

· 专家论坛 ·

乳腺癌肺转移: 机制研究和临床转化

邵志敏

乳腺癌复发转移是导致乳腺癌患者死亡的最主要原因, 每年有高达 40% 的患者出现复发转移, 这意味着中国每年有近 10 万乳腺癌病例出现新的复发转移。转移性乳腺癌治疗棘手, 预后很差, 平均寿命只有 2 年。乳腺癌转移具有一定规律, 最显著的是器官靶向转移。据报道, 乳腺癌最容易转移的靶向器官是肺、骨和肝脏。这 3 种器官转移占乳腺癌转移的 80% 以上。在器官累及率方面, 肺或骨的终生转移率可达 60% 以上, 肝转移比例略低; 在预后方面, 内脏转移(肺和肝)预后最差, 骨转移相对较好。笔者所在单位近年来对乳腺癌的肺转移特性及其调控机制进行了深入研究, 在此笔者对研究成果作一简单介绍, 以飨读者。

1 建立乳腺癌靶器官亲嗜性转移的研究模型

为揭示乳腺癌肺转移的分子机制, 需要遗传背景一致但肺转移能力不同的细胞株作为研究模型。为培育遗传背景相同但转移表型不同的乳腺癌细胞系, 笔者所在项目组采用裸鼠体内连续筛选法获取目标细胞系。首先, 笔者采用雌激素受体阴性的人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231/435 为亲本细胞, 异体原位接种于裸鼠乳腺; 然后选择出现自发性肺转移的裸鼠肺脏, 取肺转移灶内的癌细胞进行离体培养; 体外培养稳定的细胞克隆再重复接种新的裸鼠, 再次诱发肺转移; 如此循环, 进行 6~8 轮筛选, 可获得稳定的具有自发性肺高转移特性的人乳腺癌细胞株。该细胞株接种裸鼠乳腺数周后, 就能获得自发性肺高转移裸鼠模型。高转移潜能细胞系具有增殖侵袭能力强、细胞周期 S 期细胞比例高、接种后裸鼠迅速发生肺转移等特点。随着筛选周期的延长, 细胞肺转移能力逐渐提升, 6~8 个周期筛选得到的高转移细胞, 接种裸鼠 4 周后肺转移率基本达到 100%, 远远高于亲本细胞。

2 通过乳腺癌肺转移模型, 筛选乳腺癌肺转移相关候选基因和蛋白, 阐明转移相关分子的作用机制

在前期建立的模型基础上, 笔者运用高通量基因表达芯片比较相同遗传

背景的高、低转移潜能乳腺癌细胞株的 mRNA,发现近 60 个基因发生了 2 倍以上的表达变化,其中 AF1Q(All1-fused gene from chromosome 1q)基因的变化尤其明显,在高转移细胞内上调 3 倍以上。AF1Q 基因曾被报道与白血病及甲状腺癌有关,但与乳腺癌关系不明。项目组通过分子克隆方法构建了 AF1Q 真核表达质粒,转染并稳定表达 AF1Q 的 MDA-MB-435/231 细胞的侵袭能力明显增高,接种裸鼠后肺转移也明显增加,接近接种高转移细胞株的裸鼠肺转移水平。移植瘤体内基质金属蛋白酶(matrix metallo proteinases, MMP)-2、MMP-9、转录因子 Ets-1 及 RhoC(Ras homologous C)的 mRNA 和蛋白表达均显著上升。对高转移细胞株调低 AF1Q 后,其转移能力显著下调。为进一步明确 AF1Q 的作用机制,笔者观察了转染 AF1Q 前后的 mRNA 表达变化,发现包括雌激素敏感性指状蛋白(estrogen-responsive ring finger protein, EFP)及 Integrin $\alpha 3$ 在内共 22 个基因变化显著。功能研究提示 AF1Q 通过上调雌激素相关蛋白 EFP, EFP 进一步泛素化 14-3-3 δ 来诱导细胞增殖;AF1Q 通过上调 integrin $\alpha 3$ 、MMP-2 和 Ets-1 来促进转移。项目组提出 AF1Q 可能是防治转移的新候选靶点。

基因芯片的结果反映了 mRNA 水平的表达差异;而蛋白质是最后行使功能的主体,蛋白质水平的差异可能更有意义。研究者仍以上述高、低肺转移细胞株为实验模型,采用双向凝胶电泳和液相色谱/离子阱质谱(LC/ITMS)技术来分析蛋白差异,发现 46 个蛋白质存在 3 倍以上丰度变化。这些候选蛋白涉及细胞生长代谢、迁移、信号转导和免疫调节等多种功能。笔者验证了其中 10 个蛋白质的表达差异,并着重对 Rab27、PDX6 等进行研究。Rab27A 属于 Ras 超家族,涉及囊泡运输过程中的出芽、圈合,也在细胞信号转导中有一定作用。基因表达研究显示,Rab 家族成员中,只有 Rab27A mRNA 在各株人乳腺癌细胞系中的表达水平随细胞侵袭转移能力的增强而升高,提示 Rab27A 与乳腺癌转移表型关系密切。Rab27A 表达上调后,瘤细胞体外增殖加快、S 期细胞比例增多、侵袭能力增强。相似地,接种裸鼠后,不仅异体移植瘤体积增大伴明显的出血坏死,肺转移率亦大大提高(从 20%~60% 提高到 80%~100%),肺转移灶数目也增多(是亲本的 2.5~5 倍)。由于 Rab27A 不是转录因子,无法直接调控基因表达,笔者深入研究了调控机制,发现 Rab27A 通过调节胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)-II 浓度从而影响 IGF-II 下游基因起作用,因此认为 Rab27A 对乳腺癌肺转移具有重要调控作用, Rab27A 有望成为控制乳腺癌肺转移的靶点,应用 IGF 配体单克隆抗体或拮抗

剂阻断 IGF-II-IGF-IR 通路,也具有潜在治疗价值。

3 肿瘤微环境与乳腺癌肺转移发生的关系及其潜在的分子机制

恶性肿瘤的转移演进过程,自始至终受到宿主的影响。如同“种子”的生长需要适合且肥沃的“土壤”,微环境与乳腺癌细胞的关系极大影响着转移发生。“肿瘤-微环境”的研究是乳腺癌转移研究中的热点和难点。肿瘤微环境涉及基质降解、血管或淋巴管形成、黏附分子、趋化因子及其受体等。笔者先后研究了黏附分子 E-cadherin、MMPs、血小板源性生长因子等在乳腺癌侵袭转移中的作用。在微环境中,有几类分子特别引人注目,即趋化因子及其受体。

趋化因子及其受体对肿瘤具有广泛而复杂的影响,目前已知某些趋化因子如 CXCR4 具有促乳腺癌肺转移的作用。趋化因子常常会被趋化因子诱骗受体结合而被清除掉,这种结合不引起下游信号转导。Duffy 抗原趋化因子受体(DARC)、D6、CCX-CKR 是目前公认的趋化因子诱骗受体,它们对趋化因子的调节及对肿瘤转移的影响引起了研究者极大的兴趣。以 DARC 为例,笔者发现表达 DARC 的移植瘤所引起的肺转移时间明显延迟、转移灶数目明显减少。值得注意的是,DARC 主要对体内肿瘤起作用,对体外培育的肿瘤细胞作用不明显,提示 DARC 的作用靶点是微环境中非肿瘤细胞分泌的相关促转移因子。笔者检测了移植瘤中多种趋化因子的浓度,发现 CCL2(一种成血管性趋化因子)浓度在表达 DARC 的移植瘤中显著降低;不仅如此,转染 DARC 的移植瘤的微血管密度显著降低,均提示 DARC 的抗增殖转移作用主要通过清除成血管性趋化因子来实现。在人乳腺癌临床标本中,DARC 高表达与腋窝淋巴结转移、微血管密度及肿瘤远处转移均呈负相关,而与生存期成正相关。与 DRAC 研究相似,针对 D6、CCX-CKR 的研究也得到了大致相似的结果。当然,D6、CCX-CKR 有各自的趋化因子结合谱。

项目组围绕着趋化因子诱骗受体开展系列研究,证实诱骗受体主要通过降低成血管性趋化因子浓度来抑制瘤内新血管生成和转移发生,高表达诱骗受体的乳腺癌患者的转移风险较低。此前,多项研究显示多种趋化因子均与乳腺癌转移有关,却找不到好的策略对多种趋化因子进行联合清除。通过本研究,笔者认为利用趋化因子诱骗受体可联合清除一系列促转移性趋化因子,诱骗受体的小分子模拟物有望成为抗乳腺癌转移新策略。同时,根据 3 个诱骗分子的表达情况来联合预测乳腺癌转移复发,也具有临床应用价值。

4 乳腺癌转移的多分子预测

“转移预测”一直是乳腺癌研究的重点。2000 年以来,随着基因芯片技术的发展,肿瘤预后因子不再拘泥于几个简单的病理指标,一批临床意义显著的分子指标被挖掘出来。当前国际上 Oncotype DX 等预测乳腺癌复发转移风险和治疗反应的基因产品方兴未艾,但针对中国人群的研究还相对处于空白。研究组用基因芯片检测了 93 例乳腺癌冰冻组织的 mRNA 样品,从 248 个候选基因中筛选出 24 个标志性基因组成表达谱,完成的芯片再在独立人群中加以验证。该成型芯片能准确地将患者分为好预后组和差预后组(独立验证组的灵敏度 88.9%,特异度 75.0%),受试者工作特征曲线(ROC)下面积(AUC)值为 0.820。项目组还把该芯片同国外商品化的基因预后产品作比较,ROC 曲线分析显示,本 24-Gene 产品比国际上 OncotypeDX(21-Gene)和 MammaPrint(70-Gene)对中国人群有更好的预测价值。这一芯片的开发和建立对临床决策制定具有重要意义。若预测提示乳腺癌患者低危转移复发,则可免于化疗;若提示高危转移复发,则需强化治疗和加强随访监测。有效的基因预测避免了临床上“一刀切”进行化疗的情况,达到个体化治疗的目的,但目前仍有待进一步前瞻性验证和推广。

【关键词】 乳腺肿瘤;转移

【中图法分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

(收稿日期:2011-04-29)

(本文编辑:罗承丽)

邵志敏. 乳腺癌肺转移: 机制研究和临床转化 [J/CD]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2011, 5(4): 392-395.