维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)07-0879-05

乳腺癌中 PTEN 与 MMP-9、P27kip1 蛋白表达及其临床意义

杨小琼,张幸平,郭慧琳

(重庆医科大学附属第一医院肿瘤科,重庆 400016)

【摘 要】目的:第 10 号染色体同源丢失性磷酸酶 - 张力蛋白基因(Phosphatase and tension homology deleted on chromosome ten,PTEN)、基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinase 9,MMP-9)、激酶抑制蛋白(Kinase inhibited protein 1,P27kip1)在乳腺癌中的表达及其相关性,探讨三者的表达与临床分期、淋巴结转移及预后的关系。方法:选取 50 例有完整临床及病理资料的乳腺癌病例,采用 SP 免疫组织化学技术检测乳腺癌中 PTEN、MMP-9、P27kip1 蛋白的表达情况。结果:PTEN、MMP-9、P27kip1 在乳腺癌中高表达率分别为 54%、74%、62%。结论:PTEN、MMP-9、P27kip1 在乳腺癌中的表达与患者的临床分期及淋巴结转移有关,可作为乳腺癌预后的参考指标。

【关键词】乳腺癌;PTEN;MMP-9;P27kip1;免疫组化;预后

【中国图书分类法分类号】R737.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-26

Expression of PTEN, MMP-9 and P27kip1 in breast cancer and their clinical significance

YANG Xiao-qiong, et al

(*Department of Oncology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To study the expression of PTEN, MMP-9 and P27kip1 in breast cancer and their relationship, to investigate the relationship between their expression and the clinical stage, the metastasis of axillary lymph node and prognosis. *Methods*: 50 cases of breast cancer with complete clinical and pathological material are selected and test the expression of PTEN, MMP-9, P27kip1 by the SP immunohisto-chemical method. *Results*: The high expression rate of PTEN, MMP-9, P27kip1 are54 %, 74%, 62% respectively. *Conclusion*: The expression of PTEN, MMP-9, P27kip1 in breast cance correlates with the clinical stage and the metastasis of axillary lymph node and can be used as the marker of patient's prognosis.

【Key words】 Breast cancer; PTEN; MMP-9; P27kip1; Immunohisto-chemistry; Prognosis

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,近年来发病率有增高的趋势,严重威胁着妇女的健康和生命。治疗后复发和转移仍然是其主要的死亡原因,临床尚无可靠的方法做到早期预测,因此研究乳腺癌复发及转移相关的生物学标志显得尤为重要。本文采用免疫组织化学 SP 法检测 50 例乳腺癌组织中 PTEN、MMP-9、P27kip1 的表达情况,并结合患者的临床及病理学资料探讨其与临床分期、腋淋巴结转移及预后的关系。

1 材料与方法

1.1 临床资料

选用重庆医科大学附属第一医院肿瘤科 2000 年 1 月~2001 年 1 月收治的乳腺癌病例中,临床及病理资料完整的 50 例乳腺癌作为研究对象。全部病例均为侵润性非特殊类型癌。临床分期参照 1997 年国际抗癌联盟(UICC)制定的 TNM 分期标准:Ⅰ、Ⅱ期 31 例,Ⅲ、Ⅳ期 19 例。有腋淋巴结转移者 34 例,占 68%。50 例患者均为女性,年龄 24~72 岁,中位年龄 47 岁。全部患者均接受了改良根治术及术后辅助性放射治疗,放疗总剂量:50~52Gy/25~26 次 /5~5.5 周。其中 39 例行以蒽环类药物为主的方案(EMF、CEF、CA 方案)化疗,11 例行非蒽环类药物为主的方案(CMF、NP 方案)化疗;33 例 ER(+)伴或不伴 PR(+)者口服三苯氧胺(TAM)作内分泌治疗。

1.2 试剂及方法

鼠抗人 PTEN、鼠抗人 MMP-9、鼠抗人 P27kip1 单克隆抗体均购自福州迈新生物技术公司。采用免疫组化 SP 法,具

作者介绍:杨小琼(1979-),女,硕士,研究方向:乳腺癌治疗。

通讯作者:张幸平,女,主任医师,E-mail:zhang.xinping@163.com。

维普资讯 http://www.cqvip.com

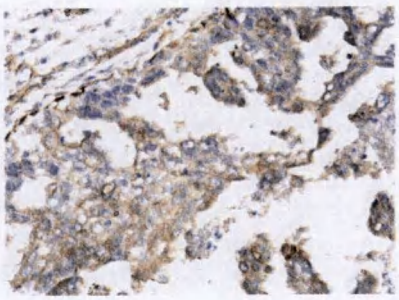


图 1 PTEN 高表达 SP×200

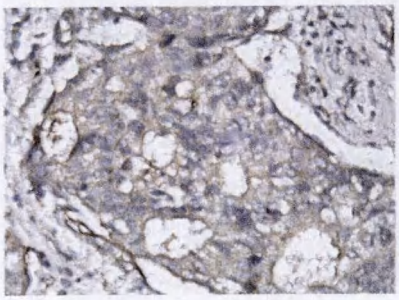


图 2 MMP-9 高表达 SP×200

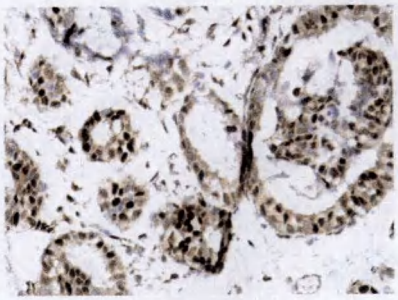


图 3 P27kip1 高表达 SP×200

表 1 乳腺癌 PTEN、MMP-9、P27kip1 表达与临床及病理学特征的关系

分组	例数	PTEN 低	PTEN 高	高表达率(%)	P	MMP-9 低	MMP-9 高	高表达率(%)	P	P27kip1 低	P27kip1 高	高表达率(%)	P
例数	50	23	27	54		13	37	74		19	31	62	
年龄(岁)													
≤50 岁	16	7	9	56.3	>0.05	4	12	75	>0.05	6	10	62.5	>0.05
>50 岁	34	16	18	52.9		9	25	73.5		13	21	61.8	
月经													
未绝经	29	14	15	51.7	>0.05	8	21	72.4	>0.05	11	18	62.1	>0.05
绝经	21	9	12	57.1		5	16	76.2		8	13	61.9	
ER													
+	33	11	22	66.7	<0.05	11	22	66.7	>0.05	9	24	72.7	<0.05
-	17	12	5	29.4		2	15	88.2		10	7	41.2	
PR													
+	27	11	16	59.3	>0.05	8	19	70.4	>0.05	7	20	74.1	>0.05
-	23	12	11	47.8		5	18	78.3		12	11	47.8	
组织学分级													
Ⅰ、Ⅱ	41	15	26	63.4	<0.05	11	30	73.2	>0.05	12	29	70.7	<0.05
Ⅲ	9	8	1	11.1		2	7	77.8		7	2	22.2	
临床分期													
Ⅰ、Ⅱ期	31	7	24	77.4	<0.05	11	20	64.5	<0.05	7	24	77.4	<0.05
Ⅲ、Ⅳ期	19	16	3	15.8		2	17	89.5		12	7	36.8	
腋淋巴结转移													
(+)	34	19	15	44.1	<0.05	6	28	82.4	<0.05	17	17	50	<0.05
(-)	16	4	12	75		7	9	56.3		2	14	87.5	

体操作步骤如下：石蜡切片脱蜡、梯度水化后，PTEN 组置 pH6.0 柠檬酸盐缓冲液中，P27kip1 组置 pH9.0EDTA（依地酸）修复液中，用微波修复抗原 5min，凉至室温。MMP-9 组无需抗原修复。滴加 50μl 过氧化酶阻断溶液 10min 以阻断内源性过氧化物酶，PBS（pH7.4）冲洗（3min×3 次）后，滴加 50μl 正常羊血清，10min 后倾去血清，分别滴加 3 种抗体，4℃放置过夜，PBS 冲洗后，滴加生物素标记的二抗 10min，PBS 冲洗后，滴加 SP 放置 10min。DAB 显色，苏木精复染，碳酸盐返蓝，中性树脂封片。用已知阳性切片做阳性对照，用 PBS 替代一抗做阴性对照。

1.3 评定标准

阳性分布标准，PTEN、MMP-9 以胞浆出现棕黄色颗粒为阳性，P27kip1 以胞核出现棕黄色颗粒为阳性。结果评分参照文献[1]报道，结合阳性细胞百分比及染色强弱两方面综合评分。计数 1 000 个肿瘤细胞，计算阳性细胞的百分率：阳性细胞≤10%=0 分，11%～50%=1 分，51%～80%=2 分，81%～

维普资讯 http://www.cqvip.com

100%=3 分;阳性细胞染色强弱评分:阴性 =0 分,弱阳性 =1 分,中度阳性 =2 分,强阳性 =3 分。根据两项之和判断结果,<3 分为低表达,≥3 分为高表达(图 1~3)。

1.4 统计学处理

数据处理应用 SPSS 10.0 统计软件分析。各项参数之间的比较运用 χ^2 检验及确切概率法检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PTEN、MMP-9、P27kip1 表达状况与临床及病理学关系

PTEN、MMP-9、P27kip1 在乳腺癌中高表达率分别为 54%(27/50)、74%(37/50)、62%(31/50)。PTEN、P27kip1 表达水平与组织学分级、临床分期及淋巴结转移呈负相关($P<0.05$),与 ER 水平呈正相关($P<0.05$),与患者年龄、绝经与否及 PR 无明显相关。MMP-9 表达水平与临床分期及淋巴结转移呈正相关($P<0.05$),与患者年龄、绝经与否、激素受体状态及组织学分级无明显相关(表 1)。

2.2 PTEN 与 MMP-9、P27kip1 蛋白表达的相关性及其协同表达与腋淋巴结转移的关系

乳腺癌中 PTEN 与 MMP-9 蛋白表达呈负相关,PTEN 高表达者 MMP-9 多呈低表达,PTEN 低表达者 MMP-9 多呈高表达,两者相关性检验差异有统计学意义($P<0.05$,见表 2)。PTEN(H)/MMP-9(L)组 11 例,有腋淋巴结转移者占 36.4%(4/11);PTEN(L)/MMP-9(H)组 21 例,有腋淋巴结转移者占 85.7%(18/21),两者协同表达与腋淋巴结转移率之间有关($P=0.007\ 3$,见表 3)。乳腺癌 PTEN 与 P27kip1 蛋白表达呈正相关,PTEN 高表达者 P27kip1 多呈高表达,两者表达相关性检验差异有统计学意义($P<0.01$,见表 2)。PTEN(H)/P27kip1(H)组 22 例,有腋淋巴结转移者占 45.5%(10/22);PTEN(L)/ P27kip1(L)组 14 例,有腋淋巴结转移者占 85.7%(12/14),两者协同表达与腋淋巴结转移率之间呈负相关($P=0.001\ 7$,见表 3)。

表 2 50 例乳腺癌 PTEN 与 MMP-9、P27kip1 表达的相关性

组别	PTEN 表达		χ^2	P
	高	低		
MMP-9				
高	16	21	5.07	<0.05
低	11	2		
P27kip1				
高	22	9	9.455	<0.01
低	5	14		

表 3 50 例乳腺癌 PTEN 与 MMP-9、P27kip1 协同表达与腋淋巴结转移之间的关系

组别	n	腋淋巴结转移数	P
PTEN(H)/MMP-9(L)	11	4(36.4%)	0.007 3
PTEN(L)/MMP-9(H)	21	18(85.7%)	
PTEN(H)/P27kip1(H)	22	10(45.5%)	0.001 7
PTEN(L)/P27kip1(L)	14	12(85.7%)	

3 讨 论

PTEN 是迄今发现的唯一具有磷脂酶活性的肿瘤抑制基因,可使磷酸化的丝 / 苏氨酸和酪氨酸去磷酸化,在维持细胞的增殖、分化和凋亡平衡中起重要作用[2]。目前认为 PTEN 的抑癌机制可能由以下几条途径完成:(1)通过使 PIP3 去磷酸化负调控 PIP3/Akt 途径调节细胞的增殖与凋亡平衡;(2)通过对 FAK 的去磷酸化抑制细胞转移及侵润;(3)通过抑制 MAPK 细胞信号传导途径抑制细胞的生长和分化。国内外研究表明,PTEN 基因突变或失活有助于肿瘤细胞侵润和转移[3,4]。本实验结果显示 46%(23/50)的患者存在 PTEN 蛋白表达的缺失或减弱,与 Depowski 等[4]报道的结果 48%(73/151)基本一致。目前认为导致乳腺癌组织中 PTEN 蛋白表达缺失或减弱的原因有两种可能:一是抑癌基因 PTEN 缺失和突变[5];二是存在其他的原因,如 PTEN 基因启动子区的过度甲基化,PTEN 蛋白合成减少,分解增加等[6]。一些研究[7,8]发现雌激素受体阴性的乳腺癌 PTEN 表达缺失率明显增高。本实验也显示 PTEN 表达与雌激素受体水平呈正相关,提示雌激素受体阴性的乳腺癌患者的预后较差可能与 PTEN 表达缺失有关。PTEN 在Ⅰ、Ⅱ期乳腺癌中的表达率(77.4%)明显高于Ⅲ、Ⅳ期(15.8%),$P<0.01$,表明其在肿瘤的进展中起抑制作用。PTEN 在无淋巴结转移者高表达率(75%)高于有淋巴结转移者(44.1%),$P<0.05$,说明 PTEN 表达高者的肿瘤恶性程度较低,不易发生侵润和转移。提示 PTEN 高表达者,患者预后较好。

MMPs 是一类依赖锌离子的内肽酶,作用是降

维普资讯 http://www.cqvip.com

解基底膜和肿瘤组织周边的细胞外基质(Extracellular matrix,ECM),ECM 在维持正常组织结构与功能以及细胞生长和分化过程中起重要作用,其动态平衡的失调与肿瘤细胞的侵袭、转移和复发密切相关。MMPs 能促进血管的生成,这为肿瘤的发生、进展、局部侵润和远处转移提供了有利条件。MMP-9 是 MMPs 家族的一员,亦称 IV 型胶原酶或明胶酶 B,是细胞外基质的降解酶,可降解Ⅳ、Ⅴ、Ⅸ、Ⅺ型胶原,其主要功能为降解 IV 型胶原,在肿瘤细胞突破基底膜屏障和侵润转移中起重要作用。本实验发现乳腺癌中 MMP-9 高表达率为 74%,与肿瘤临床 TNM 分期、淋巴结转移状态成正相关(P 均<0.05),MMP-9 高表达者临床分期晚,且具有较高的腋窝淋巴结转移率,表明 MMP-9 可能在乳腺癌的淋巴结转移过程中起重要作用。有研究[9]发现 PTEN 和MMPs 在整合素(Integrin,是 ECM 各种蛋白的受体,在胚胎发育、肿瘤的发生和侵袭转移、炎症、伤口愈合等过程中起重要作用)介导的信号传导通路中分别发挥的重要作用。Integrin 通过蛋白质合成和酪氨酸激酶信号传导调控 MMPs 活性,促进肿瘤细胞侵袭性;而 PTEN 的蛋白磷酸酶活性抑制 FAK 脱磷酸,阻止 Ras/Mek/Er 的层叠,从而影响细胞和 ECM 的相互作用,阻碍 integrin 介导的细胞迁移和局灶粘附的形成。因此,PTEN 可能是通过 integrin 间接调控 MMPs 的表达。本实验显示乳腺癌 PTEN 与 MMP-9 蛋白表达呈负相关($P<0.05$)。PTEN(L)/MMP-9(H)组较 PTEN(H)/MMP-9(L)组出现腋淋巴结转移者更多(85.7%,36.4%,$P=0.007\ 3$)。提示联合检测两者的表达可能有助于判断乳腺癌的恶性程度与淋巴结转移潜能,为临床评估乳腺癌患者预后提供依据具有重要的意义。

P27kip1 又称激酶抑制蛋白 1,是 1994 年由 Polyak 等[10]发现的一种新型抑癌基因,是细胞周期依赖性激酶抑制物家族的重要成员。它是 CyclinE/CDK 复合抑制剂,具有抑制细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK),以及抑制细胞从 G_1 期向 S 期转化的功能,是细胞周期 G_1 期的负向调节因子,抑制细胞有丝分裂。De Paola 等[11]通过对乳腺正常组织、良性肿瘤、癌前病变及恶性肿瘤的早、晚期组织中 P27kip1 表达情况的研究,发现 P27kip1 表达有依次递减趋势。P27kip1 能以剂量依赖性的方式抑制细胞周期调节蛋白 CDK 来控制细胞周期进程,其表达下降与癌症的发生发展相关:P27kip1 蛋白表达低,其细胞增殖活性高,细胞分化成熟程度差。本实验显示 P27kip1 高表达者的组织学分级较低,临床期别较早,腋淋巴结转移较少,表明该蛋白高表达的乳腺癌具有较低的恶性程度,预后较好。有研究[12]显示,PTEN 过表达可阻止乳腺癌细胞周期的演进并诱导细胞凋亡,并进一步研究发现野生型 PTEN 过表达导致细胞生长的抑制是由于 P27kip1 表达增强、细胞周期素 D1 表达减弱及 Akt 磷酸化抑制的结果,而且 PTEN 与 P27kip1 基因表达具有协同性。本实验结果显示,PTEN 与 P27kip1 蛋白在乳腺癌中的表达呈正相关,PTEN 高表达者 P27kip1 也大都呈高表达,两者协同表达与腋淋巴结转移呈负相关($P<0.05$),提示 PTEN 可能通过促进 P27kip1 的表达及其功能活性,抑制肿瘤细胞生长,两者在乳腺癌的演进中具有一致的阻抑作用。因此联合检测两者在乳腺癌中的表达,有助于判断肿瘤恶性程度,评估患者预后。

综上所述,PTEN、MMP-9、P27kip1 在乳腺癌中的表达与肿瘤的临床分期、组织学分级及腋淋巴结转移有关,联合检测三者在乳腺癌中的表达,可作为乳腺癌发生、发展及判断预后的参考指标。

参 考 文 献

[1] Kurose K,Gilley K,Matsumoto S,et al. Frequent somaticmutations in PTEN and P53 are mutually exclusive in thestroma of breast carcinomas[J]. Nat Genet,2002;32(3):355-357.

[2] Wu RC,Li X,Sch~nthal AH. Transcription activation of p21 WAF1 by PTEN/MMACI tumor suppressor[J]. Mol Cell Biochem,2002;203(1-2):59-71.

[3] Bussaglia E,Pujol RM,Gil MJ,et al. PTEN mutations in eight Spanish families and one Brazilian family with Cowden syndrome[J]. J Int,esl Dennatol,2002;118(4):639-644.

[4] Depowski PL,Rosenthal SI,Ross JS. Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer[J]. Mod Pathol,2001;14(7):672-676.

[5] Zhou XP,Waite KA,Pilarski R,et al. Germline PTEN promoter mutations and deletions in Cowden Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome result in abe rrant PTEN protein and dysregu lation of the phos-phoinositol-3-kinase/Akt pathway[J]. Am J Hum Genet,2003;73(2):404-411.

[6] Zysman MA,Chapman WB,Bapat B.Considerations when analyzing the niethylation status of PTEN tumor suppressor gene[J]. Am J Patho1,2002;160(3):795-800.

[7] Shi W,Zhang X,Pintilie M,et al. Dysregulated PTEN-PKB and negative receptor status in human breast cancer[J]. Int J Cancer,2003;104(2):195-203.

(下转第 816 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com



A B C

A. 正常大鼠；B. 未免疫大鼠的腹腔攻毒图；C. 免疫后腹腔攻毒的大鼠图

图 3 CFA/Ⅰ的免疫原性试验

要研制出一种安全、稳定、高效的 ETEC 疫苗尚有几个问题需要解决：①新的 ETEC 定居因子仍在发现，②不可能将所有的定居因子和肠毒素克隆在同一菌株共表达，③人肠道粘膜免疫机制没有完全搞清楚。目前认为，只有具备长期抗定居和抗毒素能力的疫苗才能有效预防 ETEC 腹泻[5]。载体疫苗是利用活的疫苗株做载体，通过重组菌在机体内繁殖产生保护性抗原，刺激机体产生持久的特异性免疫应答，其效果优于死菌苗。因此，克隆和表达 CFA/Ⅰ是研究 ETEC 载体疫苗的先决条件。

ETEC 致腹泻原因是定居因子抗原和肠毒素，只有联合使用多种不同血清型的定居因子和具有抗原性的减毒肠毒素一起使用才能有效预防 ETEC 腹泻。肠毒素分为热敏感肠毒素和热稳定肠毒素。CFA/Ⅰ基因往往与这两种毒素基因或其中的一种毒素基因位于同一质粒上。CFA/Ⅰ基因重组的目的，一方面为了提高其表达产量，另一方面则希望从根本上去除其生物毒性，探索研制活疫苗的可能性。本文初步的动物实验表明，攻毒后大鼠的脏器改变证实重组菌株免疫后的大鼠对野生株产生抗定居作用，显示出重组菌株的免疫保护性[6]。证明重组的 CFA/Ⅰ作为载体疫苗的候选抗原是可行的，为下一步工作打下了良好的基础。

参 考 文 献

[1] Zheng JP, Zheng ZS. Progress towards a vaccine against enterotoxigenic Escherichia coli(ETEC)[J]. Prog Microbiol Immmunol, 2003;31(1):51-54.

[2] Willshaw GA, Smith HR, Rowe B. CIoning of regions encoding colonization factor antigen Ⅰ and heat-stable enterotoxin in Escherichia coli[J]. FEMS Microbiol Lett, 1983;16(2):101.

[3] 邓建川，陈 耀，孙 航，等.重组原核表达载体 pQE30-hALRIP 的构建及鉴定[J]. 重庆医科大学学报，2007;32(3):229-231,235.

[4] 房 海，主编.大肠埃希氏菌[M]. 河北科学技术出版社，1997. 143.

[5] 郑继平，王令春，王 凡，等. 共表达 ETEC CFA/I、CS6 福氏痢疾减毒株与单独表达 CFA/Ⅰ及 CS6 混合疫苗株的免疫原性比较[J]. 中华微生物学和免疫杂志，2004;24(3):209-212.

[6] 罗 刚，杨 晓，李淑琴，等. 肠毒素大肠杆菌定居因子 CS6 抗原基因在大肠杆菌中的高效表达[J]. 军事医学科学院院刊，2004;28(3):232-234.

(责任编辑：谭乐勤)

(上接第 806 页)

[8] 薛峰杰，代志军，王西京，等.抑癌基因 PTEN 在乳腺癌中的表达及其临床意义[J]. 实用医技杂志，2004;11(10):2114-2116.

[9] Tamura M, Gu J, Matsumoto K, et al. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN [J]. Science, 1998;280(5369):1614-1617.

[10] Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, et al. Cloning of P27kipl: a cyclin dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals[J]. Cell, 1994;78(1):59-66.

[11] De Paola F, Vecci AM, Granato AM. P27kipl expresion in normal epithelium, benign and neoplastic breast lesions[J]. J Pathol, 2002;196(1):26-31.

[12] Yamada KM, Araki M. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis[J]. J Cell Sci, 2001;114(13):2375-2382.

(责任编辑：谭乐勤)