

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01398

## 肾上腺皮质肿瘤中 PPAR $\gamma$ 与 PTEN 蛋白的表达及相互关系

### Expression of PPAR $\gamma$ and PTEN in adrenocortical tumors and the relation between them

卢瑶, 罗佐杰\*, 秦映芬, 卢德成, 梁杏欢, 覃丹露, 洗晶, 戴霞

广西医科大学第一附属医院内分泌科, 南宁 530021

**[摘要]** **目的:**探讨 PPAR $\gamma$  和 PTEN 在肾上腺皮质组织中的表达及相互关系。**方法:**应用免疫组化方法检测 43 例肾上腺皮质肿瘤(腺瘤 30 例、腺癌 13 例)及 7 例瘤旁正常组织标本中 PPAR $\gamma$  及 PTEN 的表达,观察二者相互关系以及与肾上腺皮质病变病理学参数的联系。**结果:**肾上腺皮质癌与腺瘤和正常肾上腺组织比较,PPAR $\gamma$  表达明显增高(阳性率分别为 76.9%、23.3%、0),PTEN 表达减低(阳性率分别为 7.7%、43.3%、85.78%);PPAR $\gamma$  表达与肿瘤大小、淋巴结转移相关,PTEN 与淋巴结转移相关(均  $P < 0.05$ );在肾上腺皮质肿瘤中 PPAR $\gamma$  与 PTEN 表达存在负相关( $P < 0.05$ )。**结论:**PPAR $\gamma$  在肾上腺皮质肿瘤中高表达且与 PTEN 的表达显著相关,提示 PPAR $\gamma$  与 PTEN 存在相互调控机制作用于肾上腺皮质肿瘤的发生发展,检测 PPAR $\gamma$  及 PTEN 对肿瘤的早期诊断和良恶性鉴别有一定价值。

**[关键词]** 肾上腺皮质肿瘤;免疫组织化学; PPAR $\gamma$ ; PTEN

**[中图分类号]** R 736.6 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2008)11-1398-03

过氧化物酶体增殖物活化受体(peroxisome proliferators activated receptors, PPARs)属于核激素受体超家族的成员,包括 PPAR $\alpha$ 、PPAR $\beta/\delta$  和 PPAR $\gamma$  三种表型,其中以 PPAR $\gamma$  的研究最为深入。PTEN 基因,即第 10 号染色体同源缺失性磷酸酶-张力蛋白基因(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten),是迄今为止发现的第一个具有双特异性磷酸酶活性的抑癌基因。二者均通过复杂的信号转导网络(如 PI3K/AKT 信号通路、FAK 和 MAPK 信号通路等)参与细胞的增殖、分化,在肿瘤的发生、进展中发挥重要作用。本研究运用免疫组化方法检测 PPAR $\gamma$  及 PTEN 在肾上腺皮质肿瘤组织的表达,探讨二者之间的相关性以及肾上腺皮质肿瘤早期诊断和良恶性鉴别方面的价值。

#### 1 材料和方法

**1.1 研究对象** 选用广西医科大学第一附属医院 1995~2006 年手术切除、经病理证实的肾上腺皮质肿瘤石蜡包埋标本 43 例,其中 13 例肾上腺皮质癌(adrenocortical carcinoma, ACC)均按 Weiss<sup>[1]</sup>1984 年提出的病理组织学诊断标准重新复习。瘤旁正常肾上腺皮质组织 7 例作为对照。

其中男 18 例,女 25 例,年龄 6~68 岁,中位年龄为 38.6 岁。所有病例均未经过任何放疗和化疗。43 例中有典型临床表现或实验室检查异常者 33 例(76.7%),30 例腺瘤中皮质醇瘤 8 例(26.7%),醛固酮瘤 19 例(63.3%),无功能瘤 3 例(10%),13 例腺癌中皮质醇瘤 6 例(46.2%),无功能瘤 7 例(53.8%),术中均未发现出血、坏死等。

**1.2 免疫组化方法测定 PPAR $\gamma$  及 PTEN 的表达** 浓缩型

鼠抗人 PPAR $\gamma$  单克隆抗体(Santa Cruz,克隆号:AC,工作浓度 1:50);福州迈新生物技术公司即用型鼠抗人 PTEN 单克隆抗体(克隆号:17A)。采用免疫组化 S-P 法,操作步骤严格按照说明书执行。用同批实验标本中阳性表达作为阳性对照。以 PBS 液替代一抗作空白阴性对照, H-E 染色作组织学对照。

使用德国病理图像分析仪(Pathological Image Analysis System, DMR+Q550, Gemmany)进行观察和显微照相。以细胞核或细胞质呈棕褐色或棕黄色颗粒者为阳性细胞,按照 Constantine 等<sup>[2]</sup>的标准略加修改对结果进行判断,在全切片的上、下、左、右、中随机选取一个 400 倍视野,观察 5 个视野中阳性细胞的染色情况并计算阳性细胞数,计算总细胞数不少于 400 个。根据染色强度及阳性细胞数双评分半定量法评分:根据阳性细胞所占比例,无明显阳性细胞为 0 分, < 40% 阳性细胞为 1 分, 40%~85% 阳性细胞为 2 分, > 85% 阳性细胞为 3 分;显色度按切片中细胞显色有无及强度计分:无显色 0 分,浅棕黄色 1 分,棕黄色 2 分,棕褐色 3 分。两分相加 0 分为(-), 1~2 分(+), 3~4 分(++), 5~6 分(+++)。阳性表达率以(++)和(+++)之和占总例数的百分比表示。

**1.3 统计学处理** 所有数据均用 SPSS 13.0 统计软件包进行统计学处理。多样本率的比较应用  $\chi^2$  检验,相关分析应用 Spearman 等级相关分析。

#### 2 结果

**2.1 PPAR $\gamma$  和 PTEN 蛋白在肾上腺皮质组织中的表达(图**

**[收稿日期]** 2008-04-17 **[接受日期]** 2008-06-17

**[基金项目]** 广西自然科学基金(桂科自 0542085). Supported by Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region(Guizkezi 0542085).

**[作者简介]** 卢瑶, 硕士生。

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel:0771-5356517, E-mail:zluo888@yahoo.com.cn

1) PPAR $\gamma$  阳性染色集中于细胞核, 少数为胞核、胞质均着色, 呈棕黄色至深棕色颗粒状。在 13 例腺瘤组织中 PPAR $\gamma$  的阳性表达率为 76.9% (10/13), 腺瘤中阳性表达率为 23.3% (7/30), 且阳性细胞染色的程度和范围要明显低于腺

癌, 在瘤旁正常肾上腺皮质组织中几乎未发现 PPAR $\gamma$  表达 (阳性率为 0)。在正常组、腺瘤组和腺癌组组织中, PPAR $\gamma$  的阳性表达率递增, 三组之间差异具有统计学意义 ( $P < 0.001$ ), 腺瘤与腺癌组比较亦有显著差异 ( $P < 0.05$ )。

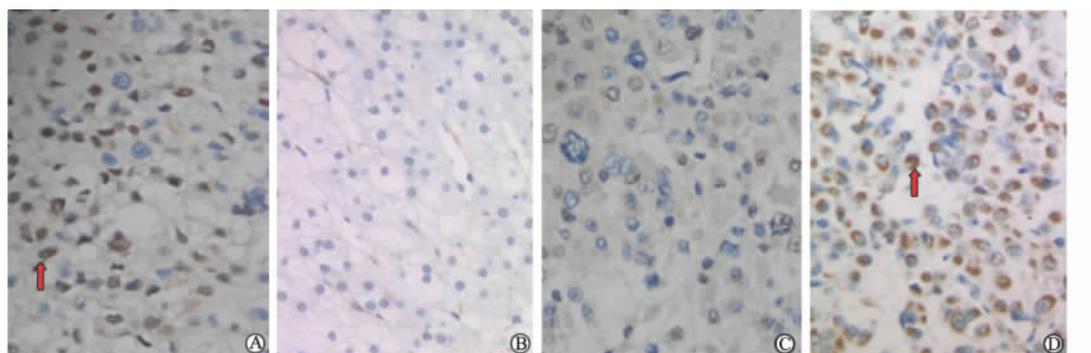


图 1 肾上腺皮质癌 (A,C) 与正常肾上腺皮质 (B,D) 组织 PPAR $\gamma$  (A,B) 和 PTEN (C,D) 免疫组化染色结果 (S-P)  
Original magnification:  $\times 200$

PTEN 蛋白阳性染色主要集中在胞质, 胞核和组织间质均未见染色。PTEN 在肾上腺皮质癌中阳性表达率为 7.7% (1/13), 在腺瘤中为 43.3% (13/30), 在正常肾上腺皮质组织几乎均为强阳性表达, 阳性率 85.78% (6/7), 三组之间比较存在显著性差异 ( $P = 0.003$ ), 腺瘤组与腺癌组比较有显著性差异 ( $P = 0.001$ )。

2.2 PPAR $\gamma$  与 PTEN 表达与临床病理参数相关性的比较分析 PPAR $\gamma$  与 PTEN 蛋白表达与临床病理参数之间的关系如表 1 所示, 经两独立样本秩和检验, PPAR $\gamma$  表达与性别、年龄及肿瘤分期无明显相关 ( $P > 0.05$ ), 而与肿块大小和淋

巴结转移显著相关 ( $P < 0.01$ ), 肿块大于 5 cm 以及有淋巴结转移者 PPAR $\gamma$  表达增加。PTEN 表达与性别、年龄、肿块大小及肿瘤分期无明显相关 ( $P > 0.05$ ), 仅与淋巴结转移显著相关 ( $P < 0.01$ ), 无淋巴结转移组 PTEN 的表达高于有淋巴结转移组。

2.3 肾上腺皮质肿瘤中 PPAR $\gamma$  与 PTEN 表达的相关性分析 如表 2 所示, 在所检测的标本中, PPAR $\gamma$  阳性表达程度越高, PTEN 表达程度下降。经 Spearman 等级相关分析, PPAR $\gamma$  与 PTEN 在肾上腺皮质肿瘤中的表达存在负相关的关系 ( $r = -0.734, P < 0.001$ )。

表 1 PPAR $\gamma$  与 PTEN 表达与临床病理参数相关性的比较

参数	N	PPAR $\gamma$				u	P	PTEN				u	P
		-	+	++	+++			-	+	++	+++		
性别						280	0.366					299.5	0.616
女性	31	13	4	11	3			8	9	4	10		
男性	21	11	5	2	3			5	7	6	3		
年龄						245	0.093					284.5	0.383
<40 岁	22	8	1	11	2			3	9	4	6		
$\geq 40$ 岁	30	16	8	2	4			10	7	6	7		
M 肿块大小						166	0.01					280.5	0.878
<5 cm	36	20	7	7	2			8	12	9	7		
$\geq 5$ cm	16	4	2	6	4			5	4	1	6		
淋巴结转移						51.5	<0.001					96.5	0.003
无	41	24	7	9	1			7	12	9	13		
有	11	0	2	4	5			6	4	1	0		
肿瘤分期						16.5	0.495					13.5	0.269
I/II	6	0	3	3	0			2	1	3	0		
III/IV	7	2	0	3	2			1	2	1	3		

### 3 讨论

PPAR $\gamma$  是由配体激活的核转录因子超家族的成员, 研究发现 PPAR $\gamma$  在人类多数恶性肿瘤中均有表达, 包括结肠癌、胰腺癌、乳腺癌等, 并且多数学者认为, PPAR $\gamma$  与淋巴结转移、肿瘤分期等预示肿瘤恶性程度的指标存在相关, 因此

可以作为肿瘤鉴别诊断的提示预后的有效指标<sup>[3-5]</sup>。这些报道均与本实验中所观察到的结果是一致的。然而越来越多的证据说明 PPAR $\gamma$  经配体激活后能抑制肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡, 其中的原因尚不明确。Kristiansen 等<sup>[4]</sup>考虑肿瘤中 PPAR $\gamma$  的高表达为代偿性的, 肿瘤细胞存在内源性配体的缺陷, PPAR $\gamma$  不能被充分激活, 因此高表达的

PPAR $\gamma$  蛋白并不能充分发挥其促凋亡作用,相反由于涉及其他肿瘤相关因子和信号通路的激活而产生了复杂的作用。另外,Han 等<sup>[6]</sup>提出:在肿瘤中,PPARs 的另一个亚型——PPAR $\beta$  表达也增加,与 PPAR $\gamma$  竞争结合维甲酸受体(RXR)进而发挥其转录作用,在反馈刺激下,肿瘤细胞中 PPAR $\gamma$  水平升高。

表 2 肾上腺皮质肿瘤中 PPAR $\gamma$  与 PTEN 表达的相关性

PPAR $\gamma$ 表达	PTEN 表达				总计
	—	+	++	+++	
—	0	2	11	15	28
+	2	0	1	2	5
++	4	1	0	0	5
+++	7	1	1	0	9
总计	13	4	13	17	47

就本实验观察,PPAR $\gamma$  染色主要集中在细胞核,部分在细胞质中也有表达,Boeck 等<sup>[7]</sup>在胰腺癌细胞中有相同的报道。关于 PPAR $\gamma$  在细胞中的定位,目前的研究不一而足,多数研究发现 PPAR $\gamma$  在肿瘤中集中于细胞核<sup>[3-5]</sup>,这与 PPAR $\gamma$  属于核转录因子的作用机制相符,但由于 PPAR $\gamma$  在细胞内的分布部分是通过磷酸化过程来实现的,而在研究中发现 PPAR $\gamma$  亦在胞质中表达,因为肿瘤中经常发生磷酸化过程的改变,推测 PPAR $\gamma$  是通过阻断胞质中的某些蛋白,从而导致受体介导效果的丧失。

PTEN 是人类恶性肿瘤中突变率较高的基因之一。目前普遍认为 PTEN 的抑癌机制由几条途径协同完成:(1) PTEN 具有酪氨酸磷酸酶活性,通过抑制 G<sub>1</sub>-S 期进程,影响细胞的周期过程及增殖。通过使 PP 去磷酸化负调控 PIP3/PKB 信号转导途径受阻,最终达到阻止细胞生长及促进细胞凋亡的目的;(2)通过对焦点黏附激酶(FAK)的去磷酸化抑制细胞转移及侵袭;(3)通过抑制促细胞分裂素激活的蛋白激酶(MAPK)细胞信号转导途径抑制细胞的生长和分化。PTEN 可能通过多种机制导致其功能性失活,现已广泛报道了 PTEN cDNA 的突变,杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH)、纯合性缺失、缺失、启动子的突变及甲基化都可导致 PTEN 基因的低转录,产生不稳定的甚至无转录子<sup>[8]</sup>。PTEN 基因突变失活导致 PTEN 蛋白不表达或表达降低,从而失去了对细胞生长、增殖的负调控,促进了肿瘤的发生。因此,PTEN 蛋白水平越低,肿瘤的恶性程度越高,患者的预后越差,对于判断肿瘤及其癌前病变的预后有重要意义<sup>[9-10]</sup>。本研究的结果与上述结论相符,同时发现,PTEN 表达与淋巴结转移显著相关,无淋巴结转移组 PTEN 的表达高于有淋巴结转移组,与性别、年龄、肿块大小及肿瘤分期无明显相关,提示 PTEN 可能参与肾上腺皮质肿瘤的恶性进展过程。

本实验运用免疫组化方法检测出,在肾上腺皮质肿瘤中,PPAR $\gamma$  和 PTEN 的表达存在负相关,由此可以推测二者

在肿瘤发生发展过程中可能存在拮抗作用。在对于胰腺癌、肝癌的研究<sup>[10-11]</sup>中发现,PPAR $\gamma$  的高表达和 PTEN 的低表达与肿瘤的发生发展有关,与肿瘤的预后相关,并提示 PPAR $\gamma$  的过量和 PTEN 的缺失可能与肿瘤发展的特定阶段有关,二者通过复杂的调控机制而发挥作用,但具体的联合作用方式尚有待研究。

[参考文献]

- [1] Weiss L M. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors[J]. Am J Surg Pathol,1984,8:163-169.
- [2] Constantine A, Montegado O. Immunohistochemical detection of P-glyco-protein in endometrial adenocarcinoma[J]. Am J Pathol,1991,138:799-806.
- [3] Giovannucci E, Michaud D. The role of obesity and related metabolic disturbances in cancers of the colon, prostate, and pancreas[J]. Gastroenterology,2007,132:2208-2225.
- [4] Kristiansen G, Jacob J, Buckendahl A C, Grützmann R, All-dinger I, Sipos B, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is highly expressed in pancreatic cancer and is associated with shorter overall survival times[J]. Clin Cancer Res, 2006,12:6444-6451.
- [5] Turturro F, Friday E, Fowler R, Surie D, Welbourne T. Troglitazone acts on cellular pH and DNA synthesis peroxisome proliferator-activated receptor independent mechanism in breast cancer-derived cell lines[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10: 7022-7030.
- [6] Han S, Roman J. Rosiglitazone suppresses human lung carcinoma cell growth through PPARgamma-dependent and PPARgamma-independent signal pathways [J]. Mol Cancer Ther, 2006,5:430-437.
- [7] Boeck S, Ankerst D P, Heinemann V. The role of adjuvant chemotherapy for patients with resected pancreatic cancer: systematic review of randomized controlled trials and meta-analysis [J]. Oncology,2008,72(5-6):314-321.
- [8] Okahara F, Ikawa H, Kanaho Y, Maehama T. Regulation of PTEN phosphorylation and stability by a tumor suppressor candidate protein[J]. J Biol Chem,2004,28:256-269.
- [9] Goto M, Iwase A, Ando H, Kurosuchi S, Harata T, Kikkawa F. PTEN and Akt expression during growth of human ovarian follicles[J]. J Assist Reprod Genet,2007,24:541-546.
- [10] Sawai H, Liu J, Reber H A, Hines O J, Eibl G. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  decreases pancreatic cancer cell invasion through modulation of the plasminogen activator system[J]. Mol Cancer Res,2006,4:159-167.
- [11] Zhang W, Wu N, Li Z, Wang L, Jin J, Zha X L. PPARgamma activator rosiglitazone inhibits cell migration via up-regulation of PTEN in human hepatocarcinoma cell line BEL-7404[J]. Cancer Biol Ther,2006,5:1008-1014.

[本文编辑] 尹 茶