

AKT 和 HK2 在喉鳞状细胞癌中的表达及意义

王艳雷,徐 鸥,单春光,任秀敏,王亚波

(河北医科大学第二医院 耳鼻咽喉科,河北 石家庄 050000)

摘 要: **目的** 探讨丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 AKT(the serine/threonine kinase, also known as protein kinase B, PKB)、己糖激酶 2(hexokinase 2, HK2)在喉鳞状细胞癌组织及癌旁组织中的表达,分析其与喉癌发病诸病理因素间的相互关系。**方法** 采用免疫组化 Streptavidin-peroxidase(SP)法检测 30 例喉癌患者的癌组织中 AKT 和 HK2 蛋白的表达情况,同期选取其癌旁组织作为对照。**结果** AKT、HK2 蛋白在喉癌组织中高表达,与肿瘤的分化程度和有无淋巴结转移密切相关,差异具有统计学意义($P<0.05$);AKT、HK2 蛋白的阳性表达与患者的年龄、肿瘤发生部位以及临床分期无关($P>0.05$);喉鳞癌组织中 AKT 与 HK2 的表达呈正相关($r=0.424, P=0.019$)。**结论** 喉鳞癌组织中 AKT、HK2 蛋白高表达与肿瘤的侵袭和转移密切相关,可提示预后不良。

关 键 词: AKT;HK2;免疫组化;喉鳞癌;糖酵解

中图分类号:R739. 65 文献标识码:A [中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2017,23(3):196-201,206]

Expressions and clinical significances of AKT and HK2 in laryngeal squamous cell carcinoma

WANG Yan-lei, XU Ou, SHAN Chun-guang, REN Xiu-min, WANG Ya-bo

(Department of Otolaryngology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract: **Objective** To explore the expressions of serine/threonine kinase AKT/PKB and hexokinase-2 (HK2) in laryngeal squamous cell carcinoma, and study the relationship between their expressions and all pathological factors of this tumor. **Methods** Immunohistochemical Streptavidin-peroxidase (SP) method was used to examine the expressions of AKT and HK2 in 30 specimens of laryngeal squamous cell carcinoma and 30 of para-carcinoma tissue. **Results** The expressions of AKT and HK2 in carcinoma specimens were higher than those in para-carcinoma tissues, and their expressions were closely related with differentiation and lymphatic metastasis of the tumor (all $P<0.05$). The expressions of AKT and HK2 were not related to patients' age, primary position and clinical stage of the tumor (all $P>0.05$). Spearman's rank correlation analysis showed that the expression of AKT was positively correlated with that of HK2 ($r=0.424, P=0.019$). **Conclusion** In laryngeal squamous cell carcinoma, the expressions of AKT and HK2 are significantly related with invasion and metastasis, which prompts poor prognosis of the tumor.

Key words: AKT; HK2; Immunohistochemistry; Laryngeal squamous cell carcinoma; Glycolysis

[Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery, 2017, 23(3):196-201, 206]

喉癌(carcinoma of the larynx)是头颈部常见的恶性肿瘤,其发病率占全身恶性肿瘤的1%~2%,其治疗手段主要以手术为主,辅以放疗、化疗等治疗措施,早期治疗效果良好,晚期则效果差。近十几年来,随着分子生物学、细胞生物学、肿瘤免疫学的发展,

使肿瘤生物治疗成为喉癌治疗的第4种方式,由此需要我们从细胞代谢水平进行更进一步的探索。

目前研究发现,糖代谢紊乱在癌症的发生发展中有着重要的作用。糖酵解是生物体内普遍存在的能量代谢过程,指葡萄糖在氧气不充足的条件下经过一系列反应,生成丙酮酸进而还原成乳酸的过程,也叫无氧氧化。然而在许多恶性肿瘤细胞中,即使在供氧充足的条件下,糖酵解代谢也异常活跃且成为肿瘤细胞获得能量的主要途径,称为 Warburg 效

基金项目:河北省自然科学基金(2016206535);河北省医学科学研究重点课题计划(20160120)。
作者简介:王艳雷,女,硕士,住院医师。
通信作者:徐 鸥,Email:xuou1978@sina.com

应。这一效应成为了许多恶性肿瘤的显著特征^[1]。近年来,探索通过阻断糖酵解途径而抑制癌细胞中能量的生成从而治疗恶性肿瘤的策略正备受关注。糖酵解过程中的重要因子葡萄糖转运体(glucose transporter, GLUT),己糖激酶(hexokinase, HK),丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK),乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)等在许多癌细胞中呈高表达,其中,HK 在喉癌中的研究还比较少。磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)-AKT 即蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB)通路,也就是 PI3K-AKT 通路,参与了糖酵解酶 HK 的上游调控,与肿瘤关系密切^[2]。

本实验采用免疫组化 SP 法检测喉癌组织与癌旁组织中 AKT 和 HK2 的表达,采用统计学软件进行分析,探讨二者与喉癌发病诸病理因素间的相互关系,从而明确 AKT 和 HK2 在喉鳞状细胞癌中的作用及其临床意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 标本来源 选取2012年2月~2013年5月在河北医科大学附属第二医院耳鼻咽喉科收治的喉鳞状细胞癌患者共30例,其中男29例,女1例;年龄49~72岁,平均年龄(61.5 ± 8.7)岁。所有患者均有完整的临床病例资料,手术前均经病理检查证实为喉鳞状细胞癌,且所有患者术前均未经过放化疗。按2002年国际抗癌协会(UICC)TNM 分类标准进行临床分期:I、II期9例,III、IV期21例;按肿瘤分化程度分级:高分化18例,中、低分化12例;经病理确认有颈部淋巴结转移11例,未转移19例;按肿瘤发生部位分组:声门型19例,声门上型9例,声门下型2例;按年龄将其分组:<60岁组的标本13例, ≥ 60 岁组的标本17例。30例癌旁组织取自距癌组织>0.5 cm处(经病理证实均为鳞状上皮)。

1.1.2 主要试剂及来源 小鼠抗人 HK2 单克隆抗体,武汉博士德生物工程有限公司,产品货号:BM1911 兔抗人 AKT 多克隆抗体,武汉博士德生物工程有限公司,产品货号:BA0631。试剂盒(SP-9000),购于北京中杉金桥生物有限公司。浓缩型 DAB 试剂盒,购于北京中杉金桥生物有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 采用链霉素抗生素蛋白-过氧化酶法(SP 法) 检测30例喉鳞癌组织及癌旁组织中 AKT 蛋

白、HK2 蛋白的表达情况。

1.2.2 载玻片及标本的处理 所有载玻片均经重铬酸钾硫酸溶液浸泡48 h后用自来水冲洗干净,60℃烤箱烘干。95%酒精溶液浸泡24 h后晾干,均匀涂抹5%多聚赖氨酸,晾干,4℃冰箱保存以备用。

①标本固定和包埋:所有标本收集后立即放入4%多聚甲醛固定24 h,分别浸泡于70%乙醇30 min,80%乙醇30 min,90%乙醇30 min 2次,95%乙醇30 min 2次,100%乙醇30 min 2次,二甲苯透明30 min 2次,55℃石蜡30 min 2次,脱水,浸蜡,用铜制模具包埋组织块;②蜡块切片:蜡块切片前应置于冰箱内先冷却10~15 min,将组织蜡块上机后先粗切标本,待暴露出组织最大切面后,连续旋转切出蜡片带,切片厚5 μm ,将蜡片带置于展片仪水盒内,控制水温45℃左右,待蜡片带内组织展平后,进行分片,捞片,将厚度5 μm 的组织切片附于经多聚赖氨酸附膜的载玻片上,60℃过夜。

1.2.3 免疫组化步骤 ①脱蜡,入水:将切片浸于二甲苯中5 min 2次,100%乙醇5 min 2次,95%乙醇5 min 2次,90%乙醇5 min 2次,85%乙醇5 min 2次,75%乙醇5 min 2次,自来水冲洗,PBS洗2次;②1%甲醇双氧水,室温10 min,蒸馏水洗1次,0.1 MPBS洗5 min $\times$ 3次;③切片上滴加抗原修复液,室温10 min,0.1 MPBS洗5 min $\times$ 3次;④切片上滴加正常山羊血清封闭液。甩去多余液体,不洗;⑤切片上滴加第一抗体(通过预试验选定效价比为1:80),4℃过夜,0.1 MPBS洗5 min $\times$ 3次;⑥切片上滴加生物素化第二抗体(IgG),37℃ 20 min,0.1 MPBS洗5 min $\times$ 3次;⑦切片上滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液(S-A/HRP),37℃ 20 min,0.1 MPBS洗5 min $\times$ 3次;⑧DAB显色:使用DAB显色试剂盒1 ml蒸馏水加显色剂A、B、C各1滴,混匀,加至标本上,显色6 min,充分水洗;⑨苏木素复染细胞核1 min,充分水洗,1%盐酸酒精分化,1%胺水返蓝,充分水洗,经70%乙醇5 min,80%乙醇5 min,90%乙醇5 min 2次,95%乙醇5 min 2次,100%乙醇5 min 2次脱水,二甲苯透明5 min 2次,中性树脂封片,通风晾干。

1.3 结果判断

以 PBS 代替一抗作为阴性对照,结果由两名病理科医师与实验者读片,如有异议复读讨论一致后确定。AKT 蛋白、HK2 蛋白染色阳性表达主要定位于细胞的胞浆内,表现为胞浆内出现棕色或黄色颗粒。对每张切片在高倍镜下至少随机观察5个不重

复的视野,判断细胞着色的强度和着色率,评分标准:按阳性细胞百分比将 0、1% ~ 10%、11% ~ 50%、51% ~ 80%、81% ~ 100% 分别计 0、1、2、3、4 分。按染色强度将紫蓝色(阴性)、黄色(弱阳性)、棕黄色(阳性)、棕褐色(强阳性)分别计 0、1、2、3 分。最终评分为两个指标的乘积,0 分为阴性,1 ~ 5 分为弱阳性,≥6 分为强阳性。弱阳性和强阳性统称为阳性。

1.4 统计学处理

所有数据均采用 SPSS 17.0 统计软件分析,蛋白阳性表达率与其它临床病理参数的相关性采用 χ^2 检验、精确概率法分析,AKT 与 HK2 蛋白表达间的关系采用 Spearman 等级相关分析检测,以双侧 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AKT、HK2 在喉癌组织与癌旁组织中的表达

AKT 表达阳性表现为细胞质着色,阳性细胞呈棕黄色颗粒状或细网状,色泽深浅不等,阴性表现为紫蓝色颗粒。AKT 在喉癌组织中的阳性表达率为 66.7% (20/30) (图 1A),在癌旁组织中表达率为 20% (6/30) (图 1B),两组间比较,差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 13.303, P = 0.000, P < 0.05$)。

HK2 表达阳性表现为细胞质着色,阳性细胞呈棕色或淡黄色颗粒状,色泽深浅不一,在癌组织中呈团块聚集或不规则分布,阴性表现为紫蓝色颗粒。HK2 在喉癌组织中的阳性表达率为 50.00% (15/30) (图 2A),在癌旁组织中表达率为 13.33% (4/30) (图 2B),两组间比较,差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 9.320, P = 0.002, P < 0.05$)。

2.2 AKT、HK2 在喉鳞癌组织中的表达与临床特征的关系

在临床分期 T1、T2 期喉癌组织中,AKT 阳性表达率为 77.78% (7/9),在 T3、T4 期喉癌组织中,Nrf2 阳性表达率为 61.91% (13/21),二者比较差异无显著统计学意义 ($\chi^2 = 0.714, P = 0.398, P > 0.05$)。根据喉癌的分化程度把喉癌分成高分化癌、中低分化癌两类。AKT 阳性表达率分别为 50.00% (9/18) 和 91.67% (11/12),经统计学分析,两组间差异显著 ($\chi^2 = 5.625, P = 0.018, P < 0.05$)。根据发生部位分为声门型、声门上型和声门下型,声门型喉癌组织 AKT 阳性表达率为 73.68% (14/19),声门上和声门下型喉癌组织 AKT

阳性表达率为 54.55% (6/11),二者比较差异无显著统计学意义 ($\chi^2 = 1.148, P = 0.284, P > 0.05$)。AKT 在有淋巴结转移者癌组织中阳性表达率是 90.91% (10/11),在无淋巴结转移者癌组织中阳性表达率为 52.63% (10/19),经统计学分析,AKT 的阳性表达与淋巴结转移有关 ($\chi^2 = 4.593, P = 0.032, P < 0.05$)。喉癌组织中 AKT 的阳性表达与发病年龄未见明显相关性 ($\chi^2 = 1.697, P = 0.193, P > 0.05$)。具体数据见表 1。

在 T1、T2 期喉癌组织中,HK2 阳性表达率为 33.33% (3/9),在 T3、T4 期喉癌组织中,HK2 阳性表达率为 57.14% (12/21),二者比较差异无显著统计学意义 ($\chi^2 = 1.429, P = 0.232, P > 0.05$)。HK2 在有淋巴结转移者癌组织中阳性表达率是 81.82% (9/11),在无淋巴结转移者癌组织中阳性表达率为 31.58% (6/19),经统计学分析,HK2 的阳性表达与淋巴结转移有关 ($\chi^2 = 7.033, P = 0.008, P < 0.05$)。在高分化组,HK2 阳性表达率为 33.33% (6/18),在中、低分化组,HK2 阳性表达率为 75.00% (9/12),二者比较差异有显著统计学意义 ($\chi^2 = 5.000, P = 0.025, P < 0.05$)。声门型喉癌组织 HK2 阳性率为 42.11% (8/19),声门上和声门下型喉癌组织 HK2 阳性率为 63.64% (7/11),二者比较差异无显著统计学意义 ($\chi^2 = 1.292, P = 0.256, P > 0.05$)。喉癌组织中 HK2 的阳性表达与年龄未见明显相关性 ($\chi^2 = 1.222, P = 0.269, P > 0.05$)。具体数据见表 2。

表 1 AKT 在喉鳞状细胞癌组织中的表达与临床特征间的关系 (例)

临床病理参数	例数	强阳性 (≥6 分)	弱阳性 (1~5 分)	阴性 (0 分)	χ^2	P
年龄						
<60 岁	13	3	4	6	1.697	0.193
≥60 岁	17	6	7	4		
癌旁组织	30	1	5	24	13.303	0.000*
癌组织	30	9	11	10		
T 分级						
T ₁ 、T ₂	9	2	5	2	0.714	0.398
T ₃ 、T ₄	21	7	6	8		
分化程度						
高分化	18	4	5	9	5.625	0.018*
中、低分化	12	5	6	1		
临床分型						
声门型	19	5	9	5	1.148	0.284
声门上(下)型	11	4	2	5		
淋巴结转移						
有	11	6	4	1	4.593	0.032*
无	19	3	7	9		

注: * $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义

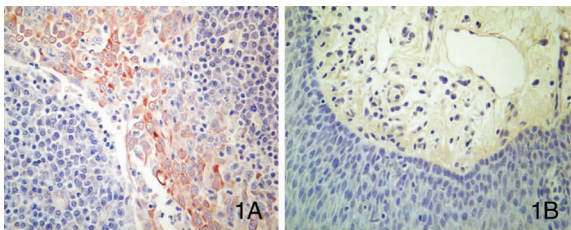


图1 AKT 在喉鳞癌组织和癌旁组织中的表达 (SP × 400) A:AKT 在喉癌组织中的阳性表达;B: AKT 在癌旁组织中的阴性表达

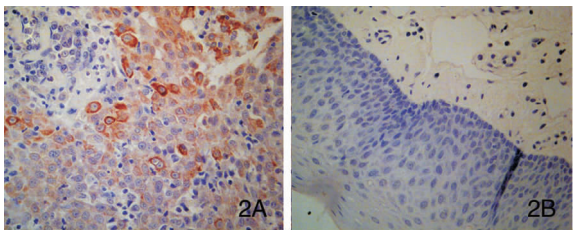


图2 HK2 在喉鳞癌组织和癌旁组织中的表达 (SP × 400) A: HK2 在喉癌组织中的阳性表达;B: HK2 在癌旁组织中的阴性表达

表 2 HK2 在喉鳞状细胞癌组织中的表达
与临床特征间的关系 (例)

临床病理参数	例数	强阳性 (≥6 分)	弱阳性 (1~5 分)	阴性 (0 分)	χ^2	P
年龄						
<60 岁	13	4	4	5	1.222	0.269
≥60 岁	17	5	2	10		
癌旁组织	30	2	2	26	9.320	0.002 *
癌组织	30	9	6	15		
T 分级						
T ₁ 、T ₂	9	1	2	6	1.429	0.232
T ₃ 、T ₄	21	8	4	9		
分化程度						
高分化	18	4	2	12	5.000	0.025 *
中、低分化	12	5	4	3		
临床分型						
声门型	19	5	3	11	1.292	0.256
声门上下型	11	4	3	4		
淋巴结转移						
有	11	7	2	2	7.033	0.008 *
无	19	2	4	13		

注: * $P<0.05$ 为差异具有统计学意义

2.3 喉鳞癌组织中 AKT 蛋白与 HK2 蛋白的相关性
AKT 蛋白与 HK2 蛋白在 30 例喉鳞癌组织中阳性共表达 13 例,阴性共表达 8 例,AKT 蛋白阳性而 HK2 表达阴性 2 例,AKT 蛋白阴性而 HK2 表达阳性 7 例,经 Spearman 秩相关性分析,二者呈正相关($r=0.424,P=0.019$)。具体数据见表 3。

表 3 喉癌组织中 AKT 和 HK2 表达的相关性分析

AKT 表达	HK2 表达		r	P
	阳性	阴性		
阳性	13	2	0.424	0.019
阴性	7	8		

3 讨论

近年来,喉癌一直是头颈部肿瘤中研究的重点,其治疗方法也逐渐从原先的手术治疗转变为以手术

治疗为主,综合放疗、化疗、生物治疗等方法为辅,这就需要我们提供更多的治疗肿瘤的切入点。高水平糖酵解作为肿瘤细胞的一个显著特征而备受重视,本实验主要研究讨论糖酵解中关键酶 HK2 及其上游 PI3K-AKT 通路在喉癌发生发展中的作用及意义。

3.1 AKT、HK2 的结构与生物学功能及二者之间的关系

AKT 是信号转导途径中重要的蛋白激酶,又称为蛋白激酶 B(PKB),其为 PI3K 下游的靶蛋白,是 PI3K-AKT 信号转导通路的核心,它的活化与肿瘤发生发展密切相关。AKT 包括 AKT1、AKT2、AKT3 3 种亚型,分别位于染色体 14q32、19q13、1q44。其中,AKT1 在多种组织中广泛表达,此 3 个亚型在氨基酸水平上同源性>80%,有相似结构,都由 1 个氨基末端 PH 结构域,1 个富含甘氨酸的铰链区,1 个中心的激酶结构域和 1 个富含色氨酸/苏氨酸的羧基末端区组成^[3]。PI3K 是一类特异的催化磷脂酰肌醇脂物质的激酶,活化的 PI3K 催化细胞膜上磷脂酰肌醇 4,5 二磷酸(PI2P2)肌醇环上 D23 磷酸化,生成第二信使磷脂酰肌醇 3,4,5 三磷酸(PI2P3)。PI2P3 通过与 AKT 的 PH 结构域功能区结合,使之从细胞质移至细胞膜,引起 AKT 构象的改变,激活 AKT。激活的 AKT 使底物蛋白特定部位的丝氨酸、苏氨酸发生磷酸化,也就是通过磷酸化其下游分子,参与细胞周期的调节、细胞生长代谢、增殖、凋亡等多种生物学活性,从而参与肿瘤的发生、发展^[4]。其中,糖酵解代谢过程中的关键酶 HK 就是 AKT 控制的下游分子之一,HK 包括 HK1、HK2、HK3 和 HK4 共 4 种同工酶,而 HK2 与肿瘤相关性最大。HK2 属于线粒体结合型,是肿瘤细胞中主要的己糖激酶亚型。AKT,尤其是 AKT1 对于 HK 结合于线粒体外膜有正性作用。HK2 通过其疏水性 N 端区域结合于线粒体外膜电压依赖性阴离子通道(VDAC)上,并与 VDAC 相互作用,在促进细胞增殖

和抑制凋亡中发挥重要作用^[5]。糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β) 可以通过磷酸化线粒体上 VDAC 的 HK 结合位点来阻止 HK 的结合,降低其活性,而在肿瘤细胞中,AKT 对于 GSK-3 β 的抑制可以维持 HK 的高活性^[6]。本实验 AKT 与 HK2 在 30 例喉鳞癌组织中的表达情况经 Spearman 相关性分析认为二者呈正性相关,与以上研究结果相一致,AKT 在提高了糖酵解水平的同时,也促进了细胞抗凋亡的作用。

3.2 AKT 与喉鳞状细胞癌的关系

首先,本实验结果显示 AKT 与喉鳞状细胞癌的发生、发展相关。研究表明,在许多肿瘤发生中磷酸化 AKT 呈高度活化,如乳腺癌、非小细胞肺癌、前列腺癌等。AKT 的磷酸化与肿瘤的发生密切相关。半胱天冬酶 caspase-9 是细胞凋亡的启动者和效应者,AKT 可以抑制前死亡蛋白酶 caspase-9 的催化活性,而抑制其促凋亡作用^[7]。AKT 可促使抑癌基因 c-myc 过度活化或过度表达,使细胞逃离 G₀ 期,引起细胞增殖。AKT 通过调节细胞周期影响细胞增殖,哺乳类动物雷帕霉素 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 是主要监控细胞生长的,它通过激活核糖体激酶 P70S6,提高 5' 多聚嘧啶 mRNA 的翻译,从而促进细胞生长,mTOR 是 AKT 的直接靶点。血管内皮生长因子 (VEGF) 是参与肿瘤血管生成的主要调控因子,能特异结合血管内皮细胞,AKT 通过激活 VEGF 而防止内皮凋亡和调节血管生成^[8]。因此喉癌的发生和发展可能与 AKT 的促进细胞生长、增殖及抑制凋亡有关,但具体机制尚待进一步研究证实。

其次,本实验结果显示 AKT 与喉鳞状细胞癌的病理分化程度及淋巴结转移相关。低分化的癌细胞分裂速度相对高分化细胞较快,所以低分化的癌细胞生长迅速,出现转移的时间也相对较早,预后较差。核因子 κ B (NF- κ B) 是一种具有多项调节功能的转录因子,与细胞的分化密切相关,AKT 通过激活 NF- κ B 的正调控因子 I κ B 激酶 (IKK α),引起依存 NF- κ B9 基因 (抑凋亡基因) 的转录,促进细胞存活。一氧化氮合成酶 (eNOS) 能增加血管的通透性并促使血管内皮细胞的迁移生长,而 AKT 可通过激活 eNOS,从而促进新生血管的形成及血管内皮生长因子诱导的内皮细胞迁移,进一步导致肿瘤发生转移和恶性转化^[9]。PI3K-AKT-mTOR 也被认为是参与细胞增殖、分化、迁移的信号调节通路。此通路的激活可增加肿瘤细胞的运动能力,这种能力的增加

是经过 AKT-mTOR-P70S6K 途径,P70S6K (核糖体蛋白) 的活化能促进肌动蛋白的细丝重构,促进细胞运动^[10]。通过降解细胞外基质是癌细胞侵袭转移的重要过程之一,经 PI3K-AKT-mTOR 途径可上调基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) mRNA 和蛋白质的表达。如上所述,AKT 可激活 NF- κ B 的转录活性,NF- κ B 使 MMP-2、基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 产量增加,且细胞运动增强,还能上调环氧化酶-2 (COX-2) 的表达,有助于细胞侵袭,有资料显示,COX-2 的表达与肿瘤细胞淋巴结转移呈正相关。上皮间叶转化 (EMT) 是上皮细胞获得成纤维细胞样能力,细胞黏附减少,活动性增加。AKT 可促进上皮细胞向间叶细胞转化,从而参与肿瘤的浸润与转移^[11]。

3.3 HK2 与喉鳞状细胞癌的关系

首先,本实验结果显示 HK2 与喉鳞状细胞癌的发生和发展相关。HK2 在许多生长迅速的恶性肿瘤细胞中高表达^[12]。恶性肿瘤糖酵解活跃与催化糖酵解的酶有很大关系,HK 就是糖酵解过程中第一个关键酶,将进入细胞内的葡萄糖催化生成为 6-磷酸葡萄糖。肿瘤细胞增殖不但需要 ATP,也需要脂肪酸、核酸、蛋白质、膜磷脂等,通过糖酵解途径产生大量中间代谢产物以满足肿瘤细胞增殖的需求。HK1 ~ 3 均对葡萄糖有很高的亲和力,约是 HK4 对葡萄糖亲和力的 250 倍,但 HK1 和 HK3 只有 C 端有催化功能,而 HK2 的 N 端和 C 端均有催化功能,其催化效率提高了 1 倍,能更最大限度地促进细胞能量代谢^[13]。可见喉鳞状细胞癌中 HK2 表达增高与其结构特点相符。近年来研究发现,HK2 除了具有糖代谢酶的催化活性,还有拮抗细胞凋亡的功能,其高表达水平与一些肿瘤不良预后密切相关^[14]。HK2 基因在人结肠癌细胞中明显表达,抑制 HK2 能明显控制结肠癌的细胞增殖并诱导细胞凋亡^[15]。彭国庆等^[16]应用免疫组化方法研究发现,宫颈癌组织 HK2 阳性表达高于正常组织,且随着宫颈癌病情的进展,HK2 表达阳性比例有逐渐增高的趋势,可见 HK2 与宫颈癌的发生发展密切相关,可考虑作为宫颈癌变的早期发生分子标志物。Patra 等^[17]在肺癌和乳腺癌的小鼠模型中发现,HK2 对肿瘤的启动和维持有着重要作用,消除 HK2 可抑制体内和体外肿瘤细胞的生长。这与本实验结果基本一致,提示 HK2 高表达可能与喉癌的发生发展有关。

其次,本实验结果显示 HK2 与喉鳞状细胞癌的病理分化程度及淋巴结转移相关。如前所述,己糖

激酶 4 种亚型在大多数生长迅速的恶性肿瘤细胞中以 HK2 高表达为主,并结合在线粒体外膜上。HK 与线粒体外膜 VDAC 的结合不但能使 HK 更好地利用 ATP 而加速糖酵解代谢,还能向线粒体供给更多 ADP 而加速三羧酸循环,刺激蛋白质合成,且调控保护细胞免凋亡^[18]。HK 调节凋亡的作用,是通过与 VDAC 的结合并相互作用实现的。前凋亡蛋白 BAX 结合至线粒体的 VDAC 上,形成允许细胞色素 C 通过的通道,导致线粒体功能失调及细胞死亡, HK2 与 VDAC 的结合干扰了 BAX 结合至 VDAC 的能力和细胞色素 C 的释放,从而潜在地抑制了线粒体途径的凋亡^[19]。在肺、结肠、乳腺恶性肿瘤组织中,已证实 HK2 蛋白表达是增高的,且在乳腺癌的研究中已经发现,当肿瘤细胞发生转移时, HK2 的活性会更高^[20]。国外学者研究,在扁桃体与舌鳞状细胞癌中, HK2 明显表达,且与癌细胞的分化程度及淋巴结转移相关^[21]。在肝癌中 HK2 的高表达与癌细胞的恶化进展、肝内转移相关,在评估预后上意义重大^[22]。Qiu 等^[23]研究发现,胃癌组织分化程度越低, HK2 蛋白表达越高,并预示着低生存率。综上,肿瘤细胞中 HK2 高表达不仅保证充分的能量供应,而且起到抗凋亡作用,从而促进肿瘤细胞的增殖,扩散与转移。

3.4 AKT 信号通路及 HK2 参与的糖酵解与喉鳞状细胞癌的关系

糖酵解异常活跃是恶性肿瘤细胞的一个显著特征,己糖激酶是糖酵解过程中第一个关键酶,其中 HK2 与肿瘤相关性最大,作为 HK2 的上游调控通路的 PI3K-AKT 通路起着重要作用。有研究^[24]发现肿瘤细胞的糖酵解水平显示出与 AKT 的活性呈正相关,即 AKT 对肿瘤细胞的糖酵解有显著加强作用,且发现细胞的有氧氧化却没有相应增长,由此可知, AKT 在不影响有氧氧化的情况下,可提高肿瘤细胞糖酵解水平。AKT 作为生长因子介导的细胞得以生存的一个主要下游因子,它的激活能促使 HK2 结合到线粒体 VDAC 上,并直接偶联线粒体内产生的 ATP 参与糖代谢,而 AKT 的抗凋亡活性需要被 HK2 催化的糖酵解的第一步反应来启动,结合到线粒体上的 HK2 会模仿 AKT 的能力,去抑制细胞色素 C 的释放及细胞凋亡,二者在致癌方面有协同作用^[25]。靶向破坏 HK2 与 VADC 之间的相互作用,可有力地促使细胞色素 C 的释放和细胞凋亡的发生。抑制 HK2 可恢复正常的葡萄糖氧化代谢,减少细胞外的乳酸,增加氧化磷酸化蛋白与氧气消耗,

增强肿瘤细胞对凋亡、放疗及化疗的敏感性^[26]。针对肿瘤细胞糖酵解过程中关键酶及其上游调控通路的靶向治疗有可能为喉癌治疗提供新的策略。

参考文献:

- [1] Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(5): 325-337.
- [2] 庞清阳, 王婷, 陈芳源. 肿瘤细胞的糖酵解异常及靶向治疗[J]. *国际肿瘤学杂志*, 2012, 39(10): 726-728.
- [3] Cheng GZ, Park S, Shu S, et al. Advances of AKT pathway in human oncogenesis and as a target for anti-cancer drug discovery[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2008, 8(1): 2-6.
- [4] Mahajan K, Mahajan NP. PI3K-independent AKT activation in cancers: a treasure trove for novel therapeutics[J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(9): 3178-3184.
- [5] Majewski N, Nogueira V, Robey RB, et al. Akt Inhibits Apoptosis Downstream of BID Cleavage via a Glucose-Dependent Mechanism Involving Mitochondrial Hexokinases[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2003, 24(2): 730-740.
- [6] Pastorino JG, Hoek JB, Shulga N. Activation of glycogen synthase kinase 3 β disrupts the binding of hexokinase II to mitochondria by phosphorylating voltage-dependent anion channel and potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(22): 10545-10554.
- [7] Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival[J]. *J Cell Mol Med*, 2005, 9(1): 59-71.
- [8] Cheung M, Testa JR. Diverse mechanisms of AKT pathway activation in human malignancy[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2013, 13(3): 234-244.
- [9] Dimmeler S, Zeiher AM. Akt takes center stage in angiogenesis signaling[J]. *Circ Res*, 2000, 86(1): 4-5.
- [10] Qian Y, Corum L, Meng Q, et al. PI3K induced actin filament remodeling through Akt and p70S6K1: implication of essential role in cell migration[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 286(1): C153-163.
- [11] Chin YR, Toker A. Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer[J]. *Cell Signal*, 2009, 21(4): 470-476.
- [12] Wolf A, Agnihotri S, Micallef J, et al. Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme[J]. *J Exp Med*, 2011, 208(2): 313-326.
- [13] Tsai HJ. Functional organization and evolution of mammalian hexokinases: mutations that caused the loss of catalytic activity in N-terminal halves of type I and type III isozymes[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1999, 369(1): 149-156.
- [14] Palmieri D, Fitzgerald D, Shreeve SM, et al. Analyses of resected

(下转第 206 页)