

• 综述 •

人类组织激肽释放酶基因与乳腺癌关系的研究进展

李梅芳 综述 何建蓉 审校

全世界每年约有 120 万妇女发生乳腺癌,有 50 万妇女死于乳腺癌。在西方发达国家,乳腺癌早已成为威胁女性身心健康最常见的恶性肿瘤之一^[1]。中国目前的发病率虽然不如西方国家高,但在过去 30 年中,乳腺癌是上升最快的恶性肿瘤之一,仅次于肺癌。在上海、北京等地区,乳腺癌的发病率已经超过子宫颈癌,成为危害女性生命健康的最常见恶性肿瘤^[2]。乳腺癌严重地危害人民健康,对社会人力资源影响极大,因此乳腺癌发病机制的研究一直备受关注。随着分子生物学技术的应用和发展,从基因水平探讨乳腺癌的发生、发展规律,将对其早期诊断和治疗具有重要意义。

人类组织激肽释放酶基因(KLK)家族是由位于 19 号染色体 q13.4 区域的 300 kb 基因序列组成,包含有 15 个人类组织激肽释放酶基因,编码丝氨酸蛋白酶,属分泌性蛋白,它们的生理功能和特性目前还不清楚^[3-4]。根据基因库基因官方命名规则,15 个人类组织激肽释放酶基因及其蛋白分别被命名为 KLK1~KLK15 和 hk1~hk15^[4]。KLK 家族的数个成员已被发现是很好的潜在的肿瘤标志物,例如 hk3 或称前列腺特异性抗原(prostate specific antigen, PSA),是 KLK 家族的一个成员,是临床上广泛用于筛选、诊断前列腺癌的肿瘤标志物^[5]。目前,相关研究提示人类组织激肽释放酶基因家族中的多个成员与前列腺癌以外的多种肿瘤的发生、发展密切相关,例如乳腺癌、卵巢癌、肺癌、结直肠癌等^[6-7]。笔者就人类激肽释放酶基因与乳腺癌关系的相关研究成果作一综述。

1 基因和蛋白质的结构

1.1 基因的结构^[3-4]

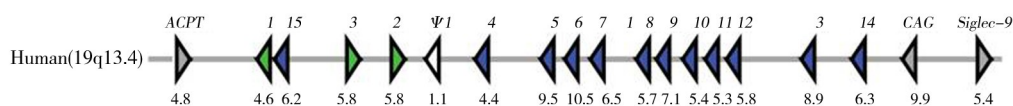
人类组织激肽释放酶基因家族位于 19q 13.3~19q13.4,长约 300 kb。着丝粒端与睾丸酸磷酸酶基因(testicular acid phosphatase gene, ACPT)相邻,端粒端与肿瘤相关基因(cancer-associated gene, CAG)和唾液酸结合的 Ig 样凝集素基因 9(sialic acid-binding Ig-like lectin gene 9, Siglec-9)相邻。该基因座包含 15 个呈串联方式排列的人类组织激肽释放酶基因,其中没有插入任何一个其他基因(图 1)。除 KLK2 和 KLK3 外,该基因家族的其余成员互

基金项目:上海教育委员会重点学科建设项目资助(J50208)

作者单位:20025 上海,上海交通大学医学院附属瑞金医院乳腺疾病诊治中心

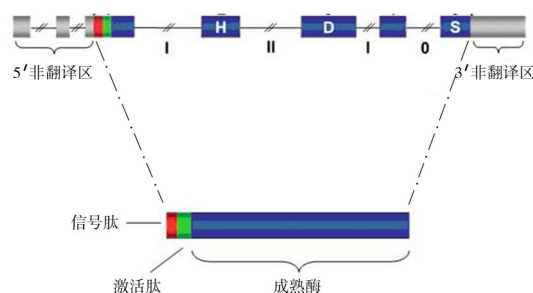
通信作者:何建蓉, E-mail: hejrong@hotmail.com

相之间在 DNA 和蛋白质水平上有 30%~50% 相似, KLK2 和 KLK3 有 80% 相似。每一个基因都含有 5 个外显子、4 个内含子和 1 个 3' 端非翻译区。除经典的 KLK(KLK1、KLK2、KLK3) 外, 5' 端还有 1 个或者 2 个非翻译区。所有 KLK 成员第 2 外显子末端附近的编码区编码催化三联体的组氨酸, 第 3 外显子中间附近的编码区编码催化三联体的天冬氨酸, 第 5 外显子起始端附近的编码区编码催化三联体的丝氨酸^[4](图 2)。



箭头的方向表示基因转录的方向, 绿色表示为传统经典的 KLK, 蓝色表示为非经典的 KLK。

图 1 人类组织激肽释放酶基因座的结构



盒子结构表示为外显子, 线性结构表示为内含子, H 代表组氨酸, D 代表天冬氨酸, S 代表丝氨酸。I 代表 I 型内含子, II 代表 II 型内含子, 0 代表 0 型内含子。

图 2 人类组织激肽释放酶基因和蛋白质的结构

1.2 蛋白质的结构^[3-4]

人类组织激肽释放酶最初合成时都以酶原的前体形式存在, 由信号肽、激活肽及成熟酶组成^[4](图 2)。人类组织激肽释放酶的空间结构大体相似, 核心主要由两个 α 螺旋和两个紧密相邻的反向平行的 β -barrels 组成。催化三联体及底物结合部位位于两个 β -barrels 形成的裂口之间, 外围是一些调控该酶活性的环形结构。各种人类组织激肽释放酶的空间结构差别主要在于外环的数量和形状的不同。

2 KLK3 与乳腺癌

在组织学上, 目前大多数相关研究均提示: PSA 在癌组织中高表达是乳腺癌预后良好的一个生物学指标; PSA 高表达者无病生存率(disease free survival, DFS)和总生存率(overall survival, OS)较 PSA 低表达者高; PSA 高表达者, 肿瘤体积更小, 雌激素受体(ER)阳性率更高, 术后复发率更低^[8]。尤其在一些特殊患者中, 如淋巴结有转移、ER(-)或者肿瘤 > 2 cm 的患者中, PSA 高表达者预后仍较低表达患者好。然而 2006 年 Narita 等^[9]报道: 在绝经前患者中 PSA 的

表达与人类表皮生长因子受体 2(HER-2)的状态呈负相关,即大多数 PSA 阳性的绝经前患者,HER-2 呈阴性;PSA 的表达与其他临床指标,如淋巴结状态、有无远处转移、ER 和孕激素受体(PR)的状态以及分化等级没有相关性。

在血清学方面,乳腺良恶性病变患者血清 PSA 水平较正常成年女性高,但在乳腺癌患者和乳腺良性病变患者间血清 PSA 上升水平的差异无统计学意义^[10-11]。有实验报道:女性乳腺良恶性病变患者血清总的 PSA 虽然没有统计学意义,但在分子构成上差异有统计学意义;乳腺癌患者较乳腺良性病变的患者血清游离 PSA 与总 PSA 的比例高,以 50%为临界值,其诊断乳腺癌的特异性大于 90%,但其敏感性较低,大约只有 20%^[10,12-13]。同时还有文献报道:在乳腺癌患者中,手术前后的血清总 PSA 和游离 PSA 的变化都有统计学意义,并且总 PSA 的变化不是太大,但游离 PSA 的变化显著,进而由此推测乳腺癌组织主要产生游离 PSA 或者乳腺癌组织生了一种水解蛋白酶参与 PSA 翻译后的修饰,修饰后的 PSA 失去了与其抑制物相结合的能力^[10-11]。

实验表明:在乳头抽吸液(nipple aspirate fluid, NAF)中也有 PSA 表达,75%以上的成年妇女乳头抽吸液中可以检测到 PSA;NAF 中的 PSA 水平与年龄和绝经状态有关,绝经前大于绝经后,随着年龄的增加 PSA 的水平逐渐下降,这表明 NAF 中 PSA 的水平与人体内激素水平有关^[14-15]。相关研究表明:NAF 中 PSA 的水平与乳腺癌明显相关,不管患者绝经与否,乳腺癌患者的 NAF 中 PSA 水平较非癌患者低^[14-15]。Sauter 等^[16]报道 NAF 中 PSA 与肿瘤分期、肿瘤大小、淋巴结的状态以及远处转移有关:肿瘤分期越高,PSA 水平越低,肿瘤越大,PSA 的水平越低;淋巴结有转移的患者较无转移者的 PSA 水平低,有远处转移者的 PSA 水平更低。

由于 PSA 在前列腺癌患者中的成功运用以及 PSA 在乳腺组织、乳汁、乳头抽吸液、乳腺囊肿液和女性血清中均有表达,促使各国学者开始研究 PSA 在乳腺疾病中临床作用,尤其是乳腺癌。到目前为止,虽然近几年开展的各种实验大多都提示 PSA 是乳腺癌预后良好的一个生物学标记,并且还有早期诊断的价值,但是 PSA 在乳腺癌中的具体生物学功能还不十分清楚,它是通过哪一条信号通路或者方式来产生生物学效应还不清楚,期待更多的研究去阐明。此外可能是由于 PSA 检测方法或者分组标准的不同,有些实验出现了结果不一致的现象。

3 KLK10 与乳腺癌

Liu 等^[17]采用减数杂交的方法比较分析正常乳腺上皮细胞 76N 细胞株与其经过射线处理后转化为相应乳腺癌细胞株 76R-30 细胞总 mRNA 差别时发现了 KLK10 基因,在正常乳腺细胞株中 KLK10 高表达而在其相应乳腺癌细胞株中低表达或者不表达。将带有 KLK10 cDNA 的质粒转染到 KLK10

表达阴性的乳腺癌细胞中,肿瘤细胞在体外不依赖支持物生长的活性降低;将转染有 KLK10 cDNA 的乳腺癌细胞注射到裸鼠的乳腺区域,裸鼠不成瘤,而将没有转染 KLK10 cDNA 的相同乳腺癌细胞注射到裸鼠的乳腺区域,裸鼠长肿瘤^[18]。KLK10 在乳腺癌细胞和组织中的低表达或表达缺失与其第 3 外显子 CpG 岛的高度甲基化相关^[19]。Kioulafa 等^[20]报道:在早期乳腺癌患者群中,KLK10 第 3 外显子的甲基化是一个预后不良的标记;第 3 外显子甲基化的患者较非甲基化的患者 OS 和 DFS 低。然而 2001 年 Luo 等^[21]通过一个包含有 749 个样本的研究表明:KLK10 高表达的患者年龄小,大多数为绝经前的患者,患者的雌、孕激素受体阴性比例高;KLK10 高表达与肿瘤的大小、分级、淋巴结状态、OS 和 DFS 无关,而且 KLK10 高表达与 ER(+)患者对他莫昔芬的治疗效果存在负相关。

到目前为止,在体外细胞实验支持 KLK10 是一种肿瘤抑制基因的结论,而人体组织标本的实验结果与体外细胞实验结果不一致,这表明 KLK10 在乳腺癌中的生物学作用还不是很清楚,需要更多的实验进行验证。Feng 等^[22]报道 KLK10 在结直肠癌和胃癌中表现出癌基因的特点,促进肿瘤的发生和发展。鉴于此,可以这样假设:klk10 可能是一种多功能的细胞因子,它产生的生物学效应主要取决于靶器官的受体类型,作用于促细胞生长的受体其就促进细胞的生长,作用于抑制细胞生长的受体就抑制细胞的生长。在乳腺癌中体外细胞株实验的结果与人体组织实验的差别可能是人体组织受到体内多种激素的作用,klk10 的受体表达下降,所以 KLK10 抑制乳腺肿瘤生长的作用不明显。

4 其他 KLK 与乳腺癌

4.1 预示乳腺癌预后良好的 KLK

到目前为止,已有的实验结果提示 KLK7、KLK8、KLK9、KLK12、KLK13 和 KLK15 可能是乳腺癌预后良好的生物学标记^[23-28]。高表达 KLK7 的患者有更高的 DFS 和 OS;在术后没有接受其他辅助治疗的患者群中,KLK7 的高表达依然是一个预后良好的标志^[23]。KLK8 和 KLK12 在乳腺癌组织中的表达较相应正常组织低^[24-26]。高表达 KLK9 的患者,OS 和 DFS 高;在临床早期或者肿瘤 ≤ 2 cm 的亚群中,KLK9 呈高表达;在 ER(-)或者 PR(-)的亚群中,KLK9 的高表达仍是一个预后良好的标记^[25]。高表达 KLK13 的患者 OS 和 DFS 高;在 ER(+),PR(+)或者淋巴结阳性的亚群中,KLK13 依然是一个独立的预后良好的标志^[27]。高表达 KLK15 的患者有更高的 OS 和 DFS;淋巴结阴性的患者 KLK15 表达高;在分化差和 ER(-)、PR(-)的患者中,KLK15 高表达的患者比低表达者预后好^[28]。

4.2 预示乳腺癌预后不良的 KLK

相关研究提示, KLK4、KLK5、KLK6、KLK11 和 KLK14 可能是乳腺癌预后不良的生物学标记。KLK4 在乳腺癌中的表达比乳腺良性肿瘤高, 并且在乳腺癌患者中, 分化好的早期乳腺癌表达低; KLK4 的表达与 PR 的表达呈负相关^[29-30]。在 RNA 水平上, 高表达 KLK5 的患者, OS 和 DFS 低; 在肿瘤 > 2 cm 或者淋巴结阳性的患者群中, KLK5 的高表达依然是一个独立的预后不良的标记^[31]。在蛋白质和 RNA 水平上, KLK6 在乳腺癌原发灶中的表达要比周围正常组织高, 但在其相应的转移病灶中 KLK6 表达低^[32]。Pampalakis 等^[32]证实造成 KLK6 在原发灶和转移灶中不同表达的原因可能与 KLK6 启动子 CpG 岛甲基化和去甲基化有关, 在原发灶中高表达是由于启动子 CpG 岛的完全去甲基化, 而在转移灶低表达是由于启动子 CpG 岛的高度甲基化。hk11 可通过降解胰岛素样生长因子结合蛋白 3 导致机体内游离胰岛素样生长因子增多, 进而促进乳腺癌的发生和发展, 是乳腺癌预后不良的一个标志^[33]。KLK14 在乳腺癌中表达较相应正常组织高, 并且 KLK14 高表达与肿瘤低分化和淋巴结阳性存在相关性^[34]。此外有文献报道乳腺癌患者血清中的 hk14 比正常人群高^[35]。Yousef 等^[36]报道: 晚期乳腺癌患者 KLK14 表达高; 在生存分析上, KLK14 高表达与低 OS 和 DFS 存在相关性; 在肿瘤 < 2 cm、淋巴结阳性、ER(+) 或者 PR(+) 的亚群中, KLK14 依然是一个预后不良的标志。

除 KLK3 和 KLK10 之外, 针对其他人类激肽释放酶基因与乳腺癌关系的研究不多, 实验的样本含量也很有限, 有些针对同一基因的实验研究则得到相反的结果, 需要更多的样本含量更大的实验来验证。此外, 目前的相关实验研究在人类组织激肽释放酶基因表达高低的分类上也存在着差异, 这也可能是造成实验结果差异的一个原因。

针对 KLK1 的研究目前主要在心脑血管疾病方面, 在乳腺癌方面未见报道^[37]。KLK2 在前列腺癌相关研究中有报道, 在其他肿瘤中也未见报道^[38]。

5 结语

在肿瘤领域, 针对丝氨酸蛋白酶的研究一直是热点, 因为目前的许多实验数据表明, 丝氨酸蛋白酶参与肿瘤发生、发展的许多环节。人类组织激肽释放酶是丝氨酸蛋白酶家族中的一个成员。目前, 相关研究仅限于人类组织激肽释放酶基因在肿瘤组织中的表达, 对每一种人类组织激肽释放酶基因的生物学功能研究不多, 况且目前的相关实验样本数量都不够大, 部分实验结果也不一致, 实验数据的说服力不强。15 种人类激肽释放酶基因在蛋白和基因水平上存在着很大的相似性, 但是, 目前的实验结果提示它们在乳腺癌中作用并不相同, 部分成员的作用完全相反。到目前为止, 没有相关的实验探索其中的原因。已有文献报道: hk2 和 hk5 可以水解 PSA 前体, 从而使后者具有生物学

活性。鉴于此,部分学者开始探讨 15 种人类激肽释放酶可能通过级联反应相互作用、相互制约而产生生物学效应^[4]。

由于人类激肽释放酶基因家族成员之一 PSA 在前列腺癌临床中的成功应用,许多学者开始探讨该家族基因在其他肿瘤中的应用价值,例如乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌、胃癌、肺癌等,其中乳腺癌研究最多,但是相关研究尚处于初级阶段,实验结果尚不一致,需要更多的大规模实验来说明和解决问题。

【关键词】 乳腺肿瘤;人类组织激肽释放酶

【中图法分类号】 R737.9 【文献标识码】 A

参考文献

- [1] 梁燕,范林军.老年乳腺癌的临床流行病学.中华乳腺病杂志:电子版,2008,2:61-62.
- [2] 郑一琼,李席如,李荣.乳腺癌保乳综合治疗的进展.中华乳腺病杂志:电子版,2008,2:35-41.
- [3] Emami N, Diamandis EP. Human tissue kallikreins: a road under construction. Clin Chim Acta 2007;381:78-84.
- [4] Borgono CA, Michael IP, Diamandis EP. Human tissue kallikreins: physiologic roles and applications in cancer. Mol Cancer Res, 2004,2:257-280.
- [5] Klein EA. What's new in prostate cancer screening and prevention? Cleve Clin J Med, 2009, 76:439-445.
- [6] Planque C, Li L, Zheng Y, et al. A multiparametric serum kallikrein panel for diagnosis of non-small cell lung carcinoma. Clin Cancer Res, 2008,14:1355-1362.
- [7] Talieri M, Li L, Zheng Y, et al. The use of kallikrein-related peptidases as adjuvant prognostic markers in colorectal cancer. Br J Cancer, 2009, 100:1659-1665.
- [8] Yu H, Levesque MA, Clark GM, et al. Prognostic value of prostate-specific antigen for women with breast cancer: a large United States cohort study. Clin Cancer Res, 1998,4:1489-1497.
- [9] Narita D, Cimpean AM, Anghel A, et al. Prostate-specific antigen value as a marker in breast cancer. Neoplasma, 2006,53:161-167.
- [10] Black MH, Diamandis EP. The diagnostic and prognostic utility of prostate-specific antigen for diseases of the breast. Breast Cancer Res Treat, 2000,59:1-14.
- [11] Borchert GH, Giai M, Diamandis EP. Elevated levels of prostate-specific antigen in serum of women with fibroadenomas and breast cysts. J Natl Cancer Inst, 1997,89:587-588.
- [12] Borchert GH, Melegos DN, Tomlinson G, et al. Molecular forms of prostate-specific antigen in the serum of women with benign and malignant breast diseases. Br J Cancer, 1997,76:1087-1094.
- [13] Giai M, Yu H, Roagna R, et al. Prostate-specific antigen in serum of women with breast cancer. Br J Cancer, 1995,72:728-731.
- [14] Sauter ER, Daly M, Lenahan K, et al. Prostate-specific antigen levels in nipple aspirate fluid correlate with breast cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1996, 5: 967-970.
- [15] Sauter ER, Babb J, Daly M, et al. Prostate-specific antigen production in the female breast: association with progesterone. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1998 7:315-320.
- [16] Sauter ER, Klein G, Wagner Mann C, et al. Prostate-specific antigen expression in nipple aspirate fluid is associated with advanced breast cancer. Cancer Detect Prev, 2004,28:27-31.
- [17] Liu XL, Wazer DE, Watanabe K, et al. Identification of a novel serine protease-like gene, the expression of which is down-regulated during breast cancer progression. Cancer Res, 1996,56:3371-3379.
- [18] Goyal J, Smith KM, Cowan JM, et al. The role for NES1 serine protease as a novel tumor suppressor. Cancer Res, 1998, 58:4782-4786.
- [19] Li B, Goyal J, Dhar S, et al. CpG methylation as a basis for breast tumor-specific loss of NES1/kallikrein 10 expression.

- Cancer Res, 2001,61;8014-8021.
- [20] Kioulafa M, Kaklamanis L, Stathopoulos E, et al. Kallikrein 10 (KLK10) methylation as a novel prognostic biomarker in early breast cancer. *Ann Oncol*, 2009, 20;1020-1025.
- [21] Luo LY, Diamandis EP, Look MP, et al. Higher expression of human kallikrein 10 in breast cancer tissue predicts tamoxifen resistance. *Br J Cancer*, 2002,86;1790-1796.
- [22] Feng B, Xu WB, Zheng MH, et al. Clinical significance of human kallikrein 10 gene expression in colorectal cancer and gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol*, 2006, 21;1596-1603.
- [23] Holzscheiter L, Biermann J C, Kotzsch M, et al. Quantitative reverse transcription-PCR assay for detection of mRNA encoding full-length human tissue kallikrein 7: prognostic relevance of KLK7 mRNA expression in breast cancer. *Clin Chem*, 2006, 52;1070-1079.
- [24] Yousef GM, Yacoub GM, Polymeris ME, et al. Kallikrein gene downregulation in breast cancer. *Br J Cancer*, 2004,90;167-172.
- [25] Yousef GM, Scorilas A, Nakamura T, et al. The prognostic value of the human kallikrein gene 9 (KLK9) in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2003,78;149-158.
- [26] Yousef GM, Magklara A, Diamandis EP. KLK12 is a novel serine protease and a new member of the human kallikrein gene family-differential expression in breast cancer. *Genomics*, 2000,69;331-341.
- [27] Chang A, Yousef GM, Scorilas A, et al. Human kallikrein gene 13 (KLK13) expression by quantitative RT-PCR: an independent indicator of favourable prognosis in breast cancer. *Br J Cancer*, 2002,86;1457-1464.
- [28] Yousef GM, Scorilas A, Magklara A, et al. The androgen-regulated gene human kallikrein 15 (KLK15) is an independent and favourable prognostic marker for breast cancer. *Br J Cancer*, 2002,87;1294-1300,999.
- [29] Papachristopoulou G, Avgeris M, Scorilas A. Expression analysis and study of KLK4 in benign and malignant breast tumours. *Thromb Haemost*, 2009,101;381-387.
- [30] Mange A, Desmetz C, Berthes ML, et al. Specific increase of human kallikrein 4 mRNA and protein levels in breast cancer stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 375;107-112.
- [31] Yousef GM, Scorilas A, Kyriakopoulou LG, et al. Human kallikrein gene 5 (KLK5) expression by quantitative PCR: an independent indicator of poor prognosis in breast cancer. *Clin Chem*, 2002,48;1241-1250.
- [32] Pampalakis G, Sotiropoulou G. Multiple mechanisms underlie the aberrant expression of the human kallikrein 6 gene in breast cancer. *Biol Chem*, 2006,387;773-782.
- [33] Sano A, Sangai T, Maeda H, et al. Kallikrein 11 expressed in human breast cancer cells releases insulin-like growth factor through degradation of IGFBP-3. *Int J Oncol*, 2007,30;1493-1498.
- [34] Fritzsche F, Gansukh T, Borgono CA, et al. Expression of human Kallikrein 14 (KLK14) in breast cancer is associated with higher tumour grades and positive nodal status. *Br J Cancer*, 2006,94;540-547.
- [35] Borgono CA, Grass L, Soosaipillai A, et al. Human kallikrein 14: a new potential biomarker for ovarian and breast cancer. *Cancer Res*, 2003, 63;9032-9041.
- [36] Yousef GM, Borgono CA, Scorilas A, et al. Quantitative analysis of human kallikrein gene 14 expression in breast tumours indicates association with poor prognosis. *Br J Cancer*, 2002,87;1287-1293.
- [37] Zhao W, Wang L, Lu X, et al. A coding polymorphism of the kallikrein 1 gene is associated with essential hypertension: a tagging SNP-based association study in a Chinese Han population. *J Hypertens*, 2007, 25;1821-1827.
- [38] Sardana G, Dowell B, Diamandis EP. Emerging biomarkers for the diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Clin Chem*, 2008, 54;1951-1960.

(收稿日期:2009-04-21)

(本文编辑:罗承丽)

李梅芳. 人类组织激肽释放酶基因与乳腺癌关系的研究进展[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2010,4(1):99-105.