

# 整合素 $\beta 3$ 在三阴性乳腺癌中的表达及其与预后的关系

李 聪, 张 悦, 任延律, 黄元夕, 李志高, 庞 达, 程绍强  
(哈尔滨医科大学附属肿瘤医院, 黑龙江 哈尔滨 150081)

**摘 要:** [目的] 探讨整合素  $\beta 3$  在三阴性乳腺癌中的临床意义。[方法] 免疫组织化学染色法检测 98 例三阴性乳腺癌组织中整合素  $\beta 3$  的表达情况。[结果] 在三阴性乳腺癌患者中整合素  $\beta 3$  表达与患者的绝经状态及淋巴结转移状态密切相关 ( $P < 0.05$ )。整合素  $\beta 3$  阳性的三阴性乳腺癌患者的 5 年无病生存时间及乳腺癌特异性生存时间均显著差于整合素  $\beta 3$  阴性者。Cox 多因素分析显示整合素  $\beta 3$  是三阴性乳腺癌预后不良的独立危险因素 (HR=1.910, 95% CI: 1.069~3.413;  $P=0.029$ )。[结论] 整合素  $\beta 3$  可作为判断三阴性乳腺癌预后的重要指标及潜在的治疗靶点。

**关键词:** 三阴性乳腺癌; 整合素  $\beta 3$ ; 预后

中图分类号: R737.9 文献标识码: A 文章编号: 1671-170X(2016)12-1037-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2016.12.B011

## Expression of Integrin $\beta 3$ in Triple Negative Breast Cancer and Its Prognostic Significance

LI Cong, ZHANG Yue, REN Yan-lyu, et al.

(The Third Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

**Abstract:** [Objective] To explore the clinical significance of integrin  $\beta 3$  expression in triple negative breast cancer (TNBC). [Methods] The expression of integrin  $\beta 3$  was detected in 98 patients with TNBC by immunohistochemical staining. [Results] Integrin  $\beta 3$  was significantly associated with menopausal status and lymph node status ( $P < 0.05$ ). Patients with positive integrin  $\beta 3$  expression had worse 5-year disease-free survival and breast cancer-specific survival than patients with negative expression. Cox multivariate analysis showed that integrin  $\beta 3$  was an independent unfavorable prognostic factor for patients with TNBC (HR=1.910, 95% CI: 1.069~3.413;  $P=0.029$ ). [Conclusion] Integrin  $\beta 3$  can be used as the prognostic marker and potential therapy target for TNBC.

**Subject words:** integrin  $\beta 3$ ; triple negative breast cancer; prognosis

三阴性乳腺癌 (triple negative breast cancer, TNBC) 是雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 及人类表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor, Her-2) 均为阴性的高度恶性的乳腺癌<sup>[1]</sup>。TNBC 患者不能从内分泌治疗及靶向治疗等治疗方式获益, 目前尚无标准治疗方案<sup>[2]</sup>。因此, 针对影响 TNBC 预后的分子标志物的探索, 对 TNBC 患者进行个体化治疗及

预后分析具有重要的临床意义。

整合素 (integrin) 是一类细胞表面黏附分子, 介导细胞间、细胞与细胞外基质间的相互黏附, 在肿瘤的发生、发展过程中发挥重要的作用<sup>[3]</sup>。整合素  $\beta 3$  作为整合素家族重要成员之一, 通常与整合素  $\alpha II b$  及  $\alpha v$  亚单位以非共价键方式结合形成异二聚体, 作为黏附受体与相应配体结合后的双向信号传导对细胞的正常生理功能起调控作用<sup>[4]</sup>。在乳腺癌、胃癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌等肿瘤细胞中存在整合素  $\beta 3$  过表达<sup>[5-9]</sup>。同时, 整合素  $\beta 3$  与肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移、血管生成及耐药等恶性生物学行为密切相关<sup>[6, 10-13]</sup>。我们前期研究中发现整合素  $\beta 3$  蛋白高

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (H2015051)

通讯作者: 程绍强, 副主任医师, 博士后; 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院乳腺外科, 黑龙江省哈尔滨市哈平路 150 号 (150081);  
E-mail: shaoqiangcheng@hotmail.com

收稿日期: 2016-05-08; 修回日期: 2016-07-18

表达是乳腺癌预后不良的独立危险因素<sup>[4]</sup>。同时,整合素  $\beta 3$  在 TNBC 中表达的阳性率显著高于其在乳腺癌整体中的表达,提示整合素  $\beta 3$  可能为影响 TNBC 预后的分子标志物及治疗靶点。本研究采用免疫组织化学染色法探讨整合素  $\beta 3$  在 TNBC 中表达情况,并分析其表达与 TNBC 的临床病理因素及预后的关系。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

标本来源于哈尔滨医科大学附属肿瘤医院乳腺外科 2006 年 1 月至 2008 年 12 月接诊并行乳腺癌改良根治手术的 TNBC 组织 98 例。TNBC 指癌组织经免疫组织化学检查结果显示 ER、PR 及 Her-2 三者均为阴性的乳腺癌。其中 Her-2 阴性定义为:免疫组织化学检测为(-)或(+);若免疫组织化学(++),则经过荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH)检测为(-)。主要排除双乳癌、炎性乳癌、确诊时存在局部进展及远处转移的患者。本组患者的临床病理特征及治疗方式见表 1(Table 1)。

### 1.2 主要试剂

兔抗人整合素  $\beta 3$  单克隆抗体(ab75872)购自 Abcam 公司;兔二步法检测试剂盒、DAB 显色试剂盒均购自中杉金桥生物技术公司。

### 1.3 实验方法

组织蜡块  $4\mu\text{m}$  连续切片,采用常规 ABC 免疫组化染色法检测 TNBC 组织中整合素  $\beta 3$  的表达。经二甲苯脱蜡、梯度酒精脱水后,于柠檬酸缓冲液中高温高压修复,滴加抗整合素  $\beta 3$  抗体稀释液,  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱过夜孵育,滴加生物素标记二抗,DAB 显色后封片。

### 1.4 结果判定

免疫组织化学染色结果由资深病理科医生进行判定。随机选取 5 个视野 (每个视野细胞数不少于 200 个),按阳性细胞所占同类细胞数百分比及着色深浅进行结果判定。①无着色 0 分,浅黄色 1 分,棕黄色 2 分,棕褐色 3 分;②阳性细胞百分比评分:< 25% 为 1 分;25%~50% 为 2 分;51%~75% 为 3 分;> 75% 为 4 分。两项得分相加,0~2 分为低表达,3~5 分为中度表达, $\geq 6$  分为高表达。整合素  $\beta 3$  呈棕黄色

**Table 1 Correlation between integrin  $\beta 3$  expression and clinicopathological features of patients with TNBC**

Clinicopathological features	N	Integrin $\beta 3$		P
		Positive	Negative	
Age(years old)				
$\geq 50$	43	22	21	0.878
<50	55	29	26	
Menopausal status				
Postmenopausal	36	14	22	0.047
Premenopausal	62	37	25	
pT				
pT <sub>1</sub>	37	15	22	0.076
pT <sub>2-4</sub>	61	36	25	
pN				
pN <sub>0</sub>	48	5	43	<0.001
pN <sub>1-3</sub>	50	46	4	
Histological status				
G <sub>1-2</sub>	79	38	41	0.111
G <sub>3</sub>	19	13	6	
Chemotherapy				
Yes	93	49	44	0.580
No	5	2	3	
Radiotherapy				
Yes	79	40	39	0.706
No	18	10	8	

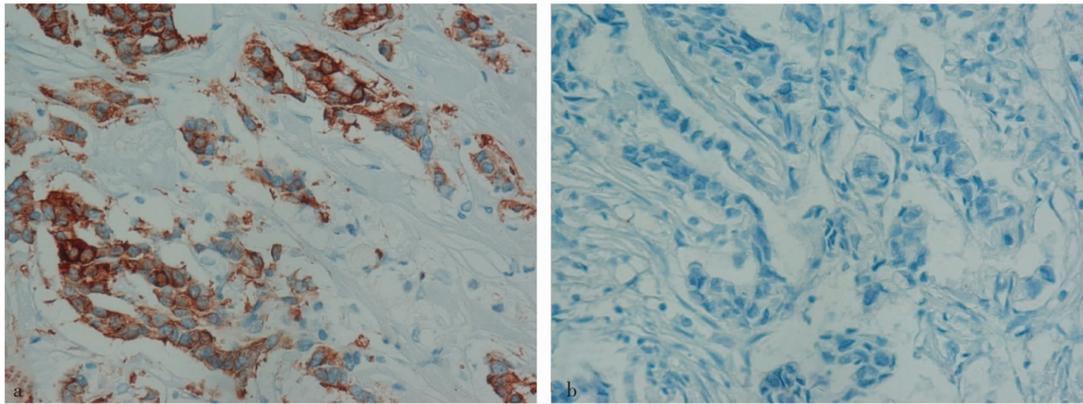
颗粒表达于乳腺癌细胞质(Figure 1a)。根据整合素  $\beta 3$  表达强弱将纳入患者分为 2 组:高表达组为整合素  $\beta 3$  阳性组(Figure 1a),其余为整合素  $\beta 3$  阴性组(Figure 1b)。

### 1.5 随访

随访资料来自哈尔滨医科大学附属肿瘤医院病案室。采用电话随访患者术后生存情况,随访直至死亡或研究终止。患者随访按照 NCCN 指南进行:术后 2 年每 3 个月随访 1 次;术后 2~5 年每 6 个月随访 1 次;术后超过 5 年每年随访 1 次。每年或疾病复发时进行 1 次乳腺钼靶检查,必要时行乳腺磁共振成像检查。无病生存时间(disease-free survival, DFS)定义为手术后至疾病复发或由于疾病进展导致患者死亡的时间。乳腺癌特异性生存时间(breast cancer-specific survival, BCSS)定义为手术后至乳腺癌引起死亡的时间或随访终止时间。

### 1.6 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件对相关数据进行统计分析。整合素  $\beta 3$  与临床病理因素间比较用  $\chi^2$  检验;采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,并用 Log-rank 检验进行生存分析;应用 Cox 比例风险回归模型进行



Note: a: positive expression; b: negative expression.

Figure 1 Integrin  $\beta 3$  expression in TNBC tissue ( $\times 400$ )

单因素及多因素预后分析。 $P < 0.05$  认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 整合素 $\beta 3$ 表达与 TNBC 临床病理因素的关系

整合素  $\beta 3$  表达与 TNBC 临床病理因素的关系见表 1 (Table 1)。整合素  $\beta 3$  表达与患者绝经状态及淋巴结转移显著相关。绝经前乳腺癌患者整合素  $\beta 3$  表达阳性率 (37/62, 59.7%) 显著高于绝经后乳腺癌患者 (14/36, 38.9%); 腋窝淋巴结转移的 TNBC 患者的整合素  $\beta 3$  阳性率 (46/50, 92.0%) 显著高于无腋窝淋巴结转移的 TNBC 患者 (5/48, 10.4%)。整合素  $\beta 3$  表达与患者年龄、肿瘤大小、组织学分级及术后放化疗无关。

### 2.2 整合素 $\beta 3$ 表达与 TNBC 患者预后的关系

全部患者随访信息完整, 中位随访时间为 71 (15~109) 个月。随访期间, 98 例患者中 23 例复发, 21 例死亡。研究发现整合素  $\beta 3$  阳性组及阴性组的 TNBC 患者 5 年 BCSS 分别为 62.6%、87.4% ( $P =$

0.002, Figure 2a), 5 年 DFS 分别为 41.0%、88.8% ( $P < 0.001$ , Figure 2b)。针对入选患者的 BCSS, Cox 单因素分析显示淋巴结转移状态及整合素  $\beta 3$  表达与 TNBC 患者预后相关, Cox 多因素分析显示整合素  $\beta 3$  阳性表达为 TNBC 患者预后不良的独立影响因素 (Table 2)。

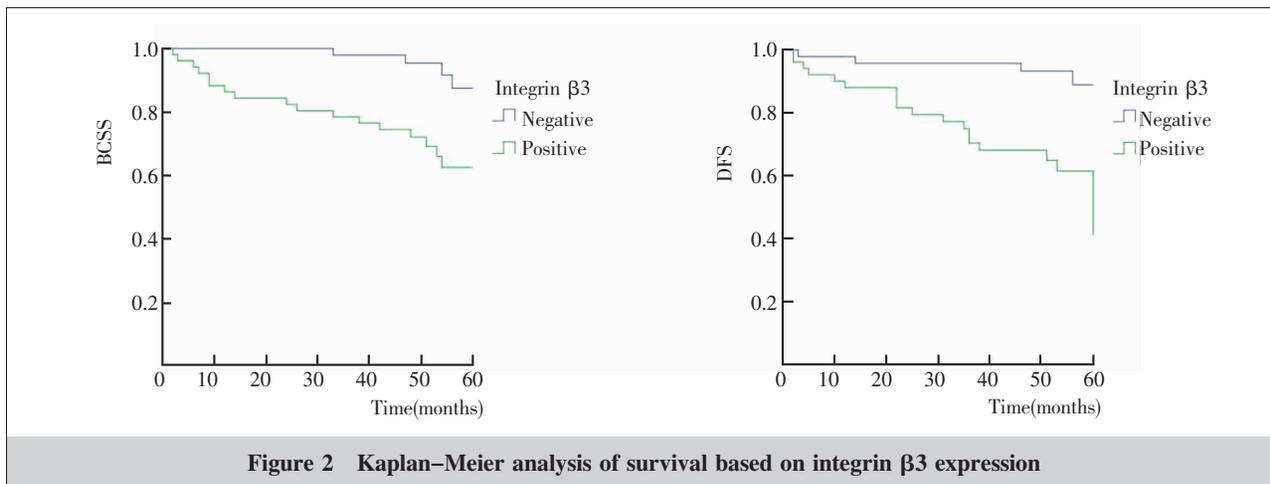
## 3 讨论

本研究发现整合素  $\beta 3$  蛋白表达与 TNBC 患者的绝经状态及淋巴结转移状态显著相关。整合素  $\beta 3$  蛋白表达状态是 TNBC 的独立预后因素。整合素  $\beta 3$  阳性患者的 DFS 及 BCSS 显著差于整合素  $\beta 3$  阴性者。研究结果与本课题组的前期研究结果一致。既往研究表明整合素  $\beta 3$  蛋白过表达与乳腺癌预后不良密切相关, 是乳腺癌预后不良的独立危险因素<sup>[14]</sup>。但前期研究纳入乳腺癌患者包含多种乳腺癌亚型, 而本研究仅纳入 TNBC 患者, 为进一步研究 TNBC 的预后标志物及潜在靶点提供依据。

整合素  $\beta 3$  作为整合素家族重要成员之一, 在

Table 2 Univariate and multivariate Cox regression analysis of prognostic factors for patients with TNBC

Variables	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	95%CI	P	HR	95%CI	P
Age ( $\geq 50 / < 50$ )	2.823	0.949~8.398	0.062	2.912	0.743~11.410	0.125
Menopausal status (postmenopausal/premenopausal)	1.349	0.559~3.225	0.506	1.079	0.341~3.418	0.897
Histologic grade ( $G_{1-2} / G_3$ )	2.233	0.901~5.536	0.083	2.626	0.950~7.260	0.063
pT (pT <sub>1</sub> /pT <sub>2-4</sub> )	1.829	0.760~4.406	0.178	1.410	0.557~3.566	0.468
pN (pN <sub>0</sub> /pN <sub>1-3</sub> )	5.498	1.865~16.210	0.002	1.177	0.235~5.890	0.843
Integrin $\beta 3$ (negative/positive)	1.911	1.330~2.747	<0.001	1.910	1.069~3.413	0.029



胃癌、肺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、前列腺癌等肿瘤细胞中过表达<sup>[5-9]</sup>,并参与调控肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移、血管生成及化疗耐药等恶性生物学行为<sup>[6,10-13]</sup>。目前整合素  $\beta 3$  在乳腺癌细胞水平上已存在较多研究:①参与乳腺癌的血管生成:整合素  $\beta 3$  在乳腺癌血管生成中起关键作用,表达于血管内皮细胞的有腔面和无腔面,参与内皮细胞的迁移及毛细血管管腔的生成<sup>[13,15]</sup>;②参与乳腺癌细胞侵袭转移:乳腺癌患者常发生骨转移,且难以治愈,是导致患者死亡的重要因素之一<sup>[16]</sup>。在乳腺癌骨转移过程中,整合素  $\beta 3$  和骨唾液蛋白等细胞外基质的蛋白三肽序列 RGD 结合,相互作用介导乳腺癌细胞与骨小梁黏附,使肿瘤细胞在骨中浸润、侵袭导致骨转移<sup>[17]</sup>;③参与肿瘤细胞的凋亡:整合素  $\beta 3$  可促进癌细胞与胶原基质结合而抑制肿瘤细胞凋亡;对基质脱离的癌细胞,整合素  $\beta 3$  可下调自身表达而阻断肿瘤失巢凋亡<sup>[18]</sup>。本研究中发现整合素  $\beta 3$  阳性患者的 DFS 及 BCSS 显著差于整合素  $\beta 3$  阴性者,整合素  $\beta 3$  蛋白表达状态是 TNBC 的独立预后因素。本研究结果与其恶性生物学行为相一致。因此整合素  $\beta 3$  可以是判定 TNBC 患者预后的重要预测指标。

近期 Seguin 等<sup>[19]</sup>发现整合素  $\beta 3$  阳性肿瘤细胞具有肿瘤干细胞样生物学活性,通过活化 KRAS/RalB,激活下游 TBK1 和 NF- $\kappa$ B,导致肿瘤细胞对厄洛替尼、拉帕替尼等药物耐药。肿瘤干细胞是肿瘤细胞中一小部分具有自我更新及多向分化潜能的细胞<sup>[20]</sup>。与一般肿瘤细胞相比,肿瘤干细胞在放化疗表现出更强的抵抗能力<sup>[21]</sup>。这种特性使其在治疗过程中得以存活,成为导致肿瘤复发、转移的根源。在治疗上

对这类细胞的清除,有可能切断肿瘤产生的源泉,最终带来肿瘤的“治愈”。以上证据为以整合素  $\beta 3$  为靶点的抗肿瘤治疗提供理论依据及指导。

本研究发现整合素  $\beta 3$  作为影响 TNBC 预后的分子标志物,整合素  $\beta 3$  阳性患者的 DFS 及 BCSS 显著差于整合素  $\beta 3$  阴性者。整合素  $\beta 3$  能否作为 TNBC 的潜在治疗靶点? Parvani 等<sup>[22]</sup>研究发现应用阳离子脂质载体(ECO)阻断整合素  $\beta 3$  的表达后抑制 TNBC 细胞上皮间质转化过程的发生,抑制 TNBC 细胞的侵袭转移能力。同时,相比未接受 ECO 治疗的成瘤裸鼠,接受静脉注射 ECO 纳米粒子的成瘤裸鼠体内肿瘤负担明显减轻并抑制肿瘤转移,提示阻断整合素  $\beta 3$  的表达可能成为治疗 TNBC 的手段之一,但仍需大量体内外实验及临床试验进一步验证。

此外,我们发现整合素  $\beta 3$  表达与患者绝经状态显著相关,绝经前乳腺癌患者整合素  $\beta 3$  表达阳性率显著高于绝经后乳腺癌患者;我们的既往研究发现整合素  $\beta 3$  在乳腺癌组织中的表达与患者发病年龄及绝经状态密切相关<sup>[14]</sup>,均提示整合素  $\beta 3$  表达可能受体内性激素的调控。研究表明体内孕酮调控乳腺干细胞的增殖,在月经下半周期孕酮分泌达高峰时乳腺干细胞的数量扩增 14 倍,为乳腺癌的发生提供机会<sup>[23]</sup>。近期研究表明整合素  $\beta 3$  阳性肿瘤细胞具有肿瘤干细胞样生物学活性<sup>[11,19]</sup>。以上研究结果提示整合素  $\beta 3$  可能为乳腺癌干细胞的分子标识,但其具体调控机制有待进一步研究。

综上,整合素  $\beta 3$  表达可以作为 TNBC 预后不良的评估指标,为 TNBC 患者进行个体化治疗提供新

的思路和潜在的治疗靶点。

## 参考文献:

- [1] Penault-Llorca F, Viale G. Pathological and molecular diagnosis of triple-negative breast cancer; a clinical perspective[J]. *Ann Oncol*, 2012, 23(Suppl 6):vi19-vi22.
- [2] Palma G, Frasci G, Chirico A, et al. Triple negative breast cancer; looking for the missing link between biology and treatments[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(29):26560-26574.
- [3] De Franceschi N, Hamidi H, Alanko J, et al. Integrin traffic—the update[J]. *J Cell Sci*, 2015, 128(5):839-852.
- [4] Yu CH, Rafiq NB, Cao F, et al. Integrin-beta3 clusters recruit clathrin-mediated endocytic machinery in the absence of traction force[J]. *Nat Commun*, 2015, 6:8672.
- [5] Li W, Liu C, Zhao C, et al. Downregulation of beta3 integrin by miR-30a-5p modulates cell adhesion and invasion by interrupting Erk/Ets1 network in triple-negative breast cancer[J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(3):1155-1164.
- [6] Ni R, Huang Y, Wang J. MiR-98 targets ITGB3 to inhibit proliferation, migration, and invasion of non-small-cell lung cancer[J]. *Onco Targets Ther*, 2015, 8:2689-2697.
- [7] Shen Z, Ye Y, Kauttu T, et al. Novel focal adhesion protein kindlin-2 promotes the invasion of gastric cancer cells through phosphorylation of integrin beta1 and beta3 [J]. *J Surg Oncol*, 2013, 108(2):106-112.
- [8] Hess K, Boger C, Behrens HM, et al. Correlation between the expression of integrins in prostate cancer and clinical outcome in 1284 patients [J]. *Ann Diagn Pathol*, 2014, 18(6):343-350.
- [9] Philippe CL. Therapeutic value of an integrin antagonist in prostate cancer[J]. *Curr Drug Targets*, 2016, 17(3):321-327.
- [10] Carter RZ, Micocci KC, Natoli A, et al. Tumour but not stromal expression of beta3 integrin is essential, and is required early, for spontaneous dissemination of bone-metastatic breast cancer[J]. *J Pathol*, 2015, 235(5):760-772.
- [11] Kannan N, Nguyen LV, Eaves CJ. Integrin beta3 links therapy resistance and cancer stem cell properties [J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(5):397-399.
- [12] Maeng YS, Aguilar B, Choi SI, et al. Inhibition of TGFBIp expression reduces lymphangiogenesis and tumor metastasis[J]. *Oncogene*, 2016, 35(2):196-205.
- [13] Robinson SD, Hodivala-Dilke KM. The role of beta3-integrins in tumor angiogenesis: context is everything [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2011, 23(5):630-637.
- [14] Lina Z, Xinxin L, Hong Z, et al. Overexpression of integrin beta3 indicates an unfavorable clinical outcome in breast cancer[J]. *Modern Oncology*, 2014, 22(12):2846-2849. [甄丽娜, 吕鑫鑫, 赵红, 等. 整合素 beta3 蛋白高表达提示乳腺癌预后不良[J]. *现代肿瘤医学*, 2014, 22(12):2846-2849.]
- [15] Eliceiri BP, Cheresh DA. Role of alpha v integrins during angiogenesis[J]. *Cancer J*, 2000, 6(Suppl 3):S245-S249.
- [16] Akhtari M, Mansuri J, Newman KA, et al. Biology of breast cancer bone metastasis[J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7(1):3-9.
- [17] Schneider JG, Amend SR, Weilbaecher KN. Integrins and bone metastasis: integrating tumor cell and stromal cell interactions[J]. *Bone*, 2011, 48(1):54-65.
- [18] Kaur S, Kenny HA, Jagadeeswaran S, et al. Beta 3-integrin expression on tumor cells inhibits tumor progression, reduces metastasis, and is associated with a favorable prognosis in patient with ovarian cancer [J]. *Am J Pathol*, 2009, 175(5):2184-2196.
- [19] Seguin L, Kato S, Franovic A, et al. An integrin beta(3)-KRAS-RalB complex drives tumour stemness and resistance to EGFR inhibition [J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(5):457-468.
- [20] Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells: current status and evolving complexities[J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(6):717-728.
- [21] McIntosh K, Balch C, Tiwari AK. Tackling multidrug resistance mediated by efflux transporters in tumor-initiating cells [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2016, 12(6):633-644.
- [22] Parvani JG, Gujrati MD, Mack MA, et al. Silencing beta3 integrin by targeted ECO/siRNA nanoparticles inhibits EMT and metastasis of triple-negative breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(11):2316-2325.
- [23] Joshi PA, Jackson HW, Beristain AG, et al. Progesterone induces adult mammary stem cell expansion [J]. *Nature*, 2010, 465(7299):803-807.

## 《肿瘤学杂志》关于“在线优先出版”的通告

为了加快学术论文传播速度,缩短出版周期,使作者研究成果的首发权及时得到确认,《肿瘤学杂志》自2016年实行“在线优先出版”,经同行评议通过采用的稿件,经编辑部加工处理后在中国知网(CNKI)实行电子版在线优先出版。具体如下:

(1)在线投稿接收之后,编辑部核实文稿的题目、作者、单位等版权作息,作者提供相关信息,供在线出版使用。此信息为文稿最终确认的出版信息,此后作者不再予以更改。

(2)在线出版的PDF全文是经作者最终校对的修改定稿。待编辑部完成整个校对流程后替换为正式出版稿,同时给出完整的发表年份、卷、期、起止页码和唯一的文献识别DOI号码。

(3)在线出版的文献是《肿瘤学杂志》印刷版本的在线优先网络版,完全满足国内外学术交流的在线检索和引用。

《肿瘤学杂志》编辑部