

AKT1 与卵巢浆液性肿瘤发生发展及化疗耐药的关系研究

闫效宇¹, 朱彦丽², 王 敏¹, 双 婷¹, 周莹莹¹

(1. 中国医科大学附属盛京医院, 辽宁 沈阳 110001;

2. 沧州市中心医院, 河北 沧州 061001)

摘要: [目的] 探讨 AKT1 的表达与卵巢浆液性肿瘤发生发展及卵巢癌化疗耐药的关系。 [方法] 免疫组织化学 SP 法检测 67 例卵巢浆液性腺癌(其中化疗耐药 30 例、化疗敏感 37 例)、10 例卵巢交界性浆液性囊腺瘤、10 例卵巢良性浆液性囊腺瘤和 10 例正常卵巢组织中的 AKT1 表达情况。 [结果] AKT1 的阳性表达率在卵巢浆液性腺癌、卵巢交界性浆液性囊腺瘤、卵巢良性浆液性囊腺瘤和正常卵巢组织中分别为 62.69%、70.00%、40.00% 和 0, 有显著统计学差异 ($P=0.001$), 在化疗耐药卵巢浆液性腺癌中明显高于化疗敏感者 ($P=0.033$)。 AKT1 的阳性表达率在 I~II 期和 III~IV 期卵巢浆液性腺癌中分别为 31.58% 和 75.00%, 有显著统计学差异 ($P=0.001$)。 AKT1 的阳性表达率与卵巢浆液性腺癌患者绝经状态、组织学分级和淋巴结转移情况无关 ($P>0.05$)。 [结论] AKT1 与卵巢浆液性肿瘤发生发展和卵巢癌化疗耐药有关, 可作为预后和化疗耐药性的间接预测指标之一。

主题词: 卵巢肿瘤; AKT1; 浆液性肿瘤; 化疗耐药

中图分类号: R737.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)08-0590-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2013.08.B002

Relationship of AKT1 with Occurrence and Chemo-resistance in Ovarian Serous Neoplasms

YAN Xiao-yu¹, ZHU Yan-li², WANG Min¹, et al.

(1. Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang 110001, China;

2. Cangzhou Central Hospital, Cangzhou 061001, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the relationship of AKT1 with occurrence and chemoresistance in ovarian serous neoplasms. [Methods] AKT1 expression in 67 cases with ovarian serous cystadenocarcinoma (30 cases, chemotherapy resistance; 37 cases, chemotherapy sensitivity), 10 cases with ovarian borderline serous cystadenoma, 10 cases with ovarian serous cystadenoma and 10 cases normal ovarian tissues were detected immunohistochemically. [Results] The positive rates of AKT1 in ovarian serous cystadenocarcinoma, ovarian borderline serous cystadenoma, ovarian serous cystadenoma and normal ovarian tissues were 62.69%, 70.00%, 40.00% and 0 respectively, with significant difference ($P=0.001$). The positive rate of AKT1 in chemotherapy resistance ovarian serous cystadenocarcinoma was significantly higher than that in chemotherapy sensitive ovarian serous cystadenocarcinoma ($P=0.033$). The positive rates of AKT1 in ovarian serous cystadenocarcinoma stage I~II and III~IV were 31.58% and 75.00%, respectively, with significant difference ($P=0.001$). The positive rate of AKT1 did not correlate with menopausal status, histological grade and lymph node metastasis ($P>0.05$). [Conclusion] AKT1 correlates with occurrence and chemoresistance in ovarian serous cancer. It may be considered as a marker for predicting prognosis and chemoresistance.

Subject words: ovarian neoplasms; AKT1; serous neoplasms; chemoresistance

卵巢癌是妇科常见的恶性肿瘤之一, 其死亡率逐年升高, 手术结合化疗仍是治疗卵巢癌的重要手

段。临床治疗中产生的耐药性是影响治疗效果的主要因素。PI3K/Akt 通路作为细胞内重要信号通路, 一旦被异常激活将导致肿瘤抑制蛋白 p53 下调、细胞凋亡受抑制及化疗耐药形成等一系列事件, 造成预后不良。AKT1 (蛋白激酶 B1, protein kinase B1, PKB) 作为该信号通路上的核心因子, 发挥着关键作

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30973189)

通讯作者: 王 敏, 科主任, 主任医师, 教授, 博士; 中国医科大学附属盛京医院妇产科, 辽宁省沈阳市和平区三好街 36 号 (110001); E-mail: wm21st@126.com

收稿日期: 2013-04-19; **修回日期:** 2013-05-27

用,与化疗耐药有着密切的联系。因此,本研究通过免疫组化法研究 AKT1 在正常及不同卵巢浆液性肿瘤中的表达情况,分析 AKT1 与卵巢浆液性肿瘤发生发展及卵巢癌化疗耐药的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集 2004 年 1 月至 2010 年 10 月期间在中国医科大学附属盛京医院妇科接受初次手术、经病理学检查确诊为卵巢浆液性腺癌患者共 67 例,分为卵巢浆液性腺癌化疗耐药(30 例)和卵巢浆液性腺癌化疗敏感(37 例)。化疗耐药判断标准:初次采用以紫杉醇+铂类为基础的化疗,化疗期间或化疗结束 6 个月内肿瘤进展或复发;化疗敏感:在完成化疗后 12 个月内无复发。同时选取卵巢交界性浆液性囊腺瘤 10 例、卵巢良性浆液性囊腺瘤 10 例及其他手术患者正常卵巢组织 10 例。以这些病例的存档蜡块作为研究对象,所有入选的患者术前均未行放化疗和其他辅助治疗。

1.2 主要试剂与方法

兔抗人 AKT1 多克隆抗体为北京博奥森生物公司产品,SP 免疫组化检测试剂盒及 DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥公司,PBS 缓冲液购自武汉博士德公司,其他试剂及仪器由本院中心实验室提供。石蜡切片经常规脱蜡水化后,以 pH6.0 的柠檬酸盐抗原修复液修复,并做内源性过氧化物酶阻断。采用免疫组化 SP 法,DAB 显色后用苏木素复染,中性树胶封固后镜检。每批实验中均按比例选择每组切片,用已知 AKT1 免疫组化染色阳性的卵巢浆液性腺癌组织切片作为阳性对照,用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.3 结果判断

双盲法阅片,按等级评分法,根据染色强度和阳性细胞所占的百分比评价蛋白表达。AKT1 主要表达在细胞质,以出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性染色。按染色强度评分:0 分为无色,1 分为淡黄色,2 分为棕黄色,3 分为棕褐色。根据阳性细胞的百分比评分:0 分为无阳性细胞,1 分为阳性细胞 $\leq 10\%$,2 分为阳性细胞 $11\% \sim 50\%$,3 分为 $51\% \sim 75\%$,4 分为 $> 75\%$ 。

染色强度与阳性细胞评分乘积 ≤ 3 为阴性, > 3 为阳性。

1.4 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件进行分析,各组间 AKT1 表达的差异采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AKT1 在正常及不同卵巢肿瘤组织中的表达

AKT1 主要表达在细胞质。AKT1 的阳性表达率在正常卵巢组织、卵巢良性浆液性囊腺瘤、卵巢交界性浆液性囊腺瘤和卵巢浆液性腺癌中分别为 0、40.00%、70.00%、62.69%,4 组比较有显著统计学差异($\chi^2=15.613, P=0.001$);在化疗耐药卵巢浆液性腺癌组织中 AKT1 阳性表达率高于化疗敏感组,分别为 76.67%和 51.35%,经比较有显著统计学差异($\chi^2=4.539, P=0.033$)(Table 1, Figure 1)。

Table 1 Expression of AKT1 in normal ovarian tissues and ovarian serous cancer tissues[n(%)]

Pathological types	n	Positive expression of AKT1	P
Normal ovarian tissues	10	0	0.001
Ovarian serous cystadenoma	10	4(40.00)	
Ovarian borderline serous cystadenoma	10	7(70.00)	
Ovarian serous cystadenocarcinoma	67	42(62.69)	0.033
Chemotherapy resistance	30	23(76.67)	
Chemotherapy sensitive	37	19(51.35)	

2.2 AKT1 的表达情况与卵巢浆液性腺癌临床病理特征的关系

AKT1 的表达与卵巢癌患者绝经状态、组织学分级和是否淋巴结转移无关($P > 0.05$),但与卵巢癌的手术病理分期即进展情况有关($P=0.001$)。AKT1 的阳性表达率在 I ~ II 期卵巢浆液性腺癌中为 31.58%,在 III ~ IV 期卵巢浆液性腺癌中为 75.00%,经比较有显著统计学差异($\chi^2=10.972, P=0.001$)(Table 2)。

3 讨论

卵巢癌发病率在女性生殖系统恶性肿瘤中占第 2 位,近年来呈逐年增加趋势。目前最佳治疗方

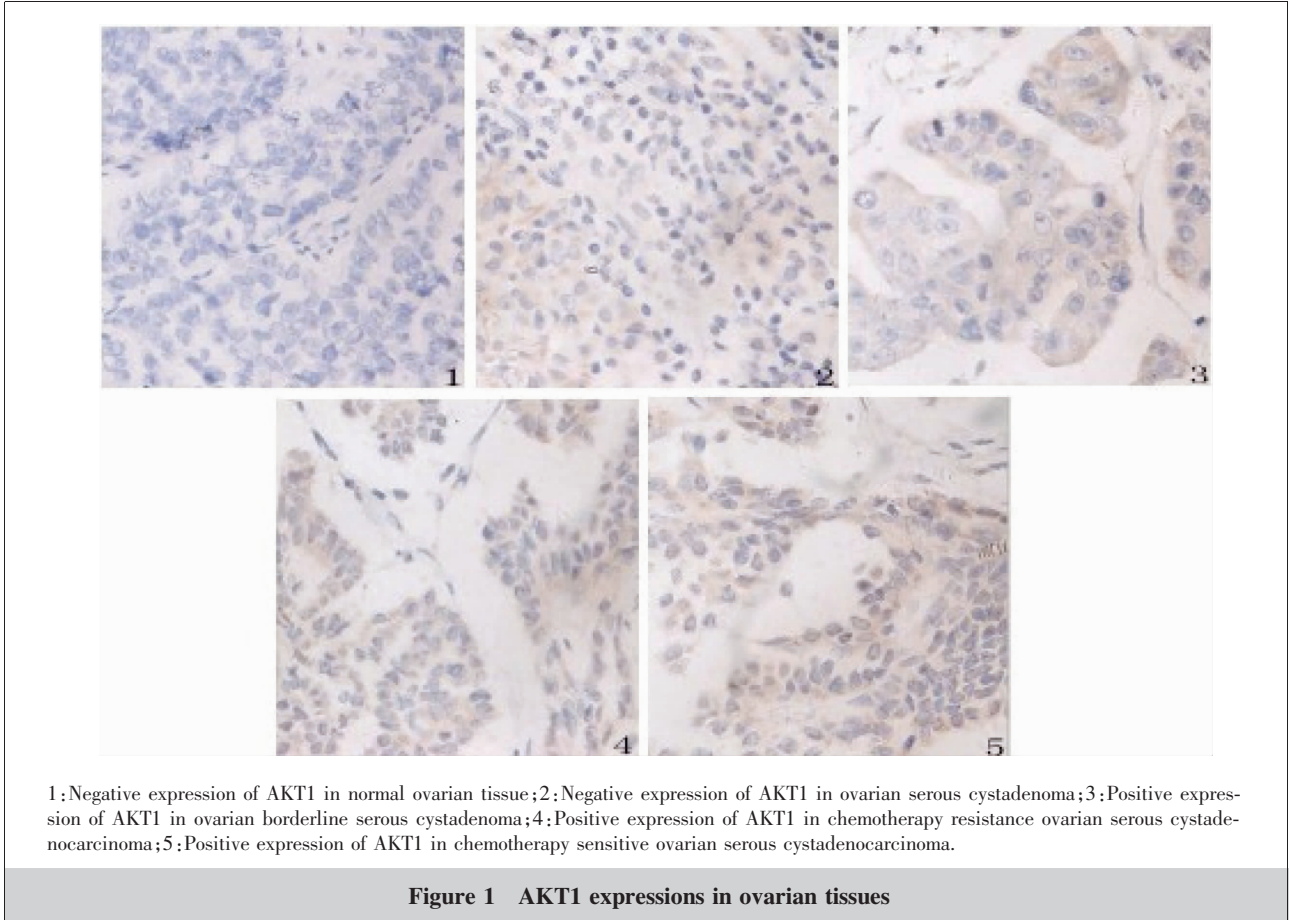


Table 2 The relationship between expression of AKT1 and clinicopathologic characteristics in ovarian serous cancer

Factors	n	AKT1[n(%)]		χ^2	P
		Positive	Negative		
Menopausal status					
Premenopausal	33	24(72.73)	9(27.27)	2.803	0.094
Postmenopausal	34	18(52.94)	16(47.06)		
Stage					
I ~ II	19	6(31.58)	13(68.42)	10.972	0.001
III ~ IV	48	36(75.00)	12(25.00)		
Histological grade					
G1	33	17(51.52)	16(48.48)	3.470	0.063
G2+G3	34	25(73.53)	9(26.47)		
Lymph node metastasis					
Yes	40	22(55.00)	18(45.00)	2.507	0.113
No	27	20(74.07)	7(25.93)		

案是手术联合化疗，但临床化疗耐药的形成是影响卵巢癌患者治疗效果、导致预后不良和患者死亡率居高不下的主要原因。卵巢癌患者首次应用一线化疗药的耐药率约 40%~50%，在首次化疗敏感的患者中有 60%在半年后也产生了继发耐药。总体来讲，至少 80%的卵巢癌患者最终出现耐药^[1,2]。因此，探

讨卵巢癌耐药机制并寻找早期预测卵巢癌耐药的敏感生物学指标具有重要临床意义。

目前研究认为，化疗耐药的分子机制有以下几方面：药物外排以及解毒增加；DNA 损伤识别缺陷及修复增加；信号传导通路的改变；凋亡相关因子功能异常^[3]。

PI3K/Akt 通路是经典抗凋亡、促存活的信号转导途径,在肿瘤发生、侵袭转移及化疗耐药中都发挥重要作用^[4]。AKT1 是 AKT 的亚型之一,是 PI3K/Akt 通路下游的主要作用靶点,定位于 14q32,具有组织分布广泛性,能在胚胎发育和生长方面起决定性作用^[5],已被确定为癌基因,在多种肿瘤中存在基因扩增。

AKT 的功能主要有以下几方面:①抑制细胞凋亡:AKT 可以磷酸化 caspase-9 前体,直接发挥抗凋亡作用;Forkhead 家族可诱导多种凋亡因子的表达,AKT 可使 Forkhead 家族磷酸化,通过转录调节,间接发挥抗凋亡作用^[6-8]。②调节细胞周期:AKT 能直接作用影响细胞周期的是抑癌基因 *c-Myc*,上调 *c-Myc* 表达,使细胞逃离 G_0 期,引起细胞增殖^[9]。AKT 还可直接磷酸化 mTOR,激活 mTOR。mTOR 可调节至少 3 种在翻译过程中有重要作用的蛋白:4E-BP1、p70s6k 和 eIF4GI,这些都是调节细胞周期的关键蛋白,一旦 AKT 表达异常,将对下游产生巨大的影响^[10,11]。③促进血管生成:AKT 能通过调节内皮型一氧化氮合酶,刺激内皮细胞的生长和增殖,增加血管的通透性,使血管扩张,从而促进血管形成,增加血流量^[12]。④促进细胞侵袭和转移:有实验证明,AKT 稳定转染的细胞株能诱导上皮间质转换且 E-钙黏素表达下调,细胞粘附性降低,细胞运动性和侵袭性增强^[13]。其抑制细胞凋亡、促进血管生成的特性都是产生化疗耐药的关键原因。Zhou 等^[14]报道在化疗耐药乳腺癌细胞中 AKT 使 Mdm2 磷酸化,使肿瘤细胞抗凋亡增加。在人前列腺癌 *PTEN* 基因缺失的细胞中 AKT 表达异常增高,并且对阿霉素和紫杉醇的耐药性明显升高^[15]。在体外诱导建立的结肠癌顺铂耐药细胞中,活化的 AKT 蛋白水平明显降低,且细胞生长抑制率和凋亡率均明显升高。在卵巢癌细胞中,已有研究证明 AKT 的异常表达或异常活性可引起紫杉醇耐药,并且抑制 PI3K/Akt 通路可以增强紫杉醇的抗肿瘤效果。以上研究表明 AKT1 在卵巢肿瘤发展及卵巢癌化疗耐药中发挥重要作用,其在组织中表达情况可能成为预测化疗耐药性的生物学指标之一。

本研究发现随着卵巢肿瘤的发生发展,AKT1 阳性表达率逐渐升高,证明了其癌基因的特点^[16,17],并且与卵巢癌的手术病理分期相关,说明其在卵巢

肿瘤发生发展中的作用。AKT1 阳性表达率在耐药组中明显高于敏感组,提示 AKT1 的检测有助于判断卵巢浆液性腺癌化疗耐药特性,与国外的文献报道相一致^[18-20]。

综上所述,AKT1 的表达与卵巢浆液性癌的发展和化疗耐药相关。AKT1 蛋白的表达强度可能成为卵巢肿瘤发生发展和化疗耐药预测的一个有效指标。

参考文献:

- [1] Long TF,Dai YM. Chemotherapy for recurrent ovarian cancer [J]. Journal of Chinese Oncology,2013,19(1):29-34. [龙腾飞,代荫梅.复发性卵巢癌的化疗[J].肿瘤学杂志,2013,19(1):29-34.]
- [2] Zeng Z,Wang M,He YN,et al. Expression of twist in ovarian serous cystadenocarcinoma and its significance [J]. Journal of Chinese Oncology,2013,19(2):102-105. [曾志,王敏,何旖旎,等.Twist 蛋白在卵巢浆液性腺癌中的表达及临床意义[J].肿瘤学杂志,2013,19(2):102-105.]
- [3] Tao T,Wang M.Screening of differentially expressed microRNA in chemoresistant and sensitive ovarian cancer cells and the identification of the tissues[J].Journal of China Medical University,2013,42(2):118-122.[陶陶,王敏.化疗耐药及敏感卵巢癌细胞差异表达 microRNA 的筛查与组织鉴定[J].中国医科大学学报,2013,42(2):118-122.]
- [4] Zhu Z,Sun H,Ma G,et al. Bufalin induces lung cancer cell apoptosis via the inhibition of PI3K/Akt pathway [J]. Int J Mol Sci,2012,13(2):2025-2035.
- [5] Dummeler B,Hemmings BA.Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease[J]. Biochem Soc Trans,2007,35(2):231-235.
- [6] Quan JH,Cha GH,Zhou W,et al. Involvement of PI3 kinase/Akt-dependent Bad phosphorylation in Toxoplasma gondii-mediated inhibition of host cell apoptosis[J]. Exp Parasitol,2013,133(4):462-471.
- [7] Vu NT,Park MA,Shultz JC,et al. hnRNP U enhances caspase-9 splicing and is modulated by AKT-dependent phosphorylation of hnRNP L[J]. J Biol Chem,2013,288(12):8575-8584.
- [8] Campbell RA,Bhat-Nakshatri P,Patel NM,et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance[J]. J Biol Chem,2001,276(13):9817-9824.

- [9] Radke J, Bortolussi G, Pagenstecher A. Akt and c-Myc induce stem-cell markers in mature primary p53(-/-) astrocytes and render these cells gliomagenic in the brain of immunocompetent mice [J]. PLoS One, 2013, 8(2):e56691.
- [10] Ali G, Boldrini L, Capodanno A, et al. Expression of p-AKT and p-mTOR in a large series of bronchopulmonary neuroendocrine tumors [J]. Exp Ther Med, 2011, 2(5):787-792.
- [11] Gedaly R, Angulo P, Hundley J, et al. PKI-587 and sorafenib targeting PI3K/AKT/mTOR and Ras/Raf/MAPK pathways synergistically inhibit HCC cell proliferation [J]. J Surg Res, 2012, 176(2):542-548.
- [12] Bharti S, Singh R, Chauhan SS, et al. Phosphorylation of Akt/GSK-3 β /eNOS amplifies 5-HT_{2B} receptor blockade mediated anti-hypertrophic effect in rats [J]. FEBS Lett, 2012, 586(2):180-185.
- [13] Fenouille N, Tichet M, Dufies M, et al. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) regulatory factor SLUG (SNAI2) is a downstream target of SPARC and AKT in promoting melanoma cell invasion [J]. PLoS One, 2012, 7(7):e40378.
- [14] Zhou BP, Liao Y, Xia W, et al. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells [J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(3):245-252.
- [15] Lee JT Jr, Steelman LS, McCubrey JA. Phosphatidylinositol 3'-kinase activation leads to multidrug resistance protein-1 expression and subsequent chemoresistance in advanced prostate cancer cells [J]. Cancer Res, 2004, 64(22):8397-8404.
- [16] Kumar S, Bryant CS, Chamala S, et al. Ritonavir blocks AKT signaling, activates apoptosis and inhibits migration and invasion in ovarian cancer cells [J]. Mol Cancer, 2009, 8:26.
- [17] Makker A, Goel MM, Das V, et al. PI3K-Akt-mTOR and MAPK signaling pathways in polycystic ovarian syndrome, uterine leiomyomas and endometriosis: an update [J]. Gynecol Endocrinol, 2012, 28(3):175-181.
- [18] Stronach EA, Chen M, Maginn EN, et al. DNA-PK mediates AKT activation and apoptosis inhibition in clinically acquired platinum resistance [J]. Neoplasia, 2011, 13(11):1069-1080.
- [19] Bezler M, Hengstler JG, Ullrich A. Inhibition of doxorubicin-induced HER3-PI3K-AKT signalling enhances apoptosis of ovarian cancer cells [J]. Mol Oncol, 2012, 6(5):516-529.
- [20] Hahne JC, Honig A, Meyer SR, et al. Downregulation of AKT reverses platinum resistance of human ovarian cancers in vitro [J]. Oncol Rep, 2012, 28(6):2023-2028.

第三届广州国际肿瘤学术会议通知

为充分把握国际肿瘤学术研究前沿和进展动态,促进我国肿瘤学发展,加强基础与临床的紧密结合,为从事肿瘤研究和防治工作的相关学者提供交流信息的平台,广东省抗癌协会、美中抗癌协会(USCACA)、中山大学肿瘤防治中心、《癌症(*Chinese Journal of Cancer*)》杂志将于2013年11月7日至9日在广东广州联合主办“第三届广州国际肿瘤学术会议”。

在成功举办前两届会议的基础上,第三届广州国际肿瘤学术会议将以“关注学科发展前沿,加强国内外学术交流”为宗旨,拟邀请多位来自美国及其他国家的著名肿瘤中心的国际知名肿瘤学家及国内多名医学界两院院士和著名肿瘤学专家、学术精英作专题学术报告。

初冬的羊城依然繁花似锦,气候宜人!我们诚挚地邀请中外专家、学者参加本次大会,相互交流,共同进步,为我国肿瘤学防治事业的发展不懈努力。

会议地点:广州白云国际会议中心

网上报名截止日期:2013年10月15日

联系人:欧老师 联系电话:020-87343138 E-mail:gzco2011@163.com

详情敬请登陆大会网站:<http://gzo.sysucc.org.cn>