

• 论 著 •

653 份乳腺癌组织标本的 ER- α 36 表达结果分析晋佳路¹, 朱仁书¹, 马全祥², 王云龙^{3△}(1. 鹤壁职业技术学院, 河南鹤壁 458030; 2. 新乡医学院, 河南新乡 450003;
3. 河南省生物工程技术研究中心, 河南郑州 450001)

摘要:目的 研究雌激素受体 α 36 亚型(ER- α 36)在乳腺癌组织的表达状态及其与乳腺癌发生、发展及临床预后的关系。方法 选取 653 份乳腺癌组织标本,用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)技术和免疫组化技术检测组织中 ER- α 36、雌激素受体 α 66 亚型(ER- α 66)、孕激素受体(PR)和人表皮生长因子受体-2(Her-2)的表达,分析 ER- α 36 的表达与上述指标及临床病理特征之间的关系。结果 ER- α 36 的总体表达率为 40%;在 Her-2 阳性组织中的表达率为 63%,明显高于阴性组的 44%($P < 0.05$);在 ER- α 66/PR/Her-2 三阴性组织中的表达率为 66%,明显高于非三阴性组的 35%($P < 0.05$);在 ER- α 66 阳性和阴性标本中及在 PR 阳性和阴性标本中的表达率差异无统计学意义($P > 0.05$);在 III + IV 期乳腺癌组织中的阳性表达率(54%)明显高于 I + II 期的 28%($P < 0.05$);在淋巴结转移阳性乳腺癌组织中的表达率(55%)明显高于无转移组织的 23%($P < 0.05$)。结论 ER- α 36 可能在乳腺癌的发生、发展及淋巴结转移过程中具有重要作用,并与 Her-2 的表达、乳腺癌分期及淋巴结转移有关,有望成为新的肿瘤标记物及临床诊治的新靶点。

关键词:乳腺癌; 雌激素受体 α 36 亚型; 雌激素受体 α 66 亚型; 孕激素受体; 人表皮生长因子受体-2

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.13.021

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)13-1851-03

Analysis of ER- α 36 expression in 653 cases of breast cancer tissuesJin Jialu¹, Zhu Renshu¹, Ma Quanxiang², Wang Yunlong^{3△}

(1. Hebi College of Vocation and Technology, Hebi, Henan 458030, China; 2. Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 450003, China; 3. Henan Biotechnology Research Centre, Zhengzhou, Henan 450001, China)

Abstract: Objective To study the expression status of estrogen receptor-alpha36 (ER- α 36) in breast cancer tissue and its relationships with the occurrence, development and clinical prognosis of breast cancer. **Methods** 653 cases of breast cancer tissues were selected in this study. The real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry were used to detect the expression of ER- α 36, estrogen receptor-alpha66 (ER- α 66), progesterone receptor (PR) and human epidermal growth factor receptor-2 (Her-2). The relationships between the expression of ER- α 36, ER- α 66, PR and Her-2 and the pathological character were analyzed. **Results** The expression rate of ER- α 36 in all cases was 40%. The expression rate of ER- α 36 in Her-2 positive tissues (63%) was significantly higher than that in the Her-2 negative group (44%, $P < 0.05$). The expression rate of ER- α 36 in ER- α 66/PR/Her-2 negative tissues (66%) was significantly higher than that in the non-three-negative group (35%, $P < 0.05$). The differences of ER- α 36 expression rate between ER- α 66 positive samples and negative samples or between PR positive and negative samples showed no statistical significance ($P > 0.05$). The expression rate of ER- α 36 in stage III + IV breast cancer tissues (54%) was significantly higher than that in stage I + II breast cancer tissues (28%, $P < 0.05$). The expression rate of ER- α 36 in breast cancer tissues with lymph node metastasis (55%) was significantly higher than that in breast cancer tissues without lymph node metastasis (23%, $P < 0.05$). **Conclusion** The results indicate that ER- α 36 may play a very important role in the occurrence, development and lymph node metastasis of breast cancer, and be associated with the expression of Her-2, breast cancer staging and lymph node metastasis. ER- α 36 is expected to become a new tumor marker and clinical diagnosis and treatment target.

Key words: breast cancer; estrogen receptor-alpha36; estrogen receptor-alpha66; progesterone receptor; human epidermal growth factor receptor-2

雌激素受体 α 36 亚型(ER- α 36)主要在细胞膜和细胞质表达^[1],与传统的雌激素受体 α 66 亚型(ER- α 66)介导着完全不同的雌激素信号通路,可通过配体依赖或非配体依赖的方式激活 MAPK/ERK 和 PI3K/Akt 通路,从而与乳腺癌的发生、进展及内分泌治疗的先天耐药有着密切联系^[2-5]。但 ER- α 36 在乳腺癌中的表达与其他雌激素相关因子的表达及临床病理特征尚无明确的阐述,本文对此进行相关研究,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 连续收集 2010~2013 年河南省肿瘤医院乳腺科及郑州大学第一附属医院乳腺科手术切除的新鲜乳腺癌组织标本 653 份,所有标本均经组织病理学确诊,且患者的一般情况、肿瘤分期、淋巴结转移情况等临床资料均较完整。

1.2 方法 采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)技术和免疫组化技术分别从 mRNA 水平和蛋白质水平检测 ER- α 36、ER- α 66、孕激素受体(PR)和人表皮生长因子受体-2(Her-2)在乳腺癌组织中的表达,分析 ER- α 36 在 ER- α 66 阴性及阳性、PR 阴性及阳性、Her-2 阴性及阳性,以及 ER- α 66/PR/Her-2 三阴性乳腺癌组织中的表达情况。根据 GeneBank 公布的基因序列,以 Primer Express 软件设计扩增 ER- α 36、ER- α 66、PR、Her-2 和内参照 β -actin 基因的 RT-PCR 引物,引物均由上海生物工程技术有限公司合成。RT-PCR 技术检测时各待检基因的引物序列及扩增条件见表 1。采用 Trizol 一步法获取总 RNA,1%琼脂糖凝胶电泳分离产物,溴乙锭(EB)染色后照

相,其结果为 3 次重复试验结果。采用免疫组化技术从蛋白质水平做进一步检测,依据 PV-9000 二步法免疫组化检测试剂盒操作:加入一抗,37 °C 孵育 1 h;滴加试剂 1,室温孵育 20

min;滴加试剂 2,室温孵育 20 min,应用二氨基联苯胺(DAB)显色。

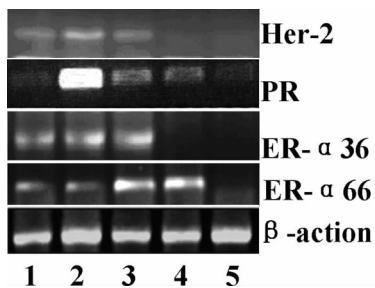
表 1 RT-PCR 技术检测时各待检基因的引物序列及扩增条件

检测指标	引物序列	扩增条件	产物长度(bp)
ER-α36	上游 5'-GGC AGA TTC CAT AGC CAT ACT TCC-3'	94 °C 5 min,94 °C 30 s,56 °C 30 s,	112
	下游 5'-GCA CGG TTC ATT AAC ATC TTT CTG-3'	72 °C 30 s,35 个循环,72 °C 延伸 10 min	
ER-α66	上游 5'-TCC AGC ACC CTG AAG TCT CT-3'	95 °C 2 min,94 °C 30 s,58 °C 30 s,	188
	下游 5'-AGA TGC TCC ATG CCT TTG TT-3'	72 °C 30 s,30 个循环,72 °C 延伸 7 min	
PR	上游 5'-AGC CGG TCC GCG TCC AG-3'	94 °C 4 min,94 °C 30 s,60 °C 60 s,	242
	下游 5'-CCA CCC AGA GCC CGA GGG-3'	72 °C 120 s,35 个循环,72 °C 延伸 10 min	
Her-2	上游 5'-CAG TGT GTC AAC TGC AGT CA-3'	94 °C 5 min,94 °C 30 s,55 °C 30 s,	322
	下游 5'-CAG GAG TGG GTG CAG TTG AT-3'	72 °C 30 s,35 个循环,72 °C 延伸 10 min	
β-actin	上游 5'-GAA CCC TAA GGC CAA CCG TG-3'	95 °C 5 min,95 °C 30 s,60 °C 30 s,	104
	下游 5'-AGG CAT ACA GGG ACA ACA CAG C-3'	72 °C 45 s,35 个循环,72 °C 延伸 10 min	

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理与统计分析,计数资料以百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ER-α36 mRNA 在乳腺癌中的表达 采用 RT-PCR 检测技术,检测到 ER-α36、ER-α66、PR 和 Her-2 在 653 份乳腺癌组织标本中的表达率分别为 40% (261/653)、61% (398/653)、35% (229/653) 和 19% (124/653),ER-α36 在 Her-2 阳性和阴性标本中的表达率分别为 63% 和 44%,两组间差异有统计学意义($P = 0.013$);ER-α36 在 ER-α66/PR/Her-2 三阴性和非三阴性标本中的表达率分别为 66% 和 35%,两组间差异有统计学意义($P = 0.036$)。ER-α36 在 ER-α66 阳性和阴性标本中的表达率分别为 41% 和 38%,差异无统计学意义($P = 0.560$);ER-α36 在 PR 阳性和阴性标本中的表达率均为 40% (91/229, 170/424),差异无统计学意义($P = 0.780$)。见图 1、表 2。



1~5:分别为不同乳腺癌组织标本。

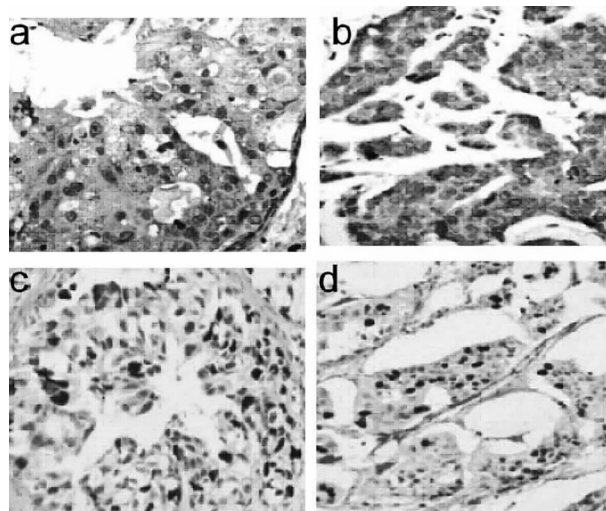
图 1 ER-α36、ER-α66、PR、Her-2 mRNA 在乳腺癌组织中的表达

表 2 ER-α36 mRNA 在乳腺癌组织中的表达及其与 ER-α66、PR、Her-2 的相关性 [$n = 653, \% (n/n)$]

指标	表达状态	ER-α36 mRNA 表达率	P
ER-α36	—	40(261/653)	—
ER-α66	阳性	41(163/398)	0.560
	阴性	38(98/255)	
PR	阳性	40(91/229)	0.780
	阴性	40(170/424)	
Her-2	阳性	63(78/124)	0.013
	阴性	44(189/429)	
ER-α66/PR/Her-2	非三阴性	35(192/549)	0.036
	三阴性	66(69/104)	

—,未分型。

2.2 ER-α36 蛋白质在乳腺癌中的表达 采用免疫组化技术从蛋白质水平进一步检测 ER-α36 的表达情况,检测结果显示 ER-α36 在 653 份乳腺癌组织标本中,以及在 ER-α66 阳性及阴性、PR 阳性及阴性、Her-2 阳性及阴性、ER-α66/PR/Her-2 三阴性乳腺癌中的表达率与 RT-PCR 检测结果一致。乳腺癌组织检测图片见图 2。细胞被染成棕褐色代表 ER-α36 阳性。



a:ER-α66 阳性乳腺癌组织;b:PR 阳性乳腺癌组织;c:Her-2 阳性乳腺癌组织;d:ER-α66/PR/Her-2 三阴性乳腺癌组织。

图 2 ER-α36 在乳腺癌组织的表达 (DAB 显色 $\times 200$)

2.3 ER-α36 表达与乳腺癌临床病理特征的关系 ER-α36 表达的阳性率与患者的年龄、月经状态、肿瘤大小、组织学分级等方面无关,差异无统计学意义($P > 0.05$)。ER-α36 在淋巴结转移阳性乳腺癌组织中的表达率为 55% (184/335),明显高于无转移组织的 23% (77/328),差异有统计学意义($P = 0.024$);III+IV 期乳腺癌组织中的阳性表达率为 54% (165/305),明显高于 I+II 期的 28% (96/348),差异有统计学意义($P = 0.031$)。见表 3。

表 3 ER-α36 表达与乳腺癌临床病理特征的关系 ($n = 653$)

参数	表达率 [% (n/n)]	ER-α36 阳性	ER-α36 阴性	P
		率 [% (n)]	率 [% (n)]	
年龄	>45	40(216/538)	49(322)	0.674
	≤45	39(45/115)	11(70)	
月经状态	绝经前	38(140/364)	34(224)	0.571

续表 2 ER-α36 表达与乳腺癌临床病理特征的关系 (n=653)

参数	表达率 [% (n/n)]	ER-α36 阳性	ER-α36 阴性	P	
		率 [% (n)]	率 [% (n)]		
肿瘤大小(cm)	绝经后	42(121/289)	19(121)	26(168)	0.712
	<2	32(28/88)	4(28)	9(60)	
	2~<5	42(188/444)	29(188)	39(256)	
淋巴结	≥5	37(45/121)	7(45)	12(76)	0.024
	转移	55(184/335)	28(184)	23(151)	
	无转移	23(77/328)	12(77)	37(241)	
分期	I+III	28(96/348)	15(96)	54(252)	0.031
	III+IV	54(165/305)	25(165)	21(140)	
组织学分级	C1	31(31/101)	5(31)	11(70)	0.563
	C2	41(158/386)	24(158)	35(228)	
	C3	43(72/166)	11(72)	14(94)	

3 讨 论

乳腺癌是雌激素依赖性肿瘤,是女性最常见的癌症(23%),乳腺癌相关病死率(14%)也居女性癌症病死率之首,发生局部扩散或远处转移患者的 5 年生存率只有 83% 和 26%^[6]。目前,临床上对乳腺癌的治疗主要包括手术、放疗、化疗、内分泌治疗及分子靶向治疗等 5 个方面,肿瘤相关因子与术后辅助治疗效果、预后关系非常密切,并成为患者选择个体化治疗的重要依据^[7]。

2005 年,一种相对分子质量为 36 × 10³ 的 ER-α 新亚型 ER-α36 被鉴定、克隆和表达^[1]。与 ER-α66 不同,ER-α36 缺少 ER-α66 中的全部 2 个转录活性域(AF-1 和 AF-2),但保留了 DNA 结合域、一部分二聚化区域及配体结合域。同时,ER-α36 的 C 末端具有一个包含 27 个氨基酸的独特片段,并介导着与 ER-α66 完全不同的雌激素信号通路,而对乳腺癌细胞产生更强的生长刺激作用^[8-9]。Vranic 等^[5]报道显示,在 ER-α66 阴性的乳腺腺癌标本和乳腺腺样囊性癌标本中,ER-α36 过表达的标本量分别在 90% 以上和 72% 以上,提示 ER-α36 也是雌激素受体阴性乳腺癌的潜在治疗靶点。

本研究对 653 例同一种乳腺癌组织中 ER-α36、ER-α66、PR 和 Her-2 的表达进行了联合检测,相关性分析发现 ER-α36 在 ER-α66 阳性和阴性标本中的表达率分别为 41% 和 38%,说明 ER-α36 的表达率与 ER-α66、PR 的表达无明显相关性(P>0.05);ER-α36 在 Her-2 阳性和阴性标本中的表达率分别为 63% 和 44%,说明 ER-α36 与 Her-2 的表达呈现正相关(P<0.05),这可能与两者之间的正反馈调节和串话机制有关^[10-11]。同时,三阴性乳腺癌组织中的表达率(66%)明显高于非三阴性组织的 35%(P<0.05),说明 ER-α36 在三阴性乳腺癌的发生、

发展及转化中可能发挥着独立而重要的作用。ER-α36 表达与乳腺癌临床病理特征关系方面,ER-α36 表达的阳性率与患者的年龄、月经状态、肿瘤大小、组织学分级均无明显关系(P>0.05),但 ER-α36 的表达明显促进了癌组织的淋巴结转移及其向更高的恶性级别发展(P<0.05)。因此,ER-α36 可能在乳腺癌的发生、发展及淋巴结转移过程中具有重要作用,并与其乳腺癌分期有关,有望成为新的肿瘤标记物并成为临床诊治的新靶点。

参考文献

- [1] Wang Z, Zhang X, Shen P, et al. Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor-α36, a novel variant of human estrogen receptor-α66[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 336(4): 1023-1027.
- [2] Lin SL, Yan LY, Liang XW, et al. A novel variant of ER-alpha, ER-alpha36 mediates testosterone-stimulated ERK and Akt activation in endometrial cancer Hec1A cells[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2009, 7(9): 102-109.
- [3] Lin SL, Yan LY, Zhang XT, et al. ER-alpha36, a variant of ER-alpha, promotes tamoxifen agonist action in endometrial cancer cells via the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways [J]. PLoS One, 2010, 5(2): e9013.
- [4] Lee LM, Cao J, Deng H, et al. ER-alpha36, a novel variant of ER-alpha, is expressed in ER-positive and-negative human breast carcinomas[J]. Anticancer Res, 2008, 28(1): 479-483.
- [5] Vranic S, Gatalica Z, Deng H, et al. ER-α36, a novel isoform of ER-α66, is commonly over-expressed in apocrine and adenoid cystic carcinomas of the breast[J]. J Clin Pathol, 2011, 64(1): 54-57.
- [6] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [7] 李晓青, 冯玉梅. 基于多基因表达水平的乳腺癌预后预测研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2013, 14(13): 807-814.
- [8] Su X, Xu X, Li G, et al. ER-α36: a novel biomarker and potential therapeutic target in breast cancer[J]. Onco Targets Ther, 2014, 7(8): 1525-1533.
- [9] Liu Y, Fang C, Zou P, et al. Diverse expression of ER-α36, a novel variant of ER-α, in hippocampus and cortex of neonatal and adult rats[J]. Acta Physiologica Sinica, 2013, 65(3): 263-268.
- [10] Zhang XT, Kang LG, Ding L, et al. A positive feedback loop of ER-α36/EGFR promotes malignant growth of ER-negative breast cancer cells[J]. Oncogene, 2011, 30(7): 770-780.
- [11] Kang L, Guo Y, Zhang X, et al. A positive cross-regulation of HER2 and ER-α36 controls ALDH1 positive breast cancer cells [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2011, 127(3/5): 262-268.

(收稿日期: 2015-05-08)

(上接第 1850 页)

- [8] 邢奔春. 甲胎蛋白异质体检测在原发性肝癌诊疗中的价值[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(2): 123-124.
- [9] 程魏, 张兰凤, 黄晶, 等. 原发性肝癌的肿瘤标志物甲胎蛋白及其异质体和高尔基体糖蛋白-73 的研究[J]. 河北医药, 2013, 35(13): 2035-2037.
- [10] Ratbi I, Elaloui SC, Moizard MP, et al. Novel nonsense mutation of GPC-3 gene in a patient with Simpson-Golabi-Behmel syndrome [J]. Turk J Pediatr, 2010, 52(5): 525-528.
- [11] 谢明水, 刘杨, 陈丹丹, 等. 甲胎蛋白异质体 3、高尔基体蛋白 73、

磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 在原发性肝癌诊断中的价值[J]. 肿瘤研究与临床, 2013, 25(11): 730-732.

- [12] Akutsu N, Yamamoto H, Sasaki S, et al. Association of glypican-3 expression with growth signaling molecules in hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(28): 3521-3528.
- [13] Kohashi K, Nakatsura T, Kinoshita Y, et al. Glypican 3 expression in tumors with loss of SMARCB1/INI1 protein expression [J]. Hum Pathol, 2013, 44(4): 526-533.

(收稿日期: 2015-05-10)