

AKT2在非小细胞肺癌中的表达及预后意义

缪小辉 宋勇 吕锺烽 展平 吕艳玲 袁冬梅

【摘要】背景与目的 AKT2是PI3K信号传导通路中重要因子，AKT2激活导致细胞生长和生存，近年来，许多研究表明AKT2在肿瘤形成、生长及转移中起着重要作用。本研究通过检测肿瘤组织中AKT2的表达水平，旨在研究AKT2在非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer, NSCLC）中的表达及其与临床预后的关系。方法 通过免疫组化方法检测80例NSCLC及10例肺良性病变的组织标本中AKT2蛋白水平。结果 NSCLC中AKT2表达的阳性率为57.50%（46/80），明显高于肺良性病变组织（1/10, 10.0%）中的表达，具有统计学差异（ $\chi^2=8.038, P=0.006$ ）。AKT2表达与NSCLC患者临床病理特征无明显关系。AKT2表达与患者无进展生存期（ $\chi^2=12.671, P=0.005$ ）及总生存期（ $\chi^2=9.851, P=0.021$ ）有明显关系。结论 NSCLC中AKT2是患者预后不良的生物学标志。

【关键词】 肺肿瘤；人AKT2蛋白；预后

【中图分类号】 R734.2

Expression and Prognostic Value of AKT2 in Non-small Cell Lung Cancer

Xiaohui MIAO, Yong SONG, Tangfeng LV, Ping ZHAN, Yanling LV, Dongmei YUAN

Department of Respiratory Medicine, Jinling Hospital, Nanjing University School of Medicine, Nanjing 210002, China

Corresponding author: Yong SONG, E-mail: yong_song6310@yahoo.com

【Abstract】 Background and objective AKT2 is a critical actor in the PI3K signal transduction pathway. Activation of AKT2 can lead to cell growth and survival. It has been revealed that AKT2 play a central role in tumorigenesis, tumor growth as well as metastasis. The aim of this study is to investigate the association between AKT2 and the clinical outcome of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients by detecting its expression levels in the tumor tissue samples. **Methods** We developed an immunohistochemistry (IHC) assay to measure AKT2 protein levels in lung specimens from 80 cases with NSCLC and 10 cases with benign pulmonary disease. **Results** The positive rate of AKT2 was 57.50% (46/80) in NSCLC, which was higher than that in benign pulmonary (10.0%) samples ($\chi^2=8.038, P=0.006$). There was no significant correlation between AKT2 expression and the clinicopathologic profiles. The expression of AKT2 was significantly correlated with the progression free survival (PFS) ($\chi^2=12.671, P=0.005$) and the overall survival (OS) ($\chi^2=9.851, P=0.021$) of patients with NSCLC. **Conclusion** AKT2 may provide a prognostic bio-marker of NSCLC.

【Key words】 Lung neoplasms; Human AKT2 protein; Prognosis

AKT2是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的重要亚型之一，AKT2通过PI3K/AKT细胞信号通路，调控细胞增殖、分化及生存^[1]。大量证据^[2,3]表明，AKT2与肿瘤细胞增殖和转移过程密切相关，在多种肿瘤组织中都存在AKT2蛋白的过度表达。目前AKT2在肺癌中表达及与患者临床病理特征的关系已有相关研究^[4]，但与患者预后关系的临床报道很少。本研究采用免疫组化方法检测肺癌组织及肺良性病变组织中的AKT2水平，旨在分析AKT2表达及其与肺癌患者的临床特征及预后的关系。

作者单位：210002 南京，南京大学医学院临床学院，南京军区南京总医院呼吸内科（通讯作者：宋勇；E-mail: yong_song6310@yahoo.com）

1 材料与方法

1.1 标本 组织标本由南京胸科医院以及南京军区南京总医院提供，2001年1月-2003年12月收集的95例原发性非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer, NSCLC）以及10例对照组肺良性病变（1例肺结核、5例支气管扩张、3例肺大疱、1例炎性假瘤）的手术组织标本，其中15例失访，共80例纳入本研究，术前均未经放化疗。肿瘤组织学TNM分期基于2009版UICC分类法重新分期，包括42例腺癌和38例鳞癌。这项研究得到南京军区南京总医院伦理委员会同意。

1.2 方法 采用免疫组织化学染色方法（EnVision），按

常规程序脱蜡和复水。通过特定兔抗人AKT2单克隆抗体（Santa Cruz公司）（用PBS液稀释成1:100）孵化过夜。PBS液冲洗后，加入山羊抗兔二抗体（二步法抗兔/鼠通用型免疫组化试剂盒 丹麦Dako公司）孵化30 min。PBS液冲洗后，切片用DAB显色剂（北京中杉金桥公司）孵化30 min。用苏木素（北京中杉金桥公司）进行复染。梯度酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。AKT2细胞质染色结果按Remmele评分系统^[5]来计算，计算阳性细胞（显棕黄色）染色密度与百分率。随机选取5个高倍镜视野，每个视野计数100个细胞，计算阳性细胞数占总细胞数的百分比，取5个视野的算术平均值。根据显色细胞的比例计分：5个视野的显色癌细胞百分比的算术平均值<5%为（-），5%-25%为（+），25%-50%为（++），>50%为（+++）。超过5%为阳性，<25%（--）为低表达组，>25%（++-+++）为高表达组。

1.3 统计及分析 80例NSCLC患者从手术日期开始随访，至患者死亡结束，至2009年5月1日仍然生存及无疾病进展者以60个月计算。实验结果采用SPSS 17.0统计软件处理，采用 χ^2 检验及Fisher's精确概率检验、Kaplan-Meier生存分析， $P<0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 NSCLC及肺良性病变组织的AKT2表达（图1）免疫组化染色显示，AKT2定位于NSCLC和肺良性病变组织细胞质中，表达程度如肺良性病变（肺大疱）组织AKT2阴

性表达组（图1A），肺腺癌AKT2低表达组（图1B）及肺鳞癌AKT2高表达组（图1C）。

在80例NSCLC中，AKT2表达阳性为46例（阳性率为57.50%），对照组10例肺良性病变组织中，AKT2表达阳性为1例（阳性率为10.0%），两组存在统计学差异（ $\chi^2=8.038, P=0.006$ ）。

2.2 AKT2蛋白在NSCLC组织中的表达及其与临床特征的关系 由表1可见，AKT2表达与临床特征无明显相关性（ $P<0.05$ ）。

2.3 AKT2与NSCLC的无疾病进展生存期（progression-free survival, PFS）和总生存期（overall survival, OS）关系 至随访结束时，生存人数为28例，生存率为35.00%。无疾病进展生存人数为19例。肿瘤中AKT2阳性表达与患者的PFS及OS相关（PFS: $\chi^2=12.761, P=0.005$; OS: $\chi^2=9.851, P=0.021$ ）（表2）。

整体PFS中位时间为17个月（95%CI: 10.182-23.818），OS中位时间为35个月（95%CI: 20.975-49.025）。AKT2表达阴性组中，PFS中位时间为36个月（95%CI: 17.428-54.572），OS中位时间为45个月（95%CI: 38.078-51.040）；AKT2表达阳性组中，PFS中位时间为12个月（95%CI: 9.529-14.417），OS中位时间为22个月（95%CI: 16.308-27.692）。结果提示：AKT2阴性组的PFS和OS中位时间明显长于阳性组。AKT2表达阳性组PFS明显低于阴性组（ $\chi^2=9.893, P=0.002$ ，图2A），同样两组的OS存在明显差异（ $\chi^2=9.611, P=0.002$ ，图2B），AKT2阳性组预后明显差于阴性组。

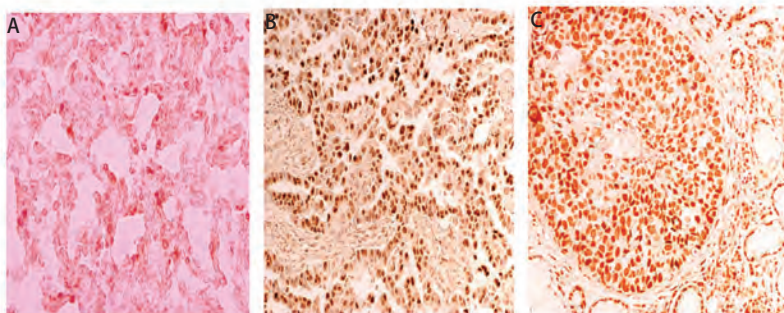


图1 AKT2在非小细胞肺癌以及良性病变组织中的表达（DAB, ×400）。A：AKT2在肺良性病变（肺大疱）组织中阴性表达；B：AKT2在肺腺癌组织中低表达；C：AKT2在肺鳞状细胞癌组织中高表达。

Fig 1 Expression of AKT2 in NSCLC and benign lung specimens (DAB, ×400). A: Negative expression of AKT2 in benign lung specimen (pulmonary bullae); B: Low-expression of AKT2 in adenocarcinoma; C: High-expression of AKT2 in squamous cell carcinoma.

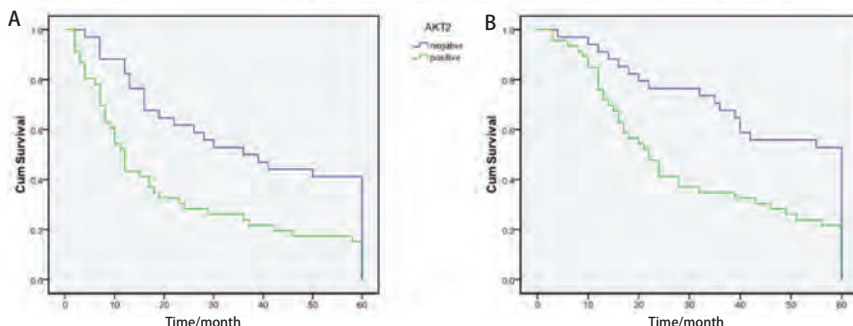


图2 AKT2表达与非小细胞肺癌患者无进展生存期（A）及总生存期（B）的Kaplan-Meier生存曲线

Fig 2 Kaplan-Meier survival curve of expression of AKT2 in 80 patients with NSCLC. Survival curves (PFS) are stratified by negative and positive AKT2 expression (A); Survival curves (OS) are stratified by negative and positive AKT2 expression (B).

表 1 AKT2表达与患者临床特征的关系

Tab 1 Relationship between the expression of AKT2 and characteristics of 80 patients with NSCLC

Characteristic	n	Expression of AKT2		χ^2	P
		Negative	Positive		
All patients	80	34	46		
Sex				2.417	0.120
Male	61	23	38		
Female	19	11	8		
Age (year)				1.666	0.197
<60	38	19	19		
≥60	42	15	27		
Smoking				2.035	0.154
Non-smoker	42	21	21		
Smoker	38	13	25		
Size of tumor				3.292	0.070
≤3 cm	18	11	7		
>3 cm	62	23	39		
Histology				0.948	0.330
Squamous cell carcinoma	38	14	24		
Adenocarcinoma	42	20	22		
N stage				0.718	0.397
N0	49	19	30		
N1+N2	31	15	16		
p-TNM stage				0.799	0.372
I+II	62	28	34		
III+IV	18	6	12		
Grade				0.389	0.533
Well/Moderate	51	23	28		
Poor	29	11	18		

表 2 AKT2表达与患者PFS及OS的关系

Tab 2 Relationship between the expression of AKT2 and PFS and OS of patients with NSCLC

Characteristic	n	Expression of AKT2		χ^2	P
		Negative	Positive		
All patients	80	34	46		
PFS (month)				12.761	0.005
≤6	11	1	10		
6-12	23	6	17		
12-24	13	7	6		
>24	33	20	13		
OS (month)				9.851	0.021
≤12	14	3	11		
12-36	27	8	19		
36-60	11	5	6		
>60	28	18	10		

3 讨论

肺癌是癌症相关死亡的首要原因，其发病率逐年上升，但目前仍然没有充分有效的治疗手段，5年生存率仅为15%左右。

AKT是一种丝氨酸/苏氨酸激酶，此酶有3种异构体，分别为AKT1、AKT2和AKT3，是PI3K信号传导通路下游因子^[6]。PI3K家族参与多种信号通路，调节细胞的主要功能。正常情况下，由其活化而产生的类脂产物3,4-二磷酸磷脂酰肌醇[PI(3,4)P₂]和3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇[PI(3,4,5)P₃]作为第二信使结合并激活多种细胞内的靶蛋白，形成一个信号级联复合物，最终调节细胞的增殖、分化、存活和迁移等。AKT在PI3K作用下发生磷酸化，磷酸化AKT水平增加可导致细胞生存通路PI3K/AKT的进一步活化，AKT主要介导体内PI3K依赖的细胞粘附、运动、侵袭和转移^[7]。AKT2是丝氨酸/苏氨酸激酶的重要亚型之一，调控细胞增殖、分化及生存^[1]。许多研究^[8,9]表明人类肿瘤组织中存在AKT2基因扩增和mRNA过表达，卵巢癌和胰腺癌中得到证实。AKT2已被认为是癌基因，PI3K/AKT成为抗凋亡的通路之一^[10]。AKT2与肿瘤细胞转移和增殖过程密切相关。

我们研究发现，NSCLC组织中AKT2表达阳性率明显高于肺良性病变组织，说明在肺癌组织中存在着AKT2的过度表达。刘红等^[11]研究报道的结果和本研究结果相似，他们同样运用免疫组化的方法检测NSCLC标本中AKT2表达阳性率增高。AKT2表达与NSCLC临床特征无相关性。

同时，本研究结果中，AKT2表达与NSCLC患者PFS及OS存在密切的相关性，AKT2阳性组的患者预后明显差于阴性组，提示AKT2在NSCLC的进展、转移中起着重要的作用，AKT2表达直接影响NSCLC患者预后，AKT2可作为NSCLC患者预后差的预测因子。

生物学标志物的不断发现，为NSCLC的诊断和治疗提供了重要线索。PI3K/AKT信号通路对于细胞增殖、分化和凋亡的调节起着重要的作用，目前对该信号通路在肿瘤侵袭转移中的作用机制已基本明确，以哌立福新(perifosine)为代表的脂类抑制剂是目前抑制AKT的抗肿瘤药物，对肺癌治疗效果的临床II期试验正在进行中^[12]。AKT2将有望成为肺癌治疗的新靶点，通过一些小分子抑制剂对AKT2选择性抑制将成为未来肺癌治疗的新途径^[13]。相信不久的将来，以PI3K/AKT通路为靶点的小分子药物将有望应用于肺癌的临床治疗中。

总之，我们通过免疫组化的方法检测NSCLC组织

及肺良性病变组织中AKT2蛋白的表达情况，分析发现AKT2蛋白的表达与患者临床特征及预后密切相关，对判断NSCLC患者预后具有重要意义。

参考文献

- Matsuda S, Mikami Y, Ohtani M, *et al.* Critical role of class IA PI3K for c-Rel expression in B lymphocytes. *Blood*, 2009, 113(5): 1037-1044.
- MS Kim, Jeong EG, Yoo NJ, *et al.* Mutational analysis of oncogenic AKT E17K mutation in common solid cancers and acute leukaemias. *Br J Cancer*, 2008, 98(9): 1533-1535.
- Tsurutani J, Fukuoka J, Tsurutani H, *et al.* Evaluation of two phosphorylation sites improves the prognostic significance of Akt activation in non-small-cell lung cancer tumors. *J Clin Oncol*, 2006, 24(2): 306-314.
- Wang J, Miao LJ, Wu YM, *et al.* Expression and relationship of phospho-AKT, CyclinD1 and MMP-9 in human non-small-cell lung cancer. *Aizheng*, 2006, 25(1): 69-72. [王静, 苗丽君, 吴逸明, 等. 非小细胞肺癌组织中AKT2、CyclinD1、MMP-9表达及其与临床病理因素的关系. *癌症*, 2006, 25(1): 69-72.]
- Remmele W, Schickelanz KH. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptor content in human breast cancer. Computer-assisted image analysis (QIC score) vs subjective grading (IRS). *Pathol Res Pract*, 1993, 189(8): 862-866.
- Wendel HG, De Stanchina E, Fridman JS, *et al.* Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. *Nature*, 2004, 428(6980): 332-337.
- Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 2007, 129(7): 1261-1274.
- Hui Xing. Fibronectin-mediated activation of Akt2 protects human ovarian and breast cancer cells from docetaxel-induced apoptosis via inhibition of the p38 pathway. *Apoptosis*, 2008, 13(2): 213-223.
- Wang J, Wan W, Sun R, *et al.* Reduction of Akt2 expression inhibits chemotaxis signal transduction in human breast cancer cells. *Cell Signal*, 2008, 20(6): 1025-1034.
- MacKeigan JP, Taxman DJ, Hunter D, *et al.* Inactivation of the antiapoptotic phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway by the combined treatment of taxol and mitogen-activated protein kinase kinase inhibition. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(7): 2091-2099.
- Liu H, Zhang ML, Wang J, *et al.* Expression of Akt2 and p2Akt in lung cancer tissue. *J Zhengzhou Univ (Med Sci)*, 2007, 42(4): 674-676. [刘红, 张茂林, 王静, 等. 肺癌组织中AKT2、p-AKT2蛋白的表达. *郑州大学学报(医学版)*, 2007, 42(4): 674-676.]
- Muñoz-Martínez F, Torres C, Castanys S, *et al.* CDC50A plays a key role in the uptake of the anticancer drug perifosine in human carcinoma cells. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80(6): 793-800.
- Zhao Z, Leister WH, Robinson RG, *et al.* Discovery of 2,3,5-trisubstituted pyridine derivatives as potent Akt1 and Akt2 dual inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, 15(4): 905-909.

(收稿: 2010-11-08 修回: 2010-12-21)

(本文编辑 丁燕)