

PI3K 和 VEGF 在大肠癌中的表达及意义

刘明开 王辉 于晶功 王乙 刘日旭 高鹏

作者单位:116021 大连市,大连大学附属新华医院检验科(刘明开 王乙 刘日旭)

272000 济宁市,山东省鲁南工程技术研究院管理中心(王辉)

116033 大连市,大连市妇幼保健院病理科(于晶功)

116023 大连市,中国科学院大连化学物理研究所(高鹏)

通讯作者:高鹏, E-mail: xuhe@medmail.com.cn

【摘要】 目的 研究磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在大肠癌变过程中的表达及临床意义。**方法** 选取 72 例大肠癌患者的大肠癌组织和癌旁正常组织,应用免疫组化法和 RT-PCR 法检测 PI3K 和 VEGF 在大肠癌中的蛋白表达和基因表达水平,并进行统计学分析。**结果** 在大肠癌组织和癌旁正常黏膜组织中 PI3K 和 VEGF 的阳性表达率差异均有统计学意义($\chi^2=60.66, \chi^2=83.70, P$ 均 <0.05),且两者在大肠癌组织中的表达呈正相关($r=0.872, P<0.05$)。大肠癌新鲜组织中 PIK3R1 和 VEGFA 基因的表达量显著高于癌旁正常黏膜组织中的表达量,且差异均具有统计学意义($t=-2.75, t=-2.61, P$ 均 <0.05)。**结论** PI3K 和 VEGF 在大肠癌的发生、发展过程中起重要作用。

【关键词】 大肠癌;磷脂酰肌醇 3-激酶;血管内皮生长因子;免疫组化;RT-PCR

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2013.03.011

Expression and significance of PI3K and VEGF in colorectal cancer

LIU Ming-kai¹, WANG Hui², YU Jing-gong³, et al. ¹Department of Clinical Laboratory, Xinhua Hospital Affiliated to Dalian University, Dalian 116021, China ²Engineering Technology Management Center of The Southern Shandong Academy, Jining 272000, China ³Department of Pathology, Dalian Women and Children Health Hospital, Dalian 116033, China

【Abstract】 Objective To investigate the expression and clinical significance of phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the progression of colorectal cancer. **Methods** The protein expression and mRNA level were detected in 72 pairs colorectal carcinoma and the corresponding control tissue samples using real time polymerase chain reaction and immunohistochemistry methods. **Results** There were statistical significance in the differences of positive rates of PI3K and VEGF between colorectal carcinoma and normal colorectal tissue ($\chi^2=60.66, \chi^2=83.70, P$ all <0.05), and the expression of PI3K and VEGF in colorectal carcinoma tissue showed positive correlation ($r=0.872, P<0.05$). The expression levels of genes PIK3R1 and VEGFA in colorectal carcinoma tissue were obviously higher than that of in the normal colorectal tissue, and the differences all had statistical significance ($t=-2.75, t=-2.61, P$ all <0.05). **Conclusion** PI3K and VEGF play an important role in the occurrence and development of colorectal cancer.

【Key words】 Colorectal cancer; Phosphoinositide 3-kinase; Vascular endothelial growth factor; Immunohistochemistry; Real time PCR

大肠癌是常见的消化道恶性肿瘤,近年来发病率及病死率呈迅速上升趋势,死亡的主要原因是肿瘤的侵袭和转移,早期诊断及发现转移病灶对于治疗及判断患者预后有着重要意义。磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B, PI3K/Akt)信号通路参与了多种因子介导的肿瘤血管生成过程,其活化与肿瘤的发生、侵袭和转移密切相关^[1]。肿瘤组织内的新生血管是肿瘤细

胞生长、侵袭和转移的基础,调节血管生成的因子很多,其中最重要的是血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)^[2]。目前发现,VEGF 家族成员包括 VEGF (即通常所指的 VEGF-A)、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E 和胎盘生长因子。都是由两个相同的多肽链通过二硫键交联构成的同源二聚体糖蛋白^[3]。本文研究免疫组化技术检测大肠癌组织中 PI3K 和 VEGF 的表达水平,采用

RT-PCR 法检测磷脂酰肌醇 3-激酶调节亚基 1 (phosphatidylinositol 3 kinase regulatory subunit 1, PIK3R1)和 VEGFA 基因表达水平,初步探讨其在大肠癌癌变过程中的作用及相互关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料 72 例患者均为 2011 年 3 月至 12 月本院肛肠外科住院患者,均经临床及病理组织学确诊为原发性大肠癌,术前均未行放疗、化疗等抗肿瘤治疗,无大肠癌家族史。其中男 40 例,女 32 例;年龄 46~79 岁。

1.2 标本来源 以大肠癌新鲜组织作为疾病组,癌旁正常黏膜组织(距肿瘤边缘 8 cm 以上)作为对照组。新鲜组织标本采集后迅速经液氮保存,待进行 RT-PCR 检测;石蜡组织标本经福尔马林固定,石蜡包埋,待进行免疫组化检测。

1.3 方法

1.3.1 RT-PCR 检测 应用 Real Time PCR 方法对大肠癌患者组织标本进行目的基因 (PIK3R1 和 VEGFA)mRNA 相对表达量的分析。

1.3.1.1 实验试剂 mRNA 提取试剂使用 TaKaRa RNAiso Plus Reagent;RT-PCR 试剂使用 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 及 SYBR Premix Ex Taq(Tli RNaseH Plus)。以上试剂均购于大连宝生物公司。

1.3.1.2 主要仪器 使用 NanoDrop ND-1000 测定 RNA 在分光光度计 260 nm、280 nm 的吸收值,计算浓度并评估纯度。进行变性琼脂糖凝胶电泳,以检测 RNA 纯度及完整性。使用 TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (TaKaRa Code.TP600),进行 RT 反应;使用 TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Real Time System (TaKaRa Code.TP800)进行 PCR 反应。

1.3.1.3 实验方法 应用 SYBR Green I 荧光染料嵌合法,以 1 个患者的组织样本 Total RNA 反转录获得的 cDNA 作为标准品,分别对管家基因 (Actb)和目的基因 (PIK3R1, VEGFA)制作标准曲线;然后再分别对各样本的管家基因和目的基因进行定量实

验,通过管家基因的校正,对各样本中目的基因的相对表达量进行分析。

1.3.1.4 引物序列 见表 1。

1.3.2 免疫组化法 检测组织标本中 PI3K p85 α 和 VEGF 表达。

1.3.2.1 实验试剂 试剂鼠抗人 PI3K 单克隆抗体购自 SantaCruz 公司,鼠抗人 VEGF 单克隆抗体购自福州迈新生物公司,即用型二步法检测试剂盒和 DAB 酶底物显色试剂盒购自福州迈新生物公司。

1.3.2.2 实验方法 标本经 10%甲醛固定,石蜡包埋组织,以 4~5 μ m 厚度连续切片,常规脱蜡及水化,按即用型二步法检测试剂盒说明书进行抗体 PI3K 和 VEGF 免疫组织化学染色,用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.3.2.3 标准及判读 PI3K 和 VEGF 在光镜下有棕黄色颗粒反应出现在细胞膜、细胞浆中均为阳性反应细胞,高倍镜下阳性细胞数占视野 10%以下为阴性(-),高倍镜下阳性细胞数占视野 10%以上为有意义,计为阳性。10%~30%为(+),30%~50%为(++),>50%为(+++),(+~(+++)均表示为阳性。

1.4 统计学处理 采用 Excel 和 SPSS 13.0 软件对实验结果进行数据整理和统计,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并以配对 t 检验进行统计学分析,组间率的比较采用 χ^2 检验,两种蛋白表达量的相关性分析采用 Spearman 相关性分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化实验的结果 免疫组化检测结果显示,在 72 例大肠癌组织中,PI3K 和 VEGF 阳性细胞弥漫并多聚集成团(图 1,3),其阳性表达率分别为 80.6%(58/72)和 87.5%(63/72)。在 72 例癌旁正常黏膜组织中,PI3K 阳性细胞主要呈灶性分布于大肠黏膜腺体,腺体间的间质散在阳性,VEGF 阳性细胞除大肠黏膜腺体外,腺体间的间质和血管也可见散在阳性(图 2,4),PI3K 和 VEGF 阳性率分别为 18.1%(13/72)和 15.3%(11/72)。从整体看,大肠癌

表 1 RT-PCR 对应的引物及产物大小

引物	序列	长度(mer)	GC 百分含量(%)	产物长度(bp)
Actb-F	5'-TGGCAGCCAGCACAATGAA-3'	19	52.6	186
Actb-R	5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'	25	48.0	
PIK3R1-F	5'-CAGCAACCTGGCAGAATTACGA-3'	22	50.0	128
PIK3R1-R	5'-TGACAGGATTTGCTAAGTCCAGGAG-3'	25	48.0	
VEGFA-F	5'-GAGCCTTGCCTTGCTGCTCTA-3'	21	57.1	148
VEGFA-R	5'-CACCAGGGTCTCGATTGGATG-3'	21	57.1	

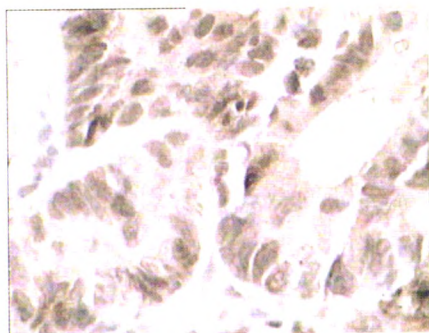


图 1 PI3K 在大肠癌组织的表达(x400)

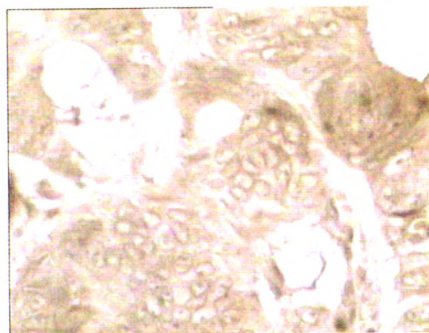


图 2 PI3K 在癌旁正常黏膜组织的表达(x400)

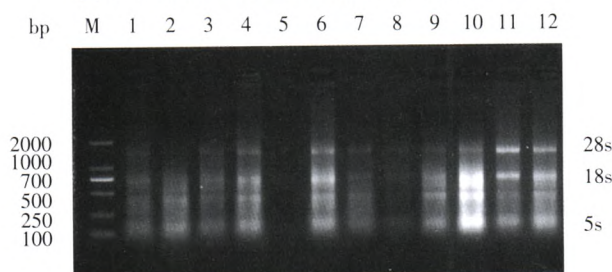


图 5 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

注:M 为 Marker 2000 bp;1~12 为患者样本

组织中 PI3K 和 VEGF 阳性反应强度和范围较癌旁正常黏膜组织明显增强,在大肠癌组织和癌旁正常黏膜组织中 PI3K ($\chi^2 = 60.66, P < 0.05$) 和 VEGF ($\chi^2 = 83.70, P < 0.05$) 的阳性表达率差异均有统计学意义,且两者的表达呈正相关($r = 0.872, P < 0.05$)。

2.2 RT-PCR 实验结果

2.2.1 Total RNA 质量确认 RNA 琼脂糖电泳结果显示, RNA 完整性较好; OD 检测结果显示, Total RNA 纯度较高, A260/A280 在 2.0 左右。见图 5。

2.2.2 目的基因检测结果比较 RT-PCR 统计结果显示, 大肠癌新鲜组织中的基因 PIK3R1 (变化倍数对数值 $1.78 \pm 0.57, t = -2.75, P < 0.05$) 和 VEGFA (变化倍数对数值 $3.79 \pm 1.56, t = -2.61, P < 0.05$) 的表达量均显著高于癌旁正常黏膜组织中的表达量, 且差异均具有统计学意义, 见图 6。

3 讨论

3.1 PI3K 在大肠癌组织中的表达及临床意义 PI3K 是一种可使肌醇环第 3 位羟基磷酸化的磷脂

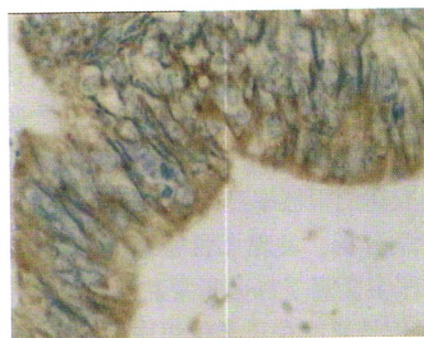


图 3 VEGF 在大肠癌组织的表达(x400)

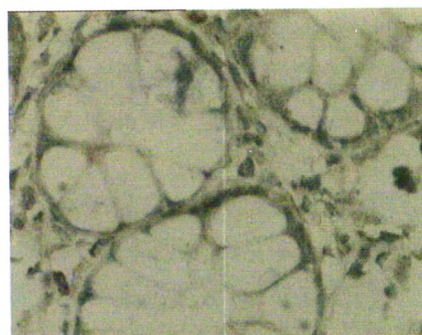


图 4 VEGF 在癌旁正常黏膜组织的表达(x400)

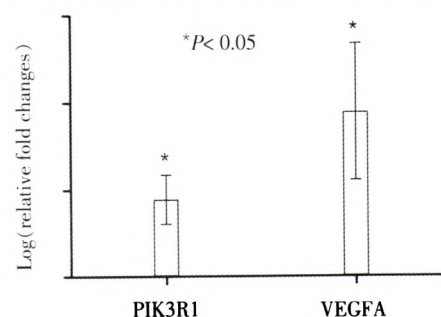


图 6 PIK3R1 和 VEGFA 基因表达水平的统计学分析

酰肌醇激酶。已发现 3 种 PI3K 同工酶, 其中研究最广泛的是能被细胞表面受体所激活的 I A 型 PI3K, 是由一个催化亚基 p110 和一个调节亚基 p85 组成的异源二聚体。PI3K 通过两种方式激活, 一种是与具有磷酸化酪氨酸残基的生长因子受体或连接蛋白相互作用, 引起二聚体构象改变而被激活; 另一种是通过 Ras 和 p110 直接结合导致 PI3K 的活化, 近来 PI3K 的催化亚基 p110 已经证实 32% 结肠癌中被激活^[1,4]。PI3K 激活的结果是在质膜上产生第二信使 PIP3, 通过 PIP3 与 Akt 的结合, PI3K 与 Akt 组成的 PI3K/Akt 信号通路在细胞的增殖和存活中起着重要的作用, 与肿瘤的发生发展密切相关^[4]。

研究表明: 在人类肿瘤中, PI3K/Akt 信号通路关键分子的编码基因在 DNA 水平上存在结构的变化, 如最初从人类肿瘤细胞分离到的调节亚基 p85 的突变体—截短的 p65-PI3K (缺乏 iSH2 结构域和 C 末端的 SH2 结构域), 能引起 PI3K 的组成性活化和细胞转化, 大肠癌和卵巢癌中 p85 α 基因在 iSH2

结构域的缺失和突变能导致 PI3K 的激活^[5,6]。本研究检测了大肠癌组织中 PI3K 的蛋白表达情况和基因表达水平,结果表明:PI3K 蛋白在大肠癌旁正常黏膜组织中呈局灶性低表达或阴性,而在大肠癌组织中表达的阳性率显著升高;通过基因表达水平的统计学分析,发现大肠癌组织中的 PIK3R1 基因表达水平显著高于癌旁正常黏膜组织。结果提示 PI3K/Akt 信号通路在正常组织中即存在,行使正常的信号转导功能,维持细胞增殖、分化、凋亡等生理过程,只是在某些因素的刺激下才被异常激活,PI3K/Akt 信号通路的异常活化可能在大肠癌发生发展过程中起关键作用。这与国外在人类大肠癌方面的研究^[7,8]发现相似。

3.2 VEGF 在大肠癌中的表达及临床意义 肿瘤组织的血管形成与肿瘤生长、浸润及转移密切相关,VEGF 是一种特异性的内皮细胞有丝分裂原,能促进内皮细胞增殖,诱导新生血管形成,在肿瘤的血管形成中起主要作用,也是最有效的促血管生长因子。

本研究检测了大肠癌组织中 VEGF 的蛋白表达情况和基因表达水平,结果表明:VEGF 蛋白在大肠癌旁正常黏膜组织中呈低水平表达或阴性,而在大肠癌组织中表达的阳性率显著升高,并且与 PI3K 蛋白的表达呈正相关;通过基因表达水平的统计学分析,发现大肠癌组织中的 VEGFA 基因表达水平显著高于癌旁正常黏膜组织。结果提示正常成人体内 VEGF 水平维持在一个较低水平,只有在生理需要或病理的情况下,如胚胎形成、骨骼生长等以及肿瘤形成的过程中出现 VEGF 的过度表达,促使血管生成急剧增加。现有研究^[9,10]表明,VEGF 通过选择性地与血管内皮细胞上高亲和力的受体酪氨酸激酶结合,使受体磷酸化而刺激内皮细胞迁移与增殖,其作用通过 PI3K/Akt 信号通路来实现,这可以很好的解释 VEGF 与 PI3K 表达正相关的结果。其作用机制可能是 VEGF 通过 PI3K 通路激活抗凋亡激酶 Akt/PKB 而发挥抗凋亡作用^[10]。

综上所述,本文研究结果表明在大肠癌组织中,PI3K 和 VEGF 表达水平均明显高于癌旁正常黏膜

组织,提示 PI3K 和 VEGF 在大肠癌的发生、发展过程中起重要作用。进一步扩大研究对象、采用多种标本类型及指标深入地研究 PI3K 和 VEGF 与大肠癌发生、发展的临床意义,将有助于寻找大肠癌早期诊断的敏感标志物,为进一步基因诊断和治疗提供分子依据。

4 参考文献

- 1 Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*, 2004, 304:554.
- 2 HASHMOTO I, KODAMA J, SEKIN et al. Vascular endothelial growth factor C expression and its relationship to pelvic lymph node status in invasive cervical cancer. *Br J Cancer*, 2001, 85:93-97.
- 3 Ferrar N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 2003, 9:669-676.
- 4 Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway. Its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*, 2004, 9:667-676.
- 5 Chang F, Lee JT, Navolanic PM, et al. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia*, 2003, 17:590-603.
- 6 Philp AJ, Campbell IG, Leet C, et al. The phosphatidylinositol3-kinase p85 alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors. *Cancer Res*, 2001, 61:7426-7429.
- 7 Colakoglu T, Yildirim S, Kayaselcuk F, et al. Clinicopathological significance of PTEN loss and the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in sporadic colorectal neoplasms is PTEN loss predictor of local recurrence. *Am J Surg*, 2008, 195:719-725.
- 8 Ollikainen M, Gylling A, Puputti M, et al. Patterns of PI3KCA alterations in familial colorectal and endometrial carcinoma. *Int J Cancer*, 2007, 121:915-920.
- 9 Li CY, Shan S, Huang Q, et al. Initial stage of tumor cell-induced angiogenesis: Evaluation via skin window chambers in rodent models. *Natl Cancer Inst*, 2000, 92:143-147.
- 10 Conde E, Angulo B, Tang M, et al. Molecular context of the EGFR mutations: evidence for the activation of mTOR/S6K signaling. *Clin Cancer Res*, 2006, 12:710-717.

(收稿日期:2013-07-31)

(本文编辑:张志成)

(上接第 155 页)

13 张化涛,张磊. 196 例呼吸道感染患儿血清中肺炎支原体抗体滴度测定及意义. *山东医药*, 2010, 50:66-68.

14 姚雯颖,赵军. 抗肺炎支原体抗体 IgM 检测的临床应用. *检验医学与临床*, 2009, 6:1679.

15 顾敏,刘佳强,蒋最明. 血清肺炎支原体抗体效价测定的临床应用.

国际医药卫生导报, 2009, 15:88-90.

16 刘引,王子才,方浩,等. 肺炎支原体 IgM 测定的临床意义. *临床儿科杂志*, 2005, 23:560-561.

(收稿日期:2013-07-31)

(本文编辑:陈淑莲)