

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.02.014

三阴性乳腺癌的预后与上皮间叶转化的相关性

龚益平¹, 漆楚波², 王明伟², 陈 创³, 赵德绵¹, 许 娟¹, 邵 军¹, 程洪涛¹, 夏和顺²**Prognosis of Triple-negative Breast Cancer and Its Relevance to Epithelial-mesenchymal Transitions**Gong Yiping¹, Qi Chubo², Wang Mingwei², Chen Chuang³, Zhao Demian¹, Xu Juan¹, Shao Jun¹, Cheng Hongtao¹, Xia Heshun²

1. Department of Breast Surgery, Hubei Cancer Hospital, Wuhan 430079, China, 2. Department of Pathology, 3. Department of Surgical Oncology, Zhongnan Hospital, Wuhan University

Corresponding Author: Xia Heshun, E-mail: xiaheshun@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To investigate the prognosis of triple-negative breast cancer and its relevance to epithelial-mesenchymal transition (EMT). **Methods** Two hundred and forty patients of breast cancer were classified into 3 groups, triple-negative group, receptor positive group and Her-2 positive group, according to the expression of estrogen receptor and progesterone receptor as well as Her-2 protein. Paraffin-embedded specimens of the primary tumors were collected and tissue micro-array blocks were constructed. Vimentin expressions were detected by immunohistochemistry. The prognosis and vimentin expression among the 3 groups were analyzed. **Results** The overall survival and the 5 year survival rate of triple-negative group were significantly decreased compared to receptor positive group, but were not statistically different from those of Her-2 group. **Conclusion** The poor prognosis of triple-negative breast cancer was associated with EMT.

Key words: Breast cancer; Prognosis; Epithelial-mesenchymal Transition; Vimentin

摘 要: 目的 探讨三阴性乳腺癌的预后及与上皮间叶转化的关系。**方法** 乳腺癌患者 240 例, 根据 ER、PR、Her-2 的检测结果分为三组: 三阴性组、受体阳性组和 Her-2 阳性组。原发灶石蜡标本制作组织芯片, 免疫组织化学检测 Vimentin 的表达, 比较三组的预后及 Vimentin 的表达差异。**结果** 三阴性组的总生存及 5 年生存率均比受体阳性组差, 和 Her-2 阳性组相比, 差异无统计学意义。而三阴组的 Vimentin 阳性表达率明显高于受体阳性组或 Her-2 阳性组。**结论** 三阴性乳腺癌的预后与上皮间叶转化有关。

关键词: 乳腺肿瘤; 预后; 上皮间叶转化; 波形蛋白

中图分类号: R737.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2012)02-0173-04

0 引言

三阴性乳腺癌 (Triple negative breast cancer) 是 ER、PR、Her-2 蛋白表达均为阴性的乳腺癌。由于其缺乏雌激素受体表达, 对内分泌治疗不敏感, 预后相对较差, 以内脏转移多为特点, 近年来引起广泛关注。不过, 该类型乳腺癌的生物异质性也很强, 不同个体间的临床表现差异很大, 需要寻找对其进一步区分的方法, 并从分子水平加深对其生物学机制的认识。

上皮间叶转化是癌症发生转移中的一个普遍现象, 波形蛋白 (Vimentin) 蛋白表达上调为其中的一个主要特点。本研究采用组织芯片检测三阴性乳腺

癌 Vimentin 的表达。

采用本研究团队的一组 240 例乳腺癌病例的数据库^[1], 用石蜡标本制作组织芯片, 具体情况如下。

1 资料与方法

1.1 资料收集及芯片制作

选取 2002 年 1 月—2003 年 12 月我院乳腺科手术切除并经病理证实的女性乳腺原发性浸润癌, 其中石蜡包埋标本完好的病例共 240 例。收集其临床病理资料, 包括年龄、月经状态、肿瘤大小、肿瘤分期、淋巴结状态、组织学分级、病理类型、手术、放化疗和内分泌治疗等, 并建立临床资料数据库。收集原发灶石蜡包埋组织标本, 由上海芯超生物科技有限公司制成组织芯片。

1.2 一般资料

240 例均为女性, 年龄 29~78 岁, 中位年龄 48 岁; 绝经前 134 例, 绝经后 106 例。原发灶直径 ≤ 2 cm 者 35 例, 2.1~5 cm 者 162 例, > 5 cm 者 43 例; 107 例接受过 1~4 周期的新辅助化疗。全部患

收稿日期: 2011-06-21; 修回日期: 2011-09-05

基金项目: 湖北省自然科学基金资助项目 (2009CDB333)

作者单位: 1. 430079 武汉, 湖北省肿瘤医院乳腺科, 2. 病理科; 3. 武汉大学中南医院肿瘤科

通信作者: 夏和顺, E-mail: xiaheshun@yahoo.com.cn

作者简介: 龚益平 (1965-), 男, 博士, 主任医师, 主要从事乳腺癌基础与临床研究

者均经手术治疗,其中根治术 39 例,改良根治术 197 例,保乳手术 4 例。这些患者均经病理学确诊为乳腺癌,其中导管浸润癌非特殊型 201 例、小叶浸润癌 23 例、导管浸润癌特殊型 16 例;病理分级 I 级 40 例,II 级 141 例,III 级 59 例。腋窝淋巴结阳性 131 例,109 例。

术后均给予辅助化疗,其中 141 例为含蒽环类和(或)紫杉类化疗药物方案。淋巴结阳性大于等于 3 枚的患者给予放疗,ER/PR 阳性的患者给予 5 年内分泌治疗。

1.3 分组

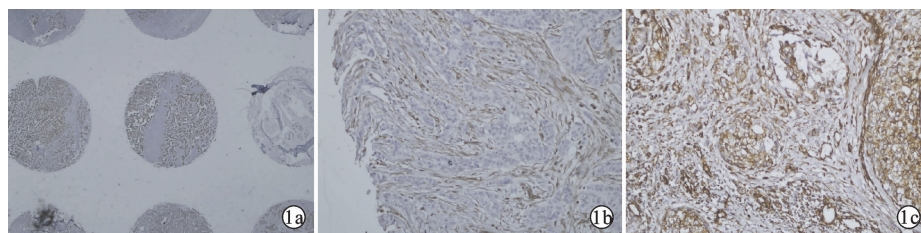
根据本研究小组的系列研究中所检测的 ER、PR、Her-2 免疫组织化学表达情况,结合 Her-2 表达“++”的 Fish 检测结果^[1],将 240 例乳腺癌分为三组,第一组为 ER、PR、Her-2 蛋白均为阴性即三阴性乳腺癌,共 51 例(21.25%),简称为“三阴组”;第二组为 ER 和(或)PR 阳性,Her-2 阴性,共 138 例(57.50%),简称为“受体阳性组”;第三组为 Her-2 阳性,共 51 例(21.25%)简称为“Her-2 阳性组”。

1.4 免疫组织化学染色

Vimentin 单克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术公司。工作浓度为 1:100;实验步骤:微波煮沸抗原修复,置于 PBS 中;滴加 3%过氧化氢阻断内源性过氧化物酶,孵育 10 min;蒸馏水漂洗,置于 PBS 中 10 min,加一抗室温孵育 1 h;PBS 漂洗 10 min,滴加 EnVision 试剂孵育 30 min;PBS 漂洗 10 min,二氨基联苯胺光学显微镜控制下显色;蒸馏水洗,对比染色、封片。

1.5 结果判定

Vimentin 免疫组织化学阳性反应为胞质呈棕黄色染色,正常情况下,间质细胞呈阳性反应,癌细胞呈阴性反应。采用半定量计分法判定,以癌细胞染色百分比及染色强度两个方面分别计分,综合评判。其中癌细胞染色<5%为 0 分;5%~35%为 1 分;>35%且≤70%为 2 分;>70%为 3 分;癌细胞按染色强度分为 4 等:0 分为无染色;1 分为浅黄色;2 分为棕黄色;3 分为棕褐色。综合计分:染色强度计分×染色百分比计分。将 0~2 分定为阴性,2 分以上定为阳性。见图 1。



1a: the microarray local; 1b: Vimentin negative, expressing in mesenchyma, not cancer cells; 1c: Vimentin positive, expressing both in cancer cells and mesenchyma

图 1 Vimentin 在三阴性乳腺癌中的表达

Figure 1 The expressions of Vimentin in triple-negative breast cancer

1.6 随访

将手术治疗作为随访起始时间,以复发和转移为终止事件,随访截止日期为 2009 年 12 月 30 日。共 100 例出现局部复发或远处转移,其中肺转移 16 例,肝转移 15 例,骨转移 20 例,脑转移 6 例,其他部位 43 例。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 12.0 统计软件进行分析。两组间 Vimentin 表达的差异比较采用 χ^2 检验。Kaplan-Meier 法计算总生存率,生存率差异比较采用 Logrank 检验。检验标准 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 三组乳腺癌临床病理特征比较

三阴性组的临床病理特征与受体阳性组相比,原发灶偏大($P < 0.05$),组织学分级高($P < 0.01$);而年龄、腋淋巴结状态等差异均无统计学意义($P > 0.05$)。与 Her-2 阳性组相比,在年龄、原发灶大小、腋淋巴结状态、组织学类型、组织学分级上差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

2.2 三组乳腺癌生存率的比较

三阴性组总体生存率比受体阳性组差(Logrank 检验, $P < 0.01$),但和 Her-2 阳性组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。5 年生存率三阴性组为 70.59% 低于受体阳性组 92.03%,差异有统计学意义($P < 0.01$),但与 Her-2 阳性组相比差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 2。三阴性组共有 24 例发生了转移,其中 12 例(50%)发生于内脏(肝肺脑等),略高于其他两组,但差异无统计学意义。

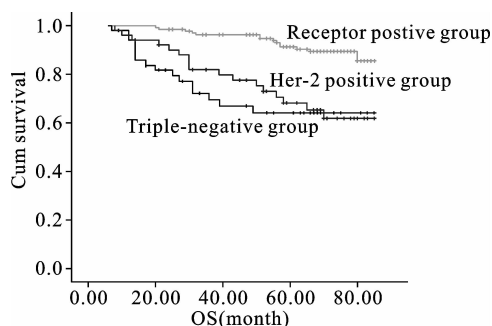


图 2 三组 Kaplan-meier 分析总体生存(OS)曲线图

Figure 2 Overall survival curve of three group by Kaplan-meier analysis

2.3 三组乳腺癌 Vimentin 的表达

12 例由于样本太小缺失,检测 Vimentin 的实际有效样本为 228 例,占总样本的 95%。

Vimentin 在乳腺癌中的表达:被判定为“-”129 例(56.58%),“+”29 例(12.72%),“++”46 例(20.18%),“+++”24 例(10.53%)。以阳线细胞数 35%为阈值,表达“++”以及“+++”被判定为阳性,表达“-”以及“+”被判定为阴性,其在乳腺癌各组中的表达情况见表 1。其中在三阴性组中的阳性率达 64.58%(31/48),分别高于受体阳性组的 23.48%(31/132)和 Her-2 阳性组的 16.67%,差异有统计学意义($P<0.01$)。

表 1 三组乳腺癌的临床病理、治疗、预后及 Vimentin 表达的比较

Table 1 Comparisons of the 3 breast cancer groups for clinical pathology, treatment, prognosis as well as Vimentin expression

Clinical characteristics	Triple Negative (n=51)	ER Positive (n=138)	Her-2 Positive (n=51)	P
Age(years)				
≤40	9	30	8	
>40~60	38	87	38	a >0.05
>60	4	21	5	b >0.05
Tumour size(cm)				
≤2	4	28	3	
>2~5	36	94	32	a <0.05 *
>5	11	16	16	b >0.05
Lymph node status				
Negative	26	62	21	a >0.05
positive	25	76	30	b >0.05
Pathological type				
Invasive ductal,NOS	44	110	47	
Invasive lobular	1	20	2	a >0.05
Other	4	10	2	b >0.05
Histological grade				
I	3	34	3	
II	23	90	28	a <0.01 *
III	25	14	20	b >0.05
Surgical type				
Conservation	0	4	0	
Modified mastectomy	44	109	44	a >0.05
Radical mastectomy	7	25	7	b >0.05
Chemotherapy regimen				
Anthrocyclus containing	15	68	16	a = 0.01 *
Non-anthrocyclus containin	36	70	35	b >0.05
5 year survival rate(%)	70.59	92.03	68.63	a <0.01 * b >0.05
Site of metastasis				
Viscera	12	17	13	a >0.05
Other	12	29	17	b >0.05
Vimentin				
Negative	17	101	40	a <0.01 *
Positive	31	31	8	b <0.01 *

Note:a:comparison between triple negative and ER positive;b: comparison between triple negative and Her-2 positive;* :reach statistical significance

3 讨论

国外统计三阴性乳腺癌患者约占乳腺癌人群的 10%~16%^[2]。研究显示,三阴性乳腺癌主要临床病理特征是:肿瘤体积较大,病理类型几乎均为导管癌,组织学分级较高,较非三阴性乳腺癌患者无瘤生存和总生存率均显著降低;与其他类型乳腺癌相比,较早发生局部复发和远处转移^[3-5],内脏转移率高于骨转移,易发生脊髓、脑膜、脑、肝和肺转移,可能有独特的转移机制。由于其治疗选择少,无法从较成熟的内分泌和靶向治疗中获益,因此对此群体的研究非常重要。

本研究中三阴性乳腺癌占有所有病例的 21.25%,平均年龄为 48.2 岁,肿瘤平均直径为 3.8 cm,绝经前患者占 57.2%。与受体阳性组相比,三阴性组中大肿块患者及组织学Ⅲ级的比例较高,总生存期缩短,5 年生存率显著降低。与 Her-2 阳性组相比,其临床病理指标差异无统计学意义,总生存期及 5 年生存率的差异亦无统计学意义。这说明,三阴性乳腺癌的预后与未经过靶向治疗的 Her-2 阳性乳腺癌一样恶劣。但本组三阴性乳腺癌的内脏转移率不及文献报道的高,可能是由于本组病例样本量不大的缘故。

通过对波形蛋白 Vimentin 表达的检测与比较,我们发现,其阳性表达率在三阴性组明显高于其他两组。这与 Sarrió 等^[6]的报道相似。

波形蛋白属于中间丝蛋白的一种,参与形成细胞骨架,并与胞膜形成广泛联系,主要分布在间叶组织及细胞,曾被当作间叶组织起源肿瘤的特异性标记。但近年来大量文献表明,多种上皮性肿瘤细胞也表达波形蛋白,且被认为与肿瘤细胞的恶性程度密切相关。Thompson 等^[7]将波形蛋白在上皮性肿瘤细胞的表达,以及促进肿瘤细胞侵袭转移的现象定义为 EMT(Epithelial-mesenchymal transitions),即上皮-间叶转化。它以上皮细胞极性的丧失及间质特性的获得为重要特征^[8]。有关 EMT 的发现最早源于胚胎发育的研究,近年来研究发现,上皮间叶转化在癌症侵袭转移过程中发挥了重要作用^[9]。癌细胞发生上皮间叶转化的主要特征表现在 E-钙黏素的表达下调,上皮细胞间连接解体,细胞分散。同时 N-钙黏素、钙黏素 6、钙黏素 11 等表达增强,形成细胞-基质黏附,以及间充质标志纤维连接蛋白、中间丝波形蛋白等表达上调,细胞骨架重排,细胞运动能力增强^[10]。这样,癌细胞丢失上皮细胞特征、同时获得间质细胞的某些特性,游走能力提高、与周边或远处间质组织的亲和能力增强,进而造成远处转移。

近年来的研究证据显示,与三阴性乳腺癌特征十分相似的基底样型乳腺癌与乳腺癌干细胞表型、EMT 以及肿瘤的侵袭转移潜能之间存在着密切的联系^[8]。乳腺癌干细胞中存在基底样表型^[11]并且富含 EMT 相关因子的表达(如 Vimentin, Slug, CTGF, MMP9, SPARC, N-cadherin 和 SIP1)^[6, 12-13],而具有干细胞特性的细胞亚群多见于基底样乳腺癌细胞株^[14],并且显示出肿瘤的侵袭潜能;而另一方面,干细胞样乳腺癌细胞株(如 MCF10A 和 PMC42-LA)也能够产生 EMT^[10]。

我们认为,本组病例中三阴性乳腺癌的 Vimentin 表达明显上调,是其癌细胞间叶化特征的体现,可能是癌细胞转移过程中 EMT 发生的结果,而这也很可能是其预后较差的重要原因。

参考文献:

- [1] Chen C, Xia HS, Gong YP, et al. The quantitative detection of total HER2 load by quantum dots and the identification of a new subtype of breast cancer with different 5-year prognosis [J]. *Biomaterials*, 2010 31(33):8818-8125.
- [2] Bauer KR, Brown M, Gress RD, et al. Descriptive analysis of estrogen receptor(ER)-negative, progesterone receptor(PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype; a population-based study from the California Cancer Registry [J]. *Cancer*, 2007, 109(9):1721-1728.
- [3] Rakha EA, El Sayed ME, Green AR. Prognostic markers in triple-negative breast cancer[J]. *Cancer*, 2007, 109(1):25-32.
- [4] Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10; 5367-5374.
- [5] Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, et al. Triple-negative breast cancer; clinical features and patterns of recurrence [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(15 Pt 1):4429-4434.
- [6] Sarrió D, Rodríguez-Pinilla SM, Hardisson D, et al. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(4):989-997.
- [7] Thompson EW, Newgreen DF, Tarin D. Carcinoma invasion and metastasis; a role for epithelial-mesenchymal transition? [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(14):5991-5995.
- [8] Hugo H, Ackland ML, Blick T, et al. Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression[J]. *J Cell Physiol*, 2007, 213(2):374-383.
- [9] Briegel KJ. Embryonic transcription factors in human breast cancer[J]. *UBMB life*, 2006, 58:123.
- [10] Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2005, 17:548.
- [11] Stingl J, Caldas C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis[J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(10):791-799.
- [12] Storci G, Sansone P, Trere D, et al. The basal-like breast carcinoma phenotype is regulated by Slug gene expression[J]. *J Pathol*, 2008, 214(1):25-37.
- [13] Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, et al. Molecular definition of breast tumor heterogeneity[J]. *Cancer Cell*, 2007, 11(3):259-273.
- [14] Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, et al. CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties; an early step necessary for metastasis[J]. *Breast Cancer Res*, 2006, 8(5):R59.

[编辑:刘红武;校对:周永红]