

## · 论著 ·

# 赖氨酰氧化酶样蛋白 2 及 E-钙黏蛋白在三阴性乳腺癌中的表达及临床意义

孙吉瑞 张金库 周炳娟 乔海芝 陈红 马秋双 陈雪

**【摘要】 目的** 探讨赖氨酰氧化酶样蛋白 2 (LOXL2)、E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 在三阴性乳腺癌 (TNBC) 中的表达及相互关系。**方法** 收集 2008 年 8 月至 2014 年 3 月在保定市第一中心医院治疗的浸润性乳腺癌患者的组织标本进行回顾性分析, 包括 TNBC 66 例及其癌旁正常乳腺组织, 非 TNBC (non-TNBC) 70 例。采用免疫组织化学方法检测 3 组中 LOXL2 及 E-cadherin 的表达。LOXL2 和 E-cadherin 的表达及其与 TNBC 患者临床病理因素的关系采用  $\chi^2$  检验, LOXL2 和 E-cadherin 相关性分析采用 Spearman 等级相关性分析。**结果** LOXL2 在 TNBC 组、non-TNBC 组和正常乳腺组织中的阳性表达率分别为 74.2% (49/66)、51.4% (36/70) 和 21.2% (14/66), 差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 37.387, P < 0.001$ )。TNBC 组的 LOXL2 阳性表达率高于 non-TNBC 组及正常乳腺组织 ( $\chi^2 = 7.544, 37.198, P$  均  $< 0.017$ )。E-cadherin 在 TNBC、non-TNBC 及癌旁正常乳腺组织中的阳性表达率分别为 24.2% (16/66)、41.4% (29/70) 和 97.0% (64/66), 差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 77.031, P < 0.001$ )。TNBC 组的 E-cadherin 阳性表达率低于正常乳腺组织 ( $\chi^2 = 73.108, P < 0.017$ ), 但是与 non-TNBC 组比较, 差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 4.532, P > 0.017$ )。在 TNBC 患者中, LOXL2 和 E-cadherin 的表达与淋巴结转移 ( $\chi^2 = 11.509, 9.964, P = 0.001, 0.003$ ) 及临床分期 ( $\chi^2 = 7.436, 9.175, P = 0.006, 0.002$ ) 有关, 与患者的年龄 ( $\chi^2 = 0.169, 0.539, P = 0.681, 0.463$ ) 和肿瘤直径 ( $\chi^2 = 1.418, 0.592, P = 0.492, 0.744$ ) 无关。LOXL2 与 E-cadherin 蛋白在 TNBC 中的表达呈负相关 ( $r = -0.475, P < 0.001$ )。**结论** LOXL2 可能成为新的判断 TNBC 预后的分子标志物。

**【关键词】** 乳腺肿瘤; 受体, erbB-2; 钙粘着糖蛋白类

**【中图分类号】** R737.9 **【文献标志码】** A

**Expressions of lysyl oxidase-like protein 2 and E-cadherin in triple-negative breast cancer and clinical significance** Sun Jirui, Zhang Jinku, Zhou Bingjuan, Qiao Haizhi, Chen Hong, Ma Qiushuang, Chen Xue.

Department of Pathology, First Central Hospital of Baoding City, Baoding 071000, China

Corresponding author: Zhang Jinku, Email: zjkb@sohu.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the expressions of lysyl oxidase-like protein 2 (LOXL2) and E-cadherin in triple-negative breast cancer (TNBC) and their correlation. **Methods** The tissue samples from invasive breast cancer patients treated in First Central Hospital of Baoding City from August 2008 to March 2014 were collected for retrospective analysis, including 66 cases of TNBC and their normal breast tissue as control, 70 cases of non-TNBC. Immunohistochemistry was used to detect the expressions of LOXL2 and E-cadherin in samples. The expressions of LOXL2 and E-cadherin and their relationship with clinicopathological parameters were compared using  $\chi^2$  test, and the correlation of LOXL2 and E-cadherin was analyzed using Spearman correlation analysis. **Results** The positive rate of LOXL2 was 74.2% (49/66) in TNBC group, 51.4% (36/70) in non-TNBC group and 21.2% (14/66) in control group, which indicated a significant difference ( $\chi^2 = 37.387, P < 0.001$ ). LOXL2 positive rate in TNBC group was significantly higher than that in non-TNBC group or in normal breast tissue ( $\chi^2 = 7.544, 37.198$ , both  $P < 0.017$ ). The positive rate of E-cadherin was 24.2% (16/66) in TNBC group, 41.4% (29/70) in non-TNBC group and 97.0% (64/66) in control group, which indicated a significant difference ( $\chi^2 = 77.031, P < 0.001$ ). E-cadherin positive rate in TNBC group was significantly lower than that in normal breast tissue ( $\chi^2 = 73.108, P < 0.017$ ), but there was no significant difference between TNBC group and non-TNBC group ( $\chi^2 = 4.532, P > 0.017$ ). In TNBC patients, the expressions of LOXL2 and E-cadherin were correlated with lymph node

metastasis ( $\chi^2 = 11.509, 9.964; P = 0.001, 0.003$ ) and TNM staging ( $\chi^2 = 7.436, 9.175; P = 0.006, 0.002$ ), but they were not correlated with the patients' age ( $\chi^2 = 0.169, 0.539; P = 0.681, 0.463$ ) and tumor diameter ( $\chi^2 = 1.418, 0.592; P = 0.492, 0.744$ ). LOXL2 was negatively correlated with E-cadherin in TNBC samples ( $r = -0.475, P < 0.001$ ). **Conclusion** LOXL2 may have the potential to be a molecular marker for the prognosis of TNBC patients.

**【Key words】** Breast neoplasms; Receptor, erbB-2; Cadherins

根据美国癌症协会(American Cancer Society, ACS)的统计数据,乳腺癌已成为全球女性最常见的恶性肿瘤,病死率仅次于肺癌<sup>[1]</sup>。其中三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)是指ER、PR及HER-2表达均阴性的乳腺癌,因为其恶性程度高、预后差、易早期发生远处转移而备受关注<sup>[2]</sup>。赖氨酰氧化酶样蛋白2(lysyl oxidase-like protein 2, LOXL2)在细胞衰老、趋向运动、细胞分化、上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)、组织纤维化等方面发挥着重要的作用,同时能促进肿瘤的侵袭和转移<sup>[3]</sup>。研究证实,癌细胞通过EMT使细胞失去极性,细胞间连接受到破坏,具有更强的迁移和侵入能力,可形成局部扩散并侵入淋巴管和血管发生转移<sup>[4-6]</sup>。E-钙黏蛋白(E-cadherin)对维持细胞形态和调节细胞间黏附具有重要作用<sup>[6]</sup>。LOXL2的过表达减弱了糖原合成酶激酶3 $\beta$ (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , GSK3 $\beta$ )介导的锌指转录因子Snail降解,从而使E-cadherin表达下降,诱发了EMT,促进了TNBC的浸润和转移<sup>[7]</sup>。本研究旨在探讨TNBC患者LOXL2与E-cadherin的表达及其相关性。

## 资料与方法

### 一、标本来源

收集保定市第一中心医院2008年8月至2014年3月手术治疗的浸润性乳腺癌患者的病理标本进行回顾性分析。全部标本均常规取材,4%的中性甲醛溶液固定,石蜡包埋,4  $\mu$ m厚度切片。标本均来自女性患者,年龄25~88岁,平均年龄51岁。所有病例术前均未进行过放射治疗、化疗及内分泌治疗。根据TNBC的判断标准(ER、PR、HER-2均阴性),筛选出TNBC 66例,同时收集其对应的癌旁正常乳腺组织(距癌组织边缘 $\geq 5$  cm)作为对照,再用随机数字表法选出70例non-TNBC进行分析。

### 二、实验试剂

兔抗人LOXL2多克隆抗体购自美国SANTA CRUZ公司,兔抗人E-cadherin、兔抗人HER-2、兔抗人ER、兔抗人PR、即用型快捷免疫组织化学MaxVision检测试剂盒及DAB显色试剂盒均购自福州迈新生物公司。

### 三、检测方法

采用免疫组织化学MaxVision两步法检测

LOXL2、E-cadherin在TNBC组、non-TNBC组及癌旁正常乳腺组织中的表达,所有操作步骤均按产品说明书进行,采用柠檬酸修复液(pH 6.0)高温高压修复,以LOXL2阳性的直肠黏膜组织和E-cadherin阳性的结肠癌组织免疫组织化学染色结果作为阳性对照,以PBS替代一抗作为阴性对照,DAB显色,苏木精复染,中性树胶封片。

### 四、结果判定

LOXL2以细胞质有棕黄色颗粒为阳性(图1a)。根据阳性细胞的比例和着色程度分为4级:(1)癌细胞无细胞膜/细胞质/细胞核染色或 $\leq 10\%$ 的癌细胞出现细胞膜/细胞质/细胞核染色为(-);(2) $> 10\%$ 癌细胞出现细胞质部分染色为(+);(3) $> 10\%$ 癌细胞出现细胞质弱、中度完全染色为(++);(4) $> 10\%$ 癌细胞出现细胞质高度完全染色为(+++)。(-)判为阴性,(+)~(+++)判为阳性<sup>[8]</sup>。E-cadherin阳性表达于细胞膜(图1b),阳性细胞数 $> 90\%$ 为阳性, $\leq 90\%$ 为阴性<sup>[9]</sup>。

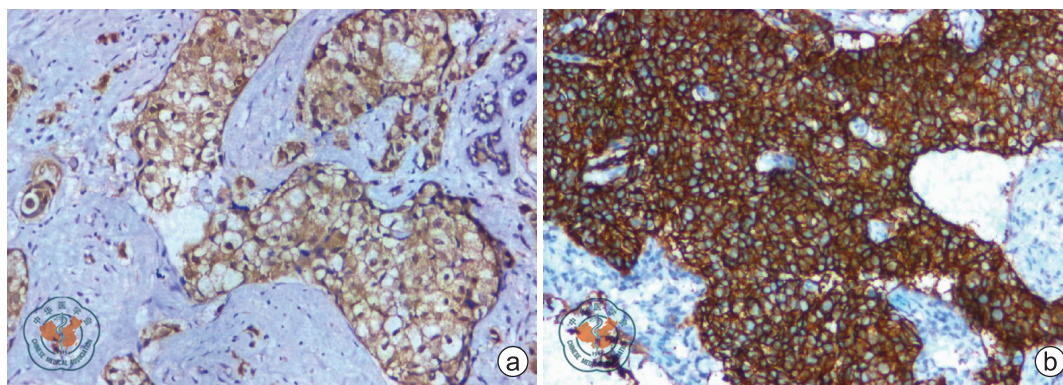
### 五、统计学分析

采用SPSS 18.0统计学软件,分析LOXL2和E-cadherin的表达及其与TNBC临床病理因素的关系采用 $\chi^2$ 检验,LOXL2和E-cadherin相关性分析采用Spearman等级相关性分析, $P < 0.050$ 表示差异有统计学意义。组间两两比较采用 $\chi^2$ 分割法,新的检验水平调整为0.017。

## 结 果

### 一、LOXL2及E-cadherin蛋白在TNBC、non-TNBC及癌旁正常乳腺组织中的表达

LOXL2在TNBC组、non-TNBC组和正常乳腺组织中的阳性表达率分别为74.2%(49/66)、51.4%(36/70)和21.2%(14/66),差异有统计学意义( $\chi^2 = 37.387, P < 0.001$ )。TNBC组和non-TNBC组LOXL2阳性表达率显著高于正常乳腺组织组( $\chi^2 = 37.198, 13.341, P$ 均 $< 0.017$ ),并且LOXL2在TNBC组的阳性表达率也高于non-TNBC组( $\chi^2 = 7.544, P < 0.017$ ,表1)。E-cadherin在TNBC、non-TNBC及癌旁正常乳腺组织中的阳性表达率分别为24.2%(16/66)、41.4%(29/70)和97.0%(64/66),差异有统计学意义( $\chi^2 = 77.031, P < 0.001$ )。TNBC组和non-TNBC组E-cadherin的阳性表达率低于正



注:图 a 所示 LOXL2 在细胞质呈阳性表达;图 b 所示 E-cadherin 在细胞膜呈阳性表达;LOXL2 为赖氨酰氧化酶样蛋白 2; E-cadherin 为 E-钙黏蛋白

图 1 LOXL2 及 E-cadherin 在三阴性乳腺癌中的表达 (MaxVision ×100)

常乳腺组织 ( $\chi^2 = 73.108, 48.468, P$  均  $< 0.017$ ), 而 E-cadherin 阳性表达率在 TNBC 组与 non-TNBC 组, 差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 4.532, P > 0.017$ , 表 1)。

表 1 各组中 LOXL2 和 E-cadherin 的表达 [例 (%)]

组别	例数	LOXL2		E-cadherin	
		阳性	阴性	阳性	阴性
TNBC	66	49 (74.2)	17 (25.8)	16 (24.2)	50 (75.8)
non-TNBC	70	36 (51.4)	34 (48.6)	29 (41.4)*	41 (58.6)
正常乳腺组织	66	14 (21.2)	52 (78.8)	64 (97.0)	2 (3.0)
$\chi^2$ 值		37.387		77.031	
$P$ 值		$> 0.001$		$> 0.001$	

注: \* 与 TNBC 组比较,  $\chi^2 = 4.532, P > 0.017$ , 其余组间比较  $P$  均  $< 0.017$ ; LOXL2 为赖氨酰氧化酶样蛋白 2; E-cadherin 为 E-钙黏蛋白; TNBC: 三阴性乳腺癌; non-TNBC: 非三阴性乳腺癌

二、LOXL2 和 E-cadherin 的表达与 TNBC 临床病理特征的关系。

LOXL2 和 E-cadherin 的表达与 TNBC 的淋巴结转移及临床分期有关, 与患者的年龄和肿瘤直径无关, 具体统计数据见表 2。

### 三、LOXL2 与 E-cadherin 的相关性分析

在 LOXL2 阳性表达的 49 例 TNBC 中有 6 例 E-cadherin 阳性表达, 而 LOXL2 阴性表达的 17 例中有 10 例呈 E-cadherin 阳性表达。Spearman 等级相关分析表明: LOXL2 与 E-cadherin 蛋白在 TNBC 中的表达呈负相关 ( $r = -0.475, P < 0.001$ , 表 3)。

## 讨 论

TNBC 作为一类特殊类型的乳腺癌, 有着特殊的临床表现、组织学分级及免疫表型, 并且具有较高的增殖指数, 临床预后不良, 易早期发生远处转移和术后局部复发, 并且对成熟的内分泌疗法不敏感, 因而成为学者们研究的热点。

表 2 三阴性乳腺癌的临床病理特征与 LOXL2、E-cadherin 表达的关系

临床病理特征	LOXL2			$\chi^2$ 值	$P$ 值	E-cadherin			$\chi^2$ 值	$P$ 值
	例数	(例)				(例)				
		阳性	阴性			阳性	阴性			
年龄 (岁)										
<48	30	23	7	0.169	0.681	6	24	0.539	0.463	
≥48	36	26	10			10	26			
肿瘤直径										
≤2 cm	40	29	11	1.418	0.492	9	31	0.191	0.909	
>2 cm 及 <5 cm	18	15	3			5	13			
≥5 cm	8	5	3			2	6			
临床分期										
I、II	28	16	12	7.436	0.006	12	16	9.175	0.002	
III	38	33	5			4	34			
淋巴结转移										
有	35	32	3	11.509	0.001	3	32	9.964	0.003	
无	31	17	14			13	18			

注: LOXL2 为赖氨酰氧化酶样蛋白 2; E-cadherin 为 E-钙黏蛋白

表 3 LOXL2 和 E-cadherin 在三阴性乳腺癌中表达的相关性 (例)

E-cadherin	LOXL2		合计
	阳性	阴性	
阳性	6	10	16
阴性	43	7	50
合计	49	17	66

注:  $r = -0.475, P < 0.001$ ; LOXL2 为赖氨酰氧化酶样蛋白 2; E-cadherin 为 E-钙黏蛋白

肿瘤转移是一个多步骤、多基因参与的复杂过程, 包括癌细胞侵袭、在循环系统生存、在远端器官克隆性生长。在 EMT 过程中, 上皮细胞标志物 E-cadherin、紧密连接蛋白 (claudin)、封闭蛋白 (occludin) 等表达下调, 间质类型标志物波形蛋白



(vimentin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)等表达上调。E-cadherin 是一类主要介导细胞间黏附的钙依赖性跨膜蛋白,位于染色体 16q22.1,分子质量是 80 000 ~ 124 000, N-末端位于细胞外,对钙离子具有高度敏感性,是钙离子的结合位点,COOH-末端位于细胞质内,由  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  三个亚单位及其他连接蛋白组成并与肌动蛋白相连,对维持细胞形态和调节细胞间黏附起重要作用<sup>[7]</sup>。在肺腺癌、肠癌、胃癌、卵巢癌中,肿瘤的分化、侵袭和转移与 E-cadherin 表达缺失相关<sup>[10-13]</sup>。LOXL2 是 LOXL 家族成员之一,位于染色体 8p21.2-p23.3,在细胞衰老、趋向运动、细胞分化、EMT、组织纤维化及肿瘤的发生、发展方面扮演着重要角色<sup>[3, 14]</sup>。LOXL2 在子宫、胎盘、前列腺、胰腺以及再生组织中高表达,在心、脑、肺、肾、骨骼肌中低表达,在其他组织中基本不表达<sup>[15]</sup>。LOXL2 在肿瘤的侵袭过程中发挥一定的作用,并与多种恶性肿瘤的进展有关。Akiri 等<sup>[16]</sup>研究发现,用人的 LOXL2 基因转染低侵袭能力的乳腺癌 MCF-7 细胞后接种裸鼠,能够诱发雌激素依赖性肿瘤,并且由于 LOXL2 的表达,肿瘤细胞能够侵入周围血管、神经及肌肉组织中,促进对周围组织的浸润。黄菁<sup>[17]</sup>发现 LOXL2 mRNA 转录水平在乳腺癌中较正常组织显著增加,通过免疫组织化学及 ELISA 进一步证实,随着疾病严重程度的增加,LOXL2 阳性细胞数量逐渐增加,LOXL2 与乳腺癌严重程度呈正相关。LOXL2 可通过 Snail/E-cadherin 通路促进肿瘤的侵袭、转移<sup>[18]</sup>。LOXL2 能提高 Snail 蛋白的稳定性,当 LOXL2 过表达时,其减弱了 GSK3 $\beta$  介导的 Snail 蛋白的降解,使 E-cadherin 表达下降,诱发了 EMT,从而促进了肿瘤的侵袭和转移<sup>[7]</sup>。目前尚不确定 LOXL2 是否通过抑制 Snail 活性来促进侵袭、转移。

本研究发现 LOXL2 在 TNBC 中的阳性表达率高于 non-TNBC 及正常乳腺组织,E-cadherin 的阳性表达率低于正常乳腺组织,差异均具有统计学意义,而且 LOXL2 和 E-cadherin 的表达与 TNBC 的 TNM 分期及淋巴结转移相关。同时,LOXL2 与 E-cadherin 的表达呈负相关。笔者推测 LOXL2 可能通过抑制 E-cadherin 表达促进癌细胞的侵袭和转移。

综上所述,LOXL2 可能是 TNBC 一个重要的功能基因,通过诱导 TNBC 的 EMT 促进其浸润和转移。LOXL2 有望作为新的判断 TNBC 预后的分子标志物,但其作用机制仍不清楚,尚需进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90.
- [2] 胡夕春,王碧芸,邵志敏,等. 2011 年《St. Gallen 早期乳腺癌初始治疗国际专家共识》与中国抗癌协会乳腺癌专业委员会指南之比较[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版,2011,5(4):404-407.
- [3] Cano A, Santamaría PG, Moreno-Bueno G. LOXL2 in epithelial cell plasticity and tumor progression[J]. Future Oncol, 2012, 8(9):1095-1108.
- [4] Tiwari N, Gheldof A, Tatari M, et al. EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells[J]. Semin Cancer Biol, 2012, 22(3):194-207.
- [5] Jiang J, Tang YL, Liang XH. EMT: a new vision of hypoxia promoting cancer progression[J]. Cancer Biol Ther, 2011, 11(8):714-723.
- [6] Kerosuo L, Bronner-Fraser M. What is bad in cancer is good in the embryo: importance of EMT in neural crest development[J]. Semin Cell Dev Biol, 2012, 23(3):320-332.
- [7] Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(19):10869-10874.
- [8] Moreno-Bueno G, Salvador F, Martín A, et al. Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2), a new regulator of cell polarity required for metastatic dissemination of basal-like breast carcinomas[J]. EMBO Mol Med, 2011, 3(9):528-544.
- [9] 李伟,熊正文,李宏伟,等. Cox-2、E-cad 的 mRNA 及蛋白在乳腺浸润性导管癌中的表达及意义[J]. 解放军医药杂志, 2011,23(4):9-12.
- [10] Zhan P, Shen XK, Qian Q, et al. Down-regulation of lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) is associated with disease progression in lung adenocarcinomas[J]. Med Oncol, 2012, 29(2):648-655.
- [11] Kim YJ, Kang HB, Yim HS, et al. NDRG2 positively regulates E-cadherin expression and prolongs overall survival in colon cancer patients[J]. Oncol Rep, 2013, 30(4):1890-1898.
- [12] 孙淑明,卢晓峰,吴丽娥,等. E-钙黏蛋白在胃癌浸润、转移中的作用[J]. 汕头大学医学院学报,2008,21(3):146-148.
- [13] Faleiro-Rodrigues C, Macedo-Pinto I, Pereira D, et al. Association of E-cadherin and  $\beta$ -catenin immunoreexpression with clinicopathologic features in primary ovarian carcinomas[J]. Hum Pathol, 2004, 35(6):663-669.
- [14] Li W, Nellaippan K, Strassmaier T, et al. Localization and activity of lysyl oxidase within nuclei of fibrogenic cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(24):12817-12822.
- [15] Jourdan-Le Saux C, Tronecker H, Bogic L, et al. The LOXL2 gene encodes a new lysyl oxidase-like protein and is expressed at high levels in reproductive tissues[J]. J Biol Chem, 1999, 274(18):12939-12944.
- [16] Akiri G, Sabo E, Dafni H, et al. Lysyl oxidase-related protein-1 promotes tumor fibrosis and tumor progression in vivo[J]. Cancer Res, 2003, 63(7):1657-1666.
- [17] 黄菁. 赖氨酰氧化酶样蛋白-2 在乳腺癌诊断中的应用价值[J]. 现代预防医学, 2012,39(21):5631-5633.
- [18] Peinado H, Del Carmen Iglesias-de la Cruz M, Olmeda D, et al. A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression[J]. EMBO J, 2005, 24(19):3446-3458.

(收稿日期:2015-01-04)

(本文编辑:刘军兰)

孙吉瑞,张金库,周炳娟,等. 赖氨酰氧化酶样蛋白 2 及 E-钙黏蛋白在三阴性乳腺癌中的表达及临床意义[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版,2016,10(3):151-154.