

ALDH1 和上皮间质转化相关蛋白在三阴性乳腺癌中的表达及其相关性

姚宇锋, 龚建平, 秦建伟, 唐金海

(江苏省肿瘤医院, 江苏省肿瘤防治研究所, 江苏 南京 210009)

摘要: [目的] 探讨三阴性乳腺癌(TNBC)组织中乙醛脱氢酶 1(ALDH1)和上皮间质转化(EMT)相关蛋白的表达情况及其相关性。[方法] 采用免疫组化方法检测 90 例 TNBC 组织中 ALDH1 以及 EMT 相关蛋白 E-钙黏蛋白(E-cad)、N-钙黏蛋白(N-cad)的表达, 分析其与临床病理特征的关系, 并进一步分析 ALDH1 和 EMT 相关蛋白之间的相关性。[结果] TNBC 组织中 ALDH1、E-cad、N-cad 的阳性表达率分别为 45.6%(41/90)、56.7%(51/90)、52.2%(47/90)。淋巴结转移在不同 ALDH1 表达组间差异具有统计学意义($P<0.05$), 肿瘤大小、组织学分级、淋巴结转移在不同 E-cad 表达组间差异具有统计学意义($P<0.05$), 组织学分级、淋巴结转移在不同 N-cad 表达组间差异具有统计学意义($P<0.05$)。ALDH1 的表达与 E-cad、N-cad 的表达均相关 ($P<0.001$), E-cad 的表达与 N-cad 的表达也呈弱的负相关 ($r=-0.208, P=0.049$)。[结论] TNBC 组织中 EMT 参与了乳腺癌的发生、浸润、转移, 并且能够增加乳腺癌组织中的干细胞表型。

关键词: 乳腺癌; 乙醛脱氢酶 1(ALDH1); 上皮间质转化; 免疫组织化学

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)05-0369-04

Expression of ALDH1 and Epithelial-mesenchymal Transition-related Proteins in Triple Negative Breast Cancer and Their Correlations

YAO Yu-feng, GONG Jian-ping, QIN Jian-wei, et al.

(Jiangsu Cancer Hospital, Nanjing 210009, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expressions of aldehyde dehydrogenase 1(ALDH1) and epithelial-mesenchymal transition(EMT)-related proteins in triple negative breast cancer (TNBC) and their correlations. [Methods] The expressions of ALDH1, E-cadherin(E-cad), N-cadherin(N-cad) in 90 cases with TNBC were detected immunohistochemically. The relationship between the expressions of ALDH1, E-cadherin, N-cadherin and the clinicopathological characteristics was analyzed. The correlation between ALDH1 and EMT-related proteins was also analyzed. [Results] The positive rate of ALDH1, E-cad, N-cad was 45.6%(41/90), 56.7%(51/90), 52.2%(47/90) respectively in TNBC. The lymph node metastasis was significantly different between the positive and negative expression groups of ALDH1. The tumor size, histological grade, lymph node metastasis were significantly different between the positive and negative expression groups of E-cad. The histological grade, lymph node metastasis were significantly different between the positive and negative expression groups of N-cad. The expression of ALDH1 strongly correlated with the expressions of E-cad and N-cad($P<0.001$). The expressions between E-cad and N-cad showed weak correlation($r=-0.208, P=0.049$). [Conclusion] EMT is involved in the occurrence, invasion and metastasis of TNBC and also increases the stem cell phenotype in the breast cancer tissue.

Subject words: breast neoplasms; aldehyde dehydrogenase 1(ALDH1); epithelial-mesenchymal transition; immunohistochemistry

乳腺癌复发转移是危及乳腺癌患者生命的主要因素, 上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transi-

tion, EMT)使乳腺癌细胞失去上皮标志, 获得间质表型, 表现出极强的侵袭、迁移能力, 直接导致肿瘤转移, 并且促使转移肿瘤细胞干细胞化, 产生对化疗药物的抵抗^[1]。E-钙黏蛋白(E-cad)、N-钙黏蛋白(N-

基金项目: 江苏省“333 高层次人才培养工程”科研项目资助

收稿日期: 2013-02-04; **修回日期:** 2013-03-22

cad)分别表达于上皮细胞、间质细胞,是发生 EMT 的标志,因此本实验通过免疫组化方法检测这两种蛋白以及乳腺癌干细胞标志物乙醛脱氢酶 1(aldehyde dehydrogenase,ALDH1)在三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer,TNBC)中的表达,探讨 EMT 与乳腺癌干细胞之间的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集江苏省肿瘤医院 2010 年 1 月 1 日至 2012 年 12 月 31 日手术病理确诊的 TNBC 90 例,均为女性,平均年龄 49.5 岁(22~73 岁)。所有患者均为初诊可手术患者并经术后病理确诊为浸润性乳腺癌,免疫组化检测确诊为 ER、PR 和 Her-2 的表达均为阴性。病理类型均为浸润性导管癌。术后病理分期 I 期 56 例,II 期 20 例,III 期 14 例。所有病例术后均参照 NCCN 指南进行规范化的化疗、放疗等综合治疗。

1.2 免疫组织化学染色

采用 Envision 两步法完成免疫组织化学染色,检测 ER、PR、Her-2、E-cad、N-cad、ALDH1 的表达情况。ER、PR 阳性定位于细胞核,Her-2、E-cad 阳性定位于细胞膜,N-cad 阳性定位于细胞膜和(或)细胞质,ALDH1 阳性定位于细胞质(Figure 1)。阳性百分率采用计数估计半定量判断标准,即选取 5 个不同高倍镜视野,计数 500 个细胞,计算出其中阳性细胞数的百分率。ER、PR、E-cad、N-cad 阳性细胞数 $\geq 10\%$ 为阳性, $<10\%$ 为阴性;Her-2 阳性细胞数 $<10\%$

为(-),10%~25%为(+),26%~50%为(++), $>50\%$ 为(+++),(-)和(+)归为阴性。ALDH1 采用阳性染色强度结合阳性细胞所占百分比进行判断,将切片中平均阳性细胞比例及染色深浅分别计 0~3 分,阳性细胞比例 0~10% 为 0 分,11%~30% 为 1 分,31%~70% 为 2 分, $>71\%$ 为 3 分,染色深浅以多数细胞为准,无显色为 0 分,浅棕色为 1 分,深棕色为 2 分,以上述 2 项评分之和作为每一例患者的积分,按积分高低判定 ALDH1 表达水平,0 分为阴性表达, ≥ 1 分即为阳性表达。

1.3 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件包进行统计分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。不同组间的临床病理特征比较采用卡方检验,用 Spearman 相关分析进行 3 种蛋白表达之间的相关性分析。

2 结果

2.1 TNBC 中 ALDH1、E-cad、N-cad 表达以及与临床病理特征的关系

90 例 TNBC 组织中,ALDH1 阳性比例 45.6%(41/90),E-cad 阳性比例 56.7%(51/90),N-cad 阳性比例 52.2%(47/90)。淋巴结转移在不同 ALDH1 表达组间差异具有统计学意义($P<0.05$)。肿瘤大小、组织学分级、淋巴结转移在不同 E-cad 表达组间差异具有统计学意义($P<0.05$),组织学分级、淋巴结转移在不同 N-cad 表达组间差异具有统计学意义 ($P<0.05$)(Table 1)。

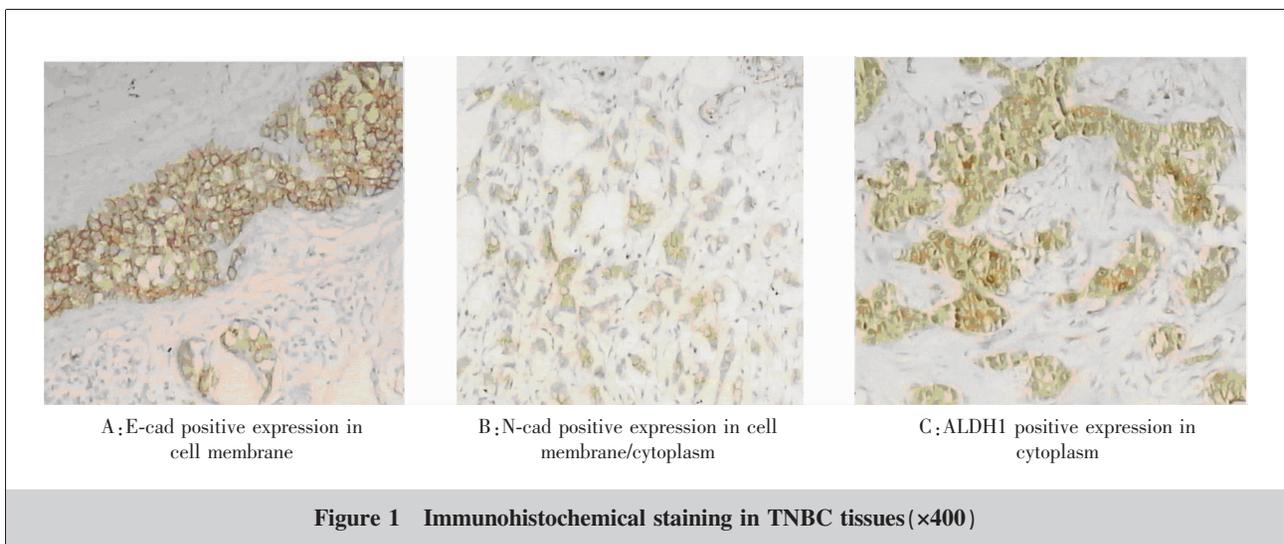


Table 1 The expressions of ALDH1,E-cad,N-cad and their relationships with the clinicopathological characteristics in TNBC

Clinicopathological characteristics		ALDH1			E-cad			N-cad		
		-	+	<i>P</i>	-	+	<i>P</i>	-	+	<i>P</i>
Age(years)	≤50	29	29	0.277	23	35	0.380	29	29	0.661
	>50	12	20		16	16		14	18	
Tumor size(cm)	≤3	31	39	0.800	26	44	0.040	33	37	1.000
	>3	10	10		13	7		10	10	
Histological grade	I	19	25	0.678	11	33	0.001	29	15	0.001
	II+III	22	24		28	18		14	32	
Lymph node metastasis	Negative	33	28	0.018	20	41	0.006	34	27	0.042
	Positive	8	21		19	10		9	20	

2.2 ALDH1、E-cad、N-cad 表达的相关性分析

Spearman 相关性分析显示,90 例 TNBC 组织中 ALDH1 阳性表达与 E-cad 表达呈负相关($r=-0.461$, $P<0.001$),与 N-cad 表达呈正相关($r=-0.518$, $P<0.001$),而 E-cad 表达与 N-cad 表达呈较弱的负相关($r=-0.208$, $P=0.049$)。

3 讨论

癌组织中存在一小群具有自我分化潜能的肿瘤干细胞^[2]。Al-Hajj 等^[3]通过人乳腺癌的动物移植模型成功分离并且鉴定出人乳腺癌干细胞,并确定其特异细胞表型 CD44⁺CD24⁻,随后 Ginestier 等^[4]证实 ALDH1 阳性乳腺癌细胞也具有乳腺癌干细胞特性并且发现其表达与乳腺癌患者预后差有关。我们的结果也显示 ALDH1 与 TNBC 的淋巴结转移相关,说明含更多干细胞表型的 TNBC 患者更容易发生淋巴结转移,预后更差。

EMT 使乳腺癌细胞失去上皮标志,获得间质表型,表现出极强的侵袭、迁移能力,直接导致肿瘤转移,并且促使转移肿瘤细胞干细胞化^[1,5]。E-cad、N-cad 分别表达于上皮细胞、间质细胞,E-cad 下调、N-cad 表达是发生 EMT 的标志。既往研究^[6]发现在约 70% 的原发性乳腺肿瘤中存在 E-cad 的表达减少甚至缺失,正是由于 E-cad 的功能缺失导致细胞与细胞之间的粘附力下降,促使上皮间质化的发生,进而引起肿瘤转移^[7]。本实验结果中 E-cad 表达与 TNBC 肿瘤大小、组织学分级、淋巴结转移负相关,N-cad 与组织学分级、淋巴结转移正相关,而且上皮标志物 E-cad 与间质标志物 N-cad 的表达负相关,这些均显示 EMT 与 TNBC 的不良预后因素存在相关性,直接

参与了 TNBC 的发生、浸润甚至远处转移。

Mani 等^[8]在体外实验中首先发现乳腺癌上皮细胞在经历 EMT(Snail 或 Twist 异位表达或加入 TGF-β 培养)后 E-cad 下调,而 N-cad 升高,同时流式细胞分析显示具有干细胞表型的细胞增多,具有自我更新能力,从而认为 EMT 可以诱导乳腺癌细胞发生干细胞化,这些现象被其他研究包括体外实验^[5]、动物模型^[9]所证实。临床也发现高表达 EMT 和干细胞标志物的基底样型乳腺癌更容易发生远处转移^[10]。

在 EMT 引起的肿瘤转移过程中,播散的癌细胞具有干细胞特性,超过 60% 的循环肿瘤细胞表达 NOTCH1 蛋白,具有自我更新能力^[11],70% 的循环肿瘤细胞表达干细胞标志物 ALDH1^[12]。但是究竟是肿瘤干细胞发生 EMT 引起肿瘤浸润扩散,还是 EMT 致使干细胞表型增加,目前没有统一的结论。于丁等^[13]通过动物模型研究认为乳腺癌干细胞通过上调 Twist 表达的上皮-间叶转化参与了肿瘤转移。我们在研究 TNBC 的干细胞表型与 EMT 的相关性时发现,干细胞标志物 ALDH1 与上皮标志物 E-cad 呈负相关,与 N-cad 成正相关,这提示 EMT 确实能够促进 TNBC 干细胞表型的增加,而干细胞表型的增加正是乳腺癌细胞发生耐药、复发转移的关键。因此从 EMT 通路入手,阻断乳腺癌的浸润、转移以及干细胞表型的产生,或许是乳腺癌治疗一条新的途径。

参考文献:

- [1] Hennessy BT, Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, et al. Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(10): 4116-4124.
- [2] Hermann PC, Bhaskar S, Cioffi M, et al. Cancer stem cells

- in solid tumors[J]. *Semin Cancer Biol*, 2010, 20(2): 77-84.
- [3] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(7): 3983-3988.
- [4] Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome[J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(5): 555-567.
- [5] Morel AP, Lièvre M, Thomas C, et al. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition[J]. *PLoS One*, 2008, 3(8): e2888.
- [6] Singhai R, Patil VW, Jaiswal SR, et al. E-cadherin as a diagnostic biomarker in breast cancer[J]. *N Am J Med Sci*, 2011, 3(5): 227-233.
- [7] Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(6): 442-454.
- [8] Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells [J]. *Cell*, 2008, 133(4): 704-715.
- [9] Santisteban M, Reiman JM, Asiedu MK, et al. Immune-induced epithelial to mesenchymal transition in vivo generates breast cancer stem cells[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(7): 2887-2895.
- [10] Sarrió D, Rodríguez-Pinilla SM, Hardisson D, et al. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(4): 989-997.
- [11] Reuben JM, Lee BN, Li C, et al. Circulating tumor cells and biomarkers: implications for personalized targeted treatments for metastatic breast cancer[J]. *Breast J*, 2010, 16(3): 327-330.
- [12] Fehm T, Hoffmann O, Aktas B, et al. Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by RT-PCR and comparison to status of bone marrow disseminated cells[J]. *Breast Cancer Res*, 2009, 11(4): R59.
- [13] Yu D, Zang AH, Wu HJ, et al. Breast cancer stem cell involves distant metastasis through epithelial-mesenchymal transition induced by up-regulating twist expression[J]. *Journal of Chinese Oncology*, 2010, 16(9): 710-714. [于丁, 臧爱华, 吴辉菁, 等. 乳腺癌干细胞通过上调 Twist 表达的上皮-间叶转化参与肿瘤转移 [J]. *肿瘤学杂志*, 2010, 16(9): 710-714.]

关于启用稿件远程处理系统的通知

本刊已启用稿件远程处理系统,该系统包括作者在线投稿/查询、主编办公、专家审稿、编辑办公等功能,通过网上投稿、网上查稿、网上审稿,实现作者、编辑、审稿专家的一体化在线协作处理,从而构建一个协作化、网络化、角色化的编辑稿件业务处理平台。对于广大作者而言,该系统最大的优点是支持在线投稿,方便作者及时了解稿件处理进程,缩短稿件处理时滞。使用过程中具体注意事项如下:

(1)第1次使用本系统投稿的作者,必须先注册,才能投稿。注册时各项信息请填写完整。作者自己设定用户名和密码,该用户名密码长期有效。

(2)已注册过的作者,请不要重复注册,否则将导致查询稿件信息不完整。如果遗忘密码,可以致电编辑部查询。

(3)作者投稿请点击“作者登录”,登录后按照提示操作即可。投稿成功后,系统自动发送回执邮件,作者投稿后请随时关注邮箱提示,也可随时点击“作者登录”,获知该稿件的审理情况、处理进展、审稿意见等。

(4)网上投稿成功1周内,请将稿件处理费20元通过邮局汇款至编辑部(务必注明第一作者姓名、稿号和详细地址);并将以下文件邮寄至编辑部:①单位介绍信;②文章若属于基金项目资助,附上基金项目批文的复印件。编辑部收到稿件处理费和上述文件后,稿件将进入审稿程序。

稿件远程处理系统启用后,本刊只接受网上投稿,不再接收电子邮件投稿和纸质稿,《肿瘤学杂志》网址:<http://www.chinaoncology.cn>。

如有任何问题,请与编辑部联系!联系电话:0571-88122280。

《肿瘤学杂志》编辑部