

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.09.022

乳腺癌肿大腋窝淋巴结中 BCSCs 相关基因表达与肿瘤复发、转移的关系

余天雾¹, 龚建平^{2△}, 郭丹³, 周健¹

(1. 重庆医科大学附属永川医院普外 3 科 402160; 2. 重庆医科大学附属第二临床学院肝胆外科 400010; 3. 重庆医科大学附属第二临床学院三腺外科 400010)

[摘要] **目的** 探索乳腺癌干细胞(BCSCs)相关基因 CD44、Twist1、OCT4 在乳腺癌患者癌组织、腋窝肿大淋巴结中的表达与乳腺癌转移及复发的关系。**方法** 以免疫组化法和组织免疫荧光聚合酶链反应(RT-PCR)分别检测乳腺癌患者癌组织、腋窝淋巴结中 BCSCs 相关因子 CD44、CD24、Twist1 和 OCT4 的基因和抗原表达。**结果** 在术前和术中确诊为乳腺癌的 14 例患者中均有癌细胞腋窝淋巴结转移。免疫组化法测得乳腺癌癌组织、腋窝肿大淋巴结 BCSCs 相关因子 CD44、Twist1 和 OCT4 抗原阳性过表达,而 CD24 呈低表达;RT-PCR 检测乳腺癌组织、腋窝淋巴结中 BCSCs 相关因子 CD44、Twist1 和 OCT4 的基因表达增强($P < 0.05$),CD24 基因低表达($P > 0.05$)。**结论** 乳腺癌伴腋窝淋巴结肿大者 BCSCs 相关因子 CD44、Twist1 和 OCT4 的基因、抗原表达明显增高,可能表明 BCSCs 相关因子与乳腺癌细胞易早期转移、复发有关。

[关键词] 乳腺肿瘤;干细胞;CD44;Twist1;OCT4**[中图分类号]** R737.9**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)09-1224-05

Relation between expression of BCSCs associated genes from swelling axillary lymph nodes of breast cancer with recurrence and metastasis of tumor

Yu Tianwu¹, Gong Jianping^{2△}, Guo Dan³, Zhou Jian¹

(1. Third Department of General Surgery, Affiliated Yongchuan Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 3. Department of Three Glands Surgery, Affiliated Second Clinical College, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

[Abstract] **Objective** To explore the relation between the expression of breast cancer stem cells(BCSCs) related gene CD44, OCT4 and Twist1 in breast cancer tissues and swelling axillary lymph nodes with the recurrence and metastasis of breast cancer. **Methods** The genes and antigen expressions of BCSCs relative factors CD44, CD24, OCT4 and Twist1 in the breast cancer tissue and axillary lymph nodes were detected by the immunohistochemical method and RT-PCR. **Results** Totally 14 cases of preoperatively and intraoperatively diagnosed breast cancer had axillary lymph nodes metastasis of cancer cells. The over expression of BCSCs relative factors CD44, OCT4 and Twist1 antigen positive in the breast cancer tissue and axillary lymph nodes were detected by the immunohistochemical method, while CD24 was lowly expressed; the gene expressions of BCSCs relative factors CD44, OCT4 and Twist1 in the breast cancer tissue and axillary lymph nodes were enhanced by the RT-PCR detection ($P < 0.05$), while CD24 gene was lowly expressed($P > 0.05$). **Conclusion** The genes and antigen expression of BCSCs related factors CD44, OCT4 and Twist1 in the patients with breast cancer complicating swelling axillary lymph nodes are significantly increased, which might indicate that the BCSCs related factors are related with easily early metastasis and recurrence of breast cancer cells.

[Key words] breast neoplasms; stem cell; CD44; Twist1; OCT4

乳腺癌标本或乳腺肿瘤细胞系中乳腺癌干细胞(BCSCs)的鉴别主要是基于肿瘤细胞表面的分子表型如 CD44⁺CD24^{-/low}或 ALDH⁺。除了 CD44,与肿瘤的侵袭、转移和复发有关的因素还包括 BCSCs 的其他相关基因的过表达,如 OCT4 和 Twist1。在肿瘤细胞中或表达 OCT4 的细胞株中像肿瘤干细胞样的细胞只是很少的一部分,它是转录因子 POU 家族中的一个,在胚胎干细胞中维持多能和增殖的作用。正常乳腺组织的 OCT4 的过度转导作用导致拥有诱发肿瘤和肿瘤侵袭能力的细胞系产生。临床研究表明,与低级别和 OCT4 低表达的肿瘤相比,肿瘤干细胞分子 OCT4 过表达的乳腺肿瘤与病情进一步恶化、远处转移和生存期更短密切相关^[1]。具有螺旋-环-螺旋基础结构的转录因子 Twist1 已被报道在肿瘤细胞血液播散、转移方面有强大的促进作用,也为临床的研究、有效的治疗干预提供了理想的标靶。Twist1 能促使细胞的表皮间

质化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),能使癌细胞之间失去细胞黏附和肿瘤细胞转移^[2]。对于上皮恶性肿瘤来说,EMT 是癌细胞血液播散的关键事件^[3],同时认为它有助于肿瘤干细胞分子表型的形成^[4]。尤其是 EMT 促进了癌细胞从原发灶脱离并且通过丧失细胞极性和黏附能力来促进癌细胞的迁徙^[5]。进一步阐明 Twist1 促进肿瘤转移的机制和 Twist1 功能调节子的识别有助于制订出抑制 EMT 和肿瘤转移的新策略。乳腺淋巴结转移(lymph nodes metastasis, LNM)表明淋巴结内含有侵袭力强的分子表型的癌细胞而且 EMT 调节子的水平表达上调^[6]。试验模型提供的证据进一步解释了原发肿瘤具有发展到肿瘤细胞播散和促进生长因子表达增加的可能。因而,LNM 可以作为原发性乳腺肿瘤侵袭和远处转移潜能的替代性分子标志^[6]。目前 BCSCs 在乳腺癌患者腋窝淋巴结、血液循环和骨髓存在情况与乳腺癌转移的关系

所知甚少,而且缺乏有效的检测方法。本课题拟以 BCSCs 为细胞平台,CD44、Twist1、OCT4 干细胞基因表达为 BCSCs 检测依据,以免疫荧光聚合酶链反应(RT-PCR)检测 CD44、Twist1、OCT4 干细胞基因的表达,初步探索 BCSCs 与乳腺癌复发和转移的相关性。

1 材料与与方法

1.1 材料 本研究选取 14 例 2013 年乳腺癌术后患者,病理诊断明确。14 例均为女性,年龄 38~69 岁,中位年龄 53.5 岁。本院乳腺癌患者术中切下的乳腺癌组织、肿大腋窝淋巴结(14 例)均经病理检查结果证实;所有这些操作均遵守科学实验伦理道德委员会管理章程。

1.2 试剂 抗体 CD44、CD24、Twist1、OCT4 购于 Santa 公司,RT-PCR 试剂盒、CD44、CD24、Twist1 及 OCT4 primer 购于 TaKaRa 公司;免疫荧光二抗抗体(驴抗兔 IgG-FITC 和羊抗兔 PE 抗体)购于 SA (USA)公司;磷酸盐缓冲液(PBS, 0.01 mol/L, pH7.4)购于南京生物试剂公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫荧光和激光共聚焦操作过程 将手术中取下的乳腺癌灶组织、腋窝淋巴结、正常乳腺组织进行脱水、冰冻切片后定于载玻片。PBS 浸洗切片 3 min 后滴加 3% H_2O_2 及山羊血清封闭组织,在湿盒中 37 °C 封闭 15 min(室温 30 min 也可)。再滴加 CD44 抗体(以 0.01 mol/L, pH7.4 的 PBS 稀释 1:100)覆盖标本切片。置湿盒中 4 °C 孵育过夜(37 °C 1~2 h 许),再用 PBS 浸洗 3 min,重复 5 次,洗去一抗后滤纸擦去标本液体。滴加荧光二抗置湿盒中,37 °C 避光孵育 1 h,再以 PBS 浸洗 3 min,反复 5 次洗去二抗。以 50%甘油封片后立即在荧光显微镜下观察。以同样方法操作 CD24、Twist1、OCT4 免疫荧光激光共聚焦检查。

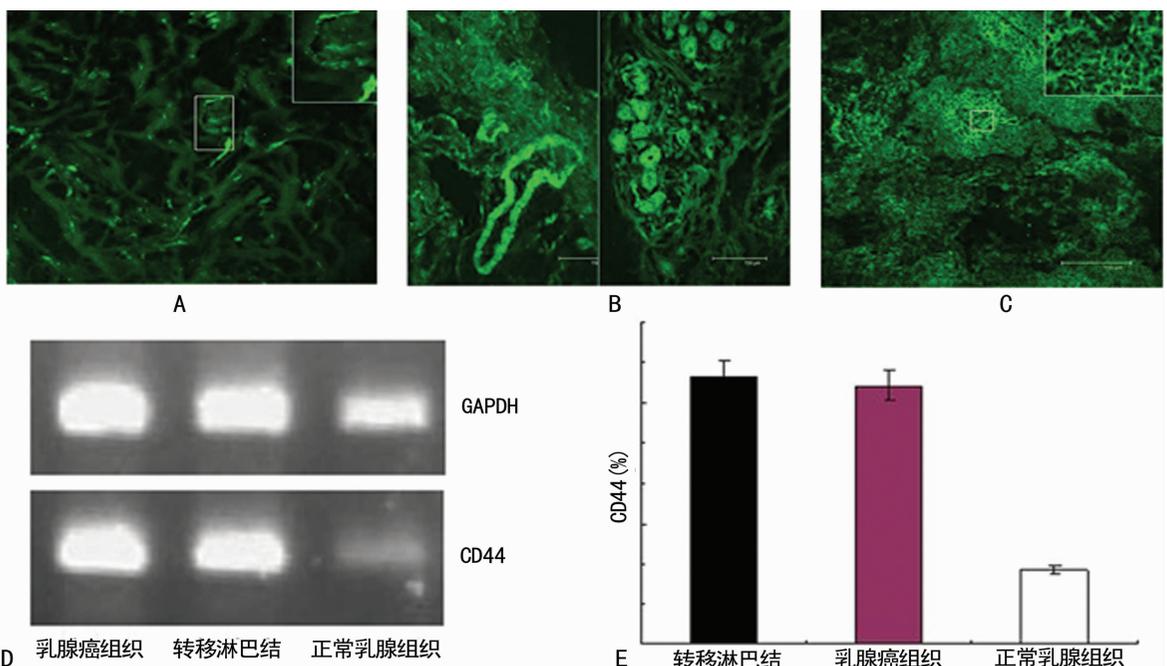
1.3.2 RT-PCR 检测乳腺癌灶组织、腋窝淋巴结、正常乳腺组织 CD44、CD24、Twist1、OCT4 的基因表达 先以超声波碎掉冰冻的乳腺组织、乳腺癌组织和腋窝淋巴结。再用 Trizol 提取总 RNA,紫外分光光度计检测质量与含量。采用 TaKaRa 公司反转录试剂盒,严格按照试剂盒操作说明反转录获得 cD-

NA。CD44: 5'-GCC CAA TGC CTT TGA TGG ACC-3' (Sense primer), 3'-GCA GGG ATT CTG TCT GTG CTG-5' (Anti-sense primer); CD24: 5'-ATG GGC AGA GCA ATG GTG GCC A-3' (Sense primer), 3'-TCA AGA GAA GCA CCA GAG TGA GA-5' (Anti-sense primer); Twist1: 5'-CAA GAA GTC TGC GGG CTG TG-3' (Sense primer), 5'-TCG TTC AGC GAC TGG GTG C-3' (Anti-sense primer); OCT4: 5'-CAA ACG ACC ATC TGC CGC T-3' (Sense primer), 5'-CAG GTT GCC TCT CAC TCG GTT-3' (Anti-sense primer)。退火条件:56 °C。常规 PCR 操作,10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,Alpha Innotech Coporation 凝胶成像系统观察并拍照。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 对数据进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间非对称比较使用 Student's *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

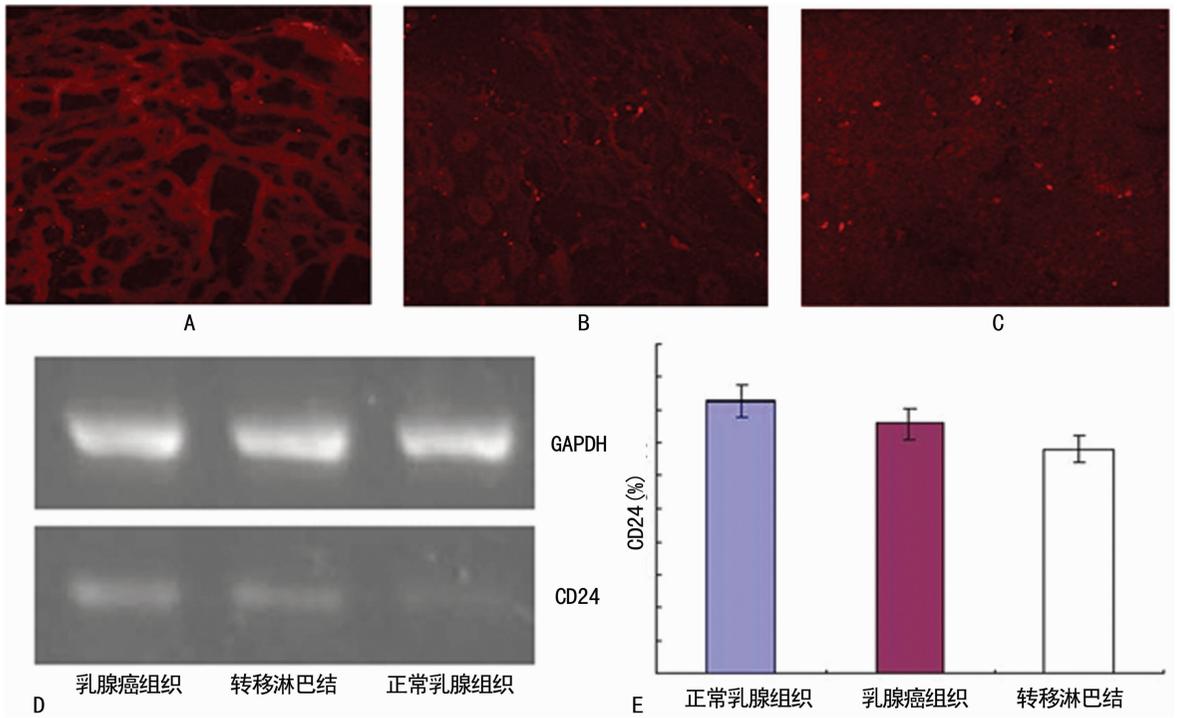
2 结果

2.1 临床病理资料 本研究共收集了 14 例原发性侵袭性乳腺癌患者,每例肿瘤标本均经有经验的病理医生确认,每例患者均经国际抗癌协会 TNM 标准分级。乳腺肿瘤小于或等于 2 cm 占 42.8%(6 例),肿瘤大于 2 cm 占 57.2%(8 例)。根据 Elston 和 Ellis 方法将肿瘤标本行组织学分级:1~2 级占 42.8%(6 例),3 级占 57.2%(8 例);在所有肿瘤标本中 11 例为侵袭性导管癌(IDC),而其余的 3 例为髓样癌或乳腺小叶癌。为了便于分析资料,笔者还收集了患者标本的部分免疫组化指标如孕激素受体(PR)、雌激素受体(ER)、人表皮生长因子受体-2(HER2)、CEA 和 BCA225。当 10%的细胞核阳性表达时判定为 PR 或 ER 过表达。根据 Herceptest 评分系统使用单克隆抗体对 HER2 进行评分。0:无细胞膜反应或不足 10%细胞有反应;1:超过 10%细胞存在不全性细胞膜反应;2:超过 10%细胞有弱至中等强度的完全包膜反应;3:超过 10%细胞强烈的完全包膜反应。14 例中有 12 例 BCA225 血清抗原高于 75 $\mu\text{g/L}$,2 例血清抗原低于 75 $\mu\text{g/L}$ 。有 11 例患者 CEA 血清抗原高于 7 ng/L,3 例患者 CEA 血清抗原低于 7 ng/L。



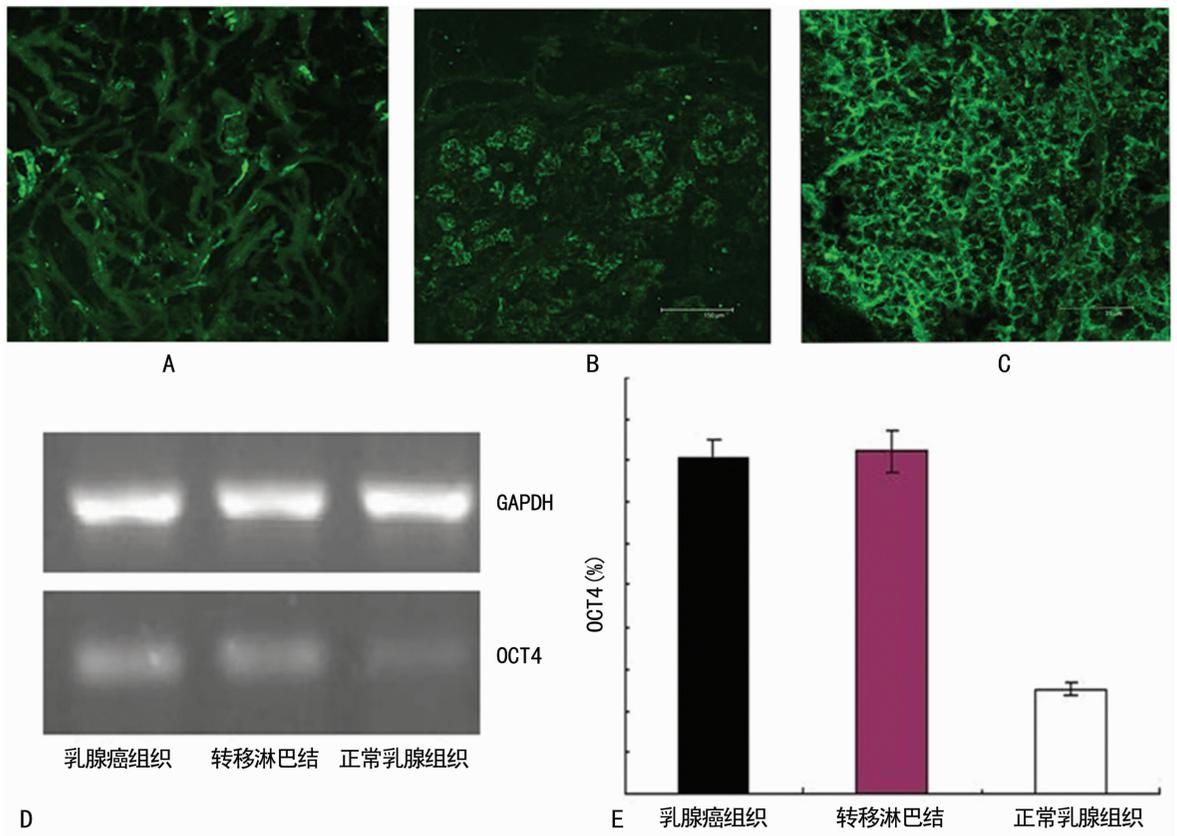
A:正常乳腺组织中的 CD44 抗原;B:乳腺癌组织中的 CD44 抗原;C:转移淋巴结中的 CD44 抗原;D、E:RT-PCR 检测。

图 1 CD44 在邻近正常的乳腺组织、乳腺癌组织和转移的腋窝淋巴结中的表达



A:正常乳腺组织中的 CD24 抗原;B:乳腺癌组织中的 CD24 抗原;C:转移淋巴结中的 CD24 抗原;D、E:RT-PCR 检测。

图 2 CD24 在邻近正常的乳腺组织、乳腺癌组织和转移的腋窝淋巴结中的表达



A:正常乳腺组织中的 OCT4;B:乳腺癌组织中的 OCT4;C:转移淋巴结中的 OCT4;D、E:RT-PCR 检测。

图 3 OCT4 在邻近正常的乳腺组织、乳腺癌组织和转移的腋窝淋巴结中的表达

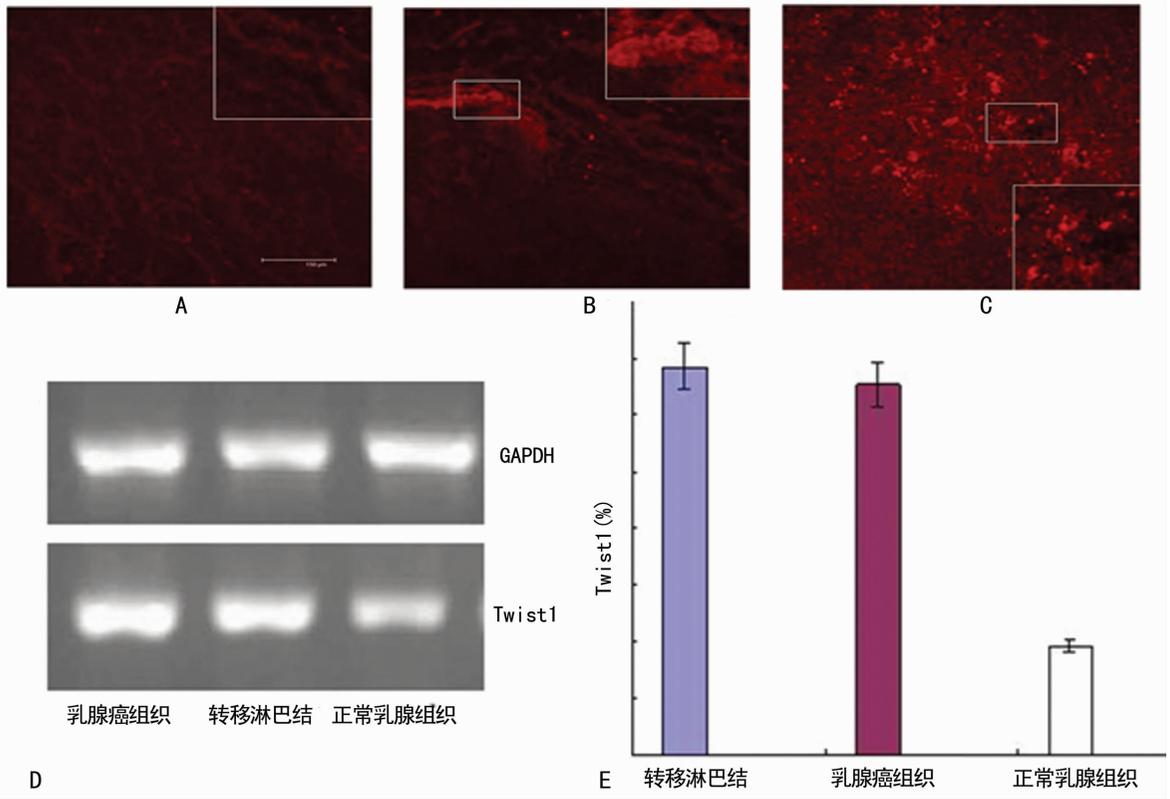
2.2 CD44、CD24 抗体检测 遂行组织冰冻切片 CD44 和 CD24 抗体染色、激光共聚焦检测。激光共聚焦扫描显示: CD44 抗原尽管也表达于正常乳腺组织(图 1A),但主要存在于肿瘤细胞膜上,细胞间质内也有少量表达;乳腺癌组织(图 1B)

和转移淋巴结中(图 1C)CD44 的表达要明显强于邻近正常的乳腺组织。RT-PCR 检测结果显示:在乳腺癌组织和转移淋巴结中 CD44 基因表达均明显强于邻近正常的乳腺组织(图 1D、E),而 CD44 在肿瘤组织和转移淋巴结中的过表达。RT-PCR

结果显示乳腺癌组织和转移的腋窝淋巴结中的 CD44 mRNA 表达明显强于邻近正常的乳腺组织 ($P < 0.05$), 在乳腺癌组织和转移的腋窝淋巴结之间的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。CD24 在正常乳腺组织、原发癌灶内和淋巴结中皆少量表达或不表达 (图 2), 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 OCT4 检测 原发乳腺癌组织和转移淋巴结中的 OCT4 具有自我更新和促使癌细胞增殖的功能, OCT4 抗原主要表达于肿瘤细胞膜上和细胞基质内; 它可表达于正常乳腺组织上皮

细胞核内 (图 3A), 乳腺癌组织 (图 3B) 和转移的腋窝淋巴结中 (图 3C), 明显强于邻近正常的乳腺组织 (图 3A)。RT-PCR 结果显示: 在乳腺癌组织和转移淋巴结中 OCT4 基因表达均明显强于正常的乳腺组织 (图 3D、E)。RT-PCR 检测, 乳腺癌组织和转移的腋窝淋巴结中的 OCT4 mRNA 表达明显强于邻近正常的乳腺组织 ($P < 0.05$), 在乳腺癌组织和转移的腋窝淋巴结之间的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



A: 正常乳腺组织中的 Twist1; B: 乳腺癌组织中的 Twist1; C: 转移淋巴结中的 Twist1; D、E: RT-PCR 检测。

图 4 Twist1 在邻近正常的乳腺组织、乳腺癌组织和转移的腋窝淋巴结中的表达

2.4 Twist1 检测 原发性乳腺癌和淋巴结转移灶中 Twist1 的过表达可能有助于癌细胞的迁徙、侵袭和远处转移分别以激光共聚焦、RT-PCR 对 3 种组织中的 Twist1 的表达状态进行了检测。激光共聚焦照片显示: 乳腺导管癌上皮的基底层的细胞核内和细胞间质内, 而且正常乳腺组织内小管上皮基底层的细胞核内也可见少量表达 (图 4A)。然而正常乳腺组织 Twist1 较原发乳腺癌组织 (图 4B) 和转移的腋窝淋巴结组织 (图 4C) 的荧光强度弱得多。RT-PCR 检测结果显示乳腺癌组织和转移腋窝淋巴结中 Twist1 基因的表达较正常乳腺组织中的表达要强很多 (图 4D、E), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 然而在后二者中差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 乳腺癌组织和腋窝淋巴结中 BCSCs 分子标志物 CD44 的高表达是癌细胞增殖、转移的关键环节 第 1 个被确认的实体肿瘤干细胞来源于乳腺癌, 那些具有 CD44⁺CD24⁻ 标志物的一小撮细胞亚群 (仅 100 个那样少) 能再生为一个肿瘤实体, 反之, 不具有这种生物标志的众多肿瘤细胞却具有该功能^[7]。试验结果表明 CD44 分子在原发乳腺癌和转移的腋窝淋巴结中高表达而在正常乳腺组织中低表达。而 CD24 在肿瘤组织、腋

窝淋巴结和正常组织中均低表达, 这与以前的研究相符合。Li 等^[8]报道到了乳腺癌肿瘤干细胞是由高水平的透明质酸受体 CD44 和对热稳定的低表达的 CD24 分子为特征的细胞。这表明乳腺癌干细胞主要在形成的初始阶段其主要作用并维持这种趋势。乳腺癌干细胞 CD44⁺CD24⁻ 也保持干细胞的多种特性如自我更新、增殖和促进癌细胞转移等。进一步研究表明, 以透明质酸诱导为基础的这类肿瘤细胞的标志包括高聚集的 CD44⁺CD24⁻ 为特征的肿瘤侵袭性细胞, 细胞连接蛋白如钙黏素和封闭素下调, 以及丰富的表皮间质化标志物如强烈的淋巴细胞侵袭和对化疗产生抵抗的分子表型过表达^[9]。因而以 CD44 为靶靶可以干预乳腺癌干细胞的分化、自我更新和肿瘤的侵袭。

3.2 乳腺癌干细胞 OCT4 的高表达维系了癌细胞的自我更新并增加了对治疗的抵抗和复发的概率 正常组织中的 OCT4, 尤其是孕期, 具有多重功能如乳腺上皮细胞的自我更新、增殖, 以及环境诱导的多重特性^[10-11]。正常乳腺组织中 OCT4 一旦变异, 他的转导就会导致具有侵袭、克隆能力的肿瘤细胞系产生。实验结果表明和正常组织相比, 乳腺组织和受累腋窝淋巴结内 OCT4 的基因和蛋白均为过表达。这表明 OCT4 与细胞

的产生和分化状态密切相关。而且当正常组织内 OCT4 呈高表达时赋予了肿瘤发生的能力。临床研究已表明:与组织内 OCT4 呈中低程度表达相比,COT4 干性分子高表达的肿瘤与疾病进展、远处转移和远期更短的生存期有关^[1]。OCT4 预后差与肿瘤干细胞耐药增多导致肿瘤患者化疗失败率高有密切关系^[12]。

CD44⁺CD24^{-/low} 乳腺癌干细胞中 Twist1 的过表达由于使上皮间质化而促进了肿瘤的侵袭转移。尽管 Twist1 在其他上皮类肿瘤细胞的核内表达是低频率事件,但是在乳腺癌细胞核内表达却具有重要的临床意义。试验结果显示 Twist1 主要表达在乳腺癌和转移淋巴结中 CD44⁺CD24^{-/low} 癌细胞核内,同时正常组织内也有少量表达。这表明 Twist1 可能主要在肿瘤的起始和促进肿瘤转移方面起作用。更重要的是,笔者发现在 I~IV 级的乳腺癌组织和腋窝淋巴结内发现 Twist1 的表达上调。表明转移淋巴结内 Twist 的高表达及后者从阴性到阳性的转变可能会导致更差的预后。研究证明乳腺上皮中 Twist1 可能通过 CD44 的过表达促进乳腺癌干细胞的产生和醛酸脱氢酶活性的增加使上皮间质化^[8,13]。另一方面, Twist1 诱导了上皮间质化,能使上皮肿瘤细胞具有间质化细胞系的特性如与癌细胞远处转移密切相关的迁徙和侵袭能力^[14]。本研究文献报道表明肿瘤间质中的 Twist1 与肿瘤中阳性 ER 和 PR 的状态紧密相关。所有 Twist1 高表达的肿瘤细胞株都显示了 ER 基因和蛋白的表达,以及二者在乳腺癌患者中呈反比关系^[15]。

本研究发现原发性乳腺癌和转移性腋窝淋巴结中的 CD44、OCT4 及 Twist1 分别较正常乳腺组织高表达,而且在 Twist1 高表达患者中 ER 呈低表达,预示了这类患者可能预后更差。

参考文献

- Chang CC, Shieh GS, Wu P, et al. Oct-3/4 expression reflects tumor progression and regulates motility of bladder cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(15): 6281-6291.
- Kong Y, Wang J, Liu W, et al. Cytokeratin19-2g2, a novel fragment of cytokeratin19 in serum, indicating a more invasive behavior and worse prognosis in breast cancer patients[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57092.
- Mark A Eckert TM, Jing Y. Twist1-induced invadopodia formation promotes tumor metastasis[J]. *Cancer Cell*, 2011, 19(3): 372-386.
- Wilkie AO, Morriss-Kay GM. Genetics of craniofacial development and malformation[J]. *Nat Rev Genet*, 2001, 2(6): 458-468.
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, et al. Epithelial-Mesenchymal transitions in development and disease[J]. *Cell*, 2009, 139(5): 871-890.
- Markiewicz A, Ahrends T, Wełnicka-Jaskiewicz M, et al. Expression of epithelial to mesenchymal transition-related markers in lymph node metastases as a surrogate for primary tumor metastatic potential in breast cancer [J]. *J Transl Med*, 2012(10): 226.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(7): 3983-3988.
- Li J, Zhou BP. Activation of b-catenin and Akt pathways by Twist are critical for the maintenance of EMT associated cancer stem cell-like characters [J]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 49.
- Prat A, Parker JS, Karginova O, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer[J]. *Breast Cancer Res*, 2010, 12(5): R68.
- Hassiotou F, Hepworth AR, Beltran AS, et al. Expression of the pluripotency transcription factor OCT4 in the normal and aberrant mammary gland[J]. *Front Oncol*, 2013(3): 79.
- Kim JB, Greber B, Araúzo-Bravo MJ, et al. Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4[J]. *Nature*, 2009, 461(7264): 643-649.
- Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges[J]. *Nat Med*, 2011, 17(3): 313-319.
- Kalluri R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(6): 1417-1419.
- Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis[J]. *Science*, 2011, 331(624): 1559-1564.
- Vesuna F, Lisok A, Kimble B, et al. Twist contributes to hormone resistance in breast cancer by downregulating estrogen receptor- α [J]. *Oncogene*, 2012, 31(27): 3223-3234.

(收稿日期: 2015-09-29 修回日期: 2015-12-01)

(上接第 1222 页)

- Hall JE, Uhrich TD, Barney JA, et al. Sedative, amnestic, and analgesic properties of small-dose dexmedetomidine infusions[J]. *Anesth Analg*, 2000, 90(3): 699-705.
- Menda F, Köner O, Sayin M, et al. Dexmedetomidine as an adjunct to anesthetic induction to attenuate hemodynamic response to endotracheal intubation in patients un-

dergoing fast-track CABG[J]. *Ann Card Anaesth*, 2010, 13(1): 16-21.

- Tobise F, Toyoshima Y, Kawana S. Effect of dexmedetomidine on hemodynamics in pediatric patients following cardiac surgery[J]. *Masui*, 2007, 56(4): 409-413.

(收稿日期: 2015-10-08 修回日期: 2015-12-17)