网络出版时间:2017 - 7 - 20 23:55 网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170720.2354.020.html

◇临床医学研究◇

人胃癌组织 BRSK2 表达与患者临床病理学参数及预后的关系

王小强,常家聪,叶啸天,高 翔,曹先东,郭爱军

摘要 **目的** 研究人胃癌组织中脑选择性蛋白激酶-2(BRSK2)表达水平与胃癌患者临床指标及预后的关系。**方法** 免疫组织化学法检测 121 例人胃癌组织及相应癌旁正常胃黏膜组织中 BRSK2 蛋白的表达,分析 BRSK2 与临病理学参数的关系;结合患者的随访资料进一步分析 BRSK2 表达与胃癌患者生存的相关性(Kaplan-Meier 法和 Log-rank 检验);最后建立 Cox 回归模型,评估 BRSK2 及各临床病理学参数与胃癌患者预后的相关性。**结果** BRSK2 在正常胃黏膜组织中表达水平较高,然而,其在胃癌组织中表达水平下降。62 例胃癌组织中 BRSK2 表达降低(51.24%),明显低于癌旁正常胃黏膜组织($\chi^2 = 55.22$,$P < 0.001$)。BRSK2 在胃癌组织中的表达与患者肿瘤浸润深度($P < 0.001$)、肿瘤组织分化($P = 0.006$)、TNM 分期($P < 0.001$)、淋巴结转移($P = 0.001$)相关,然而其与患者年龄、性别、肿瘤部位、直径、手术方式、癌胚抗原、糖类抗原 19-9 无相关性。生存分析表明 BRSK2 高表达组的胃癌患者总生存时间和无病生存时间均高于 BRSK2 低表达组。Cox 回归分析表明 BRSK2 是胃癌患者的独立预后因子。**结论** 胃癌患者癌组织中 BRSK2 表达下降与肿瘤的进展及不良预后相关,表明 BRSK2 可以作为胃癌患者预后的分子标志物和一个潜在的治疗靶点。

关键词 胃癌;BRSK2;免疫组织化学;预后
中图分类号 R 735.2
文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2017)09 - 1346 - 06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2017.09.020

在世界范围内,胃癌发病率居恶性肿瘤第 4 位,因胃癌导致的年死亡人数系消化系统恶性肿瘤首位[1]。在中国,2015 年癌症统计数据显示,胃癌发病率居恶性肿瘤第 2 位,年新发胃癌679 100例,年胃癌死亡498 000例,是消化系统最常见的肿瘤[2]。可见,胃癌的防治形势依然严峻,进一步加强对胃癌发病机制的研究,从而寻找更为有效的靶向药物和灵敏度及特异度更强的生物学标志物对于胃癌的筛查、治疗和预后意义重大。脑选择性蛋白激酶-2(brain-selective protein kinase 2,BRSK2)是腺苷酸激活的蛋白激酶(AMP-activated protein kinase,AMPK)家族的一员[3],在脑组织表达,最初显示与突触囊泡聚集及神经纤维成熟有关[4]。近年来研究[5-6]显示 BRSK2 参与调节细胞周期,影响细胞增殖、凋亡及肿瘤的发生发展。然而,BRSK2 在胃癌中表达情况及对胃癌预后的意义未见相关报道。因此,本研究将探讨 BRSK2 在人胃癌中的表达情况及其与患者临床资料和预后的关系。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2008 年 12 月 ~ 2009 年 12 月在安徽医科大学第一附属医院接受胃癌手术的患者 121 例,其中男 75 例,女 46 例,年龄 29 ~ 80 岁,中位年龄 61.4 岁。纳入标准:患者诊断胃癌明确、患者手术之前无放疗及化学治疗的病史。随机选取 41 例患者癌组织旁的正常胃黏膜组织作为对照。肿瘤按第七版国际抗癌联盟(UICC)公布的肿瘤 - 淋巴结 - 远处转移(tumor-node-metastasis,TNM)分期标准分期。其中,49 例为高、中分化癌;72 例为低分化癌;Ⅰ、Ⅱ期患者 55 例;Ⅲ、Ⅳ期患者 66 例。糖类抗原 19-9(carbohydrate antigen 19-9,CA-19-9)及癌胚抗原(carcino-embryonic antigen,CEA)取自患者术前 1 周的检验数据,患者的主要临床病理参数见表 1。实验前获得患者的知情同意,同时经过安徽医科大学第一附属医院医学伦理委员会的同意和批准。

1.2 主要试剂 兔抗人 BRSK2 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司);PV-6000 免疫组织化学检测试剂盒及浓缩型 DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.3 实验方法 将收集所得病例的石蜡包埋的组织制作成厚度 4 μm 的切片。将所有的石蜡切片放入 80 ℃的烤箱中烤片 30 min 后经二甲苯脱蜡和梯度酒精水化,然后用 3% 过氧化氢灭活内源性过氧化物酶活性;切片经柠檬酸缓冲液煮沸法修复抗原,冷却之后用 PBS 缓冲液冲洗;切片滴加兔抗人 BR-

2017 - 03 - 31 接收
基金项目:安徽省科技攻关计划项目(编号:1501ld04040)
作者单位:安徽医科大学第一附属医院普通外科,合肥 230022
作者简介:王小强,男,硕士研究生;
常家聪,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:changjiacong03@aliyun.com

SK2 多克隆抗体(一抗),在 4 ℃下孵育过夜;PBS 缓冲液冲洗切片后滴加通用型 IgG 抗体-HPR 多聚体,37 ℃下孵育 15 min;PBS 缓冲液冲洗后采用现配 DAB 试剂染色,苏木精轻度复染细胞核冲洗脱水干燥后用中性树胶封片。PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。

1.4 BRSK2 染色结果判定 在肿瘤细胞中,BRSK2 蛋白主要定位于细胞质,以胞质中出现棕黄色颗粒为阳性细胞。显微镜下双盲法阅片。染色范围 1% ~5% 计为 0 分,6% ~25% 计为 1 分,26% ~50% 计为 2 分,51% ~75% 计为 3 分,76% ~100% 计为 4 分。染色强度评分为 0 分(基本不着色),1 分(浅黄色),2 分(棕黄色),3(棕褐色);两者相乘为最终得分:0 分为阴性,1 ~2 为弱阳性,3 ~4 分为中度阳性,5 ~6 分为强阳性。

1.5 随访情况 本研究为回顾性分析,随访从患者术后开始,直至患者死亡或本研究结束,为期 6 年,截止于 2014 年 12 月。随访时间 2 ~60 个月,中位随访时间 36.1 个月。无 1 例失访,无病生存期为患者术后到肿瘤再发的时间,总生存期为患者术后到患者死亡的时间。其他疾病引起的死亡病例不纳入本研究范围。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行分析,无序定性资料采用 χ^2 检验,有序定性资料采用 Mann-Whitney U 检验,Kaplan-Meier 绘制生存曲线研究 BRSK2 和其他病理参数对患者预后的影响,组间生存率曲线经过 Log-rank 检验分析。建立 Cox 回归分析模型确定胃癌患者独立的预后因子,检验水准 $\alpha = 0.05$。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌及癌组织旁的正常胃黏膜组织中 BRSK2 的表达 染色结果表明 BRSK2 在癌组织旁的正常胃黏膜组织中表达最强,在胃癌组织中表达降低。在胃癌组织中,阳性表达大多数见于分化程度比较高的组织;121 例标本中,62 例(51.24%)为阴性,39 例(32.23%)为弱染色,20 例(16.53%)为强染色。与此相比,41 例癌组织旁的正常胃黏膜组织中,4 例(9.76%)为阴性,11 例(26.83)为弱染色,26 例(63.41%)为强染色;与癌组织旁的正常胃黏膜组织相比,BRSK2 在胃癌组织中表达显著下降($\chi^2 = 55.22$,$P < 0.001$)。见图 1。

2.2 胃癌组织中 BRSK2 表达水平与患者临床病理学参数的关系 BRSK2 蛋白在胃癌组织中的表达水平与患者肿瘤浸润深度($P < 0.001$)、肿瘤组织分化程度($P = 0.006$)、TNM 分期($P < 0.001$)、淋巴结转移($P = 0.001$)相关。见表 1。

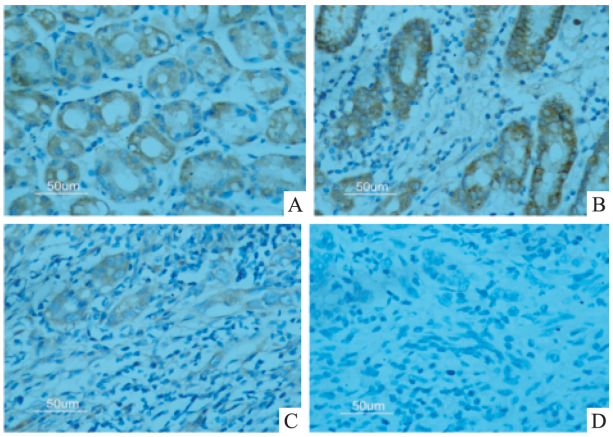

图 1 胃癌组织及癌旁正常胃黏膜组织中 BRSK2 的表达 免疫组化染色 ×400

A:癌旁正常胃黏膜组织;B:高分化癌组织;C:中分化癌组织;D:低分化癌组织

2.3 胃癌组织 BESK2 的表达水平与患者生存的关系 Kaplan-Meier 生存分析和 Log-rank 检验表明,胃癌患者中 BRSK2 阴性表达组的中位生存期为 20 个月,明显低于 BRSK2 阳性表达组的中位生存期 28 个月($\chi^2 = 50.667$,$P = 0.001$);同时,BRSK2 阴性表达的胃癌患者组无病中位生存期为 12 个月,明显低于 BRSK2 阳性表达组的无病中位生存期 19 个月($\chi^2 = 46.712$,$P < 0.001$);表明胃癌组织中 BRSK2 蛋白表达水平下降增加了患者的复发率和死亡率,这类胃癌患者具有更差的预后。见图 2。

2.4 胃癌组织 BRSK2 的表达水平结合患者不同 T 分期的生存分析 癌组织的浸润深度是胃癌分期及预后的一个重要指标,因此,本研究结合胃癌患者的 BRSK2 表达水平和癌组织不同的浸润深度(T 分期)做了进一步的分析。结果如下:T3 + T4 期患者,无病生存率组 $\chi^2 = 8.713$,$P = 0.003$,总生存率组 $\chi^2 = 4.997$,$P = 0.025$,可见 BRSK2 阴性表达组的 T3 + T4 期胃癌患者有更差的总生存率及无病生存率;T1 + T2 期患者,无病生存率组 $\chi^2 = 15.316$,$P < 0.001$,总生存率组 $\chi^2 = 23.023$,$P < 0.001$,可见 BRSK2 阴性表达组的 T1 + T2 期胃癌患者有更差的总生存率及无病生存率。总之,在不同阶段的胃癌患者中,BRSK2 阴性表达组的胃癌患者皆具有更差的总生存率及无病生存率。见图 3。

2.5 胃癌组织 BRSK2 的表达水平结合患者淋巴

结转移情况的生存分析　淋巴结转移是胃癌的不良预后因素;本实验也证明了淋巴结转移与胃癌患者总生存率和无病生存率的负相关性(χ^2 = 18.655、18.512,P < 0.001)。本研究将胃癌患者 BRSK2 的表达水平结合患者淋巴结转移情况做了进一步分析。结果表明胃癌组织中 BRSK2 阴性表达组合并淋巴结转移的胃癌患者具有更差的总生存率及无病生存率(χ^2 = 27.262、23.912,P < 0.001),见图 4。

表 1　121 例胃癌患者临床病理参数与 BRSK2 表达水平的关系(n)

参数	BRSK2 蛋白表达			Z 值	P 值
	阴性 (n = 62)	弱阳 (n = 39)	强阳 (n = 20)		
年龄(岁)					
>60	40	25	8	-1.462	0.144
≤60	22	14	12		
性别					
男	42	19	14	-0.781	0.435
女	20	20	6		
部位					
贲门	34	17	12	-0.228	0.820
胃体/胃窦	28	22	8		
癌组织分化					
高/中	18	19	12	-2.751	0.006
低	44	20	8		
直径(cm)					
≤5	36	28	12	-0.778	0.436
>5	26	11	8		
浸润深度					
T1 + T2	12	12	16	-4.276	<0.001
T3 + T4	50	27	4		
淋巴结转移					
无	16	17	14	-3.461	0.001
有	46	22	6		
手术方式					
部分切除	16	17	6	-1.146	0.252
全胃切除	46	22	14		
TNM 分期					
Ⅰ/Ⅱ	18	21	16	-4.109	<0.001
Ⅲ/Ⅳ	44	18	4		
CEA					
阴	26	20	2	-1.433	0.152
阳	36	19	18		
CA199					
阴	26	16	2	-1.955	0.051
阳	36	23	18		

2.6　胃癌患者的独立预后因素分析　单因素回归分析表明肿瘤组织中 BRSK2 阳性表达的患者有更好的总生存率和无病生存率(HR = 0.288、0.346,P < 0.001)。多因素分析表明 BRSK2 是胃癌患者总生存率(HR = 0.511,P < 0.006)和无病生存率(HR = 0.587,P < 0.037)独立的预后因素之一。其余胃癌患者预后的影响因素见表 2。

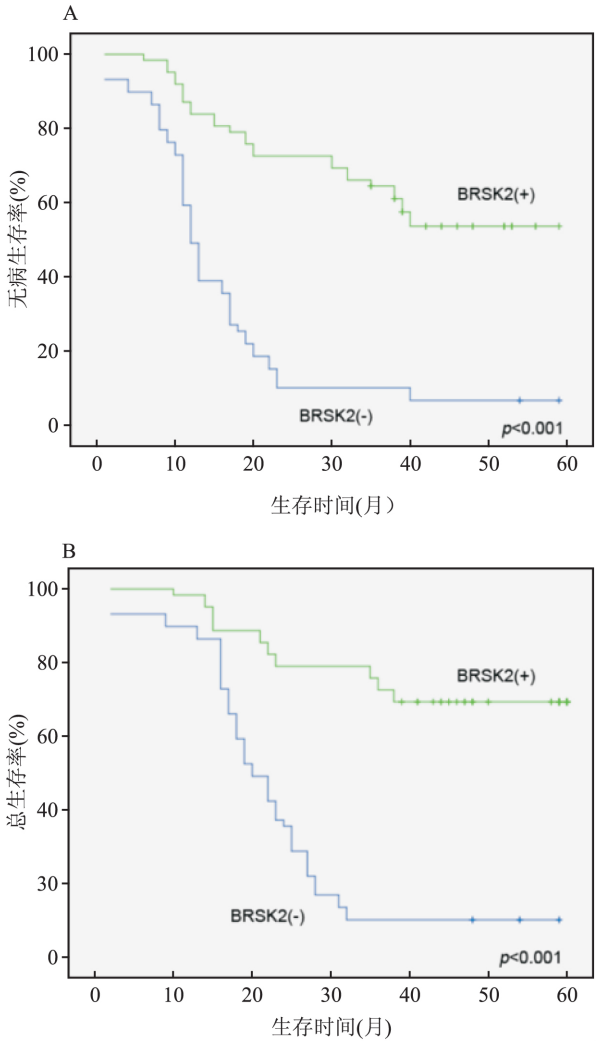

图 2　结合患者不同 BRSK2 表达水平的生存曲线分析

3　讨论

AMPK 是一个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,众多研究[7-9]已经证实其在细胞水平和个体水平参与能量平衡的调节。此外,AMPK 已被发现在抑制细胞增殖过程中起重要作用[9],越来越多证据的出现使其成为癌症治疗的潜在靶点[10-11]。而作为 AMPK 家族的众多成员之一,BRSK2 最初被发现在脑组织中表达,主要与突触囊泡的聚集及神经纤维的成熟有关[12]。后来科学家们又在 PANC-1 和 HeLa 细胞系中发现 BRSK2 的表达,由于内质网应激导致其表达水平明显减少,同时 BRSK2 也参与内质网应激诱导的细胞凋亡[13]。本实验证明了在胃癌组织中 BRSK2 的表达水平下降。作为一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,AMPK 家族的一员,BRSK2 同时也受 LKB1

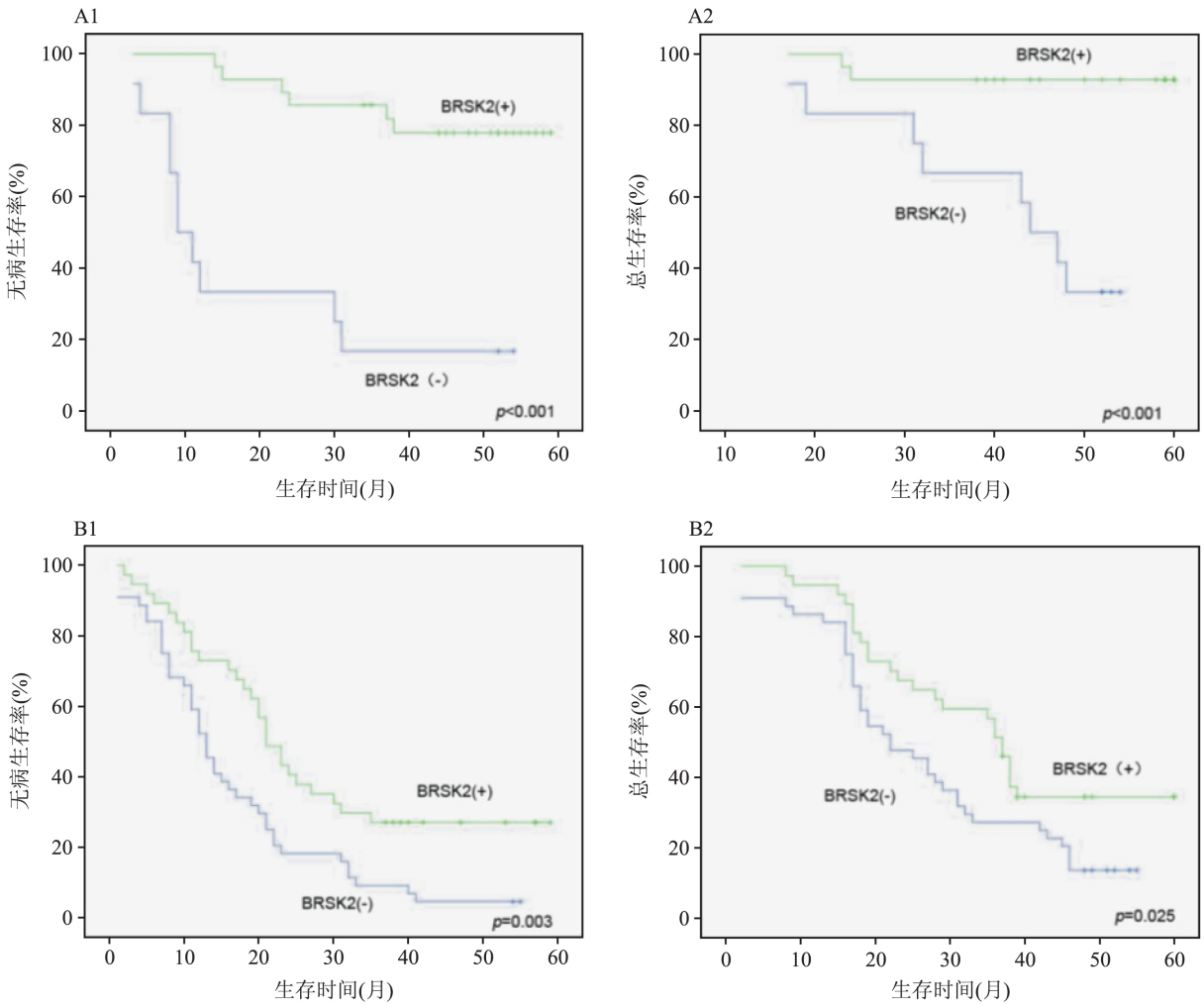

图 3 结合患者 T 分期和 BRSK2 表达水平的生存曲线分析

A:T1 + T2 期;B:T3 + T4 期;1:无病生存率;2 :总生存率

表 2 胃癌患者无病生存率和总生存率的 Cox 回归分析

因素	无病生存率			总生存率		
	HR 值	相对危险度(95% *CI*)	*P* 值	*HR* 值	相对危险度(95% *CI*)	*P* 值
单因素						
组织分化	2.239	(1.399 ~ 3.585)	0.001	2.452	(1.460 ~ 4.118)	0.001
浸润深度	1.807	(1.047 ~ 3.118)	0.034	2.947	(1.508 ~ 5.756)	0.002
淋巴结转移	2.047	(1.303 ~ 3.216)	0.002	2.067	(1.275 ~ 3.352)	0.003
TNM **分期**	5.586	(3.315 ~ 9.412)	<0.001	4.616	(2.682 ~ 7.947)	<0.001
CEA	2.088	(1.345 ~ 3.242)	0.001	2.525	(1.573 ~ 4.052)	0.001
CA199	–	–	0.081	1.640	(1.021 ~ 2.635)	0.041
BRSK2	0.288	(0.185 ~ 0.450)	0.001	0.346	(0.213 ~ 0.561)	0.001
多因素						
TNM **分期**	5.516	(3.057 ~ 9.953)	< 0.001	5.333	(2.913 ~ 9.763)	<0.001
BRSK2	0.511	(0.317 ~ 0.823)	0.006	0.587	(0.355 ~ 0.970)	0.037
年龄(岁)	1.765	(1.090 ~ 2.859)	0.021	2.203	(1.189 ~ 3.443)	0.009
CEA	1.740	(1.111 ~ 2.724)	0.016	2.938	(1.791 ~ 4.818)	<0.001

磷酸化调节,该蛋白激酶的稳定性和活性在胰腺 LKB1 有缺陷的患者中显著下调,并导致胰腺癌的发生[12]。体外研究[13]表明 BRSK2 在哺乳动物中调节细胞周期使细胞停滞在 G2/M 时相,内源性 Jab1(C-Jun 激活域结合蛋白 1)能逆转上述停滞作用,并且和 BRSK2 一起参与癌症的进程。牛耿明等[6]报道,BRSK2 的表达和胰腺癌患者的淋巴结转移、TNM 分期及患者预后密切相关。最新研究还显

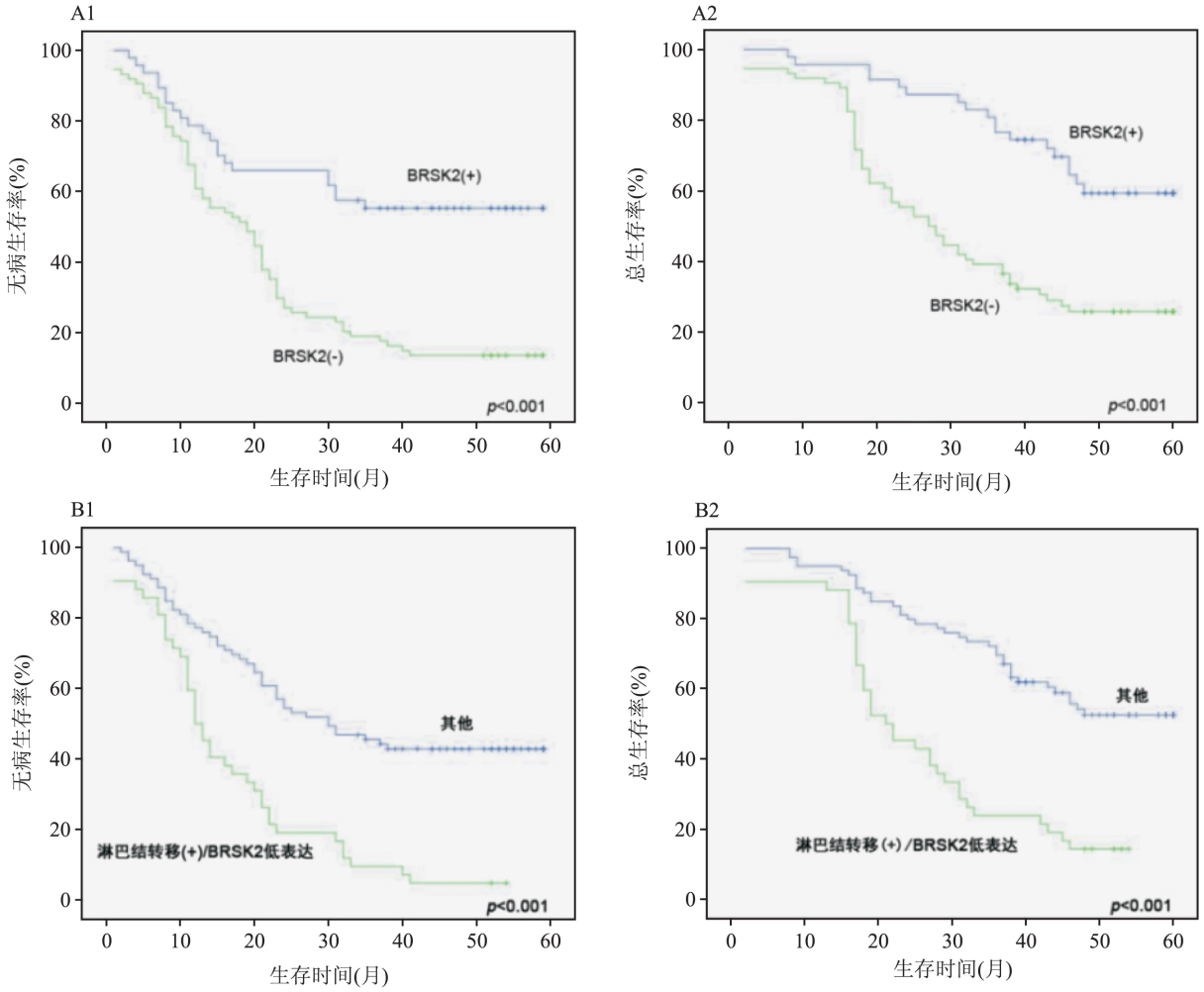

图 4 结合患者淋巴结转移情况和 BRSK2 表达水平的生存曲线分析

A:淋巴结转移;B:淋巴结转移结合 BRSK2 表达;1:无病生存率;2:总生存率

示 BRSK2 参与了转移性骨肉瘤的发生[14]。综上所述,BRSK2 与人类肿瘤的发生和发展密切相关,有可能成为人类肿瘤治疗的一个潜在靶点。

本研究通过对 121 例胃癌术后患者标本的免疫组化检测显示,BRSK2 在癌组织旁正常胃黏膜组织中的表达普遍高于其在胃癌组织中的表达;而且通过对患者的临床病理资料的分析得出,BRSK2 在胃癌组织中的表达下调与患者肿瘤浸润深度、癌组织分化程度、TNM 分期、淋巴结转移密切相关,表明 BRSK2 可能作用于肿瘤的浸润转移,可能作为胃癌患者不良预后的一个潜在的生物学标志物。

预后分子标志物有助于预测患者的治疗效果及复发情况,在临床上广泛应用。本研究显示,肿瘤组织中 BRSK2 阳性表达的患者有较高的总生存率和无病生存率,同时多变量分析表明 BRSK2 表达水平是胃癌患者独立的预后风险因子。此外,BRSK2 阴性表达的胃癌患者在不同 T 分期均有较差的预后。可见,在不同分期的胃癌患者中,BRSK2 都可作为一个潜在的预后分子生物学标志物。

淋巴结转移作为胃癌患者的不良预后因素在学界已经得到了广泛认可,因此本研究结合患者肿瘤组织的 BRSK2 表达水平和淋巴结转移情况做了进一步生存分析,结果表明,BRSK2 阴性表达和淋巴结转移阳性的患者具有更差的预后,因此,临床上 BRSK2 阴性表达和淋巴结转移阳性的患者需要制定更严密的治疗和随访方案,从而延迟或早期发现患者的病情复发及转移,提高和改善患者的预后。

综上所述,本研究首次探究了胃癌患者肿瘤组织中 BRSK2 的表达情况以及其与患者预后的关系,证明了在胃癌患者中,BRSK2 表达水平的下调和患者肿瘤的进展及不良预后密切相关。同时也证明了 BRSK2 是胃癌患者无病生存率和总生存率独立的预后因子。因此,BRSK2 可能是预测胃癌患者预后的新的临床分子标志物,或成为胃癌的临床治疗中

一个潜在的治疗靶点，为胃癌研究提供一种新的思路。然而，BRSK2 在胃癌的发生发展中的具体作用机制还不是很清楚，有待于进一步的研究。

参考文献

[1] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69 – 90.

[2] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115 – 32.

[3] Manning G, Whyte D B, Martinez R, et al. The protein kinase complement of the human genome [J]. Science, 2002, 298 (5600): 1912 – 34.

[4] Crump J G, Zhen M, Jin Y, et al. The SAD-1 kinase regulates presynaptic vesicle clustering and axon termination [J]. Neuron, 2001, 29(1): 115 – 29.

[5] Wang Y, Wan B, Li D, et al. BRSK2 is regulated by ER stress in protein level and involved in ER stress-induced apoptosis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 423(4): 813 – 8.

[6] 牛耿明，纪 元，靳大勇，等. 蛋白激酶 BRSK2 在胰腺导管腺癌中的表达及意义 [J]. 中华医学杂志，2010，90(16): 1084 – 8.

[7] Steinberg G R, Kemp B E. AMPK in health and disease [J]. Physiol Rev, 2009, 89(3):1025 – 78.

[8] Hardie D G. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8 (10): 774 – 85.

[9] Shaw R J, Kosmatka M, Bardeesy N, et al. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(10): 3329 – 35.

[10] Hardie D G, Alessi D R. LKB1 and AMPK and the cancer-metabolism link-ten years after [J]. BMC Biol, 2013, 11:36.

[11] Fogarty S, Hardie D G. Development of protein kinase activators: AMPK as a target in metabolic disorders and cancer [J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1804(3): 581 – 91.

[12] Hezel A F, Gurumurthy S, Granot Z, et al. Pancreatic LKB1 deletion leads to acinar polarity defects and cystic neoplasms [J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(7): 2414 – 25.

[13] Zhou J, Wan B, Li R, et al. Jab1 interacts with brain-specific kinase 2(BRSK2) and promotes its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 422 (4): 647 – 52.

[14] Yao P, Wang Z B, Ding Y Y, et al. Regulatory network of differentially expressed genes in metastatic osteosarcoma [J]. Mol Med Rep, 2015, 11(3): 2104 – 10.

Expression of BRSK2 in human gastric cancer and its relationship with clinicopathological parameters and prognosis

Wang Xiaoqiang, Chang Jiacong, Ye Xiaotian, et al

(*Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei* 230022)

Abstract ***Objective*** To evaluate the correlations of BRSK2 expression with clinicopathological parameters and prognosis in gastric cancer patients. ***Methods*** BRSK2 expression in 121 gastric cancer samples and 46 adjacent normal epithelial tissues from gastric cancer patients were detected by immunohistochemistry. ***Results*** BRSK2 decreased expression in 62 of 121 cases of gastric cancer (51.24%), which was significantly higher than adjacent noncancerous epithelial tissues ($\chi^2 = 55.22$, $P < 0.001$). In addition, BRSK2 decreased expression was significantly correlated with depth of invasion/T classification ($P < 0.001$), Histological differentiation ($P = 0.006$), TNM stage ($P < 0.001$), and lymph node metastasis ($P = 0.001$). Kaplan-Meier survival analysis showed that the overall survival time and disease-free survival time in patients with BRSK2-negative expression were shorter. Multivariate analysis further demonstrated that BRSK2 was an independent prognostic factor for gastric cancer patients. ***Conclusion*** The decrease of BRSK2 expression in cancer tissues of patients with gastric cancer was associated with the progression and poor prognosis of the tumor, indicating that BRSK2 could be used as a molecular marker for the prognosis of gastric cancer patients and a potential therapeutic target.

Key words gastric cancer; BRSK2; immunohistochemistry; prognosis