

· 论 著 ·

[文章编号] 1007-385X(2007)04-0373-04

PTEN 蛋白表达与乳腺癌增殖、侵袭转移的相关性

黄玉钿^{1*}, 张 声², 郑 曦¹, 吴钦穗¹, 黄双月³, 杨发端⁴(1. 福州市第一医院 病理科, 福州 350009; 2. 福建医科大学 附属第一医院 病理科, 福州 350005; 3. 福州市第一医院 普外科, 福州 350009; 4. 福建医科大学 附属协和医院 病理科, 福州 350001)

[摘 要] 目的: 研究乳腺癌组织中抑癌基因 *PTEN* 编码蛋白的表达与肿瘤细胞增殖、侵袭转移的关系, 探讨 *PTEN* 蛋白的表达在乳腺癌发生发展过程中的作用机制。方法: 选取福州市第一医院病理科存档的乳腺癌标本 86 份和乳腺良性病变组织标本 30 份, 应用免疫组织化学法检测乳腺癌组织和乳腺良性病变组织中 *PTEN* 表达情况与 Ki67 增殖指数, 分析 *PTEN* 表达与乳腺癌 Ki67 增殖指数以及患者年龄、肿瘤大小、组织病理学分级、淋巴结转移、临床分期等临床病理学参数之间的关系。结果: 乳腺癌组 *PTEN* 的阳性表达率为 52.3%, 良性对照组为 93.3%; 乳腺癌组 Ki67 增殖指数为 $(31.5 \pm 20.6)\%$, 对照组为 $(9.7 \pm 6.9)\%$, 比较均具有显著差异 ($P < 0.01$)。乳腺癌 *PTEN* 表达与 Ki67 增殖指数、组织病理学分级、腋窝淋巴结转移及临床分期呈负相关 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 与患者年龄、肿瘤大小未见显著相关 ($P > 0.05$)。结论: *PTEN* 蛋白的表达与乳腺癌细胞增殖及侵袭转移具有相关性, 是判断肿瘤生物学行为和患者预后的重要参考指标之一。

[关键词] 乳腺肿瘤; *PTEN*; Ki67; 免疫组织化学

[中图分类号] R73-37 [文献标志码] A

Correlation between *PTEN* protein expression and proliferation, invasion and metastasis of breast cancer

HUANG Yu-dian^{1*}, ZHANG Sheng², ZHENG Xi¹, WU Qin-sui¹, HUANG Shuang-yue³, YANG Fa-duan⁴(1. Department of Pathology, First Hospital of Fuzhou, Fuzhou 350009, China; 2. Department of Pathology, the First Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China; 3. Department of General Surgery, First Hospital of Fuzhou, Fuzhou 350009, China; 4. Department of Pathology, Union Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of tumor suppressor gene *PTEN*-encoded protein in breast cancer tissues and its correlation with tumor cell proliferation, invasion and metastasis, so as to assess the role of *PTEN* protein in the carcinogenesis and progression of breast cancer. **Methods:** The expression of *PTEN* was examined by immunohistochemically in 86 breast cancer specimens (kept in Department of Pathology, First Hospital of Fuzhou) and 30 benign breast specimens; the proliferation index of Ki67 was obtained. The relationship between *PTEN* expression and Ki67 proliferation index, patient age, tumor size, histopathologic grade, axillary lymph-node metastasis, and clinical stage of breast cancer was analyzed. **Results:** The positive rate of *PTEN* was 52.3% in breast cancer group and 93.3% in the control group ($P < 0.01$); the Ki67 proliferation index was $(31.5 \pm 20.6)\%$ in breast cancer group and $(9.7 \pm 6.9)\%$ in the control group ($P < 0.01$). *PTEN* expression was negatively related to Ki67 proliferation index, histopathologic grade, axillary lymph-node metastasis and clinical stage of breast cancer ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and was not related to patients age and tumor size ($P > 0.05$). **Conclusion:** *PTEN* expression was related to the proliferation, invasion and metastasis of breast cancer cells and it can serve as an important marker for predicting biological behavior and prognosis of tumors.

[Key words] Breast tumor; *PTEN*; Ki67; Immunohistochemistry

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(4): 373-376]

[基金项目] 福州市科技局科研基金资助项目(No. 2004350102000721). Supported by Science Research Fundation from Sci-Tech Bureau of Fuzhou(No. 2004350102000721)

[作者简介] 黄玉钿(1977 -), 男, 福建省福州市人, 硕士, 医师, 主要从事肿瘤病理的研究。

* Corresponding author. E-mail: hyd0591@163.com

乳腺癌细胞的增殖和侵袭转移是一个极其复杂的多步骤动态过程,所有过程都需要通过激活相应的细胞内信号转导途径来实现。第10号染色体同源丢失性磷酸酶-张力蛋白基因(phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten, PTEN)是Li等^[1]发现的定位于人染色体10q23上的肿瘤抑制基因,能通过其磷酸酶活性调控细胞内多条信号转导通路。本研究采用免疫组化S-P法检测86例乳腺癌组织和30例乳腺良性病变组织中PTEN的表达情况,并分析乳腺癌PTEN表达与Ki67增殖指数及其他临床病理学参数之间的关系,旨在探讨PTEN表达在乳腺癌肿瘤细胞增殖、侵袭转移等过程中的作用及其临床意义。

1 材料与方法

1.1 实验标本和主要试剂

选取福州市第一医院病理科2000-2004年间存档的乳腺癌手术切除标本86例,其中乳腺浸润性导管癌78例、浸润性小叶癌5例、黏液腺癌3例,所有标本均经4%甲醛溶液固定,24 h内取材,常规石蜡包埋,以4 μm厚度连续切片。所有患者术前未接受放疗和化疗,患者全部为女性,年龄为31~85岁,平均(47.2 ± 19.6)岁。取30例乳腺良性病变组织作为对照组,其中乳腺小叶增生15例,乳腺纤维腺瘤15例,全部为女性,年龄为53~22岁,平均(40.9 ± 12.8)岁,年龄与乳腺癌组无显著差异($P > 0.05$)。所有病例均经病理确诊,并复查无误。乳腺浸润性导管癌的组织病理学分级采用Bloom-Richardson系统Nottingham改良方案^[2]: I级28例, II级33例, III级17例;临床分期按TNM分期法(国际抗癌联盟UICC, 2003版),分为TNM I~II期58例, III~IV期28例;按乳腺癌肿瘤大小分为≤2 cm组32例, 2~5 cm组34例及≥5 cm组20例;按年龄分为<50岁47例、≥50岁39例;腋窝淋巴结有转移46例,无转移40例。

鼠抗人PTEN、Ki67单克隆抗体购自美国NeoMarkers公司,为即用型试剂;S-P试剂盒及DAB显色液购自北京中山生物技术公司。

1.2 免疫组化染色法检测乳腺癌细胞PTEN和Ki67的表达

PTEN和Ki67抗体染色采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(S-P)免疫组化染色法。乳腺癌及乳腺良性病变石蜡包埋组织切片常规脱蜡,抗原高压修复,3% H₂O₂消除内源性过氧化物酶,山羊血清封闭非特异性抗原,加一抗(PTEN和Ki67单克隆抗

体)4℃冰箱过夜,第2天切片恢复室温后,依次加生物素标记的二抗及链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶溶液,DAB显色,苏木精衬染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明封片。用已知阳性片做阳性对照,同时用PBS代替一抗为阴性对照。

1.3 免疫组化阳性结果判断

PTEN阳性染色定位于乳腺上皮细胞质,免疫组化结果判定采用半定量法:先将阳性细胞所占百分比打分(0分为阴性、1分为≤10%、2分为11%~50%、3分为≥51%);再将特异性定位于乳腺上皮细胞质的染色按着色深浅打分(与背景着色相对比:0分为无色、1分为淡黄色、2分为棕黄色、3分为棕褐色);阳性细胞百分比与染色强度的得分乘积≥3分为免疫反应阳性。

Ki67阳性染色定位于乳腺上皮细胞核,染色结果判定采用相对定量法:每例随机观察5个高倍(×200倍)视野,以每个视野下“Ki67阳性癌细胞数/癌细胞总数×100%”的平均数作为乳腺癌Ki67增殖指数;乳腺良性对照组则以阳性上皮细胞数占上皮细胞总数的百分比作为Ki67的增殖指数。

1.4 统计学处理

采用SPSS 11.0软件进行统计学分析。PTEN表达阳性率的组间差异显著性检验采用 χ^2 检验;用 $\bar{x} \pm s$ 代表组内Ki67增殖指数的平均水平,组间差异的显著性检验采用 t 检验。

2 结果

2.1 PTEN与Ki67在乳腺癌组织中的表达

PTEN阳性定位于乳腺癌细胞质上,着色深浅不一,散在分布,细胞核表达极少(图1);PTEN在乳腺癌组织中的表达阳性率为52.3%(45/86),在良性对照组中的阳性率为93.3%(28/30),乳腺癌PTEN表达阳性率显著低于对照组($P < 0.01$)。Ki67阳性表达位于乳腺癌细胞核上(图1);乳腺癌Ki67标记指数为(31.5 ± 20.6)%,而对照组标记指数为(9.7 ± 6.9)%,乳腺癌Ki67增殖指数显著高于对照组($P < 0.01$)。

2.2 癌组织中PTEN表达与Ki67增殖指数的关系

乳腺癌PTEN表达阳性组的Ki67标记指数为(27.0 ± 20.4)%,低于PTEN阴性组的(36.5 ± 19.8)%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 乳腺癌组织中PTEN表达与临床病理学参数的关系

在乳腺癌中,淋巴结转移组PTEN阳性率低于无转移组,TNM III~IV期PTEN阳性率低于TNM

I ~ II 期, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 乳腺浸润性导管癌组织 III 级分化组 PTEN 阳性率低于 I 级分化组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); PTEN 的表达阳性率与患者年龄、肿瘤大小未见显著相关 ($P > 0.05$, 表 1)。

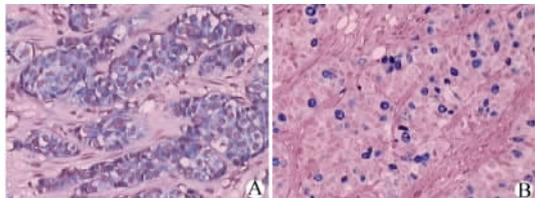


图 1 乳腺癌组织中 PTEN、Ki67 的阳性表达 (S-P, $\times 400$)

Fig. 1 Expression of PTEN and Ki67 in breast cancer tissues (S-P, $\times 400$)

A: PTEN; B: Ki67

表 1 乳腺癌组织中 PTEN 表达与临床病理参数的关系

Tab. 1 Correlation between PTEN expression and clinical pathologic parameters in breast cancer tissues

Group	Case	PTEN expression			P
		Negative (n)	Positive (n)	Positive rate (%)	
Age					
<50	47	22	25	53.2	>0.05
≥ 50	39	19	20	51.3	
Size					
<2 cm	32	11	21	65.6	>0.05
2 - 5 cm	34	19	15	44.1	
>5 cm	20	11	9	45.0	
Histopathologic grades [#]					
I	28	9	19	67.9	>0.05
II	33	17	16	48.5	
III	17	12	5	29.4	
Axillary lymph-node metastasis					
No	40	12	28	70.0	<0.01 ^{△△}
Yes	46	29	17	37.0	
Clinical stages					
I - II	58	21	37	63.8	<0.01 ^{**}
III - IV	28	20	8	28.6	

* $P < 0.05$ vs I grade, ** $P < 0.01$ vs I ~ II stages;

^{△△} $P < 0.01$ vs No Axillary lymphnode metastasis;

[#]: Breast invasive ductal cancer

3 讨论

PTEN 基因又称 MMAC1 或 TEP1, 全长 200 kb, 编码含 403 个氨基酸的蛋白质, 第 5 外显子编码的第 122-133 位氨基酸序列含有一个保守的 PTPase 基因家族的催化结构域, 其典型的氨基酸顺序为 HCXXGXXRS/T, 该序列与蛋白质丝氨酸/苏氨酸磷酸酶催化中心高度同源, 表明该区域具有双特异磷酸酶功能。PTEN 是人类发现的第一个具有双重特异性磷酸酶活性的抑癌基因, 除了蛋白磷酸酶活性, PTEN 还具有脂质磷酸酶活性, 其抑癌作用主要通过其脂质磷酸酶活性使细胞内第二信使 3,4 - 二磷酸磷脂酰肌醇 (PIP2) 和 3,4,5 - 三磷酸磷脂酰肌醇 (PIP3) 去磷酸化, 负调控 PI3K/PKB/AKT 信号转导途径^[3,4], 从而诱导周期素依赖性激酶 (CDK) 抑制剂 P27 活性使细胞周期阻滞在 G₁ 期, 介导细胞凋亡; 在多种恶性肿瘤的研究中都发现有抑癌基因 PTEN 的缺失表达。

本研究显示, PTEN 在乳腺良性病变组织中的表达阳性率为 93.3% (28/30), 而在乳腺癌组织中的阳性率仅 52.3% (45/86), 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 在乳腺癌组织中 PTEN 表达缺失率达 47.7%, 提示在乳腺良性上皮演变为乳腺癌的过程中, 抑癌基因 PTEN 编码蛋白的缺失表达具有举足轻重的作用。目前的研究认为, 抑癌基因 PTEN 的失活主要是由于 PTEN 基因的突变缺失^[5]、启动子区 DNA 的甲基化^[6]以及 PTEN 基因的异常降解^[7]等因素, 导致 PTEN 蛋白表达的缺失, PIP2、PIP3 等信号分子活性增强, 细胞异常增殖, 趋于恶变。

本研究同时采用细胞核增殖相关抗原 Ki67 的标记指数反映肿瘤细胞的增殖水平。研究发现, 乳腺癌 PTEN 表达阳性组的 Ki67 标记指数低于 PTEN 阴性组, 差别有显著意义 ($P < 0.05$), 提示 PTEN 蛋白能显著抑制乳腺癌细胞的增殖; 研究还发现, PTEN 蛋白表达的阳性率与乳腺癌组织病理学分级、淋巴结转移的出现及 TNM 分期呈负相关, 但与乳腺癌的肿瘤大小和发病年龄未见显著相关。以上结果显示, PTEN 的表达能促进乳腺癌的分化, 削弱癌细胞的侵袭转移能力。可见, PTEN 蛋白除了在乳腺癌的演变过程中扮演了重要角色, 对乳腺癌的进展也具有显著的抑制作用; PTEN 能作用于 FAK 的酪氨酸残基, 使之去磷酸化, 降低 FAK 的激酶活性, 抑制 FAK 蛋白的表达, 下调 Ras - MAPK 级联反应, 对整合素介导的信号转导起负调控作用^[8,9], 从而抑制细胞的局部黏附、迁移作用及细胞的增殖活

性;PTEN 还可通过调节基质金属蛋白酶^[10]和血管内皮生长因子^[11]来抑制肿瘤细胞对基质的降解和肿瘤新生血管的形成,影响乳腺癌细胞的侵袭转移;此外,PTEN 的基因序列中含有与张力蛋白和辅助蛋白的高度同源区,提示 PTEN 可能参与细胞骨架重组并影响肿瘤细胞向远处迁移。

乳腺癌组织 PTEN 蛋白表达的检测可作为判断肿瘤生物学行为和患者预后的重要参考指标之一,具有潜在的临床应用价值。Hong 等^[12]在高侵袭力的人肺癌细胞模型中建立稳定的可诱导的野生型 PTEN 转染体,发现 PTEN 的过表达能显著抑制肺癌细胞的侵袭力。因此,进一步阐明 PTEN 的抑癌机制,将为开发新的抗肿瘤药物和指导临床治疗提供新的思路。

[参 考 文 献]

- [1] Li J, Yen C, Liaw D, *et al.* PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer [J]. *Science*, 1997, 275 (5308): 1943-1947.
- [2] Page DL, Ellis IO, Elston CW. Histologic grading of breast cancer. Let's do it [J]. *Am J Clin Pathol*, 1995, 103 (2):123-124.
- [3] Kawaguchi T, Yamashita Y, Kanamori M, *et al.* The PTEN/Akt pathway dictates the direct alphaVbeta3-dependent growth-inhibitory action of an active fragment of tumstatin in glioma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(23): 11331-11340.
- [4] 周诗琼, 陈洪雷, 姚 峰, 等. PTEN、PI3K 和 Akt 蛋白在胃癌组织中的表达及其临床意义 [J]. *武汉大学学报: 医学版*, 2006, 27 (4): 433-436.
- [5] Priulla M, Calastretti A, Bruno P, *et al.* Preferential chemosensitization of PTEN-mutated prostate cells by silencing the Akt kinase [J]. *Prostate*, 2007, 67 (7): 782-789.
- [6] Wiencke JK, Zheng S, Jelluma N, *et al.* Methylation of the PTEN promoter defines low-grade gliomas and secondary glioblastoma [J]. *Neuro Oncol*. 2007, 9 (3): 271-279.
- [7] Dahia PL. PTEN, a unique tumor suppressor gene [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2000, 7(2): 115-129.
- [8] Cai XM, Tao BB, Wang LY, *et al.* Protein phosphatase activity of PTEN inhibited the invasion of glioma cells with epidermal growth factor receptor mutation type III expression [J]. *Int J Cancer*, 2005, 117 (6): 905-912.
- [9] 黄玉钿, 张 声, 郑 曦, 等. 乳腺癌中黏着斑激酶、抑癌基因 PTEN 编码蛋白的表达与生物学行为相关性分析 [J]. *中华实验外科杂志*, 2005, 22 (10): 1201-1202.
- [10] Moon SK, Kim HM, Kim CH. PTEN induces G1 cell cycle arrest and inhibits MMP-9 expression via the regulation of NF-kappaB and AP-1 in vascular smooth muscle cells [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 421 (2): 267-276.
- [11] Huang J, Kontos CD. PTEN modulates vascular endothelial growth factor-mediated signaling and angiogenic effects [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (13): 10760-10766.
- [12] Hong TM, Yang PC, Peck K, *et al.* Profiling the downstream genes of tumor suppressor PTEN in lung cancer cells by complementary DNA microarray [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000, 23(3): 355-363.

[收稿日期] 2007 - 04 - 24

[修回日期] 2007 - 05 - 08

[本文编辑] 王 莹

· 简 讯 ·

《中国肿瘤生物治疗杂志》2008 年度征订启事

《中国肿瘤生物治疗杂志》是由中国免疫学会和中国抗癌协会联合主办的国家级医学学术期刊(刊号为 CN31-1725/R), 双月刊。本刊为中国科技论文统计源期刊、医学核心期刊, 已被《中国科技论文与引文数据库》、《中国科学引文数据库》、《中国学术期刊综合评价数据库》、《中文生物医学期刊文献数据库》、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国学术期刊文摘》、《中国医学文摘》及美国《化学文献》(CA)、波兰《哥白尼索引》(IC)等国内外多数权威数据库和文摘刊物收录。

本刊为中国肿瘤生物治疗领域唯一的高级学术刊物, 重点报道我国肿瘤生物治疗方面基础理论与临床的最新研究成果、新实验技术及其学术进展, 宣传我国肿瘤生物治疗的政策和发展策略。主要栏目有述评、专家论坛、论著、研究快报、学术争鸣、技术方法、文献综述、专题讲座、科技动态等。以肿瘤防治专业的中高级临床和科研工作者、医药院校师生及其他相关学科的科技人员为读者对象。

《中国肿瘤生物治疗杂志》每期定价 8.00 元, 全年定价 48.00 元, 邮发代号: 4-576, 请通过邮局订阅。若错过, 可从本刊编辑部补订, 请将 48.00 元(优惠免邮资)寄本刊编辑部, 并注明详细通讯地址及邮政编码, 编辑部将负责如期寄至您手中。

联系地址: 上海市翔殷路 800 号第二军医大学免疫楼

《中国肿瘤生物治疗杂志》编辑部

联系人: 王莹, 韩丹

邮政编码: 200433

联系电话: 021-55620605 × 22; 021-25070316 × 22; 传 真: 021-25074547

http: www. biother. org; E-mail: cjcb@biother. org