

a-B 晶体蛋白在三阴性乳腺癌中的表达及靶向治疗意义*

张凯丽 田志胜 王树峰

摘要 目的:研究 a-B 晶体蛋白在三阴性乳腺癌(TNBC)中的表达,通过分析 a-B 晶体蛋白与乳腺癌临床、病理各指标之间的相关性,从而探讨其在 TNBC 的预后及靶向治疗中的作用。**方法:**采用免疫组织化学(IHC)S-P 法检测 30 例 TNBC, 50 例非 TNBC 的石蜡标本切片组织中的 a-B 晶体蛋白,比较 TNBC 与非 TNBC 组织中 a-B 晶体蛋白表达差异性,对 a-B 晶体蛋白表达与乳腺癌临床及病理指标间的关系进行相关性分析。**结果:**a-B 晶体蛋白在 TNBC 中的阳性表达率为 66.67%(20/30),明显高于在非 TNBC 中的表达率 42.00%(21/50)($\chi^2=4.566, P<0.05$);a-B 晶体蛋白在乳腺癌中的表达与年龄、肿瘤直径、肿瘤分期无明显差异($P>0.05$);与有无淋巴结转移、淋巴结转移个数、P53 表达、ki-67 表达有显著性差异($P<0.05$),且呈正相关。a-B 晶体蛋白在 TNBC 中的表达与年龄、肿瘤直径、有无淋巴结转移、淋巴结转移个数、肿瘤分期、P53 表达、ki-67 表达无相关性($P>0.05$)。**结论:**a-B 晶体蛋白的阳性表达在 TNBC 与非 TNBC 之间存在差异。a-B 晶体蛋白在 TNBC 中高表达,且表达强度明显高于非 TNBC。a-B 晶体蛋白与乳腺癌预后不良相关,而 a-B 晶体蛋白在 TNBC 中的高表达可能为 TNBC 预后差的原因之一。

关键词 三阴性乳腺癌 非三阴性乳腺癌 a-B 晶体蛋白 靶向治疗

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.20130535

Expression of α -B crystalline in triple-negative breast cancer and its significance in targeted therapy

Kaili ZHANG, Zhisheng TIAN, Shufeng WANG

Correspondence to: Kaili ZHANG; E-mail: zkli72@yahoo.com.cn

Department of Neurosurgery, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

This work was supported by the Projects of Key Research Topic, Hebei Academy of Medical Science (No.20120077)

Abstract Objective: To investigate the expression of α -B crystalline in triple-negative breast cancer (TNBC) and discuss its role in the prognosis and targeted therapy of TNBC by analyzing the correlation among α -B crystalline and the clinico-pathological indices of breast cancer. **Methods:** Immunohistochemistry SP assay was used to determine α -B crystalline expression in paraffin-embedded specimens of 30 cases of TNBC and 50 cases of non-TNBC tissues. The differences in protein expressions among tissues were compared, and correlation analysis was performed to determine the relationship between protein expression and clinico-pathological indices. **Results:** The positive expression rate of α -B crystalline was 66.67% in TNBC (20/30) and 42.00% in non-TNBC (21/50), which indicates that the expression is significantly higher in TNBC than in the non-TNBC tissues ($\chi^2=4.566, P<0.05$). The expression of α -B crystalline in breast cancer has no significant difference in terms of age, tumor diameter, and cancer stage ($P>0.05$), but exhibits a difference in terms of lymph node metastasis and the number of metastasized lymph nodes [P53, Ki67 ($P<0.05$)], which presents a positive correlation ($r=0.251$). The α -B crystalline expression in TNBC has no significant difference among indices such as age, tumor diameter, nodal metastasis, number of metastasis, P53, cancer stage, and Ki67 ($P>0.05$). **Conclusion:** Significant differences were found in α -B crystalline expression between TNBC and non-TNBC. α -B crystalline is highly expressed in TNBC tissues, and the expression is significantly higher in TNBC tissues than that in non-TNBC tissues. α -B crystalline is associated with poor prognosis of breast cancer. Consequently, the overexpression of α -B crystalline in TNBC may be a reason for unfavorable TNBC prognosis.

Keywords: triple negative breast cancer, non-triple negative breast cancer, α -B crystalline protein, targeted therapy

三阴性乳腺癌约占所有乳腺癌的 10% ~ 16%^[1], 其具有特殊的生物学行为和临床病理特征,容易发生远处转移,对放疗、内分泌治疗及 HER-2 阳性靶向治疗不敏感,预后差,目前治疗手段局限,仅倚重于

手术与辅助化疗,因此亟待专门针对三阴性乳腺癌的靶向治疗药物的问世。a-B 晶体蛋白是小分子热休克蛋白家族的一员。有研究^[2]发现 a-B 晶体蛋白与某些疾病关系密切,如白内障、肝硬化、老年性痴

作者单位:河北医科大学第二医院腺体外科(石家庄市 050000)

*本文课题受河北省医学科学研究重点课题计划项目(编号:20120077)资助

通信作者:张凯丽 zkli72@yahoo.com.cn

呆等。随着研究的深入,人们发现其在某些肿瘤中亦有表达,并认为其高表达与肿瘤的侵袭行为和预后差相关,可以成为肿瘤治疗的一种靶蛋白^[3]。Moyano等^[4]研究指出 α -B晶体蛋白在乳腺癌中高表达,并通过激活MEK/ERK通路,增加了肿瘤侵袭性与远处转移,因此其可以成为乳腺癌一个预后因子,其高表达提示预后不良。

本研究通过对TNBC与非TNBC中 α -B晶体蛋白的表达进行比较,并结合相关临床,病理资料(发病年龄、肿瘤直径、淋巴结转移等)来分析其在三阴性乳腺癌发生发展及侵袭转移过程中起到的作用,探讨 α -B晶体蛋白在TNBC中的预后及靶向治疗意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验对象 选自河北医科大学第二医院腺体外科2009年3月至2012年5月间经手术切除并经病理证实为乳腺癌的癌组织石蜡包埋蜡块。所选标本均有完备临床资料。

1.1.2 实验分组 实验前按照术后免疫组化结果选取30例三阴性乳腺癌石蜡包埋蜡块(ER、PR、HER-2均为阴性的乳腺癌),作为实验组;另选取50例非三阴性乳腺癌石蜡包埋蜡块,作为对照组。

所选对象均为女性,实验组年龄32~74岁,中位年龄50岁;伴有淋巴结转移9例,无淋巴结转移21例;对照组年龄24~78岁,中位年龄54岁;伴有淋巴结转移的20例,无淋巴结转移30例。

1.1.3 实验试剂 鼠抗 α -B crystallin单克隆抗体(浓缩型)购自加拿大Stressgen生物公司;SP-9001 18 mL购自河北博海生物工程开发有限公司。显色剂DAB 3 mL购自河北博海生物工程开发有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验方法 取实验组和对照组动物组织蜡块,按编号标记,将厚度5 μ m的组织切片附于经多聚赖氨酸附膜的载玻片上,60℃过夜;脱蜡、入水,1%甲醇双氧水,室温10 min,蒸馏水洗1次,0.1M PBS洗3次 \times min,切片上滴加抗原修复液,室温10 min,0.1M PBS洗3次 \times 5 min,切片上滴加正常山羊血清封闭液,室温20 min。甩去多余液体,不洗,切片上滴加第一抗体,4℃过夜,0.1M PBS洗3次 \times 5 min,切片上滴加生物素化第二抗体(IgG),37℃ 20 min,0.1M PBS洗3次 \times 5 min;切片上滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液(S-A/HRP),37℃ 20 min,0.1M PBS洗3次 \times 5 min;DAB显色,苏木素复染细胞核,显微镜观察:选择实验组和对照组的阳性和阴性组织相,进行100、200和

400倍的显微图像分析。

1.2.2 免疫组织化学结果判定 α -B晶体蛋白呈棕黄色颗粒表达于细胞质,细胞膜,阳性标准依据阳性细胞计数及免疫组织化学评分(5个视野)判定:A为阳性细胞数分级0~1%为0、1%~10%为1、10%~50%为2、50%~80%为3、80%~100%为4。B为阳性细胞显色强度分级0(阴性)、1(弱阳性)、2(阳性)、3(强阳性),IHS=A \times B参照相关标准^[5],本研究对实验结果进行分级,IHS<4分为阴性,4 \leq IHS<9为阳性,IHS \geq 9为强阳性。

1.3 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件对所有数据进行统计,计数资料计算阳性表达率之间的比较采用 χ^2 检验进行相关分析。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 α -B晶体蛋白表达

α -B晶体蛋白主要表达在乳腺癌的细胞膜、细胞质,在三阴性乳腺癌中的阳性表达见图1,阴性表达见图2。 α -B晶体蛋白在三阴性乳腺癌中的阳性表达率是66.67%(20/30),在非三阴性乳腺癌中的表达率是42.00%(21/50),表达率及免疫组化评分在二者之间有显著性差异($\chi^2=4.566, P<0.05$,表1,2)。

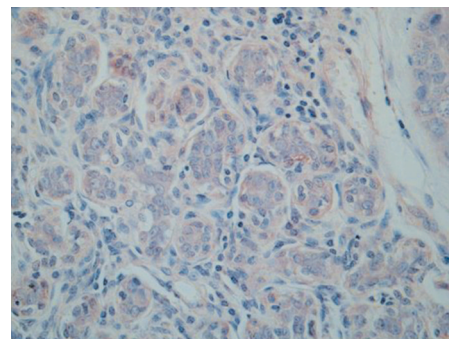


图1 α -B晶体蛋白在三阴性乳腺癌中的强阳性表达($n=9$)(H&E \times 200)
Figure 1 Expression of α -B crystallin in triple negative breast cancer; strongly positive (IHS = 9) (H&E \times 200)

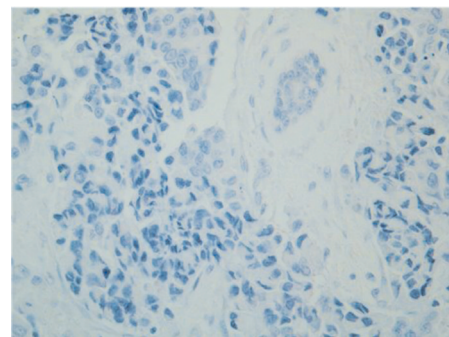


图2 α -B晶体蛋白在非三阴性乳腺癌中的阴性表达($n=2$)(H&E \times 200)
Figure 2 Expression of α -B crystallin in non-triple negative breast cancer; negative (IHS = 2) (H&E \times 200)

表1 a-B晶体蛋白在不同乳腺癌组织中的表达 例

Table 1 Expression of α -B crystalline in different breast cancer (n)

Groups	Cases	a-B crystalline expression	
		+	-
TNBC	30	20	10
NTNBC	50	21	29

 $\chi^2=4.566, P<0.05$

表2 不同乳腺癌组织中a-B晶体蛋白免疫组化评分的比较

Table 2 Comparison of IHS scores

Groups	Cases	IHS score	
		4~9	≥ 9
TNBC	20	5	15
NTNBC	21	15	6

 $\chi^2=8.84, P<0.05$

表3 a-B晶体蛋白的表达与乳腺癌临床、病理指标间的相关性 例

Table 3 Correlation of α -B crystalline expression in breast cancer with clinicopathologic features and tumor markers of patients (n)

Clinicopathologic features		a-B crystallin expression		P
		+	-	
Age(years)	≤ 40	13	8	0.371
	40-60	20	25	
	>60	8	6	
Tumor size (cm)	≤ 2	8	10	0.775
	2-5	24	22	
	>5	9	7	
Lymph node metastasis	Negative	21	8	0.004
	Positive	20	31	
pN	pN ₀ (LN=0)	20	31	0.004
	pN ₁ (LN=1-3)	7	3	
	pN ₂ (LN ≥ 4)	14	5	
Histologic grades	I	8	13	0.278
	II	21	19	
	III	12	7	
P53	Negative	25	14	0.028
	Positive	16	25	
ki-67	Negative	28	14	0.007
	Positive	13	25	

表4 a-B晶体蛋白的表达与三阴性乳腺癌临床、病理指标间的相关性 例

Table 4 Correlation of α -B crystalline expression in TNBC with clinicopathologic features and tumor markers of patients (n)

Clinicopathologic features		a-B crystallin expression		P
		+	-	
Age(years)	≤ 40	3	2	0.861
	40-60	14	6	
	>60	3	2	
Tumor size (cm)	≤ 2	5	4	0.628
	2-5	11	5	
	>5	4	1	

2.2 a-B晶体蛋白在乳腺癌中的表达与临床病理指标之间的关系

a-B晶体蛋白在乳腺癌中的表达与年龄、分期无明显相关性($P>0.05$),与肿瘤直径无明显相关性($P>0.05$),与有无淋巴结转移存在相关性($P<0.05$),与淋巴结转移个数存在相关性($P<0.05$),与肿瘤分期无明显相关性($P>0.05$),与P53的表达存在相关性($P<0.05$),且呈正相关性($r=0.324$),与ki-67的表达有相关性($P<0.05$),且呈正相关性($r=0.251$,表3)。

a-B晶体蛋白在三阴性乳腺癌中的表达与年龄、分期无明显相关($P>0.05$),与肿瘤直径无明显相关($P>0.05$),与有无淋巴结转移无明显相关($P>0.05$),与淋巴结转移个数无明显相关($P>0.05$),与肿瘤分期无明显相关($P>0.05$),与P53的表达无相关($P>0.05$),与ki-67的表达无相关($P>0.05$,表4)。

表4 a-B晶体蛋白的表达与三阴性乳腺癌临床、病理指标间的相关性 例(续表4)

Table 4 Correlation of α-B crystalline expression in TNBC with clinicopathologic features and tumor markers of patients (n)

Clinicopathologic features	a-B crystallin expression		P
	+	-	
Lymph node metastasis	Negative	7	0.398
	Positive	13	
PN	pN ₀ (LN=0)	13	0.691
	pN ₁ (LN=1-3)	3	
	pN ₂ (LN≥4)	4	
Histological grades	I	4	0.218
	II	11	
	III	5	
P53	Negative	14	0.425
	Positive	6	
ki-67	Negative	15	0.431
	Positive	5	

3 讨论

三阴性乳腺癌是乳腺癌的一个特殊类型^[5],是由Bryand等^[6]在2006年首次明确提出的。在2011年St. Gallen国际乳腺癌会议上^[7],为方便临床运用,国际乳腺癌治疗专家根据激素受体、HER-2和ki-67状态分为五大类:Luminal A型、Luminal B型、HER-2阳性型、三阴性型和其他特殊类型。其具体的致病机制、基因表达及相互作用的机理与非三阴性乳腺癌有一定的差异,特别是其发病年龄轻,容易发生肝、肺、脑等远处转移,5年生存率低,目前治疗较局限,主要依赖新辅助化疗、手术、术后辅助放疗、内分泌治疗无效,没有相应的靶向治疗药物,无临床治疗规范可查,因此丰富三阴性乳腺癌的治疗手段,延长患者的生存期是人们关注的热点。在Cerb-b2阳性乳腺癌患者应用曲妥珠单抗取得较好疗效的同时,人们也把目光聚集到三阴性乳腺癌的靶向治疗的研究。

目前在研究的靶向治疗药物有:1)PARP抑制剂:腺苷二磷酸核糖多聚酶(PARP),是一种DNA单链、双链修复的关键酶,其抑制剂可以阻断DNA链修复,增加细胞死亡,目前其对应药物AZD2281正在临床研究当中,尚未应用于临床。2)Src抑制剂:抑制原癌基因的表达,相应的药物达沙替尼已经进入临床实验,临床有效率达9.3%^[8]。3)EGFR抑制剂:表皮生长因子抑制剂,相应的药物有吉非替尼、西妥昔单抗、尼妥珠单抗等,有报道^[9]其联合紫杉醇类肿瘤三阴性乳腺癌取得较好的疗效。4)VEGF抑制剂:抗血管内皮生长因子抑制剂,相应的药物有贝伐单抗,曾经应用于临床,但疗效不明显,第35届圣安东尼奥乳腺癌研讨会公布研究结果,在三阴性乳腺癌的术后化疗方案中添加贝伐单抗并未显著改善无病生

存,美国FDA也已经宣布撤销其治疗乳腺癌的适应症。5)a-B晶体蛋白:一种小分子热休克蛋白,可以持久激活MAPK-ERK通路,在乳腺上皮细胞发生癌变的过程中重扮演要角色。目前尚无对应的药物。总之,目前的靶向治疗药物并没有取得预期的临床效果,因此a-B晶体蛋白成为人们研究的热点。

a-B晶体蛋白^[10]广泛存在于多种细胞中,是小分子热休克蛋白家族的一员,具有热休克蛋白家族的基本功能。1)a-B晶体蛋白具有分子伴侣功能,可以稳定靶蛋白分子构象,维持细胞内环境的稳定;2)a-B晶体蛋白具有抗细胞凋亡的作用,研究发现其能帮助细胞抵抗高温、射线、缺氧、药物等多种因素导致的细胞凋亡^[11]。a-B晶体蛋白是MAPK(促丝裂原活化蛋白酶)信号通路的调节蛋白,抑制其表达,可以加速细胞凋亡。a-B晶体蛋白还直接与caspase前体直接作用,使其裂解活化受到抑制,进而抑制凋亡发生^[11-12]。近年来发现^[12-13]a-B晶体蛋白与某些疾病关系密切,如白内障、肝硬化、老年性痴呆等,随着研究的深入,人们发现其在某些肿瘤中亦有表达,并认为其高表达与肿瘤的侵袭行为和预后差相关,可以成为肿瘤治疗的一种靶蛋白,并发现其在乳腺癌中也有高表达。国内研究也证实其在乳腺癌中高表达,且在分化差的恶性肿瘤中表达有差异,提示其可能参与肿瘤的浸润转移过程,增加了细胞的侵袭性^[14]。在本实验中,a-B晶体蛋白主要表达在乳腺癌的细胞膜、细胞质,在三阴性乳腺癌中的阳性表达率是66.67%(20/30),在非三阴性乳腺癌中的表达率是42.00%(21/50),二者之间有显著性差异($\chi^2=4.566, P<0.05$)。a-B晶体蛋白在三阴性乳腺癌中的表达率与国外的报道大体一致, Kim等^[13]研究其表达率为

60%;但是比国内的要低,房爱菊等^[14]在其研究中,浸润性导管癌表达率为70.07%,在三阴性乳腺癌中表达率为87.5%。结果虽有差异,但a-B晶体蛋白在三阴性乳腺癌高表达,且在伴有淋巴结转移的三阴性乳腺癌中表达更明显7/9(77.78%),表达强度也高于非三阴性乳腺癌($\chi^2=8.84, P<0.05$),提示其影响乳腺癌的侵袭转移。

a-B晶体蛋白在三阴性乳腺癌中的表达与临床病理指标(年龄,肿瘤直径,淋巴结转移,淋巴结转移个数,肿瘤分期)无显著性差异,与P53、ki-67无统计学相关性,这与Chelouche-Lev等^[15]的研究及国内的有关研究不同,其研究均表明a-B晶体蛋白的过表达与淋巴结呈正相关,其表达与三阴性乳腺癌容易发生远处转移,侵袭性高有关。考虑与三阴性乳腺癌样本量较小有关,但其在乳腺癌中的表达与淋巴结转移有相关性,且与病理学指标有相关性,可以作为乳腺癌的一个预后因子,而其在三阴性乳腺癌中的高表达,通过增加样本量,有望能达到预期结果。

综上所述,三阴性乳腺癌中a-B晶体蛋白高表达,在其侵袭、转移过程中发挥了重要作用,其可以作为三阴性乳腺癌的预后指标,通过进一步研究其抑制剂,有望成为三阴性乳腺癌靶向治疗的有效药物,丰富三阴性乳腺癌的治疗手段,提高患者的预后生存。

参考文献

- Bauer KR, Brown M, Cress RD, et al. Descriptive analysis of estrogen receptor(ER)-negative, progesterone receptor(PR)-negative, and HER-2 negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: A population-based study from the California Cancer Registry[J]. *Cancer*, 2007, 109(9):1721-1728.
- Dabir DV, Trojanowski JQ, Richter-Landsberg G, et al. Expression of the small heat-shock protein alphaB-crystalline in tauopathies with glial pathology[J]. *Am J Pathol*, 2004, 164(1):155-166.
- Arrigo S, Simon B, Giber C, et al. Hsp27(HspB1) and aB-crystallin(HspB5) as therapeutic targets[J]. *FEBS Letters*, 2007, 581(19):3665-3674.
- Moyano IV, Evans JR, Chen F, et al. a-B crystalline is a novel oncoprotein that predicts poor clinical outcome in breast cancer[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(1):261-270.
- Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, et al. Cox-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors[J]. *Cancer*, 2000, 89:2637-2645.
- Bryan BB, Schnitt SJ, Collins LC, et al. Ductal carcinoma in situ with basal-like phenotype: a possible precursor to invasive basal-like breast cancer[J]. *Mod Pathol*, 2006, 19(5):617-621.
- Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, et al. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011[J]. *Ann Oncol*, 2011, 22(8):1736-1747.
- 张保宁, 张慧明. 三阴性乳腺癌研究进展: 第31届圣安东尼奥乳腺癌研讨会报道[J/CD] *中华乳腺病杂志(电子版)*, 2009, 3(1):5-8.
- Dennison SK, Jacobs SA, Wilson JW, et al. A phase II clinical trial of ZD1839(Iressa) in combination with docetaxel as first line treatment in patients with advanced breast cancer[J]. *Invest New Drugs*, 2007, 25(6):545-551.
- 刘双, 肖献忠. aB晶体蛋白的功能与疾病[J]. *生命的化学*, 2005, 25(2):19-21.
- Li DW, Xiang H, Mao YW, et al. Caspase-3 is actively involved in okadaic acid-induced lens epithelial cell apoptosis[J]. *Exp Cell Res*, 2001, 266(2):279-291.
- Kamradt MC, Chen F, Sam S, et al. The small heat shock protein alphaB-crystallin negatively regulates apoptosis during myogenic differentiation by inhibiting caspase-3 activation[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(41):543-549.
- Kim HS, Lee Y, Lim YA, et al. aB-crystalline is a Novel Oncoprotein Associated with Poor Prognosis in Breast Cancer[J]. *J Breast Cancer*, 2011, 14(1):14-19.
- 房爱菊, 高永生, 李盛梅, 等. 转移相关蛋白与乳腺癌转移潜能的相关性分析[J]. *中国普通外科杂志*, 2008, 17(11):1079-1083.
- Chelouche-Lev D, Kluger HM, Berger AJ, et al. a-B crystalline as a marker of lymph node involvement in breast carcinoma[J]. *Cancer*, 2004, 100(12):2543-2548.

(2013-04-04 收稿)

(2013-06-03 修回)

(本文编辑: 贾树明)