

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.01.016

· 临床研究 ·

Rb 和 P-Rb 在乳腺癌组织中的表达及其在癌细胞上皮间质转化中的意义

张梦雯^{1,2}, 刘飞², 谷丽娜², 张国生³, 桑梅香¹(1. 河北医科大学第四医院 肿瘤研究所免疫室, 河北 石家庄 050011; 2. 河北医科大学第四医院 门诊部, 河北 石家庄 050011; 3. 河北医科大学第四医院 实验动物中心, 河北 石家庄 050011)

[摘要] **目的:** 分析视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, Rb)基因和磷酸化 Rb(P-Rb)在人乳腺癌组织中的表达及在乳腺癌上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)中的意义。**方法:** 选取 2009 年 1 月至 2009 年 8 月在河北医科大学第四医院进行手术切除的 65 例乳腺癌患者标本, 利用免疫组织化学法检测乳腺癌组织中 Rb、P-Rb、上皮细胞标记物 CDH1 和间质细胞标记物 Vimentin 的表达状况, 分析二者表达与乳腺癌患者临床病理学指标和预后的关系。利用 real-time PCR 及 Western blotting 方法检测在 TGF β 诱导的 EMT 过程中 Rb 及 P-Rb 的表达变化。**结果:** 乳腺癌组织中, Rb 和 P-Rb 蛋白表达阳性率分别为 55.38% 和 50.77%。P-Rb 蛋白表达与乳腺癌患者的肿瘤大小、临床分期及淋巴结转移状况呈正相关。CDH1 和 Vimentin 蛋白表达阳性率分别为 76.92% 和 43.08%。CDH1 蛋白表达与乳腺癌患者的肿瘤大小、临床分期及淋巴结转移状况呈负相关。Vimentin 蛋白表达与乳腺癌患者的肿瘤大小、临床分期及淋巴结转移状况呈正相关。Rb 及 P-Rb 蛋白表达均与 CDH1 蛋白表达呈正相关, 与 Vimentin 蛋白表达呈负相关。P-Rb 蛋白表达阳性的乳腺癌患者的总五年生存率明显低于 P-Rb 蛋白表达阴性的患者; CDH1 蛋白表达阳性的乳腺癌患者的总五年生存率明显高于 CDH1 蛋白表达阴性的患者, Vimentin 蛋白表达阳性的乳腺癌患者的总五年生存率明显低于 Vimentin 表达阴性的患者。在 TGF β 诱导的 HMLE 细胞发生 EMT 的过程中, Rb 的表达显著下降, P-Rb 的表达显著上升。**结论:** Rb 的磷酸化失活影响了乳腺癌细胞上皮间质转化的过程, 与乳腺癌的转移密切相关。

[关键词] 乳腺癌; 上皮间质转化; 视网膜母细胞瘤基因; 磷酸化 Rb; E 钙黏蛋白; 波形蛋白

[中图分类号] R737.9; R730.22

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)01-0095-07

Expressions of Rb and P-Rb in breast cancer tissues and their significance in TGF- β induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells

ZHANG Mengwen^{1,2}, LIU Fei², GU Lina², ZHANG Guosheng³, SANG Meixiang²(1. Department of Immunology, Institute of Tumor Research, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 2. Out-Patient Department, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, 050011, Hebei, China; 3. Animal Center, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of retinoblastoma (Rb) and phosphate retinoblastoma (P-Rb) in human breast cancer tissues and their significance during the process of epithelial-mesenchymal transition (EMT). **Methods:** 65 samples from patients with breast cancer that surgically removed in the Fourth Clinical Hospital of Hebei Medical University from Jan. to Aug. 2009 were retrospectively examined in this study. Immunohistochemistry was used to examine the expression of Rb, P-Rb, CDH1 and Vimentin in the breast cancer tissues of 65 cases. The correlation between their expression and clinicopathological parameters and prognosis of the case with breast cancer was analyzed. Real-time PCR and Western blotting were used to examine the expression change of Rb and P-Rb in TGF β -induced EMT. **Results:** Expression rates of Rb and P-Rb in the breast cancer tissues were 55.38% and 50.77%, respectively. Expression of P-Rb was positively correlated with tumor size, clinical stages and lymph node metastasis. Expression rates of CDH1 and Vimen-

[基金项目] 河北省科技支撑计划项目资助(No. 14277732D)。Project supported by the Science and Technology Support Program of Hebei Province (No. 14277732D)

[作者简介] 张梦雯(1979-),女,河北省平乡县人,硕士生,主要从事肿瘤方面的研究, E-mail:980019504@qq.com

[通信作者] 桑梅香(SANG Meixiang, corresponding author), E-mail:mxsang@hotmail.com

tin in the breast cancer were 76.92% and 43.08% respectively. Expression of CDH1 negatively correlates with tumor size, clinical stages and lymph node metastasis, while expression of Vimentin positively correlates with tumor size, clinical stages and lymph node metastasis. Both expressions of Rb and P-Rb positively correlates with expression of CDH1, but negatively correlates with expression of Vimentin. Overall 5 years survival rate of patients with P-Rb positive breast cancer was significantly lower than that of patients with P-Rb negative breast cancer; overall 5 years survival rate of patients with CDH1 positive breast cancer was significantly higher than that of patients with CDH1 negative breast cancer; overall 5 years survival rate of patients with Vimentin positive breast cancer was significantly lower than that of patients with Vimentin negative breast cancer. Expression of Rb was down regulated and that of P-Rb up regulated in TGF β induced EMT of HEML cells. **Conclusion:** Inactivation of Rb with phosphorylation affected EMT and correlated with breast cancer metastasis.

[**Key words**] breast cancer; epithelial-mesenchymal transition(EMT); retinoblastoma(Rb); P-Rb; CDH1; Vimentin
[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(1): 95-101. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.01.016]

上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是在某些生理、病理因素作用下, 上皮细胞失去细胞极性和细胞间连接, 从而转变为具有间质细胞形态和特征的细胞过程^[1-2]。其分子特性为上皮细胞标记物 E-cadherin(也称为 CDH1)等表达降低, 间质细胞标记物 Vimentin 等表达上升^[3]。EMT 在胚胎发育过程中起关键作用, 同时在肿瘤的发展过程中 EMT 可使上皮性肿瘤细胞获得间充质细胞表型, 增强肿瘤细胞的侵袭和转移能力, 也使肿瘤细胞获得自我更新能力等干细胞样特性^[4-6]。研究表明, TGF β 可通过与其受体结合激活下游 Smad 信号通路, 促进 EMT 相关分子的表达^[7]。视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, Rb)基因是一种肿瘤抑制基因, 可调控肿瘤细胞的生长、分化及凋亡等多种生物学过程, 且在多种肿瘤中被磷酸化而失活^[8-9]。有研究提示, 乳腺癌细胞中 Rb 基因的降低可导致细胞与细胞间连接的破坏, 且诱导细胞向间质细胞表型转化^[10]。本研究拟利用免疫组织化学方法检测乳腺癌组织中 Rb 及 EMT 标记物 CDH1 和 Vimentin 的表达状况, 分析其表达与乳腺癌患者转移和预后的关系, 并采用 RT-PCR 及 Western blotting 方法研究 Rb 基因在 TGF- β 诱导的乳腺癌细胞 EMT 的过程中的变化, 以期探讨 Rb 基因在 EMT 过程中发挥的作用。

1 材料与方 法

1.1 标本采集及主要试剂

选取 2009 年 1 月至 2009 年 8 月在河北医科大学第四医院进行手术治疗的 65 例女性乳腺癌患者, 具体的临床资料见表 1。所有患者术前未经任何抗肿瘤治疗且均于术后得到确切的病理学诊断。每例

患者均取乳腺癌原发灶组织标本。组织标本离体后均经 10% 中性甲醛固定, 常规石蜡包埋。上述标本的获得均取得受试者或其家属的知情同意并签署知情同意书以及获得医院伦理委员会的批准。SP 免疫组化染色试剂盒、DAB 试剂盒、鼠抗人的 Rb 或 P-Rb 单克隆抗体、兔抗人的 CDH1 单克隆抗体及兔抗人的 Vimentin 单克隆抗体均购自于北京中杉金桥生物技术有限公司, DMEM 培养液购自于美国 Gibco 公司, 反转录试剂盒 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 购自于 Fermentas 公司, Go Taq[®] qPCR Master Mix 试剂盒购自于 Promega 公司。

1.2 细胞培养

人乳腺癌细胞 HMLE 细胞在含 10% 胎牛血清、终浓度分别为 100 IU/ml 和 100 μ g/ml 的青链霉素、8% NaHCO₃ 的 DMEM 培养液中培养, 培养环境为 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂。细胞用 0.05% 胰蛋白酶进行消化传代。

1.3 免疫组织化学法检测乳腺癌组织中 Rb、P-Rb、CDH1 和 Vimentin 的表达

石蜡包埋组织制成 4 μ m 的连续病理切片, 二甲苯常规脱蜡, 梯度乙醇水化, 自来水缓水冲洗 3 次, 1 \times PBS 洗 2 次, pH 值 9.0 的 EDTA 抗原修复, 冷却后 1 \times PBS 洗 2 次, 3% 过氧化氢孵育 20 min, 1 \times PBS 洗 2 次, 置于湿盒中, 正常山羊血清 37 $^{\circ}$ C 条件下封闭 45 min, 1 \times PBS 洗 2 次, 滴加 1:200 倍稀释的鼠抗人的 Rb 或 P-Rb 单克隆抗体, 或兔抗人的 CDH1 单克隆抗体, 或兔抗人的 Vimentin 单克隆抗体, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 1 \times PBS 洗 2 次, 滴加试剂盒提供的生物素化山羊抗兔二抗工作液原液一滴, 温箱中孵育 30 min, 1 \times PBS 洗 2 次, 滴加试剂盒提供的辣根过氧化物酶标记链酶卵白素工作液(三抗)原液一滴, 温箱中孵育 30 min, 应用 DAB 液显色, 蒸馏水终止

显色,复染,苏木素 3 min,过水 3 次,盐酸乙醇一过, 醇 5 min,无水乙醇 5 min 浸泡两次,中性树胶封片。过水,氨水返蓝 3 min,过水,80% 乙醇 5 min,95% 乙

表 1 Rb、P-Rb、CDH1 和 Vimentin 蛋白表达与乳腺癌患者临床病理学指标的关系(*n*)Tab. 1 Correlation between Rb, P-Rb, CDH1 and Vimentin expression and the clinicopathological parameters of breast cancer patients (*n*)

Variables	Rb		<i>P</i>	P-Rb		<i>P</i>	CDH1		<i>P</i>	Vimentin		<i>P</i>
	-	+		-	+		-	+		-	+	
Age(<i>t/a</i>)												
≤40	2	4	0.124	2	4	0.630	1	5	0.653	1	5	0.102
40 ~ 60	23	20		21	22		9	34		27	16	
≥60	4	12		9	7		5	11		9	7	
Tumor diameter (<i>d/cm</i>)												
≤2	6	14	0.067	13	7	0.034	1	19	0.035	16	4	0.002
>2 and <5	18	21		18	21		11	28		21	18	
≥5	5	1		1	5		3	3		0	6	
Pathological type												
Ductal	14	28	0.013	25	17	0.025	9	33	0.670	25	17	0.567
Lobular	15	8		7	16		6	17		12	11	
Histological grade												
I	4	4	0.948	5	3	0.703	3	5	0.567	4	4	0.831
II	18	23		19	22		9	32		23	18	
III	7	9		8	8		3	13		10	6	
Clinical stage												
I	2	5	0.217	5	2	0.025	0	7	0.004	6	1	0.000
II	16	24		22	18		6	34		28	12	
III	11	7		5	13		9	9		3	15	
Lymph node metastasis												
0	12	17	0.682	17	12	0.045	4	25	0.033	23	6	0.000
1 ~ 3	6	9		9	6		2	13		10	5	
>3	11	10		6	15		9	12		4	17	

光镜下观察,随意选取 5 个高倍视野(×200),计数肿瘤细胞总数和阳性细胞数,得出阳性细胞百分率。阳性细胞率 ≤25% 记 0 分,26% ~ 50% 为 1 分,51% ~ 75% 为 2 分,>75% 为 3 分。再按多数阳性细胞呈现的染色强度予以记分,无显色为 0 分,浅棕黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。以上均有 2 名有经验的临床病理医师阅片,并采用双盲法进行判定。将上述两项得分相加,0 分判为(-),1 ~ 2 分判为(+),3 ~ 4 分判为(++),5 ~ 6 分判为(+++)。本研究以(++)和(+++)定义为该蛋白高表达,(-)和(+)定义为该蛋白低表达。

1.4 real-time PCR 及 Western blotting 法检测在 TGFβ 诱导的 EMT 过程中 Rb 及 P-Rb 的表达

采用 TRIzol 试剂提取细胞的总 RNA,用反转录

试剂盒 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 按照说明书进行从 RNA 到 cDNA 的制备,用 Go Taq® qPCR Master Mix 试剂盒进行 real-time PCR 扩增,GAPDH 作为内参照。所用引物序列为 Rb forward, 5'-CTTCCTCATGCTGTTTCAGGAG-3', Rb reverse, 5'-TG-CATGAAGACCCGAGTTATAGAAT-3'; CDH1 forward, 5'-GGTCTGTCATGGAAGGTGCT-3', CDH1 reverse, 5'-GATGGCCGCATTGTAGGT-3'; Vimentin forward, 5'-AAAGTGTGGCTGCCAAGAAG-3', Vimentin reverse, 5'-AGCCTCAGAGAGGTCAGCAA-3'; GAPDH forward, 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3', GAPDH reverse, 5'-GCCCAATACGACCAATCC-3'。

细胞用 1 × PBS 洗涤两次,500 × *g* 3 min 离心去上清,收集细胞,加入 1 × SDS 上样缓冲液 300 μl,冰

上放置 30 min,超声裂解细胞,4℃,15 000 × g 条件下离心 10 min,收集上清为细胞裂解液。用 BCA 法进行蛋白定量,10% SDA-PAGE 垂直电泳分离,上样量为 30 μg/孔,转移蛋白质到聚乙烯二氟(polyvinilidene difluoride, PVDF)膜上,5%脱脂奶粉 4℃封闭过夜,1:2 000 倍稀释一抗,室温孵育 1 h,膜洗 3 次,加入 1:3 000 倍稀释的辣根过氧化物酶标记的抗鼠或抗兔的二抗室温孵育 1 h,膜洗 3 次,用 ECL 发光系统进行显影,对条带进行定性分析,以β-actin 作为内参照。

1.5 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析,计数资料以率表示,采用卡方检验或连续校正的卡方检验统计 Rb、P-Rb、CDH1 和 Vimentin 的表达与乳腺癌患者临床病理学指标之间的关系,采用 Kaplan-Meier 法计算患者的总生存率,采用 log-rank 检验计算 Rb、P-Rb、CDH1 和 Vimentin 表达与患者总生存率的关系。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化检测 Rb 和 P-Rb 蛋白在乳腺癌组织中的表达

Rb 及 P-Rb 蛋白在乳腺癌组织中主要表达于细胞核,主要呈棕黄色颗粒(图 1)。65 例乳腺癌组织中,36 例 Rb 蛋白表达阳性,阳性率为 55.38%。Rb 蛋白的表达与乳腺癌患者的年龄、肿瘤大小、病理类型、组织学分级、临床分期及淋巴结转移状况均无明显相关性(表 1)。65 例乳腺癌组织中,33 例 P-Rb 蛋白表达阳性,阳性率为 50.77%。P-Rb 蛋白的表达与乳腺癌患者的肿瘤大小、临床分期及淋巴结转移状况呈明显正相关(表 1)。

2.2 CDH1 和 Vimentin 蛋白在乳腺癌组织中的表达

CDH1 蛋白在乳腺癌组织中主要表达于细胞膜和细胞浆(图 2)。65 例乳腺癌组织中,50 例 CDH1 蛋白表达阳性,阳性率为 76.92%。CDH1 蛋白的表达与乳腺癌患者的肿瘤大小、临床分期及淋巴结转移状况呈明显负相关。Vimentin 蛋白在乳腺癌组织中主要表达于细胞质(图 2)。65 例乳腺癌组织中 28 例 Vimentin 蛋白表达阳性,阳性率为 43.08%。Vimentin 蛋白表达与乳腺癌患者的肿瘤大小、临床分期及淋巴结转移状况呈明显正相关。

2.3 乳腺癌组织中 Rb 和 P-Rb 表达与 CDH1 和 Vimentin 蛋白表达之间的关系

65 例标本中,29 例 Rb 蛋白表达阴性的乳腺癌

组织中有 17 例 CDH1 蛋白表达阳性,阳性率为 58.62%;36 例 Rb 蛋白表达阳性的乳腺癌组织中有 33 例 CDH1 蛋白表达阳性,阳性率为 91.67%;明显高于 Rb 表达阴性组,提示 Rb 蛋白表达与 CDH1 蛋白表达之间存在正相关($\chi^2 = 9.881, P = 0.002$)。

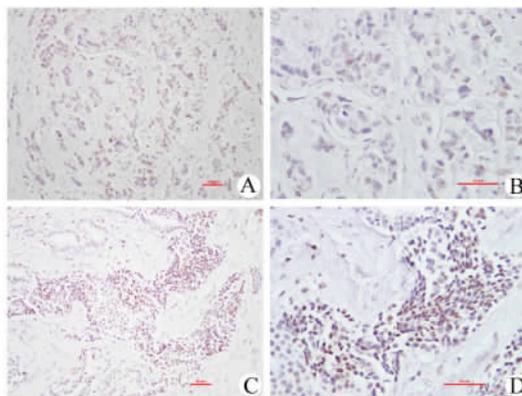


图 1 乳腺癌组织中 Rb 和 P-Rb 蛋白的表达

Fig. 1 Expression of Rb and P-Rb in breast cancer tissues

- A: Positive expression of Rb (× 200);
- B: Positive expression of Rb (× 400);
- C: Positive expression of P-Rb (× 200);
- D: Positive expression of P-Rb (× 400)

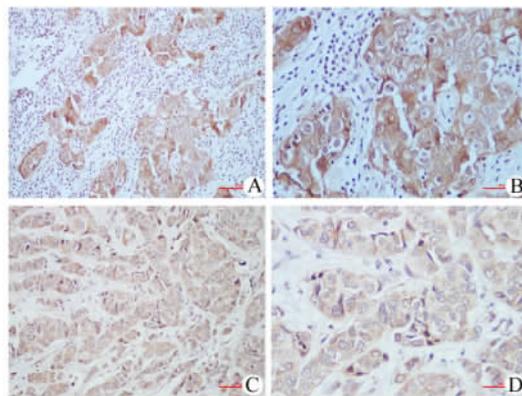


图 2 乳腺癌组织中 CDH1 和 Vimentin 蛋白的表达

Fig. 2 Expression of CDH1 and Vimentin in breast cancer tissues

- A: Positive expression of CDH1 (× 200);
- B: Positive expression of CDH1 (× 400);
- C: Positive expression of Vimentin (× 200);
- D: Positive expression of Vimentin (× 400)

29 例 Rb 蛋白表达阴性的乳腺癌组织中有 18 例 Vimentin 蛋白表达阳性,阳性率为 62.09%;36 例 Rb 蛋白表达阳性的乳腺癌组织中有 10 例 Vimentin 蛋白表达阳性,阳性率为 27.78%;明显低于 Rb 表达

阴性组,提示 Rb 蛋白表达与 Vimentin 蛋白表达之间存在负相关($\chi^2 = 7.702, P = 0.006$)。

32 例 P-Rb 蛋白表达阴性的乳腺癌组织中有 31 例 CDH1 蛋白表达阳性,阳性率为 96.88%;33 例 P-Rb 蛋白表达阳性的乳腺癌组织中有 19 例 CDH1 蛋白表达阳性,阳性率为 57.58%;明显低于 P-Rb 表达阴性组,提示 P-Rb 蛋白表达与 CDH1 蛋白表达呈负相关($\chi^2 = 14.135, P = 0.000$)。28 例 P-Rb 蛋白表达阴性的乳腺癌组织中有 6 例 Vimentin 蛋白表达阳性,阳性率为 21.43%;33 例 P-Rb 蛋白表达阳性的乳腺癌组织中有 22 例 Vimentin 蛋白表达阳性,阳性率为 66.67%;明显高于 P-Rb 表达阴性组,提示 Rb 蛋白表达与 Vimentin 蛋白表达呈正相关($\chi^2 = 15.212, P = 0.000$)。

15 例 CDH1 蛋白表达阴性的乳腺癌组织中有 14 例 Vimentin 蛋白表达阳性,阳性率为 93.3%;50

例 CDH1 蛋白表达阳性的乳腺癌组织中有 14 例 CDH1 蛋白表达阳性,阳性率为 28.0%;明显低于 CDH1 表达阴性组,提示 Vimentin 蛋白表达与 CDH1 蛋白表达呈负相关($\chi^2 = 20.086, P = 0.000$)。

2.4 Rb、P-Rb、CDH1 和 Vimentin 蛋白表达与乳腺癌患者预后的关系

如图 3 所示,生存分析结果显示,Rb 蛋白表达与乳腺癌患者的总五年生存率无明显关系($P = 0.172$),P-Rb 蛋白表达阳性的乳腺癌患者的总五年生存率明显低于 P-Rb 蛋白表达阴性的患者($P = 0.022$),CDH1 蛋白表达阳性的乳腺癌患者的总五年生存率明显高于 CDH1 蛋白表达阴性的患者($P = 0.000$),Vimentin 蛋白表达阳性的乳腺癌患者的总五年生存率明显低于 Vimentin 表达阴性的患者($P = 0.000$)。

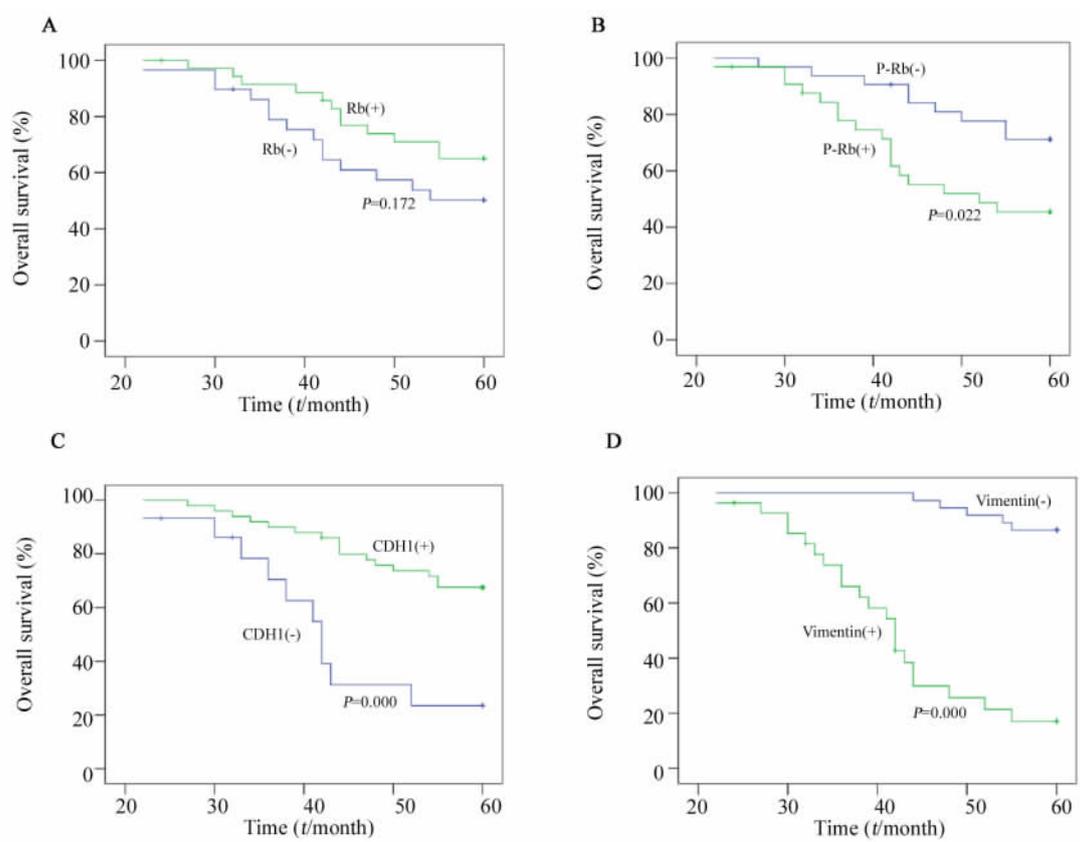


图 3 Rb、P-Rb、CDH1 和 Vimentin 蛋白表达与乳腺癌患者总体生存率的关系

Fig.3 Association between the expressions of Rb, P-Rb, CDH1, Vimentin and the overall survival rate of breast cancer patients

A: Association Rb expression and overall survival of breast cancer patients; B: Association P-Rb expression and overall survival of breast cancer patients; C: Association CDH1 expression and overall survival of breast cancer patients;

D: Association Vimentin expression and overall survival of breast cancer patients

2.5 TGF- β 诱导乳腺癌细胞 HMLE 发生 EMT 过程中 Rb 及 EMT 标记物的表达变化

如图4所示, 10 nmol/ml 的 TGF- β 处理 HMLE 细胞 24 h 后, 细胞发生了从上皮细胞到间质细胞特性的转变, 上皮细胞标记物 CDH1 的表达明显下降, 间质细胞标记物 Vimentin 的表达明显上升。同时, 在细胞发生 EMT 的过程中, Rb 的表达显著下降, P-Rb 的表达显著上升。表明, Rb 的失活参与了乳腺癌细胞从上皮表型到间质表型的转变。

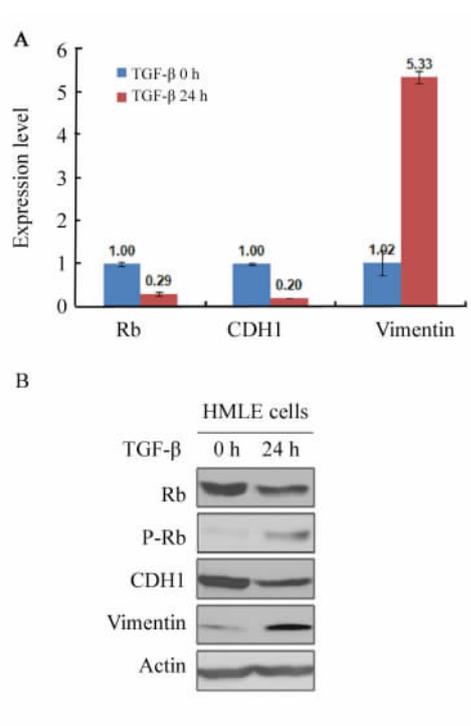


图4 Real-time PCR 和 Western blotting 检测 TGF β 处理 HMLE 细胞 24 h 后 Rb、P-Rb、CDH1 和 Vimentin 表达的变化

Fig.4 Rb, P-Rb, CDH1 and Vimentin expression in HMLE cells after TGF β treatment detected by RT-PCR and Western blotting

A: Real-time PCR; B: Western blotting

3 讨论

Rb 基因是一种肿瘤抑制基因, 其表达产物分布于细胞核内, 可调控细胞的增殖、分化和凋亡^[11]。Rb 蛋白的磷酸化和去磷酸化形式是其调节细胞生物学功能的主要形式^[12], 磷酸化形式是其失活形式。细胞周期依赖性蛋白激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs) 能够对 Rb 进行磷酸化, 使其失活^[13,16]。Rb 蛋白的不同磷酸化状态对于其发挥功

能起到关键的作用。最近的研究显示, 乳腺癌细胞中 Rb 基因的降低可促使细胞与细胞间的连接遭到破坏, 且诱导细胞由上皮表型向间质表型转化^[10,15]。但关于 Rb 和 P-Rb 在乳腺癌组织中的表达情况及与 EMT 标记物的关系目前尚不清楚。本研究检测了 65 例乳腺癌组织中 Rb、P-Rb、上皮标记物 CDH1 以及间质细胞标记物 Vimentin 的分布情况, 分析了其表达与乳腺癌患者临床病理学指标和预后的关系, 并分析了 Rb 和 P-Rb 在 TGF- β 诱导乳腺癌细胞 EMT 过程中的变化。研究结果显示, 乳腺癌组织中 Rb 蛋白的表达与乳腺癌患者的年龄、肿瘤大小、病理类型、组织学分级、临床分期及淋巴结转移状况均无明显相关性; P-Rb 蛋白的表达与乳腺癌患者的肿瘤大小、临床分期及淋巴结转移状况呈明显正相关关系; CDH1 蛋白的表达与乳腺癌患者的肿瘤大小、临床分期及淋巴结转移状况呈明显负相关; Vimentin 蛋白表达与乳腺癌患者的肿瘤大小、临床分期及淋巴结转移状况呈明显正相关。P-Rb 蛋白表达阳性的乳腺癌患者的总五年生存率明显低于 P-Rb 蛋白表达阴性的患者, CDH1 蛋白表达阳性的乳腺癌患者的总五年生存率明显高于 CDH1 蛋白表达阴性的患者, Vimentin 蛋白表达阳性的乳腺癌患者的总五年生存率明显低于 Vimentin 表达阴性的患者。以上结果提示, EMT 和 Rb 基因的失活促进了乳腺癌向恶性方向的转变。研究结果还显示, Rb 蛋白表达与 CDH1 蛋白表达呈正相关, 与 Vimentin 蛋白表达呈负相关; 而 P-Rb 蛋白表达与 CDH1 蛋白表达呈负相关, 与 Vimentin 蛋白表达呈正相关。提示, Rb 基因的失活与乳腺癌 EMT 过程密切相关。研究表明, TGF- β 可通过与其受体结合激活下游 Smad 信号通路, 促进 EMT 的发生^[7]。本实验结果显示, 在 TGF- β 诱导乳腺癌细胞 HMLE 发生 EMT 的过程中, Rb 蛋白的表达显著下降, P-Rb 蛋白的表达显著上升。此结果表明, Rb 的失活参与了乳腺癌细胞从上皮表型到间质表型的转变。但 Rb 失活参与 EMT 的机制目前尚不清楚。Arima 等^[14] 研究显示, 在乳腺癌细胞 MCF7 中抑制 Rb 的表达可引起细胞间连接的破坏并诱导 MCF7 细胞向间质样表型的转变, 且 Rb 的过表达可抑制 MCF10A 细胞发生 EMT。该研究小组的结果还显示, CDH1 的启动子上存在 Rb 的结合位点, Rb 可与 AP-2a 形成复合物并结合到 CDH1 的启动子上, 从而调控 CDH1 的表达。此外, Rb 的功能缺失也可以诱导其它 EMT 相关的转录因子, 如 Slug, Zeb-1 等的表达。最新的研究结果显示^[17], Rb 基因的缺失可导致有关侵袭

基因的下调,这与本文的结果一致,即 Rb 蛋白与 CDH1 蛋白呈正相关,而 P-Rb 蛋白与 CDH1 蛋白呈负相关。这进一步证明了 *Rb* 基因的失活参与了乳腺癌细胞从上皮到间质的转化过程。

总之,*Rb* 基因的失活影响了乳腺癌细胞从上皮到间质的转化,从而促进了乳腺癌的转移,抑制 *Rb* 基因的失活可作为阻止乳腺癌细胞转移的靶点。

[参 考 文 献]

- [1] ZHU T, LI X, LUO L, et al. Reversion of malignant phenotypes of human glioblastoma cells by β -elemene through β -catenin-mediated regulation of stemness-, differentiation- and epithelial-to-mesenchymal transition-related molecules [J]. J Transl Med, 2015, 13(1): 356. DOI: 10.1186/s12967-015-0727-2.
- [2] FU J, KE X, TAN S, et al. The natural compound codonolactone attenuates TGF- β 1-mediated epithelial-to-mesenchymal transition and motility of breast cancer cells [J]. Oncol Rep, 2015, 4. DOI: 10.3892/or.2015.4394.
- [3] TIWARI N, GHELDOLF A, TATARI M, et al. EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells [J]. Semin Cancer Biol, 2012, 22(3): 194-207. DOI: 10.1016/j.semcancer.2012.02.013.
- [4] GUNASINGHE N P, WELLS A, THOMPSON E W, et al. Mesenchymal-epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonization in breast cancer [J]. Cancer Metastasis Rev, 2012, 31(3/4): 469-478. DOI: 10.1007/s10555-012-9377-5.
- [5] THIERY J P, ACLOQUE H, HUANG R Y, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease [J]. Cell, 2009, 139(5): 871-890. DOI:10.1016/j.cell.2009.11.007.
- [6] YANG J, WEINBERG R A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis [J]. Dev Cell, 2008, 14(6): 818-829. DOI:10.1016/j.devcel.2008.05.009.
- [7] O'CONNOR J W, GOMEZ E W. Biomechanics of TGF β -induced epithelial-mesenchymal transition: implication for fibrosis and cancer [J]. Clin Transl Med, 2014, 3: 23. DOI:10.1186/2001-1326-3-23.
- [8] WEINBERG R A. The retinoblastoma protein and cell cycle control [J]. Cell, 1995, 81(3): 323-330. DOI:10.1016/0092-8674(95)90385-2.
- [9] TAYA Y. RB kinases and RB-binding proteins: new points of view [J]. Trends Biochem Sci, 1997, 22(1): 14-17. DOI:10.1016/S0968-0004(96)10070-0.
- [10] SHEAHAN S, BELLAMY C O, HARLAND S N, et al. TGF β induces apoptosis and EMT in primary mouse hepatocytes independently of p53, p21Cip1 or Rb status [J]. BMC Cancer, 2008, 8: 191. DOI: 10.1186/1471-2407-8-191.
- [11] MANNING A L, DYSON N J. RB, mitotic implications of a tumor suppressor [J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(3): 220-226. DOI: 10.1038/nrc3216.
- [12] GORDON G M, DU W. Conserved RB functions in development and tumor suppression [J]. Protein Cell, 2011, 2(11): 864-878. DOI:10.1007/s13238-011-1117-z.
- [13] DU W, SEARLE J S. The Rb pathway and cancer therapeutics [J]. Curr Drug Targets, 2009, 10(7): 581-589. DOI:10.2174/138945009788680392.
- [14] ARIMA Y, INOUE Y, SHIBATA T, et al. Rb depletion results in deregulation of E-Cadherin and induction of cellular phenotypic changes that are characteristic of the epithelial-to-mesenchymal transition [J]. Cancer Res, 2008, 68(13): 5104-5112. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5680.
- [15] AGNIESZKA K W, DEREK W C, DAYANA R, et al. The retinoblastoma tumor suppressor pathway modulates the invasiveness of ErbB2 positive breast cancer [J]. Oncogene, 2014, 33(30): 3980-3991. DOI: 10.1038/onc.2013.367.
- [16] AGNIESZKA K W, ERIK S K. Retinoblastoma tumor suppressor pathway in breast cancer: prognosis, precision medicine, and therapeutic interventions [J]. Breast Cancer Res, 2014, 16(3): 207. DOI: 10.1186/bcr3652.
- [17] KNUDSEN E S, MCCLENDON A K, FRANCO J, et al. RB loss contributes to aggressive tumor phenotypes in MYC-driven triple negative breast cancer [J]. Cell Cycle, 2015, 14(1): 109-22. DOI:10.4161/15384101.2014.967118.

[收稿日期] 2015 - 10 - 20 [修回日期] 2015 - 12 - 25

[本文编辑] 党瑞山

· 读者 · 作者 · 编者 ·

文稿中统计学符号规范化书写的要求

本刊严格遵守国家标准 GB/T 3358 - 2009《统计学词汇及符号》的有关规定。为此,请作者书写统计学符号时注意以下要求:(1)样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} ,不用大写 X ,也不用 Mean 或 M ;(2)标准差用英文小写 s ,不用 SD;(3)标准误用英文小写 s_x ,不用 SE;(4) t 检验用英文小写 t ;(5) F 检验用英文大写 F ;(6)卡方检验用希腊文小写 χ^2 ;(7)相关系数用英文小写 r ;(8)自由度用希腊文小写 ν ;(9)样本数用英文小写 n ;(10)概率用英文大写 P ;(11)以上符号 \bar{x} 、 s_x 、 t 、 F 、 χ^2 、 r 、 ν 、 n 、 P 均为斜体。请作者注意遵照执行。

(本刊编辑部)