

· 论著 · 甲状腺乳腺 ·

雌激素受体阳性乳腺癌中扰动样激酶2的表达及其与临床病理特征、预后的关系*

陈佳菁 林 慧* 陈燕红

联勤保障部队第九一〇医院病理科(福建 泉州 362000)

【摘要】目的 探讨扰动样激酶2(TLK2)蛋白在雌激素受体(ER)阳性乳腺癌中的表达及其与临床病理特征、预后的关系。**方法** 收集2017年1月至2022年12月第九一〇医院病理确诊的134例ER阳性乳腺癌及癌旁组织标本。采用免疫组化检测TLK2蛋白的表达,并分析其与乳腺癌临床病理特征的关系。通过Kaplan-Meier Plotter数据库分析TLK2 mRNA表达与ER阳性乳腺癌患者无复发生存率的关系。**结果** TLK2蛋白在68.66%的乳腺癌组织中高表达。管腔B型、肿瘤直径>2cm、存在脉管侵犯、Ki-67增殖指数高的乳腺癌患者TLK2高表达率大于管腔A型、肿瘤直径≤2cm、脉管无侵犯、Ki-67指数低的患者,差异均有统计学意义($P<0.05$)。在ER阳性乳腺癌患者中,TLK2 mRNA高表达组无复发生存率低于TLK2低表达组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** ER阳性乳腺癌组织中TLK2的表达存在明显的异质性,与肿瘤的增殖、侵袭密切相关,其在预后判断上具有潜在的应用价值。

【关键词】 扰动样激酶2; 乳腺癌; 雌激素受体; 免疫组化; 预后

【中图分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

【基金项目】 泉州市科技计划项目(2020N053s)

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2026.1.019

Expression of TLK2 in Estrogen Receptor Positive Breast Cancer and the Relationship with Clinicopathological Characteristics and Prognosis*

CHEN Jia-jing, LIN Hui*, CHEN Yan-hong.

Department of Pathology, The 910th Hospital of Joint Logistic Support Force of PLA, Quanzhou 362000, Fujian Province, China

Abstract: Objective To investigate the expression of Tausled-like kinase (TLK2) protein in estrogen receptor (ER) positive breast cancer and its relationship with clinicopathological characteristics and prognosis. **Methods** A total of 134 ER positive breast cancer and adjacent tissue samples were collected from January 2017 to December 2022 in the 910th Hospital. The expression of TLK2 protein was detected by immunohistochemical method, and its relationship with the clinicopathological characteristics of breast cancer was analyzed. The relationship between TLK2 mRNA expression and recurrence free survival rate of ER positive breast cancer patients was analyzed by Kaplan Meier Plotter database. **Result** TLK2 protein was highly expressed in 68.66% of breast cancer tissues. The high expression rate of TLK2 in breast cancer patients with luminal B, tumor diameter >2cm, vascular invasion, and high Ki-67 proliferation index was higher than that in patients with luminal A, tumor diameter ≤2cm, no vascular invasion, and low Ki-67 index ($P<0.05$). In ER positive breast cancer patients, the recurrence free survival rate of TLK2 mRNA high expression group was lower than that of TLK2 low expression group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of TLK2 in ER positive breast cancer tissue has obvious heterogeneity, which is closely related to tumor proliferation and invasion, and has potential application value in prognosis judgment.

Keywords: Tausled-like Kinase 2; Breast Cancer; Estrogen Receptor; Immunohistochemistry; Prognosis

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,在临床表现、组织病理学和分子特征上具有明显的异质性。约60~70%的乳腺癌雌激素受体(estrogen receptor, ER)阳性,通过内分泌疗法能够有效消除雌激素的促癌作用,但仍有高达40%的晚期诊断患者在20年内复发,并且不同患者之间的临床结果差异很大^[1-3]。扰动样激酶2(tausled-like kinase, TLK2)最先在拟南芥中被鉴定出来,作为一种核丝氨酸/苏氨酸激酶,参与调节细胞周期S期的染色质组装以及DNA双链断裂修复等过程,在胃癌、胶质母细胞瘤中过表达可诱导瘤细胞生长、迁移、侵袭及上皮间充质转化,与患者预后不良有关^[4-5]。癌症基因组图谱(The cancer genome atlas, TCGA)的拷贝数资料显示约9%的乳腺癌中存在TLK2基因扩增,在ER阳性的乳腺癌中更为多见^[6]。本研究拟通过检测TLK2在ER阳性乳腺癌中的表达,探讨其与

临床病理特征、预后的关系,以期对其参与乳腺癌发生发展的功能机制有进一步认识。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2017年1月至2022年12月行根治性切除的134例乳腺癌患者作为研究对象,所有患者均为女性,年龄27~91岁,中位年龄47岁。

纳入标准: 临床病理资料完整;组织病理确诊为浸润性癌,非特殊型;经免疫组化检测明确ER、孕激素受体、人表皮生长因子受体-2、Ki-67的表达情况,其中ER表达阳性。排除标准:复发患者;术前行新辅助治疗。本研究经医院伦理委员会批准,患者或家属知情同意并签署知情同意书。

1.2 方法

【第一作者】 陈佳菁,女,主治医师,主要研究方向:乳腺肿瘤病理诊断与研究。E-mail: 172639572@qq.com

【通讯作者】 林 慧,男,副主任医师,主要研究方向:乳腺肿瘤病理诊断与研究。E-mail: lenchoolin@163.com

1.2.1 免疫组织化学染色 乳腺癌及癌旁组织标本经福尔马林充分固定，取材脱水后石蜡包埋。以4μm厚切片，脱蜡后PBS缓冲液冲洗，配置EDTA抗原修复液(1:50)，高温高压修复。兔抗人TLK2单克隆抗体(克隆号E-12，购自美国圣克鲁斯生物技术公司)以1:200稀释，加样后4℃冰箱孵育过夜。染色过程按照EliVision plus法试剂盒(购自福州迈新公司)说明书进行操作。

1.2.2 结果判读 TLK2蛋白阳性染色定位于细胞核，随机观察5个高倍视野，进行阳性率和染色强度评分，阳性率≤5%为0分、6%~25%为1分、26%~50%为2分、51%~75%为3分、>75%为4分；不着色0分、浅黄色1分、棕黄色2分。两项相乘后0分为阴性、1~3分低表达、4~8分高表达。

1.2.3 生存分析 通过Kaplan-Meier Plotter数据库(<https://kmplot.com/analysis/>)进行在线生存分析，选择乳腺癌基因芯片数据，分析TLK2 mRNA表达与ER阳性乳腺癌患者无复发生存的关系。

1.3 统计学方法 采用SPSS 26.0软件进行分析，组间比较采用卡方检验。以P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌及癌旁组织中TLK2的表达情况比较 对134例ER阳性乳腺癌及癌旁组织进行TLK2免疫组化检测，染色结果显示TLK2染色定位于细胞核，在乳腺癌中的表达阳性率为96.27%(129/134)，其中68.66%(92/134)呈高表达，在癌旁乳腺组织中仅9.70%(13/134)呈高表达，差异有统计学意义(P<0.05)，见表1。同时还观察到TLK2在部分原位癌成分中呈高表达，在间质纤维母细胞和淋巴细胞散在低表达，见图1。

2.2 TLK2表达与ER阳性乳腺癌患者临床病理特征的关系 按年龄、部位、分子亚型、组织学级别、直径、Ki-67增殖指数以及脉管是否侵犯进行分组，结果显示TLK2的表达水平与分子亚型、肿瘤直径、脉管侵犯以及Ki67增殖指数密切相关，在腔面B型、直径>2cm、发生脉管侵犯、Ki-67高增殖指数的乳腺癌中的表达高于其他组，差异具有统计学意义(P<0.05)，见表2。比较不同年龄、部位、组织学级别乳腺癌TLK2的表达，差异无统计学意义(P>0.05)。

2.3 TLK2表达与ER阳性乳腺癌患者预后的关系 生存分析显示，TLK2 mRNA高表达组乳腺癌患者的无复发生存率显著低于低表达组，(P<0.01)，见图2。

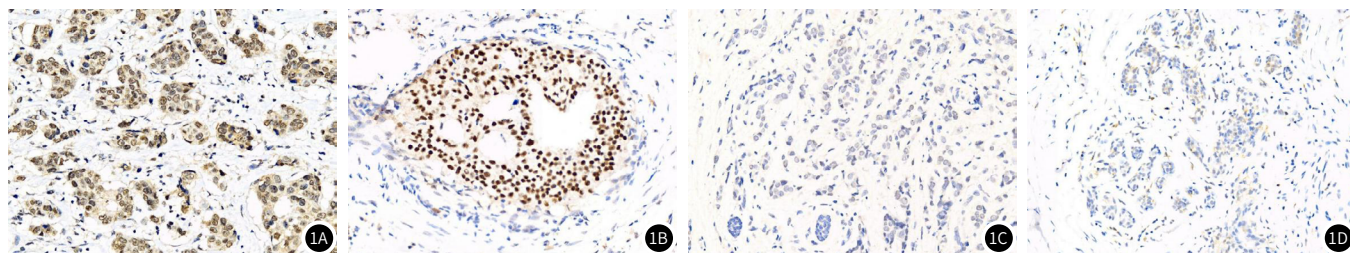


图1A~图1D TLK2在乳腺癌及癌旁组织中免疫组化表达。图1A: 为TLK2在乳腺癌组织中高表达(免疫组化, ×200); 图1B: 为TLK2在原位癌组织中高表达(免疫组化, ×200); 图1C: 为TLK2在乳腺癌组织中低表达(免疫组化, ×200); 图1D: 为TLK2在癌旁组织和间质纤维母细胞、淋巴细胞散在低表达(免疫组化, ×200)。

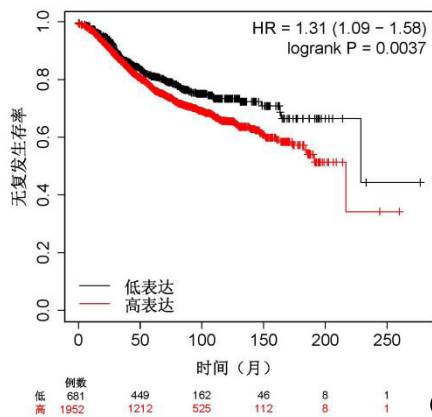


表2 TLK2表达与乳腺癌患者临床病理特征的关系[例(%)]

临床病理特征	TLK2表达		χ ² 值	P值	
	阴性或低表达	高表达			
年龄	≤50岁(n=85)	25(29.41)	60(70.59)	0.403	0.526
	>50岁(n=49)	17(34.69)	32(65.31)		
肿瘤部位	左侧(n=63)	21(33.33)	42(66.67)	0.219	0.640
	右侧(n=71)	21(29.58)	50(70.42)		
分子亚型	管腔A型(n=54)	23(42.59)	31(57.41)	5.319	0.021
	管腔B型(n=80)	19(23.75)	61(76.25)		
组织学级别	1、2级(n=78)	24(30.77)	54(69.23)	0.029	0.866
	3级(n=56)	18(32.14)	38(67.86)		
肿瘤直径	≤2cm(n=59)	25(42.37)	34(57.63)	5.959	0.015
	>2cm(n=75)	17(22.67)	58(77.33)		
脉管侵犯	无(n=47)	20(42.55)	27(57.45)	4.227	0.040
	有(n=87)	22(25.29)	65(74.71)		
Ki-67指数	≤20%(n=76)	31(40.79)	45(59.21)	7.281	0.007
	>20%(n=58)	11(18.97)	47(81.03)		

表1 乳腺癌及癌旁组织中TLK2蛋白的表达比较[例(%)]

组别	阴性	低表达	高表达	χ ² 值	P值
乳腺癌(n=134)	5(3.73)	37(27.61)	92(68.66)	98.572	<0.001
癌旁组织(n=134)	23(17.16)	98(73.13)	13(9.70)		

3 讨论

人类TLK家族有2个成员, TLK1位于2q31.1, TLK2位于17q23.2, 编码序列存在84%的一致性, 激酶结构域的相似性可达96%^[7]。TLK激酶活性在细胞分裂周期中波动, 在S期达到峰值, 主要通过磷酸化组蛋白H3/H4的分子伴侣抗沉默因子1, 从而促进DNA复制偶联的核小体组装, 与DNA复制、转录、损伤修复、染色体组装和分离等细胞学过程密切相关^[8]。两者在哺乳动物胚胎发育和维持基因组稳定性中发挥冗余作用, 但TLK2蛋白在胎盘发育过程中具有特殊作用^[9]。TLK1可在口腔鳞癌、前列腺癌等多种恶性肿瘤的进展中发挥重要作用^[10-11], 但TLK2与癌症相关的报道则较为有限。有研究发现与乳腺MCF-10A上皮细胞相比, 乳腺癌MCF-7和HCC70细胞中的TLK2在mRNA和蛋白水平均显著上调, 并可促进HCC70细胞的增殖、迁移和侵袭^[12]。

本研究证实TLK2在ER阳性乳腺癌中上调表达, 与肿瘤直径、Ki67增殖指数以及脉管侵犯密切相关, 也提示TLK2可增强乳腺癌细胞的增殖和侵袭能力。基于蛋白质基因组学的研究显示, TLK2蛋白在乳腺癌中存在过度磷酸化, 表明其激酶活性在肿瘤进展过程也有所增强^[13]。将MCF7细胞中的TLK2基因敲除后则会显著降低内源性抗沉默因子1的磷酸化, 并抑制癌细胞的生长^[8]。体外实验表明激酶抑制剂可通过阻断TLK2磷酸化抑制胃癌细胞的增殖、侵袭和迁移, 吩噻嗪类抗精神病药物在高表达TLK2的细胞中具有显著的抗增殖作用, 提示其可能作为癌症的潜在治疗靶点^[5, 14]。此外, 我们还观察到TLK2可在乳腺原位癌组织中过表达, 说明TLK2可能在早期阶段就已经参与乳腺癌的发生发展, 但目前并不清楚其在各阶段的作用是否存在差别。

基因扩增导致过表达是乳腺癌中较为常见的分子改变, 与肿瘤进展密切相关, TLK2所在的染色体17q23正是其中的热点区域^[15]。在本组病例中, 管腔B型乳腺癌TLK2蛋白的表达水平显著高于管腔A型, B型乳腺癌的特征是增殖指数更高、更具侵袭性, 提示TLK2的功能与细胞增殖和侵袭相关, 同时也说明ER阳性乳腺癌也存在高度的异质性。基于TCGA的研究发现在所有乳腺癌亚型中, 以管腔B型的TLK2扩增最为常见(21.3%), TLK2 mRNA表达水平与肿瘤发展阶段相关^[6]。本研究免疫组化结果显示TLK2在68.66%的乳腺癌样本中高表达, 明显高于TCGA数据库中TLK2基因的扩增率, 提示其表达受到多种机制调控。有文献报道miR-622在乳腺癌细胞中可直接结合TLK2基因发挥负性调控作用^[12]。Correia等发现昼夜节律E3连接酶复合体参与TLK2的翻译后调控并调节其稳定性^[16]。

染色体碎裂和重排在ER阳性乳腺癌中多见, 可导致染色体17q多个易感区域的基因共同上调表达, 并通过细胞周期调控参与肿瘤进展过程^[14]。TLK2是DNA损伤修复的重要调节因子, 过度表达可通过抑制细胞周期检查点激酶的磷酸化导致G2/M检查点缺陷, 细胞周期在DNA损伤未修复时提前进入有丝分裂, 引起染色体畸变的累积和基因组不稳定, 但目前具体机制仍不清楚^[17-18]。生存分析结果显示TLK2 mRNA高表达组患者的无复发生存率较低, 因此在管腔型乳腺癌中TLK2表达上调提示患者可能预后不良。

综上所述, 本研究发现TLK2在ER阳性乳腺癌组织中的表达存在明显的异质性, 与肿瘤细胞增殖、侵袭密切相关, 并对其在肿瘤发生发展过程中的作用进行了初步探讨, 为下一步的功能机制研究提供思路。

参考文献

- [1] Beumers L, Vlachavas EI, Borgoni S, et al. Clonal heterogeneity in ER+breast cancer reveals the proteasome and PKC as potential therapeutic targets [J]. *NPJ Breast Cancer*, 2023, 9(1): 97-111.
- [2] 汤子建, 谢朝邦, 张体江. 体系内不相干运动定量参数评估浸润性乳腺癌 Luminal分型研究 [J]. *中国CT和MRI杂志*, 2024, 22(7): 102-104.
- [3] 钟世燕, 雷益, 余娟, 等. 磁共振成像在乳腺癌分子分型中的研究进展 [J]. *中国CT和MRI杂志*, 2022, 20(3): 186-188.
- [4] Lin M, Yao Z, Zhao N, et al. TLK2 enhances aggressive phenotypes of glioblastoma cells through the activation of SRC signaling pathway [J]. *Cancer Biol Ther*, 2019, 20(1): 101-108.
- [5] Wang M, Li J, Yang X, et al. Targeting TLK2 inhibits the progression of gastric cancer by reprogramming amino acid metabolism through the MTOR/ASNS axis [J]. *Cancer Gene Ther*, 2023, 30(11): 1485-1497.
- [6] Kim JA, Tan Y, Wang X, et al. Comprehensive functional analysis of the tousled-like kinase 2 frequently amplified in aggressive luminal breast cancers [J]. *Nat Commun*, 2016, 7(1): 12991-13007.
- [7] Segura-Bayona S, Stracker TH. The tousled-like kinases regulate genome and epigenome stability: Implications in development and disease [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(19): 3827-3841.
- [8] Simon B, Lou HJ, Huet-Calderwood C, et al. Tousled-like kinase 2 targets asf1 histone chaperones through client mimicry [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 749-764.
- [9] Segura-Bayona S, Knobel PA, Gonzalez-Buron H, et al. Differential requirements for tousled-like kinases 1 and 2 in mammalian development [J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24(11): 1872-1885.
- [10] Khalil MI, Singh V, King J, et al. TLK1-mediated mk5-s354 phosphorylation drives prostate cancer cell motility and may signify distinct pathologies [J]. *Mol Oncol*, 2022, 16(13): 2537-2557.
- [11] Hu S, Wang H, Yan D, et al. Loss of miR-16 contributes to tumor progression by activation of tousled-like kinase 1 in oral squamous cell carcinoma [J]. *Cell Cycle*, 2018, 17(18): 2284-2295.
- [12] 熊玉圆, 陈德杰, 孟琳, 等. TLK2促进人乳腺癌细胞系增殖、迁移和侵袭 [J]. *基础医学与临床*, 2021, 41(8): 1156-1162.
- [13] Mertins P, Mani DR, Ruggles KV, et al. Proteogenomics connects somatic mutations to signalling in breast cancer [J]. *Nature*, 2016, 534(7605): 55-62.
- [14] Lin CL, Tan X, Chen M, et al. Eralpha-related chromothripsis enhances concordant gene transcription on chromosome 17q11.1-q24.1 in luminal breast cancer [J]. *BMC Med Genomics*, 2020, 13(1): 69-86.
- [15] Mortuza GB, Hermida D, Pedersen AK, et al. Molecular basis of tousled-like kinase 2 activation [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2535-2552.
- [16] Correia SP, Chan AB, Vaughan M, et al. The circadian E3 ligase complex scf (fbx13+cry) targets TLK2 [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 198-206.
- [17] Bruinsma W, Van Den Berg J, Aprelia M, et al. Tousled-like kinase 2 regulates recovery from a DNA damage-induced G2 arrest [J]. *EMBO Rep*, 2016, 17(5): 659-670.
- [18] Kim JA, Anurag M, Veeraghavan J, et al. Amplification of TLK2 induces genomic instability via impairing the G2-M checkpoint [J]. *Mol Cancer Res*, 2016, 14(10): 920-927.

(收稿日期: 2024-10-04)

(校对编辑: 姚丽娜)