

临床研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000287

β -TrCP 在乳腺癌组织中的表达及其对患者预后的影响

杨庄青¹, 刘德权¹, 李梅², 王茂华¹

(昆明医科大学第三附属医院、云南省肿瘤医院 1. 乳腺科; 2. 病理科, 昆明 650118)

【摘要】目的:探讨 β -TrCP 蛋白在乳腺癌组织中的表达及其对患者预后的影响。**方法:**采用免疫组化 SP 法检测 56 例乳腺癌及对应癌旁组织中 β -TrCP 蛋白表达情况, 分析其表达与乳腺癌患者预后的关系。**结果:** β -TrCP 蛋白在乳腺癌组织中的阳性率为 71.4%(40/56), 在对应癌旁组织中的阳性率为 14.3%(8/56), 差异具有统计学意义($\chi^2=37.333, P=0.000$); β -TrCP 蛋白在乳腺癌组织中的阳性表达与雌激素受体阳性($P=0.002$)、孕激素受体阳性($P=0.004$)、淋巴结转移($P=0.007$)和 TNM 分期($P=0.004$)有关; β -TrCP 阴性表达患者 5 年生存率 100%(16/16), β -TrCP 阳性表达患者 5 年生存率 72.5%(29/40), 95%CI=0.559~0.837。log-rank 检验差异有统计学意义($P=0.015$)。Cox 多因素分析提示 β -TrCP 蛋白在乳腺癌组织中的阳性表达是乳腺癌患者预后不良的独立影响因素($RR=0.287, 95\%CI=0.120\sim0.683, P=0.005$)。**结论:** β -TrCP 蛋白在乳腺癌组织中的表达异常升高, 且与乳腺癌患者不良预后相关, 提示 β -TrCP 蛋白在乳腺癌发生发展中可能发挥重要作用。

【关键词】 β -TrCP; E3 泛素连接酶; 乳腺癌; 临床意义; 预后

【中图分类号】R736.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-012-31

Expression of β -TrCP in breast cancer tissues and its effect on prognosis of patients with breast cancer

Yang Zhuangqing¹, Liu Dequan¹, Li Mei², Wang Maohua¹

(1. Department of Galactophore; 2. Department of Pathology, Cancer Hospital of Yunnan Province; the Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the expression of β -TrCP in breast cancer tissues and its effect on prognosis of patients with breast cancer. **Methods:** β -TrCP expression in 56 samples of breast cancer and normal tissues and the corresponding samples of tumor-adjacent tissues were detected by immunohistochemistry. The correlation between β -TrCP expression and prognosis was analyzed. **Results:** The expression of β -TrCP in breast cancer tissues was significantly up-regulated compared with that of the normal tumor-adjacent tissues($\chi^2=37.333, P=0.000$). Clinicopathological evaluation suggested that β -TrCP positive expression was associated with ER positive($P=0.002$), PR positive($P=0.004$), lymph node metastasis($P=0.007$) and TNM stage($P=0.004$). Five-year survival rate was 100%(16/16) in patients with negative expression of β -TrCP and was 72.5%(29/40) in patients with positive expression of β -TrCP (95%CI=0.559 to 0.837). Results of log-rank test of statistical significance($P=0.015$). Multivariate Cox regression analysis revealed that β -TrCP positive expression was an independent factor for predicting poor prognosis in breast cancer($P=0.005, RR=0.287, 95\%CI=0.120\sim0.683$). **Conclusion:** High-expression of β -TrCP is correlated with the poor prognosis in breast cancer, suggesting β -TrCP may play a key role in development and progression of breast cancer.

【Key words】 β -TrCP; E3 ubiquitin ligase; breast cancer; clinical significance; prognosis

乳腺癌是最常见危害女性健康的恶性肿瘤之一, 近年来其发病率呈现明显上升及年轻化的趋势, 已跃居城市女性恶性肿瘤的首位^[1-2]。 β -Transducin repeat-containing proteins(β -TrCP)作为 E3 泛素连接酶复合体中底物识别组分, 在控制细胞周期

和信号转导重要调节因子的稳定性中发挥关键作用。 β -TrCP 功能十分重要, 因为其诱导核因子 κB (nuclear factor κB , NF- κB) 转录活性, NF- κB 在肿瘤细胞增殖和存活中发挥关键作用, 其在人乳腺癌组织中常表达上调^[3]。许多研究表明 β -TrCP 过表达促进多种恶性肿瘤进展, 在结肠癌、肝母细胞瘤、胰腺癌和黑色素瘤中发现 β -TrCP 过表达^[4]。Kudo 等在小鼠乳腺上皮细胞中过表达外源性 β -TrCP 导致细

作者介绍: 杨庄青, Email: YZ_0912@163.com,

研究方向: 乳腺肿瘤。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000287.html>

胞增殖显著增加,另外 38%的 β -TrCP 过表达转基因小鼠产生了不同肿瘤,包括乳腺、卵巢和子宫肿瘤^[5-6]。但 β -TrCP 在人乳腺癌组织中的表达及其对患者预后的影响目前研究尚少,本研究采用免疫组织化学染色技术检测 β -TrCP 蛋白在乳腺癌及对应癌旁组织中的表达情况,分析其与乳腺癌临床病理参数的关系,并进一步探讨 β -TrCP 蛋白对乳腺癌患者预后的影响,为临床提供具有潜在应用价值的分子标记和治疗新靶点。

1 资料与方法

1.1 临床资料

资料及来源:收集本院病理科 2004 年 1 月至 2006 年 12 月间行手术切除、经病理确诊及常规相关免疫组化染色,且有 5 年以上完整随访资料的 56 例乳腺浸润性导管癌及对应癌旁组织(距肿瘤边缘大于 3 cm),均为女性,年龄 25~73 (51.0 ± 3.7) 岁。

分期及概况:根据 TNM 分期(AJCC 2003 年)进行临床分期: I + II 期 36 例, III + IV 期 20 例;参照 Elston 和 Ellis 改良的 Scarff-Bloom-Richardson 定量组织学分级法进行病理分级: I 级 8 例, II 级 20 例, III 级 28 例;其中存在淋巴结转移 30 例,无淋巴结转移 26 例。雌激素受体(estrogen receptor, ER)阳性 38 例,阴性 18;孕激素受体(progesterone receptor, PR)阳性 34 例,阴性 22;人表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor 2, HER-2)阳性 8 例,阴性 48 例。

1.2 免疫组织化学染色

实验方法:兔抗人 β -TrCP 多克隆抗体(sc-15354)购自美国 Santa Cruz 公司;免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。对石蜡块进行 4 μ m 连续切片,经过二甲苯脱蜡和酒精梯度水化后,抗原修复液(枸橼酸+枸橼酸钠)进行热抗原修复,3% H_2O_2 孵育 15 min 灭活内源性过氧化物酶,10%山羊血清室温封闭 30 min,将以 1:100 比例稀释的 β -TrCP 抗体加于标本后,4 $^{\circ}C$ 孵育过夜。PBS 冲洗 3 min $\times$ 3 次,滴加生物素标记的山羊抗兔二抗工作液,室温孵育 30 min。PBS 冲洗 3 min $\times$ 3 次,滴加 HRP 标记的链霉卵白素工作液,室温孵育 30 min。DAB 显色,苏木精轻度复染,1%盐酸酒精分化,稀氨水反蓝,酒精和二甲苯梯度脱水至透明,中性树脂胶封片。显微镜下观察、成像系统拍照,统计分析实验结果。

评价标准:用染色强度联合阳性细胞百分比进行评分:染色强度分为 4 等级:阴性=0 分;弱阳性=1 分;中度=2 分;强阳性=3 分;阳性细胞百分比分 5 等级: $\leq 5\%$ =0 分;6%~25%=1 分;26%~50%=2 分;51%~75%=3 分;75%~100%=4 分,染色强度和阳性细胞百分比评分相乘 ≥ 1 分则认为 β -TrCP 蛋白阳性表达^[7]。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,采用卡方检验检测 β -TrCP 蛋白的表达和临床病理参数之间的相关性,生存率

分析采用 Kaplan-Meier Log Rank 检验,将有意义的临床病理因素采用 Cox 回归模型行多因素分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 乳腺癌及对应癌旁组织中 β -TrCP 蛋白的表达

β -TrCP 蛋白在乳腺癌组织中的阳性率为 71.4% (40/56),在对应癌旁组织中的阳性率为 14.3% (8/56),差异具有统计学意义($\chi^2=37.333, P=0.000$)。 β -TrCP 蛋白表达主要定位于胞浆和胞膜(图 1)。

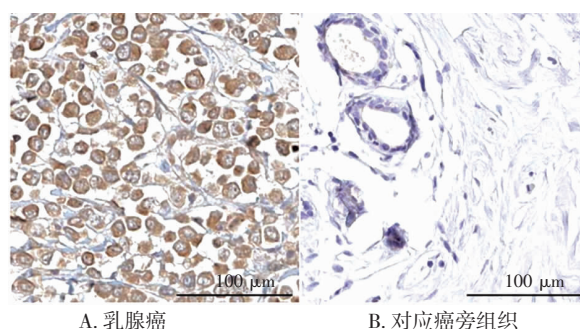


图 1 β -TrCP 蛋白的免疫组化染色 (SP, 400 $\times$, 标尺: 100 μ m)

Fig.1 Immunohistochemical staining of β -TrCP (SP, 400 $\times$, scale bar: 100 μ m)

2.2 β -TrCP 蛋白表达与乳腺癌临床病理参数的关系

统计学分析显示 β -TrCP 蛋白在乳腺癌组织中的阳性表达与 ER 阳性($\chi^2=9.464, P=0.002$)、PR 阳性($\chi^2=8.153, P=0.004$)、淋巴结转移($\chi^2=7.352, P=0.007$)和 TNM 分期($\chi^2=8.470, P=0.004$)有关(表 1)。

表 1 β -TrCP 蛋白表达与乳腺癌临床病理参数的相关性($n=56$)

临床特征	类别	例数 (n)	β -TrCP 表达		χ^2 值	P 值
			阳性	阴性		
年龄(岁)	≤ 50	30	22	8	0.115	0.735
	>50	26	18	8		
肿瘤大小(cm)	≤ 2	18	12	6	0.295	0.587
	>2	38	28	10		
ER	阳性	38	32	6	9.464	0.002
	阴性	18	8	10		
PR	阳性	34	29	5	8.153	0.004
	阴性	22	11	11		
HER-2	阳性	8	5	3	0.033	0.856
	阴性	48	35	13		
病理分级	I + II 级	28	23	5	3.150	0.076
	III 级	28	17	11		
淋巴结转移	无	26	14	12	7.352	0.007
	有	30	26	4		
肿瘤分期	I + II 期	36	21	15	8.470	0.004
	III + IV 期	20	19	1		

表 2 乳腺癌患者预后多因素分析

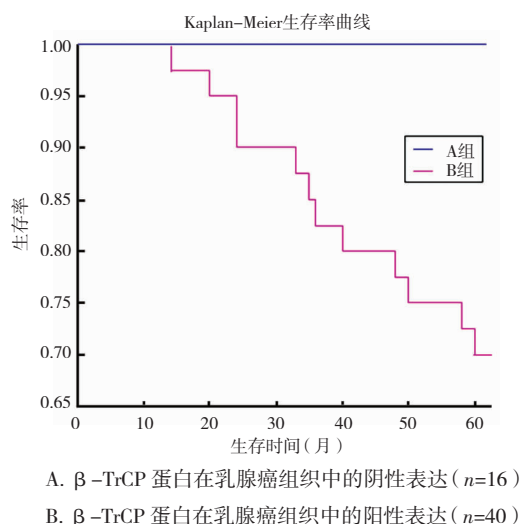
Tab.2 Multivariate Cox regression analysis of prognosis of patients with breast cancer

因素	回归系数	标准误差	Wald χ^2	P 值	RR	95%CI	
淋巴结转移	0.917	0.447	4.208	0.040	2.502	1.042	6.008
β -TrCP 蛋白表达	-1.250	0.443	7.962	0.005	0.287	0.120	0.683
TNM 分期	1.038	0.421	6.079	0.014	2.824	1.237	6.444

2.3 β -TrCP 蛋白表达与乳腺癌患者预后的相关性

56 例患者全部获得 5 年随访,其中累计 11 例死于肿瘤进展或复发,术后 5 年生存率为 80.4% (11/56)。Kaplan-Meier 生存分析显示, β -TrCP 阴性表达患者 5 年生存率 100% (16/16), β -TrCP 阳性表达患者 5 年生存率 72.5% (29/40), 95%CI=0.559~0.837。

经 Log-Rank 检验,差异具有统计学意义 ($\chi^2=5.925$, $P=0.015$,图 2)。将上述临床病理参数纳入 COX 模型进行多因素回归分析,得出 β -TrCP 蛋白表达、TNM 分期以及淋巴结转移 3 个因素是与乳腺癌患者预后相关的独立因素 ($P<0.05$, 表 2)。

图 2 β -TrCP 蛋白阴性表达和阳性表达的生存曲线Fig.2 Survival curve of β -TrCP protein's positive and negative expression

3 讨论

蛋白与泛素(泛素化)和泛素样蛋白的结合已经成为调控肿瘤细胞生长和存活的一种重要机制,已有研究表明调节蛋白的异常泛素化促进细胞转化和肿瘤进展,因此这可能作为抗肿瘤治疗的潜在靶点^[8]。蛋白酶体降解抑制剂 Velcade(bortezomib)可以有效抑制多发性骨髓瘤,而其作为药物治疗其他恶性血液病的疗效正在开展临床试验评估^[9]。蛋白酶体抑制剂抗癌的主要机制是通过稳定 NF- κ B 抑

制因子 I κ B,从而抑制 NF- κ B 的功能^[9]。I κ B 蛋白酶解需要 β -TrCP 介导的磷酸化依赖的泛素化作用,进而 NF- κ B 活化促进多方面肿瘤进展,包括加速细胞周期进展、细胞增殖、肿瘤发生和发展、血管发生和转移等^[10]。作为一个主要的抗凋亡因子,其在肿瘤抵抗放疗和化疗作用中发挥关键作用,NF- κ B 持续活化是包括乳腺癌在内的多种人类恶性肿瘤的标志^[11]。 β -TrCP 有 2 个亚型 β -TrCP1 和 β -TrCP2,在人乳腺癌细胞系和原发肿瘤组织中 β -TrCP2 表达升高,乳腺 β -TrCP1 敲除小鼠出现发育不全^[12],相反,表达人 β -TrCP1 的转基因小鼠出现乳腺上皮细胞增生过度、NF- κ B p65/RelA 核内蓄积和乳腺肿瘤发生^[13],提示 β -TrCP 在调控乳腺细胞生长和存活以及乳腺癌发生发展中发挥重要作用。本研究中通过免疫组化染色技术发现乳腺癌组织中 β -TrCP 阳性表达率明显高于对应的癌旁组织,进一步临床病理参数分析发现在 ER/PR 阳性、高 TNM 分期和淋巴结转移的乳腺癌组织中 β -TrCP 阳性表达率显著升高,以上结果与之前 β -TrCP 与乳腺癌的相关研究结论一致^[14],提示乳腺癌中 β -TrCP 发挥一定作用。

有关 β -TrCP 表达与肿瘤患者预后相关性的研究尚少,本研究通过随访和统计学分析发现 β -TrCP 蛋白阴性表达患者的 5 年生存率较 β -TrCP 蛋白阳性表达患者显著升高,多因素分析提示 β -TrCP 蛋白是一个独立的乳腺癌患者预后因素。综上所述, β -TrCP 在乳腺癌组织中的表达异常升高,且与 ER/PR 阳性、淋巴结转移和 TNM 分期有关, β -TrCP 蛋白阴性表达患者具有较好 5 年生存率,且 β -TrCP 蛋白阳性表达是乳腺癌患者预后不良的独立影响因素,提示其可能成为具有潜在应用价值的分子标记和治疗新靶点。

参 考 文 献

- [1] 刘春富,董琦,纪艳超,等.乳腺癌组织中 Survivin 表达及其与预后的关系[J].临床与实验病理学杂志,2009,25(3):267-269.
- [2] 宫惠琳,张锁平,张冠军,等.Survivin、MMP-2 在乳腺癌中的表达及其相关性研究[J].重庆医科大学学报,2012,37(2):106-109.