

# ICAM-1在三阴性乳腺癌中的表达的 临床意义及与预后的关系

刘子梅, 余文熙, 孙 鑫, 袁 媛, 沈 赞

上海交通大学附属第六人民医院肿瘤内科, 上海 200233

**[摘要]** **背景与目的:** 三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)侵袭性强, 预后差, 治疗手段匮乏。该研究通过检测人TNBC与对应癌旁组织中细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)蛋白的表达, 研究ICAM-1蛋白与TNBC临床病理特征及预后的相关性。**方法:** 收集59例TNBC及其对应的50例癌旁组织标本, 应用免疫组织化学法检测ICAM-1在59例TNBC及50例癌旁组织中的表达水平, 比较其阳性率。分析ICAM-1蛋白的表达与TNBC年龄、肿瘤大小、临床病理类型、组织学分级、淋巴结转移、肿瘤TNM分期、脉管癌栓、神经浸润、Ki-67、p53和E-cadherin等临床病理特征及与患者预后的关系。**结果:** TNBC中ICAM-1的表达明显高于癌旁组织( $P=0.000$ )。ICAM-1与淋巴转移、组织学分级和TNM分期有关( $P$ 分别为0.036、0.027和0.048), 与肿瘤大小、临床病理类型、脉管癌栓、Ki-67水平、p53和E-cadherin表达等无关。ICAM-1高表达组患者的无病生存时间(disease-free survival, DFS)显著较ICAM-1低表达组短( $P=0.036$ ), 但对于总生存时间(overall survival, OS)没有显著影响。另外, Cox比例风险模型多因素分析, ICAM-1表达、淋巴结转移是影响DFS的独立危险因素( $HR=3.2$ , 95%CI: 1.6-6.4,  $HR=2.7$ , 95%CI: 1.3-5.9,  $P$ 均 $<0.05$ )。**结论:** ICAM-1蛋白可以作为判断TNBC恶性程度的指标, ICAM-1高表达的三阴性乳腺癌临床预后差。

**[关键词]** 三阴性乳腺癌; 细胞间黏附分子-1; 免疫组化; 预后

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2017.02.007

中图分类号: R737.9 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2017)02-0121-07

**Clinical significance of ICAM-1 expression and its correlation with prognosis of triple-negative breast cancer** LIU Zimei, YU Wenxi, SUN Chu, YUAN Yuan, SHEN Zan (Department of Medical Oncology, Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China)

Correspondence to: SHEN Zan E-mail: sshenzan@vip.sina.com

**[Abstract]** **Background and purpose:** Triple negative breast cancer (TNBC) is with high invasion, poor prognosis and lack of usefull treatment. This study investigated expression status of ICAM-1 protein in TNBC in order to explore its relationship with clinicopathological features and outcome in patients. **Methods:** Fifty-nine tissue samples of TNBC were collected while 50 cases of para-carcinoma tissue samples were used as negative controls. Immunohistochemical staining was conducted to detect expression level of ICAM-1 protein. The relationship of ICAM-1 protein expression with clinicopathological features (age, tumor size, subtype, grade, status of lymph node metastasis, TNM stage, vascular tumor thrombus, nerve infiltration, Ki-67, p53 and E-cadherin expression) and outcome in patients were analyzed. **Results:** The ICAM-1 protein expression of TNBC was significantly higher than that in adjacent tissues ( $P=0.000$ ). ICAM-1 expression was related to status of lymph node metastasis, grade and TNM stage (with a  $P$ -value of 0.036, 0.027 and 0.048, respectively), while demonstrated an undefined relationship with tumor size, subtype, vascular tumor thrombus and expression of Ki-67, p53 and E-cadherin. The disease-free survival (DFS) of ICAM-1 high expression set was shorter than that of the lower one but has nothing to do with overall survival (OS). In addition, Cox proportional hazards model showed that ICAM-1 expression and lymph node metastasis were independent risk factors of DFS in patients ( $HR=3.2$ , 95%CI: 1.6 to 6.4,  $HR=2.7$ , 95%CI: 1.28 to 5.9,  $P<0.05$ ). **Conclusion:** ICAM-1 could serve as a predictive factor for differentiation status of TNBC. The high expression of ICAM-1 in TNBC may indicate

poorer prognosis.

[Key words] Triple-negative breast cancer; Intercellular adhesion molecule-1; Immunohistochemistry; Prognosis

三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)是乳腺癌分子分型中的一种,其雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)和人表皮生长因子受体2(human epithelial growth factor receptor-2, HER-2)表达均阴性。具有肿瘤负荷大、恶性程度高、临床复发转移早和缺少相应治疗手段等临床特点。

细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1),又叫做CD54分子,由ICAM-1基因编码,属于黏附分子中免疫球蛋白超家族中的成员,是介导黏附反应重要的一个黏附分子。它分为sICAM-1(可溶型)和mICAM-1(膜型)2种,mICAM-1(膜型)在细胞表面以糖蛋白的形式存在,sICAM-1(可溶型)位于细胞外以游离形式存在。ICAM-1在促进炎症部位的黏连性、控制肿瘤恶化、转移及调节机体免疫反应中起重要作用。它通过与其受体的特异性结合,使白细胞、炎症细胞和肿瘤细胞等与内皮细胞间的黏附作用增强,促进内皮细胞活化,使它们更容易穿透内皮。内皮细胞上的细胞间黏附分子介导细胞与细胞间或细胞与基质间相互接触和结合,从而参与细胞的信号转导与活化、细胞组织生长与分化、免疫应答、炎性反应、血管生成及肿瘤转移等生理病理过程<sup>[1]</sup>。ICAM-1的研究在肝癌<sup>[2]</sup>、前列腺癌<sup>[3]</sup>和肺癌<sup>[4]</sup>中均有报道,但在TNBC中研究较少,本研究旨在探讨ICAM-1与TNBC临床病理特征及预后之间的关系。

## 1 资料和方法

### 1.1 标本收集与处理

收集2008—2013年上海交通大学附属第六人民医院TNBC患者根治标本59例(剔除新辅助化疗患者)。其中癌组织59例,癌旁组织50例(50例为对应癌组织样本,缺失9例)。根据NCCN

指南,HER-2阴性包括免疫组织化学法结果阴性或行FISH检测结果无扩增。患者年龄24~83岁,平均年龄57.4岁,根据AJCC TNM分期标准,I~II期40例,III~IV期19例,浸润性导管癌38例,浸润性小叶癌3例,基底细胞癌8例,其他10例,肿块小于等于2 cm者23例,大于2 cm者36例。59例患者中,术后复发或转移15例,其中骨转移6例,肺转移3例,肝转移2例,淋巴结2例,局部复发2例。所有标本经10%甲醛溶液固定后,常规石蜡包埋,切片厚度为5 μm。

### 1.2 主要试剂耗材

ICAM-1兔抗人单克隆抗体购自英国Abcam公司(货号ab53013),即用型SABC(过氧化物酶)试剂盒、改进型柠檬酸钠抗原修复液、DAB辣根过氧化物酶显色试剂盒、苏木素染色液、中性树胶封片剂和磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)等均购自上海威奥生物科技有限公司。

### 1.3 免疫组织化学法染色

本实验分为阳性对照组、阴性对照组和实验组。阳性对照组使用正常肺组织(已知ICAM-1表达量高),阴性对照组采用PBS代替一抗。实验组包括59例癌组织和50例癌旁组织标本。载玻片防脱片剂处理,置58~60℃烤箱30~60 min。切片常规脱蜡至水:二甲苯60℃5 min共3次。100%→95%→75%酒精,每级均为3 min。3% $H_2O_2$ 室温5~10 min灭活内源性酶。0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液(pH为6.0)热修复抗原。5%BSA封闭液封闭,ICAM-1兔抗人一抗(1:50稀释),4℃过夜。滴加生物素化山羊抗兔IgG(二抗),37℃20 min。滴加试剂SABC,37℃20 min。DAB显色:使用DAB显色试剂盒(AR1022)。取1 mL蒸馏水,加试剂盒中A、B和C试剂各1滴,混匀后加至切片。苏木素复染碱性PBS返蓝。中性树脂封片。

#### 1.4 免疫组织化学法结果及判定标准

所有的免疫组织化学切片均由两位资深病理科医师评审,参照参考文献[5-6]的判定标准,最后评分结果采取阳性细胞比例及着色深浅相结合的方法,每张切片随机选取5个视野,每个视野计数100个细胞,细胞数小于等于25%记为1分,25%~50%记为2分,大于50%记为3分,ICAM-1蛋白为细胞膜蛋白,在细胞膜及细胞质中着色,显微镜下无着色记为0分,着色为浅黄颗粒记为1分,深黄或棕色颗粒记为2分。最后两者所得评分相乘,0和1分为阴性表达,2、3、4和6分为阳性表达。

#### 1.5 统计学处理

应用SPSS 23.0统计软件,率的比较应用 $\chi^2$

检验,相关统计量应用非参数Spearman相关,根据需要并做Fisher精确检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。单因素生存分析应用Log-rank检验,对于 $P<0.05$ 的指标应用Cox风险模型进行多因素分析。

## 2 结 果

### 2.1 ICAM-1蛋白癌组织和癌旁组织的表达

59例癌组织中阳性43例(72.9%),阴性16例(21.7%,图1)。50例癌旁组织中,阳性9例(18%),阴性41例(82%)。ICAM-1蛋白的表达癌组织明显高于癌旁组织( $P=0.000$ ,表1)。

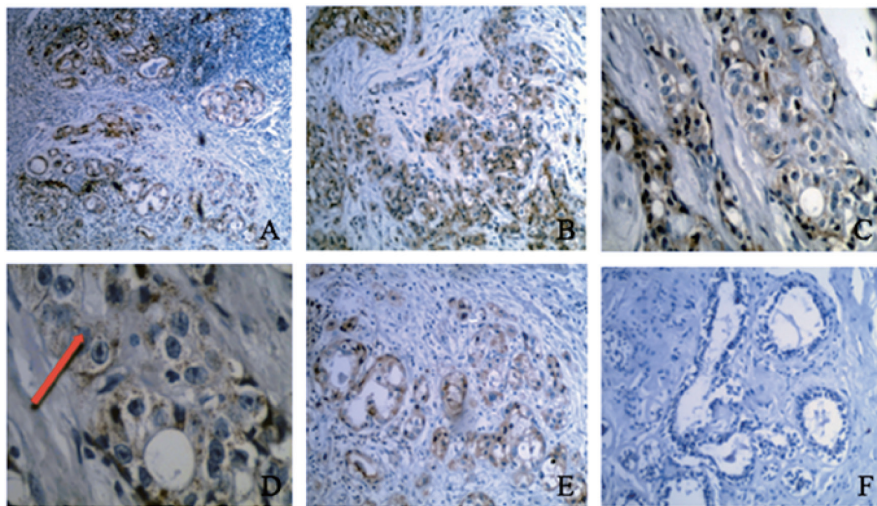


图1 免疫组化标记ICAM-1蛋白在TNBC及癌旁组织中的表达情况

Fig. 1 Immunohistochemical staining of ICAM-1 protein in TNBC and para-carcinoma tissues

A, B, C, D: ICAM-1 strongly positive (+++) by immunohistochemical staining in TNBC tissues ( $\times 40$ ,  $\times 100$ ,  $\times 200$ ,  $\times 400$ , respectively), red arrow displayed the localization of ICAM-1 on the surface membrane and in cytoplasm of TNBC cells. E: ICAM-1 lightly stained by immunohistochemical in TNBC tissues ( $\times 100$ ). F: ICAM-1 non-stained in normal breast tissues ( $\times 100$ )

表1 ICAM-1蛋白在TNBC及癌旁组织中的表达情况

Tab. 1 expression of ICAM-1 in TNBC and para-carcinoma tissues

Sample	n	ICAM-1 expression		P value
		Yes	No	
TNBC tissues	59	43(72.9)	16(21.7)	0.000
Para-carcinoma tissues	50	9(18)	41(82)	

### 2.2 ICAM-1的表达与临床病理特征之间的关系

ICAM-1与淋巴转移、组织学分级和TNM分

期有关( $P$ 分别为0.036、0.027和0.048),与肿瘤大小、临床病理类型、脉管癌栓、Ki-67水平、p53和E-cadherin表达等无关(表2)。

表 2 TNBC中ICAM-1蛋白的表达和临床病理特征之间的关系

Tab. 2 Association of ICAM-1 protein expression with the clinicopathological features in TNBC

Item	<i>n</i>	ICAM-1 expression		$\chi^2$	<i>P</i> value
		Yes	No		
Age/year					
≤50	18	12(66.7)	6(33.3)	0.155	0.694
>50	41	31(75.6)	10(24.4)		
Tumor size <i>d</i> /cm					
≤2	23	15(65.2)	8(34.8)	1.120	0.290
>2	36	28(77.8)	8(22.0)		
Subtype					
Ductal	38	30(78.9)	8(21.1)	3.287	0.329
Lobular	3	2(66.7)	1(33.3)		
Basal	8	7(70.0)	3(30.0)		
Others	10	4(50.0)	4(50.0)		
Histological grade					
I	14	7(50.0)	7(50.0)	4.862	0.027
II - III	45	36(80.0)	9(20.0)		
Lymph node metastasis					
Yes	24	21(87.5)	3(12.5)	4.374	0.036
No	35	22(62.9)	13(37.1)		
Blood vessel metastasis					
Yes	7	6(85.7)	1(14.3)	0.113	0.718
No	52	37(71.2)	15(28.8)		
TNM-staging					
I - II	40	26(65.0)	14(35.0)	3.904	0.048
III - IV	19	17(89.5)	2(10.5)		
Ki-67 level					
≤0.25	13	9(69.2)	4(30.8)	0.813	0.666
0.25-0.50	24	19(79.2)	5(20.8)		
>0.50	22	15(68.2)	7(31.8)		
p53 expression					
Yes	36	15(65.2)	8(34.8)	1.120	0.290
No	23	28(77.8)	8(22.2)		
E-cadherin expression					
Yes	41	32(78.0)	9(22.0)	1.060	0.303
No	18	11(66.1)	7(38.9)		

### 2.3 ICAM-1与预后的关系

单因素分析显示, ICAM-1蛋白的表达与无病生存时间(disease-free survival, DFS)相关, 与(overall survival, OS)无关(图2)。多因素分析

显示, ICAM-1蛋白的表达及淋巴结转移是影响无疾病生存DFS的独立预后因素( $P < 0.05$ , 表3、4)。

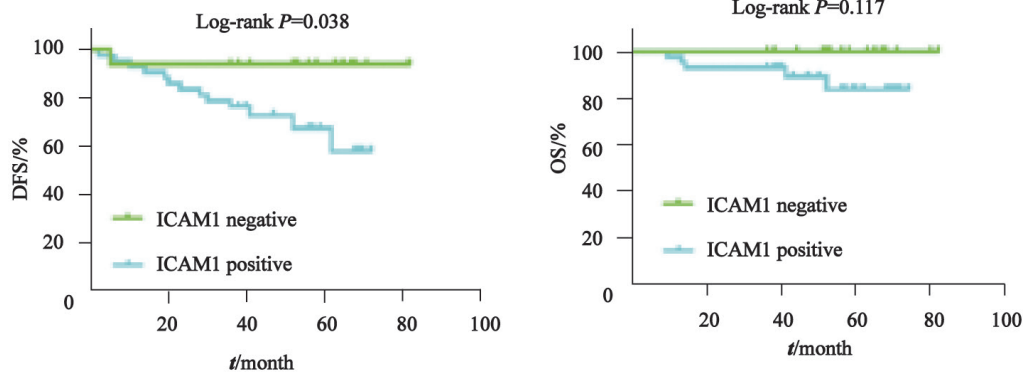


图 2 TNBC中ICAM-1的表达与DFS及OS之间的关系

Fig. 2 Association of ICAM-1 protein expression with DFS and OS in TNBC

表3 TNBC临床病理特征和DFS的关系

Tab. 3 Association of TNBC clinicopathological features with DFS

Item	n	DFS/month			$\chi^2$	P value
		$\bar{x}\pm s$	95%CI			
			Low	Upper		
ICAM-1 expression						
Yes	43	78.188±4.660	69.055	87.320	4.411	0.036
No	16	55.829±3.851	48.281	63.377		
Age/year						
≤50	18	52.146±7.018	38.390	65.901	1.388	0.239
>50	41	69.949±3.857	62.390	77.507		
Tumor size d/cm						
≤2	23	79.870±3.062	73.869	85.870	8.106	0.004
>2	36	52.988±4.373	44.418	61.559		
Subtype						
Ductal	38	60.111±3.575	53.110	67.112	0.002	0.960
Lobular	3	42.333±12.317	18.192	66.474		
Basal	8	70.700±8.082	54.859	86.541		
Others	10	56.500±10.129	36.647	76.353		
Grade						
I	14	67.800±9.630	48.925	86.675	0.105	0.746
II-III	45	59.053±3.438	52.314	65.792		
Lymph node metastasis						
Yes	24	45.854±5.294	35.479	56.229	13.559	0.000
No	35	76.448±3.570	69.450	83.446		
blood vessel metastasis						
Yes	7	47.518±5.204	37.319	57.718	10.547	0.001
No	52	74.498±3.975	66.707	82.290		
TNM-stage						
I-II	40	75.211±3.283	68.777	81.645	18.133	0.000
III-IV	19	40.311±6.395	27.777	52.845		
ki-67 level						
≤0.25	13	71.769±7.386	57.294	86.245	0.053	0.819
0.25-0.50	24	56.708±4.939	47.029	66.388		
>0.50	22	60.385±4.709	51.155	69.614		
p53 expression						
Yes	36	59.295±4.079	51.300	67.289	0.001	0.971
No	23	66.478±5.798	55.114	77.842		
E-cadherin expression						
Yes	41	52.066±6.056	40.196	63.935	2.413	0.120
No	18	70.657±3.960	62.895	78.419		

表4 Cox比例风险模型多因素分析影响DFS的独立危险因素

Tab. 4 Cox proportional hazards model analysis the independent risk of DFS

Item	B	SE	Wald	Sig.	Exp(B)	95%CI	
						Upper	Lower
ICAM-1 expression	1.169	0.354	10.926	0.001	3.219	1.609	6.438
lymph node status	1.011	0.392	6.665	0.010	2.748	1.276	5.920
TNM staging	0.223	0.330	0.455	0.500	1.249	0.654	2.386
Blood vessel metastasis	0.538	0.336	2.556	0.110	1.712	0.886	3.310
Tumor size d/cm	0.186	0.411	0.204	0.652	1.204	0.538	2.697

### 3 讨 论

乳腺癌是女性患者最常见的恶性肿瘤之一, 并且其发病率呈逐年上升趋势。TNBC是乳腺癌的一种特殊类型, 其复发率高, 转移早。由于TNBC的ER、PR和HER-2表达均阴性, 内分泌与靶向药物均无用武之地, 加上国际又无规范的化疗方案可供临床医师参考, 一直被看作是比较顽固的肿瘤, 因此找到其相应靶点就成为了一项难题。

ICAM-1基因定位于染色体19p13.2, 编码一种糖蛋白即ICAM-1蛋白, 全长532个氨基酸, 分子量为 $80 \times 10^3 \sim 100 \times 10^3$ , 主要表达于内皮细胞及免疫细胞的表面, 它可以和淋巴细胞功能相关抗原-1(lymphocyte function-associated antigen-1, LFA1)即整合素CD11a/CD18或MAC(CD11b/CD18)相结合, 也是鼻病毒的受体。

ICAM-1在促进炎症部位的黏连性、控制肿瘤恶化转移及调节机体免疫反应中发挥重要作用。它通过与其受体的特异性结合, 使白细胞、炎症细胞和肿瘤细胞等与内皮细胞间的黏附作用增强, 促进内皮细胞活化, 使它们更容易穿透内皮。内皮细胞上的细胞间黏附分子介导细胞与细胞间或细胞与基质间相互接触和结合, 从而参与细胞的信号转导与活化、细胞组织生长及分化、免疫应答、炎症反应、血管生成及肿瘤转移等生理病理过程<sup>[1]</sup>。

ICAM-1在正常组织中一般呈低水平的表达, 但在肺和肾脏组织中表达量较高。最近有研究发现, 其表达与很多恶性肿瘤相关, 包括前列腺癌<sup>[7]</sup>和卵巢癌<sup>[8]</sup>。Hayes等<sup>[9]</sup>利用免疫组织化学法研究了300例人体正常的组织、癌组织及转移组织, 发现ICAM-1的表达与很多类型肿瘤相关, 且在肿瘤的转移中也扮演着重要的角色。另外, ICAM-1蛋白也被报道与某些肿瘤特定的临床病理类型相关。

关于ICAM-1蛋白与TNBC的临床病理特征

之间的关系研究很少, 因此, 我们应用免疫组织化学法直接测定ICAM-1在癌组织和癌旁组织中的表达情况, 结果发现, ICAM-1的表达癌组织中明显高于癌旁组织, 且与淋巴转移、组织学分级和TNM分期有关, 与肿瘤大小、临床病理类型、脉管癌栓、Ki-67水平、p53和E-cadherin表达等无关。预后方面提示ICAM-1表达与无疾病生存DFS相关, ICAM-1高表达的患者PFS较低表达的患者短, 但与OS无关, 可能是由于我们的标本数太少, 乳腺癌5年生存率太高, 随访截止时间期间未出现太多患者死亡, 因此, 我们也不将OS作为我们的研究终点。

本研究只是在组织标本中检测到ICAM-1的表达, 后续试验还需要在TNBC细胞株中采用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)检测ICAM-1 mRNA的表达及蛋白[质]印迹法(Western blot)检测蛋白水平的表达及其敲出后对细胞行为学的影响, 并在裸鼠成瘤模型上进一步研究其参与肿瘤发生、发展的具体机制。ICAM-1有可能成为TNBC潜在的一个靶点。

#### [参 考 文 献]

- [1] 肖宇宏, 白云, 宋敏, 等. 内毒素刺激人脐静脉内皮细胞免疫相关分子的表达[J]. 免疫学杂志, 2006, 22(2): 124-128.
- [2] ZHU P P, YUAN S G, LIAO Y, et al. High level of intercellular adhesion molecule-1 affects prognosis of patients with hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(23): 7254-7263.
- [3] DUZAGAC F, INAN S, ELA S F, et al. JAK/STAT pathway interacts with intercellular cell adhesion molecule (ICAM) and vascular cell adhesion molecule (VCAM) while prostate cancer stem cells form tumor spheroids [J]. J BUON, 2015, 20(5): 1250-1257.
- [4] KOTTEAS E A, BOULAS P, GKIOZOS I, et al. The intercellular cell adhesion molecule-1 (icam-1) in lung cancer: implications for disease progression and prognosis [J]. Anticancer Res, 2014, 34(9): 4665-4672.
- [5] MATHEW J, HINES J E, OBAFUNWA J O, et al. CD44 is expressed in hepatocellular carcinomas showing vascular invasion [J]. J Pathol, 1996, 179(1): 74-79.
- [6] GONZALEZ M A, PINDER S E, WENCYK P M, et al. An immunohistochemical examination of the expression of

- E-cadherin, alpha- and beta/gamma-catenins, and alpha2- and beta1-integrins in invasive breast cancer [ J ] . J Pathol, 1999, 187(5): 523-529.
- [ 7 ] CHEN H, HERNANDEZ W, SHRIVER M D, et al. ICAM gene cluster SNPs and prostate cancer risk in African Americans [ J ] . Hum Genet, 2006, 120(1): 69-76.
- [ 8 ] USAMI Y, ISHIDA K, SATO S, et al. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression correlates with oral cancer progression and induces macrophage/cancer cell adhesion [ J ] . Int J Cancer, 2013, 133(3): 568-578.
- [ 9 ] HAYES S H, SEIGEL G M. Immunoreactivity of ICAM-1 in human tumors, metastases and normal tissues [ J ] . Int J Clin Exp Pathol, 2009, 2(6): 553-560.
- ( 收稿日期: 2016-08-08 修回日期: 2016-12-16 )

## 《中国癌症杂志》2017年征订启事

《中国癌症杂志》是由国家教育部主管、复旦大学附属肿瘤医院主办的全国性肿瘤学术期刊，读者对象为从事肿瘤基础、临床防治研究的中高级工作者。主要报道内容：国内外研究前沿的快速报道、专家述评、肿瘤临床研究、基础研究、文献综述、学术讨论、临床病理

讨论、病例报道、讲座和简讯等。《中国癌症杂志》已入选中文核心期刊、中国科技核心期刊及全国肿瘤类核心期刊，并为中国科技论文统计源期刊，先后被“中国期刊网”、“万方数据——数字化期刊群”和“解放军医学图书馆数据库(CMCC)”等收录。

《中国癌症杂志》为月刊，大16开，80页铜版纸(随文彩图)，每月30日出版，单价15元，全年180元。国际标准连续出版物号1007-3639，国内统一连续出版物号CN 31-1727/R，邮发代号4-575。

读者可在当地邮局订阅，漏订者可直接向本刊编辑部订阅。

主 编：沈镇宙

联系地址：上海市东安路270号复旦大学附属肿瘤医院内

《中国癌症杂志》编辑部

邮 编：200032

电 话：021-64188274；021-64175590×83574

网 址：www.china-oncology.com

电子邮件：zgazz@163.com

《中国癌症杂志》编辑部