

. 实验研究 .

脑胶质瘤 ATM 及 PI3K 的表达及其意义

胡志民 刘金霞 陶胜忠

【摘要】目的 探讨脑胶质瘤共济失调毛细血管扩张突变基因(ATM)及磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)的表达及其意义。方法 采用反转录-聚合酶链反应技术检测 40 例脑胶质瘤组织(WHO I ~ II 级 25 例,WHO III ~ IV 级 15 例)和 8 例非瘤脑组织 ATM 及 PI3K mRNA 的表达水平。结果 与非瘤脑组织相比,胶质瘤组织 ATM 和 PI3K mRNA 水平明显增高($P<0.05$),而且随着胶质瘤病理级别增高,ATM 和 PI3K mRNA 水平亦明显增高($P<0.05$)。结论 脑胶质瘤 ATM、PI3K 表达显著增高,且随着病理学分级的升高,其表达水平显著升高。这提示两者在胶质瘤发生、发展过程中扮演重要角色。

【关键词】胶质瘤;共济失调毛细血管扩张突变基因;磷脂酰肌醇3-激酶;基因表达

【文章编号】1009-153X(2015)01-0031-03 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 739.41; Q 786

Expressions of ATM and PI3K in human brain gliomas and their meanings

HU Zhi-min¹, LIU Jin-xia², TAO Sheng-zhong³. 1. Department of Neurosurgery, People,s Hospital of Puyang City, Puyang 457000, China; 2. Department of Pathology, People's Hospital of Puyang City, Puyang 457000, China; 3. Department of Neurosurgery, The Second Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, China

【Abstract】Objectives To explore the expressions of ataxia-telangiectasia mutated gene (ATM) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) in different grades of WHO grading gliomas and their meanings. Methods The expressions of ATM and PI3K mRNA were detected by reverse transcription polymerase chain reaction in 25 samples of WHO grades I ~ II, 15 of WHO grades III ~ IV and 8 of normal brain tissues. Results The levels of ATM and PI3K mRNA were significantly higher in WHO grades III ~ IV gliomas than those in WHO grades I ~ II ($P<0.05$), which were significantly higher than those in the normal brain tissues ($P<0.05$). Conclusions The levels of PI3K and ATM mRNA expressions are significantly higher in the gliomas than those in the normal brain tissues and are positively related to WHO grade of gliomas. It is suggested that the up-regulation of ATM and PI3K expressions may play an important role in the pathogenesis and development of the gliomas.

【Key words】Glioma; Ataxia-telangiectasia mutated gene; Phosphatidylinositol 3-kinase ; Gene expression

脑胶质瘤是严重危害人类身体健康和生命质量的常见颅内原发性肿瘤之一。目前,胶质瘤的病因及发病机制尚不清楚,但随着医学技术,尤其是分子生物学的发展,人们对胶质瘤的发生、发展有了进一步的了解。我们采用反转录-聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)技术检测了 40 例脑胶质瘤组织和 8 例非瘤脑组织中共济失调毛细血管扩张突变基因(ataxia-telangiectasia mutated gene, ATM)和磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)mRNA 的表达量,探讨它们在脑胶质瘤发生、发展中的作用,为临

床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源 选取手术切除的脑胶质瘤组织标本 40 例,其中男 23 例,女 17 例;年龄 3~70 岁,平均(40±20)岁,术前均未经放射治疗和化学药物治疗。根据 2007 年 WHO 中枢神经系统肿瘤分类标准^[1]进行病理学分级,其中 I ~ II 级 25 例,III ~ IV 级 15 例。对照组 8 例非瘤脑组织,均取自颅脑损伤、脑出血需内减压的患者。

1.2 RT-PCR 检测 mRNA 表达 提取肿瘤组织及非瘤组织总 RNA,反转录后备用。在相应的条件下进行 PCR 扩增,ATM 引物序列为,上游 5'-TATCCATCAT CCGAAAGG-3',下游 5'-GCAAGGGACACTGTAAT C-3',产物大小为 578 bp;PI3K 引物序列为,上游 5'-ATCGACAAGCGCATGAACAGC-3',下游 5' TAC CACGGAGCAGGCGTAGCAG-3',产物大小为 315

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2015.01.010
基金项目:河南省卫生厅科技创新型人才工程资助项目(201004126)
作者单位:457000 河南,濮阳市人民医院神经外科(胡志民),病理科(刘金霞);450014 郑州,郑州大学第二附属医院神经外科(陶胜忠)
通讯作者:陶胜忠,E-mail:tao2003wh@yahoo.com.cn

bp;内参β-肌动蛋白引物序列为,上游 5'-CTGGGACGACATGGAGAAAA-3',下游 5'-CTGGGACGACATGGAGAAAA 3',产物大小为 564 bp;内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)引物序列为,上游 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3',下游 5' TGGTGAAGACGCCAGTGA-3',产物大小为 138 bp。反应条件为 94 ℃ 预热 5 min,94 ℃ 变性 30 s;ATM、β-肌动蛋白退火温度为 58 ℃,GAPDH、PI3K 为 57 ℃;72 ℃ 延伸 2 min,35 个循环后 72 ℃ 10 min。采用凝胶分析软件 Gel-Pro analyzer 4.0 对 RT-PCR 产物进行图像分析,荧光条带强度用累积光密度(integrated optical density,IOD)表示,目的基因的相对表达量用目的基因的 IOD 与内参的 IOD 比值即相对累计光密度值(relative integrated optical density,RIOD)来表示。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行分析,定量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,定量资料组间比较采用 *t* 检验和单因素方差分析;相关性采用 Pearson 相关系数分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

与非瘤脑组织相比,胶质瘤组织 ATM 和 PI3K mRNA 水平明显增高($P<0.05$),而且随着胶质瘤病理级别增高,ATM 和 PI3K mRNA 水平亦明显增高($P<0.05$)。详见表 1。胶质瘤组织 ATM 和 PI3K mRNA 水平显著正相关($r=0.588,P<0.05$)

3 讨论

ATM 位于人类染色体 11q22~23,全长 184 kb,其在细胞周期调控的信号传导及 DNA 双链断裂损伤修复中扮演着极其重要的角色;PI3K 是 ATM 最主要的功能区^[3]。ATM 的异常表达在多种肿瘤组织中均能检测到。研究发现,ATM 基因异常表达,可能

与肿瘤的发生、进展有关^[2]。

我们利用 RT-PCR 技术检测胶质瘤组织 ATM 和 PI3K mRNA 表达水平,结果研究发现胶质瘤 ATM mRNA 表达水平明显增高($P<0.05$)。由此我们推测胶质瘤可能存在 ATM 突变,启动子被激活,ATM mRNA 表达增高。ATM 表达的蛋白质是细胞 DNA 损伤后反应传导通路中的中枢调控因子,DNA 损伤检控点能够检测受损或者结构异常的 DNA,促使异常基因进入凋亡程序或者启动检控点信号转导途径对其进行修复。当 ATM 启动子被甲基化时,ATM 在胶质瘤细胞中的表达降低,肿瘤细胞增殖旺盛,胶质瘤细胞对辐射的敏感性上升;去甲基化后,ATM 在胶质瘤细胞中的表达升高,肿瘤细胞增殖减缓,胶质瘤细胞的敏感性也下调^[3]。当 ATM 突变而功能受损时,受损的 DNA 很容易随细胞分裂而传入子代细胞,最终导致细胞癌变或促发细胞凋亡,表现为对放射线及其类似药物敏感。ATM 的突变和失活可以导致 DNA 双链断裂修复障碍,基因不稳定性因素增加,从而表现为对放射的高度敏感性和肿瘤易发倾向^[4]。

同时,我们发现 ATM mRNA 随着胶质瘤病理分级的增高,其表达也随着升高。其可能机制是胶质瘤的恶性程度越高,其细胞增殖越旺盛,ATM 的表达越强。在高级别胶质瘤组织中,细胞增殖失控,ATM 捕捉到 DNA 损伤信号,启动检测点信号,激活 p53 蛋白依赖和非依赖性途径参与细胞周期检测点信号传导系统的调控,进行 DNA 损伤的信号传导,使受损伤细胞停滞于各个细胞周期,并对其进行修复^[5]。未修复的 DNA 的积累对 DNA 损伤反应发挥了持续应激作用,导致重要信号通路的永久激活,最终扰乱细胞的稳态,导致其恶性增生。

PI3K mRNA 在胶质瘤中的表达趋势和 ATM mRNA 相同,PI3K/蛋白激酶 B(protein kinase B,PKB)通路在减少肿瘤化疗耐药性,增强放疗的敏感性方面扮演了重要的角色。PKB 能磷酸化糖原合成酶激酶等前凋亡蛋白,上调细胞周期素水平,使细胞不能进入凋亡程序而长期存活^[6]。在多种肿瘤组织中均有 PKB 的过度表达及活化^[7]。PI3K 在胶质瘤中的表达情况可能与 PI3K 的调节亚基 p85 和催化亚基 p110 具有类脂激酶和蛋白激酶的双重活性有着密切的联系^[8]。

另外,有研究表明 PI3K/PKB 虽然参与细胞凋亡的过程又介导细胞增生,但其在促细胞增殖方面的作用尤为突出^[9]。PI3K 基因在多种肿瘤生物学发展

表 1 ATM、PI3K 基因 mRNA 在胶质瘤和非瘤脑组织中的表达($\bar{x}\pm s$)

组织类型	例数 (例)	RIOD 值	
		ATM	PI3K
非瘤脑组织	8	0.273±0.067	0.402±0.210
胶质瘤组织	40	0.671±0.235*	0.838±0.246*
I~II 级	25	0.442±0.155*	0.631±0.217*
III~IV 级	15	0.808±0.154	0.962±0.167

注:与非瘤脑组织相应值比, $P<0.05$;III~IV 级相应值比, $P<0.05$;ATM:共济失调毛细血管扩张突变基因;PI3K:磷脂酰肌醇 3-激酶;RIOD:相对累计光密度

中具有抗凋亡作用,促进了肿瘤的恶性增殖。PI3K 的调节亚基 p85 和催化亚基 p110 共同激活 PKB,转入细胞核促使相关功能基因转录;活化的 PKB 能够磷酸化下游的底物蛋白,组成一个级联信号系统,进行信号传导的调控^[10]。恶性胶质瘤细胞可通过上调 Bcl-2 家族中抗凋亡成员的水平,同时下调促凋亡成员的水平等多种途径对抗凋亡^[11]。反义及显性负调节 PKB2 RNA 能够抑制脑胶质瘤细胞的增殖。PI3K/PKB 有抗凋亡和提高细胞的辐射抗性作用,信号通路异常激活,促进恶性增殖,逃避了机体对异常细胞的清理^[12]。在胶质瘤细胞中,PKB 被激活后,通过磷酸化下游的许多靶蛋白而调控生物学活性,作用于细胞凋亡通路的调控,引起相应细胞信号转导通路的调控紊乱,使肿瘤细胞无限制性增殖,处于无监管状态,促进肿瘤细胞存活和抗凋亡,参与调节细胞的变形和运动,促进了肿瘤的恶性增殖。

胶质瘤组织 ATM 和 PI3K mRNA 表达趋于同向,提示两者在肿瘤的发生、发展中具有协同效应。ATM 表达的蛋白质最主要的功能区为 PI3K,位于 ATM 表达的蛋白质 C 末端,此功能区主要参与细胞周期的调控以及 DNA 损伤识别和修复^[13]。ATM 具有基因组不稳定性 and 肿瘤易感性的双重特性,参与了 DNA 的损伤修复及多个细胞周期检测点(G₁/S, S 和 G₂/M)的监控。ATM 表达的蛋白质通过磷酸化和去磷酸化一系列蛋白底物如 p53 等,参与激活细胞周期检测点和 DNA 损伤后修复信号网络系统,使受损的 DNA 停止于细胞周期检测点并及时对其进行修复。在胶质瘤细胞中,激活 PI3K 信号转导通路,抑制细胞凋亡,促进血管形成和肿瘤侵袭转移,处于胶质瘤恶性进展的核心环节。

【参考文献】

[1] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system [J]. *Acta Neuropathol*, 2007, 114(5): 97-109.

[2] Kim JH, Kim H, Lee KY, *et al.* Genetic polymorphisms of ataxia telangiectasia mutated affect lung cancer risk [J]. *Human Mole Gen*, 2006, 15(7): 1181-1186.

[3] Sartor CI. Biological modifiers as potential radiosensitizers:

targeting the epidermal growth factor receptor family [J]. *Semin Oncol*, 2000, 27(6): 15-20.

[4] Grenbaek K, Worm J, Ralfkiaer E, *et al.* ATM mutations are associated with inactivation of the ARF-TP53 tumor suppressor pathway in diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Blood*, 2002, 100(4): 1430-1437.

[5] Kish S, Lu KP. A critical role for Pin2/TRF1 in ATM-dependent regulation: inhibition of Pin2/TRF1 function complements telomere shortening, radiosensitivity, and the G(2)/M checkpoint defect of ataxia-telangiectasia cells [J]. *J Biolo Chemi*, 2002, 277(9): 7420-7429.

[6] Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, *et al.* Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor [J]. *Cell*, 1999, 96: 857-868.

[7] Saglam O, Garrett CR, Boulware D, *et al.* Activation of the serine/threonine protein kinase AKT during the progression of colorectal neoplasia [J]. *Clin Colorectal Cancer*, 2007, 6 (9): 652.

[8] Djordjevic S, Driscoll PC. Structural insight into substrate specificity and regulatory mechanisms of phosphoinositide 3-kinases [J]. *Trends Biodmn Sci*, 2002, 27:426-432.

[9] Yang ZZ, Tschopp O, Di-Poi N, *et al.* Dosage-dependent effects of Akt1/protein kinase B alpha (PKB alpha) and Akt3/PKB gamma on thymus, skin, and cardiovascular and nervous system development in mice [J]. *Mol Cell Bio1*, 2005, 25(23): 10407-10418.

[10] 朱婉儿,胡长春,谢文婷,等.慢性应激对大鼠海马 Akt/FKHR1 信号通路活性的影响[J]. *心理学报*, 2007, 39(4): 656-661.

[11] Ziegler DS, Kung AL, Kieran MW. Anti-apoptosis mechanisms in malignant gliomas [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26: 493-500.

[12] 薛景,刘芬菊. PI3K/Akt 与胶质瘤辐射抗性[J]. *国外医学.放射医学核医学分册*, 2005, 29(1): 42-43.

[13] Daika GK, Lin SC, Zhao S, *et al.* DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis [J]. *Oncogene*, 1999, 18: 7883-7899.

(2014-08-08 收稿, 2014-10-19 修回)