

# 乳腺癌细胞肿瘤标记物表达及其与临床病理特征相关性研究

王瑾 郑芹 杨惠玲

**【摘要】** 目的 探讨肿瘤标记物 14-3-3 $\sigma$ 、Akt 和 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白在乳腺癌中的表达及其与临床病理特征及 Her-2 的相关性。方法 选取 43 份乳腺癌石蜡标本和 10 份正常乳腺组织标本,采用免疫组织化学技术(SABC)检测组织中 14-3-3 $\sigma$ 、Akt 和 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白的表达,结合临床资料和随访资料,进行回顾性研究,作出评估。统计学采用 Wilcoxon 秩和检验或 Kruskal-Wallis 检验,并采用 Kaplan Meier 法进行单因素生存分析。结果 14-3-3 $\sigma$ 、Akt 可表达于细胞胞浆,而 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白可表达于细胞胞浆或(和)胞核。胞浆 14-3-3 $\sigma$ 、Akt 或 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白胞浆表达均与淋巴结转移和临床分期呈正相关( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ),并提示生存相对较差, p27<sup>Kip1</sup> 蛋白胞浆错误定位的患者预后不良。Her-2 蛋白可能对 PI3k-Akt 和 p27<sup>Kip1</sup> 通路参与乳腺癌致病起到一定作用。结论 14-3-3 $\sigma$ 、Akt 或 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白可作为判断乳腺癌淋巴转移和预后评估的有效指标。

**【关键词】** 乳腺癌; 肿瘤标记物; 14-3-3 $\sigma$  蛋白; Akt 蛋白; p27<sup>Kip1</sup> 蛋白

**Expression of three tumor markers in breast cancer tissue and its association with pathological characteristics** WANG Jin, ZHENG Qin, YANG Hui-ling. Department of Pathophysiology, Medical School, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

Corresponding author: YANG Hui-ling, E-mail: yanghl@mail.sysu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate the expressions of 14-3-3 $\sigma$ , Akt and p27<sup>Kip1</sup> proteins in breast cancer, and evaluate their relations with clinicopathologic status and Her-2 protein. **Methods** Expressions of 14-3-3 $\sigma$ , Akt and p27<sup>Kip1</sup> proteins were examined by immunohistochemistry (SABC) method and the retrospective analysis was conducted based on clinical data and follow-up. **Results** High-level expression of 14-3-3 $\sigma$ , Akt or p27<sup>Kip1</sup> protein in cytoplasm positively correlated with lymph nodal metastasis and TNM stage ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ), and probably predicted a poor prognosis; Her-2 protein may contribute to tumorigenesis and development of breast cancer mediated by PI3k-Akt and p27<sup>Kip1</sup> pathway. **Conclusion** 14-3-3 $\sigma$ , Akt and p27<sup>Kip1</sup> proteins may serve as useful markers to predict lymph nodemetastasis and to evaluate prognosis of patients with breast cancer.

**【Key words】** Breast cancer; Tumor marker; 14-3-3 $\sigma$  protein; Akt protein; p27<sup>Kip1</sup> protein

乳腺癌 (breast cancer) 是严重威胁妇女健康的一种恶性肿瘤。目前,乳腺癌发病率已跃居我国妇女癌症发病首位<sup>[1]</sup>。以癌基因 (oncogene) 或抑癌基因 (tumor suppressor gene) 作为肿瘤标记物已取得很大进展,它通过检测各种癌基因和突变的抑癌基因及其产物,为肿瘤的诊断和进一步治疗提供依据。14-3-3 $\sigma$  蛋白是一种分子伴侣, Akt 蛋白是一种蛋白激酶, p27<sup>Kip1</sup> 蛋白是细胞周期负调控因子。不同的研究表明它们的表达与肿瘤的发生发展存在密切关系,并且它们之间有相互调节和(或)制约作用。本研究应用免疫组化法对 Akt、p27<sup>Kip1</sup> 及 14-3-3 $\sigma$  蛋白在乳腺癌组织中的表达情况进行检测,并对其与乳腺癌临床病理特征的关系及生存时间进行分析,以探讨其在乳腺癌的发生和发展中的作用。

## 资料与方法

### 一、一般资料

筛查中山大学肿瘤防治中心 2002 年全年乳腺癌患者的资料,从中选择了 43 例根治性手术切除的乳腺癌石蜡标本;另外选取 10 例癌旁正常乳腺组织石蜡切片作对照。病例选取的条件包括:患者术前均未行放、化疗,术后均有明确的病理学诊断;年龄 27~73 岁,中位年龄 47.0 岁。根据 2002 年国际抗癌联盟(UICC)的 TNM 分期法:T1 (肿瘤最大径 $\leq 2$  cm) 11 例, T2 (肿瘤最大径 $> 2$  cm,但 $\leq 5$  cm) 17 例, T3 (肿瘤最大径 $> 5$  cm) 12 例, T4 [任何大小肿瘤,直接扩散到胸壁和皮肤(胸壁包括肋骨、肋间肌和前锯肌,不包括胸肌)] 3 例; N0 (无区域淋巴结转移) 20 例, N1-3 (有同侧或对侧区域淋巴结转移) 23 例;所取标本均无远处转移。I 期 6 例, II 期 (II a+ II b) 26 例, III 期 (III a+ III b+ III c) 11 例。

### 二、方法

Akt 鼠抗人抗体购自 Cell Signaling 公司, p27<sup>Kip1</sup> 兔多抗抗体及 14-3-3 $\sigma$  山羊多抗抗体购自 Santa Cruz 公司,二抗及 DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

标本经 4% 甲醛溶液固定,石蜡包埋,4  $\mu$ m 切片,免疫组化 SABC 法检测实验步骤按说明书进行。抗原采用高温高压修复,用已知的阳性乳腺癌切片作阳性对照,用 PBS 取代一抗作阴性对照。

### 三、结果判读标准

14-3-3 $\sigma$ 、Akt 蛋白阳性着色为粗细不一的棕黄颗粒,主要定位于肿瘤细胞胞浆中;p27<sup>Kip1</sup> 定位于肿瘤细胞核和(或)胞浆。染色按阳性细胞数占肿瘤细胞的比例进行分级<sup>[2-4]</sup>。Akt 阳性细胞数 $< 10\%$  为(-), 10%~50% 为(+), $> 50\%$  为(++); P27<sup>Kip1</sup> 阳性细胞数 $< 5\%$  为(-), 5%~50% 为(+), $> 50\%$  为(++); 14-3-3 $\sigma$  阳性细胞数 $< 10\%$  为(-), 10%~50% 为(+), 50%~75% 为(++), $> 75\%$  为(+++)。

### 四、统计分析

应用 SPSS 13.0 软件包进行统计分析。计数资料分析组间相关采用秩和分析,同时进行 Kaplan Meier 生存分析。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义

## 结 果

一、通过采用免疫组织化学方法检测发现与正常乳腺组织相比,在乳腺癌组织中 14-3-3 $\sigma$ 、Akt 蛋白过表达,且定位于细胞浆(图 1, 2); p27<sup>Kip1</sup> 蛋白为细胞核和(或)细胞浆表达(图 3, 4)。

二、采用 Wilcoxon 秩和检验或 Kruskal-Wallis 检验(表 1),分析发现胞浆 14-3-3σ、Akt 蛋白或 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白胞浆表达均与淋巴结转移和临床分期呈正相关;应用 Kaplan Meier 法进行单因素生存分析并所绘制 5 年生存曲线结果表明(图 5,6)胞浆 14-3-3σ、Akt 蛋白过表达的病人生存期相对较短, p27<sup>Kip1</sup> 蛋白胞浆错误定位的患者预后不良。

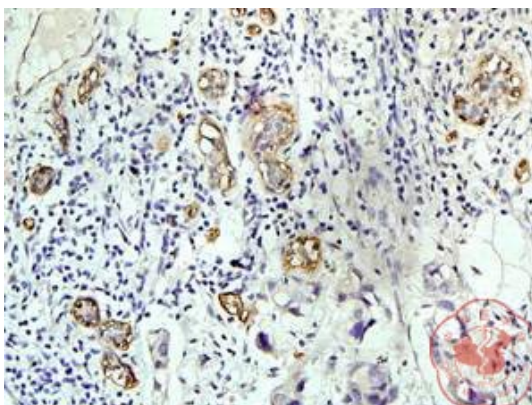


图 1 14-3-3σ 蛋白在乳腺癌中表达(×200)

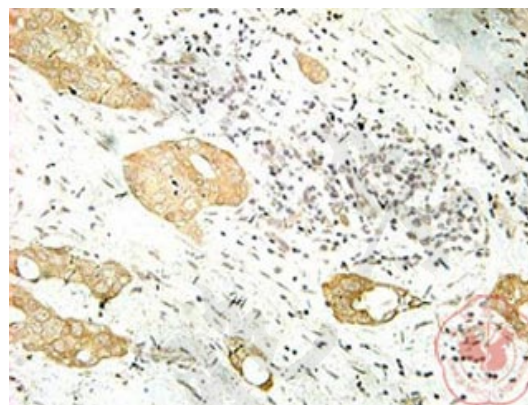


图 2 Akt 蛋白在乳腺癌中表达(×200)

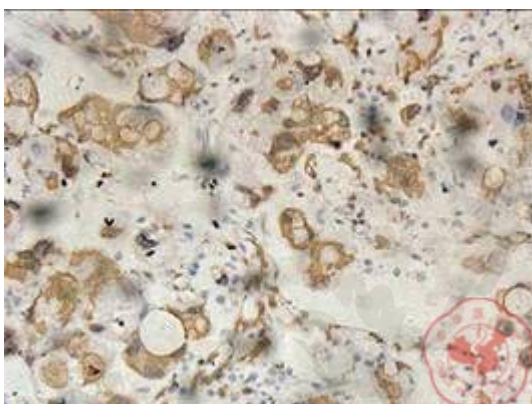


图 3 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白在乳腺癌细胞浆中表达(×200)

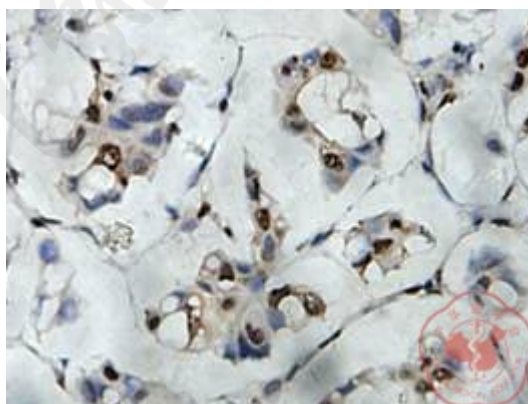


图 4 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白在乳腺癌细胞核中表达(×400)

表 1 14-3-3σ、Akt 和 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白表达与乳腺癌临床病理特征相关性分析(例)

临床病理特征	例数	14-3-3σ					Akt					P27 <sup>Kip1</sup> 核					P27 <sup>Kip1</sup> 浆						
		-	+	++	+++	H	P	-	+	++	H	P	-	+	++	H	P	-	+	++	H	P	
肿瘤大小		13.204 0.000					3.201 0.125					2.032 0.134					1.284 0.174						
T1	11	6	1	3	1		6	3	2			4	3	4				5	5	1			
T2	17	2	7	7	1		6	3	8			7	7	3				5	6	6			
T3	12	0	2	2	7		1	3	8			8	3	1				1	5	6			
T4	3	0	0	0	1		0	3	0									1	0	2			
淋巴结转移		14.520 0.000					4.567 0.031					4.860 0.034					5.041 0.030						
N <sub>0</sub>	20	7	7	4	2		10	4	6			5	11	4				5	14	1			
N <sub>1-4</sub>	23	1	3	11	8		3	8	12			16	3	4				7	2	14			
临床分期		19.321 0.000					5.207 0.012					5.103 0.012					4.741 0.020						
I	6	4	1	1	0		4	2	0			1	2	3				3	3	0			
II	26	4	9	10	3		9	5	12			11	11	4				7	12	7			
III	11	0	0	4	7		0	5	6			9	1	1				2	1	8			

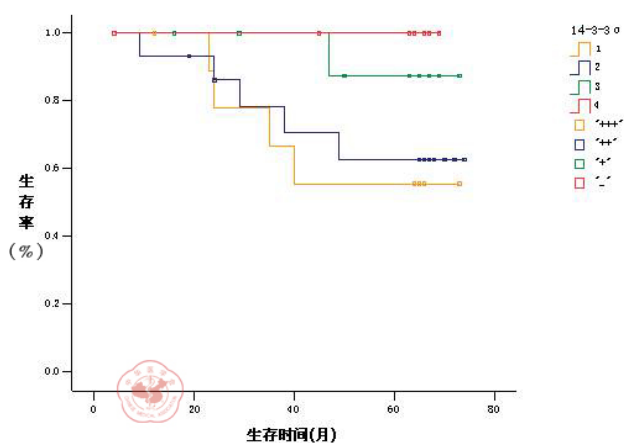


图5 14-3-3 $\sigma$  蛋白表达水平与生存时间  
(Kaplan-Meier 生存曲线)

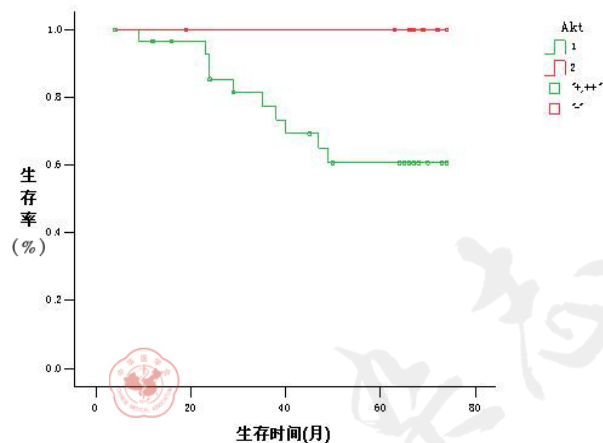


图6 Akt 蛋白表达水平与生存时间  
(Kaplan-Meier 生存曲线)

三、通过比较 14-3-3 $\sigma$ 、Akt、p27<sup>Kip1</sup> 蛋白与 Her-2 的相关性发现,与 Her-2 阴性组比较, Her-2 阳性组的 14-3-3 $\sigma$ 、Akt 蛋白表达升高;而胞核 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白表达降低,胞浆表达水平升高;

四、Akt 与 ER 呈正相关,胞浆 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白表达与 PR 呈正相关,提示 PI3K/Akt 通路可能参与雌激素类蛋白表达,但具体机制仍有待进一步研究。同时,胞浆 Akt 和胞浆 p27<sup>Kip1</sup> 表达水平与 VEGF 呈正相关,提示在 VEGF 促进血管内皮细胞增殖和抗凋亡的功能中, Akt 蛋白和 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白可能发挥一定的作用。

## 讨 论

一、14-3-3 $\sigma$  蛋白,又称人乳腺癌上皮标志物-1(human mammary epithelial marker 1, HEM1)<sup>[5]</sup>,是目前研究的所有 14-3-3 蛋白各亚型中与肿瘤关系最为密切的亚型<sup>[6]</sup>。Mong-Hong Lee 等<sup>[7]</sup>在乳腺癌细胞株的研究发现 14-3-3 $\sigma$  可以与 p53 结合稳定其表达,抑制其降解过程,提高其转录活性,使细胞周期阻滞在 G2/M 期,从而抑制肿瘤增殖。

本研究是通过免疫组织化学方法检测 14-3-3 $\sigma$  在乳腺癌组织中和正常乳腺组织中的表达情况,结果为 14-3-3 $\sigma$  蛋白在乳腺癌组织中表达是过量的。这一结果与多数研究中所报道的 14-3-3 $\sigma$  蛋白在多种肿瘤中表达下降并不一致,其中有报道认为 14-3-3 $\sigma$  蛋白在乳腺癌的表达增加<sup>[8]</sup>,而 Moreira 等<sup>[9]</sup>曾报道 14-3-3 $\sigma$  在乳腺癌表达下调只是偶发事件(表达缺失率 3/68)。但多数报道支持由于 14-3-3 $\sigma$  启动了 CpG 岛甲基化而导致在乳腺癌中该基因沉默<sup>[10]</sup>。但在此研究中 14-3-3 $\sigma$  蛋白在 Her-2 阳性组织中表达增强,是否提示着 14-3-3 $\sigma$  蛋白在 Akt 蛋白增加而 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白降低情况下出现代偿性增高作用,14-3-3 $\sigma$  蛋白的表达与肿瘤淋巴转移, TMN 分期有关,且随临床分期的增高,14-3-3 $\sigma$  蛋白表达明显增高。这些均提示 14-3-3 $\sigma$  蛋白在乳腺癌中的表达增多可能是一个预后不佳的潜在因素。生存曲线显示随 14-3-3 $\sigma$  蛋白表达增强,生存率出现下降趋势。

二、Akt 蛋白,又称为蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB),是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)下游的直接靶蛋白, Akt 的

活化依赖于 PI3K 对含有肌醇的膜磷脂酰肌醇环上 3 位羟基的特异磷酸化<sup>[11]</sup>。Akt 可通过多种途径或作用多种因子促进凋亡。例如, Akt 可以作用于下游的凋亡蛋白 Bad, 使其磷酸化, 抑制其促凋亡作用<sup>[12]</sup>; Akt 磷酸化 Forkhead 蛋白家族, 促进 Forkhead 蛋白离开细胞核, 从而抑制促凋亡基因转录<sup>[13]</sup>; Akt 可催化 MDM2 的 Ser166 和 Ser188 磷酸化, 而磷酸化的 MDM2 更有效地转到核内, 促使 p53 降解<sup>[14]</sup>, 从而抑制凋亡。此外, Akt 参与多种途径调节细胞周期的进程, 如 Akt 可磷酸化细胞周期抑制物 P27<sup>Kip1</sup> 使其失活, 阻止 P27<sup>Kip1</sup> 进入细胞核从而抑制 P27<sup>Kip1</sup> 介导的 G1 期阻滞, 促进增殖<sup>[15]</sup>。

本研究显示乳腺癌中 Akt 蛋白在乳腺癌组织中高表达。此外, 本研究对临床病理资料进行分析, Akt 与淋巴结转移和临床分期显著相关。这说明 Akt 可能与乳腺癌的发生发展有关, 可用于临床乳腺癌病情和治疗的判断。对于生存分析, 生存曲线显示了 Akt 过表达的患者 5 年的生存率低于其表达阴性的患者。

三、p27<sup>Kip1</sup> 蛋白, 肿瘤的发生发展与细胞周期调控异常关系密切。细胞周期由正调控因子细胞周期依赖性蛋白激酶 (cyclin-dependent kinase, CDK) 和负调控因子 CDK 抑制因子 (CDK inhibitor, CKI) 共同作用而精切调控。p27<sup>Kip1</sup> 为 CKI 两大家族之一的成员, p27<sup>Kip1</sup> 定位于染色体 12p13, 主要通过抑制细胞周期从 G1 期到 S 期的转换抑制来抑制细胞增殖, 其主要通过抑制多种 Cyclin-CDKs 复合物 (如 cyclinE/CDK2, cyclinD1/CDK4 复合物) 的活性来实现其对细胞周期的调控, 它可抑制多种 Cyclin-CDKs 复合物的活性, 对细胞周期进行负调控, 抑制细胞分裂和增殖, 促进细胞分化和凋亡<sup>[16]</sup>。

p27<sup>Kip1</sup> 蛋白发挥活性的区域在细胞核, 当 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白自身被磷酸化后, 磷酸化的 p27<sup>Kip1</sup> 从细胞核转入细胞浆, 在细胞浆内通过泛素化-蛋白水解途径水解失活<sup>[17]</sup>。本研究检测 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白在乳腺癌组织的胞核表达率低于正常乳腺组织核表达。同时在胞浆表达丰富, 高于正常乳腺组织胞浆表达。由此说明, p27<sup>Kip1</sup> 可在胞浆和胞核表达, 但对于肿瘤组织, 由于磷酸化的 p27<sup>Kip1</sup> 从胞核泄漏入胞浆, 使得胞浆表达增加。实验表明, p27<sup>Kip1</sup> 蛋白与淋巴结转移和临床分期有密切关系, 与肿瘤大小无关。p27<sup>Kip1</sup> 蛋白胞核表达降低及胞浆表达增加, 可提示 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白从核泄入浆的量增多, 造成 p27<sup>Kip1</sup> 泛素化失活, 从而失去抑制肿瘤的功能。p27<sup>Kip1</sup> 蛋白的核浆定位颠倒可用于提示乳腺癌的发展程度。生存曲线显示了错误的核浆定位可能将不利于乳腺癌的预后。

四、乳腺癌的发生发展是一个多阶段和多步骤的复杂过程, 其中涉及众多癌基因和抑癌基因失衡、信号通路传导异常和细胞周期调节的改变等。PI3k-Akt 和 p27<sup>Kip1</sup> 通路参与乳腺癌的发生发展, 并在细胞膜 Her-2 蛋白参与下发挥作用(图 7)。实验表明, 在 Her-2 阴性 (缺失状态) 的乳腺癌组织中 Akt 蛋白的表达水平低于其在 Her-2 阳性组织中, 提示 Her-2 存在情况下, Akt 蛋白表达增加, 促进肿瘤细胞的增殖。同时 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白的胞核表达在 Her-2 阳性乳腺癌组织中也降低, 而胞浆组织 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白表达水平升高, 促进 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白从胞核到胞浆的释放和降解, 失去抑制肿瘤的作用。以上提示, Her-2 蛋白存在或者缺失可能对 PI3k-Akt 和 p27<sup>Kip1</sup> 通路有直接影响。14-3-3 $\sigma$  蛋白在 Her-2 阳性组织中表达增强, 其水平高于在 Her-2 阴性的乳腺癌组织中。根据以往的研究, 14-3-3 $\sigma$  作为一种抑癌基因可直接抑制 Akt 的表达, 从而增强 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白的细胞周期负调控作用; 也可以增加 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白的稳定性, 阻止 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白出核发生降

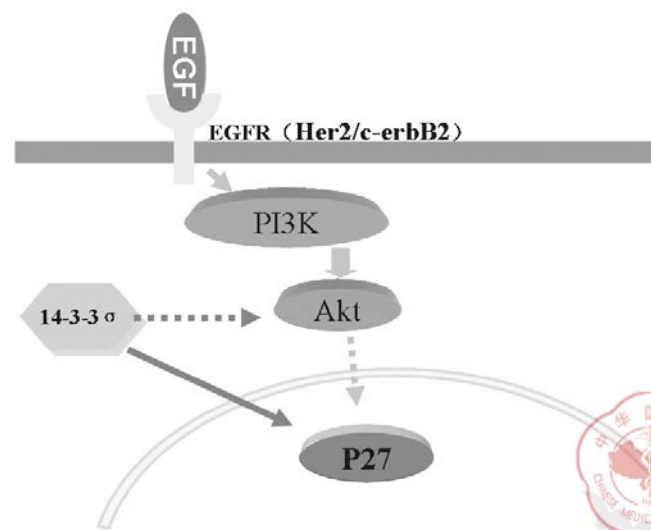


图7 Her-2 与 PI3K-Akt 通路在乳腺癌发病机制中作用

解<sup>[18]</sup>。但在此研究中 14-3-3 $\sigma$  蛋白在 Her-2 阳性组织中表达增强,是否提示着 14-3-3 $\sigma$  蛋白在 Akt 蛋白增加而 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白降低情况下出现代偿性增高作用、还是一种异常的反应、或者存在另外的蛋白分子影响其表达? 这些需进一步探讨。

#### 参考文献

- 1 Yang L, Parkin DM, Ferlay J, et al. Estimates of cancer incidence in China for 2000 and projections for 2005[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005, 14(1):243-250.
- 2 Liang J, Zubovitz J, Petrucelli T, et al. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest[J]. *Nat Med*, 2002, 8(10):1153-1160.
- 3 Moreira JM, Ohlsson G, Rank FE, et al. Down-regulation of the tumor suppressor protein 14-3-3sigma is a sporadic event in cancer of the breast[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2005, 4(4):555-569.
- 4 Motti ML, Califano D, Troncone G, et al. Complex regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27<sup>Kip1</sup> in thyroid cancer cells by the PI3K/AKT pathway: regulation of p27<sup>Kip1</sup> expression and localization[J]. *Am J Pathol*, 2005, 166(3):737-749.
- 5 Prasad GL, Valverius EM, McDuffie E, et al. Complementary DNA cloning of a novel epithelial cell marker protein, HME1, that may be down-regulated in neoplastic mammary cells[J]. *Cell Growth Differ*, 1992, 3(8):507-513.
- 6 Hermeking H. The 14-3-3 cancer connection[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(12):931-943.
- 7 Lee MH, Lozano G. Regulation of the p53-MDM2 pathway by 14-3-3 $\sigma$  and other proteins[J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2006, 16(3):225-234.
- 8 Simooka H, Oyama T, Sano T, et al. Immuno-histochemical analysis of 14-3-3 sigma and related proteins in hyperplastic and neoplastic breast lesions, with particular reference to early carcinogenesis [J]. *Pathol Int*, 2004, 54(8):595-602.
- 9 Moreira JM, Ohlsson G, Rank FE, et al. Down-regulation of the tumor suppressor protein 14-3-3sigma is a sporadic event in cancer of the breast[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2005, 4(4):555-569.
- 10 Mhawech P, Benz A, Cerato C, et al. Down regulation of 14-3-3sigma in ovary, prostate and endometrial carcinomas is associated with CpG island methylation[J]. *Mod Pathol*, 2005, 18(3):340-348.
- 11 Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway[J]. *Science*, 2002, 296(5573):1655-1657.
- 12 Shimamura H, Terada Y, Okado T, et al. The PI3-kinase-Akt pathway promotes mesangial cell survival and inhibits

- apoptosis in vitro via NF-kappa B and Bad[J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14(6):1427-1434.
- 13 Brownawell AM, Kops GJ, Macara IG, et al. Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX[J]. Mol Cell Biol, 2001, 21(10):3534-3546.
  - 14 Feng J, Tamaskovic R, Yang Z, et al. Stabilization of Mdm2 via decreased ubiquitination is mediated by protein kinase B/Akt-dependent phosphorylation[J]. J Biol Chem, 2004, 279(34):35510-35517.
  - 15 Liang J, Zubovitz J, Petrocilli T, et al. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest[J]. Nat Med, 2002, 8(10):1153-1160.
  - 16 Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond[J]. Dev Cell, 2008, 14(2):159-169
  - 17 Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, et al. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27[J]. Science, 1995, 269(5224):682-685.
  - 18 Yang H, Zhang Y, Zhao R, et al. Negative cell cycle regulator 14-3-3 $\sigma$  stabilizes p27<sup>Kip1</sup> by inhibiting the activity of PKB/Akt[J]. Oncogene, 2006, 25(33): 4585-4594.

(收稿日期:2011-03-07)

(本文编辑:蔡晓珍)

王瑾,郑芹,杨惠玲.乳腺癌细胞肿瘤标记物表达及其与临床病理特征相关性研究[J/CD]. 中华细胞与干细胞杂志: 电子版, 2011, 1(1): 74-80.