文章编号:1000-5404(2014)05-0495-04

论著

三阴性乳腺癌中程序性细胞死亡基因4表达及其与预后的关系

韩晓蓉[1,2],王 颀[2],吴坤河[3],谢四梅[2],连臻强[2],黄宗海[1] (510280 广州,南方医科大学珠江医院普外科[1];511442 广州,广东省妇幼保健院:乳腺科[2],病理科[3])

[摘要] **目的** 探讨三阴性乳腺癌中程序性细胞死亡基因4(programmed cell death gene 4,PDCD4)的表达及其与患者预后的关系。**方法** 收集广东省妇幼保健院乳腺科2007年1月至2012年12月间收治的随访资料完整的三阴性乳腺癌患者共176例,均为女性,中位年龄44岁。采用免疫组化方法检测PDCD4的表达;采用Kaplan-meier法对患者的无病生存及总生存情况进行分析,并运用Cox回归法探讨影响三阴性乳腺癌生存预后的因素。**结果** 176例患者中,PDCD4表达阳性者79例(44.8%),显著低于癌旁组织阳性表达率(90.0%,$P=0.005$)。PDCD4表达缺失与年龄无关($P>0.05$),而与肿瘤直径、淋巴结转移个数及组织学分级相关($P<0.05$),肿瘤越大($r=-0.270$,$P<0.001$)、淋巴结转移越多($r=-0.240$,$P=0.001$)、组织学分级越高($r=-0.206$,$P=0.006$),PDCD4阳性表达率越低。中位随访时间42个月,单因素分析显示PDCD4表达阳性者其无病生存率及总生存率均优于表达阴性者($P<0.05$)。多因素分析显示PDCD4表达、肿瘤直径及分期是影响三阴性乳腺癌预后的独立因素($P<0.05$)。**结论** 三阴性乳腺癌中PDCD4表达缺失与预后不良相关,PDCD4可作为评估三阴性乳腺癌预后的指标。

[关键词] 三阴性乳腺癌;程序性细胞死亡基因4;预后
[中图法分类号] R195.4; R394.3; R737.9 [文献标志码] A

Expression of programmed cell death gene 4 in triple-negative breast cancer and its relationship with prognosis

Han Xiaorong[1,2], Wang Qi[2], Wu Kunhe[3], Xie Simei[2], Lian Zhenqiang[2], Huang Zonghai[1] ([1]Department of General Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510280; [2]Department of Breast Diseases, [3]Department of Pathology, Guangdong Maternal and Children Hospital, Guangzhou, Guangdong Province, 511442, China)

[**Abstract**] **Objective** Programmed cell death gene 4 (PDCD4) is a tumor suppressor gene, and plays an important role in regulation of cell apoptosis. The study was to investigate the expression of PDCD4 and its correlation with clinicopathological characteristics and prognosis of triple negative breast cancer. **Methods** A total of 176 patients with pathologically diagnosed triple-negative breast cancer and complete follow-up data were subjected from Department of Breast Surgery in Guangdong Maternal and Children Hospital during Jan, 2007 to Dec, 2012, and all patients were women, with a median age of 44. PDCD4 expression in the 176 specimens and 10 specimens of para-tumor breast tissues was detected by S-P immunohistochemical assay. SPSS 13.0 statistical software was used to conduct *Chi*-square test, and Kaplan-meier and COX proportional hazards model was used to analyze the prognosis. **Results** The positive rate of PDCD4 in the tumor cells of triple negative breast cancer was significantly lower than that in the para-tumor breast tissues (44.8% *vs* 90.0%, $P=0.005$). The loss of PDCD4 expression was closely correlated to tumor size ($r=-0.270$, $P<0.001$), lymph node metastasis ($r=-0.240$, $P=0.001$) and histological grade ($r=-0.206$, $P=0.006$). The median follow-up period was 42 months. The disease free survival and overall survival rate was significantly higher in PDCD4-positive group than in PDCD4-negative group ($P<0.05$). Cox model revealed that PDCD4 expression, tumor size, and stage were independent prognostic factors of triple-negative breast cancer ($P<0.05$). **Conclusion** PDCD4 expression is down-regulated in triple-negative breast cancer, and the loss of PDCD4 expression is correlated to poor prognosis. PDCD4 is an independent prognostic factor of

[通信作者] 黄宗海,E-mail:drhuangzh@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131219.2213.017.html(2013-12-19)

triple-negative breast cancer.

[**Key words**] triple-negative breast cancer; programmed cell death gene 4; prognosis

Corresponding author: Huang Zonghai, E-mail: drhuangzh@163.com

近年来,基因聚类分析将乳腺癌分为 Luminal A、Luminal B、人类表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)阳性及三阴性乳腺癌[1]。其中,三阴性乳腺癌是乳腺癌研究的热点,由于其雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)及 HER2 表达均为阴性,目前仍缺乏治疗靶点。为了寻找这一类型乳腺癌的治疗靶点,许多学者都在研究与乳腺癌侵袭、转移相关的信号通路,其中对 mTOR 信号通路的研究发现,与非三阴性乳腺癌相比,三阴性乳腺癌中磷酸化的 mTOR 表达率更高,提示 mTOR 可能在三阴性乳腺癌的进展中起着重要作用[2]。程序性细胞死亡基因4(programmed cell death gene 4, PDCD4)是一种抑癌基因,是 mTOR 信号通路下游的重要靶点,它对细胞凋亡起着调控作用[3]。PDCD4 在三阴性乳腺癌的表达情况及其与预后的关系目前尚不清楚。本研究采用免疫组化方法检测三阴性乳腺癌中 PDCD4 的表达,并探讨其与三阴性乳腺癌预后的关系。

1 资料与方法

1.1 患者资料

2007年1月至2012年12月间广东省妇幼保健院乳腺科共收治乳腺癌患者1 148例,其中随访资料完整的三阴性乳腺癌176例,占全部乳腺癌患者的15.3%,患者均为女性,年龄25~71岁,中位年龄44岁,均经术后病理及免疫组化证实为三阴性乳腺癌。患者术前均未经化疗及放疗。

1.2 PDCD4 的免疫组化检测

抗 PDCD4 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,工作浓度为1∶100。免疫组化检测采用 S-P 法,试剂盒购自福建迈新公司。程序严格按照试剂盒使用程序进行。主要步骤:4 μm 厚的石蜡切片,62 ℃烘烤过夜,二甲苯脱蜡、梯度酒精脱水并水化后,0.01 mol/L 枸橼酸钠(pH=6.0)微波抗原修复,双蒸水冲洗3遍,30 mL/L 过氧化氢室温孵育10 min 以消除内源性过氧化物酶活性,PBS 冲洗3遍,50 g/L 牛血清白蛋白(BSA)室温封闭20 min,滴加一抗(兔抗 PDCD4 抗体,1∶100)4 ℃过夜。室温平衡30 min,5 min PBS 冲洗3遍,滴加生物素二抗后室温孵育15 min,5 min PBS 冲洗3遍,滴加 SABC 液室温孵育15 min,5 min PBS 冲洗3遍,显色剂显色,自来水冲洗,苏木精复染,封片。免疫组化结果判定:细胞质或胞核中出现棕黄色颗粒为阳性染色细胞。选取10例癌旁正常乳腺组织作为阳性对照。400倍显微镜下每张切片计数10个视野,取阳性细胞数百分比的平均值。细胞不显色或阳性细胞数≤30%为阴性(-);阳性细胞数>30%为阳性(+)。

1.3 随访

随访方式为电话随访及门诊随访。无病生存时间定义为自手术日期起至出现复发或转移的时间,总生存时间定义为自手术日期起至出现与乳腺癌相关的死亡的时间。全部患者随访6~68个月,中位随访时间42个月。

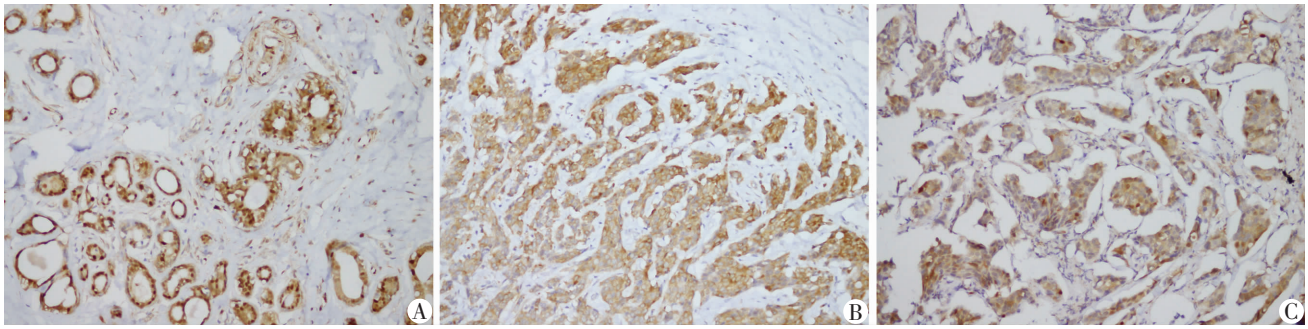
1.4 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件。率的比较采用 χ^2 检验,等级资料采用 Spearman 等级相关检验。采用 Kaplan-Meier 法对患者的无病生存及总生存情况进行分析,采用 Log-rank 检验比较生存曲线间的差异,并运用 Cox 比例风险模型分析影响三阴性乳腺癌生存预后的因素。

2 结果

2.1 PDCD4 表达情况

正常乳腺上皮细胞中,PDCD4 表达于细胞核中(图1A)。而在肿瘤组织中,PDCD4 主要表达在肿瘤细胞的细胞质和/或胞核中(图1B、C)。176例患者中,PDCD4 表达阳性者79例,阳性表达率为44.8%,而癌旁正常乳腺组织中,PDCD4 阳性表达率为90.0%(9/10),二者之间有显著差异($\chi^2=7.726$, $P=0.005$),三阴性乳腺癌组织中 PDCD4 表达率明显低于癌旁组织。PDCD4 表达阳性的三阴性乳腺癌中,定位于细胞质者48例(60.8%,48/79),定位于细胞核者22例(27.8%,22/79),细胞核、质均呈阳性染色者9例(11.4%,9/79)。PDCD4 表达缺失与患者年龄无显著相关($P>0.05$),而与肿瘤直径、淋巴结转移数目及组织学分级相关($P<0.05$),肿瘤越大($r=-0.270$, $P<0.001$),淋巴结转移数目越多($r=-0.240$, $P=0.001$),组织学分级越高($r=-0.206$, $P=0.006$),PDCD4 表达缺失越明显(表1)。



A:正常组织细胞核;B:肿瘤组织细胞质;C:肿瘤组织细胞质与细胞核

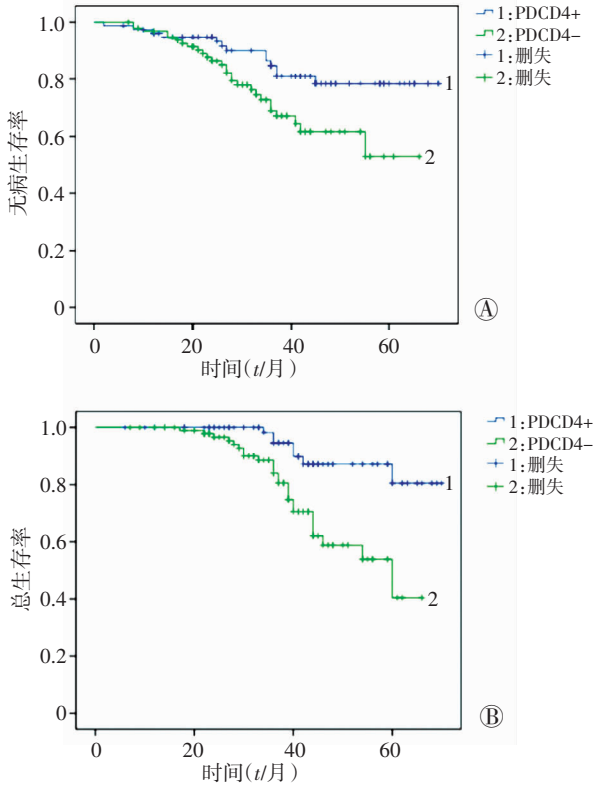
图1 PDCD4 在正常乳腺及乳腺癌组织中的表达 (S-P ×200)

表 1　三阴性乳腺癌中 PDCD4 表达与临床病理因素的关系[例(%)]

临床特征	n	PDCD4$^+$(n=79)	PDCD4$^-$(n=97)
年龄			
≤44 岁	114	51(44.7)	63(55.3)
>44 岁	62	28(45.2)	34(54.8)
肿瘤直径			
≤2 cm	53	36(67.9)	17(32.1)
>2 ~ <5 cm	75	27(36.0)	48(64.0)
≥5 cm	48	16(33.3)	32(66.7)
淋巴结转移			
0 个	97	54(55.7)	43(44.3)
≤3 个	43	15(34.9)	28(65.1)
>3 ~ <10 个	24	6(25.0)	18(75.0)
≥10 个	12	4(33.3)	8(66.7)
组织学分级			
Ⅰ级	38	24(63.2)	14(36.8)
Ⅱ级	47	22(46.8)	25(53.2)
Ⅲ级	91	33(36.3)	58(63.7)

2.2　PDCD4 表达与三阴性乳腺癌患者预后的关系

本组患者中位随访时间 42 个月。运用 Kaplan-Meier 法分析 PDCD4 阳性和 PDCD4 阴性两组的无病生存及总体生存曲线。结果显示 PDCD4 阳性组的无病生存及总体生存曲线均明显优于 PDCD4 阴性组，两者差异有显著性(P<0.05,图 2)。



A:两组患者无病生存曲线;B:两组患者的总生存曲线

图 2　PDCD4 表达与三阴性乳腺癌患者预后的关系

2.3　多因素 Cox 比例风险模型的预后分析将可能影响三阴性乳腺癌预后的因素

年龄、肿瘤直径、N 分期、组织学分级、PDCD4 表达一起纳入 Cox 比例风险模型，采用逐步前进(Forward Stepwise) 方法进行多因素预后分析。结果显示，肿瘤直径、分期及 PDCD4 表达均是影响预后的独立因素(P<0.05,表 2)。

表 2　三阴性乳腺癌预后相关因素的多因素分析

项目	*B*	*SE*	*Wald*	*df*	*Sig.*	*Exp*(B)
年龄	0.139	0.367	0.144	1	0.704	1.149
肿瘤直径	0.928	0.299	9.667	1	0.002	2.530
淋巴结	−0.106	0.206	0.267	1	0.605	0.899
分期	0.936	0.367	6.498	1	0.011	2.550
分级	0.064	0.276	0.054	1	0.816	1.067
PDCD4	−1.684	0.470	12.835	1	0.000	0.186

3　讨论

3.1　三阴性乳腺癌中 PDCD4 的表达

三阴性乳腺癌是一类侵袭性非常高的乳腺癌分子亚型，占全部乳腺癌的 10%~20%，多数在 3 年内发生复发，极易发生远处转移。然而，临床实践中，并非所有三阴性乳腺癌预后都差，为了更好的评估三阴性乳腺癌的预后及其对药物的敏感性，Lehmann 等[4]利用基因聚类分析法将三阴性乳腺癌分为 6 个亚型，即 BL1、BL2、IM、M、MSL 及 LAR 等，其中 BL 型即所谓的基底型预后最差。但目前缺乏适当的蛋白标记物来作为评估三阴性乳腺癌预后的指标。

程序性细胞死亡基因 4(PDCD4)是一种抑癌基因，人 PDCD4 基因位于染色体 10q24 上。作为抑癌基因，PDCD4 在多种正常组织中表达，如 IL-12 介导的 NK 细胞和 T 细胞、神经组织、肺脏、乳腺上皮细胞等。近年来的研究发现 PDCD4 蛋白在多种肿瘤细胞中表达下降或缺失，如肺癌、胃癌、肝癌、乳腺癌、卵巢癌及胶质瘤等[5-9]，并且与肿瘤的恶性程度及预后相关。Wen 等[10]比较了正常乳腺组织、导管原位癌(DCIS)及浸润性导管癌中 PDCD4 的表达情况，发现与正常乳腺组织相比，DCIS 中 PDCD4 表达水平轻度下调，而浸润性导管癌中 PDCD4 明显下调，说明 PDCD4 可能在乳腺癌的进展过程中具有重要作用。本研究发现，三阴性乳腺癌组织中 PDCD4 阳性表达率为 44.8%，较癌旁正常组织的阳性表达率明显下降，提示三阴性乳腺癌组织中 PDCD4 的表达缺失可能与其恶性程度有关。关于 PDCD4 蛋白的细胞定位，在正常乳腺上皮细胞中 PDCD4 蛋白定位于细胞核，而本研究则发现，三阴性乳腺癌中 PDCD4 的表达大部分定位于细胞质。有研究发现 AKT 是 PI3K 信号传导通路中重要的抑制因子，能够调节 PDCD4 蛋白的细胞亚定位[11]。三阴性乳腺癌组织中 PDCD4 蛋白表达异位是否与此相关及其意义如何均有待进一步研究。

3.2 三阴性乳腺癌中 PDCD4 表达与临床病理因素的关系

乳腺癌中 PDCD4 表达与临床病理因素的关系目前尚不清楚。本研究中,PDCD4 的表达缺失与肿瘤直径、淋巴结转移数目及组织学分级呈正相关,即肿瘤越大,淋巴结转移越多,组织学分级越高,PDCD4 表达缺失越显著。这提示 PDCD4 表达的缺失对三阴性乳腺癌的进程有较大影响。Santhanam 等[12]研究表明乳腺癌进展过程中 PDCD4 表达的缺失可能通过赖氨酰氧化酶活性的增加而增加癌细胞浸润能力,因此 PDCD4 表达的缺失可能与三阴性乳腺癌的高侵袭性有关。

3.3 三阴性乳腺癌中 PDCD4 表达与预后的关系

研究表明 PDCD4 表达下调或缺失的肿瘤通常具有组织学分级较高,分期越晚,预后愈差的特点。本研究中,三阴性乳腺癌中 PDCD4 表达阴性者具有组织学分级高,肿瘤大,淋巴结转移多的特点。而生存分析显示,PDCD4 阳性表达的三阴性乳腺癌其无病生存及总生存均优于表达阴性者,多因素分析则显示,PDCD4 表达与肿瘤直径及分期为三阴性乳腺癌的独立预后因素。PDCD4 是细胞凋亡的调控基因,其表达下调可阻止肿瘤细胞凋亡的发生,从而可促进肿瘤细胞的生长和浸润,这可能是 PDCD4 表达阴性的三阴乳腺癌预后差的原因之一。有研究表明,PDCD4 是同样为抑癌基因的 P53 mRNA 翻译的调节因子,PDCD4 表达的下调可直接抑制 P53 mRNA 的翻译,导致 P53 表达的下调[13]。这可能是 PDCD4 表达阴性的三阴性乳腺癌预后差的另一个原因。

研究还发现癌细胞中的 PDCD4 蛋白表达水平可影响其对抗肿瘤药物的敏感性。Liwak 等[14]的研究发现,PDCD4 表达的缺失可导致多形性胶质瘤对多柔比星耐药。Bourguignon 等[15]则发现 PDCD4 表达的下调可导致乳腺癌细胞株 MCF-7 对多柔比星及紫杉醇耐药。也就是说,PDCD4 表达的下调或缺失可使肿瘤细胞对化疗不敏感,而三阴性乳腺癌目前除化疗之外尚无其他治疗手段。三阴性乳腺癌中 PDCD4 表达阴性者预后差可能与 PDCD4 表达缺失降低了其对化疗药物的敏感性有关,其机制有待进一步研究。

综上所述,三阴性乳腺癌中 PDCD4 表达缺失较多见,可能导致其对化疗不敏感,且 PDCD4 表达缺失减少了肿瘤细胞凋亡,并抑制了 P53 蛋白表达。这可能是 PDCD4 阴性的三阴乳腺癌预后差的原因。

参考文献:

[1] Goldhirsch A, Winer E P, Coates A S, *et al*. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlihgts of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy Of Early Breast Cancer 2013[J]. Ann Oncol, 2013, 24(9): 2206-2223.

[2] Populo H, Lopes J M, Soares P. The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(2): 1886-1918.

[3] Lankat-Buttgereit B, Goke R. The tumour suppressor Pdcd4: recent advances in the elucidation of function and regulation[J]. Biol Cell, 2009, 101(6): 309-317.

[4] Lehmann B D, Bauer J A, Chen X, *et al*. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies[J]. J Clin Invest, 2011, 121(7): 2750-2767.

[5] Reis P, Tomenson M, Cervigne N K, *et al*. Programmed cell death 4 loss increases tumor cell invasion and is regulated by miR-21 in oral squamous cell carcinoma[J]. Mol Cancer, 2010, 9: 238.

[6] Motoyama K, Inoue H, Mimori K, *et al*. Clinicopathological and prognostic significance of PDCD4 and microRNA-21 in human gastric cancer[J]. Int J Oncol, 2010, 36(5): 1089-1095.

[7] Asangani I A, Rasheed S A, Nikolova D A, *et al*. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer[J]. Oncogene, 2008, 27(15): 2128-2136.

[8] Li X, Xin S, Yang D, *et al*. Down-regulation of PDCD4 expression is an independent predictor of poor prognosis in human renal cell carcinoma patients[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2012, 138(3): 529-535.

[9] Gao F, Wang X, Zhu F, *et al*. PDCD4 gene silencing in gliomas is associated with 5′CpG island methylation and unfavourable prognosis[J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(10): 4257-4267.

[10] Wen Y H, Shi X, Chiriboga L, *et al*. Alterations in the expression of PDCD4 in ductal carcinoma of the breast[J]. Oncol Rep, 2007, 18(6): 1387-1393.

[11] Palamarchuk K, Efanov A, Maximov V, *et al*. Akt phosphorylates and regulates Pdcd4 tumor suppressor protein[J]. Cancer Res, 2005, 65(24): 11282-11286.

[12] Santhanam A N, Baker A R, Hegamyer G, *et al*. Pdcd4 repression of lysyl oxidase inhibits hypoxia-induced breast cancer cell invasion[J]. Oncogene, 2010, 29(27): 3921-3932.

[13] Wedeken L, Singh P, Klempnauer K H. Tumor suppressor protein Pdcd4 inhibits translation of p53 mRNA[J]. J Biol Chem, 2011, 286(50): 42855-42862.

[14] Liwak U, Jordan L E, Von-Holt S D, *et al*. Loss of PDCD4 contributes to enhanced chemoresistance in Glioblasttoma multiforme through de-pression of Bcl-xL translation[J]. Oncotarget, 2013, 4(9): 1365-1372.

[15] Bourguignon L Y, Spevak C C, Wong G, *et al*. Hyaluronan-CD44 interaction with protein kinase C(epsilon) promotes oncogenic signaling by the stem cell marker Nanog and the Production of microRNA-21, leading to down-regulation of the tumor suppressor protein PDCD4, anti-apoptosis, and chemotherapy resistance in breast tumor cells[J]. J Biol Chem, 2009, 284(39): 26533-26546.

(**收稿**:2013-09-19;**修回**:2013-11-19)

(编辑 栾 嘉)