

乳腺癌组织中 CHK2 和 pCHK2 蛋白的表达及临床意义

贾朝阳 冯 丹 王雅杰

摘 要 **目的** 检测乳腺癌组织和癌旁组织中细胞周期检测点激酶 2 (CHK2) 和磷酸化 CHK2 (pCHK2) 蛋白的表达情况及其与乳腺癌临床病理学特征的相关性。**方法** 制作乳腺癌组织芯片, 利用免疫组化法检测 261 例乳腺癌组织及 36 例癌旁组织中 CHK2 和 pCHK2 蛋白的表达情况, 并分析其与乳腺癌临床病理学特征的关系。**结果** CHK2 和 pCHK2 蛋白在癌组织中的表达分别为 86.2% 和 24.1%, 明显高于癌旁组织 5.6% 和 0 ($P < 0.05$), 且在同一病例的癌组织中表达呈正相关 ($r = 0.226, P = 0.023$), CHK2 和 pCHK2 与肿瘤病理类型、大小、淋巴结转移数目、TNM 分期、ER、PR、Her-2 等临床病理特征相关性无统计学差异 ($P > 0.05$)。**结论** CHK2 和 pCHK2 可能在乳腺癌的发生、发展中发挥着一定作用, 可作为乳腺癌基因研究和治疗的靶点。

关键词 乳腺癌 免疫组化 细胞周期检测点激酶 2 磷酸化 CHK2

Expression and Clinical Significance of CHK2 and pCHK2 in Patients of Breast Cancer. Jia Zhaoyang, Feng Dan, Wang Yajie. Department of Oncology Changhai Hospital Affiliated to the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract Objective To investigate the expression of CHK2 and pCHK2 in breast cancer and corresponding adjacent noncancerous tissue, and analyze the correlations between protein expression and its clinical significance. **Methods** Breast cancer tissue were collected to make tissue microarray. Immunohistochemical technique was used to test CHK2 and pCHK2 expression in 261 patients breast cancer and 36 corresponding adjacent noncancerous tissue. The relationship between clinical characteristic and CHK2/pCHK2 expression was also studied. **Results** CHK2 and pCHK2 protein expression in cancer tissues were 86.2% and 24.1%, which was significantly higher than that in the adjacent tissues (5.6% and 0). Their expression in cancer tissues were positively correlated ($r = 0.226, P = 0.023$). There was no correlation between CHK2, pCHK2 distribution and clinicopathological parameters, such as TNM, ER, PR, Her-2 ($P > 0.05$). **Conclusion** CHK2 and pCHK2 may play an important role in the development of breast cancer, and it may be considered as a valuable marker for the gene research and therapy of breast cancer.

Key words Breast cancer; Immunohistochemistry; CHK2; pCHK2

乳腺癌正成为全球女性的首发恶性肿瘤。乳腺癌的发生是一个多基因参与、多步骤的复杂演变过程。DNA 损伤修复系统在肿瘤的发生过程中发挥着重要的作用, 受损 DNA 的异常修复可能会增加患癌症的风险。细胞周期检测点激酶 2 (cell cycle checkpoint kinase 2, CHK2 或 CHEK2) 是 DNA 双链断链损伤中重要的信号转导蛋白, 参与细胞周期 G_1 , S 或 G_2/M 期阻滞, 促进细胞对损伤进行修复。本研究采用免疫组化 SP 法检测 CHK2 和磷酸化 CHK2 - T68 蛋白在乳腺癌组织和癌旁组织中的表达情况, 并对其与肿瘤病理类型、大小、淋巴结转移数目、TNM 分期、

雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素受体 (progesterone receptor, PR)、人表皮生长因子受体 (human epidermal growth factor receptor - 2, Her-2) 蛋白等临床病理学特征的相关性进行分析。

材料与方法

1. 基本情况: 收集 1991 ~ 2011 年间, 长海医院、上海交通大学医学院附属瑞金医院及上海市黄浦区中心医院经治的乳腺癌患者组织标本 261 例。所有病例均经病理确诊, 并对乳腺癌患者的病理资料进行收集和整理按照临床特征、淋巴结转移及 TNM 分期等指标进行分类统计。261 例乳腺癌患者均为女性, 患者年龄 31 ~ 84 岁, 中位年龄 53 岁。病理诊断为浸润性导管癌患者为 218 例, 非浸润性导管癌 43 例; 肿瘤直径 $\leq 2\text{cm}$ (T_1) 93 例, $2 \sim 5\text{cm}$ (T_2) 146 例、 $> 5\text{cm}$ (T_3) 22 例; 组织学分级: I 级 3 例, II 级 187 例, III 级 71 例; 按照第 7 版 AJCC 乳腺癌 TNM 分期: I 期 59 例, II 期 146 例, III 期 54 例, IV 期 2 例。

2. 免疫组化检测: 鼠抗人 CHK2、磷酸化 CHK2 - T68 抗体均采自 Cell Signaling Technology 公司, ER、PR、Her-2 抗体采

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81072175; 81102010); 上海市科委基金资助 (06DZ19505; 114119a7500); 上海市卫生局科研基金资助项目 (2009113; 2011198); 上海市重点学科建设项目 (B905)

作者单位: 200433 第二军医大学长海医院肿瘤科

通讯作者: 王雅杰, 电子信箱: yajiewa0459@163.com

自 Dako 公司,免疫组化 SP 试剂盒及其他试剂均采自上海申能博彩公司。显微镜观察 HE 切片,选取病变典型部位,并在相应蜡块上做标记。应用组织芯片制作工艺制作受体石蜡方块并打孔制备组织芯片。免疫组化按试剂盒说明书推荐的步骤严格进行操作,组织芯片脱蜡至水、抗原修复、SP 法免疫组化染色。用已知的乳腺癌阳性切片作为阳性对照,用 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。

3. 结果判定标准:(1)CHK2 和 pCHK2 蛋白:均定位于细胞核,阳性细胞的阳性染色为淡黄色、棕黄色、棕褐色。高倍镜(×100)下取 5 个不同的视野观察,每视野平均 250 个细胞,计数阳性细胞百分比并计算平均值:≤5% 为 0 分,6%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分,51%~75% 为 3 分,>75% 为 4 分。染色强度以多数阳性细胞呈现的染色记分:不着色为阴性计 0 分,淡棕黄色为弱阳性“+”计 1 分,深棕黄色为强阳性“+++”计 3 分,阳性介于弱阳性和强阳性之间为“++”计 2 分。综合判定取二者分值得积:0 分为“-”,1~4 分为“+”,5~8 分为“++”,9~12 分为“+++”。0~4 分为阴性,5~12 分为阳性。(2)ER、PR:对有棕色颗粒定位于细胞核肿瘤细胞进行计数,<1% 为“-”,1%~50% 为“+”,50%~

75% 为“++”,>75% 为“+++”。(3)Her-2:棕色颗粒定位于细胞膜,肿瘤细胞无染色为“-”,任何比例肿瘤细胞有弱或不完全膜染色为“+”,30% 以下肿瘤细胞有强的完整膜染色为“++”,>30% 的浸润性肿瘤细胞出现强的均一完整膜染色为“+++”。

4. 统计学方法:采用 SPSS 19.0 软件进行数据处理,组间比较采用 *Pearson* χ^2 检验,两者相关性利用 *Spearman* 相关系数检验,蛋白表达和各项临床病理学特征的关系应用 *Person's* χ^2 检验或 *Fisher* 确切概率法。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. 乳腺癌和癌旁组织中 CHK2、pCHK2 的表达:CHK2、pCHK2 蛋白定位于细胞核,阳性染色为淡黄色、棕黄色、棕褐色颗粒。CHK2、pCHK2 蛋白在乳腺癌组织中的阳性表达率分别为 86.2% 和 24.1%,明显高于癌旁组织的 5.6% 和 0,差异具有统计学意义($P<0.05$,表 1、图 1)。在同一病例中 CHK2 蛋白与 pCHK2 蛋白表达呈正相关($r=0.226,P=0.023$)。

表 1 CHK2、pCHK2 蛋白在乳腺癌及癌旁组织中的表达

项目	n	CHK2		χ^2	P	pCHK2		χ^2	P
		(-)	(+)			(-)	(+)		
癌组织	261	36	225	114.235	0.000	198	63	11.029	0.001
癌旁组织	36	34	2			36	0		

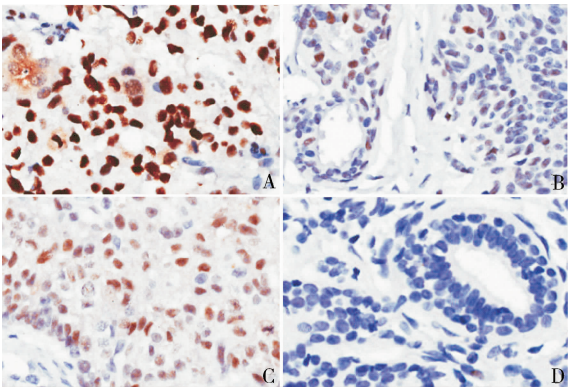


图 1 CHK2 和 pCHK2 蛋白在乳腺癌组织中的阳性表达(SP,×200)

A. 为 CHK2 蛋白在癌组织表达情况;B. 为 CHK2 蛋白在癌旁组织表达情况;C. 为 pCHK2 蛋白在癌旁组织表达情况;D. 为 pCHK2 蛋白在癌旁组织表达情况

2. CHK2、pCHK2 的表达与乳腺癌临床病理学特征的关系:ER、PR 主要表达于细胞核,Her-2 主要表达于细胞膜。CHK2 和 pCHK2 蛋白与肿瘤的病理类型、肿瘤大小、淋巴结转移、TNM 分期、ER、PR、Her-2 等临床病理学特征的相关性无统计学差异($P>$

0.05,表 2)。

讨 论

乳腺癌是全球女性最常见的恶性肿瘤之一,根据美国癌症联合会(American Cancer Society, ACS)最新的统计资料显示,2009 年美国新发乳腺癌为 23 万,约 4 万人死于乳腺癌,病死率仅次于肺癌,居第 2 位^[1]。近 20 年来我国城市女性乳腺癌发病率呈持续上升趋势。CHK2 在 DNA 损伤修复及维持染色体稳定性上发挥着重要作用,当细胞遭受电离辐射后,DNA 双链发生断裂损伤(double strains breaks,DSB),DSB 使细胞内毛细血管扩张性共济失调突变基因(ataxia telangiectasia mutated,ATM)激酶活化,活化的 ATM 蛋白激酶使底物 CHK2 激酶磷酸化,继而通过不同的分子通路来调节细胞周期的转换,同时激活修复相关基因对 DNA 损伤进行修复使细胞周期进程发生阻滞^[2]。对 CHK2 基因与肿瘤易感性的研究始于移码突变 1100delC(1100 位的单个胞嘧啶碱基缺失)在 Li-Fraumeni 综合征中的致病作用^[3]。CHK2 1100delC 是目前报道最多的突变,在多种散发和遗传性肿瘤中都检测到其低频率突变^[4]。

表 2 CHK2、pCHK2 的表达与乳腺癌临床病理学特征的关系

临床病理特征	<i>n</i>	CHK2		χ^2	<i>P</i>	pCHK2		χ^2	<i>P</i>
		(-)	(+)			(-)	(+)		
病理类型				1.002	0.137			0.399	0.527
浸润性导管癌	218	28	190			167	51		
非浸润性导管	43	8	35			31	12		
肿瘤直径 (cm)				5.375	0.068			3.654	0.161
≤2	93	74	19			79	14		
2~5	146	131	15			122	24		
>5	22	20	2			15	7		
淋巴结转移				6.077 *	0.099			0.264 *	0.970
0	156	27	129			129	27		
1~3	56	7	49			46	10		
4~9	27	2	25			22	5		
≥10	22	0	22			19	3		
TNM 分期				1.419	0.234			2.495	0.114
I~II	205	31	174			160	45		
III~IV	56	5	51			38	18		
ER 表达				5.821	0.054			1.556	0.459
0	98	8	89			78	19		
+	0	0	0			0	0		
++	23	6	17			21	2		
+++	141	22	119			117	24		
PR 表达				3.412	0.332			1.635	0.651
0	147	21	126			123	24		
+	12	2	10			9	3		
++	39	8	31			34	5		
+++	63	5	58			50	13		
Her-2 表达				7.823	0.050			2.466	0.482
0	82	18	64			68	14		
+	51	7	44			43	8		
++	57	6	51			50	7		
+++	71	5	66			55	16		

* 为 Fisher 确切概率法

CHK2 作为一种蛋白激酶,没有 DNA 损伤时在正常组织细胞中广泛表达,可见于细胞周期的各个阶段,并且具有明显的组织特异性^[5]。CHK2 激酶的活化起始于 T68 位点的磷酸化,再进一步激活 T-loop 环上的 T383 和 T387 位点,启动 CHK2 蛋白自磷酸化过程形成能够发挥生物学作用的二聚体。磷酸化 CHK2-T68 蛋白相比 CHK2 总蛋白更能直接反应 CHK2 激酶的活化。Carlessi 等^[6]的研究发现在多种肿瘤组织中都不同程度的存在着 CHK2-T68 位点的磷酸化,在正常、增生和炎性组织中却没有检测到这一现象。Oka 等^[7]对肠癌的研究中也发现 pCHK2 蛋白在晚期患者肿瘤组织中的表达高于正常组织和腺瘤。Yoon 等^[8]研究表明 pCHK2 阳性的口腔黏膜白斑更易发展为鳞状细胞癌。裴小娟等^[9]的研究发现高级别和中级别的导管内原位癌中 CHK2 蛋白表达明显低于低级别的病变。本研究应用免疫组化法检

测乳腺癌组织和癌旁组织中 CHK-2、磷酸化 CHK2-T68 蛋白的表达情况,结果显示 CHK-2、pCHK-2 蛋白在癌组织中的表达明显高于癌旁组织 ($P < 0.01$)。本研究发现在癌旁的正常组织中几乎检测不到磷酸化 CHK2-T68 蛋白的表达,说明在乳腺癌中存在着 CHK-2 蛋白的活化现象。Bartkova 等^[10]报道,在黏膜期(Ta)膀胱癌和 T₁ 期膀胱癌中 CHK2-T68 磷酸化表达强,而 T₂₋₄ 期膀胱癌中的 CHK2-T68 磷酸化表达弱,认为在肿瘤早期存在着更高比例的 CHK2 激活。在本研究中并没有观察到这一现象,此外,本研究还检测到 CHK2、pCHK2 在同一病例的癌组织中表达呈正相关,也可能提示在 CHK2 蛋白的激活贯穿于乳腺癌发展的整个过程之中。

既往针对 CHK2 的研究主要集中在 CHK2 基因突变与不同肿瘤易感性的关系中,在 CHK2 基因突变与肿瘤临床病理特征相关性的研究中尚存在很多争议。

Cybulski 等^[11]和 Bock 等^[12]研究发现 CHK2 基因突变与肿瘤的大小及淋巴结转移数目没有相关性,但 CHK2 基因突变的乳腺癌患者雌、孕激素受体阳性率高,雌激素阳性风险是无突变者的 4 倍。Schmidt 等^[13]的研究发现 CHK2 基因突变与肿瘤的病理类型无关。有研究认为 CHK2 基因突变会导致 CHK2 激酶的丧失^[14]。目前尚没有关于 CHK2 蛋白表达与乳腺癌临床病理学特征的相关性的报道,本研究将 CHK2、pCHK2 蛋白表达阳性率与肿瘤的病理类型、大小、淋巴结转移数目、TNM 分期、ER、PR、Her-2 等临床病理特征的相关性进行统计学分析,差异没有统计学意义($P>0.05$)。马全富等^[15]对子宫内膜癌的研究也没有检测到 CHK2 蛋白表达与肿瘤临床病理特征的关系。

综上所述,DNA 损伤修复通路与细胞的凋亡、癌变有着密切的关系,CHK2 蛋白作为细胞周期的重要检测点机制,其基因突变、缺陷或过表达都可能导致 DNA 损伤无法修复或细胞的恶性增殖。进一步的深入探讨 CHK2 的生物学功能及 DNA 损伤修复通路在乳腺癌发生、发展中的作用,将为乳腺癌新的临床治疗策略提供一定的理论基础。

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 Stolz A, Ertych N, Bastians H. Tumor suppressor CHK2: regulator of DNA damage response and mediator of chromosomal stability[J]. Clin Cancer Res,2011,17(3): 401-405
- 3 Narod SA, Lynch HT. CHEK2 mutation and hereditary breast cancer[J]. J Clin Oncol,2007,25(1): 6-7
- 4 Hollestelle A, Wasielewski M, Martens JW, et al. Discovering moderate-risk breast cancer susceptibility genes[J]. Curr Opin Genet Dev,2010,20(3): 268-276
- 5 Matsuoka S, Huang M, Elledge SJ. Linkage of ATM to cell cycle reg-

- ulation by the Chk2 protein kinase[J]. Science,1998,282(5395): 1893-1897
- 6 Carlessi L, Buscemi G, Fontanella E, et al. A protein phosphatase feedback mechanism regulates the basal phosphorylation of Chk2 kinase in the absence of DNA damage[J]. Biochim Biophys Acta, 2010,1803(10): 1213-1223
- 7 Oka K, Tanaka T, Enoki T, et al. DNA damage signaling is activated during cancer progression in human colorectal carcinoma[J]. Cancer Biol Ther, 2010,9(3): 246-252
- 8 Yoon AJ, Shen J, Santella RM, et al. Activated checkpoint kinase 2 expression and risk for oral squamous cell carcinoma[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,2007,16(12): 2768-2772
- 9 裴小娟,杨清绪,刘少杰,等.细胞周期调节因子 ATM、Chk2 和 p53 在乳腺浸润性导管癌中的表达及其临床病理意义[J].中华病理学杂志,2012,41(7): 479-480
- 10 Bartkova J, Guldberg P, Gronbaek K, et al. Aberrations of the Chk2 tumour suppressor in advanced urinary bladder cancer[J]. Oncogene, 2004,23(52): 8545-8551
- 11 Cybulski C, Gorski B, Huzarski T, et al. CHEK2-positive breast cancers in young Polish women[J]. Clin Cancer Res,2006,12(16): 4832-4835
- 12 De Bock GH, Schutte M, Krol-Warmerdam EM, et al. Tumour characteristics and prognosis of breast cancer patients carrying the germline CHEK2 *1100delC variant[J]. J Med Genet, 2004,41(10): 731-735
- 13 Schmidt MK, Tollenaar RA, de Kemp SR, et al. Breast cancer survival and tumor characteristics in premenopausal women carrying the CHEK2 *1100delC germline mutation[J]. J Clin Oncol,2007,25(1): 64-69
- 14 Guo X, Ward MD, Tiedebohl JB, et al. Interdependent phosphorylation within the kinase domain T-loop regulates CHK2 activity[J]. J Biol Chem,2010,285(43): 33348-33357
- 15 马全富,黄晓园,高庆蕾,等. Chk1/2 和 Plk1 蛋白在子宫内膜癌中的表达[J]. 肿瘤防治研究, 2008,35(6): 424-426

(收稿日期:2013-03-28)

(修回日期:2013-06-13)

白藜芦醇对腹膜透析液作用下人腹膜间皮细胞线粒体活性氧产生的影响

伍 军 何 敏 邓行江 何文飞 程 兵

摘 要 目的 白藜芦醇对腹膜透析液作用下人腹膜间皮细胞线粒体活性氧产生的影响。**方法** 体外培养人腹膜间皮细

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81200555);广东省自然科学基金资助项目(S2011040002796);广东省中医药局建设中医药强省科研课题(20122042)

作者单位:512026 韶关,汕头大学医学院附属粤北医院肾内科

通讯作者:伍军,副主任医师,电子信箱:doctorwujun@163.com