

PTEN 和 AKT 在乳腺癌中的表达及临床意义

Expression of PTEN and AKT in Breast Cancer and Its Clinical Significance
ZHAO Lin, XIU Yin-ling, CHEN Shuo, et al.

赵 林¹, 修银铃², 陈 说², 赵 鑫³, 赵 杨²

(1.辽宁省肿瘤医院, 辽宁 沈阳 110042; 2.中国医科大学第一附属医院, 辽宁 沈阳 110001; 3.中国医科大学临床医学系, 辽宁 沈阳 110001)

摘 要: [目的] 探讨 PTEN 和 AKT 在乳腺癌中的表达及在乳腺癌发生发展中的作用。[方法] 采用 RT-PCR 和 Western Blot 方法检测 PTEN 和 AKT mRNA 和蛋白质在 64 例乳腺癌组织和 15 例癌旁正常乳腺组织中的表达。[结果] AKT mRNA 在乳腺癌中表达为 0.87 ± 0.47 , 高于癌旁正常组织 0.39 ± 0.20 ($P < 0.01$), III 期乳腺癌表达 (1.27 ± 0.66) 高于 I ~ II 期, 组织学分级 III 级表达 1.24 ± 0.92 , 高于 I 级 (0.59 ± 0.45)、II 级 (0.86 ± 0.39), 有淋巴结转移组 (1.05 ± 0.67) 高于无转移组 (0.70 ± 0.40), 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); PTEN mRNA 在乳腺癌表达为 0.99 ± 0.79 , 低于癌旁正常组织 1.49 ± 0.64 ($P < 0.01$), III 期乳腺癌 0.66 ± 0.43 表达低于 I ~ II 期, 组织学 III 级表达 (0.57 ± 0.35) 低于 I 级 (1.48 ± 0.70)、II 级 (1.00 ± 0.62), 有淋巴结转移组 (0.78 ± 0.39) 高于无转移组 (1.20 ± 0.77), 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。PTEN 和 AKT 表达呈负相关 ($r = -0.51$, $P < 0.01$)。[结论] PTEN 失活解除抑制 AKT, 促进乳腺癌的发生发展。

关键词: PTEN; AKT; 乳腺癌

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2013)06-0502-04

细胞的信号传导系统是沟通细胞内外以及细胞之间联系的桥梁, 其异常将会影响细胞生长、分化、代谢等各项功能。研究发现, 多数参与信号传导系统的蛋白是癌基因或抑癌基因的产物, 它们的异常表达与肿瘤的发生发展密切相关。AKT 通路是重要的调节细胞增殖的信号通路。AKT 蛋白受抑癌基因 PTEN 的调控而发挥作用。本文采用 RT-PCR、Western Blot 印迹杂交法对乳腺癌中 PTEN 和 AKT 的表达进行半定量分析, 探讨其在乳腺癌发生、发展中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2010 年 1 月至 2010 年 11 月辽宁省肿瘤

收稿日期: 2012-11-20; 修回日期: 2013-01-09

基金项目: 辽宁省自然科学基金资助项目 (2009225008-11); 辽宁省教育厅资助项目 (L2010633)

通讯作者: 赵杨, E-mail: yida.zhaoyang@163.com

医院行手术治疗经组织病理学确诊的乳腺癌 64 例, 年龄 33~78 岁, 平均年龄 47 岁; 绝经 28 例。TNM 分期: I 期 16 例, II 期 34 例, III 期 14 例; 病理类型均为浸润性导管癌; 组织学分级: I 级 12 例, II 级 38 例, III 级 14 例; 免疫组化方法进行 ER、PR 检测: ER 阳性 45 例, PR 阳性 34 例。所有病例术后常规行腋淋巴结检查, 每例淋巴结检取数目均在 10 枚以上。其中, 淋巴结无转移 33 例, 转移 1~3 枚 15 例, 4~9 枚 10 例, ≥ 10 枚 6 例。取 15 例癌旁 3cm 外正常乳腺组织作为对照。每例标本均液氮保存。

1.2 试剂与仪器

兔抗 PTEN 多克隆抗体、兔抗 AKT 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司; HRP 标记羊抗兔 IgG、化学发光 (ECL) 底物购自 Santa Cruz 公司, RT-PCR 试剂盒购自大连宝生物, 引物由北京华大基因公司合成, Trizol Reagent 由美国 Invitrogen Life Technologies 公司提供; 紫外分光光度计 (英国 UV-visible Spectrometer, UV300); 电泳仪 (美国 BIO-RAD, Power-

Pac200);垂直板电泳装置(美国 BIO-RAD,Mini-Protein III);DYY 40B 型转印电泳槽 (北京六一仪器厂);高速冷冻离心机(Sigma 31k 5C 型,美国);Chem-i Imager5500 凝胶电泳成像分析系统 (美国 Alphainnotech chemi Imager); 小型台式离心机 (美国 SIGMA,1-13);PCR 扩增仪(德国 Biometra)。

1.3 实验方法

1.3.1 PCR 检测 PTEN、AKT mRNA 表达

采用 Trizol 试剂一步法提取乳腺癌组织总 RNA,紫外分光光度计测定纯度并定量,反转录合成 cDNA,参考 Gene Bank 人 *PTEN*、*AKT* 基因序列采用 Primer premier5.0 软件自行设计引物(Table 1)进行 PCR 反应。扩增后,RT-PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳,将各样品 RT-PCR 产物经分子定量成像系统分析,以 β -actin 条带为内参照,其光密度值设定为 1.0,计算 *PTEN*、*AKT* mRNA 表达的相对丰度。

1.3.2 Western Blot 检测 PTEN 和 AKT 蛋白表达

取乳腺癌组织加入裂解液,冰上匀浆 2min,离心取上清,采用 Lorry 法测定蛋白质浓度,电泳前加 2 $\times$ SDS 缓冲液,100 $^{\circ}$ C 水浴 10min,60 μ g 蛋白进行 10%SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,蛋白分离后,电泳转至 PVDF 膜,4 $^{\circ}$ C 封闭过夜,一抗(兔抗 *PTEN* 1:400,兔抗 *AKT* 1:400)室温 2h,二抗室温 2h,ECL 发光,分析结果。

1.4 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件进行数据分析,数据以均数 $\pm$ 标准差表示,相关性分析采用 Pearson 相关分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PTEN、AKT mRNA 在乳腺癌组织中的表达

PTEN mRNA 在乳腺

癌中呈低表达(Figure 1),与正常乳腺组织相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。*PTEN* mRNA 表达随肿瘤分期和组织学分级的增高逐渐降低,淋巴结转移阳性组低于阴性组($P<0.05$)。*AKT* mRNA 在乳腺癌中呈过度表达,与正常乳腺组织相比差异有统计学意义($P<0.01$)。*AKT* 表达随肿瘤分期和组织学分级的增高而逐渐增高,淋巴结转移阳性组高于阴性组($P<0.05$)(Table 2)。

2.2 PTEN、AKT 蛋白在乳腺癌组织中的表达

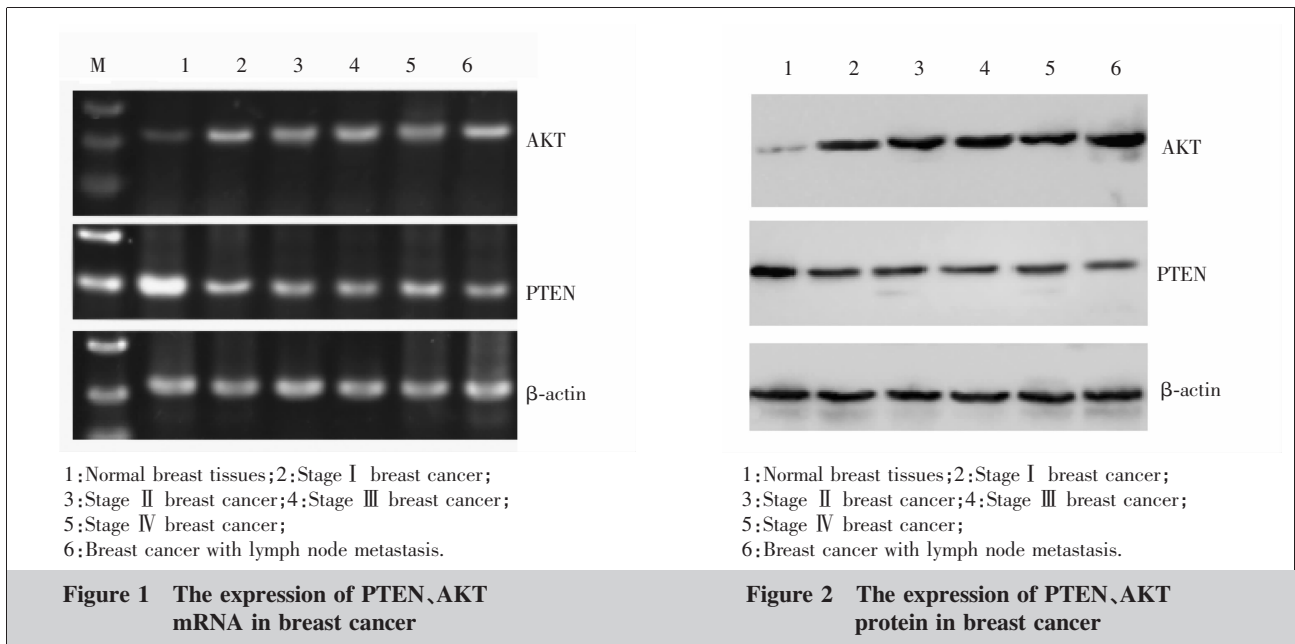
PTEN 蛋白在乳腺癌中表达低于正常乳腺组织,差异有统计学意义($P<0.01$)。*PTEN* 表达随肿瘤分期和组织学分级的增高逐渐降低,淋巴结转移阳性组表达高于淋巴结转移阴性组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。*AKT* 蛋白在乳腺癌中表达高于正常乳腺组织,差异有统计学意义($P<0.01$)。*AKT* 表达随肿瘤分期和组织学分级的增高逐渐增高,有淋巴结转移组表达高于无淋巴结转移组,差异均有统计学意义($P<0.05$)(Figure 2、Table 3)。

Table 1 Degenerate primer of *PTEN*、*AKT* and β -actin

Primers	Forward	Reverse	Length (bp)
<i>PTEN</i>	5' ACAAAGCCAACCGATAC 3'	5' AAACGGGAAAGTGCC 3'	506
<i>AKT</i>	5' GGACGATAGCTTGGAGGGA 3'	5' GCGACAGCGAAAGGTTAA 3'	788
β -actin	5' GCATGGAGTCCTGTGGCAT 3'	5' GGTGGCGTTTACGAAGATC 3'	320

Table 2 The expression of *PTEN*、*AKT* mRNA in breast tissues

Variable	N	<i>PTEN</i> mRNA	<i>P</i> value	<i>AKT</i> mRNA	<i>P</i> value
Histological type			0.013		0.002
Normal breast tissues	15	1.49 $\pm$ 0.64		0.39 $\pm$ 0.20	
Breast cancer tissues	64	0.99 $\pm$ 0.79		0.87 $\pm$ 0.47	
Clinicopathological stage			0.036		0.028
I	16	1.39 $\pm$ 0.77		0.53 $\pm$ 0.32	
II	34	0.96 $\pm$ 0.56		0.86 $\pm$ 0.53	
III	14	0.66 $\pm$ 0.43		1.27 $\pm$ 0.66	
Histological grade			0.029		0.040
I	12	1.48 $\pm$ 0.70		0.59 $\pm$ 0.45	
II	38	1.00 $\pm$ 0.62		0.86 $\pm$ 0.39	
III	14	0.57 $\pm$ 0.35		1.24 $\pm$ 0.92	
PR expression			0.888		0.683
-	30	1.03 $\pm$ 0.66		0.81 $\pm$ 0.51	
+~+++	34	0.97 $\pm$ 0.65		0.93 $\pm$ 0.62	
ER expression			0.919		0.506
-	19	1.01 $\pm$ 0.64		0.79 $\pm$ 0.45	
+~+++	45	0.99 $\pm$ 0.66		0.90 $\pm$ 0.62	
Lymph node metastasis			0.010		0.014
-	33	1.20 $\pm$ 0.77		0.70 $\pm$ 0.40	
+	31	0.78 $\pm$ 0.39		1.05 $\pm$ 0.67	



在乳腺癌中,PTEN 表达与 AKT 表达呈负相关,相关系数为-0.51,有统计学意义($P<0.01$)。

3 讨论

AKT 通路是重要的调节细胞增殖的信号通路,活化的 AKT 是细胞存活因子,作为一种丝氨酸/苏

氨酸蛋白激酶,通过磷酸化多个下游靶点降低凋亡因子与增加抗凋亡蛋白的活性^[1]。AKT 能够直接磷酸化促凋亡分子 BAD 发挥抗凋亡作用^[2];还能通过 NF- κ B,促进 caspase-8 类似物 c-FLIP 的表达抑制凋亡^[3];并且通过激活己糖激酶维持线粒体的稳定性从而抑制凋亡^[4]。本实验采用 RT-PCR 和 Western-Blot 方法对 64 例乳腺癌组织中 AKT mRNA 和蛋白

的表达进行了研究,发现 AKT 在乳腺癌中过度表达,高于正常乳腺组织。因此,推测 AKT 在乳腺癌发生中起一定的作用。AKT 信号通路在癌细胞迁移中也发挥重要作用。在哺乳类细胞,AKT 通过其下游的效应因子如 Rho、Rac1 和 cdc42 使细胞骨架重排,调节细胞运动。AKT 信号通路还可通过多种途径上调基质金属蛋白酶 2(MMP2),促进细胞侵袭^[5];促进血管内皮生长因子(VEGF)及其他血管生成因子的表达和

Table 3 Expression of PTEN、AKT protein in breast tissues

Variable	N	PTEN protein	P value	AKT protein	P value
Histological types			0.006		0.002
Normal breast tissues	15	1.11±0.60		0.42±0.19	
Breast cancer tissues	64	0.69±0.49		1.05±0.73**	
Clinicopathological stage			0.032		0.045
I	16	0.99±0.79		0.63±0.30	
II	34	0.64±0.29		1.02±0.72	
III	14	0.45±0.23*		1.58±0.81*	
Histological grade			0.030		0.042
I	12	1.04±0.90		0.63±0.38	
II	38	0.66±0.30		1.03±0.67	
III	14	0.45±0.23*		1.46±0.92*	
PR expression			0.479		0.824
-	30	0.73±0.43		1.02±0.66	
+~+++	34	0.65±0.56		1.07±0.81	
ER expression			0.370		0.464
-	19	0.79±0.64		0.94±0.59	
+~+++	45	0.65±0.42		1.09±0.79	
Lymph node metastasis			0.033		0.013
-	33	0.56±0.23		0.83±0.55	
+	31	0.82±0.64*		1.28±0.84*	

分泌,刺激血管生成^[6,7]。本研究发现,AKT在乳腺癌晚期癌组织中的表达高于早期癌组织,推测癌变发生后 AKT 的过度表达促进细胞增殖,抑制细胞凋亡,使癌组织细胞无限制生长扩散,并通过降解细胞外机制,促进血管生成,从而促进乳腺癌的发展。通过对 AKT 的表达与乳腺癌腋窝淋巴结转移的分析发现,两者之间存在相关性,AKT 在腋窝淋巴结转移阳性组的乳腺癌组织的表达明显高于阴性组,提示 AKT 在发生淋巴结转移时处于高表达状态,推测 AKT 参与乳腺癌的淋巴结转移过程。

抑癌基因 *PTEN* 是继 *p53* 之后人类肿瘤中突变率第二高的基因,*PTEN* 缺失使其对细胞生长的调控及对细胞凋亡、黏附和迁移的控制减弱,与人类多种肿瘤的发生、发展密切相关^[8]。本研究发现,*PTEN* 在乳腺癌中过度表达,高于正常乳腺组织,晚期癌中的表达高于早期癌,推测 *PTEN* 失活能抑制乳腺细胞凋亡,促进乳腺癌的发展。

PIP3 为 PI3K 的产物并介导 AKT 活化,*PTEN* 蛋白能使 PIP3 脱磷酸,抑制 PI3K/AKT 通路,从而发挥抑制细胞增殖、促进细胞凋亡等生物学作用^[9,10]。本研究发现乳腺癌中 *PTEN* 和 AKT 的表达呈负相关,提示在乳腺癌的发生中,由于 *PTEN* 的失活解除抑制 PI3K/AKT 通路,使乳腺细胞凋亡受抑制,无限制增殖,并促进乳腺癌的发展。*PTEN* PI3K/AKT 通路的异常在乳腺癌发生发展中发挥了重要的作用,为乳腺癌的靶向治疗研究提供新的思路。

参考文献:

- [1] Mayo LD,Donner DB. The PTEN,Mdm2,p53 tumor suppressor-oncoprotein network[J]. Trends Biochem Sci,2002,27(9): 462-467.
- [2] Khor TO,Gul YA,Ithnin H,et al. Positive correlation between overexpression of phospho-BAD with phosphorylated Akt at serine 473 but not threonine 308 in colorectal carcinoma[J].Cancer Letters,2004,210(2):139-150.
- [3] Micheau O,Lens S,Gaide O,et al. NF- kappaB signals induce the expression of c-FLIP [J]. Mol Cell Biol,2001,21(16):5299-5305.
- [4] Robey RB,Hay N. Mitochondrial hexokinases,novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt [J].Oncogene,2006,25(34):4683-4696.
- [5] Kim D,Kim S,Koh H,et al. Akt/ PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metal loproteinase production[J].FASEB J,2001,15(11):1953-1962.
- [6] Gordan JD,Simon MC. Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype[J]. Curr Opin Genet Dev,2007,17(1): 71-77.
- [7] Karar J,Maity A.PI3K/AKT/mTOR pathway in angiogenesis[J]. Front Mol Neurosci,2011,4(51):3389-3392.
- [8] Guanti G,Resta N,Simone C,et al.Involvement of PTEN mutations in the genetic pathways of colorectal cancerogenesis [J]. Hum Mol Genet,2000,9(2):283-287.
- [9] Khwaja A. PI3K as a target for therapy in haematological malignancies[J].Curr Top Microbiol Immunol,2010,347: 169-188.
- [10] Goo CK,Lim HY,Ho QS,et al.PTEN/Akt signaling controls mitochondrial respiratory capacity through 4E-BP1[J]. PLoS One,2012,7(9):e45806.