

引用本文:杨盼,成林杰,单玮碧,等.间歇性缺氧通过上调蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白通路促进S180实体瘤的生长[J].安徽医药,2021,25(4):678-681.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.04.010.

◇临床医学◇



间歇性缺氧通过上调蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白通路促进S180实体瘤的生长

杨盼,成林杰,单玮碧,艾孜买提·肉孜江,姚巧玲

作者单位:新疆医科大学基础医学院,新疆维吾尔自治区 乌鲁木齐 830011

通信作者:姚巧玲,女,教授,博士生导师,研究方向为睡眠呼吸障碍对靶器官的损害,Email:49165627@qq.com

基金项目:国家自然科学基金项目(81860022,81560020)

摘要: 目的 探讨间歇性缺氧(Intermittent hypoxia, IH)对S180实体瘤生长的影响及其可能机制。方法 2018年3—5月,在新疆医科大学动物房购买的8周龄清洁级昆明鼠为研究对象,将16只接种S180实体瘤的小鼠采用随机数字表法分成2组:常氧组(Room air, RA)和IH组,每组8只,IH暴露两周后处死小鼠,取肿瘤组织称重量,TUNEL法检测肿瘤凋亡情况,蛋白质印迹法(Western blotting)检测丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine kinase, Akt)、p-Akt、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)及p-mTOR在RA组和IH组肿瘤组织中的蛋白表达情况。结果 IH组肿瘤组织重量明显高于RA组($P<0.05$),IH组肿瘤组织凋亡小体数为 (81.18 ± 8.92) 个,低于RA组肿瘤组织凋亡小体数 (129.75 ± 20.20) ($P<0.05$),IH组肿瘤组织中Akt、mTOR的蛋白表达与RA组差异无统计学意义,IH组肿瘤组织中p-Akt、p-mTOR的蛋白表达水平明显增加($P<0.05$)。结论 IH可促进小鼠S180实体瘤的生长,其机制可能同上调Akt/mTOR通路促进S180实体瘤的生长并抑制肿瘤组织的凋亡有关。本研究将为睡眠呼吸暂停综合征(Obstructive sleep apnea, OSA)合并肿瘤的治疗提供新的思路。

关键词: 低氧; 间歇性缺氧(IH); 肿瘤; 蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路(Akt/mTOR); 凋亡; 蛋白质印迹法(Western blotting); 小鼠

Intermittent hypoxia promotes S180 solid tumor growth by upregulating the Akt/mTOR pathway

YANG Pan, CHENG Linjie, SHAN Weibi, Aizimaiti · Rouzijiang, YAO Qiaoling

Author Affiliation: College of Basic Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang Uygur Autonomous Region 830011, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of intermittent hypoxia (IH) on the growth of S180 solid tumor and its possible mechanism. **Methods** Eight-week-old clean-grade Kunming mice purchased in the Animal Room of Xinjiang Medical University From March to May 2018 were selected as the research objects. Sixteen mice inoculated with S180 solid tumor were randomly assigned into 2 groups using a random number table: Room air (RA) group and IH group, 8 mice in each group. The mice were sacrificed after two weeks of IH exposure, tumor tissues were weighed, and the tumor apoptosis was detected by TUNEL staining, and the expressions of serine/threonine kinase (Akt), p-Akt, mammalian target of rapamycin (mTOR) and p-mTOR in tumor tissues of RA group and IH group were detected by Western blotting. **Results** The tumor weights of IH group were significantly heavier than those of RA group ($P<0.05$). The number of apoptotic bodies in tumor tissues of IH group was (81.18 ± 8.92) , which was lower than that in RA group [(129.75 ± 20.20) , $P<0.05$]. The protein expressions of Akt and mTOR in tumor tissues of IH group were not significantly different from those of RA group. The protein expression levels of p-Akt and p-mTOR in tumor tissues of IH group increased significantly ($P<0.05$) compared with RA group. **Conclusion** IH promotes the growth of S180 solid tumors in mice. The mechanism may be related to the up-regulation of Akt/mTOR pathway and the inhibition of the apoptosis of tumor tissues. This study will provide new ideas for the treatment of tumors combined with obstructive sleep apnea.

Key words: Hypoxia; Intermittent hypoxia (IH); Tumor; Threonine kinase/mammalian target of rapamycin (Akt/mTOR signaling pathway); Apoptosis; Western blotting; Mice

睡眠呼吸暂停综合征(Obstructive sleep apnea, OSA)是一种以睡眠中反复发生的上呼吸道完全或部分塌陷而造成的通气中断为特征的睡眠障碍性疾病。

可导致多个脏器的损害,包括心血管系统损害^[1],代谢功能损害^[2]及大脑认知功能障碍^[3],可严重影响患者的生活质量和寿命^[4]。其中间歇性缺氧(Intermittent hy-

poxia, IH)是OSA的主要标志和特征。

将动物暴露于IH是一种常见的OSA动物实验模型,有研究表明IH可促进肿瘤的生长和转移。Akt/mTOR(蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白)信号通路作为肿瘤领域的研究热点,被证明在多种肿瘤中异常激活,调控肿瘤细胞的存活、增殖及迁移。研究发现Akt/mTOR信号通路的活化可为细胞的生长、蛋白质的合成提供有利条件,进而为细胞的抗凋亡提供途径^[5-6]。Akt/mTOR信号通路和凋亡是否在OSA合并肿瘤的发生和进展中发挥调控作用,目前国内外均没有报道。2018年3—5月,选用在新疆医科大学动物房购买的8周龄清洁级昆明鼠制备IHS180实体瘤模型,探讨Akt/mTOR信号通路及凋亡在OSA合并肿瘤发病机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 8周龄的昆明小鼠(雄性)16只,体重(21±2)g,购自新疆医科大学实验动物中心[许可证号SCXK(新)2018-0001]。实验期间,室温在22℃左右,照明时间为9:00-21:00,小鼠自由饮水和喂食,本研究符合一般动物实验伦理学原则。

1.2 实验仪器及试剂 S180实体瘤(赠送),胎牛血清(10091-148),美国Gibco,0.25%胰酶(J112861)、双抗(SV30010)、DMEM高糖(SH30022.0)购置于美国Hyclone, TUNEL试剂盒(MK1028)购于博士德生物,BCA蛋白定量试剂盒(UB276927)、RIPA裂解液(TK274910)购置于美国Thermo,蛋白激酶B(Akt、#4865)、磷酸化Akt(p-Akt、#4060)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR、#2983)、磷酸化mTOR(p-mTOR、#5536)兔来源的单克隆抗体购置于美国CST公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养及处理 将S180实体瘤放于含10%胎牛血清及DMEM高糖的完全培养基中,置于37℃5%二氧化碳培养箱中培养,根据细胞生长情况进行传代,离心去上清,加入完全培养液吹打,使细胞悬浮于完全培养液中,并进行细胞计数,调整浓度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$,取3只正常的小鼠,每只鼠腹腔打0.2 mL的细胞悬液,制备恶性腹水瘤小鼠模型。10 d后,选取生长良好的S180荷瘤小鼠(腹水型)无菌条件下抽取腹水,以完全培养液1:1稀释成瘤细胞悬液,制成 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 的细胞悬液备用,每只小鼠接种0.2 mL(细胞数 2×10^5 个)。

1.3.2 动物模型的建立 肿瘤接种:用75%乙醇消毒小鼠腋下,细胞悬液在使用前用枪混匀,然后用1 mL无菌注射器吸取0.2 mL的悬液,并将其接种于小鼠左前肢腋下部皮下,形成圆形小皮丘,注射完停10 s,出针。

缺氧的暴露:把接种S180实体瘤的小鼠采用随机数字表法随机分为RA组和IH组。IH按照本课

题组以往的造模方式进行,小鼠放到缺氧箱中,IH循环由30 s氮气和30 s氧气组成,每个IH循环是1 min,氧的最低浓度为 $(7 \pm 1)\%$,IH暴露时间为9:00~21:00,连续2周^[7]。RA组小鼠在普通鼠笼进行饲养,IH组和RA组小鼠在同一房间,实验期间,所有小鼠自由饮水和进食。IH暴露两周后,小鼠称体质量,用4%水合氯醛麻醉,取肿瘤组织称重,一半组织液氮速冻,保存于-80℃备用;另一半组织浸泡在4%甲醛里面,用于石蜡切片。

1.3.3 肿瘤组织细胞凋亡检测 4%甲醛固定后,肿瘤组织常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片;取石蜡切片,按照TUNEL检测试剂盒说明书进行凋亡检测,每组随机选择5个视野,计数凋亡小体,取均数。

1.3.4 Western blotting检测蛋白表达 取适量肿瘤组织,加入已配好的含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液,充分混匀,剪碎,超声。冰上裂解30 min,裂解完成后,在4℃,12 000 r/min条件下离心20 min,收集上清,BCA法测定蛋白浓度。配胶,依次进行电泳和转膜,随后用1%的BSA进行封闭1 h,一抗孵育,4℃过夜(Akt、p-Akt的抗体稀释比为1:1 000,mTOR、p-mTOR及 β -actin抗体稀释比为1:2 000),TBST洗3次,每次5 min。二抗孵育1 h后,TBST洗3次,采用ECL法显色,将条带置于成像仪中,拍照并保存。蛋白条带灰度值用Image J计算、分析。

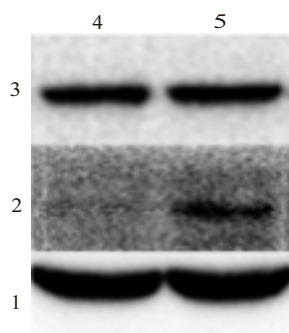
1.4 统计学方法 用SPSS 21.0软件进行统计分析,如果满足正态分布,则计数资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间采用独立样本 t 检验进行比较,如不满足正态分布,数据用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,用Mann-Whitney U 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤组织质量占比情况 小鼠瘤质量RA组和IH组小鼠肿瘤组织的质量分别为0.22(0.15, 2.30)和2.76(1.93, 4.14),IH组肿瘤组织质量高于RA组($Z = -2.143, P < 0.05$)。RA组和IH组肿瘤组织质量占小鼠体质量的比例分别为2.46%和8.87%,IH组肿瘤组织质量占小鼠体质量的百分比高于RA组,两组相比差异有统计学意义($Z = -2.429, P < 0.05$)。

2.2 肿瘤组织细胞凋亡情况 RA组肿瘤组织切片中相应凋亡小体个数为 (129.75 ± 20.20) 个,IH组肿瘤组织切片中凋亡小体个数为 (81.18 ± 8.92) 个;IH组肿瘤组织切片中凋亡小体个数低于RA组($t = 2.424, P < 0.05$)。

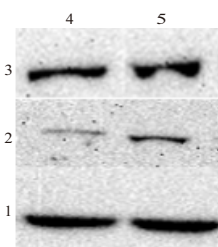
2.3 Western blotting检测Akt、p-Akt在IH和RA肿瘤组织中的表达 RA组和IH组肿瘤组织中Akt的相对表达量分别为 (0.79 ± 0.03) 、 (0.80 ± 0.03) ,两组表达量差异无统计学意义($t = -0.128, P > 0.05$)。IH组肿瘤组织中p-AKT的相对表达量 (0.62 ± 0.02) 高于RA组 (0.50 ± 0.04) ($t = -2.604, P < 0.05$)。见图1。



注:1— β -肌动蛋白;2—磷酸化 Akt;3—蛋白激酶 B;4—常氧组;5—间歇性缺氧组。

图1 常氧组(RA)与间歇性缺氧组(IH)Western blotting检测 Akt、p-Akt 及 β -actin 的表达

2.4 mTOR、p-mTOR 在 IH 组和 RA 组肿瘤组织中的表达 RA 组和 IH 组肿瘤组织中 mTOR 的相对表达量分别为 (0.64 ± 0.04) 、 (0.62 ± 0.06) , 两组差异无统计学意义 ($t=0.243$, $P>0.05$)。IH 组中 p-mTOR 的相对表达量 (0.35 ± 0.02) 高于 RA 组 (0.26 ± 0.03) ($t=-2.711$, $P<0.05$)。见图 2。



注:1— β -肌动蛋白;2—磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白;3—哺乳动物雷帕霉素靶蛋白;4—常氧组;5—间歇性缺氧组。

图2 Western blotting 检测 mTOR、p-mTOR 及 β -actin 的表达

3 讨论

近几年的研究发现 OSA 模式的间歇性缺氧可以促进肿瘤的生长和转移。2012 年西班牙学者 Al-mendros^[8]发现暴露在间歇性环境 2 周的小鼠与正常组比较其黑色素实体瘤的体积、质量均增加。Huang^[9]也发现暴露在间歇性环境 5 周的小鼠与正常组比较其肿瘤的体积、质量均增加。动物实验证明 OSA 模式间歇低氧不仅与肿瘤发生有关,且与肿瘤的生长有关。本研究发现间歇性缺氧环境暴露 2 周后, IH 组 S180 肿瘤的质量明显高于 RA 组 ($P<0.05$), IH 组 S180 肿瘤质量占小鼠体质量的百分比高于 RA 组 ($P<0.05$), 说明间歇性缺氧可促进实体瘤的生长。

肿瘤在生长过程中存在着细胞增殖与凋亡的失衡,细胞凋亡受到抑制会使细胞死亡率下降,将导致细胞数目不断增加,表现出生长的优势。因此,我们检测了肿瘤组织中的细胞凋亡情况,结果发现 IH 组 S180 肿瘤组织切片中相应凋亡小体个数低于 RA 组 ($P<0.05$)。说明 IH 所致的肿瘤细胞生长加速与 IH 条件下细胞的凋亡减少有关。

mTOR 信号通路参与凋亡、炎症和自噬等多种肿瘤的发病机制有关。研究表明,胰腺癌、白血病、膀胱癌等肿瘤可通过抑制 mTOR 活化促进细胞凋亡进程^[10-11]。我们的研究发现 IH 组 S180 肿瘤组织切片中凋亡小体个数低于 RA 组 ($P<0.05$)。说明在本实验条件下,磷酸化 mTOR 的激活可能抑制了细胞的凋亡进程,从而促进了肿瘤组织的生长。

mTOR 可被 PI3K/Akt 途径激活。活化的磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) 可在 3-磷酸肌醇依赖蛋白激酶 1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase1, PDK1) 的协同下磷酸化 Akt 使其被激活。活化的 Akt 磷酸化结节性硬化复合物-2 (Tuberous sclerosis complex-2, TSC2), 而被磷酸化的 TSC2 将从负向调控脑内 Ras 同系物 (Ras homolog enriched in brain, Rheb) 的结节性硬化复合物-1 (Tuberous sclerosis complex-1, TSC1)/TSC2 复合物中解聚,使 Rheb 活性增强,正向调控 mTOR 的活性。磷酸化 Akt 的增加, mTOR 也增加,因此, Akt 与 mTOR 可构成 Akt/mTOR 通路, Akt 由 480 个氨基酸残基组成,具有可催化及可调节活性区域,该区域可使 Akt 磷酸化成 p-Akt 而发挥各种生理功能^[12-14]。mTOR 是 Akt 的下游底物,活化的 Akt 可直接激活 mTOR 而发挥调控细胞的周期、生长增殖等作用。大量研究表明,多种实体瘤组织中均有 Akt、mTOR 蛋白的异常表达^[15-16]。有研究表明^[17-18] Akt、mTOR 磷酸化水平增加可使肿瘤细胞凋亡减少,在我们的研究中, p-mTOR 上调的同时 Akt 的磷酸化被激活,说明 Akt/mTOR 通路被激活,导致肿瘤细胞凋亡减少,这可能是肿瘤细胞凋亡减少的原因。

Akt / mTOR 信号通路不仅与肿瘤的凋亡有关,还可能与肿瘤的预后关系密切,张刚等^[19]发现宫颈癌、肺癌和胃癌的发生发展及预后变差与 Akt / mTOR 信号通路的激活关系密切。我们的结果表明 IH 暴露后, S180 实体瘤肿瘤组织 Akt/mTOR 通路上调,提示 IH 可能是 OSA 导致实体瘤预后变差的原因之一。

综上所述, IH 可促进肿瘤的生长,导致缺氧小鼠肿瘤重量增加,其机制可能同 Akt-mTOR 通路在肿瘤组织中的激活,减少肿瘤组织凋亡小体的数量,抑制了肿瘤细胞凋亡有关。

参考文献

- [1] STRAUSS S, HAVULINNA A S, TUOMI T, et al. Obstructive sleep apnea and the risk for coronary heart disease and type 2 diabetes: a longitudinal population-based study in Finland[J/OL]. BMJ Open, 2018, 8(10): e022752.DOI:10.1136/bmjopen-2018-02275.
- [2] ZHU H, XU H, CHEN R, et al. Smoking, obstructive sleep apnea syndrome and their combined effects on metabolic parameters: Evidence from a large cross-sectional study[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):8851.

- [3] DAULATZAI MA. Evidence of neurodegeneration in obstructive sleep apnea: Relationship between obstructive sleep apnea and cognitive dysfunction in the elderly[J]. J Neurosci Res, 2015,93(12):1778-1794.
- [4] 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征诊治指南(基层版)写作组. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征诊治指南(基层版)[J]. 中华全科医师杂志, 2015, 14(7):398-405.
- [5] BUCHKOVICH NJ, YU Y, ZAMPIERI CA, et al. The TORrid affairs of viruses: effects of mammalian DNA viruses on the PI3K-Akt-mTOR signalling pathway[J]. Nat Rev Microbiol, 2008,6(4):266-275.
- [6] KAUL A, CHEN YH, EMNETT RJ, et al. Pediatric glioma-associated KIAA1549; BRAF expression regulates neuroglial cell growth in a cell type-specific and mTOR-dependent manner[J]. Genes Dev, 2012,26(23):2561-2566.
- [7] YAO Q, SHIN MK, JUN JC, et al. Effect of chronic intermittent hypoxia on triglyceride uptake in different tissues [J]. J Lipid Res, 2013,54(4):1058-1065.
- [8] ALMENDROSI, MONTERRAT JM, RAMIREZ J, et al. Intermittent hypoxia enhances cancer progression in a mouse model of sleep apnea[J]. European Respiratory Journal, 2012,39(1):215-217.
- [9] HUANG MH, ZHANG XB, WANG HL, et al. Intermittent hypoxia enhances the tumor programmed death ligand 1 expression in a mouse model of sleep apnea[J]. Ann Transl Med, 2019,7(5):97.
- [10] 单广夷,孔垂泽,李军,等. 雷帕霉素对膀胱癌T24细胞增殖及侵袭能力的影响[J]. 中国医科大学学报,2011,40(4):301-303.
- [11] ASATI V, BHARTI SK, MAHAPATRA DK, et al. Triggering PI3K/Akt/mTOR axis: exploration of newer inhibitors and rational preventive strategies[J]. Curr Pharm Des, 2016,22(39):6039-6054.
- [12] MA LI, CHANG Y, YU L, et al. Pro-apoptotic and anti-proliferative effects of mitofusin-2 via PI3K/Akt signaling in breast cancer cells[J]. Oncol Lett, 2015,10(6):3816-3822.
- [13] JANKU F, HONG DS, FU S, et al. Assessing PIK3CA and PTEN in early-phase trials with PI3K/AKT/mTOR inhibitors[J]. Cell Rep, 2014,6(2):377-387.
- [14] 徐曼秋,苏贞,甄玲玲,等. 藏红花素预处理减轻大鼠胃缺血再灌注损伤作用与PI3K/Akt信号通路的关系[J]. 安徽医药, 2019, 23(9):1715-1720.
- [15] ZHAO Z, LIU H, HOU J, et al. Tumor Protein D52 (TPD52) Inhibits growth and metastasis in renal cell carcinoma cells through the PI3K/Akt signaling pathway[J]. Oncol Res, 2017,25(5):773-779.
- [16] 赵光辉,宋晓旭,刘宁,等. PI3K/AKT/MTOR 信号通路抑制剂在胃癌中的研究进展[J]. 癌症进展, 2019, 17(9):1003-1007.
- [17] 王健,李健,王勇,等. 黄芩素通过抑制PI3 K/AKT/mTOR通路诱导膀胱癌细胞凋亡[J]. 山东大学学报(医学版),2019,57(9):74-82.
- [18] 刘楠,朱琳,李纳,等. 红花多糖通过阻断PI3K/Akt/mTOR通路诱导人乳腺癌MDA-MB-435细胞凋亡的机制研究[J]. 中草药, 2018, 49(18):4374-4379.
- [19] 张刚,郭剑,郝鑫,等. PI3K/AKT/mTOR 信号通路蛋白p-AKT及p-mTOR在胃癌组织中的表达及意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2016,32(10):1149-1151,1155.

(收稿日期:2020-02-24,修回日期:2020-04-22)

引用本文:冉琪,胡亚飞,游玉峰.超声造影表现与肝硬化背景下肝细胞癌组织病理、分化程度及预后的关系分析[J].安徽医药,2021,25(4):681-685.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.04.011.

◇临床医学◇



超声造影表现与肝硬化背景下肝细胞癌组织病理、分化程度及预后的关系分析

冉琪^a,胡亚飞^a,游玉峰^b

作者单位:恩施自治州中心医院,^a超声科,^b放射科,湖北 恩施445000

通信作者:游玉峰,男,主任医师,研究方向为超声分子影像,Email:1961562648@qq.com

基金项目:国家自然科学基金(81660291)

摘要: **目的** 探讨超声造影(CEUS)表现与肝硬化背景下肝细胞癌(HCC)组织病理、分化程度及预后的关系。**方法** 选择2014年1月至2017年1月在恩施州中心医院行根治性切除术的174例肝硬化背景下HCC病人为研究对象。收集病人的一般临床资料及微血管浸润(MVI)、微血管密度(MVD)及增殖细胞核抗原(Ki-67)等病理资料。记录肝CEUS动脉期、门脉期、延迟期等增强特征。分析CEUS特征与MVI、MVD、Ki-67、肿瘤分化程度及预后的关系。**结果** Ki-67阳性组HCC病人肿瘤低/中分化的发生率90.1%(91/101)较Ki-67阴性组74.0%(54/73)显著升高($P<0.05$)。动脉期不均匀增强、门脉期低增强、延迟期低增强的HCC病人Ki-67阳性发生率[69.7%(76/109)比38.5%(25/65)、67.5%(79/117)比38.6%(22/57)、69.7%(53/76)比49.0%(48/98)]及肿瘤低/中分化发生率[90.2%(101/112)比71.0%(44/62)、89.1%(98/110)比73.4%(47/64)、88.7%(102/115)比72.9%(43/59)]显著升高($P<0.05$)。延迟期低增强的HCC病人MVI阳性发生率[80.2%(65/81)比65.6%(61/93)]显著升高($P<0.05$)。不同MVD的HCC病人间CEUS特征差异无统计学意义($P>0.05$)。动脉期不均匀增强的HCC病人早期复发的发生率[37.7%(40/106)比27.9%(19/68)]显著升高($P<0.05$)。**结论** CEUS特征与肝硬化背景下HCC病人组织病理、分化程度等显著相关,并可能有助于预测病人术后的复发情况。

关键词: 癌,肝细胞; 超声心动描记术; 肝硬化; 组织病理; 因果律; 预后