

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.23.008
文章编号: 1005-8982 (2018) 23-0036-06

临床研究 · 论著

乳腺癌组织中 Snail、Bcl-2 的表达水平及其临床意义

刘平贤, 张浩, 李伟汉

(河南省南阳市中心医院, 河南 南阳 473009)

摘要: 目的 探讨乳腺癌组织中 Snail 和 Bcl-2 蛋白的表达水平与临床病理特征及预后的相关性。**方法** 使用免疫组织化学法分析 2010 ~ 2015 年在该院就诊的 92 例乳腺癌患者的癌组织中 Snail 和 Bcl-2 蛋白表达水平, 分析 2 种蛋白表达的相关性, 以及两者与患者临床病理特征及预后的关系。**结果** 乳腺癌组织中 Snail 高表达率为 62.5%, Bcl-2 低表达率为 57.6%, 与癌旁组织蛋白表达率比较有差异 ($P < 0.05$), 乳腺癌组织中 Snail 与 Bcl-2 呈负相关 ($P < 0.05$); Snail 表达水平与组织学分级、淋巴结是否转移、雌激素受体 (ER) 及孕激素受体 (PR) 表达有相关性 ($P < 0.05$), Bcl-2 表达水平与肿瘤大小、ER 及 PR 有相关性 ($P < 0.05$); 低表达 Snail 乳腺癌患者无瘤生存率为 87.5%, 死亡 1 例; 高表达 Snail 乳腺癌患者无瘤生存率为 78.3%, 死亡 5 例, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 高表达 Bcl-2 乳腺癌患者无瘤生存率为 87.2%, 死亡 1 例, 低表达 Bcl-2 乳腺癌患者无瘤生存率为 77.4%, 死亡 5 例, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** Snail 表达水平与乳腺癌进展呈正相关, Bcl-2 表达水平与乳腺癌进展呈负相关, 而高表达 Snail 和低表达 Bcl-2 患者预后较差。

关键词: 乳腺癌; B-淋巴细胞白血病-2; Snail; 病理分期

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

Expressions of Snail and Bcl-2 in breast cancers and their clinical significance

Ping-xian Liu, Hao Zhang, Wei-han Li

(Nanyang Central Hospital, Nanyang, Henan 473009, China)

Abstract: Objective To investigate the expressions of Snail and Bcl-2 in breast cancers and their correlations with clinicopathological features and prognosis. **Methods** The expressions of Snail and Bcl-2 proteins in 92 patients with breast cancers treated in our hospital from 2010 to 2015 were analyzed by immunohistochemical method. The correlation between Snail and Bcl-2 protein expressions was analyzed, and their relationships with clinicopathological features and prognosis were analyzed. **Results** The high expression rate of Snail was 62.5% and the low expression rate of Bcl-2 was 57.6% in the breast cancer tissues, which were significantly higher than those in the paracancerous tissues ($P < 0.05$). There was a negative correlation between Snail and Bcl-2 expressions in the breast cancer tissues ($r = -0.519$). In addition, the expression level of Snail was correlated with pathological stage, lymph node metastasis and the positive expressions of estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) ($P < 0.05$); the expression of Bcl-2 was correlated with histological grade, ER and PR ($P < 0.05$). In the breast cancer patients with low expression of Snail, the disease-free survival rate was 87.5%, 1 case died; while in the breast cancer patients with high expression of Snail, the disease-free survival rate was 78.3%, 5 cases died; the differences were significant ($P < 0.05$). The disease-free survival rate of the breast cancer patients with high expression of Bcl-2 was 87.2%, 1 case died; while the disease-free survival rate of the breast cancer patients with low expression of Bcl-2 was 77.4%, 5 cases died, there were statistically significant differences ($P < 0.05$). **Conclusions** Snail and breast cancer progression are positively

收稿日期: 2018-02-15

correlated, Bcl-2 and breast cancer progression are negatively correlated. The patients with high expression of Snail and low expression of Bcl-2 have poor prognosis.

Keywords: breast cancer; Bcl-2; Snail; pathological stage

据有关数据显示, 每年约 120 万女性确诊为乳腺癌, 死亡人数约 45 万, 乳腺癌已成为威胁全球女性健康最常见的恶性肿瘤之一^[1]。目前, 手术切除仍然是治疗乳腺癌的主要手段, 基于组织病理学诊断结果不仅有助于了解患者的病理特征, 而且有利于对患者预后进行准确判断。但是临床资料显示, 相同病理结果患者其治疗及预后差异较大。有文献报道称, 由于乳腺癌的高度异质性, 即使存在完全相同的组织形态学结构, 其分子遗传内容的改变也未必相同, 这可能是患者治疗效果差异的原因之一^[2]。探讨与浸润、转移及无限增殖有关的蛋白分子改变具有重要意义。研究发现, Snail 可调节肿瘤细胞上皮间质化, 促进细胞转移^[3]。B 淋巴细胞白血病-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 基因是肿瘤细胞重要的抗凋亡基因^[4]。但是目前关于 Snail 与 Bcl-2 是否存在一定关系的报道较少。因此, 本研究通过分析 2010 ~ 2015 年在河南省南阳市中心医院治疗并有完整随访记录的患者的病理特征及预后, 结合 Snail 和 Bcl-2 蛋白表达水平, 为进一步了解乳腺癌的发病机制, 探索新的治疗方法提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2010 年 4 月-2015 年 5 月于本院实施手术切除的 92 例乳腺癌患者作为研究对象, 获取乳腺癌石蜡组织标本 92 例, 癌旁组织标本 92 例, 癌旁组织距手术边缘 >3 cm。根据 TNM 分期标准, I、II 期 57 例, III 期 35 例。根据肿瘤组织分化情况, 中、高分化 50 例, 低分化 42 例。纳入标准: ①病理结果显示浸润性导管癌; ②术前未放化疗; ③近 3 个月内未服用激素类药物; ④完整的病例资料及随访记录。排除标准: ①合并有其他肿瘤; ②生存期 <3 个月; ③存在糖尿病等慢性消耗性疾病。患者的病理资料中, 如乳腺癌组织类型雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素受体 (progesterone receptor, PR)、ki-67 及人类表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor-2, Her-2) 免疫组织化学结果均由本院高年资病理医师给出。本研究经本院伦理委员会批准, 患者均知情并

签署知情同意书。

1.2 主要试剂及仪器

兔抗人 Snail 单抗、兔抗人 Bcl-2 单抗及羊抗兔多抗 (英国 Abcam 公司), 二氨基联苯胺 (Diaminobenzidine, DAB) 显色试剂盒 (福州迈新生物技术开发有限公司), 免疫组织化学试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司), Ti 型荧光显微镜 (上海尼康仪器有限公司), TC-150 型自动脱水机、TB-718 型自动包埋机及 TK-218V 恒温摊片机 (孝感市湖北泰维医疗科技有限公司)。

1.3 免疫组织化学法

病理组织经 10% 甲醛固定、脱水、透明及透蜡后进行石蜡包埋、切片, 厚 5 ~ 6 μm , 依次进行脱蜡、复水、抗原修复、灭活过氧化氢酶及封闭步骤后, 分别加入 Snail 单抗 (1 : 30 稀释) 或 Bcl-2 单抗 (1 : 50 稀释), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤后加入羊抗兔多抗 (1 : 1 000 稀释), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBS 洗涤后加入辣根过氧化物, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 ~ 20 min, PBS 洗涤后加入 DAB 显色液, 自来水冲洗并进行苏木精复染, 二甲苯透明, 中性树脂封片观察。以 PBS 为抗体阴性对照。

1.4 免疫结果判断

由于 Snail 和 Bcl-2 均表达于细胞质中, 免疫组织化学法结果可显示棕黄色或棕褐色。结果由 2 位未直接参与本研究的病理医生在双盲情况下阅片, 根据阳性细胞数目和染色程度进行评分: ①阳性细胞数 $\leq 5\%$ 计 0 分, $>5\% \sim 25\%$ 计 1 分, $>25\% \sim 50\%$ 计 2 分, $>50\% \sim 75\%$ 计 3 分, $>75\% \sim 100\%$ 计 4 分; ②染色程度: 未见阳性细胞计 0 分, 黄色计 1 分, 棕黄色计 2 分, 棕褐色计 3 分。最终得分 = 阳性细胞数目得分 \times 染色程度得分, 得分 <5 分为低表达, ≥ 5 分为高表达。患者 Snail 高表达 60 例, 低表达 32 例; Bcl-2 高表达 39 例, 低表达 53 例。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计学分析, 计数资料以率 (%) 或构成比表示, 比较用 χ^2 检验, 生存曲线分析采用 Kaplan-Meier 法中的 Log-rank χ^2 检验, 相

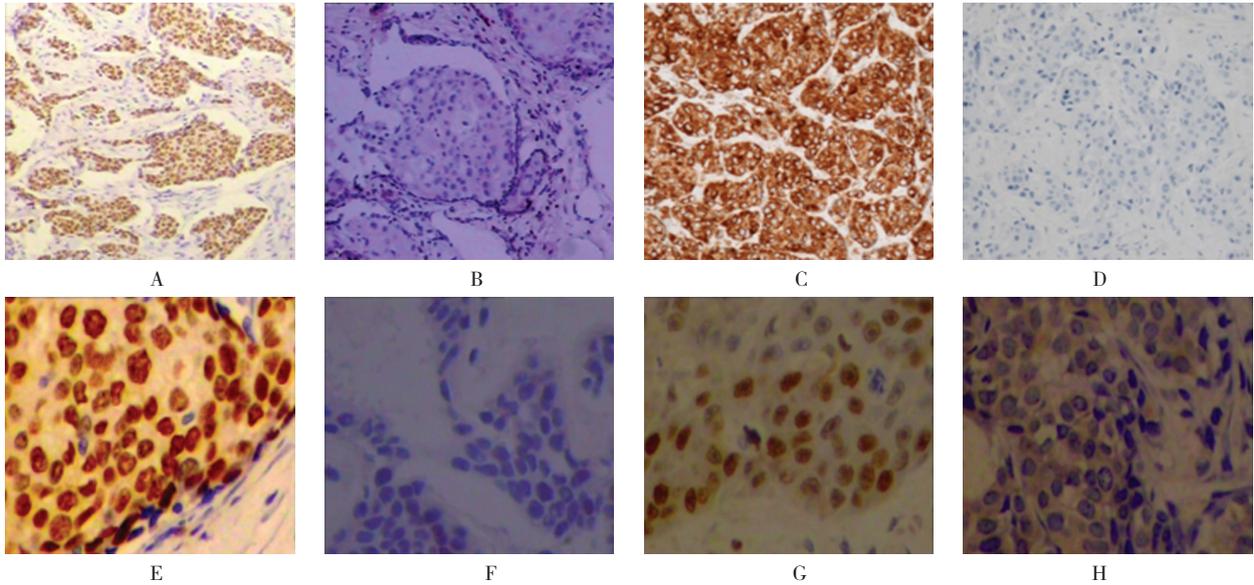
关性分析采用 Pearson 法。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌及癌旁组织中 Snail 与 Bcl-2 蛋白表达水平

乳腺癌组织中 Snail 高表达率为 62.5% (60/92),

Bcl-2 低表达率为 57.6% (53/92), 癌旁组织中 Snail 高表达率为 39.1% (36/92), Bcl-2 低表达率为 34.8% (32/92), 两者的 Snail 和 Bcl-2 表达率比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2=12.554$ 和 9.643 , $P=0.014$ 和 0.046), 乳腺癌组织中 Snail 与 Bcl-2 表达水平呈负相关 ($r=-0.519$, $P=0.021$)。见图 1。



A: 乳腺癌组织中 Snail 的表达 (×100); B: 乳腺癌组织中 Bcl-2 的表达 (×100); C: 癌旁组织中 Snail 的表达 (×100); D: 癌旁组织中 Bcl-2 的表达 (×100); E: 乳腺癌组织中 Snail 的表达 (×400); F: 乳腺癌组织中 Bcl-2 的表达 (×400); G: 癌旁组织中 Snail 的表达 (×400); H: 癌旁组织中 Bcl-2 的表达 (×400)。

图 1 乳腺癌及癌旁组织中 Snail 与 Bcl-2 的表达情况

2.2 Snail 表达水平与临床病理特征的相关性

Snail 表达水平与病理分期、肿瘤大小及 HER-2 无相关性 ($P > 0.05$), 与组织学分级、淋巴结是否转

移、雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 及孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 表达有相关性 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 Snail 表达水平与临床病理特征的相关性

因素	例数	Snail/例		r 值	P 值	因素	例数	Snail/例		r 值	P 值
		高表达	低表达					高表达	低表达		
病理分期						ER					
I、II 期	57	34	23	0.132	0.727	(+)	53	45	8	-0.456	0.000
III 期	35	26	9			(-)	39	15	24		
组织学分级						PR					
中、高分化	50	22	28	0.406	0.000	(+)	54	45	9	-0.389	0.000
低分化	42	38	4			(-)	38	15	23		
肿瘤大小						HER-2					
>2 cm	55	32	23	0.103	0.560	(+)	57	34	23	0.156	0.727
≤ 2 cm	37	28	9			(-)	35	26	9		
淋巴结转移											
有	49	40	9	0.366	0.014						
无	43	20	23	0.366	0.014						

2.3 Bcl-2 表达水平与临床病理特征的相关性

Bcl-2 表达水平与病理分期、组织学分级、淋巴

结转移及 HER-2 表达无相关性 ($P > 0.05$), 与肿瘤大小、ER 及 PR 有相关性 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 Bcl-2 表达水平与临床病理特征的相关性

因素	例数	Bcl-2/ 例		r 值	P 值	组别	例数	Bcl-2/ 例		r 值	P 值
		高表达	低表达					高表达	低表达		
病理分期						ER					
I、II 期	57	23	34	-0.256	0.992	(+)	53	34	19	0.511	0.000
III 期	35	16	19			(-)	39	5	34		
组织学分级						PR					
中、高分化	50	26	24	-0.188	0.387	(+)	54	31	23	0.389	0.017
低分化	42	13	29			(-)	38	8	30		
肿瘤大小						HER-2					
>2 cm	55	14	41	-0.492	0.002	(+)	57	28	29	-0.156	0.595
≤ 2 cm	37	25	12			(-)	35	11	24		
淋巴结转移											
有	49	25	24	-0.153	0.525						
无	43	14	29	-0.153	0.525						

2.4 Snail 对乳腺癌患者预后的影响

低表达 Snail 乳腺癌患者中, 骨转移 2 例, 肝转移 2 例, 无瘤生存率为 87.5% (28/32); 高表达 Snail 乳腺癌患者中, 骨转移 3 例, 肺转移 2 例, 脑转移 2 例及肝转移 6 例, 无瘤生存率为 78.3% (47/60), 两者无瘤生存率比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2=4.553, P=0.042$)。低表达 Snail 患者死亡 1 例, 高表达 Snail 患者死亡 5 例, 两者生存率比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2=5.642, P=0.036$)。见图 2。

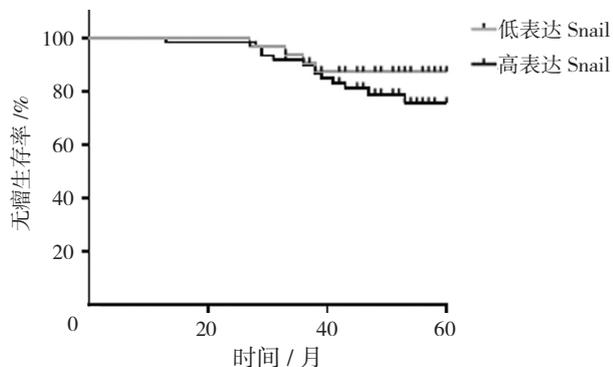


图 2 高、低表达 Snail 患者的生存曲线

2.5 Bcl-2 对乳腺癌患者预后的影响

高表达 Bcl-2 乳腺癌患者中, 骨转移 2 例, 肝转移 3 例, 无瘤生存率为 87.2% (34/39); 低表达 Bcl-2 乳腺癌患者中, 骨转移 3 例, 肺转移 2 例, 脑转移 2 例, 肝转移 5 例, 无瘤生存率为 77.4% (41/53), 两者无瘤生存率比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2=6.542, P=0.032$)。低表达 Bcl-2 患者死亡 5 例, 高表达 Bcl-2 患者死亡 1 例, 两者生存率比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2=7.215, P=0.028$)。见图 3。

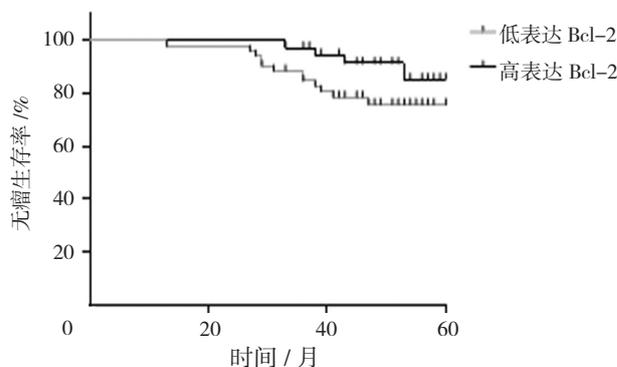


图 3 高、低表达 Bcl-2 患者的生存曲线

3 讨论

临床数据显示,目前我国乳腺癌发病率已位居女性癌症第 1 位,其发病率约为万分之四,且每年以 3% 的速度逐年增加,并呈现年轻化趋势^[5]。而通过对乳腺癌发病机制的深入了解以及分子诊断学技术的发展,已证实乳腺癌术后复发与转移可受到肿瘤微环境、机体免疫功能及遗传等多因素调节,并涉及多基因及多条信号通路。其中 Snail 与 Bcl-2 是目前研究乳腺癌转移及复发的重要调控因子。由于 Snail 可通过上调波形蛋白、成纤维细胞特异蛋白和 Rho 蛋白表达或下调钙粘附蛋白 E 表达等途径导致肿瘤上皮间质化并促进肿瘤转移的发生,因而 Snail 高表达往往意味着肿瘤转移风险较大,且患者预后不良^[6]。Bcl-2 蛋白则与 Bax 蛋白同时表达于正常的乳腺上皮细胞,且两者表达水平处于动态平衡中,但乳腺癌组织中多呈现 Bcl-2 过表达^[7]。由此笔者推测 Bcl-2/Bax 失衡或将导致机体无法及时清除变异的异常细胞,从而为肿瘤的形成或复发提供条件。而采用药物抑制 Bcl-2 蛋白活性,诱导肿瘤凋亡并最终起到杀死肿瘤细胞便是根据 Bcl-2 的作用机制。

由于肿瘤增殖及转移在一定程度上或许存在某种联系,而以往研究中又多将 Snail 与 Bcl-2 作为研究肿瘤转移的重要调控基因或关键的药物靶点,较少涉及到两者相关性或两者与肿瘤病理特征及预后关系。但深入了解以上问题,不仅有利于对药物治疗效果的正确评价,还有助于提前制定合理的治疗手段,从而提高乳腺癌治疗效果及生存率。因此,本研究首先针对乳腺癌组织及癌旁组织中 Snail 及 Bcl-2 的表达水平差异进行分析。其结果显示,Snail 及 Bcl-2 在不同组织中的表达水平有差异,且 Snail 与 Bcl-2 表达水平在乳腺癌组织中呈现负相关性。研究显示,钙黏附蛋白 E 是肿瘤上皮间质化的直接调控蛋白,而低分化、高恶性程度的肿瘤组织中往往低表达钙黏附蛋白 E,且 Snail 又可负性调节钙黏附蛋白 E,因而,高表达 Snail 的肿瘤组织或许易发生肿瘤上皮间质化及肿瘤转移^[8]。但是,作为抗凋亡基因 Bcl-2,虽然其在乳腺癌组织及癌旁组织中表达存在差异,但 Bcl-2 在乳腺癌组织并非高表达,而 SMERAGE 等也证实,高表达 Bcl-2 与患者预后具有正相关性^[9]。其可能原因是 Bcl-2 不仅抑制细胞凋亡,也延缓了细胞周期及分裂次数,从而对细胞增殖产生负性作用^[10]。而这或许解释了 Snail 与 Bcl-2 存在负相关性的可能性之一,即细

胞增殖或许有利于细胞上皮间质化的发生^[11]。

随后,本研究按临床病理特征对乳腺癌患者分组,并探讨不同情况分组下 Snail 与 Bcl-2 的表达情况。其结果显示,Snail 与组织学分级、淋巴结转移与否以及 ER、PR 表达存在相关性。由于 Snail 与肿瘤细胞侵袭能力存在正相关性,而病理分期则是以癌组织浸润程度为判断依据之一,而癌组织浸润程度越高,其发生癌细胞转移的几率也大大增加,因而也更易出现淋巴结转移。此外,三阴性乳腺癌(ER-/PR-/HER-2-)具有侵袭性强、癌细胞易转移及预后较差等特点,而从本研究结果可知,Snail 与 ER 及 PR 均存在负相关性,但 Snail 与 HER-2 无明显相关性,基本与以往报道相符合^[12]。其可能存在机制为内分泌激素影响肿瘤微环境,从而对 Snail 调节钙黏附蛋白 E 通路产生影响^[13]。此外,Bcl-2 与肿瘤大小、ER 及 PR 存在相关性。由于肿瘤变大多伴随肿瘤细胞大量增殖,而此类癌细胞多低表达或不表达 Bax,而高表达 Bcl-2^[14]。MARTIN 等^[15]研究发现 Bcl-2 高表达患者多为 ER+ 或 / 和 PR+,但其具体作用机理仍有待进一步分析。另外,高表达 Snail 或低表达 Bcl-2 患者的无瘤生存期及生存率均低于低表达 Snail 或高表达 Bcl-2 患者。结合其病理特征分析,笔者猜测如下原因:① Snail 低表达及 Bcl-2 高表达多为雌 / 孕激素受体阳性患者,而这类患者进行内分泌治疗效果较好;②病理早期、未发生淋巴转移或肿瘤较小患者采取手术治疗效果较好。

综上所述,Snail 及 Bcl-2 不仅存在一定负相关性,且在一定程度上均可反应患者病理特征及其预后,不仅可作为治疗乳腺癌的药物靶点,也可作为乳腺癌的诊断指标之一。但鉴于本研究纳入样本数较少,后续还需进行多样本,随机双盲实验,以便获得更加可信的结论。

参 考 文 献:

- [1] GOLDHIRSCH A, WINER E P, COATES A S, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the st gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2013[J]. *Annals of Oncology*, 2013, 24(9): 2206-2223.
- [2] KHATCHERESSIAN J L, HURLEY P, BANTUG E, et al. Breast cancer follow-up and management after primary treatment: american society of clinical oncology clinical practice guideline update[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2013, 31(7): 961-965.
- [3] 高月,鲁亚晶,苗杨,等. Snail 和 E-cad 在化生性乳腺癌中的表

- 达及其临床意义 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2015, 20(9): 799-803.
- [4] 李刚, 任宏, 张靖, 等. 乳腺癌中 bcl-2 与 nm23-h1 基因表达情况及其临床意义 [J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22(2): 332-335.
- [5] 黄哲宙, 陈万青, 吴春晓, 等. 中国女性乳腺癌的发病和死亡现状 - 全国 32 个肿瘤登记点 2003-2007 年资料分析报告 [J]. 肿瘤, 2012, 32(6): 435-439.
- [6] DONG C, WU Y, YAO J, et al. G9a interacts with Snail and is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in human breast cancer[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2012, 122(4): 1469-1486.
- [7] VAILLANT F, MERINO D, LEE L, et al. Targeting BCL-2 with the BH3 mimetic ABT-199 in estrogen receptor-positive breast cancer[J]. Cancer Cell, 2013, 24(1): 120-129.
- [8] CARLSON G E, SHIRURE V, OSTERMANN A O, et al. The epithelial to mesenchymal transition regulates the expression of E-selectin ligands on breast cancer cell lines[J]. Cancer Research, 2016, 76(14 Supplement): 1609-1609.
- [9] SMERAGE J B, BUDD G T, DOYLE G V, et al. Monitoring apoptosis and Bcl-2 on circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer[J]. Molecular Oncology, 2013, 7(3): 680-692.
- [10] GROSS A. BCL-2 family proteins as regulators of mitochondria metabolism[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Bioenergetics, 2016, 1857(8): 1243-1246.
- [11] ZHAO N, SUN B, ZHAO X, et al. Coexpression of Bcl-2 with epithelial-mesenchymal transition regulators is a prognostic indicator in hepatocellular carcinoma[J]. Medical Oncology, 2012, 29(4): 2780-2792.
- [12] 胡磊, 王箏, 江颖, 等. 三阴性乳腺癌的最新进展 [J]. 中华内分泌外科杂志, 2013, 7(5): 395-397.
- [13] MIMOTO R, TAIRA N, TAKAHASHI H, et al. DYRK2 controls the epithelial-mesenchymal transition in breast cancer by degrading snail[J]. Cancer Letters, 2013, 339(2): 214-225.
- [14] ZHAO N, SUN B, ZHAO X, et al. Coexpression of Bcl-2 with epithelial-mesenchymal transition regulators is a prognostic indicator in hepatocellular carcinoma[J]. Medical Oncology, 2012, 29(4): 2780-2792.
- [15] MARTIN L A, DOWSETT M. BCL-2: a new therapeutic target in estrogen receptor-positive breast cancer[J]. Cancer Cell, 2013, 24(1): 7-9.

(李科 编辑)