

不同激素受体状态乳腺癌趋化因子 CCL5 的表达及临床意义

朱永云¹ 李娟娟² 陈创² 赵迎春¹

【摘要】 目的 探讨不同激素受体状态乳腺癌组织中趋化因子 CCL5 表达的临床意义。**方法** 应用免疫组织化学 SP 法检测 2008 年 1 月至 2010 年 1 月芜湖市第二人民医院 121 例浸润性乳腺癌手术患者组织石蜡样本中 CCL5 的表达,采用 χ^2 检验分析 CCL5 与临床病理因素关系,并运用单因素和多因素生存分析不同激素受体状态乳腺癌组织中 CCL5 表达的预测价值。**结果** 乳腺癌组织中 CCL5 表达与淋巴结状态有关($\chi^2=18.676, P<0.001$)。CCL5 阳性组的 5 年 DFS 显著低于 CCL5 阴性组($\chi^2=5.089, P=0.024$),淋巴结状态阳性组的 5-DFS 显著低于淋巴结状态阴性组($\chi^2=26.105, P<0.001$)。进一步多因素分析显示,淋巴结状态是乳腺癌患者 5 年 DFS 的独立预后因素($RR=5.453, 95\% CI: 2.589 \sim 11.485, P<0.001$)。激素受体阳性患者中, CCL5 阳性组的 5 年 DFS 显著低于 CCL5 阴性组($\chi^2=10.535, P=0.001$),淋巴结状态阳性组的 5 年 DFS 显著低于淋巴结状态阴性组($\chi^2=11.439, P=0.001$),不同组织学分级患者间 5 年 DFS 差异具有统计学意义($\chi^2=6.024, P=0.049$),进一步多因素分析显示, CCL5 是激素受体阳性乳腺癌患者 5 年 DFS 的独立预后因素($RR=3.205, 95\% CI: 1.052 \sim 9.762, P=0.040$),淋巴结状态是激素受体阳性乳腺癌患者 5 年 DFS 的独立预后因素($RR=3.915, 95\% CI: 1.191 \sim 12.872, P=0.025$)。**结论** 不同激素受体状态乳腺癌组织中 CCL5 的表达,能为乳腺癌内分泌治疗提供更准确诊疗依据。

【关键词】 乳腺肿瘤;趋化因子 CCL5; 预后

【中图分类号】 R737.9 **【文献标志码】** A

Expression of chemokine CCL5 in breast cancer with different hormone receptor status and its clinical significance Zhu Yongyun¹, Li Juanjuan², Chen Chuang², Zhao Yingchun¹. ¹Department of Thyroid and Breast Surgery, Wuhu Second People's Hospital, Wuhu 241000, China; ²Department of Breast and Thyroid Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Corresponding author: Zhu Yongyun, Email: 1197635097@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression of chemokine CCL5 in breast cancer with different hormone receptor status and its clinical significance. **Methods** The expression of CCL5 in paraffin-embedded samples was analyzed in 121 cases of invasive breast cancer treated in Wuhu Second People's Hospital from January 2008 to January 2010 using immunohistochemical SP technique. χ^2 test was used to detect the relationship between CCL5 expression and clinicopathologic parameters. The survival analysis was used to detect the prognostic value of CCL5 in breast cancer tissue with different hormone receptor status. **Results** CCL5 expression in breast cancer tissue was related to lymph node status ($\chi^2=18.676, P<0.001$). The 5-year DFS in CCL5 positive group was significantly lower than that in CCL5 negative group ($\chi^2=5.089, P=0.024$); the 5-year DFS in positive lymph node group was significantly lower than that in negative lymph node group ($\chi^2=26.105, P<0.001$). The multivariate analysis showed that lymph node status was an independent prognostic factor for 5-year DFS of breast cancer patients ($RR=5.453, 95\% CI: 2.589-11.485, P<0.001$). In the patients with hormone receptor positive, the 5-year DFS in CCL5 positive group was significantly lower than that in CCL5 negative group ($\chi^2=10.535, P=0.001$); the 5-year DFS in positive lymph node group was significantly lower than that in negative lymph node group ($\chi^2=11.439, P<0.001$); the 5-year DFS showed a

significant difference among the patients with breast cancer of different histological grades ($\chi^2 = 6.024, P = 0.049$). CCL5 and lymph node status were independent prognostic factors for 5-year DFS in patients with hormone receptor positive breast cancer ($RR = 3.205, 95\% CI: 1.052-9.762, P = 0.040$; $RR = 3.915, 95\% CI: 1.191-12.872, P = 0.025$). **Conclusion** CCL5 expression in breast cancer tissue with different hormone receptor status can provide important reference in clinical management of breast cancer.

【Key words】 Breast neoplasms; Chemokine CCL5; Prognosis

内分泌治疗是乳腺癌个体化治疗的主要手段之一,其主要依据是激素受体状态^[1]。激素受体是 ER、PR 的统称,是乳腺癌重要的预后因素,其表达情况与内分泌治疗的疗效密切相关^[2-3]。许多激素受体阳性乳腺癌患者从内分泌治疗中获益,但是也有相当一部分激素受体阳性乳腺癌患者从中获益甚微,造成了部分患者的治疗不足^[4-5]。以上现象可能与乳腺癌复杂的生物学特性有关,尤其是在其浸润转移方面。趋化因子 CCL5 是一种重要的趋化性细胞因子,与乳腺癌浸润转移密切相关^[6-7]。Svensson 等^[8]通过向激素受体阳性的乳腺癌鼠模型中注射 CCL5 抗体,证实了 CCL5 能促进肿瘤细胞的浸润。但是,关于 CCL5 表达对激素受体阳性乳腺病患者预后影响的研究较少。因而,本研究以乳腺癌浸润转移关键分子 CCL5 为切入点,探讨不同激素状态下乳腺癌组织中 CCL5 的表达及其预测价值,以期对乳腺癌内分泌治疗提供更准确的依据。

资料与方法

一、研究对象

回顾性收集芜湖市第二人民医院 2008 年 1 月至 2010 年 1 月浸润性乳腺癌手术患者组织石蜡样本 121 例,均为女性,年龄 30~83 岁,中位年龄为 49 岁,所有患者术前均未接受放射治疗、化疗。根据病例诊断当年 NCCN 指南,激素受体阳性患者,术后采取内分泌治疗、化疗、放射治疗;激素受体阴性患者,术后采取化疗、放射治疗;2008 年 1 月至 2010 年 1 月接受治疗的病例,因本单位条件所限及治疗费用昂贵等原因,患者均未行赫赛汀靶向治疗。同时采集患者的淋巴结状态、肿瘤大小、病理分级、激素受体状态、HER-2 状态等临床病理信息。采用电话或门诊方式对 121 例患者进行术后随访,随访截止时间 2015 年 4 月,随访时间 18~60 个月,在此期间死于乳腺癌相关疾病者为完全数据,生存和失访病例按截尾数据处理。生存时间按月计算,以手术日至末次随访所得的截尾时间为准。

二、主要试剂

鼠抗人 CCL5 单克隆抗体(克隆号:53405.111, 1:100 稀释)购自美国 Abcam 公司,生物素标记的

羊抗兔 IgG(1:500 稀释)购自美国 Vector 公司。

三、研究方法

1. 免疫组织化学 SP 法

石蜡标本进行厚 4 μm 切片,随后脱蜡、脱水, PBS 冲洗 3 min \times 3 次;高温高压抗原修复;加 3% 过氧化氢溶液,室温下孵育 10 min,以阻断内源性过氧化氢酶;PBS 冲洗 5 min \times 3 次;滴加鼠抗人 CCL5 单克隆抗体加一抗,室温下孵育 60 min;PBS 冲洗 3 min \times 3 次;滴加生物素标记的羊抗兔 IgG,室温下孵育 30 min;PBS 冲洗 3 min \times 3 次;加新配制的 DAB 显色液,显微镜下观察,阳性显色为棕黄色;自来水冲洗,苏木素复染,常规脱水、透明、干燥、封片,已知阳性组织切片作为阳性对照,以 PBS 代替鼠抗人 CCL5 单克隆抗体作为阴性对照,在显微镜下观察 CCL5 在乳腺癌组织中的表达。

2. 染色结果评定标准

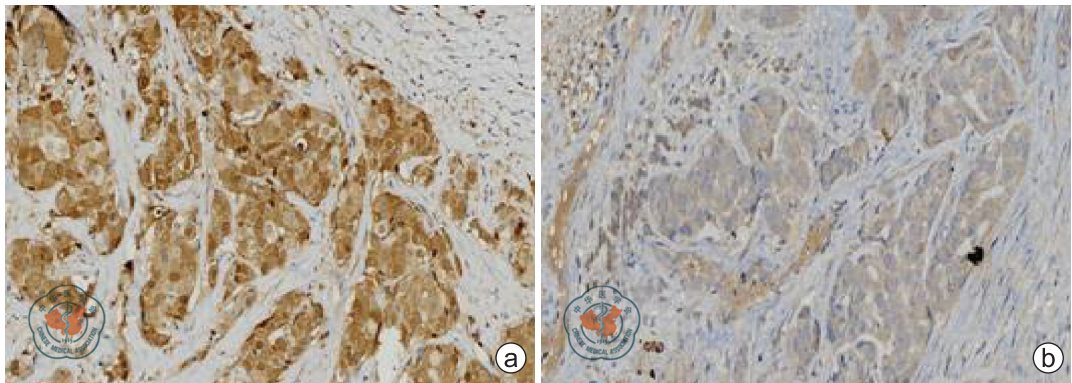
CCL5 免疫组织化学染色以细胞质内出现棕黄色颗粒为阳性细胞。每张切片随机选择 10 个高倍视野,共计数 1 000 个细胞,以阳性细胞数占总细胞数的比例计算阳性表达率。根据阳性细胞表达率判断结果:CCL5 阳性细胞表达率 $\geq 5\%$,判定为 CCL5 阳性表达,CCL5 阳性细胞表达率 $< 5\%$,判定为 CCL5 阴性表达^[9](图 1)。

四、统计学分析

应用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理。CCL5 与临床病理因素关系的评估采用 χ^2 检验;Kaplan-Meier 法进行单因素生存分析,Log-rank 检验评估组间差异;Cox 比例风险模型进行多因素分析,变量赋值见表 1。 $P < 0.050$ 为差异有统计学意义。

表 1 乳腺癌患者生存资料变量赋值表

变量	变量分类及赋值
年龄	≤ 50 岁=0, > 50 岁=1
淋巴结状态	阴性=0, 阳性=1
肿瘤大小	≤ 2 cm=0, > 2 cm=1
组织学分级	1 级=1, 2 级=2, 3 级=3
激素受体状态	阴性=0, 阳性=1
HER-2 状态	阴性=0, 阳性=1
复发	未复发=0, 复发=1



注:a 图所示 CCL5 的阳性表达;b 图所示 CCL5 的阴性表达

图 1 乳腺癌组织中趋化因子 CCL5 的表达(SP ×200)

结 果

一、乳腺癌 CCL5 表达与各临床病理参数的关系

121 例乳腺癌患者中 CCL5 的表达与临床病理参数间的关系见表 2。不同年龄、肿瘤大小、组织学分级、激素受体、HER-2 状态的患者间 CCL5 阳性率的差异无统计学意义,不同淋巴结状态的患者间 CCL5 阳性率的差异具有统计学意义($\chi^2 = 18.676, P < 0.001$)。

表 2 121 例乳腺癌患者的临床病理特征与趋化因子 CCL5 表达关系

项目	总例数	CCL5 阳性 (%)	χ^2 值	P 值
年龄(岁)				
≤50	64	33(51.6)	2.644	0.104
>50	57	21(36.8)		
淋巴结状态				
阴性	75	22(18.2)	18.676	<0.001
阳性	46	32(69.6)		
肿瘤大小				
≤2 cm	49	17(34.7)	3.289	0.070
>2 cm	72	37(51.4)		
组织学分级				
1 级	42	14(33.3)	5.286	0.071
2 级	55	25(45.6)		
3 级	24	15(62.5)		
激素受体 ^a				
阴性	75	34(45.3)	0.040	0.842
阳性	46	20(43.5)		
HER-2				
阴性	76	29(38.2)	3.462	0.063
阳性	45	25(55.6)		

注:^aER、PR 状态任一阳性即视为激素受体阳性

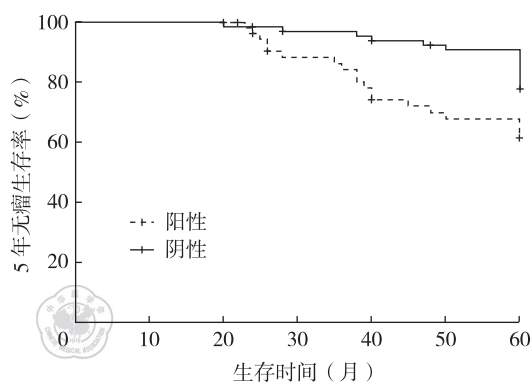
二、CCL5 状态对患者 5 年预后的预测价值分析

Kaplan-Meier 生存分析表明,CCL5 阳性组($n = 54$)的 5 年 DFS 显著低于 CCL5 阴性组($n = 67$) (Log-rank 检验, $\chi^2 = 5.089, P = 0.024$,图 2),淋巴结状态阳性组($n = 46$)的 5 年 DFS 显著低于淋巴结状态阴性组($n = 75$) (Log-rank 检验, $\chi^2 = 26.105, P < 0.001$,图 3);不同年龄、肿瘤大小、病理分级、激素受体状态、HER-2 状态组间 5 年 DFS 差异无统计学意义 (Log-rank 检验, $\chi^2 = 2.052, 2.823, 3.724, 3.542, 2.503, P$ 均 > 0.050)。将 CCL5 和淋巴结状态两个单因素分析差异有显著性的自变量纳入 Cox 回归分析,结果显示:只有淋巴结状态是乳腺癌 5 年 DFS 的独立预后因素($RR = 5.453, 95\% CI: 2.589 \sim 11.485, P < 0.001$)。

三、不同激素状态下 CCL5 表达的预测价值分析

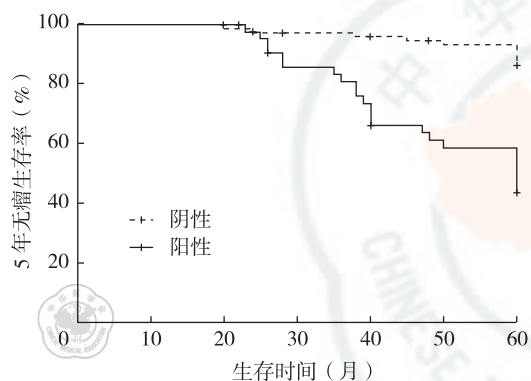
在 46 例激素受体阳性患者中,CCL5 阳性组($n = 20$)的 5 年 DFS 显著低于 CCL5 阴性组($n = 26$) (Log-rank 检验, $\chi^2 = 10.535, P < 0.001$,图 4),淋巴结状态阳性组($n = 22$)的 5 年 DFS 显著低于淋巴结状态阴性组($n = 24$) (Log-rank 检验, $\chi^2 = 11.439, P < 0.001$,图 5),不同组织学分级组间 5 年 DFS 差异有统计学意义 (Log-rank 检验, $\chi^2 = 6.024, P = 0.049$,图 6);不同年龄、肿瘤大小及 HER-2 状态患者间 5 年 DFS 差异无统计学意义 (Log-rank 检验, $\chi^2 = 0.571, 0.806, 2.070, P$ 均 > 0.050)。将 CCL5、淋巴结状态和组织学分级三个单因素分析差异有统计学意义的自变量纳入 Cox 回归分析,结果显示:CCL5 状态是乳腺癌淋巴结阳性患者 5 年 DFS 的独立预后因素 ($RR = 3.205, 95\% CI: 1.052 \sim 9.762, P = 0.040$),淋巴结状态也是激素受体阳性乳腺癌患者 5 年 DFS 的独立预后因素 ($RR = 3.915, 95\% CI: 1.191 \sim 12.872, P = 0.025$)。

在 75 例激素受体阴性患者中,CCL5 阳性组



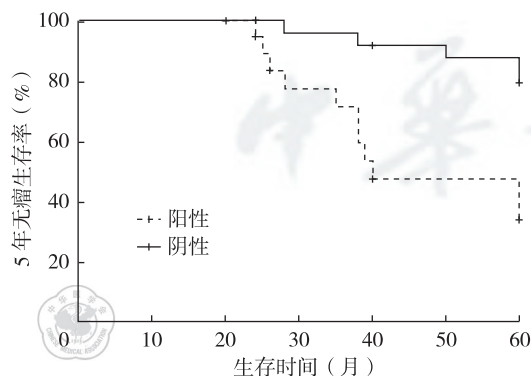
注:组间比较, $\chi^2=5.089, P=0.024$

图2 121例乳腺癌患者中不同 CCL5 状态组间 5 年无瘤生存曲线



注:组间比较, $\chi^2=26.105, P<0.001$

图3 121例乳腺癌患者中不同淋巴结状态组间 5 年无瘤生存曲线



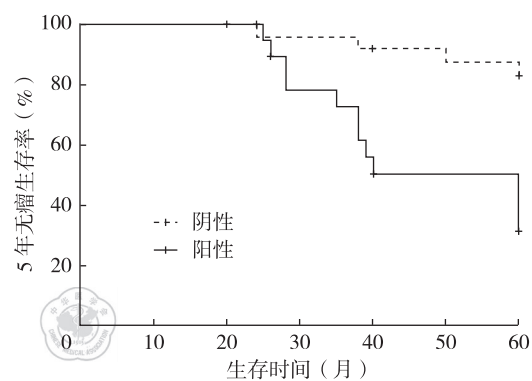
注:组间比较, $\chi^2=10.535, P<0.001$

图4 46例激素受体阳性乳腺癌患者中不同 CCL5 状态组间 5 年无瘤生存曲线

($n=34$)与 CCL5 阴性组($n=41$)5 年 DFS 的差异无统计学意义(Log-rank 检验, $\chi^2=0.128, P=0.721$)。

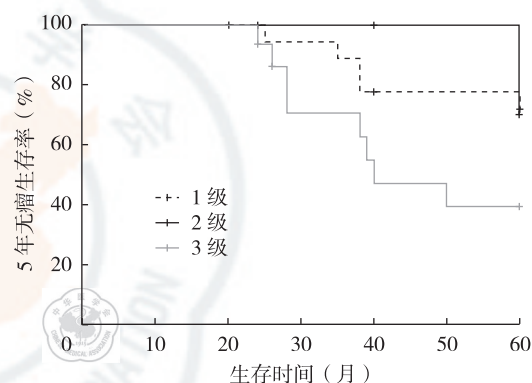
讨 论

激素受体是乳腺癌预后的重要影响因素,通过



注:组间比较, $\chi^2=11.439, P<0.001$

图5 46例激素受体阳性乳腺癌患者中不同淋巴结状态组间 5 年无瘤生存曲线



注:组间比较, $\chi^2=6.024, P=0.049$

图6 46例激素受体阳性乳腺癌患者中不同组织学分级组间 5 年无瘤生存曲线

内分泌治疗能提高乳腺癌的疗效^[2],而 CCL5 是乳腺癌浸润转移过程中的重要因子^[6-7]。因此,探讨不同激素受体状态乳腺癌 CCL5 的表达,有助于为乳腺癌内分泌治疗提供更充分的诊疗依据。

CCL5 主要由 CD8⁺T 淋巴细胞分泌,是肿瘤细胞中表达的主要趋化因子之一,具有趋化 T 细胞、单核细胞的作用^[10],能增强肿瘤细胞的浸润与转移能力,与乳腺癌的发生、发展密切相关^[3,11]。多项研究显示,乳腺癌中 CCL5 的表达与患者的临床病理特征密切相关。Wang 等^[12]发现 miRNA-21 抑制剂可增加 MCF-7 乳腺癌细胞系中趋化因子 CCL5 和干扰素诱导蛋白 10 释放,而 CCL5 和干扰素诱导蛋白 10 释放可导致乳腺癌淋巴结转移。Hartmann 等^[13]检测 102 例乳腺癌患者及 66 例健康对照者 CCL5 表达情况,结果发现乳腺癌患者中 CCL5 表达水平明显高于健康对照者中 CCL5 表达水平明显,淋巴结无转移者 CCL5 表达水平降低,淋巴结转移数目增加时 CCL5 表达水平增高。姚晓莉等^[14]应用实时荧光定量聚合酶链反应技术检测不同病理组织学分级乳

腺癌 CCL5 mRNA 的表达,结果显示 IV 期乳腺癌 CCL5 mRNA 表达量最高,提示 CCL5 可能以自分泌方式与受体 CCR5 结合促进乳腺癌生长和转移。本研究应用免疫组织化学检测了 121 例乳腺癌 CCL5 的表达,结果显示:CCL5 的表达只与淋巴结状态有关,与年龄、肿瘤大小、病理分级、激素受体、HER-2 状态等其他临床病理特征无关,与 Wang^[12]、Hartmann 等^[13]研究结果相一致。

CCL5 作为乳腺癌浸润转移的关键分子,其与乳腺癌预后的关系也备受学者们关注。Yaal-Hahoshen 等^[15]应用 Cox 风险比例模型分析了 142 例女性乳腺癌患者 CCL5 表达与不同分期、分子分型患者的关系,结果提示 CCL5 可以作为预测 II 期乳腺癌患者疾病是否进展的标志物,尤其对 CCL5(+)/ER(-) II a 亚组患者的预后有较大预测价值。但 Dorjgochoo 等^[16]同样应用 Cox 风险比例模型分析了 6 983 例中国女性乳腺癌与包含 CCL5 在内的 22 个基因变异的关系,结果发现这些基因的变异与患者生存均无关联,提示 CCL5 不能作为判断乳腺癌预后的一个指标。本研究通过 Kaplan-Meier 生存分析发现 CCL5 阳性组的 5 年 DFS 显著低于 CCL5 阴性组,证实 CCL5 是乳腺癌预后重要影响因素;但是纳入 CCL5 和淋巴结状态两个自变量进行 Cox 回归分析,发现 CCL5 状态并不是乳腺癌 5 年 DFS 的独立预后因素。

为进一步研究乳腺癌内分泌治疗的有效群体,本研究引入乳腺癌浸润转移关键分子 CCL5,探讨不同激素受体状态下乳腺癌 CCL5 的预测价值。通过 Kaplan-Meier 生存分析发现,在激素受体阴性患者中,CCL5 阳性组与 CCL5 阴性组间 5 年 DFS 的差异无统计学意义;在激素受体阳性患者中,CCL5 阳性组的 5 年 DFS 显著低于 CCL5 阴性组;进一步 Cox 回归分析表明,CCL5 状态是乳腺癌激素受体阳性患者 5 年 DFS 的独立预后因素。以上研究得出 CCL5 状态对激素受体阳性患者的预后有良好的预测价值,但是对激素受体阴性患者的预后没有预测价值。该研究结果表明:在激素受体阳性患者中,CCL5 状态为阴性的患者更适合以 NCCN 指南为依据的内分泌治疗、化疗、放射治疗等综合治疗;而 CCL5 状态为阳性的患者采取以 NCCN 指南为依据的综合治疗的同时,可能还需考虑以 CCL5 等乳腺癌关键分子为靶点治疗策略,以提高疗效。

参 考 文 献

- [1] Benson JR, Jatoi I, Keisch M, et al. Early breast cancer [J]. Lancet, 2009, 373(9673):1463-1479.
- [2] Barmes DM, Hanby AM. Progesterone and estrogen receptors in breast cancer: past, present and future [J]. Histopathology, 2001, 38(3):271-274.
- [3] Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, et al. Mesenchymal stem cells within tumor stroma promote breast cancer metastasis [J]. Nature, 2007, 449(7162):557-563.
- [4] Oakman C, Santarpia L, Di Leo A. Breast cancer assessment tools and optimizing adjuvant therapy [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2010, 7(12):725-732.
- [5] Tripathy D. Are we hitting the right combination for hormonally sensitive breast cancer? [J]. J Clin Oncol, 2009, 27(16):2580-2582.
- [6] Li J, Tu Y, Wen J, et al. Role for ezrin in breast cancer cell chemotaxis to CCL5 [J]. Oncol Rep, 2010, 24(4):965-971.
- [7] Gallo M, De Luca A, Lamura L, et al. Zoledronic acid blocks the interaction between mesenchymal stem cells and breast cancer cells: implications for adjuvant therapy of breast cancer [J]. Ann Oncol, 2012, 23(3):597-604.
- [8] Svensson S, Abrahamsson A, Rodriguez GV, et al. CCL2 and CCL5 are novel therapeutic targets for estrogen-dependent breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(16):3794-3805.
- [9] Soria G, Ofri-Shahak M, Haas I, et al. Inflammatory mediators in breast cancer: coordinated expression of TNF α & IL-1 β with CCL2&CCL5 and effects on epithelial-to-mesenchymal transition [J]. BMC Cancer, 2011, 11, 130.
- [10] Niwa Y, Akamatsu H, Niwa H, et al. Correlation of tissue and plasma RANTES levels with disease course in patients with breast or cervical cancer [J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(2):285-289.
- [11] Pinilla S, Alt E, Abdul Khalek FJ, et al. Tissue resident stem cells produce CCL5 under the influence of cancer cells and thereby promote breast cancer cell invasion [J]. Cancer Lett, 2009, 284(1):80-85.
- [12] Wang Z, Han J, Cui Y, et al. miRNA-21 inhibition enhances RANTES and IP-10 release in MCF-7 via PIAS3 and STAT3 signalling and causes increased lymphocyte migration [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 439(3):384-389.
- [13] Hartmann MC, Dwyer RM, Costello M, et al. Relationship between CCL5 and transforming growth factor-beta1 (TGFbeta1) in breast cancer [J]. Eur J Cancer, 2011, 47(11):1669-1675.
- [14] 姚晓莉, 童鹤翔, 涂毅, 等. CCL5 及其受体在乳腺癌组织中的表达及其意义 [J]. 中华实验外科杂志, 2007, 24(5):590-592.
- [15] Yaal-Hahoshen N, Shina S, Leider-Trejo L, et al. The chemokine CCL5 as a potential prognostic factor predicting disease progression in stage II breast cancer patients [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(15):4474-4480.
- [16] Dorjgochoo T, Zheng Y, Gao YT, et al. No association between genetic variants in angiogenesis and inflammation pathway genes and breast cancer survival among Chinese women [J]. Cancer Epidemiol, 2013, 37(5):619-624.

(收稿日期:2015-06-08)

(本文编辑:宗贝歌)