



DOI:10.3969/j.issn.1673-2588.2013.02.001

http://www.gjbl.net/gjblkx/fileup/PDF/20130293.pdf

· 论 著 ·

mTOR 和 CCR7 与乳腺癌侵袭转移的关系

刘清华¹, 李媛媛¹, 徐滨², 王竹青³, 刘雨清¹

(1. 潍坊医学院病理学教研室, 山东 潍坊 261053; 2. 胜利油田中心医院病理科, 山东 东营 257034;
3. 潍坊市中心医院病理科, 山东 潍坊 261053)

[摘要] 目的: 探讨乳腺浸润性导管癌组织中哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)与趋化因子受体7(chemokine receptor 7, CCR7)蛋白的表达, 以及二者与乳腺癌侵袭、转移之间的关系。方法: 采用免疫组织化学方法检测65例乳腺浸润性导管癌及32例正常乳腺组织中mTOR和CCR7的表达情况, 并分析二者之间的相关性及其与各临床病理特征之间的关系。结果: mTOR和CCR7蛋白在乳腺浸润性导管癌中的阳性表达率(mTOR为68%, CCR7为74%)高于癌旁正常乳腺组织中的阳性表达率(mTOR为25%, CCR7为28%), 差异有统计学意义($P < 0.01$)。mTOR与CCR7的表达呈正相关($r = 0.485$, $P < 0.05$)。mTOR和CCR7的高表达均与淋巴结转移、临床恶性肿瘤分期有关(均 $P < 0.05$), 而与年龄、雌激素受体、孕激素受体无关(均 $P > 0.05$)。结论: mTOR和CCR7的异常高表达可能与乳腺癌的侵袭、转移有关, 且检测二者的表达可作为判断乳腺癌转移的预测指标。

[关键词] 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; 趋化因子受体7; 乳腺浸润性导管癌; 免疫组织化学; 侵袭; 转移

Relationship between mTOR, CCR 7 and the invasion and metastasis of breast carcinoma

LIU Qinghua¹, LI Yuanyuan¹, XU Bin², WANG Zhuqing³, LIU Yuqing¹

(1. Department of Pathology, Weifang Medical University, Weifang Shandong 261053; 2. Department of Pathology, Shengli Oil Field Central Hospital, Dongying Shandong 257034; 3. Department of Pathology, Weifang Central Hospital, Weifang Shandong 261053, China)

Abstract **Objective:** To detect the expression of mammalian target of rapamycin (mTOR) and chemokine receptor chemokine receptor 7 (CCR7) protein in breast infiltrating duct carcinoma, and to analyze the correlation between mTOR, CCR7 protein and the invasion and metastasis of breast cancer. **Methods:** Immunohistochemistry was used to detect the mTOR and CCR7 protein expression level in 65 patients with breast infiltrating duct carcinoma

收稿日期 (Date of reception): 2012-10-11

作者简介 (Biography): 刘清华, 硕士研究生, 主要从事乳腺肿瘤的研究。

通信作者 (Corresponding author): 刘雨清, Email: yuqingliu89@hotmail.com

基金项目 (Foundation items): 国家自然科学基金 (81072068); 山东省中青年科学家奖励基金 (2010BSB14050)。This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81072068) and the Young Scientist Award Fund of Shandong Province, P. R. China (2010BSB14050).

and 32 cases of normal breast tissue. At the same time, the relationship between the expression of mTOR, CCR7 and the clinicopathologic characteristics was analyzed. **Results:** The positive expression rates of the mTOR and CCR7 protein in the breast infiltrating duct carcinoma tissue (mTOR: 68%, CCR7: 74%) was significantly higher than those in the cancer adjacent tissue (mTOR: 25%, CCR: 7 28%)($P < 0.01$). The protein expression level of mTOR was positively related with that of CCR7 in breast infiltrating duct carcinoma tissue ($r = 0.485$, $P < 0.05$). The expression of mTOR and CCR7 were related with the lymph node metastasis and TNM stage (both $P < 0.05$), but there is no correlation with the patients' age, estrogen receptor, progesterone receptor ($P > 0.05$). **Conclusion:** The abnormal expression of mTOR and CCR7 may be related with the occurrence, development, invasion and metastasis of the breast cancer, and the detection of mTOR and CCR7 protein expression may be served as the predict index for breast carcinoma metastasis.

Key words mammalian target of rapamycin; chemokine receptor 7; breast infiltrating duct carcinoma; immunohistochemistry; invasion; metastasis

趋化因子受体 7(chemokine receptor 7, CCR7) 是 CC 类家族成员之一, 在多种肿瘤中呈高表达, 与肿瘤的侵袭转移密切相关^[1-2]。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR) 作为磷脂酰肌醇-3 羟基激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB)/mTOR 信号转导通路中一个重要的调控基因, 一方面可以上调基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinases 2, MMP-2) mRNA 和蛋白质表达, 降解细胞外基质, 另一方面也可以促进肿瘤细胞的侵袭和转移^[3-4]。迄今为止, 肿瘤的发生机制尚不清楚。但已有研究结果显示在肿瘤细胞发生、发展过程中, CCR7-PI3K /AKT / mTOR 信号通路发挥了重要作用, CCR7 可以通过诱导 mTOR 分子磷酸化, 激活 mTOR 信号通路, 从而调节肿瘤细胞的活性, 促进细胞周期的进展, 使其抗凋亡, 促进肿瘤的进展。因此, 该信号通路也成为了乳腺癌领域研究的热点之一。本研究采用 Max VisionTM 免疫组织化学的方法检测 mTOR 和 CCR7 在乳腺浸润性导管癌和正常乳腺组织中的表达水平, 并分析其与乳腺癌淋巴结侵袭转移的关系, 从而为乳腺癌的基因靶向治疗及预后评估等提供新的靶点和理论依据。

1 材料与方法

1.1 标本收集

收集潍坊市人民医院及潍坊医学院附属医院 2011 年 6~12 月乳腺浸润性导管癌手术切除标本 65 例, 其中淋巴结转移 35 例, 无淋巴结转移 30 例。按照 AJCC 乳腺癌临床分期(2003)标

准, TNM I 期 18 例, II 期 24 例, III 期 23 例。所有患者术前未经任何化学治疗和抗肿瘤治疗, 手术后常规病理诊断确诊为乳腺癌, 并进行免疫组织化学检测雌激素受体(estrogen receptor, ER) 和孕激素受体(progesterone receptor, PR)。发病年龄 32~74(53.0±10.7) 岁。同时取癌旁 5 cm 外正常乳腺组织 32 例作为对照。

1.2 试剂与方法

兔抗人 mTOR 多克隆抗体(1:400 稀释)、兔抗人 CCR7 多克隆抗体(1:400 稀释)、通用型免疫组织化学 PV-9000 检测试剂盒均购自北京博奥森生物技术有限公司, 柠檬酸盐缓冲液、DAB 显色试剂盒购自北京中杉生物技术有限公司。免疫组织化学技术采取 Max VisionTM 两步法, 具体操作按试剂盒说明书进行。

1.3 结果判定

在光学显微镜下观察免疫组织化学染色切片, CCR7 和 mTOR 均以细胞膜和(或)细胞质染成淡黄色、棕黄色或棕褐色为阳性表达, ER 和 PR 均以细胞核染成黄色颗粒为阳性表达。阳性对照有明显免疫阳性信号显示, 阴性对照无免疫阳性信号显示。二者均采用二级计分法, 阳性细胞计数: 根据阳性细胞所占 5 个以上高倍镜视野比例计数, <5% 为 0 分, 5%~25% 为 1 分, 26%~50% 为 2 分, >50% 为 3 分。着色强度分类: 无着色计 0 分, 淡黄色为 1 分, 黄或棕黄色为 2 分, 褐或棕褐色为 3 分。免疫组织化学结果以阳性细胞计数与着色强度的乘积表示 mTOR 和 CCR7 的表达强度, 0 分为(-), 1~3 分为(+), 4~6 分为(++), 7~10 分为

(+++), ≥ 4 分者称为高表达, < 4 分为低表达。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。两变量之间的相关性分析采用 Spearman 等级分析, 计数资料采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 mTOR 和 CCR7 在乳腺浸润性导管癌组织和正常乳腺组织中的表达及其相关性

mTOR 和 CCR7 蛋白均定位于乳腺浸润性导管癌和正常乳腺组织的细胞膜和 (或) 细胞质中。在 65 例乳腺浸润性导管癌中, mTOR 蛋白阳性率为 68%(44/65), 而在 32 例正常乳腺组织中, mTOR 蛋白阳性率为 25%(8/32), 两者比较差异有统计学意义 ($\chi^2=15.72$, $P=0.001$)。在 65 例乳腺浸润性导管癌中, CCR7 蛋白表达阳性率为 74%(48/65), 而在 32 例正常乳腺组织中, CCR7

蛋白表达阳性率为 28%(9/32), 两者比较差异有统计学意义 ($\chi^2=18.49$, $P=0.001$)。经 Spearman 相关系数检验显示, mTOR 和 CCR7 两个因子在乳腺浸润性导管癌组织中的表达呈正相关 ($r=0.485$, $P < 0.05$)。

2.2 mTOR 和 CCR7 蛋白与乳腺癌淋巴结转移的关系

mTOR 和 CCR7 在无淋巴结转移的乳腺癌组织和有淋巴结转移的乳腺癌组织中均有阳性染色。其中, mTOR 蛋白在有淋巴结转移的 35 例乳腺浸润性导管癌组织中, 阳性表达率为 74%(26/35), 而在无淋巴结转移的 30 例乳腺浸润性导管癌组织中, 阳性表达率为 50%(15/30), 两者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); CCR7 蛋白在有淋巴结转移的 35 例乳腺浸润性导管癌组织中, 阳性表达率为 77%(27/35), 而在无淋巴结转移的 30 例乳腺浸润性导管癌组织中, 阳性表达率为 47%(14/30), 两者差异有统计学意义 (表 1, 图 A-D; $P < 0.05$)。

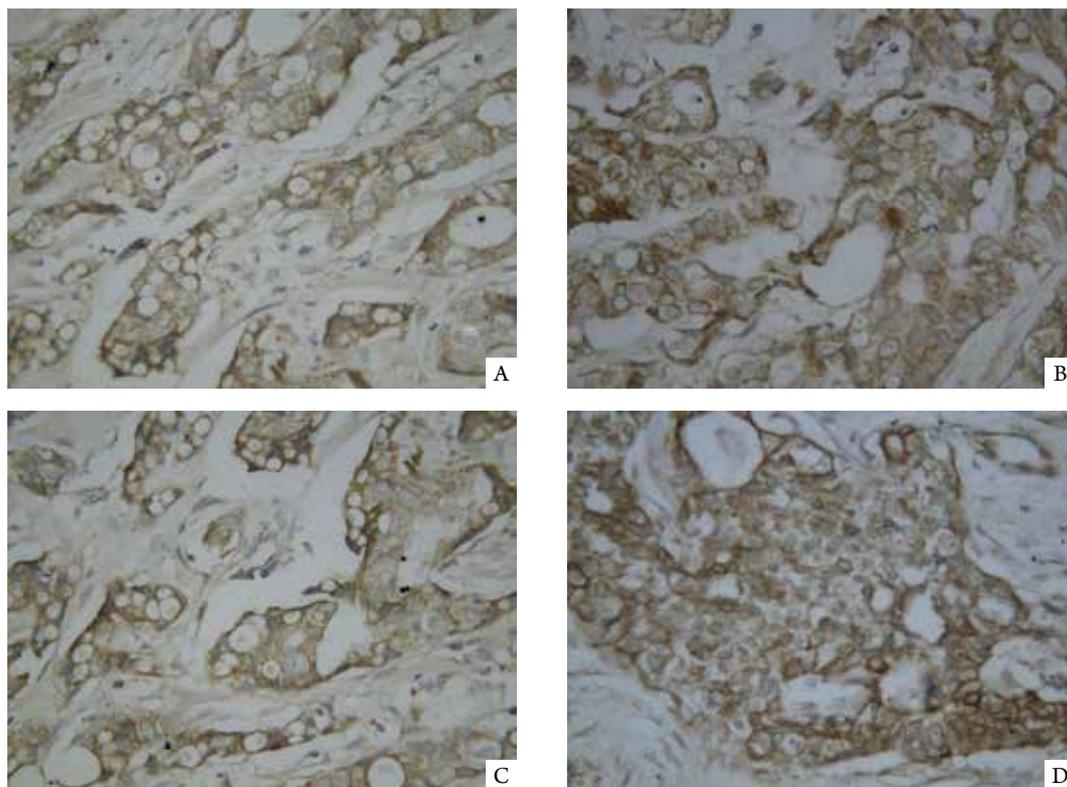


图 1 mTOR 和 CCR7 在乳腺癌中的阳性表达 ($\times 400$)。A: 无淋巴结转移乳腺癌组织中 mTOR 蛋白呈低表达; B: 有淋巴结转移乳腺癌组织中 mTOR 蛋白呈高表达; C: 无伴淋巴结转移乳腺癌组织中 CCR7 蛋白呈低表达; D: 有淋巴结转移乳腺癌组织中 CCR7 蛋白呈高表达。

Figure 1 Positive expression of mTOR and CCR7 protein in breast cancer ($\times 400$). A: Low expression of mTOR in breast cancer without lymph node metastasis; B: High expression of mTOR in breast cancer with lymph node metastasis; C: Low expression of CCR7 in breast cancer without lymph node metastasis; D: High expression of CCR7 in breast cancer with lymph node metastasis.

2.3 乳腺癌组织中 mTOR 和 CCR7 的表达与临床病理特征之间的关系

mTOR 和 CCR7 高表达均与乳腺癌的淋巴结

转移、TNM 分期有关 (均 $P < 0.05$), 而与年龄、ER 和 PR 均无关 (表 1; $P > 0.05$)。

表 1 mTOR 和 CCR7 在乳腺癌组织中的表达与临床病理参数的关系

Table 1 Relationship between the expression of mTOR and CCR7 and clinicopathologic characteristics in breast cancer tissues

临床病理参数	n	mTOR					CCR7					
		+	-	阳性率/%	χ^2	P	+	-	阳性率/%	χ^2	P	
年龄 / 岁												
<50	38	17	21	0.45	0.85	0.35	12	26	0.32	0.58	0.45	
≥ 50	27	9	18	0.33			11	16	0.41			
淋巴结转移												
有	35	26	9	0.74	4.091	0.043 [△]	27	8	0.77	6.44	0.011 [△]	
无	30	15	15	0.50			14	16	0.47			
ER												
+	36	20	16	0.56	0.001	0.975	22	14	0.61	0.006	0.94	
-	29	16	13	0.55			18	11	0.62			
PR												
+	30	18	12	0.60	0.056	0.81	14	16	0.47	1.585	0.21	
-	35	22	13	0.63			11	24	0.31			
TNM 分期												
I ~ II 期	42	12	30	0.29	4.905	0.027 [△]	16	26	0.38	4.382	0.036 [△]	
III ~ IV 期	23	13	10	0.57			15	8	0.65			

[△] $P < 0.05$ 。

3 讨论

肿瘤转移是指恶性肿瘤细胞脱离原发部位, 通过各种途径, 到达远处的组织或器官, 继续生长增殖而形成新转移灶的过程^[5]。然而, 在恶性肿瘤侵袭转移过程中, 趋化因子受体 CCR7 可能发挥着至关重要的作用。Muller 等^[6] 研究发现与正常乳腺上皮细胞相比, 人乳腺癌细胞高表达 CCR7, 在乳腺癌的常见转移部位 (如腋窝淋巴结、肺及肝) 也高水平表达次级淋巴组织趋化因子 (secondary lymphoid-tissue chemokine, SLC), 而在非常见转移部位 SLC 的表达水平却低得多。本研究结果显示: CCR7 在乳腺浸润性导管癌组织中的阳性表达率明显高于癌旁正常乳腺组织 ($P < 0.01$), 且有淋巴结转移的乳腺癌患者中 CCR7 的阳性表达也明显高于无淋巴结转移患者。以上实验结果说明, CCR7 蛋白与乳腺癌淋巴结特异性侵袭转移关系密切, 其作用机制可能是 CCR7/SLC 作为吸引趋化因子, 由其浓度梯度来控制肿瘤细胞向其他组织器官和淋巴结发生侵袭和转移。

mTOR 信号转导通路的激活不仅可以诱导基因表达, 促进细胞周期由 G_1 期向 S 期转变, 抑制细胞的凋亡, 从而导致细胞持续生长和肿瘤形成。同时, 还在血管的形成、肿瘤细胞的侵袭和转移过程中也扮演重要角色。Zhou 等^[7] 研究发现: mTOR 的磷酸化水平从正常乳腺上皮组织、不典型增生到恶性转化再到肿瘤浸润渐次增加, mTOR 在乳腺癌组织中的阳性表达率过高, 与乳腺癌组织具有较高的侵袭性和不良预后有关。本研究结果发现: mTOR 在乳腺浸润性导管癌组织和有淋巴结转移的乳腺癌患者中阳性表达率明显高于癌旁正常乳腺组织和无淋巴结转移患者, 两者间的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。上述结果说明, mTOR 在癌组织和转移淋巴结中高表达可能与乳腺癌的发生、侵袭转移关系密切, 其具体机制还有待进一步研究。

总之, 在乳腺癌组织中, CCR7 和 mTOR 蛋白的阳性表达均与淋巴结转移和临床 TNM 分期相关 (均 $P < 0.05$), 而与年龄、ER 和 PR 均无关 (均 $P > 0.05$)。由于, 淋巴结的转移状况是影响乳腺癌

预后的重要因素之一, 因此可将 mTOR 和 CCR7 的生物治疗应用于临床治疗晚期肿瘤转移患者, 从而为恶性肿瘤的基因靶向治疗提供新的依据。

参考文献

1. Cunningham HD, Shannon LA, Calloway PA, et al. Expression of the C-C chemokine receptor-7 mediates metastasis of breast cancer to the lymph nodes in mice[J]. *Transl Oncol*, 2010, 3(6):354-361.
2. Gunther K, Leier J, Henning G, et al. Prediction of lymph node metastasis in colorectal carcinoma by expression of chemokine receptor CCR7 [J]. *Int J Cancer*, 2005, 116(5):726-733.
3. Mansure JJ, Nassim R, Chevalier S, et al. Inhibition of mammalian target of rapamycin as a therapeutic strategy in the management of bladder cancer [J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(24):2339-2347.
4. Sato T, Nakashima A, Tamanai F, et al. Rheb-mTOR signaling pathway involved in tumor formation [J]. *Pharmacol Res*, 2010, 55(1):11-17.
5. 吕志红, 李学农. 转移相关miRNAs在肿瘤转移中的作用[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2012, 32(4): 307-311.
LÜ Zhihong, LI Xuenong. Effect of tumor metastasis-related miRNAs on tumor metastasis [J]. *International Journal of Pathology and Clinical Medicine*, 2012, 32(4): 307-311.
6. Muller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis [J]. *Nature*, 2001, 410(6824): 50-56.
7. Zhou X, Tan M, Stone Hawthorne V, et al. Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(20): 6779-6788.

(本文编辑 傅希文)

本文引用: 刘清华, 李媛媛, 徐滨, 王竹青, 刘雨清. mTOR 和 CCR7 与乳腺癌侵袭转移的关系 [J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2013, 33(2): 93-97. DOI:10.3969/j.issn.1673-2588.2013.02.001

Cite this article as: LIU Qinghua, LI Yuanyuan, XU Bin, WANG Zhuqing, LIU Yuqing. Relationship between mTOR, CCR 7 and invasive, metastatic in breast carcinoma [J]. *International Journal of Pathology and Clinical Medicine*, 2013, 33(2): 93-97. DOI:10.3969/j.issn.1673-2588.2013.02.001