

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.07.013

# 乳腺浸润性导管癌中 AKT 和 VEGF-C 的表达及其与淋巴道转移的相关性

李小芳,姜汉国,李飞虹,蔡琼珍

## Expression of AKT and VEGF-C in Breast Invasive Ductal Carcinoma and Their Correlations with Lymphatic Metastasis

LI Xiao-fang,JIANG Han-guo,LI Fei-hong, CAI Qiong-zhen

Department of Pathology in Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China

Corresponding Author: JIANG Han-guo, E-mail: jianghg12@163.com

**Abstract: Objective** To discuss the relationship between AKT, p-AKT, AKT2, VEGF-C expression and lymphatic metastasis of breast invasive ductal carcinoma (IDC) and to research the relevance between AKT and VEGF-C, p-AKT and VEGF-C, AKT2 and VEGF-C in IDC. **Methods** RT-PCR was used to detect the expressions of AKT2 and VEGF-C mRNA on 17 fresh breast cancer tissues. Immunohistochemical (IHC) method (SP) was used to examine the expressions of AKT, p-AKT, AKT2 and VEGF-C protein in paraffin-embedded specimens of 74 breast invasive ductal carcinomas. Western-blot was used to detect the expressions of AKT, p-AKT, AKT2 and VEGF-C protein on 17 fresh breast cancer tissues. **Results** The expression of AKT2 mRNA in IDC with lymphatic metastasis was higher than that in IDC without lymphatic metastasis ( $P < 0.05$ ). And there was no significant difference on the expression of VEGF-C mRNA ( $P > 0.05$ ). The difference between the expressions of AKT2 and VEGF-C protein in the two groups were statistically significant ( $P < 0.05$ ). There was no significant differences between the expression of AKT and p-AKT protein in the two groups ( $P > 0.05$ ). The expressions of p-AKT, AKT2 and VEGF-C protein in metastasis group were higher than those in non-metastasis group. There was no significant difference on the expression of AKT protein between two groups. There were significant positive correlations between expression of AKT and VEGF-C, p-AKT and VEGF-C in breast cancer ( $r = 0.283, P = 0.015$ ;  $r = 0.328, P = 0.004$ ). There was no significant correlations between expression of AKT2 and VEGF-C in IDC ( $r = 0.072, P = 0.543$ ). **Conclusion** The expressions of AKT2 and VEGF-C were closely related to lymphatic metastasis of IDC. AKT2 and VEGF-C can be used as predictors of lymphatic metastasis.

**Key words:** Breast neoplasm; AKT; VEGF-C; Tumor metastasis

**摘要: 目的** 探讨 AKT、p-AKT、AKT2 及 VEGF-C 表达与乳腺浸润性导管癌淋巴结转移的关系, 以及乳腺浸润性导管癌中 AKT、p-AKT 和 AKT2 与 VEGF-C 表达的关系。**方法** 采用 RT-PCR 法检测 17 例乳腺浸润性导管癌新鲜组织中 AKT2 和 VEGF-C mRNA 的表达; 用免疫组织化学 SP 法检测 74 例乳腺浸润性导管癌石蜡标本中 AKT、p-AKT、AKT2 和 VEGF-C 蛋白的表达, 用 Western blot 法检测 17 例乳腺浸润性导管癌新鲜标本中 AKT、p-AKT、AKT2 和 VEGF-C 蛋白的表达。**结果** AKT2 mRNA 在淋巴结转移组中的表达高于无淋巴结转移组 ( $U = 14.000, P = 0.043$ ), VEGF-C mRNA 在两组乳腺浸润性导管癌组织中表达水平差异无统计学意义 ( $U = 29.000, P = 0.601$ ); AKT2 和 VEGF-C 蛋白在有淋巴结转移组中的表达均高于无淋巴结转移组 ( $P < 0.05$ ), 而 AKT 及 p-AKT 的表达在两组间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); p-AKT、AKT2 及 VEGF-C 蛋白在淋巴结转移组中表达均高于无淋巴结转移组; 在乳腺浸润性导管癌中 VEGF-C 与 AKT、VEGF-C 与 p-AKT 的表达均呈显著正相关 ( $r$  分别为 0.283 和 0.328,  $P$  值分别为 0.015 和 0.004), VEGF-C 与 AKT2 的表达无相关性 ( $r = 0.072, P = 0.543$ )。**结论** AKT2 及 VEGF-C 与乳腺浸润性导管癌淋巴结转移密切相关, 可作为乳腺浸润性导管癌淋巴结转移的预测因子。

**关键词:** 乳腺肿瘤; AKT; VEGF-C; 肿瘤转移

**中图分类号:** R737.9; R73-37

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-8578(2010)07-0781-05

**收稿日期:** 2009-03-18; **修回日期:** 2009-11-19

**作者单位:** 524001 广东湛江, 广东医学院附属医院病理科

**通信作者:** 姜汉国, E-mail: jianghg12@163.com

**作者简介:** 李小芳 (1983-), 女, 硕士, 住院医师, 主要从事乳腺癌的基础和临床研究

## 0 引言

乳腺癌是危害妇女健康最主要的恶性肿瘤之一。浸润性导管癌 (invasive ductal carcinoma, IDC) 是乳腺癌中最常见的组织学类型, 约占乳腺癌的 70% 左右。大量研究证实, 淋巴结转移与否是乳腺癌重要的预后因素之一。因此在乳腺癌的诊断与治疗过程中, 如何早期检测和控制淋巴结转移则成为乳腺癌防治的重要环节。目前, 乳腺癌的转移机制仍不清楚。近年来, 有很多学者研究发现 AKT 的活化与肿瘤的浸润转移有关。VEGF-C (vascular endothelial growth factor-C) 是人类发现的第一种促淋巴管生成因子, 在肿瘤的淋巴道转移中起重要作用。有学者报道, 在胃癌组织中可能存在 p-AKT/VEGF-C 通路促进胃癌的恶性生物学表型<sup>[1]</sup>。本实验以乳腺浸润性导管癌为研究对象, 初步探讨 AKT、p-AKT、AKT2 及 VEGF-C 与乳腺浸润性导管癌淋巴结转移的相关性。

## 1 资料与方法

### 1.1 资料

#### 1.1.1 一般资料

收集广东医学院附属医院病理科 2006 年 1 月—2007 年 3 月存档蜡块标本, 其中无淋巴结转移乳腺浸润性导管癌 37 例, 有淋巴结转移的乳腺浸润性导管癌 37 例。均为女性, 年龄 32~72 岁 (中位年龄 48 岁)。按照病理报告中大体描述的肿瘤最大直径作为肿瘤大小的数值, 最大者 10.0cm, 最小者 1.5cm, 中位数为 3.5cm。根据 WHO (2003 年) 进行临床分期: I 期 7 例, II 期 50 例, III 期 16 例, IV 期 1 例。所有标本均用 10% 福尔马林固定, 石蜡包埋切片, 厚 4 $\mu$ m。另收集 2006 年 11 月~2007 年 3 月广东医学院附属医院外科切除的乳腺浸润性导管癌新鲜标本 17 例, 其中无淋巴结转移组 7 例, 有淋巴结转移组 10 例, 所有标本取约 1.2cm<sup>3</sup> 装入冻存管中, 迅速放入 -70℃ 冰箱内保存备用。

#### 1.1.2 主要试剂

兔抗人 p-AKT (Thr473) 单克隆抗体购于 Cell Signaling 公司, 兔抗人 AKT2 单克隆抗体购于 Signalway Antibody 公司, 兔抗人 AKT 多克隆抗体和兔抗人 VEGF-C 多克隆抗体购于 Santa Cruz 公司; 一步法 RT-PCR 试剂盒购于 QIAGEN 公司, Trizol 试剂为 Invitrogen 公司产品, RT-PCR 引物由上海生物公司合成; 化学发光剂为 Santa Cruz 公司产品, 预染色的蛋白 Marker 购自北京华美生物有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 法检测 AKT2 及 VEGF-C mRNA 的表达

TRIzol 法提取组织总 RNA, 每例取总 RNA 2 $\mu$ g 进行逆转录聚合酶链反应, 同时扩增 GAPDH 作为内参照, 每个标本至少重复 3 遍。AKT2 引物序列 (276bp), 正义: 5'-GGC CCC TGA TCA GAC TCT A-3', 反义: 5'-TCC TCA GTC GTG GAG GAG T-3'; VEGF-C 引物序列 (130bp), 正义: 5'-GGC TGT TTG GTC ATT GGC -3', 反义: 5'-TGG GTC CAT GCT AAC AAA GA -3'; 内参 GAPDH 引物序列 (339bp), 正义: 5'-GGA AGC TTG TCA TCA ATG G-3', 反义: 5'-AAT CCA AGC CCT TTG CTG TT-3'。50℃ 30min 逆转录合成 cDNA, 95℃ 15min 预变性后开始循环: 94℃ 45s, 52℃~58℃ 45s, 72℃ 1min, 共 35 个循环, 最后于 72℃ 延伸 10min。扩增产物在 2.0% 琼脂糖凝胶上电泳分离, 紫外透射仪下拍照。采用图像分析软件 BandScan4.3 版分析电泳条带的光密度值, 目的条带与内参条带吸光度值的比值即为 AKT2 及 VEGF-C mRNA 相对表达量。

1.2.2 免疫组织化学法检测 AKT、p-AKT、AKT2 及 VEGF-C 蛋白的表达

SP 法对 74 例乳腺浸润性导管癌组织进行检测, 操作按 SP 试剂盒说明书进行。经 DAB 显色, 苏木精对比染色后封片, 于 48h 内光学显微镜下阅片。结果判断: 每一批免疫组织化学均设已知阳性对照和用 PBS 代替一抗的空白对照。AKT 及 VEGF-C 阳性表达定位于细胞质, p-AKT 及 AKT2 阳性表达大部分定位于胞质, 少部分定位于胞核, 均呈棕黄色或棕褐色颗粒样分布。由两人分别对实验结果进行双盲法评估。每一切片随机选择 3 个视野 ( $\times 100$ ), 在显微镜 ( $\times 400$ ) 下计数每个视野 100 个肿瘤细胞中阳性细胞的比例, 取 3 个视野的平均百分数为判定结果。评分标准参照文献<sup>[2]</sup>作适当修改: 阳性细胞数  $\leq 5\%$  为 0 分;  $> 5\% \sim 25\%$  为 1 分;  $> 25\% \sim 50\%$  为 2 分;  $51\% \sim 75\%$  为 3 分;  $> 75\%$  为 4 分。染色强度: 0 分为无染色; 1 分为淡黄色; 2 分为黄色; 3 分为棕黄色。免疫组织化学结果根据染色阳性细胞数和染色强度分别评分, 两者乘积 0~1 分为阴性 (-); 2~3 分为阳性 (+ ~ ++); 4 分以上为强阳性 (+++).

1.2.3 Western 印迹检测 AKT、p-AKT、AKT2 及 VEGF-C 蛋白的表达水平

从乳腺癌组织中提取蛋白, 以  $\beta$ -actin 的水平作为等量蛋白质上样对照, 每个样本至少重复 3 遍, 取 50  $\mu$ g 蛋白质样品进行 SDS-PAGE 电泳, 并转至硝酸纤维素膜上; 室温封闭 2 h 后, 用 TBST 缓冲液漂洗 3 次, 分别加入 AKT、p-Akt、AKT2 或 VEGF-C 抗体 (1:1 000) 4℃ 孵育过夜, TBST 漂洗 3 次后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (1:2 000), 室温摇

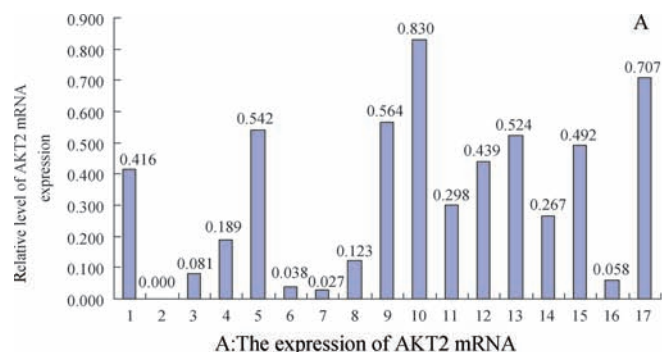
床孵育 2 h, 增强化学发光显色系统显色, 暗室内 X 线底片感光成像, 将胶片进行扫描或拍照, 以  $\beta$ -actin 蛋白水平作为内对照, 采用图像分析软件 Band-Scan4.3 版分析目标带的吸光度值。

### 1.3 统计学方法

数据采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析。根据资料类型和统计目的不同分别做行  $\times$  列表  $\chi^2$  检验, 四格表  $\chi^2$  检验, Spearman 相关分析, 独立样本  $t$  检验和 Wilcoxon 两样本比较法。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

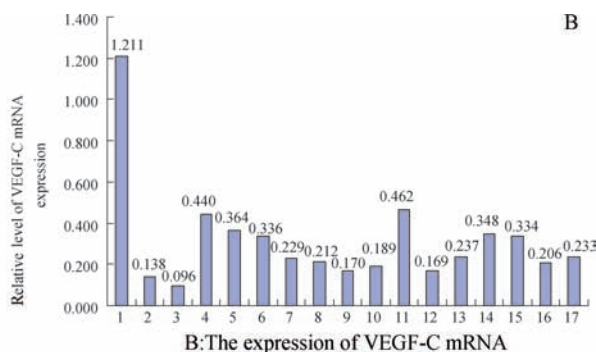
## 2 结果

### 2.1 AKT2 和 VEGF-C mRNA 在两组乳腺癌中



的表达

AKT2 和 VEGF-C mRNA 在无淋巴结转移组的乳腺浸润性导管癌组织中有 1 例无表达, 其余 16 例乳腺浸润性导管癌组织中均有表达; 统计分析显示 AKT2 mRNA 在淋巴结转移的乳腺浸润性导管癌组织中表达高于无淋巴结转移组, 两组间比较差异有统计学意义 ( $U = 14.000, P = 0.043$ ), 见图 1A、2A。VEGF-C mRNA 在 17 例乳腺浸润性导管癌组织中均有表达, VEGF-C 在两组乳腺浸润性导管癌组织中表达水平差异无统计学意义 ( $U = 29.000, P = 0.601$ ), 见图 1B、2B。

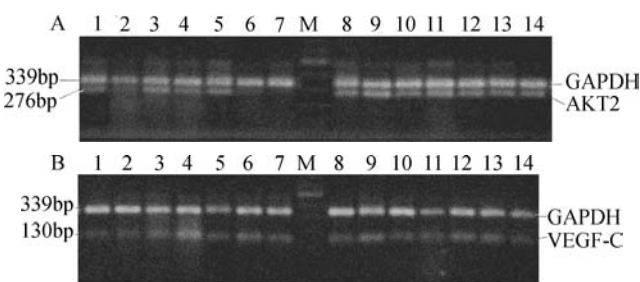


1~7: breast cancer without lymphatic metastasis

8~17: breast cancer with lymphatic metastasis

图 1 乳腺浸润性导管癌组织中 AKT2 和 VEGF-C mRNA 的表达

Figure 1 The expression of AKT2 and VEGF-C mRNA in IDC



1~7: breast cancer without lymphatic metastasis

8~17: breast cancer with lymphatic metastasis

图 2 AKT2 和 VEGF-C 基因的 RT-PCR 结果

Figure 2 RT-PCR result of AKT2 and VEGF-C gene

### 2.2 AKT、p-AKT、AKT2 及 VEGF-C 蛋白在两组乳腺癌组织中的表达

AKT、p-AKT、AKT2 及 VEGF-C 在无淋巴结转移的乳腺浸润性导管癌中阳性率分别为 54.05% (20/37)、86.49% (32/37)、54.05% (20/17) 和 67.57% (25/37), 在淋巴结转移的乳腺浸润性导管癌中阳性率分别为 64.86% (24/37)、81.08% (30/37)、89.19% (33/37) 和 89.19% (33/37)。AKT2 和 VEGF-C 在有淋巴结转移组中的表达均高于无淋巴结转移组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 而 AKT

学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 1、图 3。Western 印迹结果显示: 在所有乳腺浸润性导管癌组织中均可见 AKT (60kD)、p-AKT (60kD)、AKT2 (56kD) 及 VEGF-C (47kD) 蛋白的表达, 且 p-AKT、AKT2 及 VEGF-C 蛋白在有淋巴结转移乳腺浸润性导管癌组织中表达均高于无淋巴结转移组, 见图 4。

表 1 AKT、p-AKT、AKT2 及 VEGF-C 在乳腺浸润性导管癌中的表达

Table 1 The expressions of AKT, p-AKT, AKT2 and VEGF-C in IDC

| Groups                    | n  | AKT       | p-AKT     | AKT2      | VEGF-C    |
|---------------------------|----|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Lymph node metastasis (-) | 37 | 20(54.05) | 32(86.49) | 20(54.05) | 25(67.57) |
| Lymph node metastasis (+) | 37 | 24(64.86) | 30(81.08) | 33(89.19) | 33(89.19) |

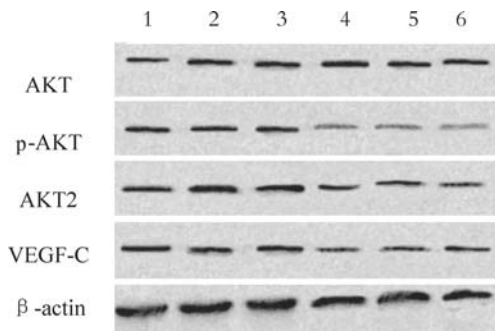
Note:  $\chi^2$  Test; there was no significant difference between the expression of AKT and p-AKT protein in the two groups,  $\chi^2$  value was 0.897 and 0.398 respectively,  $P$  was 0.344 and 0.528 respectively; there was significant difference between the expression of AKT2 and VEGF-C protein in the two groups,  $\chi^2$  value was 11.236 and 5.103 respectively,  $P$  was 0.001 and 0.024 respectively



3a: AKT;3b: p-AKT;3c: AKT2;3d: VEGF-C

图 3 AKT、p-AKT、AKT2 及 VEGF-C 蛋白在乳腺浸润性导管癌组织中的表达 (SP×200)

Figure 3 The expressions of AKT, p-AKT, AKT2 and VEGF-C protein in human breast invasive ductal carcinoma (SP×200)



1~3: breast cancer with lymphatic metastasis  
4~6: breast cancer without lymphatic metastasis

图 4 乳腺浸润性导管癌组织中 AKT、p-AKT、AKT2 及 VEGF-C 蛋白的表达

Figure 4 The expressions of AKT, p-AKT, AKT2 and VEGF-C protein in IDC

### 2.3 AKT、p-AKT、AKT2 及 VEGF-C 蛋白的表达与乳腺浸润性导管癌临床病理指标的关系

AKT 和 AKT2 蛋白的表达均与淋巴结转移情况相关,在无淋巴结转移的乳腺癌组织中阳性率均

为 54.05%,在淋巴结转移个数为 1~3 个时,阳性率分别为 43.75%和 87.50%,淋巴结转移个数大于 3 个时,阳性率分别为 80.95%和 90.48%,三组间比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); VEGF-C 的表达与临床分期有关, I、II、III~IV 期时其阳性率分别为 42.86%、80.00%和 88.24%,三组间比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见表 2。

### 2.4 乳腺浸润性导管癌中 VEGF-C 与 AKT、p-AKT、AKT2 表达的相关性

结果显示 VEGF-C 与 AKT, VEGF-C 与 p-AKT 表达呈正相关。VEGF-C 与 AKT2 表达无相关性,见表 3。

### 3 讨论

AKT 是 1991 年发现的一种对细胞代谢、细胞增殖和迁移等生命活动中信号转导有重要功能的蛋白激酶。PI3K/AKT 信号转导通路是细胞内重要的信号转导通路,在细胞的凋亡、存活、增殖以及迁

表 2 AKT、p-AKT、AKT2 及 VEGF-C 与乳腺浸润性导管癌临床病理参数间的关系

Table 2 Relationship between clinicopathological indexes with the expression of AKT, p-AKT, AKT2 and VEGF-C in IDC

|                       | n  | AKT |    |        | p-AKT |    |       | AKT2 |    |        | VEGF-C |    |        |
|-----------------------|----|-----|----|--------|-------|----|-------|------|----|--------|--------|----|--------|
|                       |    | -   | +  | P      | -     | +  | P     | -    | +  | P      | -      | +  | P      |
| Age                   |    |     |    |        |       |    |       |      |    |        |        |    |        |
| <45y                  | 30 | 12  | 18 |        | 5     | 25 |       | 10   | 20 |        | 4      | 26 |        |
| ≥45y                  | 44 | 18  | 26 | 0.938  | 7     | 37 | 0.931 | 11   | 33 | 0.435  | 12     | 32 | 0.153  |
| Tumor size            |    |     |    |        |       |    |       |      |    |        |        |    |        |
| ≤3cm                  | 33 | 13  | 20 |        | 4     | 29 |       | 11   | 22 |        | 6      | 27 |        |
| >3cm                  | 41 | 17  | 24 | 0.857  | 8     | 33 | 0.391 | 10   | 31 | 0.396  | 10     | 31 | 0.519  |
| Lymph node metastasis |    |     |    |        |       |    |       |      |    |        |        |    |        |
| 0                     | 37 | 17  | 20 |        | 5     | 32 |       | 17   | 20 |        | 12     | 25 |        |
| 1~3                   | 16 | 9   | 7  | 0.047* | 4     | 12 | 0.585 | 2    | 14 | 0.003* | 2      | 14 | 0.068  |
| >3                    | 21 | 4   | 17 |        | 3     | 18 |       | 2    | 19 |        | 2      | 19 |        |
| Clinical stage        |    |     |    |        |       |    |       |      |    |        |        |    |        |
| I                     | 7  | 3   | 4  |        | 1     | 6  |       | 3    | 4  |        | 4      | 3  |        |
| II                    | 50 | 19  | 31 | 0.799  | 8     | 42 | 0.977 | 15   | 35 | 0.417  | 10     | 40 | 0.044* |
| III~IV                | 17 | 8   | 9  |        | 3     | 14 |       | 3    | 14 |        | 2      | 15 |        |

Note: \* refers to statistical significance

表 3 乳腺浸润性导管癌中 VEGF-C 与 AKT、p-AKT、AKT2 表达的相关分析

Table 3 Relationship of VEGF-C expression with AKT, p-AKT and AKT2 in IDC

| VEGF-C | AKT |   |    | p-AKT |   |    | AKT2 |   |    |
|--------|-----|---|----|-------|---|----|------|---|----|
|        | -   | + | ++ | -     | + | ++ | -    | + | ++ |

|     |    |    |   |   |   |   |   |    |   |   |   |   |
|-----|----|----|---|---|---|---|---|----|---|---|---|---|
| -   | 9  | 4  | 3 | 0 | 5 | 5 | 3 | 3  | 8 | 1 | 4 | 3 |
| +   | 10 | 2  | 4 | 2 | 3 | 7 | 7 | 1  | 4 | 4 | 6 | 4 |
| ++  | 8  | 8  | 2 | 0 | 3 | 7 | 1 | 7  | 3 | 5 | 5 | 5 |
| +++ | 3  | 10 | 8 | 1 | 1 | 5 | 6 | 10 | 6 | 4 | 9 | 3 |

Note: VEGF-C and AKT,  $r = 0.283$ ,  $P = 0.015$ ; VEGF-C

and p-AKT,  $r = 0.328$ ,  $P = 0.004$ ; VEGF-C and AKT2,  $r = 0.072$ ,  $P = 0.543$

移等活动中发挥重要的生物学功能。AKT 作为 PI3K/AKT 信号转导通路中的中心环节,主要负责由 PI3K 始动的生物信息转导,其功能除了涉及细胞周期调控和凋亡启动外,还参与血管生成、淋巴管生成、端粒酶活性和细胞侵袭性等诸多重要的生理和病理过程。研究发现 AKT 的过表达及过度激活广泛存在于各种肿瘤中<sup>[3]</sup>,且 p-AKT 表达水平增高在许多肿瘤中提示预后不佳,如胰腺癌、胃癌和乳腺癌等<sup>[4-6]</sup>。本结果揭示,AKT 和 p-AKT 蛋白在有淋巴结转移乳腺浸润性导管癌中表达高于无淋巴结转移乳腺浸润性导管癌,且随着淋巴结转移个数的增加其表达呈升高的趋势,这提示 AKT 的过表达和过度激活可能会促使乳腺浸润性导管癌发生淋巴道转移。

AKT 基因有三种亚型:AKT1、AKT2 和 AKT3,分别位于人类染色体的 14q32.32、19q13.1-q13.2 和 1q14,其结构相似,功能不尽相同,在不同组织细胞上三种亚型表达水平并不一致。有研究发现<sup>[7-8]</sup>,IGF-1 在肿瘤转移中的作用如何,主要取决于肿瘤细胞内 AKT 亚型所占的比例,如果以 AKT1 为主,IGF-1 抑制肿瘤细胞侵袭和转移,AKT2 为主则促进肿瘤细胞侵袭和转移。研究发现 AKT1 主要与肿瘤细胞的增殖有关,有研究者采用 RNA 干扰技术抑制乳腺癌 MCF-7 细胞中 AKT1、PI3KP85 亚基的表达,可抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的体外增殖<sup>[9]</sup>;AKT2 则主要介导肿瘤细胞的侵袭和转移,有研究者把全长的、野生型的人类 AKT2 cDNA 转染进人类乳腺癌和卵巢癌细胞中,发现转染的细胞能够通过上调  $\beta 1$ -整合素而增加肿瘤细胞的侵袭和转移能力<sup>[10]</sup>。本实验结果表明,AKT2 mRNA 及蛋白在有淋巴结转移的乳腺浸润性导管癌中的表达均高于无淋巴结转移组,且 AKT2 蛋白随着淋巴结转移个数的增加,其阳性率也升高。这提示 AKT2 可能参与了乳腺浸润性导管癌的淋巴结转移过程,可以作为乳腺浸润性导管癌淋巴结转移的预测因子。

——VEGF-C 作为一种促淋巴管生成因子,可以选择性地促进淋巴管的增殖和成熟,免疫功能及肿瘤转移。

DOI: 10.3969/j.issn.1673-5263.2010.07.014

基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(11511453)  
作者单位:1. 161006 黑龙江省齐齐哈尔医学院微生物形态实验室;2. 天津医科大学肿瘤医院肿瘤研究所;3. 黑龙江省齐齐哈尔医学院教务处;4. 秦皇岛市第一医院病理科

作者简介:刘婷(1972-),女,硕士,副教授,主要从事乳腺癌浸润转移机制的研究

移。研究表明 VEGF-C 与它的特异性受体 VEGFR-3 结合可诱导受体酪氨酸磷酸化,经细胞内激酶反应激活 MARK 及 PI3K/AKT 信号转导通路,最终促进淋巴管内皮细胞增殖和生存<sup>[11]</sup>。研究表明<sup>[12]</sup>在乳腺癌组织中 VEGF-C 的表达状态与 VEGFR-3 阳性的淋巴管数量及淋巴结转移关系密切,VEGF-C 可以诱导乳腺癌组织内淋巴管的生成,进而促进乳腺癌细胞发生淋巴道转移。在本实验中,我们发现 VEGF-C 蛋白在有淋巴结转移组中的表达高于无淋巴结转移组,这与 Okada 等<sup>[13]</sup>的报道一致。然而,本实验结果显示 VEGF-C mRNA 的表达在两组间无显著差异,这可能是因样本例数过少所致。此外,我们还发现 VEGF-C 蛋白的表达与乳腺癌的临床分期有关,随着病程的进展其表达呈升高的趋势。因此,我们推测 VEGF-C 可能还与乳腺癌患者的预后有关。

目前,国内外有关 AKT 与 VEGF-C 的相关性研究大多集中在淋巴管内皮细胞内,在肿瘤细胞内的报道较少。周晓东等<sup>[1]</sup>通过分析胃癌组织中 p-AKT 蛋白与 VEGF-C 免疫染色强度后,发现二者的表达水平呈现高度一致性,较高表达 p-AKT 蛋白的胃癌组织,其 VEGF-C 亦有较高的表达水平,从而推测胃癌组织中可能存在 p-AKT/VEGF-C 信号调节通路促进胃癌的恶性生物学表型。Kobayashi 等<sup>[14]</sup>研究表明在胃癌组织中,p-AKT 与 VEGF 的表达呈正相关,用 PI3K 的抑制剂 LY294002 作用于胃癌细胞后,发现 VEGF 的分泌明显减少。在恶性神经胶质瘤中整合素连接激酶的抑制剂 QLT0254 或 QLT0267 通过抑制 AKT 的磷酸化,从而抑制 VEGF 的分泌<sup>[15]</sup>。VEGF-C 作为 VEGF 家族中的成员之一,活化的 AKT 是否通过同样的机制上调 VEGF-C 的表达,还需要进一步的研究证实。我们通过分析乳腺浸润性导管癌中 AKT 与 VEGF-C、p-AKT 与 VEGF-C、AKT2 与 VEGF-C 的相关性得出,AKT、p-AKT 与 VEGF-C 均呈正相关,AKT2 与 VEGF-C 无相关性。这提示在乳腺浸润性导管癌中 AKT 有上调 VEGF-C 表达的可能,从而促进乳腺浸润性导管癌发生淋巴道转移。

(下转第 794 页)

## CD151 和整合素 $\alpha 3 \beta 1$ 在乳

2007,11(11):1384-1393; discussion 1393-1394.

- [14] Wijnhoven BP, Tran KT, Esterman A, et al. An evaluation of prognostic factors and tumor staging of resected carcinoma of the esophagus[J]. *Ann Surg*, 2007,245(5):717-725.
- [15] Hofstetter W, Correa A M, Bekele N, et al. Proposed modification of nodal status in AJCC esophageal cancer staging system[J]. *Ann Thorac Surg*, 2007,84(2):365-373; discussion 374-375.
- [16] Tachibana M, Kinugasa S, Yoshimura H, et al. Clinical outcomes of extended esophagectomy with three-field lymph node dissection for esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Am J Surg*, 2005,189(1):98-109.
- [17] Shimada H, Okazumi S, Matsubara H, et al. Impact of the number and extent of positive lymph nodes in 200 patients with thoracic esophageal squamous cell carcinoma after three-field lymph node dissection[J]. *World J Surg*, 2006,30(8):

1441-1449.

- [18] Roder J D, Busch R, Stein H J, et al. Ratio of invaded to removed lymph nodes as a predictor of survival in squamous cell carcinoma of the oesophagus[J]. *Br J Surg*, 1994,81(3):410-413.
- [19] Mariette C, Piessen G, Briez N, et al. The number of metastatic lymph nodes and the ratio between metastatic and examined lymph nodes are independent prognostic factors in esophageal cancer regardless of neoadjuvant chemoradiation or lymphadenectomy extent[J]. *Ann Surg*, 2008,247(2):365-371.
- [20] Greenstein AJ, Litle VR, Swanson SJ, et al. Prognostic significance of the number of lymph node metastases in esophageal cancer[J]. *J Am Coll Surg*, 2008,206(2):239-246.

[编辑:安 凤;校对:周永红]

#### (上接第 785 页)

综合本实验结果,我们推测,在乳腺浸润性导管癌的淋巴道转移中可能存在 PI3K/AKT/VEGF-C 通路在起作用。其机制可能是:各种生长因子作用于乳腺癌细胞膜上的受体,激活细胞膜上的酪氨酸激酶,将信号转导至细胞内,使 AKT 磷酸化,磷酸化的 AKT 促进 VEGF-C 蛋白的表达,VEGF-C 分泌至肿瘤细胞外,与癌组织内淋巴管内皮细胞表面的 VEGFR-3 结合,促进淋巴管内皮细胞生长,从而增加了癌细胞进入淋巴系统潜在进入点的密度,促进乳腺癌发生淋巴结转移。但是 AKT 上调 VEGF-C 表达的具体机制如何,需要进一步的体内外相关实验证实。

#### 参考文献:

- [1] 周晓东,于皆平,于红刚,等. 蛋白激酶 B 在胃癌中的表达及其生物学意义[J]. *中华消化杂志*, 2005, 25(7): 401-405.
- [2] Chau NM, Ashcroft M. Akt2: a role in breast cancer metastasis [J]. *Breast Cancer Res*, 2004, 6(1): 55-57.
- [3] Yoeli-Lerner M, Tokar A. Akt/PKB Signaling in Cancer: A Function in Cell Motility and Invasion [J]. *Cell Cycle*, 2006, 5(6): 603-605.
- [4] Yamamoto K, Tomita Y, Hoshida J, et al. Prognostic significance of activated AKT expression in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(8): 2846-2850.
- [5] Nam SY, Lee HS, Jung GA, et al. AKT/PKB activation in gastric carcinomas correlates with clinicopathologic variables and prognosis [J]. *APMIS*, 2003, 111(12): 1105-1113.
- [6] Murakami D, Tsujitani S, Osaki T, et al. Expression of phosphorylated Akt (pAkt) in gastric carcinoma predicts prognosis and efficacy of chemotherapy [J]. *Gastric Cancer*, 2007, 10(1):45-51.

- [7] Tanno S, Mitsuuchi Y, Altomare DA, et al. AKT activation up-regulates insulin-like growth factor I receptor expression and promotes invasiveness of human pancreatic cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(2):589-593.
- [8] Pennisi PA, Barr V, Nunez NP, et al. Reduced expression of insulin-like growth factor I receptors in MCF-7 breast cancer cells leads to a more metastatic phenotype [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(22):6529-6537.
- [9] 梅玫,任玉,周旋,等. RNAi 下调 AKT1、PI3KP85 表达抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2010, 17(1):51-56.
- [10] Arboleda MJ, Lyons JF, Kabbinnar FF, et al. Overexpression of AKT2/protein kinase B beta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2003,63(1):196-206.
- [11] Mäkinen T, Veikkola T, Mustjoki S, et al. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3 [J]. *EMBO J*, 2001, 20(17):4762-4773.
- [12] 刘芳,张雅洁. VEGF-C 及其受体 Flt-4 在乳腺癌细胞增殖及转移中的作用[J]. *癌症*, 2003, 22(10): 1053-1056.
- [13] Okada K, Osaki M, Araki K, et al. Expression of hypoxia-inducible factor (HIF-1alpha), VEGF-C and VEGF-D in non-invasive and invasive breast ductal carcinomas [J]. *Anticancer Res*, 2005, 25(4):3003-3009.
- [14] 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.
- [15] Edwards LA, Woo J, Huxham LA, et al. Suppression of VEGF secretion and changes in glioblastoma multiforme microenvironment by inhibition of integrin-linked kinase (ILK) [J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(1):59-70.

[编辑:杨 卉;校对:刘红武]