

乳腺癌组织中白细胞介素8表达及其临床意义

胡紫叶 周昱 尼加提·艾尔肯 匡夏颖 张晋 林颖

【摘要】 目的 探讨乳腺癌组织中 IL-8 表达与临床病理特征的关系及其对患者长期预后的影响。**方法** 回顾性分析 1995 年 1 月至 2007 年 12 月中山大学附属第一医院 296 例术前未经过任何治疗的浸润性乳腺癌患者的临床资料。同时收集患者的石蜡标本制作组织芯片,但在芯片制作过程中,有 79 例因组织块过小或脱落未能获得准确数据,故实际纳入分析的样本量为 217 例。利用组织芯片技术及免疫组织化学染色方法检测 217 例乳腺癌组织中 IL-8 的表达,并采用 χ^2 检验分析 IL-8 表达与乳腺癌临床病理特征的关系,用 Kaplan-Meier 法进行生存分析,用 Log-rank 检验分析 IL-8 阳性者与阴性者之间 DFS 及 OS 的差异,用多因素 Cox 回归分析 IL-8 表达对患者 DFS 的影响。**结果** 217 例乳腺癌组织中,IL-8 表达阳性者共 59 例,约占 27.2% (59/217)。乳腺癌组织中 IL-8 的表达与患者肿瘤 T 分期、淋巴结转移状态、ER 和 PR 状态存在联系 ($\chi^2 = 11.208, 5.516, 55.642, 19.706, P$ 均 < 0.050)。单因素分析显示,IL-8 阳性乳腺癌患者 5 年及 10 年 DFS 率分别为 83.6% 和 66.7%,而 IL-8 阴性乳腺癌患者 5 年及 10 年 DFS 率分别为 95.4% 和 87.2%。IL-8 阳性者 DFS 率明显低于 IL-8 阴性者 ($\chi^2 = 8.564, P = 0.003$),但 IL-8 表达对患者 OS 的影响尚不明确 ($\chi^2 = 2.460, P = 0.117$)。多因素分析显示,IL-8 是影响乳腺癌患者 DFS 的独立危险因素 ($HR = 2.450, 95\% CI: 1.117 \sim 5.376, P = 0.025$)。并且,在已绝经的乳腺癌患者中,IL-8 阳性患者较阴性患者具有更大的疾病进展风险 ($HR = 4.526, 95\% CI: 1.706 \sim 12.006, P = 0.002$)。**结论** IL-8 可以作为判断乳腺癌患者预后的参考指标之一。IL-8 阳性者提示预后较差,并且在绝经后的乳腺癌患者中其参考价值更大。

【关键词】 乳腺肿瘤; 白细胞介素 8; 预后

【中图分类号】 R737.9 **【文献标志码】** A

Expression of interleukin 8 in breast cancer tissue and its clinical significance Hu Ziye, Zhou Yu, Nijati · Aierken, Kuang Xiaying, Zhang Jin, Lin Ying. Breast Disease Center, First Affiliated Hospital, Sun Yet-sen University, Guangzhou 510080, China
Corresponding author: Lin Yin, Email: frostlin@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the correlation between interleukin-8 (IL-8) in breast cancer tissue and clinicopathological characteristics and the impact of IL-8 on long-term prognosis in breast cancer patients. **Methods** Clinical data of 296 patients with invasive breast cancer without any treatment before operation in the First Affiliated Hospital of Sun Yet-sen University from January 1995 to December 2007 were analyzed retrospectively. At the same time, the paraffin-embedded samples were collected to make tissue microarray. Totally 217 patients were included in this study and 79 patients were excluded from the study because of small or absceded samples. The expression of IL-8 in 217 cases of breast cancer was detected by tissue microarray technique and immunohistochemical staining. χ^2 test was used to analyze the relationship between IL-8 expression and clinical characteristics of breast cancer. Kaplan-Meier method was used for survival analysis, and the differences of DFS and OS between IL-8 positive and IL-8 negative patients were analyzed by Log-rank test. Cox regression model was applied to demonstrate the impact of IL-8 on DFS.

Results IL-8 expression was positive in 59 cases, accounting for about 27.2% of 217 cases in total. The expression of IL-8 was related to tumor stage, lymph node status, ER and PR status ($\chi^2 = 11.208, 5.516, 55.642, 19.706$, all $P < 0.050$). Univariable analysis showed that 5-year and 10-year DFS were 83.6% and 66.7% in IL-8 positive patients, 95.4% and 87.2% in IL-8 negative patients respectively. DFS in IL-8 positive patients was significantly lower than that in IL-8 negative patients ($\chi^2 = 8.564, P = 0.003$), while IL-8 had indefinite impact on OS ($\chi^2 = 2.460, P = 0.117$). Multivariable analysis identified IL-8 as an independent risk factor of DFS ($HR = 2.450, 95\% CI: 1.117-5.376, P = 0.025$). In postmenopausal patients, IL-8 positive patients had a higher risk of disease progression than IL-8 negative patients did ($HR = 4.526, 95\% CI: 1.706-12.006, P = 0.002$). **Conclusion** IL-8 could be a prognostic index of breast cancer patients and IL-8 positive expression indicates a poor prognosis, especially in postmenopausal patients.

【Key words】 Breast neoplasms; Interleukin-8; Prognosis

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤。2012年全球女性乳腺癌发病率及病死率分别占女性恶性肿瘤的25%和15%^[1]。全身性综合治疗水平的提高极大改善了乳腺癌患者的生存率,然而部分高危患者的预后仍然不佳。IL-8作为具有趋化作用的细胞因子^[2],在乳腺癌的发展过程中亦起到重要作用。已有细胞实验明确了ER阴性表达的乳腺癌细胞其IL-8表达升高,反之亦然^[3,4],并证实IL-8影响乳腺癌细胞的生物学行为^[5-7]。笔者前期的研究发现,乳腺癌组织中IL-8阳性表达率明显高于乳腺良性肿瘤及正常乳腺组织^[8]。本研究利用组织芯片技术,探讨IL-8在乳腺癌组织中的表达与临床病理特征的关系及其对乳腺癌患者长期预后的影响。

资料与方法

一、一般资料

回顾性分析1995年1月至2007年12月中山大学附属第一医院296例术前未经任何治疗的浸润性乳腺癌患者的临床资料。所有患者均为女性,年龄为29~98岁,中位年龄为50岁。术后73.6%(218/296)的患者接受常规辅助化疗,68.9%(204/296)的患者接受内分泌治疗;33.4%(99/296)的患者接受乳腺癌根治术治疗,63.9%(189/296)的患者接受乳腺癌改良根治术治疗,2.7%(8/296)的患者接受其他方式的手术。因早期病例缺失某些数据,故本组患者中具有初诊时肿瘤转移情况数据者占30.1%(89/296),仅有28.1%(83/296)的患者有明确的HER-2数据。

另外,还同时收集患者的石蜡标本制作组织芯片,但有79例因组织块过小或脱落,未能获得准确数据而被剔除,故实际纳入分析的样本量为217例,占总样本量73.3%(217/296)。

本研究末次随访时间为2015年10月。患者的随访时间为21~205个月,中位随访时间为91个月。

二、标本制作

查阅病理切片,定位癌灶,选取相应的“供体”蜡块,同时准备好一块无组织的4 cm×2 cm空白蜡块。先在“受体”石蜡块上用组织芯片阵列仪(型号MTA-1,美国Beecher Instrument公司)打出直径0.6 mm,深2.0 mm的孔。选取标本(“供体”蜡块)有代表性的位置,并在“供体”蜡块上准确标记所需要的靶点。利用组织芯片仪钻取直径为0.6 mm的靶点组织,并转移至“受体”蜡块相应的孔位上。每例标本取2个代表性位点,制成含乳腺癌组织的芯片蜡块。对该蜡块进行切片,切下的组织平整地粘贴于载玻片上。

三、免疫组织化学染色

IL-8一抗购自美国R&D公司,二抗及DAB显色剂均购自中国上海优宁维公司。免疫组织化学染色方法按照SP法标准程序操作,IL-8一抗体积分数为1:50。ER及PR免疫组织化学染色结果经中山大学附属第一医院病理科检测所得。

四、结果判断

至少两位病理学专家独立阅片。根据ASCO 2010版乳腺癌激素受体免疫组织化学检测指南推荐^[9],ER、PR阳性反应为细胞核着棕黄色,着色细胞数>1%判断为阳性。IL-8阳性反应为细胞质着棕黄色,着色细胞>10%判断为阳性^[8]。

五、统计学分析

所有数据通过SPSS19.0进行分析。采用 χ^2 检验评估IL-8表达与临床病理特征的关系。采用Kaplan-Meier法进行生存分析,用Log-rank检验比较IL-8阳性者与阴性者的生存差异。运用进入法进行Cox回归变量的筛选,用多因素Cox回归分析

年龄、月经状态、肿瘤 T 分期、淋巴结转移情况、ER/PR 状态及 IL-8 表达状态对 DFS 和 OS 的影响。变量赋值情况见表 1。以 $P < 0.050$ 为差异有统计学意义。

表 1 乳腺癌患者无瘤生存 Cox 回归分析变量赋值表

变量	变量分类赋值
年龄	≤50 岁 = 0, >50 岁 = 1
月经状态	未绝经 = 0, 已绝经 = 1
肿瘤 T 分期	T ₁₋₄ 为分类变量
淋巴结转移	无转移 = 0, 转移 = 1
ER	阴性 = 0, 阳性 = 1
PR	阴性 = 0, 阳性 = 1
IL-8	阴性 = 0, 阳性 = 1

结 果

一、乳腺癌组织中 IL-8 的表达情况

217 例乳腺癌组织中, IL-8 表达阳性者共 59 例, 占 27.2% (59/217)。乳腺癌组织中 IL-8 免疫组织化学染色结果见图 1。

二、乳腺癌组织中 IL-8 表达与临床病理特征的关系

乳腺癌组织中 IL-8 表达与确诊年龄、是否绝经无关, 而与乳腺癌 T 分期、淋巴结是否转移、ER 及 PR 表达状态有关(表 2)。

三、IL-8 表达与乳腺癌患者 DFS 之间的关系

IL-8 阳性乳腺癌患者 5 年 DFS 率为 83.6%, 10 年 DFS 率为 66.7%, 而 IL-8 阴性乳腺癌患者 5 年及 10 年 DFS 率分别为 95.4% 和 87.2%。IL-8 阳性者 DFS 率明显低于 IL-8 阴性者 ($\chi^2 = 8.564$, $P = 0.003$; 图 2)。

表 2 217 例乳腺癌患者临床特征与 IL-8 表达的关系

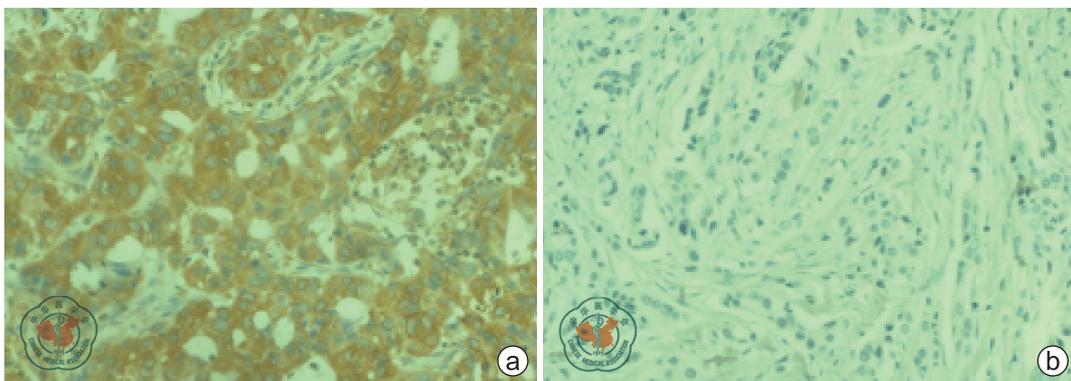
临床特征	例数	IL-8 (例)		χ^2 值	P 值
		阴性	阳性		
确诊年龄					
≤50 岁	113	85	28	0.692	0.406
>50 岁	104	73	31		
月经状态					
未绝经	96	73	23	0.908	0.341
已绝经	121	85	36		
T 分期					
T ₁	59	40	19	11.208	0.011
T ₂	135	104	31		
T ₃	13	5	8		
T ₄	10	9	1		
淋巴结					
阴性	141	110	31	5.506	0.019
阳性	76	48	28		
ER					
阴性	82	36	46	55.642	<0.001
阳性	135	122	13		
PR					
阴性	65	34	31	19.706	<0.001
阳性	152	124	28		

四、IL-8 表达与乳腺癌患者 OS 之间的关系

在 217 例乳腺癌患者中, IL-8 阳性者 5 年 OS 率为 90.4%, 10 年 OS 率为 76.3%, 而 IL-8 阴性者 5 年及 10 年 OS 率分别为 98.0% 和 83.9%。两组患者的 OS 率相似 ($\chi^2 = 2.460$, $P = 0.117$; 图 3)。

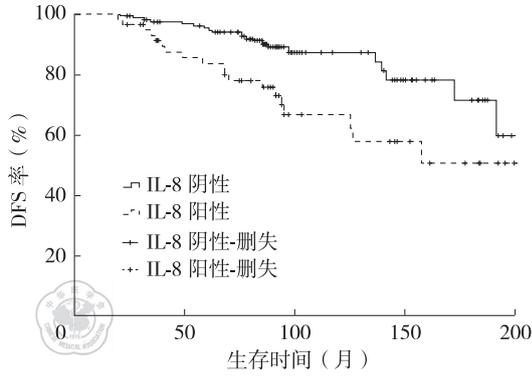
五、多因素 Cox 回归分析 IL-8 对判断预后的意义

对本研究中 217 例乳腺癌患者数据进行 Cox 回归分析发现, 相较于其他指标, 如确诊时年龄、肿瘤大小、病理学类型及淋巴结是否转移等, IL-8 是影响



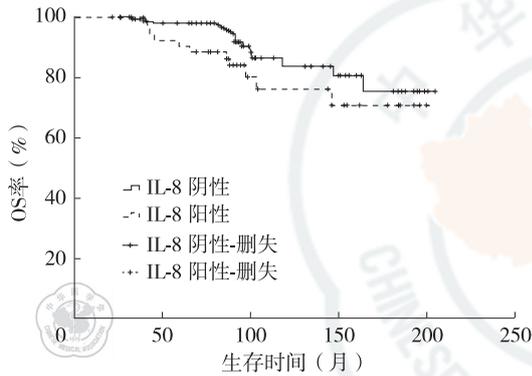
注: a 图显示 IL-8 阳性表达; b 图显示 IL-8 阴性表达

图 1 乳腺癌组织中 IL-8 免疫组织化学染色结果 (SP × 200)



注:IL-8 阳性与阴性乳腺癌患者间 DFS 率相比,差异有统计学意义, $\chi^2=8.564, P=0.003$

图2 217例乳腺癌患者IL-8表达相关的DFS曲线



注:IL-8 阳性与阴性乳腺癌患者间 OS 率相比,差异无统计学意义, $\chi^2=2.460, P=0.117$

图3 217例乳腺癌患者IL-8表达相关的OS曲线

患者 DFS 的独立危险因素 ($HR = 2.450, 95\% CI: 1.117 \sim 5.376, P = 0.025$)。IL-8 阳性乳腺癌患者 DFS 率明显低于 IL-8 阴性者,在矫正其他混杂因素后,IL-8 阳性者面临更大的疾病进展风险(表 3)。

六、IL-8 对绝经后乳腺癌患者 DFS 的影响

对患者进行月经状态分层分析发现:对绝经前的乳腺癌患者而言,IL-8 表达状态对 DFS 的影响尚未确定;但对绝经后的乳腺癌患者而言,IL-8 阳性者疾病进展的风险是 IL-8 阴性者的 4.562 倍(表 4)。

讨 论

乳腺癌的全身性治疗方式已经能改善乳腺癌患者的预后,但恶性肿瘤仍能从其他机制增强其特有的生物学行为能力,例如:T 淋巴细胞参与肿瘤细胞的转移过程^[10];上皮-间质转化过程促进肿瘤细胞的迁移、定植^[11];炎症反应相关机制亦参与到肿瘤细胞的迁移、侵袭过程中^[12]。IL-8 是趋化因子家族

表 3 217 例乳腺癌患者 IL-8 表达相关

DFS 的 Cox 多因素回归分析

因素	回归系数	标准误	Wald 值	P 值	HR 值	95% 置信区间
确诊年龄	-0.122	0.369	0.109	0.742	0.885	0.430 ~ 1.825
月经状态	0.780	0.415	3.536	0.060	2.182	0.968 ~ 4.920
T 分期						
T ₁	1.000	1.000	4.845	1.000		
T ₂	-1.082	0.850	1.623	0.203	0.339	0.064 ~ 1.791
T ₃	-0.720	0.765	0.885	0.347	0.487	0.109 ~ 2.181
T ₄	0.146	0.867	0.028	0.866	1.157	0.211 ~ 6.333
淋巴结转移	0.174	0.361	0.234	0.628	1.191	0.587 ~ 2.413
ER	-0.050	0.455	0.012	0.912	0.951	0.395 ~ 2.339
PR	0.445	0.419	1.123	0.289	1.560	0.686 ~ 3.549
IL-8	0.896	0.401	4.998	0.025	2.450	1.117 ~ 5.376

注:HR 为风险比

表 4 分层分析 IL-8 表达对不同月经状态乳腺癌患者 DFS 的影响 (n=217)

因素	回归系数	标准误	Wald 值	P 值	HR 值	95% 置信区间
未绝经						
IL-8 表达	-0.667	0.776	0.738	0.390	0.513	0.112 ~ 2.350
已绝经						
IL-8 表达	1.510	0.498	9.198	0.002	4.526	1.706 ~ 12.006

注:HR 为风险比

成员之一,作为第一个被发现具有趋化作用的细胞因子^[2],已经被证实存在于胰腺肿瘤、黑色素瘤、胃肠肿瘤^[13-15]等多种实体肿瘤的发生、发展过程中起到重要作用。

笔者研究团队前期的研究表明,乳腺癌细胞中 IL-8 表达与 ER 状态呈负相关,同时 IL-8 对乳腺癌细胞的生物学行为起到促进作用^[5-7]。本研究在笔者研究团队前期研究^[8]的基础上,延长随访年限,扩大样本量,对乳腺癌患者的组织芯片进行相关分析后,证实乳腺癌组织中 IL-8 的表达与 ER 状态有关。

在分析 217 例乳腺癌组织 IL-8 表达与患者生存的关系时,笔者发现,IL-8 表达对患者的 DFS 有影响,而对患者的 OS 无影响,但趋势与对 DFS 的影响一致,考虑与样本量较小有关。已有文献报道,在结直肠癌、膀胱癌等实体肿瘤中,IL-8 高表达提示患者预后较差^[16-17]。但目前有关 IL-8 对乳腺癌患者预后影响的研究较少,且以往的研究多利用 ELISA 检测外周血 IL-8 含量对乳腺癌患者预后的影响,并且多集中在探讨基因多态性对乳腺癌患者生存的影响^[18]。而本研究利用组织芯片技术,通过免疫组织

化学染色的方法直接观察乳腺癌组织中 IL-8 的表达量,并分析其与乳腺癌预后的关系。

在多因素分析中,本研究发 现 IL-8 阳性者疾病进展风险为 IL-8 阴性者的 2.450 倍,提示 IL-8 可作为 DFS 的预测参考指标。Yokoe 等^[19]的研究发现,乳腺癌复发患者外周血中 IL-8 水平升高,可能影响患者体内的抗肿瘤反应,从而导致患者预后较差。本研究纳入的患者以 I、II 期为主,病理类型均为浸润性癌,也得到类似结果。本研究在纠正混杂因素后进一步分层比较不同月经状态下 IL-8 表达对患者预后的影响,结果显示,乳腺癌组织中 IL-8 的状态对判断绝经后乳腺癌患者的 DFS 有更大价值,提示临床医师应该更加关注绝经后乳腺癌患者癌组织中 IL-8 的状态。

综上所述,乳腺癌组织中 IL-8 表达水平升高在一定程度上提示患者有较差的预后。同时,笔者也需要增加样本类型并完善数据分析,改进检测方法进一步明确 IL-8 表达对不同类型、不同阶段乳腺癌患者预后的影响。ER 作为核受体家族成员之一,是如何调控 IL-8 表达的,机制尚不明确。研究这一调控途径可以为针对 ER 的治疗方式开拓新的思路,在降低患者病死率的同时改善患者 DFS 率,以期进一步提高乳腺癌患者的生存率。

参 考 文 献

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*,2015,65(2):87-108.
- [2] Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, et al. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,1987,84(24):9233-9237.
- [3] Freund A, Chauveau C, Brouillet JP, et al. IL-8 expression and its possible relationship with estrogen-receptor-negative status of breast cancer cells[J]. *Oncogene*,2003,22(2):256-265.
- [4] Lin Y, Huang R, Chen L, et al. Identification of interleukin-8 as estrogen receptor-regulated factor involved in breast cancer invasion and angiogenesis by protein arrays [J]. *Int J Cancer*, 2004, 109 (4): 507-515.
- [5] Yao C, Lin Y, Chua MS, et al. Interleukin-8 modulates growth and invasiveness of estrogen receptor-negative breast cancer cells[J]. *Int J Cancer*,2007,121(9):1949-1957.
- [6] Shao N, Chen L, Ye R, et al. The depletion of interleukin-8 causes cell cycle arrest and increases the efficacy of docetaxel in breast cancer cells[J]. *Biochem Bioph Res Commun*,2013,431(3):535-541.
- [7] Shao N, Lu Z, Zhang Y, et al. Interleukin-8 upregulates integrin β 3 expression and promotes estrogen receptor-negative breast cancer cell invasion by activating the PI3K/Akt/NF- κ B pathway[J]. *Cancer Lett*, 2015,364(2):165-172.
- [8] 姚陈,王深明,谢丹,等. 白细胞介素-8 的表达与乳腺癌预后的关系[J]. *中华外科杂志*,2006,44(13):900-903.
- [9] Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer[J]. *J Clin Oncol*,2010,28(16):2784-2795.
- [10] Fridlender ZG, Albelda SM, Granot Z. Promoting metastasis: neutrophils and T cells join forces[J]. *Cell Res*,2015,25(7):765-766.
- [11] Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Clin Invest*,2009,119(6):1420-1428.
- [12] Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer [J]. *Cell*,2010,140(6):883-899.
- [13] Araki S, Omori Y, Lyn D, et al. Interleukin-8 is a molecular determinant of androgen independence and progression in prostate cancer [J]. *Cancer Res*,2007,67(14):6854-6862.
- [14] Kunz M, Hartmann A, Flory E, et al. Anoxia-induced up-regulation of interleukin-8 in human malignant melanoma. A potential mechanism for high tumor aggressiveness[J]. *Am J Pathol*,1999,155(3):753-763.
- [15] Xiao YC, Yang ZB, Cheng XS, et al. CXCL8, overexpressed in colorectal cancer, enhances the resistance of colorectal cancer cells to anoikis[J]. *Cancer Lett*,2015,361(1):22-32.
- [16] Cheng XS, Li YF, Tan J, et al. CCL20 and CXCL8 synergize to promote progression and poor survival outcome in patients with colorectal cancer by collaborative induction of the epithelial-mesenchymal transition[J]. *Cancer Lett*,2014,348(1/2):77-87.
- [17] Reis ST, Leite KR, Piovesan LF, et al. Increased expression of MMP-9 and IL-8 are correlated with poor prognosis of bladder cancer[J]. *BMC Urol*,2012,12:18.
- [18] Slattery ML, Herrick JS, Torres-Mejia G, et al. Genetic variants in interleukin genes are associated with breast cancer risk and survival in a genetically admixed population: the breast cancer health disparities study[J]. *Carcinogenesis*,2014,35(8):1750-1759.
- [19] Yokoe T, Iino Y, Morishita Y. Trends of IL-6 and IL-8 levels in patients with recurrent breast cancer: preliminary report [J]. *Breast Cancer*,2000,7(3):187-190.

(收稿日期:2016-02-18)

(本文编辑:罗承丽)

胡紫叶,周昱,尼加提·艾尔肯,等. 乳腺癌组织中白细胞介素 8 表达及其临床意义[J/CD]. *中华乳腺病杂志:电子版*, 2016,10(3):137-141.