

· 论 著 ·

mTOR 及 PTEN、PHLPP、VEGF、p53 蛋白 在结肠癌中的表达及意义

张利, 吴慧丽, 李琨琨, 肖兴国, 张洋

郑州大学附属郑州中心医院消化一科, 河南 郑州 450007

摘要: **目的** 检测结肠癌组织中 mTOR、PTEN、PHLPP 及 VEGF 和 p53 蛋白表达, 探讨结肠癌发生、发展可能的分子机制及临床意义。**方法** 选择 2011 年 3 月至 2012 年 10 月 65 例结肠癌组织标本及 25 例腹部外伤者的正常结肠组织标本, 分别采用免疫组化法及 Western-blot 方法检测 mTOR 及 PTEN、PHLPP、VEGF、p53 蛋白的阳性表达率及相对表达量, 并对检测结果进行比较。**结果** mTOR、PTEN、PHLPP、VEGF、p53 蛋白在正常结肠组织中的阳性率分别为 12.0%、96.0%、92.0%、12.0%、8.0%, 在结肠癌组织中综合阳性率为 78.5%、23.1%、20.0%、92.3%、67.7%。结肠癌组 mTOR、VEGF、p53 阳性表达率高于正常对照组, PTEN、PHLPP 低于正常对照组 (P 均 < 0.01)。Western-blot 检测结果显示, TNM 分期越晚, mTOR 蛋白及 VEGF 表达水平越高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), PTEN、PHLPP 蛋白表达水平越低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而 p53 蛋白表达水平在肿瘤 TNM 不同分期无明显变化。**结论** mTOR 通路蛋白及抑癌基因 PTEN、PHLPP、p53 可能参与结肠癌发生、浸润、转移的信号传导。提示 mTOR 通路蛋白抑制剂可用于结肠癌的治疗。

关键词: mTOR 信号通路; 结肠癌; 血管内皮生长因子; PTEN 基因; PHLPP 基因; p53 蛋白; 抑癌基因
中图分类号: R 735.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2015)12-1567-03

Expressions and significance of mTOR, PTEN, PHLPP, VEGF and p53 proteins in colon cancer

ZHANG Li, WU Hui-li, LI Kun-kun, XIAO Xing-guo, ZHANG Yang

First Division of Gastroenterology Department, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University,
Zhengzhou, Henan 450007, China

Abstract: Objective To study the expressions of mammalian target of rapamycin (mTOR), phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN), pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatase (PHLPP), vascular endothelial growth factor (VEGF) and p53 proteins in colon cancer tissues and discuss the clinical significance and potential molecular mechanism of occurrence and development of colon cancer. **Methods** The colon cancer tissue samples of 65 colon cancer patients from March 2011 to October 2012 and normal colon tissues samples of 25 patients with abdominal trauma were collected. The positive expression rates and relative expression quantities of mTOR, PTEN, PHLPP, VEGF, p53 proteins in tissues were detected by immunohistochemical method and Western-blot method, respectively, and the results were compared between two groups. **Results** The positive expression rates of mTOR, PTEN, PHLPP, VEGF and p53 proteins in normal colon tissues were 12.0%, 96.0%, 92.0%, 12.0%, 8.0%, respectively, and were 78.5%, 23.1%, 20.0%, 92.3% and 67.7%, respectively in colon carcinoma tissues. The expressions of mTOR, VEGF and p53 proteins in colon cancer tissue significantly higher than those in normal colon tissues (all $P < 0.01$), while the expressions of PTEN and PHLPP in colon cancer tissues were significantly lower than those of normal colon tissue (all $P < 0.01$). Western-blot test showed that the later TNM stage, the higher expressions of mTOR and VEGF proteins ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) and the lower expressions of PTEN and PHLPP in colon cancer tissues ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while there was no obvious changes of p53 protein expression in different TNM stages. **Conclusions** The mTOR signaling pathway protein and PTEN, PHLPP and p53 tumor suppressor genes might participate in the signal transduction of occurrence, invasion, metastasis of colon cancer. It is prompted that the inhibitors of mTOR pathway proteins can be used for the therapy of colon cancer.

Key words: mTOR signal pathway; Colon cancer; Vascular endothelial growth factor; PTEN gene; PHLPP gene; p53

protein; Tumor suppressor gene

Akt 信号通路的重要底物,哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是重要的中心调控蛋白,主要调控细胞生存及增殖、凋亡等^[1],通过磷酸化其下游的多种蛋白来调控翻译及转录。mTOR 蛋白信号通路是许多肿瘤的重要治疗靶点,影响着肿瘤的发生、发展和转移^[2-5]。由于周围环境及饮食结构的改变,结肠癌发病率逐年上升,已成为危及人类健康的常见消化道肿瘤^[6-9]。目前研究结肠癌相关表达蛋白的标志物较多,但对 mTOR 通路蛋白及抑癌基因表达的研究较少。本研究检测 Akt/mTOR 通路相关蛋白及抑癌基因在结肠癌组织中表达水平,探讨 Akt/mTOR 通路 mTOR 蛋白及抑癌基因参与结肠癌发生、浸润、转移的可能机制,为临床应用 mTOR 通路蛋白抑制剂治疗结肠癌的有效性及其疗效观察指标提供参考。

1 对象与方法

1.1 对象 (1) 结肠癌组:2011 年 3 月至 2012 年 10 月在我院胃肠外科行手术治疗并经术中快速病理切片证实的结肠腺癌患者 65 例,不分性别、民族、年龄;标本采集前,均未对结肠癌患者进行放、化疗治疗;均采用 2009 年国际抗癌联盟临床分期法(TNM)进行分期。(2) 正常结肠组织对照组(正常对照组):为意外伤害后肠外伤行部分大肠切除的正常大肠黏膜组织 25 例。

1.2 试剂和器材 试剂:细胞裂解液,Western-blot 试剂盒,Ecl 试剂盒,显影液及定影液,上样 buffer, mTOR、PTEN、PHLPP、VEGF、p53 兔抗人一抗,羊抗兔二抗(均购于深圳晶美生物工程有限公司)。器材:电泳仪和电转槽。

1.3 方法

1.3.1 免疫组化检测相关蛋白的阳性表达率 将肿瘤及正常组织标本先固定再连续切片。采用免疫组化法染色,羊抗人浓缩型单克隆抗体,浓度 1:70,羊抗人浓缩型多克隆抗体 mTOR、PTEN、PHLPP、VEGF、

p53,浓度 1:110;采用 PBS 作为一抗阴性对照。严格按各试剂盒说明书操作。

1.3.2 Western-blot 检测蛋白表达 在低温环境下,将各样品加裂解液提取总蛋白。通过测定裂解上清液蛋白浓度后,取每种样品 20 μ g 总蛋白上样,并进行电泳、转膜至硝酸银纤维素膜即 NC 膜上。用非特异性抗体封闭 2 h,加入稀释为 1:1 000 的一抗,4 $^{\circ}$ C 摇床过夜,再加入稀释为 1:2 000 二抗,室温孵育 1 h。取 NC 膜浸没在增强化学发光剂(Ecl)中 3 min,在暗室曝光显影及定影。通过图像分析系统处理 X 线片上的条带,测定灰度值积分,计算以上指标与 β -actin 比值即为各蛋白表达的相对量。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行正态性检验,非正态分布数据行倒数转换为近似正态,组间差异比较采用 t 检验;计数资料的比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 mTOR、PTEN、PHLPP、VEGF、p53 蛋白在正常结肠组织中的阳性率分别为 12.0%、96.0%、92.0%、12.0%、8.0%,在结肠癌组织中综合阳性率为 78.5%、23.1%、20.0%、92.3%、67.7%。结肠癌组 mTOR、VEGF、p53 阳性表达率高于正常对照组,PTEN、PHLPP 低于正常对照组(P 均 < 0.01)。见表 1。

2.2 两组各相关蛋白表达水平比较 正常对照组及结肠癌组,裂解细胞行免疫印迹 mTOR 蛋白及 PTEN、PHLPP、VEGF、p53 蛋白表达检测(各灰带值分别与 β -actin 已进行校正)。各灰度值进行统计学分析结果显示,TNM 分期越晚,mTOR 蛋白及 VEGF 表达水平越高,PTEN 与 PHLPP 蛋白表达水平越低,而 p53 蛋白表达水平在肿瘤 TNM 不同分期无明显变化。见表 2。

表 1 正常结肠组织及不同临床分期结肠癌组织各蛋白表达阳性率 例(%)

分组	例数	mTOR	PTEN	PHLPP	VEGF	p53
正常对照组	25	3(12.0)	24(96.0)	23(92.0)	3(12.0)	2(8.0)
结肠癌组	65	51(78.5)	15(23.1)	13(20.0)	60(92.3)	44(67.7)
P 值		< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

表 2 结肠癌不同 TNM 各分期相关蛋白相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

分组	例数	mTOR	PTEN	PHLPP	VEGF	p53
正常对照组	25	0.106 \pm 0.053	0.235 \pm 0.130	0.176 \pm 0.210	0.335 \pm 0.230	0.203 \pm 0.090
结肠癌组 TNM 分期	65					
I、II 期	37	0.176 \pm 0.032*	0.130 \pm 0.230*	0.126 \pm 0.250*	0.485 \pm 0.230*	0.246 \pm 0.100
III、IV 期	28	0.278 \pm 0.038#	0.024 \pm 0.060#	0.085 \pm 0.120*	0.624 \pm 0.380#	0.235 \pm 0.130

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,# $P < 0.01$ 。

3 讨论

结肠癌血清标记物较多,但特异性及敏感性均低。本研究以探索结肠癌敏感性指标为目的,现已证实,结肠癌发生、发展分子机制中 Akt/mTOR 信号通路可促进细胞增殖、抑制细胞凋亡及诱导肿瘤多药耐药^[6]。进一步表明,mTOR 通路蛋白参与结肠癌发生及发展的分子机制,可能是通过激活下游 PTEN、PHLPP、VEGF、p53 来调控细胞周期基因转录或诱导转录调控子生成。

PTEN 是新型抑癌基因,在多种肿瘤中如造血系统其表达均有降低,其表达降低提示肿瘤预后不良。本文结果显示,已有淋巴结及远处转移,且病理分型为高度恶性的结肠癌组织中其表达降低。推测可能机制是 Akt/mTOR 通路通过信号分子来调控 PTEN 活性,发挥肿瘤抑制功能^[6-8]。

PHLPP 的缺失引起肿瘤的发生、发展,PHLPP 是一种抑癌基因^[9]。有文献报道,在结肠癌内 β -TrCP 介导的泛素化可以降解 PHLPP,并且此降解过程受 p-Akt、p-mTOR 的负性调控^[10]。这与本文结果相一致,即在结肠癌中,mTOR 表达增强,而 PHLPP 表达减低。其机制可能是以上分子信号调控综合作用的结果。

在肿瘤组织中,VEGF/VEGFR2 信号转导通路决定肿瘤微血管生成。对 RCC 移植动物模型的研究发现,mTOR 抑制剂与 VEGF 抑制剂(如苏尼替尼)具有协同抗肿瘤作用^[11]。本研究结果显示,在结肠癌组织中 mTOR 与 VEGF 的阳性表达较正常结肠组织显著增强。

p53 是最为常见的突变基因,陈奇等^[12]报道在结肠癌组织中的总表达率为 55.6%,而与组织学类型无关,如腺瘤、腺癌^[13-14]。本文结果显示,在结肠癌中突变型 p53 阳性率为 67.7%,Western-blot 实验检测 p53 蛋白表达水平与肿瘤临床分期无关。推测 mTOR 信号通路的异常激活合并 p53 失活时导致细胞恶性转化,激活 mTOR 信号通路能引起细胞生长及分化蛋白的表达增强,进一步促使肿瘤的发生及发展^[15-16]。

总之,在结肠癌中 mTOR 蛋白、VEGF 表达阳性率及表达水平增高,且在肿瘤晚期,合并有淋巴结转移、远处转移更显著;而 PTEN、PHLPP 则表达显著减少^[17-19]。mTOR 通路蛋白及抑癌基因 PTEN、PHLPP、p53 及 VEGF 可能参与结肠癌发生、浸润、转移的信号传导。其分子机制可能是,在结肠癌中 Akt/mTOR 信号通路可通过异常激活,调控减低抑癌

基因 PTEN、PHLPP 表达,促使抑癌基因 p53 突变型转化,增强 VEGF 表达,进一步促成肿瘤血管生成等,从而促使结肠癌发生与发展。

参考文献

- [1] 李欣,杨作成. 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白抑制剂与肿瘤治疗[J]. 国际肿瘤学杂志,2012,39(8):576-579.
- [2] 郑鹏生,冀静. mTOR 信号通路与肿瘤的研究进展[J]. 西安交通大学学报(医学版),2010,31(1):1-9.
- [3] 赵凡,LI Zhuo-ri. mTOR 信号通路和肿瘤治疗[J]. 中国普通外科杂志,2012,21(2):204-208.
- [4] 张莉霞,肖菊香,锁爱莉,等. TCTP、mTOR 在胃癌中的表达意义[J]. 昆明医科大学学报,2014,35(4):30-34.
- [5] 童刚领,孙晓非,甄子俊,等. p-mTOR 和 p-4EBP1 在横纹肌肉瘤组织中的表达及其临床意义[J]. 中国肿瘤临床,2011,38(8):447-451.
- [6] Klaver CE, Musters GD, Bemelman WA, et al. Adjuvant hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in patients with colon cancer at high risk of peritoneal carcinomatosis; the COLOPEC randomized multicentre trial[J]. BMC Cancer,2015,15:428.
- [7] Dienstmann R, Salazar R, Tabernero J. Personalizing colon cancer adjuvant therapy; selecting optimal treatments for individual patients[J]. J Clin Oncol,2015,33(16):1787-1796.
- [8] 熊伟,程金湘,章翔,等. 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白研究进展[J]. 中华神经外科疾病研究杂志,2011,10(1):85-88.
- [9] 钱帅伟,漆正堂,丁树哲. 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白通路及细胞自噬[J]. 生命科学,2011,23(8):730-735.
- [10] Khwaja A. PI3K as a target for therapy in haematological malignancies[J]. Curr Top Microbiol Immunol,2010,347:169-188.
- [11] 成志勇,王素云,卞永生,等. PTEN/Akt/mTOR 通路增加 K562/ADM 细胞化疗敏感性[J]. 基础医学与临床,2012,32(1):49-55.
- [12] 陈奇,曾照芳. p53 基因突变与消化系统恶性肿瘤的关联[J]. 激光杂志,2012,33(2):79-80.
- [13] 王素云,成志勇,邓凯,等. 野生型 PTEN 基因对人多发性骨髓瘤细胞株 RPMI8226 增殖、凋亡和侵袭活性的影响[J]. 中国老年学杂志,2010,30(5):614-617.
- [14] 闫朝奇,张丽君,高峰,等. PI3K/Akt/mTOR 通路抑制剂对白血病细胞株增殖及其 PHLPP 表达的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2012,19(4):369-373.
- [15] Li X, Liu J, Gao T. β -TrCP-mediated ubiquitination and degradation of PHLPP1 are negatively regulated by Akt[J]. Mol Cell Biol,2009,29(23):6192-6205.
- [16] Wacheck V. mTOR pathway inhibitors in cancer therapy: moving past rapamycin[J]. Pharmacogenomics,2010,11(9):1189-1191.
- [17] 董崇海,曲玲,赵清喜,等. 散发性结直肠癌、腺瘤组织中 hMLH1 和突变型 p53 表达[J]. 中国肿瘤,2007,16(2):123-126.
- [18] 张丹丹,李庆琳. PI3K/Akt/mTOR 信号通路及肿瘤[J]. 安徽医药,2012,16(3):281-282.
- [19] 吴慧丽,张利,李琨琨,等. 雷帕霉素在溃疡性结肠炎患者中应用的临床价值评估[J]. 世界华人消化杂志,2013,21(15):1458-1461.