

· 临床研究 ·

宫颈病变中 PI3K-Akt 信号通路的表达与 HPV 感染关系的研究*

郭云鸿, 王瑞芳, 田晓予

(河南科技大学第一附属医院妇科, 河南洛阳 471003)

摘要:目的 探讨磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)-蛋白激酶 B(Akt)信号通路在宫颈鳞癌(SCC)发生、发展中的意义及与人乳头瘤病毒(HPV)感染的关系。方法 采用免疫组化方法检测 PI3K、Akt 蛋白在 80 例 SCC, 36 例宫颈上皮内瘤变(CIN), 12 例慢性宫颈炎中的表达;治疗前均采用聚合酶链反应(PCR)方法检测 HPV-DNA 感染。结果 SCC 组中 PI3K、Akt 蛋白阳性表达率显著高于 CIN 组和慢性宫颈炎组($P < 0.05$), SCC 中 PI3K、Akt 蛋白的阳性表达均与临床分期密切相关($P < 0.05$); PI3K、Akt 在 SCC 中的表达存在相关关系($P < 0.05$); 116 例 CIN 和 SCC 中, PI3K-Akt 在 HPV 阳性组的表达率均显著高于 HPV 阴性组($P < 0.05$)。结论 PI3K、Akt 在 SCC 发生、发展中起重要作用;两者与 HPV 感染密切相关。

关键词:人乳头瘤病毒;宫颈肿瘤;磷脂酰肌醇 3 激酶;蛋白激酶 B

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.20.011

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)20-2337-02

The Expression and clinical significance of PI3K-Akt in cervical lesion and the relationship with HPV*

Guo Yunhong, Wang Rui Fang, Tian Xiaoyu

(Department of Gynaecology, the First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China)

Abstract: Objective To explore the expression and clinical significance of PI3K-Akt in cervical lesion and the relationship with HPV. Methods Immunohistochemical method was used to test the expression of PI3K and Akt protein in 80 cases of SCC, 36 cases of CIN and 12 cases of cervicitis; HPV-DNA was detected by polymerase chain reaction technique. Results In SCC, the expression of PI3K and Akt were significantly higher than these of CIN and cervicitis ($P < 0.05$); the expression of PI3K and Akt was significantly correlated with the clinical stage ($P < 0.05$); the expression of PI3K was correlated with the expression of Akt ($P < 0.05$); in 116 cases of SCC and CIN, when there were HPV infection, the expression of PI3K and Akt were significantly higher than no infection. Conclusion PI3K and Akt should play an important role in the genesis and development of SCC, both have a close relationship with HPV infection.

Key words: human papillomavirus; uterine cervical neoplasms; PI3K; Akt

高危型人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染被认为是宫颈癌及癌前病变的主要病因,近年来,HPV感染率及宫颈癌发病率虽均较前升高,但仅有少数 HPV 持续感染的患者最终发生了宫颈癌,表明还有更多其他因素参与了宫颈癌的发生、发展。目前,信号转导通路的异常改变被认为与肿瘤的发生密切相关,其中磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)-蛋白激酶 B(Akt)信号转导通路与细胞增殖、凋亡、分化密切相关,本实验通过对宫颈鳞癌中 PI3K、Akt 蛋白表达及与 HPV 感染的研究,探讨 HPV 感染、PI3K-Akt 信号转导通路在宫颈鳞癌(SCC)发生、发展中的作用及相互关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 80 例 SCC 组织为河南科技大学第一附属医院妇科 2007~2010 年病理科保存的石蜡包埋宫颈病变组织(SCC 组), 36 例宫颈上皮内瘤变(CIN)组织(CIN 组)及 12 例慢性宫颈炎组织(慢性宫颈炎组)取自子宫良性病变行全子宫切除术后患者,年龄(30~73)岁,中位年龄 44.5 岁。所有研究对象均在入院未行任何治疗前检测 HPV,全部病例取标本前均未做放疗、化疗;临床分期根据国际妇产科联盟(FIGO)2000 年修订的标准,本资料 80 例的临床分期为 I~III 期,其中 66 例进行了宫颈癌根治术,术中清扫淋巴结,可进行是否有

盆腔淋巴结转移的探讨。

1.2 方法 PI3K、Akt 蛋白的检测采用免疫组织化学 SP 法,石蜡切片脱蜡至水,3% H_2O_2 去除内源性过氧化物酶,0.01 mol/L 柠檬酸缓冲液煮沸修复抗原,加入一抗、二抗,孵育反应,DAB 染色,苏木素复染。实验以已知阳性切片做阳性对照,以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗做阴性对照。两种试剂均购自福建迈新公司;HPV-DNA 检测采用香港凯普生物科技有限公司 HPV 核酸扩增分型检测试剂盒,按试剂盒的说明书进行操作:酚氯仿法提取基因组 DNA,紫外分光光度计检测 $OD_{260/280}$ 值,比值为 1.7~2.0 时认为达到所要求纯度,取 1 μ L 抽提好的 DNA 样本作为模板,加入 PCR-Mix、Taq 酶按一定的比例混匀,利用 PCR 进行体外扩增 DNA,使用 HPV 核酸扩增分型检测试剂盒及核酸分子快速杂交仪,根据导入杂交原理使目的分子穿过在已经固定好核酸探针的低密度基因芯片膜上,进行快速杂交。HPV-DNA 阳性率=(阳性标本数/总标本数) $\times 100\%$ 。

1.3 结果判定 PI3K、Akt 蛋白免疫组化染色阳性信号呈棕黄色,定位于细胞质和(或)细胞核。在高倍镜下取 5 个热点视野,计数阳性细胞与肿瘤细胞的百分比: $< 5\%$ 为(-), $5\% \sim 25\%$ 为(+), $26\% \sim 50\%$ 为(++), $> 50\%$ 为(+++)。从+~+++

十都记为阳性。免疫组化染色判定结果:(-)记为 0 分;(+)记为 1 分;(++)记为 2 分;(+++)记为 3 分。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析,采用 χ^2 检验和 Spermann 等级相关检验进行分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SCC 组、CIN 组和慢性宫颈炎组中 PI3K 和 Akt 的表达 PI3K、Akt 主要定位于细胞质,两者在慢性宫颈炎组中表达很少,在 SCC 组中的表达水平明显高于慢性宫颈炎组和 CIN 组($P < 0.05$),组间比较均差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 PI3K、Akt 在宫颈组织中的表达

分组	n	PI3K			Akt		
		n(%)	χ^2	P	n(%)	χ^2	P
慢性宫颈炎组	12	1(8.3)	13.555	0.001	0(0.0)	20.532	0.000
CIN 组							
CIN I~II	16	4(25.0)	10.774	0.001	4(25.0)	13.152	0.000
CIN III	20	9(45.0)	2.954	0.086	10(50.0)	3.722	0.054
SCC 组	80	55(68.8)			58(72.5)		

2.2 PI3K、Akt 蛋白表达水平与临床病理指标的联系 SCC 中 PI3K、Akt 蛋白的阳性表达与临床分期均有密切关系($P < 0.05$),见表 2。

表 2 SCC 组织中 PI3K、Akt 表达与临床病理指标的关系

项目	n	PI3K			Akt		
		n(%)	χ^2	P	n(%)	χ^2	P
病理分级							
高	20	10(50.0)	4.675	0.097	11(55.0)	4.098	0.129
中	32	23(71.9)			25(78.1)		
低	28	22(78.6)			22(78.6)		
淋巴结转移							
有	29	20(68.9)	2.329	0.127	23(79.3)	3.721	0.054
无	37	22(59.5)			21(56.8)		
临床分期							
I	30	11(36.7)	23.728	0.000	13(43.3)	24.041	0.000
II	36	31(86.1)			31(86.1)		
III	14	13(92.9)			14(100.0)		

2.3 PI3K、Akt 两者间的相关性 80 例 SCC 组织标本中,PI3K、Akt 蛋白共同阳性 38 例,共同阴性 5 例,经相关性分析差异有统计学意义($r = 0.396, P < 0.05$)。

2.4 PI3K、Akt 与 HPV 感染的关系 本研究中 SCC 80 例,CIN 36 例,共 116 例标本,HPV-DNA 阳性感染 98 例中 PI3K 阳性表达 66 例(67.3%),HPV-DNA 阴性感染 18 例中 PI3K 阳性表达 2 例(11.1%),差异有统计学意义($\chi^2 = 19.826, P < 0.05$); HPV-DNA 阳性感染 98 例中 Akt 阳性表达 68 例(69.4%),HPV-DNA 阴性感染 18 例中 Akt 阳性表达 4 例(22.2%),差异有统计学意义($\chi^2 = 14.369, P < 0.05$)。

3 讨 论

宫颈癌在全世界妇女恶性肿瘤中位居第二,每年新发病例 53 万且多在发展中国家,寻找宫颈癌病因,明确宫颈癌发病机

制刻不容缓^[1]。PI3K-Akt 信号转导通路是由 PI3K 及其受体、胞内信号分子 Akt、下游靶基因构成的完整通路,其中每个环节的异常都可能导致肿瘤发生。PI3K 是由催化亚基 p110a 和调节亚基 p85 两者组成的异源二聚体,具有类脂激酶和蛋白激酶的双重活性,是细胞内重要的信号传导分子,当细胞受到刺激,调节亚基 p85 可与生长因子受体或连接蛋白相互作用使二聚体构象发生改变,暴露催化亚基 p110a 的活性部位,即 PI3K 被活化,PI3K 的催化亚基 p110a 也可直接与 Ras 结合使 PI3K 被活化,活化的 PI3K 在细胞膜上生成 PIP3,PIP3 可与 Akt 的 PH 区结合使 Akt 由细胞质转位到细胞膜,使其 Ser473 和 Thr308 位点暴露并得以磷酸化,通过此途径,Akt 完全活化,活化的 Akt 处于信号枢纽位置。研究表明^[2-3],活化的 Akt 通过作用于各种靶分子,如 Bcl-2 家族成员 BAD 和 BAX、caspase-9、NF- κ B、Mdm2、mTOR、基质金属蛋白酶等,参与细胞周期进程,促进细胞增殖,抑制细胞凋亡,多数研究认为,PI3K-Akt 通路是与肿瘤发生、发展密切相关的重要转导通路^[4-6]。本研究结果发现,PI3K、Akt 在慢性宫颈炎、CIN I~II、CIN III、SCC 中,随着病变的进展,阳性表达率均呈逐渐增高趋势,在 SCC 组织中的表达水平明显高于慢性宫颈炎组和 CIN I~II 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),并随着 SCC 临床分期的进展,两者阳性表达率逐渐增高,经相关性分析,两者间有相关关系,表明 PI3K-Akt 信号转导通路在 SCC 中存在异常活化,该活化与 SCC 的恶性进展有关,但本研究中两个指标均与病理分级和淋巴结转移无关,这可能与样本数量较少有关。

HPV 感染是宫颈癌发生的必要条件,大多数宫颈癌都伴有高危型 HPV 感染^[7],HPV 属多空病毒科 A 亚组,为嗜上皮性球状病毒,按功能分为:早期基因区(E 区),晚期基因区(L 区)和上游调节区(LCR),E 区编码的蛋白有 E1、E7 癌蛋白^[8],E6、E7 蛋白调控病毒繁殖与生长,与肿瘤发生密切相关,E2 可抑制 E6、E7 的功能,而 E5 对 E7 的完全活化是必须的。Sudarshan 等^[9]认为 HPV 是宫颈癌的主要诱导因素,该病毒癌基因 E6、E7 和宿主细胞基因的后生变化共同促进了细胞的恶性转化。Kim 等^[10]研究指出,HPV E5 蛋白在宫颈癌发病早期有非常重要的作用,可激活表皮生长因子受体(EGFR)和血管内皮生长因子(VEGF),并启动 PI3K-Akt 信号转导通路参与致癌,本研究中,HPV-DNA 阳性感染 98 例中 PI3K 阳性表达 66 例,HPV-DNA 阴性感染 18 例中 PI3K 阳性表达 2 例,HPV-DNA 阳性感染 98 例中 Akt 阳性表达 68 例,HPV-DNA 阴性感染 18 例中 Akt 阳性表达 4 例,差异均有统计学意义,表明 PI3K、Akt 蛋白的表达与 HPV 感染均有密切关系,PI3K、Akt 两者间又有相关关系,进一步证实了在 SCC 的发生、发展过程中 PI3K-Akt 信号转导通路协同 HPV 发挥了重要作用。

本研究结果显示,PI3K-Akt 信号通路在肿瘤的发生机制中起到重要的调控作用,阻断此通路对抑制肿瘤细胞生长、诱导凋亡具有重要意义。夏曙等^[11]用 LY294002 抑制 PI3K-Akt 信号通路可以增强多西紫杉醇、顺铂、塞来西布对宫颈 HeLa 细胞的杀伤作用,该通路抑制剂西罗莫司已经在乳腺癌 I 期和 II 期临床试验中应用^[12]。该信号通路的其他元件 PTEN、NF- κ B、Mdm2、mTOR 等是否也可成为治疗干预的靶目标,多靶点联合干预是否可成为一种更加有效的治疗途径,这些均有待于进一步深入研究。

夹去肉芽组织再碎石^[10]。

PCNL 的关键是经皮穿刺建立通道。作者选择在 B 超引导下穿刺肾脏中盏无血管区,减少气胸等并发症的发生。碎石时将剥皮鞘封住输尿管上段,避免碎石块返回肾盂肾盏系统内,提高结石清除率。

RIU 成功的关键是正确识别输尿管结石的部位。术中要正确识别腰大肌、侧腹膜等腹膜后解剖标志,常常需充分暴露腰大肌和肾脏下极,沿腰大肌内侧于肾下极稍下方作钝性分离寻找输尿管上段,也可由助手推动预先留置的带导丝的双 J 管,帮助寻找输尿管。

在 URSL 和 PCNL 手术中均有结石移位和较大的结石碎片残留,予以留置双 J 管,术后行 ESWL,结石多顺利排出。有报道称在 URSL 中结石移位,输尿管镜通过肾盂可看到肾盂甚至部分肾盏,可直视下行 PCNL,取出结石^[11]。

参考文献:

- [1] 李旭明,程洪林,郭闯,等. 3 种微创手术治疗复杂性输尿管上段结石 212 例比较[J]. 重庆医学,2011,40(3):271-273.
- [2] Feng C, Ding Q, Jiang H, et al. Use of NTrap during ureteroscopic Holmium:YAG laser lithotripsy of upper ureteral calculi [J]. Minim Invasive Ther Allied Technol, 2012,21(2):78-82.
- [3] Cohen J, Cohen S, Grasso M. Ureteropyeloscopy treatment of large, complex intrarenal and proximal ureteral

calculi[J]. BJU Int, 2013, 111(3 Pt B):E127-131.

- [4] 尹志康,唐伟,陈刚,等. 经皮肾镜钬激光碎石治疗肾结石 41 例[J]. 重庆医学,2008,37(14):1539-1542.
- [5] 宋立. 微创经皮肾镜取石术的临床效果分析[J]. 第四军医大学学报,2008,29(10):921-923.
- [6] Zhong W, Zeng G, Wu W, et al. Minimally invasive percutaneous nephrolithotomy with multiple mini tracts in a single session in treating staghorn calculi [J]. Urol Res, 2011,39(2):117-122.
- [7] Song L, Chen Z, Liu T, et al. The application of a patented system to minimally invasive percutaneous nephrolithotomy [J]. J Endourol, 2011,25(8):1281-1286.
- [8] 程晓冬,丛军,施卫国,等. 后腹腔镜肾盂输尿管切开取石术(附 12 例报告)[J]. 中国内镜杂志,2005,11(4):392-393.
- [9] 郑盛风,杨兵. 输尿管镜气压弹道碎石术治疗 158 例输尿管结石的疗效观察[J]. 重庆医学,2009,38(9):1102-1103.
- [10] 陈刚,吴小侯,唐伟,等. 输尿管镜下钬激光治疗合并息肉的输尿管结石[J]. 重庆医学,2009,38(17):2144-2145.
- [11] 陈合群,刘玉明,陈湘,等. 输尿管上段结石的微创手术治疗[J]. 临床泌尿外科杂志,2004,19(6):333-335.

(收稿日期:2013-01-08 修回日期:2013-03-21)

(上接第 2338 页)

参考文献:

- [1] Arbyn M, Castellsague X, de Sanjose S, et al. Worldwide burden of cervical cancer in 2008 [J]. Ann Oncol, 2011,22(12):2675-2686.
- [2] Castaneda CA, Cortes-Funes H, Gomez HL, et al. The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer [J]. Cancer Metastasis Rev, 2010,29(4):751-759.
- [3] Xia S, Zhao Y, Yu S, et al. PI3K/Akt/COX-2 pathway induces resistance to radiation in human cervical cancer HeLa cells [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2010,25(3):317-323.
- [4] Wang D, Chen J, Chen H, et al. Leptin regulates proliferation and apoptosis of colorectal carcinoma through pi3k/akt/mtor signalling pathway [J]. Biosci, 2012,37(1):91-101.
- [5] Cai D, Wang Y, Ottmann OG, et al. Flt3-Itid-, but not bcr/abl-transformed cells require concurrent akt/mtor blockade to undergo apoptosis after histone deacetylase inhibitor treatment [J]. Blood, 2006,107(5):2094-2097.
- [6] Park KR, Nam D, Yun HM, et al. Beta-caryophyllene oxide inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of pi3k/akt/mtor/s6k1 pathways and ros-mediated mapks activation [J]. Cancer Lett, 2011,312(2):

178-188.

- [7] 乐杰. 妇产科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社,2008:263.
- [8] Griesser H, Sander H, Walczak C, et al. HPV vaccine protein L1 predicts disease outcome of high-risk + HPV early squamous dysplastic lesions [J]. Am J Clin Pathol, 2009,132(6):840-845.
- [9] Sudarshan SR, Schlegel R, Liu X. The HPV-16E5 protein represses expression of stress pathway genes XBP-1 and COX-2 in genital keratinocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010,399(4):617-622.
- [10] Kim SH, Juhnn YS, Kang S, et al. Human papillomavirus 16 E5 up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor through the activation of epidermal growth factor receptor, MEK/ERK1,2 and PI3K/Akt Cell [J]. Cell Mol Life Sci, 2006,63(7/8):930-938.
- [11] 夏曙,于世英. 抑制 PI3K/AKT 提高药物对 HeLa 细胞放射增敏作用的研究 [J]. 中华放射肿瘤学杂志,2006,15(5):419-422.
- [12] Moulder S, Gladish G, Ensor J, et al. A phase 1 study of weekly everolimus (RAD001) in combination with docetaxel in patients with metastatic breast cancer [J]. Cancer, 2012,118(9):2378-2384.

(收稿日期:2012-12-08 修回日期:2013-03-17)