

BRCA-1 与 IGF-1R 在 CerbB-2 高表达乳腺癌组织中的表达及意义

周莉莉¹,唐咸艳²,李志革³,王 红¹

(1. 北京丰台医院,北京 100070;2. 广西医科大学公共卫生学院,广西 南宁 530000;3. 广西医科大学附属肿瘤医院,广西 南宁 530000)

摘 要:[目的] 探讨 BRCA-1 和 IGF-1R 在 CerbB-2 高表达乳腺癌组织中的表达及临床意义。[方法] 应用免疫组织化学 SP 法检测 BRCA-1 和 IGF-1R 在 29 例 CerbB-2 高表达的乳腺癌组织、20 例 CerbB-2 低表达的乳腺癌组织和 10 例乳腺增生症组织中的表达情况。[结果] 在 CerbB-2 高表达的乳腺癌中, BRCA-1 表达与组织学分级、腋窝淋巴结转移、术后复发转移密切相关 ($P<0.05$), 与患者年龄、肿瘤大小、雌激素及孕激素受体状况无关 ($P>0.05$); IGF-1R 表达与患者年龄、肿瘤大小、组织学分级、腋窝淋巴结转移、术后复发及雌激素与孕激素受体状况无关 ($P>0.05$)。Kaplan-Meier 生存分析结果表明 BRCA-1 和 IGF-1R 的表达与总生存期均无明显相关 ($P>0.05$)。[结论] 乳腺上皮中 BRCA-1 蛋白的表达减少与缺失和 IGF-1R 的表达增加与 CerbB-2 高表达的乳腺癌的发生和发展密切关系, 两者有望成为代替或协助 CerbB-2 判断乳腺癌恶性程度、预后及指导治疗的生物学新指标。

关键词: 乳腺癌; BRCA-1; IGF-1R; 免疫组织化学; 预后

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2015)11-0961-05

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2015.11.A015

Expression of BRCA-1 and IGF-1R in Breast Cancer with High CerbB-2 Expression and Its Clinical Significance

ZHOU Li-li¹, TANG Xian-yan², LI Zhi-ge³, et al.

(1. Beijing Fengtai Hospital, Beijing 100070, China; 2. Guangxi Medical University, Nanning 530000, China; 3. The Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of BRCA-1 and IGF-1R in breast cancer with high CerbB-2 expression and its clinical significance. [Methods] The expression of BRCA-1 and IGF-1R in 29 breast cancer tissue with high expression CerbB-2, 20 breast cancer tissue with lower CerbB-2 expression and 10 cases with hyperplasia of mammary gland was detected by immunohistochemistry SP method. [Results] In 29 cases of CerbB-2 high expression in breast cancer tissue, the cases of lower expression and missing of BRCA-1 was increased significantly ($P>0.05$); The positive expression rate of IGF-1R in breast cancer of CerbB-2 high expression was significantly higher than that in breast cancer of cerbB-2 lower expression and hyperplasia of mammary gland tissue. In breast cancer tissue of CerbB-2 high expression, the expression of BRCA-1 was significantly related to the histological grade, axillary lymph node metastasis and the postoperative recurrence metastasis ($P<0.05$), but not related to age of patients, size of tumor, ER or PR ($P>0.05$). The expression of IGF-1R was not correlated with age of patients, size of tumor, histological grade, axillary lymph node metastasis, recurrence of tumor, ER or PR ($P>0.05$). Kaplan-Meier survival analysis result showed that the expression of BRCA-1 and IGF-1R was not associated with overall survival ($P>0.05$). [Conclusion] The lower expression or absent of BRCA-1 and overexpression of IGF-1R in mammary gland epithelial were significantly related to the generation and development of the breast cancer of CerbB-2 high expression. They could become new biological parameters which can replace or assist CerbB-2 judging the malignant extent, prognosis of breast cancer and guiding the treatment.

Key words: breast cancer; BRCA-1; IGF-1R; immunohistochemistry; prognosis

乳腺癌易感基因 *BRCA-1* 是一种与家族性乳腺

癌密切相关的抑癌基因, 其与遗传性和散发性乳腺癌的关系已被越来越多的研究所证实。胰岛素样生长因子-1 受体 (IGF-1R) 作为酪氨酸蛋白激酶类受体

收稿日期: 2015-08-11; 修回日期: 2015-08-28

E-mail: liangli800@126.com

家族的主要成员之一,是目前临床乳腺癌诊断和判断预后的一个重要指标。CerbB-2是目前备受重视的癌基因之一,其在乳腺癌组织中的高表达与乳腺癌患者生存期短、复发转移密切相关,是乳腺癌预后差的独立指标。目前有关BRCA-1和IGF-1R在CerbB-2高表达乳腺癌组织中的研究尚少见,本实验采用免疫组化技术检测两者在不同CerbB-2表达的乳腺癌组织、以及乳腺增生症组织中的表达情况,探讨两者在乳腺癌侵袭和转移等生物学行为中的作用,为其在临床上的应用提供更好的指导。

1 资料与方法

1.1 材料来源

收集1998年7月至2007年7月CerbB-2高表达(++~+++)的女性乳腺癌石蜡包埋组织块29例,术前均未进行任何抗癌治疗,年龄28~62岁,中位年龄50岁;肿块直径 $\leq 5\text{cm}$ 25例, $>5\text{cm}$ 4例;根据WHO分类标准进行组织学分级:I~II级19例,III级10例;腋窝淋巴结转移20例;远处转移(肝脏,骨骼,脑组织)21例;随访至2007年7月,21例健在,8例死亡。另选择同期CerbB-2低表达(-~+)的女性乳腺癌石蜡包埋组织块20例,以及乳腺增生症石蜡包埋组织块10例作为对照。所有标本均经10%中性福尔马林固定,石蜡包埋4 μm 切片,HE和免疫组化染色。

1.2 方法

免疫组织化学检查采用SP两步法。鼠抗人

BRCA-1单克隆抗体购自Thermo Scientific 生物科技公司;鼠抗人IGF-1R单克隆抗体(浓缩型)购自武汉博士德公司;即用型快捷免疫组化MaxvisionTM鼠/兔-HRP广谱检测试剂盒与DAB显色试剂盒均购自福州迈新生物技术科技公司。整个过程按试剂盒说明书进行。每批染色均设已知阳性切片作阳性对照,用磷酸盐缓冲液(phosphatic buffered saline, PBS)代替一抗作阴性对照。

1.3 结果判断

BRCA-1阳性表达以细胞核出现清晰棕褐色颗粒为准(Figure 1),IGF-1R阳性表达以细胞浆出现清晰棕褐色颗粒为准(Figure 2)。由两位医师采用双盲法分别在10倍和40倍视野下观察每张切片。判断阳性反应根据以下两个方面^[1]:①按切片中显色癌细胞数比例计分(A):0分为无癌细胞显色;1分为显色癌细胞占癌细胞总数 $<25\%$;2分为显色细胞超过切片中癌细胞总数的25%但小于50%;3分为显色细胞超过切片中细胞总数的50%。②按切片中癌细胞显色强度计分(B):0分为细胞无显色;1分为呈浅黄色(弱染色);2分为呈棕黄色(中等染色);3分为呈棕褐色(强染色)。A+B ≥ 2 分记为阳性, <2 分记为阴性。其中BRCA-1表达++~+++作为强阳性,+作为弱阳性。IGF-1R表达++~+++作为阳性,-~+作为阴性。

1.4 统计学处理

数据分析采用SPSS13.0软件进行卡方检验、Spearman等级相关性分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

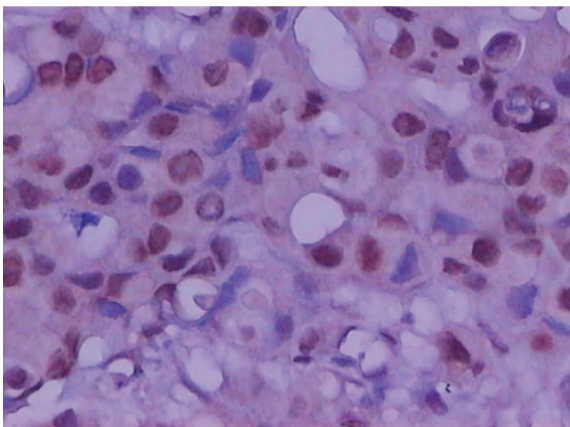


Figure 1 The positive expression of BRCA-1 in breast cancer of CerbB-2 high expression (10 $\times$ 40)

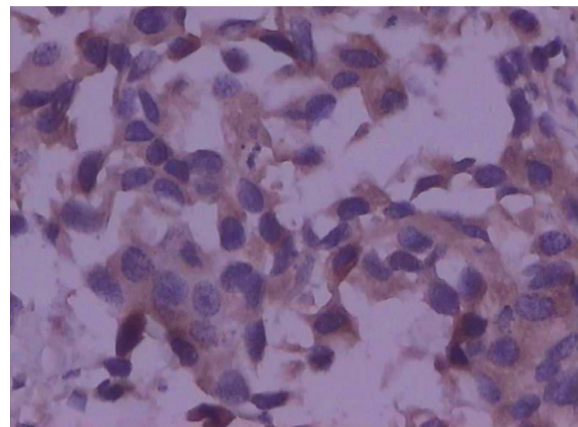


Figure 2 The positive expression of IGF-1R in breast cancer of CerbB-2 high expression (10 $\times$ 40)

2 结果

2.1 不同 CerbB-2 表达者乳腺癌组织中 BRCA-1 和 IGF-1R 蛋白表达

BRCA-1 在 CerbB-2 高表达的乳腺癌组织、CerbB-2 低表达的乳腺癌组织和乳腺增生症组织中的阳性表达率分别为 72%(21/29), 45%(9/20)和 10%(1/10), 三组间差异有统计学意义 ($\chi^2=18.020, P=0.006$)。在 CerbB-2 高表达的乳腺癌组织中 BRCA-1 的强阳性率为 41%(12/29), 在 CerbB-2 低表达的乳腺癌组织中 BRCA-1 的强阳性率为 25%(5/20), 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。IGF-1R 在三组中的阳性表达率分别为 86%(25/29), 65%(13/20)和 50%(5/10), 三组间差异有统计学意义 ($\chi^2=7.631, P=0.022$) (Table 1)。

2.2 BRCA-1和 IGF-1R 蛋白表达与 CerbB-2 高表达的乳腺癌临床病理特征的关系

在 CerbB-2 高表达的乳腺癌中 BRCA-1 表达在不同组织学分级、腋窝淋巴结转移、远处转移等分组间比较均有显著性差异 ($P<0.05$), 而在不同年龄、肿瘤大小、雌激素受体及孕激素受体组间比较无显著性差异 ($P>0.05$); IGF-1R 表达在不同年龄、肿瘤大小、组织学分级、腋窝淋巴结转移、术后复发及雌激素与孕激素受体等组间比较无显著性差异 ($P>0.05$) (Table 2)。

2.3 BRCA-1 和 IGF-1R 蛋白表达与生存期的关系

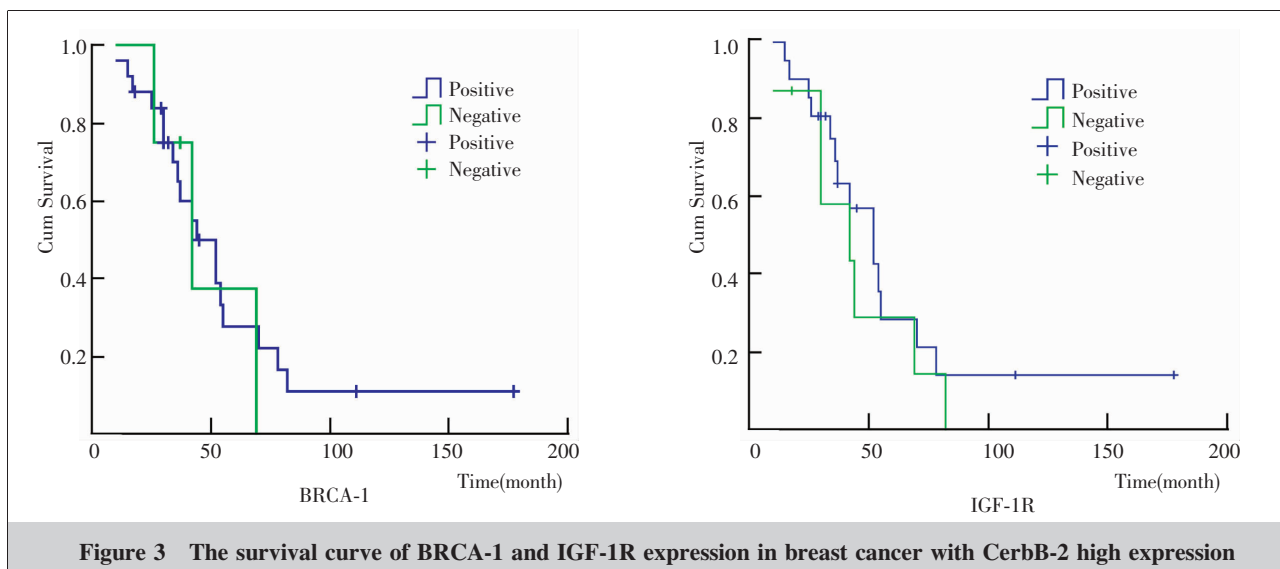
Kaplan-Meier 生存分析结果显示, BRCA-1 和 IGF-1R 表达与 CerbB-2 高表达乳腺癌患者的总生存期均无明显相关 ($P>0.05$) (Figure 3)。

Table 1 The expression of BRCA-1 and IGF-1R in breast cancer tissue of CerbB-2 high expression, CerbB-2 lower expression and hyperplasia of mammary gland tissue

Tissue type	N	BRCA-1						IGF-1R					
		-	+	++	+++	positive rate(%)	χ^2	P	- ~ +	++ ~ +++	positive rate(%)	χ^2	P
CerbB-2 high expression	29	8	9	11	1	72			4	25	86		
CerbB-2 low expression	20	11	4	2	3	45	18.020	0.006	7	13	65	7.631	0.022
Hyperplasia	10	9	1	0	0	10			5	5	50		

Table 2 The relationship between expressions of BRCA-1 and IGF-1R and the clinical pathological factors in breast cancer tissue with CerbB-2 high expression

Clinical pathological factors	N	BRCA-1				IGF-1R			
		Positive No.	Positive rate(%)	χ^2	P	Positive No.	Positive rate(%)	χ^2	P
Age(years)									
≤50	14	11	79	0.514	0.474	12	86	0.006	0.941
>50	15	10	67			13	87		
Histologic classification									
I ~ II	19	17	89	8.028	0.005	17	89	0.495	0.482
III	10	4	40			8	80		
Tumor size(cm)									
≤5	25	19	76	1.167	0.28	22	88	0.49	0.484
>5	4	2	50			3	75		
ALNM									
Positive	20	12	60	4.971	0.026	16	80	2.088	0.148
Negative	9	9	100			9	100		
Distant metastasis									
Yes	21	13	62	4.209	0.04	18	86	0.016	0.901
No	8	8	100			7	88		
ER									
Positive	14	12	86	2.397	0.122	12	86	0.006	0.941
Negative	15	9	60			13	87		
PR									
Positive	19	14	74	0.045	0.833	16	16	0.185	0.667
Negative	10	7	70			9	90		



3 讨论

BRCA1 是在 1994 年首次克隆到的一种人乳腺癌易感基因,其基因产物是由 1863 个氨基酸残基组成的蛋白质^[1],其 N 末端具有 C3H4 的锌指结构,C-末端为酸性区域,提示 *BRCA1* 基因是一个肿瘤抑制基因,一种 DNA 结合蛋白,BRCA1 突变与乳腺癌的发生密切相关。大量研究表明 BRCA1 直接参与 DNA 的修复,BRCA1 作为 E3 多肽连接酶影响 DNA 修复、转录调节、细胞周期进程和减数分裂的性染色体失活等功能,对调节细胞增殖和代谢具有重要作用^[2]。一项研究^[3]已证实 *BRCA* 基因突变的女性面临患癌症的高风险,在突变的评估中,患乳腺癌的风险可达到 41%~90%。Yoshikawa 等^[4]研究发现在正常乳腺上皮细胞中 BRCA1 蛋白高水平表达,在 108 例散发性乳腺癌组织中表达有各种程度的减少。突尼斯的一项研究表明,罹患早期家族性乳腺癌的人群中,具有明确的 BRCA 突变谱^[5]。另一组研究发现,散发性乳腺癌 BRCA1 阳性表达率为 66%,其中 34% 表达显著性减少,BRCA1 阴性表达与阳性表达患者相比其生存率明显降低。一项针对 35 岁及以下乳腺癌 194 例的研究表明,17% 患者具有 BRCA1 突变,通过回归模型分析,BRCA1 减少与一些临床变量,如淋巴结转移等潜在高恶性有着紧密的联系^[6]。同样, Marcus 等^[7]的研究发现,在散发乳腺癌中 BRCA1 表达减少,而且 BRCA1 减少与潜在高恶性,包括低分化和腋窝淋巴结转移有显著性关系。

我们的研究显示,在 *CerbB-2* 高表达的乳腺癌中,BRCA-1 突变同样明显地增加。BRCA-1 表达与患者的组织学分级、腋窝淋巴结转移以及远处转移明显相关($P<0.05$),而与患者年龄、肿瘤大小、雌激素受体及孕激素受体等因素无明显相关。这些结果均提示 BRCA1 蛋白表达缺失与 *CerbB-2* 高表达乳腺癌的浸润性生物学行为及不良预后有关。但由于本实验例数相对偏少,这些阴性结果还有待于进一步证实。*CerbB-2* 与肿瘤发生发展密切相关,是目前倍受重视的癌基因之一。*CerbB-2* 在乳腺癌组织中过表达与乳腺癌患者生存期短、易复发转移有关,是目前乳腺癌独立的预后指标。BRCA1 与 *CerbB-2* 共同定位于人染色体 17q21 上,对细胞增殖和分化起着重要作用。本实验结果提示了 *CerbB-2* 高表达的乳腺癌患者 BRCA1 表达明显降低。因此,测定 BRCA1 可作为乳腺癌诊断和预后判断的指标,但有关两者表达相关的机制还不清楚,BRCA1 能否替代 *CerbB-2* 作为独立指标尚有待于进一步研究。

IGF-1R 是一种跨膜的酪氨酸蛋白受体,由胞外的 α 亚单位和跨膜的 β 亚单位构成。 α 亚单位和 β 亚单位通过二硫键形成一个半受体,它与另一个半受体构成一个完整受体。 α 亚单位是 IGF 结合亚单位,可与 3 种不同配体相结合,按亲和力的大小依次为 IGF-1、IGF-2、胰岛素。 β 亚单位具有内在酪氨酸激酶活性,能通过亚单位酪氨酸残基的迅速自身磷酸化而活化。实验研究表明:IGF-1R 是细胞体内生长所必需的,具有促细胞分裂和增殖的作用。正常生

理水平的 IGF-1R 对体内外细胞转化的表型的维持具有重要作用。一项流行病学研究显示 IGF-1 水平与实体瘤的发展有着密切的联系,如乳腺癌、结肠癌等。这项研究讨论了 IGF-1 信号系统在人类肿瘤中的作用,并提出了以 IGF-1R 为靶点的主要策略^[8]。EGFR 是三阴性乳腺癌细胞的一个重要诊断标记,Shin 等^[9]通过一项研究发现,在 EGFR 低表达的三阴性乳腺癌中,胰岛素刺激能够通过调节与 IGF-1R 的相互作用而诱发 EGFR 的反式激活。另一个系统性的研究显示 IGF-1 系统及其受体在乳腺癌的发生、进展和转移中具有重要的作用^[10]。在早期乳腺癌患者的研究中,IGF-1R 可作为预后指标;并且在乳腺癌不同的亚型中,IGF-1R 对于不同的预测作用有着不同的表达^[11]。Pavelic 等^[12]发现,采用反义核酸技术阻断 IGF-1R 的活性,可抑制癌细胞增殖。最近的一项研究报道^[13]明确地指出,IGF-1R 在乳腺癌组织中的过表达与 CerbB-2 阳性和 DFS 的减少有着很大的关系。

本实验利用免疫组化的方法对 CerbB-2 高表达、CerbB-2 低表达的乳腺癌组织和乳腺增生组织进行分析研究,结果发现 IGF-1R 在三者中均有不同程度的表达,CerbB-2 高表达的乳腺癌中 IGF-1R 的阳性表达率远远高于 CerbB-2 低表达乳腺癌和乳腺增生症($P<0.05$),提示 IGF-1R 与乳腺癌发生密切相关,尤其是 CerbB-2 高表达的乳腺癌。但 IGF-1R 表达与组织学分级、腋窝淋巴结转移等临床病理因素和总生存期无关,因本实验标本例数较少,对于 IGF-1R 可否作为乳腺癌的诊断指标以及能否预测预后尚有待进一步研究证实。

综上所述,BRCA-1 蛋白和 IGF-1R 的表达与 CerbB-2 高表达的乳腺癌的发生有密切关系。BRCA1 蛋白表达的缺失与 IGF-1R 高表达对判断乳腺癌恶性程度及预后具有重要的参考意义。BRCA-1 和 IGF-1R 蛋白的表达与 CerbB-2 高表达乳腺癌的临床病理特征之间具有密切的关系,但是与乳腺癌患者的总生存期未见明显相关性。由于本实验例数相对较少,相关结果还有待于进一步探索。最近报道^[14]再次证实,BRCA-1 的突变会导致乳腺癌与卵巢癌;Meta 分析表明 IGF-1R 可以作为乳腺癌的一个客观的预后指标^[15]。我们可以推测,随着进一步研究的深入,BRCA1 蛋白和 IGF-1R 的检测将作为估计乳腺

癌生物学行为和预后的新的因素,并为乳腺癌的早期诊断、治疗和预防提供新的方法和思路。

参考文献:

- [1] Wang BZ, Wang J, Wu Q, et al. Expression of BRCA1 and its clinical significance in sporadic breast cancer[J]. Chinese Journal of Surgery, 2003, 41(2): 186-188. [王本忠, 王劲, 吴强, 等. 散发性乳腺癌 BRCA1 基因的表达及其临床意义[J]. 中华外科杂志, 2003, 41(2): 186-188.]
- [2] Boulton SJ. Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins[J]. Biochem Soc Trans, 2006, 34(5): 633-645.
- [3] Leonarczyk TJ, Mawn BE. Cancer risk management decision making for BRCA+ women [J]. West J Nurs Res, 2015, 37(1): 66-84.
- [4] Yoshikawa K, Honda K, Inamoto T, et al. Reduction of BRCA1 protein expression in Japanese sporadic breast carcinomas and its frequent loss in BRCA1-associated cases[J]. Clin Cancer Res, 1999, 5(6): 1249-1261.
- [5] Riahi A, Kharrat M, Ghourabi ME, et al. Mutation spectrum and prevalence of BRCA1 and BRCA2 genes in patients with familial and early-onset breast/ovarian cancer from Tunisia[J]. Clin Genet, 2015, 87(2): 155-160.
- [6] Bayraktar S, Amendola L, Gutierrez-Barrera AM, et al. Clinicopathologic characteristics of breast cancer in BRCA-carriers and non-carriers in women 35 years of age or less[J]. Breast, 2014, 23 (6): 770-774.
- [7] Marcus JN, Watson P, Page D, et al. Hereditary breast cancer: pathobiology, prognosis, and BRCA1 and BRCA2 gene linkage[J]. Cancer, 1996, 77 (3): 697-709.
- [8] Arcaro A. Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor in human cancer [J]. Front Pharmacol, 2013, 4: 30.
- [9] Shin M, Yang EG, Song HK, et al. Insulin activates EGFR by stimulating its interaction with IGF-1R in low-EGFR-expressing TNBC cells[J]. BMB Rep, 2015, 48(6): 342-347.
- [10] Christopoulos PF, Msaouel P, Koutsilieris M, et al. The role of the insulin-like growth factor-1 system in breast cancer [J]. Mol Cancer, 2015, 14: 43.
- [11] Yerushalmi R, Gelmon KA, Leung S, et al. Insulin-like growth factor receptor (IGF-1R) in breast cancer subtypes [J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 132(1): 13.
- [12] Pavelic J, Pavelic L, Karadza J, et al. Insulin-like growth factor family and combined antisense approach in therapy of lung carcinoma [J]. Mol Med, 2002, 8(3): 149-157.
- [13] Sun WY, Yun HY, Song YJ, et al. Insulin-like growth factor 1 receptor expression in breast cancer tissue and mammographic density [J]. Mol Clin Oncol, 2015, 3 (3): 572-580.
- [14] Golmard L, Delnatte C, Laugé A, et al. Breast and ovarian cancer predisposition due to de novo BRCA1 and BRCA2 mutations[J]. Oncogene, 2015, Jun1. [Epub ahead of print]
- [15] Yan S, Jiao X, Li K, et al. The impact of IGF-1R expression on the outcomes of patients with breast cancer: a meta-analysis[J]. Onco Targets Ther, 2015, 8: 279-287.