

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.05.021

三阴性乳腺癌中 MMP9 和 P53 的表达与其预后的关系研究 *

黄 硕 陈 健 贾谊君 王永坤 陆云姝 吴克瑾[△]

(上海交通大学医学院附属新华医院 上海 200092)

摘要 目的:研究三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)中基质金属蛋白酶 9(matrix metal proteinase 9, MMP9)和 P53 的表达及其与三阴性乳腺癌预后的关系。**方法:**收集 2002 年 3 月至 2011 年 7 月上海交通大学医学院附属新华医院普外科诊治且临床资料完整的 TNBC 标本 147 例, 通过免疫组化检测其 MMP9、P53 的表达。结合临床随访数据, 分析 MMP9、P53 的表达与 TNBC 预后的关系。**结果:**TNBC 占同期本院收治的乳腺癌 13.3%(147/1103)。MMP9、P53 在 TNBC 中的阳性表达率分别为 47.6% 和 66.0%。MMP9 与 TNBC 患者的淋巴结转移数显著相关($P=0.003$)。MMP9 表达阳性的 TNBC 与 MMP9 表达阴性 TNBC 患者 60 个月的无病生存(disease free survival, DFS)率分别为 62%和 83%, 差异具有统计学意义($P=0.001$); 总体生存率(overall survival, OS)率分别为 66%和 73%, 差异具有统计学意义($P=0.022$)。P53 表达阳性的 TNBC 和 P53 表达阴性的 TNBC 患者 60 个月的 DFS 分别为 65%和 87%($P=0.010$); OS 分别为 60%和 85%($P=0.005$)。MMP9 和 P53 的 HR 分别为 3.353(95%CI: 1.614-6.966, $P=0.001$)和 2.979 (95%CI: 1.239-7.165, $P=0.015$)。**结论:**MMP9 和 P53 在 TNBC 中的阳性表达与患者的预后不良有关, 且 MMP9 为影响 TNBC 患者预后的独立危险因素。

关键词:基质金属蛋白酶 9; P53; 三阴性乳腺癌; 预后

中图分类号:R737.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)05-881-04

Research on the Correlation of MMP9 and P53 Expression with the Prognosis of Triple Negative Breast Cancer*

HUANG Shuo, CHEN Jian, JIA Yi-jun, WANG Yong-kun, LU Yun-shu, WU Ke-jin[△]

(Departments of Surgery, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, 200092, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of MMP9 (matrix metal proteinase 9, MMP9) and P53 in TNBC (triple negative breast cancer, TNBC), and their relationship with the prognosis of TNBC. **Methods:** 147 cases of TNBC Paraffin specimens with complete clinical data which were treated in General Surgery Department, Affiliated Xinhua Hospital of Shanghai Jiaotong from March 2002 to July 2011 were collected. Expression of MMP9 and P53 were detected by immunohistochemistry. Combined with clinical follow-up data, the relationship between expression of MMP9/ P53 and TNBC prognosis was studied. **Results:** In 1103 cases of breast cancer, 147 cases were TNBC (13.3%). The positive expression rate of MMP9 and P53 in TNBC were 47.6% and 66.0% respectively. MMP9 expression was associated with the number of metastasizing lymph nodes ($P=0.003$). The 60 months DFS (disease free survival rate) of TNBC patients with positive and negative MMP9 expression were 62% and 83% respectively, ($P=0.001$) and OS (Overall survival rate) were 66% and 73% ($P=0.022$). The 60 months DFS of TNBC patients with positive and negative P53 expression were 65% and 87% respectively ($P=0.010$), and OS were 60% and 85% ($P=0.005$). The hazard ratio of metastasis or recurrence for the status of MMP9 and P53 were 3.353 (95%CI: 1.614-6.966, $P=0.001$) and 2.979 (95%CI: 1.239-7.165, $P=0.015$) respectively. **Conclusion:** The upregulation of MMP9 and P53 expression were associated with the poor prognosis of patients with TNBC, and MMP9 was an independent risk factor. high expression of MMP9 and P53 indicated poor prognosis in TNBC.

Key words: MMP9; P53; Triple negative breast cancer; Prognosis

Chinese Library Classification(CLC): R737.9 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)05-881-04

前言

临床上, 将雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR) 和原癌基因人类表皮生长因子受体

2(human epidermal growth factor receptor-2, HER2)表达阴性的乳腺癌定义为三阴性乳腺癌 (triple negative breast cancer, TNBC), 占乳腺癌发病率的 10.6%-29.5%^[1-4]。与其他亚型的乳腺癌比较, TNBC 较常见于年轻女性, 且更具侵袭和转移性^[5,6]。

* 基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(81102016)

作者简介: 黄硕(1985-), 男, 医学硕士, 乳腺癌的预后及治疗

[△] 通讯作者: 吴克瑾, E-mail: kejinwu@163.com

(收稿日期: 2013-09-15 接受日期: 2013-10-11)

由于 TNBC 缺少治疗的靶点, 目前还没有建立一套标准的治疗方案^[7-8]。研究表明, MMP9 和突变型 P53 参与多种肿瘤的进程。本研究旨在探讨 MMP9 和突变型 P53 的表达与 TNBC 预后的关系, 为寻找 TNBC 潜在的治疗靶点提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 病例资料

收集 2002 年 3 月至 2011 年 7 月上海交通大学医学院附属新华医院普外科诊治且临床资料完整的 TNBC 147 例。所有

病例术前均未接受任何新辅助化疗或放疗, 其中 125 例行乳腺癌改良根治术; 12 例行乳房单纯手术; 7 例行肿块切除; 3 例行乳腺癌根治术。术后有放疗指征的患者接受了相应的放疗处理。在手术和辅助治疗结束后的前 2 年间, 每 3 个月对患者进行一次随访, 第 3-5 年每 6 个月进行一次随访, 5 年以后每年进行一次随访。每次随访包括体格检查、血液检测(血常规、生化指标和肿瘤标记物)、胸部 CT 平扫、腹部 B 超/CT、乳房 B 超/X 射线检查/乳房核磁共振、骨扫描和骨密度检测等。用无病生存率来描述一定时间内未发生局部复发转移患者的比例;

表 1 MMP9 和 P53 的表达与 TNBC 患者临床特征的关系

Table1 The correlation of MMP9, P53 expression with the clinical parameters of 147 cases of TNBCs

Clinical parameters	MMP9 n(%)		P	P53(%) n(%)		P
	Negative	Positive		Negative	Positive	
Menstrual status						
postmenopausal	27(51.9%)	25(48.1%)	0.934	20(38.5%)	32(61.5%)	0.400
menstruating	50(52.6%)	45(47.4%)		30(31.6%)	65(68.4%)	
Metastasizing						
lymph node						
numbers	72(57.6%)	53(42.4%)	0.003	46(36.8%)	79(63.2%)	0.089
< 4	5(22.7%)	17(77.3%)		4(18.2%)	18(81.8%)	
≥ 4						
Tumor size						
≤ 2cm	38(51.6%)	28(42.4%)	0.255	25(37.9%)	41(62.1%)	0.372
> 2cm	39(48.1%)	42(51.9%)		25(30.9%)	56(69.1%)	
Stage						
0	3(60.0%)	2(20.0%)	0.096	2(40.0%)	3(60.0%)	0.357
I、II	68(55.7%)	54(44.3%)		44(36.1%)	78(63.9%)	
III	6(30.0%)	14(70.0%)		4(20.0%)	16(80.0%)	

用总生存率来描述一定时间内未发生死亡患者的比例。

1.2 免疫组化及标记物分析

使用免疫组化和 FISH 对三阴性标本的 ER、PR 和 Her2 进行复检。ER、PR>1%为阳性; Her2<10%为 -, ≥10-25%为 +, 25%-75%为 ++, >75%为 +++。Her2++ 的标本根据 FISH 结果判定 Her2 结果。FISH 结果提示 Her2 基因扩增与 17 号染色体比值大于 2, 记为 Her2 阳性。标本连续切片(5μm), 脱蜡水化, 抗原修复, 血清封闭后滴加一抗(Santa cruz)孵育 30 分钟; 滴加二抗(中杉金桥); DAB 显色; 苏木素复染; 封片。P53 为核染色; MMP9 为胞质染色。胞核、胞质染色 <10%为阴性, ≥10%为阳性。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析。使用交叉表卡方检测 P53、MMP9 与 TNBC 预后因素(肿瘤大小, 分期, 淋巴结转移数情况, 年龄等)的相关性。Kaplan-Meier 法生存分析用来估计无病生存率(DFS)和总生存率(OS), 并经 Log-rank 检验。多因素分析使用 Cox 比例风险回归。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TNBC 的病理特点

147 例 TNBC 占同期本院乳腺癌 13.3%(147/1103), 中位年

龄为 55(27-88), 44 例 ≤ 50 岁, 103 例 > 50 岁(29.9% vs 70.1%)。113 例肿瘤直径 ≥ 2cm, 34 例 < 2cm(76.9% vs 23.1%)。0 期患者 5 例; I、II 患者 122 例; III 期患者 20 例。依照 WHO 的病理分型, 浸润性导管癌 126 例, 髓样癌 9 例, 导管内癌 5 例, 浸润性小叶癌 3 例, 粘液腺癌 3 例, 湿疹样癌 1 例。

2.2 TNBC 的病理特点与 P53、MMP9 表达的相关性

TNBC 中 MMP9、P53 表达的阳性率分别为 47.6% 和 66.0%。MMP9、P53 的表达与 TNBC 患者的年龄、绝经状态没有相关性; MMP9 与 TNBC 患者的淋巴结转移数目具有显著相关性(P=0.003), 而与肿块大小、分期没有相关性; P53 的表达与 TNBC 患者的淋巴结转移数目、肿块大小和分期均无显著相关性(见表 1)。

2.3 P53、MMP9 的表达与 TNBC 患者预后的关系

147 例 TNBC 患者的平均随访时间 45.6 个月 (6-128 个月), 通过 Kaplan-Meier 法进行生存分析(见图 1)。MMP9 表达阳性的 TNBC 与 MMP9 表达阴性的 TNBC 患者 60 个月的 DFS 率分别为 62% 和 83%(P=0.001); OS 率分别为 66% 和 73%(P=0.022)。P53 表达阳性的 TNBC 和 P53 表达阴性的 TNBC 患者 60 个月的 DFS 率分别为 65% 和 87%(P=0.010); OS 率分别为 60% 和 85%(P=0.005)。COX 比例风险回归模型估计各个因素的风险比(Hazard Ratio, HR)。HR>1.0 被认为是较大的复

发转移风险。在单变量水平 MMP9 表达、P53 表达、分期、淋巴结转移数目和肿块大小都有较大的复发转移风险。相关性因子多变量分析结果显示:MMP9 阳性表达($P=0.010$)和淋巴结转移数目 ($P=0.026$) 与 DFS 率具有相关性,提示 MMP9 的表达

($HR=2.698, 95\%CI, 1.272-5.724$) 和淋巴结转移数目($HR=1.076, 95\%CI, 1.009-1.147$)为影响 TNBC 患者预后的独立危险因素(见表 2)。

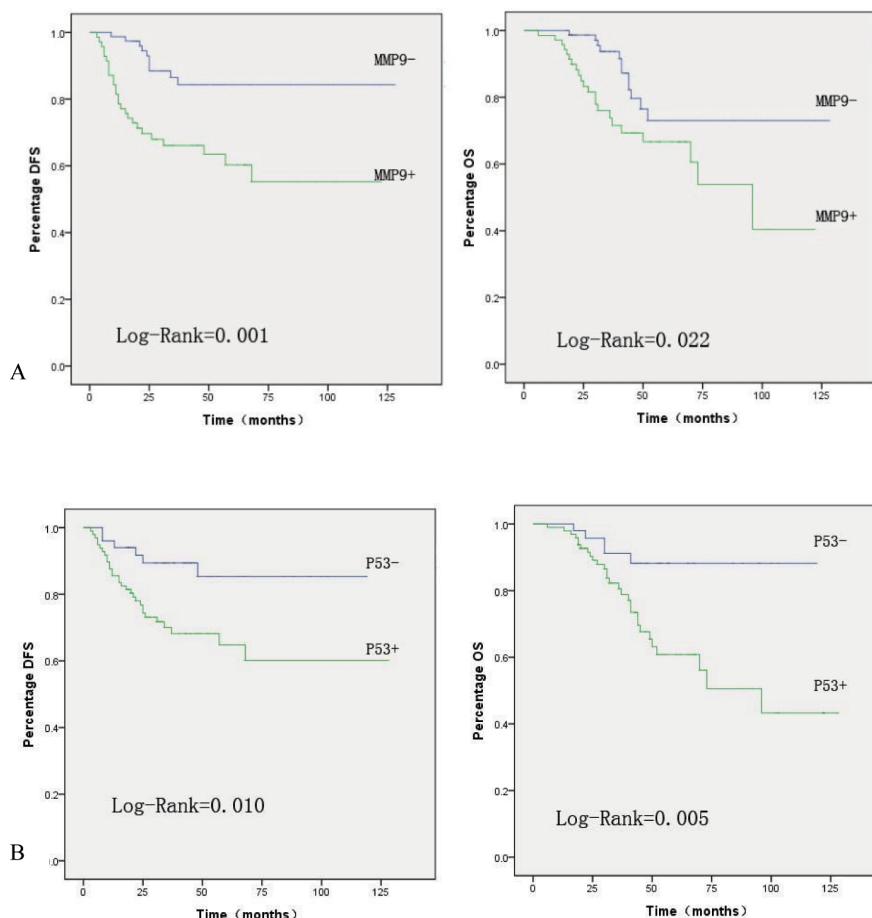


图 1 Kaplan-Meier 生存分析 P53、MMP9 的表达与 TNBC 患者预后的关系

Fig.1 Kaplan-Meier analysis of the correlation of P53 and MMP9 expression with the Prognosis of TNBC patients

A.MMP9+TNBC 患者的 DFS 和 OS 较 MMP9-TNBC 患者更差。B.P53+TNBC 患者的 DFS 和 OS 较 P53-TNBC 患者更差。

A.High expression of MMP9 indicated poor DFS and OS in TNBC. B.High expression of P53 indicated poor DFS and OS in TNBC

3 讨论

近年来,乳腺癌的发病率逐年上升,严重威胁女性健康。复发和转移是乳腺癌致死的主要原因,也是目前治疗面临的最大挑战^[10]。TNBC 相对于雌激素受体阳性乳癌和 Her2 阳性乳癌,更具侵袭性和转移力^[11]。

MMP9 是 MMP 家族成员,主要作用是裂解细胞外基质,使肿瘤细胞更易于进入血液或淋巴循环,促进肿瘤细胞转移^[12,13]。研究显示乳腺癌中 MMP9 表达高于良性组织^[10-14],且 MMP9 可能参与乳腺癌脑转移的过程^[11-15]。有研究称通过检测血清 MMP9 的水平,可以评估乳腺癌的预后^[9-16]。但是鲜有 MMP9 与 TNBC 这一特殊亚型乳腺癌相关性的报道。本研究结果显示 MMP9 表达阳性的 TNBC 患者的预后远差于 MMP 表达阴性的 TNBC 患者,且 TNBC 患者 MMP9 的表达($P=0.000$)与淋巴结转移数相关,提示 TNBC 细胞向淋巴循环转移依赖 MMP9 裂解细胞外基质这一过程。COX 比例风险回归模型数据显示, MMP9 的远处转移或局部复发的风险比($HR=3.353, P=0.001$)

明显高于淋巴结转移数、肿块大小和分期。多变量分析中,仅 MMP9 和淋巴结转移数具有统计学意义,其 HR 分别为 2.698 ($P=0.010$)和 1.134($P=0.026$)。说明 MMP9 可以作为一种独立的预后因子,提示 TNBC 预后情况。Dimitris Stellas 等人通过使用单克隆抗体成功阻滞热休克蛋白 90 (HSP90),从而降低了 MMP2 和 MMP9 的活性,该过程明显减少了 MDA-MB453 裸鼠模型的肺转移率^[12-17]。这提示 MMP9 可能成为 TNBC 潜在的治疗靶点。

P53 是一种已被广泛研究的抑癌基因,在细胞凋亡,衰老等多个方面发挥着决定性作用^[13-18, 4-19]。野生型 P53 是隐性基因,而其突变型 P53 基因则是显性基因,可引起细胞增殖和癌变,其表达蛋白可通过免疫组化检测^[14-20]。本研究的结果显示 P53 表达阳性的 TNBC 患者的预后明显差于 P53 表达阴性的 TNBC 患者,但 P53 阳性表达与 MMP9 阳性表达之间并无相关性($P=0.602$),提示 P53 和 MMP9 可能通过不同的作用机制影响 TNBC 患者的预后。

综上所述,本研究的结果表明 MMP9 和 P53 在 TNBC 中

表 2 COX 比例风险回归模型分析 P53、MMP9 的表达与 TNBC 患者预后的关系

Table2 The correlation of P53 and MMP9 expression with the prognosis of TNBC patients analyzed by COX proportional hazards regression model

Variable	Hazard Ratio	95%CI	P
Univariate analysis of DFS			
P53	2.979	1.239-7.165	0.015
MMP9	3.353	1.614-6.966	0.001
Stage	2.394	1.480-3.953	0.001
Metastasizing lymph node numbers	1.134	1.082-1.187	0.000
Tumor size	1.410	1.210-1.644	0.000
Age	1.010	0.981-1.040	0.490
Menstrual status	0.822	0.421-1.608	0.567
Multivariate Cox model of DFS			
P53	2.255	0.916-5.554	0.077
MMP9	2.698	1.272-5.724	0.010
Stage	1.126	0.594-2.136	0.715
Metastasizing lymph node numbers	1.076	1.009-1.147	0.026
Tumor size	1.197	0.994-1.443	0.058

的阳性表达与患者的预后不良有关,且 MMP9 为影响 TNBC 患者预后的独立危险因素,但二者影响 TNBC 患者预后的具体机制尚有待于进一步研究证实。

参考文献(References)

- [1] Turner NC, Reis-Filho JS. Tackling the diversity of triple-negative breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(23):6380-6388
- [2] Mahamodhossen YA, Liu W, Rong-Rong Z. Triple-negative breast cancer: new perspectives for novel therapies[J]. Med Oncol, 2013, 30(3): 653-658
- [3] Onitilo AA, Engel JM, Greenlee RT, et al. Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival[J]. Clin Med Res, 2009, 7(1-2):4-13
- [4] Lin C, Chien SY, Chen LS, et al. Triple negative breast carcinoma is a prognostic factor in Taiwanese women[J]. BMC Cancer, 2009, (9):192-201
- [5] Mersin H, Yildirim E, Berberoglu U, et al. The prognostic importance of triple negative breast carcinoma[J]. Breast, 2008, 17(4):341-346
- [6] Lund MJ, Trivers KF, Porter PL, et al. Race and triple negative threats to breast cancer survival: a population-based study in Atlanta, GA[J]. Breast Cancer Res Treat, 2009, 113(2):357-370
- [7] Wu K, Huang S, Zhu M, et al. Expression of synuclein gamma indicates poor prognosis of triple-negative breast cancer [J]. Med Oncol, 2013, 30(3):612-618
- [8] Parinyanitkul N, Blumenschein GR, Wu Y, et al. Mesothelin Expression and Survival Outcomes in Triple Receptor Negative Breast Cancer [J]. Clin Breast Cancer, 2013 Jun 27
- [9] Neuman HB, Weiss JM, Schrag D, et al. Patient demographic and tumor characteristics influencing oncologist follow-up frequency in older breast cancer survivors[J]. Ann Surg Oncol, 2013, 20(13):4128-4136
- [10] Bardia A, Baselga J. Neoadjuvant therapy as a platform for drug development and approval in breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(23):6360-6370
- [11] Chen YJ, Yeh MH, Yu MC, et al. Lapatinib-induced NF-kappaB activation sensitizes triple-negative breast cancer cells to proteasome inhibitors[J]. Breast Cancer Res, 2013, 15(6):R108
- [12] Jacob A, Jing J, Lee J, et al. Rab40b regulates trafficking of MMP2 and MMP9 during invadopodia formation and invasion of breast cancer cells[J]. J Cell Sci, 2013, 126(Pt 20):4647-4658
- [13] Prasad CP, Chaurasiya SK, Axelsson L, et al. WNT-5A triggers Cdc42 activation leading to an ERK1/2 dependent decrease in MMP9 activity and invasive migration of breast cancer cells[J]. Mol Oncol, 2013, 7(5):870-883
- [14] Mo N, Li ZQ, Li J, Cao YD, et al. Curcumin inhibits TGF-β1-induced MMP-9 and invasion through ERK and Smad signaling in breast cancer MDA-MB-231 cells[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(11): 5709-5714
- [15] Odete Mendes, Hun-Taek Kim, George Stoica. Expression of MMP2, MMP9 and MMP3 in breast cancer brain metastasis in a rat model[J]. Clinical & Experimental Metastasis, 2005, 22(3):237-246
- [16] Liu Y, Xin T, Jiang QY, et al. CD147, MMP9 expression and clinical significance of basal-like breast cancer [J]. Med Oncol, 2013, 30(1): 366-373
- [17] Durlak M, Gardian K. Metalloproteinase 2 and 9 activity in the development of pancreatic cancer[J]. Pol Przegl Chir, 2012, 84(8):377-82
- [18] Goh AM, Coffill CR, Lane DP. The role of mutant p53 in human cancer[J]. J Pathol, 2011, 223(2):116-126
- [19] Shan M, Zhang X, Liu X, et al. P16 and p53 play distinct roles in different subtypes of breast cancer[J]. PLoS One, 2013, 8(10):e76408
- [20] Swaminathan U, Joshua E, Rao UK, Ranganathan K. Expression of p53 and Cyclin D1 in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa: An Immunohistochemical study [J]. J Oral Maxillofac Pathol, 2012, 16(2):172-177