

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.40.007 [http://www.crter.org]
许海. 血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3在乳腺癌干细胞中的表达[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(40):7061-7067.

血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3在乳腺癌干细胞中的表达☆

许海(湖北中医药大学黄家湖医院妇产科, 湖北省武汉市 430065)

文章亮点:

1 Wnt/ β -catenin 信号通路参与许多正常干细胞的自我更新和分化过程, 对乳腺癌的发生、发展起着至关重要的作用。

2 血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3可能参与了细胞内的 Wnt/ β -catenin 信号通路, 但两者是否参与乳腺癌干细胞的作用机制至今仍鲜有报道。

3 实验检测了乳腺癌干细胞血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3及 β -Catenin 蛋白的表达, 提出了血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3通过调控 Wnt/ β -Catenin 信号通路, 参与乳腺癌发生发展过程的创新性观点。

关键词:

干细胞; 肿瘤干细胞; 血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3; 乳腺癌; 乳腺癌干细胞; Wnt/ β -Catenin 信号通路; 细胞分选; 干细胞图片文章

主题词:

肿瘤干细胞; 乳腺肿瘤; 蛋白激酶类; β 连环素

摘要

背景: 最新研究显示, 血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3可能与某些肿瘤的发生有着密切关系, 且对白细胞介素3撤退所诱导的乳腺癌细胞凋亡具有保护作用。另据相关报道显示, 血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3可能参与调节细胞内 Wnt 信号通路。

目的: 观察乳腺癌干细胞中血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3及 β -Catenin 蛋白的表达。

方法: 采用双波段流式细胞分选仪从71例人乳腺癌组织中分选乳腺癌干细胞, 并进行鉴定及传代培养, 以30例正常乳腺组织作为对照。应用SP免疫法检测乳腺癌干细胞和正常乳腺组织中血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3、 β -Catenin 蛋白的表达。

结果与结论: 乳腺癌干细胞中血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3、 β -Catenin 的表达均显著高于正常乳腺组织 ($P < 0.01$)。二者在乳腺癌干细胞中的表达呈正相关 ($r=0.318$, $P < 0.05$)。说明血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3可能通过调控 Wnt/ β -Catenin 信号通路, 参与乳腺癌的发生发展过程。

Expression of serum and glucocorticoid-regulated protein kinase 3 in breast cancer stem cells

Xu Hai (Department of Gynaecology and Obstetrics, Huangjiahu Hospital of Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, Hubei Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Serum and glucocorticoid-regulated protein kinase 3 may be related to tumor progression, and can prevent the apoptosis of breast cancer cells induced by interleukin-3 withdrawal. Serum and glucocorticoid regulated protein kinase 3 possibly participate in the regulation of intracellular Wnt signal pathway.

OBJECTIVE: To investigate the expression of serum and glucocorticoid-regulated protein kinase 3 and β -catenin protein expression in breast cancer cells.

METHODS: Breast cancer stem cells were isolated, identified and subcultured from 71 breast cancer cases by dual-wave flow cytometry. The 30 normal breast tissues were used as the controls. SP immunohistochemistry analysis was used to detect the level of serum and glucocorticoid-regulated protein kinase 3 and β -catenin protein expression in breast cancer stem cells and normal breast tissues.

RESULTS AND CONCLUSION: The expression of serum and glucocorticoid-regulated protein kinase 3 and β -catenin in breast cancer stem cells were both higher than that of normal breast tissues ($P < 0.01$). There had a positive correlation between serum and glucocorticoid-regulated protein kinase 3 and β -catenin expression in breast cancer stem cells ($r=0.318$, $P < 0.05$). Serum and glucocorticoid-regulated protein kinase 3 may play an important role in the occurrence and development of breast cancer by regulation of Wnt/ β -catenin pathway.

Subject headings: neoplastic stem cells; breast neoplasms; protein kinases; beta Catenin

Xu H. Expression of serum and glucocorticoid-regulated protein kinase in breast cancer stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(40):7061-7067.

许海☆, 女, 1972年生, 湖北省武汉市人, 汉族, 2009年湖北中医药大学毕业, 博士, 主要从事妇科基础与临床工作的研究。

xuhai1113@163.com

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2013)40-07061-07

收稿日期: 2013-01-06

修回日期: 2013-02-02

(20121106004/M·Y)

Xu Hai☆, M.D., Department of Gynaecology and Obstetrics, Huangjiahu Hospital of Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, Hubei Province, China
xuhai1113@163.com

Received: 2013-01-06

Accepted: 2013-02-02

0 引言 Introduction

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤,目前中国乳腺癌发病率呈逐年上升趋势,已跃居女性恶性肿瘤之首^[1]。肿瘤干细胞是存在于肿瘤组织中的少量具有无限增殖和不定分化潜能的细胞群体,它是形成不同分化程度肿瘤细胞和肿瘤细胞不断生长、转移的根源^[2],而乳腺癌干细胞是第一个在实体瘤中被鉴定的肿瘤干细胞,其标记物为CD44⁺/CD24^{-low}。深入地研究乳腺癌干细胞的生物学行为,能够为药物治疗的耐药性、肿瘤的侵袭及淋巴转移等问题提供更好地解决办法,也为临床治疗乳腺癌提供有益的指导。

研究表明,Wnt/ β -catenin信号通路参与许多正常干细胞的自我更新和分化过程,对包括乳腺癌在内的许多肿瘤发生、发展起着至关重要的作用^[3]。血清和糖皮质激素调节蛋白激酶(serum and glucocorticoid regulated protein kinase, SGK3)在离子通道、细胞增殖、细胞存活和凋亡的信号转导中起着重要的作用,对白细胞介素3撤退所诱导的乳腺癌细胞凋亡具有保护作用,能结合并磷酸化细胞核激素受体共激活因子FLII而增强雌激素受体的转录^[4]。

有文献报道,血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3可能参与了细胞内Wnt/ β -catenin信号通路,但二者在乳腺癌干细胞中的作用机制至今报道甚少。基于此,作者通过检测乳腺癌干细胞中血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3及 β -Catenin蛋白的表达,探讨血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3及Wnt/ β -Catenin信号通路在乳腺癌发生中的作用机制。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 细胞学对比观察实验。

时间及地点: 于2012年7月在湖北中医药大学实验中心完成。

材料: 选取湖北中医药大学医院乳腺外科 2007年3月至2011年10月保存的手术切除乳腺癌标本71例,病理诊断均为乳腺浸润性导管癌,均为女性,年龄32-73岁,平均年龄(41.0±4.5)岁,术前均未接受放化疗治疗。正常乳腺组织为30例癌旁乳腺组织,距肿瘤5 cm。

纳入标准: ①乳腺癌干细胞组选择2007至2011年保存的、经病理诊断确诊的手术切除乳腺癌标本。②均为乳腺浸润性导管癌。③取得受试者及其家属的知情同意。

排除标准: ①患有甲亢、甲减、糖尿病等代谢性疾病。②患有慢性阻塞性肺气肿、高血压、心脏病等慢性疾病。③患有其他部位组织器官的恶性肿瘤,且伴或不伴有乳

腺位置转移。④患有干燥综合征、系统性红斑狼疮等各类自身免疫性疾病。

乳腺癌干细胞分离培养以及免疫组化检测血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3及 β -catenin蛋白表达所需主要试剂:

试剂	来源
DMEM-F12 培养基、鼠抗人 CD44 单克隆抗体、兔抗人 CD24 单克隆抗体	美国 Gibco 公司
SGK3 多克隆抗体	CST 公司
β -catenin 抗体	上海万安生物技术有限公司
羊抗小鼠 IgG 免疫磁珠、重组人表皮生长因子(EGF)、重组人碱性成纤维生长因子(FGF)、白血病抑制因子(LIF)、D-Hank's 液、B27 添加剂、体积分数为 10%胎牛血清、肝素	AlfaAesar 公司
胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液(PBS)	武汉子心科技生物有限公司
SP 超敏试剂盒、DAB 液	福州迈新生物技术开发有限公司

实验方法:

乳腺癌干细胞的分化、鉴定及原代培养: 无菌条件下取乳腺癌标本,置入预备的无菌青霉素小瓶内,以微量移液器吸取少量DMEM培养基滴入其中,浸泡组织块,随之以眼科剪继续反复剪切,将其制备成为1 mm³左右大小的均匀碎块;过滤,加入胰蛋白酶消化,每隔15 min即用移液器进行吹打,历时30 min-2 h。以PBS进行重悬后进行计数,逐步调整细胞浓度至1×10⁸ L⁻¹,用PBS洗2次,轻轻吸取制备好的细胞悬液100 μ L,于单阳性管与双阳性管内分别缓缓加入PE-CD44与FITC-CD24的流式抗体各10 μ L;不加抗体的细胞则作为空白对照,随之轻柔吹打混匀;避光条件下,4 $^{\circ}$ C恒温孵育,历时30 min;其间,间断轻柔混匀3次;离心后,取制备好的PBS进行洗涤2次,以200 μ L的 PBS进行重悬细胞沉淀,随之使用FACS AriaTM II型流式细胞分选仪分别检测孵育好的PE单阳性和FITC单阳性以及PE/FITC双阳性细胞比例,使用的激发波长为488 nm,而发射波长为525 nm,最后根据单阳性细胞设定的荧光阈值来进行细胞分选。流式分选的目标细胞群体为CD44⁺CD24^{-low}细胞亚群。获得的CD44⁺CD24^{-low}为公认的乳腺癌干细胞标记物。

实验分组: 将分离的乳腺癌干细胞制备成细胞悬液,并调整细胞浓度至1×10⁸ L⁻¹后,置于培养瓶内传代培养,作为观察组。30例正常乳腺组织按上述方法培养作为对照组。

免疫组化检测血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3及 β -catenin的表达: 分别取上述单细胞悬液涂片,置入100%冷丙酮于4 $^{\circ}$ C固定 5 min,依次加入血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3一抗及 β -catenin一抗,采用免疫组织化学SP法检测,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。用已知的阳性切片作为阳性对照,用PBS代替一抗作为空白对照,正常乳腺组织作为阴性对照。

结果判定: 血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3以细胞浆出现棕黄色颗粒为阳性, β -catenin以细胞核或细胞质出现棕黄色颗粒为阳性。

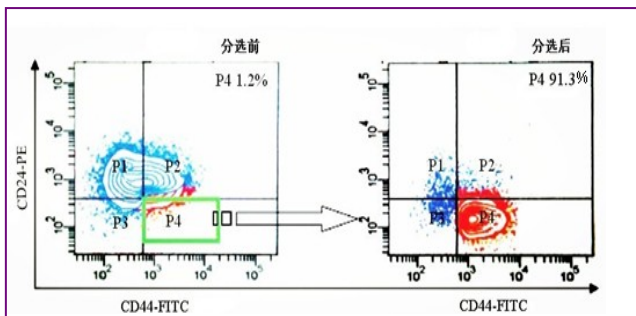
根据1996年免疫组化结果的判断标准采用半定量积分法: ①着色细胞数量评分: 每张切片随机取5个视野, 在每个视野中选取具有代表性的肿瘤区域镜下计数100个肿瘤细胞, 计算得出每张切片的阳性细胞百分率, 0分: <10%; 1分: 10%-25%; 2分: >25%-75%; 3分: >75%。②染色强度评分: 无着色为0分, 淡黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分。两项评分相加, ≤ 2 为阴性, ≥ 3 为阳性。

主要观察指标: 应用SP免疫法检测乳腺癌干细胞和正常乳腺组织中血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3、 β -catenin蛋白的表达。

统计学分析: 所有数据采用SPSS 15.0软件包进行分析, 组间比较采用 χ^2 检验, 采用Spearman相关分析血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3及 β -catenin的相关关系, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 乳腺癌干细胞的分选结果 用流式分选的方法分选, 获得的乳腺癌干细胞标记物 $CD44^+CD24^{low}$ 的比例达到91.3%以上, 可以满足进一步的实验需求, 见图1。

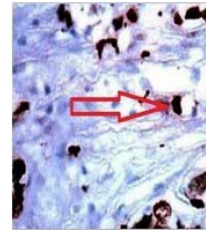


注: P4 代表分选出的 $CD44^+CD24^{low}$, 分选前检测 $CD44^+CD24^{low}$ 所占比例为1.2%, 分选后所获得的 $CD44^+CD24^{low}$ 细胞比例为91.3%。

图1 流式细胞仪分选的乳腺癌干细胞

Figure 1 Breast cancer stem cells sorted by flow cytometry

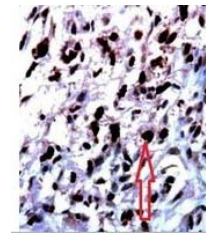
2.2 血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3及 β -catenin蛋白在乳腺癌干细胞及正常乳腺组织中的免疫组化染色结果 在乳腺癌干细胞中可见大量阳性染色血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3细胞, 主要表达于细胞浆, 正常乳腺组织见少量阳性染色细胞。 β -catenin蛋白在乳腺癌干细胞的细胞核或细胞质也可见大量阳性染色细胞, 正常乳腺组织细胞膜核或细胞质阳性染色细胞少见, 见图2-5。



注: 红色箭头所指为血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3蛋白在正常乳腺组织中的表达, 主要定位于细胞浆, 可见少量棕黄色阳性染色颗粒。

图2 血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3在正常乳腺组织的阳性表达(免疫组化, $\times 400$)

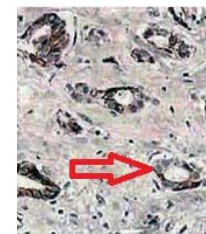
Figure 2 Positive expression of serum and glucocorticoid-regulated protein kinase 3 in normal breast tissue (Immunohistochemistry, $\times 400$)



注: 红色箭头所指为血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3蛋白在乳腺癌干细胞中的表达, 主要定位于细胞浆, 可见大量棕黄色阳性染色颗粒。

图3 血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3在乳腺癌干细胞的阳性表达(免疫组化, $\times 400$)

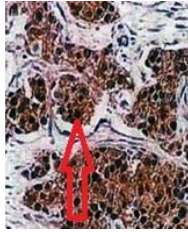
Figure 3 Positive expression of serum and glucocorticoid-regulated protein kinase 3 in breast cancer stem cells (Immunohistochemistry, $\times 400$)



注: 红色箭头所指为 β -catenin蛋白在正常乳腺组织中的表达, 主要定位于细胞核或细胞质, 可见少量棕黄色阳性染色颗粒。

图4 β -catenin在正常乳腺组织的阳性表达(免疫组化, $\times 400$)

Figure 4 Positive expression of β -catenin in normal breast tissue (Immunohistochemistry, $\times 400$)



注：红色箭头所指为 β -catenin 蛋白在乳腺癌干细胞中的表达，主要定位于细胞核或细胞质，可见大量棕黄色阳性染色颗粒。

图5 β -catenin 在乳腺癌干细胞的阳性表达(免疫组化, $\times 400$)

Figure 5 Positive expression of β -catenin in breast cancer stem cells (Immunohistochemistry, $\times 400$)

2.3 血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3及 β -catenin蛋白在乳腺癌干细胞及正常乳腺组织中的表达 血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3及 β -catenin蛋白在乳腺癌干细胞中的阳性表达强度分别为 56.34%(40/71)和 43.66%(31/71)，明显高于正常乳腺组织的 13.33%(4/30)和10.0%(3/20)，见表1。血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3在乳腺癌干细胞中呈高表达，说明其在乳腺癌的发生过程中可能发挥了重要作用。同时， β -Catenin 在乳腺癌干细胞中也呈高表达，说明在乳腺癌患者体内，Wnt/ β -Catenin信号通路处于异常激活状态。

表1 血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3及 β -catenin蛋白在乳腺癌干细胞及正常乳腺组织中的表达比较

Table 1 Comparison on the expression of serum and glucocorticoid-regulated protein kinase 3 and β -catenin in normal breast tissue and breast cancer stem cells

组织	n	糖皮质激素调节蛋白激酶3表达		β -catenin 蛋白表达	
		阳性(n)	阳性率(%)	阳性(n)	阳性率(%)
乳腺癌干细胞	71	40	56.34 ^a	31	43.66 ^b
正常乳腺组织	30	4	13.33	3	10.00

与正常乳腺组织比较， $\chi^2=3.214$ ，^a $P<0.01$ ； $\chi^2=3.586$ ，^b $P<0.05$ 。

注：血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3在乳腺癌干细胞中呈高表达，说明其在乳腺癌的发生过程中可能发挥了重要作用。同时， β -Catenin 在乳腺癌干细胞中也呈高表达，说明在乳腺癌患者体内，Wnt/ β -Catenin 信号通路处于异常激活状态。

2.4 血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3及 β -catenin蛋白在乳腺癌干细胞表达的相关性 血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3及 β -catenin蛋白在乳腺癌干细胞表达呈正相关， $r=0.318$ ， $P<0.05$ ，见表2。

表2 血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3及 β -catenin蛋白在乳腺癌干细胞中表达的相关性

Table 2 The correlation between the expression of serum and glucocorticoid-regulated protein kinase 3 and β -catenin in breast cancer stem cells

糖皮质激素调节蛋白激酶3	β -catenin		总计
	阳性	阴性	
阳性	37	3	40
阴性	3	28	31
合计	40	31	71

$r=0.318$ ， $P<0.05$ ，二者呈正相关。

注：在乳腺癌干细胞中，高表达的血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3基因，通过调控Wnt/ β -Catenin信号通路使其异常激活，共同参与了乳腺癌的发生。

3 讨论 Discussion

肿瘤干细胞自我更新的信号通路是决定肿瘤干细胞生物学行为的重要因素，也是肿瘤干细胞的干预靶点。乳腺癌干细胞理论为根治乳腺癌开辟了新的治疗途径，肿瘤治疗研究开始以特异性乳腺癌干细胞为主要目标，即从源头上根治肿瘤。乳腺干细胞是具有多种分化和自我更新能力的成体干细胞，既可能来源于正常的干细胞，也可能来源于祖细胞。研究表明，正常情况下多个信号转导通路和激素严格调控着乳腺干细胞的分化和更新能力，一旦调控发生异常，就会导致异常自我更新及增殖异常，形成乳腺癌干细胞，从而导致乳腺癌的发生^[5]。乳腺癌干细胞是在治疗乳腺癌过程中发生药物抵抗及放疗抵抗导致治疗失败的主要原因^[6-9]，也是肿瘤高复发率的重要原因。Gupta等^[10]发现肿瘤干细胞具有细胞周期长、代谢慢的特点，因此对抗有丝分裂药物具有较高的耐受性。Lindeman等^[11]研究表明休眠肿瘤干细胞具有化疗抵抗能力。另外，研究显示乳腺癌干细胞在某些遗传性乳腺癌中有更高的比例^[12]。Mumcuoglu等^[13]最近的研究结果显示乳腺癌的恶性程度与CD44⁺/CD24⁻细胞群分化程度直接相关，分化越差恶性程度越高。Huang等^[14]发现乳腺癌相关成纤维细胞通过基质细胞衍生因子1通路而增加CD44⁺CD24⁻细胞的含量，此通路有望成为化疗药物治疗乳腺癌的新靶点。因此，通过研究并了解乳腺癌干细胞的某些特性，对于乳腺癌预后的判断及开发靶向治疗将具有重要意义。

乳腺癌是一种全身性疾病，其发生发展是一个多因素参与的复杂过程。生长因子、细胞因子以及激素等生物活性物质参与了乳腺细胞癌变以及转移的过程，这些活性物质介导的信号转导途径发生异常，可引起某些基因的过度扩增，导致正常细胞接受了异常的增殖、分化

和生长信号,最终促使细胞发生癌变^[15]。细胞信号的转导不仅将信号传至胞核,而且与胞内生长分化有关的信号因子结合,激活特定的信号通路,与原癌基因或抑癌基因突变的产物相关联,导致细胞的失控性生长,从而影响细胞信号传导通路的各个环节,最终导致肿瘤的发生、发展。多项研究表明,Wnt、Notch、Hedgehog等转导通路在乳腺癌干细胞自我更新和分化中起重要作用^[16],它们除了能影响乳腺干细胞的自我更新和乳腺发育外,可能还具有诱导乳腺干细胞恶性转化以及促进乳腺癌的形成等功能^[17-18]。同时,Wnt、Notch和Hedgehog信号转导通路对乳腺干细胞表型更新能力,肿瘤干细胞表型特征以及肿瘤干细胞的维持、自我更新和乳腺组织的重建等方面有着重要的影响^[19],阻断信号转导通路将会使乳腺癌干细胞的比例明显下降。因此,上述这些信号转导通路为乳腺癌的预防和治疗提供了新靶点,通过对它们的研究,开发出调节乳腺癌干细胞的分子制剂,应用于乳腺癌的靶向治疗,是目前研究的重点。

经典Wnt通路是一条重要的信号转导通路,它通过Wnt蛋白与胞膜受体的特异性结合,引发一连串级联反应,最终引起核内基因表达的改变。Wnt/ β -catenin信号转导通路在进化上高度保守,其以不同的机制在胚胎发育、细胞增殖、转运、迁移、凋亡及器官形成等生命过程和动物体生长发育中发挥重要作用,已发现其在多种干细胞维持自我更新过程中发挥作用^[20],该通路的异常活化与肿瘤的发生、发展有关^[21-23]。Wnt信号通路不仅参与早期胚胎中乳腺的发展,而且在异常激活时导致乳腺癌的发生^[24],进而促进细胞增殖、侵袭转移、抵抗凋亡,同时还与肿瘤细胞化疗耐药性有关。Wnt通路对乳腺干细胞的转化和维持稳态起着重要作用^[24]。最近有学者指出,在乳腺癌患者中Wnt通路的状况与CD44⁺/CD24⁻/Lin⁻细胞的转移与否有密切关系^[25]。研究表明,Wnt信号通路的活化可以诱导乳腺干细胞和祖细胞分化成癌细胞;同时,可引起乳腺癌干细胞的比例增加^[26-27]。Wnt蛋白是细胞间的信号分子,正常情况下,该分子调节一些器官的发育,其异常调节时则导致肿瘤发生。持续增加Wnt1基因的表达可引起鼠乳腺增生,形成乳腺肿瘤。骨髓中Wnt表达可能同样影响骨髓干细胞,在长期的骨髓干细胞培养中,激活Wnt的下游激活物 β -catenin的过度表达能扩增可移植的骨髓干细胞^[28-30]。 β -Catenin是Wnt通路中重要的转录因子, β -catenin的稳定是Wnt通路的核心,当 β -catenin水平低下时Wnt通路处于关闭状态,反之,处于开启状态^[31]。Wnt通路致癌的关键是 β -catenin降解障碍使胞质内游离的 β -catenin聚集并与TCF/LEF-1结合进入细胞核,激活下游靶基因c-myc、cyclinD1的转录,进而导致肿瘤的发生。有文献报道,当阻断乳腺腺泡祖细胞的 β -catenin信号,乳腺

发育就会停止,这说明 β -catenin是乳腺干细胞的存活因子^[32]。在一些细胞系,如鼠4T1乳腺癌细胞系、MCF7乳腺癌细胞系中,乳腺癌干细胞表达更高水平的Wnt-1和 β -catenin等信号分子^[33]。MMTV-Wnt转基因小鼠乳腺癌中的干细胞标志物表达明显增高^[34]。这些资料均说明,Wnt通路的异常激活可对乳腺干细胞的自我更新产生不良影响,优先诱导干细胞的异常增殖,引起干细胞比例的异常增加,而异常增殖转化的乳腺干细胞进而形成乳腺癌干细胞,导致乳腺肿瘤的形成。

血清和糖皮质激素调节蛋白激酶是1993年发现的一个与蛋白激酶B(PKB)第二信使蛋白具有极高同源性的Ser/Thr蛋白激酶,该基因全长2.4 kb,序列高度保守,在各种哺乳动物组织和细胞系中均有表达。近年来研究表明,血清和糖皮质激素调节蛋白激酶可能是多种细胞信号转导通路和细胞磷酸化级联反应的一个功能性交汇点,可被多种应激因素诱导激活,在调节离子通道、细胞增殖、细胞存活和凋亡的信号转导中起重要的作用^[35],持续高水平的血清和糖皮质激素调节蛋白激酶表达和激活,与高血压、糖尿病性肾病等多种疾病密切相关^[36]。目前已发现哺乳类血清和糖皮质激素调节蛋白激酶的异构酶有血清和糖皮质激素调节蛋白激酶1、2和3(也称CISK)3种,迄今为止,研究较多的是血清和糖皮质激素调节蛋白激酶1,其对鼠的毛囊形态发生、自身稳定以及肠道营养物质的吸收等具有重要作用^[37-38]。血清和糖皮质激素调节蛋白激酶2和血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3的同源程度最高,他们的催化结构域具有高达80%的氨基酸序列相同,但很多方面具有显著的不同之处^[39-41]。虽然已有证据显示,血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3在某些肿瘤的形成过程中可能发挥着重要的作用,但国内外关于血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3的研究报道并不多见。有文献报道血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3可能参与调节细胞内Wnt信号通路^[15, 42]。有文献报道,血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3可能与某些肿瘤的发生有着密切关系,最新研究显示,CISK/血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3对白细胞介素3撤退所诱导的乳腺癌细胞凋亡具有保护作用^[43];能结合并磷酸化细胞核激素受体共激活因子FLII而增强雌激素受体的转录^[44]。但迄今为止,有关血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3在肿瘤发生发展中的作用机制却鲜有报道。

由于CD44⁺CD24^{-low}是公认的乳腺癌干细胞标志物,因此,作者采用双波段流式细胞分选仪分选出CD44⁺CD24^{-low}细胞亚群,结果显示富集了高纯度的CD44⁺CD24^{-low}乳腺癌干细胞,充分满足了后续实验的要求。接下来,作者以免疫组化检测发现血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3及 β -Catenin蛋白在乳腺癌干细胞中均有大量阳性染色细胞,而正常乳腺组织中仅有少量

血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3和 β -Catenin阳性表达细胞。另外,结果显示,乳腺癌干细胞中血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3蛋白阳性表达率为56.34%,显著高于正常乳腺组织的阳性表达率(13.3%),二者之间有显著差异性($\chi^2=3.214$, $P < 0.05$),提示血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3在乳腺癌的发生过程中可能发挥了重要作用。同时, β -Catenin在乳腺癌干细胞中阳性表达率为43.66%,显著高于正常乳腺组织的阳性表达率(10.0%),组间比较差异显著($\chi^2=3.586$, $P < 0.05$),提示 β -Catenin在乳腺癌干细胞中呈高表达,也说明在乳腺癌患者体内,Wnt/ β -Catenin信号通路处于异常激活状态,与文献报道一致。另外结果显示,在乳腺癌干细胞中,血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3与 β -Catenin均呈高表达,二者的表达呈正相关($P < 0.05$)。由此推测,在乳腺癌干细胞中,高表达的血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3基因,通过调控Wnt/ β -Catenin信号通路使其异常激活,共同参与了乳腺癌的发生。

综上所述,血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3可能通过调控Wnt/ β -Catenin信号通路,参与了乳腺癌的发生发展过程,为针对乳腺癌干细胞治疗该病提供了新的研究方向。但是,实验没有检测Wnt/ β -Catenin信号通路下游靶基因的表达状态,因此血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3基因对Wnt/ β -Catenin信号通路下游靶基因例如cyclin D1的影响是怎样的?尚需要进一步深入研究探讨。另外,随着对乳腺癌相关信号转导通路的深入研究,越来越发现到乳腺癌发病机制的复杂性,不仅是Wnt/ β -Catenin信号通路,可能是两条或多条信号通路共同参与而引起的^[45-46],因此,血清和糖皮质激素调节蛋白激酶3在参与乳腺癌发生发展的过程中是否还与除Wnt/ β -Catenin信号通路外的其他转导途径相互作用,同样需要进一步的探索。

作者贡献: 设计、实施、评估及资料收集为许海。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验所采用的标本均来自于湖北中医药大学医院乳腺外科;受试对象均签署了知情同意书;实验获得了本院伦理委员会的批准。

学术术语: 血清和糖皮质激素调节的蛋白激酶(SGK)是一种新发现的丝/苏氨酸蛋白激酶,与其他蛋白激酶显著不同的是,血清和糖皮质激素调节的蛋白激酶的转录、活性和在细胞内定位受到不同因素的调节,是多种胞内信号途径的交汇点,参与了细胞存活与凋亡、离子通道调节等过程,与高血压、糖尿病性肾病等疾病密切相关。

作者声明: 文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

4 参考文献 References

- [1] 邵志敏,余科达.乳腺外科的发展趋势[J].中国普外基础与临床杂志,2007,14(3):252-254.
- [2] 马文浩.乳腺癌干细胞信号转导通路的研究进展[J].医学综述,2011,17(18):2759-2762.
- [3] Zardawi SJ, O'Toole SA, Sutherland RL, et al. Dysregulation of Hedgehog, Wnt and Notch signalling pathways in breast cancer. *Histol Histopathol.* 2009;24(3):385-398.
- [4] Wang Y, Zhou D, Phung S, et al. SGK3 is an estrogen-inducible kinase promoting estrogen-mediated survival of breast cancer cells. *Mol Endocrinol.* 2011;25(1):72-82.
- [5] 牛畅,叶棋浓.乳腺癌干细胞和乳腺癌[J].生物技术通讯,2010,21(5):731-735.
- [6] Moulder S. Intrinsic resistance to chemotherapy in breast cancer. *Womens Health (Lond Engl).* 2010;6(6):821-830.
- [7] Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(4):275-284.
- [8] Cariati M, Naderi A, Brown JP, et al. Alpha-6 integrin is necessary for the tumorigenicity of a stem cell-like subpopulation within the MCF7 breast cancer cell line. *Int J Cancer.* 2008;122(2):298-304.
- [9] Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The response of CD24(-low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98(24):1777-1785.
- [10] Gupta PB, Onder TT, Jiang G, et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell.* 2009;138(4):645-659.
- [11] Lindeman GJ, Visvader JE. Insights into the cell of origin in breast cancer and breast cancer stem cells. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2010;6(2):89-97.
- [12] Heerma van Voss MR, van der Groep P, Bart J, et al. Expression of the stem cell marker ALDH1 in BRCA1 related breast cancer. *Cell Oncol (Dordr).* 2011;34(1):3-10.
- [13] Mumcuoglu M, Bagislar S, Yuzugullu H, et al. The ability to generate senescent progeny as a mechanism underlying breast cancer cell heterogeneity. *PLoS One.* 2010;5(6):e11288.
- [14] Huang M, Li Y, Zhang H, et al. Breast cancer stromal fibroblasts promote the generation of CD44+CD24- cells through SDF-1/CXCR4 interaction. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010;29:80.
- [15] Jordan CT, Guzman ML. Mechanisms controlling pathogenesis and survival of leukemic stem cells. *Oncogene.* 2004;23(43):7178-7187.
- [16] Beug H. Breast cancer stem cells: eradication by differentiation therapy. *Cell.* 2009;138(4):623-625.
- [17] Pece S, Serresi M, Santolini E, et al. Loss of negative regulation by Numb over Notch is relevant to human breast carcinogenesis. *J Cell Biol.* 2004;167(2):215-221.
- [18] Zardawi SJ, O'Toole SA, Sutherland RL, et al. Dysregulation of Hedgehog, Wnt and Notch signalling pathways in breast cancer. *Histol Histopathol.* 2009;24(3):385-398.
- [19] Rizzo P, Osipo C, Foreman K, et al. Rational targeting of Notch signaling in cancer. *Oncogene.* 2008;27(38):5124-5131.
- [20] Turashvili G, Bouchal J, Burkadze G, et al. Wnt signaling pathway in mammary gland development and carcinogenesis. *Pathobiology.* 2006;73(5):213-223.

- [21] 于晓敏,王辰,王军.Wnt信号通路的生物学效应及其与肺部疾病的关系[J].首都医科大学学报,2009,30(2):182-184.
- [22] 徐新娟,丁文柏. Wnt信号转导通路与肺癌的研究近况[J].医学综述,2008,14(2):217-219.
- [23] 林叔陈,张凤春,张雁云,等.肿瘤干细胞的调控机制研究进展[J].现代肿瘤学,2009,17(1):183-186.
- [24] Boras-Granic K, Wysolmerski JJ.Wnt signaling in breast organogenesis.Organogenesis. 2008;4(2):116-122.
- [25] Curtin JC, Lorenzi MV. Drug discovery approaches to target Wnt signaling in cancer stem cells. Oncotarget. 2010;1(7):563-577.
- [26] Lindvall C, Evans NC, Zylstra CR,et al.The Wnt signaling receptor Lrp5 is required for mammary ductal stem cell activity and Wnt1-induced tumorigenesis.J Biol Chem. 2006;281(46):35081-35087.
- [27] Liu BY, McDermott SP, Khwaja SS,et al.The transforming activity of Wnt effectors correlates with their ability to induce the accumulation of mammary progenitor cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(12):4158-4163.
- [28] Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R,et al.Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and ABCG2- cancer cells are similarly tumorigenic.Cancer Res. 2005;65(14):6207-6219.
- [29] Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM,et al. Stem cells in normal breast development and breast cancer.Cell Prolif. 2003;36 Suppl 1:59-72.
- [30] Kruger JA, Kaplan CD, Luo Y,et al. Characterization of stem cell-like cancer cells in immune-competent mice.Blood. 2006;108(12):3906-3912.
- [31] Roarty K, Rosen JM.Wnt and mammary stem cells: hormones cannot fly wingless. Curr Opin Pharmacol. 2010;10(6):643-649.
- [32] Arce L, Pate KT, Waterman ML. Groucho binds two conserved regions of LEF-1 for HDAC-dependent repression. BMC Cancer. 2009;9:159.
- [33] Kruger JA, Kaplan CD, Luo Y,et al. Characterization of stem cell-like cancer cells in immune-competent mice. Blood. 2006;108(12):3906-3912.
- [34] Stingl J, Eirew P, Ricketson I,et al. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells.Nature. 2006;439(7079):993-997.
- [35] Leong ML, Maiyar AC, Kim B, et al. Expression of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase, Sgk, is a cell survival response to multiple types of environmental stress stimuli in mammary epithelial cells.J Biol Chem. 2003;278(8):5871-5882.
- [36] Lang F, Böhmer C, Palmada M,et al. (Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms.Physiol Rev. 2006;86(4):1151-1178.
- [37] Brickley DR, Mikosz CA, Hagan CR,et al. Ubiquitin modification of serum and glucocorticoid-induced protein kinase-1 (SGK-1).J Biol Chem. 2002;277(45):43064-43070.
- [38] Klaus F, Palmada M, Lindner R,et al. Up-regulation of hypertonicity-activated myo-inositol transporter SMIT1 by the cell volume-sensitive protein kinase SGK1. J Physiol. 2008;586(6):1539-1547.
- [39] Mauro TM, McCormick JA, Wang J, et al. Akt2 and SGK3 are both determinants of postnatal hair follicle development. FASEB J. 2009;23(9):3193-3202.
- [40] Campagna DR, Custodio AO, Antiochos BB, et al. Mutations in the serum/glucocorticoid regulated kinase 3 (Sgk3) are responsible for the mouse fuzzy (fz) hair phenotype. J Invest Dermatol. 2008;128(3):730-732.
- [41] Mauro TM, McCormick JA, Wang J,et al. Akt2 and SGK3 are both determinants of postnatal hair follicle development. FASEB J. 2009;23(9):3193-3202.
- [42] Maier G, Palmada M, Rajamanickam J,et al. Upregulation of HERG channels by the serum and glucocorticoid inducible kinase isoform SGK3. Cell Physiol Biochem. 2006;18(4-5):177-186.
- [43] Wang Y, Zhou D, Phung S,et al. SGK3 is an estrogen-inducible kinase promoting estrogen-mediated survival of breast cancer cells. Mol Endocrinol. 2011;25(1):72-82.
- [44] Xu J, Liao L, Qin J, et al. Identification of Flightless-I as a substrate of the cytokine-independent survival kinase CISK.J Biol Chem. 2009;284(21):14377-14385.
- [45] Jin Q, Esteva FJ. Cross-talk between the ErbB/HER family and the type I insulin-like growth factor receptor signaling pathway in breast cancer. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2008;13(4):485-498.
- [46] Fagan DH, Yee D. Crosstalk between IGF1R and estrogen receptor signaling in breast cancer.J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2008;13(4):423-429.