

TIP30 与 VEGF-C 在乳腺癌中的表达及意义

蔡绍朋¹, 岳喜成², 李德群², 阚方功³

(1. 长兴县人民医院, 浙江 湖州 313100; 2. 安徽蚌埠医学院附属第一医院, 安徽 蚌埠 233000; 3. 山东省淄博市第一医院, 山东 淄博 255200)

摘要: [目的] 检测转录反式作用因子结合蛋白(TIP30)与血管内皮生长因子-C(VEGF-C)在乳腺癌中的表达水平。[方法] 应用免疫组织化学 Elivision 法, 检测 72 例乳腺癌及其癌旁乳腺组织中 TIP30 和 VEGF-C 蛋白表达水平, 并分析它们与临床病理指标之间的关系。[结果] TIP30 蛋白在乳腺癌及相应的癌旁乳腺组织中的阳性表达率分别是 33.33%、87.50%, 两者之间差异有显著性 ($P<0.05$)。VEGF-C 蛋白在乳腺癌及相应的癌旁乳腺组织中的阳性表达率分别是 80.56%、26.39%, 两者之间差异有显著性 ($P<0.05$)。TIP30 蛋白、VEGF-C 蛋白在乳腺癌的表达与有无淋巴结转移有关 ($P<0.05$), 而与患者年龄、临床分期、肿瘤大小、c-erbB-2 和雌、孕激素受体表达均无关 ($P>0.05$)。[结论] TIP30 在乳腺癌旁组织中的表达明显高于癌组织, VEGF-C 表达情况则相反, 两者呈负相关。

关键词: 乳腺肿瘤; 转录反式作用因子结合蛋白; 血管内皮生长因子-C; 淋巴转移

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)06-0408-05

Expressions of TIP30 and VEGF-C in Breast Cancer and Their Significance

CAI Shao-peng¹, YUE Xi-cheng², LI De-qun², et al.

(1. People's Hospital of Changxing County, Huzhou 313100, China; 2. The Affiliated First Hospital of Bengbu Medical College, Anhui Province, Bengbu 233000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expressions of Tat-interacting protein 30 (TIP30) and vascular endothelial growth factor-C(VEGF-C) in breast cancer. [Methods] The expressions of TIP30 and VEGF-C in sample tissues from 72 cases with breast cancer and corresponding adjacent breast tissues were detected with Elivision immunohistochemical method, and their relationship with clinicopathologic parameters was analyzed. [Results] The positive expression of TIP30 in breast cancer tissues and adjacent breast tissues were 33.33% and 87.50% respectively, with significant difference between them ($P<0.05$). The positive expression of VEGF-C in breast cancer tissues and adjacent breast tissues were 80.56% and 26.39% respectively, with significant difference between them ($P<0.05$). The expressions of TIP30 and VEGF-C in breast cancer correlated to lymph node metastasis with or without ($P<0.05$), but had not correlate to age, stage, tumor size, c-erbB-2, ER and PR ($P>0.05$). [Conclusion] The expression of TIP30 in adjacent breast tissues is higher than that in breast cancer tissues, with a reverse expression of VEGF-C. There is a negative correlation between the expression of TIP30 and VEGF-C in breast cancer.

Subject words: breast neoplasms; Tat-interacting protein 30; vascular endothelial growth factor-C; lymphatic metastasis

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 在我国肿瘤登记地区位居女性恶性肿瘤发病首位^[1]。研究证实, 恶性肿瘤的生长与转移依赖于肿瘤局部血管、淋巴管的生成。肿瘤血管、淋巴管是由多种癌基因或

抑癌基因参与的受多个调控机制调节的复杂网络, 转录反式作用因子结合蛋白 (Tat-interacting protein 30, TIP30) 基因是一个有潜在抗血管、淋巴管形成的肿瘤转移抑制基因。血管内皮生长因子 C (vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C) 是重要的促血管生成因子。通过对肝癌组织的研究发现 TIP30 基因是通过抑制 VEGF-C 导致肿瘤血管、淋

通讯作者: 李德群, 主任医师, 副教授; 安徽蚌埠医学院附属第一医院肿瘤科, 安徽省蚌埠市长淮路 287 号 (233000); E-mail: lide-qun8888@163.com。

收稿日期: 2011-10-25; **修回日期:** 2012-03-06

巴管形成减少或减缓而抑制肿瘤细胞的浸润和转移,从而降低了肿瘤细胞通过血管、淋巴管转移的机会。乳腺癌最常发生腋窝淋巴结转移^[2],或通过血管、淋巴管发生骨转移等。本研究采用免疫组织化学方法对 TIP30 与 VEGF-C 蛋白在乳腺癌组织和癌旁正常组织的表达情况进行检测,旨在探讨它们在乳腺癌中表达的相互关系及意义,为乳腺癌的预防及治疗靶点提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

蚌埠医学院第一附属医院肿瘤外科 2009 年 9 月~2010 年 6 月手术切除乳腺癌组织 72 例,相应癌旁正常组织 72 例(距离肿瘤组织边缘 5cm 以上)作为对照。均为女性乳腺浸润性导管癌,术前均未接受放、化疗,均有完整的临床和病理资料。患者年龄为 22~68 岁,平均年龄为(42.5±5.7)岁;按 WHO 所采用的 Scarff-Bloom-Richardson(SBR)标准组织学分级:I 级 18 例,II 级 39 例,III 级 15 例;临床分期 I 期 11 例,II 期 51 例,III 期 10 例;淋巴结转移 40 例,无淋巴结转移 32 例;ER 阳性 34 例,阴性 38 例;PR 阳性 31 例,阴性 41 例;c-erbB-2 阳性 27 例,阴性 45 例。所有标本常规应用 10%甲醛溶液浸泡固定后石蜡包埋备用。

1.2 主要试剂

鼠抗人 TIP30 单克隆抗体、鼠抗人 VEGF-C 多克隆抗体购于北京中衫金桥生物技术有限公司,EliVision™ plus KIT-9903 (A、B) 检测试剂盒、液体 DAB(二氨基联苯胺)酶底物显色试剂盒购于福州迈新生物技术开发公司。

1.3 步骤

采用免疫组化 Elivision 法检测 TIP30 和 VEGF-C,主要步骤如下:石蜡切片经二甲苯脱蜡和梯度酒精水化后,用 PBS(pH7.4)分别冲洗 3 次,每次 3~5min。进行抗原修复。每张切片加 1 滴一抗工作液(TIP30、VEGF-C),4℃过夜。PBS 冲洗 3 次,每次 3~5min。每张切片加 1 滴酶标抗鼠/兔聚合物增强剂(试剂 A),室温下孵育 20min。PBS 冲洗 3 次,每次 3~5min。每张切片加 1 滴

酶标抗鼠/兔聚合物(试剂 B),室温下孵育 30min。PBS 冲洗 3 次,每次 3~5min。加 2 滴新鲜配制的 DAB 溶液,显微镜下观察 3~10min。冲洗、复染、封片。

1.4 判定标准

TIP30 和 VEGF-C 表达均以细胞浆呈棕黄色或棕褐色为阳性,在同一张切片中随机选择 10 个高倍视野,每个高倍视野计数 100 个癌细胞,计数阳性细胞百分数。按阳性细胞所占的百分比计分:<10%为(-),11%~25%为(+),26%~50%为(++),>50%为(+++)。(+)~(+++)计为阳性。

1.5 统计学处理

用 SPSS17.0 统计软件处理,采用 χ^2 检验、秩和检验(Kruskal-Wallis *H* 检验、Mann-Whitney *U* 检验)和 Spearman 相关检验。

2 结果

2.1 乳腺癌和癌旁组织中 TIP30 表达

TIP30 的表达在乳腺癌组织中阳性率为 33.33%,在癌旁组织中阳性率为 87.50%,两者之间的差异有显著性($P<0.01$)。见图 1、表 1。

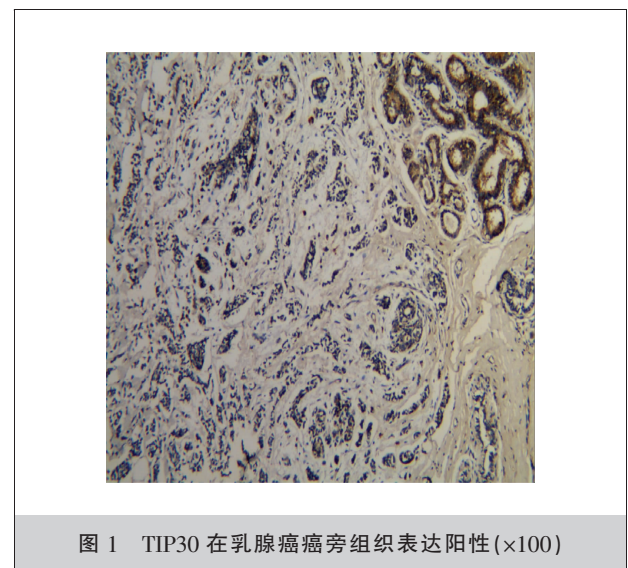


图 1 TIP30 在乳腺癌癌旁组织表达阳性(×100)

表 1 TIP30、VEGF-C 在乳腺癌组织与癌旁正常组织中的表达

组织	例数	TIP30 表达			VEGF-C 表达		
		阳性(%)	χ^2	<i>P</i>	阳性(%)	χ^2	<i>P</i>
乳腺癌组织	72	24(33.33)	44.167	0.000	58(80.56)	42.46	0.000
癌旁正常组织	72	63(87.50)			19(26.39)		

注: $P<0.05$

2.2 临床病理参数与 TIP30 表达的关系

TIP30 的表达在有淋巴结转移的乳腺癌组织中阳性率为 15.00%,在无淋巴结转移的乳腺癌组织中阳性率为 56.25%,两者有差异显著性($P<0.05$)。TIP30 的表达与患者年龄、肿瘤大小、临床分期、雌激素受体、孕激素受体、c-erbB-2 均无相关性($P>0.05$)。见表 2。

2.3 乳腺癌和癌旁组织中 VEGF-C 蛋白表达的检测结果

VEGF-C 在乳腺癌组织中表达阳性率为 80.56%,在癌旁组织中表达阳性率为 26.39%,两者之间的差异有显著性 ($P<0.005$)。见表 1。

2.4 临床病理参数与 VEGF-C 表达的关系

VEGF-C 蛋白在有淋巴结转移的乳腺癌组织中的阳性表达率为 85.00%,在无淋巴结转移的乳腺癌组织中的阳性表达率为 75.00%,差异有显著性($P<0.05$)。VEGF-C 蛋白的表达与患者年龄、肿瘤大小、临床分期、雌激素受体、孕激素受体、c-erbB-2 均无相关性($P>0.05$)。见图 2、表 3。

2.5 TIP30 与 VEGF-C 蛋白在乳腺癌中表达的相关性分析

对乳腺癌组织中 TIP30 与 VEGF-C 表达的相关性进行分析显示,两者呈负相关关系($r=-0.248$ 、 $P<0.05$)(表 4)。

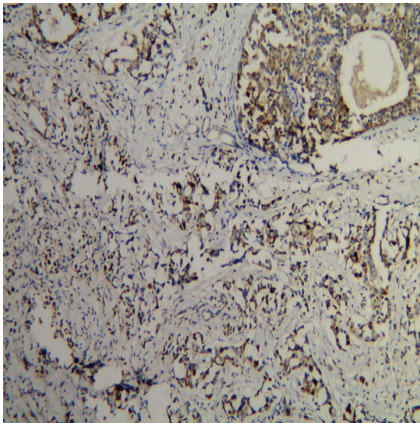


图 2 乳腺癌中 VEGF-C 表达阳性(×100)

表 2 TIP30 表达与临床病理参数的关系

临床病理参数	例数	TIP30 表达				阳性率 (%)	P
		-	+	++	+++		
年龄(岁)							
<35	11	5	2	3	1	54.55	0.239
35~50	42	29	4	7	2	30.95	
>50	19	14	3	1	1	26.32	
临床分期							
I 期	11	5	3	2	1	54.55	0.259
II 期	51	37	6	5	3	27.45	
III 期	10	6	3	1	0	40.00	
肿瘤大小(cm)							
<2	14	10	1	2	1	28.57	0.898
2~5	48	32	6	5	5	33.33	
>5	10	6	2	1	1	40.00	
淋巴结转移							
有	40	34	3	2	1	15.00	0.000*
无	32	14	5	11	2	56.25	
雌激素受体							
阳性	34	21	8	3	2	38.24	0.478
阴性	38	27	6	2	3	28.95	
孕激素受体							
阳性	31	19	9	2	1	38.71	0.516
阴性	41	29	7	3	3	31.71	
c-erbB-2							
阳性	27	16	7	3	1	40.74	0.335
阴性	45	32	8	3	2	28.89	

*: $P<0.05$ 。

表 3 VEGF-C 表达与临床病理参数的关系

临床病理参数	例数	VEGF-C 表达				阳性率 (%)	P
		-	+	++	+++		
年龄(岁)							
<35	11	2	3	5	1	81.82	0.179
35~50	42	8	15	9	10	80.95	
>50	19	4	12	2	1	78.95	
临床分期							
I 期	11	3	2	5	1	72.73	0.759
II 期	51	9	13	17	12	82.35	
III 期	10	2	2	4	2	80.00	
肿瘤大小(cm)							
<2	14	4	3	5	2	71.43	0.619
2~5	48	8	13	14	13	83.33	
>5	10	2	2	3	3	80.00	
淋巴结转移							
有	40	6	8	10	16	85.00	0.044*
无	32	8	7	13	4	75.00	
雌激素受体							
阳性	34	7	11	13	3	79.41	0.757
阴性	38	7	12	15	4	81.58	
孕激素受体							
阳性	31	5	6	12	8	83.87	0.358
阴性	41	9	11	12	9	78.05	
c-erbB-2							
阳性	27	8	4	9	6	70.37	0.603
阴性	45	6	13	17	9	86.67	

*: $P<0.05$ 。

表 4 乳腺癌组织中 TIP30 与 VEGF-C 表达的相关性

TIP30 表达	VEGF-C 表达		合计	<i>r</i>	<i>P</i>
	+	-			
+	16	8	24	-0.248	0.036
-	42	6	48		
合计	58	14	72		

3 讨 论

TIP30 基因是定位于人体第 11 号染色体上 (11p15.1), 小鼠的第 7 号染色体^[3], 由 6 个外显子组成。通过对人类 *TIP30* 基因的 cDNA 序列分析表明, 它有一个编码含 242 个氨基酸残基的多肽的开放读码框, 从 5' 端开始第 99 位有第一个甲硫氨酸密码子。*TIP30* 的 242 个氨基酸的前 20 个氨基酸残基形成一个 α -螺旋, 在这一区域包含许多带正电荷或负电荷的氨基酸, 这对于稳定与 Tat 或其他蛋白质的结合有重要作用。Elomark 等^[4]研究发现 *TIP30* 属于短链脱氢酶/还原酶 (short-chain dehydrogenase/reductase, SDR) 超家族成员之一, 能够和 NADP/NADPH 相结合, 参与细胞代谢。*TIP30* 的第 21~242 个氨基酸残基的构象与 SDRS 相似, 在其末端有一个 $\beta\alpha\beta$ 结构, 可与 NADPH 结合发挥生物学功能。Nakahara 等^[5]还证实了 *TIP30* 具有丝/苏氨酸激酶活性, 作为转录辅助因子, 可以自身磷酸化也能磷酸化 RNA 聚合酶 II 最大亚基 C 末端 (carboxyl-terminal domain, CTD) 的七肽重复序列, 调节基因的转录。*TIP30* 基因作为一种抑癌基因, 目前已有研究证实它在多种高转移性肿瘤组织中表达下调。在低转移性的小细胞肺癌 (classic small cell lung carcinoma, c-SCLC) 细胞系 NCI146、NCIH69 及 NCIH345 中 *TIP30* 高表达, 而在高转移性小细胞肺癌 (variant small cell lung carcinoma, v-SCLC) 细胞系 N417 及 H82 中 *TIP30* 低表达甚至不表达。Kuo 等^[6]通过研究发现, 在低血清培养条件下, *TIP30* 能提高依托泊普诱导的转移性高的 SCLC 细胞凋亡, 且能诱导一些如 *Bad* 和 *Siva* 凋亡相关基因及转移抑制基因 *nm23-H2* 在 c-SCLC 的表达。这在一定程度上说明 *TIP30* 的高表达能够抑制肺癌细胞的转移。张霞等^[7]用免疫组织化学的方法检测了 *TIP30* 在肝癌癌旁组织中的高表达 (阳性率为 100%), 同时癌旁组织中 *TIP30* 表达明显降低。*TIP30* 在分化高的肝癌组织中的表达阳

性率高, 在分化低的肝癌组织中其表达阴性率增加; *TIP30* 蛋白表达阴性的肝癌发生局部浸润或远处转移率明显增加。提示 *TIP30* 基因是一种潜在的抑癌基因, 参与了肝癌细胞的发生与侵袭转移。在乳腺癌中, *TIP30* 表达与淋巴结转移和血管侵袭呈负相关^[8]。Zhao 等^[9]检测了 87 例乳腺癌术后的标本, 发现 *TIP30* 蛋白的表达与腋窝淋巴结转移及血管浸润呈负相关, 与肿瘤分级、孕酮、雌激素及 p53 的表达无相关性。通过 RNA 干扰技术使 *TIP30* 表达受抑后还发现, 乳腺癌通过细胞外基质的侵袭能力增强了; 通过腺病毒载体使 *TIP30* 过表达后还发现, 其抑制了乳腺癌通过细胞外基质的侵袭能力。本实验研究通过免疫组织化学的方法发现 *TIP30* 在乳腺癌中阳性表达率明显低于癌旁组织并且与淋巴结转移情况有关。提示了 *TIP30* 的低表达使得乳腺癌细胞更具有侵袭性和转移性, 也证明 *TIP30* 与乳腺癌生长进展过程有关, 并对肿瘤的辅助诊断、治疗及预后评估, 具有重要的临床意义。

VEGF-C 是血管内皮生长因子 (VEGF) 家族的新成员。人类 *VEGF-C* 基因定位于染色体 4q34 上, 编码一种含 419 个氨基酸残基的蛋白。含 7 个外显子, 其外显子 3 和 4 编码 VEGF 的同源区, 外显子 5 和 7 编码富含半胱氨酸的 C6XCIOX CRC 型的基序, 外显子 6 编码丝蛋白典型的 CIOXCXCXC 基序, 分子量约 46.9 kD^[10]。5' 端上游序列为启动子区, 含有保守的 AP-2, Sp-1 和 NF- κ B 转录因子的结合位点, 但没有 TATA 盒^[11]。*VEGF-C* 主要由肿瘤细胞产生, 是较特异的淋巴管生成因子, 有促进血管和淋巴管生成作用, 参与生理性、病理性淋巴管和血管的新生^[12]。Schoppmann 等^[13]对有 c-erbB-2 表达的淋巴结阳性乳腺癌的 *VEGF-C* 和淋巴管相关性中发现, 肿瘤内新生淋巴管较多, 而对照组内新生淋巴管极少, 淋巴管密度 (MLD) 计数也显示高表达 *VEGF-C* 的肿瘤的 MLD 明显高于对照组。Nakamura 等^[14]运用免疫组化及 RT-PCR 的方法证实了 *VEGF-C* mRNA 在乳腺癌组织中的转录水平与淋巴结转移情况及淋巴管密度的增加程度密切相关; 张瑰红等^[15]报道, *VEGF-C* 在乳腺癌中促使细胞增殖、分化, 与淋巴结转移密切相关。本研究结果显示 *VEGF-C* 蛋白在乳腺癌组织表达阳性率明显高于癌旁组织; 且与乳腺癌组织中淋巴结转移情况有一定关系。这说明 *VEGF-C* 高

表达的肿瘤更具有侵袭性及更易产生淋巴结转移,因此 VEGF-C 在乳腺癌的生长及转移过程中发挥重要作用。

肿瘤的生长与浸润离不开新生血管的生成,且衡量肿瘤恶性程度的主要因素是侵袭和转移,这是一个涉及肿瘤细胞异常增殖、黏附、运动、细胞外基质降解、血管生成等一系列病理生理活动的复杂过程^[16]。我们的研究结果显示 TIP30 在乳腺癌组织中低表达,而 VEGF-C 在乳腺癌组织中高表达,与乳腺癌的淋巴结转移均有显著性差异,且两者与肿瘤的大小、患者年龄、雌激素受体、孕激素受体、c-erbB-2 等均无相关性。说明了两者的表达有相对的特异性,与肿瘤的淋巴结转移情况相关。同时 TIP30 与 VEGF-C 的表达也具有一定的相关性,由此我们推测:TIP30 的表达缺失促进了 VEGF-C 的转录表达,VEGF-C 表达增高又进一步促进了肿瘤血管的形成,而肿瘤血管的形成成为乳腺癌细胞的增殖及向周围组织的浸润创造了条件。在乳腺癌中,TIP30 基因可能是通过抑制 VEGF-C 导致肿瘤血管形成减少而抑制肿瘤细胞的浸润和转移,从而降低了肿瘤细胞通过血管和淋巴管浸润而传播至远处的发生率。因此,可以通过在肿瘤细胞中外源性导入 TIP30 基因抑制肿瘤血管的形成而抑制肿瘤的转移,为肿瘤的治疗提供一个新思路。

参考文献:

- [1] 郑荣寿,张思维,吴良有,等.中国肿瘤登记地区 2008 年恶性肿瘤发病和死亡分析[J].中国肿瘤,2012,21(1):1-12.
- [2] Heemers HV, Schmidt LJ, Sun Z, et al. Identification of a clinically relevant androgen-dependent gene signature in prostate cancer [J]. Cancer Res, 2011, 71(5):1978-1988.
- [3] Baker ME. TIP30, a cofactor for HIV-1 Tat-activated transcription, is homologous to short-chain dehydrogenases/reductases[J]. Curr Biol, 1999, 9(13):R471.
- [4] EL Omari K, Bird LE, Niehols CE, et al. Crystal structure of CC3(TIP30): implications for its role as a tumor suppressor[J]. J Biol Chem, 2005, 280(17):18229-18236.
- [5] Nakahara J, Kanekura K, Nawa M, et al. Abnormal expression of TIP30 and arrested nucleocytoplasmic transport within oligodendrocyte precursor cells in multiple sclerosis [J]. Clin Invest, 2009, 119(1):169-181.
- [6] Kuo PL, Chang LC, Lin CC, et al. Resveratrol-induced apoptosis is mediated by p53-dependent pathway in HepG2 cells[J]. Life Sci, 2002, 72(2):23-34.
- [7] 张霞,陈樟树,欧阳学农.人肝癌组织及肝癌细胞系中 TIP30 基因与 VEGF 的关系[J].中国肿瘤临床,2005,32(9):489-492.
- [8] Zhang CL, Mori M, Gao S, et al. TIP30 deletion in MMTV-Neu mice leads to enhanced EGFR signaling and development of estrogen receptor-positive and progesterone receptor-negative mammary tumors [J]. Cancer Res, 2010, 70(24):10224-10233.
- [9] Zhao J, Ni H, Ma Y, et al. TIP30/CC3 expression in breast carcinoma: relation to metastasis, clinicopathologic parameters and p53 expression[J]. Hum Pathol, 2007, 38(8):293-298.
- [10] Yuen D, Pytowski B, Chen L. Combined blockade of VEGFR-2 and VEGFR-3 inhibits inflammatory lymphangiogenesis in early and middle stages [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(5):2593-2597.
- [11] Chilov D, Kukk E, Taira S, et al. Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C [J]. J Biol Chem, 1997, 272(40): 25176-25183.
- [12] Lähdevuo M, Honkonen K, Tervala T, et al. Growth factor therapy and autologous lymph node transfer in lymphedema[J]. Circulation, 2011, 123(6):613-620.
- [13] Schoppmann SF, Tamandl D, Roberts L, et al. HER2/neu expression correlates with vascular endothelial growth factor-C and lymphangiogenesis in lymph node-positive breast cancer [J]. Ann Oncol, 2010, 21(5):955-960.
- [14] Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, et al. Lymph vessel density correlates with nodal status, VEGF-C expression, and prognosis in breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2005, 91(2): 125-132.
- [15] 张瑰红,曾郁,杨文涛,等.乳腺癌血管内皮生长因子-(A、B、C)mRNA 的表达及其预后意义[J].中华病理学杂志,2006,35(8):473-477.
- [16] Boedfeldt WM 2nd, Blad KI, Heslin MJ. Recent insights into angiogenesis, apoptosis, invasion, and metastasis in colorectal carcinoma [J]. Ann Surg Oncol, 2003, 10(8):839-851.