

## c-Src 表达在转移性乳腺癌中的预后价值\*

张凌云 滕月娥 曲秀娟 刘云鹏 侯科佐

**摘要 目的:** 实验研究表明非受体酪氨酸激酶(c-Src)与乳腺癌的转移密切相关,本研究探讨 c-Src 表达在转移性乳腺癌中的预后价值。**方法:** 收集2007年1月至2010年10月102例转移性乳腺癌患者的原发癌组织蜡块,免疫组化法检测 c-Src 的表达。回顾性分析 c-Src 表达与乳腺癌临床病理特征的关系、生存分析及Cox 风险模型,探讨 c-Src 表达对患者预后的影响。**结果:** 102例乳腺癌组织中 c-Src 表达率为 54.9%,c-Src 高表达于无进展生存期(PFS)≤3年( $P=0.048$ )的患者。生存分析显示 c-Src 阳性较阴性的患者疾病特异性生存(DSS)显著缩短( $P=0.017$ )。分层分析显示激素受体(HR)阳性/c-Src 阳性患者 DSS 最短,而 HR 阳性/c-Src 阴性的患者 DSS 最长( $P=0.016$ )。多因素分析显示,HR 阳性/c-Src 阳性、PFS≤3年、肿瘤组织学分级Ⅲ级和年龄≤35岁均是较差的 DSS 独立预测因子。**结论:** 转移性乳腺癌患者中,HR 阳性且 c-Src 阳性预测患者的不良预后。

**关键词** c-Src 转移性乳腺癌 ER/PR 预后

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.05.002

### Prognostic Value of c-Src Expression in Metastatic Breast Cancer

Lingyun ZHANG, Yuee TENG, Xiujuan QU, Yunpeng LIU, Kezuo HOU

Correspondence to: Yunpeng LIU, E-mail: cmuliuyunpeng@yahoo.cn

Department of Medical Oncology, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China

This work was supported by the National Science Foundation for Young Scientists of China (No.30700807), the Key Laboratory of Liaoning Provincial Department of Education (No.2008S246), and funds from Liaoning Provincial Department of Education (No.2010225032)

**Abstract Objective:** c-Src is reported to be critical for breast cancer progression. However, few reports have been published on the prognostic value of c-Src in breast cancer. The present study aims to explore c-Src expression and to evaluate its effects on the prognosis of metastatic breast cancer (MBC). **Methods:** Paraffin-embedded primary tumor tissue sections from 102 MBC patients were collected consecutively from January 2007 to October 2010. Immunohistochemical staining was conducted to determine c-Src expression. Clinical data during the follow up after 7 to 143 (median, 40) months after final diagnosis were analyzed in retrospect. Survival analysis and the Cox proportional hazards model were used to explore the prognostic value of c-Src expression in breast cancer. **Results:** The c-Src expression rate in 102 MBC patients was 54.9%. The c-Src expression rate was significantly higher among breast cancer patients with a progression-free survival (PFS) of less than 3 years ( $P = 0.048$ ). The survival analysis clearly indicated that patients with positive c-Src expression had poor disease-specific survival (DSS) compared with those with negative expression ( $P = 0.017$ ). The stratified analysis demonstrated that c-Src expression showed a significantly poor DSS ( $P = 0.016$ ) in estrogen receptor/progesterone receptor -positive patients. No significant differences in DSS were observed ( $P = 0.904$ ) among HR-negative patients. The multivariate analysis indicates that HR+/c-Src+ expression and the histologic grading of tumors and age below 35 years are the independent predictors of DSS for MBC patients. **Conclusion:** A positive hormone receptor plus HR+/c-Src+ expression predicts a poor prognosis in MBC patients.

**Keywords** c-Src; Metastatic breast cancer; ER/PR; Prognosis

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,死亡率占所有女性肿瘤的第2位<sup>[1]</sup>。尽管治疗的新药、新方法不断更新,患者生存率明显升高,但仍有相当一部分乳腺癌患者发生远处转移。统计学显示,转移性乳腺癌患者预计生存期为2~3年,但仍有25%~30%的患者生存超过5年,10%的患者生存超过10

年,目前国内外对于转移性乳腺癌的预后研究十分有限。

Src 基因是第1个被发现的有内在酪氨酸激酶活性的人类癌基因<sup>[2]</sup>。c-Src 蛋白作为非受体酪氨酸激酶,介导生长因子、黏附因子、趋化因子等多条下游信号通路。在人类许多肿瘤中,如胃癌、结肠癌、乳

作者单位:中国医科大学附属第一医院肿瘤内科(沈阳市110001)

\*本文课题受国家自然科学基金(编号:30700807)、辽宁省高等学校科研项目计划(编号:2008S246)和辽宁省科学技术计划项目(编号:2010225032)资助

通信作者:刘云鹏 cmuliuyunpeng@yahoo.cn

腺癌和胰腺癌均存在 c-Src 蛋白的过度表达和活化<sup>[3]</sup>。文献报道 c-Src 在介导乳腺癌及肺癌细胞的迁移、侵袭中发挥非常重要的作用<sup>[4-5]</sup>。体外研究结果显示 Src 能促进乳腺癌的肺转移和骨转移<sup>[6-7]</sup>，早期乳腺癌中 c-Src 高表达可预测患者较低的总生存率，但是 c-Src 表达对晚期乳腺癌患者预后的影响鲜见报道。本研究采用免疫组化方法探讨 c-Src 表达与晚期乳腺癌患者临床病理特征的关系及对预后的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 组织标本及患者情况 收集本院 2007 年 1 月至 2010 年 10 月具有完整病例及随访资料的 102 例转移性乳腺癌患者的原发癌组织蜡块，所有患者均接受规范的综合治疗，包括手术、蒽环/紫杉为基础的化疗及放疗，激素受体阳性患者接受至少 5 年以上的内分泌治疗。至随访截止时，有 27 例患者仅发生骨转移，40 例仅发生内脏转移或未伴淋巴结转移，34 例合并发生骨及内脏转移。中位随访时间为 40 (7~143) 个月。患者均为女性，发病年龄 26~76 岁，中位年龄 52 岁。本研究经中国医科大学伦理委员会批准，所有患者已签署知情同意书。

定义患者的无疾病生存期 (PFS) 为肿瘤诊断日期至发生第一次远处转移或癌症相关性死亡发生的时间。疾病特异性生存 (DSS) 定义为肿瘤诊断至发生癌症相关性死亡或末次随访的时间。

1.1.2 试剂 鼠抗人 c-Src 单克隆抗体购于 Santa Cruz 公司，SP 法免疫组化检测试剂盒、DAB 显色液均购于福州迈新生物技术开发有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 实验方法 用 SP 免疫组织化学法检测乳腺癌组织中 c-Src 的表达。石蜡切片先行常规二甲苯脱蜡 3 次，梯度乙醇水化后蒸馏水洗涤 4 次，2 min/次。再行 0.1 mol/L PBS 洗涤 3 次，3 min/次，甩干，滴加内源性过氧化酶阻断剂，室温下孵育 10 min。PBS 洗涤 3 次，3 min/次；滴加正常血清封闭液，室温下孵育 10 min，除去多余液体；滴加 c-Src 单抗 (1:250 稀释)，4℃ 冰箱放置过夜；0.1 mol/L PBS 洗涤 3 次，3 min/次；滴加生物素标记的第二抗体，室温下孵育 10 min，0.1 mol/L PBS 洗涤 3 次，3 min/次，滴加试剂链霉菌抗生物素-过氧化物酶溶液，室温下孵育 10 min；0.1 mol/L PBS 洗涤 3 次，3 min/次；滴 DAB 显色剂，室温下孵育 5 min；苏木精复染，自来水冲洗返蓝，脱水，二甲苯透明，中性树脂封片，显微镜下观察。用已知的乳腺癌阳性切片作为阳性对照，用 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.2.2 免疫组化结果的判定标准 采用单盲法阅片

(2 位观测者不了解患者的临床资料)，参照 Broustas 等<sup>[8]</sup>的方法来分免疫组化的表达水平，根据切片阳性细胞率和阳性细胞着色强度分别记分，胞浆和核膜染色为棕黄色或深棕黄色为阳性，细胞染色：0~9% 为 0 分；10%~50% 为 1 分；≥50% 为 2 分。着色强度：阴性为 0 分；弱阳性为 1 分，中等强度为 2 分，强阳性为 3 分。以上两项乘积即为该例病变的 c-Src 免疫组化评分，阳性组计为 ≥2 分，阴性组计为 0~1 分。

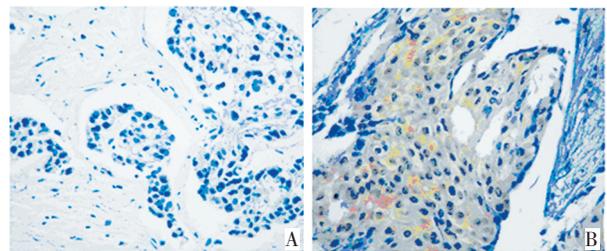
### 1.3 统计学及随访方法

定期来院或电话方式随访患者。组间差异采用  $\chi^2$  检验和 Fisher 精确概率法。当总例数 >40，所有理论数 >1，且至少一个理论数 <5 或例数 <40，或有理论数 <2 时应用 Fisher 精确概率法。应用 Kaplan-Meier 法进行生存分析，Log-rank 检验差异性，并进行 Cox 单因素及多因素分析。全部的统计检验均为双侧概率检验，检验水准  $\alpha=0.05$ 。采用 SPSS 16.0 统计软件分析处理。

## 2 结果

### 2.1 c-Src 在乳腺癌组织中的表达

本组乳腺癌标本中 c-Src 染色阳性 56 例，占 54.9%；c-Src 染色阳性反应物呈棕黄色颗粒，以胞浆为主 (图 1)。



A: 阴性对照; B: 阳性表达

图 1 乳腺癌组织中 c-Src 的表达

Figure 1 c-Src expression in breast cancer

### 2.2 c-Src 表达与临床病理特征的关系

如表 1 所示，c-Src 在患者疾病诊断时 T 分期、组织学分级、淋巴结转移、激素受体状况、转移部位的表达无显著性差异，c-Src 高表达于 PFS ≤ 3 年的患者 ( $P=0.048$ )。

### 2.3 c-Src 在乳腺癌组织中的表达与预后的关系

生存分析显示 c-Src 阳性的患者较阴性的患者 DSS 显著缩短 ( $P=0.017$ , 图 2A)，根据激素受体状况 (HR) 进行分层。生存分析显示，HR 阳性/c-Src 阳性的乳腺癌患者 DSS 最短；HR 阳性/c-Src 阴性的乳腺癌患者 DSS 最长 ( $P=0.016$ )，而 HR 阴性的乳腺癌中，c-Src 表达不影响患者的 DSS ( $P=0.904$ , 图 2B)。单因素分析显示 HR 阳性/c-Src 阳性、诊断时年龄 <35 岁、

组织学分级Ⅲ级及PFS≤3年是DSS的不良预后因素。多因素分析显示上述临床病理学特征可独立预测转移性乳腺癌患者的DSS(表2)。

表1 102例转移性乳腺癌原发癌组织c-Src表达与临床病理学参数的关系 例(%)

Table 1 Association between c-Src expression and clinicopathologic parameters in 102 metastatic breast cancer patients

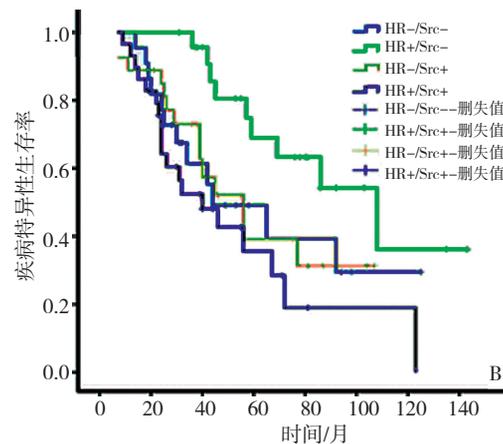
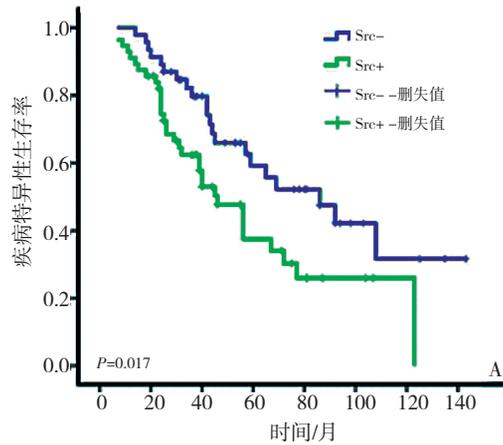
临床病理学参数	例数	c-Src 阳性	P*
<b>癌组织类型</b>			
浸润性导管癌	87	49(56.32)	0.488
浸润性小叶癌及其他	15	7(46.67)	
浸润性小叶癌	6	4(66.67)	
其他	9	3(33.33)	
<b>年龄/岁</b>			
≤35	7	5(71.43)	0.453
>35	95	51(53.68)	
<b>分期</b>			
pT <sub>1</sub>	17	9(52.94)	0.859
pT <sub>2-4</sub>	85	47(55.29)	
<b>淋巴结转移</b>			
阴性	17	11(64.71)	0.374
阳性	85	45(52.94)	
<b>组织学分级*</b>			
I + II	74	39(52.70)	0.598
III	22	13(59.09)	
<b>ER/PR 状态</b>			
阴性	49	27(55.10)	0.969
阳性	53	29(54.72)	
<b>HER-2 状态</b>			
阴性	54	29(53.70)	0.967
阳性	16	9(56.25)	
不明	32	18(56.25)	
<b>首次疾病进展时间/月</b>			
≤36	80	48(60.00)	0.048
>36	22	8(36.36)	
<b>转移部位</b>			
骨	27	16(59.26)	0.768
内脏及远处淋巴结	40	22(55.00)	
骨及内脏	34	17(50.00)	

\*浸润性导管癌96例

表2 单因素及多因素分析转移性乳腺癌患者的预后因素

Table 2 Cox regression analysis of the disease-specific survival of metastatic breast cancer patients

风险因素	单因素分析			多因素分析		
	相对危险度(HR)*	95% CI	P	相对危险度(HR)*	95% CI	P
HR/Src 阳性 vs. 其他亚组	1.991	1.132 ~ 3.501	0.017	1.906	1.042 ~ 3.487	0.036
年龄≤35岁 vs. >35岁	4.470	1.911 ~ 10.460	0.001	4.359	1.761 ~ 10.791	0.001
肿块直径>2 cm vs. <2 cm	1.219	0.574 ~ 2.586	0.606	—	—	—



A: c-Src 阳性与阴性患者的生存曲线; B: 根据激素受体状态分层进行生存分析

图2 c-Src 阳性与阴性转移性乳腺癌患者的生存曲线

Figure 2 Survival curves of the metastatic breast cancer patients with c-Src expression and those without c-Src expression

### 3 讨论

非受体酪氨酸激酶c-Src在调节肿瘤血管生成、细胞增殖、生存、迁移及侵袭等方面起着非常重要的作用<sup>[2]</sup>。文献报道乳腺癌组织较正常乳腺组织c-Src表达显著升高,且乳腺癌组织中c-Src常存在异常活化,介导下游多条信号通路的改变。体外研究显示,c-Src表达在乳腺癌的进展中尤其是肺转移及骨转移中发挥重要作用。目前关于c-Src对乳腺癌预后的研究主要集中于不同位点磷酸化的c-Src水平对早期乳腺癌预后的影响,且结论不一致<sup>[9-10]</sup>。而c-Src表达对转移性乳腺癌患者预后的影响鲜见报道。

(续表2)

风险因素	单因素分析			多因素分析		
	相对危险度(HR)*	95% CI	P	相对危险度(HR)*	95% CI	P
淋巴结阳性 vs. 阴性	1.445	0.681 ~ 3.063	0.337	—	—	—
组织学分级Ⅲ组 vs. I ~ II组	1.911	1.041 ~ 3.511	0.037	2.216	1.157 ~ 4.246	0.016
HER-2 阳性 vs. 阴性	1.436	0.666 ~ 3.094	0.356	—	—	—
PFS ≤3年 vs. >3年	3.734	1.766 ~ 7.897	0.001	3.118	1.411 ~ 6.889	0.005

\*HR:风险比 CI可信区间 P&lt;0.05

文献报道可手术的乳腺癌中 c-Src 表达率为 80% ~ 100%<sup>[11-12]</sup>, 本研究中显示转移性乳腺癌患者原发癌组织 c-Src 阳性表达率为 54.9%, 低于文献报道。但本研究中对 c-Src 表达阳性定义的标准比文献定义更严格, 可能导致报道的 c-Src 表达率偏低。

目前已知的晚期乳腺癌预后因子有转移部位、治疗情况、首次疾病进展时间及原发肿瘤预后因素等<sup>[13]</sup>。本研究显示 c-Src 表达率在年轻乳腺癌患者及早期出现疾病进展的患者中显著增高, 提示 c-Src 的高表达预测转移性乳腺癌预后较差。生存分析显示, c-Src 高表达的患者 DSS 较 c-Src 低表达的患者显著缩短, 但多因素分析未显示出其独立的预后价值。进一步根据患者 HR 状况分层分析, 结果显示, HR 阳性/c-Src 阳性的乳腺癌患者 DSS 最短, HR 阳性/c-Src 阴性的乳腺癌患者 DSS 最长。而 HR 阴性的乳腺癌中, c-Src 表达不影响患者的 DSS。多因素分析显示, HR 阳性/c-Src 阳性、PFS ≤3 年、肿瘤组织学分级Ⅲ级、患者年龄 ≤35 岁均为转移性乳腺癌患者的不良预后因素, 而 HER-2 状态、原发肿块直径、淋巴结转移情况未显示其预后相关性, 可能的原因是本研究样本量相对较小, 尚未完全体现出原发肿瘤相关预后因素的价值。

本研究显示 HR 阳性/c-Src 阳性独立预测转移性乳腺癌患者的不良预后。而在 HR 阴性患者中, c-Src 表达不影响患者的预后。需进一步大样本、多中心的前瞻性研究来证实 c-Src 表达在转移性乳腺癌患者中的预后价值。

## 参考文献

- 1 Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010[J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5): 277-300.
- 2 Aleshin A, Finn RS. SRC: a century of science brought to the clinic[J]. Neoplasia, 2010, 12(8): 599-607.
- 3 Mayer EL, Krop IE. Advances in targeting SRC in the treatment of breast cancer and other solid malignancies[J]. Clin Cancer Res, 2010,

16(14): 3526-3532.

- 4 Hiscox S, Jordan NJ, Morgan L, et al. Src kinase promotes adhesion-independent activation of FAK and enhances cellular migration in tamoxifen-resistant breast cancer cells[J]. Clin Exp Metastasis, 2007, 24(3): 157-167.
- 5 Meng XN, Jin Y, Yu Y, et al. Characterisation of fibronectin-mediated FAK signalling pathways in lung cancer cell migration and invasion[J]. Br J Cancer, 2009, 101(2): 327-334.
- 6 Myoui A, Nishimura R, Williams PJ, et al. C-SRC tyrosine kinase activity is associated with tumor colonization in bone and lung in an animal model of human breast cancer metastasis[J]. Cancer Res, 2003, 63(16): 5028-5033.
- 7 Zhang XH, Wang Q, Gerald W, et al. Latent bone metastasis in breast cancer tied to Src-dependent survival signals[J]. Cancer Cell, 2009, 16(1): 67-78.
- 8 Broustas CG, Ross JS, Yang Q, et al. The proapoptotic molecule BLID interacts with Bcl-XL and its downregulation in breast cancer correlates with poor disease-free and overall survival[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(11): 2939-2948.
- 9 Ito Y, Kawakatsu H, Takeda T, et al. Activation of c-Src is inversely correlated with biological aggressiveness of breast carcinoma[J]. Breast Cancer Res Treat, 2002, 76(3): 261-267.
- 10 Elsberger B, Tan BA, Mitchell TJ, et al. Is expression or activation of Src kinase associated with cancer-specific survival in ER-, PR- and HER2-negative breast cancer patients[J]? Am J Pathol, 2009, 175(4): 1389-1397.
- 11 Morgan L, Gee J, Pumford S, et al. Elevated Src kinase activity attenuates Tamoxifen response in vitro and is associated with poor prognosis clinically[J]. Cancer Biol Ther, 2009, 8(16): 1550-1558.
- 12 Kanomata N, Kurebayashi J, Kozuka Y, et al. Clinicopathological significance of Y416Src and Y527Src expression in breast cancer[J]. J Clin Pathol, 2011, 64(7): 578-586.
- 13 Chang J, Clark GM, Allred DC, et al. Survival of patients with metastatic breast carcinoma: importance of prognostic markers of the primary tumor[J]. Cancer, 2003, 97(3): 545-553.

(2011-07-05 收稿)

(2012-02-15 修回)

(张佺校对)