

文章编号:1005-6947(2006)04-0274-03

· 基础研究 ·

PTEN 和 mTOR 信号转导通路在胆管癌发展中作用的研究

刘民锋, 罗剑, 余险峰, 唐启彬, 陈勇军, 邹声泉

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 普通外科, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 研究 PI3K/PTEN/AKT/mTOR 信号转导通路中 mTOR 和 PTEN 蛋白在胆管癌中的表达及其在胆管癌发生、发展中的作用。方法 用免疫组织化学方法和 RT-PCR 法, 检测胆管癌中 mTOR 和 PTEN 的表达。结果 与正常组织相比, 免疫组化法和 RT-PCR 两种方法结果均显示, 胆管癌中的 mTOR 表达明显增加, 而 PTEN 的表达明显下降; 两者呈负相关 ($r = -0.862, P < 0.01$)。结论 PI3K/PTEN/AKT/mTOR 信号转导通路中重要的调节位点和节点 PTEN 在胆管癌中的表达明显降低, 而 mTOR 的表达明显增高。提示该信号转导通路在介导胆管癌的发生、发展的过程中起重要作用。

关键词:胆管肿瘤; 信号传导; mTOR; PTEN

中图分类号: R735.8 **文献标识码:** A

Effect of expression of PTEN and mTOR Gene Protein in the development of cholangiocarcinoma

LIU Min-feng, LUO Jian, YU Xian-feng, TANG Qi-bin, CHEN Yong-jun, ZOU Sheng-quan

(Department of General Surgery, Affiliated Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhou University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: **Objective** To explore the expression and relationship of PTEN and mTOR in the development of cholangiocarcinoma, determine the effect of the PI3K/PTEN/AKT/mTOR signal transduction on the development of cholangiocarcinoma. **Methods** The expression of mTOR and PTEN in the cholangiocarcinoma was detected by the immunohistochemistry and RT-PCR method. **Results** Compared to normal tissues, the expression of mTOR gene in cholangiocarcinoma significantly increased, but the expression of PTEN gene decreased. There was a negative correlation between mTOR gene and PTEN gene expression in cholangiocarcinoma. **Conclusions** The expression of mTOR gene in cholangiocarcinoma was increased and the expression of PTEN was decreased. It suggested that the mTOR gene and PTEN gene could play an important role in the process of development of cholangiocarcinoma.

Key words: Bile Duct Neoplasms; Signal Transduction; mTOR; PTEN

CLC number: R735.8 **Document code:** A

PI3K/PTEN/AKT/mTOR 作为介导肿瘤细胞凋亡、增生、分化、代谢的重要的信号转导有着非常特殊的地位, 其在多种恶性肿瘤中起着关键的调控作

用。在这条转导通路中, PTEN 和 mTOR 的调控占着非常特殊的地位。mTOR (mammal target of rapamycin) 作为一种被新发现的蛋白激酶, 是通过 PI3K/AKT 的磷酸化而被活化的, 继而通过介导下游重要的信号 S6K1 和 4E-BP1 来影响细胞周期, 调节细胞的凋亡^[1]。PTEN 则作为一种抑癌基因产物, 其在许多的肿瘤中的突变率很高, 也是 PI3K/AKT/PTEN 信号转导通路的重要调节因素。本试验试图找到 mTOR 和 PTEN 两者的关系及信号转导通路 PI3K/PTEN/AKT/mTOR 在胆管癌的发生中的意义。

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2002AA214061)。

收稿日期: 2005-08-31; **修订日期:** 2006-03-14。

作者简介: 刘民锋, 男, 安徽合肥人, 华中科技大学同济医学院附属同济医院博士研究生, 主要从事胆胰外科方面的研究。

通讯作者: 刘民锋 E-mail: matthewliu007@yahoo.com.cn。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 标本及一般资料 36例胆管癌及癌旁组织为1997—2003年本院病理科的存档组织标本。男10例,女26例;年龄34~76(平均为52)岁。其中腺癌32例,鳞癌4例,高分化癌(III~IV期)6例,低分化癌(I~II期)30例,所有标本石蜡包埋,4 μ m厚连续切片。

1.1.2 试剂 小鼠抗人PTEN单克隆抗体及SP试剂盒均为Santa公司产品,武汉博士德公司代理;DAB购自北京中山生物技术有限公司,mTOR兔多克隆抗体为Abcam公司产品,晶美公司代理。

1.2 实验方法

1.2.1 病理组织学检查 用常规苏木精伊红染色,高倍镜下观察

1.2.2 免疫组织化学检测及结果判断 采用SP法染色,4 μ m厚石蜡切片,60 $^{\circ}$ C过夜,脱蜡至水;3% H₂O₂封闭30min,微波修复,加入抗原修复液封闭,加入一抗4 $^{\circ}$ C过夜,二抗室温孵育30min,三抗室温孵育20min,充分冲洗,DAB/H₂O₂显色,苏木精伊红复染,烘干封片。用磷酸盐缓冲液PBS代替一抗作阴性对照,以慢性扁桃体炎组织作阳性对照。结果判断:凡细胞质,细胞膜呈现明显棕黄色颗粒或黄色颗粒的细胞为阳性细胞,随机选择5个高倍镜视野,计数500个细胞,计算阳性细胞百分率,<10%为(-),10%~50%为(+), \geq 50%为(++).

1.2.3 多聚酶链反应的引物的设计与合成 引物合成由上海赛百盛基因技术有限公司完成。mTOR正义为5'-CTG GGA CTC AAA TGT GTG CAG TTC-3'反义为5'-GAA CAA TAG GGT GAA TGA TCC GGG-3'; PTEN正义为5'-CAG AAA GAC TTG AAG GCG TAT-3'反义为5'-CGT CGT GTG GGT CCT GAG TGA-3'。内参照 β -肌动蛋白正义为5'-AGC

AGA GAA TGG AAA GTC AAA-3';反义为5'-ATG CTG CTT ACA TGT CTC GAT-3'。

按文献^[2]中的方法,提取石蜡包埋组织中的RNA。用逆转录(RT)PCR检测。反应条件:mTOR,95 $^{\circ}$ C预变性5min,94 $^{\circ}$ C变性80s,56 $^{\circ}$ C退火60s,72 $^{\circ}$ C延伸90s,50个循环;PTEN,95 $^{\circ}$ C预变性5min,94 $^{\circ}$ C变性80s,58 $^{\circ}$ C退火60s,75 $^{\circ}$ C延伸90s,50个循环。PCR产物均经1%琼脂糖凝胶电泳分离,紫外灯观察拍照。

1.3 统计 分析

运用相关性分析确定r值检验并行 χ^2 检验,用SPSS11.5软件完成检测。

2 结 果

2.1 mTOR和PTEN的免疫组化结果

PTEN蛋白定位于细胞浆,也可见在胞核中表达,阳性细胞弥漫分布;mTOR主要在胞浆表达(图1—4)。胆管癌组织中PTEN蛋白表达的阳性率为47.2%(17/36),明显低于癌旁组织的86.1%(31/36),两者差异有显著性($P < 0.01$);mTOR在胆管癌组织中表达的阳性率为83.3%(30/36),明显高于癌旁组织中的41.7%(15/36)。结果显示:胆管癌组织中mTOR的表达比癌旁组织显著增加,PTEN表达显著减少,相关性检验 $r = -0.862$,呈明显负相关。

2.2 mTOR和PTEN的RT-PCR实验结果

mTOR在胆管癌组织中明显较癌旁组织中增加,灰度分析(Bandscan3.0)胆管癌组织中的mTOR的表达是癌旁组织中的1.52倍,差异显著($P < 0.01$)(图5)。

PTEN在胆管癌组织中的表达增加明显下降,灰度值(Bandscan3.0)分析显示其表达与癌旁组织比较为0.78。差异有显著性($P < 0.01$)(图6)。

图1 胆管癌组织 mTOR 染色结果($\times 400$)

图2 胆管癌组织 PTEN 染色结果($\times 400$)

图3 正常胆管组织 mTOR 染色结果($\times 400$)

图4 正常胆管组织 PTEN 染色结果($\times 400$)

M: marker; 1: 正常组织; 2: 胆管癌组织

图5 mTOR RT-PCR 结果图

M: marker; 1: 正常组织; 2: 胆管癌组织

图6 PTEN RT-PCR 结果图

3 讨论

PI3-K 信号转导通路在人类的多种肿瘤中有明显的异常表达。最近的研究表明,在依赖 PI3-K 信号转导通路的肿瘤的生成过程中,蛋白激酶 mTOR 起到了重要和关键的作用。

PI3-K 信号转导是依靠 PI3-K 的产物完成级联放大效应的。PI3,4 二磷酸激醇和 PI3,4,5 三磷酸激醇作为第二信使,同时也是 PI3-K 激酶下游作用点,作用与丝氨酸/苏氨酸位置,所以也被称为蛋白激酶 B (PKB)。AKT 被 PDK1 激酶激活而磷酸化是 PI3-K 激酶活化的必要条件。此过程被 PTEN 的磷酸化所调节。PTEN 在 PI3-K 的 D3 位点上脱磷酸化,使之失活。PTEN 的这一作用是其作为抑癌功能的重要方式。自 PTEN 基因被发现至今的研究表明,作为一种肿瘤抑制基因,PTEN 在多种肿瘤中的高频率的杂合性丢失,使之成为可与 p53 相媲美的重要功能分子。体内外实验表明在缺少 PTEN 时将对细胞的生存产生决定性的影响。PTEN^{-/-} 的小鼠受到凋亡刺激时,会受损伤;而 PTEN^{+/-} 的小鼠则会通过 FAS 介导的凋亡出现淋巴结增生反应。PTEN 的肿瘤抑制功能主要

依赖其脂质磷酸酶活性,它可通过特异性地促使 PIP3 的脱磷酸化,使之转化为 PIP2,使 PIP3 不能激活下游的 AKT,从而起到抑制 AKT 活性的作用。活化的 AKT 是重要的存活因子,能磷酸化 BAD,参与抗凋亡过程;AKT 还通过磷酸化抑制 capase-9 的活性抑制凋亡^[1]。

AKT 下游的一个重要靶点是 mTOR。mTOR 也属于 PI3K 家族,是一个约有 2 500 个氨基酸的大分子蛋白。AKT 磷酸化 mTOR 激活其下游的 4E-BP1,消除 eIF-4E 和 4E-BP1 之间的相互作用,结束对翻译起始的抑制作用;mTOR 的磷酸化还活化了 P70S6K,增加了 cyclinD1, CDK4, CDC25A 和 Rb 磷酸化的表达,介导细胞 G₁ 期的进展^[3-4]。

在 PI3K/PTEN/AKT/mTOR 这条信号转导通路中,PTEN 通过抑制 PIP3 的活化,使肿瘤细胞的生长受到抑制,而 mTOR 的活化可促使进程的发展。此外,近来的研究表明,已经证实由 PTEN 介导的细胞直径、组织大小和增生是通过 mTOR 途径的调控完成的^[5-6]。mTOR 的特异性抑制剂 rapamycin 体内外实验均显示其能明显使肿瘤细胞停滞于 G₁ 期并发现其可使肿瘤细胞的体积缩小,发挥了抑制肿瘤的作用^[3,7]。

本实验结果显示,胆管癌组织中 PTEN 较癌旁的胆管组织降低,而 mTOR 的表达较癌旁组织升高,并且两者呈负性相关,说明了 PTEN 的失活性,mTOR 的低表达可能在胆管癌的生长增殖中有一定的作用,并且关系密切。由此推测,mTOR 的特异性的抑制剂及其类似物在胆管癌的治疗中可能起积极作用,本研究为这种治疗作用提供了一定的分子生物学依据。

参考文献:

- [1] Xu G, Zhang W, Bertram P, *et al.* Pharmacogenomic profiling of the PI3K/PTEN-AKT-mTOR pathway in common human tumor [J]. *Int J Oncol*, 2004, 24(4): 901-908.
- [2] 曹利平, Michael Duchrow. 改良一步法从甲醛固定石蜡包埋组织中提取 RNA [J]. *中华医学杂志*, 2000, 5(80): 376-378.
- [3] Gao N, Zhang Z, Jiang BH, *et al.* Role of PI3K/AKT/mTOR signaling in the cell cycle progression of human prostate cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 310(4): 1124-1132.
- [4] Vogt PK. PI3-kinase, mTOR, protein synthesis and cancer [J]. *Trends Mol Med*, 2001, (7) 11: 482-484.
- [5] Findlay GM, Harrington LS, Lamb RF. TSC-2 tumor suppressor and regulation of mTOR signaling: linking cell growth and proliferation? [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2005, 15(1): 69-76.
- [6] 谷化平, 尚培中, 周翠玲. 胆管癌中 pten 和 p16 抑癌基因蛋白的表达及其临床意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(2): 101-103.
- [7] Huang S, Houghton PJ. Targeting mTOR signaling for cancer therapy [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2003, 3(4): 371-377.