文章编号:1000-5404(2007)10-0935-03

论著

PI3K、p-Akt蛋白在喉鳞癌中的表达及临床意义

杨大志,姬长友 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所耳鼻咽喉-头颈外科,重庆 400042)

提 要:目的 研究磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)和蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)在人喉鳞状细胞癌组织中的表达特征及临床意义。**方法** 应用免疫组化S-P法检测40例喉鳞癌、20例声带息肉和20例喉乳头状瘤组织中PI3K和p-Akt的蛋白表达,显微镜下计数阳性细胞,对结果进行统计学分析。**结果** PI3K和p-Akt在声带息肉组织中均呈低表达;在喉乳头状瘤中,PI3K高表达,而p-Akt呈低表达;在喉鳞状细胞癌组织中,PI3K和p-Akt均呈高表达。喉鳞状细胞癌中PI3K和p-Akt的表达与喉癌临床分期、颈部淋巴结转移及肿瘤的原发部位均无明显差异($P>0.05$)。PI3K和p-Akt蛋白的阳性表达率随喉鳞癌分化程度的降低而降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。同一标本中PI3K和p-Akt的表达有显著的相关性($r=0.687$, $P<0.01$)。**结论** 喉鳞癌存在PI3K和Akt蛋白的异常表达并与癌细胞的病理分级关系密切,PI3K/Akt途径的异常活化可能在喉鳞状细胞癌发生过程中起重要作用。

关键词:喉肿瘤;免疫组化;PI3K、Akt
中图法分类号:R345.57;R730.23;R739.65 **文献标识码**:A

Expression and clinicopathologic significance of PI3K and p-Akt in laryngeal squamous cell carcinoma

YANG Da-zhi, JI Chang-you (Department of Otolaryngology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and protein kinase B (Akt) and their role in pathogenesis in laryngeal squamous cell carcinoma. **Methods** Immunohistochemical S-P method was used to detect the expression of PI3K and p-Akt in 40 paraffin-embedded human laryngeal squamous cell carcinoma, 20 cases of polyp of vocal cords and 20 cases of laryngeal papilloma. All the samples were stained by HE method to confirm their pathologic characteristics. Positive rates of PI3K and p-Akt were evaluated by microscopy. **Results** PI3K and p-Akt showed low expression in the polyp tissues of vocal cords, while they were of significantly higher expression in laryngeal squamous cell carcinoma ($P<0.01$). Papilloma cells revealed a high expression of PI3K, but low expression of p-Akt. The poor differentiation of cancer cells correlated well with the low expression of PI3K and p-Akt ($P<0.01$). There was a positive relationship between PI3K and p-Akt in the same sample ($r=0.687$, $P<0.01$). **Conclusion** PI3K and p-Akt express highly in laryngeal squamous cell carcinomas, which is related to the pathological differentiation and pathogenesis of the tumor.

Key words: laryngeal neoplasms; immunohistochemestry; PI3K; Akt

磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)是生长因子受体超家族信号传导途径中的一个关键分子。正常情况下,其活化而产生的类脂产物有PI-3, 4-P2(PIP2)和PI-3。4,5-P3(PIP3)作为第二信使结合并激活多种细胞内的靶蛋白,形成一个信号级联复合物,调节细胞的增殖、分化、存活和迁移等[1]。PI3K和其下游分子蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)所组成的信号传导通路在广泛的人类肿瘤谱中失调。该通路某些成分的异常改变所导致的功能获得或功能缺失能够引起细胞转化,可调节肿瘤细胞的增殖和存活,与肿瘤的发生发展密切相关。有关PI3K、Akt在喉鳞癌中的表达变化趋势迄今少见相关报道。我们采用免疫组织化学方法检测PI3K和磷酸化Akt(p-Akt)蛋白在喉鳞状细胞癌、喉乳头状瘤及声带息肉组织中的表达,以探讨PI3K和p-Akt蛋白异常表达与喉鳞癌发生及生物学行为的关系。

作者简介:杨大志(1977-),男,宁夏回族自治区银川市人,硕士研究生,主治医师,主要从事喉部肿瘤的基础和临床方面的研究。电话:(023)68757240,E-mail: zhuerdyang@163.com
通讯作者:姬长友,电话:(023)68757640
收稿日期:2006-09-28;修回日期:2006-11-16

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病例资料 选择本科2005年9月至2006年9月间经手术治疗的40例喉癌患者手术切除组织，均经病理诊断为喉鳞状细胞癌，术前均未接受化学治疗和放射治疗。所有组织标本经福尔马林固定，常规石蜡包埋。40例病例均为男性，年龄49～79岁，平均61.4岁。按1997年UICC临床分期标准，Ⅰ期5例，Ⅱ期13例，Ⅲ期13例，Ⅳ期9例。40例中有颈部淋巴结转移者16例，不伴转移者24例。组织学分级：高分化鳞癌23例，中分化鳞癌10例，低分化鳞状癌7例。

选择性别与年龄构成与上述40例无显著差异的声带息肉及喉乳头状瘤组织各20例作为对照。

1.1.2 试剂 兔抗人PI3K-p85亚单位多克隆抗体(Z-8)、兔抗人p-Akt多克隆抗体均购自瑞典Santa Cruz公司，工作浓度均为1∶100。免疫组化S-P染色即用型试剂盒购自武汉博士德公司。

1.2 方法

采用免疫组织化学S-P法，严格按照操作规定程序进行。对照实验同步进行。用PBS液代替一抗作为阴性对照，用已知阳性喉癌组织标本切片作为阳性对照。

1.3 结果判定

PI3K和p-Akt阳性细胞染色位于细胞质及细胞膜，呈棕黄色颗粒。半定量法计算阳性细胞平均百分率：每张切片选取5个高倍镜视野，每个视野计数100个细胞，计算各视野阳性细胞的平均百分比，阳性细胞数：<10%为(－)；10%～30%为(＋)；30%～70%为(＋＋)；70%以上为(＋＋＋)。

1.4 统计学处理

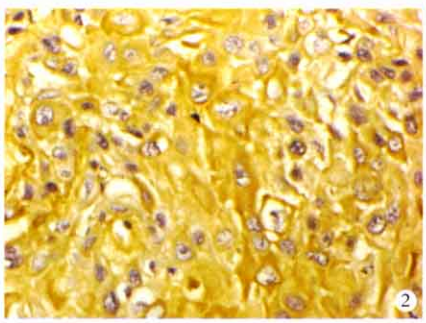
采用SPSS 13.0统计软件行χ^2检验、Fisher's确切概率法及Spearman等级相关分析。

2 结果

2.1 PI3K和p-Akt蛋白在声带息肉、喉乳头状瘤及喉鳞状细胞癌组织中的分布和表达特征

PI3K和p-Akt阳性细胞均为细胞质显示棕黄色，细胞核不着色。PI3K和p-Akt蛋白在一些声带息肉的正常黏膜角化细胞中可见极低的局灶性弱表达；在喉乳头状瘤中，PI3K呈高表达，而p-Akt的表达率与声带息肉相比则无显著性差异($P>0.05$)；在喉鳞状细胞癌组织中，PI3K和p-Akt均呈高表达(图1～3，表1)。





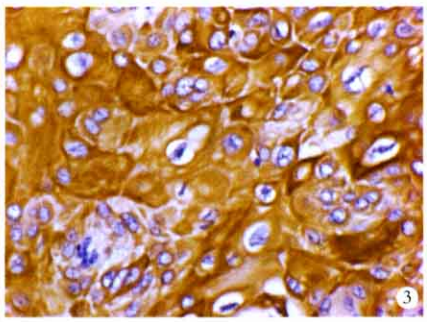


图1 PI3K在喉乳头状瘤中呈高表达 (S-P×200)

图2 PI3K在喉鳞状细胞癌中呈高表达 (S-P×400)

图3 p-Akt在喉鳞状细胞癌中呈高表达 (S-P×400)

表1 PI3K和p-Akt蛋白在声带息肉、喉乳头状瘤及喉鳞状细胞癌组织中的表达

指标	n	PI3K				p-AKt			
		－	＋	＋＋	＋＋＋	－	＋	＋＋	＋＋＋
声带息肉	20	17	3	0	0	18	2	0	0
乳头状瘤	20	5	13	2	0	16	3	1	0
喉鳞癌	40	7	25	8	0	3	7	13	17

2.2 PI3K和p-Akt蛋白的表达与喉癌的肿瘤原发部位、临床分期、病理分级、颈部淋巴结转移的关系

喉鳞状细胞癌中PI3K和p-Akt的表达与喉癌临床分期、颈部淋巴结转移及肿瘤的原发部位均无明显差异($P>0.05$)。PI3K阳性表达率随细胞分化程度的降低呈逐渐下降趋势，低分化组明显低于高分化组($\chi^2=19.023$，$P<0.01$)；p-Akt在不同分化程度的喉癌组织中的表达率亦随细胞分化程度的降低而降低($\chi^2=15.29$，$P<0.01$)，差异有统计学意义(表2)。

表2 PI3K和p-Akt蛋白在喉鳞状细胞癌组织中的表达

指标	n	PI3K				p-Akt			
		阳性例数	阳性率(%)	χ^2	P	阳性例数	阳性率(%)	χ^2	P
病理分级									
Ⅰ	23	23	100.0			23	100.0		
Ⅱ	10	8	80.0	19.023	0.000	10	100.0	15.29	0.00
Ⅲ	7	2	28.6			4	57.1		
临床分期									
Ⅰ～Ⅱ	18	14	77.8		0.709	16	88.9		0.155
Ⅲ～Ⅳ	22	17	77.3			21	95.5		
淋巴结转移									
转移	16	12	75.0		0.229	15	94.7		0.262
未转移	24	21	87.5			22	91.6		
肿瘤部位									
声门上型	8	6	75.0			7	87.5		
声门型	25	23	92.0		0.072	24	96.0		0.55
声门下型	7	4	57.1			6	85.7		

2.3　PI3K 和 p-Akt 蛋白在喉鳞癌组织中表达的相关性

40 例喉鳞癌组织中 32 例同时阳性表达 PI3K 和 p-Akt，3 例呈 PI3K 和 p-Akt 阴性表达（表 3），二者具有明显的正相关性（$P<0.01$）。

表 3　PI3K 和 p-Akt 蛋白在喉鳞癌组织中表达的相关性

PI3K	p-Akt				合计
	−	+	++	+++	
−	3	3	2	0	8
+	0	5	11	9	25
++	0	0	0	7	7
+++	0	0	0	0	0
合计	3	8	13	6	40

$r=0.687, P=0.000$

3　讨论

3.1　PI3K/ Akt 信号传导通路与肿瘤的关系

PI3K/ Akt 信号传导通路的异常改变，常出现在人类的一些恶性肿瘤组织中，在肿瘤发生、发展过程中的作用主要表现在促进细胞转化表型的改变，包括细胞生长、增殖、分化、黏附和迁移及参与抗凋亡信号等。各种癌基因酪氨酸激酶受体，如 *Src*、*Ras*、*Rac*、*Abl*、*v-Crk* 等均能活化 PI3-K[2]。PI3K/Akt 通路是 PI3K 主要介导的下游信号传导通路，Akt 是 PI3K 下游最直接的靶蛋白。PI3-K 的活化底物 PIP3 作为第二信使，与 Akt 的 PH 区结合，使之激活。活化的 Akt（磷酸化 Akt）通过磷酸化作用激活其下游分子 GSK-3、p70S6k、Bad、caspase-9 以及转录因子 FKHRL1 等，进而调节细胞的分裂、分化、黏附、迁移以及凋亡等活动[3]。

3.2　PI3K 和 p-Akt 在声带息肉、喉乳头状瘤中的表达

本实验结果表明，PI3K 和 p-Akt 蛋白在声带息肉的一些正常上皮角化细胞中呈极低的局灶性弱表达，提示 PI3K/Akt 信号转导途径在正常组织中即存在，行使正常的信号转导功能，维持细胞增殖、分化、凋亡等生理过程，只是在某些因素的刺激下才被异常激活，表现出介导癌症发生的特性。Sun 等[4] 的研究发现，与正常喉组织相比，人喉乳头状瘤中 PI3K 过表达且活性增强，但 Akt 的数量及活性却无明显升高。他们认为 PI3K 在喉黏膜角化细胞的早期分化过程中起重要作用，而 Akt 与此种作用无关。我们的实验结果表明：与声带息肉相比，PI3K 在喉乳头状瘤组织中的表达明显增高，两者间有显著性差异（$P<0.01$）；而 p-Akt 的阳性表达在声带息肉和喉乳头状瘤之间无显著性差异（$P>0.05$），这与国外的研究结果相符。

3.3　PI3K 和 p-Akt 在喉鳞癌中的表达及意义

与声带息肉相比，喉乳头状瘤中 PI3K 高表达，但 Akt 的数量却无明显升高，而喉癌组织中 PI3K 和p-Akt 均呈明显高表达，提示 PI3K/Akt 途径的异常活化可能在喉鳞状细胞癌发生过程中起关键作用。研究表明 Akt 可以阻断 *Bad*、*c-myc* 诱导的细胞凋亡，或活化胞内另外的信号转导，调节细胞的适应生存；Akt 亦可通过磷酸化其下游 GSK-3、caspase-9 或 FKHR 蛋白等，促进肿瘤细胞的生长，并可促进肿瘤血管生成。田慎之等[5] 的研究表明，喉癌组织中缺乏 PTEN，PTEN 可以抑制依赖 PIP3 激活的 Akt 的活化，下调由 PI3K/Akt 通路控制的细胞生长与存活。根据我们的研究结果推测：在多种致癌因子的作用下，PI3K 活化，PTEN 缺失，失去了对 PI3K/Akt 途径的负向调控作用，PI3K 依赖性的 Akt 的高度激活阻断了生理性的细胞凋亡，使细胞失去正常增殖与分化能力，从而导致癌变。

3.4　喉癌中 PI3K 和 p-Akt 的表达与病理分级的关系

高分化鳞癌中 PI3K 和 p-Akt 的阳性表达率显著高于低分化鳞癌，说明随着癌细胞分化程度的降低，PI3K/Akt 信号转导通路不再对喉鳞癌的进展起主要作用。PI3K 和 p-Akt 免疫组化染色也可作为判定喉癌细胞分化程度的一个免疫形态学指标。

本研究表明，喉鳞状细胞癌中 PI3K 和 p-Akt 的表达与喉癌临床分期、颈部淋巴结转移及肿瘤的原发部位均无明显相关性（$P>0.05$），提示它们可能与喉癌的预后无关。早期的喉鳞状细胞癌中即有 PI3K 和 p-Akt蛋白的高表达，这提示 PI3K/Akt 信号转导通路的激活可能与喉鳞癌的早期发生有关。

参考文献：

[1] Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, *et al*. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001, 17: 615 - 675.

[2] Dong Z, Huang C, Ma W Y. PI-3 kinase in signal transduction, cell transformation, and as a target for chemoprevention of cancer[J]. Anticancer Res, 2001, 19(5A): 3743 - 3747.

[3] Chang F, Lee J T, Navolanic P M, *et al*. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy[J]. Leukemia, 2003, 17(3): 590 - 603.

[4] Sun S, Steinberg B M. PTEN is a negative regulator of STAT3 activation in human papillomavirus-infected cells[J]. J Gen Virol, 2002, 83(Pt 7): 1651 - 1658.

[5] 田慎之，江孝清，池海超，等. 喉鳞状细胞癌中 P73、PTEN 基因的表达及其临床意义[J]. 癌症，2004，23(1)：90 - 94.

（编辑　陈聪连）