

· 临床论著 ·

肾透明细胞癌中 PTEN 和 AKT 共同高表达的机制探讨

刘尚文 李文刚 周大庆

【摘要】 目的 探讨人第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因(PTEN)/磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(AKT)信号通路在肾透明细胞癌中的活性状况及其与临床特征之间的关系。**方法** 收集36对肾透明细胞癌及其邻近非肿瘤肾组织,Western blot检测AKT(p-S473)和PTEN蛋白表达,分析两者表达水平的相关性以及PTEN与肿瘤临床特征之间的关系。肾透明细胞癌细胞系A-498转染PTEN si-RNA,观察其对AKT(p-S473)的影响。**结果** 非肿瘤肾组织中AKT(p-Ser473)为 0.945 ± 0.314 , PTEN为 3.611 ± 0.947 。与之比较,肾透明细胞癌中PTEN表达量下降(1.975 ± 0.648),AKT(p-S473)增加(2.751 ± 0.832),差异有统计学意义($P < 0.05$)。PTEN的表达水平与肿瘤临床特征之间无关($P > 0.05$),细胞系中下调PTEN引起AKT(p-S473)表达升高。**结论** 肾透明细胞癌中PTEN可以调节PI3K/AKT信号通路的活性,同时PTEN蛋白升高与AKT活性增加同时存在,提示在肾透明细胞癌中还存在使PTEN功能下降或促进AKT活性增加的因素。

【关键词】 肾肿瘤; 腺癌,透明细胞; PTEN; PI3K/AKT信号通路

Mechanisms of co-existence of high levels of the PTEN and AKT protein in renal cell carcinoma LIU Shang-wen, LI Wen-gang, ZHOU Da-qing. Department of Urology, Chinese PLA 303 Hospital, Nanning 530021, China
Corresponding author: LIU Shang-wen, Email: liusw_657410@126.com

【Abstract】 Objective To discuss the activity of the phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN)/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT pathway and the clinical significance of PTEN protein expression in clear-cell renal-cell carcinoma (CCRCC) tissues. **Methods** The protein of PTEN and AKT (phosphorylation at Ser473) of 36 paired CCRCC and adjacent non-neoplastic renal samples were analysed by Western-blot. The effect of PTEN on AKT activation was detected by Western -blot after transfected with si-RNA against PTEN in A-498 cell line. **Results** The significantly increased AKT (phosphorylation at Ser473) with decreased PTEN protein were observed in CCRCC tissues compared with the adjacent non -neoplastic renal samples while the PTEN protein expression had no significant association with pathological parameters. Blocking PTEN resulting in up-regulation of AKT phosphorylation. **Conclusions** Our findings indicate that as PTEN dominantly inhibits AKT activation, the coexistence of high levels of the PTEN protein with enhanced AKT activation suggests the existence of novel mechanisms which attenuate PTEN function in CCRCC. These mechanisms may reduce PTEN function or increase AKT activation.

【Key words】 Kidney neoplasms; Adenocarcinoma, clear cell; PTEN; PI3K/AKT pathway

目前全球肾癌的发病率大约为每年15万人,死亡约7.8万人^[1]。其中肾透明细胞癌约占肾癌的80%。尽管目前在肾癌发病机制的分子生物学方面的研究取得很大进步,但是肾切除仍然是治疗肾肿瘤的主要方法。对于转移性肾癌及晚期肿瘤,靶向治疗可以延长患者生存期,但是单一用药不良反应较多,对一部分患者来说,其治疗效果有限^[2-3]。因此进一步明确肾癌发

病机制,联合分子靶向治疗,为提高临床疗效及耐受性提供一个最佳方案。

PI3K/AKT信号通路是研究较为成熟的信号通路,在肿瘤发生中有重要作用,包括肾肿瘤的发生。在多数肿瘤中PTEN有对抗PI3K的功能,抑制AKT的活性,发挥抑癌因子作用。目前在肾透明细胞癌中,PTEN/PI3K/AKT信号通路的生物学功能研究存在一定分歧^[4]。我们通过对36对肾透明细胞癌及其对应的非肿瘤肾组织检测其PTEN蛋白表达和AKT活性,探讨此信号通路在肾透明细胞癌中的作用。

资料与方法

一、一般资料

1. 标本:收集2010年1~6月在我院住院手术的肾透明细胞癌36例患者的肿瘤组织及相对应的非肿瘤肾组织,标本切除后立即浸入液氮, -80℃冰箱保存直至使用,所有病例均经病理检查证实为肾透明细胞癌。所有试验标本的采集均经医院伦理委员会批准并征得患者同意。

2. 细胞培养:肾透明细胞癌细胞系A-498购自协和医科大学基础医学细胞中心,含10%胎牛血清的DMEM培养基(Gibco, USA)培养细胞,培养箱条件:37℃, 5% CO₂。

二、方法

1. Western blot 检测蛋白:RIPA裂解液(北京索莱宝生物公司)提取组织及细胞蛋白,BCA(北京艾德莱生物公司)法检测蛋白浓度,每泳道上样量30~50 μg, 10% SDS-PAGE电泳,电转移蛋白至PVDF膜,5%脱脂牛奶室温封闭2h,孵育一抗4℃过夜,洗膜,孵育二抗室温1h,洗膜后ECL(北京普利莱生物公司)发光检查。PTEN、AKT(phosphorylation at Ser473)一抗均购自美国Abcam生物公司,β-actin及辣根过氧化物酶标记的二抗购自美国Santa Cruz生物公司。

2. siRNA细胞转染:转染前24h细胞接种于6孔板,转染试剂为Lipofectamine 2000(Invitrogen),按试剂说明书操作,PTEN siRNA I #6251购自Cell Signaling公司。

三、统计学分析

数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS 11.0统计软件分析,应用t检验或F检验。

结 果

1. AKT(p-Ser473)及PTEN蛋白在肾透明细胞癌及癌旁组织中的表达:Western blot检测蛋白表达,Quantity One软件分析图片数据,以β-actin为内参校正相对蛋白表达量。结果显示肾透明细胞癌组织中AKT(p-Ser473)为2.751±0.832,PTEN为1.975±0.648,癌旁组织中AKT(p-Ser473)为0.945±0.314,PTEN为3.611±0.947,两组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$,图1)。PTEN蛋白表达水平在患者年龄,肿瘤大小、核分级及临床分期中分别为: < 60 岁($n = 21$), 2.003±0.758, ≥ 60 岁($n = 15$), 1.814±0.657;肿瘤直径 < 4 cm($n = 12$), 1.996±0.499, $4 \sim 7$ cm($n = 14$), 2.187±0.788, ≥ 7 cm($n = 10$), 1.826±0.964;肿瘤核分级1和2级($n = 25$), 1.690±0.890, 3级($n = 11$),

2.052±0.954;临床分期T1($n = 16$), 1.693±0.893, T2($n = 20$), 1.965±0.979。统计分析结果显示PTEN的表达与患者年龄、肿瘤大小、核分级及临床分期之间无关(表1, $P > 0.05$)。

表1 PTEN与肾透明细胞癌临床指标之间的关系

临床指标	例数	PTEN ($\bar{x} \pm s$)	t/F值	P值
年龄(岁)				
<60	21	2.003±0.758	0.779	0.4417
≥ 60	15	1.814±0.657		
肿瘤大小(cm)				
<4	12	1.996±0.499	0.6697	0.5187
4~7	14	2.187±0.788		
≥ 7	10	1.826±0.964		
核分级				
G1~2	25	1.690±0.890	1.098	0.2801
G3	11	2.052±0.954		
临床分期				
T1	26	1.693±0.893	0.861	0.3953
T2	10	1.965±0.979		

2. PTEN的下调与AKT活性上升明显相关:肾透明细胞癌及对应的非肿瘤肾组织成对比较,肿瘤组织/非肿瘤组织蛋白相对表达量比值 < 0.9 为低表达, $0.9 \sim 1.5$ 之间为相对无明显变化, > 1.5 为高表达。以此为统计标准,发现58.3%肿瘤组织中PTEN蛋白低表达,25.0%无明显变化,16.7%升高。其中PTEN低表达的肿瘤组织中66.67%的标本AKT活性增加(表2)。它提示在肾透明细胞癌中,PTEN可以下调AKT的活性。

表2 PTEN和AKT(p-Ser473)在肾透明细胞癌中的表达[例,(%)]

PTEN	例数	AKT(p-S473)		
		降低	正常	升高
降低	21	3(14.28)	4(19.05)	14(66.67)
正常	9	3(33.33)	1(11.11)	5(55.55)
升高	6	1(16.67)	2(33.33)	3(50.00)
总计	36	7(19.44)	7(19.44)	22(61.11)

3. 下调PTEN提高磷酸化AKT活性:A-498细胞转染siRNA沉默PTEN,Western blot检测转染后48h细胞的PTEN蛋白以验证转染效率及特异性,结果显示沉默PTEN后磷酸化AKT的表达明显增加(图2)。

4. PTEN蛋白上调与AKT活性增加同时存在:同非肿瘤肾组织比较,16.7%的肿瘤标本PTEN蛋白表达

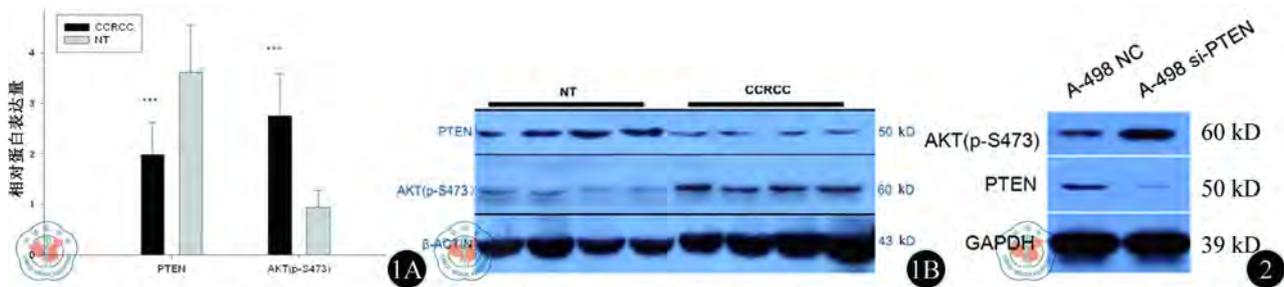


图1 1A: 肾透明细胞癌 (CCRCC) 及非肿瘤肾组织 (NT) 中PTEN, AKT(p-S473)相对表达水平。与NT组比较, *** $P < 0.001$; 1B: 肾透明细胞癌 (CCRCC) 及非肿瘤肾组织 (NT) Western blot检测蛋白 PTEN, Western blot检测磷酸化AKT的表达

上调,其中 50% 标本中 AKT 活性增加(表 2)。提示肾透明细胞癌中存在 PTEN 蛋白和 AKT 活性同时增加的现象。

讨论

PI3K/AKT 信号通路是目前研究较成熟的信号通路,它通过直接或间接作用促进肿瘤细胞生长,增加葡萄糖代谢及增强细胞存活能力,PI3K/AKT 信号通路的异常活化普遍存在于人类肿瘤,包括卵巢癌、前列腺癌、肺癌和肾细胞癌,是重要的肿瘤促进因素^[5]。在肾肿瘤发生中起重要作用的生长因子如 VEGF、EGF、TGF α 、和 c-Met 都可激活 PI3K-AKT 信号通路^[6]。AKT 的活化需要碳端 Thr308 和 Ser473 两个位点的磷酸化,所以我们选择 AKT (p-S473) 作为 AKT 活性的检测指标^[7]。

PTEN 可以对抗 PI3K 的功能,从而阻止 AKT 活化,是 PI3K/AKT 信号通路的主要抑制因子,在一些恶性肿瘤中已经证实存在 PTEN 的遗传变异或缺失。但目前关于 PTEN 在肾细胞癌中的研究较少,且文献报道研究结果不尽相同,有研究显示肾细胞癌中 PTEN 的表达明显降低^[8],并且 PTEN 表达阴性的肾透明细胞癌患者术后 5 年生存率为 90%,而 PTEN 表达阳性的患者仅为 45%^[9]。本研究发现 58.3% 的肾透明细胞癌组织中 PTEN 蛋白低表达,61.11% 的标本 AKT 活性增加。其中 66.67% 的 PTEN 低表达的肿瘤组织中 AKT 活性增加,另外,在细胞试验中,我们发现沉默 PTEN 可以引起磷酸化 AKT 表达上调,提示在肾透明细胞癌中 PTEN 可以下调 AKT 的活性,这同前述文献报道一致。另外我们发现 PTEN 的表达与患者年龄、肿瘤大小、核分级及临床分期之间无统计学差异,这可能与本研究所取的标本特性和数量有一定的关系。

同上述相矛盾的是有研究报道肾细胞中 PTEN 在 mRNA 和蛋白水平的表达均高于非肿瘤肾组织,因此得出在肾细胞癌中 PTEN 对 PI3K 无对抗作用的结论^[4]。我们也发现 41.7% 的肾透明细胞癌中 PTEN 的

表达无明显下降,其中 53.33% 的标本中 AKT 活性增加。16.7% 的肿瘤标本 PTEN 蛋白表达上调,其中 50% 标本中 AKT 活性增加,这种 PTEN 蛋白上调与 AKT 活性增加共存于同一标本的现象提示肾透明细胞癌中存在使 PTEN 蛋白功能下降的因素。并且其只影响 PTEN 的功能,而不影响 PTEN 蛋白的表达。根据文献研究我们推测其机制可能有以下四条:降低 PTEN 与细胞膜的结合能力、蛋白翻译后的修饰、存在 PTEN 拮抗因子和 PTEN 突变。

正常情况下 PTEN 位于细胞质内,只有与细胞膜上的特殊位点结合后才能发挥其功能,其蛋白质氮端位点 (R11/K13/R14/R15 和 R161/K163/K164) 与其功能密切相关^[10]。已有研究发现神经胶质瘤中 PTEN 的 K13 位点存在谷氨酸突变,从而影响 PTEN 与细胞膜的结合^[11]。碳端的磷酸化位点如: S380, T382 和 T383 可以改变 R161/K163/K164 的构象从而影响 PTEN 与细胞膜的结合。另外氧活性粒子可以氧化半胱氨酸残基 (C124) 以减弱 PTEN 磷酸酶活性^[12]。并且研究证实肾透明细胞癌中 DJ-1 可以下调 PTEN 的活性^[13],关键氨基酸的突变也可以影响 PTEN 的活性,而不影响蛋白表达。

上述这些机制或许可以解释肾透明细胞中 PTEN 蛋白表达增多,但其活性下降的原因。虽然肾细胞癌中 PTEN 基因的突变很少发现^[14],但在一些肿瘤中 PTEN 的突变已经得到充分证实。本试验证实了肾透明细胞癌中 PTEN 可以调节 PI3K/AKT 信号通路的活性,同时也存在使 PTEN 功能下降或促进 AKT 活性增加的因素。

参考文献

- [1] Zbar B, Klausner R, Linehan WM. Studying cancer families to identify kidney cancer genes. *Annu Rev Med*, 2003, 54: 217-233.
- [2] Escudier B, Eisen T, Stadler WM, et al. Sunitinib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, 2007, 356: 125-134.
- [3] Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, et al. Sunitinib versus interferon- α in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, 2007, 356: 115-124.
- [4] Hennenlotter J, Ohneseit PA, Simon P, et al. PTEN and p27Kip1 are

not downregulated in the majority of renal cell carcinomas--implications for Akt activation. *Oncol Rep*, 2008, 19:1141-1147.

[5] Sourbier C, Lindner V, Lang H, et al. The phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway: a new target in human renal cell carcinoma therapy. *Cancer Res*, 2006, 66:5130-5142.

[6] Linehan WM, Zbar B. Focus on kidney cancer. *Cancer Cell*, 2004, 6: 223-228.

[7] Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci*, 2004, 29: 233-242.

[8] Shin Lee J, Seok Kim H, Bok Kim Y, et al. Expression of PTEN in renal cell carcinoma and its relation to tumor behavior and growth. *Surg Oncol*, 2003, 12:166-172.

[9] Velickovic M, Delahunt B, McIver B, et al. Intragenic PTEN/MMAC1 loss of heterozygosity in conventional (clear-cell) renal cell carcinoma is associated with poor patient prognosis. *Mod Pathol*, 2002, 15: 479-485.

[10] Das S, Dixon JE, Cho W. Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100:7491-7496.

[11] Walker SM, Leslie NR, Perera NM, et al. The tumour-suppressor function of PTEN requires an N-terminal lipid-binding motif. *Biochem J*, 2004, 379:301-307.

[12] Salmeen A, Barford D. Functions and mechanisms of redox regulation of cysteine-based phosphatase. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7: 560-577.

[13] Kim RH, Peters M, Jang Y, et al. DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN. *Cancer Cell*, 2005, 7:263-273.

[14] Sukosd F, Digon B, Fischer J, et al. Allelic loss at 10q23.3 but lack of mutation of PTEN/MMAC1 in chromophobe renal cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 2001, 128:161-163.

(收稿日期:2012-06-28)

(本文编辑: 郝锐)

刘尚文,李文刚,周大庆. 肾透明细胞癌中 PTEN 和 AKT 共同高表达的机制探讨[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2013,7(2):657-660.

