

人乳腺球蛋白、血管内皮生长因子-C 和血管内皮生长因子受体-3 在乳腺癌中的表达及其与预后的关系

刘新兰*, 黄英, 陈萍

宁夏医科大学总医院肿瘤内科, 银川 750004

[摘要] **目的** 探讨人乳腺球蛋白(hMAM)、血管内皮生长因子-C (VEGF-C)及其受体-3 (VEGFR-3)在乳腺癌组织中表达,分析其表达与乳腺癌生物学特性及预后的关系。**方法** 采用组织微阵列技术,通过免疫组化法检测 116 例乳腺癌组织、44 例癌旁正常组织中 hMAM、VEGF-C 及 VEGFR-3 的表达。**结果** (1)乳腺癌组织中 hMAM、VEGF-C 及 VEGFR-3 的表达率分别为 59.48 % (69/116), 50.86 % (59/116) 及 61.20 % (71/116), 均高于癌旁正常组织中的表达率(分别为 0.00 %、9.09 % 及 18.18 %, P 均 < 0.01)。 (2)hMAM、VEGF-C 及 VEGFR-3 的表达与腋淋巴结转移呈正相关(P 均 < 0.05), hMAM 和 VEGFR-3 的表达与组织学分级呈正相关(P 均 < 0.05)。 (3)采用 Spearman 等级相关分析结果显示, hMAM、VEGF-C 及 VEGFR-3 在乳腺癌中的表达两两之间均呈正相关, 相关系数分别为 0.278、0.280 及 0.244 (P 均 < 0.01)。 (4)Kaplan-Meier 生存分析结果表明: hMAM、VEGF-C 及 VEGFR-3 阴性表达者无病生存率及 5 年总生存率均高于三者阳性表达(Log-rank, P 均 < 0.01)。**结论** hMAM、VEGF-C 及 VEGFR-3 在乳腺癌组织中存在高表达, 其高表达与乳腺癌的发生、侵袭转移和预后有关, 且 hMAM 可能与乳腺癌微淋巴管生成有关。

[关键词] 乳腺肿瘤; 人乳腺球蛋白; 血管内皮生长因子 C; 血管内皮生长因子受体 3; 微阵列分析; 免疫组织化学

[中图分类号] R 737.9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)10-1078-05

Expression of hMAM, VEGF-C and VEGFR-3 in breast cancer tissues and its relation with prognosis

LIU Xin-lan*, HUANG Ying, CHEN Ping

Department of Oncology, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia, China

[Abstract] **Objective** To study the expression of human-mammaglobin (hMAM) and vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR-3) in breast cancer tissues, and to analyze its relationship with biological characteristics and prognosis of breast cancer. **Methods** The expression of hMAM, VEGF-C and VEGFR-3 was determined by immunohistochemical technique in 116 breast cancer tissues and 44 adjacent normal tissues (from cancer tissue ≥ 5 cm) using tissue microarray technology (TMA). **Results** (1) The positive rates of hMAM, VEGF-C and VEGFR-3 in primary breast carcinoma tissues were significantly higher than those in the adjacent normal tissues (59.48% [69/116] vs 0.00%, 50.86% [59/116] vs 9.09% and 61.20% [71/116] vs 18.18%, respectively, all $P < 0.01$). (2) The positive rates of hMAM, VEGF-C and VEGFR-3 were significantly correlated with axillary lymph node metastasis, and the positive rates of hMAM, VEGFR-3 were significantly correlated with histological gradings (all $P < 0.05$). (3) Spearman rank correlation analysis showed that the positive rates of hMAM, VEGF-C and VEGFR-3 in breast cancer tissues were all significantly correlated with each other, with correlation coefficients being 0.278, 0.280, and 0.244, respectively, all $P < 0.05$). (4) Kaplan-Meier survival analysis showed that the disease-free survival and 5-year overall survival of patients with negative expression of hMAM, VEGF-C and VEGFR-3 were significantly prolonged compared to those with positive expression (Log-rank test, $P < 0.05$). **Conclusion** hMAM, VEGF-C and VEGFR-3 are highly expressed in breast cancer patients, which might be associated with the invasion and metastasis of breast cancer, and hMAM expression might be related to the lymphangiogenesis of breast cancer.

[Key words] breast neoplasms; human mammaglobin; vascular endothelial growth factor C; vascular endothelial growth factor receptor-3; microarray analysis; immunohistochemistry

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(10):1078-1082]

[收稿日期] 2013-07-07 **[接受日期]** 2013-07-22

[基金项目] 教育部春晖计划合作科研项目(Z2008-1-75004). Supported by the Chunhui Cooperation Project of The Ministry of Education(Z2008-1-75004).

[作者简介] 刘新兰, 硕士, 教授, 主任医师.

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0951-6743471, E-mail: liuxinlan@cscs.org.cn

侵袭和转移是导致乳腺癌患者治疗失败和死亡的主要原因^[1]。若能将敏感、特异的肿瘤标记物用于早期诊断、发现侵袭转移,并给以及时、有效的治疗,对于提高乳腺癌的治愈率和生存率具有极其重要的临床意义。自发现乳腺球蛋白(human-mammaglobin, hMAM)后,其在乳腺癌中的作用备受瞩目,血管内皮生长因子-C(vascular endothelial growth factor C, VEGF-C)在促进肿瘤细胞播散及发生区域淋巴结转移中起着重要作用^[2],而其受体-3(vascular endothelial growth factor receptor 3, VEGFR-3)与 VEGF-C 结合,调控肿瘤的生长和转移。目前关于 hMAM、VEGF-C 及 VEGFR-3 在乳腺癌中的表达与患者预后的关系国内罕见报道。本研究以此为切入点,采用组织微阵列技术(TMA),通过免疫组织化学法(IHC)检测 hMAM、VEGF-C 及 VEGFR-3 在乳腺癌组织中的表达,探讨三者在乳腺癌组织中表达的意义及其对预后的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 选取 2004 年 1 月至 2007 年 12 月于宁夏医科大学总院行手术治疗、经病理证实并有随访和预后资料、病理科存档的乳腺癌石蜡标本 116 例,其中腋淋巴结阳性者 71 例,腋淋巴结阴性者 45 例,同时取癌旁正常组织(距癌灶 > 5 cm)44 例作为对照。所有患者术前均未行任何抗肿瘤治疗。116 例乳腺癌中,79 例为浸润性导管癌、6 例浸润性小叶癌、4 例乳腺髓样癌、2 例黏液癌、2 例大汗腺癌、7 例小叶原位癌、16 例导管内癌。所有患者均为女性,年龄范围 32~77 岁,中位年龄 51.5 岁,平均随访 60 个月。

1.2 试剂 兔抗人 hMAM 多克隆抗体、兔抗人 VEGF-C 多克隆抗体、兔抗人 VEGFR-3 多克隆抗体均购自北京博奥森生物技术有限公司,DAB 显色试剂盒、柠檬酸盐抗原修复液、PBS 缓冲液、PV-6001 二步法试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 方法 所有标本均经 10% 中性甲醛固定,石蜡包埋。制备孔径为 3 mm 的含有 36~56 个组织芯的微阵列芯片,连续制成 4 μ m 厚切片。每个芯片选 4 张切片,1 张用于 H-E 染色,其余 3 张用于 IHC 染色,所加一抗分别为:抗 hMAM 抗体、抗 VEGF-C 抗体及抗 VEGFR-3 抗体。用 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照,用已知阳性切片作为阳性对照。实验步骤均按照试剂盒说明书进行,严格控制实验室

的条件。其中一抗工作液浓度 hMAM 为 1 : 50, VEGF-C 和 VEGFR-3 均为 1 : 100。

1.4 结果判定 由 2 位长期从事免疫组化实验的医师在不知道任何临床和病理资料的情况下对染色结果进行评判,hMAM、VEGF-C 和 VEGFR-3 效应产物皆为棕色颗粒,其阳性表达均定位于胞质或胞膜,背景清晰。根据阳性细胞染色强度和阳性细胞百分比进行结果判定,首先对阳性细胞染色强度进行评分:无色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;其次对阳性细胞所占百分比进行评分:0 分为阴性,1 分为阳性细胞 \leq 25%,2 分为 26%~50%,3 分为 51%~75%,4 分为 > 75%。二者积分相加,0~1 分为(-),2~3 分为(\pm),4~5 分为(+),6~7 分为(++);其中(-)和(\pm)判为阴性,(+)和(++判为阳性。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 16.0 软件,计数资料采用 χ^2 检验和 Spearman 相关分析,Kaplan-Meier 法计算生存曲线,并用 Log-rank 法进行显著性检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 hMAM、VEGF-C 及 VEGFR-3 在乳腺癌组织及癌旁正常组织中的表达 hMAM、VEGF-C 及 VEGFR-3 在乳腺癌组织中的阳性表达率均高于三者在癌旁正常组织中的表达率,差异均有统计学意义(P 均 < 0.01)。见表 1,IHC 染色结果见图 1。

2.2 hMAM、VEGF-C 及 VEGFR-3 的表达与乳腺癌生物学特性的关系 hMAM、VEGF-C 及 VEGFR-3 的表达均与腋淋巴结转移有关(P 均 < 0.05),hMAM 和 VEGFR-3 的表达均与组织学分级有关(P 均 < 0.05),三者的表达与肿瘤大小和病理类型之间的相关性均无统计学意义(P 均 > 0.05)。见表 2。

2.3 乳腺癌组织中 hMAM、VEGF-C 及 VEGFR-3 表达的相关性 结果显示,本组资料中 hMAM、VEGF-C 及 VEGFR-3 的表达两两之间均呈正相关,其中 hMAM 与 VEGF-C 表达的相关系数为 0.278 ($P=0.003$),hMAM 与 VEGFR-3 表达的相关系数为 0.280 ($P=0.002$),VEGF-C 与 VEGFR-3 表达的相关系数为 0.244 ($P=0.008$)。见表 3。

2.4 hMAM、VEGF-C 及 VEGFR-3 表达与乳腺癌患者生存的关系 随访病例 103 例,Kaplan-Meier 分析结果显示,hMAM、VEGF-C、VEGFR-3 阴性表达者无病生存率分别为 47.7%、44.2%、40.5%,5

年总生存率分别为 65.4%、71.2%、60.9%，优于其阳性表达者无病生存率(31.1%、28.3%、28.6%)和

5年总生存率(44.3%、39.2%、39.0%)，Log-rank 检验 P 均 <0.01 。见图 2。

表 1 hMAM、VEGF-C 及 VEGFR-3 在乳腺癌组织、癌旁正常组织中的表达

Tab 1 Expression of hMAM, VEGF-C and VEGFR-3 in breast cancer and adjacent normal tissues

Group	N	hMAM			VEGF-C			VEGFR-3		
		Positive n(%)	χ^2	P	Positive n(%)	χ^2	P	Positive n(%)	χ^2	P
Primary breast cancer tissue	116	69(59.48)	46.017	0.000	59(50.86)	23.317	0.000	71(61.20)	23.624	0.000
Adjacent normal tissue	44	0(0.00)			4(9.09)			8(18.18)		

hMAM: Human-mammaglobin; VEGF-C: Vascular endothelial growth factor-C; VEGFR-3: Vascular endothelial growth factor receptor-3

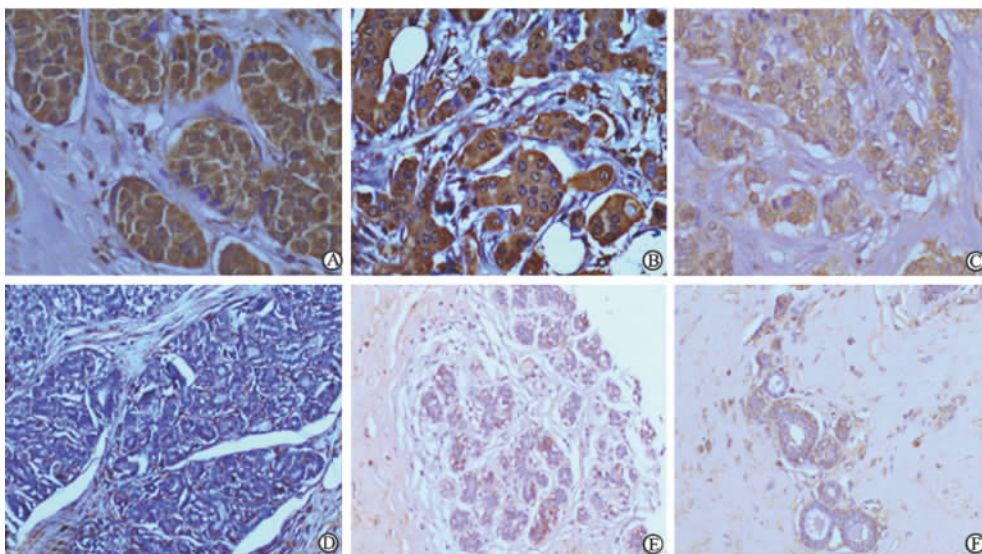


图 1 乳腺癌组织(A~C)中和乳腺癌旁正常组织(D~F)中 hMAM(A,D), VEGF-C(B,E)及 VEGFR-3(C,F)的表达

Fig 1 Expression of hMAM (A,D), VEGF-C (B,E) and VEGFR-3 (C,F) in primary breast cancer (A-C) and adjacent normal tissues (D-F)

hMAM: Human-mammaglobin; VEGF-C: Vascular endothelial growth factor-C; VEGFR-3: Vascular endothelial growth factor receptor-3

表 2 hMAM、VEGF-C 及 VEGFR-3 表达与乳腺癌生物学特性的关系

Tab 2 Association of biological characteristics of breast cancer with hMAM, VEGF-C and VEGFR-3 expression

Group	N	hMAM		VEGF-C		VEGFR-3	
		Positive n (%)	P	Positive n (%)	P	Positive n (%)	P
Axillary lymph node							
Negative	45	20(44.44)		17(37.78)		20(44.44)	
Positive	71	49(69.01)	0.009	42(59.15)	0.025	51(71.83)	0.003
Tumor size d/cm							
≤ 2	42	26(61.90)		23(57.76)		23(54.76)	
2-5	51	26(50.98)		25(49.02)		34(66.67)	
> 5	23	17(73.91)	0.146	11(47.83)	0.815	14(60.87)	0.503
Histological gradings							
Grade I	26	10(38.46)		9(34.62)		11(42.31)	
Grade II	62	38(61.29)		34(55.74)		36(58.06)	
Grade III	28	21(75.00)	0.022	16(55.17)	0.167	24(85.71)	0.004
Type of pathological							
Infiltrating	93	52(55.91)		48(51.61)		57(61.29)	
Non-invasive	23	17(73.91)	0.146	11(47.83)	0.745	14(60.87)	0.970

hMAM: Human-mammaglobin; VEGF-C: Vascular endothelial growth factor-C; VEGFR-3: Vascular endothelial growth factor receptor-3

表 3 乳腺癌组织中 hMAM、VEGF-C 及 VEGFR-3 表达的相关性

Tab 3 Correlation between hMAM, VEGF-C and VEGFR-3 expression in breast cancer tissues

Group		hMAM		VEGF-C		VEGFR-3	
		Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive
hMAM	Negative	0	0	31	16	26	21
	Positive	0	0	26	43	19	50
VEGF-C	Negative	31	26	0	0	29	28
	Positive	16	43	0	0	16	43
VEGFR-3	Negative	26	19	29	16	0	0
	Positive	21	50	28	43	0	0

hMAM: Human-mammaglobin; VEGF-C: Vascular endothelial growth factor-C; VEGFR-3: Vascular endothelial growth factor receptor-3. hMAM and VEGF-C ($r=0.278, P=0.003$), hMAM and VEGFR-3 ($r=0.280, P=0.002$), VEGF-C and VEGFR-3 ($r=0.244, P=0.008$)

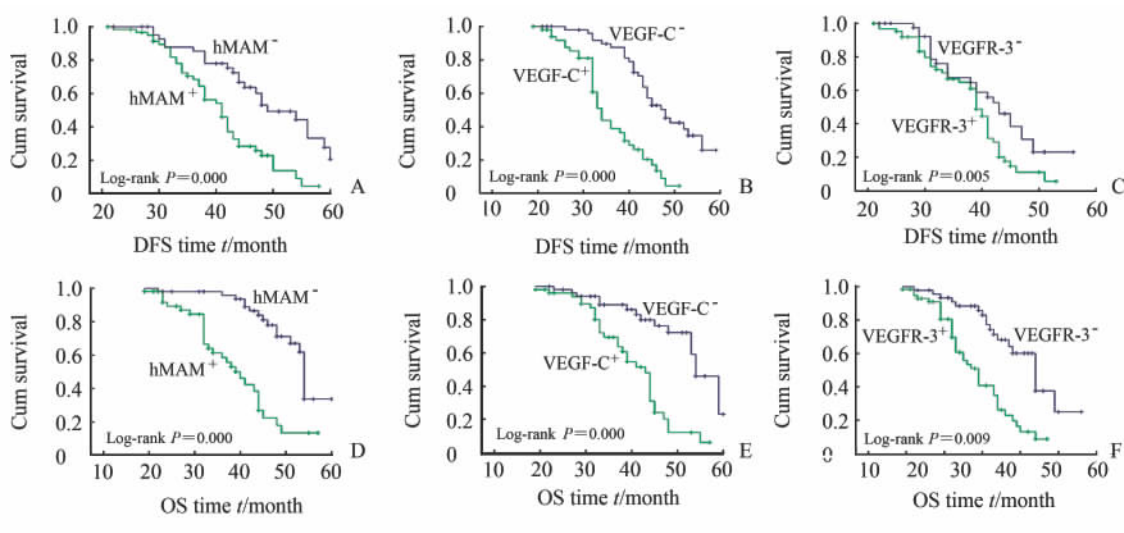


图 2 hMAM(A,D), VEGF-C(B,E) 及 VEGFR-3(C,F) 在乳腺癌组织中不同表达的无病生存(A~C)及 5 年总生存(D~F) 曲线图

Fig 2 Disease-free survival (DFS) curves (A-C) and 5-year overall survival (OS) curves (D-F)

of primary breast cancer patients with different hMAM(A, D), VEGF-C(B, E), and VEGFR-3 (C, F) expression

hMAM: Human-mammaglobin; VEGF-C: Vascular endothelial growth factor-C; VEGFR-3: Vascular endothelial growth factor receptor-3

3 讨论

近年来乳腺癌的发病率呈逐年上升趋势, 目前已居女性恶性肿瘤之首, 严重危害女性健康。肿瘤的发生是多因素、多步骤逐步演变的过程, 涉及一系列基因的改变。随着研究的深入, 人们希望能够找出特异性更好、灵敏度更高的肿瘤标记物, 从而更深入地了解肿瘤生物学行为, 为指导治疗及判断预后提供依据。hMAM 经多项研究证实高表达于乳腺癌、乳腺转移淋巴结组织, 在正常乳腺组织中呈低表达, 在其他癌组织中无表达, 具有极高的乳腺组织特异性^[3]。VEGF-C 是最先被发现的促淋巴管生长因子, 于 1996 年由 Joukov 等^[4]克隆分离出来。VEGFR-3^[5] 是第一个被发现的淋巴管内皮细胞特异性标

记物, 与 VEGF-C 结合的信号转导通路可能是促进肿瘤淋巴管生成的主要环节, 进而促进肿瘤发生淋巴结转移。

本实验结果表明, hMAM、VEGF-C 及 VEGFR-3 在乳腺癌组织中的阳性表达率均高于三者 在癌旁正常组织中的表达率 (P 均 < 0.01), 且 hMAM 在癌旁正常组织中的表达率为 0.00%, 提示 hMAM 可作为诊断乳腺癌的标记物, 三者均可能参与了乳腺癌发生发展的过程。目前多项研究^[6-8] 对于 hMAM 的表达与乳腺癌发病年龄、肿瘤大小、病理类型、淋巴结转移及月经状况等生物学特性的相关性结论尚存在差异。本实验结果表明, hMAM、VEGF-C 及 VEGFR-3 的表达均与乳腺癌腋淋巴结转移呈正相关, 与王虎霞等^[9] 研究结果一致。另外

hMAM 和 VEGFR-3 的表达亦与组织学分级相关 (P 均 < 0.05)。组织学分级差和腋淋巴结转移是乳腺癌患者预后不良因素。由此我们推测 hMAM、VEGF-C 及 VEGFR-3 可能与乳腺癌的生物学特性相关,其阳性表达者肿瘤的恶性程度可能更高,侵袭性更强,患者更易发生腋淋巴结转移甚至远处转移,三指标可能为预测乳腺癌发生侵袭转移的指标。

VEGF-C 和 VEGFR-3 是促淋巴管生长因子,两者通过特异性结合刺激淋巴管内皮细胞增殖和迁移,诱导淋巴管生成,促进肿瘤发生淋巴结转移,是判断微淋巴管生成的指标。目前关于 hMAM 与 VEGF-C 和 VEGF-D 之间表达的相关性研究鲜有报道。本实验表明,hMAM、VEGF-C 及 VEGFR-3 之间两两均呈正相关 (P 均 < 0.01)。结果表明 hMAM 亦可能与乳腺癌微淋巴管生成有关,可能是 MAM 与淋巴管生长因子具有共同的调控肿瘤进展的通路,也可能是它们相互协同、相互诱导、相互渗透,进而形成共有的途径或旁路,促进肿瘤微淋巴管生成而促使肿瘤发生淋巴结转移。在以后的工作中可以通过检测 hMAM 与微淋巴管密度等的关系进一步论证。

目前有关 hMAM、VEGF-C 和 VEGFR-3 的表达与乳腺癌预后的关系鲜有报道。Ferrucci 等^[10]研究认为,hMAM 是乳腺癌患者预后不良的指标。赵迎春等^[11]的研究结果表明,VEGF-C 表达越高,患者的总生存率越低,预后越差。本组资料经 Kaplan-Meier 生存分析结果表明, hMAM、VEGF-C 及 VEGFR-3 阳性表达者无病生存率及总生存率均较其阴性表达者缩短(Log-rank 检验, P 均 < 0.01)。提示检测此三项指标可能作为判断乳腺癌患者预后的指标,其阳性表达者患者的生存率更低,生存期可能更短,预后可能更差。

综上,乳腺癌组织中存在 hMAM、VEGF-C、VEGFR-3 的高表达,其高表达可能与乳腺癌的发生发展、侵袭转移及预后有关,而且三者可能参与了乳腺癌淋巴管生成—淋巴结转移,在此过程中它们相互诱导、相互协同。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Kodera Y, Katanasaka Y, Kitamura Y, Tsuda H, Nishio

K, Tamura T, et al. Sunitinib inhibits lymphatic endothelial cell functions and lymph node metastasis in a breast cancer model through inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 3 [J]. *Breast Cancer Res*, 2011, 13(R66): 2-11.

[2] Yu M, Berk R, Kosir M A. CXCL7-mediated stimulation of lymphangiogenic factors VEGF-C, VEGF-D in human breast cancer cell [J]. *J Oncol*, 2010, 7: 1-10.

[3] Tafreshi N K, Enkemann S A, Bui M M, Lloyd M C, Abrahams D, Huynh A S, et al. A mammaglobin-A targeting agent for noninvasive detection of breast cancer metastasis in lymph nodes [J]. *Cancer Res*, 2011, 71: 1050-1059.

[4] Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, et al. A novel vascular endothelial factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt-4 (VEGFR-3) and KDR(VEGFR-2) tyrosine kinases [J]. *EMBO J*, 1996, 15: 290-298.

[5] Pajusola K, Aprelikova O, Korhonen J, Kaipainen A, Pertovaara L, Alitalo R, et al. FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines [J]. *Cancer Res*, 1992, 52: 5738-5743.

[6] 侯永强, 刘金彪, 王新征, 梁仁杰. 人乳腺球蛋白在乳腺癌中的表达及临床意义 [J]. *实用医学杂志*, 2012, 28: 1572-1573.

[7] 颜蕴文, 张敬杰, 徐晓军, 王劲, 裴静, 任敏, 等. 联合检测乳腺癌患者外周血中细胞角蛋白 19 及人乳腺球蛋白 mRNA 的意义 [J]. *中华乳腺病杂志(电子版)*, 2010, 4: 193-199.

[8] Tjensvoll K, Oltedal S, Heikkilä R, Kvaløy J T, Gilje B, Reuben J M, et al. Persistent tumor cells in bone marrow of non-metastatic breast cancer patients after primary surgery are associated with inferior outcome [J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 2-11.

[9] 王虎霞, 盛薇, 王光辉, 樊林, 单涛, 赵伟, 等. 乳腺癌 VEGF-C 和 VEGFR-3 表达与淋巴结转移关系的研究 [J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2009, 30: 342-345.

[10] Ferrucci P F, Rabascio C, Gigli F, Corsini C, Giordano G, Bertolini F, et al. A new comprehensive gene expression panel to study tumor micrometastasis in patients with high-risk breast cancer [J]. *Int J Oncol*, 2007, 30: 955-962.

[11] 赵迎春, 李勇, 朱永云, 罗传瑜. VEGF-C、VEGF-D 在乳腺癌中的表达及其与淋巴结转移及预后的关系 [J]. *实用癌症杂志*, 2012, 27: 236-240.

[本文编辑] 尹茶