

· 实验研究 ·

## 乳腺浸润性导管癌中聚集素的表达 及其与 Bax 的关系

臧家兰 李春红 曹鸿雁 蔡莉

**【摘要】 目的** 探讨聚集素(clusterin)、Bax 在乳腺浸润性导管癌中的表达及意义。**方法** 采用 S-P 免疫组化方法,检测乳腺浸润性导管癌组织中 clusterin 和 Bax 的表达状态。**结果** Clusterin 在正常乳腺组织中不表达,在 62.79% (27/43) 的乳腺浸润性导管癌组织中阳性表达。Clusterin 在乳腺浸润性导管癌组织中的表达与年龄、绝经状态无关,而与肿瘤的分化程度( $r = 0.379\ 9$ ,  $P = 0.026\ 6$ )、临床分期( $r = 0.320\ 6$ ,  $P = 0.035\ 6$ )、肿瘤大小( $r = 0.367\ 1$ ,  $P = 0.036\ 5$ )及有无淋巴结转移( $r = 0.593\ 7$ ,  $P = 0.000\ 5$ )呈正相关。Clusterin 与 Bax 的表达呈负相关( $r = -0.327\ 3$ ,  $P < 0.05$ ),与 ER、PR 的表达状态均呈负相关( $r$  分别为  $-0.303\ 8$ 、 $-0.345\ 1$ ,  $P$  分别为  $0.012\ 5$ 、 $0.023\ 6$ ),与 HER-2 表达无相关性( $r = 0.264\ 4$ ,  $P = 0.171\ 9$ )。**结论** Clusterin 的表达状态在乳腺癌的发生、发展中可能起着重要的作用。

**【关键词】** 乳腺癌;免疫组织化学;聚集素;Bax

**【中图法分类号】** R737.9 **【文献标识码】** A

**Study on the expression of clusterin and the relationship between clusterin and Bax in infiltrating ductal carcinoma of the breast** ZANG Jia-lan ,LI Chun-hong , CAO Hong-yan ,CAI Li. The 4th Department of Internal Medicine, the 3rd Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150040, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the expression and significance of clusterin (a newly discovered anti-apoptosis protein, which is overexpressed in many cancers and plays an important role in the development of cancer) in infiltrating ductal carcinoma of the breast. **Methods** The expressions of clusterin and Bax in infiltrating ductal carcinoma of the breast were examined by immunohistochemical S-P method. **Results** The expression of clusterin was negative in normal breast tissues. The over-expression rate of clusterin in infiltrating ductal carcinoma of the breast was 62.79% (27/43). The expression level of clusterin in infiltrating ductal carcinoma of the breast

was not related to age and menopausal state, but was related positively with pathological differentiation ( $r = 0.379\ 9$ ,  $P = 0.026\ 6$ ), clinical stage ( $r = 0.320\ 6$ ,  $P = 0.035\ 6$ ) and lymph node metastasis ( $r = 0.593\ 7$ ,  $P = 0.000\ 5$ ). The expression level of clusterin in infiltrating ductal carcinoma of the breast had a negative correlation with Bax ( $r = -0.327\ 3$ ,  $P < 0.05$ ), ER ( $r = -0.303\ 8$ ,  $P < 0.05$ ) and PR expression ( $r = -0.345\ 1$ ,  $P < 0.05$ ), and had no correlation with HER-2 ( $r = 0.264\ 4$ ,  $P > 0.05$ ). **Conclusion** Clusterin may play an important role in the carcinogenesis and development of infiltrating breast carcinoma.

**【Key words】** Breast neoplasms; Immunohistochemistry; Clusterin; Bax

乳腺癌发病率已居国内外女性恶性肿瘤<sup>[1]</sup>之首位,严重危害女性的身心健康。乳腺癌的发生与细胞增殖失控及凋亡的减少有密切关系,且细胞增殖和凋亡的平衡也决定着乳腺癌组织对放、化疗及激素疗法的反应性<sup>[2]</sup>。聚集素(clusterin)是近年新发现的一种凋亡相关因子,广泛存在于人类及动物的许多组织中<sup>[3]</sup>。本实验运用免疫组化法检测 clusterin 在乳腺癌中的表达,并结合完整的临床资料分析 clusterin 表达与乳腺癌发生、发展及分化、转移的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

16 例正常乳腺组织及 43 例乳腺癌组织标本取自中国医科大学附属第一医院于 2004 年 1 月至 2005 年 5 月手术切除的病理存档蜡块,所有手术患者术前均未接受过放射治疗、化疗,诊断均经常规病理切片证实。组织均用甲醛固定,石蜡包埋,厚 4  $\mu\text{m}$  连续切片,分别作 HE 和免疫组化染色。

### 1.2 患者临床及病理资料

43 例患者按国际抗癌联盟(UICC)1997 年修订的 TNM 分期标准分为:Ⅰ~Ⅱ期 32 例,Ⅲ~Ⅳ期 11 例;高分化 12 例,中分化 14 例,低分化 17 例;淋巴结转移阳性 31 例,淋巴结转移阴性 12 例;绝经前 26 例,绝经后 17 例;年龄从 30~79 岁,平均年龄为 50 岁。

### 1.3 实验试剂与方法

羊抗人 clusterin- $\beta$ (C-18)多抗为 Santa Cruz 公司产品,鼠抗人 Bax 单克隆抗体、Ultrasensitive<sup>TM</sup> S-P 免疫组织化学染色试剂盒、DAB 显色剂购自福州迈新生物技术开发公司。免疫组化染色程序按 S-P 试剂盒说明书进行,clusterin- $\beta$ (C-18)使用浓度为 1 : 50,以已知阳性片作为阳性对照,以 PBS 液代替一抗作为阴性对照。

## 1.4 结果判定

分别由两名经验丰富的病理医师在不知临床和病理资料的情况下独立观察切片,对免疫组化结果进行评估。各指标的阳性表达均为黄色或黄棕色颗粒。按染色强度及染色细胞数量划分等级,阴性(-):显色强度与背景无明显差别;弱阳性(+):显色强度为淡黄色或仅个别细胞呈黄至棕黄染色,阳性细胞数<10%;中度阳性(++):显色强度呈黄至棕黄染色,阳性细胞10%~60%;强阳性(+++):显色强度呈棕褐色,阳性细胞数>60%。

## 1.5 统计学方法

采用 SPSS10.0 软件,对数据进行 $\chi^2$ 检验及 Spearman 等级相关检验, $P<0.05$ 为有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 Clusterin 在乳腺浸润性导管癌组织中的表达及其与临床病理特征的关系

Clusterin 在正常乳腺组织中不表达,在乳腺浸润性导管癌组织中阳性表达率为 62.79% (27/43)。Clusterin 在乳腺浸润性导管癌的癌细胞质内多呈阳性或强阳性表达(图 1)。由表 1 可见:Clusterin 在乳腺浸润性导管癌组织中的表达与患者年龄( $\chi^2=0.002\ 0$ ,  $P=0.964\ 6$ ),绝经状态( $\chi^2=0.731\ 7$ ,  $P=0.392\ 3$ )无关,与肿瘤分化程度( $r=0.379\ 9$ ,  $P=0.026\ 6$ ),临床分期( $r=0.320\ 6$ ,  $P=0.035\ 6$ ),有无淋巴结转移( $r=0.593\ 7$ ,  $P=0.000\ 5$ ),肿瘤大小( $r=0.367\ 1$ ,  $P=0.036\ 5$ )均呈正相关;与 ER( $r=-0.303\ 8$ ,  $P=0.012\ 5$ )和 PR( $r=-0.345\ 1$ ,  $P=0.023\ 6$ )表达状态呈负相关,与 HER-2 表达不相关( $r=0.264\ 4$ ,  $P=0.171\ 9$ )。

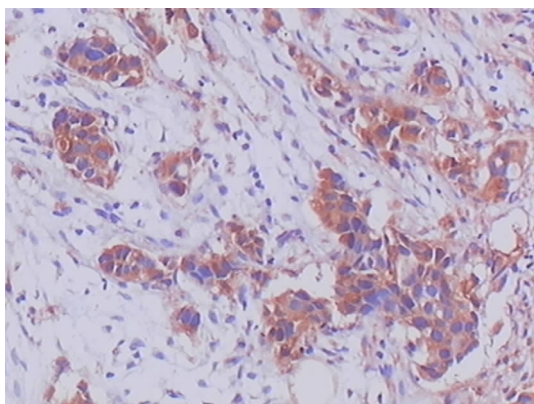


图 1 Clusterin 在乳腺浸润性导管癌中强阳性表达 (S-P 法  $\times 100$ )

## 2.2 乳腺浸润性导管癌组织中 clusterin 与 Bax 蛋白之间的关系

Bax 阳性表达位于细胞质(图 2)。由表 1 可见:在 Bax 表达阳性的乳腺浸润性导管癌组织中,clusterin 阳性表达率为 50.00% (13/26);在 Bax 表达阴性的乳腺浸润性导管癌组织中,clusterin 阳性表达率为 82.35% (14/17),二者表达呈显

著负相关( $r = -0.327\ 3$ ,  $P < 0.05$ )。

表 1 Clusterin 在乳腺浸润性导管癌中的表达与临床病理因素之间的关系

临床因素	聚集素		$\chi^2$ 值	$P$ 值
	阳性例数	阴性例数		
Bax 状态			4.605 1	0.031 9
Bax +	13	13		
Bax -	14	3		
雌激素受体			6.234 4	0.012 5
ER +	8	11		
ER -	19	5		
激素受体			5.121 2	0.023 6
PR +	6	9		
PR -	21	7		
HER-2			1.866 1	0.171 9
HER-2 +	10	2		
HER-2 -	17	14		
肿瘤分期			4.418 4	0.035 6
I + II	23	9		
III + IV	4	7		
腋窝淋巴结状态			12.250 1	0.000 5
N <sub>0</sub>	25	6		
N <sub>1</sub>	2	10		
肿瘤分化程度			7.254 6	0.026 6
高	4	8		
中	9	5		
低	14	3		
肿瘤大小			4.374 9	0.036 5
<2 cm	10	12		
≥2 cm	17	4		
年龄			0.002 0	0.964 6
<50	15	9		
≥50	12	7		
月经状况			0.731 7	0.392 3
绝经前	15	11		
绝经后	12	5		

### 3 讨论

聚集素是一种硫糖蛋白异构二聚体,1983 年在山羊睾丸中被发现后,在脑、肾脏、肝脏、肺、子宫、卵巢、乳腺、前列腺等许多组织中也发现这种蛋白质的表达。

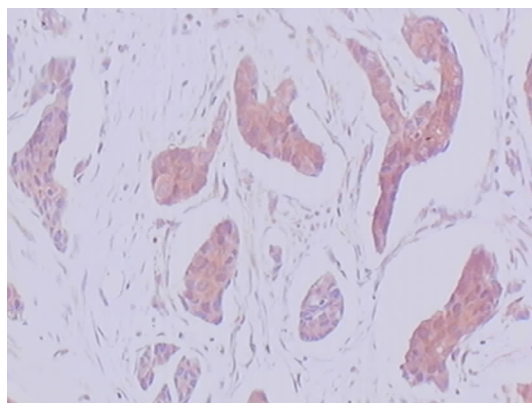


图 2 Bax 在乳腺浸润性导管癌中强阳性表达 (S-P 法  $\times 100$ )

1992 年召开的国际工作组会议建议将其命名为 clusterin。Clusterin 的表达复杂,一组是分泌型 clusterin,另一组是核型 clusterin,在细胞质和细胞核中表达核型 clusterin。人癌细胞中分泌型 clusterin 的过表达导致耐药和抵抗细胞毒药物诱导的凋亡;核型 clusterin 是一个电离辐射诱导的相对分子质量为 70 000 的蛋白,当在乳腺癌 MCF-7 细胞中过表达时可触发凋亡,因为 Clusterin 的细胞内片段可以形成聚集物,导致线粒体分布模式的严重破坏,激发线粒体途径的凋亡,细胞出现形态改变、增殖减缓、细胞周期停留在  $G_0/G_{1-S}$  期<sup>[4,5]</sup>。尽管细胞受刺激后表达的 clusterin 可能具有天然的促生存、抗凋亡能力以保护细胞自身;但是,clusterin 在细胞内聚集后可具有高度的细胞毒性,这种活性可能抵消它的抗凋亡作用。Clusterin 在前列腺癌、膀胱癌、乳腺癌等肿瘤中的表达均有上调,并与肿瘤恶性程度相关<sup>[6]</sup>。

正常乳腺中 clusterin 呈阴性表达,在不典型增生、导管内癌、侵袭性癌及转移淋巴结中 clusterin 的阳性率逐渐上升。Clusterin 与乳腺癌的发展阶段、肿块大小都有关,且与凋亡系数成反比<sup>[7]</sup>。但目前有关 clusterin 抗细胞凋亡的信号传导通路,以及 clusterin 抗体在临床肿瘤治疗中的价值均尚未确定。

Kruger 等用免疫组化和原位杂交法研究了 clusterin 在一组乳腺病例中的表达,结果发现,clusterin 的表达状态与乳腺恶变的不同阶段密切相关。在正常乳腺上皮细胞中 clusterin 表达为阴性,在乳腺癌细胞质内多呈阳性或强阳性表达,clusterin 在乳腺浸润性癌中表达率为 53%。Clusterin 在蛋白质和 RNA 水平上的表达与乳腺癌肿块大小,雌激素受体,孕激素受体阴性状态,以及从原发癌向淋巴结转移的进展有关。本研究同样发现 clusterin 在正常乳腺组织中不表达,在乳腺浸润性导管癌组织中阳性表达率为 62.79% (27/43)。在乳腺浸润性导管癌组织中的表达与淋巴结转移情况 ( $r = 0.5937$ ,  $P = 0.0005$ )、肿瘤大小 ( $r = 0.3671$ ,  $P = 0.0365$ ) 均呈正相关;与雌激素受体阴性状态负相关 ( $r = -0.3038$ ,  $P = 0.0125$ ),与孕激素受体阴性状态负相关 ( $r = -0.3451$ ,  $P = 0.0236$ ),与 HER-2 表达状态不相关 ( $r = 0.2644$ ,  $P = 0.1719$ )。Clusterin 在乳腺浸润性导管癌中的

表达与患者年龄( $\chi^2 = 0.002\ 0$ ,  $P = 0.964\ 6$ ), 绝经状态( $\chi^2 = 0.731\ 7$ ,  $P = 0.392\ 3$ ) 无关, 与 Kruger 等<sup>[8]</sup>的研究结果相同。本研究还发现 clusterin 在乳腺浸润性导管癌组织中的表达与肿瘤的分化程度( $r = 0.379\ 9$ ,  $P = 0.026\ 6$ )、临床分期( $r = 0.320\ 6$ ,  $P = 0.035\ 6$ ) 呈正相关, 这一点与 Kruger 等的研究有所不同, 他们仅发现 clusterin 在低分化肿瘤中的阳性率高于高、中分化肿瘤, 但却无统计学意义; 且未发现 clusterin 表达与肿瘤临床分期有相关性。研究表明: Clusterin 可能促进肿瘤细胞的局部浸润与扩散, 在乳腺癌的形成和发展中起作用。

大量研究表明, clusterin 与细胞凋亡有着密切的关系。但 clusterin 基因及其蛋白发挥抗凋亡作用的具体机制与结构基础尚不清楚。抑癌基因 P53 可抑制电离辐射诱导的 clusterin 表达<sup>[9]</sup>。

Zhang 等<sup>[10]</sup>建立用逆转录病毒介导稳定表达 clusterin 的人纤维肉瘤细胞株 HT1080, 探讨了 clusterin 在癌细胞中的抗凋亡功能, 发现 clusterin 特异性作用于化疗药物引起的 Bax 构象改变, 干扰 Bax 在线粒体上的活化, 从而抑制凋亡。本研究发现 clusterin 与 Bax 的表达呈负相关( $r = -0.327\ 3$ ,  $P < 0.05$ )。既往的研究未发现 clusterin 与 Bax 表达及转录之间存在相关性。Clusterin 干扰 Bax 在线粒体上活化的同时是否通过某种机制下调 clusterin 表达还有待研究; 对 clusterin 与凋亡之间关系的研究还有待进一步深化。

研究发现, clusterin 上调表达与 Herceptin 治疗抵抗有关, 针对 clusterin 和 Herceptin 的联合靶向治疗, 有望成为乳腺癌治疗新方法。Clusterin 和 BCL-2 的 ASOs(antisense oligonucleotides) 联合治疗, 与 Herceptin 同时用于进展期乳腺癌患者已进行了 I 期研究<sup>[11]</sup>。So 等<sup>[12]</sup>第 1 次报道 clusterin 反义寡核苷酸和 SiRNA 在 ER 阳性 MCF-7 和 ER 阴性 MDA-MB-231 乳腺癌细胞系中运用可提高泰素化疗敏感性。总之, 这些研究发现 clusterin 是进展期乳腺癌患者多学科治疗的一个有效靶点。

## 参考文献

- [1] Mcpherson K, Steel C M, Dixon J M. ABC of breast diseases: breast cancer epidemiology, risk factors, and genetics. BMJ, 2000, 321:624-628.
- [2] Lee S, Schmitt C A. Chemotherapy response and resistance. Curr Opin Genet Dev, 2003, 13:90-96.
- [3] Gleave ME, Miyake H. Use of antisense oligonucleotides targeting the cytoprotective gene, clusterin, to enhance androgen and chemosensitivity in prostate cancer. World J Urol, 2005, 23:38-46.
- [4] Debure L, Vayssiere J L, Rincival V, et al. Intracellular clusterin causes juxta-nuclear aggregate formation and mitochondrial alteration. J Cell Sci, 2003, 116: 3109-3121.
- [5] Caccamo A E, Scaltriti M, Caporali A, et al. Cell detachment and apoptosis induction of immortalized human prostate epithelial cells are associated with early accumulation of a M<sub>r</sub>45 000 nuclear isoform of clusterin. Biochem J, 2004, 382(Pt1):157-168.
- [6] Trougakos I P, Gonos E S. Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer. Int J Biochem Cell Biol, 2002, 34:1430-1448.
- [7] Redondo M, Villar E, Torres Munoz J, et al. Overexpression of clusterin in human breast carcinoma. Am J Pathol, 2000, 157:

393 - 399.

- [8] Kruger S, Ola V, Fischer D, *et al.* Prognostic significance of clusterin immunoreactivity in breast cancer. *Neoplasma*, 2007, 54: 46 - 50.
- [9] Criswell T, Klovov D, Beman M, *et al.* Repression of IR-inducible clusterin expression by the p53 tumour suppressor protein. *Cancer Biol Ther*, 2003, 2: 372 - 380.
- [10] Zhang H, Kim J K, Edwards CA, *et al.* Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax. *Nat Cell Biol*, 2005, 7: 909 - 915.
- [11] Biroccio A, D'Angelo C, Jansen B, *et al.* Antisense clusterin oligodeoxynucleotides increase the response of HER-2 gene amplified breast cancer cells to Trastuzumab. *J Cell Physiol*, 2005, 204: 463 - 469.
- [12] So A, Sinnemann S, Huntsman D, *et al.* Knockdown of the cytoprotective chaperone, clusterin, chemosensitizes human breast cancer cells both *in vitro* and *in vivo*. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4: 1850 - 1859.

(收稿日期: 2007 - 04 - 23)

(本文编辑: 周艳)