

PP2Ac 在人不同类型肺癌组织和肺癌细胞中的表达

李彩霞¹⁾, 张林²⁾, 白鹏³⁾, 王秦秦¹⁾

(1) 昆明医学院第一附属医院临床实验研究中心, 云南昆明 650031; 2) 昆明医学院第一附属医院病理科; 3) 南通大学附属医院神经外科, 江苏南通 226001)

[摘要] **目的** 研究 PP2Ac 在人不同类型肺癌组织和肺癌细胞中的表达. **方法** 用免疫组化方法从组织水平上观测临床获取人不同类型肺癌标本组织的 PP2Ac 蛋白表达; 用 Western blot 分子生物学方法从细胞水平上测定两种人肺癌细胞株 (YTLMC-90 和 GLC-82) 的 PP2Ac 和 p-AKT 蛋白表达. **结果** 免疫组化结果显示: 在人肺鳞癌、腺癌和小细胞肺癌三种肺癌组织中的 PP2Ac 蛋白表达与肺癌患者的性别、年龄和肿瘤分化程度均无明显相关性 ($P > 0.05$); 在人肺鳞癌组织和小细胞肺癌组织细胞浆中均未见有 PP2Ac 蛋白表达, 但在其间质有阳性表达; 在人肺腺癌组织中 PP2Ac 蛋白呈阴性表达, 而 p-AKT 蛋白却呈现强阳性表达. Western blot 结果表明: 在人正常肺组织细胞中 PP2Ac 蛋白呈正常表达; YTLMC-90 细胞中 PP2Ac 蛋白较人正常肺组织表达稍弱, 而在 GLC-82 细胞中表达明显减弱, 甚至缺失; 在人正常肺组织细胞中 p-AKT 蛋白呈低表达, 给予 GLC-82 细胞加入 PP2A 抑制剂 OA (岗田酸), 在 6 h、12 h、24 h 的不同时间点, p-AKT 蛋白的表达均较未加 OA 组明显增强, PP2Ac 和 p-AKT 蛋白表达呈反相关. **结论** PP2Ac 可能参与肺癌的发生, 其表达水平可能与肺癌细胞病理类型有关. AKT 的活化 (p-AKT) 可能与肺癌的发生发展密切相关.

[关键词] PP2Ac; 人肺癌; p-AKT; 细胞株

[中图分类号] R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2007) 06-0068-05

The Expression of PP2Ac in Various Kinds of Lung Carcinomatous tissue and Lung Carcinomatous cells

LI Cai-xia¹⁾, ZHANG ling²⁾, BAI Peng³⁾, WANG Qin-qin¹⁾

(1) Clinical Medicine Research Center of, 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650031; 2) Dept. of Pathology, 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical College; 3) Dept. of Neurosurgery, The Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China)

[Abstract] **Objective** To research the expression of PP2Ac in various kinds of human Lung carcinomatous tissue and two kinds of lung carcinomatous cells (YTLMC-90 and GLC-82). **Methods** Immunohistochemical technique analysed the difference expression of PP2Ac protein in collected paraffin-embedded human lung carcinomatous tissue. Western blot technique analysed the expression of PP2Ac and p-AKT protein in two kinds of lung carcinomatous cells, YTLMC-90 and GLC-82. **Results** Immunohistochemical analysis showed that the expression of PP2Ac in various kinds of Lung carcinomatous tissue wasn't related to sex, age, differentiation degree ($P > 0.05$), that there was negative expression of PP2Ac protein in the cytoplasm of the human lung squamous cancer and small cell lung cancer while positive expression of PP2Ac protein in intercellular substance, and that there were negative expression of PP2A in human lung adenocarcinoma and overexpression of p-AKT protein in human lung adenocarcinoma. Western blot technique

[作者简介] 李彩霞 (1976~), 女, 山东省临沂市人, 在读硕士研究生, 主治医师, 主要从事肿瘤内科临床研究工作.

[通讯作者] 王秦秦. E-mail: qqw@vip.163.com

analysis showed that there was normal expression of PP2A protein in normal human lung tissue, and lower expression in YTLMC-90 cell than in normal human lung tissue. While sharp low expression GLC-82 cell. Adding okadaic acid (OA), an inhibitor of PP2A, the expression of p-AKT in GLC-82 cells was sharply higher than in normal lung tissue at 6 h, 12 h and 24 h, indicating that inverse correlation between PP2A and p-AKT protein expression. **Conclusions** PP2A is involved in human lung carcinomas, its expression level is related to histological type of human lung cancer. Activation of AKT (p-AKT) is related tightly to human lung cancer.

[**Key words**] PP2Ac; Lung neoplasms; p-AKT; Cell line

肺癌是一种常见的呼吸系统恶性肿瘤,也是当前世界上最常见的人类肿瘤之一,严重威胁着人类的健康和生命.肺癌已成为我国第一大癌症,且发病率及死亡率增长最为迅速.我省宣威和个旧为肺癌高发区,其发病机制尚不清楚.因此开展肺癌的研究对我省防治肺肿瘤具有重要的临床价值和意义.

蛋白磷酸酶 2A (protein phosphatase 2A, PP2A) 是由一个核心酶和一个调节亚基构成的复合物,是广泛存在于真核生物体内的丝/苏氨酸蛋白磷酸酶.大多数的研究表明 PP2A 具有抑癌作用,在许多人类癌细胞内均已发现了 PP2A 的基因突变或 PP2A 调节功能的改变,因而 PP2A 被认为是一个潜在的抑癌基因^[1,2].然而,目前有关 PP2Ac 在人不同类型肺癌组织中的表达的相关研究国内尚未有报道,因此本研究用免疫组化方法从组织水平上观测临床获取不同类型肺癌标本组织 PP2Ac 蛋白表达;用 Western blot 分子生物学方法从细胞水平上测定人肺癌细胞株 PP2Ac 蛋白的表达,为阐明 PP2Ac 在人肺癌发生中的作用及其治疗提供理论和实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料

人不同类型肺癌组织和人正常肺组织标本:选取昆明医学院第一附属医院胸外科 2004 年 1 月至 2007 年 3 月住院肺癌患者手术切除组织标本 50 例.其中男 27 例,女 23 例,年龄 34 岁至 72 岁,平均年龄 (49.2 ± 6.7) 岁,均经病理科确诊,鳞癌 24 例,其中,高分化鳞癌 4 例,中分化鳞癌 6 例,低分化鳞癌 14 例;腺癌 19 例,其中,高中分化腺癌 13 例,低分化腺癌 6 例.小细胞肺癌 7 例,均为中低分化.临床分期,依据 1997 年

国际抗癌联盟 (UICC) TNM 分期标准^[3].所有患者术前均未接受化疗、放疗和其他治疗.

细胞株:云南锡矿工肺鳞癌 YTLMC-90 细胞和宣威腺癌 GLC-82 细胞由本实验中心建株.

各种试剂与仪器:RPMI1640 (Invitrogen 公司);新生牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司);辣根酶标羊抗兔 IgG2HRP 及蛋白质 marker (北京中衫金桥生物技术有限公司);兔抗人 PP2A (FC-309) (Santa cruz 公司);兔抗人 p-AKT 多克隆抗体 (碧云天生物公司);ECL 试剂盒 (SIGMA 公司);SP 免疫组化试剂盒及相关试剂 (福州迈新公司);微型胶垂直电泳仪、电泳电源供应仪及半干系统电转仪 (Amersham Pharmacia biotech 公司).

1.2 方法

1.1.2 人不同类型肺癌组织标本中的 PP2Ac 的表达测定

应用免疫组化染色法 (SP 法) 测定人不同类型肺癌标本组织中的 PP2Ac 的表达.光学显微镜下随机选取 5 个视野,每个视野记数 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.① 根据显色细胞的比例计分:0 分 (显色癌细胞为 0 %);1 分 (显色细胞 <10 %);2 分 (显色细胞 10 % ~ 50 %);3 分 (显色细胞 51 % ~ 80 %);4 分 (显色细胞 >80 %).② 根据细胞染色强度计分:0 分 (癌细胞无显色);1 分 (浅黄色);2 分 (棕黄色);3 分 (黄褐色).积分 = 染色强度 × 阳性细胞数,积分范围 0 ~ 12 分,≥4 分定义为阳性表达.

1.2.2 细胞株的培养

复苏冻存的 YTLMC-90 细胞和 GLC-82 细胞,待细胞生长至达培养瓶底表面积的 2/3 时传代培养,用于 Western blot 测定.

1.2.3 YTLMC-90 细胞和 GLC-82 细胞中的

PP2Ac 和 p-AKT 蛋白表达水平的测定

分别收集培养的肺腺癌 GLC-82、鳞癌 YTLMC-90 细胞,常规处理样品;取正常人肺组织超声破碎,制备样品.各样品用于 Westernblot 测定 PP2Ac 蛋白表达.

将 GLC-82 细胞以 4×10^5 每孔接种于 24 孔板,实验分 2 组:PP2A 抑制剂 OA 组,加入 20 nmol/L PP2A 的抑制剂 OA;未加 PP2A 抑制剂 OA 组,加入等量 PBS 液.应用 Westernblot 方法分别于 6 h、12 h 和 24 h 测定 p-AKT 和 T-AKT 蛋白在 GLC-82 细胞中的表达.

1.2.4 统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件进行统计学分析.免疫组化法部分:资料结果进行 χ^2 检验、Spearman 等级相关分析. $P < 0.05$ 判定为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 PP2Ac 蛋白在人不同类型肺癌组织中的表达

免疫组化结果分析显示:在人肺鳞癌、腺癌和小细胞肺癌三种肺癌标本组织中的 PP2Ac 蛋白表达与肺癌患者的性别、年龄和肿瘤分化程度均无明显相关性 ($P > 0.05$).

2.2 PP2Ac 蛋白在人肺鳞癌组织和小细胞肺癌组织中的表达

免疫组化结果显示:PP2Ac 蛋白在人肺鳞癌组织间质细胞呈阳性表达为黄棕色或黄褐色均匀颗粒状,细胞质着色,而在癌组织细胞浆未见有阳性表达(见图 1);小细胞肺癌组织中无明显 PP2Ac 蛋白表达,间质有微弱表达(见图 2).

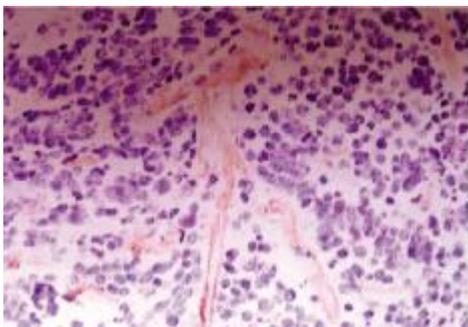


图 1 人肺鳞癌中 PP2Ac 的阴性表达 (SP \times 100)
Fig.1 The negative expression of PP2Ac in human lung squamous carcinoma(SP \times 100)

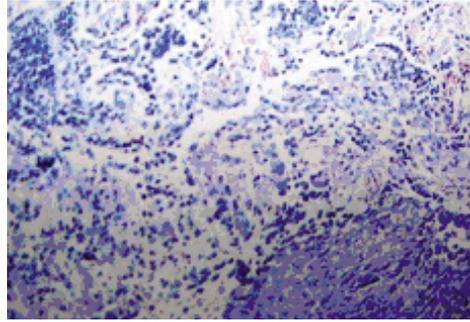


图 2 小细胞肺癌中的 PP2Ac 阴性表达 (SP \times 100)
Fig.2 The negative expression of PP2Ac in human small cell lung cancer(SP \times 100)

2.3 PP2Ac 和 p-AKT 蛋白在人肺腺癌组织中的表达

免疫组化结果显示:PP2Ac 蛋白在人腺癌组织中未见明显表达(见图 3),p-AKT 的阳性染色主要定位于癌细胞胞浆,少数为癌细胞胞浆和胞核共表达,呈阳性表达为黄棕色或黄褐色均匀颗粒状^[9],在人肺腺癌组织胞浆和胞核中可见明显表达(见图 4).

2.4 PP2Ac 蛋白在 YTLMC-90 和 GLC-82 细胞株中的表达

免疫印迹实验结果表明:在人正常肺组织细胞中,可见 PP2Ac 蛋白的正常表达;YTLMC-90 细胞中 PP2Ac 蛋白较正常组织表达稍弱,而在 GLC-82 细胞中表达明显减弱,甚至缺失(见图 5).

2.5 p-AKT 和 T-AKT 蛋白在人正常肺组织细胞和 GLC-82 细胞中的表达

免疫印迹结果显示:在人正常肺组织细胞中

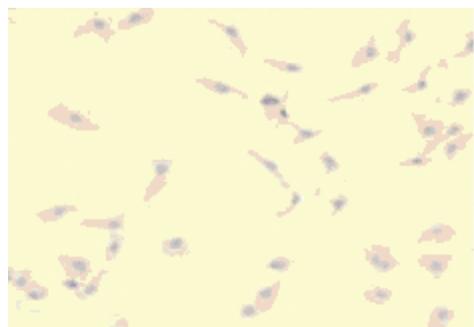


图 3 肺腺癌中 PP2Ac 阴性表达 (SP \times 200)
Fig.3 Negative expression of PP2Ac in human lung adenocarcinoma (SP \times 200)

图 4 肺腺癌中 p-AKT 强阳性表达 (SP×200)

Fig.4 Overexpression of p-AKT in human lung adenocarcinoma (SP×200)

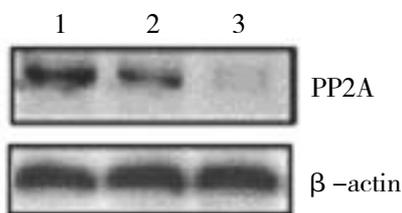
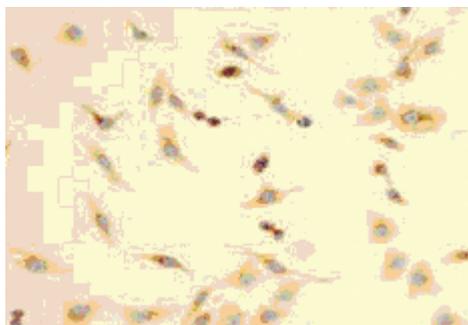


图 5 PP2Ac 蛋白在 YTLMC-90 和 GLC-82 细胞株中的表达

Fig.5 The expression of PP2Ac protein in YTLMC-90 and GLC-82

1: 人正常肺组织细胞; 2: YTLMC-90; 3: GLC-82

可见 p-AKT 呈低表达; 给予 GLC-82 细胞加入 PP2A 抑制剂 OA, 在 6 h、12 h、24 h 的不同时间点的 p-AKT 的表达均较未加 OA 组明显增强, 提示 PP2A 和 p-AKT 表达呈反相关 (见图 6)。

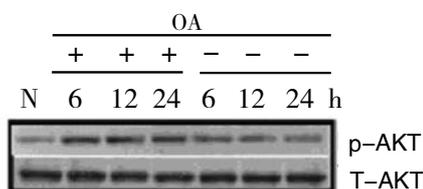


图 6 p-AKT 和 T-AKT 蛋白在人正常肺组织细胞和 GLC-82 细胞中的表达

Fig.6 The expression of p-AKT and T-AKT protein in human normal lung tissue cell and GLC-82 cell

+: 加入 OA; -: 未加入 OA; N: 人正常肺组织细胞

PP2A 是真核生物体内 Ser/ Thr 蛋白磷酸酶, 能拮抗绝大多数 Ser/ Thr 蛋白激酶的活性, 在物质代谢、基因表达、DNA 复制与损伤修复、细胞分裂、细胞转化及细胞凋亡等生理过程中具有重要的调节作用。越来越多的研究表明 PP2A 是一个肿瘤抑制因子, 在人类的结肠癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、恶性黑色素瘤和皮肤癌等多种恶性肿瘤中都发现有 PP2A 的基因突变或活性改变^[5], 目前有关 PP2Ac 在人不同类型肺癌组织中的表达的相关研究国内尚未有报道。本研究用免疫组化方法在临床获取不同类型肺癌组织标本上, 从组织水平观测 PP2Ac 蛋白表达的结果提示: 在人肺鳞癌、腺癌和小细胞肺癌三种肺癌标本组织中的 PP2Ac 表达与肺癌患者的性别、年龄和肿瘤分化程度均无明显相关性 ($P > 0.05$)。在人肺鳞癌组织和小细胞肺癌组织细胞浆中均未有 PP2Ac 蛋白表达, 而在间质有阳性表达。用 Western blot 分子生物学方法在人肺癌细胞株上, 从细胞水平测定 PP2Ac 蛋白的表达的结果表明: 在人正常肺组织细胞中, 可见 PP2Ac 的正常表达; YTLMC-90 细胞中 PP2Ac 较人正常肺组织表达稍弱, 而在 GLC-82 细胞中表达明显减弱, 甚至缺失。这些结果提示 PP2Ac 可能参与肺癌的发生, 其表达水平可能与肺癌细胞病理类型有关。

AKT 是存在于人类染色体中的鼠类胸腺淋巴瘤病毒 (T-8 strain from AKR/J mouse, AKT8) 致癌基因 (*v-akt*) 的同源物, 编码一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 此激酶位于体内重要的细胞生存信号转导通路 PI3K/AKT 通路的关键部位, 多种生长因子、激素、细胞因子、RAS 的激活、PTEN 的失活等均可经 PI3K 的作用引起 AKT 的活化^[6,7]。活化的 AKT (即磷酸化 AKT, p-AKT) 通过调控下游的多种分子促进肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移、凋亡等, 与肿瘤的发生发展密切相关。研究表明在多种肿瘤组织中都存在 AKT 的活化^[8,9]。本实验结果表明: 免疫组化检测 p-AKT 在人肺腺癌细胞浆中呈强阳性表达; Western blot 显示在人正常肺组织细胞中可见 p-AKT 蛋白呈低表达, 给予 GLC-82 细胞加入 PP2A 抑制剂 OA, 在 6 h、12 h、24 h 的不同时间点的 p-AKT 的表达均较未加 OA 组明显增强, PP2A 和 p-AKT 蛋白表达呈反相关。OA 是 PP2A 特异性抑制剂, 能够明显抑制

3 讨论

PP2A 蛋白在 GLC-82 细胞中表达, 推测 AKT 的活化 (p-AKT) 可能与肺癌的发生发展密切相关^[9]。

在肿瘤的生物治疗日益引起人类关注的今天, 随着对 PP2A 的了解愈来愈深入, 及其肿瘤发生的内部机制的阐明, 将来有可能研制开发出以 PP2A 或者相关蛋白质作为靶点的治疗肿瘤新药。本实验中心在国家自然科学基金资助下成功购建云南个旧肺癌 cDNA 文库, 共获得 42 个阳性克隆, 与 GenBank 数据库比较发现其中 1 个阳性克隆与 PP2A 催化亚单位 (PP2Ac) α 异构体有 99% 的同源性, 由 C-A 的点突变^[10], 推演所编码肽链的氨基酸发生了精氨酸 - 色氨酸的变化, 该基因有可能成为肺癌的基因诊断和生物治疗的候选靶抗原和靶基因。本实验结果有助于阐明 PP2A 在肺癌发生中的作用及其机制, 可为肺癌治疗提供一定的理论和实验依据。

[参考文献]

- [1] CALIN G A, DE IASIO M G, CAPRINI E, et al. Low frequency of alterations of the a (PPP2R1A) and b (PPP2R1B) isoforms of the subunit A of the serine-threonine phosphatase 2A in human neoplasms [J]. *Oncogene*, 2000, 19: 1191-1195
- [2] WILSON N J, MOSS S T, CSAR X. F, et al. Protein phosphatase 2A is expressed in response to colony-stimulating factor 1 in macrophages and is required for cell cycle progression independently of extracellular signal-regulated protein kinase activity [J]. *Biochem*, 1999, 339, 517-524
- [3] 董克伟. 临床肿瘤学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2002: 682-683
- [4] 苗丽君, 王静. Akt 与肿瘤的研究进展 [J]. *国外医学: 生理、病理科学与临床分册*, 2004, 24 (5): 406-409
- [5] JANSSENS V, VAN HOOF C, MARTENS E, et al. Identification and characterization of alternative splice products encoded by the human phosphotyrosyl phosphatase activator gene [J]. *Eur J Biochem*, 2000, 267: 4406-4413
- [6] TESTA J R, BELLACOSA A. AKT plays a central role in tumorigenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 (20): 10983-10985
- [7] KIM D, KIM S, KOH H, et al. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production [J]. *FASEB J*, 2001, 15 (11): 1953-1962
- [8] MEDEMA R H, KOPS G J, BOS J L, et al. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1 [J]. *Nature*, 2000, 404 (6779): 782-787
- [9] NAKANISHI K, SAKAMOTO M, YAMASAKI S, et al. Akt phosphorylation is a risk factor for early disease recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer*, 2005, 103 (2): 307-312
- [10] MIAO L J, WANG J. Recent advances in study of Akt and tumor [J]. *Foreign Medical Sciences: Section of Pathophysiology and Clinical Medicine*, 2004, 24 (5): 406-409
- [11] GOTZ J, PROBST A, EHLER E, et al. Delayed embryonic lethality in mice lacking protein phosphatase 2A catalytic subunit Ca [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 12370-12375

(2007-08-19 收稿)