

Akt 及 Survivin 表达在非小细胞肺癌中的临床意义

赵 球¹, 郭人花²

(1.常州市肿瘤医院,江苏 常州 213000;2.南京医科大学第一附属医院,江苏 南京 210029)

摘 要: [目的] 探讨 Akt 及 Survivin 表达在非小细胞肺癌(NSCLC)中的临床意义。 [方法] 采用 qRT-PCR 技术及 Western blot 法检测 55 例 NSCLC 原发灶、癌旁及正常组织中 Akt 及 Survivin 的表达。 [结果] qRT-PCR 和 Western blot 均显示 Akt 及 Survivin 在 NSCLC 原发灶中的表达明显高于癌旁及正常组织 ($P < 0.05$); qRT-PCR 显示在术后 1 年内发生远处转移的患者组织中的表达明显高于其在没有发生远处转移的组织中的表达 ($P = 0.0297$), 在有淋巴结转移的 NSCLC 原发灶中的表达明显高于无淋巴结转移者 ($P = 0.0137$)。 Akt 及 Survivin 在分级为 II/III 级的 NSCLC 中的表达均明显高于在 I 级患者中表达 ($P = 0.0487, P = 0.0467$), 但 Akt 及 Survivin 的表达与患者的年龄、性别、肿瘤的大小、分化程度及分期都没有明显关系 ($P > 0.05$)。 两种方法检测均显示 Akt 与 Survivin 的表达成正相关 ($r = 0.5545, P < 0.05; r = 0.6144, P < 0.05$)。 [结论] Akt 和 Survivin 相互关联, 可能协同促进 NSCLC 的发生发展及侵袭转移。

主题词: 非小细胞肺癌; Akt; Survivin; 肿瘤转移

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2015)09-0757-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2015.09.B012

The Clinical Significance of Expressions of Akt and Survivin in Non-small Cell Lung Cancer

ZHAO Qiu¹, GUO Ren-hua²

(1.Changzhou Tumor Hospital, Changzhou 213000, China; 2. The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the clinical significance of expressions of Akt and Survivin in non-small cell lung cancer(NSCLC). [Methods] The expressions of Akt and Survivin were detected in cancer tissues, cancer adjacent tissues and normal tissues in samples from 55 cases with NSCLC by qRT-PCR and Western blot methods. [Results] Akt and Survivin expressions were significantly higher in cancer tissues than those in cancer adjacent tissues and normal tissues by both qRT-PCR and Western blot methods ($P < 0.05$). qRT-PCR detection showed that the level of Survivin was higher in patients with distant metastasis within one year postoperation than that in patients without distant metastasis ($P = 0.0297$), and also was higher in patients with lymph metastasis than that in patients without lymph metastasis ($P = 0.0137$). Akt and Survivin were higher in NSCLC patients with grade II/III than those in patients with grade I ($P = 0.0487, P = 0.0467$), but both of them had no significant correlation with patients' age, gender, tumor size, differentiation and staging ($P > 0.05$). Both qRT-PCR and Western blot detection showed that Akt and Survivin were positively correlated ($r = 0.5545, P < 0.05; r = 0.6144, P < 0.05$). [Conclusion] Akt and Survivin are correlated, which might have synergistic effect on development and invasion and metastasis of NSCLC.

Subject words: non-small cell lung cancer(NSCLC); Akt; Survivin; neoplasm metastasis

PIK3CA 基因能够编码 PI3K 的 P110 催化亚单位,使激酶活性增强,从而持续刺激下游的 Akt,活

化的 Akt 可磷酸化它的下游分子,从而促进细胞的生长和增殖、运动和侵袭,抑制细胞的凋亡和导致 EGFR-TKI 耐药的产生^[1,2],此信号通路在非小细胞肺癌(NSCLC)发生发展的早期阶段起到非常重要的作用。研究发现,凋亡抑制因子 Survivin 除了与细胞的凋亡和增殖有关,还能够诱导耐药产生^[3-5],且其

基金项目: 国家自然科学基金(81172217)

通讯作者: 郭人花,主任医师,副教授,博士;南京医科大学第一附属医院肿瘤科,江苏省南京市广州路 300 号 (210029);E-mail: rhguo@163.com

收稿日期: 2014-12-08; **修回日期:** 2015-01-27

表达受到PI3K/Akt 信号通路调节^[6,7]。本研究的目的是探讨 Akt 及 Survivin 在 NSCLC 原发灶、癌旁及正常组织中的表达差异,探索它们在 NSCLC 发生发展以及浸润转移过程中的作用,以期为 NSCLC 的治疗提供新的靶点。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集南京医科大学第一附属医院心胸外科 2010 年 1 月至 2012 年 2 月期间行手术治疗的 NSCLC 病例 55 例,每例包括肿瘤组织、癌旁组织和正常组织。癌旁组织距离原发灶组织大于 2cm,正常组织距离原发灶组织大于 5cm。55 例 NSCLC 患者中男性 38 例,女性 17 例;肿瘤分级为 I 级者 12 例,II/III 级者 43 例;鳞状细胞癌 16 例,腺癌 39 例;伴淋巴结转移者 20 例;术后 pTNM 分期 I/II 期 40 例、III/IV 期 15 例;术后 1 年内出现远处转移患者 11 例。所有患者术前均未接受过任何化疗或放疗治疗。

1.2 试剂及仪器

1.2.1 主要试剂

TRI-ZOL 总 RNA 提取试剂盒购自美国普飞生物公司;TaKaRa RNA 反转试剂盒、SYBR 实时荧光定量 PCR 试剂盒购自大连宝生物工程有限公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;兔抗 Akt 单克隆抗体、鼠抗 Survivin 单克隆抗体、二抗 HRP 标记的抗兔 IgG、二抗 HRP 标记的抗鼠 IgG 均购自上海明睿生物技术有限公司。Akt 上游引物序列为:5'-AATGGACAGAAGCTATCCAGGC-3';下游引物序列为:5'-TGATGGGTTGTAGAGGCATCC-3。Survivin 上游引物序列为:5'-AGGACCACCGCATCTCTA-CAT-3';下游引物序列为:5'-AAGTCTG-GCTCGTTCTCACTG-3'。引物均由上海英俊生物工程有限公司合成。

1.2.2 主要仪器

7900HT 型荧光定量 PCR 仪,购自美国 Applied Biosystems 公司;Western blot 设备,购自上海碧云天生物技术有限公司;Alpha Innotech 凝胶成像系统,购自美国 Applied Biosystems 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 qRT-PCR 实验

按照试剂盒的操作说明提取 NSCLC 原发灶、癌旁和正常组织中的总 RNA,取 100mg 组织,加入 1ml Trizol 试剂,匀浆,然后加入 0.2ml 氯仿,振荡 20s,室温静置 5min。12 000r/min 离心 10min,取上清;加入 500μl 异丙醇,轻轻混匀,室温静置 10min。12 000r/min 离心 10min,弃上清。加入 1ml 的 75%乙醇,轻轻摇匀,置-20℃冰箱过夜充分沉淀,离心,弃上清,然后晾干,加入 50μl DEPC 水溶解。然后进行反转录(reverse transcription, RT)反应。在 10μl 反应体系中加入 2μl 总 RNA,37℃孵育 1h,接着 95℃灭活 5min,再立即冰浴,0℃冰箱保存备用。然后设计 Akt 及 Survivin 引物,在 7900HT 型荧光定量 PCR 仪进行 qRT-PCR 反应,在 5μl PCR 反应体系中加入 1μl cDNA,扩增条件为:95℃预变性 30s;PCR 反应:95℃5s,60℃34s,循环 40 次。

1.3.2 Western blot 实验

①取 2ml EP 管加入 500μl 裂解液(已加入蛋白酶抑制剂);②取 0.1g 组织,充分剪碎后加入研磨器中,加入适量液氮,将组织研成粉末状;③将研磨后的组织转至加有裂解液的 2ml EP 管中;④冰上超声(超声 3s,停 6s),30%能量;⑤冰上静置 30min,每 10min 震荡 1 次;⑥12 000r/min,4℃离心 30min;⑦收集上清,测完蛋白含量后,所有蛋白样品调至等浓度后上样。⑧电泳:取 25μg 蛋白样品上样后开始进行 6%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳时间一般 1~2h,电压为 60V,电泳至溴酚兰刚跑出终止电泳。电泳结束后将浓缩胶和分离胶上不用的部分切去以备转膜用;⑨转膜:利用半干式转膜法,电转移 15A 1~2h 后,打开盖子,取出夹子,取出膜。将膜移至含有封闭液的平皿中。⑩曝光:将膜室温牛奶封闭 1h,加入兔抗 Akt 单克隆抗体及鼠抗 Survivin 单克隆抗体(1:1000)4℃过夜,用 TBST 洗 6 次每次 10min,加 HRP 标记的抗兔及抗鼠 IgG 室温孵育 1h,再用 TBST 洗 3 次,每次 10min,最后采用 Alpha 凝胶成像系统曝光成像。

1.4 统计学处理

数据处理采用 Graphpad.5 软件,采用单因素方差分析比较 Akt 及 Survivin 在 NSCLC 原发灶、癌旁和正常组织中的表达差异,不同临床病理特征下

Akt 和 Survivin 水平比较采用非配对 *t* 检验, 采用 Stata 软件, 应用线性相关分析 Akt 和 Survivin 在 NSCLC 组织中的表达相关性。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 qRT-PCR 检测 3 种组织中 Akt 及 Survivin 的表达

Akt 在 NSCLC 原发灶中的表达明显高于在癌旁及正常组织中的表达 ($P=0.0138, P=0.0002$, Figure 1); Survivin 在 3 种组织中的表达亦有差异 ($P<0.0001, P<0.0001$, Figure 2)。

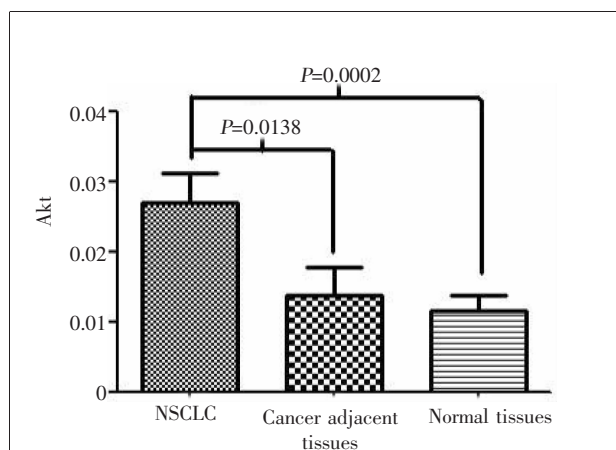


Figure 1 Expression level of Akt in 3 kinds of tissues by qRT-PCR

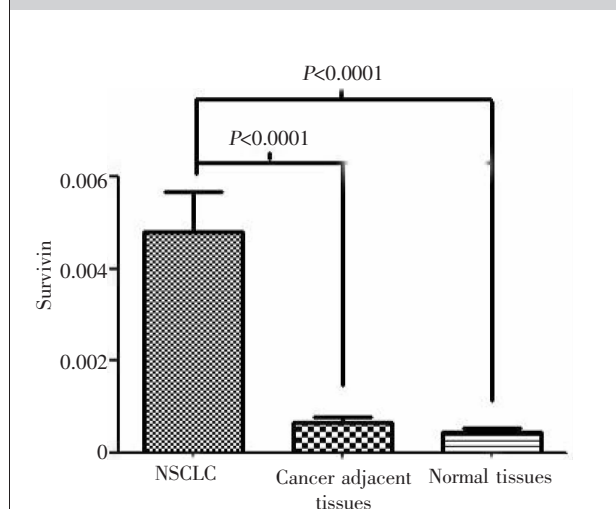


Figure 2 Expression level of Survivin in 3 kinds of tissues by qRT-PCR

2.2 Western blot 法检测 3 种组织中 Akt 和 Survivin 蛋白表达

Akt 及 Survivin 蛋白在 NSCLC 原发灶中的表达最高, 在正常组织中最低 (Figure 3)。

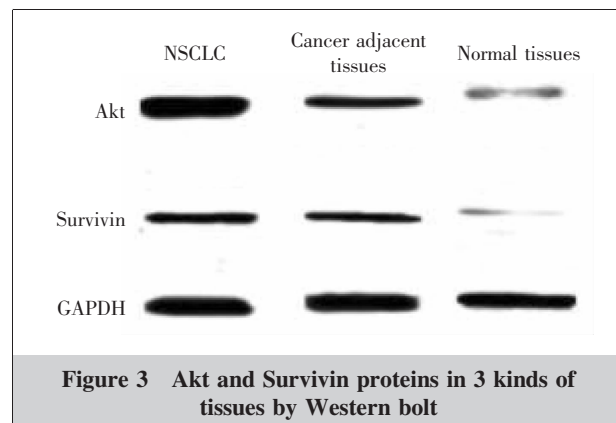


Figure 3 Akt and Survivin proteins in 3 kinds of tissues by Western blot

2.3 qRT-PCR 法检测 Akt 及 Survivin 在不同临床病理特征 NSCLC 患者中的表达水平

Akt 在分级为 II/III 级的 NSCLC 原发灶中的表达明显高于在 I 级中表达 ($P=0.0487$, Table 1); Survivin 在术后 1 年内发生远处转移的患者组织中的表达明显高于其在没有发生远处转移的组织中的表达 ($P=0.0297$), 在有淋巴结转移的 NSCLC 原发灶中的表达明显高于无淋巴结转移者 ($P=0.0137$), 在分级为 II/III 级的 NSCLC 原发灶中的表达亦明显高于在 I 级中表达 ($P=0.0467$, Table 2)。

2.4 Akt 和 Survivin 相关性

qRT-PCR 和 Western blot 两种方法检测 Akt 与 Survivin 在 NSCLC 组织中的表达, 均显示成正相关 ($r=0.5545, P<0.05; r=0.6144, P<0.05$)。

3 讨论

PIK3CA 是新近发现的一种体细胞突变的癌基因, 其可能通过参与 PI3K/Akt 细胞信号转导途径调节细胞的生长和凋亡。Samuels 等^[8]在体外构建了 PIK3CA 基因突变的癌细胞株, 其中包含了两个突变区(exon9、exon20)的重组突变, 通过体外细胞培养发现 PIK3CA 突变型与野生型相比, PI3K 激酶活性明显增强, 同时 Akt 的磷酸化水平显著提高, 同时 NIH 3T3 转化能力也明显增强。在对所有突变位点检测的研究中发现包含有 PIK3CA 突变的细胞均具

Table 1 The expression of Akt and clinicopathologic parameters in NSCLC

Parameters	Positive expression of Akt(%)	Akt level	P
Age(years old)			
<65	30(54.5)	0.01470 ± 0.00309	0.8111
≥65	25(45.5)	0.01300 ± 0.00200	
Gender			
Male	38(69.1)	0.02352 ± 0.00313	0.4765
Female	17(30.9)	0.01345 ± 0.00249	
Tumor size(cm)			
<3	20(36.4)	0.02786 ± 0.00275	0.5864
≥3	35(63.6)	0.03379 ± 0.00373	
Histology type			
Squamous cell carcinoma	16(29.1)	0.01168 ± 0.00132	0.2182
Adenocarcinoma	39(71.9)	0.02710 ± 0.00342	
Lymph node metastasis			
Yes	35(63.6)	0.02687 ± 0.00240	0.0677
No	20(36.4%)	0.01360 ± 0.00168	
Distant metastasis within 1 year postoperation			
Yes	11(20.0)	0.01367 ± 0.00149	0.2220
No	44(80.0)	0.01589 ± 0.00632	
Pathological grading			
I	12(21.8)	0.02401 ± 0.00365	0.0487
II / III	43(78.2)	0.02110 ± 0.00698	
TNM stage			
I / II	40(72.7)	0.1258 ± 0.09404	0.2671
III / IV	15(27.3)	0.06361 ± 0.00113	

Table 2 The expression of Survivin and clinicopathologic parameters in NSCLC

Parameters	Positive expression of Survivin(%)	Survivin level	P
Age(years old)			
<65	30(54.5)	0.006088 ± 0.000931	0.7293
≥65	25(45.5)	0.007087 ± 0.000130	
Gender			
Male	38(69.1)	0.003179 ± 0.000437	0.2610
Female	17(30.9)	0.006700 ± 0.000114	
Tumor size(cm)			
<3	20(36.4)	0.006979 ± 0.000141	0.1938
≥3	35(63.6)	0.003520 ± 0.000490	
Histology type			
Squamous cell carcinoma	16(29.1)	0.003156 ± 0.000732	0.2679
Adenocarcinoma	39(71.9)	0.006570 ± 0.000113	
Lymph node metastasis			
Yes	35(63.6)	0.005500 ± 0.000524	0.0137
No	20(36.4)	0.002483 ± 0.000264	
Distant metastasis within 1 year postoperation			
Yes	11(20.0)	0.015686 ± 0.002250	0.0297
No	44(80.0)	0.006064 ± 0.000107	
Pathological grading			
I	12(21.8)	0.0007581 ± 0.000047	0.0467
II / III	43(78.2)	0.010644 ± 0.001572	
TNM stage			
I / II	40(72.7)	0.005102 ± 0.000127	0.1875
III / IV	15(27.3)	0.003473 ± 0.000480	

有高的酶活性和转化能力。这些结果都显示具有 *PIK3CA* 突变的细胞其分子生物学功能和细胞生物学特性都发生了改变, *PIK3CA* 突变能够通过上调 PDK 的活性并进一步激活下游分子 Akt 等, 进而对细胞的生长、增殖、黏附等过程进行调控。因而认为, *PIK3CA* 基因突变可能通过激活下游的 Akt 参与调控细胞癌变的过程。肖秀英等^[9]应用免疫组织化学 EnVision 法检测 60 例结直肠癌患者原发灶及其转移灶中 PI3K、p-Akt 蛋白的表达, 发现 PI3K 在转移灶中的阳性率显著高于原发灶中的阳性率(46.7% vs 30%, $\chi^2=13.890, P<0.05$), 而 p-Akt 在原发灶及转移灶中的表达差异无统计学意义 (53.3% vs 50.0%, $\chi^2=0.267, P>0.05$), 推断 PI3K 的表达与结直肠癌转移密切相关, 而 AKT 的表达可能不参与结直肠癌的转移。我们的研究在基因水平上发现 Akt 在 NSCLC 肿瘤组织中的表达明显高于在癌旁及正常组织中的表达, 表明 Akt 的高表达与 NSCLC 的发生有关, 是一种重要的 NSCLC 癌基因。

研究发现 Survivin 在很多种恶性肿瘤中异常表达, 包括肺癌、乳腺癌、胰腺癌、结肠癌、软组织肉瘤、脑部肿瘤、软组织肉瘤、神经母细胞瘤、恶性血液病等^[10-12]。张晓宇等^[13]研究发现 NSCLC 组织中 Survivin 蛋白表达阳性率为 63.3%(38/60), 而在肺良性疾病肺组织中均无表达, 其表达与肺癌淋巴结转移及分化程度有密切关系。p53 蛋白表达阳性的 NSCLC 中, Survivin 蛋白表达阳性率(80.5%)明显高于 p53 蛋白表达阴性者 (26.3%)。Survivin 蛋白在 NSCLC 中的表达水平与癌细胞的凋亡指数 AI 成负相关($r=-0.231, P<0.05$)。我们的研究在基因水平上发现 Survivin 在 NSCLC 组织中的表达明显高于在癌旁及正常组织中的表达, 进一步证实 Survivin 的高表达与 NSCLC 的发生发展过程有关, 且 Survivin 在分级为 II/III 级的 NSCLC 组织中的表达明显高于分级为 I 级的组织 ($P=0.0467$), 在有淋巴结转移的 NSCLC 组

组织中的表达明显高于无淋巴结转移者 ($P=0.0137$), 在有远处转移(术后 1 年内)的 NSCLC 组织中的表达明显高于无远处转移者 ($P=0.0297$), 表明 Survivin 的表达可能在判断 NSCLC 的恶性程度、肿瘤进展倾向及预后中有一定价值。

研究还发现 Akt 与 Survivin 的表达成正相关, 我们推测在 NSCLC 的发生过程中, PIK3CA 过量表达, 进一步激活下游 Akt 及 Survivin, 协同促进细胞的生长及侵袭转移, 但需要进一步实验证明。

参考文献:

- [1] Persad S, Attwell S, Gray V, et al. Regulation of protein kinase B/Akt-ser 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343 [J]. J Biol Chem, 2001, 276 (29): 27462–27469.
- [2] Lee HY, Srinivas H, Xia D, et al. Evidence that phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase kinase-4/c-Jun NH2-terminal kinase-dependent pathways cooperate to maintain lung cancer cell survival [J]. J Biol Chem, 2003, 278(26): 23630–23638.
- [3] Guo R, Huang Z, Shu Y, et al. Tamoxifen inhibits proliferation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 via down-regulation of survivin expression [J]. Biomed Pharmacother, 2009, 63 (5): 375–379.
- [4] Guo R, Wang T, Shen H, et al. Involvement of mTOR and survivin inhibition in tamoxifen-induced apoptosis in human hepatoblastoma cell line HepG2 [J]. Biomed Pharmacother, 2010, 64(4): 249–255.
- [5] Guo RH, Wang TS, Shu YQ, et al. Effects of survivin in tamoxifen-induced inhibition of proliferation and enhancement of apoptosis in hepatoma Hep22 cells [J]. Chinese Journal of Oncology, 2009, 31 (10): 752–755. [郭人花, 王同杉, 束永前, 等. Survivin 在他莫昔芬抑制肝癌 HepG2 细胞增殖和诱导凋亡中的作用 [J]. 中华肿瘤杂志, 2009, 31(10): 752–755.]
- [6] Guo RH, Wang TS, Shu YQ, et al. Insulin/PI3K signalling pathway regulates the expression of survivin in liver cancer HepG2 cells [J]. Chinese Journal of Oncology, 2008, 30 (10): 745–748. [郭人花, 王同杉, 束永前, 等. 胰岛素/PI3K 信号传导调节 survivin 在肝癌细胞 HepG2 中的表达 [J]. 中华肿瘤杂志, 2008, 30(10): 745–748.]
- [7] Guo RH, Huang ZH, Shu YQ, et al. Expression of survivin in hepatocellular carcinoma and its correlation with phosphorylation of PKB/Akt [J]. Jiangsu Medical Journal, 2007, 33(8): 762–764. [郭人花, 黄祖瑚, 束永前, 等. 生存素(survivin)在肝细胞癌中的表达及其与 Akt 磷酸化的相关性研究 [J]. 江苏医药, 2007, 33(8): 762–764.]
- [8] Samuels Y, Wang Z, Bardehi A, et al. High frequency of mutations the PIK3CA gene in human cancers [J]. Science, 2004, 304: 554–557.
- [9] Xiao XY, Yu BH, Wang LS, et al. Expression and significance of PI3K, p-Akt and mTOR in colorectal carcinoma and its metastasis spots [J]. China Oncology, 2011, 21(4): 247–250. [肖秀英, 于宝华, 王丽莎, 等. 结直肠癌原发及转移灶中 PI3K, p-Akt 及 mTOR 的表达及意义 [J]. 中国癌症杂志, 2011, 21(4): 247–250.]
- [10] Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, et al. Expression of Survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas [J]. Clin Cancer Res, 2000, 6: 127–134.
- [11] Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, et al. Inhibition of apoptosis by Survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer [J]. Cancer Res, 1998, 58: 5071–5074.
- [12] Islam A, Kageyama H, Takada N, et al. High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma [J]. Oncogene, 2000, 19: 617–623.
- [13] Zhang XY, Zhang JH, Zhong LH, et al. Expression of Survivin gene in non-small cell lung cancer and its relation with p53 and apoptosis [J]. Shandong Medical Journal, 2006, 46(4): 14–16. [张晓宇, 张家洪, 钟立厚, 等. Survivin 在非小细胞肺癌中的表达及其与 p53、细胞凋亡的关系 [J]. 山东医药, 2006, 46(4): 14–16.]