

· 论著 ·

原发性乳腺癌 p-AS160 (Thr642) 水平与常用临床病理指标的相关性研究

姜小华 李君 孙建文 任孔华 单阁 特尼格尔 崔北年 代龙

【摘要】 目的 探讨乳腺癌组织中 p-AS160(Thr642)水平上调与常用临床病理指标的相关性。**方法** 采用免疫组织化学的方法检测 81 例原发性乳腺癌患者肿瘤组织中 p-AS160 (Thr642)、ER、PR、P53 以及 HER-2 的表达水平,采用卡方检验(线性趋势性检验)比较分析 p-AS160 (Thr642)与淋巴结转移、pTNM 分期、ER、PR、P53 以及 HER-2 的相关性。采用 Spearman 检验分析 p-AS160 (Thr642)与患者年龄、肿瘤大小的相关性。**结果** p-AS160 (Thr642)与 HER-2、肿瘤大小呈显著正相关($\chi^2 = 7.245, P = 0.007; r = 0.273, P = 0.013$),而与患者年龄呈显著负相关($r = -0.229, P = 0.040$)。**结论** p-AS160 分子可能是乳腺癌的一个有价值的标志物与治疗靶分子。

【关键词】 乳腺肿瘤;磷酸化;AS160;HER-2

【中图法分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

Correlation of p-AS160 (Thr642) level and clinical biological parameters in breast cancer JIANG Xiao-hua, LI Jun, SUN Jian-wen, REN Kong-hua, SHANG Ge, Teni Geer, CUI Bei-nian, DAI Long. Department of Laboratory Medicine, 85th Hospital of PLA, Shanghai 200052, China

【Abstract】 Objective To observe the correlation between p-AS160 (Thr642) and clinical biological parameters in breast cancer. **Methods** Immunohistochemical method was used to detect p-AS160 (Thr642), estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), P53 and HER-2 levels in tumor tissues of 81 primary breast cancer patients. The association between p-AS160 levels and lymph node metastasis, pTNM stage, ER, PR, P53 and HER-2 was analyzed using Chi-square test. The association between p-AS160 (Thr642) levels and the patient's age and tumor size was analyzed by the Spearman nonparametric test. **Results** p-AS160 (Thr642) was inversely correlated with the patient's age ($r = -0.229, P = 0.040$) and positively correlated with tumor size ($r = 0.273, P = 0.013$) and HER-2 ($\chi^2 = 7.245, P = 0.007$). **Conclusion** p-AS160 (Thr642) might be useful as a marker and a potential target molecule for breast cancer.

【Key words】 breast neoplasms; phosphorylation; AS160; HER-2

AS160 分子 (Akt Substrate of 160) 是 2002 年发现的蛋白激酶 B (Akt) 的底物^[1]。笔者之前的研究发现,乳腺癌中 AS160 分子在 Thr642 位点磷酸化

水平[p-AS160(Thr642)]显著上调^[2-3]。HER-2 被认为是与乳腺癌发生发展密切相关的原癌基因,参与调控细胞的生长、增殖及分化,其产物的过度表达常提示恶性程度高、预后差^[4-5]。本研究分析了 p-AS160 (Thr642) 水平与 HER-2 过表达等乳腺癌常用临床病理指标的相关性。

1 资料和方法

1.1 标本来源

81 例乳腺癌蜡块标本及癌旁正常组织标本均来自解放军 85 医院 2003 ~ 2009 年经手术治疗的乳腺癌患者。所有患者术前未经任何治疗,均为女性。年龄 26 ~ 81 岁,中位年龄 51 岁。浸润性导管癌 70 例,浸润性小叶癌 6 例,髓样癌 5 例。肿瘤大小(3.4±1.7)cm 所有标本均经病理证实。本研究经本院伦理委员会审核通过,并获得患者知情同意。

1.2 主要试剂和仪器

抗 p-AS160 (Thr642) 抗体的制备与验证,参见文献[2]。合成 p-AS160 (Thr642) 磷酸化多肽,免疫动物,抗 p-AS160 (Thr642) 抗体经非磷酸化多肽 AS160 (Thr642) 亲和柱阴性纯化后,再用 p-AS160 (Thr642) 磷酸化多肽亲和柱阳性纯化获得。单克隆抗体 ER(克隆号:ID5)、PR(克隆号:SP2)、P53(克隆号:BP53.12)、HER-2(克隆号:CB11)、SP 超敏检测试剂盒、DAB 显色试剂盒和苏木精复染液等购自福建迈新生物技术开发有限公司。其余化学试剂为国产分析纯。

1.3 免疫组织化学分析

采用免疫组织化学 SP 法。石蜡包埋组织 4 μm 连续切片,贴附于涂有 100 g/L 多聚赖氨酸的载玻片上。常规脱蜡后,滴加新鲜配制 H₂O₂,室温孵育 10 min,以灭活内源性酶,浸入 pH 6.0 柠檬酸缓冲液,置微波炉中煮沸 10 min 以修复抗原。室温中冷却,加普通兔血清封闭,PBS 洗 3 次,滴加一抗。抗 p-AS160 (Thr642) 抗体为 1 : 100 稀释,其余一抗为即用型试剂。4 ℃孵育过夜后漂洗 3 次,加 HRP 标记抗兔二抗,室温孵育 30 min,漂洗后滴加 DAB 底物溶液显色 10 min 后,再以苏木精复染 1 min,脱水,透明及封片,在光学显微镜下观察结果并照像。

所有切片均经两名高年资病理医师在不了解临床资料的情况下独立阅片。p-AS160(Thr642) 免疫组织化学结果判定:以肿瘤细胞内出现黄色或棕黄色颗粒为阳性表达。着色强度分为无色(-)为 0 分,浅黄色(+)为 1 分,黄色(++)为 2 分,棕黄色及深棕色(+++)为 3 分^[2]。HER-2 阳性表现为细胞膜着色,结果判定参考《乳腺癌 HER-2 检测指南(2009 版)》^[6],HER-2(++)的病例再委托艾迪康检验医学中心(上海)进行 FISH 检测。ER、PR 与 P53 的阳性判

定标准为阳性细胞计数 $>10\%$ ^[7]。

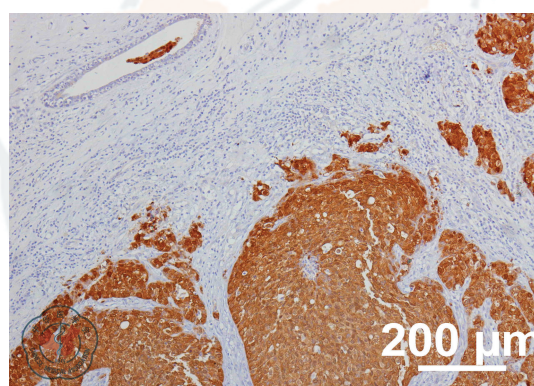
1.4 统计学分析

用 SPSS 11.0 统计分析软件,采用卡方检验(线性趋势性检验)比较分析 p-AS160 (Thr642) 与淋巴结转移、病理分期、ER、PR、P53 以及 HER-2 的相关性。采用 Spearman 检验分析 p-AS160 (Thr642) 与患者年龄、肿瘤大小相关性。 $P<0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 p-AS160 (Thr642) 检测结果与染色特点

免疫组织化学分析显示 p-AS160 (Thr642) 定位于细胞胞质与胞核,以胞质为主。肿瘤细胞阳性,着色明显高于背景。癌旁正常组织为阴性(图 1)。81 例乳腺癌组织中,有 75 例 p-AS160 (Thr642) 阳性,其中 1 分:32 例,2 分:31 例,3 分:12 例(表 1)。



患者,女性,年龄 51 岁,髓样癌。实心箭头所指为残存正常乳腺导管,空心箭头所指为脱落肿瘤细胞

图 1 p-AS160 (Thr642) 免疫组织化学染色强阳性(+++)($\times 200$)

表 1 免疫组织化学检测 81 例乳腺癌组织 p-AS160 (Thr642) 水平 (例)

病理类型	例数	p-AS160 (Thr642)			
		0	1	2	3
浸润性导管癌	70	4	28	28	10
浸润性小叶癌	6	1	3	2	0
髓样癌	5	1	1	1	2
合计	81	6	32	31	12

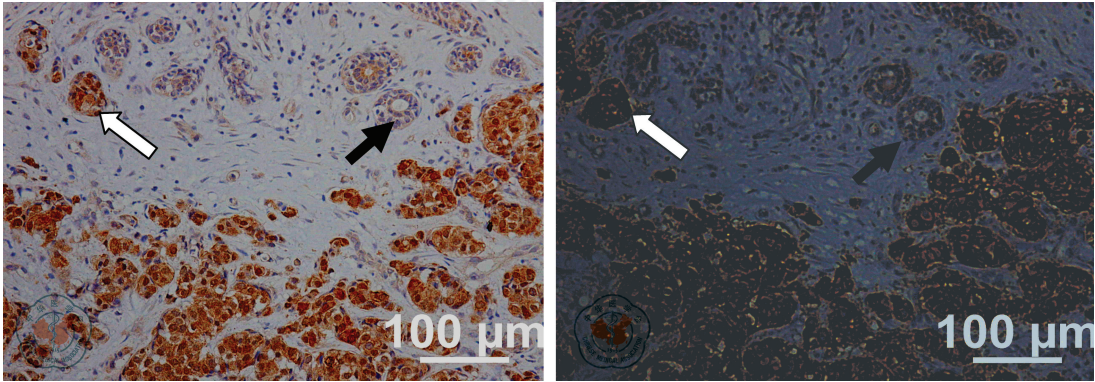
2.2 p-AS160 (Thr642) 水平与常用临床病理指标相关性

经卡方检验(线性趋势性检验)比较,p-AS160 (Thr642) 与淋巴结转移、pTNM 分期、ER、PR、P53 无显著相关性,但与 HER-2 水平显著正相关($\chi^2 = 7.245, P=0.007$)(表 2,图 2)。经 Spearman 检验分析,p-AS160 (Thr642) 与

肿瘤大小呈显著正相关 ($r=0.273, P=0.013$), 而与患者年龄呈显著负相关 ($r=-0.229, P=0.040$)。

表 2 乳腺癌 p-AS160 (Thr642) 水平与临床病理指标相关性分析

临床病理指标	例数	p-AS160(Thr642) (例)				χ^2 值	P 值
		0	1	2	3		
淋巴结转移						3.160	0.075
-	34	2	18	12	2		
+	47	4	14	19	10		
pTNM 分期						0.796	0.372
I、II	50	4	20	21	5		
III	31	2	12	10	7		
ER						0.101	0.751
-	51	2	23	18	8		
+	30	4	9	13	4		
PR						0.975	0.324
-	52	5	17	20	10		
+	29	1	15	11	2		
P53						1.079	0.299
-	54	5	21	22	6		
+	27	1	11	9	6		
HER-2						7.245	0.007
-	58	5	27	21	5		
+	23	1	5	10	7		



p-AS160 (Thr642) 与 HER-2 在实心箭头所指区域共同低表达,而在空心箭头所指区域共同高表达。

图 2 p-AS160(Thr642) (a) 与 HER-2 (b) 的免疫组织化学检查结果($\times 400$)

3 讨论

糖代谢是能量代谢的核心组成部分。细胞葡萄糖摄取涉及多个信号转导途径,主要有 Akt、AMPK 和 c/n PKC 途径。近年来发现 AS-160 分子是 Akt、AMPK 和 c/n PKC 3 种不同信号途径的共同通路。研究认为,AS160 是机体内调节细胞需要摄取葡萄糖的众多信号途径的一个关键交汇点。AS160 分子有

8 个磷酸化位点,而 Thr642 位点是主要磷酸化位点^[8]。

肿瘤细胞无法调控地增殖是恶性肿瘤的最主要特征,而不断增多的细胞数对能量的需求上升,所以与正常细胞、组织及良性病变相比,恶性肿瘤细胞对葡萄糖的摄取显著增加。众多研究证实 AS160 分子的众多上、下游分子在肿瘤中高表达或高活化^[9-10]。而笔者以往的研究表明,AS160 的磷酸化水平在乳腺癌中显著增高^[2],而 AS160 的磷酸化水平上调可引起细胞摄取葡萄糖增加,能量代谢旺盛,以满足肿瘤细胞快速生长与增殖的需要。由此推断,抑制 AS160 磷酸化水平或可作为乳腺癌治疗的一个新方向。

HER-2 基因,在胎盘、胚胎上皮组织及许多肿瘤细胞中呈高表达,而在正常组织中为阴性或微量表达^[11]。HER-2 蛋白作为一个重要的肿瘤标记蛋白,尤其对乳腺癌来说,被认为是乳腺癌重要的预后指标和疗效的预测指标^[4-5,12]。

HER-2 基因激活后,通过一系列信号转导通路使细胞的生物学特性发生改变,并导致细胞恶性转化和出现恶性表型。目前认为 HER-2 受体介导的信号转导通路主要包括 Ras-Raf-Mek-MAPK、PI3K-AKT 等^[11]。AS-160 分子的活化涉及 Akt、AMPK 和 c/n PKC 3 种不同信号途径。本研究发现 AS160 的磷酸化水平与 HER-2 蛋白相关,笔者推测这可能是因为 HER-2 蛋白可激活 AS160 的上游分子如 AKT 等。

本研究中,p-AS160 (Thr642) 阳性率显著高于 HER-2。文献报道 Akt、AMPK 和 c/n PKC 3 种不同信号途径在乳腺癌中都可出现异常^[10]。3 种信号途径中任何一种或几种活化都可导致 AS160 分子磷酸化水平显著上调。反之推测 AS160 分子磷酸化水平上调的概率可能高于 3 种信号途径中任何单独一种。本研究中 81 例肿瘤样本中有高达 75 例 p-AS160 (Thr642) 呈阳性,而癌旁组织为阴性,显示 p-AS160 (Thr642) 对乳腺癌诊断有较高的应用价值。

患者年龄、肿瘤大小、HER-2 都是目前用于判断乳腺癌预后的重要指标。本研究发现 AS160 磷酸化水平与患者年龄呈负相关,而与肿瘤大小、HER-2 显著正相关,提示 AS160 的磷酸化水平或许可作为肿瘤进展和预后的判定指标,其在临床评价危险度的作用仍有待研究。

参考文献

- [1] Kane S, Sano H, Liu SC, et al. A method to identify serine kinase substrates Akt phosphorylates a novel adipocyte protein with a Rab GTPase-activating protein (GAP) domain[J]. J Biol Chem, 2002, 277(25): 22115-22118.
- [2] Jiang XH, Sun JW, Xu M, et al. Frequent hyperphosphorylation of AS160 in breast cancer[J]. Cancer Biol Ther, 2010, 10(4): 362-367.
- [3] 姜小华, 狄杨, 蒋晓飞, 等. 从睾丸 cDNA 表达文库筛选胰腺癌肿瘤抗原[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(7): 750-753.
- [4] Tsutsui S, Ohno S, Murakami S, et al. Prognostic value of c-erbB-2 expression in breast cancer[J]. J Surg Oncol, 2002, 79(4): 216-223.

- [5] Capala J, Bouchelouche K. Molecular imaging of HER2-positive breast cancer: a step toward an individualized 'image and treat' strategy[J]. Curr Opin Oncol, 2010, 22(6):559-566.
- [6] 《乳腺癌 HER2 检测指南(2009 版)》编写组. 乳腺癌 HER2 检测指南(2009 版)[J]. 中华病理学杂志, 2009, 38(12):836-340.
- [7] 张萍, 徐兵河, 马飞, 等. 年轻三阴性乳腺癌患者的临床病理特征及预后分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2010, 32(2):128-131.
- [8] Sakamoto K, Holman GD. Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic[J]. J Am Physiol Endocrinol Metab, 2008, 295(1):E29-E37.
- [9] Bartlett JM. Biomarkers and patient selection for PI3K/Akt/mTOR targeted therapies: current status and future directions[J]. Clin Breast Cancer, 2010, 10(Suppl 3):S86-S95.
- [10] Salh B, Marotta A, Wagey R, et al. Dysregulation of phosphatidylinositol 3-kinase and downstream effectors in human breast cancer[J]. Int J Cancer, 2002, 98(1):148-154.
- [11] Gullick WJ, Srinivasan R. The type 1 growth factor receptor family: new ligands and receptors and their role in breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 1998, 52(1-3):43-53.
- [12] 连臻强, 何洁华, 王曦, 等. 乳腺癌不同分子亚型的临床特点和生存分析[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2009, 3(2):139-146.

(收稿日期:2011-12-13)

(本文编辑:刘军兰)

姜小华, 李君, 孙建文, 等. 原发性乳腺癌 p-AS160(Thr642) 水平与临床病理指标的相关性研究[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2012, 6(3):298-303.

中华医学会