

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.10.020

PI3k/Akt 蛋白及 mRNA 在 60 例胃癌中的表达及意义*

程 玉¹,李建玲²,刘海旺¹,李春辉^{1△}

(承德医学院附属医院:1. 病理科;2. 麻醉科,河北承德 067000)

[摘要] **目的** 探讨磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(Akt)在胃癌组织及远端正常组织中的表达情况,分析其表达与胃癌临床病理特征之间的关系。**方法** 应用免疫组化 S-P 法、逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 60 例胃癌组织和 25 例正常胃组织(距癌边缘 10 cm 以上的胃组织)中 PI3K、Akt 蛋白及 mRNA 的表达。**结果** PI3K、Akt 在胃癌组织中的表达均明显高于在远端正常胃组织中的表达,差异有统计学意义($P < 0.01$),二者在胃癌组织中的表达均与胃癌的分化程度、TNM 分期、浸润深度、淋巴结转移情况相关($P < 0.05$)。**结论** PI3k/Akt 蛋白及 mRNA 参与了胃癌的发生、发展、浸润转移,在胃癌的癌变过程中起着重要作用。

[关键词] 胃肿瘤;1-磷脂酰肌醇 3-激酶;蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶;免疫组织化学;逆转录聚合酶链反应

[中图分类号] R735.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)10-1352-03

Expression of PI3k/Akt protein and mRNA in 60 cases of gastric carcinoma and its significance*

Cheng Yu¹, Li Jianling², Liu Haiwang¹, Li Chunhui^{1△}

(1. Department of Pathology; 2. Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde, Hebei 067000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the expression of phosphoinositide 3 kinase (PI3K) and Akt in gastric carcinoma tissues and the distal normal tissues, and to analyze their correlation with the clinical pathologic characteristics of gastric cancer. **Methods** The S-P immunohistochemistry and RT-PCR were used to detect the expression of PI3K and Akt protein and mRNA in 60 cases of gastric carcinoma tissues and 25 cases of normal gastric mucosal tissues. **Results** The expression of PI3K and Akt in the gastric carcinoma tissues was significantly higher than that in the distal normal gastric tissues with statistical difference ($P < 0.05$) and their expression in gastric carcinoma tissues was significantly related with the pathologic differentiation degree, TNM stage, invasion depth and lymph node metastasis ($P < 0.05$). **Conclusion** PI3k/Akt protein and mRNA participate in the occurrence, development, infiltration and metastasis process of gastric cancer, and play an important role in the canceration of gastric carcinoma.

[Key words] stomach neoplasms; 1-phosphatidylinositol 3-kinase; protein-serine-threonine kinase; immunohistochemistry; reverse transcriptase polymerase chain reaction

近年来,随着分子生物学的发展,信号转导通路已成为肿瘤发病机制和靶向治疗研究的热点。磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphoinositide 3 kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)信号转导通路在多种肿瘤的发生、发展过程中都扮演着重要角色^[1-2]。本研究利用免疫组化和逆转录聚合酶链反应(reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)技术从蛋白和基因水平观察 PI3K、Akt 在胃癌和远端正常组织中的表达,分析 PI3K/Akt 蛋白及 mRNA 与胃癌临床病理特征的关系,探讨其在胃癌发生、发展中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集承德医学院附属医院 2012 年 7 月至 2013 年 2 月手术切除的胃癌组织 60 份(胃癌组)及距癌边缘 10 cm 以上正常胃组织 25 份(对照组),术前均未行化疗、放疗,所有病例经术后病理学检查证实为胃腺癌,相应癌旁组织均未见癌细胞累及。60 例胃癌患者中,男 45 例、女 15 例;年龄 45~77 岁,中位 50 岁;高中分化者 24 例、低分化者 36 例,Ⅰ、Ⅱ期患者 28 例,Ⅲ、Ⅳ患者 32 例,癌组织穿透浆膜者 48 例,有淋巴结转移者 35 例。所有标本离体后立即分为两份,一份在离体后 30 min 内储存在-80℃冰箱里,另一部分离体后

立即置于 10% 福尔马林溶液中固定,常规石蜡包埋。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 兔抗人 PI3K (P85 α 亚型)、Akt1/2 浓缩型多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司,工作浓度 1:100。RT-PCR 试剂盒及 DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司,PCR 引物由北京赛百盛基因技术有限公司设计合成。P85 α 上游引物:5'-TGC TAT GCC TGC TCT GTA GTG GT-3',下游引物:5'-GTG TGA CAT TGA GGG AGT CGT TG-3',扩增片段为 175 bp;Akt 上游引物:5'-GTG CTG GAG GAC AAT GAC TAC GG-3',下游引物:5'-AGC AGC CCT GAA AGC AAG GA-3',扩增片段为 194 bp; β -actin 上游引物:5'-AGC GGG AAA TCG TGC GTG AC-3',下游引物:5'-ACA TCT GCT GGA AGG TGG AC-3',扩增片段为 453 bp。

1.2.2 免疫组化检测 采用 S-P 法,严格按照说明书实验步骤进行操作。最后组织切片用 PBS 替代 PI3K、Akt 作为阴性对照,用已知阳性切片做阳性对照。PI3K、Akt 阳性染色呈黄色至棕黄色,主要定位于癌细胞细胞质。在染色均匀的区域,选取 5 个高倍镜视野($\times 200$),按阳性细胞百分率(A 值)评分:1%~25% 为 1 分,25%~50% 为 2 分,50% 为 3 分;

* 基金项目:河北省医学科学研究重点课题(ZL20140103)。 作者简介:程玉(1988-),在读硕士研究生,主要从事胃癌的基础与临床研究。△ 通讯作者, Tel:15633142839; E-mail:chli612@126.com。

(2)按染色强度(B值)评分:不着色为0分,浅棕黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。两项得分相加小于或等于2分为阴性,>2分为阳性。

1.2.3 RT-PCR 检测 采用 Triazol 试剂盒分别提取胃癌及远端正常胃组织总 RNA,分析其完整性、纯度和浓度,并作 RT-PCR 检测。PI3K 的循环条件为 94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,35 个循环;72 °C 再延伸 5 min。Akt 的循环条件为 94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,35 个循环;72 °C 再延伸 5 min。 β -actin 的循环条件为 94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,30 个循环;72 °C 再延伸 5 min。PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳进行定性检测,相应位点出现单一电泳条带为阳性表达。以 β -actin 做内参照,电泳结果用凝胶图像分析系统进行光密度测定。

1.3 统计学处理 实验数据通过 SPSS17.0 统计软件进行处理,免疫组化结果采用 χ^2 进行统计检测,PCR 灰度值用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用两独立样本 *t* 检验检测,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组 PI3K、Akt 蛋白表达情况及二者的相关性 PI3K 蛋白在 60 份胃癌组织中,阳性表达 52 份(86.67%),Akt 蛋白在 60 份胃癌组织中,阳性表达 43 份(71.67%);二者在 25 份正常组织中无表达或弱阳性表达,PI3K、Akt 在胃癌组织中的阳性表达明显高于在正常胃组织中表达,差异有统计学意义($P < 0.01$)。且二者的表达呈正相关关系($r = 0.297, P < 0.05$),见表 1、2。

表 1 PI3K 和 Akt 蛋白在两组标本组织中的表达

组别	n	PI3K			Akt				
		+	-	χ^2	P	+	-	χ^2	P
胃癌组	60	52	8	35.505	0.000	43	17	25.302	0.000
对照组	25	5	20			3	22		

表 2 在胃癌中 PI3K 和 Akt 蛋白表达的相关性

Akt	PI3K		r	P
	+	-		
+	40	3	0.297	0.021
-	12	5		

2.2 PI3K、Akt 蛋白表达与胃癌临床病理特征的关系 PI3K、Akt 蛋白的表达与患者的年龄、性别均无相关($P > 0.05$),而与胃癌的分化程度、肿瘤分期、浸润深度及淋巴结转移情况均密切相关($P < 0.05$),见表 3、图 1。

表 3 PI3K 和 Akt 蛋白表达与胃癌临床特征的相关性

临床特征	n	PI3K 蛋白			Akt 蛋白				
		阴性	阳性	χ^2	P	阴性	阳性	χ^2	P
年龄(岁)									
>50	52	6	46	0.234	0.628	14	38	0.039	0.844
≤50	8	2	6			3	5		
性别									
男	45	4	41	1.731	0.188	10	35	2.216	0.137
女	15	4	11			7	8		
组织学分级									
高-中分化	24	7	17	6.544	0.011	13	11	13.146	0.000

续表 3 PI3K 和 Akt 蛋白表达与胃癌临床特征的相关性

临床特征	n	PI3K 蛋白			Akt 蛋白				
		阴性	阳性	χ^2	P	阴性	阳性	χ^2	P
低分化	36	1	35			4	32		
临床分期									
I/II	28	7	21	4.436	0.035	12	16	5.454	0.020
III/IV	32	1	31			5	27		
黏膜侵犯									
有	48	3	45	7.581	0.006	9	39	10.855	0.001
无	12	5	7			8	4		
淋巴结转移									
有	35	1	34	5.951	0.015	6	29	5.180	0.023
无	25	7	18			11	14		

2.3 两组 PI3K、Akt mRNA 表达比较 胃癌组织中 PI3K 与 β -actin、Akt 与 β -actin 的灰度值比显著高于远端正常胃组织(图 2),差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 4。

表 4 两组 PI3K、Akt mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PI3K mRNA	Akt mRNA
胃癌组	60	0.81 ± 0.29	0.56 ± 0.20
对照组	25	0.39 ± 0.06	0.31 ± 0.26
<i>t</i>		7.355	3.204
<i>P</i>		0.000	0.003

2.4 PI3K、Akt mRNA 表达与胃癌临床病理特征的关系 胃癌组织中 PI3K、Akt mRNA 的表达与患者的年龄、性别均无相关($P > 0.05$),而与肿瘤的分化程度、肿瘤分期、浸润深度及淋巴结转移情况均密切相关($P < 0.05$),见表 5。

表 5 PI3K、Akt mRNA 的表达与胃癌临床特征的相关性($\bar{x} \pm s$)

临床特征	n	PI3K mRNA	<i>t</i>	<i>P</i>	Akt mRNA	<i>t</i>	<i>P</i>
年龄(岁)							
>50	52	0.58 ± 0.08	0.681	0.953	0.49 ± 0.20	3.426	0.756
≤50	8	0.51 ± 0.10			0.53 ± 0.09		
性别							
男	45	0.59 ± 0.08	0.975	0.392	0.50 ± 0.13	1.338	0.234
女	15	0.52 ± 0.07			0.59 ± 0.05		
组织学分级							
高-分化中	24	0.72 ± 0.20	2.402	0.021	0.47 ± 0.17	2.440	0.020
低分化	36	0.90 ± 0.33			0.65 ± 0.19		
临床分期							
I/II	28	0.75 ± 0.25	4.740	0.000	0.44 ± 0.09	5.130	0.000
III/IV	32	1.25 ± 0.20			0.76 ± 0.17		
黏膜侵犯							
有	48	1.06 ± 0.76	3.078	0.003	0.68 ± 0.21	2.540	0.020
无	12	0.76 ± 0.25			0.49 ± 0.16		
淋巴结转移							
有	35	1.24 ± 0.15	10.300	0.000	0.77 ± 0.21	3.710	0.000
无	25	0.68 ± 0.17			0.49 ± 0.14		

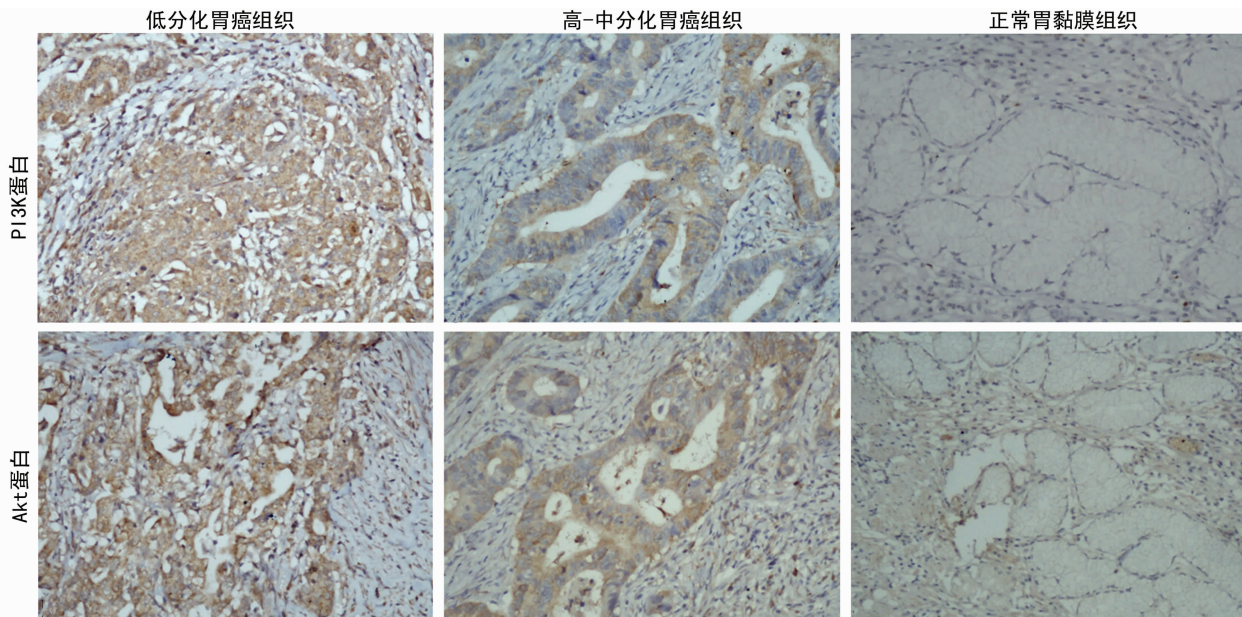
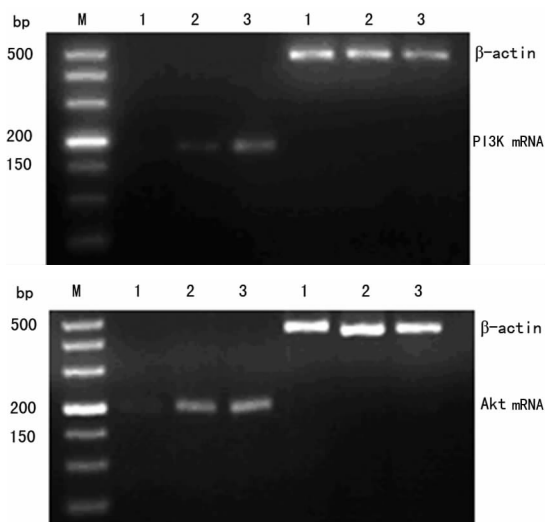


图1 PI3K及Akt蛋白在两组标本组织中的表达($\times 200$)



M: 标记物; 1: 正常胃黏膜; 2: 高-中分化胃癌组织; 3: 低分化胃癌组织。

图2 PI3K、Akt mRNA 在两组标本中的表达

3 讨论

PI-3K/Akt 信号转导通路是一条酪氨酸激酶级联信号通路,其中 PI3K 是此信号通路的始动因子。Src、Ras、Rac、Abl、v-Crk 等具有酪氨酸激酶活性的癌性蛋白可与 PI3K 的调节亚基 p85 结合而发生作用,这些癌性蛋白的异常活化可使 PI3K 持续活化,致细胞形态改变、凋亡受阻,导致细胞转化及过度增殖^[3]。PI3K 还可以将具有 PH 结构域的信号分子 Akt 招募到质膜上进行活化,活化的 Akt 进一步激活下游信号分子,对细胞功能进行调控^[4]。通过对底物的磷酸化,Akt 可阻断代谢抑制激酶如腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)的活性^[5],上调细胞的新陈代谢活性^[6];并且其还可使细胞周期激酶抑制剂 p21、p27 失活,从而促进细胞生长、存活及肿瘤生成。本研究结果显示,PI3K、Akt 在胃癌组织中的表达明显高于在远端正常组织中的表达,差异有统计学意义($P < 0.01$),且随着胃癌分化程度高 \rightarrow 中 \rightarrow 低变化,TNM 分期 I、II 期 \rightarrow III、IV 期改变,PI3K、Akt 阳性表达明显增高,提示

PI3K/Akt 信号转导通路与胃癌的发生与发展有关。本实验结果与 Horiguchi 等^[7]的报道中提及的胃癌中 Akt 激酶活性增高的现象一致。Osaki 等^[8]发现,在胃癌细胞系 MKN-45 中,PI3K/Akt 信号转导通路在抵抗 Fas 调节的凋亡中起重要作用。已有研究发现 Akt 上游调节器肝细胞生长因子(HGF)及其受体 c-Met 高表达于胃癌中,c-Met 小分子量抑制剂 PHA-665752 可减少 Akt 信号的激活,使胃癌异种移植模型中肿瘤细胞减少^[9]。PI3K/Akt 信号转导通路可将有丝分裂信号传递给 p70s6k,使细胞周期素(cyclin)、细胞周期依赖性蛋白激酶 4(CDK4)等细胞周期主要蛋白的翻译上调,同时抑制 CDK4 的表达,促进 G 期进展,使细胞周期加速,促进细胞增殖和分化,从而促进肿瘤的发生、发展^[10]。

本研究还发现随着胃癌浸润程度的增加,淋巴结转移灶的出现,PI3K、Akt 的阳性表达明显增高,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示 PI3K/Akt 信号转导通路参与了胃癌的浸润转移。活化的 PI3K/Akt 信号转导通路可以上调基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9 mRNA 和蛋白的表达,降解细胞外基质,突破基底膜,促进侵袭浸润^[11]。Akt 能磷酸化 GSK3 β ,拮抗 β -CAT 的降解,增高其浓度,从而下调 E-钙黏素表达最终减弱了细胞的黏附能力^[12]。活化的 Akt 还可以增加 NF- κ B 的转录活性,增加肿瘤细胞的运动功能,有助于癌细胞侵袭。Akt 还能上调胰腺癌细胞的胰岛素样生长因子受体(IGF-IR),IGF-IR 在许多恶性肿瘤中过表达并且与肿瘤细胞的侵袭与转移相关^[13-14]。

综上所述,本实验从基因和蛋白水平证实了 PI3K、Akt 在胃癌组织中高表达,PI3K/Akt 信号转导通路参与了胃癌的发生、发展及浸润转移等生物学行为。进一步扩大研究对象并采用多种研究方法检测 PI3K、Akt 与胃癌的临床病理意义,可能为胃癌的早期诊断寻找敏感标志物并且为临床治疗提供新的靶点。

参考文献

- [1] Papadimitrakopoulou V. Development of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors and their application in personalized therapy for non-small-cell lung cancer[J]. Thorac Oncol, 2012, 7(8):1315-1326. (下转第 1357 页)

规律有效的被动张口训练(特制木楔式撑口器)至少 1 年。本研究关节强直患者伴有小颌畸形,为了减轻因颞部畸形造成的心理压力,提高患者术后生存质量,同期行颞前徙成形手术的必要性是明确的,由于颞前徙成形手术的手术部位靠前,对下颌骨后段特别是髁突的移位并未产生特别大的影响,术后所有患者移植髁突在关节窝内稳定,张口度明显改善,术后面形改善良好。但有 1 例患者出现移植髁突明显吸收,可能与局部炎症及机械刺激强度明显有关。

综上所述,自体髁突移植再造髁突的关节成形手术伴同期颞前徙成形手术的疗效确切,术后并发症少。因此,两种术式的早期联合应用,对于颞颌关节强直伴有小颌畸形患者的治疗是一种新的有效方法。

参考文献

- [1] Chrcanovic BR. Open versus closed reduction; mandibular condylar fractures in children[J]. *Oral Maxillofac Surg*, 2012, 16(3):245-255.
- [2] Jain G, Kumar S, Rana AS, et al. Temporomandibular joint ankylosis; a review of 44 cases[J]. *Oral Maxillofac Surg*, 2008, 12(2):61-66.
- [3] Rao K, Kumar S, Kumar V, et al. The role of simultaneous gap arthroplasty and distraction osteogenesis in the management of temporo-mandibular joint ankylosis with mandibular deformity in children[J]. *J Craniomaxillofac Surg*, 2004, 32(1):38-42.
- [4] Arakeri G, Kusanale A, Zaki GA, et al. Pathogenesis of post-traumatic ankylosis of the temporomandibular joint: a critical review[J]. *Br J Oral Maxillofacial Surgery*,

2012, 50(1):8-12.

- [5] Güven O. A clinical study on temporomandibular joint ankylosis in Children[J]. *J Craniofac Surg*, 2008, 19(5):1263-1269.
- [6] 胡静,殷峰松. 正颌外科与颞下颌关节[J]. *口腔颌面外科杂志*, 1999, 9(1):57-59.
- [7] 李自力,王兴,张熙恩,等. 颞下颌关节强直继发颌面畸形的外科矫治[J]. *中华口腔医学杂志*, 1997, 32(1):10-12.
- [8] 张晓虎,杨驰,房兵,等. 同期关节重建及下颌体牵张成骨治疗颞下颌关节强直 3 例报道[J]. *中国口腔颌面外科杂志*, 2007, 5(6):436-439.
- [9] Phillips JH, Rechner B, Tompson BD. Mandibular growth following reconstruction using a free fibula graft in the pediatric facial skeleton[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2005, 116(2):419-424.
- [10] Landa LE, Gordon C, Dahar N, et al. Evaluation of long-term stability in second metatarsal reconstruction of the temporomandibular joint[J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2003, 61(1):65-71.
- [11] Saeed N, Hensher R, McLeod N, et al. Reconstruction of the temporomandibular joint autogenous compared with alloplastic[J]. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2002, 40(4):296-299.
- [12] 刘尧,祝颂松,李继华,等. 自体髁突移植再造髁突关节成形术疗效评估[J]. *实用口腔医学杂志*, 2009, 25(5):668-671.

(收稿日期:2014-10-26 修回日期:2014-12-21)

(上接第 1354 页)

- [2] Bavec S, Argyle DJ. Receptor tyrosine kinase inhibitor: molecularly targeted drugs for veterinary cancer therapy[J]. *Vet Comp Oncol*, 2012, 10(3):163-173.
- [3] Zenonos K, Kyprianou K. RAS signaling pathways, mutation and their role in colorectal cancer[J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2013, 5(5):97-101.
- [4] Ji WT, Liu HJ. PI3K-Akt signaling and viral infection[J]. *Recent Pat Biotechnol*, 2008, 2(3):218-226.
- [5] Hahn-Windgassen A, Nogueira V, Chen CC, et al. Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(37):32081-32089.
- [6] Robey RB, Hay N. Is Akt the "Warburg kinase"? -Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis[J]. *Semin Cancer Biol*, 2009, 19(1):25-31.
- [7] Horiguchi A, Oya M, Uchida A. Elevated Akt activation and its impact on clinicopathological features of renal cell carcinoma[J]. *Urol*, 2003, 169(2):710-713.
- [8] Osaki M, Kase S, Adachi K, et al. Inhibition of the PI3K-Akt signaling pathway enhances the sensitivity of Fas-mediated apoptosis in human gastric carcinoma cell line, MKN-45[J]. *Cancer Res Clin Oncol*, 2004, 130(1):8-14.
- [9] Christensen JG, Schreck R, Burows J, et al. A selective

small molecule inhibitor of c-Met kinase inhibits c-Met-dependent phenotypes in vitro and exhibits cytoreductive antitumor activity in vivo[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(21):7345-7355.

- [10] Qian Y, Corum L, Meng Q, et al. PI3K induced actin filament remodeling through Akt and p70S6K1; implication of essential role in cell cycle[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 286(1):153-163.
- [11] Ferretti C, Bruni L, Dangles-Marie V, et al. Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts[J]. *Hum Reprod Update*, 2007, 13(2):121-141.
- [12] Qiao M, Sheng S, Pardee AB. Metastasis and AKT activation[J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(19):2991-2996.
- [13] Blanco-Aparicio C, Renner O, Leal JF, et al. PTEN: more than the AKT pathway[J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(7):1379-1386.
- [14] Zhou X, Tan M, Stone Hawthorne V, et al. Activation of the/mammalian target of Rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB overexpression predicts tumor progression in breast cancers[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(20):6779-6788.

(收稿日期:2014-11-15 修回日期:2014-12-10)