

乳腺癌组织中血管内皮生长因子-D 和 PTEN 的表达及临床意义

赵云霞¹, 刘恒超², 马琳¹, 赵瑾¹

[摘要] **目的:**探讨乳腺癌组织中血管内皮生长因子-D(VEGF-D)和 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源物(PTEN)蛋白异常表达的作用及其临床意义。**方法:**应用免疫组织化学 S-P 法检测 90 例乳腺浸润性导管癌和 20 例乳腺良性增生性病变组织中 VEGF-D 蛋白和 PTEN 蛋白的表达;结合临床病理指标进行分析。**结果:**乳腺癌组织中 VEGF-D 蛋白和 PTEN 蛋白表达与良性增生性病变组织中表达差异均有统计学意义($P < 0.01$)。VEGF-D 蛋白阳性表达在淋巴结有无转移、雌激素受体阳性与阴性表达间差异均有统计学意义($P = 0.03$ 和 $P < 0.05$)。PTEN 蛋白的阴性表达在淋巴结有无转移、雌激素受体阳性及阴性表达间差异均有统计学意义($P < 0.01$)。乳腺癌组织中 VEGF-D 蛋白与 PTEN 蛋白表达呈显著负相关关系($P < 0.01$)。**结论:**VEGF-D 和 PTEN 蛋白异常表达参与了乳腺癌的浸润和转移;VEGF-D 和 PTEN 表达存在相关性。

[关键词] 乳腺肿瘤;免疫组织化学;血管内皮生长因子-D;10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白的同源物

[中图分类号] R 737.9

[文献标志码] A

DOI: 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2015.06.002

Expressions of vascular endothelial growth factor-D and PTEN in breast cancer tissue and its clinical significance

ZHAO Yun-xia¹, LIU Heng-chao², MA Lin¹, ZHAO Jin¹

(1. Department of Physiopathology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030;

2. Department of Nuclear Medicine, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the roles of the aberrant expressions of vascular endothelial growth factor(VEGF)-D and gene of phosphate and tension homology deleted on chromosome ten(PTEN) in breast cancer tissue and its clinical significance. **Methods:** The levels of VEGF-D and PTEN in 90 samples of breast invasive carcinoma tissue, and 20 samples of benign proliferative lesions were detected using immunohistochemical method, the results of which together with the clinical pathological parameters were analyzed.

Results: The differences of the levels of VEGF-D and PTEN protein between breast cancer tissue and benign hyperplastic lesions tissue were statistically significant($P < 0.01$). The differences of the positive expression of VEGF-D protein in the patients with lymph nodes metastasis or without, and positive and negative expression of estrogen receptor were statistically significant($P = 0.03$ and $P < 0.05$). The differences of the negative expression of VEGF-D protein in the patients with lymph nodes metastasis or without, and positive and negative expression of estrogen receptor were statistically significant($P < 0.01$). The level of VEGF-D protein was significantly negative correlation with PTEN in breast cancer tissue($P < 0.01$). **Conclusions:** The aberrant expressions of VEGF-D and PTEN are related to the invasion and metastasis of breast cancer. The expressions of VEGF-D and PTEN protein are correlative.

[Key words] breast tumor; immunohistochemistry; vascular endothelial growth factor-D; gene of phosphate and tension homology deleted on chromosome ten

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤,发病率逐年上升,且有年轻化的趋势。在我国,乳腺癌已成为危害女性健康的主要恶性肿瘤,位居女性恶性肿瘤发病之首,近 30/10 万,全国乳腺癌平均死亡率约为 3/10 万^[1]。浸润和转移是肿瘤预后不良的根本原

因,约半数乳腺癌患者就诊时已发生淋巴道转移。本研究旨在探讨血管内皮生长因子-D(VEGF-D)和 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源物(PTEN)在乳腺癌中的表达状况,并与其他较为确定的预后指标相比较,结合临床病理资料进行分析评价,进一步探讨乳腺癌淋巴转移的机制,为乳腺癌的预后判断和防治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 研究对象 标本来源于蚌埠医学院病理学教研室(蚌埠医学院第一附属医院病理科)2008 ~ 2009 年手术切除乳腺组织存档蜡块标本,其中乳腺癌组织标本 90 例,所有患者均接受手术治疗,术前

[收稿日期] 2013-11-20

[基金项目] 安徽省教育厅高校自然科学研究项目(KJ2013Z206);安徽省教育厅自然科学研究项目(KJ2013B148)

[作者单位] 1. 蚌埠医学院 病理生理学教研室,安徽 蚌埠 233030;
2. 蚌埠医学院第一附属医院 核医学科,安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 赵云霞(1977-),女,讲师。

未接受过化疗、内分泌或放射治疗,经病理确诊,且外检已做过雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)检测。年龄 31~79 岁, <50 岁 64 例, ≥50 岁 26 例。所有病例均为浸润性导管癌。将浸润性导管癌 90 例按照 WHO 提供的方法进行分级^[1],其中 I 级 5 例; II 级 39 例; III 级 46 例。按 TNM 分类^[2]和肿瘤大小分为 3 组, T1 期肿瘤最大直径 ≤2.0 cm 32 例; T2 期肿瘤最大直径 >2.0~5.0 cm 48 例; T3 期肿瘤最大直径 >5.0 cm 10 例。有腋淋巴结转移 74 例;未转移 16 例。ER、PR 检测结果以病理免疫组织化学(S-P)法报告结果为准。ER 阳性 22 例, ER 阴性 68 例; PR 阳性 39 例, PR 阴性 51 例。标本用 10% 甲醛固定,石蜡包埋,常规制片。随机选择 20 例乳腺良性增生性病变标本作为对照。

1.2 方法和试剂 采用 S-P 法,分别行 VEGF-D 蛋白和 PTEN 蛋白标记。鼠抗人 VEGF-D 单克隆抗体(工作浓度 1:100)购自 R&D 公司,鼠抗人 PTEN 单克隆抗体(即用型),及其它相关试剂均购自福州迈新生物技术开发有限公司。严格按照 S-P 法实验步骤进行,用已知阳性切片作阳性对照,以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3 结果判断 VEGF-D 蛋白和 PTEN 蛋白阳性表达均定位于细胞质,细胞质出现明显的黄色或棕黄色颗粒视为阳性着色。判定标准:以染色强度和阳性细胞比例评定阳性表达。细胞质出现定位明确、染色明显的棕黄/棕褐色颗粒为阳性细胞。随机抽取 5 个视野,每个视野计 100 个细胞中阳性细胞数所占比例 >10% 为阳性病例。

1.4 统计学方法 采用 χ^2 检验、四格表确切概率法、秩和检验及等级相关分析。

2 结果

2.1 乳腺癌和乳腺良性增生性病变组织中 VEGF-D 蛋白和 PTEN 蛋白的表达比较 良性增生性病变组织中 VEGF-D 蛋白阳性率为 20.0%,明显低于乳腺癌组织中阳性率的 94.4% ($P < 0.01$)。乳腺癌组织中 PTEN 蛋白阴性率为 81.1%,显著高于良性增生性病变组织的 15.0% ($P < 0.01$) (见表 1,图 1,2)。

2.2 临床病理指标与乳腺癌组织中 VEGF-D 蛋白和 PTEN 蛋白表达的关系 淋巴结转移阳性组 VEGF-D 蛋白阳性表达高于阴性组 ($P = 0.003$); ER 表达阴性组 VEGF-D 蛋白阳性表达高于阳性组 ($P < 0.05$)。淋巴结转移阳性组和 ER 阴性组 PTEN 蛋白阴性表达均显著高于淋巴结转移阴性组和 ER

表达阳性组 ($P < 0.01$)。不同年龄、病理分级及肿瘤大小患者的 VEGF-D、PTEN 表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) (见表 2)。

表 1 乳腺癌和乳腺良性增生性病变组织中 VEGF-D 和 PTEN 蛋白表达比较 (n)

分组	n	VEGF-D 表达		PTEN 表达	
		+	-	+	-
良性增生性病变	20	4	16	17	3
乳腺癌	90	85	5	17	73
合计	110	89	21	34	76
χ^2	—	53.44		33.49	
P	—	<0.01		<0.01	

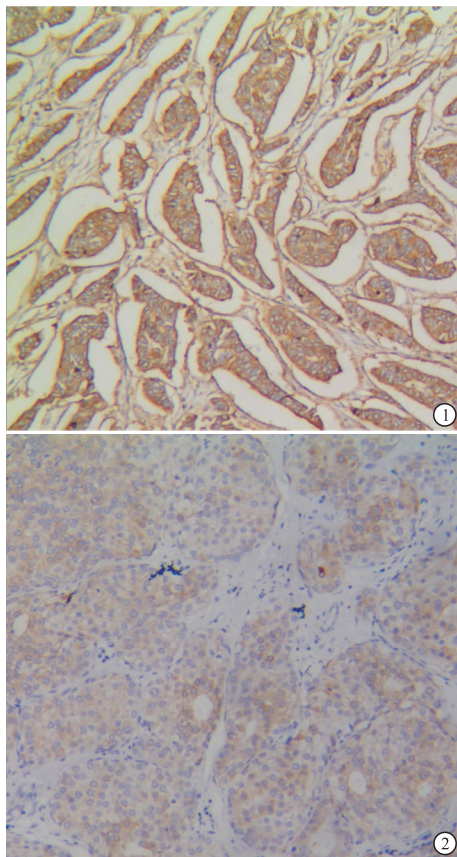


图1 乳腺癌中 VEGF-D 阳性表达定位于胞质 (S-P 法)

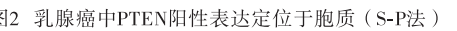


图2 乳腺癌中 PTEN 阳性表达定位于胞质 (S-P 法)

2.3 乳腺癌组织中 VEGF-D 蛋白和 PTEN 蛋白表达相关性分析 乳腺癌组织中 VEGF-D 蛋白和 PTEN 蛋白表达呈显著负相关关系 ($P < 0.01$) (见表 3)。

3 讨论

乳腺癌转移是导致乳腺癌预后差的主要因素,而且是乳腺癌早期分子事件。长期以来,人们重点

表2 乳腺癌临床病理指标与 VEGF-D 和 PTEN 蛋白表达的关系 (*n*)

临床病理指标	<i>n</i>	VEGF-D		χ^2	<i>P</i>	PTEN		χ^2	<i>P</i>
		+	-			+	-		
年龄/岁									
<50	64	61	3	0.003	>0.05	9	55	2.37	>0.05
≥50	26	24	2			8	18		
病理分级									
I	5	4	1	2.11*	>0.05	1	4	3.42	>0.05
II	39	37	2			4	35		
III	46	44	2			12	34		
肿瘤大小									
≤2 cm	32	30	2	5.05*	>0.05	7	25	1.57	>0.05
>2~5 cm	48	47	1			7	41		
>5 cm	10	8	2			3	7		
淋巴结转移									
阳性	74	73	1	0.003 Δ		5	69	35.66	<0.01
阴性	16	12	4			12	4		
ER									
阳性	22	18	4	5.94	<0.05	13	9	27.34	<0.01
阴性	68	67	1			4	64		
PR									
阳性	39	38	1	0.38	>0.05	9	30	0.79	>0.05
阴性	51	47	4			8	43		

*示 χ^2 值; Δ 示四表格确切概率法表3 乳腺癌组织中 VEGF-D 和 PTEN 蛋白表达的关系 (*n*)

PTEN 表达	VEGF-D 表达		合计	r'_s	<i>P</i>
	+	-			
+	13	4	17	-0.379	<0.01
-	72	1	73		
合计	85	5	90		

关注乳腺癌的血管转移,乳腺癌抗血管生成治疗已开始初步应用于临床,而乳腺癌淋巴管生成与转移的问题却甚少关注。一方面由于一直强调的血管生成对转移的重要性掩盖了可能存在的淋巴管生成对转移的作用;另一方面,由于长期以来对淋巴管生成的鉴定较为困难。近年来,人们已经发现很多淋巴管的标志物用于识别淋巴管,为淋巴管生成在肿瘤生物学研究提供了实际可行的技术手段。目前,乳腺癌淋巴管转移已成为新的研究热点。

以往,淋巴转移被认为是一个被动过程,最近的研究^[3]表明,淋巴转移是一个主动过程,淋巴管生成能促进淋巴转移。肿瘤组织中促进淋巴管生成的信号系统研究最广泛的就是 VEGF 家族的血管内皮生长因子 VEGF-C 和 VEGF-D。VEGF-D 是由 Achen 等^[4]在 1998 年基于计算机同源检索发现的 VEGF

家族的第 5 个成员。由于 VEGF-D 发现的时间较短,在肿瘤组织中表达的意义尚不明确。文献^[5]报道 VEGF-D 在肿瘤组织中的表达具有较大的差异。在结直肠癌中 VEGF-D 被认为是与淋巴转移密切相关的指标,影响肿瘤预后^[6]。子宫内膜癌组织中 VEGF-D 的存在提示淋巴转移,且有助于识别预后不良的病例^[7]。VEGF-D 在胃癌中是独立的预后指标^[8]。VEGF-D 还被认为是卵巢上皮癌预后不良的重要指标^[9]。VEGF-D 在乳腺癌中的意义仍有较大争议,Nakamura 等^[10]首次提出 VEGF-D 可能是乳腺癌的一个独立预后因子,并全面阐述了其在乳腺癌发展中的作用。本研究显示,VEGF-D 在乳腺癌组织中表达明显增强,表明其在乳腺癌的发展过程中起着非常重要的作用。VEGF-D 表达在淋巴结转移阳性组显著高于阴性组,淋巴结转移是乳腺癌预后不良的重要因素,提示 VEGF-D 参与了乳腺癌的淋巴转移过程;本研究还发现 VEGF-D 的表达在 ER 阴性的病例中显著增强,ER 阴性是乳腺癌预后不良的判断指标之一,因此,我们认为 VEGF-D 是乳腺癌预后不良的重要因子。

PTEN 是迄今为止发现的第一个具有磷酸酶活性的抑癌基因。PTEN 通过其磷酸酶活性调节细胞内多种信号转导途径,从而调控细胞周期,促进细胞凋亡,抑制细胞生长。当 PTEN 基因发生突变后,其异常产物不具有上述功能,而失去了对细胞生长的负调控作用。本研究结果显示,PTEN 蛋白失表达乳腺癌组明显高于良性增生性病变组,且其与有无淋巴结转移、ER 状况有关,与国内外报道^[11]基本一致,提示 PTEN 基因突变在乳腺癌的发展中具有重要意义,并使肿瘤更具有侵袭和转移能力,更容易发生淋巴结转移。ER 阳性表达是乳腺癌对激素治疗敏感,预后较好的独立预后指标。PTEN 蛋白失表达时往往伴有 ER 表达缺失,提示 PTEN 基因改变是乳腺癌预后较差的指标。因此,我们认为 PTEN 在乳腺癌浸润、转移过程中具有重要作用,可以作为临床治疗、提示预后的指标之一。

VEGF-D 在乳腺癌转移中的作用虽有争议,但目前研究^[12]认为其与淋巴管生成和淋巴结转移相关,VEGF-D 与 VEGFR-3 结合后形成 VEGF-D-VEGFR-3 信号通道,可使 RAFTK 酪氨酸酶磷酸化,活化细胞骨架蛋白 paxillin,促进淋巴管内皮细胞的迁移,同时还可激活 Ras/MAPK 信号转导通路或 JNK 通路,诱导淋巴管内皮细胞肌动蛋白重组,刺激其增殖,进而调节淋巴管的生长并促进淋巴转移。

研究^[13]认为,PTEN 通过抑制 PI3KPAKT 途径从而抑制 VEGF 的表达。李敬东等^[14]发现,牙龈癌组织中 PTEN 与 VEGF 的表达存在相关性。本文研究结果显示,乳腺癌组织中 PTEN 与 VEGF-D 的表达呈显著负相关关系与张莉萍等^[11]报道一致。PTEN 与 VEGF-D 间的关系尚存在不同观点,还需大量实验研究。

综上所述,PTEN 与 VEGF-D 表达与乳腺癌浸润、转移和预后密切相关,临床联合检测 PTEN 和 VEGF-D 对预测乳腺癌生物学行为及预后有一定意义。抗淋巴管生成治疗将是肿瘤治疗的新方向,VEGF-D 的研究可能为乳腺癌抗淋巴管生成治疗提供新的参考方向。

[参 考 文 献]

- [1] Bilynskyj BT. The breast cancer treatment as a marker of progress in oncology[J]. *Exp Oncol*,2010,32(3):190-194.
 - [2] Tavassoli FA,Devilee P. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs[M]. Lyon:IARC Press,2003:10-80.
 - [3] Xiong Y,Cao LP,Rao HL,et al. Clinical significance of peritumor lymphatic vessel density and lymphatic vessel invasion detected by D2-40 immunostaining in FIGO Ib1-IIa squamous cell cervical cancer[J]. *Cell Tissue Res*,2012,348(3):515-522.
 - [4] Achen MG,Jeltsch M,Kukk E. et al. Vascular endothelial growth factor(VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2(Flk1) and VEGF receptor 39(Flt4)[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,1998,95(2):548-553.
 - [5] 邓恋. 淋巴管新生与肿瘤转移的研究进展[J]. *实用癌症杂志*,2013,28(1):95-97.
 - [6] 施华球,鄢俊,王祥财. VEGF-D 与其受体在结直肠癌中的表达及与淋巴管生成的关系[J]. *山东医药*,2010,50(1):38-39.
 - [7] 杨泽妹,徐海霞. 血管内皮生长因子及其受体在子宫内膜癌中的表达及对淋巴管生成的作用[J]. *中国老年学杂志*,2010,30(15):2117-2118.
 - [8] Schimanski C,Schlaegel F,Jordan M. VEGF-D correlates with metastatic disease in gastric cancer patients undergoing surgery[J]. *World J Surg*,2011,35(5):1010-1016.
 - [9] 朱勇杰,师晓莉,沈妮娜,等. 血管内皮生长因子 VEGF-C 和 VEGF-D 在卵巢上皮癌的表达及其预后研究[J]. *新疆医科大学学报*,2014,27(12):1591-1594.
 - [10] Nakamura Y,Yasuoka H,TsuJimoto M, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor D in breast carcinoma with long-term follow-up[J]. *Clin Cancer Res*,2003,9(2):716-721.
 - [11] 张莉萍,王一,黄国平,等. 乳腺癌中 PTEN 蛋白表达及其与 VEGF、MMP-9 表达的相关性研究[J]. *Diag Pathol*,2008,15(5):382-385.
 - [12] Sotiropoulou N,Bravou V,Kounelis S, et al. Tumor expression of lymphangiogenic growth factors but not lymphatic vessel density is implicated in human cervical cancer progression[J]. *Pathology*,2010,42(7):629-636.
 - [13] Price TJ,Hardingham JE, Lee CK, et al. Prognostic impact and the relevance of PTEN copy number alterations in patients with advanced colorectal cancer(CRC) receiving bevacizumab[J]. *Cancer Med*,2013,2(3):177-285.
 - [14] 李敬东,梁锐英,赵艳萍,等. 牙龈癌中 VEGF 及 PTEN 的表达及其相关性分析[J]. *上海口腔医学*,2014,23(5):619-623.
- (本文编辑 章新生)
-
- (上接第 703 页)
- [2] 谭晓梅,傅钧庭,罗佳波,等. 高效液相色谱串联质谱法测定中药注射剂对 P815 细胞脱颗粒后上清液中组胺含量[J]. *分析测试学报*,2013,32(4):483-487.
 - [3] 俞发荣,谢明仁,张琛,等. 苍耳子药物血清对 H4 细胞毒性作用的实验研究[J]. *中国临床研究*,2013,26(3):209-210.
 - [4] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1993:33-34.
 - [5] 马静,李学林,唐进法,等. HPLC 测定不同厂家参麦注射液中人参皂苷 Rg1 和 Re 的含量[J]. *中国实验方剂学杂志*,2013,19(11):79-81.
 - [6] 刘玉强,才谦. 50 批不同来源白术药材及饮片中白术内酯 I 和白术内酯 III 含量的 HPLC 法测定[J]. *药物分析杂志*,2012,32(7):1249-1252.
 - [7] 王光忠,邵贝贝,邓媛媛,等. RP-HPLC 测定茯苓乙醇提取物中茯苓酸的含量[J]. *中国现代中药*,2012,14(1):41-42.
 - [8] 王晓莉,巩丽丽,容蓉,等. 3 种方法制备的四逆汤中甘草苷、甘草酸含量测定[J]. *中国实验方剂学杂志*,2012,18(6):71-71.
 - [9] 徐秋香,郁红礼,吴皓,等. HPLC 同时测定四君子汤中 4 种指标性成分的含量[J]. *中国实验方剂学杂志*,2013,19(3):62-65.
 - [10] 吕涛,姚希贤,孙泽明. 药物血清内黄芪甲苷含量测定及其抑制 HSCs 活化增殖的实验研究[J]. *中华中医药学刊*,2012,29(12):2770-2773.
 - [11] 陈萌,娄利霞,吴爱明,等. 活血益气方及其拆方药物血清对 VEGF₁₆₅ 转染脐静脉内皮细胞分泌 MMP-9、MMP-2 的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*,2012,18(2):156-160.
 - [12] 倪彩霞,曾南,汤奇,等. 芳香开窍药对正常小鼠血脑屏障通透性的影响[J]. *江苏中医药*,2011,43(2):88-89.
 - [13] 金泉克,肖海娟,孙珏,等. 中药复方肠胃清含药血清对胃癌 SGC7901 细胞凋亡的影响[J]. *中国中医药信息杂志*,2012,19(5):32-35.
 - [14] 王熙月,韩凤娟,汤欣,等. 中药复方药物血清对 CDKN2A 和 RPS3a 基因在人卵巢癌细胞株 SKOV3 中表达的影响[J]. *世界中西医结合杂志*,2011,6(9):747-750.
 - [15] 张颖,林力,刘光宇,等. 塞络通灌胃后人参皂苷在大鼠体内的药代动力学及脑分布研究[J]. *中国中药杂志*,2014,39(2):316.
 - [16] 邱楠楠,刘金平,卢丹,等. 紫红参提取物灌胃给予大鼠后入血成分研究[J]. *医药导报*,2014,33(1):16-19.
- (本文编辑 姚仁斌)