

· 实验研究 ·

鞘氨醇激酶 1 在乳腺不典型增生及乳腺癌中的表达及意义

张毅 周艳 王姝姝 陈庆秋 姜军

【摘要】 目的 探讨鞘氨醇激酶 1(SPHK1)在乳腺癌发生过程中的表达情况及意义。方法 收集本院 2008 年 3 月至 2009 年 10 月手术后切除经病理证实的各级乳腺不典型增生标本 30 例、乳腺癌标本 36 例及正常乳腺组织 11 例,用免疫组织化学法检测各类组织的 SPHK1 表达,了解其在乳腺癌发生过程中不同组织改变阶段的表达情况。定量资料采用 Spearman 等级相关分析或 Mann-Whitney 检验。结果 SPHK1 在正常乳腺组织中无表达,在不典型增生组织中表达呈逐渐增强趋势,在乳腺癌中有强表达($r=0.797, P=0.000$)。在乳腺癌组织中 SPHK1 表达与临床病理学特征无明显关系($P>0.050$)。结论 SPHK1 可能与乳腺癌的发生有关。

【关键词】 鞘氨醇激酶 1;乳腺不典型增生;乳腺肿瘤

【中图分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

Expression of sphingosine kinase 1 in atypical hyperplasia of the breast and breast cancer and its significance ZHANG Yi, ZHOU Yan, WANG Shu-shu, CHEN Qing-qiu, JIANG Jun. Breast Disease Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

【Abstract】 Objective To investigate the expression of sphingosine kinase 1 (SPHK1) in carcinogenesis of breast cancer and its significance. **Methods** From March 2008 to October 2009, samples of 30 cases of atypical hyperplasia of the breast, 36 cases of breast cancer and 11 cases of normal breast tissues were selected. All samples were confirmed pathologically. The expression of sphingosine kinase 1 (SPHK1) was detected with immunohistochemistry to analyze the difference expression of SPHK1 in the process of carcinogenesis of breast cancer. Spearman rank correlation and Mann-Whitney test were used for statistical analysis. **Results** There was no expression of SPHK1 in the normal breast tissues, the expression of SPHK1 increased gradually in the atypical hyperplasia tissues, but there was a strong expression of SPHK1 in the breast cancer tissues ($r=0.797, P=0.000$). There was no significant correlation between SPHK1 expression and clinicopathological features in breast cancer tissues ($P>0.050$). **Conclusions** SPHK1 may be associated with carcinogenesis of breast cancer.

【Key words】 Sphingosine kinase 1; Atypical hyperplasia; Breast neoplasms

乳腺癌是严重危害女性健康的恶性肿瘤之一,发病率呈不断增加趋势。欧美发达国家乳腺癌发病率明显高于亚非洲等欠发达国家。乳腺癌的发生与膳食中脂类食品的关系研究表明膳食脂肪的摄入量与乳腺癌的发生有相关性^[1]。乳腺癌的发生一般经历乳腺导管上皮增生→非典型增生→原位癌→浸润性癌一系列过程,在不同的发生阶段其分子生物学特征并不相同^[2]。而鞘氨醇激酶与体内脂质代谢密切相关,参与细胞的增殖、分化及凋亡^[3],与肿瘤的发生、发展有关。本研究将检测鞘氨醇激酶 1(sphingosine kinase 1,SPHK1)在乳腺癌发生不同阶段的表达情况,探索其与乳腺癌发生的关系。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集本院 2008 年 3 月至 2009 年 10 月手术切除后经病理证实为乳腺不典型增生标本 30 例,其中不典型增生 I 级 10 例,不典型增生 II 级 14 例,不典型增生 III 级 6 例;患者均为女性,年龄 35~71 岁,平均年龄 47.1 岁;选取同期乳腺癌标本 36 例,均为女性,年龄 33~79 岁,平均年龄 48.7 岁,病理组织学为浸润性导管癌 33 例,浸润性小叶癌 2 例,黏液腺癌 1 例。正常对照 11 例,患者为纤维腺瘤患者,取切除纤维腺瘤包膜外正常组织。患者均签署知情同意书。

1.2 试剂

兔抗人 SPHK1 单克隆抗体购自北京市艾碧康生物制品公司,SP 试剂盒(即用型,工作浓度 1:100)购自北京中杉生物技术公司。

1.3 免疫组织化学染色

采用免疫组织化学 SP 法,将石蜡切片脱蜡和水化后,用 3% H₂O₂-甲醇消化内源性过氧化物酶的活性,修复抗原,再用 0.5% 小牛血清白蛋白封闭非特异性抗体,滴加一抗,滴加生物素化的二抗,滴加链霉菌抗生物素蛋白——过氧化物酶,DAB 显色,水洗,苏木素复染,脱水、透明、中性树胶封片。显微镜下观察结果。

阳性结果的判定^[4]:综合考虑切片中阳性细胞占所观察同类细胞数的百分比和阳性细胞着色强度两项指标,半定量判断结果。SPHK 1 定位于细胞质。根据切片中阳性细胞占计数细胞百分比分为 4 级:≤5%为 0 分;6%~25%为 1 分;26%~50%为 2 分;≥51%为 3 分。根据显色程度判断阳性强度:基本不着色者为 0 分;着色淡黄色者为 1 分;棕黄色者为 2 分;棕褐色者为 3 分。将每张切片着色程度得分与着色细胞百分率得分相乘,为其最后得分。0~1 为阴性(-);2~3 分为弱阳性(+);4~6 分为中等阳性(++);6 分以上为强阳性(+++)。

1.4 病理学观察

所有手术切除的新鲜标本常规以福尔马林固定,根据苏木精-伊红染色及免疫组织化学染色,由两名以上病理医师进行阅片确定病理组织学类型。乳腺癌组织学类型及分级参照 WHO 标准^[5]。

1.5 统计学方法

用 SPSS13.0 统计软件进行 Mann-Whitney 检验及 Spearman 等级相关分析。检验水准 $\alpha=0.050$ 。

2 结果

2.1 SPHK1 的表达情况

SPHK1 在正常乳腺组织中无表达,在不典型增生组织中表达呈逐渐增强趋势,而在乳腺癌中有强表达($r=0.797, P=0.000$;图 1~3,表 1)。

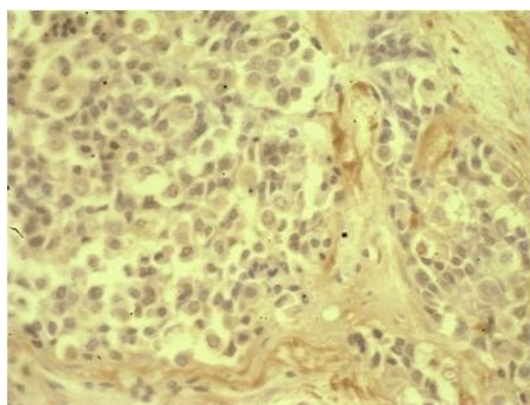


图 1 SPHK1 在乳腺癌中强表达(SP 染色 ×200)

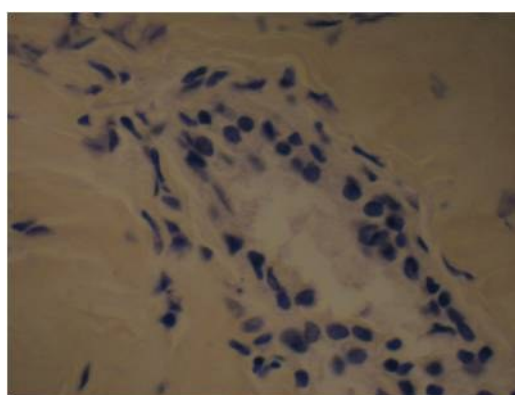


图 2 SPHK1 在不典型增生 III 级中弱表达(SP 染色 ×200)

2.2 SPHK1 表达与乳腺癌临床病理关系

SPHK1 表达与患者年龄、肿瘤大小、激素受体表达情况以及是否有腋窝淋巴结转移均无关系($P>0.05$,表 2)。

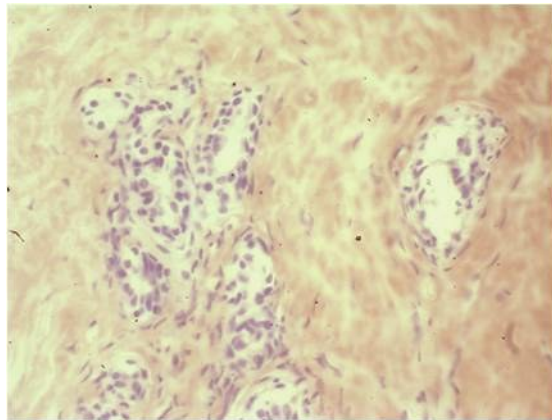


图3 SPHK1在正常组织中不表达(SP染色 ×200)

表1 鞘氨醇激酶1在乳腺组织中的表达

组别	例数	鞘氨醇激酶1表达强度(例)				r 值	P 值 ^a
		-	+	++	+++		
正常组织	11	11	0	0	0	0.797	0.000
不典型增生 I	10	8	2	0	0		
不典型增生 II	14	7	6	1	0		
不典型增生 III	6	1	2	2	1		
乳腺癌	36	2	5	9	20		

a: Spearman 相关分析

表2 鞘氨醇激酶1表达情况与乳腺癌临床病理的关系

临床病理因素	例数	鞘氨醇激酶1表达强度(例)				Z 值	P 值 ^a
		-	+	++	+++		
年龄(岁)						-0.343	0.731
≤50	25	1	3	7	14		
>50	11	1	2	2	6		
肿瘤大小(cm)						-0.110	0.913
≤2.5	13	0	2	4	7		
>2.5	23	2	3	5	13		
淋巴结转移						-0.020	0.984
无	10	0	1	4	5		
有	26	2	4	5	15		
ER						-0.463	0.643
阳性	15	1	3	3	8		
阴性	21	1	2	6	12		
PR						-1.155	0.248
阳性	12	0	1	3	8		
阴性	24	2	4	6	12		

a: Man-whitney 检验; ER: 雌激素; PR: 孕激素

3 讨论

据 WHO 统计,每年全球新增乳腺癌患者 400 万,每年死于乳腺癌 50 万^[6]。研究证实乳腺癌的发生一般经历一系列的组织学变化过程,但有关肿瘤发生过程的分子机制仍不明确。

随着生活水平的提高,人们的饮食结构发生了很大变化。研究表明乳腺癌

的发生、发展可能与膳食脂肪的摄入及膳食脂肪酸的构成相关^[1],也就是说脂质代谢相关分子的激活与乳腺癌的发生密切相关。近来研究表明多种磷脂代谢产物作为信号转导分子参与了细胞生命活动的调控,其中鞘磷脂的活性代谢产物 1-磷酸鞘氨醇(sphingosine1-phosphate, S1P)既可作为细胞内第二信使发挥作用,又可与细胞表面的特定受体结合而调节细胞的增殖、凋亡、迁移及黏附分子表达等^[3,7]。S1P/神经酰胺的平衡是决定细胞生存或凋亡的重要因素。在 S1P 生物合成过程中,鞘氨醇激酶起关键限速作用^[8-9]。目前,在人类和小鼠组织中已发现有 SPHK1 和 SPHK2 两种异构体存在,其中 SPHK 1 是细胞调节 S1P 生成的最主要分子,与多种肿瘤细胞的过度增殖有关。2006 年, Venkataraman 等^[10]发现,人体中有 3 种 SPHK1 亚型,分别命名为 SPHK1a、SPHK1b、SPHK1c。SPHK1 对于维持正常细胞周期必不可少,SPHK1 表达增加不仅导致 S1P 水平升高,改变 S1P/神经酰胺的平衡,能对抗细胞凋亡,还能增加细胞周期由 G1 期向 S 期转化的速率。Kohnno 等^[11]研究发现,SPHK1 活化能够促进小肠腺瘤细胞增殖,抑制 SPHK1 活性可抑制小肠癌的发生。Nava 等^[12]将筛选出的高表达 SPHK1 的乳腺癌 MCF-7 细胞注射入裸鼠乳房皮下,生长出的肿瘤数量及体积均明显超过对照组。因此系列体内外实验表明 SPHK1 可能在乳腺癌发生过程中起重要作用。

本研究通过检测 SPHK1 在人体正常组织、不典型增生及乳腺癌中的表达,发现 SPHK1 在乳腺组织中无表达,在非典型增生组织中有弱表达,在乳腺癌中有强表达,也就是从正常组织向乳腺癌过度过程中 SPHK1 表达呈不断增强趋势,表明 SPHK1 在人乳腺癌发生过程中可能发挥重要作用。而在乳腺癌中,SPHK1 表达与患者年龄、肿瘤大小、淋巴结状态及激素受体表达情况无关系,似乎仅说明 SPHK1 与乳腺癌发生过程有关。然而,由于病例资料有限,SPHK1 表达是否与乳腺癌进展有关尚不清楚,因此有必要进一步深入研究其机制及进行大样本资料临床观察。

参考文献

- [1] 韦娜,糜漫天,张乾勇,等. 不同膳食脂肪酸对大鼠乳腺癌组织脂肪酸组成和脂代谢基因表达的影响. 营养学报,2007,29:122-124.
- [2] Edlich RF, Cross CL, Wack CA, et al. Breast cancer and ovarian cancer genetics: an update. J Environ Pathol Toxicol Oncol,2008,27:245-256.
- [3] Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I, et al. Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. Science,2007,316:295-298.
- [4] 邢传平,刘斌,董亮. 免疫组织化学标记结果的判断方法. 中华病理学杂志,2001,30: 318.
- [5] Tavassoli FA, Devilee P. World Health Organization classification of tumors. pathology and genetics, tumors of breast and female genital organs. Lyon: IARC Press, 2003.

- [6] 陈建国,陆建华. 国内外癌症防制现状. 肿瘤,2007,27:755-776.
- [7] Okada T, Kajimoto T, Jahangeer S, et al. Sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate signalling in central nervous system. Cell Signal,2009,21:7-13.
- [8] Shida D, Takabe K, Kapitonov D, et al. Targeting SPHK1 as a new strategy against cancer. Curr Drug Targets,2008,9:662-673.
- [9] Oskouian B, Saba J. Sphingosine-1-phosphate metabolism and intestinal tumorigenesis: lipid signaling strikes again. Cell Cycle,2007,6:522-527.
- [10] Venkataraman K, Thangada S, Michaud J, et al. Extracellular export of sphingosine kinase-1a contributes to the vascular S1P gradient. Biochem J,2006,397:461-471.
- [11] Kohno M, Momoi M, Oo ML, et al. Intracellular role for sphingosine kinase 1 in intestinal adenoma cell proliferation. Mol Cell Biol,2006,26:7211-7223.
- [12] Nava VE, Hobson JP, Murthy S, et al. Sphingosine kinase type 1 promotes estrogen-dependent tumorigenesis of breast cancer MCF-7 cells. Exp Cell Res,2002,281:115-127.

(收稿日期:2010-02-25)

(本文编辑:罗承丽)

张毅,周艳,王姝姝,等. 鞘氨醇激酶1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):200-205.