

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.21.002

GSK-3 β 、Snail 和 E-cadherin 在三阴乳腺癌组织中的表达及临床意义*

高双全¹, 肖高芳^{1 Δ} , 高双荣², 王林辉¹, 丁宇¹, 杜日昌¹

(1. 韶关市粤北人民医院病理科, 广东韶关 512026; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100029)

[摘要] **目的** 探讨 GSK-3 β 、Snail 和 E-cadherin 在三阴乳腺癌(TNBC)中表达及意义。**方法** 选择 2006 年 9 月至 2013 年 9 月收治的 48 例 TNBC 患者作为观察对象即 TNBC 组, 并随机选出 60 例非 TNBC 患者作为对照即 NTNBC 组, 应用免疫组织化学 SP 法检测 GSK-3 β 、Snail 和 E-cadherin 的表达情况, 并进行统计分析。**结果** TNBC 组 GSK-3 β 、Snail 的阳性表达率显著高于 NTNBC 组($P < 0.05$), E-cadherin 的阳性表达率显著低于 NTNBC 组($P < 0.05$)。GSK-3 β 与 Snail 表达呈正相关($P < 0.05$), 与 E-cadherin 表达呈负相关($P < 0.05$)。**结论** Snail、GSK-3 β 、E-cadherin 可能共同参与乳腺癌上皮间质转化过程, 可成为综合评价 TNBC 的重要标志物。

[关键词] 三阴乳腺癌; 糖原合成酶-3 β ; 蜗牛蛋白; E-钙粘蛋白

[中图分类号] R365

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)21-2884-03

The expression and significance of GSK-3 β , Snail and E-cadherin in triple negative breast carcinoma*

Gao Shuangquan¹, Xiao Gaofang^{1 Δ} , Gao Shuangrong², Wang Linhui¹, Ding Yu¹, Du Ricang¹

(1. Department of Pathology, Yue Bei People's Hospital, Shaoguan, Guangdong 512026, China; 2. Institute of Traditional Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the expression of Snail, GSK-3 β and E-cadherin in triple negative breast carcinomas and to determine their correlation with clinicopathological features. **Methods** 48 cases of TNBC (TNBC group) and 60 cases of non-TNBC (NTNBC group) admitted in our hospital from September 2006 to September 2013 were collected. Expression of Snail, E-cadherin and GSK-3 β were detected by immunohistochemistry and statistical analysis was conducted. **Results** (1) GSK-3 β and Snail positive expression rate of TNBC group was significantly higher than that of the NTNBC group ($P < 0.05$), E-cadherin positive expression rate of TNBC group was significantly lower than that of the NTNBC group ($P < 0.05$). (2) GSK-3 β was positively correlated with Snail ($P < 0.05$), GSK-3 β was negatively correlated with E-cadherin ($P < 0.05$). **Conclusion** GSK-3 β , Snail and E-cadherin might be involved in breast carcinoma during EMT, and they could be important markers of comprehensive evaluation of TNBC.

[Key words] triple negative breast neoplasms; GSK-3 β ; snail; E-cadherin

三阴乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)表现为雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)和人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor-2, Her-2)表达均缺失的一种特殊类型的乳腺癌^[1], 占全部乳腺癌的 13.7%~23.8%^[2], 具有发病年龄轻、侵袭性高、易复发转移、生存期短及预后差等特点, 严重威胁了患者的生命。临床上, TNBC 对内分泌治疗不敏感, 化疗是目前惟一的全身性治疗方法, 但预后较差。因此寻求有效的治疗方法已成为当今研究的热点。有研究表明, TNBC 较非 TNBC 更容易发生上皮间质转化(EMT), 从而增加肿瘤细胞的侵袭性和恶性程度, 而 Snail、糖原合成酶激酶 3(GSK-3 β)和 E-钙黏着蛋白(E-cadherin)均参与了 EMT 过程。因此, 本文拟比较 TNBC 与非 TNBC 中 Snail、GSK-3 β 和 E-cadherin 的表达的差异, 对全面评价 TNBC 的预后具有重要意义, 可能为 TNBC 的基因靶向治疗提供实验基础和依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择韶关市粤北人民医院于 2006 年 9 月至 2013 年 9 月收治的 48 例 TNBC 患者作为观察对象即 TNBC 组, 随机选出 60 例非 TNBC 患者作为对照即 NTNBC 组(ER、PR 或 HER-2 为阳性), 所有病例均有完整的临床病理资料。

1.2 主要试剂 兔抗人单克隆抗体 Snail(Santa Cruz 公司, 美国)、E-cadherin (Abcam 公司, 美国)。兔抗人单克隆抗体 GSK-3 β (Santa Cruz 公司, 美国), 免疫组织化学和 DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术公司。GSK-3 β 抗体的工作浓度为 1:50, Snail 与 E-cadherin 抗体的工作浓度为 1:100。

1.3 方法 石蜡包埋的乳腺癌组织标本, 经 4 μ m 连续切片后进行免疫组织化学染色。按 SP 法免疫组织化学检测试剂盒说明书检测乳腺癌样本中 GSK-3 β 、Snail 和 E-cadherin 的表达。用已知的阳性片作为阳性对照, 用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。

1.4 判断标准 GSK-3 β 阳性结果为细胞质染成棕黄色, 阳性细胞数小于 10% 为阴性, $\geq 10\%$ 为阳性。Snail 主要定位于细胞核, 其中阳性细胞数小于 30% 为阴性, $\geq 30\%$ 为阳性。E-cadherin 主要定位于细胞膜, 阳性细胞数小于 10% 为阴性, $\geq 10\%$ 为阳性。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件分析, 计数资料用率表示采用 χ^2 检验分析, GSK-3 β 、Snail 和 E-cadherin 表达相关性分析采用 Spearman 等级相关性分析; 生存时间等预后指标用 Kaplan-Meier 法分析, 用 Log-Rank 检验进行相关曲线的统计学检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81001692)。 作者简介: 高双全(1976-), 硕士, 主治医师, 主要从事肿瘤病理的研究。

Δ 通讯作者, Tel: (0751)6913271; E-mail: xiaogaofang083@163.com。

2 结 果

2.1 临床指标比较 与 NTNBC 组相比, TNBC 组患者腋窝淋巴结转移率升高(43.75% vs. 25.00%), 比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。NTNBC 组和 TNBC 组患者肿瘤大小均以 2.0~5.0 cm 多见, 组织学类型均以浸润性导管癌最常见, 但两组在患者年龄、肿瘤大小及组织学类型方面差异均无统计学意义($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 TNBC 组和 NTNBC 组患者的临床病理因素比较[n(%)]

项目	TNBC 组 (n=48)	NTNBC 组 (n=60)	χ^2	P
年龄(岁)				
≤35	4(8.33)	6(10.00)		
35~50	24(50.00)	22(36.67)		
>50	20(41.67)	32(53.33)	1.948	0.378
肿瘤平均直径(cm)				
≤2	12(25.00)	21(35.00)		
2~5	28(58.33)	32(53.33)		
>5	8(16.67)	7(11.67)	1.473	0.479
腋窝淋巴结转移				
有	21(43.75)	15(25.00)		
无	27(56.25)	45(75.00)	4.219	0.040
组织学类型				
浸润性导管癌	32(66.67)	46(76.66)		
浸润性小叶癌	10(20.83)	7(11.67)		
其他类型	6(12.50)	7(11.67)	1.808	0.405

2.2 两组患者 GSK-3 β 、Snail 和 E-cadherin 的表达情况比较

本研究结果显示, TNBC 组 GSK-3 β 的阳性表达率(54.17%)明显高于 NTNBC 组(25.00%), 差异有统计学意义($P < 0.01$); TNBC 组 Snail 的阳性表达率(43.75%)显著高于 NTNBC 组(31.67%), 差异有统计学意义($P < 0.05$); TNBC 组 E-cadherin 的阳性表达率(22.92%)显著低于 NTNBC 组(46.67%), 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 2、图 1。

表 2 两组患者 GSK-3 β 、Snail 和 E-cadherin 的表达情况比较[n(%)]

临床病理指标	TNBC 组 (n=48)	NTNBC 组 (n=60)	χ^2	P
GSK-3 β				
阳性	26(54.17)	15(25.00)		
阴性	22(45.83)	45(75.67)	9.631	0.002
Snail				
阳性	21(43.75)	19(31.67)		
阴性	25(56.25)	41(68.33)	3.889	0.049
E-cadherin				
阳性	11(22.92)	28(46.67)		
阴性	37(77.08)	32(53.33)	6.520	0.011

2.3 TNBC 中 GSK-3 β 表达与 Snail 和 E-cadherin 表达的相关性 48 例 TNBC 组织中 GSK-3 β 和 Snail 同时表达阳性 16 例(33.3%); GSK-3 β 和 Snail 同时表达阴性 15 例(31.3%)。GSK-3 β 表达与 Snail 表达呈正相关($r = 0.296, P < 0.05$)。48 例 TNBC 组织中 GSK-3 β 和 E-cadherin 同时表达阳性 3 例(6.3%); GSK-3 β 和 E-cadherin 同时表达阴性 14 例(29.2%)。GSK-3 β 表达与 E-cadherin 表达呈负相关($r = -0.294, P < 0.05$)。

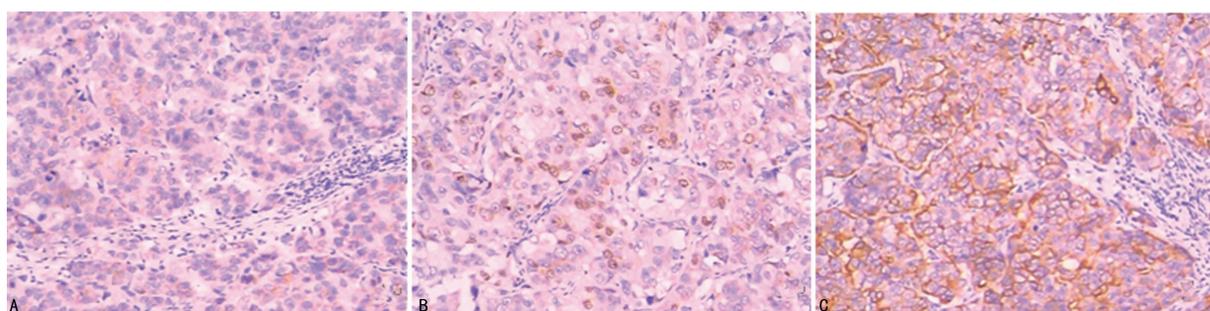


图 1 免疫组织化学检测 TNBC 中 GSK-3 β 、Snail 和 NTNBC 中 E-cadherin 的表达($\times 200$)

3 讨 论

TNBC 较 NTNBC 更容易发生 EMT, 使上皮细胞失去极性及与基底膜连接的上皮表型特征, 从而获得高迁移、侵袭及降解细胞外基质的表型特征[3]。EMT 的发生与多种蛋白分子有关。

E-cadherin 是维持上皮表型的重要黏附分子, E-cadherin 减少或缺失时, 会导致肿瘤的过度增长和向外侵袭。有研究报道, E-cadherin 表达阴性患者的预后明显较阳性患者差[4]。E-cadherin 的下调或缺失是发生 EMT 的重要标志[5]。增加 E-cadherin 表达、抑制 Wnt 通路可促进上皮分化并抑制 EMT 的

过程[6]。本研究显示, TNBC 中 E-cadherin 较 NTNBC 表达明显降低, 在 E-cadherin 阴性的样本中 Snail、GSK-3 β 明显增高, 说明 E-cadherin 下调对 TNBC 低分化、高侵袭性发挥着重要作用。

GSK-3 β 是糖原合成酶激酶 3 的一个亚型, 参与 PI3-Kinase、Wnt/ β -catenin 及 Hedgehog 信号转导、细胞增殖和肿瘤发生等过程[7], 在细胞周期 S 期, GSK-3 β 水平最高, 在凋亡早期, GSK-3 β 在细胞核内迅速增加[8]。Wnt 信号是参与乳腺浸润性导管癌浸润行为的关键通路, GSK-3 β 在 Wnt 通路中与 E-cadherin、Slug、 β -连环蛋白(β -catenin)共同参与了 EMT 过

程^[9]。本研究发现,在 TNBC 中 GSK-3 β 表达较 NTNBC 明显增高。因此,其是参与浸润性乳腺癌的 EMT 过程中 Wnt/ β -catenin 信号通路的关键成分,GSK-3 β 持续高表达伴随 E-cadherin 表达缺失与 TNBC 高侵袭性、低生存期密切相关。

Snail 是近年发现的锌指转录因子,是肿瘤细胞 EMT 过程中的关键调节者^[10],其高表达和 E-cadherin 低表达,在肿瘤细胞浸润、迁移过程中发挥着重要作用^[11]。研究发现,Snail 可作为乳腺癌的独立负性诊断指标^[12],即 Snail 高表达,则乳腺癌分化差,侵袭性强,易转移,生存期短。Côme 等^[13]发现乳腺癌组织中 Snail、Slug 高表达能抑制 E-cadherin 启动子,导致其部分表达或完全缺失,且 Snail、Slug 在乳腺浸润性导管癌中高表达与淋巴结转移密切相关。本研究显示,TNBC 中 Snail 较 NTNBC 中的表达水平明显增高,在 E-cadherin 阴性表达样本中的阳性表达率显著高于 E-cadherin 阳性表达组,与 Côme 等^[13]的结果一致,表明 Snail 表达与 E-cadherin 呈负相关,TNBC 更具有强浸润、迁移能力,并易于发生淋巴结转移。

综上所述,TNBC 中 GSK3 β 、Snail 高表达、E-cadherin 部分表达或完全缺失,与乳腺癌高侵袭性、易转移、生存期短密切相关,联合检测 GSK3 β 、Snail、E-cadherin 的表达,对判断 TNBC 的复发转移及预后有重要的意义。

参考文献

[1] Wang J, Xie X, Wang X, et al. Locoregional and distant recurrences after breast conserving therapy in patients with triple-negative breast cancer: A meta-analysis[J]. *Surgical Oncology*, 2013, 22(4): 247-255.

[2] 林坚, 胡梅齐, 彭炜, 等. 三阴乳腺癌的临床病理特征及预后[J]. *中国癌症杂志*, 2010, 20(6): 462-465.

[3] 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.

[4] Kashiwagi S, Yashiro M, Takashima T, et al. Significance

of E-cadherin expression in triple-negative breast cancer [J]. *Br J Cancer*, 2010, 103(2): 249-255.

[5] Baranwal S, Alahari SK. Molecular mechanisms controlling E-cadherin expression in breast cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 384(1): 6-11.

[6] 倪露露, 李雁, 任宏丽. Wnt 信号通路和肿瘤干细胞在肿瘤复发转移中作用机制的研究述评[J]. *中华中医药学刊*, 2013, 31(6): 1341-1344.

[7] Chen Y, Yue S, Xie L, et al. Dual Phosphorylation of suppressor of fused (Sufu) by PKA and GSK3 beta regulates its stability and localization in the primary cilium[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(15): 13502-13511.

[8] 曾益新. 肿瘤学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 67-68.

[9] Prasad CP, Rath G, Mathur S, et al. Expression analysis of E-cadherin, Slug and GSK3beta in invasive ductal carcinoma of breast[J]. *BMC Cancer*, 2009, 9(3): 325-332.

[10] Battle E, Sancho E, Franci C, et al. The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells[J]. *Nature Cell Biology*, 2000, 2(2): 84-89.

[11] Becker KF, Rosivatz E, Blechschmidt K, et al. Analysis of the E-cadherin repressor Snail in primary human cancers [J]. *Cells Tissues Organs*, 2007, 185(1/2/3): 204-212.

[12] Muenst S, Däster S, Obermann EC, et al. Nuclear expression of snail is an independent negative prognostic factor in human breast cancer [J]. *Dis Markers*, 2013, 35(5): 337-344.

[13] Côme C, Magnino F, Bibeau F, et al. Snail and slug play distinct roles during breast carcinoma progression [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(18): 5395-5402.

(收稿日期: 2015-01-21 修回日期: 2015-03-22)

(上接第 2883 页)

High expression of ErbB family members and their ligands in lung adenocarcinomas that are sensitive to inhibition of epidermal growth factor receptor[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(24): 11478-11485.

[8] Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer; correlation with clinical response to gefitinib therapy[J]. *Science*, 2004, 304(5676): 1497-1500.

[9] Raso MG, Behrens C, Herynk MH, et al. Immunohistochemical expression of estrogen and progesterone receptors identifies a subset of NSCLCs and correlates with EGFR mutation[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(17): 5359-5368.

[10] Nose N, Sugio K, Oyama T, et al. Association between estrogen receptor-beta expression and epidermal growth factor receptor mutation in the postoperative prognosis of adenocarcinoma of the lung [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(3): 411-417.

[11] Stabile LP, Lyker JS, Gubish CT, et al. Combined targeting of the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer shows enhanced antiproliferative effects[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(4): 1459-1470.

[12] Marquez-Garban DC, Chen HW, Goodglick L, et al. Targeting aromatase and estrogen signaling in human non-small cell lung cancer[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1155(11): 194-205.

[13] 朱晓莉, 张祖贻, 朱毅. 肺癌雌激素受体表达与三苯氧胺拮抗治疗的研究[J]. *江苏医药*, 2002, 28(9): 641-643.

[14] Garon E B, Pietras R J, Finn R S, et al. Antiestrogen fulvestrant enhances the antiproliferative effects of epidermal growth factor receptor inhibitors in human non-small-cell lung cancer[J]. *J Thorac Oncol*, 2013, 8(3): 270-278.

(收稿日期: 2015-01-22 修回日期: 2015-03-23)