文章编号:1000-5404(2007)20-1999-03

论著

雌激素受体β及其剪切变异体表达与雌激素受体阻滞剂治疗耐药的关系

周 艳,姜 军,张 毅,凡庆东,范林军,梁 燕,徐鹰妮 (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β及其剪切变异体表达与乳腺癌他莫昔分治疗耐药的关系。**方法** 选取接受他莫昔分治疗期间出现疾病进展的13例病例作为他莫昔分抵抗组,另外选取在年龄、绝经状态、随访时间、肿瘤分级分期和组织学表现上均接近,但是接受他莫昔分治疗期间未出现疾病进展的同样13例患者作为他莫昔分敏感组。采用免疫组化方法检测总ERβ、ERβ1和ERβcx蛋白的表达。**结果** 总ERβ表达在他莫昔分抵抗组和敏感组之间有显著性差异($P<0.05$),总ERβ蛋白水平在他莫昔分敏感组明显高于他莫昔分抵抗组。ERβ1和ERβcx蛋白表达水平在2组间没有显著性差异。**结论** 在预测内分泌治疗敏感性时,总ERβ以及ERβ异构型将和ERα状态一起,可能扮演重要角色,需要更大样本的前瞻性实验进行深入研究。

关键词: 乳腺肿瘤;雌激素受体;内分泌治疗;耐药
中图法分类号: R737.9;R969.2;R977 **文献标识码:** A

Relationship of estrogen receptor-beta and its isoform expressions with tamoxifen resistance in human breast cancer

ZHOU Yan, JIANG Jun, ZHANG Yi, FAN Qing-dong, FAN Lin-jun, LIANG Yan, XU Ying-ni (Breast Disease Centre, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the relationship of estrogen receptor-beta and its isoform expressions with tamoxifen resistance in human breast cancer. Methods Thirty patients of primary breast cancer whose disease progressed while on tamoxifen therapy (tamoxifen resistant) and 13 matched patients of primary breast cancer without disease progression (tamoxifen sensitive) were included. The expression of total estrogen receptor beta (ERβ), ERβ1 and ERβcx in the specimens were tested by IHC. Results High total ERβ protein expressions were more in tamoxifen sensitive tumors than resistant tumors ($P<0.05$), while the expressions of ERβ1 and ERβcx protein showed no significant differences between the two groups. Conclusion The expressions of ERβ protein and its isoforms may differ in breast cancer patients who have different sensitivity to tamoxifen therapy.

Key words: breast neoplasm; estrogen receptors; endocrine therapy; resistance

乳腺癌内分泌治疗在乳腺癌的综合治疗中具有十分重要的意义,目前一般通过检测癌组织雌激素受体α(estrogen receptor alpha, ERα)和孕激素受体(progesterone receptor, PR)蛋白的表达,来预测患者对内分泌治疗的反应情况。但是有部分ERα表达阳性的乳腺癌对以他莫昔分为代表的内分泌治疗却不敏感,还有部分接受内分泌开始敏感的患者,在治疗的过程中出现疾病进展。这些现象目前均没有明确的解释。雌激素受体β(estrogen receptor β, ERβ)是继ERα后发现的新的雌激素受体亚型,二者生物学特性在不同条件下表现为既相似又相对、既协同又拮抗的关系,共同调节乳腺癌发生与发展,并影响乳腺癌激素治疗敏感性和预后。而ERβ变异体或异构型的存在使乳腺癌生物学特性更加复杂多变。随着ERβ研究的逐渐深入,乳腺癌ERβ表达在内分泌治疗中可能发挥一定的作用[1]。因此,本实验通过临床配对研究,初步探讨总ERβ表达、全长的ERβ1表达和ERβ剪切变异体ERβcx表达在内分泌治疗中可能的意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料

患者资料为1997-2005年在西南医院住院乳腺癌患者中选出。他莫昔分治疗抵抗组13例患者均为女性,年龄31~47

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:2007-03-13;修回日期:2007-03-25

岁，平均42.1岁。TNM病理分期：Ⅱ期4例，Ⅲ期9例。病理类型：浸润性导管癌8例，浸润性小叶癌5例。他莫昔分治疗敏感组的病例选择以抵抗组为标准，13例患者年龄32～47岁，平均42.3岁。病理分期和病理类型均与前组相同。全部26例患者均行术前空芯针穿刺活检确诊，术前均未行新辅助内分泌治疗，手术方式全部为改良根治术，术后进行6周期常规化疗，化疗方案为CEF或者TE，术后辅助放疗根据术后分期决定。

1.2 病例选择标准

他莫昔分治疗抵抗组：入组病例均为可手术乳腺癌，接受术后他莫昔分内分泌治疗的病例。并且在接受内分泌治疗期间出现疾病进展（局部复发、远处转移或者死亡），这部分患者术前均未接受新辅助内分泌治疗，这组病例共有13例，称为他莫昔分抵抗组；他莫昔分治疗敏感组：另外选择与入组病例在年龄、绝经状态、随访时间、肿瘤分级分期和组织学表现上均接近，但是接受他莫昔分治疗期间未出现疾病进展的同样13例患者作为对照组。

1.3 免疫组化检测

石蜡包埋标本由病理科提供，切片行HE染色，重新阅片复诊。检测采用EnVision超敏二步法。免疫组化试剂盒由福州迈新公司提供，免疫组化实验步骤按试剂盒说明书进行操作。以卵巢组织切片作为阳性对照，PBS代替一抗作为阴性对照。全长的ERβ1（克隆号PPG5/10）为浓缩型鼠抗人单克隆抗体（1∶20稀释），主要针对全长的野生型ERβ1的C末端，购自Serotec公司；IgYERbeta503（Dr Andrew Strom惠赠）则针对总的ERβ蛋白，为浓缩型鸡抗人多克隆抗体（1∶200稀释）。IgYERbeta503为ERβ的重组蛋白质，在配体结合区域断裂并插入18个氨基酸序列，虽然其具体的抗原决定簇还未知，但是文献认为其能检出总ERβ的表达[2]；ERβcx抗体（克隆号57/3）为浓缩型鼠抗人单克隆抗体（1∶20稀释），购自Serotec公司。

1.4 结果判断

阳性细胞的细胞核染成棕色，细胞质或细胞膜也可着色。按照细胞核染色着色深浅评分：无色为0分，淡黄色为1分，棕黄色为2分，棕褐色为3分。随机观察5个高倍视野（400倍），计算阳性细胞率：阳性细胞率＜10%为0分，10%～50%为1分，＞50%为2分。染色强度与阳性细胞率的乘积为表达强度，评分小于2分为低表达，大于2分为高表达。

1.5 统计学分析

采用SPSS 10.0统计软件进行他莫昔分治疗抵抗组和敏感组之间蛋白表达的差异比较的Fisher's精确检验。

2 结果

2.1 总ERβ表达和内分泌治疗的关系

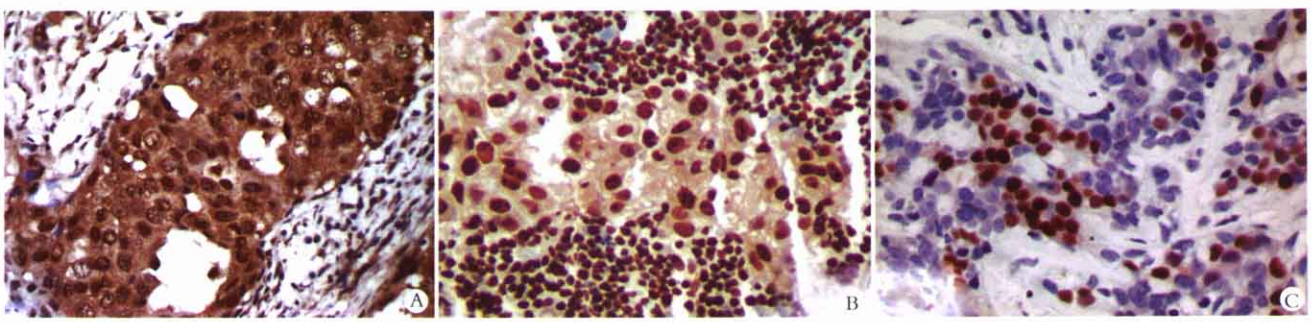
在全部26例患者中，总ERβ表达低组12例，其中他莫昔分治疗抵抗组9例，敏感组3例；总ERβ表达高组14例，其中他莫昔分治疗抵抗组4例，敏感组10例。总ERβ表达在他莫昔分治疗抵抗组和敏感组之间有显著性差异（$P<0.05$），总ERβ表达在他莫昔分治疗敏感组明显增加，提示总ERβ蛋白表达增多可能是他莫昔分治疗敏感的指标。总ERβ蛋白表达情况见图1A。

2.2 ERβ1表达和内分泌治疗的关系

ERβ1表达低组12例，其中他莫昔分治疗抵抗组7例，敏感组5例；ERβ1表达高组14例，其中他莫昔分治疗抵抗组6例，敏感组8例。他莫昔分治疗抵抗组和敏感组之间没有显著性差异（$P>0.05$）。ERβ1蛋白表达情况见图1B。

2.3 ERβcx表达和内分泌治疗的关系

ERβcx表达低组21例，其中他莫昔分治疗抵抗组10例，敏感组11例；ERβcx表达高组5例，其中他莫昔分治疗抵抗组3例，敏感组2例。他莫昔分治疗抵抗组和敏感组之间没有显著性差异（$P>0.05$）。ERβcx蛋白表达情况见图1C。



A：总ERβ蛋白；B：ERβ1蛋白；C：ERβcx蛋白

图1 ERβ及其剪切变异体在乳腺癌中的表达 （EnVision×400）

3 讨论

乳腺癌内分泌治疗（endocrine therapy，ET）临床面临的主要问题是原、继发耐药。即使雌激素受体和孕激素受体均阳性，也只有70%左右的患者治疗有效，即约有30%的受体阳性患者存在原发的内分泌治疗耐药；而几乎所有初治有效的患者在应用ET药物一段时间后会出现治疗无效，即继发耐药，且一旦发生耐药，以他莫昔分为代表的选择性雌激素受体调节剂（selective estrogen receptor modulators，SERMs）类药物反而会促进肿瘤的生长。ERβ及其不同剪接亚型在正常和癌变的乳腺组织中广泛表达，在乳腺癌发生、

发展中的作用目前尚不完全清楚，但有报道其与 ERα 共同影响内分泌治疗效果[3]。目前关于 ERβ 表达对内分泌治疗的影响存在很大争议，Speir 等[4,5] 认为 ERβ mRNA 的高表达提示他莫昔分治疗耐药，而 Esslimani-Sahla 等[6,7] 则认为 ERβ 蛋白水平增加提示他莫昔分治疗敏感，同时也有学者认为他莫昔分治疗效果和 ERβ 水平无关[8]。这些结果的差异说明 ERβ 作用的复杂性。因此，我们考虑 ERβ 对内分泌治疗影响的复杂性和 ERβ 多种形式的剪切变异体有关，其中 ERβcx 被认为和内分泌治疗耐药密切相关。ERβcx 不能和 E_2 结合，也不能激活雌激素敏感基因的转录，但是 ERβcx 比 ERβ 更容易和 ERα 结合形成异构体，从而抑制 ERα 与 DNA 的结合，这种异构体能明显抑制 ERα 配体依赖的转录活性，而且可能通过别的信号通路影响他莫昔分介导的转录抑制效应。

因此，我们选择在接受他莫昔分治疗过程中出现疾病进展的 13 例患者原发乳腺癌标本，并选择在年龄、绝经状态、肿瘤大小、肿瘤分级分期以及入院时间等均类似的另外 13 例接受他莫昔分治疗无疾病进展的患者作为配对对照研究，检测其组织中总 ERβ、全长序列的 ERβ1 以及剪切变异体 ERβcx 的表达，探讨 ERβ 表达和内分泌治疗耐药可能的关系。有趣的是，在我们这样小样本的研究中，发现总 ERβ 表达与他莫昔分治疗敏感相关，在他莫昔分治疗敏感组，总 ERβ 表达水平高于抵抗组，而 ERβ1 和 ERβcx 的表达水平和他莫昔分治疗效果均无关。Mann 等[9] 研究 ERβ 表达和预后关系时发现，ERβ 阳性肿瘤接受他莫昔分辅助治疗时，比 ERβ 阴性患者具有更好的总生存率。他也采用的是针对 N 末端的 ERβ 抗体，对所有 ERβ 亚型均能染色。虽然我们的研究结果和文献报道结果不尽相同，但分析可能的原因有：①样本量太小。由于本组有限的样本量，使得 ERβcx 的表达率较低，全部病例中仅 5 例为高表达组，因此在他莫昔分敏感组和抵抗组之间没有显著差异；②抗体选择的差异。抗体设计到底是针对 N 末端序列还是 C 末端序列会导致结果差异很大，会分别检出不同的变异体。特别是早期的文献报道，会由于抗体选择的差异而出现结果的差异；③检测方法的差别。文献报道 ERβ 和内分泌治疗抵抗相关的文献，主要都是检测 mRNA 水平，没有进行蛋白水平检测。细胞内发挥作用的是 ERβ 蛋白，因此，我们认为蛋白水平的检测比 mRNA 水平检测更有说服力。

本研究结果说明总 ERβ 蛋白水平的增加和患者对他莫昔分治疗敏感有关，提示除了全长序列的 ERβ1 蛋白表达以外，其余 ERβ 剪切变异体的表达也影响内分泌治疗的效果，也说明 ERβ 的各种异构型可能有独立的不同于 ERβ1 的作用，值得深入研究。迄今为止，尚无一种观点能够完满地解释乳腺癌他莫昔分耐药性的成因，但是，我们的结果提示在预测内分泌治疗敏感性时，总 ERβ 以及 ERβ 异构型将和 ERα 状态一起，可能扮演重要角色，需要更大样本的前瞻性试验进行深入研究。

参考文献：

[1] Hayashi S I, Eguchi H, Tanimato K, *et al*. The expression and function of estrogen receptor alpha and beta in human breast cancer and its clinical application[J]. Endocr Relat Cancer, 2003, 10(2): 193 - 202.

[2] Saji S, Jensen E V, Nilsson S, *et al*. Estrogen receptors alpha and beta in the rodent mammary gland[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(1): 337 - 342.

[3] 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.

[4] 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.

[5] Chang H G, Kim S J, Chung K W, *et al*. Tamoxifen-resistant breast cancers show less frequent methylation of the estrogen receptor beta but not the estrogen receptor alpha gene[J]. J Mol Med, 2005, 83(2): 132 - 139.

[6] Esslimani-Sahla M, Simony-Lafontaine J, Kramar A, *et al*. Estrogen receptor beta (ER beta) level not its ER beta cx variant helps to predict tamoxifen resistance in breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(17): 5769 - 5776.

[7] Murphy L C, Leygue E, Niu Y, *et al*. Relationship of coregulator and oestrogen receptor isoform expression to de novo tamoxifen resistance in human breast cancer[J]. Br J Cancer, 2002, 87(12): 1411 - 1416.

[8] Cappelletti V, Celio L, Bajetta E, *et al*. Prospective evaluation of estrogen receptor-beta in predicting response to neoadjuvant antiestrogen therapy in elderly breast cancer patients[J]. Endocr Relat Cancer, 2004, 11(4): 761 - 770.

[9] Mann S, Laucirica R, Carlson N, *et al*. Estrogen receptor beta expression in invasive breast cancer[J]. Hum Pathol, 2001, 32(1): 113 - 118.

（编辑　陈聪连）