

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00767

• 论 著 •

乳腺癌组织中 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 V 的活性和临床意义

胡 薇¹,施俊义¹,郑唯强²,倪灿荣²,陈 颖²,于观贞³,盛 媛¹,李 莉¹,方国恩^{1*}

1. 第二军医大学长海医院普通外科,上海 200433
2. 第二军医大学长海医院病理科,上海 200433
3. 第二军医大学长征医院肿瘤科,上海 200003

[摘要] **目的:**检测乳腺癌组织中 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 V (GnT-V) 的活性并分析其临床意义。**方法:**应用组织芯片技术构建 12×10 乳腺癌组织阵列块,通过凝集素印迹法检测以白细胞植物凝集素(PHA-L)标记的 GnT-V 在 57 例乳腺癌和 12 例乳腺良性病变中的活性,并探讨其与临床病理学参数间的关系。**结果:**乳腺癌组织中 PHA-L 阳性 89.47%(51/57),胞质阳性,乳腺良性病变组织中 PHA-L 阳性 8.33%(1/12),两者存在显著性差异($P<0.01$)。乳腺癌中 GnT-V 活性在不同病理类型、不同淋巴结转移状况、不同病理分期患者中的表达无明显差异。**结论:**乳腺病灶 GnT-V 高活性提示病变恶性可能大,可以 GnT-V 为靶点,治疗出现复发及转移三阴的乳腺癌患者。

[关键词] 乳腺肿瘤;癌;N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 V;组织芯片

[中图分类号] R 737.9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)07-0767-04

Activity of N-acetylglucosaminyltransferase V in breast cancer tissues and its clinical significance

HU Wei¹,SHI Jun-yi¹,ZHENG Wei-qiang²,NI Can-rong²,CHEN Ying²,YU Guan-zhen³,SHENG Yuan¹,LI Li¹,FANG Guo-en^{1*}

1. Department of General Surgery,Changhai Hospital,Second Military Medical University,Shanghai 200433,China
2. Department of Pathology,Changhai Hospital,Second Military Medical University,Shanghai 200433
3. Department of Oncology,Changzheng Hospital,Second Military Medical University,Shanghai 200003

[ABSTRACT] **Objective:** To explore the activity of N-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) in breast cancer tissues and to discuss its clinical significance. **Methods:** The activities of GnT-V were examined in a tissue microarray cohort of 57 breast carcinomas and 12 benign breast lesions. Lectin blotting using Phaseolus vulgaris leukocytic phytohemagglutinin (PHA-L) labeling was used to assay GnT-V activity. The relationship between clinicopathological parameters and GnT-V activity was investigated. **Results:** High activity of GnT-V was observed in 89.47% (51/57) breast cancer tissues, which was significantly higher than that in the benign breast lesions (8.33%[1/12], $P<0.01$). No difference in GnT-V activities was observed in breast cancer patients with different pathological types, different lymphatic statuses, and different stages. **Conclusion:** Higher GnT-V activity in breast cancer tissues indicates a higher risk of malignancy. Targeting GnT-V might be a future way for treatment of triple-negative breast cancer patients with recurrence and metastasis.

[KEY WORDS] breast neoplasms; carcinoma; N-acetylglucosaminyltransferase V; tissue microarray

[Acad J Sec Mil Med Univ,2009,30(7):767-770]

乳腺癌是严重危害妇女健康的恶性肿瘤,在我国其发病率不断上升。糖基转移酶已成为肿瘤学研究的热点,研究^[1-4]发现 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 V (N-acetylglucosaminyltransferase V, GlcNAcT-V 或 GnT-V) 与肿瘤的转移密切相关。但 GnT-V 与浸润性乳腺癌预后关系及机制的研究尚有限。本研究应用组织芯片技术和凝集素印迹法,探讨 GnT-V 在乳腺癌组织中的活性及其对乳腺癌预后的

意义。

1 材料和方法

1.1 标本收集 选取第二军医大学长海医院 2000 年 1 月至 10 月间浸润性乳腺癌病例 57 例,收集存档的石蜡标本,年龄 29~82 岁,中位年龄 53 岁,所有病例术前均未行放射和(或)化学药物治疗。按 WHO 乳腺肿瘤病理学分类:浸润性导管癌 44 例,小叶癌 8

[收稿日期] 2008-09-20 [接受日期] 2009-02-21

[作者简介] 胡 薇,博士,主治医师. E-mail: huweicj@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-81870201, E-mail: fanguoen@yahoo.com

例,黏液腺癌 4 例,大汗腺癌 1 例。TNM 分期:I 期 16 例,II 期 26 例,III 期 14 例,IV 期 1 例(淋巴结转移 24 例)。随访中脑转移死亡 2 例,肺或胸膜转移死亡 7 例,肝转移死亡 3 例,因老年痴呆死亡 1 例,心脏病死亡 1 例,另外肝转移带瘤生存 1 例,骨转移带瘤生存 1 例,其余患者自述健康。7 年总生存率 75.44%(43/57),无病生存率 71.93%(41/57)。另收集乳腺良性病变 12 例石蜡标本(纤维腺病或纤维腺瘤)作为对照。所有病例临床资料完整。

1.2 病理学复验与肿瘤区域标记 根据 WHO 乳腺肿瘤病理学分类和 TNM 分期标准对存档标本的 H-E 染色切片进行复核诊断,并在对应蜡块(组织芯片供体蜡块)上标记出肿瘤细胞集中的区域。

1.3 组织芯片制作^[6] 用莱卡石蜡(Leica Histowax)与蜂蜡(上海华灵康复器械厂)混合(7:3),制备组织芯片受体蜡块。用美国 Beecher 公司组织芯片构建仪打孔,然后取出供体蜡块(组织蜡块)上做标记的组织芯放入受体蜡块孔中(组织芯直径为 2 mm),重复上述操作,制成 12×10 点组织阵列块 2 块。将制成的组织阵列面朝下放在载玻片上,于 37℃ 放置 30 min,取出并轻压载玻片使组织柱在模块中排平。常规方法连续切片,厚 4 μm,裱于 10%多聚赖氨酸处理的载玻片上,60℃ 烘干过夜,即制成组织芯片。

1.4 凝集素印迹法检测 GnT-V 活性 GnT-V 活性的检测是通过凝集素印迹法以白细胞植物凝集素(PHA-L)标记体现的^[6-7],生物素标记的 PHA-L(VECTOR 公司)作为一抗,用免疫组化 EnVision 二步法进行,其阴性对照采用与猪甲状腺球蛋白(7.5 μmol/L; Sigma 公司)预孵育过 30 min 的生物素标记的 PHA-L^[6,8]。

1.5 阳性结果评定标准 GnT-V 活性阳性部位主要在细胞质,以出现黄色颗粒且染色强度高于背景非特异性着色者为阳性细胞。根据显色强度及阳性细胞数两项指标之和判断阳性等级。参考文献^[9]设定同一条件下的着色强度按照从无到有、由浅(黄色)至深(黄棕色)分为 4 个等级,即一、+、++、+++ ,相应计分 0、1、2、3;阳性细胞数由少至多亦分为 4 个等级,即 0、<25%、25%~75%、>75% ,分别计分 1、2、3、4;两项得分相加:0~3 分为阴性,4~7 分为阳性。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 10.5 统计软件包进行 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 组织芯片质量 H-E 染色观察癌组织芯显露

满意,脱点少,脱点用常规切片补充(图 1)。

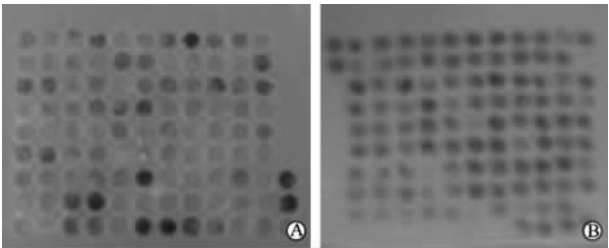


图 1 乳腺癌组织芯片(A)及 H-E 染色(B)
Fig 1 Tissue microarray(A) and H-E staining(B)
containing 57 breast carcinomas and 12 benign breast lesions

2.2 乳腺癌组织及乳腺良性病变组织中 GnT-V 的活性情况 本实验所构建的组织芯片,乳腺癌组织中 PHA-L 阳性平均 89.47%(51/57),主要在癌细胞的胞质、胞膜表达,以胞质为主(图 2),乳腺良性病变组织 PHA-L 阳性率为 8.33%(1/12)。乳腺癌组织中 GnT-V 活性绝大多数呈高表达和中等表达,而在乳腺良性病变组普遍呈低表达或阴性表达。GnT-V 在乳腺癌组织中的活性与乳腺良性病变组织之间存在显著差异($P<0.01$)。

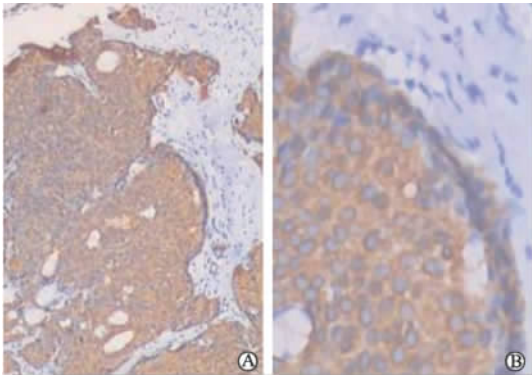


图 2 PHA-L 阳性乳腺癌组织
Fig 2 PHA-L positive expression in breast cancer
Original magnification: ×100(A); ×400(B)

2.3 乳腺癌组织中 GnT-V 活性与临床病理学参数的关系 本组乳腺癌病例中,TNM 分期、肿瘤大小以及有无淋巴结转移对总生存率、无病生存率均有明显影响($P<0.01$,表 1)。乳腺癌组织中雌激素受体(ER)阳性 40.35%(23/57),孕激素受体(PR)阳性 42.11%(24/57),其中 ER/PR 均阴性 49.12%(28/57),ER/PR/HER-2 均阴性 28.07%(16/57)。ER/PR/HER-2/PHA-L 均阴性仅 5.26%(3/57)。

乳腺癌中 GnT-V 活性在不同病理类型、不同淋巴结转移状况、不同病理分期患者中的表达无明显差异。

表 1 组织芯片中乳腺癌临床病理学指标与预后关系分析

Tab 1 Relationship between clinical pathological information and prognosis of breast cancer in tissue microarray

(x̄±s)					
Index	N	Overall survival for 7 years(%)	P	Disease free survival for 7 years(%)	P
Age(year)					
≤50	26	83.31±21.11	0.30	79.12±27.65	0.43
>50	31	76.35±28.77		72.61±33.92	
Pathological type					
Ductal invasive	44	76.71±27.79	0.26	72.23±33.10	0.23
Lobular invasive	8	92.63±3.07		92.63±3.07	
Others	5	83.40±19.97		77.80±32.42	
Size d/cm					
≤2	19	90.16±13.87	<0.01	87.79±19.40	<0.01
>2 and ≤5	29	81.31±24.58		79.48±27.72	
>5	9	51.33±29.35		37.22±34.32	
Axillary lymph node metastasis					
Negative	33	90.61±12.96	<0.01	90.76±12.11	<0.01
Positive	24	54.92±36.80		64.08±30.99	
TNM stage					
I + II	42	89.21±16.21	<0.01	89.79±14.87	<0.01
III + IV	15	37.40±31.38		50.80±27.78	

3 讨 论

组织芯片 (tissue chip) 又称组织微阵列 (tissue microarray, TMA)。它是将数十种、上百种甚至上千种的不同组织按照设计,整齐地排放在一张固相载体(通常是载玻片)上制成组织切片的技术,具有高通量、可比性强、实验误差小等优点,还可节约大量时间、财力和人力成本。这一技术由美国国立癌症研究院的 Kononen 等^[10]于 1998 年首次报道。本研究采用组织芯片技术,成功构建了 12×10 乳腺癌组织芯片并配以相应的临床资料以及预后随访信息,作为实验研究的基础和前提。

本实验所构建的组织芯片中临床病理分 I 和 II 期的患者与分期 III 和 IV 的患者总生存率以及无病生存率有明显差异,其激素受体表达情况也与以往乳腺癌报道一致,说明该组织芯片整体上能反映乳腺癌生物学特性,可用于目前的实验研究,以及今后发现的新标志物的测定。另一方面该技术的成熟可推广建立更大的组织阵列用于乳腺癌的研究。

细胞癌变时癌细胞膜上糖蛋白的糖基出现异常,影响肿瘤细胞的识别和黏附,进而造成肿瘤转移,糖基转移酶的参与起了关键作用。GnT-V 是 N-型糖链合成中的一个限速酶,与肿瘤的转移密切相关。GnT-V 以 β1,6 分支连接方式催化复杂性寡糖为细胞表面蛋白侧链,决定 N-糖链类型及复杂型糖链结构,是一种由 ras/raf 途径调控的酶。

以往研究^[11-12]表明,GnT-V 在结肠癌、肝癌、胆

管癌、肺癌、子宫内膜癌中活性显著增强,结肠癌中 GnT-V 表达程度与远距离转移成正相关。在比较人肝癌高转移和低转移的模型中发现,高转移模型 GnT-V 活性明显高于低转移模型^[13]。人肝癌中 GnT-V 活性的高低与病情的严重程度是完全一致的。Jin 等^[14]研究发现 GnT-V 活性增高与肝外胆管癌淋巴结转移潜能成正比,肝外胆管癌与良性胆管疾病对照 GnT-V mRNA 表达水平升高 7.75 倍。Yamamoto 等^[15]发现 GnT-V 表达与子宫内膜癌预后不良相关。

2005 年 Handerson 等^[6]研究发现 323 例乳腺癌患者中转移淋巴结内通过 PHA-L 印迹染色所反映的 GnT-V 的活性较原发肿瘤明显增强,在无淋巴结转移的乳腺癌中 GnT-V 活性增高也提示预后不良,并独立于肿瘤大小、细胞核分裂情况或患者年龄等因素。

多数研究表明 GnT-V 可增加肿瘤的恶性程度、增强活性、促进转移,但也有一些不同的研究结论。Ishimura 等^[16]研究发现 GnT-V 表达水平和 β1,6 分支 N-聚糖与膀胱癌分期相反,GnT-V 阳性的患者较阴性患者生存期明显长。Ishibashi 等^[17]对照了人类食管癌和邻近非肿瘤组织中 GnT-V 的表达,认为它的表达增加是食管肿瘤起源的早期事件。Dosaka-Akita 等^[18]也发现 GnT-V 低水平表达与非小细胞肺癌的病理 I 期以及其他非鳞癌的预后不良以及生存期短有关。日本研究者^[19]用抗 GnT-V 单克隆抗体对 130 例由于睾丸生殖细胞肿瘤切除的睾

丸标本行免疫组化检测,发现在恶性肿瘤转移和进展时人睾丸生殖细胞中 GnT-V 的阳性表达下降及 $\beta 1,6$ 分支 N-糖链减少或消失,并且认为 GnT-V 可能是非精原细胞的睾丸生殖细胞肿瘤第 I 期的预示因子。

本实验研究发现 GnT-V 活性在绝大多数乳腺癌肿瘤细胞中呈阳性 (89.47%),与良性乳腺疾病有显著差异,说明乳腺病灶 GnT-V 高活性提示病变恶性可能大。本组织芯片中乳腺癌患者 PHA-L 阳性比例远高于 ER、PR 以及 HER-2 癌基因阳性比例,ER/PR/HER-2/PHA-L 均阴性率极低 (5.26%)。现在临床上对于 ER/PR/HER-2 癌基因扩增三阴性的乳腺癌患者出现复发及转移时往往束手无策,今后如采用 GnT-V 为靶点治疗乳腺癌,对于该类患者不失为一个良好的治疗方向。

[参考文献]

- [1] Dennis J W, Laferté S, Waghorne C, Breitman M L, Kerbel R S. $\beta 1-6$ branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis[J]. *Science*, 1987, 236: 582-585.
- [2] Taniguchi N, Miyoshi E, Ko J H, Ikeda Y, Ihara Y. Implication of N-acetylglucosaminyltransferases III and V in cancer, gene regulation and signaling mechanism[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1455(2-3): 287-300.
- [3] Chakraborty A K, Pawelek J M. GnT-V, macrophage and cancer metastasis, a common link[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2003, 20: 365-373.
- [4] Zhang Y, Zhao J H, Zhang X Y, Guo H B, Liu F, Chen H L. Relations of the type and branch of surface N-glycans to cell adhesion, migration and integrin expressions[J]. *Mol Cell Biochem*, 2004, 260(1-2): 137-146.
- [5] Rimm D L, Camp R L, Charette L A, Olsen D A, Provost E. Amplification of tissue by construction of tissue microarrays [J]. *Exp Mol Pathol*, 2001, 70: 255-264.
- [6] Handerson T, Camp R, Harigopal M, Rimm D, Pawelek J. Beta 1,6-branched oligosaccharides are increased in lymph node metastases and predict poor outcome in breast carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11: 2969-2973.
- [7] Yamamoto H, Swoger J, Greene S, Saito T, Hurh J, Sweeley C, et al. Beta 1,6-N-acetylglucosamine-bearing N-glycans in human gliomas, implications for a role in regulating invasivity[J]. *Cancer Res*, 2000, 60: 134-142.
- [8] Yamamoto H, Swoger J, Greene S, Saito T, Hurh J, Sweeley C, et al. Coexpression of 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase V glycoprotein substrates defines aggressive breast cancers with poor outcome[J]. *Cancer Epidemiol Biomark Prevent*, 2005, 14: 2517-2523.
- [9] Barnes D M, Harris W H, Smith P, Millis R R, Rubens R D. Immunohistochemical determination of oestrogen receptor: comparison of different methods of staining and correlation with clinical outcome of breast cancer[J]. *Br J Cancer*, 1996, 74: 1445-1451.
- [10] Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens[J]. *Nat Med*, 1998, 4: 844-847.
- [11] Murata K, Miyoshi E, Ihara S, Noura S, Kameyama M, Ishikawa O, et al. Attachment of human colon cancer cells to vascular endothelium is enhanced by N-acetylglucosaminyltransferase V [J]. *Oncology*, 2004, 66: 492-501.
- [12] Murata K, Miyoshi E, Kameyama M, Ishikawa O, Kabuto T, Sasaki Y, et al. Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in colorectal cancer correlates with metastasis and poor prognosis[J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6: 1772-1777.
- [13] Guo H B, Zhang Y, Chen H L. Relationship between metastasis-associated phenotypes and N-glycan structure of surface glycoproteins in human hepatocarcinoma cells[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2001, 127: 231-236.
- [14] Jin X L, Zheng S S, Wang B S, Chen H L. Correlation of glycosyltransferases mRNA expression in extrahepatic bile duct carcinoma with clinical pathological characteristics[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2004, 3: 292-295.
- [15] Yamamoto E, Ino K, Miyoshi E, Shibata K, Takahashi N, Kajiyama H, et al. Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in endometrial cancer correlates with poor prognosis[J]. *Br J Cancer*, 2007, 97: 1538-1544.
- [16] Ishimura H, Takahashi T, Nakagawa H, Nishimura S, Arai Y, Horikawa Y, et al. N-acetylglucosaminyltransferase V and beta 1-6 branching N-linked oligosaccharides are associated with good prognosis of patients with bladder cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12: 2506-2511.
- [17] Ishibashi Y, Dosaka-Akita H, Miyoshi E, Shindoh M, Miyamoto M, Kinoshita I, et al. Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in the development of human esophageal cancers: immunohistochemical data from carcinomas and nearby noncancerous lesions[J]. *Oncology*, 2005, 69: 301-310.
- [18] Dosaka-Akita H, Miyoshi E, Suzuki O, Itoh T, Katoh H, Taniguchi N. Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V is associated with prognosis and histology in non-small cell lung cancers[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10: 1773-1779.
- [19] Kyan A, Kamimura N, Hagiwara S, Hatakeyama S, Koie T, Yoneyama T, et al. Positive expressions of N-acetylglucosaminyltransferase-V (GnT-V) and beta 1-6 branching N-linked oligosaccharides in human testicular germ cells diminish during malignant transformation and progression [J]. *Int J Oncol*, 2008, 32: 129-134.

[本文编辑] 尹 茶