

# mTOR 与 Notch 通路共同活化的相关性与人乳腺癌恶性程度及预后的关系

张 舒 石玉镯 陈欣欣 孙 强

**摘 要** **目的** 在人乳腺癌组织中研究 mTOR 和 Notch 通路共同活化的相关性与人乳腺癌生物行为的内在联系。**方法** 把 57 例人乳腺癌组织样本标本的免疫组化染色结果(5 例乳腺腺瘤及腺病标本作为对照),和 33 例人乳腺癌组织样本的 Western blot 法检测结果,依照临床病理检查结果分组,采用 Stata 9.2 软件,检查各组别 mTOR 通路与人 Notch 通路共同活化水平,确定 mTOR 和 Notch 相关性在不同组间的差别。**结果** 在有效样本中,mTOR 和 Notch 通路共同活化的相关性在低分化、具有淋巴转移的、ER(-)、HER-2(+)、Ki67 指数 $\geq 50\%$ 或 p53(-)的乳腺癌组中更显著。**结论** 乳腺癌中 mTOR 与 Notch 通路共同活化的相关性与肿瘤的恶性程度和预后相关。

**关键词** 乳腺癌 mTOR Notch 恶性程度 预后  
[中图分类号] R73 [文献标识码] A

**Role of Correlated Activation of mTOR and Notch Pathways in the Malignancy and Prognosis of Human Breast Cancer.** Zhang Shu, Shi Yuzhuo, Chen Xinxin, et al. Dept. of Breast Surgery, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100005, China

**Abstract Objective** To examine the linkage between mTOR and Notch co-activation and the malignancy and prognosis of human breast cancer. **Methods** Human breast cancer patients were grouped according to the commonly used clinical prognostic factors. Tumor tissues were analyzed by either immunohistochemistry (IHC) (57 patients and 5 normal control) or Western blot (33 patients) for mTOR and Notch activities. The reciprocity between mTOR and Notch activities were quantified and statistically analyzed in each sample group by Stata 9.2 software. **Results** mTOR and Notch have more significant relevance in lower differentiate, with lymph node metastasis, ER(-), HER-2(+), Ki67 index $\geq 50\%$  or p53(-) breast cancer samples examined. **Conclusion** The mTOR-Notch cascade is more activated in the breast tumors with higher malignancy or worse prognosis.

**Key words** Breast cancer; mTOR; Notch; Malignancy; Prognosis

肿瘤是一种分化障碍性疾病,最基本的特征是细胞过度增生和分化程度的降低或完全丧失,一般来说,分化程度越低,肿瘤的恶性度越高<sup>[1]</sup>。恶性肿瘤多易发生转移,从而危及患者的生命及影响治疗的效果。乳腺癌是女性常见恶性肿瘤之一。尽管乳腺癌的治疗已经取得非常大的进展,但仍有一定比例的女性 5 年内出现复发或者转移。乳腺癌中多个受体、抗体或基因的失活或过度表达均会影响患者的生存和预后,包括雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、人表皮生长因子受体 2(HER-2)、p53 等蛋白水平和

Ki67 指数等<sup>[2]</sup>。这些指标从分子水平上也常作为临床乳腺癌的分型指标。

膜受体酪氨酸激酶(RTK)-PI<sub>3</sub>K-AKT-mTOR 通路可以调节细胞增殖、代谢、凋亡等功能,且 mTOR 通路异常活化可以促进肿瘤的发生发展<sup>[3,4]</sup>。Notch 通路则是调控细胞分化的重要通路,它的上调可抑制细胞分化<sup>[5,6]</sup>。大量实验证明在乳腺癌中这两条通路常存在异常活化<sup>[7]</sup>。有研究在细胞实验中证明, mTOR 在转录水平上上调 Notch 信号通路使细胞由分化转向增殖从而促进肿瘤发生<sup>[1,8]</sup>。且 mTOR 与 Notch 通路共同活化具有高度相关性在人乳腺癌组织中已得到验证<sup>[9]</sup>。但 mTOR-Notch 通路共同活化的相关性与肿瘤的恶性程度、预后是否有深入的联系,目前尚未有研究阐明。本实验将在组织水平上研究 mTOR 和 Notch 通路的相关水平与肿瘤恶性程度以及预后指标的关系,探讨 mTOR 和 Notch 共同活化水平对乳腺癌治疗或预后的指导意义。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81101516)

作者单位:100005 中国医学科学院/北京协和医学院北京协和医院皮肤科(张舒);中国医学科学院/北京协和医学院基础医学研究所生理系(石玉镯、陈欣欣);中国医学科学院/北京协和医学院北京协和医院乳腺外科(孙强);协和转化医学中心(张舒、孙强)

通讯作者:孙强,电子信箱:sunq@medmail.com.cn;陈欣欣,电子信箱:chenxinx@hotmail.com

## 材料与方法

1. 人乳腺癌组织: 进行免疫组织化学分析的乳腺癌标本共 57 例, 均为浸润性导管癌, 来源于北京协和医院病理科 2008 年 1~12 月的外科手术标本。患者均为女性, 平均年龄 52.8 (29~82) 岁。同时选取 5 例乳腺腺瘤及腺病标本作为对照。用于 Western blot 法检测的乳腺癌标本共 33 例, 均为浸润性导管癌, 取自北京协和医院 2008 年 12 月~2009 年 3 月间收治的乳腺癌病例。患者均为女性, 平均年龄 51.6 (31~72) 岁。用于免疫染色的 57 例人乳腺癌组织标本的切片根据染色结果, 分为高、中、低分化 3 组; 根据阳性淋巴结率 [ 阳性淋巴结率 (%) = 转移的淋巴结数目 / 术中清除的淋巴结总数  $\times 100\%$  ], 将乳腺癌样品分阳性淋巴结率  $< 15\%$  及  $\geq 15\%$  两组; 根据雌激素受体 (ER)、孕激素受体 (PR)、人表皮生长因子受体 2 (HER-2)、p53 的免疫组化结果分为 ER(+) (ER  $\geq 2$ )、ER(-) (ER  $< 2$ )、PR(+) (PR  $> 0$ )、PR(-) (PR = 0)、HER-2(+) (HER-2  $> 0$ )、HER-2(-) (HER-2 = 0)、p53(+) (p53  $> 0$ )、p53(-) (p53 = 0) 8 组。用于 Western blot 法检测的 33 例乳腺癌组织标本预先取部分组织进行冷冻切片染色, 分为低、中高分化 2 组; 根据阳性淋巴结率, 分为阳性淋巴结率  $< 15\%$  及  $\geq 15\%$  两组; 根据 ER、PR、HER-2、Ki67 的免疫组化结果分为 ER(+) (ER  $> 0$ )、ER(-) (ER = 0)、PR(+)、PR(-)、HER-2(+)、HER-2(-)、Ki67 指数  $\geq 50\%$ 、Ki67 指数  $< 50\%$  共 8 组。

2. 抗体: pS6 (Ser235/236) 和 S6 抗体由多肽 (CAKRRRLp-SpSLRA 和 CNGYDTSAQ EDMT-NH2) 注射兔子, 得到免疫血清, 经纯化获得。 $\beta$ -actin 单克隆抗体 (Santa Cruz 公司), Hes1 抗体 (Chemicon 公司), Notch1 抗体 (Sigma 公司), Western blot 二抗 (Santa Cruz 公司), 免疫组化染色二抗 (北京中杉金桥生物技术有限公司)。

3. 免疫组化染色: 组织蜡块由北京协和医院病理科免疫

组化室切片并制片, 分别进行 HE、pS6、Notch1 抗体免疫组化染色。所有切片由高年资病理科医师阅片。pS6 基因表达产物定位于细胞质, Notch1 基因表达产物定位于细胞核及细胞质, 以出现棕黄色颗粒作为阳性细胞。对阳性细胞计数, 以阳性细胞百分比计分。由此得到的免疫组化定量结果。

4. Western blot 法: 将冻存于  $-80^{\circ}\text{C}$  下的乳腺癌组织标本切取称量 10mg 置入 EP 管中, 加入裂解液 800 $\mu\text{l}$  进行超声裂解, 每次 5s, 间隔 6s, 重复 20 次, 10000r/min 离心 15s 后  $98^{\circ}\text{C}$  加热 10min 变性。 $4^{\circ}\text{C}$  离心机中, 15000r/min 离心 15min, 得到的上清为总蛋白裂解液。SDS-PAGE 胶电泳检测 pS6、Hes1、 $\beta$ -actin 的蛋白表达水平, 样品即为上述总蛋白裂解液。Western blot 法检测结果经 AlphaEase FC 凝胶图像分析软件进行灰度分析, 以  $\beta$ -actin 的灰度值作为内参, 计算整合密度值 (代表面积与平均密度值的乘积), 得到 pS6 和 Hes1 的相对表达水平的定量结果。

5. 统计学方法: 免疫组化染色和 Western blot 法检测的定量结果的回归分析均应用 Stata 9.2 软件。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。其中免疫组化定量结果回归分析中, 以每张切片中 pS6 及对应 Notch1 阳性细胞百分比得分作为变量; Western blot 法检测定量结果回归分析中, 以 pS6 和 Hes1 的整合密度值作为变量, 计算二者之间的相关性。

## 结 果

1. 免疫染色和 Western blot 法分别对 mTOR 通路及 Notch 通路活化程度定量: mTOR 活化可使下游的 S6K 磷酸化, 故用 S6K 底物 S6 的磷酸化水平 (pS6) 作为 mTOR 信号通路活化的指示蛋白。通过免疫组化染色, 在 57 例乳腺癌组织及 5 例乳腺良性疾病中检测 pS6 与 Notch 受体 Notch1 的表达水平, 分别得到 pS6 和 Notch1 的阳性细胞百分比, 结果如表 1。

表 1 pS6 与 Notch1 在免疫组化染色中的阳性细胞百分比

| 项目     | B1  | B2  | B3  | B4  | B5  | B6  | B7  | B8  | B9  | B10 | B11 | B12 | B13 | B14 | B15 | B16 | B17 | B18 | B19 |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| pS6    | 80  | 10  | 30  | 5   | 60  | 60  | 50  | 20  | 50  | 5   | 5   | 70  | 0   | 80  | 50  | 80  | 90  | 60  | 5   |
| Notch1 | 80  | 45  | 50  | 80  | 10  | 75  | 10  | 0   | 20  | 10  | 80  | 70  | 55  | 90  | 60  | 60  | 90  | 80  | 85  |
| 项目     | B20 | B21 | B22 | B23 | B24 | B25 | B26 | B27 | B28 | B29 | B30 | B31 | B32 | B33 | B34 | B35 | B36 | B37 | B38 |
| pS6    | 20  | 70  | 70  | 80  | 50  | 70  | 80  | 0   | 5   | 90  | 50  | 0   | 20  | 50  | 20  | 80  | 90  | 30  | 80  |
| Notch1 | 80  | 65  | 75  | 90  | 40  | 80  | 90  | 90  | 90  | 90  | 60  | 0   | 85  | 70  | 30  | 90  | 90  | 40  | 70  |
| 项目     | B39 | B40 | B41 | B42 | B43 | B44 | B45 | B46 | B47 | B48 | B49 | B50 | B51 | B52 | B53 | B54 | B55 | B56 | B57 |
| pS6    | 50  | 80  | 20  | 75  | 80  | 0   | 70  | 50  | 50  | 80  | 80  | 30  | 0   | 65  | 90  | 70  | 80  | 70  | 5   |
| Notch1 | 85  | 70  | 50  | 50  | 75  | 10  | 80  | 20  | 75  | 90  | 0   | 90  | 10  | 65  | 55  | 85  | 80  | 80  | 0   |

Hes1 是 Notch 的下游靶点, 当 Notch 信号活化时, Hes1 的表达量升高, 故而常作为 Notch 信号活化的指示蛋白。通过 Western blot 法检测 33 例乳腺癌组织中 pS6 与 Notch 配体 Hes1 的蛋白表达水平, 筛选后得到 30 例有效结果, 对 Western blot 法检测结果进行灰度分析, 得到 pS6 与 Hes1 的整合密度值, 结果如表 2。

2. mTOR 与 Notch 通路共同活化的相关性在低分化中更显著: 在免疫组化染色样本中, 低分化组样本中 pS6 与 Notch1 相关性最大, 相关系数为 0.547 ( $P < 0.01$ ), 随着分化程度的升高, 两者相关性逐渐降低, 中分化组中相关系数为 0.431, 高分化组中相关系数为 0.199 (表 3)。而在良性对照组中, 虽然

表 2 pS6 与 Hes1 在 Western blot 法中的整合密度值

| 项目   | A2       | A3       | A4       | A5       | A6       | A7       | A8       | A10      | A11      | A12      |
|------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| pS6  | 119886.3 | 0        | 122991.7 | 40071.7  | 0        | 186872.6 | 248054.0 | 117080.4 | 639682.9 | 9656.4   |
| Hes1 | 55410.9  | 71203.3  | 108933.4 | 127460.5 | 0        | 150538.9 | 168520.1 | 0        | 276692.8 | 122024.3 |
| 项目   | A13      | A14      | A15      | A17      | A18      | A20      | A21      | A22      | A23      | A24      |
| pS6  | 33188.1  | 77274.9  | 9688.2   | 55824.3  | 36560.2  | 8740.8   | 2488.5   | 28324.3  | 6284.8   | 285685.2 |
| Hes1 | 74673.6  | 100752.9 | 125989.5 | 97761.5  | 99709.5  | 121814.7 | 78556.6  | 70672.6  | 126636.5 | 92753.2  |
| 项目   | A25      | A26      | A28      | A29      | A31      | A33      | A34      | A35      | A37      | A38      |
| pS6  | 164818.0 | 0        | 0        | 305219.9 | 205432.4 | 0        | 491868.3 | 287870.8 | 123797.1 | 125875.2 |
| Hes1 | 241278.5 | 136617.6 | 229064.2 | 247932.6 | 182254.5 | 200364.0 | 163016.6 | 196293.0 | 109243.2 | 145321.3 |

表 3 免疫组化染色样本中 mTOR 通路  
Notch 通路表达与分化的关系

| 项目       | pS6       | pS6<br>低分化 | pS6<br>中分化 | pS6<br>高分化 |
|----------|-----------|------------|------------|------------|
| 与 Notch1 | 0.403     | 0.547      | 0.431      | 0.199      |
| 相关系数     | (0.128) * | (0.176) *  | (0.298)    | (0.252)    |
| 样本数      | 57        | 22         | 20         | 15         |
| 确定系数     | 0.15      | 0.33       | 0.10       | 0.05       |

括号内为标准误, \*  $P < 0.01$

pS6 均为阳性,Notch1 表达均  $< 5\%$  或为阴性,几乎完全不相关。说明在低分化乳腺癌中 mTOR – Notch 通路活化程度最高。

Western blot 法检测样本中可以得到类似结果,低分化组中 pS6 与 Hes1 相关性最高 (相关系数 = 1.756,  $P < 0.01$ ), 高于中高分化组 (相关系数 = 0.613), 说明低分化乳腺癌中 mTOR – Notch 通路活化程度最高,详见表 4。

表 4 Western blot 法检测样本中 mTOR – Notch 通路  
表达与分化的关系

| 项目          | pS6            | pS6 低分化        | pS6 中高分化     |
|-------------|----------------|----------------|--------------|
| 与 Hes1 相关系数 | 1.252(0.408) * | 1.765(0.446) * | 0.613(0.612) |
| 样本数         | 29             | 12             | 17           |
| 确定系数        | 0.26           | 0.61           | 0.06         |

括号内为标准误, \*  $P < 0.01$

3. mTOR 与 Notch 相关性在具有淋巴结转移的乳腺癌中更显著:在免疫组化样本及 Western blot 法

检测样本中,mTOR 与 Notch 相关性均在阳性淋巴结率  $\geq 15\%$  组更显著 ( $P$  均  $< 0.05$ , 表 5、表 6)。

表 5 免疫组化样本中 mTOR – Notch 通路表达与  
淋巴结转移的关系

| 免疫组化样本        | pS6            | pS6             |
|---------------|----------------|-----------------|
| 阳性淋巴结率        | $< 15\%$       | $\geq 15\%$     |
| 与 Notch1 相关系数 | 0.296(0.152) * | 0.723(0.269) ** |
| 样品数           | 39             | 18              |
| 确定系数          | 0.09           | 0.31            |

括号内为标准误, \*  $P < 0.1$ , \*\*  $P < 0.05$

表 6 Western blot 法检测样本中 mTOR – Notch 通路  
表达与淋巴结转移的关系

| Western blot 法检测样本 | pS6          | pS6            |
|--------------------|--------------|----------------|
| 阳性淋巴结率             | $< 15\%$     | $\geq 15\%$    |
| 与 Hes1 相关系数        | 0.621(0.531) | 2.003(0.583) * |
| 样品数                | 21           | 8              |
| 确定系数               | 0.07         | 0.66           |

括号内为标准误, \*  $P < 0.05$

4. mTOR 与 Notch 相关性在 ER (–)、HER – 2 ( + )、Ki67 指数  $\geq 50\%$  及 p53 (–) 的乳腺癌中更显著:在免疫组化样本中,ER (–) 组、HER – 2 ( + ) 组,p53 (–) 组中,pS6 与 Notch1 的相关性较同组更高,并且差异具有统计学意义 (表 7)。在 Western blot 法检测样本中,ER (–) 组、PR (–) 组、HER – 2 ( + ) 组及 Ki67 指数  $\geq 50\%$  组中,pS6 与 Hes1 相关性最高,差异具有统计学意义 (表 8)。

表 7 免疫组化样本中 mTOR – Notch 通路表达与 ER、PR、HER – 2、p53 的关系

| 项目            | pS6            |              |              |                |                |                |                |              |
|---------------|----------------|--------------|--------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--------------|
|               | ER $< 2$       | ER $\geq 2$  | PR = 0       | PR $> 0$       | HER – 2 = 0    | HER – 2 $> 0$  | p53 = 0        | p53 $> 0$    |
| 与 Notch1 相关系数 | 0.458(0.201) * | 0.247(0.178) | 0.342(0.216) | 0.401(0.167) * | 0.345(0.146) * | 0.809(0.325) * | 0.425(0.161) * | 0.321(0.223) |
| 样品数           | 29             | 28           | 27           | 30             | 42             | 15             | 31             | 26           |
| 确定系数          | 0.16           | 0.07         | 0.09         | 0.17           | 0.12           | 0.32           | 0.19           | 0.08         |

括号内为标准误, \*  $P < 0.05$

表 8 Western blot 法检测样本中 mTOR - Notch 通路表达与 ER、PR、HER - 2、Ki67 指数的关系

| 项目          | pS6            |              |                |              |               |                |              |                |
|-------------|----------------|--------------|----------------|--------------|---------------|----------------|--------------|----------------|
|             | ER = 0         | ER > 0       | PR = 0         | PR > 0       | HER - 2 = 0   | HER - 2 > 0    | Ki67 < 0.5   | Ki67 ≥ 0.5     |
| 与 Hes1 相关系数 | 1.715(0.684) * | 0.132(0.303) | 1.860(0.616)** | 0.080(0.268) | -0.395(0.297) | 1.654(0.715) * | 0.546(0.546) | 1.352(0.484) * |
| 样品数         | 13             | 16           | 17             | 12           | 14            | 15             | 10           | 19             |
| 确定系数        | 0.36           | 0.01         | 0.38           | 0.01         | 0.13          | 0.29           | 0.11         | 0.31           |

括号内为标准误, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$

讨 论

mTOR 通路活化后,通过上调 Notch 信号通路抑制细胞分化,从而促进肿瘤增殖。这一现象在多个肿瘤细胞系中得到验证。二者共同活化在乳腺癌组织中也具有高度的相关性。应用 Western blot 法检测及免疫组化染色,笔者证明了在乳腺癌组织中 mTOR 与 Notch 共同活化表达相关性与肿瘤分化程度、淋巴结转移情况、ER、PR、HER - 2 表达、Ki67 指数及 p53 突变情况有关。

结果显示,低分化组中,mTOR 与 Notch 相关性最高,随着分化逐渐升高,相关性逐渐降低,在良性对照组中几乎完全不相关。在淋巴结转移情况的数据中笔者发现,阳性淋巴结率  $\geq 15\%$  组两者显著相关,而  $< 15\%$  组则无显著相关,说明 mTOR 与 Notch 同时活化的肿瘤淋巴结转移风险增加,而淋巴结低转移组或阴性组,两者无明显相关。这些结果说明,在恶性程度越高的乳腺癌组织中,mTOR 与 Notch 越倾向于同时活化,而在恶性程度低或良性的乳腺肿瘤中则倾向于无明显相关,因此笔者认为 mTOR - Notch 通路活化可使乳腺肿瘤恶性程度升高。

在 ER( - )、HER - 2( + )、Ki67 指数  $\geq 50\%$  及 p53( - )的乳腺癌中,二者相关性更为显著。ER、PR 代表乳腺癌激素受体表达情况,HER - 2 的表达也与乳腺癌预后相关。ER( - )、HER - 2( + )均提示不良预后,高 Ki67 指数反映肿瘤增殖活性较高,p53 为抑癌基因,其缺失亦提示不良预后<sup>[10, 11]</sup>。以上结果均支持乳腺癌中恶性程度高的肿瘤具有更高的 mTOR、Notch 通路相关性。本实验也可对所选病例的患者进行随访,进一步验证 mTOR、Notch 高相关性与乳腺癌患者预后的关系。

本研究的结果提示,mTOR 与 Notch 通路的共同活化,将来有可能作为检测乳腺癌恶性程度及判断预

后的指标,并且由于 mTOR 和 Notch 通路的异常活化是乳腺癌发病的重要因素,使用 mTOR 或 Notch 抑制剂,或者二者联合用药,对乳腺癌进行靶向治疗。这对未来乳腺癌靶向治疗新方案及肿瘤个体化治疗具有很好的指导意义。

参考文献

- 1 Ma JH, Meng Y, Kwiatkowski DJ, *et al.* Mammalian target of rapamycin regulates murine and human cell differentiation through STAT3/p63/Jagged/Notch cascade[ J]. J Clin Invest, 2010. 120(1):103 - 114
- 2 Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, *et al.* Molecular portraits of human breast tumours[ J]. Nature, 2000. 406(6797):747 - 752
- 3 Manning BD, Cantley LC, AKT/PKB signaling: navigating downstream[ J]. Cell, 2007,129(7):1261 - 1274
- 4 Sabatini DM. mTOR and cancer: insights into a complex relationship [ J]. Nat Rev Cancer, 2006. 6(9):729 - 734
- 5 Ehebauer M, Hayward P, Arias AM. Notch, a universal arbiter of cell fate decisions[ J]. Science, 2006,314(5804):1414 - 1415
- 6 Chen VC, Stull R, Joo D, *et al.* Notch signaling respecifies the heman-gioblast to a cardiac fate[ J]. Nat Biotechnol, 2008,26(10):1169 - 1178
- 7 Robertson GP. Functional and therapeutic significance of Akt deregulation in malignant melanoma [ J]. Cancer Metastasis Rev, 2005, 24(2):273 - 285
- 8 McKenzie G, Ward G, Stallwood Y, *et al.* Cellular Notch responsiveness is defined by phosphoinositide 3 - kinase - dependent signals [ J]. BMC Cell Biol, 2006,7:10
- 9 石玉镯,张舒,孙强,等. mTOR - Notch 通路在人乳腺癌组织中的验证[ J]. 医学研究杂志, 2013,42(9):34 - 37
- 10 Knight WA, Osborne CK, McGuire WL. Hormone receptors in primary and advanced breast cancer[ J]. Clin Endocrinol Metab, 1980,9(2):361 - 368
- 11 Wright C, Angus B, Nicholson S, *et al.* Expression of c - erbB - 2 oncoprotein: a prognostic indicator in human breast cancer[ J]. Cancer Res, 1989,49(8):2087 - 2090

(收稿日期:2014 - 04 - 15)

(修回日期:2014 - 05 - 20)