

PLAU 和 AKT1 在口腔鳞癌中的表达

孙二灿¹, 肖巧玲¹, 夏飞飞¹, 刘喆¹, 徐江², 黎昌学¹

摘要 目的 探讨激酶纤溶酶原激活剂(PLAU)和蛋白激酶 B1(AKT1)在口腔鳞癌(OSCC)及正常组织中的表达、预后和两分子在 OSCC 组织中的相关性。方法 采用免疫组化法检测 70 例 OSCC 及 50 例正常组织中 PLAU 和 AKT1 的表达水平,分析 PLAU 和 AKT1 表达与临床病理特征、预后和两分子在 OSCC 组织中的相关性,并使用生物信息学数据库进一步验证实验结果。结果 PLAU 和 AKT1 在 OSCC 组织中的表达高于正常组织($P < 0.05$);Kaplan-Meier 分析显示,PLAU 和 AKT1 低表达患者的生存时间长于高表达患者($P < 0.05$);Spearman 秩和相关检验显示,在 OSCC 组织中,PLAU 和 AKT1 表达有着较强的相关性($r = 0.357, P < 0.05$);GEPIA 生物信息学数据库分析结果与实验结果一致。结论 PLAU 和 AKT1 在 OSCC 组织中高表达,且与患者不良预后相关,在 OSCC 组织中 PLAU 和 AKT1 存在相关性。

关键词 口腔鳞癌; PLAU; AKT1; 免疫组化; 预后

中图分类号 R 739.8

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)11-1821-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.11.024

口腔鳞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是以组织浸润和淋巴结转移倾向为特征的恶性肿瘤,其发病率在所有癌症中排名第六,全球每年新增 OSCC 病例超过 20 万例^[1]。手术联合化疗可以提高 OSCC 患者的总生存期,术前化疗可缩小肿瘤,术后化疗可预防肿瘤复发转移。因此,进一步研究 OSCC 的发病机制,寻找 OSCC 预后和靶向治疗的有效分子标志物,具有重要的临床意义。

磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/AKT)信号通路调节许多不同的细胞过程。该通路的异常激活常见于肺癌、结肠癌、胰腺癌、前列腺癌、乳腺癌、

胃癌和卵巢癌^[2]。尿激酶纤溶酶原激活剂(urokinase plasminogen activator, PLAU)编码一种丝氨酸蛋白酶,该蛋白酶与其受体结合后促进蛋白质水解,促进肿瘤细胞间质的降解^[3]。因此,PLAU 在肿瘤细胞的迁移、侵袭和转移中发挥关键作用。然而,关于 PLAU 和蛋白激酶 B1(v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1, AKT1)在 OSCC 中的关系的报道较少。该研究通过检测 AKT1 和 PLAU 在 OSCC 及正常组织中的表达,探讨其与 OSCC 临床病理及预后特征的关系。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2008—2012 年在石河子大学医学院第一附属医院治疗的 106 例 OSCC 和 73 例正常组织(对照组)。课题组选取术前未接受任何治疗和其他癌症的患者,最终获取临床病理资料和随访信息完整的 70 例 OSCC 组织(OSCC 组)和 50 例正常组织制成组织(对照组)芯片,随访截止日期为 2020 年 7 月 30 日。本研究经石河子大学第一附属医院伦理委员会批准。

1.2 免疫组织化学染色 采用 EnVision 两步法,将组织芯片切成 4 μm 吸附在载玻片上去脂水合,在 EDTA 缓冲液中热诱导提取抗原,在 3% 过氧化氢中阻断内源性过氧化物酶活性,用 3% 的牛血清阻断非特异性抗原的染色,孵育一抗 PLAU(1:50,货号 ab133563)和 AKT1(1:100,货号 ab81283)(英国 Abcam 公司)在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下培养过夜,DAB 显色液显色 1 min 后苏木精复染封片。免疫组织化学染色结果由 2 名病理医师采用双盲方法进行评价,免疫反应总分(immunoreactive score, IRS)计算为阳性细胞百分比乘以细胞着色强度(表 1)。根据 IRS 值,结果分为两组,其中 ≤ 6 分为低表达组, > 6 分为高表达组。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 23.0 软件对数据进行分析,采用 χ^2 检验分析 PLAU 和 AKT1 的表达水平与患者临床病理特征的相关性,使用 Kaplan-Meier 法进行生存分析,采用 Spearman 秩和检验分

2022-05-18 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81560442);新疆维吾尔自治区研究生科研创新项目(编号:XJ2020G102)

作者单位:¹石河子大学医学院,石河子 832000

²石河子大学医学院第一附属医院口腔科,石河子 832000

作者简介:孙二灿,男,硕士研究生;

黎昌学,男,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: 2636096480@qq.com

表1 免疫组织化学评分表

| 阳性细胞 | | 着色强度 | | IRS (分) |
|--------|----|------|----|------------|
| 百分比(%) | 记分 | 强度 | 记分 | |
| <5 | 0 | 无着色 | 0 | 0~1 |
| 5~ | 1 | 黄色 | 1 | 2~4 |
| 25~ | 2 | 棕黄色 | 2 | 5~8 |
| 50~ | 3 | 棕色 | 3 | 9~12 |
| 75~ | 4 | | | |

总分 = 阳性细胞所占百分比分值 × 着色强度分值

别确定 PLAU 和 AKT1 在 OSCC 和正常组织表达的关系。P < 0.05 为差异有统计学意义。

1.4 生物信息学数据库验证 为了提高实验的可信度,使用生物信息学数据库进行验证。GEPIA 数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn/detail.php>)是一个在线分析网站,其包含数据来自 TCGA 和 GTEx 数据库的 9 736 个肿瘤样本和 8 587 个正常样本的数据^[4]。课题组首先使用 GEPIA 来研究 OSCC 和正常组织中 PLAU 和 AKT1 的表达差异,随后课题组评估 PLAU 和 AKT1 在 OSCC 中高低表达与患者预后之间的联系。最后使用 GEPIA 数据库分别验证 PLAU 和 AKT1 的表达在 OSCC 和正常组织的相关性。

2 结果

2.1 PLAU 和 AKT1 在 OSCC 中表达情况及与临床病理特征的关系 PLAU 主要分布在 OSCC 细胞胞质或(和)细胞膜上,AKT1 主要分布在 OSCC 细胞细胞核或(和)细胞胞质,均呈棕黄色或黄褐色

(图1)。PLAU 和 AKT1 在 OSCC 组织阳性表达率高于正常组织,差异有统计学意义(P < 0.01, P < 0.05),见表2,PLAU 和 AKT1 表达与 OSCC 患者年龄、性别、TNM 分期、T 分期、淋巴结转移、分化程度、吸烟史、饮酒史等均无关(P > 0.05),见表3。

表2 OSCC 及正常组织中 PLAU 和 AKT1 的表达(n)

| 项目 | 例数 | 高表达 | 低表达 | χ ² 值 | P 值 |
|---------|----|-----|-----|------------------|-------|
| PLAU | | | | 34.27 | <0.05 |
| OSCC 组织 | 70 | 46 | 24 | | |
| 正常组织 | 50 | 6 | 44 | | |
| AKT1 | | | | 41.286 | <0.05 |
| OSCC 组织 | 70 | 49 | 21 | | |
| 正常组织 | 50 | 3 | 47 | | |

2.2 OSCC 中 PLAU 和 AKT1 表达与患者的预后关系 采用 Kaplan-Meier 分析 PLAU 和 AKT1 表达是否可以作为预测 OSCC 预后的指标,并绘制生存曲线检测了 70 例有完整随访资料的 OSCC 患者的 PLAU 和 AKT1 表达水平与预后的关系。分析结果显示 PLAU 和 AKT1 高表达组患者术后生存时间短于低表达组患者,差异有统计学意义(P < 0.05),见图2。

2.3 OSCC 中 PLAU 和 AKT1 表达的关系 相关性分析显示,在 OSCC 组织样本中 PLAU 和 AKT1 呈明显相关性(r = 0.357, P = 0.002),见表4。在正常组织样本中 PLAU 和 AKT1 无明显相关性(r = 0.24, P = 0.094),其中 r 为相关系数,见表5。

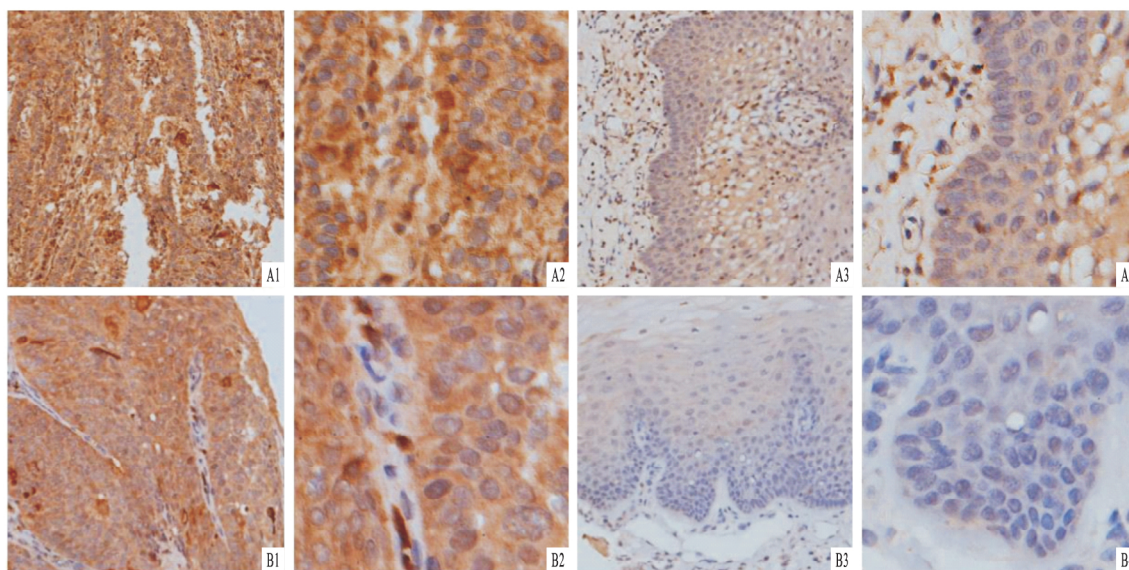


图1 PLAU 和 AKT1 在 OSCC 和正常组织中表达情况

A1、A2: PLAU 在 OSCC 组织中表达; A3、A4: PLAU 在正常组织中表达; B1、B2: AKT1 在 OSCC 组织中表达; B3、B4: AKT1 在正常组织中表达; A1、A3、B1、B3: ×100; A2、A4、B2、B4: ×400

表3 OSCC 中 PLAU 和 AKT1 表达与临床病理特征的关系(n)

| 临床参数 | n | AKT1 表达 | | | | PLAU 表达 | | | |
|---------------------------------|----|---------|-----|------------|-------|---------|-----|------------|-------|
| | | 低表达 | 高表达 | χ^2 值 | P 值 | 低表达 | 高表达 | χ^2 值 | P 值 |
| 年龄(岁) | | | | 0.193 | 0.660 | | | 0.667 | 0.414 |
| ≤60 | 21 | 8 | 13 | | | 9 | 12 | | |
| >60 | 49 | 13 | 36 | | | 16 | 33 | | |
| 性别 | | | | 0.288 | 0.592 | | | 1.835 | 0.175 |
| 男 | 37 | 6 | 31 | | | 10 | 27 | | |
| 女 | 33 | 7 | 26 | | | 14 | 19 | | |
| TNM 分期 | | | | 2.728 | 0.099 | | | 0.030 | 0.863 |
| I + II | 34 | 9 | 25 | | | 12 | 22 | | |
| III + IV | 36 | 4 | 32 | | | 12 | 24 | | |
| T 分期 | | | | 1.437 | 0.231 | | | 0 | 0.988 |
| T ₁ + T ₂ | 38 | 9 | 29 | | | 13 | 25 | | |
| T ₃ + T ₄ | 32 | 4 | 28 | | | 11 | 21 | | |
| 淋巴结转移 | | | | 0.162 | 0.688 | | | 0.169 | 0.681 |
| 无 | 60 | 9 | 51 | | | 20 | 40 | | |
| 有 | 10 | 2 | 8 | | | 4 | 6 | | |
| 分化程度 | | | | 0.452 | 0.502 | | | 0.348 | 0.555 |
| 高 + 中 | 67 | 12 | 55 | | | 13 | 54 | | |
| 低 | 3 | 1 | 2 | | | 1 | 2 | | |
| 吸烟史 | | | | 0.364 | 0.546 | | | 0.435 | 0.510 |
| 有 | 21 | 3 | 18 | | | 6 | 15 | | |
| 无 | 49 | 10 | 39 | | | 18 | 31 | | |
| 饮酒史 | | | | 0.380 | 0.538 | | | 0.001 | 0.975 |
| 有 | 9 | 1 | 8 | | | 3 | 6 | | |
| 无 | 61 | 12 | 49 | | | 21 | 40 | | |

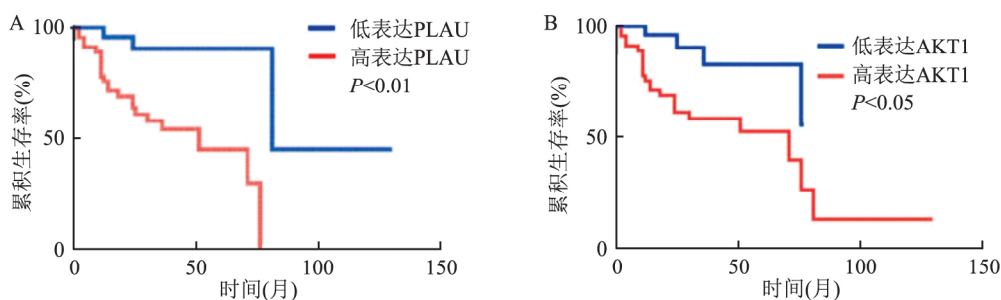


图2 PLAU 和 AKT1 表达与 OSCC 患者预后的生存分析

表4 OSCC 组织中 PLAU 与 AKT1 表达的关系

| PLAU 表达 | AKT1 表达 | | | r 值 | P 值 |
|---------|---------|-----|-------|-------|-----|
| | 低表达 | 高表达 | r 值 | | |
| 低表达 | 10 | 14 | 0.357 | 0.002 | |
| 高表达 | 11 | 35 | | | |

表5 正常组织中 PLAU 与 AKT1 表达的关系

| PLAU 表达 | AKT1 表达 | | | r 值 | P 值 |
|---------|---------|-----|-------|-------|-----|
| | 低表达 | 高表达 | r 值 | | |
| 低表达 | 43 | 1 | 0.240 | 0.094 | |
| 高表达 | 4 | 2 | | | |

2.4 PLAU 和 AKT1 在生物信息学数据库中验证结果 生物信息学数据库验证结果显示 PLAU 和 AKT1 在 OSCC 中表达高于正常组织(P < 0.05) ,见

图3A、B。同样在 OSCC 中 ,PLAU 和 AKT1 高表达的生存时间短于 PLAU 和 AKT1 低表达患者生存时间(P < 0.05) ,见图3C、D。最后 ,PLAU 和 AKT1 相关性分析显示 ,在 OSCC 中 ,PLAU 和 AKT1 表达有明显相关性(r = 0.35 ,P < 0.001) ,在正常组织中 ,PLAU 和 AKT1 表达之间没有相关性(r = 0.26 ,P = 0.088) ,见图3E、F。

3 讨论

OSCC 是一种常见的发生于口腔部位的恶性肿瘤 ,约 90% 的口腔恶性肿瘤都是 OSCC^[5]。PI3K/AKT 信号通路在细胞增殖、生长和凋亡等具有不同的作用 ,特别是在促进细胞存活和抑制细胞凋亡方面

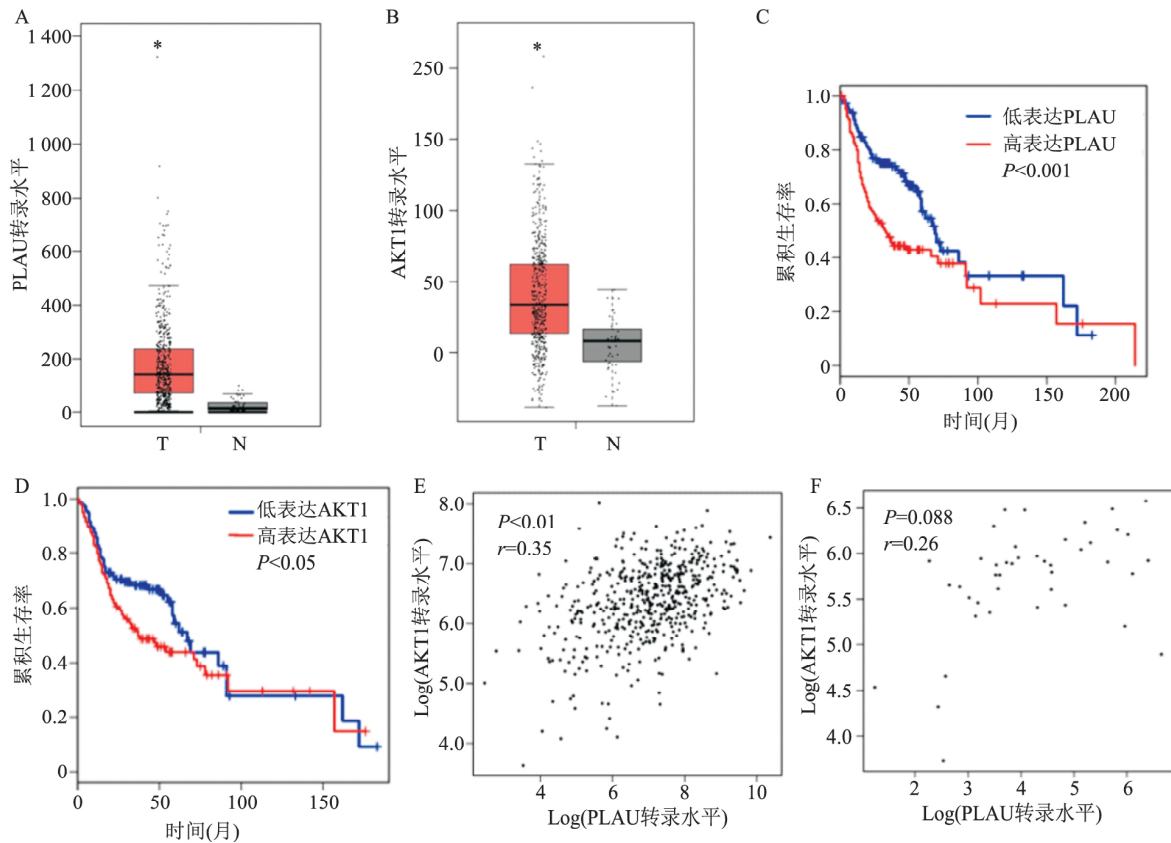


图3 GEPIA 数据库对实验结果验证

A、B: OSCC 和正常组织中 PLAU 和 AKT1 的表达差异; T: OSCC 组织; N: 正常组织; 与正常组织比较: * $P < 0.05$; C、D: PLAU 和 AKT1 的表达与 OSCC 患者预后的生存分析; E、F: OSCC 和正常组织中 PLAU 和 AKT1 表达的关系

发挥着重要作用^[6]。AKT 蛋白家族是 PI3K/AKT 信号通路的关键蛋白,其包括 AKT1、AKT2 和 AKT3 三个亚型^[7],虽然各亚型在结构上有显著的相似性,但其功能却存在很大差异^[8]。研究^[9]显示 AKT1 在细胞存活、增殖、肿瘤发育、血管生成和肿瘤转移中发挥重要作用。PLAU 是一种能将纤溶酶原转化为纤溶酶的丝氨酸蛋白酶,其在喉癌、胃癌和肝癌表达升高,同时 PLAU 的表达升高与其不良预后有关^[10-11]。此外,PLAU 可促进纤维蛋白溶解和细胞外基质降解,从而导致癌细胞扩散和转移与 PLAU 表达密切相关。然而,PLAU 和 AKT1 在 OSCC 中的功能和机制依然需要进一步探讨。

本研究结果显示,PLAU 和 AKT1 在 OSCC 中表达高于正常组织,表明 PLAU 和 AKT1 高表达在 OSCC 的发生发展起重要作用。随后课题组对 PLAU 和 AKT1 在 OSCC 中的表达与肿瘤分化、TNM 分期、淋巴结转移、性别、年龄、肿瘤大小、饮酒史和吸烟史等临床资料进行相关性分析,结果显示与上述临床资料无明显相关性,这可能与课题组收集样本过少和随访时间较短有关,需要继续收集病例和不断随

访。另外,PLAU 和 AKT1 单独不能影响 OSCC 的发展和分化,需和其他分子一起作用,这可以做进一步研究探索。Kaplan-Meier 法对患者生存分析显示 PLAU 和 AKT1 高表达组的术后生存时间明显短于低表达组,证明了 PLAU 和 AKT1 可以用来判断 OSCC 患者预后。

课题组还研究了 OSCC 中 PLAU 和 AKT1 之间的关系。PI3K/AKT 信号通路参与肿瘤生长和血管生成,并能反映肿瘤的恶性程度^[12]。此外,有研究^[13]表明 PLAU 可通过调节 PI3K/AKT 信号通路促进血管内皮细胞生成。这些表明 PI3K/AKT 通路 与 PLAU 存在相关性。与报道一致,课题组发现在 OSCC 中 PLAU 和 AKT1 之间存在显著关联。这些结果提示 PLAU 和 AKT1 共同促进了 OSCC 的发生, PLAU 和 PI3K/AKT 信号通路在 OSCC 中存在着某种联系。

为了提高本研究的可信度,使用生物信息学数据库对 PLAU 和 AKT1 在 OSCC 和正常组织的差异性表达进行验证,在 OSCC 中,PLAU 和 AKT1 表达明显升高,且高表达 PLAU 和 AKT1 患者生存时间

明显缩短,PLAU和AKT1在OSCC和正常组织中相关性分析进行验证,生物信息学数据库验证结果与实验结果一致,提示着PLAU和AKT1在OSCC中具有潜在的研究价值。

参考文献

- [1] He L H, Ping F, Fan Z N, et al. Salivary exosomal miR-24-3p serves as a potential detective biomarker for oral squamous cell carcinoma screening[J]. *Biomed Pharmacother* 2020, 121: 109553.
- [2] Rascio F, Spadaccino F, Rocchetti M T, et al. The pathogenic role of PI3K/AKT pathway in cancer onset and drug resistance: An updated review[J]. *Cancers (Basel)* 2021, 13(16): 3949.
- [3] Mahmood N, Mihalciou C, Rabbani S A. Multifaceted role of the urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR): diagnostic, prognostic, and therapeutic applications [J]. *Front Oncol* 2018, 12(8): 24.
- [4] Tang Z F, Li C W, Kang B X, et al. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses [J]. *Nucleic Acids Res* 2017, 45(W1): W98–102.
- [5] 吴江恩, 后军, 薛浩伟, 等. BEX1和BEX4在口腔鳞状细胞癌中的表达与临床意义[J]. *安徽医科大学学报* 2021, 56(8): 1295–9.
- [6] Alwhaibi A, Verma A, Adil M S, et al. The unconventional role of AKT1 in the advanced cancers and in diabetes-promoted carcinogenesis [J]. *Pharmacol Res* 2019, 145: 104270.
- [7] Honardoost M, Hosseini R S M A. Triangle of AKT2, miRNA, and tumorigenesis in different cancers [J]. *Appl Biochem Biotechnol* 2018, 185(2): 524–40.
- [8] Sahlberg S H, Mortensen A C, Haglöf J, et al. Different functions of AKT1 and AKT2 in molecular pathways, cell migration and metabolism in colon cancer cells [J]. *Int J Oncol* 2017, 50(1): 5–14.
- [9] Hinz N, Jücker M. Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: a comprehensive review [J]. *Cell Commun Signal* 2019, 17(1): 154.
- [10] Lin M S, Zhang Z, Gao M J, et al. MicroRNA-193a-3p suppresses the colorectal cancer cell proliferation and progression through downregulating the PLAU expression [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 5353–63.
- [11] Ai C, Zhang J X, Lian S Y, et al. FOXM1 functions collaboratively with PLAU to promote gastric cancer progression [J]. *J Cancer*, 2020, 11(4): 788–94.
- [12] Chen X, Wang W, Li Y F, et al. MYSM1 inhibits human colorectal cancer tumorigenesis by activating miR-200 family members/CDH1 and blocking PI3K/AKT signaling [J]. *J Exp Clin Cancer Res* 2021, 40(1): 341.
- [13] Tang J, Wang J, Fan L, et al. cRGD inhibits vasculogenic mimicry formation by down-regulating uPA expression and reducing EMT in ovarian cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(17): 24050–62.

Expression of PLAU and AKT1 in oral squamous cell carcinoma

Sun Ercan¹, Xiao Qiaoling¹, Xia Feifei¹, Liu Zhe¹, Xu Jiang², Li Changxue¹

(¹School of Medicine Shihezi University Shihezi 832000; ²Dept of Stomatology, The First Affiliated Hospital of Shihezi University Medical College Shihezi 832000)

Abstract Objective To investigate the expression and prognosis of urokinase plasminogen activator (PLAU) and v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 (AKT1) in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and normal tissues and the correlation of PLAU and AKT1 in OSCC tissues. **Methods** The expression levels of PLAU and AKT1 in 70 cases of oral squamous cell carcinoma and 50 cases of normal tissues were detected by immunohistochemical method, and the correlation between PLAU and AKT1 expression and clinicopathological features and prognosis as well as the correlation between PLAU and AKT1 expression in OSCC tissues was analyzed, and the results were further verified by bioinformatics database. **Results** The expression of PLAU and AKT1 in OSCC tissues was higher than that in normal tissues ($P < 0.05$). Kaplan–Meier analysis showed that patients with low PLAU and AKT1 expression had longer survival time than those with high AKT1 expression ($P < 0.05$). Spearman rank sum correlation test showed that there was a strong correlation between PLAU and AKT1 expression in OSCC tissues ($r = 0.357$, $P < 0.05$). GEPIA bioinformatics database analysis results are consistent with experimental results. **Conclusion** PLAU and AKT1 are highly expressed in OSCC tissues and are associated with poor prognosis of patients. There is a correlation between PLAU and AKT1 in OSCC tissues.

Key words oral squamous cell carcinoma; PLAU; AKT1; immunohistochemistry; prognosis