

绝经前乳腺癌患者肿瘤组织中AIB-1蛋白表达与他莫昔芬耐药关系的研究*

周涛^① 丁雅雯^① 刘月平^② 王建新^① 陈砚凝^② 杨丽^③ 王桂兰^①
王小玲^② 耿翠芝^①

摘要 目的:探讨绝经前乳腺癌患者肿瘤组织中AIB-1蛋白表达与他莫昔芬耐药关系。方法:选取2004年1月至2004年12月河北医科大学第四医院外一科手术切除并经病理证实、且随访资料完整的绝经前女性原发性乳腺癌206例,按照免疫组化检测结果分成:ER+/PR+且接受他莫昔芬治疗组(Tamoxifen group, T组), ER-PR-的非内分泌治疗组(Control group, C组);T组及C组均按AIB-1及Her-2表达状态分为不同亚组。采用Kaplan-Meier法分析各亚组无病生存(disease-free survival, DFS)及总生存(overall survival, OS)时间。结果:术后随访30~84个月,中位时间65个月,58例患者出现局部复发或远位转移,5年DFS为71.84%(148/206);死亡36例,5年OS为82.52%(170/206)。随着组织学分级、腋淋巴结阳性及Her-2蛋白表达的增高,AIB-1蛋白呈现高表达($\chi^2=12.573, P=0.002$; $\chi^2=7.939, P=0.005$; $\chi^2=4.502, P=0.036$);分层分析中,T组AIB-1及Her-2均高表达亚组的DFS和OS低于其他亚组,且有统计学差异($\chi^2=5.900, P=0.002$; $\chi^2=4.533, P=0.049$);该亚组患者的生存曲线明显低于其他亚组患者(Log-rank检验, $\chi^2=8.903, P=0.005$; $\chi^2=9.405, P=0.004$)。结论:AIB-1蛋白高表达常常伴随着不良的临床生物学行为和预后,AIB-1蛋白高表达、同时伴有Her-2高表达的绝经前乳腺癌患者对他莫昔芬治疗耐药,提示AIB-1的表达可以作为预测他莫昔芬耐药的因子。

关键词 AIB-1 Her-2 他莫昔芬 耐药 预后 乳腺癌

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2011.24.016

Relationship between AIB-1 and Tamoxifen Resistance in Premenopausal Patients with Primary Breast Cancer

Tao ZHOU¹, Yawen DING¹, Yueping LIU², Jianxin WANG¹, Yanning CHEN², Li YANG³, Guilan WANG¹, Xiaoling WANG², Cuizhi GENG¹
Correspondence to: Cuizhi GENG, E-mail:gengcuizhi@hotmail.com

¹Department of Breast Center and No1 Department of Surgery, The Forth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

²Department of Pathology, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

³CT Center, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

This work was supported by the Foundation for Hebei Advanced Subjects of High Education (No. Ji Jiao Gao No.[2005]52)

Abstract Objective: To investigate the relationship between the protein expression of amplified breast cancer 1 (AIB-1) and tamoxifen resistance in premenopausal patients with primary breast cancer. **Methods:** A total of 206 premenopausal patients with breast cancer were chosen for the study. The patients were diagnosed by pathology and were treated in The Fourth Hospital of Hebei Medical University. The estrogen and progesterone receptors as well as AIB-1 were analyzed by immunohistochemistry (IHC). All cases were divided into two groups: the group of ER or PR positive, in which patients accepted tamoxifen therapy (treatment group, group T) and the group of both ER and PR negative, in which no endocrine treatment was given (control group, group C). Group T and group C were divided into several subgroups according to their AIB-1 and HER-2 expression status. The disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) rates were analyzed using Kaplan-Meier methods. **Results:** All cases were followed up from 30 months to 84 months, and the mean time was 65 months. A total of 58 patients experienced local recurrence and metastasis, while 36 of them died. The DFS and OS of 5 years were 71.84% (148/206) and 82.52% (170/206), respectively. High AIB-1 expression was correlated with the histologic grade 3, axillary lymph nodes metastases and over-expression of HER-2 ($\chi^2 = 12.573, P = 0.002$; $\chi^2 = 7.939, P = 0.005$; $\chi^2 = 4.502, P = 0.036$). The DFS and OS in the subgroup of both AIB-1 and HER-2 over-expression were lower than that of the other subgroups ($\chi^2 = 5.900, P = 0.002$; $\chi^2 = 4.533, P = 0.049$), and the survival was lower than that of the other subgroups (Log-rank test, $\chi^2 = 8.903, P = 0.005$; Log-rank test, $\chi^2 = 9.405, P = 0.004$). **Conclusion:** High AIB-1 is correlated with worse clinical biological behavior and prognosis. HER-2 over-expression, as well as high AIB-1 resulted in tamoxifen resistance for premenopausal patients with primary breast cancer. This condition implies that high AIB-1 may be an independent predictive factor of improved response to tamoxifen and may not be a factor that can predict tamoxifen resistance.

Keywords AIB-1; Her-2; Tamoxifen; Resistance; Prognosis; Breast cancer

作者单位:①河北医科大学第四医院外一科、河北省乳腺疾病诊治中心(石家庄市050011);②河北医科大学第四医院病理科;③河北医科大学第四医院CT室

* 本文课题受河北省高等院校强势特色学科资金(编号:冀教高2005-52号)资助

通信作者:耿翠芝 gengcuizhi@hotmail.com

如今,临床上多以ER、PR及Her-2状况预测乳腺癌患者他莫昔芬治疗效果。然而,激素受体的信号传导途径是一个含有多种辅助因子相互作用的复杂过程,辅助因子的变化和修饰会影响、调控靶基因的表达^[1],因此,仅有60%ER阳性的乳腺癌患者对内分泌治疗敏感^[2]。乳腺癌扩增因子-1(Amplified In Breast Cancer-1, AIB-1, 又称SRC-3)属于P160蛋白家族成员,能够以配体依赖的形式与激素受体相互作用,也能提高激素受体转录活性,可能影响乳腺癌的内分泌治疗效果。本研究应用免疫组织化学SP法(streptavidin peroxidase conjugated method, SP)检测绝经前、ER阳性乳腺癌患者肿瘤组织中AIB-1蛋白表达,并与临床病理特征和预后相关联,探讨AIB-1与他莫昔芬治疗耐药的关系。

1 材料与方法

1.1 一般资料

河北医科大学第四医院2004年1月至12月经病理证实、且随访资料完整的女性绝经前原发性乳腺癌206例,年龄23~48岁,中位年龄41岁;按AJCC第6版(2003年)TNM分期,Ⅰ期39例、Ⅱ期146例、Ⅲ期21例;病理类型包括:浸润性导管癌135例、浸润性小叶癌19例、髓样癌23例、其他29例(黏液腺癌9例、低分化腺癌7例、富脂质癌5例、鳞癌3例、管状腺癌3例、腺棘细胞癌2例);腋淋巴结转移>3枚45例,占21.84%。按照美国国家综合癌症网(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)乳腺癌临床实践指南(2004年版),所有患者均接受规范的手术和/或放疗;根据免疫组化检测结果,ER+或PR+者157例,占76.21%,常规他莫昔芬治疗(Tamoxifen group, T组)至5年或治疗失败为止,ER/ER均为阴性者49例,占23.79%,未给他莫昔芬治疗(Control group, C组)。T组和C组均按Her-2及AIB-1表达情况各分为4个亚组(Her-2、AIB-1均高表达组;Her-2高表达、AIB-1低表达组;Her-2低表达、AIB-1高表达组;Her-2、AIB-1均低表达组)。本研究符合医学伦理相关规定。

1.2 试剂及检测方法

肿瘤标本经石蜡包埋,4 μm厚切片,S-P法检测乳腺癌组织中ER、PR、Her-2、AIB-1蛋白表达。免疫组化试剂盒购自北京中山金桥生物技术有限公司(产品号 erpa0151prpa0312p; 试剂号 100708501c),一抗稀释度:ER 1:100, PR 1:100, Her-2 1:100, AIB-1 1:200。试剂包括兔抗人AIB-1单克隆抗体,鼠抗人ER、PR、Her-2单克隆抗体。用已知阳性的乳腺癌标本染色切片作为阳性对照;以PBS代替一抗作阴性对照,省去一抗作空白对照。

1.3 结果判定

ER/PR结果判定标准:按照先前描述的免疫组化检测结果,将癌细胞核棕黄色着色<10%,定为ER/PR表达阴性,≥10%为阳性^[3]。

AIB-1结果判定标准:细胞胞浆和/或核内有棕黄色细颗粒者为阳性细胞。阳性细胞数少于5%为(-);颗粒呈淡黄色,阳性细胞占5%~50%为(+);棕色颗粒较深,阳性细胞占51%~75%为(++);棕色颗粒量多,深棕色,阳性细胞数占75%以上为(+++)。本实验将(-)~(+)定为AIB-1低表达,将(++~(+++)定为AIB-1高表达^[4]。(图1、2)。

Her-2结果判定标准:1)注意细胞膜完全着色的癌细胞比例及着色强度;2)胞质着色忽略不计;3)导管内癌的着色忽略不计,只评定浸润癌的着色情况;4)正常乳腺上皮不应着色。应用美国FDA推荐的HercepTest评分标准^[5]:(按每张切片计)结果分为(-)~(+++),完全没有着色或少于10%的癌细胞胞膜染色为(-);超过10%的癌细胞呈现微弱、不完整的细胞膜着色为(+);超过10%的癌细胞呈现弱至中等完整的细胞膜着色为(++);超过10%的癌细胞呈现强的、完整的细胞膜着色为(+++)。本试验将(-)~(+)为低表达,(++)为高表达,(++)者做Fish检测,红色信号的总数与绿色信号的总数比值≥2为RHE-2基因扩增,否则为无扩增(图3、4)。存在Her-2基因扩增为高表达,无Her-2基因扩增为低表达。

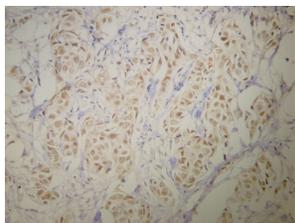


图1 AIB-1在乳腺癌中的高表达 (SP×200)

Figure 1 The high expression of AIB-1 in breast cancer (SP×200)

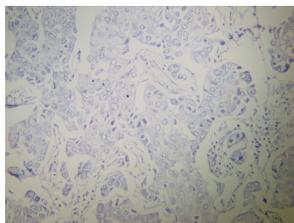


图2 AIB-1在乳腺癌中的低表达 (SP×200)

Figure 2 The low expression of AIB-1 in breast cancer (SP×200)

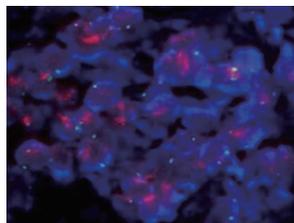


图3 FISH检测Her-2基因扩增 (SP×200)

Figure 3 Her-2 gene amplification in breast cancer with FISH test (SP×200)

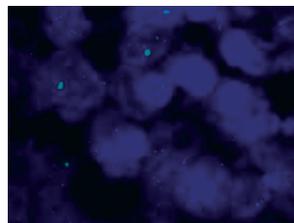


图4 FISH检测Her-2基因无扩增 (SP×200)

Figure 4 Her-2 gene non-amplification in breast cancer with FISH test (SP×200)

1.4 预后判定

从病理确诊为乳腺癌、且行正规治疗的当天算起,截至2010年12月,经病理证实局部或区域淋巴结有癌细胞为局部复发;影像学或病理证实肺、肝、骨及对侧乳房、腋下或锁骨上淋巴结等部位有转移者为远位转移。无病生存(disease-free survival, DFS)期是指治疗的第一天开始至局部复发或远位转移为止;总生存(overall survival, OS)期是指治疗的第一天开始至因乳腺癌导致死亡或末次随访时间为止。

1.5 统计学方法

采用SPSS13.0统计软件包进行统计学处理,两组比较用 χ^2 检验。Kaplan-Meier法计算DFS及OS,两组曲线比较用Log-Rank检验。检验标准为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 随访结果

术后随访30~84个月,中位随访时间65个月;58例患者出现局部复发或远位转移,5年DFS为71.84%(148/206),其中T组为76.43%(120/157),C组为57.14%(28/49),两组之间的差异显著($\chi^2=6.870, P=0.011$);死亡36例,5年OS为82.52%(170/206),其中T组为84.71%(133/157),对照组为75.51%(37/49),两组之间的差异无统计学意义($\chi^2=2.193, P=0.194$)。

2.2 AIB-1蛋白表达与临床病理指标的关系

206例患者中,AIB-1蛋白高表达113例,阳性表达率为54.85%;随着组织学分级的增高,AIB-1蛋白高表达率逐步提高且差异显著($\chi^2=12.573, P=0.002$);在腋淋巴窝结阳性数 >3 枚的45例患者中,AIB-1高表达率为29.20%,明显高于12.90%的低表

达且有统计学意义($\chi^2=7.939, P=0.005$);本组中206例绝经前女性乳腺癌组织的Her-2阳性表达率为44.66%(92/206),同时Her-2的高表达与AIB-1的高表达显著正相关($\chi^2=4.502, P=0.036$);AIB-1蛋白高表达与临床分期、病理类型、激素受体状态的关系无统计学差异($\chi^2=0.124, P=0.940; \chi^2=1.647, P=0.649; \chi^2=0.083, P=0.870$)。

2.3 AIB-1蛋白表达与预后的关系

亚组分层分析中,T组中有37例出现复发转移,其中AIB-1及Her-2均高表达亚组患者复发转移21例,占44.65%(21/46),其复发转移率显著高于其他亚组(23.13%,37/160),并有统计学差异($\chi^2=8.903, P=0.005$)。

比较各亚组DFS,仅T组中的AIB-1及Her-2均高表达组明显低于AIB-1低表达和Her-2高表达组($\chi^2=5.900, P=0.002$);其他各亚组之间差异无统计学意义($\chi^2=0.110, P=1.000; \chi^2=0.135, P=1.000; \chi^2=0.134, P=0.560$)。见表1。将T组中的AIB-1及Her-2均高表达亚组与其他所有亚组DFS进行比较,差异有统计学意义(Log-rank检验, $\chi^2=8.903, P=0.005$)。

比较各亚组OS,T组中AIB-1及Her-2均高表达亚组患者OS为67.39%(31/46),显著低于AIB-1低表达和Her-2高表达组($\chi^2=4.533, P=0.049$);其他各亚组之间差异无统计学意义($\chi^2=0.442, P=0.627; \chi^2=0.062, P=1.000; \chi^2=0.001, P=1.000$)。见表2。将T组中的AIB-1及Her-2均高表达亚组与其他所有亚组OS进行比较,差异有统计学意义($\chi^2=9.405, P=0.004$)。

表1 206例绝经前乳腺癌组织不同组别中AIB-1和HER-2的表达对DFS的影响

Table 1 The effect of AIB-1 and Her-2 expression upon DFS in different groups of 206 premenopausal patients with primary breast cancer

项目	未治疗组(n=49)				他莫西芬治疗组(n=157)			
	例数	65个月DFS(95%CI)	P	χ^2	例数	65个月DFS(95%CI)	P	χ^2
Her-2高表达			1.000	0.110			0.023	5.900
AIB-1高表达	12	0.412(0.44~0.83)			46	0.544(0.20~0.64)		
AIB-1低表达	6	0.333(0.12~0.56)			28	0.821(0.61~0.93)		
Her-2低表达			1.000	0.135			0.560	0.134
AIB-1高表达	14	0.642(0.42~0.66)			41	0.854(0.66~0.98)		
AIB-1低表达	17	0.706(0.38~0.67)			42	0.881(0.57~0.76)		

表2 206例绝经前乳腺癌组织不同组别中AIB-1和HER-2的表达对OS的影响

Table 2 The effect of AIB-1 and Her-2 expression upon OS in different groups of 206 premenopausal patients with primary breast cancer

项目	未治疗组(n=49)				他莫西芬治疗组(n=157)			
	例数	65个月OS(95%CI)	P	χ^2	例数	65个月OS(95%CI)	P	χ^2
Her-2高表达			0.627	0.422			0.049	4.533
AIB-1高表达	12	0.667(0.04~0.83)			46	0.674(0.20~0.64)		
AIB-1低表达	6	0.500(0.12~0.56)			28	0.893(0.61~0.93)		

(续表2)

项目	未治疗组(n=49)				他莫西芬治疗组(n=157)			
	例数	65个月OS(95% CI)	P	χ^2	例数	65个月OS(95% CI)	P	χ^2
Her-2低表达			1.000	0.062			1.000	0.001
AIB-1高表达	14	0.857(0.42~0.66)			41	0.927(0.66~0.98)		
AIB-1低表达	17	0.824(0.38~0.67)			42	0.929(0.57~0.76)		

3 讨论

分子生物学研究表明,AIB-1高表达可以导致多种肿瘤组织,如乳腺癌、肺癌和垂体肿瘤的发生,其致瘤性可以通过雌激素依赖或非依赖途径发生^[6]。本研究结果显示,随着组织学分级的增高,AIB-1蛋白高表达率逐步提高且差异显著($P=0.002$);在腋窝淋巴结阳性数大于3枚的患者中,AIB-1高表达率明显高于腋窝淋巴结阳性率0~3枚的患者($P=0.005$);并且与Her-2的高表达呈正相关($P=0.036$);从临床上证实了AIB-1的高表达常常伴随着不良的临床生物学行为,可以作为预测乳腺癌患者预后的独立指标。

已有基础研究表明,作为ER共激活剂,AIB-1可能调节雌激素激动剂或拮抗剂(如:他莫昔芬)的功能,以降低其抗肿瘤作用;AIB-1高表达可能是导致ER阳性患者他莫昔芬治疗耐药因素之一^[7-8]。研究显示:AIB-1通过某种机制降低他莫昔芬的拮抗雌激素作用,从而降低此类药物的抗肿瘤作用^[9]。Kirkegaard等^[10]研究亦发现AIB-1、Her-2均高表达且接受他莫昔芬治疗的患者10年生存率为45%,而低表达且接受同样治疗的患者10年生存率为75%,考虑可能的机制是:Her-2等生长因子受体过表达可以通过MAPK途径促进ER和AIB-1磷酸化,增强转录活性,从而降低他莫昔芬治疗效果,而此时的他莫昔芬类雌激素作用增强,而导致乳腺癌细胞生长。本组数据显示,ER阳性且接受他莫昔芬治疗的绝经前乳腺癌患者的DFS和OS均高于ER/PR阴性组,说明了他莫昔芬可以有效延长激素依赖性乳腺癌患者的无病生存期和总生存期;本实验结果还显示,AIB-1蛋白高表达常常伴随Her-2高表达;而AIB-1蛋白高表达、同时伴有Her-2高表达的绝经前乳腺癌患者,尽管接受了规范的他莫昔芬治疗,但是其DFS和OS均低于其他亚组、包括ER/PR阴性组,并有统计学差异。提示AIB-1可能通过Her-2高表达来降低ER阳性患者的他莫昔芬治疗效果,使患者产生他莫昔芬耐药,此结果与Osborne等^[11]的研究结果相符合,且进一步研究认为:只有Her-2和AIB-1同时高表达,成为激酶信号通路的下游靶点,才会造成他莫昔芬耐药。

综上,本文认为,AIB-1可通过Her-2的高表达来降低他莫昔芬结合ER所产生的拮抗作用,从而难

以抑制乳腺肿瘤的生长和转移。本实验结果证实,AIB-1蛋白高表达常常伴随着不良的临床生物学行为和预后;AIB-1蛋白高表达、同时伴有Her-2高表达的绝经前乳腺癌患者对他莫昔芬治疗耐药,提示AIB-1的表达可以作为预测他莫昔芬耐药的因子,此结论具有重要的临床意义。

参考文献

- Bouras T, Southey MC, Venter DJ. Overexpression of the steroid receptor coactivator AIB-1 in breast cancer correlates with the absence of estrogen and progesterone receptors and positivity for p53 and HER-2/neu[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(3): 903-907.
- Massarweh S, Schiff R. Unraveling the mechanisms of endocrine resistance in breast cancer: new therapeutic opportunities[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(7): 1950-1954.
- Ryden L, Landberg G, Stal O, et al. HER-2 status in hormone receptor positive premenopausal primary breast cancer adds prognostic, but not tamoxifen treatment predictive, information[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2008, 109(2): 351-357.
- Henke RT, Haddad BR, Kim SE, et al. Overexpression of the nuclear receptor coactivator AIB-1(SRC-3) during progression of pancreatic adenocarcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(18 Pt 1): 6134-6142.
- 霍临明. 乳腺癌HER-2检测指南[J]. *中华病理学杂志*, 2006, 35(10): 631-633.
- Torres-Arzuayus MI, Zhao J, Bronson R, et al. Estrogen-dependent and estrogen-independent mechanisms contribute to AIB-1-mediated tumor formation[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(10): 4102-4111.
- Alkner S, Bendahl PO, Grabau D, et al. AIB-1 is a predictive factor for tamoxifen response in premenopausal women[J]. *Ann Oncol*, 2010, 21(2): 238-244.
- 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.
- Lahusen T, Henke RT, Kagan BL, et al. The role and regulation of the nuclear receptor co-activator AIB-1 in breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, 116(2): 225-237.
- Kirkegaard T, McGlynn LM, Campbell FM, et al. Amplified in breast cancer 1 in human epidermal growth factor receptor-positive tumors of tamoxifen-treated breast cancer patients[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(5): 1405-1411.
- Osborne CK, Bardou V, Hopp TA, et al. Role of the estrogen receptor coactivator AIB-1 (SRC-3) and HER-2/neu in Tamoxifen resistance in breast cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2003, 95(5): 353-361.

(2011-06-15收稿)

(2011-11-05修回)

(王展宏校对)