

胃癌组织中5-脂氧合酶的表达及其与磷酸化Akt的相关性

李勇, 李建英, 王小众, 邹来玉, 陈治新

李勇, 李建英, 王小众, 邹来玉, 陈治新, 福建医科大学附属协和医院消化内科 福建省福州市 350001
李勇, 福建医科大学附属协和医院2004级硕士研究生.
福建省科技人才创新基金资助项目, No. 2002J061
通讯作者: 李建英, 350001, 福建省福州市新权路29号, 福建医科大学附属协和医院消化内科. JYLi99@hotmail.com
电话: 0591-83357896-8482
收稿日期: 2006-07-08 接受日期: 2006-09-20

Expression of 5-lipoxygenase in gastric cancer and its correlation with phosphorylated Akt

Yong Li, Jian-Ying Li, Xiao-Zhong Wang, Lai-Yu Zou, Zhi-Xin Chen

Yong Li, Jian-Ying Li, Xiao-Zhong Wang, Lai-Yu Zou, Zhi-Xin Chen, Department of Gastroenterology, the Affiliated Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Supported by the Innovation Foundation for the Science and Technology Talents of Fujian Province, No. 2002J061
Correspondence to: Dr. Jian-Ying Li, Department of Gastroenterology, the Affiliated Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China. JYLi99@hotmail.com

Received: 2006-07-08 Accepted: 2006-09-20

Abstract

AIM: To investigate the expression of 5-lipoxygenase (5-LOX) in human gastric cancer and its effect on phosphorylated Akt (p-Akt).

METHODS: Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression of 5-LOX mRNA, and Western blot was conducted to evaluate 5-LOX and p-Akt protein in 30 pairs of fresh gastric cancer and adjacent normal tissues.

RESULTS: In gastric cancer, the expression of 5-LOX was significantly higher than that in the adjacent normal tissues both at mRNA (76.7% vs 40%, $P < 0.05$) and protein (56.7% vs 30%, $P < 0.05$) level. The expression of p-Akt protein was also markedly higher in the cancer tissues than that in the adjacent normal ones (56.7% vs 26.7%, $P < 0.05$). There was no obvious correlation between the expression of 5-LOX and p-Akt protein ($r = 0.186$, $P > 0.05$).

CONCLUSION: The 5-LOX protein may promote the carcinogenesis and progression of gastric cancer, which is not correlated with PI3-K/Akt signaling pathway.

Key Words: Gastric cancer; 5-lipoxygenase; Phosphorylated Akt; Reverse transcription-polymerase chain reaction; Western blot

Li Y, Li JY, Wang XZ, Zou LY, Chen ZX. Expression of 5-lipoxygenase in gastric cancer and its correlation with phosphorylated Akt. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(32):3103-3106

摘要

目的: 检测5-脂氧合酶(5-lipoxygenase, 5-LOX)在胃癌组织中的表达, 并探讨5-LOX对磷酸化Akt (phosphorylated Akt, p-Akt)表达的影响。

方法: 采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测30例新鲜胃癌及癌旁正常组织标本中5-LOX mRNA表达水平; 免疫印迹法(Western blot)检测5-LOX和p-Akt蛋白的表达水平。

结果: 5-LOX在胃癌组织中的表达显著高于癌旁正常组织(76.7% vs 40%, $P < 0.05$, mRNA水平; 56.7% vs 30%, $P < 0.05$, 蛋白水平)。p-Akt蛋白在胃癌组织中的表达也显著高于癌旁正常组织(56.7% vs 26.7%, $P < 0.05$)。相关性分析表明, 胃癌组织中5-LOX蛋白表达和p-Akt水平间无明显相关性($r = 0.186$, $P > 0.05$)。

结论: 5-LOX蛋白对胃癌的发生、发展有一定促进作用, 但与PI3-K/Akt信号通路无关。

关键词: 胃肿瘤; 5-脂氧合酶; 磷酸化Akt; 逆转录-聚合酶链反应; 免疫印迹

李勇, 李建英, 王小众, 邹来玉, 陈治新. 胃癌组织中5-脂氧合酶的表达及其与p-Akt的相关性. *世界华人消化杂志* 2006;14(32):3103-3106

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3103.asp>

0 引言

5-脂氧合酶(5-lipoxygenase, 5-LOX)是脂氧合酶同工酶的一种, 也是其中研究最为深入的一

■背景资料

胃癌是我国常见的恶性肿瘤, 近年来, 5-脂氧合酶(5-lipoxygenase, 5-LOX)和胃癌发生发展之间的相关性已经引起人们的重视。因此, 研究5-脂氧合酶在胃癌形成中的作用及其作用机制具有重要意义。

■研发前沿

目前, 有关5-LOX在恶性肿瘤中的研究主要集中在结肠癌、肺癌、乳腺癌和前列腺癌, 在胃癌中的研究较少。

■创新盘点

本文通过5-LOX与p-Akt的相关性分析,研究5-LOX对靶基因转录的调控机制。

种,在人体内分布广泛,是机体催化花生四烯酸生成生物活性分子从而影响细胞信号传导及代谢的关键酶,在多种恶性肿瘤的研究中均显示出重要作用^[1-3]。Akt,也称为蛋白激酶B,是一种原癌基因,因其与致小鼠白血病病毒癌基因v-Akt高度同源而得名^[4-5]。由于处在细胞内多种信号途径的交叉口,因此Akt在各种肿瘤发病机制的研究中越来越受到关注,国内外对其在胃癌中的作用均有研究^[6-7]。目前,有关5-LOX在胃癌中的作用及其机制的研究较少,本实验拟用RT-PCR方法检测胃癌及癌旁正常组织中5-LOX mRNA的表达,Western blot方法检测5-LOX和p-Akt蛋白表达,通过探讨二者间的相关性,研究5-LOX在胃癌发生、发展中的作用及其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 收集30例2004-06/2006-01通过外科手术切除胃癌组织的患者,其中女性5例,男性25例,平均年龄58.0岁。取癌组织及距肿瘤边缘5 cm正常癌旁胃黏膜组织(经病理证实)。液氮保存用于做RT-PCR及Western blot研究。羊抗人5-LOX多克隆抗体购于美国Santa Cruz公司(SC-8885),兔抗山羊二抗购于北京中山生物技术有限公司。小鼠抗磷酸化Akt抗体购于cell signal公司。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR检测 RNA的提取按RNA提取试剂盒说明书规范操作,提取组织总RNA,然后进行定量、检测纯度等。取RNA样品2 μ g, 42℃, 60 min, 99℃, 5 min合成cDNA。5-LOX基因上游引物: 5'-CCCGGGGCATGGAGAGCA-3', 下游引物: 5'-GCGGTGGGGCAGCGTGTC-3, 416 bp; 内参 β -actin基因上游引物: 5'-CTATTGGCAACGAGCGGTTC-3', 下游引物: 5'-CTTAGGAGTGGGGTGGCTT-3', 776 bp。取1 μ L cDNA进行PCR扩增(反应体系25 μ L)。5-LOX基因扩增条件: 94℃, 3 min; 94℃, 30 s; 63℃, 30 s; 72℃, 1 min; 32个循环; 72℃, 7 min。取8 μ L PCR产物,经12 g/L琼脂糖凝胶(含0.5 g/L溴化乙锭)中电泳分离,紫外灯下观察结果。

1.2.2 Western blot检测 将新鲜组织于冰盒上研磨,加入组织蛋白裂解液(10 g/L去氧胆酸钠, 10 g/L SDS, 150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris, 1 mg/L亮氨酸leupeptin, 1 mg/L抑肽酶Aprotinin, 1 mg/L抑肽素Pepstatin, 0.1 mg/L

表1 胃癌组织与癌旁正常组织中5-LOX mRNA的表达(n/%)

组织类型	n	5-LOX mRNA	
		-	+
胃癌组织	30	7 (23.3%)	23 (76.7%) ^a
癌旁正常组织	30	18 (60.0%)	12 (40.0%)

$\chi^2 = 8.2971$, ^a $P < 0.05$ vs 癌旁正常组织。

苯甲基磺酰氟(PMSF)1000 μ L,充分混匀。4℃, 12 000 g,离心20 min,收集上清。Bradford比色法测定蛋白浓度。每孔25 μ g蛋白上样,100 g/L SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳。蛋白印迹包括电转膜、50 g/L脱脂奶粉封闭、TBST稀释的一抗4℃过夜(5-LOX, 15-LOX-1抗体浓度分别为1:200, 1:1000)、二抗(1:6000)室温轻摇60 min,用化学发光试剂盒(北京中山生物技术有限公司)进行蛋白信号检测, β -actin作为内对照。

统计学处理 采用SPSS 11.0统计分析软件进行 χ^2 检验、Spearman's等级相关检验。 $P < 0.05$ 认为有显著性差异。

2 结果

2.1 5-LOX mRNA在胃癌组织与癌旁正常组织中的表达 RT-PCR产物电泳后观察,30例胃癌组织与癌旁正常组织中均可测到776 bp的 β -actin,其中5-LOX mRNA在胃癌组织中阳性表达率为76.7%(23/30),在癌旁正常组织中阳性表达率为40%(12/30)。上述结果经统计学分析,差异均有显著性意义($\chi^2 = 8.2971$, $P < 0.05$,表1,图1)。

2.2 5-LOX和p-Akt蛋白在胃癌组织与癌旁正常组织中的表达 在Western blot实验中,30例胃癌组织与癌旁正常组织中均可测到42 kDa的 β -actin蛋白,其中5-LOX蛋白在胃癌组织中阳性表达率为56.7%(17/30),在癌旁正常组织中阳性表达率为30%(9/30),差异有显著性意义($\chi^2 = 4.3439$, $P < 0.05$); p-Akt蛋白在胃癌组织中阳性表达率为56.7%(17/30),在癌旁正常组织中阳性表达率为26.7%(8/30),差异有显著性意义($\chi^2 = 5.5543$, $P < 0.05$)(表2,图2)。

2.3 5-LOX和p-Akt蛋白表达的相关性 5-LOX和p-Akt蛋白两者的表达呈正相关,但无统计学意义($r = 0.186$, $P = 0.326$,表3)。

3 讨论

胃癌作为我国常见的恶性肿瘤,其死亡率位居前列,然而其病因不清,临床上治疗胃癌的方法主

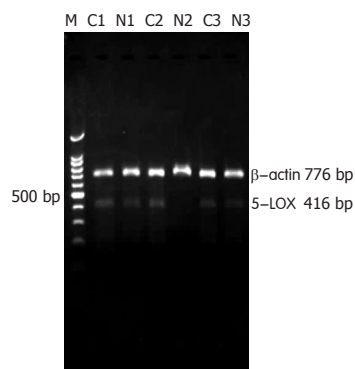


图 1 5-LOX mRNA电泳图. 图中显示C1, N1, C2, C3, N3中5-LOX表达阳性, N2表达阴性(C1, N1, C2, N2, C3, N3分别为配对的胃癌及其癌旁正常组织, M为DNA Marker).

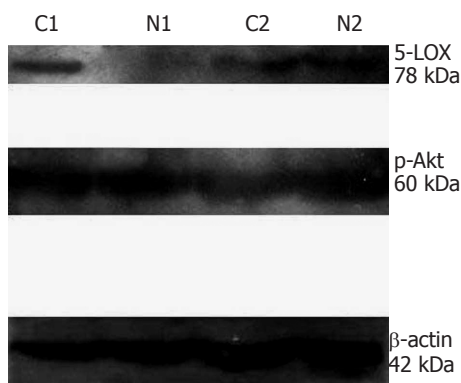


图 2 5-LOX, p-Akt蛋白在胃癌及其癌旁正常胃黏膜组织中表达. C1, C2, N2中5-LOX表达阳性, N1表达阴性; C1, N1, C2, N2中p-Akt表达阳性(C1, N1, C2, N2为两例配对的胃癌及其癌旁正常组织).

应用要点

本实验通过对5-LOX在胃癌中表达的深入研究, 为今后通过调节其活性对胃癌患者进行临床治疗奠定基础.

表 2 胃癌组织与癌旁正常组织中5-LOX, p-Akt蛋白的表达(n/%)

组织类型	n	5-LOX 蛋白		p-Akt蛋白	
		-	+	-	+
胃癌组织	30	13 (43.3%)	17 (56.7%) ^a	13 (43.3%)	17 (56.7%) ^a
癌旁正常组织	30	21 (70.0%)	9 (30.0%)	22 (73.3%)	8 (26.7%)

$\chi^2 = 4.3439$, ^a $P < 0.05$ vs 癌旁正常组织.

表 3 5-LOX蛋白和p-Akt蛋白表达的相关性(n)

5-LOX蛋白表达	n	p-Akt蛋白表达		r	P值
		-	+		
-	13	7	6	0.186	0.326
+	17	6	11		

要是采用手术为主、化疗和放疗为辅, 但效果并不理想, 缺乏特效的治疗方法. 因此加强对胃癌病因研究以开发新的有效防治胃癌的药物具有重要的临床意义. 随着研究的深入, 脂氧合酶代谢途径已经日益引起人们的广泛关注, 其中以5-LOX的研究最为深入, 普遍认为5-LOX在恶性肿瘤形成过程中具有促进作用. 人类5-LOX基因定位于第10号染色体p11.2亚带, 长度超过82 kb, 包括14个外显子和13个内含子, 可催化花生四烯酸转化为白三烯(leukotriene, LTs)和5-羟二十碳四烯酸(5-HETE)^[8-9]. 目前, 有关5-LOX的研究报道较多, 发现, 5-LOX及其主要下游产物5-HETE和LTB4在各种恶性肿瘤中高表达, 部分癌前病变亦有发现. Hong *et al*^[10]在结肠癌、肺癌、乳腺癌和前列腺癌多个细胞系中均检测到5-LOX的表达, 表达率高达100%. Hennig *et al*^[11]通过实验证实, 胰腺癌细胞系PANC-1, AsPC-1, MiaPaCa2均有5-LOX的表达; 与正常胰腺组织相比, 5-LOX在胰腺癌组织中表达显著增高. 有报道称, 5-LOX在食管癌组织中表达率为79%, 在所有8种食管癌细胞系中也都有高表达, 5-LOX抑制剂通过诱导凋亡抑制细胞增殖^[12-13]. 上述研究均提示5-LOX的促癌作用. 尽管5-LOX在多种恶性肿瘤中均有研究, 但在胃癌中的研

究报道较少.

本实验通过RT-PCR和Western blot方法检测发现, 胃癌组织中5-LOX mRNA和蛋白表达均明显高于癌旁胃组织, 从转录和翻译水平证实, 5-LOX在胃癌组织中高表达, 此结果与上述研究结果相吻合, 提示5-LOX高表达与胃癌形成密切相关. 在前期研究中我们通过免疫组化方法发现, 5-LOX 表达显著高于胃癌组织, 伴淋巴结转移者5-LOX蛋白阳性表达率显著高于无淋巴结转移者, TNM分期III-IV期患者5-LOX蛋白阳性表达率显著高于I-II期; 采用5-LOX选择性抑制剂AA861对胃癌AGS细胞株进行处理后发现, AA861可抑制其生长, 诱导其凋亡^[14]. 结合本次的实验结果, 我们认为5-LOX在胃癌发生、发展过程中有一定促进作用. 但5-LOX是如何发挥促癌作用的呢? 目前, 关于5-LOX在胃癌中促癌机制研究, 国外文献报道极少, 国内尚未见报道. Tong *et al*^[15]在胰腺癌, 食管癌细胞中外源性添加LTB4(5-LOX 的产物)进行处理, 发现LTB4

■同行评价

本文较好综述了5-LOX与p-AKT的关系,有一定理论与临床意义。

可促进Akt磷酸化,从而促进肿瘤细胞增殖,抑制凋亡。提示,5-LOX促肿瘤细胞增殖抑制其凋亡的机制可能涉及到三磷酸肌醇激酶(PI3K)/Akt级联反应。丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)激酶蛋白激酶B(PKB/Akt)是1991年发现的一种对细胞代谢、细胞增殖和迁移等生命活动中信号转导有重要功能的蛋白激酶,近年来由于他参与由生长因子激活的PI3K介导的信号转导过程而日益受到关注。Akt经磷酸化作用生成p-Akt而激活,促进细胞生长和增殖。Akt蛋白的过度活化可使细胞发生恶性转化,从而参与各种肿瘤的形成、侵袭和转移^[16-18]。因此,我们进而采用Western blot方法检测了p-Akt蛋白在胃癌和癌旁正常组织的表达,结果表明,p-Akt在胃癌组织中的表达显著增高,提示活化的Akt在胃癌发生、发展过程中有着重要作用,这与一些研究结果相似^[16-17]。将胃癌组织中5-LOX与p-Akt蛋白表达情况进行相关性分析,发现二者间无相关性,提示5-LOX的促癌作用可能与p-Akt无关。

总之,5-LOX可促进胃癌的形成与发展,这一促癌作用可能不涉及三磷酸肌醇激酶(PI3K)/Akt这一信号传导通路。究竟5-LOX在胃癌形成过程中如何发挥促癌作用,其作用机制是如何?下一步,我们拟通过体外实验进一步研究。

4 参考文献

- 1 Brash AR. Lipoygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem* 1999; 274: 23679-23682
- 2 Jampilek J, Dolezal M, Opletalova V, Hartl J. 5-Lipoxygenase, leukotrienes biosynthesis and potential antileukotrienic agents. *Curr Med Chem* 2006; 13: 117-129
- 3 Claria J, Romano M. Pharmacological intervention of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways. Impact on inflammation and cancer. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 3431-3447
- 4 Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 1997; 275: 661-665
- 5 Burgering BM, Coffey PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal

transduction. *Nature* 1995; 376: 599-602

- 6 周晓东, 于皆平, 于红刚, 于红刚, 罗和生, 吕农华, 朱莹. 蛋白激酶B在胃癌中的表达及其生物学意义. *中华消化杂志* 2005; 25: 401-405
- 7 Gao S, Yu BP, Li Y, Dong WG, Luo HS. Antiproliferative effect of octreotide on gastric cancer cells mediated by inhibition of Akt/PKB and telomerase. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2362-2365
- 8 李勇, 李建英, 王小众. 5-脂氧合酶促癌机制研究进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 800-804
- 9 谢正元, 文艺, 张吉翔. 5-脂氧合酶与肝脏疾病. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1905-1908
- 10 Hong SH, Avis I, Vos MD, Martinez A, Treston AM, Mulshine JL. Relationship of arachidonic acid metabolizing enzyme expression in epithelial cancer cell lines to the growth effect of selective biochemical inhibitors. *Cancer Res* 1999; 59: 2223-2228
- 11 Hennig R, Ding XZ, Tong WG, Schneider MB, Standop J, Friess H, Buchler MW, Pour PM, Adrian TE. 5-Lipoxygenase and leukotriene B(4) receptor are expressed in human pancreatic cancers but not in pancreatic ducts in normal tissue. *Am J Pathol* 2002; 161: 421-428
- 12 Hoque A, Lippman SM, Wu TT, Xu Y, Liang ZD, Swisher S, Zhang H, Cao L, Ajani JA, Xu XC. Increased 5-lipoxygenase expression and induction of apoptosis by its inhibitors in esophageal cancer: a potential target for prevention. *Carcinogenesis* 2005; 26: 785-791
- 13 Chen X, Li N, Wang S, Hong J, Fang M, Youselfson J, Yang P, Newman RA, Lubet RA, Yang CS. Aberrant arachidonic acid metabolism in esophageal adenocarcinogenesis, and the effects of sulindac, nordihydroguaiaretic acid, and alpha-difluoromethylornithine on tumorigenesis in a rat surgical model. *Carcinogenesis* 2002; 23: 2095-2102
- 14 邹来玉, 李建英, 王小众, 陈治新. AA861对人胃癌细胞凋亡及与5-脂氧合酶mRNA表达的影响. *福建医科大学学报* 2006; 40: 14-18
- 15 Tong WG, Ding XZ, Talamonti MS, Bell RH, Adrian TE. LTB4 stimulates growth of human pancreatic cancer cells via MAPK and PI-3 kinase pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 335: 949-956
- 16 Schlieman MG, Fahy BN, Ramsamooj R, Beckett L, Bold RJ. Incidence, mechanism and prognostic value of activated AKT in pancreas cancer. *Br J Cancer* 2003; 89: 2110-2115
- 17 Ringel MD, Hayre N, Saito J, Saunier B, Schuppert F, Burch H, Bernet V, Burman KD, Kohn LD, Saji M. Overexpression and overactivation of Akt in thyroid carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 6105-6111
- 18 Itoh N, Semba S, Ito M, Takeda H, Kawata S, Yamakawa M. Phosphorylation of Akt/PKB is required for suppression of cancer cell apoptosis and tumor progression in human colorectal carcinoma. *Cancer* 2002; 94: 3127-3134

电编 李琪 编辑 王晓瑜