基础研究 文章编号:0253-3626(2010)02-0172-03

Akt 在肝细胞癌中的表达及其临床意义

冯春红[1],陈 润[2],李 波[1],贺 凯[1],张孟瑜[1],苏 松[1],夏先明[1]
(1.泸州医学院第一附属医院肝胆外科,泸州 646000;2.泸州医学院卫生统计学教研室,泸州 646000)

【摘 要】目的:探讨蛋白激酶 B(Protein kinase B,PKB/Akt)在肝细胞肝癌(Hepatocellular carcinoma,HCC)组织及癌旁肝组织(Liver tissue just around the tumor,LAT)中的表达变化,并分析其与 HCC 临床分级之间的关系。方法:采用逆转录聚合酶链反应(Reverse transcription -polymerase chain reaction,RT-PCR)、免疫印迹(Western blot)以及免疫组织化学染色方法检测 HCC 组织标本中癌及癌旁 Akt 的表达变化,并分析 Akt 的表达与 HCC 临床分级之间的关系。结果:Akt 在 HCC 癌组织中的表达高于癌旁组织,Akt 在癌组织中表达的阳性强度与临床分级呈正相关,癌组织中过表达的 Akt 在细胞核的定位明显增强。结论:Akt 的过表达在 HCC 的发生、发展中具有重要作用。

【关键词】Akt;肝细胞肝癌;临床分级
【中国图书分类法分类号】R735.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-05-12

Expressions and clinical significancer of Akt proteins in hepatocellular carcinoma

FENG Chun-hong, et al
(*Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital of Luzhou Medical College*)

【Abstract】*Objective:* To investigate the expression of Akt proteins in hepatocellular carcinoma (HCC) and it's relation with clinical grading. *Methods*: Firstly, the mRNA levels of Akt in HCC and liver tissue just around the tumor(LAT) were detected by semi-quantitative reverse transcription and the polymerase chain reaction (RT-PCR). Then, analyzing the expression of Akt proteins in HCC and LAT by Western blot and immunohistochemical methods. Finally, the relation between Akt proteins level and HCC clinical grading was analyzed. *Results*: The expression of Akt in HCC are much higher than LAT, and there is a positive correlation between Akt proteins level and HCC clinical grading. Furthermore, Akt is highly concentrated in the nucleus of HCC. *Conclusion*: The over-expression of Akt may play an important role in the occurrence and development of HCC.

【Key words】Akt; Hepatocellular carcinoma; Clinical grading

肝细胞肝癌(Hepatocellular carcinoma,HCC)的发生是一个多步骤、多因素的长期过程,其中多基因的改变包括癌基因的激活和抑癌基因的失活。蛋白激酶 B(Protein kinase,PKB/Akt)具有丝/苏氨酸蛋白激酶活性,Akt 自身被磷酸化而激活后,通过磷酸化胞内多种底物蛋白质,调节它们的活性,参与调控细胞内多种信号途径,在促进细胞存活及增殖、阻止细胞凋亡、调节糖代谢和蛋白合成等过程中起着十分关键的作用[1]。PI3K/Akt 通路是介导细胞存活与否的一条经典通路,体内许多肿瘤发生均与该通路异常激活密切相关,有研究表明在胃癌、卵巢癌、胰腺癌和乳房癌存在 Akt 的过度表达。本研究检测了 HCC 组织和癌旁组织中 Akt 的表达差异其与临床分级之间的关系。

作者介绍:冯春红(1977-),女,主治医师,研究方向:肝胆胰疾病。
通讯作者:李 波,男,副教授,E-mail:liboer2002@126.com。
基金项目:四川省科技厅科研项目资助(编号:05JY029-146);四川省卫生厅科研项目资助(编号:080196)。

1 材料和方法

1.1 标本及试剂

收集泸州医学院附属医院手术切除 HCC 标本及癌旁组织(石蜡包埋)26 例。Trizol Reagent 为 INVITRIOGEN 公司产品;DEPC 为赛百盛公司产品;琼脂糖为 Promega 产品;溴化乙锭(EB)为 Ameresco 产品;RT-PCR 反应试剂盒为TAKARA 公司产品;氯仿、异丙醇、溴酚蓝为上海生工公司产品;Akt 和 GAPDH 单克隆抗体为 CST 公司产品;持久性化学发光底物检测试剂盒购自 Pierce 公司。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 检测 HCC 组织中 Akt 基因表达 按照 TRIZOL 试剂盒说明进行总 RNA 抽提。根据鼠白血病病毒(Murine leukemia virus, MLV)反转录酶的操作说明进行 cDNA 合成,合成产物采用 Taq 酶进行扩增,用 1.5%的琼脂糖凝胶分离 RT-PCR 产物。采用凝胶图像分析系统对电泳条带扫描分析,计算目的基因 mRNA 的相对表达量并作比较分

析。Akt 上游引物为 5'-GGAGGACAATGACTACGGC-3'，下游引物为 5'-TCATCTTGGTCAGGTGGTGT-3'，GAPDH 上游引物为 5'-AGAACATCATCCCTGCCTCAC TG-3'，下游引物为 5'-CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC-3'。RT-PCR 条件：50℃预变性 30 min，94℃变性 2 min，55℃退火 30 s，72℃延伸 30 s，扩增 30 循环，最后 72℃补平 7 min。取 10 μl 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶在紫外分析仪下观察结果，用 Bio-Rad Doc Gel 2000 凝胶成像分析系统进行拍照。

1.2.2 Western blot 检测 HCC 组织中 Akt 蛋白表达 SDS-PAGE 电泳分离蛋白后，采用半干式电转移将蛋白分子转移到 PVDF 膜，电转移结束后将 PVDF 膜用洗膜缓冲液 TBST 洗涤 3 次（5 min/ 次），封阻缓冲液（5%BSA）在室温下密闭轻摇动封阻 1 h，洗膜缓冲液洗涤 3 次（5 min/ 次）后，将 PVDF 膜分别与 I 抗稀释液（Akt 单克隆抗体或 GAPDH 单克隆抗体，I 抗与封阻缓冲液之比为 1:1 000）室温下轻摇动孵育 2 h，洗膜缓冲液洗涤 3 次（5 min/ 次），将 PVDF 膜分别与 II 抗稀释液（II 抗与封阻缓冲液之比为 1:2 000）于室温下轻摇动孵育 1 h，洗膜缓冲液洗涤 3 次（5 min/ 次）。在弱光下加入化学发光底物（0.125 ml/cm²）摇动 5 min 后，取出夹在透明的塑料袋中，排除膜与塑料间的气泡，然后在暗室中将其正面向上紧贴 X 光片在暗匣中曝光 20 s，用自动洗片机冲洗 X 光片，即得到 Akt、GAPDH 的免疫印迹图谱。

1.2.3 免疫组化检测 Akt 蛋白质表达 石蜡切片 65℃烘烤，脱蜡。3%H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶，微波修复抗原。10% 山羊血清封闭，Akt 单克隆抗体（1:100）4℃过夜孵育。PBS 冲洗，生物素标记羊抗鼠 IgG 置于室温下 30 min。辣根过氧化酶标记链霉卵白素室温下孵育 30 min，冲洗后 DAB 显色，苏木精染细胞核，封固。Akt 蛋白阳性表达呈棕黄或棕褐色颗粒。光学显微镜观察。样本染色评分参照 Formwitz 评分方法。每张玻片随机观察 5 个 40 × 10 倍视野，无阳性细胞者计 0 分，阳性细胞 <25%者 1 分，阳性细胞 25% ~50%者 2 分，阳性细胞 50% ~75%者 3 分，阳性细胞 >75%者 4 分。显色情况评分：无色 0 分，淡黄色 1 分，棕黄色 2 分，棕褐色 3 分。以上 2 项得分的乘积即该样本的染色得分，根据上述得分评价样本染色情况：0 分为阴性（－），1 ~ 4 分弱阳性（+），5 ~ 8 分阳性（++），9 ~ 12 分强阳性（+++），对每张切片中肝癌组织和癌旁肝组织分别进行评分。

1.3 统计学分析

用 SAS9.0 统计软件对资料进行分析，采用相对数指标对数据进行描述，采用符号秩和检验、Spearman 等级相关进行统计推断，检验水准均采用双侧 0.05。

2 结 果

2.1 HCC 标本中 Akt 的 mRNA 水平

随机选取的 3 例 HCC 标本的半定量 RT-PCR 结果，结果表明其中 2 例 Akt 的 mRNA 水平在癌组织中明显高于癌旁组织（见图 1）。

2.2 HCC 中 Akt 蛋白表达水平的检测

随机选取 3 例 HCC 标本检测癌及癌旁组织的 Akt 蛋白水平，Western blotting 结果（图 2）表明癌组织中 Akt 的蛋白水平高于对应的癌旁组织。

对 26 例标本进行免疫组织化学染色分析，结果见表 1。肝细胞癌及癌旁肝组织中 Akt 表达的弱阳性率分别为 26.9%、57.7%，阳性率分别为 42.3%、23.1%，强阳性率分别为 26.9%、3.8%，其中肝细胞癌的阳性强度高于对应癌旁肝组织的标本总数为 21 例，采用符号秩和检验对 Akt 在肝细胞癌及癌旁肝组织中的表达程度进行差异性检验，结果显示：Akt 在癌旁组织中的表达程度比在肝细胞癌中的表达程度更强（S=120，P<0.000 1）。免疫组化显示在 HCC 组织中高表达的 Akt 在细胞核中有明显的聚集趋势，而 Akt 在癌旁组织主要是定位于胞浆中（图 3）。

2.3 HCC 中 Akt 表达水平与临床分级间的相关性

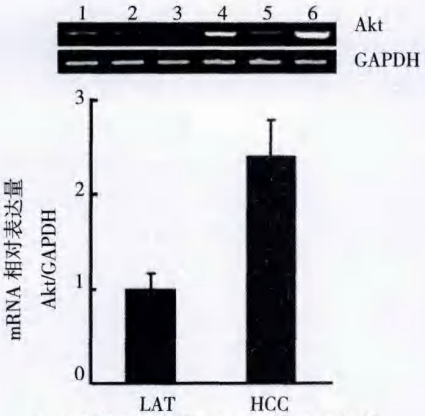
对上述 26 例标本进行 Akt 免疫组织化学染色水平与临床分级间的相关分析，结果见表 2。采用 Spearman 秩相关进行分析，得：r_s=0.988 7，P<0.05，可见 Akt 表达水平与临床分级间呈正相关，即 Akt 表达水平越高其所对应的临床分级越高。

表 1 肝癌组织及癌旁肝组织 Akt 表达情况

组织	Akt 表达情况（例数/百分比）				例数
	－	+	++	+++	
HCC	1(3.9)	7(26.9)	11(42.3)	7(26.9)	26
LAT	4(15.4)	15(57.7)	6(23.1)	1(3.8)	26

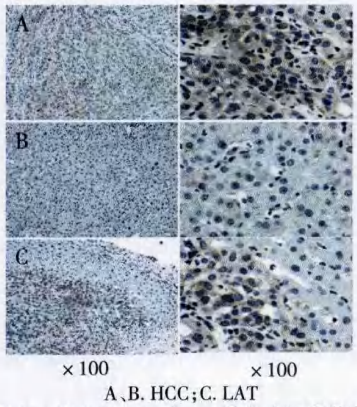
表 2 HCC 中 Akt 表达水平与临床分级间的相关分析

Akt 水平	临床分级				合计	r_s	P
	I	II	III	IV			
－	0	1	0	0	1	0.989	<0.05
+	1	2	2	2	7		
++	1	5	4	1	11		
+++	0	2	3	2	7		
合计	2	10	9	5	26		



1、3、5 为 LAT 组织；2、4、6 为 HCC 组织

图 1　癌及癌旁组织 Akt 的 mRNA



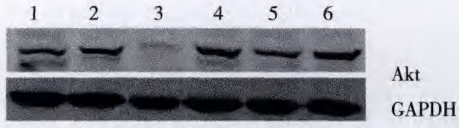
A、B. HCC；C. LAT

图 3　HCC 及 LAT 中 Akt 的免疫组化学染色

3　讨　论

肿瘤的发生是由于细胞增殖和分化失常，其关键是调控增殖、分化的基因及其编码的蛋白分子在细胞中的异常表达或调控发生变化。PI3K/Akt 信号转导通路是一条参与细胞增殖调控的重要信号通路，PI3K 和 Akt（又称 PKB）是该通路中的中心环节，Akt 是位于 PI3K 下游的 1 个重要丝苏氨酸激酶，是促进细胞生存和维持细胞正常功能的关键信号分子。PI3K 的作用是催化肌醇磷脂肌醇环上 3 位羟基磷酸化，生成各种 3- 磷酸肌醇磷脂，包括 PI-3-P、PI-3,4-P2 和 PI-3,4,5-P3。生长因子受体活化后可激活 PI3K，使细胞质膜 3- 磷酸肌醇磷脂含量增高。Akt 可与质膜上的 3- 磷酸肌醇磷脂（主要是 PI-3,4,5-P3）结合并被部分活化。3- 磷酸肌醇磷脂还可激活 PDK（PKB 激酶），后者使 Akt 磷酸化全部激活。Akt 激活后可激活核糖体 S6 激酶（Ribosomal S6 kinase，Pm），促进蛋白质合成及细胞增殖，Akt 也可促进 Bcl-2 表达，阻止细胞凋亡[2]。PI3K/Akt 传导通路在体内肿瘤发生、发展过程中起重要纽带作用。Akt 在介导细胞生长和增殖、细胞运动和侵袭、细胞凋亡等方面均起着重要作用[8]。目前的研究表明 GSK3α/β、FOX01、TSC2、IKKα、BAD、MDM2 等均为 Akt 调控的重要下游靶分子[6]，正是这些分子使得 Akt 具备了对细胞的代谢、生长、增殖，甚至是癌变的重要调控作用。

有研究证实 HCC 中存在 PI3K 和 Akt 的过度激活，HCC 中 PI3K 的突变导致 Akt 的持续活化，而 Akt 的过表达同样



1、3、5 为 LAT；2、4、6 为 HCC 组织

图 2　癌旁及癌组织 Akt 蛋白水平

会引起 Akt 通路的过度激活，Akt 的过表达在 HCC 的发生发展中起到了重要的作用，Akt 的磷酸化程度与 HCC 患者的预后也有密切的联系[4]。研究表明 HCC 组织中 Akt 蛋白表达水平明显高于癌旁组织，且随肿瘤组织的临床病理分期、分化程度不同而变化，证明 Akt 信号通路在 HCC 转移中起非常重要的作用从而证实同其他恶性肿瘤一样，Akt 的磷酸化程度与 HCC 患者的预后有密切的联系[7]。我们研究表明 Akt 在 HCC 癌组织中的表达高于癌旁组织，证实 Akt 的表达与 HCC 的发生有密切关系。有研究表明在细胞中 Akt 的表达定位主要是胞浆，但是在某些细胞和肿瘤组织中也发现了 Akt 在细胞核内集聚，提示 Akt 可以在细胞核内发生活化，进而对其对靶分子实施调控[5,6]，因而推测 Akt 在细胞核内的聚集活化可能与肿瘤的发生、发展有着密切的联系。我们证实在 HCC 组织中高表达的 Akt 在细胞核中有明显的聚集趋势，而 Akt 在癌旁组织主要是定位于胞浆中。细胞的增殖和凋亡之间的平衡是维持细胞正常长所必需的，增殖和凋亡的失平衡导致肿瘤形成，Akt 基因在 HCC 细胞核中表达增强，可以促进细胞增殖及抑制细胞凋亡，进一步证实 Akt 与 HCC 发生有重要关系。此外，我们证实 Akt 在癌组织中表达的阳性强度与临床分级呈正相关，低分化的 HCC 细胞容易发生侵袭转移，表明 Akt 与 HCC 的转移有密切关系。

参　考　文　献

[1] Nicholson K M, Anderson N G. The protein kinase B/Akt signaling pathway in human malignancy[J]. Cell Signal, 2002, 14 (5): 381-395.

[2] 李亚丽，邹　伟，马克里，等. PEMT2 过表达抑制大鼠肝癌细胞 PI3 K，Akt 的表达[J]. 生物化学与生物物理进展，2004，31(4): 345-348.

[3] Boyault S, Rickman D S, de Reyniès A, et al. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets[J]. Hepatology, 2007, 45 (1): 42-52.

[4] Borgatti P, Martelli A M, Tabellini G, et al. Threonine 308 phosphorylated form of Akt translocates to the nucleus of PC12 cells under nerve growth factor stimulation and associates with the nuclear matrix protein nucleolin[J]. J Cell Physiol, 2003, 196 (1): 79-88.

[5] Vasko V, Saji M, Hardy E, et al. Akt activation and localisation correlate with tumour invasion and oncogene expression in thyroid cancer[J]. J Med Genet, 2004, 41 (3): 161-170.

[6] Wang R, Brattain M G. Akt can be activated in the nucleus[J]. Cell Signal, 2006, 18 (10): 1722-1731.

[7] 谭莉莉，白文元. PI3K/Akt 信号通路与肝细胞癌[J]. 国际肿瘤学杂志，2008，28(2): 120-122.

[8] 王　爽，贾延劼，谢　鹏，等. 磷脂酰肌醇 -3 激酶/Akt 在体外神经干细胞存活和分化中作用的实验研究[J]. 重庆医科大学学报，2005，30(4): 489-492，496.

（责任编辑：冉明会）