

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2009.12.013

血管内皮生长因子受体 3 与 PI3K/AKT 在胃癌组织中的表达及意义

苗莹莹¹, 朱正秋², 黄广清²

Expression and Significance of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 and PI3K/Akt in Gastric Carcinoma Tissue

MIAO Ying-ying¹, ZHU Zheng-qiu², HUANG Guang-qing²

1. Department of Graduate Faculty, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China; 2. Department of Oncology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College

Corresponding Author: ZHU Zheng-qiu, E-mail: 82880999zzq@sina.com

Abstract: Objective To examine the expression of the vascular endothelial growth factor receptor 3, phosphatidylinositol-3-kinase(PI3K) and protein kinase B (PKB or Akt) in gastric carcinoma and their adjacent normal tissues. **Methods** The mRNA expressions of VEGFR-3, PI3K and Akt in 36 cases of gastric carcinoma and their adjacent normal tissues were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The protein expressions of VEGFR-3, P-Akt in the same tissues were detected by immunohistochemical method. **Results** 1. RT-PCR the mRNA expression levels of VEGFR-3, PI3K and Akt in gastric carcinoma tissues were higher than those of the adjacent normal tissues ($P < 0.05$). VEGFR-3 mRNA expression was correlated with PI3K mRNA and Akt mRNA expression ($P < 0.05$). The mRNA expression level of VEGFR-3 was related TNM stage, depth of invasion, lymphnode metastasis and distant metastasis ($P < 0.05$). 2. Immunohistochemical the protein expression levels of VEGFR-3 and P-Akt in gastric carcinoma tissues were higher than those of the adjacent normal tissues ($P < 0.05$). VEGFR-3 protein expression was correlated with P-Akt protein expression ($P < 0.05$). **Conclusion** The tumors with VEGFR-3 expression are more likely to have lymphnode metastasis VEGFR-3 is an important predictor for the prognosis of gastric carcinoma. The expression of VEGFR-3 and PI3K/Akt have some relations.

Key words: Vascular endothelial growth factor receptor 3; Gastric carcinoma; Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K); Protein kinase B (Akt); Lymphnode metastasis

摘要:目的 观察血管内皮生长因子受体 3(VEGFR-3)和磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(PKB 或 Akt)在胃癌组织及相应癌旁组织中的表达情况。**方法** 采用 RT-PCR 法检测 36 例胃癌及相应癌旁对照组织中 VEGFR-3、PI3K、Akt mRNA 的表达;免疫组织化学法检测 VEGFR-3、P-Akt 蛋白的表达,并用图像分析方法测定平均吸光度值。**结果** 1. RT-PCR 胃癌组织中 VEGFR-3mRNA、PI3KmRNA、AktmRNA 与癌旁对照组织的表达水平相比,差异有统计学意义($P < 0.05$),且 VEGFR-3mRNA 与 PI3KmRNA、AktmRNA 表达呈正相关($P < 0.05$)。VEGFR-3 mRNA 表达与 TNM 分期、浸润深度、淋巴结转移与远处转移有关($P < 0.05$)。2. 免疫组织化学 VEGFR-3、P-Akt 蛋白在胃癌组织中的表达水平明显高于癌旁对照组织($P < 0.05$),且 VEGFR-3、P-Akt 蛋白表达水平呈正相关($P < 0.05$)。**结论** VEGFR-3 阳性表达的胃癌患者可能更易发生淋巴结转移,VEGFR-3 可作为评估患者预后的重要指标。VEGFR-3 与 PI3K/Akt 的表达具有一定的相关性。

关键词: 血管内皮生长因子受体 3; 胃癌; 磷脂酰肌醇-3-激酶; 蛋白激酶 B; 淋巴结转移

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2009)12-1039-05

收稿日期:2009-01-04;修回日期:2009-04-23

基金项目:徐州医学院资助课题(08KJ27)

作者单位:1. 221002 江苏徐州,徐州医学院研究生部;

2. 徐州医学院附属医院肿瘤内科

通信作者:朱正秋, E-mail: 82880999zzq@sina.com

作者简介:苗莹莹(1983-),女,硕士,住院医师,主要从事胃癌综合防治研究

0 引言

胃癌主要扩散形式是淋巴道转移,淋巴道转移是影响胃癌患者预后的一个重要因素,深入研究胃癌淋巴转移机制具有重要意义。血管内皮生长因子受体 3(VEGFR-3)是成熟淋巴管内皮细胞的特异

性标志物, VEGF-C、D/VEGFR-3 调控系统可能参与肿瘤间质淋巴管生成及淋巴道转移过程^[1]。但目前的研究对其具体调控机制尚不明确。PI3K/Akt 信号通路活性异常不仅能导致细胞恶性转化, 还与肿瘤细胞的侵袭转移行为相关。本研究检测胃癌组织及相应癌旁正常组织中 VEGFR-3、PI3K 及 Akt 的表达, 观察 VEGFR-3 和 PI3K/Akt 信号通路中关键酶相关性, 初步研究 VEGFR-3 在肿瘤淋巴转移过程中的调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本

收集徐州医学院附属医院普外科 2008 年 3 月~2008 年 7 月手术切除的 36 例胃癌组织及其癌旁正常组织(距离肿瘤组织 5 cm 以上)。36 例中男 27 例, 女 9 例; 年龄 42~72 岁, 平均 59 岁。术前均未行放疗或化疗。所有病例均经术后病理证实为胃癌, 相应癌旁组织均未见癌累及。肿瘤大小: ≥ 5 cm 16 例, < 5 cm 20 例; 分化程度: 中低分化 22 例, 高分化 14 例; 穿透浆膜(serous membrane, SM) 8 例, 未穿透浆膜层 28 例; 有淋巴结转移 19 例, 无淋巴结转移 17 例; 有远处转移 7 例, 无远处转移 29 例; TNM 分期: I、II 期 24 例, III、IV 期 12 例(分期标准参照 AJCC 肿瘤分期手册第六版胃癌部分)。肿瘤切除后立即无菌条件下切取肿瘤及距肿瘤 5 cm 以上的正常胃组织分别放入两个无核酶冻存管中, 做好标记放置于液氮中保存, 0.5 h 后转存至 -80°C 冰箱中备用。再切取 $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ 大小的标本分别放入两个装有多聚甲醛液体的广口瓶中。

1.1.2 主要试剂

兔抗人 VEGFR-3(flt-4)多克隆抗体购自福州迈新公司; 兔抗人 P-Akt (ser-473)单克隆抗体购自 cell signaling 公司; SP 法免疫组织化学试剂盒及浓缩型 DAB 染色试剂盒均购自北京中杉金桥公司; UNIQ-10 柱式总 RNA 抽提试剂盒为上海生物工程有限公司产品; 一步法 RT-PCR 试剂盒为杭州博日产品, Marker 为天根公司产品; PCR 引物、GAPDH 由 invitrogen 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 检测胃癌及正常胃组织 VEGFR-3, PI3K 及 AKT mRNA 的表达

采用离心柱法提取组织总 RNA, 用紫外分光光度仪检测其纯度, 电泳测其完整性。引物设计工具为 Primer 5。VEGFR-3 引物序列(545 bp): Upper 5'-CCG TTT GTG GAG GGA AAG AAT AAG-

3', Lower 5'-AAC CCA GGA GGT CGG TCA AGT-3'。PI3K 引物序列(377 bp): Upper 5'-CAT CAC TTC CTC CTG CTC TAT -3', Lower 5'-CAG TTG TTG GCA ATC TTC TTC- 3'。AKT 引物序列(312 bp): Upper 5'- GCG ACG TGG CTA TTG TGA- 3', Lower 5'- CAG TCT GGA TGG CGG TTG- 3'。GAPDH 引物序列(138 bp): Upper 5'- GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC- 3', Lower 5'- TGG TGA AGA CGC CAG TGG A- 3'。VEGFR-3、GAPDH 的 PCR 扩增反应条件为: 94°C 3 min 预变性后开始 32 个循环(94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 1 min), 最后于 72°C 延伸 7 min。PI3K、AKT 的 PCR 扩增反应条件为: 94°C 3 min 预变性后开始 30 个循环(94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 1 min), 最后于 72°C 延伸 7 min。PCR 反应以试剂盒提供的对照 RNA 样品及其特异性引物的扩增产物为阳性对照, 以反应系统中不加模板 RNA 的扩增产物为阴性对照, 以 GAPDH 为内参照。产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 与 marker 对比碱基对大小, 以出现明显与目的基因相同的条带为阳性。应用美国 Image J 图像分析系统计算每个样本扩增产物与 GAPDH 的灰度比值。

1.2.2 免疫组织化学 SP 法检测 VEGFR-3 及 P-Akt 的表达

标本用 10% 多聚甲醛固定, 梯度酒精脱水, 浸蜡包埋, $4\ \mu\text{m}$ 连续切片。切片二甲苯脱蜡, 梯度酒精脱水, 蒸馏水洗, 3% 过氧化氢孵育。抗原修复: 切片置于 0.01 mol/L , pH 6.2 枸橼酸盐缓冲液中, 微波炉高火 2 min, 低火 10 min, 室温冷却。10% 正常羊血清室温孵育后, 切片置于湿盒中, 滴加适当比例稀释的一抗, 4°C 冰箱过夜。PBS 洗后, 滴加二抗, 37°C 孵育 10 min, PBS 洗 3 次, 再滴加辣根酶标记链霉卵白素, 37°C 孵育 10 min, PBS 洗 3 次, DAB 显色, 显微镜下控制显色程度。蒸馏水洗, 苏木精复染, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 封片。PBS 代替一抗作为阴性对照。结果判定: VEGFR3 阳性细胞为胞质或者胞膜出现棕黄色颗粒者, P-Akt 阳性细胞为胞质或胞核出现棕黄色颗粒者。在显微镜下按统一放大倍数(10×40 倍)进行分析, 三名操作者独立将每张阳性切片按等距抽样原则随机摄取 5 个视野^[2]。图像采集后采用 Image Pro-Plus 6.3 分析软件(MediaCybernetics 公司), 参数设定: 选择文献中常用参数阳性面积(area)、平均吸光度(mean density)、累积吸光度(integrated optical density, IOD), 测定阳性物质平均 IOD 值。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计分析软件,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,样本均数之间比较采用 *t* 检验方法,相关性分析采用 Pearson 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VEGFR-3mRNA、PI3KmRNA、AktmRNA 在人胃癌和癌旁组织中的表达情况

2.1.1 RT-PCR 结果显示 VEGFR-3mRNA 在胃癌与癌旁组织中的表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 1a、表 1。VEGFR-3mRNA 在胃癌组织中的表达与胃癌 TNM 分期有关,分期越晚、浸润程度越深,其表达量越高 ($P < 0.05$);有淋巴结转移组显著高于无淋巴结转移组 ($P < 0.05$);有远处转移组表达量高于无转移组 ($P < 0.05$),但是 VEGFR-3mRNA 表达与肿瘤大小、分化程度无关 ($P > 0.05$),见表 2。

2.1.2 RT-PCR 结果显示 PI3KmRNA、AktmRNA 在胃癌组织中表达量显著高于癌旁组织, ($P < 0.05$),见图 1b、c、表 3。VEGFR-3mRNA 在胃癌组织中的表达分别与 PI3KmRNA、AktmRNA 的表达呈正相关 ($r = 0.58, P < 0.05; r = 0.52, P < 0.05$)。

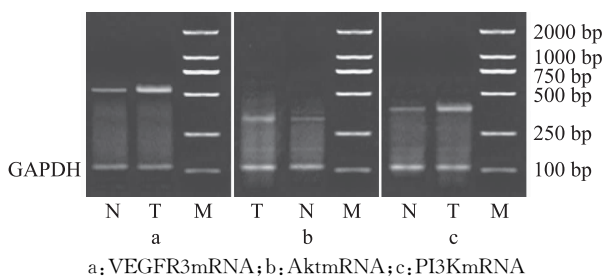


图 1 RT-PCR 检测胃癌及相应癌旁组织中 VEGFR3mRNA、AktmRNA、PI3KmRNA 的表达

Figure 1 Detection of the expression of VEGFR3mRNA, AktmRNA, PI3KmRNA in gastric carcinoma and adjacent normal tissues by RT-PCR

表 1 VEGFR3、PI3K、AktmRNA 在胃癌和癌旁对照组织中的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The expression level of VEGFR3mRNA, AktmRNA, PI3KmRNA in gastric carcinoma and adjacent normal tissues ($\bar{x} \pm s$)

Groups	VEGFR-3mRNA	PI3KmRNA	AktmRNA
Carcinoma tissues	1.03 ± 0.03	1.15 ± 0.12	1.13 ± 0.07
Normal tissues	0.63 ± 0.16	0.59 ± 0.25	0.63 ± 0.08
<i>P</i>	0.00	0.01	0.00

2.2 VEGFR-3、P-Akt 蛋白在人胃癌和癌旁组织中的表达情况

表 2 VEGFR-3mRNA 在胃癌组织中的表达与临床病理因素的关系 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The relationship of the expression level of VEGFR3mRNA and clinical pathologic factors ($\bar{x} \pm s$)

Clinical and pathological features	<i>n</i>	VEGFR3mRNA	<i>P</i>
Measurement			0.39
< 5 cm	20	1.05 ± 0.22	
≥ 5 cm	16	1.13 ± 0.31	
Differentiation			0.59
Well	14	1.06 ± 0.35	
Poor	22	1.11 ± 0.20	
Depth of invasion			0.00
< SM	28	1.02 ± 0.24	
≥ SM	8	1.32 ± 0.21	
Lymphnode metastasis			0.00
Non	17	0.96 ± 0.16	
Metastasis	19	1.20 ± 0.29	
Distant metastasis			0.00
Non	29	1.03 ± 0.26	
Metastasis	7	1.34 ± 0.07	
TNM stage			0.01
I, II	24	1.01 ± 0.27	
III, IV	12	1.24 ± 0.17	

免疫组织化学结果显示 VEGFR-3、P-Akt 在胃癌组织中表达量显著高于癌旁组织 ($P < 0.05$),见表 3。VEGFR-3 在胃癌组织中的表达与 P-Akt 的表达呈正相关 ($r = 0.59, P < 0.05$),见图 2。

表 3 VEGFR-3、P-Akt 在胃癌和癌旁对照组织中的表达 ($\bar{x} \pm s, \times 10^{-2}$)

Table 3 The expression level of VEGFR3, P-Akt in gastric carcinoma and adjacent normal tissues ($\bar{x} \pm s, \times 10^{-2}$)

	VEGFR-3	P-Akt
Carcinoma tissues	2.34 ± 4.96 *	10.79 ± 0.94 *
Normal tissues	0.40 ± 0.08	5.23 ± 3.09

Note: *: Compared with adjacent normal tissue group, $P < 0.05$

3 讨论

VEGFR-3 是血管内皮生长因子家族的第三个受体酪氨酸激酶,它广泛表达于胚胎发育期的血管内皮细胞,但在成人组织中仅限表达于淋巴管内皮细胞,是淋巴管内皮特异性标志。VEGFR-3 在许多恶性肿瘤中高表达,VEGFR-3 与 VEGF-C、VEGF-D 结合后,信号转导改变,诱导淋巴内皮细胞增殖、迁徙,诱导淋巴管新生,促进肿瘤细胞的侵袭和转移^[3-5]。研究表明 VEGFR-3 与其配体可以

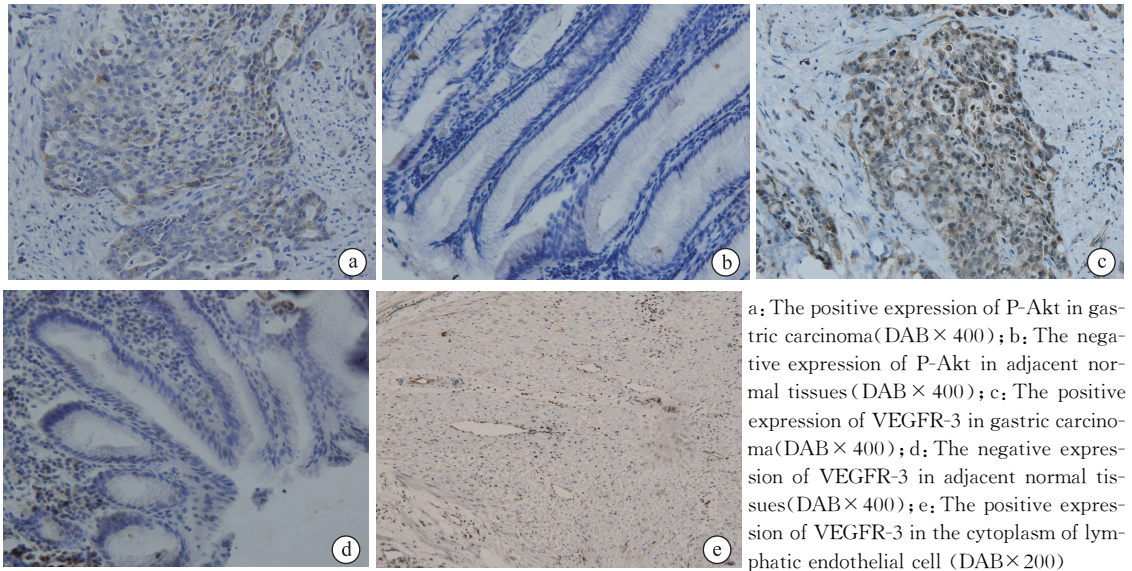


图 2 P-Akt 及 VEGFR-3 在胃癌及相应癌旁组织中的表达
 Figure 2 Detection of the expression of P-Akt and VEGFR-3 in gastric carcinoma and adjacent normal tissues by immunohistochemical method

相互作用,调节淋巴管内皮细胞的生长,促进增殖、抑制凋亡,从而具有更高的增殖活性及浸润性^[6]。Roberts 等^[7]的动物实验研究显示 VEGFR-3 可以介导乳腺癌的淋巴转移和肺转移,而通过对其抑制可以降低转移风险;Pytowski 等^[8]的研究提示 VEGFR-3 的中和抗体可以特异性的完全阻断成人淋巴管内皮细胞的再生。

本实验从基因和蛋白的水平分别揭示了 VEGFR-3 在胃癌组织中的表达显著高于癌旁正常组织,且表达水平与淋巴结转移、临床分期等因素有关,结果与 Yonemura 的研究结果一致^[9]。

与其他的受体酪氨酸激酶一样,VEGFR 在连接配体后也被二聚体化、自身磷酸化。磷酸化的酪氨酸残基可以控制激酶的活力,也可为胞质中的信号分子提供连接位置,这些信号分子或是一些衔接蛋白或是酶本身。Veikkola^[10]等指出在 VEGF 刺激下,血管内皮生长因子受体 2 即 KDR 迅速磷酸化,通过 PKC-MAPK 通路促进内皮细胞有丝分裂, KDR 磷酸化后还能激活 PI3K,后者进一步激活抗凋亡信号分子 PKB,从而在内皮细胞中转导生存信号,组织内皮细胞凋亡。相对于 KDR 而言,有关 VEGFR-3 的信号转导通路尚未明确。PI3K/Akt 信号通路具有调节细胞的增殖、存活和迁移等功能。近年来发现,这条通路的活性异常不仅能导致细胞恶性转化,还与肿瘤细胞的侵袭转移行为相关^[11]。而且这条通路还参与了 KDR 细胞内的信号转导过程,导致了肿瘤血管内皮细胞的增殖、迁移和存活。作为肿瘤细胞内重要的信号通路的 PI3K/Akt 是否

参与了胃癌的疾病进展过程,是否参与了 VEGFR-3 诱导的胃癌淋巴转移中的细胞内分子机制?它们之间的关系又如何呢?这是本实验研究的另一个重点。

本实验从基因和蛋白的水平揭示了 PI3K 及 Akt 在胃癌组织中的表达显著高于癌旁正常组织,相关性分析提示两者与 VEGFR-3 的表达具有相关性,提示胃癌发生发展过程中存在 Akt 的激活,促进了肿瘤细胞的生长增殖,抑制了细胞的凋亡,促进了侵袭和转移。VEGFR-3 与配体结合后可能上调了 PI3K 及 Akt 的表达,但这只能作为组织水平的实验证据,尚需细胞水平实验的佐证,此部分实验正在进行中。

综上所述,VEGFR-3 的阳性表达可作为预测胃癌淋巴转移的指标,抗 VEGFR-3 抗体有可能抑制胃癌新生淋巴管形成,阻止胃癌的淋巴结转移,针对 VEGFR-3 的基因治疗亦会成为胃癌治疗中的重要方法。PI3K/AKT 通路的针对性拮抗剂有可能成为胃癌治疗的靶点。VEGFR-3 的表达调控可能与 PI3K/AKT 信号途径相关,尤其与 Akt 磷酸化活性相关。但是仍需要大量的实验及研究进一步证明。

参考文献:

[1] Zeng Y,Opeskin K,Baldwin ME,et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 by lymphatic endothelial cells is associated with lymphnode metastasis in prostate cancer [J]. Clin Cancer Res. 2004,10(15):5137-5144.