

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.19.006

文章编号: 1005-8982(2019)19-0039-04

鞘氨醇激酶 1 在乳腺癌骨髓中的表达及临床意义*

袁鲲¹, 谭鑫¹, 吴芳兰¹, 吴瑛¹, 吴东波²

(长沙市第一医院 1. 检验科, 2. 妇产科, 湖南 长沙 410005)

摘要: 目的 探讨鞘氨醇激酶 1 (SPHK1) 在乳腺癌患者骨髓中的表达及临床意义。**方法** 选取 2016 年 6 月—2018 年 6 月长沙市第一医院诊治的 90 例乳腺癌患者、52 例乳腺良性肿瘤及 20 例健康体检者骨髓, 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 及 Western blotting 检测骨髓中 SPHK1 的表达。**结果** 90 例乳腺癌患者中骨髓 SPHK1 阳性 68 例 (75.6%), 高于良性乳腺肿瘤组 (13.5%) 及健康对照组 (5.0%) ($P < 0.05$); 乳腺癌患者 SPHK1 mRNA 表达水平高于良性乳腺肿瘤患者和健康对照组 ($P < 0.05$); 乳腺癌患者 SPHK1 蛋白含量为 (1.657 ± 0.198), 高于良性乳腺肿瘤患者 (0.963 ± 0.132) 和健康对照组 (0.749 ± 0.128) ($P < 0.05$); 以病理活检为金标准, 骨髓 SPHK1 诊断敏感性为 75.6%, 特异性为 86.5%。经 Kappa 检验 κ 值为 0.59, 具有较好的一致性。**结论** 乳腺癌患者骨髓中 SPHK1 表达升高, SPHK1 的检测有助于早期检测乳腺癌患者的骨髓转移。

关键词: 乳腺肿瘤; 鞘氨醇激酶 1; 转移; 骨髓

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

Expression of sphingosine kinase-1 in bone marrow of breast cancer and its clinical significance*

Kun Yuan¹, Xin Tan¹, Fang-lan Wu¹, Ying Wu¹, Dong-bo Wu²

(1. Department of Clinical Laboratory, 2. Department of Obstetrics and Gynecology, The First Hospital of Changsha, Changsha, Hunan 410005, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of sphingosine kinase 1 (SPHK1) in bone marrow of patients with breast cancer and its clinical significance. **Methods** Bone marrow samples were collected from 90 patients with breast cancer, 50 patients with benign breast tumors and 20 healthy persons. The expression of SPHK1 in bone marrow was detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blotting method. **Results** In 90 cases of breast cancer, 68 cases (75.6%) were SPHK1 positive in bone marrow, which was higher than that in benign breast cancer group (13.5%) and healthy control group (5.0%) ($P < 0.05$); the expression of SPHK1 mRNA in breast cancer patients was significantly higher than that in benign breast cancer patients and healthy control group ($P < 0.05$); the expression of SPHK1 protein in breast cancer patients was (1.657 ± 0.198), which was higher than that in benign breast cancer patients (0.963 ± 0.132) and healthy control group (0.749 ± 0.128) ($P < 0.05$). The sensitivity and specificity of SPHK1 in bone marrow were 75.6% and 86.5%, respectively. The κ value was $0.59 > 0.40$ tested by Kappa test, which showed good consistency. **Conclusions** SPHK1 can be used as a molecular marker of bone marrow metastasis in breast cancer patients, which is helpful for early detection of bone marrow metastasis in breast cancer patients.

Keywords: breast neoplasms; sphingosine kinase 1; neoplasm metastasis; bone marrow

收稿日期: 2019-04-10

* 基金项目: 湖南省财政厅一般项目 (No: 长财教指 [2017]122 号)

[通信作者] 吴瑛, E-mail: 59715943@qq.com

乳腺癌现为女性恶性肿瘤发病率占首位的疾病, 严重危害女性健康^[1-2]。乳腺癌的临床预后与是否远处转移密切相关, 现在认为鞘氨醇激酶 (sphingosine kinases, SPHKs) 是肿瘤进展的关键因素^[3-4], 目前发现鞘氨醇激酶 1 (SPHK1) 与肿瘤发病有重要关系, 包括肿瘤增殖、抵抗凋亡及转移^[5-6]。而 SPHK1 与乳腺癌临床远处转移相关研究鲜少报道, 因此, 为明确 SPHK1 与乳腺癌骨髓微转移相关性, 是否可以作为早期诊断指标, 特做以下研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2016 年 6 月—2018 年 6 月长沙市第一医院乳腺癌、乳腺良性肿瘤及健康体检者骨髓 (骨髓来源本院检验科骨髓细胞形态室)。乳腺癌患者 90 例。年龄 (39 ± 12) 岁; 均行病理检查确诊, 术前未接受放射及化学治疗, 常规体检并排除远处转移。按国际抗癌联盟 (union for international cancer control, UICC) 2010 年肿瘤 TNM 分期标准进行分期^[7]: I 期 28 例, II 期 41 例, III 期 21 例。良性乳腺肿瘤患者 52 例, 排除身体其他部位恶性肿瘤。年龄 (34 ± 9) 岁; 乳腺纤维腺瘤 28 例, 导管内乳头状瘤 24 例。健康体检者 20 例, 为单纯乳腺增生, 年龄 (32 ± 5) 岁。健康对照组部分患者因症状较重, 疑乳腺肿块性质, 在行排癌检查的同时, 同意行骨髓检测; 部分患者伴有血象异常, 同意行骨髓检测, 后复查血象正常。3 组间患者年龄差异无有统计学意义 ($P > 0.05$)。研究经本院医学伦理委员会批准, 所有患者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 常规骨髓取样 三点取材法在患者双侧髂前上棘与胸骨处行骨髓穿刺术, 取骨髓液 10 ml, 置入 -70℃ 冰箱冷冻保存备用。

1.2.2 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测各组骨髓中 SPHK1 mRNA 的表达 取骨髓液加入 Trizol, 按说明书提取总 RNA, 采用 RT-PCR 试剂盒及 real-time PCR 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司) 对样本 RNA 进行逆转录及 PCR 扩增。引物序列由大连宝生物工程有限公司合成: SPHK1 正向为 5'-CTTCCTTGAACCATTATGC-3', 反向为 5'-CCGATACTTCTCACTCTC-3', 扩增片段长度为 426 bp。β-actin 引物序列正向为 5'-GTGGGCATGGGTCAGAAG-3', 反向为 5'-G

AGGCGTACAGGGATAGCAC-3', 扩增片段长度为 576 bp; 逆转录体系 20 μl, 反应条件: 42℃ 下扩增 30 min, 95℃ 下水浴 2 min, 置入 -20℃ 冰箱冷冻保存。采用美国 Applied Biosystemes 公司 ABI PRISM7 300 荧光定量聚合酶链反应 (RTFQ-PCR) 仪进行 PCR 反应, 反应体系 20 μl, 反应条件: 95℃ 预变性 1 min 30 s, 随后 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 30 s, 65℃ 延伸 1 s, 共 40 个循环。美国 Thermo Electron Corporation 公司连续光谱荧光酶标仪自动进行样本检测, 结果 $< 10^3$ copy/ml 为阴性, $\geq 10^3$ copy/ml 为阳性。

1.2.3 Western blotting 检测骨髓中 SPHK1 蛋白的表达 提取总蛋白, BCA 蛋白定量试剂盒 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司] 检测蛋白浓度, 配制 10% 分离胶及 5% 堆积胶, 每孔加入等量待测蛋白。SDS-PAGE 电泳后, 将蛋白转移至 PVDF 上, 室温封闭 2 h, 加入 SPHK1 多克隆抗体 (1 : 400, 美国 Santa Cruz 公司) 4℃ 过夜, HRP 标记的兔抗山羊二抗 (1 : 4 000) 室温孵育 1 h。用凝胶图像分析系统 (江苏捷达) 进行灰度分析, 计算积分光密度 (IOD) 值。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 13.0 统计软件, 阳性率的比较采用 χ^2 检验, 组间均数比较进行方差齐性检验, 如方差齐, 则采用单因素方差分析, 组间进一步两两比较采用 SNK- q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。通过计算骨髓 SPHK1 对乳腺癌诊断的敏感性、特异性、准确性、阳性预测值 (PPV)、阴性预测值 (NPV)、阳性似然比 (positive likelihood ratio, PLR) 和阴性似然比 (negative likelihood ratio, NLR) 评估诊断符合率。应用 Kappa 检验评估诊断一致性, 若 $0.75 < \kappa \leq 1.00$, 说明一致性极好; $0.40 < \kappa \leq 0.75$, 一致性好; $0.00 \leq \kappa \leq 0.40$, 则一致性差。

2 结果

2.1 各组 SPHK1 在骨髓中的表达

90 例乳腺癌组患者中骨髓 SPHK1 阳性 68 例 (75.6%), 52 例良性乳腺肿瘤组患者骨髓 SPHK1 阳性 7 例 (13.5%), 20 例健康对照组中骨髓 SPHK1 阳性 1 例 (5.0%), 3 组间阳性率比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 67.119, P = 0.000$)。

2.2 各组 SPHK1 mRNA 和蛋白在骨髓中的表达

90 例乳腺癌组患者 SPHK1 mRNA 相对表达量为 (3.015 ± 0.943) 高于良性乳腺肿瘤组患者 (0.974 ±

0.397) 和健康对照组 (0.482 ± 0.093), 组间比较差异有统计学意义 ($F = 8.423, P = 0.000$); 良性乳腺肿瘤组患者 SPHK1 mRNA 表达量与健康对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (见图 1)。90 例乳腺癌组患者 SPHK1 蛋白相对表达量为 (1.657 ± 0.198), 良性乳腺肿瘤组患者为 (0.963 ± 0.132), 健康对照组为 (0.749 ± 0.126), 组间比较差异有统计学意义 ($F = 4.768, P = 0.000$); 良性乳腺肿瘤组 SPHK1 蛋白相对表达量与健康对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (见图 2)。

2.3 骨髓 SPHK1 的检测诊断乳腺癌的符合率

ROC 曲线下面积为 0.887, SPHK1 蛋白确定良恶性肿块临界值为 1.1247。以病理活检为金标准, 骨髓 SPHK1 诊断敏感性为 75.6%, 特异性为 86.5%。经 Kappa 检验评估骨髓 SPHK1 诊断乳腺癌骨髓微转移的一致性, κ 值为 $0.59 > 0.4$, 表示具有较好的一致性。见表 1。

表 1 骨髓 SPHK1 的检测诊断乳腺癌的符合率

项目	敏感性 /%	特异性 /%	准确性 /%	阳性预测值 /%	阴性预测值 /%	Youden 指数	PLR	NLR	κ
骨髓 SPHK1	75.6	86.5	79.6	90.7	67.1	0.621	5.6	0.28	0.59

3 讨论

SPHK 将鞘氨醇转化为鞘氨醇 1 磷酸 (S1P), S1P 可作为细胞内第二信使以及可结合特异性受体的细胞外配体。而产生的 S1P, 反过来可以作为 G 蛋白偶联 S1P 受体 1-5 (S1PR1-S1PR5) 家族的配体, 并调节广泛的生物学效应, 包括调控细胞增殖、转化和迁移, 促进血管生成, 在细胞增殖、迁移和存活中起关键作用^[8-9]。SPHK 具有 2 种不同功能的异构体, SPHK1 和 SPHK2, 这 2 种形式已被发现与肿瘤的发生发展密切相关, 其中以 SPHK1 更为明显, SPHK1 是细胞内神经鞘脂类代谢的重要限速酶, 可能成为肿瘤新的治疗靶点^[10-12]。有研究认为 SPHK1 在消化道肿瘤中与肿瘤晚期进展相关, 可以作为消化道肿瘤患者死亡的预测因子^[13-14]。在原发性肝癌中, SPHK1 表达高于癌旁组织, 且高表达 SPHK1 蛋白的肝癌患者生存期较短。认为 SPHK1 是肝癌的一个潜在分子靶点, 有助于判断病情的复发和预后^[15]。近年来有研究认为, SPHK1 高表达与血管内皮细胞增殖有重要关系, 可能是促进血管内皮细胞过度增殖的重要因子, 这亦提示 SPHK1 蛋白与肿瘤增殖及远处转移可能有关^[16-17]。

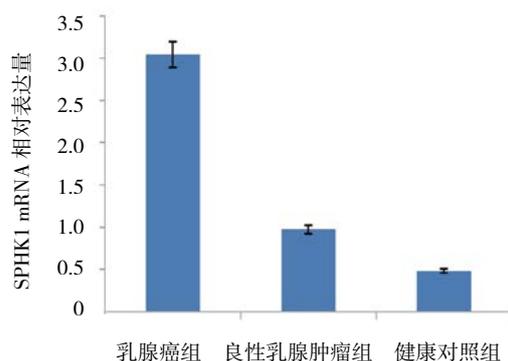


图 1 各组骨髓中 SPHK1 mRNA 的相对表达量

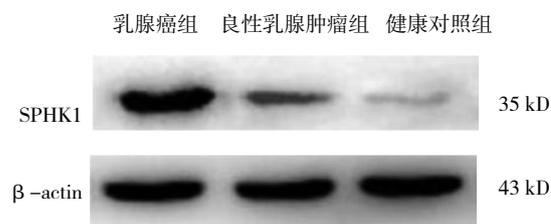


图 2 SPHK1 蛋白在各组骨髓中的表达

熊伟等^[18]发现, ABCB5 与 SPHK1 在乳腺癌组织中表达高于癌旁组织, 且 SPHK1 蛋白表达与肿瘤分期、肿瘤大小、月经情况、淋巴结转移、ER 及 HER-2 表达有关, 认为其在乳腺癌发生、发展中有一定作用, 其检测可辅助乳腺癌的诊断和病情评估。微阵列分析结果提示乳腺癌患者 SPHK1 异构体表达高水平预示预后较差^[19]。研究也证实 SPHK1 在 ER 阳性乳腺癌中高表达, 并与 ER 受体相互作用^[20]; SPHK1/S1P 信号通路也被报道能促进内分泌药物耐药性且促进雌激素依赖性肿瘤的发生、活化及存活。但有关 SPHK1 与乳腺癌远处转移的研究较少, 本研究发现乳腺癌组患者骨髓中 SPHK1 阳性率高于良性乳腺肿瘤组及健康对照组; 乳腺癌组患者 SPHK1 mRNA 和蛋白相对表达量高于良性乳腺肿瘤组患者和健康对照组; 骨髓 SPHK1 诊断乳腺癌的敏感性为 75.6%, 特异性为 86.5%。经 Kappa 检验 κ 值为 $0.59 > 0.40$, 具有较好的一致性。显示 SPHK1 在乳腺癌患者骨髓中存在表达异常, 且与病理诊断符合情况较为一致。

表达 SPHK1 的成纤维细胞可获得转化型并促进肿瘤发生, 提示 SPHK1 具有致癌活性, 且 SPHK1

在多种人类肿瘤中高表达,此外在某些肿瘤中其表达上调与临床预后较差密切相关,抑制 SPHK1 表达可影响肿瘤细胞的增殖,SPHK1 的活化是细胞增殖、转化、转移和耐药的关键因素。因此,通过检测肿瘤的微转移可以监测肿瘤发展趋势,在肿瘤可能转移的早期进行干预,消灭潜在微转移灶,对乳腺癌患者预后具有极大的临床意义。SPHK1 可能是肿瘤侵袭转移的关键调控因子,因而乳腺癌患者骨髓中 SPHK1 表达升高,使检测骨髓微转移成为可能。

综上所述,SPHK1 可作为检测乳腺癌患者骨髓转移的分子标志之一,有助于早期检测乳腺癌患者的骨髓转移,可能成为乳腺癌治疗的新靶点。

参 考 文 献:

- [1] SO W K, LEUNG D Y, HO S S, et al. Associations between social support, prevalent symptoms and health-related quality of life in Chinese women undergoing treatment for breast cancer: a cross-sectional study using structural equation modelling[J]. *Eur J Oncol Nurs*, 2013, 17(4): 442-448.
- [2] 徐兵河. 乳腺癌 [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2005: 14-15.
- [3] AOYAGI T, NAGAHASHI M, YAMADA A, et al. The role of sphingosine-1-phosphate in breast cancer tumor-induced lymphangiogenesis[J]. *Lymphat Res Biol*, 2012, 10(3): 97-106.
- [4] STEVENSON C E, TAKABE K, NAGAHASHI M, et al. Targeting sphingosine-1-phosphate in hematologic malignancies anticancer[J]. *Agents Med Chem*, 2011, 11(9): 794-798.
- [5] XIONG H, WANG J, GUAN H, et al. SPHK1 confers resistance to apoptosis in gastric cancer cells by downregulating Bim via stimulating Akt/FoxO3a signaling[J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(4): 1369-1373.
- [6] TAKABE K, SPIEGEL S. Export of sphingosine-1-phosphate and cancer progression[J]. *J Lipid Res*, 2014, 55(9): 1839-1846.
- [7] 吴芳兰, 范先成, 李倩, 等. 丝氨酸蛋白酶抑制因子基因检测在乳腺癌骨髓微转移诊断中的作用 [J]. *中国现代医学杂志*, 2015, 25(32): 45-48.
- [8] SUKOCHEVA O, WADHAM C, XIA P. Estrogen defines the dynamics and destination of transactivated EGF receptor in breast cancer cells: role of S1P(3) receptor and Cdc42[J]. *ExpCell Res*, 2013, 319(4): 455-465.
- [9] LEONG WI, SABA JD. S1P metabolism in cancer and other pathological conditions[J]. *Biochimie*, 2010, 92(6): 716-723.
- [10] LIU X, ZHANG Q H, YI G H. Regulation of metabolism and transport of sphingosine-1-phosphate in mammalian cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 363(1/2): 21-33.
- [11] XIE Z, LIU H, GENG M. Targeting sphingosine-1-phosphate signaling for cancer therapy[J]. *Sci China Life Sci*, 2017, 60(6): 585-600.
- [12] PYNE N J, TONELLI F, LIM K G, et al. Sphingosine 1-phosphate signalling in cancer[J]. *Biochem Soc Trans*, 2012, 40(1): 94-100.
- [13] TAN S S, KHIN L W, WONG L, et al. Sphingosine kinase 1 promotes malignant progression in colon cancer and independently predicts survival of patients with colon cancer by competing risk approach in South Asian population[J]. *Clinical and Translational Gastroenterology*, 2014, 5: e51.
- [14] FUEREDER T, HOEFLMAYER D, JAEGER-LANSKY A, et al. Sphingosine kinase 1 is a relevant molecular target in gastric cancer[J]. *Anticancer Drugs*, 2011, 22(3): 245-252.
- [15] 方长英, 朱传卫, 余良河, 等. 鞘氨醇激酶 1 在原发性肝癌组织中的表达及其临床意义 [J]. *沈阳医学院学报*, 2017, 19(6): 473-476.
- [16] 张敬, 孙晓燕. 鞘氨醇激酶 1 在婴幼儿血管瘤中的表达及其作用 [J]. *影像研究与医学应用*, 2018, 2(10): 246-247.
- [17] CHANG C H, HUANG Y L, SHYU M K, et al. Sphingosine-1-phosphate induces VEGF-C expression through a MMP-2/FGF-1/FGFR-1-dependent pathway in endothelial cells in vitro[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34(3): 360-366.
- [18] 熊伟, 吴煌福, 黄光越, 等. ABCB5 和 SphK1 在乳腺癌组织中的表达及意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(5): 688-691.
- [19] DATTA A, LOO S Y, HUANG B, et al. SPHK1 regulates proliferation and survival responses in triple-negative breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(15): 5920-5933.
- [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.

(王荣兵 编辑)