

乳腺浸润性导管癌中 Paxillin 和 Caspase-3 蛋白的表达及临床意义

仲广生 李孟圈 苏 静

摘要 目的:探讨桩蛋白(Paxillin)和天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)在乳腺浸润性导管癌(IDC)中的表达及其与乳腺浸润性导管癌(IDC)患者临床病理因素的关系。**方法:**采用免疫组化检测术中切除的原发性乳腺浸润性导管癌(IDC)和距癌灶约5 cm处正常乳腺组织中 Paxillin 和 Caspase-3 的表达,统计学分析两者间及其与乳腺浸润性导管癌(IDC)病理特征的关系。**结果:**Paxillin 在 IDC 组的表达高于正常乳腺组织组,差异具有统计学意义($P < 0.05$);Caspase-3 在 IDC 组的表达低于正常乳腺组织组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。在 IDC 组中,Paxillin 的表达与 Her-2 状态相关,2 种蛋白的表达与乳腺 IDC 的淋巴结转移及组织学分级相关,2 种蛋白在 IDC 中的表达呈负相关($r = -0.32, P = 0.013$)。**结论:**Paxillin 和 Caspase-3 的异常表达在乳腺浸润性导管癌(IDC)的发生、发展中可能起着重要的作用,且与乳腺浸润性导管癌(IDC)的浸润转移密切相关。

关键词 乳腺肿瘤 桩蛋白 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.01.006

Expression and Clinical Significance of Paxillin and Caspase-3 in Breast Invasive Ductal Carcinoma

Guangsheng ZHONG, Mengquan LI, Jing SU

Corresponding author: Mengquan LI; E-mail: lmq10332@126.com

Department of Breast Surgery, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Abstract Objective: To explore the expression and clinical significance of paxillin and caspase-3 in breast invasive ductal carcinoma (IDC). **Methods:** The paxillin and caspase-3 expression in IDC tissue and normal mammary specimens were detected by immunohistochemistry. Then, the correlation between the expression of these two proteins and the clinicopathologic characteristics of breast IDC was analyzed. **Results:** The paxillin expression was significantly higher in IDC tissue than in normal mammary tissue ($P < 0.05$), whereas the caspase-3 expression was significantly lower in IDC tissue than in normal mammary tissue ($P < 0.05$). In IDC, the paxillin expression was correlated with the Her-2 level, whereas the paxillin and caspase-3 expression was closely correlated with the lymph-node metastasis and histological grades ($P < 0.05$). Moreover, negative correlations were observed between the paxillin and caspase-3 expression ($r = -0.32; P = 0.013$). **Conclusion:** The abnormal expression of paxillin and caspase-3 plays important roles in the occurrence and development of IDC and correlates with the invasion and metastasis of breast IDC.

Keywords Breast tumor; Paxillin; Caspase-3

针对乳腺癌发生机制及其浸润转移特点的研究已成为当今肿瘤研究的热点。桩蛋白(paxillin)是细胞骨架上的一种磷酸蛋白,可以结合粘着斑蛋白(vinculin),调节细胞移动和播散等功能,在整合素介导的细胞信号转导途径中发挥重要作用。在乳腺癌细胞的黏附、增殖、迁移和恶性转化过程中 paxillin 发挥关键作用^[1],有可能成为乳腺癌的预后评估指标。天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(cysteiny aspartate specific protease-3, Caspase-3),作为 Caspase 家族中重要的凋亡执行者之一,其介导的信号传导途径在细胞凋亡过程中发挥着独特的作用,Caspase-3 表达异常通过对细胞凋亡过程的影响可能与恶性肿瘤的发生发展密切相关。Caspase-3 表达降低在肿瘤的发生发展过程中起着重要作用^[2]。

本实验主要研究2种蛋白与乳腺浸润性导管癌(IDC)临床病理特征的关系,为乳腺癌的治疗和预后评估提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 临床资料

随机选择2006年1月至2007年12月间郑州大学第一附属医院乳腺外科手术切除的原发性乳腺浸润性导管癌标本60例(选取癌组织中央非坏死组织),均为女性,年龄25~71岁,中位年龄45岁;临床分期按国际抗癌联盟(UICC)规定的TNM分期标准进行划分,I期19例,II期26例,III期15例;组织学分级按世界卫生组织(WHO)乳腺癌组织学分类进行划分,I级16例,II级20例,III级24例;腋窝出现淋巴

结转移41例,无淋巴结转移19例。所有患者术前均未接受放、化疗和内分泌治疗,且均施行了乳腺癌根治或改良根治术,术后常规病理证实为浸润性导管癌。另从中随机选择25例距癌灶约5 cm经病理证实的正常乳腺组织作为对照。

1.2 主要试剂

鼠抗人 Paxillin 单克隆抗体购自美国 NeoMarkers 公司,兔抗人 Caspase-3 单克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司,SP 免疫组化超敏试剂盒和显色试剂盒(DAB kit)均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 Paxillin 和 Caspase-3 表达检测

阳性对照用已证实的 Paxillin 和 Caspase-3 阳性片,阴性对照用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗,免疫组化步骤严格按照 SP 试剂盒说明进行。标本经手术切除后立即用4%中性甲醛溶液固定,酒精脱水之后,进行石蜡包埋处理,其后对所有标本行4 μ m连续切片,以免疫组化 SP 法进行染色。检测 Paxillin 和 Caspase-3 在所有标本中的表达。鼠抗人 Paxillin 单克隆抗体和兔抗人 Caspase-3 单克隆抗体的工作浓度分别为1:100和1:400。

1.4 结果判定

Paxillin 的表达定位于细胞膜和(或)细胞质内, Caspase-3 的表达定位于细胞核或细胞质内,以相应着色部位出现棕黄色或棕褐色颗粒样物为阳性表达。判定方法:采用计数法和双盲法进行阅片,先在显微镜下($\times 100, \times 200$)对全片整体观察,然后在显微

镜下($\times 400$)随机选取5个视野,对视野中出现的阳性细胞进行计数,阳性细胞百分比 $\geq 10\%$ 为阳性,阳性细胞百分比 $< 10\%$ 为阴性^[3]。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理。以 χ^2 检验及 Spearman 等级相关进行数据分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 Paxillin 和 Caspase-3 蛋白在细胞中的表达

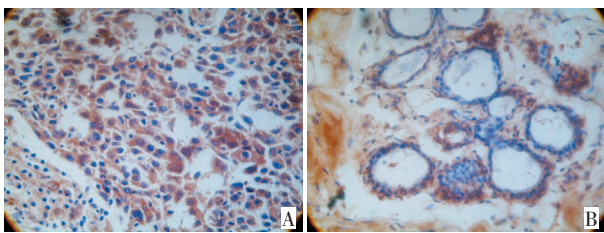
Paxillin 和 Caspase-3 蛋白在乳腺 IDC 组中的阳性表达率分别为65.00%(39/60)、45.00%(27/60), Paxillin 和 Caspase-3 在乳腺正常组织组织中的表达分别为40.00%(10/25)、72.00%(18/25),两项指标在两组间的表达差异均有统计学意义($P < 0.05$)。Paxillin 在乳腺癌组织中的表达强于乳腺正常组织(图1), Caspase-3 在乳腺正常组织中的表达强于乳腺癌组织(图2)。

2.2 Paxillin 和 Caspase-3 蛋白表达与乳腺 IDC 临床病理参数的关系

如表1所示, Paxillin 和 Caspase-3 蛋白的表达与年龄、绝经与否、TNM 分期、ER 和 PR 表达均无明显相关性; Paxillin 和 Caspase-3 蛋白的表达与组织学分级及淋巴结转移与否均具有相关性($P < 0.05$); Paxillin 的表达与 Her-2 状态具有相关性($P < 0.05$)。

2.3 乳腺浸润性导管癌中 Paxillin 和 Caspase-3 表达的关系

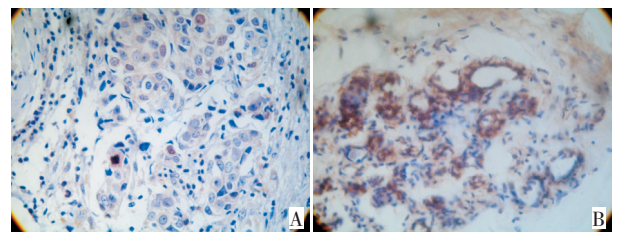
如表2所示, Paxillin 和 Caspase-3 蛋白表达在乳腺 IDC 呈负相关($r = -0.32, P = 0.013$)。



A: 乳腺癌组织; B: 正常乳腺组织

图1 Paxillin 在乳腺组织中的表达(SP $\times 200$)

Figure 1 Staining of paxillin (SP $\times 200$)



A: 乳腺癌组织; B: 正常乳腺组织

图2 Caspase-3 在乳腺组织中的表达(SP $\times 200$)

Figure 2 Staining of caspase-3 (SP $\times 200$)

表1 Paxillin 和 Caspase-3 蛋白表达与乳腺 IDC 临床病理参数的关系 例(%)

Table 1 The relationship of paxillin and caspase-3 expression with clinicopathologic parameters of breast IDC

临床病理	例数	Paxillin 阳性	χ^2	P	Caspase-3 阳性	χ^2	P
年龄(岁)	<50	23(65.71)	0.019	0.891	15(42.86)	0.156	0.693
	≥ 50	16(64.00)			12(48.00)		
月经状况	未绝经	20(64.51)	0.007	0.935	14(45.16)	0.001	0.979
	已绝经	19(65.51)			13(44.82)		

(续表1)

临床病理	例数	Paxillin 阳性	χ^2	P	Caspase-3 阳性	χ^2	P
TNM分期	I	13(68.42)	1.166	0.558	9(47.37)	0.136	0.934
	II	15(57.69)			11(42.30)		
	III	11(73.33)			7(46.67)		
淋巴结转移	无	8(42.10)	6.406	0.011	14(73.68)	9.243	0.002
	有	31(75.60)			13(31.70)		
组织学分级	I	6(37.50)	10.879	0.004	11(68.75)	7.727	0.021
	II	12(60.00)			10(60.00)		
	III	21(87.50)			6(25.00)		
ER	阴性	15(57.69)	1.077	0.299	12(46.15)	0.025	0.875
	阳性	24(70.58)			15(44.11)		
PR	阴性	21(77.77)	3.542	0.061	11(40.74)	0.360	0.549
	阳性	18(54.55)			16(48.48)		
Her-2	阴性	19(52.77)	5.910	0.015	16(44.44)	0.011	0.916
	阳性	20(83.33)			11(45.83)		

表2 Paxillin 和 Caspase-3 蛋白表达在乳腺 IDC 中的关系 例

Table 2 The relationship between the expression of paxillin and caspase-3 protein in breast IDC

Paxillin	Caspase-3		合计
	阳性	阴性	
阳性	13	26	39
阴性	14	7	21
合计	27	33	60

3 讨论

乳腺癌的病因尚未完全阐明,发病机制复杂,标志性分子在乳腺癌的发生发展中扮演着重要角色,当今乳腺癌研究的一大热点便是关于其标志性分子的研究。Paxillin 主要定位于黏着斑,在细胞信号转导中发挥着重要的衔接作用。在整合素介导的细胞信号传导途径中,Paxillin 介导细胞外基质和细胞骨架之间的黏附,继之来调节细胞的增殖、存活、迁移和恶性转化过程。在 3D ECM 模型系统中的研究发现,Paxillin 通过调节 Rac1、RhoA、FAK 和非肌肉肌球蛋白 II 的活动,来调节细胞形态和三维迁移机制,进而调节乳腺癌细胞的侵袭、可塑性和转移机制^[4]。本研究中 Paxillin 在乳腺浸润性导管癌(IDC)组的表达高于正常乳腺组织组($P<0.05$),且 Paxillin 的表达与乳腺浸润性导管癌(IDC)的淋巴结转移及组织学分级相关($P<0.05$),表明 Paxillin 的表达不仅在乳腺浸润性导管癌(IDC)的发生中起着重要作用,同时增加了乳腺浸润性导管癌(IDC)的浸润和转移特性。其具体作用机制可能与 Paxillin 的黏附作用密切相关,通过 Paxillin 的粘附作用促进乳腺癌的发展。Paxillin

的重要合作伙伴非受体酪氨酸激酶,在 Paxillin 的黏附过程中发挥重要作用,其被证实是在乳腺等一些实性肿瘤中高表达^[5]。以往相关研究显示,Paxillin 在肝细胞癌中呈高表达状态,且肝外转移组阳性率显著高于无转移组^[6]。在乳腺癌、前列腺癌中 Paxillin 呈高表达状态,且与肿瘤的浸润转移潜能密切相关^[7-8]。这同本研究结果基本一致。由此,本研究认为检测 Paxillin 的表达可能有助于评估乳腺癌的恶性程度及预测乳腺癌的浸润和转移潜能,控制 Paxillin 的表达,可以明显的抑制肿瘤的侵袭和粘附能力,Paxillin 有可能成为临床抑制乳腺癌浸润和转移的靶点。

肿瘤发生的一个关键环节是细胞凋亡过程受抑制,Caspase 家族在细胞凋亡过程中发挥着关键作用,Caspase-3 作为最重要的凋亡执行者之一,与肿瘤的发生发展密切相关。Caspase-3 通常以非活化酶原的形式存在于细胞质中,经凋亡信号刺激后由非活化转化为活化形式,从而对多种底物蛋白进行降解来实现诱导细胞凋亡过程^[9]。Caspase-3 的低表达使细胞凋亡过程受抑,进而诱发肿瘤的发生。相关研究认为,Caspase-3 在胃癌、肺癌和乳腺癌等恶性肿瘤中呈低表达状态^[10-11]。本研究数据表明 Caspase-3 在乳腺浸润性导管癌(IDC)组中的表达明显低于正常乳腺组织组($P<0.05$),这同以往的研究相一致。Caspase-3 的低表达使细胞正常凋亡过程受抑制,从而促进了乳腺浸润性导管癌(IDC)的发生发展,同时本研究中 Caspase-3 的表达与乳腺浸润性导管癌(IDC)的淋巴结转移情况及组织学分级密切相关($P<0.05$),提示 Caspase-3 在乳腺癌的恶性转化和浸润转移过程中发挥着一定作用,可为乳腺癌的预后评估提供参

考。

本研究中发现, Paxillin 和 Caspase-3 的表达在乳腺浸润性导管癌 (IDC) 中呈负相关 ($r=-0.32$, $P=0.013$), 这说明在乳腺浸润性导管癌 (IDC) 的发生发展过程中, 两者可能存在着某种内在联系。有研究认为, Paxillin 作为 Caspase-3 的裂解底物参与细胞凋亡过程, Paxillin 被裂解为数个不同的蛋白片段, 细胞凋亡进程受到抑制, 同时伴有 Caspase-3 的低表达, 推测其可能机制是 Caspase-3 对 Paxillin 的裂解进行初级调节, 进而破坏 Paxillin 的粘附作用, 阻碍细胞生存信号传导^[12-13], 通过对凋亡过程的调节, 共同参与肿瘤的发生发展过程, 两者在恶性肿瘤的发生发展过程中存在着协同作用。结合本实验数据, 可以认为 Paxillin 和 Caspase-3 的协同作用可能促进了乳腺浸润性导管癌 (IDC) 的发生发展过程, Paxillin 和 Caspase-3 的具体协同机制有待于进一步研究。

更为有意义的是, 本研究数据表明 Paxillin 在乳腺浸润性导管癌 (IDC) Her-2 阳性组的表达高于 Her-2 阴性组 ($P<0.05$), 表明 Paxillin 和 Her-2 在乳腺浸润性导管癌 (IDC) 中的表达存在着相关性。Paxillin 对乳腺癌进展的影响, 一定程度上可能取决于 Her-2 的表达状态, 同时 Paxillin 的表达可能预示着乳腺癌患者对化疗的反应, 而其中 Her-2 的表达状态起着不可或缺的作用^[14]。结合本实验结果, 推测 Paxillin 的上调可能作为一些乳腺癌 Her-2 通路的一部分, 在乳腺癌的进展及浸润转移中发挥重要作用, 对 Paxillin 和 Her-2 的深入研究, 将为乳腺癌 Her-2 阳性患者的治疗提供新的靶点。

综上所述, 本实验结果表明, Paxillin 表达的上调和 Caspase-3 的下调可能促进了乳腺浸润性导管癌 (IDC) 的发生发展过程, 其中两者发挥着一定程度的协同作用, 且两者的表达与乳腺癌的浸润、转移密切相关, 乳腺浸润性导管癌 (IDC) 中 Paxillin 的表达与 Her-2 的表达状态存在一定程度的相关性, 对 Paxillin 和 Caspase-3 的深入研究将为乳腺癌的治疗提供新的靶点和预后评估价值, 同时对 Paxillin 的深入研究, 有可能为 Her-2 阳性的乳腺癌患者的治疗提供新的靶点和预后评估价值。

参考文献

- Sattler M, Pisick E, Morrison PT, et al. Role of the cytoskeletal protein paxillin in oncogenesis[J]. Crit Rev Oncol, 2000, 11(1): 63-76.
- Yang XF, Xin Y, Mao LL. Clinicopathological significance of pten and caspase-3 expressions in breast cancer[J]. Chin Med Sci J, 2008, 23(2): 95-102.
- McGregor BA, Antoni MH. Psychological intervention and health outcomes among women treated for breast cancer: A review of stress pathways and biological mediators[J]. Brain Behav Immun, 2009, 23(2): 159-166.
- Deakin NO, Turner CE. Distinct roles for paxillin and Hic-5 in regulating breast cancer cell morphology, invasion, and metastasis[J]. Mol Biol Cell, 2011, 22(3): 327-341.
- Livasy CA, Moore D, Cance WG, et al. Focal adhesion kinase overexpression in endometrial neoplasia[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2004, 12(4): 342-345.
- 李海刚, 谢德荣, 黎洪浩, 等. 肝细胞癌 Paxillin 和 VEGF 的表达及其临床意义[J]. 中国肿瘤临床, 2004, 31(7): 412-413.
- 孙兴华, 王亚红, 马彬, 等. Paxillin 和 HER-2 在乳腺癌中的表达及意义[J]. 辽宁医学院学报, 2009, 30(3): 203-206.
- Sen A, O'Malley K, Wang Z, et al. Paxillin regulates androgen- and epidermal growth factor-induced MAPK signaling and cell proliferation in prostate cancer cells[J]. J Biol Chem, 2010, 285(37): 28787-28795.
- Chen T, Wong YS, Zheng W, et al. Caspase and p53-dependent apoptosis in breast carcinoma cells induced by asynthetic selenadiazole derivative[J]. Chem Biol Interact, 2009, 180(1): 54-60.
- 应荣彪, 冯俊, 李建军, 等. 胃癌中 survivin 和 caspase-3 的表达及其临床意义[J]. 中国癌症杂志, 2010, 20(1): 17-21.
- 王强, 杨志雄, 廖思海. Fas, FasL 和 Caspase-3 在肺癌中的表达及其临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2009, 17(2): 248-251.
- Deakin NO, Turner CE. Paxillin comes of age[J]. J Cell Sci, 2008, 121(Pt 15): 2435-2444.
- Phipps LE, Hino S, Muschel RJ. Targeting cell spreading: a method of sensitizing metastatic tumor cells to TRAIL-induced apoptosis[J]. Mol Cancer Res, 2011, 9(3): 249-258.
- Short SM, Yoder BJ, Tarr SM, et al. The expression of the cytoskeletal focal adhesion protein paxillin in breast cancer correlates with HER2 overexpression and may help predict response to chemotherapy: a retrospective immunohistochemical study[J]. Breast J, 2007, 13(2): 130-139.

(2011-08-10 收稿)

(2011-11-19 修回)

(邢颖校对)