

PTEN、VEGF 蛋白表达与犬乳腺肿瘤病理学特征的关系

邱昌伟¹ 林德贵¹ 陈双燕² 宋筱瑜¹ 王金秋¹

(1. 中国农业大学 动物医学院, 北京 100094; 2. 中国农业科学院 草原研究所, 呼和浩特 010010)

摘要 为探讨犬的乳腺肿瘤组织中 PTEN 和 VEGF 蛋白表达与临床病理学特征关系的相关性,采用免疫组织化学 SP 染色法检测了 32 例乳腺肿瘤组织及 6 例正常乳腺组织中上述 2 种蛋白的表达。结果发现:1) PTEN 蛋白在正常乳腺组织和良性乳腺肿瘤高表达率为 100%,在恶性乳腺肿瘤组织中的高表达率为 67% (8/12),两者比较差异极显著 ($P < 0.01$);乳腺肿瘤组织中 PTEN 蛋白表达与犬的年龄、肿瘤大小无关 ($P > 0.05$),而与淋巴结转移、组织学分级有关 ($P < 0.01$)。2) VEGF 蛋白在正常乳腺组织中高表达率为 33.3% (2/6),在乳腺肿瘤组织中高表达率为 78% (25/32),两者比较差异极显著 ($P < 0.01$);乳腺肿瘤组织中 VEGF 蛋白表达与患病犬的年龄、肿瘤大小无关 ($P > 0.05$),而与淋巴结转移有关 ($P < 0.05$)。联合检测 PTEN、VEGF 表达可作为乳腺癌生物学行为和预后判断的重要指标。

关键词 犬; 乳腺肿瘤; PTEN 蛋白; VEGF 蛋白; 临床病理学特征; 免疫组织化学检测

中图分类号 S 851.4; R 730.45

文章编号 1007-4333(2007)02-0005-05

文献标识码 A

Relation between expressions of PTEN and VEGF and clinicopathological features in canine mammary gland tumors

Qiu Changwei¹, Lin Degui¹, Chen Shuangyan², Song Xiaoyu¹, Wang Jinqiu¹

(1. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. Grassland Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hohhot 010010, China)

Abstract To investigate the relationship between expression of PTEN and VEGF and clinicopathological features in canine mammary gland tumor, the expression levels of PTEN and VEGF protein were assessed in 32 cases of canine mammary gland tumors tissues and 6 cases of normal mammary gland tissues using SP immunohistochemical method. The over-expression rate of PTEN protein was 100% in normal and well-differentiated mammary gland tissues and 67% in breast cancer cases respectively with a significant difference between the two groups ($P < 0.01$). Expression of PTEN was not related to age and tumor size, but closely correlated with lymph node metastasis ($P < 0.01$). The over-expression rate of VEGF protein was 33.3% in normal mammary gland tissues, and 78% in canine mammary gland tumors with a significant difference between the two groups ($P < 0.01$). Expression of VEGF was not related to age or tumor size, but closely correlated with lymph node metastasis and clinical stage ($P < 0.05$). Therefore, the combined detection of PTEN and VEGF could serve as an important index to estimate the biological behavior and prognosis of canine mammary gland tumors.

Key words canine; mammary tumor; PTEN; VEGF; clinicopathological features; immunohistochemical assay

乳腺是犬猫肿瘤常发的部位,母犬乳腺癌发病率约占全部肿瘤性疾病的 25%~42%,这种疾病在公犬很少发病(低于 3%)^[1]。乳腺癌生长与其肿瘤

组织内的血管生长密切相关,丰富的血管可向其提供必要的物质条件。有研究表明:肿瘤血管的生成依赖于多种相关因子的调节和诱导,血管内皮生长

收稿日期: 2006-06-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30471275)

作者简介: 邱昌伟, 博士研究生, E-mail: sdqiu2001@163.com; 林德贵, 教授, 通讯作者, 主要从事动物肿瘤和皮肤病研究, E-mail: csama@sina.com

因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)被认为是促进血管生成的主要因素之一^[2]。蛋白酪氨酸磷酸酶(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosometen, PTEN)是至今发现的第1个具有双特异性磷酸酶活性的抑癌基因。PTEN基因突变、缺失及PTEN蛋白的低表达与多种肿瘤的发生发展密切相关^[3]。本实验采用免疫组织化学方法对犬的乳腺肿瘤组织和正常乳腺组织中PTEN、VEGF表达进行相对定量检测,以探讨PTEN、VEGF的表达与犬乳腺肿瘤生物学行为的关系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

采用2005年8月到2006年3月在中国农业大学动物医院收集的32例犬乳腺肿瘤手术标本,6例不同的正常乳腺组织取自实验犬。患病动物全是母犬,年龄4~14岁,平均年龄9岁。按WHO标准对32例犬乳腺肿瘤进行组织学分类,其中良性肿瘤20例(62.5%),恶性肿瘤12例(37.5%)。

1.2 免疫组织化学

收集的犬乳腺肿瘤组织、正常乳腺组织分别用中性甲醛固定,石蜡包埋,3 μ m连续切片,分别进行HE染色和免疫组化染色,严格按照试剂盒要求进行操作。兔抗人PTEN单克隆抗体、鼠抗人VEGF单克隆抗体、SP免疫组化试剂盒均购自北京中山公司。用PBS代替一抗作阴性对照。

1.2.1 石蜡切片的制作

修整石蜡标准块。将标本固定于标本台上,用石蜡切片机连续切片,切片厚度为3 μ m,每例标本切5张片子,每片上附有2个相同的组织。

展片与粘片:将切下的组织蜡片先放入冷水中,然后放入摊片机的水槽中,水温为40 $^{\circ}$ C,切片漂浮于水面并因受热而展平,将载玻片垂直伸入水中展平的蜡片下,小心拾起载玻片,蜡片即于载玻片上,倾去带到玻片上的水,置于37 $^{\circ}$ C烤箱内烤干。

1.2.2 免疫组化实验

1)将石蜡切片置入二甲苯中透明5 min,共2次,梯度酒精复水(依次为100%(体积分数,下同)、95%、75%和50%),在每种梯度酒精中各浸泡5 min。

2)0.01 mmol/L, pH为7.2的PBS(以下只记为PBS)洗3次,5 min。

3)3%(体积分数)H₂O₂室温(25 $^{\circ}$ C)孵育15 min,以消除内源性过氧化物酶的活性。

4)蒸馏水冲洗,PBS浸泡3次,5 min。

5)石蜡切片置于微波炉内进行抗原热修复。将切片放入盛有抗原修复液的容器中,置微波炉中加热,使容器内液体温度保持在98 $^{\circ}$ C并维持15~20 min。所用抗原修复工作液为0.01 mmol/L的EDTA缓冲液。取出容器,切片仍置于缓冲液中,室温冷却30 min。

6)取出切片,PBS冲洗3次,5 min。

7)用10%(体积分数)正常山羊血清(为SP试剂盒中的A液)封闭,室温(25 $^{\circ}$ C)孵育15 min,以消除非特异性背景着色。倾去血清,勿洗,直接滴加1:50的一抗,4 $^{\circ}$ C过夜。一抗分别为兔抗人PTEN单克隆抗体,鼠抗人VEGF单克隆抗体。

8)PBS冲洗3次,5 min。

9)滴加第2代生物素标记二抗工作液(为SP试剂盒中的B液),37 $^{\circ}$ C孵育30 min。

10)PBS冲洗3次,5 min。

11)滴加第2代辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液(为SP试剂盒中的C液),37 $^{\circ}$ C孵育30 min。

12)PBS冲洗3次,5 min。

13)新鲜配制的DAB显色,不超过7 min。

14)自来水冲洗,苏木素复染2 min,盐酸酒精分化15 sec,中性树胶封片。

1.3 结果判定标准

PTEN、VEGF蛋白的阳性信号主要存在于腺泡上皮和导管上皮胞浆中,出现黄色或棕黄色颗粒为阳性染色。采用半定量积分法判断结果,阳性细胞5%为0分,6%~50%为2分,50%为3分;阳性强度淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分;两者积分相乘,0分为阴性(-),1~3分为弱阳性(+),4~6分为中度阳性(++),7~9分为强阳性(+++)。将(-+)视为低表达,(+++++)视为高表达,每例切片选5个高倍视野进行计数。

1.4 统计学处理

采用SPSS10.0统计软件进行统计分析,包括检验分析和Spearman's检验相关性分析。 $P < 0.05$ 为统计学显著性差异。

2 结果

2.1 PTEN、VEGF免疫组化结果

1)免疫组织化学法检测PTEN蛋白表达阳性物质为棕黄色或棕色颗粒,主要位于细胞浆,少数细胞核膜见阳性表达物。在良性乳腺肿瘤组织和正常

乳腺组织中均为中等程度或强阳性表达(图 1 - 1), PTEN 在犬恶性乳腺肿瘤中的高表达的表达率为 67%(图 1 - 2)。

2) VEGF 染色定位于肿瘤及周围血管、少量肌

上皮细胞浆,在肿瘤癌巢边缘增强,随着肿瘤恶性程度的增强,VEGF 的表达率随之增加,VEGF 蛋白在正常犬乳腺组织中高表达率为 33.3%(图 1 - 3),在乳腺肿瘤组织中高表达率为 78%(图 1 - 4)。

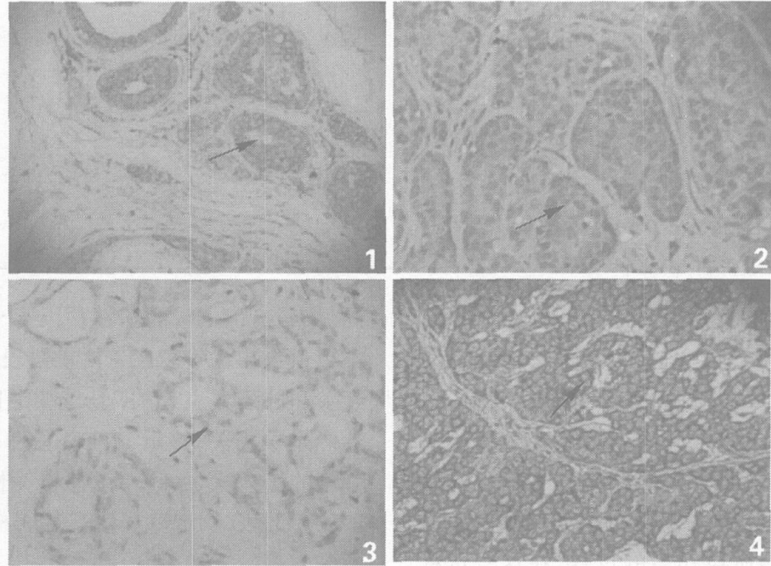


图 1 PTEN 和 VEGF 蛋白在犬乳腺肿瘤组织中的表达

Fig. 1 Expression of PTEN and VEGF proteins in canine mammary tumor tissues

1. PTEN 蛋白在腺肌上皮瘤中表达阳性(×200);
2. PTEN 蛋白在恶性肉瘤中表达阳性(×200);
3. VEGF 蛋白在良性肿瘤组织中表达阴性(×200);
4. VEGF 在恶性肿瘤组织中表达强阳性(×200)

2.2 VEGF、PTEN 蛋白表达与临床病理特征的关系

PTEN 蛋白在犬正常和良性乳腺肿瘤组织中的表达为 100%(26/26),在犬恶性肿瘤中的表达率为 67%(8/12),两者比较有显著性差异($P < 0.01$)。乳腺肿瘤组织中 PTEN 蛋白表达与犬的年龄、肿瘤大小无关($P > 0.05$),而与组织学分级和淋巴结转

移有关($P < 0.01$)。VEGF 蛋白在正常乳腺组织中高表达率为 33.3%(2/6),而在乳腺肿瘤组织中高表达率为 78%(25/32),两者比较有显著性差异($P < 0.05$);乳腺肿瘤组织中 VEGF 蛋白表达与患病犬的年龄、肿瘤大小无关($P > 0.05$),而与淋巴结转移有关(表 1,2)。

表 1 PTEN 蛋白表达与犬乳腺肿瘤临床病理特征的关系

Table 1 Relationship between PTEN and clinicopathological features in canine mammary gland tumors

指 标	参数或级别	PTEN 蛋白				P
		n	高表达数	低表达数	高表达率/ %	
年龄/岁	<8	3	2	1	66.67	0.500 < P < 0.750
	8	29	16	13	55.17	
肿瘤最大直径/cm	<3	5	3	2	60.00	0.237 0
	3	27	13	14	48.15	
淋巴结转移	无	30	19	11	63.33	3.117 9
	有	2	0	2	0	
组织学分级	~	10	2	8	19.200 0	<0.005
		1	0	1		
		1	0	1		
正常和良性乳腺瘤组织		26	26	0	100	6.635 0
恶性乳腺肿瘤组织		12	8	4	67	<0.010

表2 VEGF蛋白表达与犬乳腺肿瘤临床病理特征的关系

Table 2 Relationship between the VEGF and clinicopathological features in canine mammary gland tumors

指标	参数	VEGF 蛋白				P	
		n	高表达数	低表达数	高表达率/%		
年龄/岁	<8	3	2	1	66.67	1.965 7	0.1 < P < 0.25
	8	29	20	9	68.97		
肿瘤最大直径/cm	<3	5	3	2	60.00	0.413 4	0.50 < P < 0.75
	3	27	20	7	74.00		
淋巴结转移	无	30	22	8	73.33	0.711 1	<0.05
	有	2	2	0	100.00		
正常乳腺组织		6	2	4	33.3		
乳腺肿瘤组织		32	25	7	78.0	4.136	<0.05

3 讨论

蛋白酪氨酸磷酸酶(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10, PTEN)是继 P53 和 Rb 基因之后,至今发现的第 1 个具有磷酸酶活性与肿瘤发生关系密切的抑癌基因。肿瘤的发生是一个长期、多因素、多阶段作用的过程,在这一过程中癌基因的激活与抑癌基因的失活被认为是其中重要的事件。随着对 PTEN 研究的深入,对其结构特点、功能机制及信号转导途径等的认识都取得了很大进展。此外,在前列腺癌、子宫内膜癌、黑色素瘤等多种肿瘤均常伴有染色体 10q 等位基因的缺失。这些均提示第 10 号染色体片段上有与肿瘤相关的基因存在。1997 年,Steck 等 3 个实验小组在该位点发现了一个肿瘤抑制基因并命名为 PTEN^[4]。PTEN 开放读码框架序列分析表明,其编码的蛋白与细胞骨架蛋白 Tensin 和 auxilin 具有明显的同源性,因此被命名为 PTEN^[5-6]。Stambolic 等发现 PTEN 杂合性敲除小鼠(PTEN +/-)对乳腺癌高度易感,6 个月后有近一半(49%)的雌性小鼠发生了乳腺癌,因此,PTEN 基因的丢失或变异是导致乳腺癌发生发展的重要因素^[7]。

1) 本实验采用免疫组织化学的方法检测了 PTEN 在 32 例犬乳腺肿瘤和 6 例正常乳腺组织中的表达情况,结果显示在乳腺癌组织中 PTEN 蛋白表达的阳性率为 67%,而在正常乳腺组织和良性乳腺肿瘤组织中 PTEN 蛋白的表达阳性率为 100%,两者之间的差异有统计学意义,提示 PTEN 基因的缺失或突变与乳腺癌的发生发展有关。随着肿瘤恶性程度的增加,PTEN 蛋白表达的阳性率显著下降,结果表明,PTEN 蛋白低表达的病例,其恶性程度

高,更容易出现浸润和转移,这一研究结果与人的医学报道很相近^[8]。PTEN 蛋白表达水平与患病动物年龄和肿瘤大小无关,但与腋淋巴结转移和组织学分级呈负相关,提示 PTEN 蛋白低表达可能与肿瘤细胞的增殖及浸润转移有相关性。上述结果表明 PTEN 的表达状态与乳腺癌的分化、生长有关,反映了乳腺癌的恶性生物学行为;伴有腋淋巴结转移的乳腺癌组织 PTEN 高表达率显著低于无腋淋巴结转移者,这在一定程度上显示 PTEN 表达的缺失或减弱有利于乳腺癌的淋巴结转移。其作用机制可能是:与细胞骨架蛋白 Tensin 同源的 PTEN 在细胞迁移和肿瘤侵袭转移的 2 条通路上扮演着重要角色,一方面 PTEN 通过抑制局灶黏附激酶(FAK)的磷酸化,使 FAK/P130case 通路受阻,阻断整合素介导的细胞迁移和局灶黏附的形成,从而抑制细胞的方向性迁移;另一方面 PTEN 通过使 Shc 去磷酸化,阻断 Shc/MAPK 通路,抑制细胞的无方向性随机迁移。PTEN 基因异常引起其磷酸酶活性急剧下降,促进肿瘤细胞的侵袭和转移^[9]。

2) 肿瘤组织的迅速生长、浸润和转移都需要血管的形成。如果肿瘤内没有血管的形成,实体瘤便不会继续生长,也不会转移,从而不会危及人与动物的生命。VEGF(血管内皮生长因子)作为内皮细胞特异性的有丝分裂原,能够高度特异地选择诱导血管内皮细胞有丝分裂,刺激内皮细胞增殖并促进血管形成,增加血管尤其是微小血管的通透性,并且使血浆大分子外渗并沉积在血管外的基质中,为新生血管网的建立提供营养和必须的基质^[10-11]。此外,VEGF 还可以通过自分泌途径直接导致肿瘤细胞某些不明性状的改变,甚至提供肿瘤细胞逃避机体的免疫监控,从而有利于肿瘤的发展。

3) 本实验发现, VEGF 在犬良性和恶性乳腺肿瘤组织中都有表达, 且随着肿瘤恶性程度的增加, VEGF 的表达量也随之增加。这与 Toi、Linderholm 等学者报道的结果相一致^[12-13]。实验结果还表明, VEGF 表达与乳腺肿瘤大小、发病年龄无关, 而与淋巴结转移有关。这说明乳腺癌组织中的 VEGF 表达与肿瘤生长和浸润以及淋巴结转移之间存在着密切相关性, 其机制可能是 VEGF 通过一系列复杂的机制诱导血管的形成, 为肿瘤的生长提供充足的营养, 并使肿瘤边缘部分的癌细胞与淋巴管接触增多, 或通过静脉-淋巴管吻合处的血管进入淋巴管, 还可以增加微血管通透性, 并诱导新生淋巴管的形成, 从而促使肿瘤转移, 但详细的机制目前尚不十分清楚, 有待进一步研究^[14]。

参 考 文 献

- [1] Dorn C R, Taylor D O N, Schneider R, et al. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa counties, California: . Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda county[J]. Natl Cancer Inst, 1968, 40:307-18
- [2] Gasspool R M, Evas T R J. Clinical imaging of cancer metastasis[J]. Cancer, 2000, 36(13):1661-1670
- [3] Li Y, Podsvanina K, Liu X, et al. Deficiency of PTEN accelerate mammary oncogenesis in MMTV₂Wnt21 transgenic mice[J]. BMC Mol Biol, 2001, 2(1):20-25
- [4] Li J, Yen C, Liaw D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast and prostate cancer[J]. Science, 1997, 275:1943-1947
- [5] Steck P A, Pershouse M A, Jzsser S A, et al. Identification of a candidate tumor suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers[J]. Nat Genet, 1997, 15(4):356-364
- [6] Li D M, Sun H. TEP1 encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta [J]. Cancer Res, 1997, 57:2124-2129
- [7] Stambolic V, Tsao M S, Macpherson D, et al. High incidence of breast and endometrial neoplasia resembling human Cowden syndrome in PTEN + / - mice[J]. Cancer Res, 2000, 60(13):3605-3609
- [8] 王知力, 郭双平, 王文亮. PTEN 基因的研究进展[J]. 临床与实验病理学杂志, 2001, 17(4):339
- [9] 彭惠, 杨光华. 肿瘤抑制基因 PTEN/MMAC1/TEP1 在肿瘤研究中的进展[J]. 临床与实验病理学杂志, 2001, 17(4):342-344
- [10] Bellon G, Martiny, Robinet A. Matrix metalloproteinases and matrikines in angiogenesis [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2004, 49(3):203-220
- [11] Iruela-Arispe M L, Luque A, Lee N. Thrombospondin modules and angiogenesis[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(6):1070-1078
- [12] Toi M, Hoshina S, Takayanagi T, et al. Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer[J]. Jpn J Cancer Res, 1994, 85(10):1045-1049
- [13] Linderholm B K, Lindh B, Beckman L, et al. Prognostic correlation of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in 1307 primary breast cancers[J]. Clin Breast Cancer, 2003, 4(5):340-347
- [14] Dvorak H F, Brow L F, Deptmar M, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyper-permeability and angiogenesis[J]. Am J Pathol, 1995, 146(5):1029