

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.12.022

AR、NF- κ Bp65 在三阴性乳腺癌中的表达及意义

陈健¹, 张旭², 田茹¹, 刘艺¹, 董红梅¹, 郭瑞峰¹, 梁化印¹**Expression and Significance of AR and NF- κ Bp65 in Triple Negative Breast Carcinoma**CHEN Jian¹, ZHANG Xu², TIAN Ru¹, LIU Yi¹, DONG Hong-mei¹, GUO Rui-feng¹, LIANG Hua-yin¹

1. Department of Pathology, No. 252 Hospital of PLA, Baoding 071000, China; 2. Department of Pediatrics, Baoding Maternal and Children Health Hospital

Abstract: Objective To investigate the expression and significance of AR and NF- κ Bp65 in triple negative breast carcinoma (TNBC). **Methods** The expression of AR and NF- κ Bp65 in 60 cases of TNBC were detected by immunohistochemical staining. **Results** The positive rate of AR was 35% (21/60), and that of NF- κ Bp65 was 70% (42/60), and there was no correlation between them. Compared with clinicopathologic features, AR-positive cases were more likely at lower tumor grade and had less mitosis count ($P=0.026$, $P=0.032$, respectively), but NF- κ B p65-positive cases had more mitosis count ($P=0.037$). However, there was no significant difference found between their expressions and the others features. **Conclusion** AR and NF- κ B have high positive rates in TNBC, so they may play critical roles in tumorigenesis of TNBC, and could be new treatment targets.

Key words: Breast neoplasms; Triple negative; AR; NF- κ B; Treatment

摘要:目的 探讨 AR 和 NF- κ Bp65 在三阴性乳腺癌 (TNBC) 中的表达及意义。**方法** 采用免疫组织化学 EnVision 法检测 60 例 TNBC 中 AR、NF- κ Bp65 的表达情况。**结果** 60 例 TNBC 中, AR 阳性 21 例 (35%), NF- κ Bp65 阳性 42 例 (70%), 两者表达无相关性 ($P=0.324$)。AR 阳性者组织学分级低 ($P=0.026$)、核分裂多 $<10/10\text{HPF}$ ($P=0.032$), NF- κ Bp65 阳性者核分裂多 $\geq 10/10\text{HPF}$ ($P=0.037$), 其他临床病理学特征比较无差异。**结论** AR、NF- κ B 在 TNBC 中有较高的阳性率, 可能在肿瘤发生过程中发挥着重要作用, 可作为 TNBC 的治疗靶点。

关键词: 乳腺肿瘤; 三阴性; AR; NF- κ B; 治疗**中图分类号:** R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2010)12-1416-04

0 引言

三阴性乳腺癌 (triple negative breast carcinoma, TNBC) 是指 ER、PR 阴性且 HER2 阴性或低表达的乳腺癌, 约占乳腺癌的 10%~15%, 常表现为体积大、组织学分级高、易复发转移等特点, 尽管对蒽环类化疗药物如阿霉素、环磷酰胺等较敏感, 但仍有较高的复发率, 总体预后较差, 因此亟待新的具有特征性的治疗方法^[1]。实验表明雄激素受体 (androgen receptor, AR) 和核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 在乳腺癌中均有较高的阳性率^[2-3], NF- κ B 是一种多向性核转录因子, 可与 AR 基因中相关

位点结合, 促进后者的表达^[4]。本实验采用免疫组织化学方法, 检测 NF- κ Bp65、AR 在 TNBC 中的表达, 并分析其意义。

1 资料与方法

1.1 资料

复习解放军 252 医院病理科 2000—2008 年乳腺癌存档病例, 挑选 ER、PR 阴性且 HER2 阴性或弱阳性 (0~+) 病例共 60 例。患者全部为女性, 年龄 29~84 岁, 平均 53 岁。依据 2003 年 WHO 乳腺癌分类标准, 其中非特殊类型浸润性导管癌 41 例, 其他类型 19 例; 组织学分级 G1 级 4 例, G2 级 29 例, G3 级 27 例; 40 例可获知淋巴结状态, 其中 20 例有淋巴结转移, 临床分期 I 期 5 例, II 期 29 例, III 期 6 例。

1.2 方法

收稿日期: 2009-09-28; 修回日期: 2010-03-22

作者单位: 1. 071000 河北保定, 解放军第 252 医院病理科; 2. 河北省保定市妇幼保健院儿科

作者简介: 陈健 (1976-), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事乳腺癌治疗靶点研究

1.2.1 试剂 兔抗人 NF-κBp65、AR 单克隆抗体购自北京中杉公司。

1.2.2 步骤 采用免疫组织化学 EnVision 法,玻片经多聚赖氨酸处理,微波抗原修复。

1.3 结果判断

切片免疫组织化学染色以已知阳性的乳腺癌为阳性对照,以 PBS 代替一抗为阴性对照。(1)AR:参照 Ogawa 等^[5]的方法,以细胞核内出现棕黄色颗粒作为阳性,≥10%细胞核着色为阳性。(2)NF-κBp65:以胞质中出现棕黄色颗粒作为阳性,参照 Malik 等^[6]的方法在高倍光学显微镜下对阳性细胞进行评分,随机选择 5 个视野,总共计数 200 个细胞,没有细胞着色为 0 分,≤20%细胞着色为 1 分,21%~50%细胞着色为 2 分,>50%细胞着色为 3 分。阳性染色强度按以下标准区分:没有着色为 0 分;微弱棕黄色为 1 分;胞核或胞质中等强度棕黄色为 2 分;阳性细胞核或胞质呈深棕色为 3 分。最后将上述两种评分相乘之积作为评判标准,分数为 0~2 分者作为阴性,3 分或以上作为阳性表达。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 13.0 进行统计学处理。用 Pearson χ^2 检验和非参数统计中 Spearman 等级相关分析数据, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AR、NF-κBp65 表达及与临床病理参数的关系

60 例 TNBC 中,AR 阳性 21 例(35%),NF-κBp65 阳性 42 例(70%),见图 1、2。AR 阳性者组织学分级 G1~G2 级 15 例(15/21,71.4%),AR 阴性者组织学分级 G1~G2 级 18 例(18/39,46.2%),AR 阳性乳腺癌组织学分级显著低于 AR 阴性乳腺癌($P=0.026$)。此外,AR 阳性乳腺癌多数核分裂≤10/10HPF($P=0.032$),NF-κBp65 阳性者多数核分裂>10/10HPF($P=0.037$),其他临床病理参数比较差异无统计学意义,见表 1。

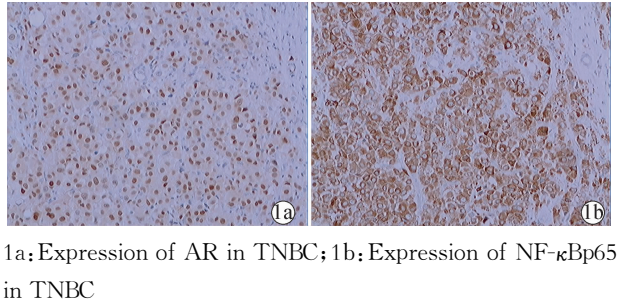


图 1 三联阴性乳腺癌中 AR、NF-κBp65 的阳性表达
(EnVision×100)

Figure 1 Expression of AR and NF-κBp65 in TNBC
(EnVision ×100)

表 1 AR、NF-κBp65 表达及与临床病理参数的关系
Table 1 Correlations between expression of AR、NF-κBp65 and clinicopathologic features of breast carcinoma

	AR		χ^2	P	NF-κBp65		χ^2	P
	+	-			+	-		
Age(years)			0.242	0.785			0.013	0.909
≤50	10	16			18	8		
>50	11	23			24	10		
Lymph node metastasis			0.000	1.000			0.114	1.000
negative	9	11			14	6		
positive	9	11			13	7		
Tumor size (cm)			0.155	0.783			0.055	1.000
≤2	7	15			15	7		
>2	14	24			27	11		
Mitosis count (/10HPF)			5.053	0.032			4.351	0.037
≤10	15	16			18	13		
>10	6	23			24	5		
Histological grade			5.270	0.026			3.351	0.171
1	3	1			3	1		
2	12	17			17	12		
3	6	21			22	5		
Clinical stages			1.342	0.353			1.285	0.668
I	2	3			3	2		
II	12	17			21	8		
III	4	2			3	3		

2.2 AR、NF- κ Bp65 表达的相关性

60 例 TNBC 中, AR、NF- κ Bp65 均阳性 13 例 (21.7%), AR 阳性且 NF- κ Bp65 阴性 8 例 (13.3%), AR 阴性且 NF- κ Bp65 阳性 29 例 (48.3%), 均阴性 10 例 (16.7%), 两者表达无相关性 ($r = -0.130$, $P = 0.324$)。

3 讨论

乳腺癌中 75%~80% 为激素依赖型, 15%~20% 过表达 HER2, 剩余 10%~15% 病例即为 TNBC, 由于没有针对性靶点, 临床多采用常规化疗和放疗, 缺乏更为有效的治疗手段, 尽管多数 TNBC 表达 EGFR, 然而, 到目前为止, 尚没有数据能证明 EGFR 抑制剂可以减少 TNBC 的复发率及延长生存期^[7], 而另一可能有效的靶点 c-Kit, 由于阳性率太低, 应用前景亦不明显, 因此, 针对 TNBC 新的治疗靶点成为研究热点之一。

1986 年, Sen 等^[8]首先从成熟 B 淋巴细胞中鉴定出 NF- κ B, 后继研究发现, NF- κ B 在人体中存在 5 种构型: NF- κ B1 (p50/p105)、NF- κ B2 (p52/p100)、RelA (p65)、RelB 和 c-Rel, 在细胞中以同二聚体或异二聚体的形式存在, 其功能被 I κ B 家族抑制。NF- κ B 参与生长发育、炎症反应、免疫反应、细胞生长、凋亡、癌症发生等过程, 可被 150 多种细胞外刺激所激活, 其下游调节基因也有 150 多个^[9]。NF- κ B 在乳腺癌中的活性首先取决于 ER 表达下调, 其次是 EGFR 和(或)HER2 过表达及 MAPK 活性增高。Biswas 等^[10]检测发现, 86% 的 ER-/HER2+ 乳腺癌及 33% 的 ER-/HER2-乳腺癌 NF- κ B 转录活性增强, 而在 ER+ 乳腺癌中仅有微弱活性。Van Laere 等^[11]检测发现 18 例 ER-乳腺癌中 12 例 NF- κ B 转录活性增强, 而 19 例 ER+ 乳腺癌中, 仅有 1 例具有转录活性, 13 例具有转录活性的乳腺癌中 9 例过表达 EGFR 和(或)HER2, 而 24 例不具有转录活性的乳腺癌中仅有 5 例过表达 EGFR 和/或 HER2。MDA-MB-231 为 ER-乳腺癌细胞系, 体外实验表明, 采用 NF- κ B siRNA 处理, 120h 后细胞数量减少 30%, 72 小时 G₀/G₁ 期细胞数量增加 25%, 相应 S 期和 G₂/M 期细胞数量减少^[12]。此外, Chiu 等^[13]报道 curcumin 可抑制 NF- κ B 的转录活性, 从而抑制 MDA-MB-231 的增殖。本组实验结果显示, NF- κ Bp65 在 TNBC 中阳性率为 70%, 阳性者表现为有丝分裂活性增强, 但与组织学分级、淋巴结转移及临床分期等均无相关性, 这与 Liu 等^[14]人的研究结果相似。由于 NF- κ B 在 TNBC 中有较高的阳性率, 且多数具有转录活性, 因此针对 NF- κ B 是有

效而且可行的。

Delfino 等^[4]检测发现, AR 基因中存在 3 个可与 NF- κ B 结合的位点, RelA 可使 AR 启动子活性 (ARLUC) 增强 12.5 倍, 而 RelA 与 p50 协同作用可使 ARLUC 活性增强 14 倍。本组实验中未发现 AR 表达与 NF- κ B 具有相关性, 但实验结果表明, AR 阳性者 61.9% (13/21) 同时 NF- κ Bp65 阳性 (AR 阳性 21 例, 其中 13 例与 NF- κ Bp65 同时阳性, 见 2.2), 这可能说明, TNBC 中 AR 的表达主要受 NF- κ B 的调节。有数据表明^[15], AR 表达缺失是高级别导管内癌发展成为高级别浸润性导管癌过程的关键步骤, 且在乳腺癌中有较高的阳性率。据报道, AR 阳性见于 49% 的 ER 阴性乳腺癌和 89% 的 ER 阳性乳腺癌, 平均约为 60%~70%^[2], 本组为 35%, 与 Ogawa 等^[5]的结果相近。本组实验结果表明, TNBC 中表达 AR 者核分裂多数在 10/10HPF 以下, 组织学分级低, 但未发现 AR 表达与年龄具有相关性。针对 AR 的治疗研究发现^[16-17], 脱氢表雄酮 (DHEA) 可抑制 ER-/AR+ 乳腺癌细胞 (HCC1937) 增殖, 使其生长速率降低 22%, ER/PR/AR 均阴性乳腺癌细胞系 HCC1806 转染 AR 后, 采用 DHEA 可明显增加癌细胞死亡率。此外, 醋酸甲羟孕酮 (MPA) 也具有与 AR 结合的能力, 高剂量的 MPA 可抑制 MDA-MB-453 (ER-/PR-/AR+) 的生长, 因此, 对 TNBC 中 AR 阳性表达者采用 DHEA、MPA 等治疗是有效的^[18]。

TNBC 的发生机制不同于激素依赖型乳腺癌和 HER2 过表达型乳腺癌, 但确切机制尚不清楚, NF- κ Bp65、AR 在 TNBC 中有较高的阳性率, 可能在 TNBC 的发生发展过程中起着重要作用, 可作为 TNBC 新的治疗靶点, 相关机制的进一步研究将有助于人们对 TNBC 发生的理解。

参考文献:

- [1] Carey LA, Dees EC, Sawyer L, et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(8):2329-2334.
- [2] Agoff SN, Swanson PE, Linden H, et al. Androgen receptor expression in estrogen receptor-negative breast cancer. Immunohistochemical, clinical, and prognostic associations[J]. Am J Clin Pathol, 2003, 120(5):725-731.
- [3] Biswas DK, Iglehart JD. Linkage between EGFR family receptors and nuclear factor kappaB (NF-kappaB) signaling in breast cancer[J]. J Cell Physiol, 2006, 209(3):645-652.
- [4] Delfino FJ, Boustead JN, Fix C, et al. NF-kappaB and TNF-alpha stimulate androgen receptor expression in Sertoli cells [J]. Mol Cell Endocrinol, 2003, 201(1-2):1-12.
- [5] Ogawa Y, Hai E, Matsumoto K, et al. Androgen receptor expression in breast cancer: relationship with clinicopathological factors and biomarkers[J]. Int J Clin Oncol, 2008, 13(5):431-435.

- [6] Malik SN, Brattain M, Ghosh PM, et al. Immunohistochemical demonstration of phospho-akt in high gleason grade prostate cancer [J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(4): 1168-1171.
- [7] Arteaga CL, Truica CI. Challenges in the development of anti-epidermal growth factor receptor therapies in breast cancer[J]. Semin Oncol, 2004, 31(1 Suppl 3):3-8.
- [8] Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism[J]. Cell, 1986, 47(6):921-928.
- [9] Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors[J]. Oncogene, 1999, 18(49):6853-6866.
- [10] Biswas DK, Shi Q, Baily S, et al. NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(27): 10137-10142.
- [11] Van Laere SJ, Van der Auwera I, Van den Eynden GG, et al. NF-kappaB activation in inflammatory breast cancer is associated with oestrogen receptor downregulation, secondary to EGFR and/or ErbB2 overexpression and MAPK hyperactivation[J]. Br J Cancer, 2007, 97(5):659-669.
- [12] Monks NR, Pardee AB. Targeting the NF-kappa B pathway in estrogen receptor negative MDA-MB-231 breast cancer cells using small inhibitory RNAs[J]. J Cell Biochem, 2006, 98(1): 221-233.
- [13] Chiu TL, Su CC. Curcumin inhibits proliferation and migration by increasing the Bax to Bcl-2 ratio and decreasing NF-kappaBp65 expression in breast cancer MDA-MB-231 cells[J]. Int J Mol Med, 2009, 23(4):469-475.
- [14] Liu C, Zhou S, Ke CS, et al. Activation and prognostic significance of AKT, NF-kappaB and STAT3 in breast cancer with lymph node metastasis and estrogen receptor expression[J]. Ai Zheng, 2007, 26(9):929-936.
- [15] Hanley K, Wang J, Bourne P, et al. Lack of expression of androgen receptor may play a critical role in transformation from in situ to invasive basal subtype of high-grade ductal carcinoma of the breast[J]. Hum Pathol, 2008, 39(3):386-392.
- [16] Toth-Fejel S, Cheek J, Calhoun K, et al. Estrogen and androgen receptors as comediators of breast cancer cell proliferation: providing a new therapeutic tool[J]. Arch Surg, 2004, 139(1): 50-54.
- [17] Garreau JR, Muller P, Pommier R, et al. Transgenic introduction of androgen receptor into estrogen-receptor-, progesterone-receptor-, and androgen-receptor-negative breast cancer cells renders them responsive to hormonal manipulation[J]. Am J Surg, 2006, 191(5):576-580.
- [18] Bentel JM, Birrell SN, Pickering MA, et al. Androgen receptor agonist activity of the synthetic progestin, medroxyprogesterone acetate, in human breast cancer cells[J]. Mol Cell Endocrinol, 1999, 154(1-2):11-20.

[编辑:刘红武;校对:贺文]

• 简讯 •

《肿瘤防治研究》杂志征订征稿启事

《肿瘤防治研究》杂志创刊于 1973 年,是我国第一本独立的全国性肿瘤专业高级学术刊物。由国家卫生部主管,中国抗癌协会、湖北省肿瘤医院主办。杂志是中文核心期刊、中国科技论文统计源期刊、湖北省优秀医学期刊、中国抗癌协会系列刊物。被美国《化学文摘》(CA)、波兰《哥白尼索引》(IC)、美国《乌利希期刊指南》(Ulrich PD)、《日本科学技术振兴机构中国文献数据库》(JST)、英国《国际农业与生物科学研究中心》(CABI)、美国《剑桥科学文摘》(CSAI)、英国《全球健康》(Global Health)及国内所有大型数据库收录。

新的一年,希望广大朋友们能一如既往地给予本刊以热忱的关注:将优秀稿件投往《肿瘤防治研究》以支持我国学术期刊的发展;订阅《肿瘤防治研究》以关注我国肿瘤防治研究事业取得的进步。同时,编辑部将进一步加强自身的建设,努力提升自己的办刊能力,紧紧围绕内容为王、快速反应的要旨,竭尽全力打造精品期刊,以回报朋友们的支持与厚爱。

邮发代号:38-70; 国外代号:MO6482; 定价:8.00 元/册; 出版周期:月刊

中国标准连续出版物号:ISSN 1000-8578 CN 42-1241/R

投稿网站: <http://www.zlfzyj.com> E-mail: zlfzyj@263.net.cn

电话/传真:0086-27-87670126

通信地址:430079 武汉市武昌卓刀泉南路 116 号《肿瘤防治研究》编辑部