PI3K、p-AKT 及 AFP 在肝细胞癌组织中表达及意义

朱志立[1],米 娜[2],李 靖[2],黄小兵[2],王 梁[2],郑 璐[2] (第三军医大学:1. 基础医学部外科应用解剖与手术学教研室,重庆 400038;2. 新桥医院肝胆外科,重庆 400037)

[摘 要] **目的** 检测 PI3K、p-AKT 及 AFP 在肝细胞癌组织中的表达并探讨三者之间的相关性。**方法** 采用免疫组织化学 SP 法检测 42 例肝细胞癌组织和 10 例正常肝组织中 PI3K、p-AKT 及 AFP 三种蛋白的表达情况。**结果** PI3K 及 p-AKT 的阳性表达主要位于肿瘤细胞的胞浆内,AFP 的阳性表达主要位于细胞核或细胞浆内。PI3K、p-AKT 及 AFP 在肝癌组织中的阳性表达率分别为 71.4%、66.6% 和 78.5%,均显著高于三者在正常肝组织中的表达程度。PI3K、p-AKT 及 AFP 三者间的表达呈正相关。**结论** PI3K、p-AKT 及 AFP 的表达在肝癌的发展中起重要作用,PI3K/AKT 信号通路的激活可能受 AFP 的高表达促进。

[关键词] 肝细胞癌;PI3K;p-AKT;AFP

[中图分类号] R735.7 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2011)03-0246-03

Expressions and significances of PI3K, p-AKT and AFP protein in hepatocellular carcinoma

ZHU Zhi-li, MI Na, LI Jing, HUANG Xiao-bing, WANG Liang, ZHENG Lu (Department of Surgical Applied Anatomy and Operative Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the expression of PI3K, p-AKT and AFP proteins in hepatocellular carcinoma and to analyze the correlations among them. **Methods** The expressions of PI3K, p-AKT and AFP in 43 cases of hepatocellular carcinoma and 10 cases of normal hepatic were detected by SP immunohistochemical method. **Results** The positive staining of PI3K and p-AKT predominantly was observed in the cytoplasm of tumorous cells while that of AFP was predominantly observed in the cytoplasm or nucleus. The positive expression rates of PI3K、p-AKT and AFP were 71.4%, 66.6% and 78.5% respectively in hepatocellular carcinoma tissues, notablely higher than those in normal hepatic tissue. Positive correlations were found among the 3 proteins. **Conclusion** The expressions of PI3K, p-AKT and AFP are very important in the growth of hepatocellular carcinoma. The high expression of AFP may activate the PI3K/AKT signaling pathway.

Keywords: hepatocellular carcinoma; PI3K; p-AKT; AFP

PI3K/AKT 信号转导通路在抗凋亡机制中发挥着重要的作用,其异常活化可以使肿瘤细胞逃避凋亡,促进肿瘤血管新生和肿瘤发生。PI3K(磷脂酰肌醇 3-激酶)是生长因子受体超家族信号转导途径中的一个关键分子,具有脂类激酶活性和蛋白激酶活性。AKT 又称蛋白激酶 B(PKB),为细胞内信号转导通路上的一种原癌基因。PI3K 使 AKT 活化后生成磷酸化 AKT(p-AKT)可通过磷酸化调节一些和细胞凋亡直接或间接相关的底物蛋白,发挥促肿瘤细胞生存、促进细胞周期行进以及促生长作用[1]。AFP 是一种特异性较强的原发性肝癌标志物,可抑制免疫攻击,促进肝癌细胞生长[2],并能导致 PI3K/AKT 活化[3]。本研究通过检测正常肝组织和肝细胞癌中 PI3K、p-AKT 及 AFP 的表达,探讨三者在肝癌中表达的意义及相关关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集第三军医大学新桥医院肝胆外科 2008 年至 2010 年间手术切除的 42 例肝细胞癌标本(肝癌组),其中患者男性 32 例,女性 10 例,年龄 29 ~ 76 岁,平均(48.15 ± 4.03)岁。受检者均为初诊手术的肝细胞癌患者,术前未接受化学治疗、放射治疗及免疫抑制治疗等,所有标本均经病理组织学切片证实。另取 10 例肝血管瘤或肝外伤患者的正常肝组织标本做对照(正常组)。

1.2 方法

所有标本均选取新鲜组织中最典型部分,经 40 g/L 缓冲中性福尔马林液固定,常规石蜡包埋,5 μm 厚度连续切片。采用免疫组织化学 SP 法检测肝癌组织和正常肝组织中 PI3K、p-AKT及 AFP 三种蛋白表达情况。免疫组织化学染色 PI3K 兔抗人多克隆抗体,p-AKT 鼠抗人单克隆抗体和鼠抗人 AFP 单克隆抗体购自武汉博士德生物制品公司。其余材料及试剂取自第三军医大学新桥医院中心实验室。切片经二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,高温高压抗原修复,EnVisionTM 法染色,DAB 显色,苏木精复染,脱水、透明、封片。每批染色均用已知阳性片作为阳性对照,PBS 代替 PI3K、p-AKT、AFP 抗体作为阴性对照。

[基金项目] 重庆市自然科学基金资助项目(2010BB5183)

[作者简介] 朱志立(1982 -),男,重庆市人,助教,本科,主要从事外科手术学方面的研究。电话:(023)68752251

[通讯作者] 郑 璐,电话:(023)68774606,E-mail:xqyyzl@gmail.com

[收稿日期] 2011-03-14 [修回日期] 2011-04-15

1.3 结果判断

细胞胞浆内出现棕黄色颗粒则判定 PI3K、p-AKT 阳性染色,细胞浆或细胞核内出现棕黄色颗粒则判定 AFP 阳性染色。染色结果判断方法:先按照染色强度进行计分,0 分为无色,1 分为浅黄色,2 分为棕黄色,3 分为棕褐色;再在高倍镜(400 倍)下每张切片随机选取 5 个视野,每个视野计数 500 个细胞,共计 2 500 个,按阳性细胞所占的百分比计分:0 分(显色细胞为 0%),1 分(显色细胞少于 10%),2 分(显色细胞 10% ~ 50%),3 分(显色细胞多于 50%),积分为染色强度计分与阳性细胞百分比计分的乘积,范围 0 ~ 9 分,大于等于 2 分为免疫组化阳性。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行 χ^2 检验和相关性检验,$P<0.05$有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化染色结果

PI3K、p-AKT 蛋白的阳性表达主要位于肿瘤细胞胞浆(图 1a、b),AFP 的阳性表达主要位于细胞胞浆或细胞核(图 1c)。PI3K 蛋白阳性表达在癌组织的细胞浆中呈深棕色染色,p-AKT 蛋白的阳性表达在胞浆内呈膜下型、全浆型表达,AFP 的阳性表达主要位于胞浆,呈弥漫性,少数也可见胞膜和核膜染色。在 42 例肝细胞癌组织中,PI3K、p-AKT 及 AFP 的阳性表达率分别为 71.4%、66.6% 和 78.5%(表 1)。在 10 例正常肝组织中,有 1 例 PI3K 及 2 例 p-AKT 出现阳性染色,而 AFP 在 10 例正常肝组织中均为阴性表达(图 1d)。PI3K、p-AKT 及 AFP 在肝细胞癌组织中的阳性表达率均显著高于正常肝组织中的阳性表达率,差异有显著的统计学意义($P<0.01$)。

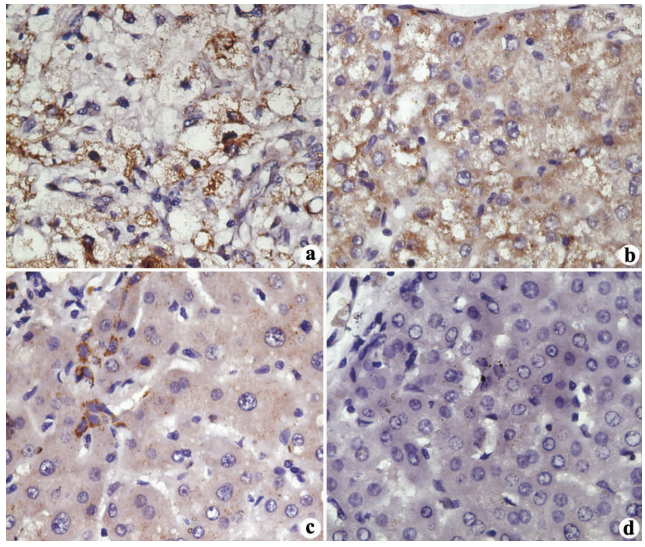
表 1 PI3K、p-AKT、AFP 在正常肝组织和肝细胞癌组织中的表达(n,%)

组别	n	PI3K 阳性	p-AKT 阳性	AFP 阳性
正常组	10	1(10.0)	2(20.0)	0(0)
肝癌组	42	30(71.4)*	28(66.6)*	33(78.5)*

*:与正常组比较,$P<0.01$

2.2 肝细胞癌组织中 PI3K、p-AKT 和 AFP 表达之间的关系

PI3K 及 p-AKT 均阳性表达 23 例,均阴性表达 7 例,两者呈正相关,r 值为 0.641。PI3K 及 AFP 均阳性表达 26 例,均阴性表达 5 例,两者呈正相关,r 值为 0.625。p-AKT 及 AFP 均阳性表达 25 例,均阴性表达 6 例,两者呈正相关,r 值为 0.598,见表 2。



a:PI3K 在肝细胞癌中表达;b:p-AKT 在肝细胞癌中表达;c:AFP 在肝细胞癌中表达;d:正常肝组织中未见 AFP 表达

图 1 肝癌和正常肝组织 PI3K、p-AKT 及 AFP 免疫组织化学染色(SP 法 ×400)

表 2 肝细胞癌组织中 PI3K、p-AKT 和 AFP 表达之间的关系

项目		PI3K		AFP		p-AKT		r 值	P 值
		+	-	+	-	+	-		
p-AKT	+	23	5					0.641	<0.05
	-	7	7						
PI3K	+			26	4			0.625	<0.05
	-			7	5				
AFP	+					25	8	0.598	<0.05
	-					3	6		

3 讨论

PI3K/AKT 信号通路作为细胞内重要信号转导通路之一,通过影响下游多种效应分子的活化状态,在细胞内发挥着抑制凋亡、促进增殖的关键作用,它与人类多种肿瘤的发生发展密切相关。PI3K 是由调节亚基 p85 和催化亚基 p110 所组成的异二聚体。PI3K 通过两种方式激活,一种是与具有磷酸化酪氨酸残基的生长因子受体或连接蛋白相互作用,引起二聚体构象改变而被激活;另一种是通过 Ras 和 p110 直接结合导致 PI3K 活化[3]。PI3K 和其下游分子丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 AKT 所组成的 PI3K/AKT 信号通路异常对维持肿瘤细胞恶性生物学特性中起着重要的作用[4]。AKT 为细胞内信号转导通路上的一种原癌基因,活化后的 AKT(p-AKT)可通过磷酸化调节许多靶基因、各种激酶、转录因子及其他调节分子,发挥促肿瘤细胞生存、促进细胞周期行进以及促生长作用[5]。AFP 被公

认为是一种特异性较强的原发性肝癌标志物,是早期诊断肝癌及监测其复发和转移的生化指标之一。肝癌细胞高表达 AFP 被认为是维持肝癌细胞在体内得以生存的重要因子[6]。研究发现 AFP 受体可通过 cAMP-PKA、Ca 离子,TPK-Ras-MAPK 等多信号转导途径调节肝癌细胞生长[7],并能促进 p21Ras 蛋白的表达。Ras 蛋白是酪氨酸蛋白激酶(TPK)信号转导途径的重要组成成分,已有研究证实 Ras 可与磷脂酰肌醇 3-激酶催化亚单位(PIK3CA)直接结合,导致 PI3K/AKT活化[3]。

本研究结果显示 PI3K、p-AKT 及 AFP 在肝癌组织中的阳性表达率均显著高于正常肝组织,表明在肝癌中 PI3K/AKT 信号通路是激活的,AFP 的表达明显上调,提示 PI3K、p-AKT 及 AFP 的表达,PI3K/AKT 途径的异常活化在肝癌的发生发展过程中起重要作用,PI3K/AKT 信号通路的激活可能受 AFP 的高表达促进。研究结果还显示 PI3K 与 p-AKT、PI3K 与 AFP 及 p-AKT 与 AFP 的表达均呈正相关关系,且有统计学意义。这提示在肝癌细胞中 AFP 的表达与 PI3K/AKT 信号通路的活化是有关联的,PI3K/AKT 信号通路激活可能促进 AFP 的表达。但其具体的相互作用机制仍未完全明确,有待进一步的实验研究。

肝癌的生长与 PI3K、p-AKT 及 AFP 的表达密切相关,PI3K/AKT 信号通路的激活可能受 AFP 的高表达促进。目前国内外鲜有关于 AFP 介导 PI3K/AKT 信号通路的研究报道,如能进一步阐明 AFP 介导 PI3K/AKT信号通路的存在,则可为肝癌的治疗提供新的有效途径。

[参考文献]

[1] Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(7): 489 – 501.

[2] Mizejewski GJ. Alpha-fetoprotein structure and function: relevance to isoforms, epitopes, and conformational variants[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2001, 226(5): 377 – 408.

[3] Ward SG, Finan P. Isoform-specific inhibitors as therapeutic agents [J]. Curr Opin Pharmacol, 2003, 3(4): 426-434.

[4] 孙晓杰,黄常志. PI3K-AKT 信号通路与肿瘤[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(3): 306 – 311.

[5] Donahue AC, Fruman DA. PI3K signaling controls cell fate at many points in B lymphocyte development and activation[J]. Semin Cell Dev Biol, 2004, 15(2): 183 – 197.

[6] Si S, Sun Y, Li Z, et al. Gene therapy by membrane-expressed superantigen for alpha-fetoprotein-producing hepatocellular carcinoma [J]. Gene Ther, 2006, 13(22): 1603 – 1610.

[7] 李孟森,李平风,杜国光,等. 甲胎蛋白对 HeLa 细胞 N-ras、p53 和 p21ras 表达的促进作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2002, 18(6): 750 – 754.

(编辑:余汇洋)

(上接第 245 页)

嘶,双侧损伤表现为失声或呼吸困难。其中 1 例患者出现呼吸困难,迅速予以气管切开,之后给予针灸、理疗、药物治疗均无效,最终行永久性气管切开。其余不同程度的声嘶患者经药物、针灸、理疗等处理后恢复正常。如发现神经损伤,应迅速行自体静脉桥接术,手术视野尽量暴露清楚,使其修复,疗效确切[2]。术后待患者清醒后,嘱患者大声说话,了解神经损伤情况;术后进半流质饮食,吞咽时应小心缓慢,减少说话,以促进声带恢复。

2.3 甲状腺危象的护理

甲状腺危象患者主要表现为高热、脉搏短促、心率增快、恶心、呕吐、腹泻、不同程度的意识障碍等,术后出现以上情况后,及时通知医生,辅助医师予以降温、抑制甲状腺激素合成、碘化钾、减慢心率、糖皮质激素等对症处理,同时严密观察患者生命体征,做出合理的动态处理[3]。

2.4 甲状旁腺损伤的护理

本组有 2 例甲状旁腺损伤患者,该并发症是由于甲状旁腺损伤引起的低钙血症所导致的一系列非典型症状,主要表现为肢体、口周感觉异常、抽搐等现象,出现上诉情况时予以静脉注射 10% 葡萄糖酸钙 10 ~ 20 mL,同时嘱患者食低磷高钙饮食。

2.5 甲状腺功能减退的护理

甲状腺功能减退患者临床症状表现为乏力、怕冷、反应迟钝、肌肉酸痛、心率过缓、食欲差等,实验室生化检查发现 TSH 增高,TT4 和 FT4 降低。该并发症主要是因为手术造成的,如甲状腺组织切除或损伤过多,或者是由于甲状腺血管损伤引起血液供应障碍等。术后补充适量的碘和足量的蛋白质,可进食低脂低胆固醇饮食,同时予以左甲状腺素替代治疗,嘱患者终生服药,定期随访复查[4]。

通过对本组 155 例甲状腺手术患者护理资料的分析发现,甲状腺手术术后并发症的护理关键在于及时发现并发症,同时积极配合医生做好防治工作。做到术前准备工作充分,术后密切监视患者生命体征和临床表现,促进良好预后,不仅减少患者痛苦和经济负担,而且提高了生存质量,为社会节省了不少医疗资源。

[参考文献]

[1] 张 军,张永久. 甲状腺术后再次出血 4 例诊治分析[J]. 中国误诊学杂志, 2010, 10(28): 7031.

[2] 王志明,李劲东,吕新生,等. 静脉桥接修复喉返神经缺损的实验研究[J]. 中国普通外科杂志, 2000, 9(6): 504 – 507.

[3] 曹明炎,孟 镔,牛鹏辉,等. 甲状腺大部分切除术后并发症的临床分析[J]. 局解手术学杂志, 2009, 18(5): 329.

[4] 姜 伟. 甲状腺功能减退症患者的护理体会[J]. 中国现代药物应用, 2010, 4(8): 185 – 186.

(编辑:何泓睿)