

Slug、E-cadherin、Vimentin 及 β -catenin 在基底细胞样乳腺癌中的表达

冯迪, 耿敬姝, 于晓宇, 蒋 旸
(哈尔滨医科大学附属肿瘤医院, 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要: [目的] 观察 Slug 在基底细胞样乳腺癌(BLBC)中的表达情况及其与上皮间质转化(EMT)的关系。[方法] 依照免疫组化表型筛选出 BLBC、管腔 A、管腔 B/C、Her-2 过表达及正常乳腺样型共 147 例乳腺癌, 采用 EnVision 两步法检测各亚型中 Slug、E-cadherin、Vimentin 及 β -catenin 的表达情况。[结果] 41 例 BLBC 中 Slug、Vimentin 阳性率分别为 63.4%(26/41) 和 39.0%(16/41)。E-cadherin 表达减弱率为 63.4%(26/41)、 β -catenin 异常表达率为 53.7%(21/41)。BLBC 组中 Slug、Vimentin 阳性率高于其他各亚型 ($P<0.01$)。BLBC 组中 Slug 表达与 E-cadherin 表达减弱和 Vimentin 表达上调存在相关性 ($P<0.05$)。BLBC 组中 Slug 阳性表达与组织学分级、淋巴结转移相关。[结论] EMT 可能是造成 BLBC 特殊生物学行为的原因, 并且受 Slug 基因表达的调节。

关键词: 乳腺癌; Slug; 基底细胞样; EMT

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2013)09-0757-05

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2013.09.A018

Expression of Slug, E-cadherin, Vimentin and β -catenin in Basal-like Breast Cancer

FENG Di, GENG Jing-shu, YU Xiao-yu, et al.

(Harbin Medical University Tumor Hospital, Harbin 150081, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of Slug in basal-like breast carcinoma (BLBC) and its relationship with epithelial-mesenchymal transition (EMT). [Methods] One hundred and forty-seven cases of breast cancers including BLBC, Luminal A, Luminal B, Her-2 overexpression and normal breast-like were enrolled based on immunophenotypes. The expression of Slug, E-cadherin, Vimentin and β -catenin were detected by immunohistochemistry. [Results] Slug and Vimentin positive rate in 41 cases of BLBC were 63.4%(26/41) and 39.0%(16/41) respectively. E-cadherin expression weakened in 26 cases (63.4%). β -catenin abnormal expression was observed in 21 cases (53.7%). The positive rates of Slug and Vimentin were higher in BLBC than those in other subtypes of breast cancer ($P<0.01$). Slug expression significantly related to E-cadherin reduced expression and Vimentin increased expression ($P<0.05$). Slug positive expression related to grade and lymph node metastasis in BLBC. [Conclusion] EMT might be the cause of special biologic behavior in BLBC and be regulated by expression of Slug.

Key words: breast cancer; Slug; basal-like; EMT

乳腺癌是一类具有高度异质性的肿瘤。近年来, 多数学者支持根据 cDNA 组织芯片基因表型, 将乳腺癌分为 5 种亚型^[1]: 管腔 A 型(Luminal A)、管腔 B 型(Luminal B)、Her-2 过表达型(Her-2 overexpressing)、正常乳腺样型(normal breast-like)及基底细胞样型(basal-like breast cancer, BLBC), 每种亚型都具有相

对独立的生物学行为及临床预后。但由于基因分析常规应用的局限性, 免疫组化检测被认为是最便捷的判断方法, 而其中以 Nielsen 等^[2]提出的免疫组化标准被认为最具说服力。分子亚型中的基底细胞样乳腺癌是一组具有肌上皮/基底细胞免疫表型特征的乳腺癌, 其侵袭、浸润能力较强^[3], 但造成其特殊生物学行为的原因尚不明确。上皮间质转化(epithelial mesenchymal transitions, EMT) 是肿瘤获得浸润和转

收稿日期: 2013-07-03; 修回日期: 2013-08-02

通讯作者: 耿敬姝, E-mail: jingshugeng@me.com

移能力的一种重要方式。有研究显示 EMT 在乳腺癌的侵袭、转移中具有重要的作用。本文通过检测锌指转录因子 Slug 及上皮间质转化因子 E-cadherin、Vimentin、 β -catenin 在 BLBC 和其他各组亚型中的表达,分析基底细胞样型与 EMT 之间的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料

实验组织 150 例(147 例可评价)选自哈尔滨医科大学附属肿瘤医院病理科 2008~2009 年乳腺癌外科手术切除标本,同时具有 ER、PR、Her-2 免疫组织化学表达结果,患者年龄 29~75 岁,平均年龄 50.6 岁,中位年龄 51 岁。其中管腔 A 组 30 例,管腔 B 组 30 例,Her-2 过表达组 30 例,三阴性组 60 例。三阴性组中,表达 CK5/6 和(或) EGFR 者为基底细胞样型,CK5/6 及 EGFR 阴性者为正常乳腺样型(Table 1)。

1.2 主要试剂

所用抗体 Slug 兔抗人(sc-15391)多克隆抗体购自美国 Santa Cruz,CK5/6、EGFR、E-cadherin、Vimentin(V9)、免疫组织化学 PV9000 通用型二步法检测试剂盒及 DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 免疫组织化学染色

所有标本经 10%福尔马林固定,石蜡包埋,连续 4 μ m 厚切片,0.01mol/L 柠檬酸盐缓冲液或 EDTA 抗原修复,EnVision 二步法免疫组化染色。所用抗 Slug 抗体浓度为 1:50,其余抗体为即用型,染色步骤按说明书进行,DAB 显色,苏木素复染,透明封固。

1.4 结果判定

由于 Slug 为核转录因子,本实验以胞核伴或不伴胞浆出现棕黄色染色即判定为阳性^[4]。Vimentin 为胞浆着色,有明确的癌细胞染色即判定为阳性;CK5/6 为胞浆着色,EGFR 为包膜着色,随机计数 5

个高倍视野($\times 400$),根据阳性细胞数占视野中细胞总数的百分比进行判断: $\geq 10\%$ 为表达阳性,不表达或 $<10\%$ 为表达阴性;E-cadherin、 β -catenin 阳性染色主要定位于细胞膜, $\geq 50\%$ 为正常表达, $<50\%$ 为减弱表达,如胞核出现棕黄色为异位表达,表达减少或异位表达均认定为异常表达^[5]。

1.5 统计学处理

统计分析采用 SPSS17.0 软件。不同组间率的比较采用 Pearson χ^2 检验或 Fisher 精确概率法。相关性分析采用 Spearman 等级相关分析方法。

2 结果

2.1 CK5/6、EGFR 在三阴性组中的表达

三阴性组[ER-、PR-、Her-2-]有效样本共 59 例,其中 1 例由于脱片无法判定结果。采用 Nielsen 等^[2]提出的免疫指标配伍用于判断 BLBC,确定基底细胞样型共 41 例,占全体三阴性组的 69.50%,其余 18 例,确定为正常乳腺样组。

2.2 Slug 在各组亚型中的表达

正常乳腺中 Slug 不表达,本组实验中 Slug 阴性 89 例;其中包括 BLBC 组 15 例,管腔 A 组 20 例,管腔 B 组 20 例,Her-2 过表达组 21 例,正常乳腺样组 13 例。Slug 阳性表达共 58 例;其中 BLBC 组(Figure 1)为 26 例,占 63.4%(26/41),高于管腔 A 组 28.6%(8/28),管腔 B 组 33.3%(10/30),Her-2 过表达组 30.0%(9/30)及正常乳腺样组 27.8%(5/18)($\chi^2=13.862, P=0.008$)(Table 2)。

2.3 E-cadherin 在各组亚型中的表达

BLBC 组中 E-cadherin 表达减弱(Figure 2)26 例,占 63.4%(26/41),高于管腔 A 组 21.4%(6/28),管腔 B 组 33.3%(10/30),Her-2 过表达组 36.7%(11/30)及正常乳腺样组 26.7%(4/15)($\chi^2=16.542, P=0.002$)(Table 2)。

Table 1 Immunophenotype and prognosis of breast cancer molecular subtype

Phenotype	Immunophenotype	Prognosis
Luminal A	ER and(or)PR+、Her-2-	Good
Luminal B	ER and(or)PR+、Her-2+	Relatively good
Her-2 over-expressing	ER and(or)PR-、Her-2+	Poor
BLBC	ER、PR、Her-2 triple negative, CK5/6、EGFR positive	Worst
Normal breast-like	ER、PR、Her-2、CK5/6、EGFR negative	Relatively good

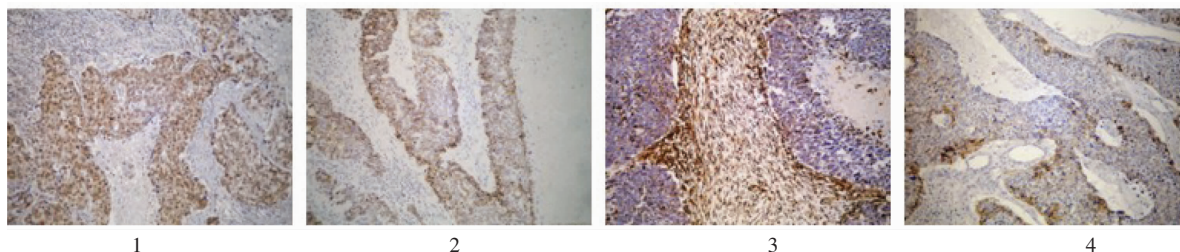


Figure 1 Slug positive nuclear expression in BLBC(SP×100)
Figure 2 E-cadherin membrane expression reduced in BLBC(SP×100)
Figure 3 Vimentin positive expression in BLBC(SP×100)
Figure 4 β-catenin membrane expression reduced in BLBC(SP×100)

Table 2 The expression of Slug、E-cadherin、Vimentin and β-catenin in BLBC and other subtypes

Variable	BLBC	Luminal A	Luminal B	Her-2 over expressing	Normal-like	χ^2	P value
Slug							
Positive	26(63.4)	8(28.6)	10(33.3)	9(30.0)	5(27.8)	13.862	0.008
Negative	15(36.6)	20(71.4)	20(66.7)	21(70.0)	13(72.2)		
E-cadherin							
Reduce	26(63.4)	6(21.4)	10(33.3)	11(36.7)	4(26.7)	16.542	0.002
Normal	15(36.6)	22(78.6)	20(66.7)	19(63.3)	14(73.3)		
Vimentin							
Positive	16(39.0)	6(21.4)	4(13.3)	5(16.7)	2(11.1)	9.824	0.043
Negative	25(61.0)	22(78.6)	26(86.7)	25(83.3)	16(88.9)		
β-catenin							
Abnormal	21(51.2)	6(21.4)	12(40.0)	9(30.0)	4(22.2)	8.907	0.063
Normal	20(48.8)	22(78.6)	18(60.0)	21(70.0)	14(77.8)		

2.4 Vimentin 在各组亚型中的表达

BLBC 组中 Vimentin 阳性(Figure 3)率为 39.0% (16/41), 高于管腔 A 组 21.4% (6/28), 管腔 B/C 组 13.3% (4/30), Her-2 过表达组 16.7% (5/30) 及正常乳腺样组 11.1% (2/18) ($\chi^2=9.824, P=0.043$) (Table 2)。

2.5 β-catenin 在各组亚型中的表达

BLBC 亚型中 β-catenin 异常表达(Figure 4)率最高为 51.2% (21/41), 高于管腔 A 组 21.4% (6/28), 管腔 B/C 组 13.3% (4/30), Her-2 过表达组 16.7% (9/30) 及正常乳腺样组 22.2% (4/18) ($\chi^2=8.907, P=0.063$) (Table 2)。

2.6 BLBC 组中各因子的关系

Slug 表达与 E-cadherin 表达呈负相关 ($r=-0.272, P=0.001$)。Slug 表达与 Vimentin 表达呈正相关 ($r=0.166, P=0.044$), 而与 β-catenin 表达呈负相关 ($r=-0.174, P=0.035$), Vimentin 与 E-cadherin 表达呈负相关 ($r=-0.174, P=0.035$)。

2.7 BLBC 组中各因子表达与临床病理参数间的关系

BLBC 组与其他各亚组比较, 年龄、家族史、绝经状况、肿物直径、组织学分级、淋巴结转移情况均无统计学差异。41 例 BLBC 包括 38 例浸润性导管癌, 1 例髓样癌, 1 例黏液癌及 1 例化生性癌。Slug 阳性表达与组织学分级、腋窝淋巴结转移相关 ($P<0.05$), 而与年龄、家族史、绝经状况及肿物大小无关。随着 BLBC 组中组织学分级增高以及腋窝淋巴结转移的发生, E-cadherin 表达降低 ($P<0.05$) (Table 3)。

3 讨 论

上皮间质转化(EMT)是病理情况下上皮细胞向间充质细胞分化的现象, 1982 年 Greenberg 等^[6]发现晶状体上皮细胞可以在胶原凝胶中转变为间质细胞形态, 从而提出了 EMT 的概念。随后陆续有报道指出, EMT 不仅是多细胞生物胚胎发育与器官形成

Table 3 Relationship between different factors and clinicopathological features of BLBC

Characteristics	Cases	Slug			E-cadherin			Vimentin			β-catenin		
		n(%)	χ^2	P	n(%)	χ^2	P	n(%)	χ^2	P	n(%)	χ^2	P
Age(years)			0.322	0.570		2.035	0.154		1.328	0.249		0.016	0.904
≤50	25	15(60.00)			18(72.00)			8(32.00)			13(52.00)		
>50	16	11(68.75)			8(50.00)			8(50.00)			8(50.00)		
Family history			1.649	0.199		2.105	0.147		9.081	0.003		4.364	0.037
No	27	19(70.37)			15(55.56)			15(55.56)			17(62.96)		
Yes	14	7(50.00)			11(78.57)			1(7.14)			4(28.57)		
Menopausal status			0.146	0.702		0.073	0.786		6.740	0.009		0.241	0.623
Pro	23	14(60.87)			15(65.22)			13(56.52)			11(47.83)		
Post	18	12(66.67)			11(61.11)			3(16.67)			10(55.56)		
Grade			6.388	0.011		4.795	0.029		0.225	0.635		0.838	0.360
I ~ II	17	7(41.18)			8(47.06)			6(35.29)			8(47.06)		
III	21	17(81.00)			17(80.95)			9(42.86)			13(61.90)		
Tumor size(cm)			3.688	0.055		2.445	0.118		0.545	0.460		0.053	0.819
≤2	28	15(53.57)			20(71.43)			12(42.86)			14(50.00)		
>2	13	11(84.62)			6(46.15)			4(30.77)			7(53.85)		
Lymph node metastasis			6.190	0.013		6.190	0.013		0.788	0.375		1.172	0.279
No	17	7(41.18)			7(41.18)			8(47.06)			7(41.18)		
Yes	24	19(79.17)			19(79.17)			8(33.33)			14(58.33)		

中的基础过程,并且在肿瘤浸润、转移以及各种慢性疾病的发生发展中起着重要的作用^[7,8]。发生 EMT 的上皮细胞经历短暂的结构改变后,极性丧失,与周围细胞和基质的接触减少,细胞的迁徙和运动能力增强。同时细胞表型发生改变,上皮表型(如 E-cadherin,角蛋白丝等)逐渐丧失,从而获得间质表型(如 Vimentin,纤维连接蛋白等)的表达。研究证实,许多 EMT 的关键因子在肿瘤浸润、转移中具有重要的作用。本实验通过免疫组化方法观察 Slug 等 EMT 关键因子在 BLBC 及其他亚型乳腺癌中的表达情况,从上皮间质转化角度揭示 BLBC 特殊生物学行为的内在机制。

锌指转录因子 Snail 超家族一般由一个含有 4~6 个锌指结构域的高度保守的羟基和一个氨基末端组成。Slug 作为 Snail 家族成员之一,参与调控胚胎发育和肿瘤发生,其编码的转录因子表达于不同组织发育的各阶段,对于原肠胚和中胚层的形成都是必需的^[9]。Slug 是 E-cadherin 启动子的抑制子,能够特异抑制黏附连接成分(E-cadherin 和 β-catenin),紧密连接成分(如 Occludin 和 Zol-1)协调减少细胞间的黏附^[10],在调节 EMT 的过程中具有关键作用^[11]。本实验发现,在乳腺癌分子亚型中,Slug 蛋白在 BLBC 组中的表达水平明显高于管腔 A 组,管腔 B/C

组,Her-2 过表达组以及正常乳腺样组 ($P<0.05$),提示 Slug 高表达与 BLBC 相关。Storci 等^[12]运用 RT-PCR 等方法测定 67 例乳腺癌中 Slug 在 mRNA 水平的表达,基底细胞样表型表现 Slug 高表达。文献报道与实验结论均支持这一观点。

EMT 的重要特征是失去上皮性的标记而获得间质细胞的标记,发生 EMT 的细胞其侵袭和转移能力增强^[13,14]。为了进一步阐述 BLBC 特殊生物学行为的产生原因,我们还检测了 E-cadherin 和 Vimentin 在乳腺癌中的表达。E-cadherin 是 EMT 的关键因子,是一种钙依赖性跨膜糖蛋白,主要分布于细胞膜,介导细胞同质黏附反应^[15]。E-cadherin 表达减弱或丢失会导致癌细胞之间连接松散,易于脱落。在本实验中,BLBC 组 E-cadherin 表达减弱率为 63.4%,为各亚型乳腺癌中减弱最明显的一组($P<0.05$)。可见,BLBC 与 EMT 关系密切。而 Vimentin 作为间叶分化的标志物,是细胞发生 EMT 更为有力的证据,本实验研究了 Vimentin 在各亚型中的表达,在 BLBC 组中癌细胞 Vimentin 阳性表达率为 39%,远高于其他亚型。我们进一步分析 Slug、E-cadherin 及 Vimentin 三者表达的关系发现,Slug 表达与 E-cadherin 表达下调($r=-0.272, P=0.01$)及 Vimentin 的高表达($r=0.166, P=0.44$)均显著性相关。结果提示 Slug 可能通过调

控 E-cadherin 及 Vimentin 表达来改变细胞的状态,使上皮细胞获得间叶细胞的特质,从而导致 EMT 的发生。

BLBC 较其他各亚型在年龄、肿物大小、组织学分级及淋巴结转移率等情况差异均无统计学意义。然而我们分析了 BLBC 组中 Slug、E-cadherin、Vimentin 表达情况与临床病理特征的关系发现,Slug 阳性表达及 E-cadherin 表达减弱的病例,其组织学分级较高且更易发生腋窝淋巴结转移。我们推测,虽然 BLBC 的转移模式并非以腋窝淋巴结转移为主,但伴 EMT 表型的比不伴 EMT 表型的 BLBC 更易发生淋巴结转移。

除此之外,本实验还检测了 β -catenin 在各亚型乳腺癌中的表达情况, β -catenin 是一种胞内蛋白,具有双重功能;一是介导细胞 E 钙黏连素的重要结构分子,其异常改变在肿瘤侵袭、转移中具有重要作用;二是 WNT 信号传导途径的关键信号分子,与肿瘤发生密切相关^[16,17]。在本实验各亚型乳腺癌中, β -catenin 在 BLBC 组中异常表达率高于其他各组,但差异无统计学意义。相关性分析显示 Slug 与 β -catenin 表达呈负相关($r=-0.218, P=0.008$)。同时,随着 E-cadherin 表达减弱率的增高, β -catenin 异常表达增高。在 BLBC 组中 Slug 阳性表达与 β -catenin 异位表达之间呈显著性相关。因此,可能由于 Slug 基因高表达激活 WNT 信号转导途径,进而调控 EMT 的发生,使 BLBC 较其他各亚型具有特殊的生物学行为。

综上所述,我们认为 EMT 是造成 BLBC 较其他乳腺癌亚型具有独特生物学行为的原因,并且我们推测 EMT 是由 Slug 基因表达调节而产生的。

参考文献:

- [1] Perou CM, Serlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours[J]. Nature, 2000, 406(6797):747-752.
- [2] 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):5367-5374.
- [3] Kahlert UD, Nikkiah G, Maciarczyk J. Epithelial-to-mesenchymal(-like) transition as a relevant molecular event in malignant gliomas[J]. Cancer Lett, 2013, 331(2):131-138.
- [4] Come C, Magnino F, Bibeau F, et al. Snail and Slug play distinct roles during breast carcinoma progression[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(18):5395-5402.
- [5] Wu WX, Han WL, Zhang YP, et al. Clinicopathologic characteristics of breast cancer with basal-like immunophenotype[J]. Chinese Journal of Pathology, 2008, 37(11):519-523. [邬万新, 韩文兰, 张燕萍, 等. 基底细胞样型乳腺癌的临床病理观察[J]. 中华病理学, 2008, 37(11):519-523.]
- [6] Greenburg G, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells[J]. Cell Biol, 1982, 95(1):333-339.
- [7] Boyer B, Vall S, Edme N. Induction and regulation of epithelial mesenchymal transitions[J]. Biochem Pharmacol, 2000, 60(8):1091-1099.
- [8] Le Bras GF, Taubenslag KJ, Andl CD. The regulation of cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition, motility and tumor progression[J]. Cell Adh Migr, 2012, 6(4):365-373.
- [9] Nieto MA, Sargent MG, Wilkinson DG, et al. Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene[J]. Science, 1994, 264(5160):835-839.
- [10] Kurrey NK, Amit K, Bapat SA. Snail and Slug are major determinants of ovarian cancer invasiveness at the transcription level[J]. Gynecol Oncol, 2005, 97(1):155-165.
- [11] Prasad CP, Rath G, Mathur S, et al. Expression analysis of E-cadherin, Slug and GSK3 β in invasive ductal carcinoma of breast[J]. BMC Cancer, 2009, 9:325.
- [12] Storci G, Sansone P, Trere D, et al. The basal-like breast carcinoma phenotype is regulated by Slug gene expression[J]. Pathol, 2008, 214(1):25-37.
- [13] Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Monville F, et al. Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers[J]. Oncogene, 2006, 25(15):2273-2284.
- [14] Grunert S, Jeehlinger M, Beug H. Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(8):657-665.
- [15] Yang GZ, Gao LX, Ding HY. Basal-like breast carcinoma [J]. Chinese Journal of Diagnostic Pathology, 2008, 14(2):241-244. [杨光之, 高岚湘, 丁华野. 乳腺基底细胞样癌[J]. 诊断病理学杂志, 2008, 14(2):241-244.]
- [16] Xu WH, Liu ZB, Yang C, et al. Expression of dickkopf-1 and beta-catenin related to the prognosis of breast cancer patients with triple negative phenotype[J]. PLoS One, 2012, 7(5):e37624.
- [17] Zappulli V, De Cecco S, Trez D, et al. Immunohistochemical expression of E-cadherin and β -catenin in feline mammary tumours[J]. Comp Pathol, 2012, 147(2-3):161-170.