

·临床研究·

本文引用:胡慧钰,刘姝妍,班翊,李欣.CCR5在三阴性乳腺癌组织中的表达及其对5年生存的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(5):558-561.

CCR5在三阴性乳腺癌组织中的表达及其对5年生存的影响

胡慧钰¹,刘姝妍²,班翊³,李欣^{1*}

(1.中南大学湘雅医院 乳腺科,湖南 长沙 410008;2.吉林大学第二医院 妇产科,吉林 长春 130000;
3.美国康奈尔大学威尔医学院,纽约 美国 10065)

〔摘要〕目的 研究 CCR5 在三阴性乳腺癌(TNBC)中的表达以及其对患者生存预后的影响。方法 使用免疫组化方法检测 CCR5 在 62 例三阴性乳腺癌组织标本中的表达水平,绘制 Kaplan-Meier 曲线分析 CCR5 表达水平对患者生存预后的影响。结果 在 62 例临床三阴性乳腺癌组织标本中,29 例样本 CCR5 高表达,占样本总数的 46.77%;33 例样本 CCR5 低表达,占样本总数的 53.22%。5 年生存分析:CCR5 高表达与三阴性乳腺癌患者 5 年生存呈负相关($P=0.0031<0.05$)。结论 CCR5 在中国湖南地区乳腺癌患者癌组织样本中均有表达,高表达 CCR5 提示患者预后较差,高表达 CCR5 可能促进三阴性乳腺癌进展及转移。

〔关键词〕 CCR5;CCL5;三阴性乳腺癌;5 年生存

〔中图分类号〕 R737.9

〔文献标志码〕 B

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.05.018

CCR5 Expression in Triple-Negative Breast Cancer Tissue and Its Impact on 5 Year Survival

HU Huiyu¹, LIU Shuyan², BAN Yi³, LI Xin^{1*}

(1. Department of Breast Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410008, China;

2. Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Hospital of Jilin University, Changchun, Jilin 130000, China;

3. Weill Cornell Medicine, New York 10065, America)

〔Abstract〕 Objective To investigate the CCR5 expression in triple-negative breast cancer (TNBC) tissue, and its impact on survival prognosis. Methods The CCR5 expression in 62 specimens of TNBC were determined by immunohistochemical staining. Kaplan-Meier estimate was used to analyze the survival prognosis of TNBC patients. Results 29 cases, accounted for 46.77%, showed high expression of CCR5, and 33 cases, accounted for 53.22%, showed low expression of CCR5. High expression of CCR5 was negatively correlated with the 5-year-survival rates of these TNBC patients. Conclusion In the triple negative breast cancer patients in Hunan region of China, CCR5 is expressed. The high level expression of CCR5 indicated bad survival prognosis. CCL5/CCR5 may promote TNBC progression and metastasis.

〔Keywords〕 CCR5; CCL5; triple negative breast cancer; 5-year-survival

三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC)是被定义为缺乏雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor)以及人表皮生长因子 2(human epidermal growth factor re-

ceptor type 2,HER2)表达的亚型乳腺癌^[1],在所有乳腺癌病例中大约占 15%^[2],具有侵袭性强、易复发、易转移、生存期短和病死率高等特点^[3-4]。三阴性乳腺癌因为缺乏有效的受体靶标,临床治疗上现在除

〔收稿日期〕2018-04-22

〔基金项目〕美国 NIH 训练项目(T325T32AI007621-15)。

〔作者简介〕胡慧钰,女,在读硕士研究生,研究方向:乳腺癌的早期诊断与治疗。

〔通讯作者〕*李欣,女,博士,E-mail:xylixin@hotmail.com。

了传统的化疗药物外,治疗选择受到极大限制。

趋化因子是生理上控制免疫细胞迁移的小分子量细胞因子,其功能通过与其同源的、属于G蛋白偶联受体家族的膜受体相结合而实现。受体激活激发了一系列下游信号通路,从而导致细胞迁移。CCL5属于CC趋化因子家族,其功能通过与其同源受体CCR5相结合而实现。CCR5主要表达于T细胞、血小板、巨噬细胞、管状上皮细胞、内皮细胞以及某些特定的肿瘤细胞当中^[5-6]。一项基于TCGA以及METABRIC大数据样本库的研究显示CCL5/CCR5特异性表达于三阴性乳腺癌样本中^[7]。有研究显示,CCR5在基底样乳腺癌(主要为三阴性乳腺癌)的侵袭和转移中发挥重要作用^[8-10]。

本研究旨在探索CCR5在我国三阴性乳腺癌患者中的表达水平,并分析其生存预后差异,为寻求中国TNBC治疗新靶点提供方向。

1 资料与方法

1.1 标本来源

收集2010年10月至2013年3月间于湘雅医院乳腺科行外科手术治疗的三阴性乳腺癌临床资料及手术病理样本共62例。本实验通过湘雅医院伦理委员会批准,伦理号:201308381。病人均签署知情同意书。

1.2 方法及试剂

使用免疫组化方法检测手术样本中CCR5蛋白。脱蜡与染色:福尔马林固定的三阴性乳腺癌组织白片依次浸泡于二甲苯、100%酒精、95%酒精、70%酒精、50%酒精、PBS液中。抗体孵化:抗人CCR5抗体源自R&D systems,二抗为HRP-AEC免疫组化检测试剂盒。最后苏木精染色:CCR5显色为红至红棕色,苏木精显色为蓝色。

1.3 结果判断

CCR5主要表达于癌组织内浸润的中性粒细胞中,苏木精染色后呈现出红至红棕色。定性分析:每张切片随机选择5个高倍镜视野(400倍),以细胞质呈清晰红棕色着色作为阳性表达细胞,记录阳性细胞所占比例及染色强度。评分标准:按阳性细胞数比例计0、1、2、3、4分,分别对应无阳性细胞、≤25%、26%~50%、51%~75%、>75%。按阳性细胞着色程度分别记为0、1、2、3、4分,依次对应无着色、淡红色、红色、红棕色。上述两种计分相加,取2名病理科医师平均值。1~3判为CCR5低表达,4~8判为CCR5高表达。定量分析:将免疫组化染色切片在

显微镜高倍镜视野下定位后,彩色摄像机提取细胞图像输入Image-Pro Plus (IPP)图像处理分析软件,通过图像分割,统计,获得各病理切片细胞CCR5平均吸光光度值(u值)。

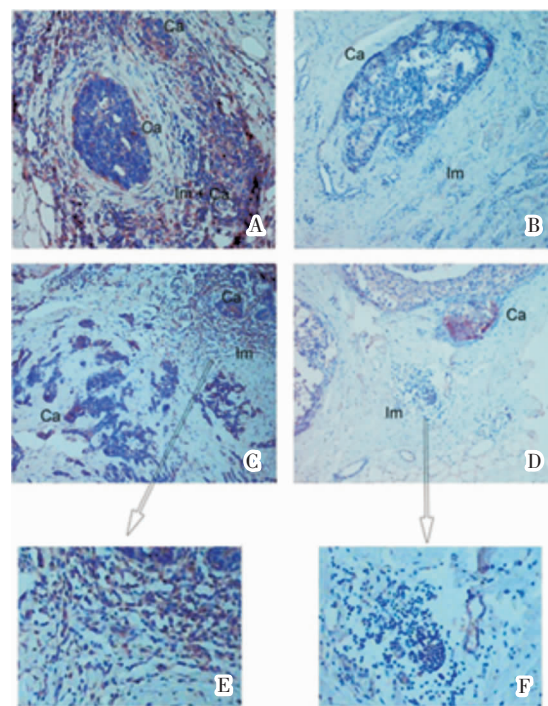
1.4 统计学处理

采用SPSS 21.0统计学软件处理数据,计量资料用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,采用t检验,计数资料用百分率(%)表示,采用 χ^2 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。生存分析Kaplan-Meier 5年生存曲线使用graphpad prism 6系统绘制完成。

2 结果

2.1 CCR5在三阴性乳腺癌中表达情况

CCR5主要表达于癌组织内浸润的中性粒细胞中,在所有62例三阴性乳腺癌临床癌组织样本中,29例样本CCR5高表达,占样本总数的46.77%;33例样本CCR5低表达,占样本总数的53.23%。CCR5高、低水平表达两组u值差异有统计学意义($P = 0.002 < 0.05$)。见图1和表1。



注:A、C:CCR5在癌组织内浸润的中性粒细胞中高表达;B、D:CCR5在癌组织内浸润的中性粒细胞中低表达;E:C图浸润的中性粒细胞CCR5染色局部放大;F:D图浸润的中性粒细胞CCR5染色局部放大

图1 CCR5在三阴性乳腺癌中的表达(免疫组化,×200)

2.2 三阴性乳腺癌患者不同表达水平CCR5与生存预后关系

对62例三阴性乳腺癌患者进行随访,随访结

表1 CCR5在三阴性乳腺癌组织中表达水平

组别	n	u 值		P
		范围	$\bar{x} \pm s$	
CCR5 高表达组	29	0.1002±0.3852	0.2216±0.0749	0.002
CCR5 低表达组	33	0.0002±0.0998	0.0436±0.0382	

果显示 CCR5 高表达组 5 年生存率明显低于 CCR5 低表达组 ($P=0.0031 < 0.05$)。见图 2。

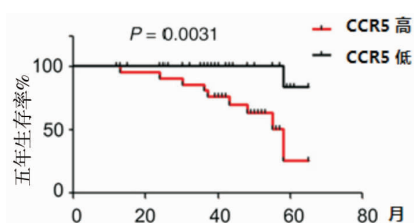


图2 CCR5高、低表达两组病人5年生存Kaplan-Meier曲线

3 讨论

三阴性乳腺癌具有平均发病年龄小、组织学分级高、侵袭性强、细胞增殖率高、易复发转移等特点,化疗是三阴性乳腺癌目前唯一有效的全身综合治疗手段。有荟萃分析综合了全球 13 份研究数据,包含 3 087 位患者以及 3 735 名对照成员,研究显示 CCL5 及其受体 CCR5 高表达与乳腺癌易感性明显相关,而与膀胱癌、宫颈癌、胰腺癌、前列腺癌以及头颈部癌症无明显关系^[1]。一项基于 TCGA 以及 METABRIC 大数据样本库的研究,在比较了 Luminal A 型、Luminal B 型、Her 2 阳性型及基底样型乳腺癌各亚型中 CCL5/CCR5 表达水平后发现,CCL5/CCR5 特异性表达于三阴性乳腺癌样本中^[7]。

在肿瘤的发生、发展、转移与迁徙过程中,肿瘤微环境一直扮演着重要角色,肿瘤微环境包含了肿瘤及其周围细胞、血管、细胞外间质、细胞因子以及细胞趋化因子^[12]。CCL5(chemokine C-C motif ligand 5),又被称之为 RANTES (regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted),它是一个参与癌症炎症进程的重要细胞趋化因子。CCL5 基因位于人类常染色体 17q11.2-q12 上,编码的蛋白质在许多生理过程中扮演重要角色^[13]。CCL5 介导了免疫细胞的迁移与趋化。研究发现,乳腺癌组织中的 CCL5 主要来源于 MSCs^[14-15]。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种具有多向分化潜能的前体细胞,其在软骨、骨、脂肪、肌肉等组织的再生中起重要作用^[16]。研究中当乳腺癌细胞与 MSCs 在体外共同培养时, MSCs 将释放大量 CCL5^[17]。而且,

缺氧与 CCL5 可共同刺激乳腺癌细胞分泌 CSF1 (colony-stimulating factor 1),后者促使 MSCs 分泌更多的 CCL5,从而形成正循环^[18]。在此过程中,CSF1 介导了肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)分泌表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF),从而促进乳腺癌细胞的转移^[18]。有实验构建 CCL5 过表达的乳腺癌细胞系,并观察到其细胞运动能力与侵袭性显著增加,从而使得其在体内经由血管到达身体远处部位形成转移灶能力显著提高,证实了 CCL5 促进乳腺癌细胞转移^[17]。CCL5 还通过促进金属蛋白酶(metalloproteinases, MMPs)的分泌,破坏细胞外间质蛋白,加速肿瘤细胞的迁移^[19-20]。动物模型实验证实,与原发性灶相比较,转移灶癌细胞中 CCR5 表达阳性的乳腺癌细胞比例增加了 8 倍^[21]。

在人三阴性乳腺癌细胞系(MDA-MB-231)中,也证实了 CCL5 可以促进其增殖潜能^[22]。人体实验表明,血浆 CCL5 浓度与 TGF- β 1 正相关^[23],而 CCL/CCR5 复合体正是通过促进 T 调节细胞分泌 TGF- β 来加速抗癌免疫细胞 CD8⁺ T 细胞的凋亡,从而加速癌症进程^[24],可以判断 CCR5 阳性的乳腺癌细胞增殖侵袭能力更强。国内鲜有研究报道中国南方三阴性乳腺癌患者中 CCR5 表达水平及其预后。本研究首次证实中国南方三阴性乳腺癌患者癌组织中 CCR5 表达水平,并发现高水平 CCR5 表达与患者预后呈负性相关。而既往体内外研究也证明了 CCL5/CCR5 直接促进乳腺癌进展与转移^[21-24]。这项结论也同时可以解释为何三阴性乳腺癌较其他类型乳腺癌复发转移风险更高。

2014 年,CCL5-CCR5 复合体结构被公诸于世^[25],这为抑制其功能从而降低乳腺癌复发转移风险提供了新的方向。现在国际市场上已有针对 CCR5 的单抗药物 Maraviroc 应用于抗 HIV 治疗中^[26],并通过美国药品食品管理局(US food and drug administration, FDA)批准。已有临床试验证实了 maraviroc 可以有效降低乳腺癌患者肺转移瘤的发生^[26]。另有文献报道,原花青素(procyanidins, PC)对三阴性乳腺癌也有一定抑制作用^[27],这也为中国乳腺癌患者尤其是三阴性乳腺癌患者的治疗提供了新的方向。

参考文献:

- [1] FOULKES W D, SMITH I E, REIS-FILHO J S. Triple-negative breast cancer[J]. N Engl J Med, 2010,363(20):1938-1948.
- [2] REIS-FILHO J S, TUTT A N. Triple negative tumours: a criti-

- cal review[J]. *Histopathology*, 2008, 52(1):108-118.
- [3] CAREY L, WINERE, VIALE G, et al. Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2010,7(12):683-692.
- [4] MONTAGNA E, BAGNARDI V, ROTMENSZ N, et al. Outcome and Medial Presentation of Breast Cancer: European Institute of Oncology Experience[J]. *Clin Breast Cancer*, 2015,15(6): 440-447.
- [5] APPAY V, ROWLAND-JONES S L. RANTES: a versatile and controversial chemokine[J]. *Trends in Immunology*, 2001,22(2): 83-87.
- [6] LEVY J A. The unexpected pleiotropic activities of RANTES[J]. *J Immunol*, 2009,182(7):3945-3946.
- [7] FERTIG E J, LEE L, PANDEY N B, et al. Analysis of gene expression of secreted factors associated with breast cancer metastases in breast cancer subtypes[J]. *Sci Rep*, 2015,5:12133.
- [8] MANES S, MIRA E, COLOMER R, et al. CCR5 expression influences the progression of human breast cancer in a p53-dependent manner[J]. *J Exp Med*, 2003,198(9):1381-1389.
- [9] MUROOKA T T, RAHBAR R, FISH E N. CCL5 promotes proliferation of MCF-7 cells through mTOR-dependent mRNA translation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009,387(2):381-386.
- [10] VADAY G G, PEEHL D M, KADAM P A, et al. Expression of CCL5 (RANTES) and CCR5 in prostate cancer [J]. *Prostate*, 2006, 66(2):124-134.
- [11] LEE Y H, BAE S C, SONG G G. Association between the chemokine receptor 5 delta32 polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis[J]. *Mod Rheumatol*, 2013,23(2): 304-310.
- [12] ALLINEN M, BEROUKHIM R, CAI L, et al. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer[J]. *Cancer Cell*, 2004,6(1): 17-32.
- [13] DONLON T A, KRENSKY A M, WALLACE M R, et al. Localization of a human T-cell-specific gene, RANTES (D17S136E), to chromosome 17q11.2-q12[J]. *Genomics*, 1990,6(3): 548-553.
- [14] JAYASINGHE M M, GOLDEN J M, NAER P, et al. Tumor-derived CCL5 does not contribute to breast cancer progression[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2008,111(3):511-521.
- [15] ZHANG Y, LV D, KIM H J, et al. A novel role of hematopoietic CCL5 in promoting triple-negative mammary tumor progression by regulating generation of myeloid-derived suppressor cells[J]. *Cell Res*, 2013, 23(3): 394-408.
- [16] PITTENGER M F, MACKAY A M, BECK S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284(5411):143-147.
- [17] KARNOUB A E, DASH A B, VO A P, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis[J]. *Nature*, 2007, 449(7162): 557-563.
- [18] CHATURVEDI P, GILKES D M, TAKANO N, et al. Hypoxia-inducible factor-dependent signaling between triple-negative breast cancer cells and mesenchymal stem cells promotes macrophage recruitment[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014,111(20): 2120-2129.
- [19] SWAMYDAS M, RICCI K, REGO S L, et al. Mesenchymal stem cell-derived CCL-9 and CCL-5 promote mammary tumor cell invasion and the activation of matrix metalloproteinases[J]. *Cell Adh Migr*, 2013,7(3): 315-324.
- [20] YANG Y, WOLFRAM J, SHEN J, et al. Live-cell single-molecule imaging reveals clathrin and caveolin-1 dependent docking of SMAD4 at the cell membrane [J]. *FEBS Lett*, 2013,587 (24): 3912-3920.
- [21] VELASCO-VELAZQUEZ M, PESTELL R G. The CCL5/CCR5 axis promotes metastasis in basal breast cancer [J]. *Oncoimmunology*, 2013,2(4):e23660.
- [22] LIN S, WAN S, SUN L, et al. Chemokine C-C motif receptor 5 and C-C motif ligand 5 promote cancer cell migration under hypoxia[J]. *Cancer Sci*, 2012,103(5): 904-912.
- [23] HARTMANN M C, DWYER R M, 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.
- [24] CHANG L Y, LIN Y C, MAHALINGAM J, et al. Tumor-derived chemokine CCL5 enhances TGF-beta-mediated killing of CD8(+) T cells in colon cancer by T-regulatory cells[J]. *Cancer Res*, 2012,72(5): 1092-1102.
- [25] TAMAMIS P, FLOUDAS C A. FLOUDAS C A. Elucidating a key anti-HIV-1 and cancer-associated axis: the structure of CCL5 (Rantes) in complex with CCR5[J]. *Sci Rep*, 2014,4:5447.
- [26] VELASCO-VELAZQUEZ M, JIAO X, FUENTE M, et al. CCR5 antagonist blocks metastasis of basal breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2012,72(15): 3839-3850.
- [27] 黄秉一,徐朝军,宋 岚.原花青素促进三阴性乳腺癌MDA-MB-231细胞凋亡的作用机制研究[J].*湖南中医药大学学报*,2017,37(11):1196-1199.

(本文编辑 李 杰)