

PTEN 在肝细胞癌中的表达及其与 AKT 磷酸化的相关性研究

杨志芳, 易继林, 李兴睿, 龙 维

Expression of PTEN in Hepatocellular Carcinoma and Its Correlation with Phosphorylation of PKB/AKT

YANG Zhi-fang, YI Ji-lin, LI Xin-gui, LONG Wei

Department of Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Abstract: Objective To investigate the clinical significance of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) protein expression and correlation between the expression of PTEN and phosphorylation of protein kinase B (PKB/AKT) in human hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** The expression of PTEN and phospho-AKT were detected by SP immunohistochemical technique and Western blotting in 35 cases of HCC, 15 cases of liver cirrhosis and 8 cases of normal tissues. **Results** The positive expression of PTEN in HCC (62.9%, 0.085 ± 0.021) were significantly lower than those in liver cirrhosis and normal tissues ($P < 0.01$). The expression level of PTEN was related to the differentiation degree of HCC and the status of metastasis ($P < 0.05$). Western blotting revealed a significant inverse correlation between PTEN and phospho-AKT ($r = -0.818$, $P < 0.01$). **Conclusion** These results demonstrate that down-regulation of PTEN, which may be able to effectively inhibit the hyper-phosphorylation of PKB/AKT, will be an important step in tumor genesis and progression of the hepatocellular carcinoma.

Keywords: Hepatocellular carcinoma; PTEN; PKB/AKT; Phosphorylation

摘要:目的 研究抑癌基因 PTEN 在肝细胞癌(HCC)中的表达及其与蛋白激酶 B(PKB/AKT)磷酸化的相关性。方法 采用免疫组织化学 S-P 染色法, Western 印迹杂交法检测 35 例肝细胞癌, 15 例肝硬化, 8 例正常肝组织中 PTEN 的表达, 并分析肝癌组织中 PTEN 表达与 AKT 磷酸化水平的关系。结果 肝癌组织中 PTEN 蛋白的阳性表达(62.9%, 0.085 ± 0.021)明显低于肝硬化和正常肝组织($P < 0.01$); 同时低分化、有肿瘤转移的肝癌其 PTEN 表达强度明显低于高分化、无转移的肝癌($P < 0.05$); 相关性分析表明: 肝癌组织中 PTEN 蛋白表达和 AKT 磷酸化水平呈明显负相关($r = -0.818$, $P < 0.01$)。结论 由于 PTEN 蛋白表达下调或缺失, 而导致 AKT 磷酸化水平的明显增高, 在肝癌的发生、发展中起着重要的作用。

关键词: 肝细胞癌; PTEN; 蛋白激酶 B; 磷酸化

中图分类号: R735.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2004)12-0748-03

0 引言

PTEN/MMAC1/TEP1 基因(简称: PTEN)位于人类第 10 号染色体(10q23)上, 是继 p53 后又一重要的抑癌基因, 目前已在许多人类恶性肿瘤和遗传性肿瘤易感综合征中发现存在 PTEN 基因缺失或突变^[1,2]。PTEN 蛋白具有双重特异性磷酸酶活性, 可依赖其脂质磷酸酶作用拮抗 PI-3K/AKT 信号通路的活化而发挥抑癌作用^[3]。本文采用免疫组织化学(SP)法、Western 印迹杂交法对肝细胞癌、肝硬化及正常组织中 PTEN 蛋白表达进行定位和定量分析, 并研究其表达水平与蛋白激酶 B(AKT)

磷酸化水平的相关性, 从而探讨其在肝癌发生、发展中的意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料

35 例肝细胞癌组织为同济医院普外科 2002 ~ 2003 年手术切除标本。其中男性 29 例, 女性 6 例, 平均年龄 44.5 岁(16 ~ 68 岁); 肝癌病理分化程度(Edmondson 分级): I ~ II 级为高分化肝癌(11 例), III ~ IV 级为低分化肝癌(24 例); 肿瘤直径 < 5cm 者 8 例, 5cm 者 27 例, 平均直径 11.2 cm, 均为单中心肝癌; 伴有肿瘤转移者(包括肝内转移、肝外转移和门静脉癌栓形成) 15 例, 无转移者 20 例, 术前检查甲胎蛋白(AFP)阴性者(< 20 ng/ml) 9 例, 阳性者 26 例, 所有病例术前均未行放化疗。标本取材后

收稿日期: 2003-12-16; 修回日期: 2004-04-20

作者单位: 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普外科

立即 -80 保存,部分用于提取总蛋白,余均采用中性福尔马林固定,石蜡包埋,4μm 厚连续切片。另选同济医院病理科存档标本 15 例肝硬变及 5 例正常肝组织为对照。所有切片均行常规苏木精-伊红染色,病理医师阅片诊断。

1.2 方法

1.2.1 试剂

兔抗 PTEN (野生型 237-403 氨基酸域)多克隆抗体、兔抗磷酸化 AKT 多克隆抗体 (Ser-473) 分别购自 SantaCruz 及 CST 公司;二抗 HRP 标记羊抗兔 IgG、化学发光 (ECL) 底物购自 SantaCruz 公司;SP 试剂盒购自北京中山公司。

1.2.2 蛋白提取与 Western 印迹杂交

组织块经冰 PBS 洗 2 次,剪碎,置入匀浆器,加入裂解液^[4],冰上匀浆 10min,离心取上清,采用 Bradford 法测定蛋白质浓度,电泳前加 2 ×SDS 缓冲液,100 水浴 5min,60 μg 蛋白进行 12%SDS -聚丙烯酰胺凝胶电泳,蛋白分离后,电泳转至硝酸纤维素膜,4 封闭过夜,一抗(兔抗 PTEN1 200 兔抗 P-AKT1 1000)室温 4h,二抗室温 2h,采用增强化学发光法 (ECL) 显影,暗室压片。

1.2.3 免疫组织化学 SP 染色

切片脱蜡水化后,微波抗原修复,常规 SP 法染色(兔抗 PTEN1 100),以正常肝细胞为内部对照,PBS 代替一抗做阴性对照。

1.2.4 结果判定

Western 印迹杂交:胶片结果经英国 UVP 公司 GDS8000 型凝胶成像分析系统分析处理数据,计算灰度值。免疫组织化学:以肝细胞胞浆中呈棕黄色着色为阳性细胞,在光镜 (267 ×) 下选取 5 个视野计数阳性细胞,阳性细胞数 <30% 记为阴性病例,阳性细胞数 ≥30% 为阳性病例;并采用 HPIAS-1000 型图文分析系统测量平均光度。

1.2.5 统计学分析

采用 SASforWindows6.22 软件进行 ² 检验、*t* 检验和 Pearson's 相关检验。

2 结果

2.1 PTEN 蛋白在肝细胞癌、肝硬变、正常肝组织中的表达

PTEN 蛋白表达位于肝细胞胞浆,未见胞核着色,35 例肝癌组织中 PTEN 表达的平均光度为 0.085 ±0.021,其中 22 例 (62.9%) 为阳性表达,13 例为阴性表达。肝癌中 PTEN 阳性表达明显低于肝硬化 (93.3%, 0.116 ±0.013) 及正常肝组织 (100%, 0.125 ±0.012) (*P* < 0.01)。PTEN 蛋白阳

性细胞在肝癌中多呈小片状或散在分布,而在肝硬变、正常肝组织中呈大片状或簇状分布,见图 1~4。

2.2 PTEN 蛋白表达强度与肝细胞癌病理学参数的关系

Western 结果显示:肝癌组织中,PTEN 蛋白表达强度与 AFP 水平及肿瘤大小无关,但在低分化、存在转移的癌组织中 PTEN 表达强度明显低于高分化、无转移的肝癌组织,见表 1。

表 1 PTEN 表达与肝癌病理学参数的关系

病理指标	n	表达强度	P
肿瘤直径			
<5 cm	8	35.86 ±15.22	>0.05
≥5cm	27	33.45 ±17.32	
分化程度*			
高分化	11	41.89 ±13.40	<0.05
低分化	24	30.67 ±15.97	
AFP 水平			
阴性	9	33.17 ±14.34	>0.05
阳性	26	33.40 ±17.32	
肿瘤转移*			
无	20	42.72 ±14.41	<0.01
有	15	20.41 ±11.46	

注: *两组比较有显著差异

2.3 肝癌组织中 PTEN 表达强度与 AKT 磷酸化水平的相关性

Western 结果显示:肝癌组织中,磷酸化 AKT 水平为 25.81 ±11.84 (0~56.096);并且相关性分析显示:肝癌组织中 PTEN 蛋白表达和 AKT 磷酸化水平呈明显负相关 (*r* = -0.818, *n* =35, *P* < 0.001),PTEN 蛋白表达愈低,AKT 磷酸化水平愈高,反之亦然,见图 5、6。



图 5 Western 印迹杂交:PTEN、磷酸化 AKT (p-AKT) 在肝癌中的表达

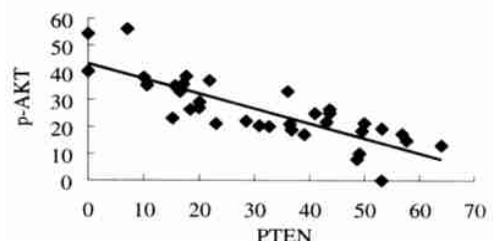


图 6 PTEN 表达与 AKT 磷酸化水平 (p-AKT) 的相关性

3 讨论

PTEN 是目前发现的唯一编码蛋白具有磷酸酶活性的抑癌基因。PTEN 蛋白含 403 个氨基酸,其磷酸酶活性域位于氨基末端。与 PTPs (protein tyrosine phosphatase) 成员不同的是,PTEN 不仅能使磷酸酪氨酸,磷酸丝/苏氨酸去磷酸,而且可使磷酸肌醇 3,4,5 三磷酸(PIP₃)的 3 位脱磷酸。文献报道 PTEN 的突变、失活可导致细胞内多个信号通路活化状态的改变,而与恶性肿瘤的多种生物学行为相关^[3,4]。

Yao 和 Kawamura 等^[5,6]均报道肝癌组织中存在 PTEN 基因突变。本研究的结果显示在肝细胞癌组织中 PTEN 的蛋白表达水平明显低于肝硬化及正常肝组织。这进一步证实了 PTEN 的失活是肝癌常见的分子事件,可能参与了肝癌的发生、发展。同时本研究中 PTEN 蛋白表达阴性率(38.5%)较 Kawamura 报道的 DNA 突变率(28%)为高。而 Whang 等^[7]在无 PTEN 基因编码区突变的前列腺癌中发现有 50% 的病例 PTEN 蛋白表达下调,这说明 PTEN 在肝癌中的失活不仅涉及基因水平的改变,并且与转录及转录后调节等机制相关,这一结论也与 Rahman 等的报道一致^[8]。

我们进一步用 Western 印迹杂交法对肝癌中的 PTEN 蛋白表达进行定量分析发现,PTEN 的表达强度与肝癌大小及 AFP 水平无关,PTEN 的低表达更多出现在低分化、存在转移的肝癌组织中,这说明 PTEN 的低表达在一定程度上反映了肝癌的侵袭转移能力,有一定的临床病理意义,但能否作为独立的预后指标,尚需进一步的研究。

PI-3K 信号通路可介导多种胞外刺激,而 PKB/AKT 是其关键的下游信号传导分子。AKT 活化后可磷酸化其多个下游底物如 Bad, Forkhead 家族转录因子(FKH-TFs)、NF- κ B、mdm2 等而抑制细胞凋亡,刺激细胞增殖。因此,PI-3K/AKT 通路的异常活化被认为对于恶性肿瘤细胞的逃避凋亡,异常增殖以及肿瘤血管新生等机制具有重要的意义^[9]。体外研究表明,PTEN 可通过使 PIP₃ 的 D3 位脱磷酸而拮抗 PI-3K 的磷酸化作用,从而减少 PIP₃ 的聚集,降低 AKT 的磷酸化水平,并引起细胞周期停滞和/或凋亡等反应^[4]。目前关于肝细胞癌组织中

PTEN 表达与 AKT 磷酸化状态两者关系的报道尚少,本研究通过对 PTEN 蛋白表达水平与 AKT 磷酸化水平进行相关性分析发现,两者呈明显的负相关($r = -0.818$),PTEN 的低表达往往伴随着 AKT 的高磷酸化状态,这表明由于 PTEN 蛋白水平的下调,导致其不能有效抑制 PI-3K/AKT 途径的异常活化,从而使肝癌细胞得以逃避凋亡,异常增殖,这一机制在肝癌的发生、发展中具有重要的意义。我们认为 PTEN/AKT 可作为候选靶基因,为肝癌的基因治疗提供新的方向。

(本文图 1~4 见封 3)

参考文献:

- [1] Li J, Yen C, Liaw D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase, is mutated in human brain, breast, and prostate cancer[J]. *Science*, 1997, 275 (28): 1943-1947.
- [2] Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, et al. Identification of candidate tumor suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers[J]. *Nat Genet*, 1997, 15 (4): 356-362.
- [3] Waite KA, Eng C. Protein PTEN: Form and Function[J]. *Am J Hum Genet*, 2002, 70 (4): 829-844.
- [4] Weng LP, Brown JL, Eng C, et al. PTEN coordinates G1 arrest by downregulating cyclin D1 via its protein phosphatase activity and upregulating p27 via its lipid phosphatase activity[J]. *Hum Mol Genet*, 2001, 10 (6): 599-604.
- [5] Yao YJ, Ping XL, Zhan GH, et al. PTEN/MMAC1 mutations in hepatocellular carcinomas[J]. *Oncogene*, 1999, 18 (20): 3181-3185.
- [6] Kawamura H, Nagai H, Bando K, et al. PTEN/MMAC1 mutations in hepatocellular carcinomas: somatic inactivation of both alleles in tumors[J]. *Jpn J Cancer Res*, 1999, 90 (4): 413-418.
- [7] Whang Y, Wu X, Suznki H, et al. Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95 (9): 5246-5250.
- [8] Rahman MA, Karyazanos ID, Yamanoi AK, et al. Impact of PTEN expression on the outcome of hepatitis C virus-positive cirrhotic hepatocellular carcinoma patients: possible relationship with Cox II and inducible nitric oxide synthase[J]. *Int J Cancer*, 2002, 100 (2): 152-157.
- [9] Li Q, Zhu GD, Tarantini G, et al. Inactivation of protein kinase B/AKT and cell cycle checkpoint kinase for treatment of cancer[J]. *Curr Top Med Chem*, 2002, 2 (9): 939-971.

[编辑:刘红武;校对:安凤]

PTEN 在肝细胞癌中的表达及其与 AKT 磷酸化的相关性研究

(正文见 748 页)

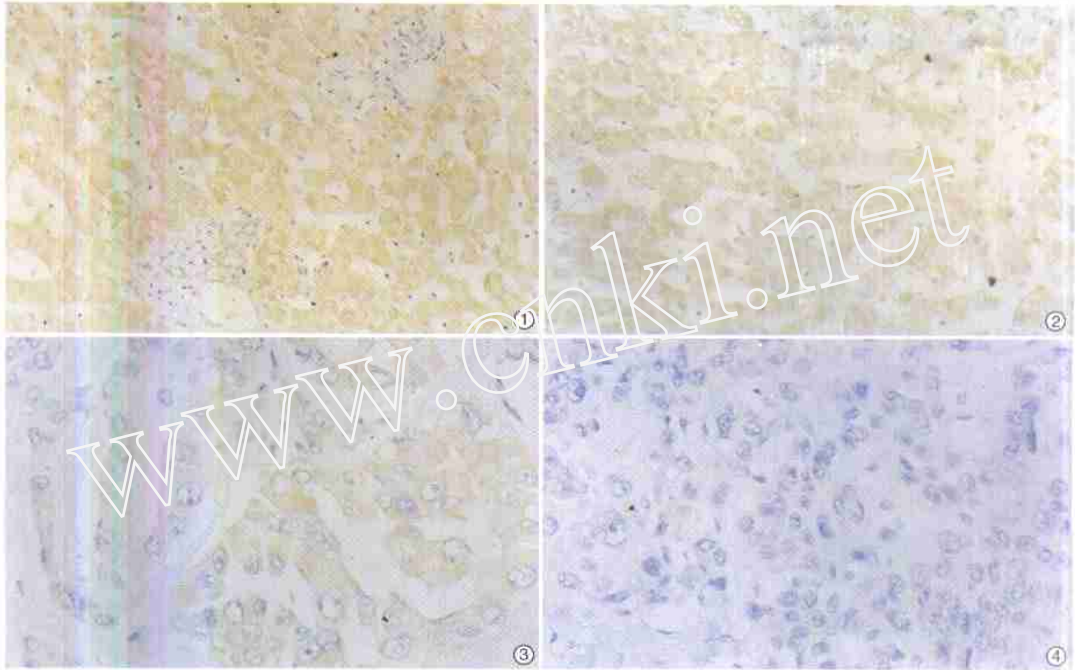


图1 PTEN 在肝硬变组织中的表达(SP, × 133)

图2 PTEN 在正常肝组织中的表达(SP, × 133)

图3 PTEN 在肝细胞癌组织中的表达(SP, × 267)

图4 PTEN 在肝细胞癌组织中的表达(SP, × 267)

肠复康对人大肠癌 HT-29 细胞增殖的影响及作用机制研究

(正文见 759 页)

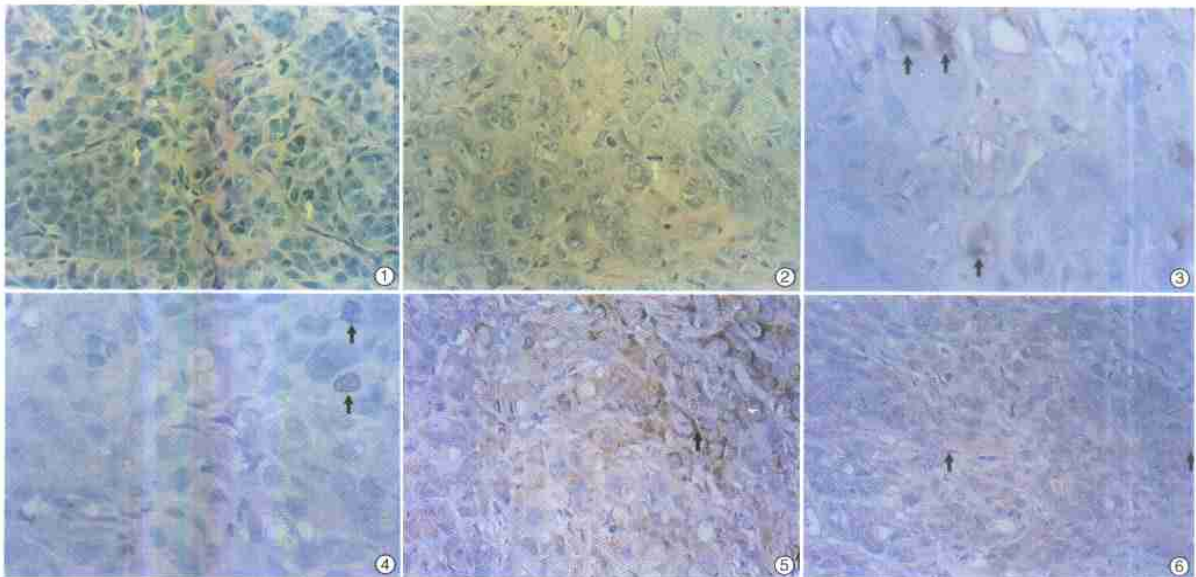


图1 空白组移植瘤 HE 染色 (× 200)

图2 肠复康高量组移植瘤 HE 染色 (× 200)

图3 空白组移植瘤 Ki-67 表达 (× 400)

图4 肠复康高量组移植瘤 Ki-67 表达 (× 400)

图5 空白组移植瘤 VEGF 表达 (× 200)

图6 肠复康高量组移植瘤 VEGF 表达 (× 200)