

# 上皮间叶转化相关蛋白在三阴性乳腺癌组织中的联合表达及其与预后的关系



漆楚波<sup>1</sup>, 龚益平<sup>2</sup>, 王明伟<sup>1</sup>, 徐唐鹏<sup>3</sup>, 陈琼荣<sup>1</sup>, 夏和顺<sup>1</sup>

## Combined Expressions of Epithelial-Mesenchymal Transition Related Proteins in Triple-Negative Breast Cancer and Its Prognostic Significance

QI Chubo<sup>1</sup>, GONG Yiping<sup>2</sup>, WANG Mingwei<sup>1</sup>, XU Tangpeng<sup>3</sup>, CHEN Qiongrong<sup>1</sup>, XIA Heshun<sup>1</sup>  
 1.Department of Pathology, Hubei Cancer Hospital, Wuhan 430079, China, 2.Department of Breast Surgery; 3.Department of Surgical Oncology, Zhongnan Hospital, Wuhan University  
 Corresponding Author: GONG Yiping, E-mail: gyp@medmail.com.cn

**Abstract: Objective** To investigate the relationship between expressions of epithelial-mesenchymal transition related proteins (E-cadherin,  $\beta$ -catenin and Vimentin) and prognosis in triple-negative breast cancer. **Methods** The expressions of E-cadherin,  $\beta$ -catenin as well as Vimentin were examined by immunohistochemistry in 51 patients with breast cancer. The relation between combined expression of 3 markers and prognostic significance was analyzed. **Results** The loss of E-cadherin or  $\beta$ -catenin expression and over-expression of Vimentin were defined as abnormal expression. The cases with 3 markers normal expressions, 1-2 markers normal expressions, and 3 markers abnormal expressions were 1 (1.96%), 37 (72.55%) and 13 (25.49%), respectively. Patients with abnormal expression of 3 markers had shorter disease free survival (DFS), compared with those without. **Conclusion** The combined expression of E-cadherin,  $\beta$ -catenin as well as Vimentin were useful in discriminating the heterogeneity of triple-negative breast cancer.

**Key words:** Breast cancer; Prognosis; Epithelial-mesenchymal transition; E-cadherin

**摘要: 目的** 检测上皮间叶转化相关蛋白E-cadherin、 $\beta$ -catenin和Vimentin在三阴性乳腺癌中的联合表达及其与预后的关系。**方法** 免疫组织化学分别检测E-cadherin、 $\beta$ -catenin和Vimentin在51例三阴性乳腺癌中的表达, 分析其联合表达与预后的相关性。**结果** E-cadherin或 $\beta$ -catenin表达的缺失或Vimentin表达的增高均为异常表达。3项均正常、1~2项不正常以及3项均不正常的病例数分别为1例(1.96%)、37例(72.55%)、13例(25.49%)。3项均不正常组的5年内无瘤生存较其他组明显缩短(Log rank检验,  $P < 0.01$ )。**结论** 上皮间叶转化相关蛋白E-cadherin、 $\beta$ -catenin和Vimentin的联合检测有助于区分三阴性乳腺癌的异质性。

**关键词:** 乳腺肿瘤; 预后; 上皮间叶转化; 钙黏蛋白

**中图分类号:** R737.9 **文献标识码:** A

## 0 引言

三阴性乳腺癌(Triple negative breast cancer, TNBC)是ER、PR、HER2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, 多以内脏转移为特点, 近年来引起广泛关注。不过, 该类型乳腺癌的生物学异质性也很强, 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(Epithelial-mesenchymal transitions, EMT)是癌症发生转移的可能机制之一, 它以上皮细胞极性的丧失及间质特性的获得为重要特征。E-cadherin、 $\beta$ -catenin及Vimentin均为EMT相关的重要指标, 本研究检测其在三阴性乳腺癌中的表达。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

采用本研究团队的一组240例乳腺癌病例数据库, 前期系列研究<sup>[1]</sup>已收集完整临床病理参数, 并完成ER、PR、HER2的检测, 本研究取其中

收稿日期: 2013-06-23; 修回日期: 2013-12-18

基金资助: 湖北省自然科学基金资助项目(2009CDB333); 武汉市科学技术计划资助项目(201271130453)

作者单位: 1.430079武汉, 湖北省肿瘤医院病理科, 2.乳腺科; 3.武汉大学中南医院肿瘤科

通信作者: 龚益平, E-mail: gyp@medmail.com.cn

作者简介: 漆楚波(1975-), 男, 博士在读, 副主任医师, 主要从事肿瘤的病理诊断工作

的51例三阴性乳腺癌原发灶石蜡包埋标本, 检测E-cadherin、 $\beta$ -catenin及Vimentin的表达, 具体如下。

51例三阴性乳腺癌为2002年1月—2003年12月在湖北省肿瘤医院乳腺科住院治疗患者。均为女性, 年龄29~69岁, 中位年龄50岁; 绝经前34例, 绝经后17例。原发灶直径 $\leq 2$  cm者4例, 2.1~5 cm者36例,  $> 5$  cm者11例; 17例接受过1~4周期的新辅助化疗。全部患者均经手术治疗, 其中根治术7例, 改良根治术44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44例、小叶浸润癌1例、导管浸润癌特殊型6例; 病理分级I级3例, II级23例, III级25例。腋窝淋巴结阳性25例, 阴性26例。术后均给予辅助化疗, 其中46例为含蒽环类和(或)紫杉类化疗药物方案。淋巴结阳性患者给予放疗。

### 1.2 随访

将手术治疗作为随访起始时间, 以5年内发现局部或远处复发为终止事件, 随访截止日期为2009年12月30日。共24例出现局部复发或远处转移, 其中肺转移4例, 肝转移1例, 骨转移4例, 脑转移2例, 其他部位复发13例。

### 1.3 免疫组织化学染色

E-cadherin、 $\beta$ -catenin和Vimentin单克隆抗体均购自北京中杉金桥生物技术公司。实验步骤: 取51例乳腺癌原发灶石蜡包埋标本, 切片厚4  $\mu$ m, 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, 复染、封片。

### 1.4 结果判定

由两位病理医生独立阅片, 确定免疫组织化学结果。两位阅片专家意见不一致时则经商讨决定结果。

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方面分别计分, 综合评判。其中癌细胞染色 $< 5\%$ 为0分;  $5\% \sim 35\%$ 为1分;  $> 35\% \sim 70\%$ 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 $\times$ 染色百分比计分。将0~2分定为阴性, 2分以上定为阳性。

### 1.5 统计学方法

采用SPSS 12.0统计软件进行分析。单因素生

存分析采用Kaplan-Meier法计算, Log-rank检验。多因素分析采用Cox回归模型计算,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 E-cadherin和 $\beta$ -catenin在三阴性乳腺癌中的表达及与Vimentin的联合表达情况

E-cadherin和 $\beta$ -catenin在三阴性乳腺癌中均以细胞膜表达为主, 伴随部分细胞质表达, 未见细胞核表达, 见图1。其阳性表达例数分别为27例(52.94%), 7例(13.73%)。正常情况下, Vimentin在间质细胞中呈阳性反应, 而癌细胞中呈阴性反应, 本实验以癌细胞中的Vimentin表达进行计分, 间质细胞中的表达不作统计。结果, 我们检测到Vimentin阳性表达有31(60.78%)例。

如果定义E-cadherin阴性、 $\beta$ -catenin阴性或Vimentin阳性为异常表达, 则在本组病例中, 三项均正常、一或二项不正常以及三项均不正常的分别有1例(1.96%)、37例(72.55%)、13例(25.49%)。将三项表达均不正常的病例定义为EMT1组, 共13例; 其余为EMT0组, 共38例, 见图2。

### 2.2 生存分析

以5年无瘤生存(5-year DFS)为参数指标做比较, 单因素分析, EMT1组的复发病例数较EMT0组明显增多, 差异有极显著统计学意义(Log-rank检验,  $P < 0.01$ ), 其Kaplan Meier无瘤生存(DFS)曲线见图3。进一步通过Cox模型多因素分析, 比较两组的传统预后相关指标: 肿瘤大小、腋窝淋巴结状态和组织学分级等发现, 它们在两组间的差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 见表1。

表1 Cox模型多因素分析比较EMT1及EMT0结果

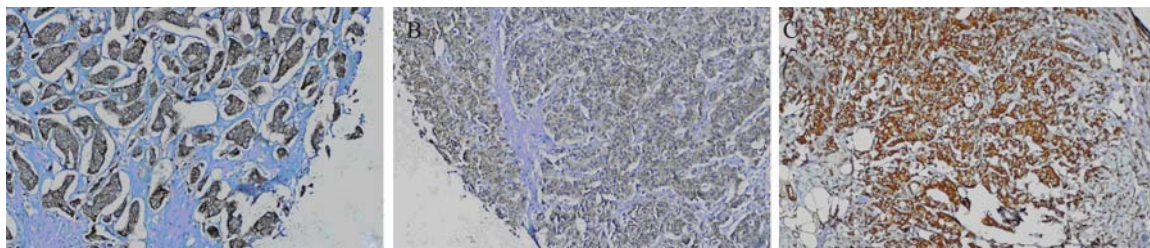
Figure 1 Cox regression model analysis results

Items	EMT1 (n=13)	EMT0 (n=38)	P
Tumor sizes			
T1	1	3	0.64
T2	8	28	
T3	4	7	
Axilla lymph node			
Negative	4	22	0.09
Positive	9	16	
Histological grades			
I	0	3	0.19
II	4	19	
III	9	16	

Notes: EMT: epithelial-mesenchymal transitions; EMT1: cases with abnormal expressions of E-cadherin,  $\beta$ -catenin and Vimentin; EMT0: other cases

## 3 讨论

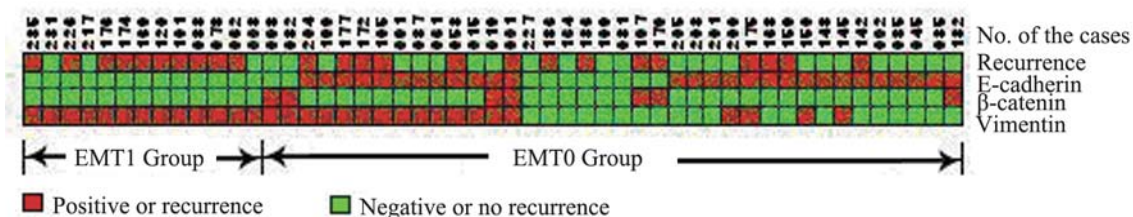
三阴性乳癌患者约占乳腺癌人群的10%



A:E-cadherin;B:β-catenin;C:Vimentin

图1 E-cadherin、β-catenin、Vimentin在三阴性乳腺癌中的表达 (Envision法 ×100)

Figure1 Positive expressions of E-cadherin, β-catenin and Vimentin in triple-negative breast cancer(Envision ×100)



EMT1 group: cases with abnormal expressions of E-cadherin, β-catenin and Vimentin; EMT0 group: other cases

图2 E-cadherin、β-catenin、Vimentin在EMT分组中的表达及复发情况

Figure2 Expressions of E-cadherin, β-catenin and Vimentin and recurrence in EMT groups

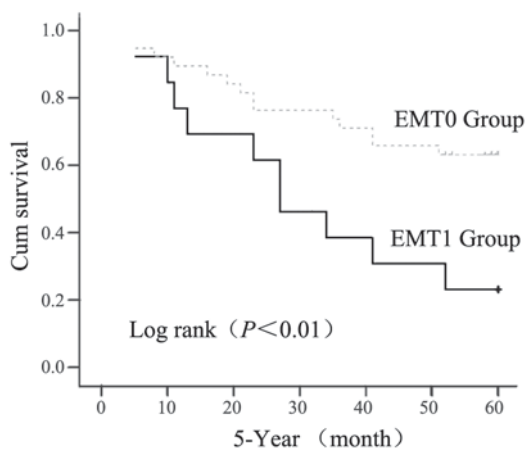


图3 单因素分析EMT分组与5年无瘤生存的关系

Figure3 Association between EMT and 5-year disease free survival by univariate analysis

~ 16%<sup>[2]</sup>。其总体临床病理特征是：肿瘤体积较大，组织学分级较高，较非三阴性乳腺癌患者无瘤生存率和总生存率均显著降低；与其他类型乳腺癌相比，亦较早发生局部复发和远处转移<sup>[3-6]</sup>，内脏转移率高于骨转移，易发生脊髓、脑膜、脑、肝和肺转移，但其机制尚不明确。

Thompson 等<sup>[6]</sup>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，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<sup>[7]</sup>。

E-cadherin为重要的细胞黏附分子，是一类建立细胞间紧密连接，维持细胞极性，保持组织结构完整的钙依赖性跨膜糖蛋白。作为抑癌基因，其

所介导的黏附系统已被公认为“浸润抑制系统”<sup>[8]</sup>，能抑制肿瘤细胞从原发灶脱落，为重要的肿瘤转移抑制因素之一。E-cadherin的功能不仅需要钙离子存在，还需要与其配体-连接素(β-catenin)结合成E-cadherin-β-catenin复合体才能发挥作用。β-catenin在细胞膜上与E-cadherin形成复合体，共同参与细胞之间的黏附作用。E-cadherin、β-catenin的表达下调使得细胞间的黏附能力下降，转移和侵袭能力增强。在多种肿瘤中（如结肠癌、肺癌等）也发现E-cadherin/β-catenin复合体的破坏，与肿瘤的复发转移密切相关<sup>[7, 9-11]</sup>。

EMT的另一个重要标志是间叶标记的表达，如Vimentin等，许多研究显示，波形蛋白的表达与肿瘤的分化程度以及细胞侵袭的表现型和肿瘤患者的生存期缩短相关<sup>[12-13]</sup>。

在本组三阴性乳腺癌中，我们发现绝大部分病例伴随着不同程度的E-cadherin/β-catenin复合体的破坏和（或）Vimentin的异常表达。我们认为这可能是癌细胞在浸润转移过程中发生EMT的结果，而这也很可能是其预后较差的重要原因。E-cadherin、β-catenin和Vimentin都是上皮间叶转化的重要标志物，其表达异常已在多种肿瘤中分别被证实与预后相关<sup>[14-15]</sup>。但将它们联合检测并用于预后判断的研究很少见。本组51例中同时检测到三种标志物异常表达的有13例(25.49%)，其5年无瘤生存率明显低于其他病例。我们分析认为，这些标志物同时异常表达或部分异常表达可能代表



着EMT发生的不同水平状态。由于病例数较少,我们不能分析其中两种或一种标志物异常时的预后与它们之间的差异。也可能正是这个原因,在多因素分析中,我们没有看到统计学上的差异。

不过,EMT受庞大的细胞信号网络的调节,其作用机制十分复杂,EMT的发生可以是瞬时的,并且可以被微环境的调节所逆转<sup>[8]</sup>,其在肿瘤转移中所起的作用也存在一定争议,Lou等<sup>[16]</sup>研究发现,大量原发性乳腺癌细胞67NR表达Vimentin,不表达E-cadherin,但是不发生转移;4T1细胞表达E-cadherin但可以转移;66cl4细胞表达混合型表型且发生肺转移。这一结果提示,乳腺癌细胞的转移能力并不与EMT严格相关。

稳态的肿瘤细胞要进入细胞间质完成浸润必需挣脱细胞之间的黏附,突破基底膜屏障。EMT为这个破坏过程的潜在机制提供了一个新的视野。已知EMT相关的上调和下调蛋白与肿瘤的发展相关。三阴性乳腺癌其实是一个异质性很强的乳腺癌群体,其中也包括了一部分预后良好的患者,只是目前还缺乏有效的分类方法。EMT相关蛋白在三阴性乳腺癌中的表达异常可能从一个方面预示着其容易发生转移的机制,其适当应用可能对区分该类型乳腺癌的异质性有一定价值。当然,本研究病例数有限,所得结论有待进一步验证。

#### 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):8818-25.
- [2] Bauer KR, Brown M, Cress 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):1721-8.
- [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(16):5367-74.
- [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):4429-34.
- [6] Thompson EW, Newgreen DF, Tarin D. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition?[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(14) : 5991- 95.
- [7] Hugo H, Ackland ML, Blick T, *et al.* Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression[J]. *J Cell Physiol*. 2007, 213(2):374-83.
- [8] Baumgart E, Cohen MS, Silva Neto B, *et al.* Identification and prognostic significance of an epithelial-mesenchymal transition expression profile in human bladder tumors[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(6): 1685-94.
- [9] Aamodt R, Bondi J, Andersen SN, *et al.* The prognostic impact of protein expression of E-cadherin-catenin complexes differs between rectal and colon carcinoma[J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2010,2010.
- [10] Kang H, Min BS, Lee KY, *et al.* Loss of E-cadherin and MUC2 expressions correlated with poor survival in patients with stages II and III colorectal carcinoma[J]. *Ann Surg Oncol*, 2010, 18(3): 711-9.
- [11] Chelidonis G, Kavantzias N, Patsouris E, *et al.* DNA ploidy, E-cadherin, beta-catenin expression and their clinicopathologic significance in imprints of non-small cell lung cancer[J]. *Anal Quant Cytol Histol*, 2009, 31(5): 332-9.
- [12] Moody SE, Perez D, Pan TC, *et al.* The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence[J]. *Cancer Cell*, 2005, 8(3): 197-209.
- [13] Willipinski-Stapelfeldt B, Riethdorf S, Assmann V, *et al.* Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(22): 8006-14.
- [14] Gong YP, Qi CB, Wang MW, *et al.* Prognosis of triple-negative breast cancer and its relevance to epithelial-mesenchymal transitions[J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*,2012,39(2):173-6.[龚益平,漆楚波,王明伟,等.三阴性乳腺癌的预后与上皮间叶转化的相关性[J]. *肿瘤防治研究*,2012,39(2):173-6.]
- [15] Wu Y, Li M, Tian YZ, *et al.* The expression of CD44v6 and E-cadherin are related with prognosis in invasive breast cancer[J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*,2006,33(11):791-4.[吴岳,李敏,田育璋,等. CD44v6、E-cadherin表达与乳腺浸润性癌预后的关系[J]. *肿瘤防治研究*,2006,33(11):791-4.]
- [16] Lou Y, Preobrazhenska O, auf dem Keller U, *et al.* Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is not sufficient for spontaneous murine breast cancer metastasis[J]. *Dev Dyn*, 2008, 237(10): 2755-68.

[编辑校对: 刘红武]