

ERR α mRNA 及蛋白在乳腺癌中的表达及其临床意义

李鹏鹏, 刘胜春

(重庆医科大学附属第一医院内分泌乳腺外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究雌激素受体相关受体 α (estrogen receptor-related receptor α , ERR α) mRNA 和蛋白在乳腺癌组织及乳腺癌旁组织的表达及意义, 进一步探讨 ERR α 与乳腺癌临床病理指标[雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)、人表皮生长因子受体-2(human epidermal growth factor receptor-2, Her-2)、P53], 以及乳腺癌分级、分期的相关性。**方法:**收集乳腺癌及对应乳腺癌旁组织标本 87 例, 分别采用免疫组织化学染色, RT-PCR, Western blot 检测 ERR α mRNA 和蛋白的表达情况, 进一步分析 ERR α 的表达与乳腺癌临床病理特征的关系。**结果:**本研究中 ERR α mRNA 和蛋白在乳腺癌组织中的表达均高于在乳腺癌旁组织中的表达 ($P < 0.05$), 且 ERR α 的表达与乳腺癌病理指标 Her-2、ER 以及肿瘤的病理分级, 肿瘤大小, 淋巴结转移相关, 而与患者的年龄、PR、P53 等无明显相关。**结论:**ERR α 在乳腺癌中的高表达, 可能作为乳腺癌一个预后不良的新的分子标记物, 为乳腺癌的诊治提供新的思路。

【关键词】雌激素受体相关受体 α ; 乳腺癌; 免疫组织化学; RT-PCR; Western blot

【中图分类号】R737.9

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-05-29

mRNA and protein expression of estrogen receptor-related receptor α in breast cancer and its clinical significance

Li Kunpeng, Liu Shengchun

(Department of Endocrine Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To detect the expression and significance of estrogen receptor-related receptor (ERR) α mRNA and protein in breast cancer and breast para-carcinoma tissues and to further discuss the correlation between ERR α and breast cancer clinical pathological index (estrogen receptor (ER), progestin receptor (PR), human epidermal growth factor receptor-2 (Her-2), P53) as well as the grade and classification of breast cancer. **Methods:** Expression of ERR α in 87 breast cancer tissues and the corresponding breast para-carcinoma tissues were detected by immunohistochemistry and reverse transcription PCR (RT-PCR), Western blot respectively and their relationship with the clinical pathological characteristics was analyzed. **Results:** Expression of ERR α mRNA and protein in breast cancer tissues was higher than that in breast para-carcinoma tissues ($P < 0.05$). Expression of ERR α was correlated with ER, Her-2, degrees of differentiation, tumor size and metastasis of the lymph nodes but was not correlated with patient's age, PR and P53. **Conclusions:** High expression of ERR α may serve as a biomarker of poor prognosis in breast cancer and it may provide new thought for the diagnosis and treatment of breast cancer.

【Key words】estrogen receptor-related receptor α ; breast cancer; immunohistochemistry; reverse transcription-polymerase chain reaction; Western blot

乳腺癌是女性恶性肿瘤中常见的一种, 体内雌激素水平的变化与乳腺癌的发生密切相关。雌激素受体相关受体 (estrogen receptor-related receptor, ERR) 属于核受体超家族, 它与雌激素受体有很高

的序列同源性, 但却不与包括雌激素和雄激素在内的任何经典的类固醇激素结合^[1]。有文献报道 ERR α 的 mRNA 表达于乳腺癌组织中^[2], 但对于 ERR α 在乳腺癌中的生物学意义还不是十分清楚, 本研究旨在初步探讨乳腺癌组织和乳腺癌旁组织中 ERR α mRNA 及蛋白的表达情况及其与乳腺癌病理指标的相关性, 为进一步探索 ERR α 在乳腺癌发生发展中所起的作用及临床病理意义奠定基础。

作者介绍: 李鹏鹏, Email: 2670923611@qq.com,

研究方向: 乳腺癌的基础与临床。

通信作者: 刘胜春, Email: liushengchun1968@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 30871295)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000017.html>

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集本院手术切除经病理确认为乳腺癌及乳腺癌旁组织(距离癌灶边缘 5 cm 以上)标本 87 例(所有标本收集均征得患者同意并签署相关同意书)。患者均为女性,其中年龄 ≤ 40 岁 18 例, >40 岁 69 例。肿瘤直径 <2 cm 41 例, ≥ 2 cm 46 例。中、高分化 30 例,低分化 57 例。腋淋巴结转移(+)37 例,腋淋巴结转移(-)50 例。雌激素受体(estrogen receptor, ER)(+)38 例,雌激素受体(-)49 例。孕激素受体(progesterone receptor, PR)(+)40 例,孕激素受体(-)的有 47 例。P53(+)32 例,P53(-)55 例。人表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor-2, Her-2)(+)16 例,人表皮生长因子受体 2(-)71 例。所有患者术前均未接受放、化疗及激素治疗,新鲜标本分装存放 -80°C 中,以备提取 RNA 和蛋白质。

1.2 主要试剂

兔抗人 ERR α 多克隆一抗购自香港 Abcam 公司,免疫组化试剂盒及 DAB 显色剂、鼠抗人 β -Actin 多克隆抗体、HRP 标记的羊抗兔 IgG 购自北京中杉试剂公司,BCA 蛋白定量试剂盒购自美国 Thermo 公司,ECL 显影液购自碧云天试剂公司,总 RNA 提取试剂 Trizol、反转录试剂盒及 Tap 酶购自 Takara 宝生物工程(大连)有限公司,ERR α 基因和内参 β -actin 基因的特异性引物由上海英俊公司合成。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学 组织于术中切除,经 10%甲醛溶液固定,石蜡包埋切片,常规二甲苯脱蜡,抗原修复,按试剂盒说明书免疫组化 SP-AP 法操作,镜下观察实验结果。结果判断光镜下观察癌细胞胞浆、胞膜及细胞核内是否有清晰的橘黄色或棕黄色颗粒依据文献[3],结果以同样物镜下计数阳性细胞所占百分比表示, $<5\%$ 为阴性, $>5\%$ 为阳性。结果均由 2 名病理科医生在盲法下进行判定。

1.3.2 ERR α mRNA 在乳腺癌组织及癌旁组织中的检测 利用 Premier Primer5 软件设计引物,根据 NCBI 中 ERR α (NM_004451.3)mRNA 序列全长设计引物如下:ERR α 上游:5'-TCGCTGTCTGACCAGATGTC-3',下游 5'-CCTCGAGCA-TCTCCAAGAAC-3',扩增片段大小为 502 bp。 β -actin 上游 5'-ATGGATGATGATGATGATATCGCCGCG-3'下游 5'-CTCCATGTCGTCCCAGTTGGT-3',扩增片段大小为 249 bp。按照试剂盒提供的说明书操作,从组织中提取组织总 RNA。分光光度计测定 RNA 分别在波长 260 nm 和 280 nm 时的紫外光吸光度(absorbance, A)值之比为 1.8~2.0,说明 RNA 纯度较高,无蛋白质污染。取等量 RNA 逆转录为 cDNA 作为 PCR 反应体系模板,采用两步法进行扩增。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min;然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30s,53 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30s,扩增 35 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min 中止反应。扩增产物在 1.5%琼脂糖凝胶中电泳 130 V,25 min,仪器曝光分析结果。用 Quantity one 软件测定 DNA 条带灰度值,以目的条带与 β -

actin 条带灰度值之比作为相对表达水平。

1.3.3 ERR α 蛋白在乳腺癌组织及癌旁组织中的检测 按照试剂盒所提供的说明书操作,取适量组织加入裂解液置于冰上在玻璃匀浆器中研磨,离心后取上清液,二喹啉甲酸蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。取等量蛋白加入上样缓冲液加热变性后进行恒压电泳。湿转法进行转膜。转膜后,将膜浸入 5%牛奶封闭液中 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h,封闭后加入 1:1 000 的 ERR α 抗体,摇床上 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日洗膜后加入 1:2 000 的二抗,室温孵育 1 h,洗膜后加入显色液显色。用 Quantity one 软件测定蛋白条带灰度值,以目的蛋白与 β -actin 的蛋白产物条带灰度值之比作为蛋白相对表达水平。

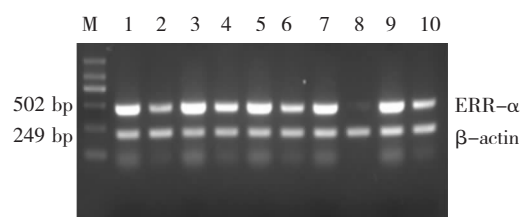
1.4 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理和分析检验,PCR 和 Western blot 数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验,阳性率比较采用卡方检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 ERR α mRNA 在乳腺癌和癌旁组织中的表达

提取组织总 RNA,经逆转录为 cDNA 后进行 PCR,结果显示在乳腺癌组织中 ERR α mRNA 的表达水平较高,高于在乳腺癌旁组织中的表达,根据灰度比较 ERR α mRNA 在乳腺癌组织相对于癌旁组织的表达情况,差异有统计学意义($t=10.186, P=0.001$),见图 1。结合乳腺癌病理指标分析,ERR α mRNA 的表达与 ER($P=0.000$)、Her-2($P=0.011$)的表达相关;而与 PR($P=0.513$)、P53($P=0.779$)无关,见表 1。



M. DNA marker II; 1, 3, 5, 7, 9. 乳腺癌组织;
2, 4, 6, 8, 10. 乳腺癌旁组织

图 1 RT-PCR 检测 ERR α mRNA 在乳腺癌及乳腺癌旁组织中的表达

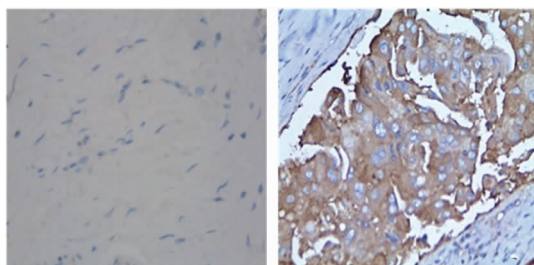
Fig.1 Determination of expression of ERR α mRNA in breast cancer and breast para-carcinoma tissues by RT-PCR

2.2 ERR α 蛋白在乳腺癌和癌旁组织中的表达

2.2.1 免疫组化 免疫组化结果显示,乳腺癌组织中 ERR α 阳性表达于乳腺癌细胞的细胞质中,阳性率为 77.0%(67/87),癌旁组织中 ERR α 阳性表达于癌旁细胞的细胞质中,阳性表达率为 32.8%(21/64),ERR α 在乳腺癌组织中的表达高于在乳腺癌旁组织中的表达,差异有统计学意义($\chi^2=39.111, P=0.006$),见图 2。

2.2.2 Western blot 提取组织总蛋白,经蛋白定量后进行 Western blot 检测。结果显示 ERR α 蛋白在乳腺癌组织中的

表达水平较高,高于癌旁组织中的表达,根据灰度比较 $ERR\alpha$ 蛋白在乳腺癌组织相对于癌旁组织的表达情况,差异有统计学意义 ($t=10.815, P=0.022$),见图 3。结合乳腺癌病理指标分析, $ERR\alpha$ 蛋白的表达与 $ER(P=0.026)$ 、 $Her-2(P=0.024)$ 的表达相关;而与 $PR(P=0.940)$ 、 $P53(P=0.177)$ 无明显关系,见表 1。

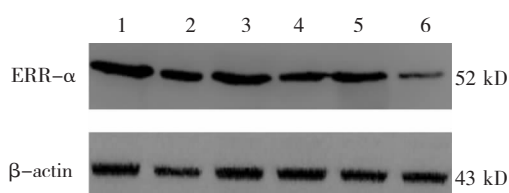


A. 乳腺癌旁组织

B. 乳腺癌组织

图 2 免疫组化法检测 $ERR\alpha$ 在乳腺癌及乳腺癌旁组织中的表达 (400×)

Fig.2 Determination of expression of $ERR\alpha$ protein in breast cancer and breast para-carcinoma tissues by immunohistochemistry (400×)



1、3、5. 乳腺癌组织;2、4、6. 乳腺癌旁组织

图 3 Western blot 检测 $ERR\alpha$ 蛋白在乳腺癌及乳腺癌旁组织中的表达

Fig.3 Determination of expression of $ERR\alpha$ protein in breast cancer and breast para-carcinoma tissues by Western blot

3 讨论

$ERR\alpha$ 是 Giguere 于 1988 年使用雌激素受体的 cDNA 结合域作为一个探针筛选 DNA 重组库得到的首个孤儿核受体^[1]。 $ERR\alpha$ 因其结构和序列与 ER 有很高的同源性,可能与 ER 一样在乳腺癌中表现出一些类似的活性。通过检测 $ERR\alpha$ 活性对依赖 ER 转录调节的乳腺癌细胞 MCF-7 的影响,发现受 $ERR\alpha$

表 1 $ERR\alpha$ mRNA 及蛋白在乳腺癌组织中的表达及其与乳腺癌临床病理特征的相关性 ($\bar{x} \pm s, n=87$)

Tab.1 Expression of $ERR\alpha$ mRNA and protein in breast cancer tissue and their relationship with clinical pathological characteristics of breast cancer ($\bar{x} \pm s, n=87$)

临床资料	例数	$ERR\alpha$ mRNA			$ERR\alpha$ 蛋白		
		转录水平	t 值	P 值	蛋白水平	t 值	P 值
年龄 (岁)							
≤40	18	0.45 ± 0.13	-0.551	0.621	0.48 ± 0.10	1.351	0.180
>40	69	0.48 ± 0.15			0.45 ± 0.10		
肿瘤直径 (cm)							
<2	41	0.38 ± 0.17	-5.349	0.000	0.43 ± 0.08	-2.451	0.016
≥2	46	0.50 ± 0.12			0.48 ± 0.12		
分化程度							
中、高分化	30	0.39 ± 0.11	-3.274	0.002	0.40 ± 0.06	-3.690	0.000
低分化	57	0.47 ± 0.11			0.48 ± 0.11		
腋淋巴结转移							
+	37	0.49 ± 0.09	3.289	0.001	0.49 ± 0.09	2.590	0.011
-	50	0.41 ± 0.11			0.43 ± 0.11		
ER							
+	38	0.38 ± 0.10	-4.721	0.000	0.43 ± 0.07	-2.270	0.026
-	49	0.49 ± 0.10			0.48 ± 0.12		
PR							
+	40	0.45 ± 0.13	0.657	0.513	0.45 ± 0.09	-0.75	0.940
-	47	0.43 ± 0.10			0.46 ± 0.11		
P53							
+	32	0.45 ± 0.12	0.282	0.779	0.48 ± 0.09	1.362	0.177
-	55	0.44 ± 0.11			0.44 ± 0.11		
Her-2							
+	16	0.51 ± 0.12	-4.721	0.000	0.51 ± 0.08	2.297	0.024
-	71	0.43 ± 0.11			0.44 ± 0.10		

和 ER 共同调节的基因只有少数,而 $ERR\alpha$ 调节 ER 介导的生物活性,而且调节受雌激素调节的基因的表达通过以下机制:共同的靶基因,辅调节的蛋白和配体,竞争性结合 ERE(雌激素反应元件)和 ERRE(雌激素受体相关受体反应元件),或者通过蛋白-蛋白相互作用结合到 ER 靶基因的启动子上^[4-5]。ER 与 PR 在多数早期乳腺癌中共同表达,PR 蛋白的丢失将会导致 ER 功能的丢失^[6],因此临床上也将 PR 的表达作为辅助 ER 预测乳腺癌内分泌治疗,而本研究中发现 $ERR\alpha$ 与 ER 的表达呈负相关,未见 $ERR\alpha$ 与 PR 有明显相关性,其具体机制尚不清楚。Her-2 的阳性表达作为乳腺癌辅助治疗的一个靶点, $ERR\alpha$ 通过上调染色体 17q12 区域的转录明显增加 Her-2 的表达,同时竞争性干扰 ER 对 Her-2 表达的抑制作用^[7],这与本研究中发现的 $ERR\alpha$ 与 ER、Her-2 的关系一致。本研究对 87 例乳腺癌组织和癌旁组织中 $ERR\alpha$ 的检测发现,乳腺癌组织中的 $ERR\alpha$ 在 mRNA 和蛋白水平表达上都高于癌旁乳腺组织,差异有统计学意义,进一步与乳腺癌临床病理特征分析显示, $ERR\alpha$ 的表达与 Her-2、乳腺癌的病理分级,肿瘤大小,淋巴结转移呈正相关,与 ER 呈负相关,而与患者的年龄、PR、P53 等无明显相关性。Chang 等^[8]为了评价 ERR 的临床意义,发现含有越高 $ERR\alpha$ 活性的乳腺癌患者其无病生存时间越短。另外,对 $ERR\alpha$ 研究中还发现, $ERR\alpha$ 通过与血管内皮生成因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)基因启动子上的 $ERR\alpha$ 反应元件结合,引起 VEGF 在各种乳腺癌细胞系中 mRNA 和蛋白水平上表达增加^[9]。由此可推测 $ERR\alpha$ 通过各种途径促进肿瘤的发生发展,目前多数文献显示,ER 是判断乳腺癌预后的一项重要指标,ER(+)的患者预后明显优于 ER(-)的患者。然而,ER 对判断乳腺癌患者的预后仍具有一定的局限性。 $ERR\alpha$ 的出现对应用 ER 判断乳腺癌预后是一个较好的补充。

针对雌激素受体和调节 17 β 雌二醇和其他雌激素产生的治疗,对 ER(+)乳腺癌患者是十分有效的^[10]。然而对于 ER(-)的乳腺癌患者,内分泌治疗却是无效的,有文献报道 $ERR\alpha$ 拮抗剂能够抑制 ER(+)MCF-7、T47D 和 ER(-)BT-20、MDA-MD-231 乳腺癌细胞的增殖,敲除 $ERR\alpha$ 的表达能够明显降低

乳腺癌细胞、前列腺癌细胞、结肠癌细胞的迁移能力^[11-12]。因此,深入研究 $ERR\alpha$ 在乳腺癌中的发病机制,将对未来乳腺癌的预防、诊断、治疗提供新的策略。

参 考 文 献

- [1] Giguère V, Yang N, Segui P, et al. Identification of a new class of steroid hormone receptors[J]. *Nature*, 1988, 331(6151): 91-94.
- [2] Jarzabek K, Koda M, Kozlowski L, et al. The significance of the expression of $ERR\alpha$ as a potential biomarker in breast cancer[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2009, 113(1-2): 127-133.
- [3] Li W, Liu M, Feng Y, et al. Evaluation of Argonaute protein as a predictive marker for human clear cell renal cell carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(6): 1086-1094.
- [4] Stein RA, Chang CY, Kazmin DA, et al. Estrogen-related receptor alpha is critical for the growth of estrogen receptor-negative breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(21): 8805-8812.
- [5] Daniel AR, Hagan CR, Lange CA. Progesterone receptor action: defining a role in breast cancer[J]. *Expert Rev Endocrinol Metab*, 2011, 6(3): 359-369.
- [6] Jarzabek K, Koda M, Kozlowski L, et al. The significance of the expression of $ERR\alpha$ as a potential biomarker in breast cancer[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2009, 113(1-2): 127-133.
- [7] Deblois G, Chahrouh G, Perry MC, et al. Transcriptional control of the ERBB2 amplicon by $ERR\alpha$ and PGC-1 beta promotes mammary gland tumorigenesis[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(24): 10277-10287.
- [8] Chang CY, Kazmin D, Jasper JS, et al. The metabolic regulator $ERR\alpha$, a downstream target of HER2/IGF-1R, as a therapeutic target in breast cancer[J]. *Cancer Cell*, 2011, 20(4): 500-510.
- [9] Stein RA, Gaillard S, McDonnell DP. Estrogen-related receptor alpha induces the expression of vascular endothelial growth factor in breast cancer cells[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2009, 114(1-2): 106-112.
- [10] Chang CY, McDonnell DP. Molecular pathways: the metabolic regulator estrogen-related receptor α as a therapeutic target in cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(22): 6089-6095.
- [11] Chisamore MJ, Wilkinson HA, Flores O, et al. Estrogen-related receptor antagonist inhibits both estrogen receptor-positive and estrogen receptor-negative breast tumor growth in mouse xeno-grafts[J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(3): 672-681.
- [12] Dwyer MA, Joseph JD, Wade HE, et al. WNT11 expression is induced by estrogen-related receptor alpha and beta-catenin and acts in an autocrine manner to increase cancer cell migration[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(22): 9298-9308.

(责任编辑:唐宗顺)