

## CD47 在乳腺癌及癌旁组织中的表达及其意义

陈 涛,王 璇,程 凯,马恒辉,王婧洁,李汉君,曾慧娟,王璐璐,王少华

**【摘要】** 目的 研究乳腺癌组织及癌旁组织中 CD47 的表达及其与临床预后及病理特征的相关性。方法 分析 TCGA 数据库中乳腺癌 CD47 表达情况及其与临床预后的相关性;选取金陵医院 2011–2015 年期间 185 例乳腺癌患者,应用免疫组化方法评价乳腺癌组织及乳腺癌旁组织中 CD47 的表达情况,分析其与患者临床病理特征及预后的相关性。结果 TCGA 数据库中 CD47 基因扩增及 mRNA 表达上调者比例为 2.6% (22/825), CD47 基因表达上调组中位总生存期低于正常组 (55.6 个月 *vs* 113.7 个月,  $P=0.0256$ )。乳腺癌组织 CD47 阳性表达率为 56.21% (104/185), 癌旁组织中阳性表达率为 12.97% (24/185), 癌与癌旁组织表达差异存在统计学意义 ( $P<0.01$ )。CD47 表达与年龄相关 ( $P<0.05$ ), 与雌激素受体 (ER) 状态、孕激素受体 (PR) 状态、人类表皮生长因子受体 2 (Her2) 状态、有无淋巴结转移、临床分期及患者预后未见相关。结论 乳腺癌组织中 CD47 的表达显著高于癌旁组织, 且与患者年龄相关, 但癌组织中 CD47 表达与患者临床病理特征未见相关。

**【关键词】** 乳腺癌; CD47; 抗肿瘤; 预后

**【中图分类号】** R737.9

**【文献标志码】** A

**【文章编号】** 1672-271X (2018) 05-0501-05

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1672-271X.2018.05.012

## Expression and significance of CD47 in breast cancer and pericancerous tissues

CHEN Tao<sup>1</sup>, WANG Xuan<sup>2</sup>, CHENG Kai<sup>2</sup>, MA Heng-hui<sup>2</sup>, WANG Jing-jie<sup>1</sup>, LI Han-jun<sup>1</sup>, ZENG Hui-juan<sup>1</sup>, WANG Lu-lu<sup>1</sup>, WANG Shao-hua<sup>1</sup>

(1. Research Institute of General Surgery, 2. Department of Pathology, Jinling Hospital, Nanjing University School of Medicine/Nanjing General Hospital of Nanjing Military Region, PLA, Nanjing 210002, Jiangsu, China)

**【Abstract】** **Objective** To study the expression of CD47 in breast cancer tissues and pericancerous tissues and its correlation with clinical prognosis and pathological characteristics. **Methods** The expression of CD47 and its correlation with clinical prognosis were analyzed in The Cancer Genome Atlas (TCGA) database. From 2011 to 2015, 185 cases of breast cancer were selected in Jinling Hospital. The expression of CD47 in breast cancer tissues and pericancerous tissues was evaluated by immunohistochemistry (IHC) assay. And its correlation with the clinicopathological features and prognosis of the patients was analyzed. **Results** The proportion of CD47 gene amplification and its mRNA expression increase was 2.6% (22/825) in TCGA database. The median OS of breast cancer group was lower than that in normal group (55.6 *vs* 113.7 months,  $P=0.0256$ ). CD47 expression was detected in 56.21% (104/185) breast cancer tissues and 12.97% (24/185) pericancerous tissues ( $P<0.01$ ). The expression of CD47 was related to age ( $P<0.05$ ), but there was no significant correlation with the expression of ER, PR, and Her2, lymph node metastasis, clinical stage and prognosis. **Conclusion** The expression of CD47 was significantly higher in breast cancer tissues than that in pericancerous tissues, which is related to age. However, there was no significant correlation between the expression of CD47 and the clinicopathological characteristics of the breast cancer patients.

**【Key words】** breast cancer; CD47; anti-tumor effect; prognosis

基金项目:南京市科技计划项目(201605003)

作者单位:210002 南京,南京大学医学院附属金陵医院(南京军区南京总医院)全军普通外科研究所(陈 涛、王婧洁、李汉君、曾慧娟、王璐璐、王少华),病理科(王 璇、程 凯、马恒辉)

通信作者:王少华, E-mail: Wanglaifu2@126.com

## 0 引 言

乳腺癌已经成为女性发病率最高的肿瘤, 且是女性癌症中的头号杀手<sup>[1-2]</sup>。随着医疗技术不断进步, 乳腺癌治疗技术日渐成熟且多样化, 目前指南

推荐的乳腺癌治疗方法包括局部治疗(手术、放疗),全身治疗(辅助/新辅助化疗、内分泌治疗及分子靶向治疗)<sup>[3]</sup>。然而,对于进展期或转移性乳腺癌,仍然缺乏显著有效的治疗手段。近年来免疫治疗作为一种新兴的实体瘤治疗方式渐渐成为研究热点<sup>[4]</sup>。CD47 是一种细胞跨膜蛋白,在人类细胞中广泛表达。CD47 通常作为“别吃我”信号为人们所认知,即表达 CD47 蛋白的细胞可通过激活吞噬细胞表面的 SIRP $\alpha$  信号通路来防止被吞噬。乳腺癌细胞同样有可能通过表达 CD47 来逃避免疫监视。因此,本研究旨在探索 CD47 在乳腺癌组织及癌旁组织中的表达情况,分析乳腺癌组织 CD47 的表达与患者临床特征及预后的相关性。

## 1 资料与方法

**1.1 数据库数据集收集** 通过 cbiportal 网站检索 TCGA(The Cancer Genome Atlas)数据库中乳腺浸润性导管癌数据集(2012, Nature)<sup>[5-6]</sup>,并从该网站下载数据集,包括基因数据及相关临床数据,分析 CD47 基因突变及表达变异情况,其中基因数据包括 4 种类型:基因扩增、mRNA 上调、mRNA 下调、正常拷贝。将基因扩增及 mRNA 表达上调分为上调组, mRNA 下调及正常拷贝者分为正常组,通过 Kaplan-Meier 分析法分析 CD47 表达与生存相关性。

**1.2 病例选取** 回顾性分析金陵医院病理科 2011–2015 年的乳腺癌病例资料,随机选取确诊为乳腺浸润性导管癌且术前未接受过治疗的 185 例患者。这些患者的乳腺癌及癌旁组织均经“中性甲醛固定-石蜡包埋”方式保存。其中 Luminal A 型 35 例, Luminal B 型 68 例,表皮生长因子受体-2(CerbB-2)过表达型 28 例,三阴性 54 例。患者均为女性,年龄为 25~82 岁,中位年龄 53 岁。对患者采用电话询问方式进行随访,随访至 2018 年 3 月。

**1.3 免疫组化** 正常前列腺腺上皮细胞组织作为阳性对照,前列腺细胞周围结缔组织为阴性对照。兔抗人单克隆抗体抗 CD47 购自 SIGMA 公司(稀释浓度为 1:200),使用 EliVision 法进行免疫组化染色。

**1.4 结果判读** 染色结果由 2 位病理科医师采取双盲法各自判读,评估浸润性导管癌细胞及正常乳腺导管腺上皮细胞膜蛋白及细胞质蛋白中 CD47 的表达情况。判读采用半定量法:按照染色强度及区域划分四个等级,即 0~3。细胞无染色为 0 分,细胞膜弱阳性为 1 分,超过 1/3 细胞膜或细胞质染色为 2 分,细胞膜强阳性染色或超过 2/3 的细胞膜或细

胞质染色为 3 分<sup>[7]</sup>。判读过程中仅评定乳腺肿瘤细胞及正常导管腺上皮细胞,而淋巴细胞、成纤维细胞、巨噬细胞及内皮细胞不计入评定结果。依据乳腺癌细胞 CD47 表达情况,将患者分为阴性组及阳性组,免疫组化染色结果判定为 0 分的为阴性组, 1~3 分的为阳性组。

**1.5 统计学分析** 应用 SPSS 24.0 统计学软件对统计结果进行分析,对评定结果采用二分法进行分组。癌组织及癌旁组织 CD47 表达结果采用配对  $\chi^2$  检验方法进行统计分析,对癌组织 CD47 表达情况与病理学指标的相关性采用  $\chi^2$  检验方法,与生存预后的关系则采用 Kaplan-Meier 分析法分析,以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 TCGA 分析** 检索 TCGA 数据库中乳腺浸润性导管癌共 825 例样本,其中 CD47 基因拷贝数发生突变(基因扩增)6 例(0.73%), mRNA 表达上调者 16 例(1.94%),表达下调者 19 例(2.30%),无变异者 784 例(95.03%)。对这些样本数据进行生存分析,可见上调组中位总生存期为 55.6 个月,正常组中位总生存期为 113.7 个月( $P=0.0256$ )。见图 1。

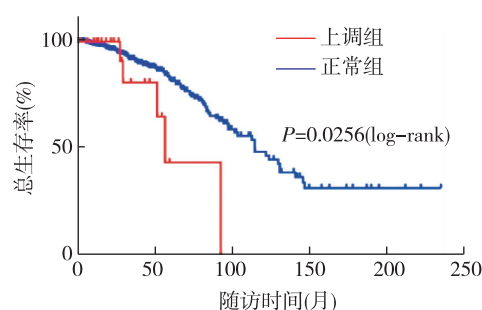


图 1 TCGA 数据库中不同 CD47 基因突变类型乳腺癌患者的生存分析

**2.2 CD47 在乳腺癌组织及癌旁组织中的表达** 形态学特征:镜下可见乳腺浸润性导管癌呈实性巢状或片状分布,向四周浸润性推进;肿瘤周围可见不同程度地分布有淋巴细胞、巨噬细胞等,部分组织可见地图样坏死;癌细胞明显增大呈卵圆形,核质比增加,部分核可见分叶。正常乳腺导管上皮细胞沿乳腺导管内膜规则均匀分布排列,无核增大或分裂现象。CD47 在乳腺癌细胞膜表面及细胞质内表达比例高,染色深,正常乳腺导管上皮细胞染色少见。见图 2。乳腺癌组织 CD47 阳性表达率为 56.21% (104/185),癌旁

组织中阳性表达率为 12.97% (24/185), 乳腺癌组织中癌细胞的 CD47 表达明显高于正常乳腺上皮细胞 ( $P<0.01$ ), 见表 1。

表 1 乳腺癌组织及癌旁组织 CD47 表达差异 ( $n=185$ )

癌旁组织	癌组织		P 值
	+	-	
+	23	1	<0.01
-	81	80	

**2.3 CD47 表达与乳腺癌病理学特征相关性** 185 例中, 阴性组 81 例, 阳性组 104 例。通过分析乳腺癌组织中 CD47 的表达, <45 岁乳腺癌患者 CD47 表达高于年龄  $\geq 45$  岁的乳腺癌患者 (68.9% vs 52.1%,  $P<0.05$ ), 提示 CD47 可能与患者的年龄相关。而 CD47 在乳腺癌组织中的表达与肿瘤大小、淋巴结转移状态、Ki-67 指数、雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素受体 (progesterone receptor, PR)、人类表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 状态、临床分期未见相关。见表 2。

**2.4 生存预后分析** 185 例患者随访时间为 13~89 个月, 中位随访时间 59 个月, 其中 14 例失访, 所有患者 3 年生存率为 92.6%, 5 年生存率为 85.7%。3 年无病生存率为 86.5%, 5 年无病生存率为 82.4%。Kaplan-Meier 分析法分析显示 CD47 阴性组与阳性组生存未见明显差异 ( $P>0.05$ ), 未发现患者乳腺癌

组织 CD47 表达与患者生存预后存在显著相关性。见图 3。

表 2 乳腺癌组织中 CD47 表达与临床病理学特征相关性 ( $n=185$ )

项目	CD47 表达量		P 值
	-	+	
年龄 (岁)			0.049
<45	14	31	
$\geq 45$	67	73	
ER 状态			0.291
-	39	42	
+	42	62	
PR 状态			0.387
-	48	55	
+	33	49	
肿瘤直径 (cm)			0.111
<2	29	26	
$\geq 2$	52	78	
淋巴结转移			0.689
无	39	47	
有	42	57	
Ki-67 指数*			0.181
<20	20	19	
>20	51	79	
Her2 表达			0.130
-	62	69	
+	19	35	
临床分期			0.393
I + II	48	68	
III + IV	33	36	

\* Ki-67 指标中, 有 16 例患者未行 Ki-67 检查

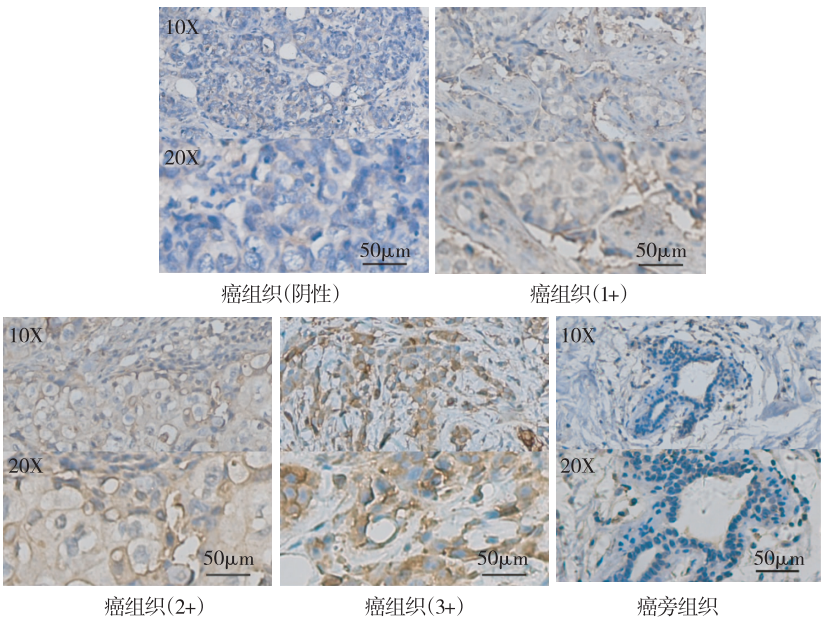
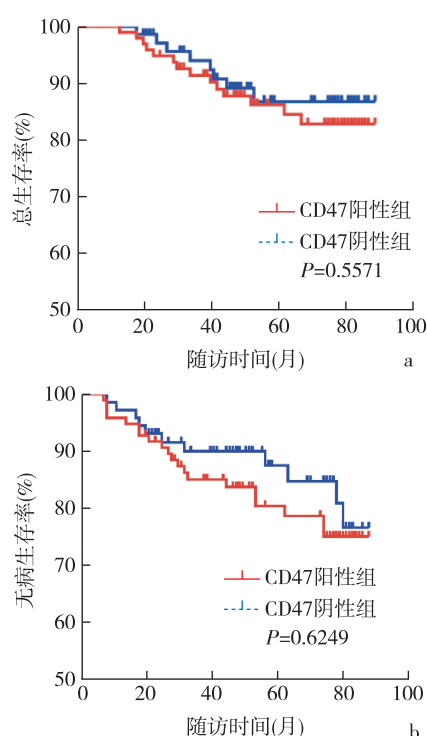


图 2 CD47 在乳腺癌及癌旁组织的表达





a: 总生存曲线; b: 无病总生存曲线

图 3 乳腺浸润性导管癌患者 CD47 表达与临床预后

### 3 讨 论

CD47 的作用之一是作为树突细胞及巨噬细胞表面的信号调节蛋白 (signal regulatory protein- $\alpha$ , SIRP $\alpha$ ) 的配体<sup>[8]</sup>, 通过与 SIRP $\alpha$  结合避免被吞噬细胞吞噬。在细胞表面过表达 CD47 可能是肿瘤细胞逃避免疫监视的一种生存策略。Kaur 等<sup>[9]</sup>发现一种新型的非 SIRP $\alpha$  依赖型的通路, 通过这一信号通路, CD47 抗体能够抑制肿瘤干细胞的分化, 维持肿瘤细胞干性特征。Zhang 等<sup>[10]</sup>研究发现, 在离体实验中模拟缺氧环境, 肿瘤细胞分泌的缺氧诱导因子 (hypoxia-inducible factors, HIFs) 能够促进乳腺癌细胞表达 CD47, HIFs 和 CD47 相互协同下, 能够使肿瘤细胞逃避免疫监视并维持癌细胞干性特征。Baccelli 等<sup>[11]</sup>在检测了 Luminal A 型乳腺癌的 CD47 表达后, 发现 Luminal A 型乳腺癌循环肿瘤细胞如果 CD47 和 MET 基因同时过表达, 则患者更容易发生淋巴结转移, 且生存预后更差。Lo 等<sup>[12]</sup>则发现, CD47 的表达促进了索拉非尼治疗小鼠体内肝癌时耐药的发生。此外, 应用 CD47 相关抗体治疗肿瘤已经取得了一定疗效, 如联合 CD47 抗体及利妥昔单抗, 能够促进吞噬作用并杀灭非霍奇金淋巴瘤细胞<sup>[13]</sup>。Willingham 等<sup>[14]</sup>发现在 CD47 相关抗体的

干扰下, 多种人类肿瘤在 NSG 小鼠体内的生长均受到抑制。综上, 乳腺癌细胞的生长、增殖及转移可能与乳腺癌细胞过表达 CD47 相关, 这提示 CD47 的过表达与乳腺癌患者预后相关。因此本研究的目的在于研究乳腺癌组织中 CD47 的表达情况, 分析其与乳腺癌患者临床病理特征及预后的相关性。

尽管 CD47 在人体正常组织中广泛表达, 但有前期小样本量研究<sup>[15]</sup>发现, 正常乳腺组织中 CD47 阳性率低, 而在乳腺癌组织表达阳性率高。本研究共入组了 185 例, 结果表明乳腺癌组织 CD47 阳性率明显高于正常组织, 与之前的研究一致。而且在年轻乳腺癌患者中 (<45 岁), CD47 表达率更高, 但年轻乳腺癌患者 CD47 表达上调的机制还有待进一步研究。

CD47 在 TCGA 数据中的基因检测结果与本研究蛋白水平检测结果存在差异, 这提示 CD47 基因可能在转录和翻译水平上存在调节因素。例如造血干细胞在穿过富含吞噬细胞的骨髓时, 会通过表达 CD47 来避免被吞噬, 当其到达合适位置后, 将重新下调 CD47 的表达<sup>[16]</sup>。肿瘤抑制基因如 miR-133a<sup>[17]</sup>、miR-192<sup>[18]</sup> 和癌基因 MYC 都能够直接与各种肿瘤的 CD47 启动子区域相结合进而调控 CD47 的表达<sup>[19]</sup>。同时有研究报道, 肿瘤细胞中表达的糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein-78, GRP78) 能够通过未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR) 在内质网水平上调 CD47 的表达<sup>[20]</sup>。因此还需要进一步探索调节 CD47 表达的相关机制。

在 TCGA 数据中, 乳腺癌 CD47 基因扩增或表达上调后对生存的影响有统计学意义, 这与部分学者的研究结果一致, 提示 CD47 基因表达变异可以作为乳腺癌患者生存预后分析因素。但本研究中 CD47 免疫组化检测结果与临床预后的相关性并未达到统计学差异, 这可能与 CD47 基因可能在转录和翻译水平上存在调节因素有关。因此 CD47 免疫组化结果能否作为乳腺癌患者生存预后的指标仍需要进一步实验验证。

事实上, 固有免疫仅仅是肿瘤免疫杀伤的一种方式, 适应性免疫同样在肿瘤免疫杀伤中起着重要作用, 有研究表明, 乳腺癌患者是否出现腋窝淋巴结转移与腋窝淋巴结淋巴细胞构成比相关<sup>[21]</sup>。在肿瘤细胞表面还表达有一种程序性死亡蛋白配体 (programmed cell death 1 ligand, PD-L1), 通过与杀伤性 T 淋巴细胞表面的程序性死亡蛋白 (programmed cell death 1, PD-1) 结合从而抑制 T

细胞对肿瘤细胞的杀伤作用<sup>[22]</sup>。Casey 等<sup>[19]</sup>研究发现 MYC 基因能够促进肿瘤细胞表面的 PD-L1 及 CD47 表达,进而促进肿瘤的增殖并增强抗肿瘤免疫反应。因此,CD47 对于乳腺癌的影响可能不仅仅是单因素的作用,其可能与多种其他免疫因素相互作用,共同调节肿瘤的发生发展。本研究仅检测了乳腺癌组织中 CD47 的表达,未能得出与病理学指标明显相关的结论,这有可能是因为样本量仍然不足引起,也有可能是存在其他与 CD47 相互作用的因素从而影响了与病理特征的相关性。此外,本研究仅进行了横断面研究,未能进行纵向对比研究病程进展时 CD47 的动态变化过程。因此 CD47 的表达在乳腺癌发生发展中的作用及相关机制还需要进一步的实验来验证。

由于抗 CD47 抗体在多种肿瘤的体外试验中,尤其是治疗急性粒细胞性白血病中取得了较好的效果<sup>[23]</sup>,而且除了发生贫血外,并不会对其他正常细胞或组织造成明显影响<sup>[14]</sup>,目前世界范围内,已经在进行多项关于联合 CD47 单克隆抗体靶向抗肿瘤的临床试验。本研究通过大样本研究了乳腺癌及癌旁组织中 CD47 的表达,验证了乳腺癌与癌旁组织中 CD47 表达存在显著差异,为进一步研究 CD47 在乳腺癌免疫逃逸及侵袭转移中的作用打下了基础;为研究乳腺癌应用 CD47 抗体进行靶向治疗提供了依据,也为乳腺癌治疗提供了一种新的策略。

#### [参考文献]

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(1): 7-30.
- [2] 朱成宾, 潘玉琴, 何帮顺. 微小 RNA 多态性与中国女性人群乳腺癌发病及病理特征的相关性研究[J]. *东南国防医药*, 2015, 17(1): 22-25.
- [3] 顾 军, 于泽平. 乳腺癌手术后辅助内分泌治疗研究进展[J]. *医学研究生学报*, 2012, 25(1): 107-112.
- [4] 陆 舜, 晋悦萍. 肺癌免疫治疗进入 2.0 时代了吗[J]. *医学研究生学报*, 2017, 30(11): 1128-1131.
- [5] Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data[J]. *Cancer Discov*, 2012, 2(5): 401-404.
- [6] Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal[J]. *Sci Signal*, 2013, 6(269): p11.
- [7] Brightwell R, Grzankowski K, Lele S, et al. The CD47 “don't eat me signal” is highly expressed in human ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2016, 143(2): 393-397.
- [8] Sick E, Jeanne A, Schneider C, et al. CD47 update: a multifaceted actor in the tumour microenvironment of potential therapeutic interest[J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 167(7): 1415-1430.
- [9] Kaur S, Elkahlon AG, Singh SP, et al. A function-blocking CD47 antibody suppresses stem cell and EGF signaling in triple-negative breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(9): 10133.
- [10] Zhang H, Lu H, Xiang L, et al. HIF-1 regulates CD47 expression in breast cancer cells to promote evasion of phagocytosis and maintenance of cancer stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(45): E6215-E6223.
- [11] Baccelli I, Stenzinger A, Vogel V, et al. Co-expression of MET and CD47 is a novel prognosticator for survival of luminal-type breast cancer patients [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(18): 8147-8160.
- [12] Lo J, Lau EY, Ching RH, et al. Nuclear factor kappa B-mediated CD47 up-regulation promotes sorafenib resistance and its blockade synergizes the effect of sorafenib in hepatocellular carcinoma in mice[J]. *Hepatology*, 2015, 62(2): 534-545.
- [13] Chao MP, Alizadeh AA, Tang C, et al. Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma[J]. *Cell*, 2010, 142(5): 699-713.
- [14] Willingham SB, Volkmer JP, Gentles AJ, et al. The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPα) interaction is a therapeutic target for human solid tumors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(17): 6662-6667.
- [15] Berglund L, Björling E, Oksvold P, et al. A gene-centric Human Protein Atlas for expression profiles based on antibodies[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2008, 7(10): 2019-2027.
- [16] Jaiswal S, Jamieson CH, Pang WW, et al. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis[J]. *Cell*, 2009, 138(2): 271-285.
- [17] Suzuki S, Yokobori T, Tanaka N, et al. CD47 expression regulated by the miR-133a tumor suppressor is a novel prognostic marker in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(2): 465-472.
- [18] Yang SY, Choi SA, Lee JY, et al. miR-192 suppresses leptomeningeal dissemination of medulloblastoma by modulating cell proliferation and anchoring through the regulation of DHFR, integrins, and CD47[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(41): 43712-43730.
- [19] Casey SC, Tong L, Li Y, et al. MYC regulates the antitumor immune response through CD47 and PD-L1[J]. *Science*, 2016, 352(6282): 227-231.
- [20] Cook KL, Soto-Pantoja DR. “UPRegulation” of CD47 by the endoplasmic reticulum stress pathway controls anti-tumor immune responses[J]. *Biomark Res*, 2017, 5(1): 26.
- [21] Kohrt HE, Nouri N, Nowels K, et al. Profile of immune cells in axillary lymph nodes predicts disease-free survival in breast cancer[J]. *PLoS Med*, 2005, 2(9): e284.
- [22] Santa-Maria CA, Park SJ, Jain S, et al. Breast cancer and immunology: biomarker and therapeutic developments [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2015, 15(10): 1215-1222.
- [23] Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, et al. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells[J]. *Cell*, 2009, 138(2): 286-299.

(收稿日期:2018-05-21; 修回日期:2018-06-15)

(责任编辑:叶华珍; 英文编辑:朱一超)