

AIB1 蛋白在乳腺癌中的表达及在内分泌治疗中的临床意义

李庆霞,潘海燕,刑雅军,张 炎,苗军程,张秀智,兰艳芹
(河北省人民医院,河北 石家庄 050051)

摘 要:[目的] 探讨 AIB1 在乳腺癌组织中的表达及其与乳腺癌内分泌治疗耐药及预后的关系。[方法] 采用免疫组织化学方法检测 120 例乳腺癌组织、20 例癌旁正常乳腺组织、40 例良性乳腺病变组织中 AIB1 表达情况,并分析乳腺癌 AIB1 表达与乳腺癌内分泌治疗耐药及预后的关系。[结果] 乳腺癌组织中 AIB1 过表达率(40.00%)显著高于正常乳腺组织(10.00%)和乳腺良性病变组织(15.00%)($P<0.05$)。内分泌治疗耐药进展病例 AIB1 蛋白的阳性表达率明显高于内分泌治疗有效病例(60.00% vs 27.00%, $P<0.05$)。[结论] AIB1 高表达与乳腺癌内分泌治疗耐药密切相关,AIB1 可以作为独立预测乳腺癌内分泌治疗疗效及预后的一个重要参数。

关键词: 乳腺癌;AIB1 蛋白;基因分型;内分泌耐药

中图分类号: R7373.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)06-0453-05

The Expression of Nuclear Receptor Coactivators AIB1 in Breast Cancer and its Clinical Significance for Endocrine Therapy

LI Qing-xia, PAN Hai-yan, XING Ya-jun, et al.
(The Hebei General Hospital, Shi jiazhuang 050051, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of nuclear receptor coactivators AIB1 in breast cancer, and the relationship of AIB1 expression with estrogen resistance during endocrine therapy and with prognosis of endocrine therapy. [Methods] The expression of AIB1 including 120 cases with breast cancer, 20 cases with normal breast and 40 cases with benign lesion was examined by immunohistochemistry. The relationship of AIB1 expression with estrogen resistance and with prognosis of endocrine therapy was analyzed. [Results] The over expression of AIB1 was 40.00% in breast cancers, which was higher than that in benign lesions(15.00%) and in normal breast tissues(10.00%) with significant difference. The over expression rate of AIB1 in patients with estrogen resistance (60.00%) was higher than that in the patients without recurrence or metastasis (27.00%)($P<0.05$). [Conclusion] Over expression of AIB1 closely correlate to endocrine therapy. AIB1 may be as an independent marker for evaluating the efficacy and prognosis for endocrine therapy.

Key words: breast cancer; AIB1; genotype; estrogen resistance

乳腺癌的综合治疗模式中内分泌治疗改善了乳腺癌患者的生活质量并延长了其生存期。然而临床研究者发现 60% 的 ER 阳性肿瘤对内分泌治疗敏感,仍有 40% 的 ER 阳性的患者对内分泌治疗不敏感而导致乳腺癌的进展和复发,这使其内分泌治疗进入到一个瓶颈时期,引起人们关于内分泌治疗耐药更多的研究。乳腺癌扩增性抗原 1 (amplified in

breast cancer 1, AIB1) 属于 p160 甾体激素受体辅助激活因子基因家族。近年的研究发现 AIB1 基因是一种潜在的致癌因子,其蛋白的过表达在多种肿瘤尤其在乳腺癌的发生发展中发挥重要作用。国外研究表明 AIB1 与乳腺癌的发生发展、临床预后不良及内分泌耐药等关系密切,因此探讨 AIB1 在乳腺癌中的表达及其在乳腺癌内分泌治疗耐药机制中的作用,筛选 ER 阳性乳腺癌内分泌治疗耐药的标志物来指导内分泌治疗具有重要意义。

收稿日期:2012-02-27;修回日期:2012-04-19
基金项目:河北省科学技术厅基金(11276103D-70)
通讯作者:李庆霞, E-mail: lqx73@163.com

1 资料与方法

1.1 临床资料

本研究收集河北省人民医院病理科 2005~2006 年间收治资料完整的首次手术切除并确诊为乳腺癌的石蜡切片 120 例,所有病例均术后接受完整放疗后接受内分泌治疗。所有患者均为女性,年龄 25~70 岁,中位年龄 50 岁。病理类型:浸润性导管癌 88 例,浸润性小叶癌 12 例,髓样癌 6 例,其他特殊类型癌 14 例;AJCC2002 年修订 TNM 国际标准进行分期,Ⅰ期 22 例,Ⅱ期 74 例,Ⅲ期 24 例。所有病理资料均经两位以上病理专家复核确认。并随机选取癌旁 5cm 外正常乳腺组织 20 例,乳腺良性纤维腺瘤 40 例作为对照。

1.2 实验方法

本实验为回顾性研究,采用免疫组化链霉素抗生物素蛋白—过氧化物酶(SP)法检测 AIB1 蛋白表达,具体方法参照说明书进行。一抗:鼠抗人 AIB1 多克隆抗体:购于 Santa Cruz 公司,浓度为 1:50。鼠抗人 ER、PR、Her-2 单克隆抗体购于北京中杉生物技术公司,工作浓度 1:50。SP 试剂盒购于北京中杉生物技术公司,用已知阳性的乳腺癌标本作阳性对照,以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。

1.3 免疫组化结果判定

AIB1 阳性:细胞核和或胞浆出现黄色颗粒,染色结果判定均采用 Sinicrope 改良法^[1]。首先在低倍镜($\times 100$ 倍)视野下选取染色定位准确染色密度较强的部位,在高倍镜下($\times 400$ 倍)下随机选取 5 个视野,每个视野数计数 100 个肿瘤细胞并计算阳性细胞数,分为 5 级,0 分:染色细胞 $<5\%$;1 分:染色细胞 $5\% \sim 25\%$;2 分:染色细胞 $25\% \sim 50\%$;3 分:染色细胞 $50\% \sim 75\%$;4 分:染色细胞 $>75\%$ 。染色强度分为 4 级,0 分:无色;1 分:胞核或胞浆内均匀分布浅黄色颗粒;2 分:深棕黄色;3 分:棕黑色,胞浆内呈粗大颗粒或块状棕褐色。将染色细胞计数分数 \times 染色强度分数,所得分数 <1 分为阴性结果,2~3 分为弱阳性(+),4~6 分为中度阳性(++), ≥ 7 分为强阳性(+++)。阴性和弱阳性判为低表达,中度、强阳性判为高表达。

ER、PR 免疫组化判断标准:细胞核、胞浆或胞膜上棕黄色颗粒为阳性颗粒。低倍镜($\times 100$ 倍)视野下选取 5 处典型肿瘤部位,在高倍镜下($\times 400$ 倍)下

随机选取 5 个视野,每个视野数计数 100 个肿瘤细胞并计算阳性细胞数。ER、PR 则胞核阳性为有效阳性细胞, $>10\%$ 的肿瘤细胞染色即为阳性结果。

Her-2 免疫组化判断:Her-2 细胞膜棕黄色阳性,按 Her-2 检测指南(2009 版)判定阴性染色;-或+:任何比例的肿瘤细胞有微弱、不完整的胞膜着色或不着色。++: $>10\%$ 的肿瘤细胞中等强度膜阳性;+++: $>30\%$ 的肿瘤细胞膜强阳性。其中-、+、++视为阴性,+++视为阳性。

1.4 基因分型标准

依据免疫组化结果,按照 Nielsen^[2]分型标准分型,ER 阳性:Luminal A 型:ER+,和(或)PR+,Her-2-;Luminal B 型:ER+,和(或)PR+,Her-2+。ER 阴性:Her-2 过表达型:ER-,PR-,Her-2+;基底细胞型:ER-,ER-,Her-2-。

1.5 随访

120 例乳腺癌病例接受满 4 年的随访,对术后内分泌治疗进行随访,均接受至少 1 次(至多 3 次)的随访,失访 26 例,共随访完整病例 94 例。无病生存(disease free survival,DFS)定义为根治术后到肿瘤复发、转移或由于疾病进展导致患者死亡时间。总生存期(overall survival,OS)定义为疾病(肿瘤)确诊的第一天直到死于各种原因为止的时间或末次随访时间。复发、远处转移及死亡并除去化疗耐药等其它导致复发转移的原因可定义为内分泌治疗耐药,20 例出现局部复发或远处转移,无病生存期为 3~60 个月,平均为 45 个月,余下 36 例 DFS 及 OS 超过 4 年。

1.6 统计学处理

AIB1 蛋白阳性率在不同乳腺组组织间的比较及其在乳腺癌不同临床激素状态组表达率的差异比较采用卡方检验或 Fisher's 确切概率法,显著性检验水准为 $P < 0.05$ (双侧)。

2 结果

2.1 AIB1 在不同乳腺组织中的表达

AIB1 蛋白阳性染色主要位于腺上皮细胞及癌细胞的细胞核及细胞质内(见图 1~3)。AIB1 蛋白的阳性表达率在乳腺癌组中为 40.00%,纤维腺瘤组中为 15.00%,正常乳腺组织中为 10.00%,3 组间 AIB1 蛋白的阳性表达率差异有统计学意义($\chi^2=13.427$, $P=$

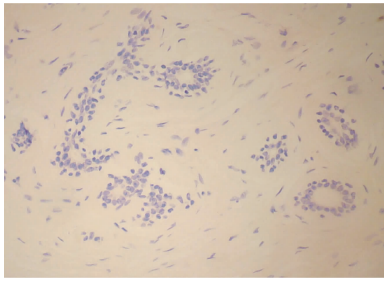


图1 AIB1在癌旁正常乳腺组织中的阴性表达 (SPx200)

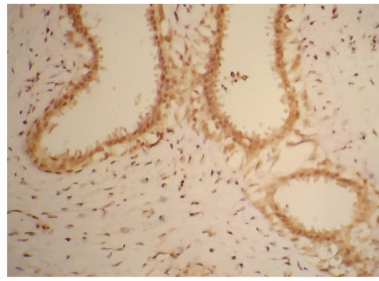


图2 AIB1在乳腺纤维瘤组织中的阳性表达 (SPx200)

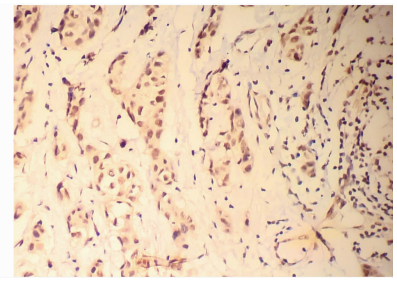


图3 AIB1在乳腺癌中的阳性表达 (SPx200)

0.001)。见表1。乳腺癌组中AIB1蛋白的阳性表达率明显高于正常乳腺组($\chi^2=6.720, P=0.010$)及乳腺纤维腺瘤组($\chi^2=8.386, P=0.004$)。

2.2 AIB1高表达与乳腺癌基因分型的关系

基因分型分析时仅分析88例浸润性导管癌。乳腺癌ER(+)组AIB1蛋白的阳性表达率与ER基因(-)组AIB1蛋白的表达率差异无统计学意义(43.90% vs 50.00%, $\chi^2=0.244, P=0.621$)。乳腺癌Her-2基因(+)组与Her-2基因(-)组AIB1蛋白的表达率

差异有统计学意义(77.40% vs 28.10%, $\chi^2=19.723, P<0.05$)。见表2。

乳腺癌组AIB1蛋白的阳性表达率与乳腺癌基因分型亚型明显相关,各亚型间AIB1阳性率有明显差异($\chi^2=21.747, P<0.05$),见表3。乳腺癌Luminal B型AIB1蛋白的阳性表达率为72.70%,Her-2过表达型AIB1蛋白的阳性表达率为88.90%,两者差异无统计学意义($P>0.05$);乳腺癌基底细胞型及Luminal A型的AIB1蛋白的阳性表达率(23.10%, 29.50%)显著

低于Her-2过表达型AIB1蛋白表达阳性表达率(88.90%)($P<0.05$)。乳腺癌基底细胞型及Luminal A型的AIB1蛋白的阳性表达率(23.10%, 29.50%)明显低于乳腺癌Luminal B型AIB1蛋白表达阳性表达率(72.70%)($P<0.05$)。

2.3 乳腺癌中AIB1蛋白的表达与内分泌治疗耐药的关系

乳腺癌中AIB1蛋白的阳性表达率与临床内分泌治疗耐药密切相关,内分泌治疗耐药进展病例中AIB1蛋白的阳性表达率(60.00%)明显高于内分泌治疗有效病例(27.00%),两者间差异有统计学意义($\chi^2=7.624, P<0.05$)。见表4。

表1 AIB1蛋白在乳腺组织、乳腺良性病变、乳腺癌中的表达比较

组别	例数	AIB1蛋白		AIB1高表达率(%)	χ^2	P值
		低表达	高表达			
癌旁正常乳腺组织	20	18	2	10.00	13.427	0.001
乳腺良性肿瘤	40	34	6	15.00		
乳腺癌	120	72	48	40.00		

表2 乳腺癌组织中AIB1蛋白表达与基因分型的关系

基因分型	例数	AIB1蛋白		高表达率(%)	χ^2	P值
		低表达	高表达			
ER					0.244	0.621
阴性	22	11	11	50.00		
阳性	66	37	29	43.90		
Her-2					19.723	<0.001
阴性	57	41	16	28.10		
阳性	31	7	24	77.40		

表3 乳腺癌组织中AIB1蛋白表达与乳腺癌基因分型亚型关系

基因分型亚型	例数	AIB1蛋白		高表达率(%)	χ^2	P值
		低表达	高表达			
Luminal A	44	31	13	29.50	21.747	<0.001
Luminal B	22	6	16	72.70		
基底细胞型	13	10	3	23.10		
Her-2过表达	9	1	8	88.90		

3 讨论

AIB1基因是类固醇激素受体转录辅激活因子基因家族中的一

表4 乳腺癌组织中 AIB1 蛋白表达与内分泌治疗耐药的关系

内分泌治疗	例数	AIB1 蛋白		高表达率 (%)	χ^2	P 值
		低表达	高表达			
耐药进展	20	8	12	60.00	7.624	0.006
有效	74	54	20	27.00		

员,在核受体如雌激素受体(estrogen receptor,ER)、孕激素受体 (progesterone receptor,PR)参与的基因转录调节中发挥重要作用,能促进类固醇激素依赖的肿瘤的发生和发展。在 ER 阳性的乳腺癌细胞株中,AIB1 基因和 ER 相互作用可能在肿瘤的进展过程中发挥重要作用。

大量的研究表明 AIB1 基因的扩增和高表达与乳腺癌的发生发展有关。Richardson 等^[3]的资料分析显示 AIB1mRNA 在乳腺癌中明显比正常乳腺组织要高得多。Hudelist 等^[4]用免疫组化技术分别检测了良性与恶性乳腺组织中 AIB1 蛋白的表达,发现 AIB1 蛋白仅在恶性乳腺上皮中表达且与高的肿瘤分级呈正相关。为了解 AIB1 在乳腺癌癌变过程中的作用,本实验用免疫组化 SP 法检测了 AIB1 蛋白在不同乳腺组织中的表达情况,结果显示乳腺癌中 AIB1 蛋白的阳性表达率明显高于其他组,从正常乳腺、乳腺良性肿瘤到乳腺癌组织,AIB1 蛋白的表达水平逐渐升高,说明 AIB1 蛋白可能参与了乳腺上皮的恶性转化,在乳腺癌的进展中发挥一定的作用。

近来研究表明 AIB1 过度表达与乳腺癌 ER 和 PR 的缺失有关。最新的研究表明无论在 ER 阳性或阴性的乳腺癌中 ER 的共激因子 AIB1 在早期复发及内分泌治疗耐药中发挥重要作用^[5],本实验结果未显示乳腺癌 AIB1 蛋白表达与乳腺癌 ER(+)组间存在相关性。有研究认为乳腺癌基因分型反映肿瘤生物学行为及临床预后^[6],本实验显示 AIB1 蛋白的阳性表达率与乳腺癌 Her-2 基因分型明显相关,也提示 AIB1 蛋白与临床预后相关。

Her-2 在 20%~30%的乳腺癌细胞中过度表达并且降低无病生存与总生存期,是广泛应用于临床的预测乳腺癌患者内分泌治疗和肿瘤复发的肿瘤标志物,Her-2 的升高提示肿瘤侵袭性高、预后差且对内分泌治疗不敏感。大量的临床研究证实 Her-2 与 AIB1 的表达关系密切^[7,8],有研究发现在 ER 阳性的乳腺癌中 Her-2 和 AIB1 的高表达与三苯氧胺(Tamoxifen,TAM)治疗抵抗有关^[9],Her-2 信号通路的

一条途径是通过 AIB1 的激活而起作用^[7,10],Her-2 通过激活蛋白激酶(mitogenactivated protein kinases,MAPK)而使 AIB1 和 ER 磷酸化导致耐药,而 AIB1 蛋白是有丝分裂原活化的

MAPK 信号传导途径中作用于 ER 的中介物,AIB1 能增强乳腺癌中多种信号转导通路包括 Her-2 和 IGF-1R。由于 AIB1 能增强 IGF-1 信号通路,而 AIB1 和 Her-2 高表达的乳腺癌患者中可能通过 IGF-1R 信号通路会导致内分泌治疗耐药。有研究报道^[11]高表达 AIB1 和 Her-2 与临床治疗的疗效的关系非常密切,预示临床预后不良,对内分泌治疗耐药,并且有可能是 TAM 或芳香化酶抑制剂等内分泌治疗的重要疗效预测标志物。有研究显示乳腺癌各基因亚型具有不同的预后及转移特点,并且能够筛选出适合内分泌治疗及化疗可能获益的患者,以避免早期乳腺癌患者不必要的化疗^[6,12]。这些研究与我们的实验结果一致,本实验基因分型显示 Luminal A 型及 Luminal B 型均属于乳腺癌 ER(+)组,细胞分化好,对激素敏感,预后好,Luminal A 型中 Her-2 及 AIB1 低表达,内分泌治疗效果良好,预后最佳。Luminal B 型预后较好,但是对三苯氧胺治疗耐药,应用芳香化酶抑制剂效果好,对临床治疗有重要指导意义。

研究显示 Luminal B 型及 Her-2 过表达型对内分泌治疗耐药及预后较差;一方面验证 Her-2 单纯高表达而 AIB1 低表达的乳腺癌患者对三苯氧胺的疗效与 Her-2 低表达的患者相同^[13],即单纯 Her-2 升高在临床上并不提示对内分泌治疗敏感,AIB1 高表达且 Her-2 低表达的患者比 AIB1 和 Her-2 均低表达的患者内分泌治疗耐药且复发率高,单纯 AIB1 高表达比单纯 Her-2 高表达患者更易发生内分泌治疗耐药及临床预后更差^[5,13]。研究^[14]显示在对 TAM 耐药的细胞中,Her-1/Her-2 和 ER-AIB1 复合体呈高表达,Her-1/Her-2 和 AIB1 信号通路使 TAM 耐药的细胞获得增殖,然而当针对 AIB1 的 siRNA 在 TAM 耐药细胞发生作用时,由 Her-1/Her-2 信号通路诱导的细胞增殖会明显减少,并且会使耐药细胞重新对 TAM 敏感。最近也报道^[15]AIB1 是预测乳腺癌内分泌治疗疗效独立的预后标志物。AIB1 和 Her-2 同时高表达乳腺癌患者更易对内分泌治疗耐药,即 AIB1 和 Her-2 共同作用降低内分泌治疗对乳腺癌

患者的疗效,两者都升高的患者内分泌治疗易出现复发耐药进展,预后较差,生存期及无病生存期明显缩短。

研究已证实 AIB1 是一个真正的癌基因,并与乳腺癌关系密切,在乳腺癌的发生、发展、内分泌治疗耐药复发中发挥重要作用。因此 AIB1 将会成为乳腺癌预防及治疗的抗肿瘤靶点及内分泌治疗疗效评估的有效标志物,为临床上乳腺癌的诊断、个体化治疗及预后评估提供新的思路和方法。

参考文献:

- [1] Saegusa M,Okayasu I.Changes in expression of estrogen receptors α and β in relation to progesterone receptor and pS2 status in normal and malignant endometrium[J]. Jpn J Cancer Res,2000,91(5):510-518.
- [2] Nielsen TO,Hsu FD,Jensen K,et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma [J].Clin Cancer Res,2004,10(16):5367-5374.
- [3] Richardson AL,Wang ZC,De Nicolo A,et al. X chromosomal abnormalities in basallike human breast cancer[J]. Cancer Cell,2006,9(2):121-132.
- [4] Hudelist G,Czerwenka K,Kubista E,et al.Expression of sex steroid receptors and their co-factors in normal and malignant breast tissue:AIB1 is a carcinoma-specific coactivator[J].Breast Cancer Res Treat,2003,78(2):193-204.
- [5] Spears M,Oesterreich S,Migliaccio I,et al.The p160 ER co-regulators predict outcome in ER negative breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat,2012,131(2):463-472.
- [6] 刘宁,冯子毅,韦伟.乳腺癌基因分型的研究进展[J].中国普通外科杂志,2010,19(5):556-559.
- [7] Lahusen T,Fereshteh M,Oh A,et al. Epidermal growth factor receptor tyrosine phosphorylation and signaling controlled by a nuclear receptor coactivator amplified in breast cancer1[J].Cancer Res,2007,67(15):7256-7265.
- [8] Shou J,Massarweh S,Osborne CK,et al. Mechanisms of tamoxifen resistance:increased estrogen receptor-Her-2/neu cross-talk in ER/Her-2-positive breast cancer [J].J Natl Cancer Inst,2004,96(12):926-935.
- [9] Su Q,Hu S,Gao H.Role of AIB1 for tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive breast cancer cells[J].Oncology,2008,75(3-4):159-168.
- [10] Kirkegaard T,McGlynn LM,Campbell FM,et al.Amplified in breast cancer 1 in humane epidermal growth factor receptor-positive tumors of tamoxifen-treated breast cancer patients[J].Clin Cancer Res,2007,13(5):1405-1411.
- [11] Lahusen T,Henke RT,Kagan BL,et al.The role and regulation of the nuclear receptor coactivator AIB1 in breast cancer[J].Breast Cancer Res Treat,2009,116(2):225-237.
- [12] 韩名利,吴城义. 乳腺癌干细胞及基因分型[J].中国普外基础与临床杂志,2010,17(3): 302-305.
- [13] Osborne CK,Bardou V,Hopp TA,et al.Role of the estrogen receptor coactivator AIB1(SRC-3)and Her-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer[J]. J Natl Cancer Inst,2003,95(5):353-361.
- [14] Zhao W,Zhang Q,Kang X,et al .AIB1 is required for the acquisition of epithelial growth factor receptor-mediated tamoxifen resistance in breast cancer cells [J]. Biochem Biophys Res Commun,2009,380(3):699-704.
- [15] Alkner S,Bendahl PQ,Grabau D,et al. AIB1 is a predictive factor for tamoxifen response in premenopausal women[J]. Ann Oncol,2010,21(2):238-244.