

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00517

人大肠癌组织中磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白的表达及意义

项洪刚,胡志前,王伟军,徐健,张剑,许超,王强*

第二军医大学长征医院普通外科,上海 200003

[摘要] **目的:**探讨哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)及其活化形式磷酸化 mTOR(phosphorylated mTOR, p-mTOR)在人大肠癌发生发展中的作用及临床意义。**方法:**应用组织芯片和免疫组织化学技术检测 185 例大肠癌组织及癌旁组织中 mTOR 及 p-mTOR 的表达,并分析其与大肠癌临床病理学特征如年龄、性别、肿瘤浸润深度(T分期)、淋巴转移、TNM 分期和分化程度之间的关系。**结果:**在大肠癌旁组织中 mTOR 呈现弥散表达, p-mTOR 基本不表达或散在表达,两者在大肠癌组织中的表达强度明显高于癌旁组织。mTOR 和 p-mTOR 在大肠癌中的过表达率分别为 45.9% 和 42.2%。两者均与性别、年龄无显著相关。mTOR 的过表达与大肠癌的分化程度相关($P < 0.05$),而与浸润深度(T分期)、TNM 分期、淋巴转移无显著相关($P > 0.05$)。p-mTOR 的过表达与大肠癌的浸润深度(T分期)、淋巴转移和 TNM 分期显著相关($P < 0.05$),而与分化程度无显著相关($P > 0.05$)。**结论:**p-mTOR 的过表达与人大肠癌的恶性表型密切相关, mTOR 的磷酸化可能参与调控了大肠癌的发生发展。

[关键词] 组织芯片;雷帕霉素; mTOR; p-mTOR; 结直肠肿瘤

[中图分类号] R 735.34 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)05-0517-04

Expression of phosphorylated mammalian target of rapamycin in colorectal cancer and its significance

XIANG Hong-gang, HU Zhi-qian, WANG Wei-jun, XU Jian, ZHANG Jian, XU Chao, WANG Qiang*

Department of General Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[ABSTRACT] **Objective:** To explore the roles of mammalian target of rapamycin (mTOR) and the activated mTOR (phosphorylated mTOR, p-mTOR) in the development and progression of colorectal cancer, and to discuss the clinical significance. **Methods:** The expression of mTOR and p-mTOR in 185 colorectal cancer specimens and the corresponding adjacent tissues were evaluated by tissue microarray and immunohistochemistry, and the relationship between the expression and the age, sex, invasion depth (T stage), lymph metastasis, TNM stage and differentiation degree was analyzed. **Results:** Diffused expression of mTOR and hardly any expression of p-mTOR were found in the adjacent tissues. The expression of mTOR and p-mTOR was obviously stronger in the colorectal cancer tissues compared with that in the adjacent tissues. The over-expression rates of mTOR and p-mTOR in colorectal cancer were 45.9% and 42.2%, respectively. There was no significant correlation of mTOR and p-mTOR over-expression with age, sex ($P > 0.05$); the over-expression of mTOR was correlated with the differentiation degree ($P < 0.05$), but not with the invasion depth (T stage), TNM stage, or lymph metastasis ($P > 0.05$). The correlation of p-mTOR over-expression with the invasion depth (T stage), lymph metastasis and TNM stage was significant ($P < 0.05$), but that with the differentiation degree was not significant ($P > 0.05$). **Conclusion:** Over-expression of p-mTOR is closely associated with the malignant phenotype of colorectal cancer. It is also indicated that p-mTOR may be involved in the development and progression of colorectal cancer.

[KEY WORDS] tissue microarray; rapamycin; mTOR; p-mTOR; colorectal neoplasms

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(5):517-520]

雷帕霉素靶蛋白(target of rapamycin, TOR)是近年来发现的一类进化上非常保守的蛋白激酶家族,广泛存在于各种生物细胞中。TOR 于 20 世纪 90 年代首先在酵母中被发现^[1];随后在哺乳动物中

也发现了酵母 TOR 的同源物,称为哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)^[2]。研究^[3]表明, mTOR 是磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K)和蛋白激酶

[收稿日期] 2008-12-26 **[接受日期]** 2009-02-10

[作者简介] 项洪刚, 硕士, 主治医师. E-mail: xiang_hg@hotmail.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81885591, E-mail: wang2929@hotmail.com

B(protein kinase B, PKB, 也称 Akt)通路的下游分子。PI3K/Akt/mTOR信号通路在肿瘤的发生发展过程中被过度激活,使细胞周期调节失控,引起细胞转化和肿瘤进展。抑制 mTOR 及其介导的信号通路已成为肿瘤预防和靶向治疗的热点^[4-5]。mTOR 的活化形式为磷酸化 mTOR(p-mTOR)。研究发现 p-mTOR 的表达与肿瘤患者的预后及对靶向治疗的敏感性密切相关。然而国内外少见关于 mTOR 及其活化状态在大肠癌中的报道,本研究旨在探讨 mTOR 及 p-mTOR 在大肠癌组织中的表达及其与临床病理学特征间的关系。

1 资料和方法

1.1 标本来源及资料 收集第二军医大学长征医院 2002 年至 2008 年存档的 185 例大肠癌石蜡标本,男性 112 例,女性 73 例。年龄 <60 岁 84 例,≥60 岁 101 例,中位年龄 62 岁。病理诊断结果经 2 名以上病理医师确认。

1.2 组织芯片构建 首先根据 H-E 染色切片选取存档组织蜡块,再根据 H-E 染色切片确定具有代表性的病变部位,然后应用组织芯片构建仪(Beecher Instruments, 美国)制备组织芯片。方法如下:应用构建仪在空白蜡块(45 mm×20 mm)中穿孔(直径 1.5 mm),然后在选取的大肠癌标本蜡块中穿刺组织(直径 1.5 mm),准确放入空白蜡块的小孔内;每例标本取样点均含有 1 处癌旁组织(癌边缘 2 cm 以上组织)和 2 处原发灶肿瘤。依次操作,直至将所有组织标本种植于空白蜡块中,并加以记录。最后应用石蜡切片机进行连续切片,厚度为 4 μm。

1.3 免疫组化染色 抗体来源:mTOR (Abcam 公司, Y-391, 稀释比例 1:50)和 p-mTOR(CST 公

司, 49F9, 稀释比例 1:100)。S-P 免疫组化试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司。免疫组化染色采用 S-P 法, PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 免疫组化结果判定 mTOR 和 p-mTOR 阳性染色为淡黄色、棕黄色或棕褐色, 定位于细胞质和(或)细胞膜。阳性判断采用二级计分法。(1)阳性细胞计数:根据阳性细胞所占 5 个以上高倍镜视野比例计数, <5% 记 0 分; 5%~25% 记 1 分; 25%~50% 记 2 分; 50%~75% 记 3 分; ≥75% 记 4 分。(2)染色强度分类:淡黄色记 1 分;黄或深黄色记 2 分;褐或棕褐色记 3 分。两者分数相乘大于 1 为阳性。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 11.0 软件作统计学处理。组内变量采用配对 χ^2 检验。

2 结果

2.1 组织芯片的构建结果 构建了 185 例大肠癌的组织芯片, 共有 3 个组织蜡块, 含 555 个位点, 每个蜡块切除 50~100 张切片, 每隔 20 张取一张切片行 H-E 染色以观察肿瘤组织是否存在。发现共有 24 个位点组织脱落, 用普通切片补充, 其余位点组织结构保存良好。

2.2 mTOR 和 p-mTOR 在癌旁组织及肿瘤组织中的表达 mTOR 和 p-mTOR 表达主要定位于细胞质或膜, 呈淡黄至棕黄、棕褐色, 弥漫或片状分布(图 1)。mTOR 在癌旁组织呈弥漫弱阳性, 而 p-mTOR 基本不着色。两者在大肠癌组织中的表达强度明显高于癌旁组织中的表达, mTOR 和 p-mTOR 在大肠癌中的过表达率分别为 45.9%(85/185)和 42.2%(78/185)。

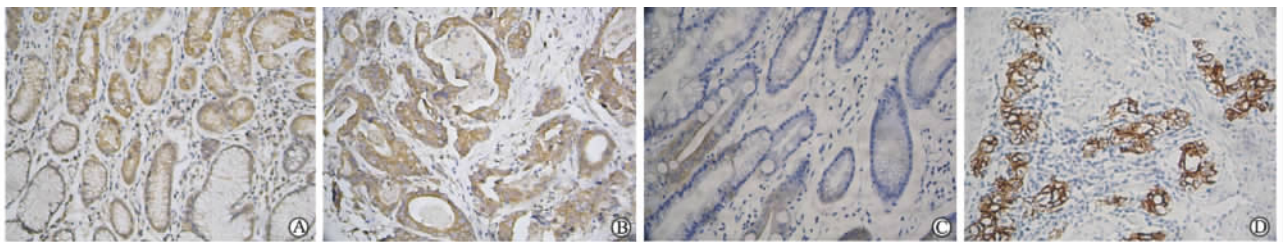


图 1 mTOR(A,B)和 p-mTOR(C,D)在大肠癌旁组织及癌组织中的表达

Fig 1 Expression of mTOR(A,B) and p-mTOR(C,D) in colorectal cancer and corresponding adjacent normal tissues

A,C: Adjacent normal tissue; B,D: Cancer tissue. Original magnification: ×400

2.3 mTOR 与 p-mTOR 表达的相关性 统计学检验结果显示,大肠癌组织中 mTOR 和 p-mTOR 的表达之间存在显著相关性($\chi^2=23.2, P<0.01$,表1)。

2.4 mTOR 及 p-mTOR 表达与大肠癌临床病理学特征间的关系 患者临床资料详见表2。进一步研究发现,mTOR 的过表达与大肠癌的分化程度相关($P<0.05$),而与浸润深度(T分期)、TNM分期、淋巴转移无显著相关($P>0.05$);p-mTOR 的过表达与大肠癌的浸润深度(T分期)、淋巴转移和 TNM分期显著相关($P<0.05$),而与分化程度无显著相

关($P>0.05$)。

表1 大肠癌组织中 mTOR 及 p-mTOR 表达的相关性
Tab 1 Correlation of mTOR expression with p-mTOR in colorectal cancer

	p-mTOR expression		Total
	Negative	Positive	
mTOR expression			
Negative	74	26	100
Positive	33	52	85
Total	107	78	185

表2 mTOR 及 p-mTOR 与大肠癌临床病理学特征间的关系

Tab 2 Correlation of clinicopathological characters of colorectal cancer with mTOR and p-mTOR expression

Feature	N	mTOR expression n(%)	P value	p-mTOR expression n(%)	P value
Age(year)					
<60	84	39(46.4)	NS	35(41.7)	NS
≥60	101	46(45.5)		43(42.6)	
Sex					
Male	112	52(46.4)	NS	48(42.9)	NS
Female	73	33(45.2)		30(41.1)	
Invasion depth (T stage)					
T1/T2	64	24(37.5)	NS	19(29.7)	0.012
T3/T4	121	61(50.4)		59(48.8)	
Lymph metastasis					
No	80	31(38.8)	NS	26(32.5)	0.020
Yes	105	54(51.4)		52(49.5)	
TNM stage					
I/II	73	29(39.7)	NS	24(32.9)	0.039
III/IV	112	56(50.0)		54(48.2)	
Differentiation degree					
Well/moderately-differentiated	92	50(54.3)	0.023	44(47.8)	NS
Poorly-differentiated	93	35(37.6)		34(36.6)	

3 讨论

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)由2549个氨基酸组成,相对分子质量为289000,是一种非典型的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,属于磷脂酰肌醇激酶家族(phosphatidylinositol kinase-related kinase, PIKK)成员。研究^[3]表明,mTOR是PI3K/Akt通路的下游分子,汇聚了来自于细胞内外的营养、生长因子、能量和环境压力对细胞的刺激信号,控制着细胞周期的进程,对细胞的分化、凋亡起重要作用。mTOR信号通路在肿瘤的发生发展过程中被过度激活,在多种实体肿瘤中过度表达,包括乳腺癌、前列腺癌、胃癌、肾癌、肝癌等^[6-10]。如果能够特异性地抑制mTOR,就能把细胞周期阻滞在G₁期,从而

触发细胞凋亡。因此,将mTOR作为相关肿瘤的治疗靶点已成为当前靶向治疗研究的新热点。

mTOR的活化形式为磷酸化mTOR(p-mTOR)。研究^[11]发现不同恶性肿瘤组织中p-mTOR的阳性表达率不同,在肝癌中约为15%,而在胃癌中达60%。Faried等^[12]发现p-mTOR是子宫颈癌的一个重要的预后指标,是治疗子宫颈癌的重要靶标。Herberger等^[13]同样发现p-mTOR是胆道肿瘤的一种负相关预后指标,p-mTOR阳性的肿瘤患者比阴性的患者生存期短。这说明p-mTOR的表达与否与肿瘤的发生发展及患者对靶向治疗的敏感性密切相关。然而关于两者在大肠癌中的共同研究相对少见。本研究利用免疫组化和组织芯片技术观察mTOR和p-mTOR二者在大肠癌中的表

达,以探讨其在大肠肿瘤发生发展中的作用。

在肿瘤细胞中,信号转导的异常导致细胞分化与分裂异常。本研究发现 mTOR 及 p-mTOR 在大肠癌组织中的表达强度明显高于癌旁组织中的表达,提示两者与大肠肿瘤的发生关系密切。mTOR 在癌旁组织中呈现弥散表达,提示该蛋白在维持正常组织形态和发育中具有一定作用,然而其磷酸化形式在癌旁组织中基本不表达或散在表达,却高表达于肿瘤细胞,表明 mTOR 的磷酸化形式 p-mTOR 在大肠癌的发生过程中起了非常重要的作用。进一步分析显示 p-mTOR 的表达随浸润深度的增加和疾病进展逐步增加,该结果表明 p-mTOR 的过度表达同样与肿瘤的进展高度相关。上述结果提示 p-mTOR 在大肠癌发生发展过程中发挥了极其重要的作用。

转移是导致肿瘤患者死亡的主要原因,约一半以上患者在第一次确诊时即存在淋巴结和(或)脏器转移。因此了解转移发生的机制非常重要。本研究显示 p-mTOR 与大肠癌淋巴转移有关,过表达该蛋白的大肠癌患者淋巴转移的比例显著高于不表达该蛋白的患者,提示 p-mTOR 在大肠癌淋巴转移中起到了重要的作用。

综上所述,p-mTOR 在大肠癌的发生发展中起到极其重要的作用,其过表达预示着大肠癌的恶性程度和转移潜能。本研究结果为 mTOR 抑制剂应用于临床提供了理论依据。

[参考文献]

[1] Heitman J, Movva N R, Hall M M. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant target of rapamycin in yeast[J]. *Science*, 1991, 253: 905-909.

[2] Brown E J, Albers M W, Shin T B, Ichikawa K, Keith C T, Lane W S, et al. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex [J]. *Nature*, 1994, 369: 756-758.

[3] Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR[J]. *Genes Dev*, 2004, 18: 1926-1945.

[4] Chan S. Targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR): a new approach to treating cancer[J]. *Br J Cancer*, 2004, 91: 1420-1424.

[5] Bianco R, Melisi D, Ciardiello F, Tortora G. Key cancer cell signal transduction pathways as therapeutic targets [J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42: 290-294.

[6] Bose S, Chandran S, Mirocha J M, Bose N. The Akt pathway in human breast cancer: a tissue-array-based analysis [J]. *Mod Pathol*, 2006, 19: 238-245.

[7] Kremer C L, Klein R R, Mendelson J, Browne W, Samadzadeh L K, Vanpatten K, et al. Expression of mTOR signaling pathway markers in prostate cancer progression [J]. *Prostate*, 2006, 66: 1203-1212.

[8] Murakami D, Tsujitani S, Osaki T, Saito H, Katano K, Tatebe S, et al. Expression of phosphorylated Akt (pAkt) in gastric carcinoma predicts prognosis and efficacy of chemotherapy[J]. *Gastric Cancer*, 2007, 10: 45-51.

[9] Robb V A, Karbowniczek M, Klein-Szanto A J, Henske E P. Activation of the mTOR signaling pathway in renal clear cell carcinoma [J]. *J Urol*, 2007, 177: 346-352.

[10] Sahin F, Kannangai R, Adegbola O, Wang J, Su G, Torbenson M. mTOR and P70 S6 kinase expression in primary liver neoplasms [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10: 8421-8425.

[11] Lang S A, Gaumann A, Koehl G E, Seidel U, Bataille F, Klein D, et al. Mammalian target of rapamycin is activated in human gastric cancer and serves as a target for therapy in an experimental model [J]. *Int J Cancer*, 2007, 120: 1803-1810.

[12] Faried L S, Faried A, Kanuma T, Aoki H, Sano T, Nakazato T, et al. Expression of an activated mammalian target of rapamycin in adenocarcinoma of the cervix: a potential biomarker and molecular target therapy [J]. *Mol Carcinog*, 2008, 47: 446-457.

[13] Herberger B, Puhalla H, Lehnert M, Wrba F, Novak S, Brandstetter A, et al. Activated mammalian target of rapamycin is an adverse prognostic factor in patients with biliary tract adenocarcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13: 4795-4799.

[本文编辑] 贾泽军