

Expression of Cx43, Cx26 in Breast Carcinoma and Their Prognosis Significance

乳腺癌中间隙连接蛋白 Cx43、Cx26 的表达及其预后意义

ZHOU Li¹, WANG Xiao-ling^{2,*}, WANG Yong-jun²

(1. Doctor Degree Candidate of The Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China; 2. Department of Pathology, the Fourth Affiliated Hospital of Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

周 莉¹/王小玲^{2,*}/王永军²

(1. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850; 2. 河北医科大学第四附属医院病理科, 河北 石家庄 050011)

【摘要】 背景与目的: 检测间隙连接蛋白 Cx43(Connexin43, Cx43)、Cx26(Connexin26, Cx26)、血管内皮生长因子 VEGF-C(Vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C) 和 雌激素受体(Estrogen receptor, ER)、孕激素受体(Progesterone receptor, PR)在乳腺癌中的表达及其与临床病理指标的关系。材料与方法: 应用免疫组化 S-P 法检测乳腺癌、癌旁乳腺组织共 125 例石蜡包埋标本中各种蛋白的表达情况, 并结合临床随访资料, 用 Cox 比例风险模型分析其预后意义。结果: Cx43 和 Cx26 在癌组织中的阳性表达率分别是 38.74%、43.24%, 低于癌旁正常组织的阳性表达率; VEGF-C 蛋白在癌组织中的阳性表达率 47.75%, 显著高于癌旁正常组织的阳性表达率。53 例 VEGF-C 阳性患者中, 淋巴结转移阳性者 37 例(69.81%), 高于无转移组。多因素 Cox 比例风险模型分析显示, VEGF-C、Cx26 和淋巴结转移与预后密切相关, 危险度分别为 11.118、0.266 和 10.126。结论: 间隙连接蛋白 Cx43 和 Cx26 的缺乏是人类乳腺癌的一个主要特点。随着 Cx43 和 Cx26 的阳性表达率降低, 乳腺肿瘤的恶性程度增高。VEGF-C 阳性表达、ER 和 PR 阴性表达在淋巴结转移组明显高于无转移组。VEGF-C、Cx26 和淋巴结转移均可能作为判断预后的独立因素。临床上联合检测这些基因产物的表达将有助于推测乳腺癌患者的预后和选择治疗方案。

【关键词】 乳腺癌; 间隙连接蛋白 Cx43; 血管内皮生长因子 Cx26; 血管内皮生长因子 VEGF-C; 免疫组织化学; 预后

中图分类号: R730.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-616X(2005)05-0291-03

【ABSTRACT】 **BACKGROUND & AIM:** To investigate the relationship among the expression of connexin43(Cx43), connexin26(Cx26), vascular endothelial growth factor-C(VEGF-C), Estrogen receptor(ER), Progesterone receptor(PR); the clinicopathological characteristics in breast carcinoma. **MATERIAL AND METHODS:** A total of 125 paraffin-embedded breast carcinoma and non-carcinomatous breast tissues were stained using S-P method, and the patients' prognosis significance was analyzed by Multivariable Cox proportional hazards model according to the clinical follow-up material. **RESULTS:** The expression levels of Cx43 and Cx26 were significantly lower in the tumors (38.74% and 43.24% respectively) than that in the non-carcinomatous breast tissues ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively). And the expression level of VEGF-C was significantly higher in the tumors (47.75%) than that in the non-carcinomatous breast tissues ($P < 0.05$). Out of 53 VEGF-C positive staining, the positive rate of lymph node metastasis was 37(69.81%), which was significantly higher than that in the no lymph node metastasis group ($P < 0.05$). By the Cox regression model, VEGF-C, Cx26, and lymph node metastasis were closely associated with prognosis. VEGF-C and lymph node metastasis were risk factors. The hazard ratios of VEGF-C expression and lymph node status were 11.118 and 10.126, respectively. $P = 0.007$ and 0.042, respectively. There was significant association with prognosis. **CONCLUSION:** The lack of Cx43, Cx26 gap junctions is a main feature of human breast cancer tissues. Breast tumor malignant degree increased with Cx43 and Cx26

收稿日期: 2004-08-09; 修订日期: 2004-10-09

作者简介: 周 莉(1968-), 女, 吉林省和龙人, 医师, 博士研究生, 研究方向为临床肿瘤病理。

* Correspondence to: WANG Xiao-ling Tel: 86-311-6044941

positive expression decreased. It was significantly higher in VEGF-C positive expression and ER, PR negative expression in lymph node metastasis group than that in the no lymph node metastasis group. VEGF-C, Cx26 and Lymph node metastasis status may be indicators of prognosis of breast carcinoma, which would be helpful in assessment prognosis and selecting the higher risk cases for further treatment.

【KEY WORDS】 breast carcinoma; connexin43; connexin26; vascular endothelial growth factor-C; immunohistochemistry; prognosis

乳腺癌是最常见的女性恶性肿瘤,近年来,因其患病率在世界范围内有逐年上升的趋势,并且发病日益年轻化,使得这一疾病的危害更加显著。我们研究采用多种蛋白和受体联合检测,期望在预后评估方面得到一些进展,以便筛选出高危病例及时进行有效治疗。

1 材料与方法

1.1 材料

标本取自河北医科大学第四医院 1996 年乳腺癌外科手术石蜡包埋标本 111 例,术前未经任何治疗。随机选取同期癌旁正常乳腺组织 14 例(距癌灶 > 4 cm,病理证实为正常乳腺组织)。所有乳腺癌标本均有完整的临床病理资料,其中 68 例有随访资料。患者均为女性,年龄 23 ~ 78 岁,平均年龄 48.23 岁,中位年龄 46 岁。年龄 > 46 岁的 53 例,年龄 ≤ 46 岁的 58 例;左侧 58 例,右侧 53 例。其中浸润型导管癌 75 例,浸润型小叶癌 36 例。组织学分级:I 级 5 例,II 级 52 例,III 级 54 例。淋巴结有转移 65 例,有脉管侵犯 76 例。肿瘤 > 2.0 cm 的 67 例,肿瘤 ≤ 2.0 cm 的 44 例。其中五年术后随访 68 例。生存期 ≤ 五年 10 例,生存期 > 五年 58 例。五年生存率为 85.29%。

1.2 试剂

间隙连接蛋白 Cx43(Connexin43, Cx43)、血管内皮生长因子 Cx26(Connexin26), Cx26 多克隆抗体(兔抗人)为美国 Zymed 公司产品。Cx43 工作液浓度为 1:250, Cx26 工作液浓度为 1:200。血管内皮生长因子 VEGF-C (Vascular endothelial growth factor-c, VEGF-C) 多克隆抗体(兔抗人)、雌激素受体 (Estrogen receptor, ER)、孕激素受体 (Progesterone receptor, PR) 均为单克隆抗体(鼠抗人)、S-P 试剂盒和 DAB 试剂盒均购自北京市中山生物技术有限公司。

1.3 方法

石蜡标本 4 μm 厚切片,常规脱蜡至水,3% H₂O₂ 封闭内源性酶活性;在枸橼酸盐缓冲液中加热修复抗原;血清封闭 37 °C 10 min;依次加一抗(4 °C 过夜),生物素标记二抗(37 °C 30 min),辣根过氧化物酶孵育(37 °C 30 min),DAB 显色,苏木素复染,盐酸酒精分

化,中性树胶封片,镜检。

1.4 判断标准

每批染色均设立以 PBS 代替一抗的阴性对照及阳性对照(阳性对照 Cx43 为 Wistar 雄性大鼠心脏, Cx26 为子宫平滑肌, VEGF-C 为结肠癌, ER、PR 为在预试验染色切片中挑选的强阳性标本)。阳性细胞分析: Cx43 和 Cx26, 在细胞浆和细胞膜上出现棕黄色颗粒为阳性细胞,每个视野中阳性细胞 > 50% 的为强阳性(++) ; 5% ~ 50% 的为阳性(+); < 5% 为阴性。VEGF-C 阳性表达为细胞浆呈棕黄色颗粒,每张切片中阳性细胞 > 30% 为阳性, < 30% 或无阳性细胞为阴性。ER、PR 阳性表达细胞核呈棕黄色颗粒,每张切片中阳性细胞 > 25% 为阳性, < 25% 或无阳性细胞为阴性。

1.5 统计学分析

Cx43、Cx26、VEGF-C、ER 和 PR 检测指标与临床病理特征的关系采用 χ^2 检验,各蛋白和受体之间表达的相关性用 Spearman 等级相关检验,多因素 Cox 比例风险模型(Multivariable Cox proportional hazards model)分析各因素对生存期的影响。所有数据均应用 SPSS10.0 软件包进行统计分析, $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 临床病理指标比较

浸润性小叶癌、有脉管侵犯和肿瘤直径大于 2.0 cm 患者中,淋巴结转移阳性率分别是 72.22%、5.79%、67.16%。其差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。在组织学分化差病例中(III 级),脉管侵犯阳性率为 55.26%,其差别有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 免疫组化结果比较

14 例癌旁组织标本中 Cx43、Cx26、VEGF-C 蛋白的阳性表达率分别为 85.71%、78.57%、14.29% (表 1); 111 例乳腺癌组织中 Cx43、Cx26、VEGF-C 蛋白的阳性表达率分别为 38.74% (43/111)、43.24% (48/111)、47.75% (53/111),其差异均有统计学意义。

Cx43 和 Cx26 在癌组织中的阳性表达率低于癌旁正常组织的阳性表达率 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$); VEGF-C 蛋白在癌组织中的阳性表达率高于癌旁正常

组织的阳性表达率 ($P < 0.05$)。Cx43 的表达在组织学分级间 (表 2) 和脉管侵犯之间差异有统计学意义。43 例 Cx43 阳性患者中, I~II 级 (图 1) 的 31 例 (72.09%), 随着 Cx43 阳性表达率降低, 乳腺肿瘤的恶性程度增高 ($P < 0.01$) (图 2)。Cx43 的表达与其它临床病理指标无关 ($P > 0.05$)。Cx26 的表达与组织学分级有关, 48 例 Cx26 阳性患者中, I~II 级的 30 例 (62.5%), 随着 Cx26 阳性表达率降低, 乳腺肿瘤的恶性程度增高 ($P < 0.05$)。Cx26 的表达与其它临床病理指标无关 ($P > 0.05$)。

表 1 Cx43、Cx26 和 VEGF-C 在癌旁乳腺组织和乳腺癌中的表达
Table 1 Expression of Cx43、Cx26 and VEGF-C between the normal breast tissue and the breast carcinomas

Protein expression		Normal breast tissue	Breast carcinomas	χ^2	P
Cx43	positive	12	43	11.134	< 0.001
	negative	2	68		
Cx26	positive	11	48	6.226	< 0.05
	negative	3	63		
VEGF-C	positive	2	53	5.649	< 0.05
	negative	12	58		

表 2 乳腺癌中各蛋白受体与组织学分级之间的关系
Table 2 Tissue grades compare with protein expression in the breast carcinomas

Protein and receptors expression	Number of case	Tissues grades		χ^2	P
		II	III		
VEGF-C	positive	53	28	0.089	0.766
	negative	58	29		
Cx43	positive	43	31	12.088	< 0.01
	negative	68	26		
Cx26	positive	48	30	4.208	< 0.05
	negative	63	27		
ER	positive	85	44	0.025	0.875
	negative	26	13		
PR	positive	85	45	0.367	0.545
	negative	26	12		

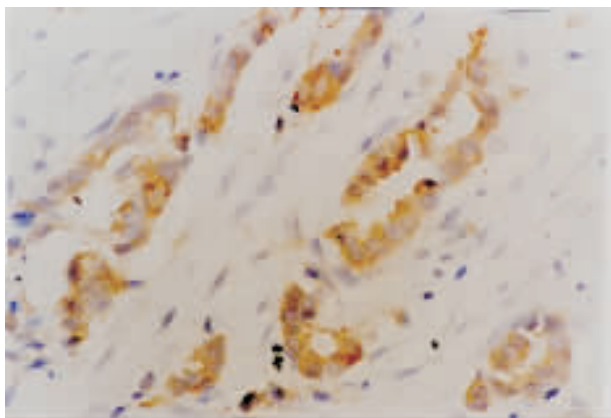


图 1 乳腺癌 I-II 级 Cx43 阳性 (SP, 350 \times)
Figure 1 Breast carcinoma I-II grade Cx43 positive (SP, 350 \times)

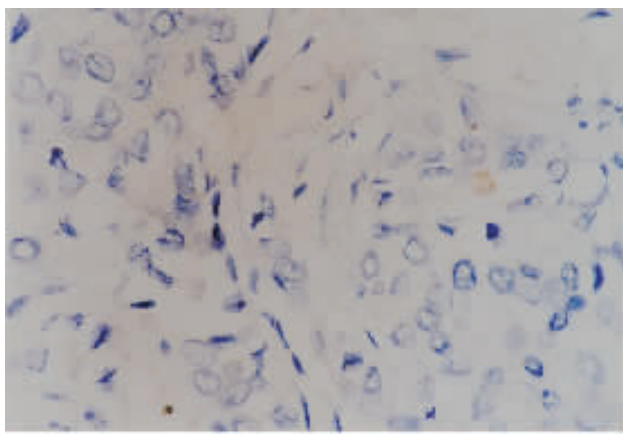


图 2 乳腺癌 III 级 Cx43 阴性 (SP, 350 \times)
Figure 2 Breast carcinoma III grade Cx43 negative (SP, 350 \times)

53 例 VEGF-C 阳性 (图 3) 患者中, 淋巴结转移阳性者 37 例 (69.81%), 高于无转移组 ($P < 0.05$)。VEGF-C 与其它临床病理指标无关。ER、PR 表达与淋巴结转移之间均有显著性意义; ER、PR 阴性的 26 例中, 淋巴结转移阳性的患者分别是 20 例 (76.92%) 和 21 例 (80.77%)。ER、PR 表达与其它临床病理指标无关 ($P > 0.05$)。Cx43 和 Cx26 蛋白表达呈正相关性能 ($r_s = 0.442, P < 0.001$)。Cx43 和 Cx26 表达与其它蛋白受体指标表达之间无相关性 ($P > 0.05$)。ER 和 PR 表达之间呈高度正相关性 ($r_s = 0.397, P < 0.001$)。ER、PR 表达与其它蛋白受体指标表达之间无相关性 ($P > 0.05$)。多因素 (组织学分型、脉管侵犯、组织学分级、ER、PR、VEGF-C、CX43、CX26 表达情况、淋巴结转移状况、性别、肿瘤大小和年龄共 12 个因素) Cox 比例风险模型分析显示 (表 3), VEGF-C、Cx26 和淋巴结转移与预后密切相关。VEGF-C 阳性表达和淋巴结转移阳性使乳腺癌患者的死亡风险变大, 危险度分别为 11.118 和 10.126, 与预后相关。VEGF-C、阳性表达和淋巴结转移的患者与 VEGF-C 阴性表达和无淋巴结转移者相比, 预后不良。Cx26 阳性表达使乳腺癌患者的死亡风险变小, 危险度为 0.266, 与预后相关。

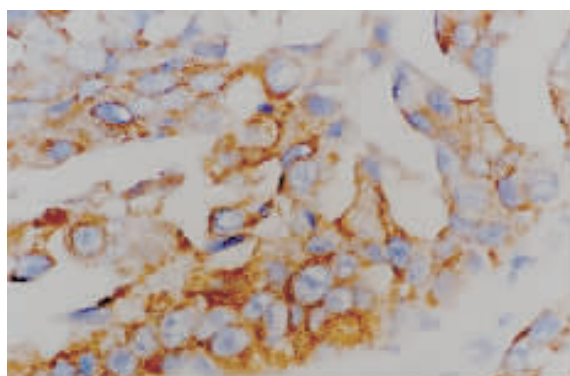


图 3 乳腺癌 VEGF-C 阳性 (SP, 350 \times)
Figure 3 Breast carcinoma VEGF-C positive (SP, 350 \times)



表 3 68例乳腺癌患者的多因素Cox 比例风险模型分析结果
Table 3 Multivariable Cox proportional hazards model outcome of 68 breast carcinomas prognosis

Variable	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95 % CI for Exp(B)	
							Lower	Upper
VEGF-C	2.409	0.889	7.339	1	.007	11.118	1.946	63.502
CX26	-1.325	0.643	4.244	1	.039	0.266	0.075	0.938
Lymph node metastasis	2.315	1.139	4.134	1	.042	10.126	1.087	94.347

3 讨 论

间隙连接(Gap junction, GJ)是普遍存在于相邻细胞间的细胞连接方式,是相邻细胞膜上的一种膜蛋白通道结构。间隙连接允许邻近细胞之间的离子(<1 000 D),核苷酸和小的调节分子以及药物或它们的代谢物进行转运,细胞通过它所介导的细胞间连接通讯(Gap junctional intercellular communication, GJIC)进行细胞间信息和能量的传递,调控细胞的生长、分化和内环境的稳定,对维持机体的功能发挥重要作用,近来研究发现,多种肿瘤和转化细胞的发生与间隙连接蛋白表达异常和间隙连接通讯功能丧失密切相关,间隙连接介导的细胞间通讯的改变是属于与致癌作用相关联的早期变化之一,间隙连接的恢复能够抑制肿瘤细胞的生长^[1]。间隙连接蛋白是多种多样的,因此它在肿瘤抑制中的作用可能是非常复杂的。间隙连接蛋白在人类实体肿瘤形成和进展中的角色,可能比在实验系统中显示的更加复杂。本实验结果显示间隙连接蛋白在乳腺癌中的缺失可能成为乳腺癌发生的诊断标记之一并充当一个潜在的治疗目标。

VEGF-C是血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)家族成员之一。VEGF家族蛋白有6个成员是特殊的、高潜力的血管因子,其作用在于增加

管腔的渗透性、内皮细胞的生长、增殖、迁移和分化^[2]。VEGF-C作为一个能对淋巴管发生作用的血管内皮细胞生长因子,目前的研究仍处于起步阶段。与正常组织比较,VEGF-C在多种肿瘤中有较高表达。我们的实验结果证实了乳腺癌中VEGF-C较正常乳腺组织有高表达。在肿瘤组织中,VEGF-C表达的增加伴随淋巴结转移率增高的原因可能是:通过VEGF-C刺激淋巴管内皮细胞的趋化或迁移因子的分泌有助于肿瘤细胞对内皮组织的粘附、内渗,以及跨越淋巴管播散的肿瘤细胞在淋巴管内的生长^[3]。VEGF-C能诱导肿瘤内淋巴管生成、淋巴管内的肿瘤生长和导致淋巴结转移的形成。新形成的淋巴管可能与已建立的淋巴管不同,它们在促进转移中更加有效^[3,4]。

参考文献:

- [1] Laird DW, Fistouris P, Batist G, et al. Deficiency of connexin 43 gap junctions is an independent marker for breast tumors [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(5): 4 104-4 110.
- [2] Pronchai O, Peter RE, Suzanne AE. Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis [J]. *Cancer*, 2001, 92(3): 556-568.
- [3] Karkkainen MJ, Makinen T, Alitalo K. Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research [J]. *Nat Cell Biol*, 2002, 4(1): 2-5.
- [4] Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, et al. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(5): 1 786-1 790.

表示混合物组成的标准化与非标准化(应废除)的量和单位对照表

(引自《法定计量单位在医学上的应用(第三版)》)

非标准化的量和单位符号	标准化的量名称和符号	SI单位
重量(质量)百分浓度, % (W/W), % (m/m)%, ppm等	质量分数 ω	1
体积百分浓度, % (V/V), %o, ppm等	体积分数 ψ	1
重量体积百分浓度, 含量% (W/V), ppm等	质量浓度 ρ	kg/L, kg/m ³
百分浓度	质量分数 ω	1
ppm浓度	体积分数 ψ	1
ppb浓度	质量浓度 ρ	kg/L, kg/m ³
当量浓度N, 体积克分子浓度M, 摩尔浓度	浓度, 物质的量浓度 c	mol/L mol/m ³
重量克分子浓度	质量摩尔浓度 b	mol/kg
克分子百分数, 克分子数, 摩尔百分数	摩尔分数 χ	1
分子比	分子浓度 c_B 细胞浓度 C_{cell}	L ⁻¹ L ⁻¹
粒子百分数, 粒子比率, 粒子含量	粒子数分数 χ	1

注:“百分浓度”等应根据具体情况表达为不同的标准化的量。但对药品的标识目前仍用;如2 %普鲁卡因、75 %乙醇质量分数或体积分数表示,不换算成量浓度(mol/L)或质量浓度(kg/L)

本刊编辑部