

磷酸化 AKT 在卵巢癌中表达的临床意义及其 与新癌基因 REDD1 表达的相关性研究

孙丽丽¹, 朱慧敏², 庞丽娟¹, 梁伟华¹, 卢立霞¹, 杜金泽¹, 杜春芳³, 贾薇¹, 常彬⁴

摘要 目的 研究磷酸化蛋白激酶 B (p-AKT) 在卵巢癌中的表达与卵巢癌患者的临床病理因子以及生存预后之间的关系, 并分析 p-AKT 表达与发育及 DNA 损伤反应调节基因 1 (REDD1) 表达的相关性。方法 收集卵巢癌组织标本 95 例, 交界性肿瘤 23 例, 正常卵巢表面上皮和输卵管组织 18 例。采用免疫组织化学 EnVision 两步法检测 p-AKT 和 REDD1 的表达, 分析 p-AKT 表达与患者临床病理因子 (分期、分级、化疗反应、无瘤生存期和总体生存期等) 的关系, 并分析 p-AKT 和 REDD1 表达的相关性。结果 ① 卵巢癌组织中 p-AKT 表达率为 55.8% (53/95), 均高于卵巢正常上皮组织 (16.7%) 和卵巢交界性肿瘤组织 (13.0%) ($P < 0.05$)。② p-AKT 蛋白的表达与卵巢癌的分化程度低、临床晚分期相关, 且在浆液性癌中的高表达率高于其他组织学类型, 但与有无腹水形成无显著相关性 ($P > 0.05$)。③ p-AKT 在化疗无效组患者中的表达高于有效组 ($P < 0.05$)。④ p-AKT 蛋白高表达患者的总体生存期和无瘤生存期低于低表达者 ($P < 0.05$)。⑤ 卵巢癌中 p-AKT 的表达和 REDD1 的表达呈正相关性 ($C = 0.626$, $P < 0.05$)。结论 p-AKT 是影响卵巢癌患者化疗反应以及预后的一个重要因素; AKT 可能被持续性高表达的 REDD1 激活, 从而促进细胞增殖, 参与卵巢癌的病理发生。

关键词 卵巢癌; 蛋白激酶 B; 发育及 DNA 损伤反应调节基因 1; 免疫组织化学

中图分类号 R 737.31

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)12-1766-05

蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) 是磷脂酰肌

醇 3-激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B, PI3K/AKT) 信号通路下游的一个关键靶激酶, 又名 AKT。文献^[1]报道, 卵巢癌组织中存在 PI3K/AKT 信号通路异常激活, 并在高级别、晚期浆液性癌患者中检测到 p-AKT 高表达, 认为此信号通路在介导肿瘤演进过程中发挥了重要作用。发育及 DNA 损伤反应调节基因 1 (regulated in DNA damage and development 1, REDD1) 又被称为 RTP801/Dig1/DDIT4, 为一个相对新的基因。前期细胞学和体外实验^[2]显示, REDD1 能够使永生化的卵巢上皮细胞发生恶性转化, 从而在裸鼠体内形成与人类卵巢浆液性癌非常类似的肿瘤。此外, 体外细胞学实验^[3]证实, REDD1 基因在缺氧环境下可持续高表达, 通过哺乳动物类雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路诱导 AKT 磷酸化, 共同参与肿瘤细胞的增殖、存活以及对化疗药物的抵抗。但在卵巢癌组织中, REDD1 表达与 AKT 激活是否存在相关性以及两者如何参与卵巢癌的发生尚未见报道。为了初步探索新癌基因 REDD1 与 PI3K/AKT 信号通路激活的关系, 采用免疫组织化学的方法检测卵巢癌组织中 p-AKT 和 REDD1 的表达, 分析两者之间的相关性, 进一步分析 p-AKT 的表达与卵巢癌患者的临床病理特征之间的关系, 探讨其在预测卵巢癌患者预后以及化疗反应方面的意义。

1 材料与方法

1.1 临床资料和组织标本 收集新疆石河子大学医学院第一附属医院病理科 1979 年 1 月 ~ 2011 年 4 月存档的卵巢癌石蜡标本 95 例, 交界性肿瘤 23 例, 正常表面上皮及输卵管组织 18 例 (对照组)。收集相关的临床数据, 包括年龄、组织学分型、国际妇产科联盟 (FIGO) 分期、组织学分级、有无腹水形成、初次化疗效果、无瘤生存时间和总体生存时间等。对所有患者进行电话随访, 随访至 2013 年 12 月 17 日。组织学分级依据 MD. 安德森肿瘤中心的 Malpica et al^[4]提出的两级分级系统和 WHO 分级系统进行。根据治疗缓解持续时间, 将患者分为化疗

2014-05-16 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81160316, 81260104); 新疆生产建设兵团重点领域科技攻关 (编号: 2011BA038); 国家人力资源和社会保障部 - 留学回国人员科技活动项目 (编号: 2010LX004); 优秀青年科技人才培养计划 (编号: 2013ZRKXYQ-YD18)

作者单位: ¹石河子大学医学院病理学系, 石河子 832000

²漯河医学高等专科学校第三附属医院妇产科, 漯河 462000

³石河子大学第一附属医院妇产科, 石河子 832000

⁴复旦大学附属肿瘤医院病理科, 上海 200032

作者简介: 孙丽丽, 女, 硕士研究生;

常彬, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: binchang7551@gmail.com;

贾薇, 女, 讲师, 责任作者, E-mail: jiawei@shzu.edu.cn

有效组和无效组:有效组为初次化疗结束后缓解时间持续6个月及以上的患者;无效组为化疗期间疾病出现进展或者化疗结束后6个月内出现复发者^[5]。患者术前均未经放、化疗。标本均经福尔马林固定,常规石蜡包埋,相应HE切片经两名资深病理学专家复片确诊。

1.2 主要试剂 兔抗人 p-AKT(Ser473)单克隆抗体(3787#,美国 Cell Signaling 公司,工作浓度 1:100);兔抗人 REDD1 多克隆抗体(ab63059,英国 Abcam 公司,工作浓度 1:100)。免疫组织化学 EnVision 二步法试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 组织芯片的制作 ① 将获得石蜡包埋组织进行 4 μm 厚度的连续切片,用于 HE 染色;然后由 2 名病理学专家进行形态学观察定位,选择富有肿瘤细胞且无坏死出血的典型区域画圈标记,然后标记蜡块组织上的相应区域。② 采用组织芯片制备仪(法国 Alphelys 公司)在蜡块中打孔(孔径 1.5 mm),提取病理蜡块组织芯,插入已制备好的空白受体蜡块中,构建成组织阵列块。③ 将制作好的组织微阵列块进行 4 μm 厚度的连续切片,裱附在经防脱片剂多聚赖氨酸处理过的载玻片上,制作成组织芯片。

1.3.2 免疫组织化学实验步骤 将组织芯片置于 65 °C 烤箱中烘烤 2 h,二甲苯脱蜡,梯度乙醇溶液洗片。用 0.5% H₂O₂ 室温孵育 10 min,以消除内源性过氧化物酶的活性,柠檬酸缓冲液高压修复。采用 EnVision 二步法染色,实验步骤严格按照操作说明书进行。将乳腺浸润性导管癌切片作为阳性对照,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.3.3 结果判定 p-AKT 和 REDD1 阳性表达部位主要位于胞质,阳性表达呈棕黄色或棕褐色均匀颗粒状。采用综合阳性细胞百分比及染色强度的半定量积分法判断阳性强度。细胞染色强度呈淡黄色为 1 分,黄色为 2 分,棕黄色为 3 分。40 倍镜下观察细胞质着色的百分比,100 倍镜下观察胞质着色的强度。阳性细胞百分比和染色强度两项积分相乘为每例标本的最终积分。REDD1 和 p-AKT 结果得分 ≤ 1 分为低表达, > 1 分为高表达。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,两组间率的差异比较采用 χ^2 检验;卵巢癌组织中 REDD1 和 p-AKT 蛋白表达之间的关系用 R × C 表资料 χ^2 检验,进一步计算 Pearson 列联系数分

析两者关系的密切程度。生存分析采用 Kaplan-Meier 法并绘制生存曲线,Log-Rank 法检验组间生存率的差异。

2 结果

2.1 患者临床病理特点 患者年龄 24 ~ 77 岁,中位年龄 51 岁;组织学分型:浆液性癌 42 例,黏液性癌 17 例,子宫内膜样癌 13 例,透明细胞癌 12 例,其他类型癌 11 例(包括未分化癌 3 例,混合型癌 6 例,恶性 Brenner 瘤 2 例);I 期 31 例,II 期 26 例,III ~ IV 期 38 例;卵巢浆液性癌按照 MDACC 分级系统进行分级,高级别浆液性癌 32 例,低级别浆液性癌 10 例;其余组织学类型按照 WHO 分级,高分化癌 24 例,中分化癌 31 例,低分化癌 40 例。对初次化疗有效者 26 例,无效者 13 例。60 例患者获得生存信息。至 2013 年 12 月 17 日,复发者 18 例;存活者 36 例,其中无病存活 29 例,带病存活 7 例;死亡者 24 例。

2.2 p-AKT 在卵巢癌组织中的表达高于卵巢正常上皮组织/输卵管上皮和交界性肿瘤 为了解 p-AKT 在卵巢正常上皮组织、交界性肿瘤和卵巢癌组织中的表达,采用免疫组化法检测了样本组和对照组中 p-AKT 的表达,结果显示 p-AKT 主要定位于胞质,少许位于胞核,见图 1。p-AKT 在卵巢正常上皮组织、交界性肿瘤和卵巢癌组织中的表达率分别为 16.7% (3/18)、13.0% (3/23)、55.8% (53/95);p-AKT 在卵巢癌组织的表达分别高于卵巢交界性肿瘤和卵巢正常上皮组织,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。p-AKT 在交界性组与卵巢正常上皮组中的表达差异无统计学意义。见图 2。

2.3 p-AKT 表达与卵巢癌患者临床病理特征的关系 p-AKT 表达与卵巢癌临床病理因子之间的相关性分析,结果显示 p-AKT 表达与不同的卵巢癌组织学分型、临床分期以及组织学分级之间的差异均有统计学意义($P < 0.05$)。p-AKT 蛋白在浆液性癌中的表达率高于其他组织学类型;在中 ~ 低分化癌组中的表达率高于高分化癌组;在 III ~ IV 期组织中高表达率高于 I ~ II 期;但 p-AKT 蛋白的表达与卵巢癌患者有无腹水的形成差异无统计学意义。见表 1。

2.4 p-AKT 蛋白表达与卵巢癌患者化疗抵抗呈正相关 根据患者的化疗反应将患者分为有效组和无效组,统计显示化疗无效组的卵巢癌组织中 p-AKT 蛋白的表达率显著高于有效组(61.5% vs 11.5%),差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

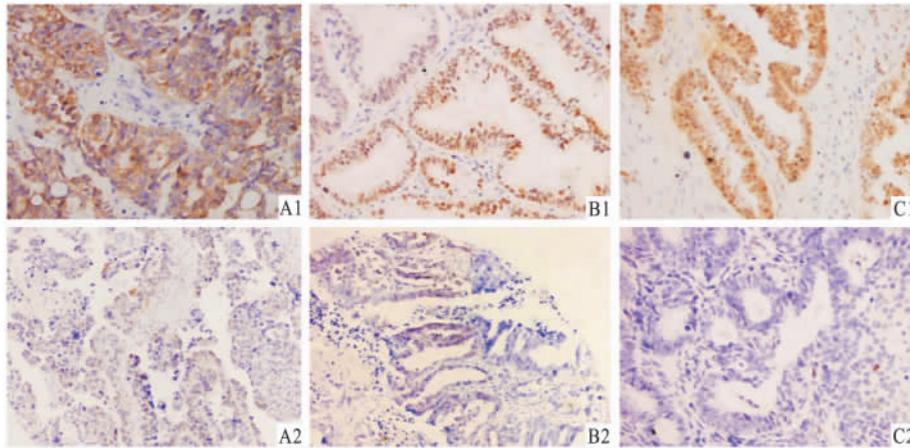


图1 p-AKT在卵巢癌不同组织学类型中的表达 EnVision 二步法 ×200
A: 卵巢浆液性癌; B: 卵巢黏液性癌; C: 卵巢子宫内膜样癌; 1: 高表达; 2: 低表达

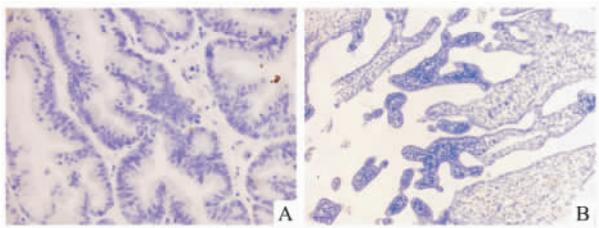


图2 p-AKT在卵巢交界性肿瘤和正常上皮组织中的低表达 EnVision 二步法 ×200
A: 卵巢交界性肿瘤; B: 正常上皮组织

2.5 p-AKT 蛋白表达与卵巢癌患者预后差相关
结果显示 p-AKT 蛋白高表达者的无瘤生存期较低表达者短,中位生存时间高表达组短于低表达组(1 100 d vs 7 615 d) 经 Log-Rank 检验,两组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图3。p-AKT 蛋白高表达者的总体生存期较低表达者短,中位生存时间高表达组短于低表达组(1 703 d vs 7 627 d) 经 Log-Rank 检验,两组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图4。

表1 卵巢癌组织中 p-AKT 蛋白的表达与临床病理特征的关系 [n(%)]

项目	n	p-AKT 的表达		χ^2 值	P 值
		高表达	低表达		
临床分期				5.982	0.014
I ~ II	57	26(45.6)	31(54.4)		
III ~ IV	38	27(71.0)	11(29.0)		
腹水				0.719	0.397
有	48	31(64.6)	17(35.4)		
无	17	9(52.9)	8(47.1)		
不详	30				
组织学分型				17.933	0.001
浆液性癌	42	33(78.6)	9(21.4)		
黏液性癌	17	8(47.0)	9(53.0)		
子宫内膜样癌	13	3(23.0)	10(77.0)		
透明细胞癌	12	4(33.3)	8(66.7)		
其他类型癌	11	5(45.5)	6(54.5)		
化疗反应				10.700	0.002
有效	26	3(11.5)	23(88.5)		
无效	13	8(61.5)	5(38.5)		
不详	56				
组织学分级				11.201	0.004
G ₁	24	7(29.2)	17(70.8)		
G ₂	31	23(74.2)	8(25.8)		
G ₃	40	23(57.5)	17(42.5)		

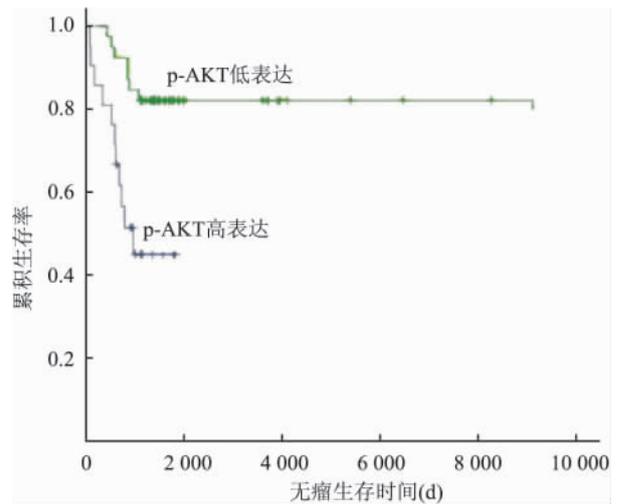


图3 60例卵巢癌患者 p-AKT 的表达的无瘤生存期 Kaplan-Meier 曲线图($P < 0.05$)

2.6 卵巢癌组织中 p-AKT 的表达和 REDD1 的表达呈正相关 结果显示两者均为高表达者 29 例,均为低表达者 31 例; p-AKT 蛋白高表达而 REDD1 蛋白低表达者 24 例; p-AKT 蛋白低表达而 REDD1 高表达者 11 例。统计分析显示,卵巢癌组织中 p-AKT

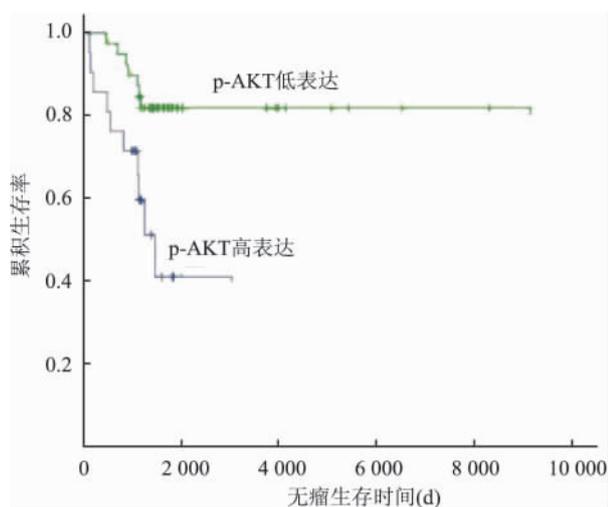


图4 60例卵巢癌患者p-AKT的表达的总体生存期Kaplan-Meier曲线图($P < 0.05$)

和REDD1蛋白的表达呈正相关($C = 0.626$, $P < 0.05$)。

3 讨论

有研究^[6]显示,在胃癌、乳腺癌、非小细胞肺癌、前列腺癌等人体多种肿瘤中检测到p-AKT呈高表达;p-AKT高表达的前列腺癌患者预后较差^[7],且p-AKT高表达与消化道恶性肿瘤的化疗耐药密切相关^[8]。本研究结果显示,95例卵巢癌组织中55.8%的病例p-AKT呈高表达,明显高于交界性肿瘤和正常组织的13.0%和16.7%;进一步分析显示临床分期越晚、病理分级越高,p-AKT表达水平越高,这与研究^[1,9]结果相近。目前卵巢癌治疗的标准方案是手术联合以铂类为基础的化疗。但是部分晚期患者,尤其是复发患者常常对目前首选的铂类药物产生化疗耐药。依据患者对化疗反应的不同将其分为化疗有效组和无效组,结果显示p-AKT在化疗无效组的高表达率显著高于化疗有效组。研究^[10]提示p-AKT活性增高与恶性或分化较低的肿瘤有关,其介导的PI3K/AKT信号通路异常激活参与了卵巢癌化疗耐药的产生。Huang et al^[11]发现p-AKT的高表达与患者的生存期缩短有关,p-AKT高表达者无瘤生存期和总体生存期明显短于低表达者,成为影响卵巢癌患者预后差的独立因素之一,与本研究结果一致。

Shoshani et al^[12]在研究神经胶质瘤细胞株缺氧反应时偶然发现REDD1为缺氧诱导因子1的效应基因。在人体正常组织中,REDD1广泛低表达,缺

氧、能量压力、DNA损伤、糖皮质激素治疗以及细胞其他应激反应均可诱导该基因高表达^[13]。研究^[12,14]表明,根据细胞所处环境的不同,REDD1具有促进凋亡和抑制凋亡的功能,其可能是一个癌基因抑或抑癌基因。本课题组前期体外细胞学实验^[2]显示REDD1是一个转化癌基因,是Ras基因介导的卵巢上皮细胞恶性转化所必须的关键因子;因为进一步转染REDD1基因到永生化的卵巢表面上皮细胞中,能够导致细胞恶性转化,从而在裸鼠体内形成模拟人类卵巢浆液性癌的肿瘤。在此基础上,采用免疫组织化学染色的方法进一步在人类卵巢癌组织中检测REDD1表达,发现在中晚期、卵巢高级别浆液性癌中REDD1呈高表达,随着FIGO期别的增高,其表达率亦升高,并且REDD1的高表达和患者腹水的出现呈正相关^[15]。

研究^[13]表明,REDD1是mTOR信号通路的负性调节基因。mTOR是高度保守的苏氨酸-丝氨酸激酶信号通路,与细胞生长、增殖和代谢有关,由mTORC1和mTORC2两个功能蛋白复合体组成。Jin et al^[3]研究发现,在成功构建的持续性高表达REDD1的肺癌细胞系中,REDD1可通过激活TSC1/2复合体抑制mTORC1的活性,进而诱导AKT S473位点磷酸化,共同促进肿瘤细胞生存和化疗耐药的形成。本研究结果显示REDD1与p-AKT呈正相关,提示卵巢癌组织中REDD1高表达可能通过诱导AKT磷酸化,导致卵巢癌的发生。近来,Dennis et al^[16]同样发现在血清饥饿的状态下,REDD1随着时间的延长其表达可持续增强,进而诱导AKT磷酸化。PI3K/AKT/mTOR信号通路是体内重要的信号转导通路,人类很多恶性肿瘤的发生和此信号通路的失调有关,REDD1和p-AKT作为该信号通路的关键调控基因,其复杂的作用机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] De Marco C, Rinaldo N, Bruni P, et al. Multiple genetic alterations within the PI3K pathway are responsible for AKT activation in patients with ovarian carcinoma [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e55362.
- [2] Chang B, Liu G, Yang G, et al. REDD1 is required for Ras-mediated transformation of human ovarian epithelial cells [J]. Cell Cycle, 2009, 8(5): 780-6.
- [3] Jin H O, Hong S E, Kim J H, et al. Sustained overexpression of Redd1 leads to Akt activation involved in cell survival [J]. Cancer Lett, 2013, 336(2): 319-24.
- [4] Malpica A, Deavers M T, Lu K, et al. Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system [J]. Am J Surg Pathol, 2004, 28

- (4): 496–504.
- [5] Rustin G J, Nelstrop A E, Crawford M, et al. Phase II trial of oral altretamine for relapsed ovarian carcinoma: evaluation of defining response by serum CA125 [J]. *J Clin Oncol*, 1997, 15(1): 172–6.
- [6] Shtilbans V, Wu M, Burstein D E. Current overview of the role of Akt in cancer studies *via* applied immunohistochemistry [J]. *Ann Diagn Pathol* 2008, 12(2): 153–60.
- [7] Shukla S, Maclennan G T, Hartman D J, et al. Activation of PI3K–Akt signaling pathway promotes prostate cancer cell invasion [J]. *Int J Cancer* 2007, 121(7): 1424–32.
- [8] Murakami D, Tsujitani S, Osaki T, et al. Expression of phosphorylated Akt (pAkt) in gastric carcinoma predicts prognosis and efficacy of chemotherapy [J]. *Gastric Cancer* 2007, 10(1): 45–51.
- [9] 魏欣, 吕庆杰, 孙寒雪, 等. 上皮性卵巢癌中磷酸化蛋白激酶 B 和磷酸化糖原合成酶激酶- β 及 β -catenin 蛋白的表达及意义 [J]. *中华病理学杂志* 2012, 41(2): 86–90.
- [10] Peng D J, Wang J, Zhou J Y. Role of the Akt/mTOR survival pathway in cisplatin resistance in ovarian cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2010, 394(3): 600–5.
- [11] Huang J, Zhang L, Greshock J, et al. Frequent genetic abnormalities of the PI3K/AKT pathway in primary ovarian cancer predict patient outcome [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2011, 50(8): 606–18.
- [12] Shoshani T, Faerman A, Mett I. Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis [J]. *Mol Cell Biol* 2002, 22(7): 2283–93.
- [13] Jin H O, Seo S K, Woo S H. Activating transcription factor 4 and CCAAT/enhancer-binding protein- β negatively regulate the mammalian target of rapamycin *via* Redd1 expression in response to oxidative and endoplasmic reticulum stress [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 48(8): 1158–67.
- [14] DeYoung M P, Horak P, Sofer A, et al. Hypoxia regulates TSC1/2–mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling [J]. *Genes Dev*, 2008, 22(2): 239–51.
- [15] 朱慧敏, 赵霞, 梁伟华, 等. REDD1、Bcl-2 在 50 例卵巢高级别浆液性癌中的表达及临床意义 [J]. *农垦医学* 2012, 34(3): 193–8.
- [16] Dennis M D, McGhee N K, Jefferson L S, et al. Regulated in DNA damage and development 1 (REDD1) promotes cell survival during serum deprivation by sustaining repression of signaling through the mechanistic target of rapamycin in complex 1 (mTORC1) [J]. *Cell Signal* 2013, 25(12): 2709–16.

The clinical significance of the phosphorylated AKT expression and its correlation with new oncogene REDD1 expression in ovarian cancer

Sun Lili¹, Zhu Huimin², Pang Lijuan¹, et al

(¹ Dept of Pathology, Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832000; ² Dept of Obstetrics and Gynecology, The Third Affiliated Hospital of Luohe Medical College, Luohe 462000)

Abstract Objective To investigate clinical significance of the expression of phosphorylated protein kinase B (p-AKT) in ovarian carcinomas, and to evaluate its correlation with the expression of new oncogene REDD1. **Methods** 18 cases of normal ovarian epithelial tissues and fallopian tube tissues, 23 cases of borderline tumor and 95 cases of ovarian carcinoma were collected. The expression of p-AKT and REDD1 were detected with immunohistochemical staining method (EnVision two step methods). The correlations between the expression of p-AKT and the clinical pathological factors of ovarian cancer patients, including grade, stage, chemotherapy response, disease-free survival time and overall survival time were analyzed. The association of p-AKT and REDD1 expression was also analyzed. **Results** Expression of p-AKT was found in 55.8% of the samples, which was significantly higher than those in the normal epithelial tissues (16.7%) ($P < 0.05$) and borderline tumors (13.0%) ($P < 0.05$). Chi-square test suggested that high expression of p-AKT was significantly associated with serous carcinoma ($P < 0.05$), low degree of differentiation ($P < 0.05$), late clinical stage ($P < 0.05$) and chemotherapy resistant ($P < 0.05$), but there was no significant correlation with the presence of ascites ($P > 0.05$). High percentage of cells expressing p-AKT was associated with a shorter overall survival time ($P < 0.05$) and disease free survival time ($P < 0.05$) by Log rank test. Positive correlation was found between p-AKT and REDD1 ($C = 0.626$, $P < 0.05$). **Conclusion** The overexpression of p-AKT had a significant negative impact on the prognostic of ovarian cancer patients. Sustained overexpression of REDD1 leads to AKT activation involved in cancer cells proliferation, leading to the occurrence of ovarian cancer.

Key words ovarian neoplasms; protein kinase B; regulated in DNA damage and development 1; immunohistochemistry