

# 血清胸苷激酶1在乳腺肿瘤中的表达及其临床意义

任若冰 许颀 李亚芬 金冶宁 何建蓉

上海交通大学医学院附属瑞金医院乳腺疾病诊治中心, 上海 200025

**[摘要]** **背景与目的:** 胸苷激酶1(thymidine kinase 1, TK1)在细胞分裂期的细胞质中表达, 是将脱氧胸苷转换为胸苷酸的催化酶, 是嘧啶补救途径的关键酶。本研究探讨TK1在乳腺肿瘤患者血清中的表达及其临床意义。**方法:** 收集上海交通大学医学院附属瑞金医院乳腺疾病诊治中心145例乳腺癌患者(乳腺癌组), 55例乳腺纤维腺瘤患者(乳腺纤维腺瘤组), 采用化学发光斑点杂交法检测两组患者的血清TK1水平, 并分析血清TK1水平与各个临床病理特征的关系。**结果:** 乳腺癌组血清TK1水平为(2.749±0.122)pmol/L, 乳腺纤维腺瘤组为(1.319±0.126)pmol/L, 差异有统计学意义( $P<0.0001$ )。在乳腺癌患者中, 淋巴结晚期( $P=0.049$ )、有远处转移( $P=0.0031$ )、TNM分期晚期( $P=0.01$ )的血清TK1水平明显升高。乳腺超声( $P<0.001$ ), 乳腺磁共振( $P=0.005$ ), 乳腺钼靶( $P=0.032$ )BI-RADS分类为恶性(4C-6)的患者的TK1水平高于良性(0-4B)患者。雌激素受体高表达的乳腺癌患者的TK1水平高于低表达的患者( $P=0.034$ )。在不同的年龄、分化程度、肿块大小及其他激素受体情况差异无统计学意义( $P>0.05$ )。随访2年后未发现TK1水平与无进展生存期的相关性, 差异无统计学意义( $P=0.7061$ )。**结论:** 血清TK1在乳腺癌的早期诊断, 预测预后具有重要价值, 并可能成为新的分子靶向治疗的基础。

**[关键词]** 血清TK1; 乳腺肿瘤; 发光印迹法; 肿瘤标志物; 诊断

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2014.01.007

中图分类号: R737.9 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2014)01-0041-05

**Expression of serum TK1 in human breast tumor and its clinical significance** REN Ruo-bing, XU Cheng, LI Ya-fen, JIN Ye-ning, HE Jian-rong (Comprehensive Breast Health Center, Rui Jin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Correspondence to: HE Jian-rong E-mail: hejrong@hotmail.com

**[Abstract]** **Background and purpose:** The position of thymidine kinase 1 (TK1) expression during cell division is in the cytoplasm. It is a catalytic enzyme to convert deoxythymidine into thymidylate. It is the key enzyme of pyrimidine salvage pathway. The aim of this study was to analyze the serum expression level of TK1 in patients with breast cancer, and explore the application of serum TK1 test in clinical assessments of diagnosis, treatment and prognosis for breast cancer. **Methods:** Patient data were collected from the patients admitted in Comprehensive Breast Health Center at Rui Jin Hospital. Chemiluminescence dot blot assay was used to detect serum TK1 levels in 145 breast cancer patients and 55 patients with breast fibroadenoma. The correlations of serum TK1 levels with breast tumor biological behavior was further studied. **Results:** Serum TK1 expression levels was significantly increased in breast cancer patients [(2.749±0.122)pmol/L] when compared to breast fibroadenoma patients[(1.319±0.126)pmol/L,  $P<0.0001$ ]. Serum TK1 levels were statistically increased in patients with lymph node metastasis ( $P=0.049$ ), distal metastasis ( $P=0.0031$ ), and late TNM stages ( $P=0.01$ ). No serum TK1 level differences were found in patients with different ages ( $P>0.05$ ), different tumor grades ( $P=0.453$ ) and different tumor size ( $P=0.908$ ). Preoperative imaging results including breast ultrasound, breast mammography and breast magnetic resonance were analyzed by assessments of BI-RADS category, and serum TK1 levels in patients with different BI-RADS categories were studied. Serum TK1 levels in patients with breast ultrasound BI-RADS categories 4C-6 were significantly higher than those with category 0-4B ( $P<0.001$ ). Consistently, the serum TK1 levels in patients with MR BI-RADS categories 4C-6 were higher than

categories 0-4B ( $P=0.005$ ). The serum TK1 levels in patients with mammography BI-RADS categories 4C-6 were higher than categories 0-4B ( $P=0.032$ ). The serum TK1 levels were significantly increased in patients with ER high expression in breast tumor tissues than those with low expression ( $P=0.034$ ). Serum TK1 levels had no differences in patients with different expression levels of PR, HER-2 and MIB-1 ( $P>0.05$ ). Most patients were followed up in our outpatient department for about 2 years. No progression-free survival differences were found in 2years. **Conclusion:** Serum TK1 test might be a potential tool for screening, prognosis determination and effect evaluations of targeted therapy in breast carcinoma.

[Key words] Serum TK1; Breast carcinoma; Chemiluminescence dot blot assay; Tumor marker; Diagnosis

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>。我国女性乳腺癌发病率逐年上升, 已居女性恶性肿瘤的第2位。发病年龄也有提早的趋势, 若能在患者尚处于亚临床转移状态时及时、有效地给予正确治疗, 可以提高治愈率, 获得长期生存。对于早期乳腺癌或者亚临床病灶患者的早期诊断、早期监测极为重要。目前乳腺癌的早期诊断主要依靠临床医生的体格检查, 乳腺影像学检查: 乳腺超声、乳腺钼靶摄片、乳腺磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)以及其他的乳腺成像技术。缺乏早期诊断的特异性检测标志物。胸苷激酶1(thymidine kinase 1, TK1)与细胞的增殖有关, 在DNA的合成中将脱氧胸苷转换为胸苷酸, 是嘧啶补救途径的关键酶。本研究应用TK1抗体来检测乳腺肿瘤患者的其水平<sup>[2]</sup>, 并分析其与乳腺肿瘤的生物行为关系。从而探讨血清TK1在乳腺癌诊断、治疗和预后等方面的应用价值。

## 1 资料和方法

### 1.1 研究对象

收集2010年9月—2011年6月, 上海交通大学医学院附属瑞金医院乳腺疾病诊治中心21~79岁女性乳腺疾病200例, 其中乳腺癌145例(乳腺癌组), 乳腺纤维腺瘤55例(乳腺纤维腺瘤组)。患者平均年龄54岁, 中位年龄55岁。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 主要实验试剂

TK1诊断试剂盒、CSI-1型化学发光数字成像分析仪购自华瑞同康生物技术(深圳)有限公司。诊断试剂盒内含24孔硝酸纤维素膜、校准品、抗TK1-IgY、生物素化抗IgY二抗、SA-

HRP、ECL1、ECL2、稀释液、洗涤液、封闭液。数字显示水浴箱为上海跃进医疗器械厂产品。离心机为德国Eppendorf公司产品。电热恒温鼓风干燥箱购自上海华连医疗器械有限公司。STS-2型脱色摇床为上海琪特分析仪器有限公司产品。振荡混合器购自江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司。

#### 1.2.2 TK1测定步骤

所有患者于手术前, 抽取全血3 mL, 1 000×g离心10 min后, 取血清备用。TK1测定在本院检验科实验室进行。准备稀释液, 洗涤液, 封闭液备用, 将含有硝酸纤维素膜的模板平置于滤纸上, 将校准品按顺序, 点样到A1、A2、A3的位置, 每孔加样3μL。待测样本血清按照顺序每孔3 μL点样在膜上后面的位置。在室温下自然晾干30 min至膜干透。把膜放入反应盒内, 用配置好的洗涤液振摇洗膜2次, 每次1 min。弃去洗涤液, 加入封闭液, 在室温下振摇封闭30 min。弃去封闭液后, 加入TK1-IgY, 在室温下振摇反应120 min。弃去反应液, 用洗涤液快速漂洗2遍, 再振摇洗涤3次, 每次5 min。加入生物素化抗IgY二抗, 室温下振摇反应40 min。弃去反应液, 用洗涤液快速漂洗2遍, 再振摇洗涤3次, 每次5 min。加入SA-HRP, 室温下振摇反应60 min。弃去反应液, 用洗涤液快速漂洗2遍, 再振摇洗涤3次, 每次5 min。加入ECL1和ECL2等量混合的试剂、过膜、浸湿、精确反应60 s后将膜片用吸水纸吸干, 继续计时5 min, 同时将膜片放入压膜透明胶片内, 挤干剩余液体。将膜片放入CSI-1型化学发光数字成像分析仪, 5 min计时结束后进行拍摄和分析。

### 1.3 参考值

依据以往的大样本的临床试验研究数据确立血清TK1的参考值：血清TK1水平0~2.0 pmol/L为正常，>2.0 pmol/L为异常<sup>[3]</sup>。

### 1.4 统计学处理

所有的数据资料用SPSS 19.0软件包处理。数据用平均值加标准误表示。2组的平均值的比较采用非配对 $t$ 检验，3组及3组以上平均值的比较采用单因素方差分析，分析两组数据之间的相关性采用非线性曲线相关系数。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血清TK1水平在两组间的比较

在乳腺癌组患者的血清中，TK1水平为

(2.749±0.122)pmol/L，而在乳腺纤维腺瘤组中则为(1.319±0.126)pmol/L，差异有统计学意义( $P<0.001$ )。

### 2.2 乳腺癌组血清TK1水平与临床病理指标的关系

在乳腺癌组患者中，淋巴结分期晚期的患者血清TK1水平较分期早期患者高，差异有统计学意义( $P=0.049$ )。有远处转移的患者血清TK1水平明显高于没有远处转移的患者，差异有统计学意义( $P=0.003$ )。TNM分期为早期的乳腺癌患者血清TK1水平高于TNM分期晚期的患者，差异有统计学意义( $P=0.01$ )。在不同的年龄、原发肿块的分化程度，原发肿块大小中，血清TK1水平差异无统计学意义( $P>0.05$ ，表1)。

表1 不同临床病理特征的乳腺癌患者血清TK1水平比较

Tab. 1 comparison of serum TK1 among different clinical and pathological status in cancer group

Clinical characteristic	<i>n</i>	TK1( $\bar{x}\pm s$ )/pmol·L <sup>-1</sup>	<i>P</i> value
Grade			
I - II	68	2.772±0.152	0.709
III	40	2.869±0.209	
Tumor size/cm			
<5	134	2.757±1.497	0.908
≥5	7	2.824±1.139	
Lymph nodes			
N <sub>0-1</sub>	61	2.547±1.312	0.049
N <sub>2-3</sub>	22	3.516±1.404	
Metastasis			
M <sub>0</sub>	141	2.706±0.122	0.0031
M <sub>1</sub>	3	4.990±0.229	
TNM stage			
T <sub>1-2</sub>	115	2.540±1.420	0.01
T <sub>3-4</sub>	30	3.548±1.366	

### 2.3 乳腺癌组血清TK1水平与组织病理指标的关系

乳腺癌组雌激素受体(estrogen receptor, ER)高表达的患者血清TK1水平高于低表达患者，差异有统计学意义( $P=0.034$ )。不同的孕激素受体(progesterone receptor, PR)、原癌基因人类表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor-2, HER-2)、细胞周期蛋白抗体(molecular immunology borstel number 1 antibody, MIB-1)表达情况下，血清TK1水平差异无统计学意义( $P=0.237$ ， $P=0.150$ ，

$P=0.110$ )。

### 2.4 乳腺癌组血清TK1水平与血清肿瘤指标CEA、CA153的关系

乳腺肿瘤患者的血清TK1水平与肿瘤指标癌胚抗原(carcino-embryonic antigen, CEA)、糖类抗原153(carbohydrate antigen, CA153)均无相关性( $TK1=2.502-0.1434\times CEA$ ， $R^2=0.4323$ ， $TK1=3.172-0.0158\times CA153$ ， $R^2=0.0025$ )。

### 2.5 乳腺肿瘤组血清TK1水平与影像学结果的关系

根据乳腺影像报告和数据库系统(Breast

Imaging Report And Data System, BI-RADS)分类为4C以上的乳腺肿块诊断为恶性可能性大。乳腺超声诊断为恶性的患者, TK1水平高于良性患者, 差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。乳腺钼靶诊断为恶性的患者, TK1水平高于良性的患者, 差异具有统计学意义( $P = 0.032$ )。乳腺磁共振诊断恶性的患者, TK1水平高于良性患者, 差异有统计学意义( $P = 0.005$ , 表2)。

表 2 不同影像学BI-RADS分期的乳腺癌患者血清TK1水平比较

Tab. 2 comparison of serum TK1 among different imaging modalities BI-RADS type in cancer group

BI-RADS	<i>n</i>	TK1( $\bar{x} \pm s$ )/pmol·L <sup>-1</sup>	<i>P</i> value
Breast ultrasound			
0-4B	58	1.557±1.041	0.001
4B-6	118	2.724±1.335	
Mammography			
0-4B	46	1.940±1.301	0.032
4C-6	48	2.455±0.973	
Breast MRI			
0-4B	27	1.788±1.340	0.005
4B-4C	121	2.622±1.375	

### 3 讨 论

乳腺癌的发生发展是个非常复杂的生物学过程, 细胞增殖调节和细胞周期功能障碍是其发病过程中的重要因素。本研究发现, TK1在乳腺癌患者血清中的表达明显高于良性病变, 而且乳腺癌的淋巴结分期、TNM分期越晚, 有远处转移, 血清TK1水平越高, 与最近的一些研究结果类似<sup>[4-5]</sup>。说明血清TK1能够反映肿瘤的侵犯、浸润和转移等恶性行为。这可能与恶性病变肿瘤负荷增加有关。TK1在细胞分裂早期开始升高, 细胞分裂完成后TK1即在细胞内被降解, 所以在正常的细胞分裂后, 其不会进入体液中<sup>[6-7]</sup>。而在恶性肿瘤中, 细胞的异常增殖增多, 反馈抑制机制失调, 大量TK1释放入血, 导致血清TK1水平异常升高。细胞的增殖越活跃, 血清TK1水平越高。这可能是血清TK1能够反映乳腺癌的恶性行为的机制。

由于缺乏可靠的血清学检测手段, 目前主要依靠乳腺影像学技术来分辨乳腺肿块的良恶

### 2.6 乳腺癌患者血清TK1水平与无进展生存期的关系(progression free survival, PFS)

至2年随访截止日, 200例患者均存活, 乳腺癌组3例患者出现了疾病进展, 血清TK1水平均高于正常。血清TK1水平正常患者的PFS为(22.42±0.49)个月, 血清TK1水平升高患者的PFS为(22.09±0.30)个月, 差异无统计学意义( $P = 0.564$ )。相关性分析显示, 乳腺癌患者的血清TK1水平与PFS差异无统计学意义( $P = 0.7061$ )。

性<sup>[8-10]</sup>。本研究结果显示, 血清TK1与现有的乳腺影像学检查技术, 包括乳腺超声、乳腺钼靶摄片、乳腺磁共振的诊断结果基本一致, 也可以作为早期诊断乳腺癌的检测指标, 并具有可预测乳腺癌的局部浸润、淋巴结转移及远处转移的优势。能够在乳腺癌发病初期对患者的疾病进展风险作出评估, 使高风险的患者在手术后接受进一步的辅助治疗而获益。因此, TK1在乳腺肿块术前诊断及风险预测方面具有重要的价值。

已有研究数据表明, 血清TK1可预测非小细胞肺癌<sup>[11-12]</sup>、肾细胞癌<sup>[13]</sup>、淋巴瘤<sup>[14]</sup>和黑色素瘤<sup>[15]</sup>的预后。本研究对收集的200例乳腺疾病患者进行2年的随访, 乳腺癌组3例患者出现了疾病进展, 血清TK1均高于正常。虽然血清TK1与PFS差异无统计学意义, 但其与肿瘤的淋巴结侵犯、远处转移、TNM分期均明显相关, 差异有统计学意义。因此, 血清TK1水平仍可预测患者的预后。由于乳腺癌术后患者的生存期较长, 目前的观察结果尚未达到终点。如进一步延长随访时间, 仍有可能发

现血清TK1水平与生存期有关。有待后续随访结果。

目前针对TK1的小干扰RNA已在研究中<sup>[16]</sup>。降低或阻断TK1的表达能干扰DNA的合成,抑制肿瘤细胞异常增殖,从而减少恶性肿瘤的局部侵犯和远处转移。由于TK1的细胞周期调节作用,干扰TK1的表达,能使部分作用于特异细胞周期的化疗药物疗效增强。因此,抑制TK1表达的小分子物质可能成为有效治疗肿瘤的新一代靶向药物,这为乳腺癌的治疗提供了新思路。

#### [参 考 文 献]

- [1] COUGHLIN S S, EKWUEME D U. Breast cancer as a global health concern [J]. *Cancer Epidemiol*, 2009, 33(5): 315-318.
- [2] WU C, YANG R, ZHOU J, et al. Production and characterisation of a novel chicken IgY antibody raised against C-terminal peptide from human thymidine kinase 1 [J]. *J Immunol Methods*, 2003, 277(1-2): 157-169.
- [3] CHEN Z H, HUANG S Q, WANG Y, et al. Serological thymidine kinase 1 is a biomarker for early detection of tumours—a health screening study on 35,365 people, using a sensitive chemiluminescent dot blot assay [J]. *Sensors (Basel)*, 2011, 11(12): 11064-11080.
- [4] HUANG S, LIN J, GUO N, et al. Elevated serum thymidine kinase 1 predicts risk of pre/early cancerous progression [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2011, 12(2): 497-505.
- [5] NISMAN B, ALLWEIS T, KADURI L, et al. Serum thymidine kinase 1 activity in breast cancer [J]. *Cancer Biomark*, 2010, 7(2): 65-72.
- [6] HANAN S, JAGARLAMUDI K K, LIYA W, et al. Quaternary structures of recombinant, cellular, and serum forms of thymidine kinase 1 from dogs and humans [J]. *BMC Biochem*, 2012, 28(13): 12.
- [7] WELIN M, KOSINSKA U, MIKKELSEN N E, et al. Structures of thymidine kinase 1 of human and mycoplasmic Origin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101 (52): 17970-17975.
- [8] LEUNG J W. Screening mammography reduces morbidity of breast cancer treatment [J]. *AJR*, 2005, 184: 1508-1509.
- [9] HUMPHREY L L, HELFAND M, CHAN B K, et al. Breast cancer screening: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force [J]. *Ann Intern Med*, 2002, 137: 347-360.
- [10] LEE C H. Screening mammography: proven benefit, continued controversy [J]. *Radiol Clin North Am*, 2002, 40: 395-407.
- [11] HOLDENRIEDER S, VON P J, DUELL T, et al. Clinical relevance of thymidine kinase for the diagnosis, therapy monitoring and prognosis of non-operable lung cancer [J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(5): 1855-1862.
- [12] XU Y, SHI Q L, MA H, et al. High thymidine kinase 1 (TK1) expression is a predictor of poor survival in patients with pT1 of lung adenocarcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2012, 33(2): 475-483.
- [13] NISMAN B, YUTKIN V, NECHUSHTAN H, et al. Circulating tumor M2 pyruvate kinase and thymidine kinase 1 are potential predictors for disease recurrence in renal cell carcinoma after nephrectomy [J]. *Urology*, 2010, 76 (2): 1-6.
- [14] PROCHAZKA V, FABER E, RAIDA L, et al. High baseline serum thymidine kinase 1 level predicts unfavorable outcome in patients with follicular lymphoma [J]. *Leuk Lymphoma*, 2012, 53(7): 1306-1310.
- [15] WU B J, LI W P, QIAN C, et al. Increased serum level of thymidine kinase 1 correlates with metastatic site in patients with malignant melanoma [J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(2): 643-648.
- [16] DI C C, FIGUEREDO R, FERGUSON P J, et al. Combining small interfering RNAs targeting thymidylate synthase and thymidine kinase 1 or 2 sensitizes human tumor cells to 5-fluorodeoxyuridine and pemetrexed [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011, 338(3): 952-963.

(收稿日期: 2013-11-01 修回日期: 2013-12-24)