

# 子宫内膜癌组织中 p- PKB 及仅含 BH3 域蛋白的表达及其相关性 \*

杨 清 张淑兰 王 玉

中国医科大学附属第二医院妇产科 (沈阳市 110004)

**摘要** 目的: 研究子宫内膜癌组织中磷酸化 PKB、磷酸化 Bad 及 Bim 蛋白及 mRNA 表达水平, 并探讨其与子宫内膜癌发生的关系以及三者间表达的相关性。方法: 采用免疫组化方法检测 11 例正常增殖期子宫内膜、13 例非典型增生子宫内膜及 55 例子宫内膜癌组织中 p- PKB、p- Bad 及 Bim 蛋白表达情况, 以及采用逆转录聚合酶链反应检测上述子宫内膜组织中 PKB、Bad 及 Bim mRNA 表达水平。结果: 与正常子宫内膜组织比较, 子宫内膜癌及非典型增生组织中 p- PKB 及 p- Bad 蛋白表达阳性率明显增加 ( $P=0.001$ ;  $P<0.001$ ); 而 Bim 蛋白的表达则显著减少 ( $P<0.001$ ), 差异有显著性; PKB mRNA 及 Bad mRNA 在正常子宫内膜、非典型增生内膜及子宫内膜癌之间表达的阳性率无明显差异 ( $P>0.05$ ), 只有 Bim mRNA 在正常子宫内膜组织中表达的阳性率明显高于非典型增生内膜及子宫内膜癌组织 ( $P=0.006$ )。结论: PKB 途径的激活与子宫内膜癌的发生密切相关。其激活后可通过多种机制作用于仅含 BH3 域蛋白, 抑制其促凋亡活性, 导致子宫内膜细胞过度增殖以及子宫内膜癌的发生。

**关键词** 子宫内膜癌 磷酸化蛋白激酶 B 仅含 BH3 结构域蛋白

中图分类号: R737.33 文献标识码: A 文章编号: 1000- 8179(2006) 16- 0912- 04

## The Expression and Correlation of p- PKB and BH3- only Proteins in Endometrial Carcinoma

Yang Qing Zhang Shulan Wang Yu

Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang

**Abstract** Objective: To study the expression of p- PKB, p- Bad and Bim protein and mRNA in the tissues of endometrial carcinoma, and to probe the relationship between this expression and the occurrence of endometrial carcinoma. Methods: Expression of p- PKB, p- Bad and Bim protein were evaluated by immunohistochemistry (SP) in 55 cases of endometrial carcinoma, 13 cases of atypical endometrial hyperplasia and 11 cases of normal proliferative-phase endometrium. The content of PKB, Bad and Bim mRNA in those tissues was evaluated by RT- PCR. Results: p- PKB and p- BAD proteins were expressed more often in the tissues of endometrial carcinoma and atypical endometrial hyperplasia than in normal proliferative-phase endometrium ( $P=0.001$ ;  $P<0.001$ ). On the contrary, Bim protein was expressed more often in normal tissue ( $P<0.001$ ). The amount of PKB mRNA and Bad mRNA in the three groups show no significant difference, but the amount of Bim mRNA in normal proliferative-phase endometrium is higher than that in endometrial carcinoma and atypical endometrial hyperplasia ( $P=0.006$ ). Conclusions: The activation of the PKB pathway is closely related to the occurrence of endometrial carcinoma, and the activated PKB pathway can affect BH3- only proteins, inhibiting their

\* 本文课题受辽宁省自然科学基金项目资助(编号: 20032064)

通讯作者: 杨清 yangqing-q@sohu.com

pro-apoptotic ability, resulting in the occurrence of endometrial carcinoma.

**Key words** Endometrial carcinoma Phosphorylated protein kinase B  
BH3-only protein

在多种生长因子激活的 PI3K 途径中, PKB 是 PI3K 的主要下游因子, 有研究表明活化的 PKB 可通过作用于 BH3 域, 进而抑制 Bcl-2 家族相关蛋白的促凋亡活性<sup>[1]</sup>。Bim 与 Bad 均属仅含 BH<sub>3</sub> 域蛋白。在子宫内膜细胞中存在有 PKB 参与的信号转导途径来调控细胞的生存与死亡<sup>[2]</sup>。本研究对子宫内膜癌组织中磷酸化 PKB (p-PKB) 与磷酸化 Bad (p-Bad) 及 Bim 蛋白表达及 mRNA 水平进行检测, 并探讨其与子宫内膜癌发生的关系以及三者间表达的相关性。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验对象

选择 2002 年 2 月~2003 年 2 月在我院妇产科收治的子宫内膜异常改变患者 68 例, 其中子宫内膜癌 55 例, 子宫内膜非典型增生 13 例。选取同期宫腔镜手术获得的正常增殖期子宫内膜组织 11 例作为对照组。所有患者术前均未接受前期治疗。55 例子宫内膜癌按 1988 年 FIGO 分期标准进行临床分期: Ⅰ期 29 例( a 9 例, b 12 例, c 8 例), Ⅱ期 16 例, Ⅲ期 10 例。组织学分级: G<sub>1</sub> 级 23 例, G<sub>2</sub> 级 20 例, G<sub>3</sub> 级 12 例。组织学类型均为子宫内膜样腺癌。79 例新鲜组织标本均为手术时立即取材。标本一部分经福尔马林固定, 常规脱水、包埋, 行 HE 染色, 以供病理学检查。其余新鲜部分置液氮冷冻后, -70℃ 冰箱保存。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 免疫组织化学检测** 取上述组织标本经 10% 甲醛固定, 常规石蜡切片, 厚度 4 μm。染色采用 SP 法, 分别滴加一抗鼠抗人 p-PKB、p-Bad 及 Bim 单克隆抗体(购于 Alexis 公司), 工作效价(稀释倍数): p-PKB 1:100; p-Bad 1:100; Bim 1:500, 并以 PBS 液置换一抗作为阴性对照。p-PKB、p-Bad 及 Bim 阳性细胞染色均为棕黄色颗粒, 定位于细胞质, p-PKB 蛋白在细胞膜上亦有着色(图 1, 图 2, 图 3)。镜下选择 10 个高倍视野的 1000 个肿瘤细胞, 计算各视野阳性细胞的平均百分率, 阳性细胞数 <5% 为阴性(0 分); 5%~20% 为弱阳性(1 分); 20%~50% 为阳性(2 分); >50% 为强阳性(50%~75% 记为 3 分; >75% 记为 4 分)。其中 2 分记为阳性。

**1.2.2 逆转录-聚合酶链反应** 1) 总 RNA 提取。取标本 100mg, Trizol 一步法提取总 RNA, 紫外分光光

度计定量后, 用于 cDNA 合成。2) 逆转录合成 cDNA。按逆转录试剂盒(大连宝生物公司产品)的要求合成 cDNA。反应条件: 65℃ 1min, 30℃ 5min, 15~30min 内匀速升温, 65℃ 30min, 98℃ 5min, 5℃ 5min。逆转录产物置于 4℃ 保存。3) PCR 扩增。反应体系为 25 μl, Bim 引物序列为 sense: 5'-ATC TCA GAG CAA TGG CTT CC-3', anti-sense: 5'-ATT CGT GGG TGG TCT TCG-3'; Bad 引物序列为: sense: 5'-GTT TGA GCC GAG TGA GCA GG-3', Anti-sense: 5'-ATA GCG CTG TGC TGC CCA GA-3'; PKB 引物序列为 sense: 5'-TCG GCT CCT GGA AAC CTC-3', anti-sense: 5'-CCC GTG CCC TTG GCT TAT-3'; -actin: sense: 5'-GAT TGC CTC AGG ACA TTT CTG-3', anti-sense: 5'-GAT TGC TCA GGA CAT TTC TG-3' (北京奥科生物技术有限责任公司合成)。反应条件为 94℃ 预变性 3min, 然后分别执行 Bim 的反应条件: 94℃ 变性 45s, 52.3℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 1min, 共 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 7min。Bad 的反应条件: 94℃ 变性 45s, 60℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 1min, 共 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 7min。PKB 的反应条件: 94℃ 变性 25s, 60℃ 退火 25s, 72℃ 延伸 45s, 共 23 个循环, 最后 72℃ 延伸 73min。取 PCR 扩增产物电泳后, 采用凝胶成像分析系统摄影, 置于 1D Kodak 成像分析系统观察扫描成像, 以 -actin 为内参照, 计算目的基因 RT-PCR 产物吸光度容积与 -actin 基因 RT-PCR 产物吸光度容积比值(A), 作为目的基因 mRNA 的相对含量, A>1 记为阳性表达。

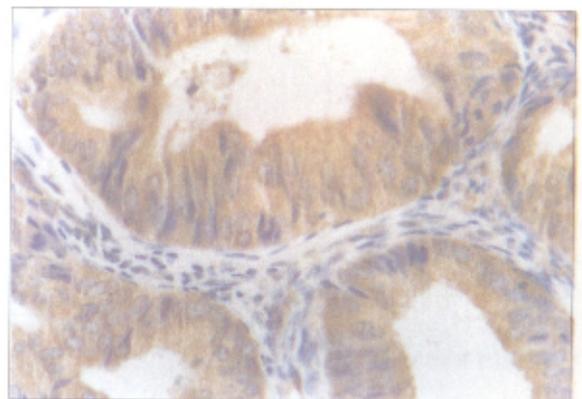


图 1 子宫内膜癌组织中 p-PKB 蛋白呈阳性表达 SP 法 ×400

1.4 统计学分析

采用 SPSS11.5 软件包进行  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  提示差异有显著性。

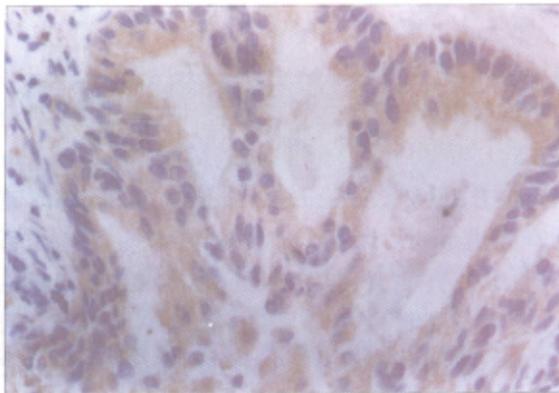


图2 子宫内膜癌组织中 p-Bad 蛋白呈阳性表达 SP 法×400

子宫内膜组织( $P < 0.001$ ) (图2, 图3)。在子宫内膜癌不同临床分期、病理分级及肌层浸润程度分组之间, 三者表达的阳性率差异无显著性( $P > 0.05$ ) (表1)。

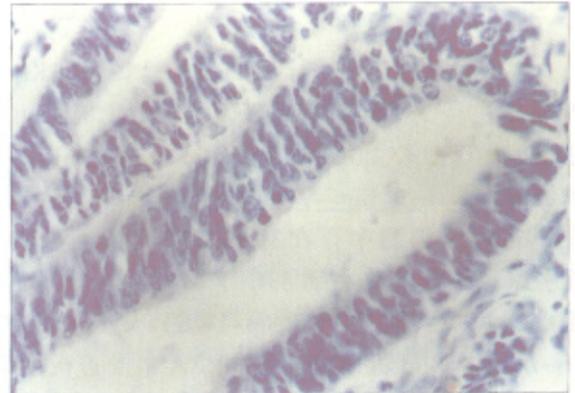


图3 子宫内膜癌组织中 Bim 蛋白呈阴性表达 SP 法×400

2 结果

2.1 子宫内膜组织中 p-PKB、p-Bad 及 Bim 蛋白表达结果

子宫内膜癌及非典型增生组织中 p-PKB 及 p-Bad 蛋白表达阳性率明显高于正常内膜组织(图1), 差异有显著性( $P = 0.001$ ;  $P < 0.001$ )。Bim 蛋白在子宫内膜癌及非典型增生组织中的表达则显著低于正常

2.2 PKB、Bad 及 Bim mRNA 在不同子宫内膜组织中表达结果

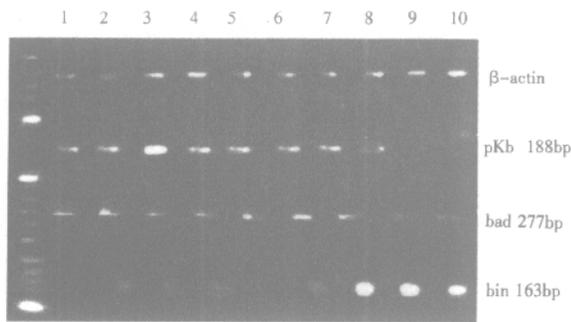
PKB mRNA 及 Bad mRNA 在正常子宫内膜、非典型增生内膜及子宫内膜癌之间表达的阳性率无明显差异( $P > 0.05$ )。只有 Bim mRNA 在正常子宫内膜组织中表达的阳性率明显高于非典型增生内膜及子宫内膜癌组织( $P = 0.006$ ) (表2) (图4)。

表1 子宫内膜组织中 p-PKB、p-Bad 及 Bim 蛋白表达阳性率 %

项目	PKB			Bad			Bim		
	阳性率	$\chi^2$	P 值	阳性率	$\chi^2$	P 值	阳性率	$\chi^2$	P 值
正常内膜组织	27.3			81.8			90.9		
非典型增生	46.2			46.2			46.2		
子宫内膜癌	61.8	4.84	0.089	43.6	5.411	0.067	32.2	10.238	0.006

表2 PKB、Bad 及 Bim mRNA 在不同子宫内膜组织中表达阳性率 %

项目	p-PKB			p-Bad			Bim		
	阳性率	$\chi^2$	P 值	阳性率	$\chi^2$	P 值	阳性率	$\chi^2$	P 值
正常内膜组织	9.1			9.1			63.6		
非典型增生	53.8			38.5			38.5		
子宫内膜癌	70.9	14.742	0.001	72.7	17.76	0.001	7.3	21.225	<0.001
临床分期									
	65.5			67.0			6.9		
	81.3			87.5			6.3		
	70.0	1.242	0.537	60.0	2.78	0.249	10.0	0.141	0.932
病理分级									
G <sub>1</sub>	65.2			73.9			13.0		
G <sub>2</sub>	75.0			70.0			0		
G <sub>3</sub>	75.0	0.621	0.733	75.0	0.623	0.941	8.3	2.724	0.256
肌层浸润									
a	66.7			77.8			11.1		
b	58.3			58.3			0		
c	75.0	0.598	0.742	75.0	1.096	0.578	12.5	1.529	0.466



1-4 为子宫内膜癌,5-7 为非典型增生内膜,  
8-10 为正常增殖期内膜

图 4 PKB、Bad 及 Bim mRNA 在不同子宫内膜组织中表达

### 3 讨论

蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) 又称丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (serine/threonine kinase, AKT), 是一种分子质量大约为 60KD 的蛋白激酶, 由 PKB 参与的经磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphoinositide 3 kinase, PI3K) 介导的信号转导通路, 并因其调节细胞的分化、凋亡而日益受到关注, 在子宫内膜细胞中存在有 PKB 参与的信号转导途径来调控细胞的生存与死亡。

BH3 域是 Bcl-2 家族的 4 个特征性同源域 (BH1-4; Bcl-2 homology domains) 之一, 是细胞凋亡的必需启动子。Bcl-2 家族仅含有 1 个 BH3 域的蛋白, 被称为仅含 BH3 结构域蛋白 (BH3-only Proteins)。到目前为止发现的所有仅含 BH3 结构域的蛋白家族成员都是促进细胞凋亡的, 这些仅含 BH3 结构域蛋白可能是整合细胞死亡与生存信号调节网中的重要部分<sup>[3]</sup>。Bad 及 Bim 均属仅含 BH3 结构域蛋白<sup>[4,5]</sup>。

PKB 通过多种机制抑制凋亡。PKB 磷酸化激活后通过磷酸化抑制促凋亡蛋白 Bad 活性, 亦可直接磷酸化相关转录因子, 负性调节促进细胞凋亡基因。研究证实, 不同的生长因子刺激后, PKB/AKT 磷酸化 Forkhead 家族转录因子, 改变其胞内定位进而抑制 Bim 等凋亡相关基因的转录<sup>[6,7]</sup>。

在子宫内膜癌变过程中, PKB 基因转录没有明显改变, 而蛋白磷酸化明显增加, 提示 PI3K/PKB 途径激活与子宫内膜癌的发生密切相关, 而在子宫内膜癌发展过程中, 该途径不再起主要作用<sup>[8]</sup>。Bad mRNA 在不同子宫内膜癌组织中表达差异不显著, 而磷酸化 Bad 蛋白在非典型增生及子宫内膜癌组织中的表达明显高于正常内膜, 说明 PI3K/PKB 途径激活

后通过磷酸化 Bad, 抑制其促凋亡活性。Bim mRNA 在正常内膜组织中的表达明显高于非典型增生及子宫内膜癌组织的表达, 提示 PKB 可能通过抑制 Bim 的转录来抑制其促凋亡活性。即 p-PKB 可通过作用于 BH3 域, 进而抑制 bcl-2 家族相关蛋白的促凋亡活性<sup>[9]</sup>。另一方面, Bim 蛋白表达在正常内膜中的表达明显高于非典型增生及子宫内膜癌组织, 而 Seward 的研究<sup>[10]</sup>证实 Bim 磷酸化后亦可抑制其促凋亡活性, 因此 PKB 激活后可能通过转录前及转录后两方面影响 Bim 活性。

综上所述, PKB 途径的激活与子宫内膜癌的发生密切相关。而其激活后可通过多种机制作用于仅含 BH3 结构域蛋白, 抑制其促凋亡活性, 导致子宫内膜过度增殖以及子宫内膜癌的发生。我们将进一步研究 PKB 对仅含 BH3 结构域蛋白的作用机制, 以期对子宫内膜癌的早期分子治疗提供理论依据。

#### 参考文献

- Harada H, Becknell B, Wilm M, et al. Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A [J]. *Mol Cell*, 1999, 3(2): 413-422
- Munir I, Fukunaga K, Kanasaki H, et al. Expression of cyclooxygenase 2 by prostaglandin E(2) in human endometrial adenocarcinoma cell line HEC-1B [J]. *Biol Reprod*, 2000, 63(3):933-941
- Lutz RJ. Role of the BH3(Bcl-2 homology 3) domain in the regulation of apoptosis and Bcl-2-related proteins [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2000, 28(2):51-56
- Jang Z, Zheng X, Lytle RA, et al. Lovastatin-induced up-regulation of the BH3-only protein, Bim, and cell death in glioblastoma cells [J]. *J Neurochem*, 2004, 89(1):168-178
- Kelekar A, Chang BS, Harlan JE, et al. Bad is a BH3 domain-containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-XL [J]. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(12):7040-7046
- Campbell RA, Bhat-Nakshatri P, Patel NM, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/akt mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(13):9817-9824
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor [J]. *Cell*, 1999, 96(6):857-868
- 杨清, 王玉, 张淑兰, 等. PTEN/PI3K 信号转导途径与子宫内膜癌生物学的相关性 [J]. *肿瘤防治杂志*, 2004, 11(6):569-572
- 杨清, 王玉, 张淑兰, 等. 子宫内膜癌组织中磷酸化蛋白激酶 B 及 Bim 蛋白表达的研究 [J]. *中华妇产科杂志*, 2004, 38(12):768-769
- Seward RJ, von Haller PD, Aebbersold R, et al. Phosphorylation of the pro-apoptotic protein Bim in lymphocytes is associated with protection from apoptosis [J]. *Mol Immunol*, 2003, 39(16):983-993

(2005-07-18 收稿)

(2006-02-21 修回)

(董恒磊校对)