

乳腺癌 CC 类趋化因子 5 表达与上皮间质转化的相关性及其意义

朱永云¹, 李娟娟², 赵迎春¹, 陈 创²

(1. 芜湖市第二人民医院, 安徽 芜湖 241000; 2. 武汉大学人民医院 湖北 武汉 430060)

摘要: [目的] 探讨乳腺癌组织 CC 类趋化因子 5(CC chemokine ligand 5, CCL5)与上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)之间的相关性, 探索抑制乳腺癌浸润转移的新途径。[方法] 应用免疫组织化学技术检测 101 例浸润性乳腺癌组织中 CCL5、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)、钙黏附蛋白 E(E-Cadherin)、钙黏附蛋白 N(N-Cadherin)、波形蛋白(Vimentin)的表达, 研究乳腺癌浸润转移关键分子 CCL5、MMP-9 表达与 EMT 之间的关联性, 分析 CCL5 促 EMT 发生的可能途径。[结果] CCL5 与 MMP-9 的表达率和 EMT 的发生率分别为 34.7%(35/101)、55.4%(56/101)和 41.6%(42/101)。乳腺癌 CCL5 表达与淋巴结转移相关($P<0.05$), 与其他临床病理特征无关($P>0.05$)。Spearman 分析显示乳腺癌组织中 CCL5 与 MMP-9 表达呈正相关($r=0.276, P=0.005$)。二元 Logistic 回归分析显示, 只有 MMP-9 与 EMT 有相关性($OR=4.697, P=0.001$)。[结论] 乳腺癌组织中 CCL5 的表达可促进 EMT 的发生, 其作用途径可能与上调 MMP-9 有关。

关键词: 乳腺癌; CCL5; MMP-9; 上皮间质转化

中图分类号: R737.9 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2016)04-0314-05

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2016.04.A014

Correlation of CC Chemokine Ligand 5 Expression with Epithelial-mesenchymal Transition in breast cancer and Its Significance

ZHU Yong-yun¹, LI Juan-juan², ZHAO Ying-chun¹, et al.

(1. Wuhu Second People's Hospital, Wuhu 241000, China; 2. Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the correlation between the expression of CCL5 and epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer and to explore the new approach of invasion and metastasis in breast cancer. [Methods] The expressions of CCL5, MMP-9, E-Cadherin, N-Cadherin and Vimentin protein were detected in the cancer cells of 101 cases with invasive breast cancer by immunohistochemistry. The relationships between the expressions of CCL5, MMP-9, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) were analyzed, possible way of CCL5 promotes EMT was analysed. [Results] The expression rates of CCL5, MMP-9, and the rate of EMT were 34.7%(35/101), 55.4%(56/101), and 41.6%(42/101), respectively. The expression of CCL5 protein in breast cancer was correlated with lymph node metastasis ($P<0.05$), but not with other clinicopathological features ($P>0.05$). Spearman analysis showed that the expression of CCL5 was correlated with the expression of MMP-9 ($r=0.276, P=0.005$). Logistic regression analysis showed that only MMP-9 induced EMT ($OR=4.697, P=0.001$). [Conclusion] The expression of CCL5 is correlated with EMT in breast cancer, maybe by up-regulation the expression of MMP-9.

Key words: breast cancer; CCL5; MMP-9; epithelial-mesenchymal transition

CCL5 是趋化性细胞因子 CC 亚族成员之一, 具

有趋化 T 细胞、单核细胞的作用, 是肿瘤细胞中表达的主要趋化因子之一, 能增强肿瘤细胞的浸润与转移能力, 与乳腺癌的发生、发展密切相关^[1,2]。上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是

收稿日期: 2015-09-02; 修回日期: 2015-10-14

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(81302314)

通讯作者: 朱永云, E-mail: 1197635097@qq.com

多细胞生物体内普遍存在的生物学现象,是上皮细胞在特定条件下消除细胞极性和相邻细胞间连接,进而转化为具有侵袭能力与迁移能力的间质细胞的过程,分为生理性和病理性,与肿瘤浸润和转移等密切相关^[3]。本研究采用免疫组织化学方法检测浸润性乳腺癌组织中 CCL5、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)、钙黏附蛋白 E(E-Cadherin)、钙黏附蛋白 N(N-Cadherin)、波形蛋白(Vimentin)的表达水平,分析乳腺癌组织中 CCL5 表达与 EMT 发生之间的相关性,以期探讨 CCL5 抑制乳腺癌浸润转移作用途径。

1 资料与方法

1.1 资料

所有标本均取安徽省芜湖市第二人民医院提供的乳腺癌石蜡病理标本。研究对象为 2013 年 6 月至 2014 年 12 月诊断为非特殊型浸润性导管癌的 101 例乳腺癌手术患者,均为女性,年龄 27~69 岁,中位年龄 48 岁;病理分期:Ⅰ期 20 例,Ⅱ期 64 例,Ⅲ期 12 例,Ⅳ期 5 例;病理分级:Ⅰ级 33 例,Ⅱ级 47 例,Ⅲ级 21 例;有淋巴结转移者 43 例,无淋巴结转移者 58 例。所有病例手术前均未行抗肿瘤治疗(包括放疗、化疗及内分泌治疗等)。

主要试剂:鼠抗人 CCL5 单克隆抗体(Abcam,克隆号:53405.111,1:100 稀释)、鼠抗人 MMP-9 单克隆抗体(MaiXin.Bio,克隆号:56-24A,1:300 稀释)、兔抗人 E-Cadherin 单克隆抗体(BD,克隆号:82-4,1:200 稀释)、兔抗人 N-Cadherin 单克隆抗体(SantaCruz,克隆号:6G11,1:200 稀释)、兔抗人 Vimentin 单克隆抗体(SantaCruz,克隆号:sp20,1:100 稀释)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化检测

石蜡标本进行厚 4 μ m 切片,60℃恒温烘烤 1h,二甲苯脱蜡(10min $\times$ 3 次),下行酒精梯度水化;高温高压柠檬酸缓冲液抗原修复;3% H_2O_2 封闭,37℃恒温培养箱湿盒孵育 10min;PBS 冲洗 3min $\times$ 3 次;除去封闭缓冲液,滴加一抗(阴性对照仅加 PBS 缓冲液),4℃冰箱湿盒孵育过夜;PBS-T 缓冲液洗涤 3min $\times$ 3 次;滴加二抗,37℃恒温培养箱湿盒孵育 30min;PBS-T 缓冲液洗涤 3min $\times$ 3 次;加 DBA 显色剂,湿盒

室温孵育 15min;苏木精复染 1min,0.5%盐酸酒精分化 10s,上行梯度酒精脱水;中性树胶封片;生物显微镜观察样本 IHC 成像,并在相同视野下用图文软件采集 IHC 图像。

1.2.2 阳性结果判断

由两位病理科主任医师依据判定标准对实验结果进行独立判断。①CCL5 以乳腺癌细胞质中出现棕黄色或棕褐色颗粒判定为阳性细胞;在高倍镜下($\times$ 400)随机选取视野计算阳性细胞率,即阳性细胞占全部肿瘤细胞的百分比,阳性细胞率 $\geq$ 5%判定为 CCL5 表达阳性,阳性细胞率 $<$ 5%判定为 CCL5 表达阴性。②MMP-9 以细胞质内出现黄色或棕黄色颗粒判定为阳性细胞; $0<$ 阳性细胞率 $\leq$ 20 记 1 分,20 $<$ 阳性细胞率 $\leq$ 50 记 2 分,阳性细胞率 $>$ 50 记 3 分;阳性细胞呈黄色记 1 分,阳性细胞呈棕黄色记 2 分,阳性细胞呈棕褐色记 3 分;两项记分之和 $>$ 3 分判定为 MMP-9 表达阳性,两项记分之和 $\leq$ 3 分判定为 MMP-9 表达阴性。③EMT 标志物:(1)E-Cadherin 以细胞膜出现棕黄色颗粒判定为阳性细胞,阳性细胞率 $\geq$ 45%判定为 E-Cadherin 表达阳性,阳性细胞率 $<$ 45%判定为 E-Cadherin 表达阴性。(2)N-Cadherin 以细胞膜和(或)细胞质内出现棕黄色颗粒判定为阳性细胞,高倍镜下($\times$ 400)只要发现阳性细胞即判定为 N-Cadherin 表达阳性,否则判定为 N-Cadherin 表达阴性。(3)Vimentin 以细胞质内出现棕黄色颗粒判定为阳性细胞,高倍镜下($\times$ 400)只要发现阳性细胞即判定为 Vimentin 表达阳性,否则判定为 Vimentin 表达阴性。E-Cadherin 阴性表达或 N-Cadherin、Vimentin 两者之间任一指标阳性表达均判定为 EMT 阳性,即上皮间质转化发生。

1.3 统计学处理

CCL5 和 MMP-9 与临床病理因素关系的评估采用 χ^2 检验,CCL5 和 MMP-9 相关性采用 Spearman 相关分析,CCL5、MMP-9 和 EMT 的相互关系用二元 Logistic 回归分析进行分析。采用 SPSS19.0 软件进行统计分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CCL5 和 MMP-9 在乳腺癌组织中的表达

应用免疫酶组织化学法检测 101 例浸润性乳腺

癌组织 CCL5、MMP-9 的表达,CCL5、MMP-9 阳性表达样本均能观察到细胞胞质内特异性分布的棕黄色颗粒(Figure 1A,1B)。CCL5 在乳腺癌组织中的阳性表达率为 34.7%(35/101),MMP-9 在乳腺癌组织中的阳性表达率为 55.4%(56/101)。

Table 1 Correlation between expression of CCL5 and clinicopathologic features of breast cancer

Features	N	CCL5		χ^2	P
		Negative	Positive		
Age(years old)	≤45	50	37	3.303	0.095
	>45	51	29		
Tumor size(cm)	≤2	30	21	0.414	0.649
	>2	71	45		
Lymph node	-	58	50	27.042	<0.001
	+	43	16		
Tumor grade	I	33	26	4.618	0.099
	II	47	29		
	III	21	11		
ER	-	44	24	4.011	0.058
	+	57	42		
PR	-	40	28	0.639	0.523
	+	61	38		
Her-2	-	61	40	0.004	1.000
	+	40	26		
Ki-67	-	34	24	0.631	0.510
	+	67	42		

2.2 乳腺癌组织CCL5 的表达与患者临床病理特征的关系

不同年龄、肿瘤大小、病理分级、ER 状态、PR 状态、Her-2 状态、Ki-67 状态间 CCL5 表达的差异无统计学意义($P>0.05$),不同淋巴结状态间 CCL5 表达的差异具有统计学意义($P<0.05$)(Table 1)。

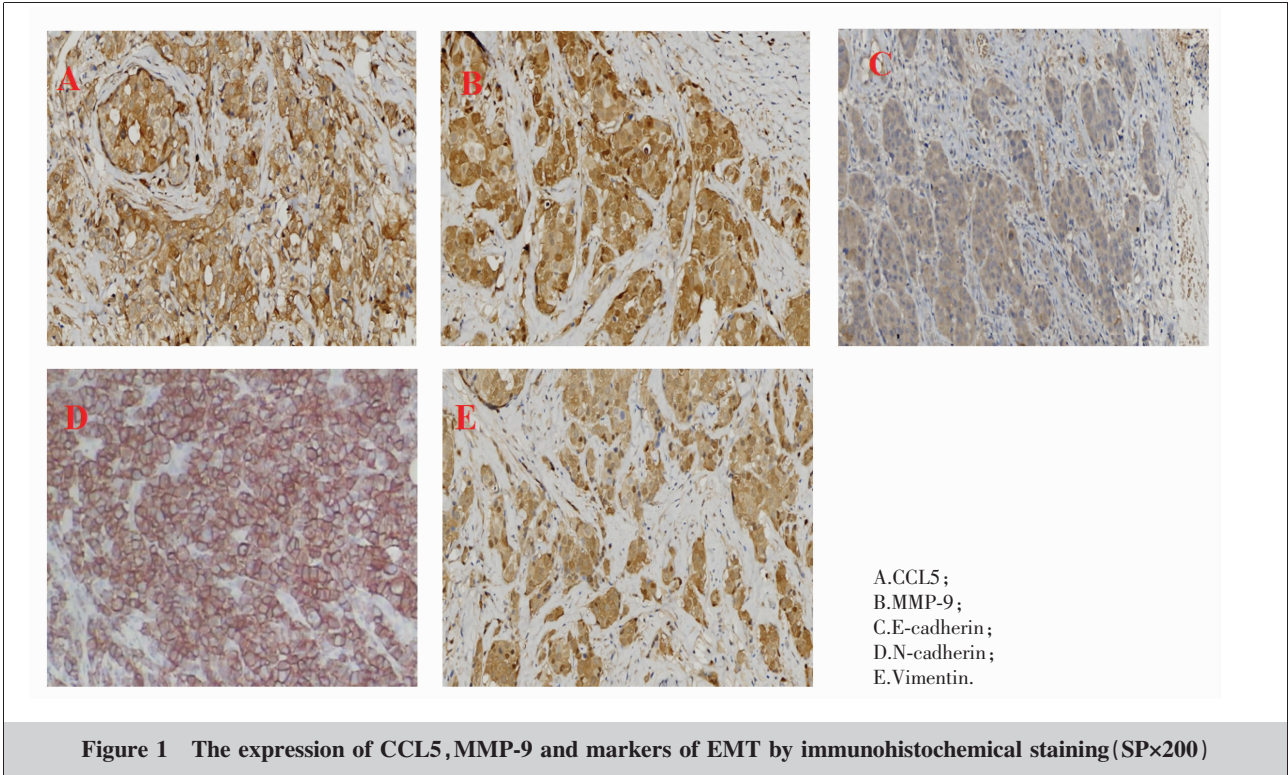
2.3 EMT 标志物在乳腺癌组织中的表达

应用免疫酶组织化学法检测 101 例浸润性乳腺癌组织 E-Cadherin、N-Cadherin、Vimentin 的表达,E-Cadherin 阳性表达样本能观察到细胞膜内特异性分布的棕黄色颗粒(Figure 1C),N-Cadherin 阳性表达样本能观察到细胞膜和(或)细胞质内特异性分布的棕黄色颗粒 (Figure 1D),Vimentin 阳性表达样本均能观察到细胞胞质内特异性分布的棕黄色颗粒(Figure 1E)。E-Cadherin、N-Cadherin、Vimentin 在乳腺癌中的阳性表达率分别为 58.4%、47.5%、41.6%。

依据以上三种 EMT 标志物的表达情况,可以判定出 EMT 发生率为 41.6%。

2.4 乳腺癌中 CCL5 和 MMP-9 相关性

Spearman 等级相关分析显示,乳腺癌组织中 CCL5 和 MMP-9 表达呈正相关($r=0.276,P=0.005$)。



2.5 乳腺癌中 CCL5、MMP-9 和 EMT 发生的相关情况

应用二元 Logistic 回归分析乳腺癌 ER、PR、HER-2、Ki-67、CCL5、MMP-9 与 EMT 的关系。以 EMT 为因变量, MMP-9 优势比 $OR=4.697$ (95%CI: 1.850~11.927), $P=0.001$, 因此可认为 MMP-9 的表达可以诱导 EMT 发生 ($P<0.05$)。

3 讨论

CCL5 能增强肿瘤细胞的浸润与转移能力, 与乳腺癌的发生、发展密切相关^[2,4,5]。乳腺癌中 CCL5 的表达与患者的临床病理特征密切相关。Hartmann 等^[6]检测 102 例乳腺癌患者及 66 健康对照者 CCL5 表达情况, 结果发现乳腺癌患者中 CCL5 表达水平明显高于健康对照者中 CCL5 表达水平明显, 淋巴结无转移者 CCL5 表达水平降低, 淋巴结转移数目增加时 CCL5 表达水平增高, Wang 等^[7]也发现 CCL5 可导致乳腺癌淋巴结转移。本研究应用免疫酶组织化学检测了 101 例乳腺癌患者 CCL5 的表达, 34.7% 的病例 CCL5 蛋白表达阳性, CCL5 的表达只与淋巴结状态有关, 与年龄、肿瘤大小、肿瘤分级、激素受体状态、Her-2 状态等其他临床病理特征无关, 与 Hartmann、Wang 等研究结果相一致, 提示 CCL5 可促乳腺癌淋巴结转移, 在肿瘤的进展和转移过程中发挥作用。CCL5 作为乳腺癌浸润转移的关键分子, 其与乳腺癌预后的关系也备受人们关注。Yaal-Hahoshen 等^[8]发现 II 期乳腺癌患者中 CCL5+/ER- II A 亚组预后较差, 提示 CCL5 可作为 II 期乳腺癌患者重要的预后跟踪检测指标。朱永云等^[2]研究发现 CCL5 阳性组的 5-DFS 显著性低于 CCL5 阴性组, 证实了 CCL5 是乳腺癌预后重要影响因素, 同时发现 CCL5 表达与 MMP-9 呈正相关。Swamydas 等^[9]在发现应用广谱 MMP 抑制剂 M6001 及 MMP-9 特异性抑制剂后, 抑制了和 CCL5 共同培养的乳腺癌细胞系中 MMP 活性剂及 CCL5 之前发挥的作用, 提示 CCL5 通过 MMP-9 方式参与了乳腺的浸润转移过程。MMP 不仅降解细胞外基质, 同时也能改变细胞-基质间、细胞-细胞间的接触, 据报道多种肿瘤中存在 MMP 表达上调, 且与肿瘤相关的 MMP 能够诱发 EMT 过程^[10]。正常乳腺上皮细胞在 $TNF\alpha$ 连续刺激 2~3 周后发生 EMT 改变, 此过程中 MMP 表

达上调, 提示 MMP 参与乳腺癌 EMT 过程^[11]。

多项研究证实 EMT 参与肿瘤的浸润转移过程, 并在其中发挥着极其重要的作用。EMT 是上皮细胞转化成间质样细胞的一个相当复杂生物学过程, 包括细胞极性消失、细胞间连接丧失、细胞游走或散在分布及重新表达间质细胞标志物等过程^[3]。肿瘤细胞可 EMT 获得了移动性、浸润性、抗凋亡性和耐药性, 从而使肿瘤向邻近组织和器官转移, 药物治疗耐药, 促进肿瘤的生长、播散^[12,13]。在卵巢癌 A2780 和 SKOV3 细胞系共培养基中加入 CCL5 抗体后, 发现 EMT 减少, 癌细胞浸润、转移能力减弱, 加入重组 CCL5 24h 后癌细胞浸润、转移能力增强, EMT 增加, 呈剂量依赖型。表明 CCL5 可促卵巢癌 EMT 及癌细胞浸润、转移^[14]。Kudo-Saito C 等^[15]发现在前列腺癌中, 肿瘤细胞分泌的 CCL5 可募集间充质干细胞进入肿瘤微环境, 进入肿瘤微环境的间充质干细胞又可释放 CCL5, 而后者可诱导 EMT。CCL5 可促直肠癌 SW480 细胞系和 SW620 细胞系上皮间质化^[16]。CCL5 可通过 $TNF\alpha$ 促乳腺癌 EMT^[17]。本实验发现乳腺癌组织中 MMP-9 的表达可诱导 EMT 发生 ($P<0.05$), 而 CCL5 的表达却不能诱导 EMT 发生 ($P>0.05$); 乳腺癌组织中 CCL5 表达又与 MMP-9 表达之间呈正相关 ($P<0.05$)。以上结果提示乳腺癌浸润转移关键分子 CCL5 可能通过上调 MMP-9 表达使上皮细胞间质转化, 进而促进乳腺癌的浸润转移。

肿瘤的浸润与转移是导致乳腺癌病情恶化乃至死亡的主要原因之一。本研究提示 CCL5 可能通过上调 MMP-9 促进 EMT 发生, 参与乳腺癌的浸润转移过程, 有望探索一种抑制乳腺癌浸润转移的新途径。但本研究选取的样本量相对较小, 且研究方法为定性分析, 所得结论尚需进行定量分析与大样本、前瞻性临床试验验证。

参考文献:

- [1] Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, et al. Mesenchymal stem cells within tumor stroma promote breast cancer metastasis [J]. *Nature*, 2007, 449(7162): 557-563.
- [2] Zhu YY, Chen C, Xie M, et al. Quantitative detection of CC chemokine ligand 5 and matrix metalloproteinase-9 by QDs-based molecular prediction of breast cancer [J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*, 2014, 31 (9): 2012-2014. 朱永云, 陈创, 孙金中, 等. 量子点标记分子探针成

- 像技术对乳腺癌 CC 类趋化因子 5 和基质金属蛋白酶-9 的定量检测及临床意义[J]. 中华实验外科杂志, 2014, 31(9): 2012–2014.
- [3] Thierry JP, Acloque H, Huang RYJ, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease[J]. Cell, 2009, 139(5): 871–890.
- [4] Svensson S, Abrahamsson A, Vazquez Rodriguez G, et al. CCL2 and CCL5 are novel therapeutic targets for estrogen-dependent breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(16): 3794–3805.
- [5] Zhang Q, Qin J, Zhong L, et al. CCL5-mediated Th2 immune polarization promotes metastasis in luminal breast cancer[J]. Cancer Res, 2015, 75(20): 4312–4321.
- [6] Hartmann MC, Dwyer RM, Costello M, et al. Relationship between CCL5 and transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in breast cancer [J]. Eur J Cancer, 2011, 47(11): 1669–1675.
- [7] Wang Z, Han J, Cui Y, et al. miRNA-21 inhibition enhances RANTES and IP-10 release in MCF-7 via PIAS3 and STAT3 signalling and causes increased lymphocyte migration [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 439(3): 384–389.
- [8] Yaal- Hahoshen N, Shina S, Leider-Trejo L, et al. The chemokine CCL5 as a potential prognostic factor predicting disease progression in stage II breast cancer patients [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(5): 4474–4480.
- [9] Swamydas M, Ricci K, Rego SL, et al. Mesenchymal stem cell-derived CCL-9 and CCL-5 promote mammary tumor cell invasion and the activation of matrix metalloproteinases[J]. Cell Adh Migr, 2013, 7: 315–324.
- [10] Orlichenko LS, Radisky DC. Matrix metalloproteinases stimulate epithelial- mesenchymal transition during tumor development[J]. Clin Exp Metastasis, 2008, 25(6): 593–600.
- [11] Leibovich-Rivkin T, Liubomirski Y, Bernstein B, et al. Inflammatory factors of the tumor microenvironment induce plasticity in nontransformed breast epithelial cells: EMT, invasion, and collapse of normally organized breast textures[J]. Neoplasia, 2013, 15(12): 1330–1346.
- [12] Bhangu A, Wood G, Brown G, et al. The role of epithelial mesenchymal transition and resistance to neoadjuvant therapy in locally advanced rectal cancer [J]. Colorectal Dis, 2014, 16(4): 133–143.
- [13] Kim NH, Kim HS, Li XY, et al. Ap53/ miRNA-34 axis regulates Snail1-dependent cancer cell epithelial-mesenchymal transition[J]. J Cell Biol, 2011, 195(3): 417–433.
- [14] Long H, Xiang T, Qi W, et al. CD133 + ovarian cancer stem-like cells promote non-stem cancer cell metastasis via CCL5 induced epithelial-mesenchymal transition [J]. Oncotarget, 2015, 6(8): 5846–5859.
- [15] Kudo-Saito C. Cancer-associated mesenchymal stem cells aggravate tumor progression [J]. Front cell Devl Biol, 2015, 3: 23.
- [16] Kan JY, Wu DC, Yu FJ, et al. Chemokine (C-C motif) ligand 5 is involved in tumor-associated dendritic cell-mediated colon cancer progression through non-coding RNA MALAT-1[J]. J Cell Physiol, 2015, 230(8): 1883–1894.
- [17] Soria1 G, Ofri-Shahak1 M, Haas I, et al. Inflammatory mediators in breast cancer: coordinated expression of TNF α & IL-1 β with CCL2 & CCL5 and effects on epithelial-to-mesenchymal transition [J]. BMC Cancer, 2011, 11(130): 1471–1491.

启 事

每期杂志出版后,本刊都将给作者/通讯作者通过邮局,以印刷品挂号形式寄赠当期杂志 2 册。如未能及时收到杂志,请登录 <http://www.chinaoncology.cn>

➡ 点击中国肿瘤

再点击

信息公告

MORE

查找 2016 年第 X 期《中国肿瘤》

杂志作者邮寄名单,按“挂刷号”可在当地邮局查询。