

· 论著 ·

鞘氨醇激酶 1 在乳腺癌中的表达及其临床意义

郑晓东^{1,2} 张彦² 房慧颖¹ 王明浩² 张毅² 姜军²

【摘要】 目的 探讨鞘氨醇激酶 1(Sphk1)在乳腺癌中的表达情况及其与临床病理特征及 E-钙黏蛋白(E-cadherin)表达的关系。方法 收集 2003 年 9 月至 2006 年 5 月重庆市肿瘤研究所乳腺外科手术切除的乳腺组织标本 171 例,包括乳腺纤维腺瘤 20 例和浸润性导管癌 151 例。通过免疫组织化学方法检测所有乳腺组织标本中 Sphk1 的表达,并分析其与乳腺癌临床病理特征及 E-cadherin 表达的关系。计数资料采用 χ^2 检验,等级资料采用秩和检验。结果 Sphk1 在 114 例乳腺癌组织中表达阳性,总阳性率为 75.50% (114/151),而在乳腺纤维腺瘤组织中均表达阴性(0/20),两组差异有统计学意义($\chi^2 = 45.298, P=0.000$)。Sphk1 表达与乳腺癌淋巴结转移状态($Z=-6.122, P=0.000$)、ER($\chi^2 = 4.478, P=0.034$)及 HER-2 表达($\chi^2 = 7.313, P=0.013$)有关,而与患者年龄($\chi^2 = 2.791, P=0.095$)、月经状况($\chi^2 = 0.010, P=0.919$)、肿瘤直径($Z=-0.249, P=0.804$)、PR 表达($\chi^2 = 0.740, P=0.390$)无关。在全部浸润性导管癌患者中,E-cadherin 与 Sphk1 表达不同的患者其淋巴结转移状态差异有统计学意义($\chi^2 = 17.187, P=0.001$)。E-cadherin(-)且 Sphk1(+)的患者淋巴结阳性率为 85.71% (18/21),E-cadherin(+)且 Sphk1(-)的淋巴结阳性率为 30.77% (8/26),两者差异具有统计学意义($\chi^2 = 14.189, P<0.008$)。结论 Sphk1 可能在乳腺癌的发生和转移过程中发挥作用,有望作为评估乳腺癌生物学行为的指标。

【关键词】 乳腺肿瘤; 肿瘤浸润; E-钙黏蛋白; 鞘氨醇激酶 1

【中图分类号】 R737.9

【文献标志码】 A

Expression of sphingosine kinase 1 in breast cancer and its clinical significance Zheng Xiaodong^{1,2}, Zhang Yan², Fang Huiying¹, Wang Minghao², Zhang Yi², Jiang Jun². ¹Department of Breast Surgery, Chongqing Cancer Institute, Chongqing 400030, China; ²Department of Breast Surgery, Southwest Hospital, Third Military Hospital, Chongqing 400030, China

Corresponding author: Zhang Yi, Email: zy53810@163.com; Jiang Jun, Email: jcbd@medmail.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the expression of sphingosine kinase 1 (Sphk1) and its correlation with clinicopathological characteristics and with E-cadherin expression in breast cancer. **Methods** We collected 171 cases of breast tissue specimens resected in Department of Breast Surgery, Chongqing Cancer Institute from September 2003 to May 2006, including 20 cases of breast fibroadenoma and 151 cases of invasive ductal carcinoma. Immunohistochemistry was used to detect Sphk1 and E-cadherin expression in all breast tissue specimens. The correlations of Sphk1 expression with clinicopathological characteristics and E-cadherin expression were analyzed. The count data were processed using χ^2 test, rank data using rank sum test. **Results** Sphk1 was positive in 114 cases of breast cancer (75.50%, 114/151), negative in all 20 cases of breast fibroadenoma; the difference was significant ($\chi^2 = 45.298, P=0.000$); Sphk1 expression was significantly associated with lymph node metastasis ($Z=-6.122, P=0.000$), ER ($\chi^2 = 4.478, P=0.034$) and HER-2 expression ($\chi^2 = 7.313, P=0.013$), not correlated with the patient's age ($\chi^2 = 2.791, P=0.095$), menopausal status ($\chi^2 = 0.010, P=0.919$), tumor diameter ($Z=-0.249, P=0.804$) or PR expression ($\chi^2 = 0.740, P=0.390$). In all patients with invasive ductal carcinoma, the patients with different E-cadherin and Sphk1 expression status showed a significant

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2015.02.005

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81072156);重庆市科技计划项目(cstc2013jcsf10027);重庆市沙坪坝区社会发展领域科技项目(cstc2013jcsf0143);重庆市卫计委科技计划项目(2012-2-505)

作者单位:400030 重庆市肿瘤研究所乳腺外科¹; 400038 重庆,第三军医大学西南医院乳腺外科²

通信作者:张毅,Email: zy53810@163.com; 姜军, Email: jcbd@medmail.com.cn

difference in lymph node metastasis ($\chi^2 = 17.187$, $P = 0.001$). The positive rate of lymph node metastasis was 85.71% (18/21) in the patients with E-cadherin (-) and Sphk1 (+), 30.77% (8/26) in the patients with E-cadherin (+) and Sphk1 (-), indicating a significant difference ($\chi^2 = 14.189$, $P < 0.008$). **Conclusion** Sphk1 may play an important role in the development and metastasis of breast cancer, which can be a useful indicator to predict the biological behaviors of breast cancer.

【Key words】 Breast neoplasms; Neoplasm invasiveness; E-cadherin; Sphingosine kinase 1

乳腺癌是女性最常见恶性肿瘤之一,且发病率不断上升。统计数据显示,2013 年全球女性乳腺癌约占当年女性新发恶性肿瘤的 29%,居发病率第 1 位^[1]。近年来,随着诊疗手段的进步,乳腺癌病死率总体呈下降趋势,但局部浸润以及远处转移仍是其难以治愈的根本原因。乳腺导管上皮细胞向乳腺癌细胞恶性转化的机制仍是目前研究的重点。鞘氨醇激酶 1 (sphingosine kinase 1, Sphk 1) 是一种维持细胞内鞘脂平衡的重要限速酶,能促进鞘氨醇磷酸化生成 1-磷酸鞘氨 (sphingosine 1-phosphate, S1P),从而调节细胞的侵袭转移、黏附分子表达以及增殖、凋亡等^[2-3]。Sphk1 在乳腺癌中呈高表达^[4],可能参与了乳腺癌的侵袭转移过程。本研究通过检测乳腺癌组织中 Sphk1 的表达情况,分析其与临床病理特征及与上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的关键蛋白 E-钙黏蛋白(E-cadherin)表达的关系。

1 材料与方法

1.1 病例来源

收集 2003 年 9 月至 2006 年 5 月重庆市肿瘤医院乳腺外科手术切除的乳腺组织标本 171 例。所有病例均经病理证实。其中,乳腺纤维腺瘤组 20 例,均为女性,年龄 19~45 岁,中位年龄 27 岁;乳腺浸润性导管癌组 151 例,均为女性,年龄 29~76 岁,中位年龄 47 岁。浸润性导管癌组无其他恶性肿瘤病史,术前检查无远处转移,术前未经放、化疗,同侧无腋窝淋巴结转移 61 例,淋巴结转移 ≥ 1 枚 90 例。术后病理诊断^[5]及临床分期^[6]按文献所述标准进行。

1.2 免疫组织化学检测

1.2.1 主要试剂 Sphk1 兔抗人单克隆抗体购于美国 Epitomics 公司, E-cadherin 兔抗人单克隆抗体购于美国 Santa Cruz Biotechnology 公司, Envision/HRP 试剂盒购于丹麦 DAKO 公司,超敏 SP 试剂盒、DAB 显色试剂盒均购于福州迈新生物

技术有限公司。

1.2.2 方法 石蜡标本以 4 μm 厚度连续切片,脱蜡、水化,3% H_2O_2 溶液处理 10 min 使内源性过氧化物酶灭活,置于枸橼酸盐修复液中热处理 13 min,用 PBS 漂洗 1 次 2 min,连续 3 次。滴加一抗(Sphk1 兔抗人单克隆抗体、E-cadherin 兔抗人单克隆抗体,工作浓度分别为 1:80、1:200),于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h 后 PBS 洗 3 次,滴加二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 25 min, PBS 浸洗, DAB 显色,苏木素复染,脱水,透明,中性树胶封片。以 Sphk1、E-cadherin 阳性的乳腺癌组织切片为阳性对照,用 PBS 缓冲液替代一抗做阴性对照。

1.3 结果判定

ER、PR、HER-2 阴阳性结果判定遵循《美国临床肿瘤学会/美国病理学会指南》^[7-8]。Sphk1 和 E-cadherin 在乳腺癌细胞质和细胞膜中均有表达,其结果判定根据光镜下免疫组织化学染色强度和阳性细胞比例综合判定^[9]:先按积分吸光度值(integrated optical density, IOD)的四分位数行染色强度记分:IOD 值为 9863~23 143 记 1 分, 23 144~31 196 记 2 分, 31 197~41 296 记 3 分, 41 297~62 867 记 4 分;再在相同视野下按照阳性细胞百分比记分: $>75\%$ 且 $\leq 100\%$ 记 3 分; $>50\%$ 且 $\leq 75\%$ 为记 2 分; $>25\%$ 且 $\leq 50\%$ 记 1 分; $\leq 25\%$ 记 0 分。表达强度以两者计分之积表示, ≥ 4 分判定为阳性。

1.4 统计学方法

采用统计软件 SPSS 21.0 分析,计数资料采用 χ^2 检验,等级资料采用秩和检验, $P < 0.050$ 为差异有统计学意义。两两比较采用卡方分割,用 Bonferroni 法调整检验水准 $\alpha' = 2\alpha/n(n-1)$,其中 α 为 0.050, n 为组数,所以 $\alpha' = 0.008$ 。

2 结果

2.1 Sphk1 及 E-cadherin 在乳腺纤维腺瘤及乳腺浸润性导管癌中的表达

Sphk1 主要表达在乳腺癌细胞质和细胞膜,

37 例表达阴性(图 1a)、114 例表达阳性(图 1b),总阳性率为 75.50% (114/151),而在乳腺纤维腺瘤组织中表达阴性(0/20)(图 1c),两者表达差异有统计学意义($\chi^2=45.298, P=0.000$)。

E-cadherin 主要表达在细胞膜上,32 例表达阴性(图 2A)、119 例表达阳性(图 2B),总阳性率为 78.81% (119/151),而在乳腺纤维腺瘤中表达比例为 100% (20/20)(图 2C),两者表达差异有统计学意义($\chi^2=3.914, P=0.048$)。

2.2 Sphk1 在乳腺浸润性导管癌中的表达与临床病理特征的关系

分析 Sphk1 与患者临床病理特征的关系,结果显示 Sphk1 在不同淋巴结转移状态、ER 表达、HER-2 表达组间差异有统计学意义,而在不同肿瘤直径、年龄、月经状况、PR 表达状况的患者中组间表达差异无统计学意义,具体统计数值见表 1。

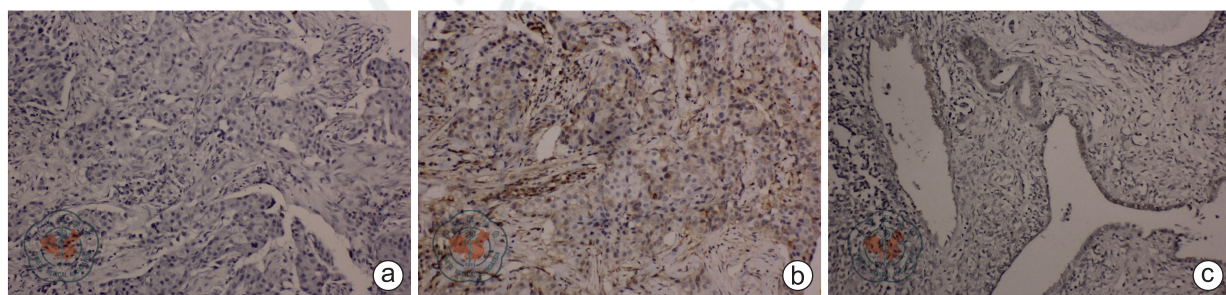
2.3 Sphk1 及 E-cadherin 表达与淋巴结转移的关系

在全部浸润性导管癌患者中,E-cadherin 与 Sphk1 表达状态不同的患者其淋巴结转移状态差异有统计学意义($\chi^2=17.187, P=0.001$)。E-cadherin(-) Sphk1(+) 的患者淋巴结阳性率为 85.71% (18/21),E-cadherin(+) Sphk1(-) 的淋

表 1 乳腺浸润性导管癌患者的临床病理特征与 Sphk1 表达之间的关系(例)

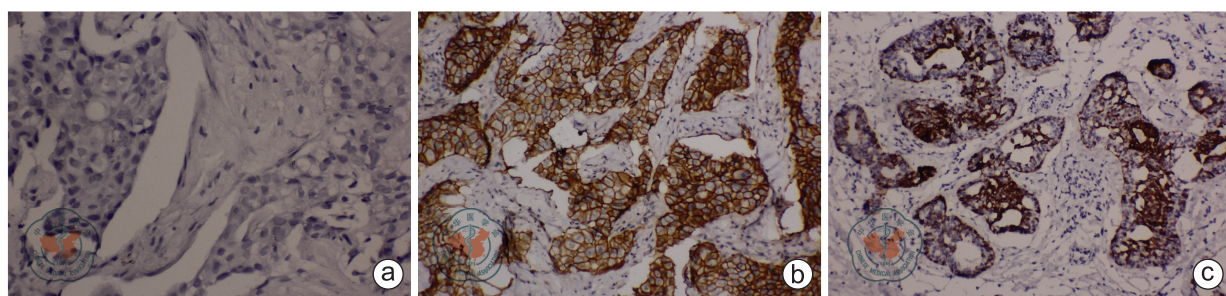
临床病理特征	Sphk1		检验值	P 值
	-	+		
年龄				
>50 岁	28	69	2.791	0.095
≤50 岁	9	45		
月经状态				
绝经前	12	38	0.010	0.919
绝经后	25	76		
肿瘤直径				
≤2 cm	12	39	-0.249 ^a	0.804
>2~5 cm	22	67		
>5 cm	3	8		
淋巴结转移				
0 枚	31	30	-6.122 ^a	0.000
1~3 枚	6	41		
4~9 枚	0	19		
≥10 枚	0	24		
ER				
-	9	50	4.478	0.034
+	28	64		
PR				
-	12	46	0.740	0.390
+	25	68		
HER-2				
-	35	84	7.313	0.007
+	2	30		

注:^a采用非参数秩和检验,检验值为 Z 值,其余为 χ^2 值; Sphk1 为鞘氨醇激酶 1



注:如图 a 所示,鞘氨醇激酶 1 在乳腺癌组织中呈阴性表达;如图 b 所示,鞘氨醇激酶 1 在乳腺癌组织中呈阳性表达;如图 c 所示,鞘氨醇激酶 1 在乳腺纤维腺瘤组织中呈阴性表达

图 1 鞘氨醇激酶 1 在乳腺组织中的表达(SP ×200)



注:如图 a 所示,E-钙黏蛋白在乳腺癌组织中呈阴性表达;如图 b 所示,E-钙黏蛋白在乳腺癌组织中呈阳性表达;如图 c 所示,E-钙黏蛋白在乳腺纤维腺瘤组织中呈阳性表达

图 2 E-钙黏蛋白在乳腺组织中的表达(SP ×200)

巴结阳性率为 30.77% (8/26), 两者差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 14.189, P < 0.008$) (表 2)。

表 2 浸润性导管患者 Sphk1 与 E-cadherin 的联合表达与淋巴结转移的关系

组别	例数	淋巴结状态(例)		χ^2 值	P 值
		+	-		
E-cadherin(+) Sphk1(+)	93	55	38	17.187	0.001
E-cadherin(-) Sphk1(+)	21	18	3		
E-cadherin(+) Sphk1(-) ^a	26	8	18		
E-cadherin(-) Sphk1(-) ^b	11	9	2		

注: Sphk1 为鞘氨醇激酶 1; E-cadherin 为 E-钙黏蛋白; ^a 与 E-cadherin(-) Sphk1(+) 组比较, $\chi^2 = 14.189, P < 0.008$; ^b 与 E-cadherin(+) Sphk1(-) 组比较, $\chi^2 = 8.111, P < 0.008$

3 讨论

研究发现 Sphk 在人类和小鼠的组织中存在 Sphk1 和 Sphk2 两种异构体^[10-11]。在人类细胞中, Sphk1 基因位于 17 号染色体, Sphk2 位于 19 号染色体。Sphk1 和 Sphk2 有着各自不同的生物学功能。Sphk1 主要分布在脑、心脏、肺、肝脏、脾脏和造血免疫系统^[12], 是细胞调节 S1P 生成最主要的分子, 与多种肿瘤细胞的过度增殖有关。Sphk1 在结肠癌、胃癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌等多种肿瘤组织中 mRNA 表达都明显高于正常组织^[13]。本研究显示, Sphk1 在乳腺浸润性导管癌细胞中的表达主要在细胞质和细胞膜, 表达阳性率为 75.50%, 而在乳腺纤维腺瘤中呈阴性表达, 推测 Sphk1 可能在乳腺浸润性导管癌的发生过程中发挥了作用。

有关动物移植瘤模型的研究发现, 过表达 Sphk1 可促进肿瘤的生长及血管生成; 反之, 干扰 Sphk1 表达则能抑制肿瘤生长及血管生成^[14-15]。将高表达 Sphk1 的人乳腺癌细胞 MCF-7 移植到小鼠体内所形成的肿瘤体积要大于低表达 Sphk1 的细胞, 而抑制 Sphk1 会使乳腺肿瘤的体积缩小^[16]。这提示 Sphk1 可能与肿瘤的不良预后相关。本研究结果显示 Sphk1 与淋巴结转移、ER 阴性、HER-2 阳性等不良预后因素有关。因此, Sphk1 与肿瘤的转移可能存在相关性。

E-cadherin 的胞外结构可与免疫球蛋白结构域相互连接, 其主要作用是形成稳定的细胞间接触, 并且维持细胞的极性^[17]。Wells 等^[18]也发现 EMT 最重要的标志性变化是 E-cadherin 的减少或丢失。因此, E-cadherin 的表达下调可作为肿瘤细

胞发生 EMT 的重要标志性事件。研究显示, 抑制 Sphk1 的表达会导致肝癌细胞的迁移能力显著降低^[19], 瘤体低表达 Sphk1 的乳腺癌患者的转移风险也较低^[20]。本研究发现 E-cadherin(-) 且 Sphk1(+) 的患者淋巴结阳性例数比例为 85.71% (18/21), E-cadherin(+) 且 Sphk1(-) 的患者淋巴结阳性例数比例为 30.77% (8/26), 两者差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 14.189, P < 0.008$)。笔者推测 Sphk1 在乳腺癌发生 EMT 进而发生转移的过程中发挥了重要作用, 可能是与 E-cadherin 共同作用促进肿瘤转移。但 Sphk1 与 E-cadherin 相互间的调控关系还不清楚, 有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013 [J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1):11-30.
- [2] Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I, et al. Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate [J]. Science, 2007, 316(5822):295-298.
- [3] Okada T, Kajimoto T, Jahangeer S, et al. Sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate signaling in central nervous system [J]. Cell Signal, 2009, 21(1):7-13.
- [4] 张毅, 周艳, 王姝姝, 等. Sphk1 在乳腺不典型增生及乳腺癌中的表达及意义 [J/CD]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2010, 4(2):49-51.
- [5] Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, et al. WHO classification of tumours of the breast [M]. Lyon: IARC Press, 2012.
- [6] Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al. AJCC cancer staging manual [M]. 7th ed. New York: Springer, 2010:347-376.
- [7] Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer [J]. J Clin Oncol, 2010, 28(16):2784-2795.
- [8] Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update [J]. J Clin Oncol, 2013, 31(31):3997-4013.
- [9] Ochiuimi T, Tanaka S, Oka S, et al. Clinical significance of angiopoietin-2 expression at the deepest invasive tumor site of advanced colorectal carcinoma [J]. Int J Oncol, 2004, 24(3):539-547.
- [10] Kohama T, Olivera A, Edsall L, et al. Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase [J]. J Biol Chem, 1998, 273(37):23722-23728.
- [11] Nava VE, Lacana E, Poulton S, et al. Functional characterization of human sphingosine kinase-1 [J]. FEBS

- Lett, 2000, 473(1):81-84.
- [12] Liu H, Sugiura M, Nava VE, et al. Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform [J]. J Biol Chem, 2000, 275 (26): 19 513-19 520.
- [13] Johnson KR, Johnson KY, Crellin HG, et al. Immunohistochemical distribution of sphingosine kinase 1 in normal and tumor lung tissue [J]. J Histochem Cytochem, 2005, 53(9):1159-1166.
- [14] Pyne NJ, Pyne S. Sphingosine 1 phosphate and cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2010, 10(7): 489-503.
- [15] Guan H, Song L, Cai J, et al. Sphingosine kinase 1 regulates the Akt/FOXO3a/Bim pathway and contributes to apoptosis resistance in glioma cells [J]. PLoS One, 2011, 6(5): e19946.
- [16] Nava VE, Hobson JP, Murthy S, et al. Sphingosine kinase type 1 promotes estrogen-dependent tumorigenesis of breast cancer MCF-7 cells [J]. Exp Cell Res, 2002, 281(1):115-127.
- [17] Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T. E-cadherin, beta-catenin and ZEB1 in malignant progression of cancer [J]. Cancer Metastasis Rev, 2009, 28(1-2):151-166.
- [18] Wells A, Yates C, Shepard CR. E-cadherin as an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the metastatic seeding of disseminated carcinomas [J]. Clin Exp Metastasis, 2008, 25(6): 621-628.
- [19] Bao M, Chen Z, Xu Y, et al. Sphingosine kinase 1 promotes tumour cell migration and invasion via the S1P/EDG1 axis in hepatocellular carcinoma [J]. Liver Int, 2012, 32(2):331-338.
- [20] Ruckhäberle E, Rody A, Engels K, et al. Microarray analysis of altered sphingolipid metabolism reveals prognostic significance of sphingosine kinase 1 in breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2008, 112(1):41-52.

(收稿日期:2014-12-31)

(本文编辑:刘军兰)

郑晓东,张彦,房慧颖,等. 鞘氨醇激酶 1 在乳腺癌中的表达及其临床病理意义[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2015,9(2):96-100.