

· 临床研究 ·

NF- κ B、HER-2 和 VEGF-C 在乳腺癌组织中的表达及相关性分析*韩中保,戴小丽,韩扣兰 Δ ,杨留才

(盐城卫生职业技术学院,江苏盐城 224006)

摘要:目的 探讨细胞核因子 B(NF- κ B)、上皮细胞生长因子受体 2(HER-2)和血管内皮生长因子 C(VEGF-C)在乳腺癌组织中的表达水平及与乳腺癌病理特征的关系。方法 采用免疫组织化学技术 SP 法,检测 59 例乳腺癌 NF- κ B、HER-2 与 VEGF-C 的表达情况。结果 在乳腺癌组织学分级为 I 级、II 级和 III 级的组织中,NF- κ B 阳性率分别为 28.6%、63.0%和 78.3%,I、II 级合并后与 III 级比较有统计学意义($P=0.013$);淋巴结转移组 NF- κ B 和 VEGF-C 的阳性率分别等于 75.0%和 84.4%,明显高于无淋巴结转移组(48.1%和 55.6%)。NF- κ B 与 HER-2 的表达呈正相关($r=0.407$, $P=0.01$);NF- κ B、HER-2 与 VEGF-C 呈正相关(r 分别为 0.283 和 0.251)。结论 乳腺癌中 NF- κ B 与 HER-2 的表达为正相关,NF- κ B 和 HER-2 与 VEGF-C 的表达呈正相关。

关键词:乳腺肿瘤;细胞核因子 κ B;人类上皮细胞生长因子受体 2;血管内皮生长因子 C

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.18.008

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)18-2080-03

Expression of NF- κ B,HER-2 and VEGF-C and its correlation analysis in breast cancer*Han Zhongbao,Dai Xiaoli,Han Koulan Δ ,Yang Liucai

(Yancheng Health Vocation and Technical College,Yancheng,Jiangsu,224006,China)

Abstract: Objective To investigate the expression of nuclear transcription factor- κ B(NF- κ B),human epidermal growth factor receptor-2(HER-2) and vascular endothelial growth factor-C(VEGF-C) in breast cancers,and the relationship between the pathological features of breast carcinoma. **Methods** 59 samples of human breast cancer tissue were examined for the expression of NF- κ B,HER-2 and VEGF-C by immunohistochemical SP method. **Results** In the tissues of histological grading of breast cancer I, II and III grade,NF- κ B positive rates were 28.6%,63.0% and 78.3%,comparison of I, II grade combined and III grade had statistical significance($P=0.013$). The positive rates of NF- κ B and of VEGF-C were 75.0% and 84.4% respectively in the lymph-node metastasis group,which was significantly higher than that of non- lymph node metastasis group(48.1% and 55.6% respectively). NF- κ B and HER-2 expressions were positively correlated($r=0.407$, $P=0.01$),Both NF- κ B and HER-2 were correlated significantly with VEGF-C(r value were 0.283 and 0.251 respectively). **Conclusion** There was a positive correlation between both NF- κ B and HER-2 positively correlate with VEGF-C in Breast cancers.

Key words: breast neoplasms;nuclear transcription factor- κ B;human epidermal growth factor receptor-2;vascular endothelial growth factor-C

近年来,乳腺癌已成为妇女恶性肿瘤死亡的主要原因。其形成和转移与其他恶性肿瘤一样是多基因、多因子共同作用的结果。细胞核因子 B(nuclear transcription factor- κ B,NF- κ B)可调控细胞增殖、分化、凋亡及恶性转化,在乳腺癌的发生、发展过程中发挥很重要的作用^[1-2]。人上皮细胞生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor-2,HER-2)是目前公认的乳腺癌重要的预后影响因子之一,在乳腺癌中,HER-2 过表达可刺激 NF- κ B 活化^[3],同时有可能促进血管内皮生长因子 C(vascular endothelial growth factor-C,VEGF-C)表达^[4-5],从而诱导淋巴管及血管的生成,引发肿瘤的转移^[6]。本文采用免疫组化 SP 法检测 ER、HER-2、NF- κ B 和 VEGF-C 在乳腺癌中的表达水平,探讨其与临床病理因素的关系及它们之间的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集盐城市第三人民医院病理科 2004 年 1 月至 2004 年 12 月间浸润性乳腺癌存档蜡块组织 59 份,患者年龄 34~75 岁,平均(50.95 \pm 4.7)岁。依据 WHO 2003 年所推荐的乳腺癌组织学分类标准、国际抗癌联盟(UICC)和美国

肿瘤联合会(AJCC)2003 年联合制定标准进行临床分型、组织病理学分级。所有患者术前均未接受放疗、化疗及生物治疗。

1.2 方法

1.2.1 实验仪器及主要试剂 实验仪器包括脱水机、包埋机、切片机、烤片机、电磁炉、显微镜、冰箱、加样器等。所用抗体包括 NF- κ B 的 P50 和 P65 亚单位抗体和抗 VEGF-C。抗 50(兔源,Sc-114,Santa Cruz 公司),抗 P65(鼠源,Sc-8008,Santa Cruz 公司);抗 VEGF-C(兔源,ZA-0266,Santa Cruz 公司)。免疫组化染色采用 SP 法(SP 试剂盒为 Santa Cruz 公司产品)。

1.2.2 组织标本的处理和免疫组织化学染色 石蜡包埋肿瘤标本连续切片 4 μ m,分别进行 HE 染色和免疫组织化学染色。HE 染色片进行组织病理学诊断,免疫组织化学染色按 SP 法进行染色。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

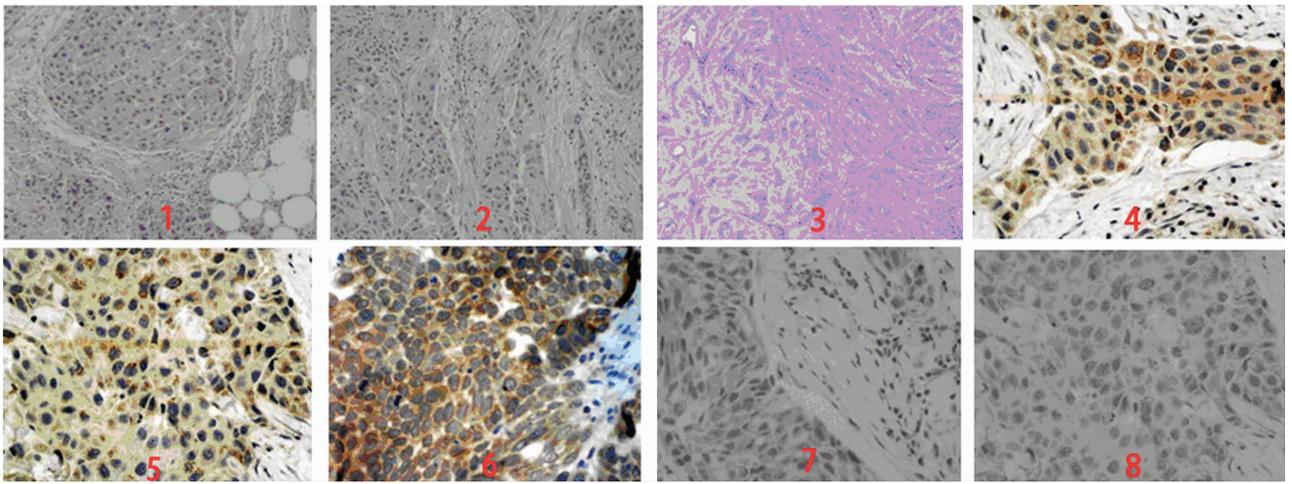
1.2.3 免疫组织化学结果判定 每张切片选取染色良好区域,随机观察 10 个高倍视野,每个视野观察 100 个细胞。HER-2 和 ER 分别以细胞膜和细胞核出现棕黄色颗粒为准,着色细胞大于 25%为阳性,小于或等于 25%为阴性;P50 和 P65 均以核着色为准,核着色细胞数大于 10%为阳性,小于或

* 基金项目:江苏省盐城市医学科技发展计划基金资助项目(YK2011119)。作者简介:韩中保(1966~),副教授,主要从事乳腺癌研究。

 Δ 通讯作者,Tel:15962080296;E-mail:hkl414@163.com。

等于 10% 为阴性;同一样本中 P50 和 P65 其一或两者皆为阳性则判该样本为 NF-κB 阳性;VEGF-C 以细胞质出现棕黄色颗粒为准,结合阳性细胞百分率和染色强度进行半定量处理,即选 5 个高倍视野,各数 100 个细胞;无细胞着色为 0 分,着色细胞占 1%~20% 为 1 分,占 21%~50% 为 2 分,大于或等于

51% 为 3 分。着色强度以多数阳性细胞呈现的染色计分,不着色为 0 分,着色弱为 1 分,着色清晰为 2 分,着色强为 3 分。将阳性细胞百分比和着色强度两者的计分相加,0~2 分为阴性,大于或等于 3 分为阳性(图 1)。



1:分化 I 级乳腺癌组织(HE,×200); 2:分化 II 级乳腺癌组织(HE,×200);3:分化 III 级乳腺癌组织(HE,×200);4:VEGF-C 在乳腺癌分化 I 级组织中阳性表达,阳性颗粒定位于细胞质(SP,×400);5:VEGF-C 在乳腺癌分化 II 级组织中阳性表达,阳性颗粒定位于细胞质(SP,×400);6: VEGF-C 在乳腺癌分化 III 级组织中阳性表达,阳性颗粒定位于细胞质(SP,×400);7:乳腺浸润性导管癌 I 级,NF-κB 阳性表达,细胞质呈棕黄色颗粒着色(SP,×400);8:乳腺浸润性导管癌 III 级,NF-κB 阳性表达,细胞质呈棕黄色颗粒着色(SP,×400)。

图 1 乳腺癌组织中 VEGF-C 与 NF-κB 影像学表现

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件对数据进行统计学分析处理,所有数据均采用 χ^2 检验和四格表进行统计学分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

乳腺癌组织学分级为 I、II、III 级乳腺癌 NF-κB 阳性率分别为 22.2%、63.0% 和 78.3%,I、II 级合并后与 III 级比较差异有统计学意义($P = 0.013$;表 1),淋巴结转移组 NF-κB 和 VEGF-C 的阳性率分别等于 75.0% 和 84.4%,明显高于无淋巴结转移组(48.1% 和 75.0%)。乳腺癌中 ER 的表达状况与 NF-κB、VEGF-C 的阳性率无相关性(表 2、表 4)。59 例乳腺癌中 NF-κB 与 HER-2 表达呈正相关($r = 0.407, P = 0.001$,表 2),NF-κB 和 HER-2 均与 VEGF-C 的表达呈正相关(r 值分别为 0.283 和 0.251,表 4)。

表 1 NF-κB 的表达及其与乳腺癌临床病理特征间的关系[n(%)]

临床病理参数	n	NF-κB(+)	χ^2	P
组织学分级				
I 级	9	2(22.2)	8.699*	0.013
II 级	27	17(63.0)		
III 级	23	18(78.3)		
淋巴结转移				
无	27	13(48.1)	4.515	0.034
有	32	24(75.0)		
TNM 分期				
I~II 期	36	15(58.3)	0.757	0.393
III~IV 期	23	7(69.6)		

*: I、II 级合并后与 III 级比较。

表 2 乳腺癌中 NF-κB 与 HER-2、ER 表达之间的关系

指标	HER-2		r	P	ER		r	P	
	+	-			+	-			
NF-κB	+	27	6	0.407	0.001	18	19	0.150	0.072
	-	10	16			16	9		

表 3 VEGF-C 的表达及其与乳腺癌临床病理特征间的关系[n(%)]

临床病理参数	n	VEGF-C(+)	χ^2	P
淋巴结转移				
无	27	15(55.6)	5.930	0.014
有	32	27(84.4)		
TNM 分期				
I~II 期	36	22(61.1)	4.570	0.033
III~IV 期	23	20(87.0)		

表 4 乳腺癌中 NF-κB、HER-2、ER 与 VEGF-C 之间的相关性

指标	表达情况	VEGF-C		r	P
		+	-		
NF-κB	+	30	7	0.283	0.030
	-	12	10		
HER-2	+	26	15	0.251	0.047
	-	16	2		
ER	+	18	7	0.118	0.906
	-	24	10		

3 讨 论

3.1 NF- κ B 在乳腺癌组织中的表达及其临床意义 典型的 NF- κ B 是 P50 和 P65 的异源二聚体,当细胞受到某些外源性刺激时,NF- κ B 则由胞质中转移至核内发挥功能^[7]。Biswas 等^[8]证实了 NF- κ B 在乳腺癌形成中的促细胞增殖作用。Hou 等^[9]研究结果表明 NF- κ B 活化能够促进乳腺癌细胞的转化、迁移和转移。本研究中 NF- κ B 在组织学分级、有无淋巴转移和 TNM 分期等不同情况下,乳腺癌组织中 NF- κ B 的表达水平比较差异有统计学意义,与文献报道相一致,提示 NF- κ B 可作为乳腺癌临床诊断及预后的辅助指标。

3.2 VEGF-C 在乳腺癌组织中的表达及其临床意义 VEGF-C 的表达诱导实质瘤内或瘤周的淋巴管内皮细胞增殖,从而促进肿瘤中淋巴管的生成、扩张及淋巴网络的形成,促进肿瘤的淋巴管转移^[10]。Denkert 等^[11]研究发现,乳腺癌组织中 VEGF-C 的表达水平与肿瘤大小、淋巴管转移情况和临床分期有关,即肿瘤越大,VEGF-C 表达的阳性率越高;VEGF-C 表达阳性率在腋窝淋巴结转移的癌组织中明显高于无淋巴结转移者;临床分期越晚,VEGF 表达的阳性率越高;大量的研究证实,VEGF-C 的表达可促进恶性肿瘤的生长、浸润和转移^[12]。本研究结果显示,VEGF-C 表达在 TNM I ~ II 期组和 III ~ IV 期组阳性率分别为 61.1% 和 87.0%,无淋巴结转移与淋巴结转移组分别为 55.6% 和 84.4%,差异有统计学意义,提示 VEGF-C 对肿瘤进展与转移尤其是对淋巴道转移有影响。

3.3 乳腺癌中 NF- κ B、HER-2、ER 与 VEGF-C 之间的相关性 本研究结果表明乳腺癌中 NF- κ B 与 HER-2 表达呈正相关 ($r=0.407, P=0.001$),与 Biswas 等^[8]报道一致,Biswas 等通过实验证明了 NF- κ B 的活化是经由 HER-2 \rightarrow IKK \rightarrow NF- κ B 这条通路。

Patricia 等^[13]提出,在乳腺癌中 ER 状态与 NF- κ B 的活化水并无明显相关性。在人乳腺癌细胞发生恶性转化之前,Sovak 等^[14]观察到 NF- κ B 的高活性表达,提示 NF- κ B 的活化在乳腺癌的转化方面起一个早期、决定性的作用。

Tsai 等^[15]研究表明在离体细胞中多肽生长因子 (heregulin-1, HRG-1) 可以促进 VEGF-C mRNA 和蛋白的表达,且 Herceptin (HER-2 的特异性抗体) 能减少这种表达。Hsieh 等^[16]实验显示在乳腺癌细胞中 HRG-1 可以通过 p38 MAPK 信号传导途径促进依赖 NF- κ B 的 VEGF-C 的表达。提出在人乳腺癌细胞存在着这样一种上调 VEGF-C 表达的机制:HER-2 的配体 HRG- β 1 经由 P38 MAPK 信号通路并且是 NF- κ B 依赖刺激 VEGF-C 的上调。HER-2、NF- κ B 以及 VEGF-C 及其受体 VEGFR-3 之间可能存在着一条促进乳腺癌淋巴道转移的通路,即 HER-2 \rightarrow NF- κ B \rightarrow VEGF-C \rightarrow VEGFR-3 \rightarrow 淋巴管生成 \rightarrow 淋巴道转移的通路。本研究结果显示,NF- κ B 和 HER-2 均与 VEGF-C 的表达呈正相关 (r 值分别为 0.283 和 0.251),进一步证实了这三者间的协同关系。

参考文献:

[1] Nagai S, Washiyama K, Kurimoto M, et al. Aberrant nuclear factor κ B activity and its participation in the growth of human malignant astrocytoma[J]. *Neurosurg*, 2002, 96(5):909-914.

[2] Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF- κ B[J]. *Genes Dev*, 2004, 18(18):2195-2224.

[3] Pegram MD, Konecny G, Slamon DJ. The molecular and cellular biology of C-erbB-2 gene amplification/overexpres-

sion and the clinical development of herceptin(trastuzumab) therapy for breast cancer[J]. *Cancer Treat Res*, 2000, 103(1):57-75.

[4] Makino K, Day CP, Wang SC, et al. Upregulation of IKK α /IKK β by integrin-linked kinase is required for HER2/neu-induced NF- κ B antiapoptotic pathway[J]. *Oncogene*, 2004, 23(21):3883-3887.

[5] Tsai PW, Shiah SG, Lin MT, et al. Up-regulation of vascular endothelial growth factor C in breast cancer cells by heregulin-1. a critical role of p38/nuclear factor- κ B signaling pathway[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(8):5750-5759.

[6] Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, et al. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(15):1786-1790.

[7] Blackwell TS, Christman JW. The role of nuclear factor- κ B in cytokine gene regulation[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997, 17(1):3-9.

[8] Biswas DK, Dal SC, Cn rz A, et al. The nuclear factor κ B(NF- κ B): a potential therapeutic target for estrogen receptor negative breast cancer[J]. *PNAS*, 2001, 98(18):10386-10391.

[9] Hou MF, Lin SB, Yuan SS, et al. The clinical significance between activation of nuclear factor κ B transcription factor and over-expression of C-erbB-2 oncoprotein in Taiwanese patients with breast cancer[J]. *Clin Chim Acta*, 2008, 334(2):137-144.

[10] Saharinen P, Petrova T. petrova. Molecular regulation of lymphangiogenesis[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1014(1):76-87.

[11] Denkert TC, Winzer KJ, Mu Ller BM, et al. Elevated expression of cyclo-oxygenase-2 is an egative prognostic factor for disease free survival and overall survival in patients with breast carcinoma[J]. *Cancer*, 2008, 97(12):2978-2987.

[12] Cheng WF, Chen CA, Lee CN, et al. Vascular epithelial growth factor in cervical carcinoma[J]. *Obstet Gynecol*, 1999, 93(6):761-765.

[13] Patricia C. Selective activation of NF- κ B subunits in human breast cancer: potential role for NF- κ B/p52 and for Bcl-3[J]. *Oncogene*, 2005, 19(14):1123-1131.

[14] Sovak MA, Kin D. Activation of NF- κ B/Rel family occurs early during neoplastic transformation of mammary cells[J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(5):871-879.

[15] Tsai PW, Shiah SG, Lin MT, et al. Up-regulation of vascular endothelial growth factor C in breast cancer cells by heregulin- β 1[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(21):5750-5759.

[16] Hsieh CY, Chen CA, Chou CH, et al. Overexpression of Her-2/neu in epithelial ovarian carcinoma induces vascular endothelial growth factor C by active NF- κ B; implications for malignant ascites formation and tumor lymphangiogenesis[J]. *Biomed Sci*, 2004, 11(2):249-259.