 高表达与肿瘤的 T 分期存在显著相关特性;(3)PIK3CD 高表达患者术后生存期缩短。Cox 回归分析显示,PIK3CD 是一个影响胃癌预后的

独立因素。以上结果为进一步分析和认识 PIK3CD 在胃癌中的作用奠定了实验基础。控制复发转移是进展期胃癌患者获得长期生存的关键,但是由于本组研究资料中仅有 6 例远处转移患者,所以未来需

要在纳入更多的远处转移病例, 采用更大样本量和更均一的病例来进一步阐明 PIK3CD 表达与胃癌发

生、发展的关系。

表 2 胃癌患者生存时间的多因素分析

Tab.2 Multivariate analysis of survival time of patients with gastric cancer

Variable	HR	95% CI	P value
Gender (Male/Female)	1.033	0.493-2.168	0.931
Age (<60/≥60, t/a)	1.080	0.534-2.184	0.831
Tumor size(<3/≥3, l/cm)	1.410	0.741-2.685	0.295
Differentiation(Well / Moderately Poorly)	0.990	0.582-1.682	0.969
TNM stage(I / II / III / IV)	0.280	0.080-0.984	0.047
Lymph node positive rate(0, <40% , 40%-80% , >80%)	1.343	0.843-2.140	0.215
Depth of invasion (T1/T2/T3/T4)	2.835	1.391-5.778	0.004
Lymph node metastasis(N0/N1/N2/N3)	2.051	1.059-3.973	0.033
Distant metastasis(M0/M1)	3.131	0.762-12.871	0.114
Expression of PIK3CD (Low/High)	3.749	1.869-7.521	0.000

在本组病例中, PIK3CD 高表达的患者, 其远期生存时间也短, 提示对 PIK3CD 的表达分析具有潜在的预后评估价值。此外, 由于已经有了有效的靶向 PIK3CD 的 miRNA 和特异性抑制剂的研究证据^[17], 结合本研究结果, 可为 PIK3CD 可能作为未来胃癌治疗的有效靶点提供了有力的证据。

综上, 本研究首次揭示了 PIK3CD 在胃癌中的表达模式, 并证明其蛋白表达水平在胃癌中升高的特征, 不仅提示了其在胃癌中潜在的促癌作用, 还提示了其作为诊断标志物和治疗靶点的潜在应用价值。

[参 考 文 献]

[1] D'Ugo D, Persiani R, Zoccali M, et al. Surgical issues after neoadjuvant treatment for gastric cancer [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2010, 14(4): 315-319.

[2] Li VS, Wong CW, Chan TL, et al. Mutations of PIK3CA in gastric adenocarcinoma [J]. BMC Cancer, 2005, 5: 29-34.

[3] 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.

[4] Van Aller GS, Carson JD, Fernandes C, et al. Characterization of PI3K class IA isoforms with regulatory subunit p55alpha using a scintillation proximity assay [J]. Anal Biochem, 2008, 383(2): 311-315.

[5] Vanhaesebroeck B, Khwaja A. PI3Kδ inhibition hits a sensitive spot in B cell malignancies [J]. Cancer Cell, 2014, 25(3): 269-271.

[6] Shi Y, Chen C, Zhang X, et al. Primate-specific miR-663 functions as a tumor suppressor by targeting PIK3CD and predicts the prognosis of human glioblastoma [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(7): 1803-1813.

[7] Fransson S, Ejeskär K. High level of p37δ-mRNA relative to p110δ-mRNA in neuroblastoma tumors correlates with poor patient survival [J]. Med Oncol, 2013, 30(4): 724.

[8] Fang Y, Xue JL, Shen Q, et al. MicroRNA-7 inhibits tumor growth and metastasis by targeting the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2012, 55(6): 1852-1862.

[9] Liao WT, Ye YP, Zhang NJ, et al. MicroRNA-30b functions as a tumour suppressor in human colorectal cancer by targeting KRAS, PIK3CD and BCL2 [J]. J Pathol, 2014, 232(4): 415-427.

[10] 于俊秀, 吴育连, 杨立涛. 淋巴结转移率评估 T3 期胃癌病人预后的价值 [J]. 中华医学杂志, 2005, 85(13): 922-925.

[11] Cui M, Yu W, Dong J, et al. Downregulation of ABI1 expression affects the progression and prognosis of human gastric carcinoma [J]. Med Oncol, 2010, 27(3): 632-639.

[12] 崔梅花, 张欣焱, 乙国兴, 等. 酿酒酵母菌抗原在炎症性肠病结肠组织中表达及意义 [J]. 中华临床医师杂志, 2011, 5(4): 986-989.

[13] 李涛, 梁美霞, 冯道夫, 等. 进展期胃癌综合治疗分析 [J]. 首都医药, 2014, 6: 25-27.

[14] Almhanna K, Strosberg J, Malafa M. Targeting AKT protein kinase in gastric cancer [J]. Anticancer Res, 2011, 31(12): 4387-4392.

[15] Pal I, Mandal M. PI3K and Akt as molecular targets for cancer therapy: current clinical outcomes [J]. Acta Pharmacol Sin, 2012, 33(12): 1441-1458.

[16] Arkenau HT. Gastric cancer in the era of molecularly targeted agents: current drug development strategies [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2009, 135(7): 855-866.

[17] 乔世峰, 王季堃, 李世正, 等. PIK3CD 沉默抑制胃癌细胞 HGC-27 的体外增殖和迁移 [J]. 肿瘤(in press).

[收稿日期] 2014 - 10 - 10 [修回日期] 2014 - 12 - 28
 [本文编辑] 阮芳铭