

· 临床研究 ·

VEGF和p53在三阴性乳腺癌患者组织和血清中表达及预后研究

许立生¹,王 水²,赵志泓^{1*},王 坤¹¹江苏大学附属医院甲乳外科,江苏 镇江 212001;²南京医科大学第一附属医院乳腺病中心,江苏 南京 210029

[摘要] 目的:探讨血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)与p53在三阴性乳腺癌患者组织和血清中的表达情况以及与预后的关系。方法:选择江苏大学附属医院2013年6月—2016年5月收治经病理确诊的乳腺癌患者390例,其中三阴性乳腺癌80例,非三阴性乳腺癌310例。采用免疫组织化学法检测患者乳腺癌组织中VEGF、p53蛋白表达水平,采用荧光定量PCR法检测患者血清VEGF、p53 mRNA水平,并分析上述指标与患者病理特征及预后的关系。结果:三阴性乳腺癌组织中VEGF和p53蛋白表达阳性率均明显高于非三阴性乳腺癌组织,差异有统计学意义(VEGF:47.50% vs. 30.00%, $P < 0.05$; p53:57.50% vs. 32.90%, $P < 0.05$)。三阴性与非三阴性乳腺癌患者血清VEGF mRNA水平分别为 4.12 ± 1.76 和 3.02 ± 1.51 , p53 mRNA水平分别为 4.98 ± 1.29 和 2.62 ± 1.02 ,差异均有统计学意义($t=5.608, 17.418, P < 0.05$)。Pearson相关性分析表明,血清VEGF mRNA与组织VEGF、p53 mRNA与组织p53蛋白表达水平均具有显著正相关关系($r=0.717, 0.743, P < 0.05$)。VEGF和p53蛋白在三阴性乳腺癌组织中的表达均与TNM分期、组织学分级和淋巴结是否转移有显著关系($P < 0.05$),与年龄、肿瘤直径无显著关系($P > 0.05$)。三阴性乳腺癌组织VEGF、p53阳性表达者3年总存活率显著低于阴性患者,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。结论:VEGF、p53阳性表达与三阴性乳腺癌发生、进展、淋巴结转移及预后不良密切相关。

[关键词] 三阴性乳腺癌;血管内皮生长因子;p53;免疫组织化学;预后

[中图分类号] R737.9

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2021)01-118-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20210122

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,近年来我国乳腺癌发病率逐年升高,且呈现年轻化趋势^[1]。乳腺癌类型众多,其中雌激素受体、孕激素受体和人类表皮生长因子受体-2均阴性的乳腺癌称为三阴性乳腺癌,该类型具有极强的侵袭性,总生存率较差,内脏转移率高^[2]。研究表明,多种基因的突变和表达异常在乳腺癌发生、进展和转移中具有重要作用,近年来关于乳腺癌早期筛查、诊断以及疗效、预后评估的相关报道众多^[3-4]。基于此,本研究探讨了血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、抑癌基因p53在乳腺癌组织及患者血清中的表达以及与预后的关系。

1 对象和方法

1.1 对象

选择江苏大学附属医院2013年6月—2016年5月收治且经病理确诊的390例乳腺癌患者作为研

[基金项目] 江苏大学附属医院科技项目(jdfyRC2018007)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhaozhsocow@163.com

究对象,均为女性,年龄37~69岁,平均年龄(49.5 ± 12.3)岁;TNM分期:Ⅰ期67例,Ⅱ期195例,Ⅲ期126例,Ⅳ期2例;三阴性乳腺癌80例,非三阴性乳腺癌310例。所有病例术前均未接受放疗、化疗、内分泌治疗、非甾体类抗炎药物治疗及其他针对肿瘤的生物靶向治疗;临床资料完整,且对本研究知情同意。本研究经医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学检测

严格按照免疫组织化学SP法检测乳腺癌组织样本中VEGF和p53蛋白表达水平。以磷酸盐缓冲液代替一抗作为阴性对照,已知抗体阳性的乳腺癌组织样本作为阳性对照。p53位于细胞核,VEGF位于细胞膜或细胞浆,以相应部位出现淡黄色至棕色颗粒作为阳性。由2名病理医师独立观察每张切片中5个400倍镜视野下的200个细胞,从以下两个方面综合评价:①染色强度:无着色,0分;浅黄色,1分;棕黄色,2分;棕褐色,3分;②阳性细胞率:无阳性细胞,0分; $\leq 10\%$,1分; $> 10\% \sim 50\%$,2分; $> 50\% \sim 75\%$,3分; $> 75\%$,4分。以上两者乘积作为最后

结果,其中0~2分为阴性(-),≥3分阳性。

1.2.2 荧光定量PCR检测

取患者空腹肘静脉血5 mL,3 000 r/min离心10 min,收集血清。采用TRIzol试剂盒(Thermo Fisher公司,美国)提取血清中的RNA。根据Prime-Script™逆转录酶试剂盒说明书进行反转录,反应体系为20 μL,反应条件:30 ℃ 10 min,42 ℃ 30 min,95 ℃ 5 min,反应产物即为cDNA,于-20 ℃保存。采用All-in-One qPCR MixRT-PCR试剂盒说明书进行定量PCR检测,反应体系25 μL。反应条件:95 ℃预变性5 min,95 ℃退火30 s,60 ℃延伸30 s,40个循环。VEGF上游引物5'-GCACCCATG-GCAGAAGGAGGAG-3',下游引物5'-GTGCTGAC-GCGCTAACTGACC-3';p53上游引物5'-ATGGAG-GAGCCGCAGTCAG-3',下游引物5'-TCAGTCT-GAGTCAGGCCCTTC-3';GAPDH为内参,上游引物5'-CTCAGACACCATGGGAAGGTGA-3',下游引物5'-ATGATCTTGAGGCTGTTGTCATA-3'。PCR扩增完成后,根据扩增曲线读取循环数(Ct),将GAPDH作为内参基因,采用相对定量法以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 对血清中VEGF和p53表达水平进行相对定量分析。

1.2.3 随访

术后对所有患者进行随访,末次随访截至2019年9月。记录患者的3年生存情况。

1.3 统计学方法

采用SPSS 15.0软件,计数资料表示为例数(百分率),VEGF和p53表达水平与患者临床病理因素相关性使用 χ^2 检验和Fisher's精确概率法分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验。采用Pearson相关分析进行相关性检验。生存曲线采用Kaplan-Meier法。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 VEGF和p53的表达

三阴性乳腺癌组织中VEGF和p53蛋白表达阳性率分别为47.50%(38/80)和57.50%(46/80),明显高于非三阴性乳腺癌组织的30.00%(93/310)和32.90%(102/310),两组比较,差异均具有统计学意义($P < 0.05$,表1)。典型病理图片见图1。

三阴性乳腺癌与非三阴性乳腺癌患者血清VEGF mRNA水平分别为 4.12 ± 1.76 和 3.02 ± 1.51 ,p53 mRNA水平分别为 4.98 ± 1.29 和 2.62 ± 1.02 ,差异具有统计学意义($t=5.608, 17.418, P < 0.001$)。Pearson

表1 VEGF和p53蛋白在三阴性和非三阴性乳腺癌组织中的表达 [n(%)]

分组	VEGF阳性	p53阳性
三阴性乳腺癌(n=80)	38(47.50)	46(57.50)
非三阴性乳腺癌(n=310)	93(30.00)	102(32.90)
χ^2 值	8.730	16.338
P值	0.003	<0.001

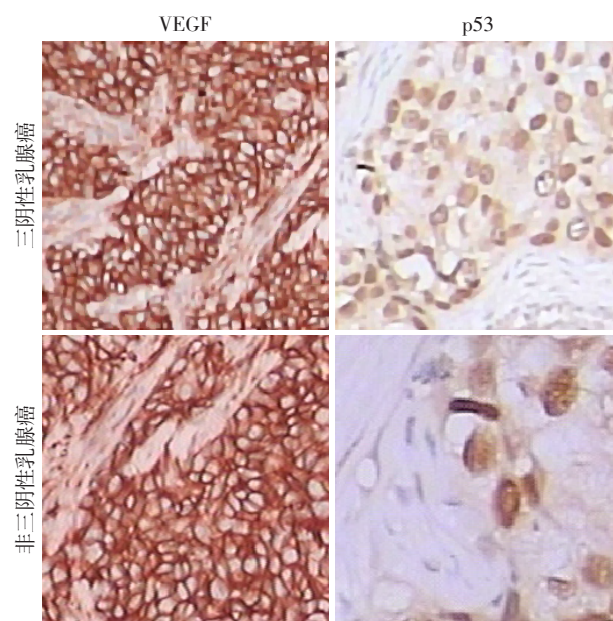


图1 VEGF、p53在三阴性乳腺癌和非三阴性乳腺癌中的表达(SP,×200)

相关性分析表明,血清VEGF mRNA水平与组织VEGF表达水平、p53 mRNA水平与组织p53表达水平均具有显著正相关关系($r=0.717, 0.743, P < 0.05$)。此外,血清中VEGF mRNA和p53 mRNA水平、组织VEGF和p53蛋白表达水平均呈正相关($r=0.524, r=0.624, P < 0.05$)。

2.2 VEGF和p53表达与病理特征的关系

VEGF和p53蛋白在三阴性乳腺癌组织中的表达均与TNM分期、组织学分级和淋巴结是否转移有显著关系($P < 0.05$),与年龄、肿瘤直径均无显著关系($P > 0.05$,表2)。

2.3 乳腺癌的预后因素分析

生存分析显示,VEGF阳性的3年生存率比VEGF阴性者低,p53阳性的乳腺癌患者3年生存率比p53阴性者低。Log-rank(Mantel-Cox)检测差异均具有统计学意义($P < 0.05$,图2、3)。因此,VEGF和p53的表达可以作为乳腺癌的预后因子。

3 讨论

三阴性乳腺癌作为乳腺癌的一种特殊类型,临

表2 VEGF和p53蛋白在三阴性乳腺癌组织中的表达与病理特征之间的关系

临床特征	例数	VEGF表达			p53表达		
		阳性[n(%)]	χ^2 值	P值	阳性[n(%)]	χ^2 值	P值
年龄			0.029	0.866		0.169	0.690
< 50岁	45	21(46.7)			25(55.6)		
≥50岁	35	17(48.6)			21(60.0)		
TNM分期			21.278	<0.001		5.946	0.015
I~II	54	16(29.6)			26(48.1)		
III~IV	26	22(84.6)			20(76.9)		
组织学分级			13.486	0.001		14.545	0.001
I级	16	3(18.8)			4(25.0)		
II级	42	18(42.9)			23(54.8)		
III级	22	17(77.3)			19(86.4)		
肿瘤直径			0.111	0.739		0.718	0.397
≤2 cm	31	14(45.2)			16(51.6)		
> 2 cm	49	24(49.0)			30(61.2)		
淋巴结转移			45.748	<0.001		15.763	<0.001
有	32	30(93.8)			27(84.4)		
无	48	8(16.7)			19(39.6)		

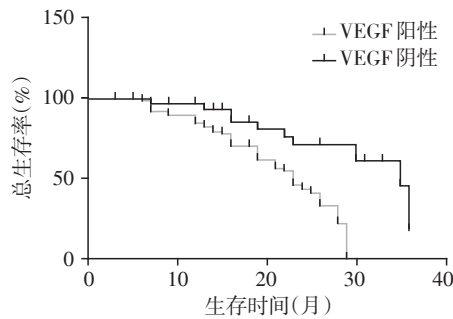


图2 VEGF阳性和阴性的乳腺癌患者生存曲线图

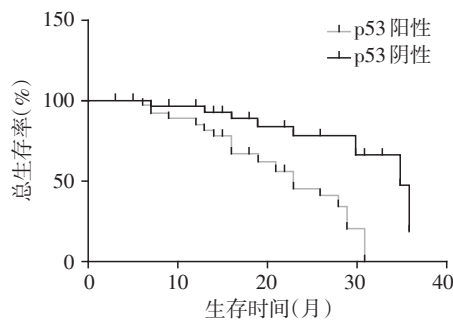


图3 p53阳性和阴性的乳腺癌患者生存曲线图

床复发率较高,预后较差,容易在早期复发转移^[5]。随着分子生物技术的不断发展,人们已经发现抑癌基因失活和/或多种癌基因过度激活在乳腺癌发生、发展中占重要地位,对于此类标志物的深入研究也成为了临床关注的热点^[6-7]。

VEGF是促进肿瘤微血管生成的重要因子,特

异性作用于血管内皮细胞,促进新生血管的形成和肿瘤生长;同时VEGF也是一种血管通透性诱导因子,可增加微血管特别是毛细血管后静脉和小静脉的通透性,加快肿瘤生长和转移^[8-9]。p53基因是迄今已发现的与人类肿瘤发生相关性最强的抑癌基因,可分为野生型和突变型两种,前者能诱导终末分化,维持基因稳定,触发衰老和诱导细胞凋亡,抑制肿瘤的发生^[10-11]。而突变型为促癌基因,可抑制野生型p53的活性,从而引起细胞的转化,促进细胞癌变^[12]。很多研究表明,p53的高表达提示肿瘤细胞活跃,与局部浸润和转移、肿瘤的恶性程度呈正相关,临床预后差,短期生存率低^[13-14]。正常细胞内p53基因为野生型,而癌变细胞内突变型p53蛋白表达量高、半衰期长,常规免疫组化方法易于检出^[15]。

本研究结果显示,三阴性乳腺癌组织中VEGF蛋白和p53蛋白表达阳性率均明显高于非三阴性乳腺癌组织,差异有统计学意义($P < 0.05$),VEGF和p53蛋白在三阴性乳腺癌组织中的表达均与TNM分期、组织学分级和淋巴结是否转移有显著关系($P < 0.05$)。有学者曾采用酶联免疫吸附法检测不同类型乳腺癌患者VEGF的表达情况,结果表明三阴性乳腺癌患者VEGF阳性表达率显著高于非三阴性乳腺癌患者。随访发现,三阴性乳腺癌组织VEGF、p53阳性表达者3年总存活率显著低于阴性患者。本研究还发现三阴性乳腺癌患者血清VEGF水平显

著高于非三阴性乳腺癌患者,且组织与血清 VEGF、p53 表达水平具有明显正相关关系,提示血清与乳腺癌组织中 VEGF、p53 蛋白水平都可作为评估三阴性乳腺癌患者预后的指标。VEGF 阳性表达或高表达能够在一定程度上促进三阴性乳腺癌患者血管内皮细胞的增殖,进而促使肿瘤新生血管数量不断增加,最终起到促进三阴性乳腺癌浸润以及淋巴结转移的效果。

综上所述,VEGF、p53 阳性表达与三阴性乳腺癌发生、进展、淋巴结转移及预后不良密切相关,血清中 VEGF、p53 也可作为三阴性乳腺癌发生、进展和预后等的生物标志物,可进一步采用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)评价血清 VEGF、p53 水平在三阴性乳腺癌诊断和预后中的评估效能。后续研究将纳入更多病例,增加随访时间,同时研究标志物之间的相关性,进一步证实研究结论。

[参考文献]

[1] 王建明,赵宏光,徐恩伟. 年轻女性乳腺癌的数字钼靶表现及临床病理特点分析[J]. 中国药物与临床,2017,17(8):1146-1148

[2] 洪 雷,魏素菊,马 静,等. 501 例三阴乳腺癌患者预后生存因素分析[J]. 中国卫生统计,2015,12(1):66-67,70

[3] 赵美琳,李卓琳,丁莹莹. 乳腺癌异质性的影像学研究现状[J]. 放射学实践,2018,33(2):215-218

[4] KIANG D T, GREENBERG L J, KENNEDY B J. Tumor marker kinetics in the monitoring of breast cancer [J]. *Cancer*,2015,65(2):193-199

[5] TANIGUCHI H, HOSHINOD, MORIYA C, et al. Silencing PRDM14 expression by an innovative RNAi therapy inhibits stemness, tumorigenicity, and metastasis of breast cancer[J]. *Oncotarget*,2017,8(29):46856-46874

[6] LI R K, GAO J, GUO L H, et al. PTENP1 acts as a ceRNA to regulate PTEN by sponging miR-19b and explores the biological role of PTENP1 in breast cancer [J]. *Cancer Gene Ther*,2017,24(7):309-315

[7] 张海燕,李铁军,陈 亮,等. 抑癌基因 ARHI 在三阴性乳腺癌中的表达及临床意义[J]. 中国医学装备,2017,14(4):120-123

[8] 姜 艺,吴 昊. 长链非编码 RNA MCM3AP-AS1 在老年晚期乳腺癌患者肿瘤组织中的表达及临床病理意义 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2019,39(11):1589-1593

[9] 张 喆,贾立周,唐 奇,等. TROP2 和 VEGFR2 在三阴性乳腺癌中的表达及与临床病理因素的相关性研究 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2019,39(10):1453-1458,1471

[10] KOYAMA R, TAMURA M, NAKAGAKI T, et al. Identification and characterization of a metastatic suppressor BRMS1L as a target gene of p53 [J]. *Cancer Sci*,2017,108(12):2413-2421

[11] SIMON M, MESMAR F, HELGUERO L, et al. Genome-wide effects of MELK-inhibitor in triple-negative breast cancer cells indicate context - dependent response with p53 as a key determinant [J]. *PLoS one*,2017,12(2):e0172832

[12] SHIMIZU C, FUKUTOMI T, TSUDA H, et al. c-erbB-2 protein overexpression and p53 immunoreaction in primary and recurrent breast cancer tissues [J]. *J Surg Oncol*,2015,73(1):17-20

[13] 金永焕,倪光华. 细胞缺氧诱导因子 1 α 、血管内皮生长因子和 P53 基因在肝外胆管癌中的表达及其意义 [J]. 延边大学医学学报,2015,38(4):261-263

[14] DOS SANTOS M B, BERTHOLIN ANSELMO D, DE OLIVEIRA J G, et al. Antiproliferative activity and p53 upregulation effects of chalcones on human breast cancer cells [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*,2019,34(1):1093-1099

[15] 常 青,胡耀杰,陈春悠,等. 人端粒酶逆转录酶与 p53 蛋白在老年人甲状腺癌组织中的表达及临床意义 [J]. 中华老年医学杂志,2016,35(2):171-173

[收稿日期] 2019-12-11