

基底细胞样型乳腺癌中 Cdc42 和 IQGAP1 的表达及临床意义

陈小悦¹, 张金库², 陈雪², 赵文明², 陈红², 孙吉瑞², 李金梅²

(1.承德医学院研究生部, 河北 承德 067000;

2.保定市第一中心医院, 河北 保定 071000)

摘要: [目的] 分析细胞分裂周期蛋白 42(Cdc42)和支架蛋白 1(IQGAP1)与基底细胞样型乳腺癌(basal-like breast cancer, BLBC)临床病理特征之间的关系及二者之间的相关性, 探讨 Cdc42 和 IQGAP1 在 BLBC 发生、发展及侵袭转移中的作用。[方法] 采用免疫组化方法检测 60 例 BLBC、45 例非基底细胞样型乳腺癌(non-basal-like breast carcinoma, Non-BLBC)和 35 例癌旁正常乳腺组织中 Cdc42 和 IQGAP1 的表达。[结果] Cdc42 在 BLBC 中的表达明显高于 Non-BLBC 和癌旁正常乳腺组织 ($P < 0.0125$), IQGAP1 在 BLBC 和 Non-BLBC 中的表达明显高于癌旁正常乳腺组织 ($P < 0.0125$); BLBC 中 Cdc42 的表达与淋巴结转移和 TNM 分期密切相关 ($P < 0.05$), IQGAP1 的表达与肿瘤大小和淋巴结转移密切相关 ($P < 0.05$), 并且两者在 BLBC 中的表达呈正相关关系 ($r = 0.638, P < 0.05$)。[结论] Cdc42 和 IQGAP1 可能是促进肿瘤的局部侵袭和远处转移的重要因素, 在 BLBC 的发生发展中起着重要的作用。

主题词: 乳腺肿瘤; 基底细胞样型; 细胞分裂周期蛋白 42(Cdc42); 支架蛋白 1(IQGAP1)

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2015)05-0387-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2015.05.B008

Expressions of IQGAP1 and Cdc42 in Basal-Like Breast Cancer and Their Clinical Significance

CHEN Xiao-yue¹, ZHANG Jin-ku², CHEN Xue², et al.

(1. Graduate School of Chengde Medical College, Chengde 067000, China;

2. Baoding First Central Hospital, Baoding 071000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the relationship of Cdc42 and IQGAP1 with the clinicopathologic features of basal-like breast cancer (BLBC) and the role of Cdc42 and IQGAP1 in the carcinogenesis, invasion and metastasis of BLBC. [Methods] The expressions of Cdc42 and IQGAP1 in 60 cases with BLBC, 45 cases with non-basal-like breast cancer (Non-BLBC) and 35 cases of cancer adjacent tissues were detected immunohistochemically. [Results] The expression of Cdc42 in BLBC were significantly higher than that in Non-BLBC and cancer adjacent tissues ($P < 0.0125$), the expressions of IQGAP1 in BLBC and Non-BLBC were significantly higher than that in cancer adjacent tissues ($P < 0.0125$). The expression of Cdc42 positively correlated with lymph nodes metastasis and TNM staging of BLBC ($P < 0.05$), the expression of IQGAP1 positively correlated with tumor size and lymph nodes metastasis of BLBC ($P < 0.05$), and there was positive correlation between the expressions of Cdc42 and IQGAP1 in BLBC ($r = 0.638, P < 0.05$). [Conclusion] Cdc42 and IQGAP1 may be important factors in tumor invasion and distant metastasis, and play important roles in the carcinogenesis of BLBC.

Subject words: breast neoplasms; basal-like; Cdc42; IQGAP1

Perou 等^[1]2000 年首先采用 cDNA 基因芯片技术对乳腺癌样本进行分析, 根据基因表达谱的差异将乳腺癌分为不同的分子亚型, 其中基底细胞样型乳

腺癌(basal-like breast cancer, BLBC)具有不同于其他亚型乳腺癌的生物学行为和病理特征, 临床上侵袭性强、易发生转移、复发率高且生存期短, 对于内分泌治疗及抗 Her-2 靶向治疗不敏感, 所以近年来引起国内外广泛关注, 成为乳腺癌研究的热点。

细胞分裂周期蛋白 42(Cdc42 蛋白)是 Rho 家

通讯作者: 张金库, 主任, 主任医师, 硕士; 河北省保定市第一中心医院病理科, 河北省保定市长城北大街 320 号 (071000); E-mail: zjkbk@sohu.com

收稿日期: 2014-10-28; **修回日期:** 2015-01-11

族蛋白重要成员之一,能结合鸟嘌呤三核苷酸(GTP),在哺乳动物细胞信号转导系统中发挥着“分子开关”样重要作用^[2],对细胞骨架的动态变化有重要调节作用。支架蛋白1(IQGAP1蛋白)是Rho家族成员Rac1和Cdc42的一个重要的效应因子,能与细胞骨架和黏附成分广泛作用^[3],在细胞黏附和迁移的信号网络中发挥关键作用^[4]。本研究通过免疫组织化学(SP法)染色方法,检测Cdc42和IQGAP1在BLBC中的表达情况及其与BLBC临床病理指标间的相互关系,探究影响BLBC发生、发展及侵袭转移的相关因素,为今后寻找治疗BLBC的靶向药物提供依据。

1 资料与方法

1.1 实验材料

收集保定市第一中心医院病理科2008年1月~2013年12月手术治疗及会诊的乳腺癌患者的存档蜡块,乳腺癌患者均为女性,术前均未进行放、化疗及内分泌治疗。筛选出60例BLBC组织(年龄23~56岁,平均42.6岁),45例非BLBC(Non-BLBC)组织(年龄24~59岁,平均49.1岁),35例癌旁正常乳腺组织(取距肿瘤边缘5cm组织,年龄23~55岁,平均45.2岁),所有标本均由两名资深病理医师复诊。BLBC免疫表型诊断标准采用ER、PR、Her-2阴性表达,CK5/6和(或)EGFR阳性表达^[7],病理TNM分期(pTNM)采用2010年国际抗癌联盟(UICC)和美国癌症联合会(AJCC)合作制定的第7版乳腺癌TNM分期标准,组织病理学分级采用Bloom-Richardson系统Nottingham改良方案。

1.2 实验试剂

兔抗人Cdc42单克隆抗体(浓缩型)购自美国Bioworld公司,鼠抗人IQGAP1单克隆抗体(浓缩型)购自美国BD公司,兔抗人ER、兔抗人PR、兔抗人Her-2、兔抗人CK5/6、兔抗人EGFR、Haopoly-HRP鼠/兔通用二抗试剂盒和DAB染色液等实验试剂均购自上海杰浩生物技术有限公司。

1.3 实验方法

采用免疫组化SP法,所有操作步骤均依据产品说明书进行,关键步骤如下:石蜡包埋的组织4 μ m连续切片,二甲苯脱蜡,梯度酒精逐级水化,柠

檬酸高温高压修复,滴加一抗4℃过夜,PBS冲洗,滴加二抗室温孵育15min,DAB显色,苏木素对比染色,风干,中性树脂封片。以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照,以Cdc42阳性的肺癌组织和IQGAP1阳性的胃癌组织作为阳性对照。

1.4 结果判断

每个病例由2位观察者采用盲法随机选取5个高倍视野($\times 400$),每个视野计数100个细胞。Cdc42结果的判断标准:每个高倍视野的阳性细胞数 $\leq 5\%$ 为阴性(-),每个高倍视野的阳性细胞数 $> 5\%$ 为阳性(+). IQGAP1结果判断标准按染色强度评分:无色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分;按阳性细胞率评分:阳性细胞率 $\leq 10\%$ 为1分,11%~50%为2分,51%~75%为3分, $> 75\%$ 为4分;将二者相乘得到综合评分:0分为(-),1~4分为弱阳性(+),5~8分为阳性(++),9~12分为强阳性(+++).

1.5 统计学处理

采用SPSS17.0统计软件进行分析,计数资料总体率的比较采用 χ^2 检验或Fisher确切概率法,相关性分析采用Spearman相关分析,检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义;组间两两比较采用 χ^2 分割法,检验水准 $\alpha=0.0125$, $P<0.0125$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Cdc42在BLBC、Non-BLBC和癌旁正常乳腺组织中的表达差异

Cdc42蛋白免疫组化阳性表达呈棕黄色颗粒,主要位于细胞浆和细胞膜(Figure 1)。Cdc42在BLBC、Non-BLBC和癌旁正常乳腺组织阳性表达率分别为85.0%(51/60)、66.7%(30/45)和31.4%(11/35);BLBC中Cdc42阳性表达率高于Non-BLBC和癌旁正常乳腺组织,差异具有统计学意义($P<0.0125$,Table 1),而Non-BLBC与癌旁正常乳腺组织相比,差异无统计学意义($P>0.0125$,Table 1)。

2.2 IQGAP1在BLBC、Non-BLBC和癌旁正常乳腺组织中的表达差异

IQGAP1蛋白免疫组化阳性表达呈棕黄色颗粒,主要位于细胞浆内(Figure 2)。IQGAP1在BLBC、

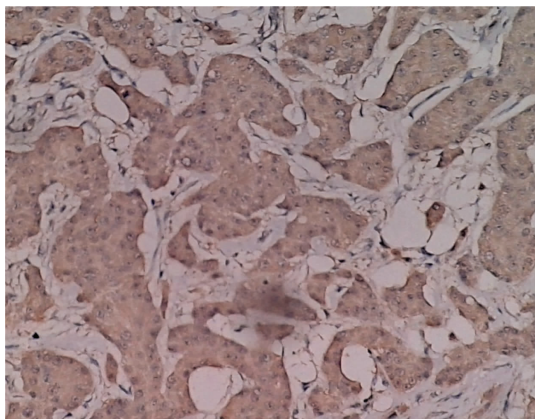


Figure 1 Expression of Cdc42 in BLBC(SP×200)

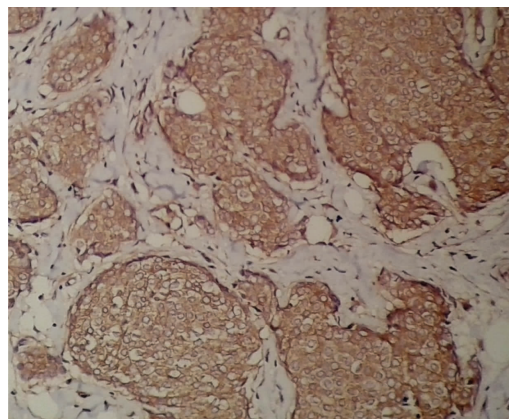


Figure 2 Expression of IQGAP1 in BLBC(SP×200)

Non-BLBC 和癌旁正常乳腺组织阳性表达率分别为 90.0% (54/60)、82.2% (37/45) 和 31.4% (11/35);BLBC 和 Non-BLBC 组中 IQGAP1 阳性表达率高于癌旁正常乳腺组织, 差异具有统计学意义 ($P<0.0125$, Table 1), 而 BLBC 与 Non-BLBC 组相比, 差异无统计学意义 ($P>0.0125$, Table 1)。

2.3 BLBC 中 Cdc42 和 IQGAP1 的表达与临床病理因素之间的关系

Cdc42 在 BLBC 中的表达与淋巴结转移情况及 pTNM 分期密切相关 ($P<0.05$), 与患者年龄、肿瘤直径及组织学分级无关 ($P>0.05$) (Table 2); IQGAP1 在 BLBC 中的表达与肿瘤直径及 pTNM 分期密切相关 ($P<0.05$), 与患者年龄、组织学分级及淋巴结转移情况无关 ($P>0.05$) (Table 2)。

2.4 BLBC 中 Cdc42 和 IQGAP1 表达的关系

经 Spearman 相关分析可得, BLBC 中 Cdc42 和 IQGAP1 的表达呈正相关 ($r=0.638$, $P<0.01$, Table 3)。

3 讨论

基底细胞样型乳腺癌是指具有基底细胞基因表型并不同程度表达基底细胞

Table 1 Expressions of Cdc42 and IQGAP1 in BLBC, Non-BLBC and normal breast tissue

Groups	N	Cdc42			IQGAP1		
		+	-	P	+	-	P
BLBC	60	51	9		54	6	
Non-BLBC	45	25	20*	0.000	37	8*	0.000
Normal breast tissue	35	11	24 [△]		11	24 ^{△△}	

Note: Cdc42: *, BLBC vs Non-BLBC, $P<0.0125$; [△]: BLBC vs normal breast tissue, $P<0.0125$; ^{△△}: Non-BLBC vs normal breast tissue, $P>0.0125$.

IQGAP1: *, BLBC vs Non-BLBC, $P>0.0125$; [△]: BLBC vs normal breast tissue, $P<0.0125$; ^{△△}: Non-BLBC vs normal breast tissue, $P<0.0125$.

Table 2 Cdc42, IQGAP1 expressions and clinicopathologic features in BLBC

Features	N	Cdc42			IQGAP1		
		+	-	P	+	-	P
Age (years old)							
< 50	21	16	5		17	4	
≥ 50	39	35	4	0.255*	34	5	0.706*
Tumor size (cm)							
≥ 2	40	36	4		38	2	
< 2	20	15	5	0.145*	13	7	0.004*
Pathological grade							
I	11	9	2		9	2	
II	21	16	5	0.256	18	3	0.948
III	28	26	2		24	4	
Lymph node metastasis							
-	19	13	6		15	4	
+	41	38	3	0.023*	36	5	0.445*
pTNM stage							
I ~ II	24	17	7		16	8	
III ~ III	36	34	2	0.023*	35	1	0.002*

Note: *: Fisher exact test.

Table 3 Correlation of Cdc42, IQGAP1 expressions in BLBC

Cdc42	IQGAP1		r	P
	+	-		
+	50	1	0.638	0.000
-	4	5		

角蛋白和肌上皮标志物的乳腺癌, 该类肿瘤常出现 17p、17q、20p、20q 的扩增及 4q、7q、8q、13q、14q、16p、17q、19q 和 Xp 的缺失, 尤以 16p、17q、19q 具有特征性, 且其最常见的肿瘤杂合性缺失 (LOH) 发生于 5p 和 4q^[5,6], 这与其它类型的乳腺癌明显不同。因此, 严格意义上来说 BLBC 的诊断应该以基因检测为标准, 但是限于临床工作中的实际情况, 一般用免疫组化方法诊断基底细胞样型乳腺癌, 本研究采用 Nielsen 等^[7]定义的方法诊断 BLBC, 认为 ER、PR、Her-2 阴性表达和细胞角蛋白 (CK5/6) 或 (和) 表皮生长因子受体 (EGFR) 阳性表达的乳腺癌为 BLBC, CK5/6 是确定 BLBC 最有效的标志物, 特异性为 100%, 敏感性 76%。BLBC 多见于青年女性^[8], 具有较高的增殖活性和高度的侵袭性, 在年龄、组织学分级及淋巴结转移一致的情况下, 更易早期复发及转移, 其临床缓解期和总生存期明显缩短^[9], 5 年无病生存率约为 15%。BLBC 较易通过血管转移至脑和肺, 而较少转移至骨和肝, 提示肿瘤具有独特的转移机制, 一旦发生转移预后极差。

Cdc42 属于 Ras 家族内 Rho 亚家族的成员, 是目前研究最多的 RhoGTP 酶之一, 它具有调节细胞骨架结构、细胞极性以及细胞内运输等多种功能^[10], 在维持 Ras 诱导的细胞表型改变方面起重要作用, 且 Cdc42 能阻断上皮细胞的正常极化并促进细胞的迁移和侵入^[11,12]; 并与肿瘤的发生和转移等密切相关, 其机制可能与诱导细胞前缘肌动蛋白细胞骨架的重组^[13]和修饰了癌基因的相关蛋白^[14]有关。研究发现, Cdc42 在多种肿瘤细胞中表达增高, Zhang 等^[15]研究发现在非小细胞肺癌组织中, Cdc42 的表达明显高于正常肺组织, 且表达 Cdc42 的肺腺癌具有较高的淋巴结转移率, 且患者生存期较短, Cdc42 高表达可以增高癌细胞的浸润能力; Chander 等^[16]发现在乳腺癌中 Cdc42 的表达明显高于对照组, 在乳腺癌的发生、发展、转移的浸润过程中起一定作用。本研究结果表明, Cdc42 在 BLBC 中的表达明显高于正常乳腺组织, 且与 BLBC 的淋巴结转移情况及 pTNM 分期有关 ($P < 0.05$), 提示 Cdc42 可能在 BLBC 的发生及进展中发挥了重要作用, 尤其在 BLBC 的转移及侵袭方面, 可能是 BLBC 预后不良的因素。另外, Cdc42 在 BLBC 中的表达明显高于 Non-BLBC, 且在 Non-BLBC 和正常乳腺组织中表达的差

异无显著, 提示与普通乳腺癌相比, BLBC 具有较高的侵袭性, 其特殊的生物学行为与不良预后有关。

IQGAPs 是近年新发现的一个蛋白家族, 在哺乳动物中有 3 个同源物即 IQGAP1~3, IQGAP1 是人类 3 个同系物中发现最早的^[17], 且研究最广泛。IQGAP1 基因位于染色体 15q26 上, 是基因扩增的热点, 其所在位点基因变异和蛋白表达增多已在多种肿瘤组织及肿瘤细胞株中被观察到, 如肺癌、肝癌、结肠癌、胃癌、卵巢癌、子宫内膜癌和恶性胶质瘤等^[18], IQGAP1 作为一个支架蛋白, 能与多种靶分子作用, 参与众多效应因子的生物学功能。Walch 等^[19]研究发现, 在胃癌组织中 IQGAP1 表达上调, 与 Rac1 的表达成正相关, 而与 E-cadherin 的表达倾向于呈负相关; Rac1 和 E-cadherin 的表达与预后无关, 但 IQGAP1 表达缺失提示患者预后良好。Wang 等^[20]用 Western 印迹和实时 RT-PCR 检测 60 例胰腺癌结果显示, 在胰腺癌组织中 IQGAP1 的蛋白和 mRNA 的表达明显高于癌旁正常胰腺组织, 组织芯片免疫组化分析表明, IQGAP1 蛋白在胰腺癌组织 (80.0%, 48/60) 与癌旁正常胰腺组织 (18.3%, 11/60) 中的表达有显著差异 ($P < 0.001$)。本研究结果表明, IQGAP1 在 BLBC 中的表达明显高于正常乳腺组织, 且与 BLBC 的肿瘤直径及 pTNM 分期有关 ($P < 0.05$), 提示 IQGAP1 可能促进了 BLBC 细胞的增殖, 并在肿瘤的侵袭转移中有重要作用。另外, IQGAP1 在 BLBC 和 Non-BLBC 中的表达差异无显著性, 可能与本实验的样本量较小有关, 有待进一步深入研究。

Cdc42 与 IQGAP1 在影响肿瘤的发生发展中, 有很多类似的功能, IQGAP1 是 Cdc42 的一个重要效应因子, 通过调节 Cdc42 的激活状态, 从而影响肿瘤的增殖及迁移, Cdc42 也能调节 IQGAP1 与靶目标的结合, 活化的 Cdc42 能阻止 IQGAP1 与 E-cadherin 介导的细胞—细胞间黏附^[21]。在本研究中, Cdc42 和 IQGAP1 在 BLBC 中的表达具有较好的相关性, 进一步支持了 Cdc42 和 IQGAP1 之间的相互作用。但是, 肿瘤的发生发展是一个异常复杂的过程, 受外界致癌因素和机体内在因素的影响, 不只是单个基因突变的结果, 而是一个长期的、分阶段的、多种基因突变积累的结果, 又由于本研究受样本量及实验方法的限制, 所以 Cdc42 和 IQGAP1 在 BLBC 中的具体作用机制及其临床意义, 仍需进一

步研究。

参考文献:

- [1] Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours[J]. *Nature*, 2000, 406(6797): 747–752.
- [2] Sinha S, Yang W. Cellular signaling for activation of Rho GTPase Cdc42[J]. *Cell Signal*, 2008, 20(11): 1927–1934.
- [3] Noritake J, Watanabe T, Sato K, et al. IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118 (Pt10): 20852–20921.
- [4] Brownm D, Sacksd B. IQGAP1 in cellular signaling: bridging the GAP[J]. *Trends Cell Biol*, 2006, 16(5): 242–249.
- [5] Jones C, Nonni AV, Fuiiford L, et al. CGH analysis of ductal carcinoma of the breast with basaloid/myoepithelial cell differentiation[J]. *Br J Cancer*, 2001, 86(3): 422–427.
- [6] Wang ZC, Lin M, Wei L, et al. Lose of heterozygosity and its correlation with expression profiles in subclasses of invasive breast cancers[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(1): 64–71.
- [7] Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical charaterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10 (16): 5367–5374.
- [8] Abd El-Rehim DM, Ball G, Pinder SE, et al. High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses[J]. *Int J Cancer*, 2005, 116 (3): 340–350.
- [9] Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Basal-like breast cancer: a critical review[J]. *Clin Oncol*, 2008, 26(15): 2568–2581.
- [10] Szczepanowska J. Involvement of Rac/Cdc42/PAK path way in cytoskeletal rearrangements[J]. *Acta Biochim Pol*, 2009, 56(2): 225–234.
- [11] Tsang CM, Lau EP, Di K, et al. Berberine inhibits Rho GTPases and cell migration at low doses but induces G2 arrest and apoptosis at high doses in human cancer cells[J]. *Int J Mol Med*, 2009, 24(1): 131–138.
- [12] Wang JB, Wu W J, Cerione RA. Cdc42 and Ras cooperate to mediate cellular transformation by intersectin-L[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(24): 22883–22891.
- [13] Gao L, Bai L, Nan QZ. Activation of Rho GTPase Cdc42 promotes adhesion and invasion in colorectal cancer cells[J]. *Med Sci Monit Basic Res*, 2013, 25(19): 201–207.
- [14] Hu J, Mukhopadhyay A, Craig AW. Transducer of Cdc42-dependent actin assembly promotes epidermal growth factor-induced cell motility and invasiveness[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(3): 2261–2272.
- [15] Zhang JY, Zhang D, Wang EH. Overexpression of small GTPases directly correlates with expression of δ -catenin and their coexpression predicts a poor clinical outcome in nonsmall cell lung cancer [J]. *Mol Carcinog*, 2013, 52(5): 338–347.
- [16] Chander H, Truesdell P, Meens J, et al. Transducer of Cdc42-dependent actin assembly promotes breast cancer invasion and metastasis[J]. *Oncogene*, 2013, 32(25): 3080–3090.
- [17] Jadeski L, Mataraza JM, Jeong HW, et al. IQGAP1 stimulates proliferation and enhances tumorigenesis of human breast epithelial cells[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(2): 1008–1017.
- [18] Liu DY, Jiang S, Yang L. Research progress in IQGAP1 and tumor [J]. *Guangdong Medical Journal*, 2010, 31(6): 789–791. [刘东阳, 姜珊, 杨磊. 支架蛋白 IQGAP1 与肿瘤的研究进展[J]. *广东医学*, 2010, 31(6): 789–791.]
- [19] Walch A, Seidl S, Hermannstadter C, et al. Combined analysis of Rac1, IQGAP1, Tiam1 and E-cadherin expression in gastric cancer[J]. *Mod Pathol*, 2008, 21(5): 544–552.
- [20] Wang XX, Li XZ, Zhai LQ, et al. Overexpression of IQGAP1 in human pancreatic cancer [J]. *Hepatobil Pancr Dis Int*, 2013, 12(5): 540–545.
- [21] Kuroda S, Fukata M, Nakagaw AM, et al. Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion [J]. *Science*, 1998, 281: 832–835.