论著

文章编号:1000-5404(2007)11-1090-03

乳腺癌雌激素受体β表达与临床病理及预后标志物的关系

周 艳,张 毅,梁 燕,姜 军 (第三军医大学西南医院乳腺疾病中心,重庆 400038)

提 要:目的 探讨雌激素受体亚型ERβ在乳腺组织中的表达及其与ERα、PR、其他生物学预后标志物以及和临床病理参数的关系。**方法** 采用组织芯片和免疫组化技术,比较109例原发性乳腺癌患者中ERβ表达与ERα、PR、其他生物学预后标志物以及和临床病理参数的关系。**结果** ERβ蛋白在良性上皮细胞和间质细胞中均有表达,不同乳腺癌组织类型中59% ERβ表达阳性,其中45%病例ERβ和ERα同时表达。统计学分析结果显示,ERβ阳性表达组中,HER-2/neu和p53蛋白表达率显著高于ERβ阴性组,而ERβ表达与否同各临床指标间无显著性差异。**结论** ERβ可能是乳腺癌重要的预后指标及治疗靶点。

关键词: 乳腺肿瘤;雌激素受体;预后

中图法分类号: R392.1; R730.23; R737.9 **文献标识码:** A

Association of ERβ expression with the clinical pathologic indexes and prognostic biomarkers of breast cancer

ZHOU Yan, ZHANG Yi, LIANG Yan, JIANG Jun (Breast Disease Centre, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the association of ERβ expression with the expression of hormonal receptor and prognostic biomarkers. **Methods** The expressions of ERβ, ERα, PR, Ki-67, HER-2/neu and p53 were detected in tissue samples from 109 breast cancer patients by immunohistochemistry on tissue microarray slides. The histologic grade, tumor size and lymph node metastasis status of 109 cases of breast cancer were recorded and served as comparison indexes. **Results** ERβ was expressed in benign epithelium and stroma cells, and breast cancer cells in 59% breast cancer tissues of different histologic types. ERβ was coexpressed with ERα in 45% breast cancer tissues. ERβ expression was found a statistically significant association with HER-2/neu ($P<0.05$) and p53 ($P<0.05$). No statistically significant association was seen between ERβ expression and histologic grade, tumor size and lymph node metastasis. **Conclusion** ERβ may be an important prognostic marker and therapeutic target in breast cancer.

Key words: breast neoplasm; estrogen receptor; prognosis

雌激素受体是乳腺癌重要的预后因子和治疗靶点。目前认为雌激素受体α(estrogen receptor alpha, ERα)表达是内分泌治疗的主要靶点。自从雌激素受体β(estrogen receptor beta, ERβ)被发现以来,越来越多的研究表明其与ERα有着不同的细胞内分布,调节不同的基因,两种受体有不同的信号途径,依赖不同的配体和不同的反应元件发挥作用,这些可能导致了它们在乳腺癌生物进展以及抗雌激素治疗反应性上具有不同的功能。已有文献报道中关于ERβ的研究多是通过RT-PCR检测,免疫组化的蛋白水平研究结果差异较大[1]。这些不同的结果可能由于样本量、抗体选择、阳性判断以及实验条件等诸多因素构成。因此,我们希望通过大样本的乳腺癌以及组织芯片技术,在统一一致的实验条件下,评价乳腺癌ERβ的表达。ERβ表达与其他生物学指标和临床病理参数的比较可提示检测ERβ是否可作为目前诊断和预后生物学指标的补充。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择自2004-2005年在本院乳腺疾病中心诊断并行手术的乳腺癌患者病例109例和肿块切除手术的乳腺良性病变病例30例。乳腺癌109例,均为女性,年龄22~74(48.34±10.4)岁,53例已绝经;肿瘤位于左侧63例,右侧46例;肿瘤最大径(4.02±1.706)cm;根据WHO肿瘤分级,临床Ⅰ期2例,Ⅱ期59例,Ⅲ期48例;病理类型为浸润性导管癌71例,浸润

作者简介:周 艳(1979-),女,重庆市人,博士研究生,医师,主要从事乳腺癌内分泌治疗方面的研究。电话:(023)68754160,E-mail: zhouyan126@yahoo.com.cn

通讯作者:姜 军,电话:(023)68754160,E-mail: jcbd@medmail.com.cn

收稿日期:2006-09-12;修回日期:2006-10-16

性小叶癌 26 例，导管内癌 5 例，黏液腺癌 3 例，髓样癌 2 例，鳞状细胞癌 2 例；患者行改良根治术 103 例，根治术 4 例，扩大根治术 2 例；清扫出区域淋巴结数目 10～44（18.24 ±7.3）枚；其中 35 例无区域淋巴结转移，74 例有区域淋巴结转移，淋巴结转移数目（7.53 ±10.1）个；乳腺良性病例 30 例，其中乳腺纤维腺瘤 16 例，乳腺腺病 6 例，正常乳腺组织 8 例。

1.2　方法

1.2.1　组织芯片的设计　　在 109 例乳腺癌患者的每例蜡块肿瘤中心、肿瘤边缘（距肿瘤边界 ±0.5 cm）以及远离肿瘤（距肿瘤边界 >3 cm）的正常腺体组织各取 2 点，30 例良性病例和正常乳腺组织各取 2 点，作为构建组织芯片的采样点。共制作 3 组组织芯片，芯片 1 排列浸润性导管癌，芯片 2 为浸润性小叶癌及其他癌，芯片 3 为浸润性导管癌和小叶癌伴区域淋巴结转移组。同时每张芯片均设计有良性对照点、正常对照点和阳性对照点。

1.2.2　组织芯片制作　　标本经 10% 甲醛固定后用石蜡包埋，5 μm 切片常规 HE 染色，阅片，标记采样点。用莱卡蜡制作 45 mm × 20 mm × 10 mm 受体蜡块，用组织微阵列仪（Beecher 公司，美国）打孔采样装置根据标记对供体组织蜡块进行采样，同时对受体蜡块进行打孔，取得直径 0.6 mm，深度 2～3 mm 的组织芯；再通过阵列仪的定位装置将供体蜡块的组织芯准确放入受体蜡块的孔内；重复上述步骤，按设计好的排列将原标本组织芯全部放入相应的受体蜡块位置孔内；55 ℃ 30 min，轻压蜡块使组织芯排平；连续 4 μm 厚度切片，敷贴于多聚赖氨酸处理载玻片上，即制作好组织芯片。

1.2.3　免疫组织化学染色　　免疫组化检测采用 EnVision 超敏二步法。试剂采用兔抗人 ERβ 单抗，购自 Santa Cruz 公司。ERα、孕激素受体（progesterone receptor，PR）、HER-2/neu、Ki-67、p53 蛋白一抗均为鼠抗人单克隆抗体，与二抗均为福州迈新生物技术公司产品，在病例蜡块获得后时采用常规切片行免疫组化染色，染色方法同前。

1.2.4　结果判定　　每个病例均由 2 位病理医师独立阅片，在 0.6 mm 的组织芯中超过 10% 的细胞染色为棕黄色，被认为阳性。HER-2/neu 的表达结果判定采用 DAKO 分级指南分为 3 级：0，阴性（小于 10% 的肿瘤细胞膜染色）；+，阴性（超过 10% 细胞染色，但是染色很淡，或者细胞膜只有部分染色）；++，不确定（超过 10 % 细胞膜有完整的轻度到中等程度的染色）；+++，阳性（超过 10% 的细胞膜被强且完整的染色）。

1.3　统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析，ERβ 表达和各类变量的相关性用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　ERβ 表达情况及与临床病理参数间的关系

在正常上皮细胞、基质细胞和炎性浸润淋巴细胞中均可见 ERβ 表达，见图 1。在乳腺癌和良性增生病变，包括腺瘤、纤维腺瘤、末梢导管增生和纤维囊性病变中也有 ERβ 表达。从形态学上可见 ERβ 表达为均一的、呈弥漫分布，染色强，且仅为细胞核染色。在全部 109 例乳腺癌中，59%（64/109）的乳腺癌有 ERβ 表达，45 例为 ERβ 表达阴性，见图 2。ERβ 表达与不同肿瘤分级以及肿瘤大小和淋巴结受累情况等参数之间均没有显著性差异（$P>0.05$），见表 1。



图 1　ERβ 在正常乳腺导管上皮细胞中的阳性表达　（EnVision 二步法 ×200）



图 2　ERβ 在乳腺癌细胞中的阳性表达　（EnVision 二步法 ×200）

表 1　ERβ 表达和临床病理参数间的关系［例数（%）］

临床指标	ERβ 阳性	ERβ 阴性	P 值
组织学分级			
Ⅰ + Ⅱ级	40（62.5）	21（46.7）	0.101
Ⅲ级	24（37.5）	24（53.3）	
肿瘤大小（最大径）			
<3 cm	17（26.6）	15（33.3）	0.445
>3 cm	47（73.4）	30（66.7）	
腋窝淋巴结状态			
有转移	43（67.2）	31（68.9）	0.851
无转移	21（32.8）	14（31.1）	

2.2　ERβ 表达和其他生物学标志物的关系

Ki-67 表达在一小部分病例，并且大部分表达在 ERβ 阳性病例。HER-2/neu 阳性表达为细胞膜染色。p53 表达表现为散在的细胞核染色。ERβ 阳性表达组中，HER-2/neu 和 p53 蛋白表达率明显高于 ERβ 阴性组，有显著性差异（$P<0.05$，表 2）。

表 2　ERβ 表达和其他生物学标志物的关系［例数（%）］

生物学标志物	ERβ 阳性	ERβ 阴性	P 值
ERα 阳性	49（76.6）	28（62.2）	0.106
PR 阳性	37（57.8）	21（46.7）	0.251
Ki-67 阳性	30（46.9）	15（33.3）	0.157
HER-2/neu 阳性	23（35.9）	7（15.6）	0.019
p53 阳性	34（53.1）	12（26.7）	0.006

3 讨论

ERβ 与 ERα 同属甾体激素受体家族成员，能和 ERα 组成二聚体，结合 ERE 反应元件，调节基因转录。但是目前对 ERβ 的文献报道，不管是在表达情况、与组织病理学指标关系、是否是预后指标以及是否和内分泌治疗相关等各个方面都存在诸多矛盾，没有统一的定论，尤其是蛋白水平的检测[1]。虽然采用免疫组化的方法检测 ERβ 蛋白表达被认为是切实可靠的，但是各个公司有不同的抗体，其抗原定位在 ERβ 不同的部位，因而可能导致检测结果的差异。我们选择检测全长的野生型 ERβ 表达，排除各种 ERβ 的剪切变异体，希望能使结果更单一可靠。而组织芯片技术的采用，也是为了最大化的减少实验操作造成的结果差异，避免因孵育时间、抗体浓度、温度、pH 值、洗脱条件等各种因素对染色效果的影响，以尽量排除主观因素导致的实验误差，得到更可靠的结论。

Speirs 等[2]研究 ERα 阳性乳腺癌患者的 ERβ 表达情况，发现 ERβ 表达者淋巴结阳性比率更高且组织学分级差。而且在他莫昔分治疗抵抗组的 ERβ 水平明显高于他莫昔分治疗敏感组[3]。有研究认为，ERβ 表达与肿瘤体积小、组织分化好、无病生存期长[4]，腋窝淋巴结阴性、组织学分级好相关[5]。也有报道认为 ERβ 表达和年龄、淋巴结状态、肿瘤大小、组织学分级等不相关[6]。在本研究中 ERβ 表达与否、肿瘤大小、淋巴结转移和组织学分级均无显著性差异，这一结论可能需要更大样本研究或者 meta 分析进一步证实。

10% ~30 % 的乳腺癌中有 HER-2/neu 扩增或者其蛋白过表达，且不管在多因素分析还是单因素分析中，HER-2/neu 表达均是独立的不良预后因素。大约 1/3 的乳腺癌有抑癌基因 p53 的突变，其突变和高组织学分级、高侵袭性相关，特别对淋巴结阴性和肿瘤直径较大的乳腺癌患者，p53 是重要的不良预后指标。ERβ 表达和生物学预后指标的关系目前报道不多，本实验结果显示 ERβ 阳性表达组中，HER-2/neu 和 p53 蛋白表达率明显高于 ERβ 阴性组，而这些指标都是提示预后不良的指标。由于随访时间不足，本实验没有进行 ERβ 和无病生存率及总生存率间的预后分析，仅仅依靠 ERβ 表达和 HER-2/neu，p53 表达之间的关系还不能明确提示 ERβ 表达和不良预后相关，但是这种表达一致性的意义和原因还需要进一步的深入研究。ERβ 表达和预后的关系文献报道差异较大，大部分文献认为 ERβ 表达提示预后好[6-8]，Fuqua 和 O'Neill 等[9,10]的研究认为 ERβ 表达和预后无显著性差异，Speirs 等[2,3]则认为 ERβ 表达是预后不佳的指标。

因此，由于 ERβ 表达和乳腺癌预后、内分泌治疗的关系均不明确[11,12]，而 ERβ 的表达到底对雌激素介导的信号转导途径有什么影响值得深入研究。我们认为，因为 ERβ 和 ERα 有不同的配体结合和转录激活蛋白，因此，雌激素对乳腺组织的生物学作用可能由这 2 种受体之间的平衡所调控。有功能的 ERβ 表达可能干扰雌激素介导的 ERα 信号转导途径，进而影响其预后和对内分泌治疗药物的反应。所以，ERβ 可能是乳腺癌重要的诊断和治疗靶点。检测 ERβ 水平可能和检测 ERα 表达水平一样重要。研究大样本接受内分泌治疗的 ERα 阳性患者中 ERβ 表达情况可能对于阐明 ERβ 在乳腺癌内分泌治疗中的临床价值有重要意义。ERβ 阳性表达组中，HER-2/neu 和 p53 蛋白表达率明显高于 ERβ 阴性组，提示 ERβ 引起的基因表达谱改变可能和生长因子及抑癌基因有关，有待深入研究。

参考文献：

[1] Saji S, Hirose M, Toi M. Clinical significance of estrogen receptor beta in breast cancer[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2005, 56(Suppl 1): 21-26.

[2] Speirs V, Parkes A T, Kerin M J, *et al*. Coexpression of estrogen receptor alpha and beta: poor prognostic factors in human breast cancer? [J]. Cancer Res, 1999, 59(3): 525-528.

[3] Speirs V, Malone C, Walton D S, *et al*. Increased expression of estrogen receptor beta mRNA in tamoxifen-resistant breast cancer patients [J]. Cancer Res, 1999, 59(21): 5421-5424.

[4] Omoto Y, Inoue S, Ogawa S, *et al*. Clinical value of the wild-type estrogen receptor beta expression in breast cancer[J]. Cancer lett, 2001, 163(2): 207-212.

[5] Jarvinen T A, Pelto-Huikko M, Holli K, *et al*. Estrogen receptor beta is coexpressed with ERalpha and PR and associated with nodal status, grade, and proliferation rate in breast cancer[J]. Am J Pathol, 2000, 156(1): 29-35.

[6] Hopp T A, Weiss H L, Parra I S, *et al*. Low Levels of estrogen receptor beta protein predict resistance to tamoxifen therapy in breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(22): 7490-7499.

[7] Myers E, Fleming F J, Crotty T B, *et al*. Inverse relationship between ER-beta and SRC-1 predicts outcome in endocrine-resistant breast cancer[J]. Br J Cancer, 2004, 91(9): 1687-1693.

[8] Nakopoulou L, Lazaris A C, Panayotopoulou E G, *et al*. The favourable prognostic value of oestrogen receptor beta immunohistochemical expression in breast cancer[J]. J Clin Pathol, 2004, 57(5): 523-528.

[9] Fuqua S A, Schiff R, Parra I, *et al*. Estrogen receptor beta protein in human breast cancer: correlation with clinical tumor parameters[J]. Cancer Res, 2003, 63(10): 2434-2439.

[10] O'Neill P A, Davies M P, Shaaban A M, *et al*. Wild-type oestrogen receptor beta (ERbeta1) mRNA and protein expression in Tamoxifen-treated post-menopausal breast cancers[J]. Br J Cancer, 2004, 91(9): 1694-1702.

[11] Chen B, Gajdos C, Dardes R, *et al*. Potential of endogenous estrogen receptor beta to influence the selective ER modulator ERbeta complex [J]. Int J of Oncol, 2005, 27(2): 327-335.

[12] Koehler K F, Helguero L A, Haldosen L A, *et al*. Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta[J]. Endocr Rev, 2005, 26(3): 465-478.

（编辑 张大春）