

· 论著 ·

乳腺癌组织中凋亡抑制蛋白 Apollon 的表达及其临床意义

陈建发 岳志强 傅明 莫友 周淑蓉

【摘要】 目的 研究乳腺癌组织中凋亡抑制蛋白 Apollon 免疫组化表达及临床意义。**方法** 回顾性收集解放军第四二二医院 2010 年 1 月至 2014 年 12 月手术切除的女性乳腺癌组织标本 66 例,采用免疫组织化学法检测 66 例乳腺癌组织中 Apollon、HER-2 及 survivin 的表达。采用 Kendall 等级相关检验分析 Apollon 表达与 HER-2 表达、survivin 表达、肿瘤大小及淋巴结状态之间的相关性。**结果** 在乳腺癌组织中 Apollon、HER-2 及 survivin 的阳性表达率分别为 59.1% (39/66)、31.8% (21/66) 及 39.4% (26/66)。Apollon 表达与 HER-2 表达 ($\tau\text{-}b=0.370, P=0.003$)、survivin 表达 ($\tau\text{-}b=0.292, P=0.018$)、肿瘤大小 ($\tau\text{-}b=0.322, P=0.009$) 及淋巴结状态 ($\tau\text{-}b=0.424, P=0.001$) 显著相关。**结论** Apollon 表达与 HER-2 表达、Survivin 表达、肿瘤大小及淋巴结状态有关,其可能是一个与乳腺癌发展相关的潜在分子标志物。

【关键词】 乳腺肿瘤; 凋亡抑制蛋白质类; 免疫组织化学; 预后

【中图法分类号】 R737.9 **【文献标志码】** A

Expression of apoptosis protein inhibitor Apollon in breast cancer tissue and its clinical significance

Chen Jianfa, Yue Zhiqiang, Fu Ming, Mo You, Zhou Shurong. Department of General Surgery, No. 422 Hospital of PLA, Zhanjiang 524009, China

Corresponding author: Chen Jianfa, Email: chenjf623@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the immunohistochemical expression of apoptosis protein inhibitor Apollon in breast cancer tissue and its clinical significance. **Methods** We retrospectively analyzed the female breast cancer tissue specimens from 66 cases treated in No. 422 Hospital of PLA from January 2010 and December 2014. The expressions of Apollon, HER-2 and survivin were assessed immunohistochemically. The correlation of Apollon expression with HER-2 expression, survivin expression, tumor size and lymph node status was analyzed using Kendall rank correlation test. **Results** The positive rates of Apollon, HER-2 and survivin in breast cancer tissue were 59.1% (39/66), 31.8% (21/66) and 39.4% (26/66), respectively. Apollon expression was significantly associated with HER-2 expression ($\tau\text{-}b=0.370, P=0.003$), survivin expression ($\tau\text{-}b=0.292, P=0.018$), tumor size ($\tau\text{-}b=0.322, P=0.009$) and lymph node status ($\tau\text{-}b=0.424, P=0.001$). **Conclusions** Apollon expression is associated with HER-2 expression, survivin expression, tumor size and lymph node status. Apollon may be a potential molecular marker in the development of breast cancer.

【Key words】 Breast neoplasms; Inhibitor of apoptosis proteins; Immunohistochemistry; Prognosis

乳腺癌严重威胁女性健康,在中国女性人群中的发病率一直位居恶性肿瘤首位,病死率则徘徊

在五六位^[1]。目前,已有多种具有广泛影响的乳腺癌分类及危险性评估方案被推行。深入研究乳腺癌分子分型,以指导制定恰当、有效的治疗方案,已成为临床关注热点。Apollon 为凋亡抑制蛋白家族(inhibitors of apoptosis proteins, IAPs)成员,其过表达能够导致癌细胞化疗抵抗及恶性肿瘤预后不良^[2],但 Apollon 在乳腺癌组织中的表达却罕

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2015.05.006

基金项目:湛江市财政资金科技专项(2012C0302)

作者单位:524009 广东 湛江,解放军第四二二中心医院普通外科

通信作者:陈建发,Email:chenjf623@163.com

有文献报道。在本研究中,笔者检测了 Apollon 在乳腺癌组织中的表达,分析其与 HER-2 状态、凋亡抑制基因 survivin 表达及相关临床病理参数之间的关系,并探讨其临床意义。

1 材料和方法

1.1 一般资料

回顾性收集解放军第四二二医院 2010 年 1 月至 2014 年 12 月手术切除的女性乳腺癌标本 66 例。患者年龄 32~73 岁,平均年龄 50 岁,术前未接受过任何化疗、放射治疗或内分泌治疗。上述病例经病理切片证实均为浸润性导管癌,临床分期为 II~III 期,均无远处转移。

1.2 实验方法

Apollon:取上述病例存档的经 4% 多聚甲醛固定、石蜡包埋癌组织标本,4 μm 厚连续切片,脱蜡,浸于 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液内,微波炉加热至沸腾并保持该状态 15 min 修复抗原;切片冷却后洗涤,采用美国 Abcam 公司封闭缓冲液封闭非特异性的背景染色;滴加 Abcam 公司兔抗人 Apollon 多克隆抗体(1:400),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,洗涤,浸于含 0.3% H_2O_2 的甲醇中灭活内源性过氧化物酶,洗涤,加美国 Vector 公司 ImmPRESS 试剂抗兔二抗(1:1 000),室温反应 15 min;洗涤,DAB 显色,苏木精轻染,封片。

HER-2:采用福州迈新生物技术开发有限公司相关试剂盒并按常规检测。

survivin:方法同 Apollon,survivin 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,1:200 稀释。

1.3 结果判定

Apollon 评分系统和标准:Apollon 蛋白定位于胞核和(或)胞质。采用双评分半定量分析,根

据阳性细胞百分比及显色程度计分,200 倍镜下随机取 5 个视野,计算阳性细胞数。阳性细胞平均数为 0 计为 0 分, $\leq 25\%$ 记为 1 分,26%~50% 记为 2 分,51%~75% 记为 3 分, $\geq 76\%$ 记为 4 分;显色程度为无着色记 0 分,淡黄色记为 1 分,棕黄色记为 2 分,棕褐色记为 3 分。2 种分数相加后综合判定,0~1 分为(-),2~3 分为(+),4~7 分为(++).(-~+)定义为阴性染色,(++)定义为阳性染色^[3]。

HER-2 评分系统和标准:阴性(-~+)为未见染色,或 $<10\%$ 细胞的细胞膜染色,或 $>10\%$ 细胞部分细胞膜轻度染色;可疑(++)为 $\geq 10\%$ 细胞轻到中度的全细胞膜染色;阳性(+++)为 $>10\%$ 细胞重度的全细胞膜染色。定义(+++)为 HER-2 阳性、(-~++)为 HER-2 阴性^[4]。

survivin 的评估系统和标准:同 Apollon。

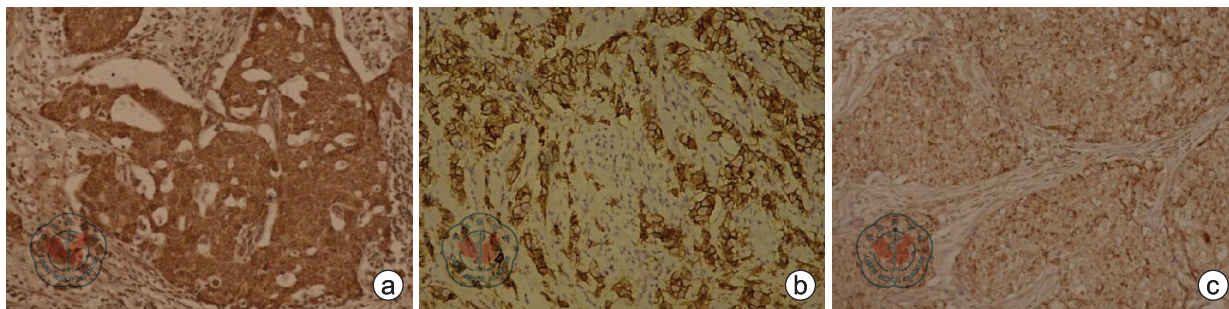
1.4 统计学方法

应用 SPSS 12.0 统计软件进行数据处理。采用 Kendall 等级相关检验分析 Apollon 表达与其他分子标志物、病理参数的相关性,检验水准 $\alpha = 0.050$ 。

2 结果

2.1 Apollon、HER-2 及 survivin 在乳腺癌组织中的表达

在乳腺癌组织中,Apollon 表达阳性的细胞胞质呈棕黄色,但不排除细胞核着色,66 例乳腺癌有 39 例表达阳性,阳性表达率为 59.1% (39/66);HER-2 阳性表达率为 31.8% (21/66);survivin 表达与 Apollon 类似,主要为胞质着色,其阳性表达率为 39.4% (26/66) (图 1)。



注:a、b、c 图分别所示 Apollon、HER-2 及 survivin 在乳腺癌组织中性表达

图 1 Apollon、HER-2 及 survivin 在乳腺癌组织中性表达 (SP 法 $\times 200$)

2.2 Apollon 表达与 HER-2、survivin、肿瘤大小及淋巴结状态的相关性

乳腺癌 HER-2 阳性表达者、乳腺癌 survivin 阳性表达者、肿瘤直径越大者及淋巴结受累者乳腺癌 Apollon 阳性表达率更高(表 1)。

表 1 66 例乳腺癌组织中 Apollon 表达与 HER-2、survivin、肿瘤大小及淋巴结状态的相关性

临床特征	例数	Apollon		相关系数	P 值
		阳性	阳性表达率(%)		
HER-2					
阳性	21	18	85. 7%	0. 370	0. 003
阴性	45	21	46. 7%		
survivin					
阳性	26	20	76. 9%	0. 292	0. 018
阴性	40	19	47. 5%		
肿瘤大小					
T ₂₋₃	52	35	67. 3%	0. 322	0. 009
T ₁	14	4	28. 6%		
淋巴结状态					
N ₁₋₃	45	33	73. 3%	0. 424	0. 001
N ₀	21	6	28. 6%		

3 讨论

细胞凋亡是一种严格程序化的细胞死亡,在正常组织发育及稳态中发挥关键作用。在多细胞生物体内,细胞凋亡能清除无用及有害细胞,在细胞生死之间保持平衡^[5]。癌前病变等压力,能够激活 DNA 损伤检查点通路,通过诱导细胞凋亡清除 DNA 损伤的细胞,从而阻断癌变,保护基因的完整性。细胞凋亡通路调控异常则能够促进肿瘤的发生、发展并导致治疗抵抗。

死亡受体途径及线粒体途径是两条主要的细胞凋亡信号通路,二者汇聚于半胱氨酸蛋白酶(caspase)^[2]。IAPs 不仅能够调控启动 caspase (initiator caspase, 包括 caspase-8、caspase-9、caspase-10), 还可调控效应 caspase (effector caspases, 包括 caspase-3、caspase-6、caspase-7)^[6]。目前,已有 Apollon 及 survivin 等 8 种人类 IAPs 家族成员被鉴定出来。其中,Apollon 为最大成员,分别在氨基端及羧基端拥有 1 个 BIR 结构域及 1 个泛素缀合酶 UBC 结构域^[7]。研究显示,Apollon 通过对抗 Smac/Diablo 及 caspases 的促细胞凋亡活性,实施其细胞保护功能^[8-9]。Apollon 在多种

恶性肿瘤中过表达,其过表达可能是儿童急性白血病的风险因子^[10],也与前列腺癌去势治疗抵抗有关^[11],Apollon 还被认为是上皮性卵巢癌术后不良预后的一个指标^[12]。

HER-2 为 I 型跨膜酪氨酸激酶受体家族成员。在病理状态下,HER-2 过表达可通过 Ras/MAPK 通路及 PI3K/Akt 通路促进细胞增殖、抑制细胞凋亡^[13]。HER-2 在乳腺癌中已被广泛研究,研究结果显示 HER-2 过表达与乳腺癌不良预后有关^[14]。国内近期发表的一项分析了 476 例乳腺癌病例的研究则表明,HER-2 表达情况是影响乳腺癌无病生存期及总生存期的独立因素^[15]。因此,HER-2 已成为判断乳腺癌预后的重要分子标志物。survivin 是目前 IAPs 家族中被研究得最为广泛的一个成员,最新的一项 Meta 分析研究显示,survivin 过表达与乳腺癌不良预后关系密切^[16]。

在本研究中,Apollon 表达与 HER-2 表达、survivin 表达、肿瘤大小及淋巴结状态相关。该结果与笔者最近发表的一项研究结果相似^[17],在该研究中,Apollon 表达与 HER-2 表达、ER、PR 及淋巴结状态相关,但与肿瘤大小无关。两项研究在 Apollon 表达与肿瘤大小相关性的差异,可能源于标本取材的不同。本研究为手术切除标本,笔者的另一项研究则为乳腺癌活组织检查组织,手术切除癌组织与活组织检查癌组织相比,二者在反映肿瘤生物学特性的能力上可能存在差异,而该差异可能是导致两项研究在 Apollon 表达与肿瘤大小相关性上不一致的可能原因之一。

Apollon 与 survivin 为同家族蛋白,二者在乳腺癌组织中的表达可能存在相似之处。两项分别包含 81 例及 86 例乳腺浸润性导管癌的研究显示,survivin 蛋白表达与 HER-2 蛋白表达相关^[18-19],一项更早的、包含了 420 例乳腺癌病例的研究也得出了类似结果^[20]。但也有研究显示 survivin 蛋白表达与 HER-2 蛋白表达无关^[21]。而另一方面,在 survivin 蛋白表达与乳腺癌肿瘤大小是否存在相关性的研究上也存在不同的结果。有研究显示 survivin 蛋白表达与肿瘤大小、淋巴结状态相关^[18,22],但也有研究表明 survivin 蛋白表达虽然与淋巴结状态相关,但与肿瘤大小无关^[23-24]。产生上述不一致的结果可能有如下原因:样本不

够大、抗体不同、染色方法及阳性评判标准的差异,此外,样本是否经过化疗、放射治疗及治疗方法的差异都可能导致免疫组织化学染色结果的差异。

综上所述,Apollon 与乳腺癌相关生物学标志物及重要病理参数的相关性提示,Apollon 有望成为评估乳腺癌生物学行为的指标之一,因此有必要对 Apollon 表达的临床意义进行深入研究。

参 考 文 献

- [1] Chen W, Zheng R, Zeng H, et al. Annual report on status of cancer in China, 2011[J]. Chin J Cancer Res, 2015;27(1): 2-12.
- [2] Pennati M, Millo E, Gandellini P, et al. RNA interference-mediated validation of survivin and Apollon/BRUCE as new therapeutic targets for cancer therapy [J]. Curr Top Med Chem, 2012, 12(2): 69-78.
- [3] 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.
- [4] 曹丹霞, 何建蓉, 沈坤炜, 等. 激素受体和 HER-2 及 Ki-67 预测乳腺癌新辅助化疗疗效价值的分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2012, 19(13): 1000-1003.
- [5] Cotter TG. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field [J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(7): 501-507.
- [6] Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins--suppressors of apoptosis[J]. Genes Dev, 1999, 13(3): 239-252.
- [7] Hauser HP, Bardhoff M, Pyrowolakis G, et al. A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors [J]. J Cell Biol, 1998, 141(6): 1415-1422.
- [8] Qiu XB, Goldberg AL. The membrane-associated inhibitor of apoptosis protein, BRUCE/Apollon, antagonizes both the precursor and mature forms of Smac and caspase-9[J]. J Biol Chem, 2005, 280(1): 174-182.
- [9] Hao Y, Sekine K, Kawabata A, et al. Apollon ubiquitinates SMAC and caspase-9, and has an essential cytoprotection function[J]. Nat Cell Biol, 2004, 6(9): 849-860.
- [10] Ismail EA, Mahmoud HM, Tawfik LM, et al. BIRC6/Apollon gene expression in childhood acute leukemia: impact on therapeutic response and prognosis[J]. Eur J Haematol, 2012, 88(2): 118-127.
- [11] Low CG, Luk IS, Lin D, et al. BIRC6 protein, an inhibitor of apoptosis: role in survival of human prostate cancer cells[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e55837.
- [12] Wang L, Chen YJ, Hou J, et al. Expression and clinical significance of BIRC6 in human epithelial ovarian cancer[J]. Tumour Biol, 2014, 35(5): 4891-4896.
- [13] 罗力亚, 刘凤玲. HER2 /neu 在肿瘤中研究进展及抗 HER2/neu 治疗[J]. 现代肿瘤医学, 2011, 19(12): 2573-2576.
- [14] Barnes DM. c-erbB-2 amplification in mammary carcinoma [J]. J Cell Biochem Suppl, 1993, 17C: 132-138.
- [15] 董莹, 康丽花, 关萌, 等. 乳腺癌患者术后辅助治疗的临床效果及其影响因素分析[J]. 吉林大学学报(医学版), 2015, 41(3): 636-642.
- [16] Song J, Su H, Zhou YY, et al. Prognostic value of survivin expression in breast cancer patients: a meta-analysis [J]. Tumour Biol, 2013, 34(4): 2053-2062.
- [17] 陈建发, 岳志强, 傅明, 等. 新辅助化疗前 apollon 在乳腺癌组织中的表达及意义[J]. 南方医科大学学报, 2015, 35(8): 1201-1205.
- [18] 李庆霞, 颜聪亚, 闫晓路, 等. 乳腺浸润性导管癌组织 FGFR1 和 Survivin 表达临床意义分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2013, 20(17): 1315-1318.
- [19] Zhang H, Jin F. HER-2 expression correlates with survivin in primary invasive ductal breast cancers[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2010, 11(5): 1201-1204.
- [20] Ryan BM, Konecny GE, Kahlert S, et al. Survivin expression in breast cancer predicts clinical outcome and is associated with HER2, VEGF, urokinase plasminogen activator and PAI-1 [J]. Ann Oncol, 2006, 17(4): 597-604.
- [21] Fuzhong T, Nan L, Jiajia G, et al. Clinical significance of the relationship between expression of survivin and effects of neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer [J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2008, 35(8): 1319-1323.
- [22] Zhang M, Zhang X, Zhao S, et al. Prognostic value of survivin and EGFR protein expression in triple-negative breast cancer (TNBC) patients[J]. Target Oncol, 2014, 9(4): 349-357.
- [23] 张真, 张小涛, 于兰, 等. 乳腺癌 CD44v6 和 Survivin 的表达与临床预后的相关性研究[J]. 中国肿瘤临床, 2011, 38(14): 835-838.
- [24] 桑占发, 王兴, 齐玉新, 等. survivin 在乳腺癌中的表达及其与 Ki-67 和 c-erbB-2 表达的关系[J]. 肿瘤防治研究, 2010, 37(7): 773-776.

(收稿日期: 2015-05-06)

(本文编辑: 宗贝歌)

陈建发, 岳志强, 傅明, 等. 乳腺癌组织中凋亡抑制蛋白 Apollon 的表达及其临床意义[J/CD]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2015, 9(5): 312-315.