

• 论著 •

ER α /ER β 、转化生长因子 β 1 在乳头状瘤、原位癌及乳腺癌组织中的表达差异及其意义

高忠诚 余之刚 张连芳 薛克成

【摘要】 目的 探讨 ER α /ER β 、TGF β 1 蛋白在乳腺癌发展过程中的表达变化。**方法** 收集了 2009 年 1 月至 2010 年 12 月在山东大学第二医院乳腺外科及临沂市人民医院普外三科入院治疗的 258 例患者的病理资料,采用免疫组化方法检测正常乳腺组织($n=61$)、乳头状瘤($n=65$)、乳腺原位癌($n=45$)及乳腺浸润性癌($n=87$)组织中 ER α / β 、TGF β 1 蛋白的表达情况。所有数据应用方差分析。**结果** ER α /ER β 的比值在正常乳腺组织(0.34)、乳头状瘤(0.43)、原位癌(0.68)及浸润性癌细胞(0.71)呈逐步上升的趋势。TGF β 1 总体表达情况在乳头状瘤、原位癌及浸润性癌与正常乳腺组织相比差异均有统计学意义($P<0.05$),原位癌及浸润性癌强度分数高于乳管内乳头状瘤与正常乳腺组织($P<0.05$)。**结论** 在乳腺癌发生发展过程中 ER α /ER β 升高,提示 ER β 可能是乳腺癌的一个自我保护因素。TGF- β 1 蛋白表达可能是乳腺癌的早期事件,如能在早期阶段对 TGF β 1 的表达进行干预,可能对乳腺癌的防治起到重要作用。

【关键词】 乳腺肿瘤;雌激素受体;转化生长因子 β 1

【中图分类号】 R737.9 **【文献标志码】** A

Expression difference of ER α /ER β and transforming growth factor β 1 in papilloma, carcinoma *in situ* and breast cancer tissue and clinical significance GAO Zhong-cheng, YU Zhi-gang, ZHANG Lian-fang, XUE Ke-cheng. Department of General Surgery, Linyi People's Hospital, Linyi 276003, Shandong Province, China
Corresponding author: YU Zhi-gang, Email: yzg@medmail.com.cn

【Abstract】 Objective To detect the expression change of ER α /ER β and transforming growth factor β 1 (TGF β 1) in the development of breast cancer. **Methods** The pathological data of 258 cases surgically treated in department of breast surgery, the Second Affiliated Hospital of Shandong University and department of general surgery, Linyi People's Hospital from January 2009 to December 2010 were collected. Immunohistochemistry were used to detect the expression of ER α /ER β and TGF β 1 in breast normal tissue ($n=61$), papilloma ($n=65$), carcinoma *in situ* ($n=45$) and invasive breast cancer ($n=87$) tissues. The analysis of variance was used for data processing. **Results** ER α /ER β was 0.34, 0.43, 0.68 and 0.71 in normal breast tissue, papilloma, carcinoma *in situ* and invasive breast cancer tissue respectively, indicating the tendency of increasing. The total score of TGF β 1 expression in papilloma, carcinoma *in situ* and invasive breast cancer were statistically different from that of normal breast tissue ($P<0.05$). The expression intensity score of TGF β 1 in carcinoma *in situ* and invasive breast cancer were statistically higher than that in papilloma and normal breast cancer tissue ($P<0.05$). **Conclusions** The ER α /ER β increased in the development of breast cancer, which hinted that ER β may play a protective role against carcinogenesis. TGF β 1 protein expression may be an early event in breast cancer, so the intervention on TGF β 1 expression in early stage may have positive effects in breast cancer prevention.

【Key words】 breast neoplasms; estrogen receptor; transforming growth factor β 1

乳腺癌为女性最常见的恶性肿瘤,近年来在中国的发病率呈上升趋势。乳腺癌的发生是由于

乳腺正常上皮细胞向恶性细胞转化,大体过程为乳腺增生到非典型增生再到原位癌,最终进展为浸润性癌。癌前病变在形态学和遗传学方面均有改变,是乳腺癌发生的必经阶段,而这一发展过程是可逆的。

研究显示:ER α /ER β 的比值在肿瘤的发生过程中变化,即随着肿瘤的发生发展,ER α 表达增

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2013.02.007

作者单位:276003 临沂,山东省临沂市人民医院普外科(高忠诚,张连芳,薛克成),250000 济南,山东大学第二医院乳腺外科(余之刚)

通信作者:余之刚, Email: yzg@medmail.com.cn

加,ER β 表达降低,ER α /ER β 升高^[1]。这种现象在乳腺癌、结肠癌、前列腺癌等恶性肿瘤中均有报道^[1-2],但还有待于进一步的研究证实。另外,转化生长因子 β 1 (transforming growth factor β 1, TGF β 1) 在乳腺癌与正常乳腺组织中有不同的表达水平^[3],在乳腺癌发展的不同阶段,其表达水平也不相同。本研究旨在检测 ER α 、ER β 及 TGF β 1 在乳腺癌发生发展中的表达情况,并探讨其临床意义。

1 资料和方法

1.1 标本收集

本研究收集了 2009 年 1 月至 2010 年 12 月在山东大学第二医院乳腺外科及临沂市人民医院普外三科住院行手术治疗的患者相关资料。入组标准:女性,既往无恶性肿瘤病史,临床资料及病理资料完整,未接受新辅助化疗,获得患者知情同意。符合入组标准纳入研究共 258 例。所有病例由病理医师复审病理切片并最终判定。所有进入研究的病例中,乳腺正常组织 61 例(取自乳腺癌改良根治术后标本,距离肿瘤组织边缘 5 cm),乳腺导管内乳头状瘤 65 例,原位癌 45 例,乳腺浸润性癌 87 例。

1.2 试剂

兔抗人 ER α (L100)单克隆抗体、兔抗人 ER β (E101)单克隆抗体、通用型 SABC 免疫组化检测试剂盒、浓缩型 DAB 显色试剂盒、EDTA 抗原修复缓冲液、PBS、多聚赖氨酸均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;兔抗人 TGF β 1 单克隆抗体购自湖北武汉博士德生物技术有限公司。10% 水合氯醛、甲醛、苏木素、伊红等试剂由山东大学第二医院病理科提供。

1.3 免疫组化染色

所有标本均经 10% 的中性甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,制作 3 μ m 连续切片行免疫组化染色。组织切片在 60 $^{\circ}$ C 下烘烤 11 h;常规组织切片经二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水;将切片浸入 EDTA 修复液,置微波炉加热至沸 15 min,通过修复抗原暴露抗体结合位点,切片自然冷却后以 PBS 洗涤 3 min \times 3 次;切片滴加 3% 过氧化氢后置湿盒中室温孵育 20 min,PBS 洗涤 5 min \times 3 次;组织切片滴加特异性抗体(ER α 、ER β 及 TGF β 1),室温下孵育过夜,PBS 洗涤 5 min \times 3 次,滴加生物素标记的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗,室温孵育 20 min,PBS 洗涤 5 min \times 3 次;切片组织滴加链菌素-亲生物素-过氧化物酶溶液,室温孵育 40 min,PBS 洗涤 5 min \times 3 次;加入新鲜配制的 DAB 显色

剂,显微镜下控制显色,适时终止;苏木素溶液复染 1~2 min,淡氨水泛蓝,脱水后中性树脂封片。

1.4 免疫组化判定标准^[4]

阳性细胞的判断标准:ER α 及 ER β 为细胞核着色,TGF β 1 为细胞质着色。采用显微摄像计算机图像分析系统,在光学显微镜下全面观察每张切片,每个组织点随机选取 5 个视野计算阳性细胞和肿瘤细胞数量。分别根据细胞染色强度和染色面积进行评分,用两者得分之和判断总体表达情况:(1)按切片中细胞显色有无及深浅计分,强度分数代表阳性肿瘤细胞的平均强度。细胞无显色为 0 分,浅黄为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。(2)按切片中显色细胞的比例评分,比例分数代表了阳性肿瘤细胞占的百分比。没有阳性细胞为 0 分,比例 $<1\%$ 为 1 分, $\geq 1\%$ 且 $<10\%$ 为 2 分, $\geq 10\%$ 且 $<1/3$ 为 3 分, $\geq 1/3$ 且 $<2/3$ 为 4 分, $\geq 2/3$ 为 5 分。(3)比例分数和强度分数相加得到该片的总分,在 0~8 之间。

两位病理学专家独立阅片,确定免疫组化结果。

1.5 数据处理

应用 SPSS 19.0 统计学软件,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ER α 表达

与正常乳腺组织相比,乳头状瘤、原位癌及浸润性癌组织中的 ER α 表达评分较高,差异有统计学意义($P < 0.01$,表 1)。乳头状瘤、原位癌及浸润性癌在 ER α 的比例分数上分别与正常乳腺组织进行比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$,表 2)。原位癌及浸润性癌的 ER α 强度分数与正常乳腺组织相比差异有统计学意义($P < 0.01$,表 3)。

2.2 ER β 表达

浸润癌与正常乳腺组织中的 ER β 表达差异有统计学意义($P < 0.05$,表 1)。在 ER β 比例分数上,乳头状瘤与正常乳腺组织表达差异有统计学意义($P < 0.05$,表 2)。在 ER β 强度分数上,浸润癌与正常乳腺组织有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 ER α /ER β 比值

在强度分数上,ER α /ER β 比值在正常乳腺组织(0.34)、乳头状瘤(0.43)、原位癌(0.68)及浸润性癌细胞(0.71)各不相同,在原位癌及浸润性癌中 ER α /ER β 的比值高于正常乳腺组织细胞中的比值(表 4)。

表 1 ERα、ERβ 及 TGFβ1 在不同乳腺组织中的总体表达情况

分组	例数	ERα	ERβ	TGFβ1
正常乳腺组织	61	2.89±1.22	5.93±2.32	4.88±2.13
乳管内乳头状瘤	65	3.54±1.63 ^a	6.13±2.87	5.76±2.21 ^a
乳腺原位癌	45	3.91±1.67 ^a	5.79±2.44	7.08±3.13 ^a
乳腺浸润性导管癌	87	3.77±1.92 ^a	5.61±2.38 ^a	6.77±2.54 ^a

^a P<0.05, 与正常乳腺组织相比

表 2 ERα、ERβ 及 TGFβ1 在不同乳腺组织中的比例分数

分组	例数	ERα	ERβ	TGFβ1
正常乳腺组织	61	2.04±0.87	3.43±1.35	4.01±1.67
乳管内乳头状瘤	65	2.47±1.03 ^a	3.83±1.43 ^a	3.76±1.25 ^a
乳腺原位癌	45	2.41±1.05 ^a	3.39±1.29	4.85±2.01 ^a
乳腺浸润性导管癌	87	2.27±0.94 ^a	3.54±1.33	4.57±2.10 ^a

^a P<0.05, 与正常乳腺组织相比

表 3 ERα、ERβ 及 TGFβ1 在不同乳腺组织中的强度分数

分组	例数	ERα	ERβ	TGFβ1
正常乳腺组织	61	0.84±0.65	2.47±0.84	1.87±0.84
乳管内乳头状瘤	65	0.99±0.67 ^a	2.29±1.07	2.01±0.91
乳腺原位癌	45	1.55±0.62 ^a	2.29±1.21	2.23±1.16 ^a
乳腺浸润性导管癌	87	1.51±0.58 ^a	2.14±1.22 ^a	2.21±1.09 ^a

^a P<0.05, 与正常乳腺组织相比

表 4 在不同乳腺组织中的 ERα/ERβ 的比值

分组	例数	强度分数	比例分数	总体表达情况
正常乳腺组织	61	0.34	0.59	0.49
乳管内乳头状瘤	65	0.43	0.64	0.58
乳腺原位癌	45	0.68	0.69	0.65
乳腺浸润性导管癌	87	0.71	0.61	0.67

2.4 TGFβ1 蛋白表达

TGFβ1 总体表达情况:乳头状瘤、原位癌及浸润性癌组织与正常乳腺组织相比差异均有统计学意义($P<0.05$), 原位癌及浸润性癌强度分数高于乳管内乳头状瘤与正常乳腺组织($P<0.05$, 表 1)。进一步对比例分数及强度进行分析, 发现乳头状瘤、原位癌及浸润性癌中 TGFβ1 比例分数均>正常组织($P<0.05$), 乳头状瘤、原位癌及浸润性中 TGFβ1 强度分数与正常组织相比差异均有统计学意义($P<0.05$, 表 2、3)。

3 讨论

乳腺癌是一种激素依赖性肿瘤, 其发生发展与 ER 密切相关。目前 ER 主要有两种亚型, 即

ERα 和 ERβ。ERα 在乳腺癌治疗方案确定及内分泌治疗方面发挥了巨大作用。ERβ 是另一种 ER 受体, 除肝脏以外, 在心血管、呼吸、消化、中枢神经系统及生殖系统(如乳腺)等都有分布。ERβ 和 ERα 在 DNA 结合区高度同源(96%), 配体结合区中度同源(58%), 而其活性功能区(active function, AF)-1、AF-2 明显不同源^[5]。ERα、ERβ 的结构、功能存在差异, 推测两者在乳腺癌的发生发展及内分泌治疗中可能发挥不同作用。

目前, ERα 已作为临床治疗的重要参考指标, ERα 阳性的乳腺癌患者可通过内分泌治疗获益。他莫西芬(tamoxifen, TAM)可通过与 ERα 结合抑制肿瘤的生长, 使患者获益, 这已经成为乳腺癌治疗的共识^[6]。目前关于 ER 作用机制的研究已成为乳腺癌研究的热点。周艳等^[7]发现外源性 ERβ 基因在乳腺癌 MCF-7 细胞中稳定表达虽不增加对 ER 拮抗剂 4-OHT 的耐药性, 但可使其对雌激素的敏感性下降。Thomas 等^[8]的动物实验设计了一种 ERβ 基因敲除鼠, 显示其出现乳腺上皮增生, 随着动物年龄的增加, 可发生严重的乳腺病变, 表明 ERβ 对正常乳腺有保护作用。Rahal 等^[9]研究指出 ERβ 可抑制 ERα 转录活性, 降低 ERα 阳性细胞对雌二醇的敏感性。Kapila 等^[10]发现 ERβ 的强度分数在正常乳腺上皮、导管内原位癌、浸润性导管癌中依次降低, 提示 ERβ 可能是乳腺癌的一个协调保护因素。

有研究提示:ERα 水平上调可能会促进肿瘤发生;而 ERβ 水平下调, 因其对 ERα 的抑制作用减弱, 可能导致细胞对雌激素的敏感性增加, 从而促进肿瘤的发生发展^[10]。Valle 等^[11]测定了乳腺癌细胞系 MCF-7 及 MCF-7/ADR 中 ERα、ERβ mRNA 表达情况, 发现同 MCF-7 细胞相比, MCF-7/ADR 中 ERα 水平降低而 ERβ 水平升高, 两者比值明显降低。王殊等^[12]研究显示, 在人乳腺癌组织中 ERα 表达明显高于癌旁组织, ERβ 表达明显低于癌旁组织, ERα/ERβ 比值明显高于癌旁组织。本研究通过比较 ERα/ERβ 比值在不同乳腺组织中的情况, 发现总体表达情况与强度分数均随疾病的严重程度逐渐增高, 证实了上述观点。

目前对乳腺癌癌前病变的化学预防主要是通过抑制 ER 作用来降低乳腺癌的发病率, TAM 主要是针对 ERα 发挥作用, 对 ERβ 的影响目前还不清楚。了解 ERα、ERβ 的表达情况均具有预后和治疗意义, 重点在于两种受体及其异型体的相

对水平、比例以及 ER β 与 TAM 结合后通过 API 通路介导转录过程的倾向性。ER β 状况对乳腺癌患者的临床治疗具有潜在的重大意义,但只有从分子水平进一步研究 ER β 和其异型体、其协同因子的功能后,才可能研发出针对 ER β 的治疗措施。

TGF 是一种由多种类型细胞分泌的多肽类生长因子。TGF β 1 在乳腺癌的发生发展过程中参与细胞的分化、增殖、凋亡等过程,发挥了重要作用^[13]。在癌症进展期,TGF β 1 又起到了促进肿瘤血管生成,利于肿瘤细胞的浸润、转移和免疫抑制的作用^[14]。近年来,研究发现某些恶性肿瘤中 TGF β 表达明显增高,提示 TGF β 1 可能在癌变过程及促进癌细胞浸润转移中发挥作用^[15]。

本研究重点关注 TGF β 1 蛋白在乳腺癌发生发展过程中的表达情况,结果发现在正常乳腺组织、乳头状瘤、原位癌及浸润性癌中均有较高的表达水平,但与正常乳腺组织比较差异有统计学意义($P < 0.01$),原位癌与浸润性癌 TGF β 1 强度分数高于乳管内乳头状瘤与正常乳腺组织($P < 0.05$),原位癌及浸润性癌两者之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。这一结果提示在乳腺细胞癌变的过程中,TGF β 1 发挥了重要作用。TGF β 1 可通过降低 T 淋巴细胞介导的细胞免疫及自然杀伤细胞活性,促使癌细胞逃避机体的免疫监视,从而加速癌细胞的浸润转移,进而诱导乳腺癌的早期发生^[16]。Bouquet 等^[17]也在动物实验中验证了该观点。这些研究都提示 TGF β 1 可能在早期乳腺癌的发生及发展过程中发挥重要作用。如能在早期阶段对 TGF β 1 的表达进行干预,可能对乳腺癌的防治起到重要作用。

参考文献

- [1] Gallo D, De Stefano I, Grazia Prisco M, et al. Estrogen receptor Beta in cancer: an attractive target for therapy [J]. *Curr Pharm Des*, 2012, 18(19):2734-2757.
- [2] 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.
- [3] Moses H, Barcellos-Hoff MH. TGF-beta biology in mammary development and breast cancer [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011, 3(1):a003277.
- [4] Kawai H, Ishii A, Washiya K, et al. Estrogen receptor α and

β are prognostic factors in non-small cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(14):5084-5089.

- [5] Deroo BJ, Buensuceso AV. Minireview: estrogen receptor-beta: mechanistic insights from recent studies [J]. *Mol Endocrinol*, 2010, 24(9):1703-1714.
- [6] Honma N, Horii R, Iwase T, et al. Clinical importance of androgen receptor in breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen monotherapy [J]. [2012-09-20]. <http://link.springer.com/article/10.1007/s12280-012-0337-2>.
- [7] 周艳,姜军,杨新华,等. 他莫昔芬对转染 ER 阻基因的 MCF-7 细胞生长特性的影响 [J/CD]. *中华乳腺病杂志:电子版*, 2008, 2(1):36-39.
- [8] Thomas CG, Strom A, Lindberg K, et al. Estrogen receptor beta decreases survival of p53-defective cancer cells after DNA damage by impairing G₂/M checkpoint signaling [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 127(2):417-427.
- [9] Rahal OM, Simmen RC. Paracrine-acting adiponectin promotes mammary epithelial differentiation and synergizes with genistein to enhance transcriptional response to estrogen receptor β signaling [J]. *Endocrinology*, 2011, 152(9):3409-3421.
- [10] Kapila K, Anim JT, Francis IM, et al. Expression of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta in fine needle aspirates of breast carcinoma [J]. *Acta Cytol*, 2010, 54(1):25-30.
- [11] Valle A, Sastre-Serra J, Oliver J, et al. Chronic leptin treatment sensitizes MCF-7 breast cancer cells to estrogen [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2011, 28(5):823-832.
- [12] 王殊,王杉,张嘉庆,等. 雌激素受体亚型在人乳腺癌的表达及意义 [J]. *中华外科杂志*, 2004, 14(13):792-795.
- [13] Todorović-Raković N. TGF-beta 1 could be a missing link in the interplay between ER and HER-2 in breast cancer [J]. *Med Hypotheses*, 2005, 65(3):546-551.
- [14] Ramsauer M, D'Amore PA. Contextual role for angiopoietins and TGF beta1 in blood vessel stabilization [J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 10):1810-1817.
- [15] Chorna I, Bilyy R, Datsyuk L, et al. Comparative study of human breast carcinoma MCF-7 cells differing in their resistance to doxorubicin: effect of ionizing radiation on apoptosis and TGF-beta production [J]. *Exp Oncol*, 2004, 26(2):111-117.
- [16] 王宏远,王刚平,王绍田,等. COX-2、TGF- β 1 和 HIF-1 α 表达与乳腺癌侵袭转移的关系 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2008, 13(5):417-420.
- [17] Bouquet F, Pal A, Pilonis KA, et al. TGF β 1 inhibition increases the radiosensitivity of breast cancer cells *in vitro* and promotes tumor control by radiation *in vivo* [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(21):6754-6765.

(收稿日期:2012-10-26)

(本文编辑:刘军兰)

高忠诚,余之刚,张连芳,等. ER α /ER β 、转化生长因子 β 1 在乳头状瘤、原位癌及乳腺癌组织中的表达差异及其意义 [J/CD]. *中华乳腺病杂志:电子版*, 2013, 7(2):107-110.