

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2004)20-1887-03

前列腺癌组织中 PTEN 蛋白的表达及其与肿瘤细胞凋亡的关系

胡传义, 高吴阳, 洪林 (三峡大学仁和医院泌尿外科, 湖北宜昌 443001)

Expression of PTEN protein in tissues of prostatic carcinoma and its correlation with apoptosis of cancer cells

HU Chuan-Yi, GAO Wu-Yang, HONG Lin

Department of Urology, Renhe Hospital, Three Gorges University, Yichang 443001, China

【Abstract】 AIM: To investigate the expression of PTEN protein in tissues of prostatic carcinoma (Pca) and its correlation with the apoptosis of cancer cells. **METHODS:** Expression of PTEN protein and apoptotic index (AI) were detected by S-P immunohistochemical and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP biotin nick end labeling (TUNEL) technique in 42 cases of Pca and 10 cases of normal prostate (NP). The relationship between the PTEN gene deletion and AI in Pca was analyzed. **RESULTS:** All of the ten cases of NP were positive for PTEN protein. The overall deletion rate of PTEN gene in Pca was 64.3% and it was strongly associated with the degree of differentiation, clinical stage and lymph metastasis in Pca ($P < 0.05$), but it had no correlation with the age of patients. The PTEN gene deletion was negatively correlated with AI in Pca ($r = -0.746, P < 0.001$). **CONCLUSION:** There is a higher deletion rate of PTEN gene in Pca, which may play an important role in the genesis and development of some Pca and result in the reduction of cell apoptosis in Pca. Detection of PTEN protein and AI in Pca may be helpful to evaluate the degree of cell differentiation, decide on therapeutic strategies and deduce prognosis.

【Keywords】 PTEN protein; prostatic neoplasms; immunohistochemistry

【摘要】目的:探讨抑癌基因 PTEN 蛋白在前列腺癌(Pca)组织中的表达及其与肿瘤细胞凋亡的关系。方法:采用免疫组织化学 S-P 法和 DNA 原位末端标记 TUNEL 法分别测定 42 例 Pca 及 10 例正常前列腺组织(NP)中 PTEN 蛋白的表达和肿瘤细胞凋亡,并分析 PTEN 基因表达缺失与肿瘤细胞凋亡的关系。结果:NP 组织中 PTEN 蛋白全部阳性表达,而 Pca 中

PTEN 基因表达缺失率达 64.3%,且与肿瘤细胞分化程度、临床分期和有无淋巴结转移密切相关,PTEN 基因表达缺失与肿瘤细胞凋亡成负相关($r = -0.746, P < 0.001$)。结论:前列腺癌组织中 PTEN 表达缺失率较高,PTEN 基因失活在 Pca 的发生发展中起重要作用,且导致肿瘤细胞凋亡减少,联合检测 PTEN 蛋白和凋亡指数,有助于对肿瘤细胞的分化程度作出正确评价,以指导临床治疗及估计预后。

【关键词】 PTEN 蛋白;前列腺肿瘤;免疫组织化学

【中图分类号】 R737.25

【文献标识码】 A

0 引言

前列腺癌(prostatic carcinoma, Pca)高发于老年男性,是最多见的恶性肿瘤之一。p21, p53 及 p16 基因的异常表达与前列腺癌的发病密切相关^[1,2],表明 Pca 的发生是多基因调控的。PTEN(也称 MMAC1 或 TEPI)是 1997 年发现的一种抑癌基因,通过使 PIP3(3,4,5-三磷酸脂酰肌醇)去磷酸化,从而抑制细胞增殖、促进其凋亡。Li 等^[3]应用 RT-PCR-SSCP 方法检测多种肿瘤细胞系和移植瘤中 PTEN 基因的突变率,发现多形性胶质母细胞瘤为 31%,前列腺癌为 100%,乳腺癌为 6%,而原发性胶质母细胞瘤为 17%。研究表明 PTEN 基因突变在 Pca 的发生、发展和转移中起重要作用^[4]。为此,我们检测前列腺癌组织中 PTEN 蛋白的表达及肿瘤细胞的凋亡情况,探讨其临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料 1990/2002 我院 42 例开放性前列腺切除术的 Pca 石蜡包埋标本(年龄 49~73 岁,平均 61 岁)和 10 例正常前列腺(NP)标本(为尸体解剖标本,年龄 23~48 岁,平均 32 岁)均为 40 g/L 甲醛固定。所有患者术前均未接受任何治疗。以上标本全部经苏木精-伊红(HE)染色,病理诊断明确。Pca 参照 Gleason 的分级标准,按腺体分化程度将 Pca 分为:高分化腺癌 12 例、中分化腺癌 17 例、低分化腺癌 13 例。按 Whitmore-Jewett 的临床分期标准分为:A 期 8 例、B 期 15 例、C 期 11 例、D 期 8 例。有淋巴结转移 16 例。石蜡标本 4 μm 厚连续切片,分别行复查诊断、PTEN 蛋白免疫组化和细胞凋亡检测。

收稿日期 2004-02-10; 修回日期 2004-05-24

作者简介 胡传义(1971-),男(汉族),湖北省天门市人,硕士,讲师。

Tel. (0717)6557037 Email. huchuanyi2001@163.com

1.2 方法

1.2.1 免疫组化采用超高敏 S-P 法 一抗为鼠抗人 PTEN mAb(1:100),二抗为羊抗鼠 IgG,以上抗体及 S-P 试剂盒均购自福州迈新公司.石蜡切片脱蜡入水 30 mL/L H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶,高温高压修复抗原,小牛血清封闭 10 min,加一抗后 4℃ 过夜,生物素标记的二抗孵育 10 min,链酶亲和素-过氧化氢酶孵育 10 min,DAB 显色,苏木精复染,脱水封片.以该公司提供的良性前列腺增生组织片作为阳性对照,以 PBS 液代替一抗作为阴性对照.

1.2.2 细胞凋亡检测采用 DNA 原位末端标记 (TUNEL 法) TUNEL 试剂盒为德国宝灵曼公司产品,检测程序参照试剂盒说明书,方法简略为:常规脱蜡入水,20 mg/L 蛋白酶 K37℃ 消化 15 min,30 mL/L H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶 10 min,1:10 小牛血清封闭非特异性反应,滴加末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)反应液,室温孵育 60 min,DAB 显色.以乳腺癌标本作为阳性对照,以 PBS 液代替 TdT 反应液作为阴性对照.

1.2.3 结果判断 ① 染色程度:组织切片中胞质出现黄至棕黄色颗粒者为阳性细胞标志,将阳性细胞按其数量及显色程度分为 3 级:表达弱阳性(+),即阳性细胞数 <10%、显色强度为淡黄色或个别细胞呈黄至棕黄色;表达强阳性(++),即阳性细胞数 >60%、多数细胞呈黄至棕黄色.表达中度阳性(++),即阳性细胞数及显色强度介于弱阳性与强阳性之间.凡显色强度与背景无明显差异者为阴性.② 凋亡细胞计数:细胞核上有黄至棕色颗粒着色为阳性标志,光镜下随机观察 5~10 个视野,计数每高倍视野(×400)中平均阳性凋亡细胞数,其阳性细胞数的百分比为凋亡指数(apoptosis index, AI).

统计学处理:计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,计数资料采用 χ^2 检验.

2 结果

2.1 PTEN 蛋白在前列腺组织中的表达 组织切片中胞质出现黄至棕黄色颗粒者为阳性细胞标志.NP 组织中均有 PTEN 不同程度的表达(Fig 1),而 Pca 中 PTEN 基因表达缺失率为 64.3%,二者之间差异有极显著意义($P < 0.01$).Pca 组织中 PTEN 蛋白表达与不同临床病理特征关系见 Tab 1:肿瘤分级愈低、临床分期愈晚,PTEN 基因表达缺失率愈高,有淋巴结转移者显著高于无淋巴结转移者,而与患者年龄无关.

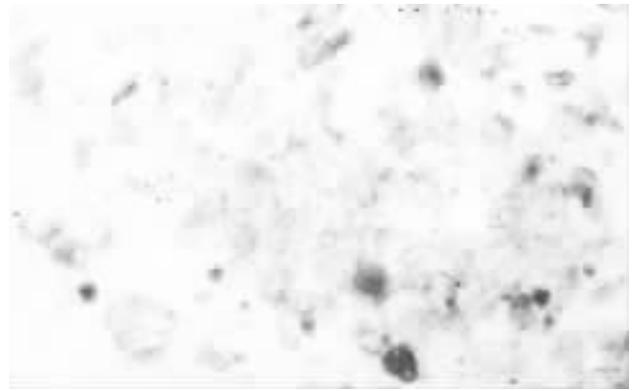


Fig 1 Expression of PTEN protein in prostatic carcinoma DAB ×400

图 1 前列腺癌组织 PTEN 蛋白的表达

表 1 PTEN 蛋白在前列腺组织中的表达及肿瘤细胞的凋亡
Tab 1 Expression of PTEN protein in the tissues of prostatic carcinoma and the apoptosis of cancer cells

Group	n	Negativity of PTEN protein		AI/%
		n	%	
NP	10	0	0 ^b	1.1 ± 0.8 ^b
Pca	42	27	64.3	3.0 ± 1.3
Pathological grade				
Low differentiation	13	6	46.2	3.9 ± 1.4
Middle differentiation	17	9	52.9	3.1 ± 1.2
High differentiation	12	12	100 ^d	2.0 ± 0.8 ^d
Clinical stage				
A-B	23	11	47.8 ^e	3.5 ± 1.4 ^f
C-D	19	16	84.2	2.4 ± 1.0
Lymphatic invasion				
Pos	16	14	87.5 ^g	2.3 ± 0.9 ^h
Neg	26	13	50.0	3.5 ± 1.3

^b $P < 0.01$ vs Pca; ^d $P < 0.01$ vs low or middle differentiation; ^e $P < 0.05$,

^f $P < 0.01$ vs C-D; ^g $P < 0.05$, ^h $P < 0.01$ vs Neg. Δ : G₁ vs G₂ + G₃; AI: Apoptosis index.

2.2 Pca 中细胞凋亡情况 凋亡细胞阳性定位于细胞核,在前列腺组织中散在分布(Fig 2).Pca 细胞凋亡情况见 Tab 1.Pca 组 AI 明显高于 NP 组,二者之间差异有显著意义($P < 0.05$);低分化组 AI 显著低于中、高分化组($P < 0.01$),而中、高分化组间差异无显著意义($P > 0.05$);有淋巴结转移组明显低于无淋巴结组($P < 0.001$).

2.3 PTEN 蛋白的表达与 AI 的相关性 统计分析表明 Pca 组织中 PTEN 基因表达缺失与 AI 呈负相关($r = -0.746$, $P < 0.001$).

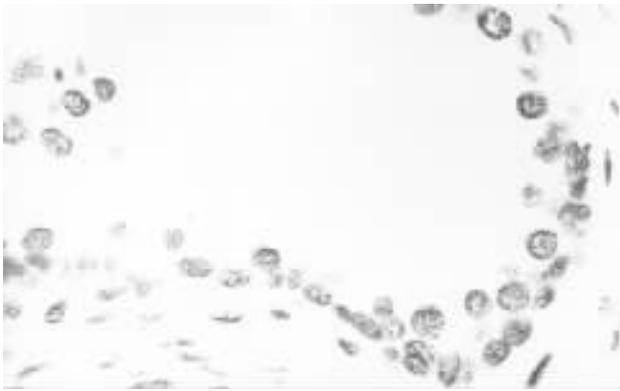


Fig 2 Apoptosis of cancer cells DAB $\times 400$

图2 前列腺癌组织细胞凋亡

3 讨论

3.1 PTEN 表达缺失与 Pca 的发生、发展 PTEN 是第一个具有磷酸酶活性的抑癌基因,定位于染色体 10q23.3,其蛋白产物最显著的特点是具有磷酸酪氨酸酶和双重特异性磷酸酶结构域,且与张力蛋白和辅助蛋白具有同源性^[3]。目前普遍认为 PTEN 的抑癌机制由以下 3 个途径共同完成:①通过使 PIP3(3,4,5-三磷酸脂酰肌醇)去磷酸化,从而抑制细胞增殖、促进细胞凋亡^[5];②通过对 FAK(聚集黏附激酶)的去磷酸化,从而抑制细胞转移、扩散^[6];③通过抑制 MAPK 细胞信号传导,使细胞生长、分化受抑制^[7]。PTEN 表达异常促进肿瘤细胞的生长、浸润和转移。本研究结果显示:42 例 Pca 中 27 例未观察到 PTEN 蛋白的表达,表达缺失率为 64.3%,而 10 例正常前列腺组织均可观察到不同程度的 PTEN 蛋白表达,临床分期愈晚、组织分化程度愈低,PTEN 蛋白的缺失率愈高,有淋巴结转移组明显高于无淋巴结转移组。McMenamin 等^[4]的研究表明,Pca 患者预后愈差、恶性程度愈高,其 PTEN 蛋白水平愈低,可以认为 PTEN 表达缺失是 Pca 不良预后的病理标志。提示 Pca 的发生、发展与 PTEN 基因表达产物缺失有关。

3.2 PTEN 表达缺失与肿瘤细胞凋亡的关系

PTEN 作为一种肿瘤抑制基因参与细胞凋亡调控,主要是依赖其脂质磷酸酶的活性而实现的。PIP3(3,4,5-三磷酸脂酰肌醇)是 PTEN 脂质磷酸酶作用的底物,一般情况下,PIP3 在细胞水平上很低,但一旦遇到生长因子的刺激,PIP3 的水平会迅速上升。PIP3 在细胞膜上的聚集也使丝氨酸/苏氨酸激酶 Akt(也称 PKB)被脱磷酸化而活化。活化的 Akt 通过 2 种方式起到抗细胞凋亡的作用,即阻止从线粒体释放细胞色素 C 和使 Forkhead 转录因子失活。Akt 还会使凋

亡因子 BAD 和 caspase-9 脱磷酸化而失活。Stambolic 等^[8]在体外实验中发现,纯化的 PTEN 能从 PIP3 上转移特异的磷酸基团,使 PIP2 向 PIP3 的转化发生逆转,从而抑制了 PIP3 激酶的磷酸化作用,阻断了 Akt 及其下游激酶的活性,引起细胞凋亡。而失去 PTEN 的作用会导致 PIP3 的聚集和 Akt 的高水平状态,从而导致细胞不受各种凋亡刺激的作用。杨波等^[9]将含 PTEN 的逆转录病毒载体载入前列腺癌细胞系 PC-3 后,细胞生长明显受到抑制,细胞周期由 G₁-S₀ 期受抑制,并出现一个小的凋亡峰。我们的研究发现,Pca 组织中 PTEN 基因表达缺失率与 AI 呈负相关($r = -0.746, P < 0.001$)。表明 PTEN 基因失活抑制了 Pca 肿瘤细胞的凋亡。

【参考文献】

- [1] 刘荣福,邵国兴,杨力军,等. 基因 p21、p53 在前列腺癌中的表达及相互关联[J]. 第四军医大学学报,1999,20(10):568-569. Liu RF, Shao GX, Yang LJ, et al. The expression and correlation between gene p21 and gene p53 in human prostate carcinoma specimens [J]. J Fourth Mil Med Univ, 1999, 20(10):568-569.
- [2] 刘荣福,邵国兴,王禾,等. 前列腺癌基因 p16 的表达与肿瘤生物学行为的关系[J]. 第四军医大学学报,1999,20(8):692-695. Liu RF, Shao GX, Wang H, et al. The relationship between the expression of tumor suppressor gene p16 and biological behaviors in prostate carcinoma [J]. J Fourth Mil Med Univ, 1999, 20(8):692-695.
- [3] Li J, Yen C, Liaw D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast and prostatic cancer [J]. Science, 1997, 275:1943-1947.
- [4] McMenamin ME, Soung P, Perera S, et al. Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high gleason score and advanced stage [J]. Cancer Res, 1999, 59(17):4291-4296.
- [5] Mshama T, Dixon JE. PTEN: A tumor suppressor that functions as a phospholipid phosphatase [J]. Trends Cell Biol, 1999, 9(4):125-128.
- [6] Tamura M, Gu J, Matsumoto K, et al. Inhibition of cell migration, spreading and focal adhesions by tumor suppressor PTEN [J]. Science, 1998, 280(5369):1614-1617.
- [7] Gu J, Tamura M, Yamada KM. Tumor suppressor PTEN inhibits integrin and growth factor-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathways [J]. J Cell Biol, 1998, 143(5):1375-1383.
- [8] Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, et al. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN [J]. Cell, 1998, 95(1):29-39.
- [9] 杨波,陈宝琦,王禾,等. 抑癌基因 PTEN 对人前列腺癌细胞系 PC-3 的作用[J]. 第四军医大学学报,2003,24(8):715-718. Yang B, Chen BQ, Wang H, et al. Effects of tumor suppressor gene PTEN on human prostate cancer PC-3 [J]. J Fourth Mil Med Univ, 2003, 24(8):715-718.