

· 综述 ·

上皮-间质转化与乳腺癌转移

李建一 张文海

癌细胞的远处转移是肿瘤发展的最终形式,也是癌症患者死亡的最主要原因^[1]。尽管早期乳腺癌患者通过规范化治疗,5 年生存率达到了目前的 98%;但转移性乳腺癌患者的 5 年生存率较 40 年前相比,只是从 20% 提高到目前的 26%,而因乳腺癌死亡的患者几乎都死于转移^[2]。因此,对乳腺癌远处转移机制的研究是乳腺肿瘤研究的核心问题,对是否能有效控制乳腺癌、提高患者的存活率至关重要。近年来,多数学者将上皮-间叶转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)理论从发育生物学领域引入肿瘤学研究,并得到了初步证实和广泛关注^[3]。有关上皮-间叶转化理论指导下的乳腺癌转移机制的研究已成为目前的热点。为了进一步对 EMT 的调控机制进行深入研究,有必要从 EMT 角度对目前有关乳腺癌转移的相关研究作一系统回顾。

1 EMT 与肿瘤转移的级联过程

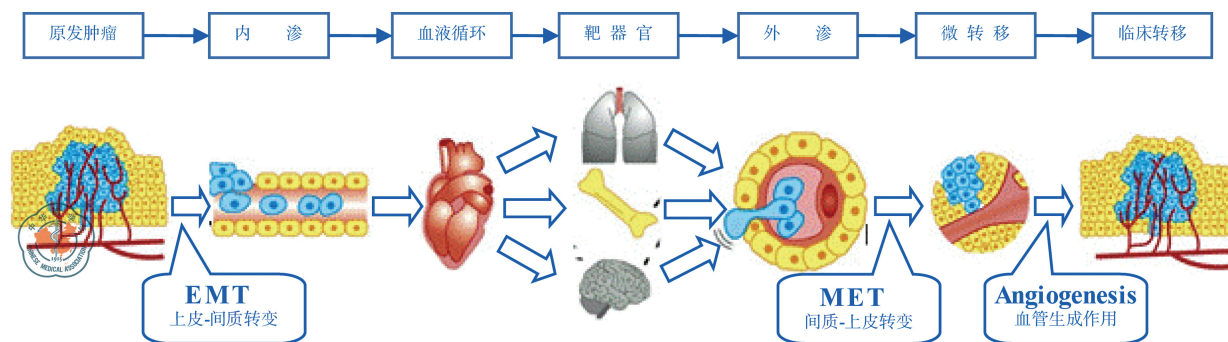
癌细胞转移是一个多步骤、多阶段,且受体内微环境影响极大的复杂过程。目前,有关肿瘤转移的主要假说认为,肿瘤的转移大体分为 7 个阶段,6 个步骤(图 1)^[4]。其中,肿瘤侵袭转移的起始阶段发生 EMT,主要表现为癌细胞获得间质细胞的特性穿过基底膜,进而发生内渗(intravasation);肿瘤转移的终末阶段发生间质-上皮转化(mesenchymal-epithelial transition, MET),主要表现为间质特性的肿瘤细胞重新获得上皮细胞特性,外渗后发生微转移(micro-metastasis)^[5]。临床上脉管癌栓和微转移的大量存在提示肿瘤转移是“效率极其低下的过程”,即发生了 EMT 的肿瘤细胞中只有极少部分通过内渗进入血液循环,后者的极少部分锚定(homing)靶器官后发生 MET 形成微转移,而微转移的极少部分通过“血管生成作用(angiogenesis)”产生了危害生命的临床转移^[6]。由此可见,EMT 作为肿瘤转移起始阶段的关键步骤,不但决定了之后步骤是否发生,而且癌细胞发生 EMT 的数量从概率上决定着最终发生临床转移的多少。

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2012.02.011

基金项目:沈阳市科学技术计划项目(1091142-9-02)

作者单位:110004 沈阳,中国医科大学附属盛京医院乳腺外科

通信作者:张文海, E-mail: zhangwh@sj-hospital.org

图 1 肿瘤转移模式图^[4]

2 EMT 与癌细胞的解离活化

目前的研究表明,EMT 主要包括癌细胞解离、去极化、活动性增加、黏附性增强和细胞外基质的降解,涉及的功能执行蛋白家族主要包括:(1)黏附连接蛋白家族(adherence junction protein, AJP);(2)紧密连接蛋白家族(tight junction protein, TJP);(3)细胞外基质金属蛋白酶(matrix metalloprotease, MMP)家族等^[7]。细胞间黏附连接和紧密连接的破坏是 EMT 的重要环节。目前以 E-钙粘素(E-cadherins)和 N-钙粘素(N-cadherins)反向表达为代表的,包括 α -连环蛋白、 β -连环蛋白及 γ -连环蛋白等一系列参与细胞黏附连接的蛋白执行分子的表达变化被认为是评价是否发生 EMT 的主要指标^[8]。此外,构成脊椎动物上皮细胞间特有的封闭连接(occludin junction)称为紧密连接(tight junction, TJ),其构成分子包括 claudins、JAMs(junctional adhesion molecules)、occludin、ZO(zona occludens)等^[9]。其中研究较多的是 claudins,由大约 20 多个成员组成的功能复杂的蛋白家族,是构成 TJ 最主要的功能分子,可以维持 TJ 特有的栅栏及屏障功能,参与维持上皮细胞的极性^[10]。claudins 的大多数成员在肿瘤组织中低表达,但是也有文献报道 claudin-3 和 claudin-4 的表达与肿瘤的恶性程度成正相关^[11]。该研究以脉管是否存在癌栓为分组标准,检测 16 例导管浸润癌患者的肿瘤标本,发现在年龄、ER、PR、HER-2 及 TNM 分期均达到组间平衡的基础上,8 例脉管癌栓阳性患者的平均淋巴结转移数高于阴性组($P < 0.05$),进一步用 Realtime RT-PCR 方法检测两组患者肿瘤组织中的 claudin-3、claudin-4、claudin-17 和 JAMs-C(junction adhesion molecule-C),发现脉管癌栓阳性组 claudin-4 的 mRNA 相对含量低于阴性组(1.30 ± 0.78 比 2.33 ± 2.08 , $P = 0.019$)。此结果与 Szasz 等^[12]用 claudin-4 预测乳腺癌局部淋巴结转移的研究结果基本一致。claudin-4 的相对含量越少说明细胞间解离的程度越高,发生 EMT 的概率越高,可以在一定程度上影响淋巴结发生转移的概率^[12]。

3 EMT 与细胞外基质的降解

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)是由胶原蛋白、纤连蛋白、弹性蛋

白、层黏连蛋白、玻璃黏连蛋白、蛋白多糖、透明质烷及硫酸类肝素蛋白多糖构成的细胞外环境。在癌细胞 EMT 过程中会遇到上述一系列的组织屏障^[13]。活化的癌细胞只有降解了细胞外基质,特别是破坏了基底膜才能顺利进入血管系统进而发生内渗(intravasation)。MMP 是降解 ECM 最主要的蛋白酶家族,包括近 30 个成员,几乎可以降解 ECM 的所有成分。按其底物特异性主要分为 6 类:(1)胶原酶,包括 MMP-1、MMP-8、MMP-13 及 MMP-18;(2)明胶酶 MMP-2 和 MMP-9;(3)基质溶解素 MMP-3、MMP-10、MMP-11 及 MMP-19;(4)基质溶解因子 MMP-7 和 MMP-26;(5)膜型基质金属蛋白酶 MT-MMPs,包括 MMP-14、MMP-15、MMP-16、MMP-17、MMP-24 及 MMP-25;(6)其他,如 MMP-12、MMP-20、MMP-23 及 MMP-28^[14]。其中,有关肿瘤侵袭转移研究较多的是同为明胶酶的 MMP-2 和 MMP-9,多数实验证明其高表达与肿瘤侵袭转移成明显正相关。最近,研究提示 MMP-2、MMP-9 增高与区域淋巴结转移有关^[15]。近来,研究提示 MMP-13 可以独立地作为乳腺癌预后不良的预测因子^[16]。该研究收集了 TNM 分期相同的 30 例乳腺癌(导管浸润癌)组织,以是否存在脉管癌栓作为分组条件,发现脉管癌栓阳性患者的淋巴结转移数目较阴性者明显增多(11.8 ± 10.62 比 3.00 ± 4.69 , $P < 0.05$),对年龄、是否绝经、肿瘤长径、ER、PR、HER-2、P53、Ki67 的检测未发现统计学差异,而用 Realtime RT-PCR 法检测两组肿瘤组织中 MMP-2、MMP-9、MMP-13 和 MMP-14,却发现脉管癌栓阳性组 MMP-2 及 MMP-13 的 mRNA 表达显著低于阴性组,提示 MMP-2 及 MMP-13 参与 ECM 降解的程度可能决定乳腺癌淋巴结转移发生的概率^[17]。

4 EMT 的调控

其实除了上述主要功能执行分子家族以外,参与 EMT 的还有肌动蛋白(actin),肌球蛋白(myosin),组织金属蛋白酶抑制物(tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMP),尿激酶纤溶酶原激活剂(urokinase plasminogen activator, uPA)等^[18]。EMT 过程涉及如此庞大的广泛分布于细胞质、细胞膜、细胞外的蛋白执行分子。针对它们是如何启动、如何相互配合且步调一致地完成 EMT 进而发生内渗等重要问题,以往的研究已在转移促进基因、转移抑制基因、转录因子等方面取得了一定进展^[19],但由于从 DNA 到执行功能的蛋白质受众多复杂的因素干扰和调控,至今对 EMT 的启动与调控仍未解释清楚。最近,对小分子 RNA(microRNA, miRNA)的再认识为研究 EMT 的启动与调控机制提供了一个崭新的途径。

miRNA 是一类长度为 21 ~ 23 个核苷酸的非编码调控单链 RNA 分子,它参与 RNA 介导的基因沉默。miRNA 通过与靶基因 mRNA 的 3' UTR 互补序列结合,从而导致 mRNA 降解或者抑制它们的翻译。不同 miRNA 与靶基因 mRNA 结合位点序列的互补程度有所不同。miRNA 识别 3' UTR 结合位点的

机制现在还没有完全研究清楚,但是研究发现,miRNA 第 2~8 个核苷酸对其调控靶基因的作用非常重要,这 7 个核苷酸的序列通常与靶基因 mRNA 结合位点完全互补,因此被称为种子序列(seed sequence)。与种子序列相同或相似的 miRNA 通常有一些相同的靶基因,因此会被归为一个 miRNA 家族^[20]。目前已初步证实与肿瘤转移相关的 miRNA 有 10 种(表 1)。

表 1 肿瘤转移相关 miRNA 与调控的靶基因

miRNA 编号	促进转移	抑制转移	靶基因	参考文献
miR-335		✓	P53、SOX4、PTPRN2、MERTK、TNC	[21]
miR-206		✓	ESR、Notch、ER	[22]
miR-146a/b		✓	NFkB、IRAK1、TRAF6、EGF、ROCK1	[23]
miR-31		✓	ITGA5、RDX、RhoA	[24]
miR-10b	✓		TWIST1、RHOC、HOXD10	[25]
miR-373	✓		CD44	[26]
miR-520c	✓		CD44	[26]
miR-21	✓		PTEN、RHOB、TPM1、PDCD4、MMP	[27]
miR-143	✓		NFkB	[28]
miR-182	✓		MITF、FOXO3	[29]

5 关键 microRNA 与 EMT 的调控

早在 1998 年 Heimann 等^[30]对 1598 名原发性乳腺癌患者进行了长达 6 年的随访,发现随着瘤体长径的增加,患者的累计转移率也逐步增加,初步证实了乳腺癌转移是肿瘤局部进展的必然结果(图 2)。目前,以 EMT 为核心的肿瘤转移理论认为,肿瘤越大说明生长期越长,发生 EMT 的肿瘤细胞越多,发生转移的概率也就越大。

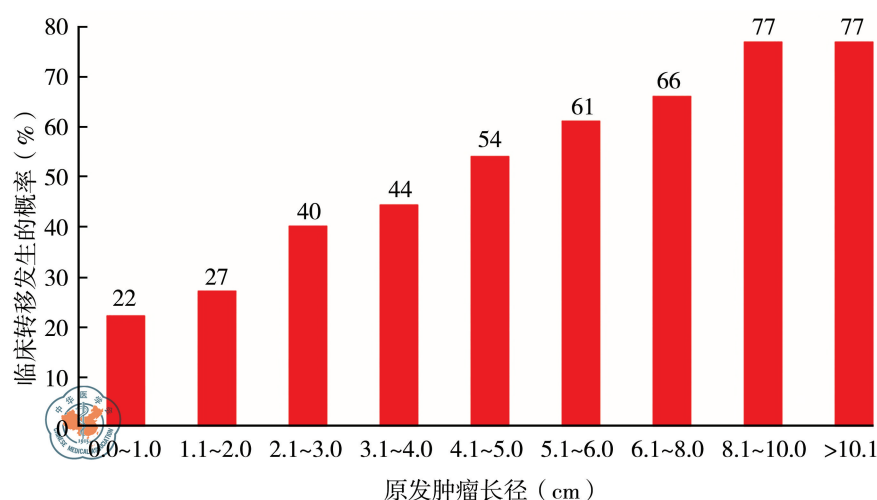


图 2 乳腺癌瘤体长径与转移率的关系^[30]

然而,临床上还是可以经常发现那些瘤体较小的乳腺癌发生了淋巴结转

移,而瘤体较大的乳腺癌未发生淋巴结转移,前者的预后往往较差且治疗上十分棘手,而后者的预后良好。既然理论上两者发生 EMT 过程所需要的蛋白执行分子是相同的,那么是什么因素启动了 EMT,使较小的乳腺癌早期发生转移呢? 既往对肿瘤转移促进基因、肿瘤转移抑制基因及转录因子方面的研究并没有解释清楚乳腺癌早期转移的分子机制。最近的研究提示,miR-21 可以通过缺氧诱导分子的表达调控体外乳腺癌细胞 EMT^[31],与 Lou 等^[27]在卵巢癌方面的实验结果基本一致,提示 miR-21 可能启动或调控肿瘤的早期转移。但是,同一 miRNA 调控的树状级联结构和不同 miRNA 的协同网络结构使 miRNA 的调控功能异常复杂、强大。研究发现 miR-21 可能调控的下游分子包括磷酸酶同源张力蛋白(PTEN)、ras 基因同源家族成员-B (RHOB)、组织金属蛋白酶抑制剂(TPM-1)、程序性细胞死亡蛋白-4(PDCD-4)和 MMP 等,而实际的情况可能远比此还复杂^[27,32]。

6 结语

目前,以 EMT 为核心的肿瘤转移级联理论已成为研究乳腺癌等实体性上皮来源恶性肿瘤转移机制的主要理论指导。目前的研究热点集中在 EMT 的调控机制,而 microRNA 的发现及其对 mRNA 翻译调控的新进展将为 EMT 调控机制的研究提供崭新的维度。找到启动并调控乳腺癌转移的关键 miRNA,将有助于寻找预测乳腺癌早期转移的生物标志物,并有助于发现干预乳腺癌转移的治疗靶点。

【关键词】 上皮-间叶转化;乳腺肿瘤;转移

【中图分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

参考文献

- [1] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010 [J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5): 277-300.
- [2] La Vecchia C, Bosetti C, Lucchini F, et al. Cancer mortality in Europe, 2000-2004, and an overview of trends since 1975 [J]. Ann Oncol, 2010, 21(6):1323-1360.
- [3] Vincent-Salomon A, Thiery JP. Host microenvironment in breast cancer development: epithelial-mesenchymal transition in breast cancer development [J]. Breast Cancer Res, 2003, 5(2): 101-106.
- [4] Aokage K, Ishii G, Ohtaki Y, et al. Dynamic molecular changes associated with epithelial-mesenchymal transition and subsequent mesenchymal-epithelial transition in the early phase of metastatic tumor formation [J]. Int J Cancer, 2011, 128(7): 1585-1595.
- [5] Geiger TR, Peeper DS. Metastasis mechanisms [J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1796(2): 293-308.
- [6] Weinberg RA. The Biology of Cancer [M]. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, 2007:559.
- [7] Zheng G, Lyons JG, Tan TK, et al. Disruption of E-cadherin by matrix metalloproteinase directly mediates epithelial-mesenchymal transition downstream of transforming growth factor-beta1 in renal tubular epithelial cells [J]. Am J Pathol, 2009, 175(2): 580-591.
- [8] Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T. E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer [J]. Cancer Metastasis Rev, 2009, 28(1/2): 151-166.
- [9] Ooshio T, Kobayashi R, Ikeda W, et al. Involvement of the interaction of afadin with ZO-1 in the formation of tight junctions in Madin-Darby canine kidney cells [J]. J Biol Chem, 2010, 285(7): 5003-5012.

- [10] Ohtani S, Terashima M, Satoh J, et al. Expression of tight-junction-associated proteins in human gastric cancer: downregulation of claudin-4 correlates with tumor aggressiveness and survival [J]. *Gastric Cancer*, 2009, 12(1): 43-51.
- [11] Jung H, Jun KH, Jung JH, et al. The expression of claudin-1, claudin-2, claudin-3, and claudin-4 in gastric cancer tissue [J]. *J Surg Res*, 2011, 167(2): 185-191.
- [12] Szasz AM, Tokes AM, Micsinai M, et al. Prognostic significance of claudin expression changes in breast cancer with regional lymph node metastasis [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2011, 28(1): 55-63.
- [13] Radisky ES, Radisky DC. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer [J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2010, 15(2): 201-212.
- [14] Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment [J]. *Cell*, 2010, 141(1): 52-67.
- [15] Daniele A, Zito AF, Giannelli G, et al. Expression of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in sentinel lymph node and serum of patients with metastatic and non-metastatic breast cancer [J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(9): 3521-3527.
- [16] Chang HJ, Yang MJ, Yang YH, et al. MMP13 is potentially a new tumor marker for breast cancer diagnosis [J]. *Oncol Rep*, 2009, 22(5): 1119-1127.
- [17] 邓晓莉, 李建一, 张文海. MMP-2 和 MMP-13 与乳腺癌腋窝淋巴结转移的相关性 [J]. *中华内分泌外科杂志*, 2011, 5(6): 293-297.
- [18] Gos M, Miloszewska J, Przybyszewska M. Epithelial-mesenchymal transition in cancer progression [J]. *Postepy Biochem*, 2009, 55(2): 121-128.
- [19] Moreno-Bueno G, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer [J]. *Oncogene*, 2008, 27(55): 6958-6969.
- [20] Klinghoffer RA, Magnus J, Schelter J, et al. Reduced seed region-based off-target activity with lentivirus-mediated RNAi [J]. *RNA*, 2010, 16(5): 879-884.
- [21] Scarola M, Schoeffner S, Schneider C, et al. miR-335 directly targets Rb1 (pRb/p105) in a proximal connection to p53-dependent stress response [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(17): 6925-6933.
- [22] Wang X, Ling C, Bai Y, et al. MicroRNA-206 is associated with invasion and metastasis of lung cancer [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2011, 294(1): 88-92.
- [23] Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, et al. Expression of microRNA-146 suppresses NF-kappaB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells [J]. *Oncogene*, 2008, 27(42): 5643-5647.
- [24] Valastyan S, Chang A, Benaich N, et al. Concurrent suppression of integrin alpha5, radixin, and RhoA phenocopies the effects of miR-31 on metastasis [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(12): 5147-5154.
- [25] Ma L. Role of miR-10b in breast cancer metastasis [J]. *Breast Cancer Res*, 2010, 12(5): 210.
- [26] Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, et al. The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis [J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(2): 202-210.
- [27] Lou Y, Yang X, Wang F, et al. MicroRNA-21 promotes the cell proliferation, invasion and migration abilities in ovarian epithelial carcinomas through inhibiting the expression of PTEN protein [J]. *Int J Mol Med*, 2010, 26(6): 819-827.
- [28] Zhang X, Liu S, Hu T, et al. Up-regulated microRNA-143 transcribed by nuclear factor kappa B enhances hepatocarcinoma metastasis by repressing fibronectin expression [J]. *Hepatology*, 2009, 50(2): 490-499.
- [29] Segura MF, Hanniford D, Menendez S, et al. Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(6): 1814-1819.
- [30] Heimann R, Hellman S. Aging, progression, and phenotype in breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 1998, 16(8): 2686-2692.
- [31] Han M, Wang Y, Liu M, et al. MiR-21 regulates epithelial-mesenchymal transition phenotype and hypoxia-inducible factor-1 α expression in third-sphere forming breast cancer stem cell-like cells [J]. *Cancer Sci*, 2012. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02281.x.
- [32] Connolly EC, Van Doorslaer K, Rogler LE, et al. Overexpression of miR-21 promotes an in vitro metastatic phenotype by targeting the tumor suppressor RHOB [J]. *Mol Cancer Res*, 2010, 8(5): 691-700.

(收稿日期: 2011-01-11)

(本文编辑: 罗承丽)