

腺苷酸活化的蛋白激酶在食管鳞癌中的表达及其临床意义

赵颂媛, 张雪梅, 马洪升[△]

四川大学华西医院 消化内科(成都 610041)

【摘要】 目的 通过研究腺苷酸活化的蛋白激酶(AMPK)在食管鳞癌组织和正常食管组织中的表达和激活情况,探讨 AMPK 在食管癌发生中的意义。**方法** 应用免疫印迹(Western blot)方法检测 40 例食管鳞癌病例标本和对应的正常食管组织中 AMPK 下游底物乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)及 p-ACC 的表达,并分析其与临床病理参数之间的关系。**结果** 食管鳞癌组 p-ACC 蛋白的表达低于正常食管组织,差异有统计学意义($P<0.05$)。p-ACC 表达下调率在低分化鳞癌组是 81.8% (9/11),高于中高分化鳞癌组 3.5% (1/29),差异有统计学意义($\chi^2=22.11, P<0.05$)。统计分析表明,p-ACC 表达下调与食管癌患者的年龄、性别、TNM 分期及淋巴结转移无相关性($P>0.05$)。**结论** p-ACC 在食管鳞癌中的表达下调,并与食管癌的组织分化程度相关,提示 p-ACC 表达的下调可能与食管癌的发生、发展相关,这对评估食管癌生物学行为及为寻找食管癌新的治疗靶点有一定的指导作用。

【关键词】 腺苷酸活化的蛋白激酶 食管鳞癌 能量代谢

Expression and Its Clinical Significance of AMP-activated Protein Kinase in Esophageal Squamous Cell Carcinoma

ZHAO Song-yuan, ZHANG Xue-mei, MA Hong-sheng[△]. Department of Gastroenterology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: mahongsheng63@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression and its possible function of AMP-activated protein kinase (AMPK) in the occurrence of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **Methods** The tissue samples were collected from 40 fresh ESCC and 40 normal esophagus, and the expression of AMPK downstream substrates p-ACC and ACC were tested by Western-blot, then the correlations of p-ACC and ACC expression to the clinicopathologic characteristics were analyzed. **Results** The expression of p-ACC in ESCC was lower than that in normal tissues, with significant statistical difference ($P<0.05$). The down-regulation ratio of p-ACC in poorly-differentiated ESCC was 81.8% (9/11), which was significantly higher than that in moderately and well-differentiated ESCC (3.5%, 1/29). There was no correlation of p-ACC down-regulation with age, gender, TNM stage and lymph node metastasis ($P>0.05$). **Conclusion** The expression of p-ACC was down-regulation in ESCC, and the down-regulation is associated with tumor cell differentiation.

【Key words】 AMP-activated protein kinase (AMPK) Esophageal squamous cell carcinoma Energy metabolic

肿瘤的发生、发展是一个多步骤、多基因参与的、复杂的、系统性的过程,涉及一系列原癌基因异常的激活以及抑癌基因突变导致的失活,从而使肿瘤细胞表现出生长加快、恶性分裂、凋亡受阻、侵袭转移等异常现象。随着人们研究的不断扩展,人们又发现了肿瘤细胞区别于正常细胞的另一显著特征,即细胞能量异常^[1]。细胞能量代谢的改变受多种复杂因素的调控。腺苷酸活化的蛋白激酶^[2](AMP-activated protein kinase, AMPK)是进化过程中高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,主要调控

细胞内的代谢和能量平衡。AMPK 对细胞内 AMP/ATP 的比率敏感。任何导致 AMP 升高或者 ATP 降低的因素都可以激活 AMPK。活化的 AMPK 可作用于多种下游底物,抑制消耗 ATP 的合成代谢过程(如:蛋白质的合成,脂质合成,糖原合成等),启动生成 ATP 的分解代谢过程(如:脂肪酸氧化和糖酵解),维持机体能量代谢平衡。有研究表明^[3],AMPK 可以调控多种肿瘤细胞的生长及增殖。目前国内外关于 AMPK 和食管癌的关系了解不多,其表达对食管癌的影响尚不清楚。本研究应用免疫印迹法检测 AMPK 下游底物乙酰辅酶 A 羧化酶 (acetyl-CoA carboxylase, ACC) 及 p-ACC 在

[△] 通讯作者, E-mail: mahongsheng63@163.com

食管鳞癌 (ESCC) 组织中的表达状况,分析 AMPK 与食管鳞癌临床分期、病理分级、淋巴结转移等临床病理因素的关系,了解 AMPK 表达水平与食管鳞癌之间可能存在的关系。

1 材料及方法

1.1 标本及其来源

本实验标本来源于四川大学华西医院胸外科,2012 年 3~6 月经手术切除食管鳞癌患者组织标本 40 例;所有病例在术前均未接受任何辅助治疗(放疗、化疗及其他特殊治疗),术式均为食管癌根治术,病理诊断均由有经验的病理专家复核确诊;所有病例按 2009 年国际抗癌联盟(UICC)第七版 TNM 标准分级和分期;同时取 40 例正常食管黏膜组织标本为对照组,取自食管癌切除标本,距肿瘤边缘 > 5 cm,经病理确诊为正常食管黏膜。

40 例食管鳞癌标本中,其中男性 33 例,女性 7 例,<60 岁 14 例,≥60 岁 26 例,中位年龄 62 岁;分化程度包括高、中分化 29 例,低分化 11 例。21 例证明有淋巴结转移,19 例没有转移。按照 UICC 2009 年的食管癌分期临床分期标准:I~II 期 16 例,III~IV 期 24 例。

1.2 主要实验试剂

ACC 及 p-ACC 相关抗体购自 cell signaling 公司;DAB 显色试剂盒购自碧云天公司;其他试剂如乙醇等均为国产分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 总蛋白的提取 取标本,称重,每 100 mg 标本加 100 μL 裂解液,液氮研磨,玻璃匀浆器匀浆;标本置冰上裂解 5~10 min;10 000×g 离心,4 ℃,10 min,取上清液;取少量上清进行蛋白定量;剩余的蛋白缓慢冷却后分装,置于-70 ℃冰箱中保存备用。

1.3.2 蛋白浓度测定 按 BCA 蛋白质定量试剂盒操作说明操作,测定样品浓度。

1.3.3 变性聚丙烯酰胺不连续凝胶电泳 (SDS-PAGE) 灌制 10%分离胶和 5%积层胶,每孔上样 25 μg。电泳起始电压 80 V,待样品进入分离胶后调整电压为 100 V。待溴酚蓝抵达分离胶底部时停止电泳。

1.3.4 转膜 剪一张硝酸纤维素膜和 4 张吸附滤纸,其大小与凝胶相当。将凝胶、膜、滤纸和支持垫浸入转印缓冲液中使其完全浸泡。小心地将支持垫中的气泡排出。组装转印夹层组合:依次为支持垫、

2 张吸水纸、凝胶、膜、2 张吸水纸和支持垫。将组装好的夹层组合放入转印槽中,并使膜靠近正极(阳极,红色电极)。于 4 ℃条件下,100 V 电压转移 90 min。

1.3.5 封闭、洗膜和抗体的孵育 封闭液(溶于1×TBST 的 5%脱脂奶粉)4 ℃,摇床封闭 2 h;TBST 室温下充分清洗膜 15 min×4 次;兔抗人 ACC 1 : 800、兔抗人 p-ACC 1 : 800、兔抗人 β-actin 1 : 1 000 滴度 4 ℃孵育过夜;TBST 室温下充分清洗膜 15 min×4 次;1 : 5 000 滴度抗兔 IgG 室温孵育 2 h;TBST 室温下充分清洗膜 15 min×4 次。

1.3.6 Western blot 结果检测 将 ECL 显影液 A 和 B 等体积混合,混合液均匀撒在膜上,曝光。Western blot 数据结果采用 Biorad Quantity one 4.5.0 软件进行分析,以同一管中的目的蛋白和对应的内参 β-actin 条带的灰度比值作为目的蛋白相对表达量。

1.4 统计学方法

数据统计结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用 χ^2 检验和配对 t 检验进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ACC 在 ESCC 和正常食管组织中的表达

40 例 ESCC 标本的 Western blot 结果表明,食管癌与癌旁正常食管组织中 ACC 和 β-actin 产物条带光密度之比分别为 0.690 ± 0.255 和 0.630 ± 0.113 。配对 t 检验证实 ACC 蛋白在食管癌组织中与正常食管组织中的表达比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)(图 1)。

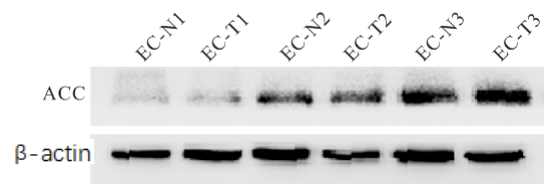


图 1 Western blot 检测 ESCC 和正常食管组织 ACC 表达

Fig 1 The expression of ACC in ESCC and histologically normal tissues were test by Western blot

EC: Esophageal squamous cell carcinoma; N1-N3: Normal tissues; T1-T3: Tumor tissues

2.2 p-ACC 在 ESCC 和正常食管组织中的表达

40 例 ESCC 标本的 Western blot 结果表明,癌与癌旁正常食管组织 p-ACC 和 β-actin 产物条带光密度值之比分别为 0.523 ± 0.167 和 0.655 ± 0.175 。配对 t 检验证实 p-ACC 蛋白在人 ESCC 组

织中表达下调,与正常食管组织中的表达比较,差异有统计学意义($t=3.066,P<0.05$)(图 2)。

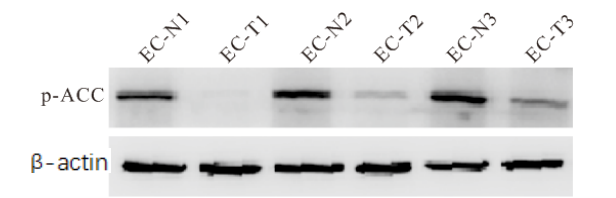


图 2 Western blot 检测 ESCC 和正常食管组织 p-ACC 表达
Fig 2 The expression of p-ACC in ESCC and histologically normal tissues were test by Western blot

2.3 p-ACC 蛋白的表达与食管癌组织临床病理参数的关系

40 例 ESCC 标本中,其中 10 例(25%)癌组织中 p-ACC 的表达低于相应的正常组织,另 30 例(75%)癌组织中 p-ACC 的表达等于或稍高于其在正常组织中的表达。p-ACC 表达与食管癌患者性别、年龄、分期及淋巴结转移无关($P>0.05$);p-ACC 表达下调率在低分化鳞癌组是 81.8% (9/11),高于中高分化鳞癌组 3.5% (1/29),差异有统计学意义($\chi^2=22.11,P<0.05$)(附表)。

附表 p-ACC 与食管癌临床病理参数的关系					
Table The relationship with esophageal cancer clinical pathological parameters					
Clinicopathologic characteristics	The expression of p-ACC		The down-regulation ratio of p-ACC (%)	χ^2	P
	Down-regulation	Expression of normal or slightly elevated			
Gender				0.068	$P>0.05$
Male	8	25	24.24		
Female	2	5	28.57		
Age (yr.)				0.147	$P>0.05$
<60	3	11	21.43		
≥60	7	19	26.92		
TNM stage				0.139	$P>0.05$
I - II	3	13	18.75		
III - IV	7	17	29.17		
Lymph node metastasis				0.033	$P>0.05$
With lymph node metastasis	5	16	23.81		
Without lymph node metastasis	5	14	26.32		
Tissue differentiation degree				22.11	$P<0.05$
Moderately and well-differentiated	1	28	3.45		
Poorly-differentiated	9	2	81.81		

3 讨论

食管癌是人类九种最常见的恶性肿瘤之一,全世界每年新增病例 30 万,其中 70% 的病例发生在我国。鳞状细胞癌是我国食管癌的主要病理类型,并且其发病率仍呈上升趋势。食管癌是高致死性的疾病,尽管目前以手术为主,包括放化疗在内的治疗方案已经比较成熟,但其预后仍较差,术后 5 年生存率仅 20%~30%。

AMPK 广泛存在于真核细胞生物中,是进化中高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。AMPK 最初是作为脂肪代谢和胆固醇合成过程中两种关键酶 ACC 和 3-羟基-3 甲基辅酶 A 还原酶的上游调节因子被发现的。因其可以被 AMP 变构激活,故在 1987 年将其命名为 AMPK^[4]。AMPK 是由 α 、 β 和 γ 亚单位组成的异源三聚体,每个亚单位又可分为不同的亚型,分别为: $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 和 $\gamma 3$,不

同的亚单位自由排列组合可以形成多种不同的 AMPK 三聚体^[5,6]。

AMPK 作为细胞内的能量感受器,在细胞的生长调控中起着至关重要的作用。AMPK 通过多种方式调节细胞生长和增殖,在人类代谢性疾病和肿瘤疾病中发挥着重要作用^[7]。人们也在许多肿瘤细胞的体外实验中,发现了 AMPK 激活剂抗肿瘤细胞增殖的作用。Woodard 等^[8,9]在肾细胞癌(RCC)中应用 AMPK 激活剂二甲双胍或 AICAR,发现 mTOR 的活性降低,进一步的研究表明,二甲双胍或 AICAR 可以使他汀类药物对 RCC 细胞的细胞毒性作用明显增强,起到一定程度的化疗增敏作用。Hadad 等^[10]发现,乳腺癌中 AMPK 的低表达与其组织学分级和淋巴结转移密切相关。已有学者在乳腺癌的体外实验中证实,应用二甲双胍激活 AMPK 后,可以抑制 mTOR 信号级联通路,进而抑制乳腺癌细胞的增生,进一步的研究表明,当用 RNA 干扰

技术沉默 AMPK 的表达后,可以削弱二甲双胍对乳腺癌细胞的抑制作用^[11]。越来越多的研究表明,AMPK 有可能为肿瘤的基因治疗、抗肿瘤药物的开发提供新的作用靶点。同时人们也发现,在肿瘤形成的特异性阶段,激活 AMPK 可能会对肿瘤细胞起到保护作用。因为在能量缺失的情况下,活化的 AMPK 会给肿瘤细胞提供适宜的生长条件,保护细胞逃避凋亡^[12]。在肿瘤形成的不同阶段,AMPK 的活化可能在其中扮演不同的角色。目前 AMPK 在肿瘤中的的作用机制还尚未完全明确,我们需要更多的实验研究来帮助深入的了解 AMPK 在肿瘤形成中的调节机制。ACC 是 AMPK 典型的下游直接底物,AMPK 使 ACC 磷酸化,从而抑制 ACC 酶活性,检测细胞内 p-ACC 含量变化可反映 AMPK 活力。本研究通过检测 ACC 来间接反映 AMPK 在 ESCC 中的表达及活化情况,研究结果表明,ACC 蛋白在 ESCC 中与正常食管组织中的表达比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。p-ACC 蛋白在人 ESCC 组织中表达下调,与正常食管组织中的表达比较,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。40 例 ESCC 标本中,其中 10 例 (25%)癌组织中 p-ACC 的表达低于相应的正常组织,另 30 例 (75%)癌组织中 p-ACC 的表达等于或稍高于其在正常组织中的表达。p-ACC 表达与食管癌患者性别、年龄、分期及淋巴结转移无关 ($P>0.05$);p-ACC 表达下调率在低分化鳞癌组是 81.8% (9/11),高于中高分化鳞癌组 3.5% (1/29),差异有统计学意义 ($\chi^2=22.11, P<0.05$)。

综上所述,AMPK 表达与食管癌存在密切关联,检测其在食管癌组织或食管癌细胞中的表达,可为食管癌的分期、病理分型、诊断提供参考指标。但能否成为食管癌治疗新的分子靶点有待于进一步的研究。

参 考 文 献

1 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next

generation. *Cell*,2001;144(5):646-674.

2 Mitchelhill KI, Stapleton D, Gao G, *et al.* Mammalian AMP-activated protein kinase shares structural and functional homology with the catalytic domain of yeast Snf1 protein kinase. *J Biol Chem*,1994;269(4):2361-2364.

3 Viollet B, Horman S, Leclerc J, *et al.* AMPK inhibition in health and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol*,2010;45(4):276-295.

4 Carling D,Zammit VA,Hardie DG. A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatoryenzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett*,1987;223(2):217-222.

5 Mitchelhill KI, Stapleton D, Gao G, *et al.* Mammalian AMP-activated protein kinase shares structural and functional homology with the catalytic domain of yeast Snf1 protein kinase. *J Biol Chem*,1994;269(4):2361-2364.

6 Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases; conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol*,2007;8(10):774-785.

7 Wang W,Guan KL. AMP-activated protein kinase and cancer. *Acta Physiol (Oxf)*,2009;196(1):55-63.

8 Woodard J, Joshi S, Viollet B, *et al.* AMPK as a therapeutic target in renal cell carcinoma. *Cancer Biol Ther*,2010;10(11):1168-1177.

9 Woodard J, Sassano A, Hay N, *et al.* Statin-dependent suppression of the Akt/mammalian target of rapamycin signaling cascade and programmed cell death 4 up-regulation in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*,2008;14(14):4640-4649.

10 Hadad SM, Baker L, Quinlan PR, *et al.* Histological evaluation of AMPK signalling in primary breast cancer. *BMC Cancer*,2009;9:307. doi:10.1186/1471-2407-9-307.

11 ZakikhaniM, Dowling R, Fantus IG, *et al.* Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Res*,2006;66(21):10269-10273.

12 Kato K, Ogura T, Kishimoto A, *et al.* Critical roles of AMP-activated protein kinase in constitutive tolerance of cancer cells to nutrient deprivation and tumor formation. *Oncogene*,2002;21(39):6082-6090.

(2012-11-28 收稿,2013-03-07 修回)

编辑 汤 洁