

食管鳞癌组织中 PHLPP1 及 PHLPP2 的表达及其临床意义

何晓燕¹, 张志梅², 李 硕¹, 施瑞华^{1*}

(¹南京医科大学第一附属医院消化内科, 江苏 南京 210029; ²连云港市第一人民医院消化内科, 江苏 连云港 222000)

[摘要] 目的:探讨 PHLPP1 及 PHLPP2 在食管上皮内瘤变及食管鳞癌组织中的表达及其临床意义。方法:采用 qRT-PCR 方法检测 40 对食管上皮内瘤变及其正常对照组织和 63 对食管鳞癌及其正常对照组织中 PHLPP1 及 PHLPP2 mRNA 的表达情况,并探讨其表达量与临床病理资料的关系。结果:食管鳞癌组织中 PHLPP1 和 PHLPP2 mRNA 的表达水平均明显低于正常对照组织及上皮内瘤变组织($P < 0.05$)。食管上皮内瘤变组织中 PHLPP1 和 PHLPP2 mRNA 的表达水平与正常对照组织无统计学差异($P > 0.05$)。病理分级Ⅲ级的食管鳞癌患者组织中 PHLPP1 和 PHLPP2 mRNA 的表达水平均明显低于Ⅰ~Ⅱ级患者($P < 0.01$),TNM 分期Ⅲ期的食管鳞癌患者组织中 PHLPP1 和 PHLPP2 mRNA 的表达水平均明显低于Ⅰ~Ⅱ期患者($P < 0.01$)。结论:PHLPP1 及 PHLPP2 表达水平与食管鳞癌发生发展与恶性程度密切相关,有望成为食管鳞癌诊断的新靶点。

[关键词] 食管鳞癌;食管上皮内瘤变;PHLPP1;PHLPP2;癌变

[中图分类号] R735.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)02-214-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20150216

Expression and clinicopathologic significance of PHLPP1 and PHLPP2 in esophageal squamous cell carcinoma

He Xiaoyan¹, Zhang Zhimei², Li Shuo¹, Shi Ruihua^{1*}

(¹Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Gastroenterology, First People's Hospital of Lianyungang, Lianyungang 222000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression and clinicopathologic significance of PHLPP1 and PHLPP2 in esophageal intraepithelial neoplasia and esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **Methods:** qRT-PCR was used to quantify PHLPP1 and PHLPP2 mRNA expression in 40 pairs of esophageal intraepithelial neoplasia and their matched normal tissues, and 63 pairs of ESCC tissues and their matched normal esophageal tissues. The association of PHLPP1 and PHLPP2 expression with the clinicopathologic features was evaluated in 103 cases of esophageal intraepithelial neoplasia and ESCC patients. **Results:** The mRNA expression of PHLPP1 and PHLPP2 was significantly downregulated in ESCC tissue samples compared to the matched normal tissues and intraepithelial neoplasia tissues ($P < 0.05$). Levels of PHLPP1 or PHLPP2 mRNA had no significantly change in esophageal intraepithelial neoplasia compared to their matched normal tissues ($P > 0.05$). PHLPP1 and PHLPP2 were expressed at relatively high levels in ESCC with an early pathological grade (Ⅰ/Ⅱ), and markedly decreased in Grade Ⅲ tumors ($P < 0.01$). In addition, the expression of PHLPP1 and PHLPP2 between patients with TNM stage Ⅰ/Ⅱ and stage Ⅲ of ESCC tissues was statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion:** Aberrant expression of PHLPP1 and PHLPP2 was closely related to the development and progression of ESCC. PHLPP1 and PHLPP2 may act as a prognostic marker for this widespread disease.

[Key words] ESCC; esophageal intraepithelial neoplasia; PHLPP1; PHLPP2; carcinogenesis

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(02):214-217]

食管癌是世界上最常见的八大恶性肿瘤之一,其病死率居胃肠道恶性肿瘤第3位^[1]。尽管近年来内

镜等诊疗技术不断发展,食管癌5年生存率仍低于20%^[2]。根据病理组织学类型,食管癌主要分为两种:食管腺癌和食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)。这两种类型的食管癌发病率具有明显的地区特异性^[3-4]。我国正处于食管鳞癌高发地区,大约

[基金项目] 食管疾病研究创新团队(CXZZ11_0705)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: ruihuashi@126.com

90%的食管癌病理类型为鳞癌^[1]。目前虽已有大量的研究致力于食管鳞癌相关的遗传学改变^[5],但食管鳞癌的具体发病机制尚不明确,临床上可用于辅助诊断的肿瘤标志物也很少^[4]。因此,在基因水平上进一步探索食管癌发病机制,寻找特异及敏感的肿瘤标志物及治疗靶点显得至关重要。

PHLPP,富含亮氨酸的磷酸酶,由 N 端的 PH 结构域、中央的激酶催化结构域和 C 末端的调节结构域组成的一种丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶。其能使 Akt、蛋白激酶 C 以及 S6 激酶的相应保守位点直接去磷酸化,从而促进细胞凋亡和抑制细胞增殖。PHLPP 家族由 3 个磷酸酶组成,即 PHLPP1 α 、PHLPP1 β 和 PHLPP2^[6-7]。作为一种新型抑癌基因,各种研究表明 PHLPP 在胃癌等多种肿瘤中表达下调或缺失^[8-9],但在食管鳞癌中的变化情况至今尚不明确。本研究旨在探究 PHLPP 在食管上皮内瘤变(esophageal intraepithelial neoplasia, EIN)和食管鳞癌中的表达情况及其与肿瘤恶性程度的相关性。

1 对象和方法

1.1 对象

选取南京医科大学第一附属医院消化内科和普外科 2013 年 1 月~2013 年 12 月住院并手术治疗,术后病理证实为食管不典型增生或食管鳞癌的患者 103 例,年龄 36~78(60.81 \pm 8.04)岁,其中男 73 例,女 30 例。其中食管上皮内瘤变 40 例,Vienna 分型^[10]:低级别上皮内瘤变 10 例,高级别上皮内瘤变 30 例;食管鳞癌 63 例,TNM 分期: I 期 11 例, II 期 34 例, III 期 18 例。病理分级: I 级 13 例, II 级 22 例, III 级 28 例。所有患者术前均未接受放疗及其他食管手术。每对样本都包括同一患者病变组织及正常食管黏膜组织(距病变部位 5 cm 以上),标本收集后冻存于液氮。本实验获得南京医科大学伦理委员会批准。

RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒(大连宝生物工程技术有限公司)。RT-PCR 引物由上海华津生物科技有限公司合成。PHLPP1 的上下游引物分别为:5'-CCT-CATCCGCTTCTATGCAGG-3', 5'-GCATCTTGCCTT-TACGGACAT-3'; PHLPP2 的上下游引物分别为:5'-ATGGAGCAGACACACTACCACTG-3', 5'-GCAAAG-GACGAGATGTAAGTCA-3'; GAPDH 的上下游引物分别为:5'-CGGAGTCAACGGATTTGTCGTAT-3', 5'-AGCCTTCTCCATGGTGGT-GAAGAC-3'。

1.2 方法

液氮下研磨粉碎组织块,TRIzol 法提取组织 RNA。逆转录反应体系为 10 μ l; 5 \times PrimerScript^{RT} Master Mix 2 μ l, total RNA 500ng, RNase Free dH₂O up to 10 μ l; 反应条件: 37 $^{\circ}$ C 15 min; 85 $^{\circ}$ C 5 s; 4 $^{\circ}$ C。实时定量 PCR 反应体系为 10.0 μ l; SYBR Premix Ex Taq II (2 \times) 5.0 μ l, PCR 上游引物 0.4 μ l, PCR 下游引物 0.4 μ l, cDNA 2.0 μ l (300 ng), RNase Free dH₂O 2.2 μ l; 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环。PHLPP1/2 mRNA 的相对表达量以 2^{- Δ CT} 及 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算。

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件进行分析, PHLPP1/2 mRNA 的相对表达量均进行对数变换(LnX)后进行统计学分析。所有结果均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间比较用独立样本 *t* 检验或配对 *t* 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PHLPP1 和 PHLPP2 mRNA 在食管上皮内瘤变及食管鳞癌组织中的表达

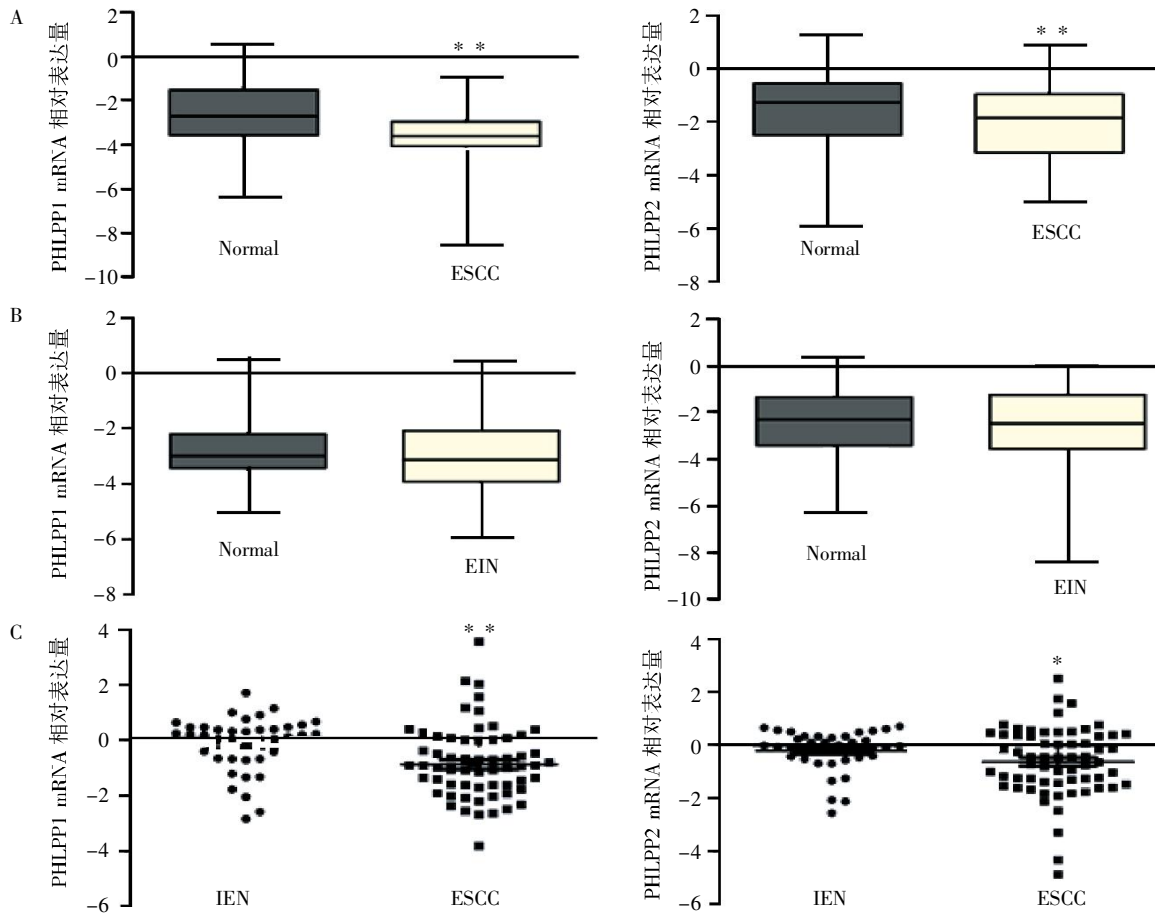
RT-PCR 结果显示, 食管鳞癌组织中 PHLPP1 和 PHLPP2 mRNA 的表达水平(LN2^{- Δ CT})均明显低于正常对照组织($P < 0.01$, 图 1A)。食管上皮内瘤变组织中 PHLPP1 和 PHLPP2 mRNA 的表达水平(LN2^{- Δ CT})均低于其正常对照组织, 但无统计学差异($P > 0.05$, 图 1B)。食管鳞癌组织中 PHLPP1 和 PHLPP2 mRNA 的表达水平(LN2^{- $\Delta\Delta$ CT})均明显低于食管上皮内瘤变组织($P < 0.05$, 图 1C)。

2.2 PHLPP1 和 PHLPP2 mRNA 的表达水平与食管鳞癌临床病理参数的关系

TNM 分期 III 期的食管鳞癌患者 PHLPP1 和 PHLPP2 mRNA 的表达水平均明显低于 I~II 期患者($P < 0.01$), 病理分级 III 级的食管鳞癌患者 PHLPP1 和 PHLPP2 mRNA 的表达水平均明显低于 I~II 级患者($P < 0.01$)。年龄 ≤ 60 岁与 > 60 岁的食管鳞癌患者 PHLPP1 和 PHLPP2 mRNA 的表达水平都无统计学差异($P > 0.05$), 男性患者与女性患者 PHLPP1 和 PHLPP2 mRNA 的表达水平也均无统计学差异($P > 0.05$, 表 1)。

3 讨论

PHLPP 为一类新型的蛋白磷酸酶, 由 Gao 等^[6]及 Brognard 等^[7]学者发现并证实为人体内一种天然抗癌基因, 在各物种中高度保守。目前发现



A:食管鳞癌组织中 PHLPP1 和 PHLPP2 mRNA 的表达水平均明显低于正常对照组织, ** $P < 0.01$; B:食管上皮内瘤变组织中 PHLPP1 和 PHLPP2 mRNA 的表达水平低于其正常对照组织, 但无统计学差异, $P > 0.05$; C:食管鳞癌组织中 PHLPP1 和 PHLPP2 mRNA 的表达水平均明显低于食管上皮内瘤变组织, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

图 1 PHLPP1 和 PHLPP2 mRNA 在正常对照组织(Normal)食管上皮内瘤变(EIM)及食管鳞癌组织(ESCC)中的表达

Figure 1 PHLPP1 and PHLPP2 mRNA expression in esophageal intraepithelial neoplasia and ESCC tissues

表 1 食管鳞癌患者 PHLPP1 及 PHLPP2 mRNA 表达水平与临床病理特征的关系

Table 1 Correlation between Clinicopathological Features and PHLPP1&2 mRNA expression in ESCC tissues ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(n=63)	PHLPP1 mRNA ^a			PHLPP2 mRNA ^a		
		LN($2^{-\Delta\Delta CT}$)	t 值	P 值	LN($2^{-\Delta\Delta CT}$)	t 值	P 值
年龄(岁)			-1.262	0.212		0.091	0.928
≥60	32	-1.167 0 ± 1.409 4			-0.595 4 ± 1.356 4		
<60	31	-0.717 8 ± 1.416 3			-0.625 5 ± 1.259 5		
性别			-1.354	0.181		-0.573	0.569
男	45	-1.098 1 ± 1.510 2			-0.669 8 ± 1.244 7		
女	18	-0.565 8 ± 1.110 1			-0.461 2 ± 1.453 4		
病理分级			-3.041	0.003		-3.712	<0.001
I~II	35	-0.489 0 ± 1.473 5			-0.115 4 ± 1.220 6		
III	28	-1.517 2 ± 1.133 1			-1.228 7 ± 1.133 8		
TNM 分期			-2.809	0.007		-3.056	0.003
I~II	45	-0.644 5 ± 1.047 8			-0.313 2 ± 0.980 2		
III	18	-1.699 6 ± 1.914 7			-1.352 8 ± 1.688 6		

PHLPP 包含两个亚型,即 PHLPP1 和 PHLPP2,其编码基因分别位于染色体 18q21.33 和 16q22.3。其中 PHLPP1 基因包含 2 个剪切变体,即 PHLPP1α 和

PHLPP1β,除了前 2 个外显子略有不同外,PHLPP1α 和 PHLPP1β 的编码结构完全相同,所以其表达产物的主体结构也完全相同,功能也十分相似^[6-7]。

AKT 信号通路参与体内诸多重要生物学过程的调控,在细胞代谢、细胞周期调控、血管生成等方面都发挥着非常重要的作用,Akt 信号通路调节紊乱,是引起包括食管癌在内的多种肿瘤的关键因素之一^[11]。Gao 等^[6-7]研究发现 PHLPP1 及 PHLPP2 均可直接使 Akt 羧基末端丝氨酸的 473 位点去磷酸化,降低 Akt 的活性,抑制 PI3K (phosphoinositide 3-kinase)/Akt 通路,促进细胞凋亡和抑制细胞增殖,从而发挥抑癌作用。近年来,部分学者对多种肿瘤的组织及细胞系进行了 PHLPP 相关检测,结果均发现了明显的 Akt 过度活化及 PHLPP 表达下降现象^[9]。然而,至今尚无研究报道 PHLPP1 或 PHLPP2 在食管鳞癌组织中的表达情况。

本研究首次发现,较正常对照及上皮内瘤变组织,PHLPP1 及 PHLPP2 的 mRNA 表达水平在食管鳞癌组织中明显下调。根据临床资料的进一步统计分析,发现食管鳞癌组织中 PHLPP1 和 PHLPP2 mRNA 的表达水平均与肿瘤恶性程度呈明显相关性,肿瘤 TNM 分期越高、病理分级越差,PHLPP1 和 PHLPP2 表达越低。上述结果说明,原发性食管鳞癌的发生发展过程伴随着 PHLPP1 及 PHLPP2 表达的逐级下调。据此本文推测,肿瘤抑制性磷酸酶 PHLPP1 及 PHLPP2 可能在食管鳞癌的发生发展过程中发挥重要作用,但该推测是否成立尚有待进一步研究探讨。近年来一些研究证明,PHLPP1 及 PHLPP2 的表达下调或缺失可促进多种肿瘤的癌变进程。Wang 等^[8]研究发现,PHLPP1 蛋白在胃癌中的表达阳性率明显低于正常对照组织,且与肿瘤的恶性程度及患者术后生存率密切相关。与 PHLPP1 蛋白阴性患者相比,PHLPP1 蛋白阳性患者的 TNM 分期较低,病理分级较好,术后生存期较长。Liu 等^[9]报道,结肠癌组织中的 PHLPP1 及 PHLPP2 表达水平亦明显下降,细胞及动物实验证明 PHLPP1 及 PHLPP2 的过表达可抑制肿瘤细胞增殖。上述研究结果显示,PHLPP1 及 PHLPP2 确实是肿瘤发生发展相关研究中具有潜力的切入点,但到目前为止,导致肿瘤中 PHLPP1 及 PHLPP2 低表达的具体机制尚不十分明确,其中基因多态性及 DNA 甲基化这两种解释的讨论较为热烈^[12]。早期研究表明,PHLPP1 及 PHLPP2 基因均位于肿瘤发生发展过程中染色体脆性部位,特别是 PHLPP1,其基因位点是食管鳞癌癌变易缺失部位^[6-7,13-14],因此对于 PHLPP1 及 PHLPP2 在食管鳞癌中的低表达,等位基因缺失可能是重要

原因之一,其他具体机制有待进一步深入研究。

总之,作为肿瘤抑制性磷酸酶,PHLPP1 及 PHLPP2 与食管鳞癌的发生发展及恶性程度密切相关,其有望成为食管鳞癌恶性程度的有效监测指标。

[参考文献]

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61 (2): 69-90
- [2] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64 (1): 9-29
- [3] Wheeler JB, Reed CE. Epidemiology of esophageal cancer[J]. Surg Clin North Am, 2012, 92 (5): 1077-1087
- [4] Zhang Y. Epidemiology of esophageal cancer[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19 (34): 5598-5606
- [5] Hou G, Lu Z, Liu M, et al. Mutational analysis of the PTEN gene and its effects in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Dig Dis Sci, 2011, 56 (5): 1315-1322
- [6] Gao T, Furnari F, Newton AC. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth[J]. Mol Cell, 2005, 18 (1): 13-24
- [7] Brognard J, Sierceki E, Gao T, et al. PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms[J]. Mol Cell, 2007, 25 (6): 917-931
- [8] Wang Z, Shu H, Wang Z, et al. Loss expression of PHLPP1 correlates with lymph node metastasis and exhibits a poor prognosis in patients with gastric cancer[J]. J Surg Oncol, 2013, 108 (7): 427-432
- [9] Liu J, Weiss HL, Rychahou P, et al. Loss of PHLPP expression in colon cancer: role in proliferation and tumorigenesis[J]. Oncogene, 2009, 28 (7): 994-1004
- [10] Dixon MF. Gastrointestinal epithelial neoplasia: Vienna revisited[J]. Gut, 2002, 51 (1): 130-13
- [11] Altomare DA, Testa JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer[J]. Oncogene, 2005, 24 (50): 7455-7464
- [12] Newton AC, Trotman LC. Turning off AKT: PHLPP as a drug target[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2014, 54: 537-558
- [13] Rakha EA, Green AR, Powe DG, et al. Chromosome 16 tumor-suppressor genes in breast cancer[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2006, 45 (6): 527-535
- [14] Ando T, Ishiguro H, Kimura M, et al. Frequent loss of the long arm of chromosome 18 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Oncol Rep, 2007, 17 (5): 1005-1011

[收稿日期] 2013-04-19