

雄激素受体表达程度与乳腺癌预后的关系

阎语 玉素甫·买买提 王昶文 谭捷 赵菡阳 黄韬

【摘要】 目的 探讨乳腺癌中雄激素受体(AR)的表达程度与乳腺癌临床病理特征及乳腺癌预后的关系。**方法** 通过组织芯片(购自上海芯超生物科技有限公司,芯片号:K14-051)收集2001年1月至2008年7月期间接受乳腺癌改良根治术的310例乳腺浸润性导管癌患者的病例资料,应用免疫组织化学技术检测癌组织中AR的表达,并采用 χ^2 检验比较患者年龄、淋巴结转移情况及ER、P53、Ki67表达情况与AR表达程度的关系,采用非参数秩和检验比较患者分子分型、肿瘤大小、乳腺癌组织学分级与AR表达程度的关系,绘制Kaplan-Meier生存曲线研究AR表达程度对乳腺癌患者预后的影响,并用Cox比例风险回归模型探讨影响乳腺癌患者预后的独立因素。**结果** AR阳性表达、弱阳性表达、阴性表达患者分别为155、100、55例,所占比例为50% (155/310)、32% (100/310)、18% (55/310)。AR的表达程度与患者年龄、分子分型、组织学分级、ER及P53表达程度有关($\chi^2 = 7.128, P = 0.028; Z = 56.099, P < 0.001; Z = 10.144, P = 0.006; \chi^2 = 65.577, P < 0.001; \chi^2 = 16.127, P < 0.001$)。Kaplan-Meier生存分析显示,不同AR表达程度的患者间OS率差异有统计学意义($\chi^2 = 11.965, P = 0.003$),其中AR阳性表达(81.3%)、AR弱阳性表达组(87.0%) OS率均高于AR阴性表达组(67.3%) ($\chi^2 = 5.991, P = 0.014; \chi^2 = 10.335, P = 0.001$),而AR阳性表达组与AR弱阳性表达组比较,OS率差异无统计学意义($\chi^2 = 2.386, P = 0.122$)。Cox回归分析显示,AR、肿瘤大小、淋巴结状态以及分子分型是乳腺癌预后的独立预测因素($OR = 0.559, 95\% CI: 0.318 \sim 0.981, P = 0.043; OR = 1.505, 95\% CI: 1.047 \sim 2.161, P = 0.027; OR = 1.616, 95\% CI: 1.046 \sim 2.497, P = 0.030; OR = 1.457, 95\% CI: 1.023 \sim 2.076, P = 0.037$)。**结论** AR表达程度与乳腺癌预后有关,可作为其不良预后的独立预测因子。

【关键词】 乳腺肿瘤; 受体,雄激素; 免疫组织化学; 预后

【中图分类号】 R737.9

【文献标志码】 A

Correlation analysis of androgen receptor expression with breast cancer prognosis Yan Yu, Yusufu · Maimaiti, Wang Changwen, Tan Jie, Zhao Qiuyang, Huang Tao. Department of Breast and Thyroid Surgery, Wuhan Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

Corresponding author: Huang Tao, Email: huangtaowh@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the relationship of androgen receptor (AR) expression with clinicopathological characteristics and the prognosis of breast cancer. **Methods** Using tissue microarray (purchased from Shanghai Xinchao Biotechnological Co., Ltd., No. K14-051), we collected the data of 310 patients with breast invasive ductal carcinoma who underwent modified mastectomy from January 2001 to July 2008. The expression of AR was detected by immunohistochemistry. The relationship of AR expression with patients' age, lymphatic metastasis, ER, P53, and Ki67 expression was analyzed using χ^2 test. The relationship of AR expression with molecular subtype, tumor size and histological grade was analyzed by nonparametric rank sum test. The Kaplan-Meier survival curve was used to investigate the impact of AR on breast cancer prognosis, and Cox regression model was used to explore independent factors in the prognosis of breast cancer. **Results** In all 310 patients, there were 155 patients with AR positive, 100 AR weakly positive, 55 AR negative, accounting for 50%, 32% and 18% respectively. AR expression was correlated with patients' age, molecular subtype, histological grade, ER, and P53 expression ($\chi^2 = 7.128, P = 0.028; Z = 56.099, P < 0.001; Z = 10.144, P = 0.006; \chi^2 = 65.577, P < 0.001; \chi^2 = 16.127, P < 0.001$). There was a significant difference in overall survival among three groups with different AR expression ($\chi^2 = 11.965, P =$

0.003)。The overall survival in AR positive group (81.3%) or AR weakly positive group (87.0%) was significantly higher than that in AR negative group (67.3%) ($\chi^2 = 5.991$, $P = 0.014$; $\chi^2 = 10.335$, $P = 0.001$), while the overall survival showed no statistical difference between AR positive group and AR weakly positive group ($\chi^2 = 2.386$, $P = 0.122$)。Cox regression showed that AR, tumor size, lymph node status and molecular subtypes were the independent predictive factors in the prognosis of breast cancer ($OR = 0.559$, 95% CI : 0.318–0.981, $P = 0.043$; $OR = 1.505$, 95% CI : 1.047–2.161, $P = 0.027$; $OR = 1.616$, 95% CI : 1.046–2.497, $P = 0.030$; $OR = 1.457$, 95% CI : 1.023–2.076, $P = 0.037$)。Conclusion AR expression is associated with the prognosis of breast cancer, so it can be used as an independent predictive factor in the prognosis of breast cancer.

【Key words】 Breast neoplasms; Receptor, androgen; Immunohistochemistry; Prognosis

早期影像检验技术与辅助化疗的进步大大提高了乳腺癌患者的生存期^[1],但乳腺癌仍是中国女性癌症死亡的主要原因之一。ER 和 PR 早已被证明为乳腺癌的独立预后因子^[2]。有研究表明,女性体内高水平雌激素的存在可致乳腺癌发病率上升,但绝经后妇女乳腺癌发病率并未随体内雌激素的减少而下降^[3]。与 ER、PR 有着相似结构的 AR 在各种分子分型的乳腺癌中均有较高的阳性率,已有研究表明,AR 阴性乳腺癌肿瘤组织分化程度低,肿瘤侵袭能力和复发转移风险明显高于 AR 阳性乳腺癌^[4]。那么 AR 是否与乳腺癌患者的预后密切相关?本研究利用组织芯片对 310 例乳腺浸润性导管癌患者的临床病理资料进行整合,应用免疫组织化学技术检测 AR 表达程度,以期探讨 AR 表达程度与乳腺癌相关病理因素及预后的关系。

资料与方法

一、一般资料

310 点乳腺癌组织芯片(购自上海芯超生物科技有限公司,芯片号:K14-051)收录了 2001 年 1 月至 2008 年 7 月期间接受正规手术治疗的 310 例女性乳腺浸润性导管癌患者资料,术后随访至 2013 年 12 月。所有患者随访资料完整,原始病历资料详细记载患者的年龄、性别、肿瘤位置、大小、临床分期、术后病理报告及生存时间。310 例患者术前均无远处转移,患者年龄 29~88 岁,中位年龄 54 岁。采用美国癌症联合委员会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)第 6 版分期标准^[5]进行分期,310 例患者临床分期为 I 期 47 例(15.2%),II 期 181 例(58.4%),III 期 71 例(22.9%),未分期 11 例(3.5%),有淋巴结有转移者 163 例(52.6%),无转移者 147 例(47.4%)。

二、免疫组织化学方法

1. 实验试剂及染色方法

兔抗人 AR 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司,免疫组织化学 SP 试剂盒及 DAB 显色试剂盒购自武

汉谷歌生物科技有限公司。组织芯片内每个位点均具有相应的 HE 染色结果,保证每例标本代表性的乳腺癌癌组织,采用 SP 免疫组织化学法进行染色。具体步骤:(1)烤片,60℃,20 min。(2)常规二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水。(3)3% H_2O_2 37℃ 孵育 10 min, PBS 冲洗 3×5 min,灭活内源性过氧化物酶。(4)枸橼酸缓冲液(pH 值=6.0)中煮沸 15~20 min,自然冷却后冷水冲洗, PBS 冲洗 3×5 min。(5)正常羊血清工作液封闭,37℃,10 min。(6)滴加 AR 单克隆抗体 4℃ 冰箱孵育过夜, PBS 冲洗 3×5 min(用 PBS 缓冲液代替一抗作阴性对照),滴加生物素标记二抗,37℃ 孵育 30 min, PBS 冲洗 3×5 min。(7)滴加辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素工作液,37℃ 孵育 30 min, PBS 冲洗 3×5 min。(8)DAB/ H_2O_2 反应染色,用自来水充分冲洗后苏木素复染,常规脱水,透明,干燥,封片。制成的切片使用 Aperio ScanScope 切片扫描仪进行扫描。

2. 结果判读

所有标本均由两位病理科医师采用双盲法进行判读,肿瘤细胞核内出现棕黄色颗粒为 AR 阳性表达细胞。着色细胞数为 0 或<10%为 AR 阴性表达组;10%~25%为 AR 弱阳性表达组;>25%为 AR 阳性表达组^[6]。

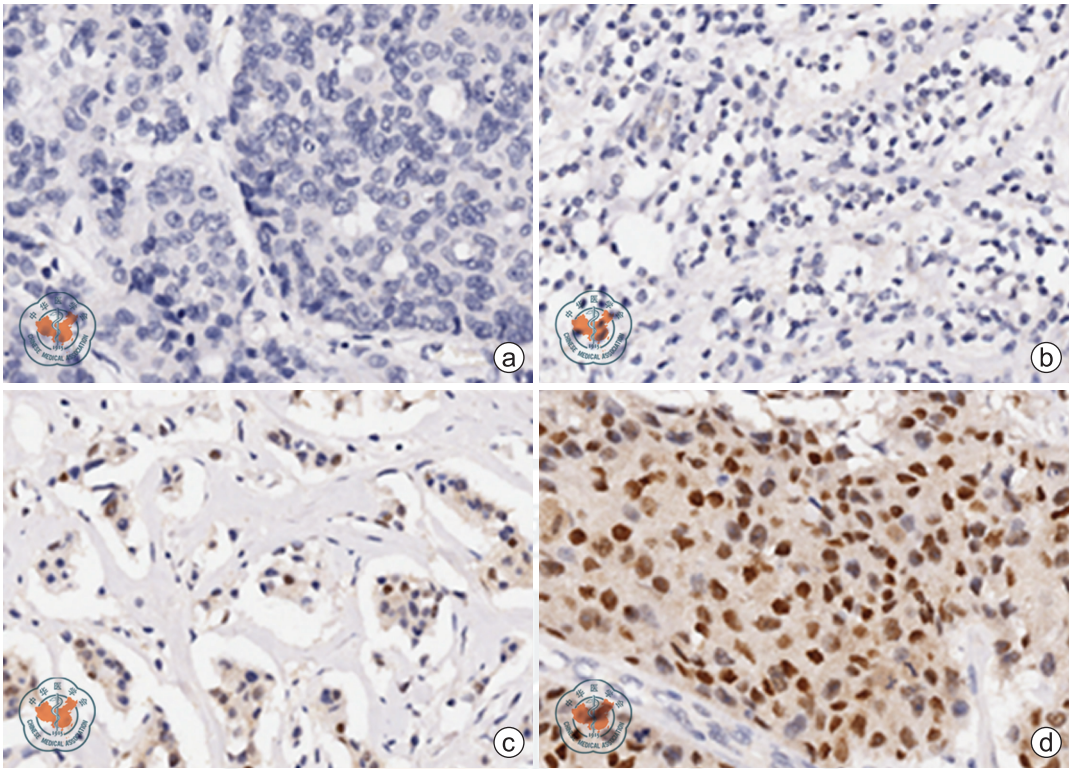
三、统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。AR 表达程度与患者年龄、淋巴结转移情况及 ER、P53、Ki67 表达情况的关系采用 χ^2 检验,肿瘤大小、乳腺癌组织学分级采用非参数秩和检验, Kaplan-Meier 生存曲线用于研究 AR 表达程度对乳腺癌预后的影响。应用 Cox 比例风险回归模型分析影响乳腺癌预后的各临床病理因素,各变量赋值见表 1。 $P < 0.050$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、AR 表达程度与乳腺癌患者临床病理特征分析

AR 阳性表达、弱阳性表达、阴性表达患者分别为 155、100、55 例,所占比例为 50%(155/310)、32%



注:AR 为雄激素受体;a 图为 AR 表达的阴性对照(SP ×400);b 图为 AR 阴性表达(SP ×400);c 图为 AR 弱阳性表达(SP ×400);d 图为 AR 阳性表达(SP ×400)

图 1 AR 在乳腺癌组织中表达的免疫组织化学染色结果

表 1 影响乳腺癌中 AR 表达的临床病理因素赋值表

变量	变量分类及赋值
年龄	<50 岁=0, ≥50 岁=1
肿瘤大小	T ₁ =1, T ₂ =2, T ₃₋₄ =3
淋巴结转移	无=0, 有=1
组织学分级	1 级=1, 2 级=2, 3 级=3
分子分型	luminal A=1, luminal B=2, HER-2 过表达=3, 三阴性=4
ER	阴性=0, 阳性=1
HER-2	阴性=0, 阳性=1
AR	阴性=0, 阳性=1
Ki67	<14%=0, ≥14%=1
P53	阴性=0, 阳性=1

注:AR 为雄激素受体

(100/310)、18% (55/310)。各组免疫组织化学染色如图 1 所示。AR 表达程度与 310 例患者年龄、分子分型、肿瘤大小、是否有淋巴结转移、组织学分级以及 ER、P53、Ki67 表达的关系如表 2 所示。AR 的表达程度与患者年龄、分子分型、组织学分级、ER、P53 表达程度有关。

二、AR 表达程度与乳腺癌患者预后的关系

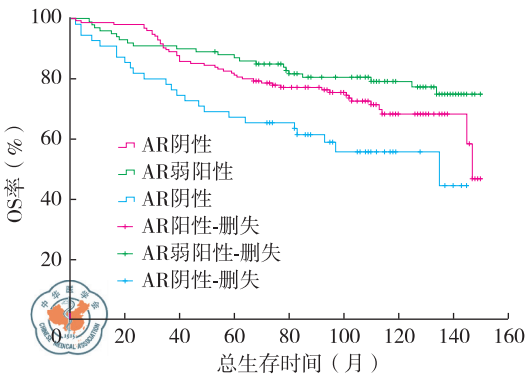
1. Kaplan-Meier 生存分析

截至 2013 年 12 月,310 例乳腺癌患者生存期

为 2~162 个月,中位生存期为 103 个月,91 例患者死亡,其中 AR 阳性表达、弱阳性表达、阴性表达组死亡例数分别为 24、22、45 例,占各组总例数的 15.49% (24/155)、22.00% (22/100)、81.82% (45/55)。对 310 例乳腺癌患者使用 Kaplan-Meier 法作生存曲线,结果如图 2 所示,各组患者 OS 率差异有统计学意义($\chi^2=11.965, P=0.003$)。

2. Cox 多因素预后分析

对经过筛选的影响乳腺癌预后的临床病理因素



注:AR 为雄激素受体;AR 阳性表达(81.3%)、AR 弱阳性表达组(87.0%)OS 率均高于 AR 阴性表达组(67.3%), $\chi^2=5.991, 10.335, P=0.014, 0.001$;AR 阳性表达组与 AR 弱阳性表达组比较,OS 率差异无统计学意义, $\chi^2=2.386, P=0.122$

图 2 不同 AR 表达乳腺癌患者的生存曲线比较

(肿瘤大小、淋巴结转移、分子分型、ER 表达、AR 表达)进行 Cox 多因素预后分析。结果显示 AR、肿瘤大小、淋巴结转移状态以及分子分型是影响乳腺癌预后的重要因素(表 3)。

表 2 310 例浸润性乳腺癌组织 AR 表达与临床病理特征的关系

临床病理特征	例数	AR 表达(例)			检验值	P 值
		阳性	弱阳性	阴性		
年龄						
<50 岁	110	44	41	25	$\chi^2 = 7.128$	0.028
≥50 岁	200	111	59	30		
分子分型						
luminal A	136	12	50	74	$Z = 56.099$	<0.001
luminal B	75	3	21	51		
HER-2 过表达	36	6	13	17		
三阴性	63	34	16	13		
肿瘤大小						
T ₁	79	43	24	12	$Z = 4.442$	0.109
T ₂	197	102	63	32		
T ₃₋₄	34	10	13	11		
淋巴结转移						
无	146	74	41	31	$\chi^2 = 1.045$	0.307
有	164	81	59	24		
组织学分级						
1 级	48	19	23	6	$Z = 10.144$	0.006
2 级	236	127	71	38		
3 级	26	9	6	11		
ER						
阴性	109	34	30	45	$\chi^2 = 65.577$	<0.001
阳性	201	121	70	10		
P53						
阴性	91	32	44	15	$\chi^2 = 16.127$	<0.001
阳性	219	123	56	40		
Ki67						
≥14%	99	47	28	24	$\chi^2 = 4.362$	0.113
<14%	211	108	72	31		

注:AR 为雄激素受体

表 3 浸润性乳腺癌中 AR 表达与临床病理特征关系的 Cox 多因素回归分析($n=310$)

临床病理特征	回归系数	标准误	Wald 值	P 值	OR 值	95% 置信区间
分子分型	0.377	0.180	4.353	0.037	1.457	1.023 ~ 2.076
肿瘤大小	0.409	0.185	4.887	0.027	1.505	1.047 ~ 2.161
淋巴结转移	0.480	0.222	4.683	0.030	1.616	1.046 ~ 2.497
AR	-0.582	0.287	4.101	0.043	0.559	0.318 ~ 0.981
ER	0.576	0.454	1.610	0.204	1.780	0.731 ~ 4.335

注:AR 为雄激素受体

讨 论

核受体甾族化合物家族既是细胞信号通路的决定性部件,也在调节基因表达方面有着重要作用,有着与 ER、PR 极其相似结构的 AR 便是该家族中一员。ER、PR 在乳腺癌预后和内分泌治疗靶点方面的价值现已明确^[3],但 AR 在乳腺癌的发生、发展中扮演的生物学角色依旧备受争议。在正常的乳腺上皮细胞中,AR 有着广泛的表达。近年来研究表明,无论乳腺癌细胞 ER 的表达程度如何,AR 均有 60%~80% 的阳性率^[1,6-7]。AR 与 ER 是共表达的关系,一篇样本量为 7 693 例患者的系统性综述中提到,ER 阳性的乳腺癌患者的 AR 阳性率为 74.8%,而 ER 阴性患者的 AR 阳性率仅有 31.8%^[7]。且研究表明,对于 ER 阳性乳腺癌和三阴性乳腺癌患者,AR 阳性往往提示着良好的预后^[8],但在 ER 阴性乳腺癌中,AR 却是不良预后的指标^[9]。本研究对 310 例乳腺浸润性导管癌患者病理资料进行分析后发现,AR 阳性表达、AR 弱阳性表达组患者的 OS 明显高于 AR 阴性表达组,但 AR 阳性表达组与 AR 弱阳性表达组相比,OS 之间差异无统计学意义,这与 Cogliati 等^[10]提出的上调 AR 表达可改善乳腺癌患者预后的结论基本相符。但乳腺癌患者的预后与 AR 表达程度间是否存在线性相关,是一个值得探讨的议题。

AR 对乳腺癌细胞的调控是一个复杂的多通道途径。目前研究表明,AR 通过丝裂原激活的蛋白激酶-ER/PR 信号通路调节乳腺癌细胞增殖^[11]。机体中 ER 由不同基因转录为 ER α 、ER β 两个亚型,Peters 等^[12]研究发现 AR 能够通过抑制 ER α 活性,切断其介导的信号通路来抑制乳腺上皮细胞增殖,Need 等^[13]的研究也证明了这一点。同时,AR 能够上调 ER β 的表达,抑制肿瘤细胞的侵袭转移^[14],增加患者对他莫昔芬的敏感度^[15],这可能与雌激素和雄激素之间存在拮抗作用,且两者的拮抗作用达到较好的平衡状态有关^[12],也解释了为何激素依赖型乳腺癌 AR 阳性患者预后较好。Micello 等^[16]发现,在 ER、PR 阴性的乳腺癌细胞中,AR 可上调 HER-2 的表达,而 HER-2 在雌激素刺激下可以活化信号分子大鼠肉瘤蛋白,促进肿瘤细胞增殖。也有研究表明,AR 可通过下调 E-钙黏蛋白的表达增加肿瘤转移概率,通过下调 B 淋巴细胞瘤-2 蛋白的表达来诱导乳腺癌细胞凋亡^[17]。这都表明 AR 对乳腺癌细胞的侵袭转移起着双向作用,盲目提升 AR 表达程度并不能很好地抑制乳腺癌发生、发展。

乳腺癌中 AR 的重要性远在 20 世纪便被发现。

在20世纪40年代到80年代间,雄激素混合物曾被广泛应用于乳腺癌的治疗^[18],因其过多的不良反应,这种疗法逐渐被抗雌激素的内分泌治疗所取代。近年来 Ingle 等^[19]的研究中提到,对接受过手术治疗的绝经后乳腺癌患者给予氟甲睾酮后,肿瘤生长可有不同程度的抑制,效果不逊色于他莫昔芬。Peters 等^[20]的动物实验也验证了在小鼠乳腺组织上使用 AR 激动剂双氢睾酮可明显抑制其乳腺上皮细胞增殖。但同时 De Amicis 等^[21]的研究发现,高表达的 AR 可使肿瘤细胞产生他莫昔芬耐药。因此,在针对 AR 的乳腺癌临床靶向治疗中,如何调控 AR 的表达程度,如何寻求 AR 与 ER 之间的平衡,都值得学者们进一步探索。

随着对乳腺癌分子异质性研究的深入以及抗雌激素治疗耐药性的产生,AR 再次成为乳腺癌靶向治疗的研究热点^[22]。AR 作为乳腺癌的辅助预后因子,既可用于疾病转归的评估,也能在一定程度上指导乳腺癌内分泌治疗^[9]。在今后的临床工作中,AR 也许会如同 ER、PR、HER-2、Ki67 等指标一样,被列入乳腺癌免疫组织化学常规检查项目。

参 考 文 献

- [1] Safarpour D, Tavassoli FA. A targetable androgen receptor-positive breast cancer subtype hidden among the triple-negative cancers[J]. Arch Pathol Lab Med, 2015, 139(5): 612-617.
- [2] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials[J]. Lancet, 2005, 365(9472): 1687-1717.
- [3] Key T, Appleby P, Barnes I, et al. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies[J]. J Natl Cancer Inst, 2002, 94(8): 606-616.
- [4] Agrawal AK, Jeleń M, Grzebieniak Z, et al. Androgen receptors as a prognostic and predictive factor in breast cancer[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2008, 46(3): 269-276.
- [5] Singletary SE, Connolly JL. Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual[J]. CA Cancer J Clin, 2006, 56(1): 37-47; quiz 50-31.
- [6] Wang X, Yarid N, McMahon L, et al. Expression of androgen receptor and its association with estrogen receptor and androgen receptor downstream proteins in normal/benign breast luminal epithelium[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2014, 22(7): 498-504.
- [7] Vera-Badillo FE, Templeton AJ, de Gouveia P, et al. Androgen receptor expression and outcomes in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. J Natl Cancer Inst, 2014, 106(1): djt319.
- [8] Hu R, Dawood S, Holmes MD, et al. Androgen receptor expression and breast cancer survival in postmenopausal women[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(7): 1867-1874.
- [9] Elebro K, Borgquist S, Simonsson M, et al. Combined androgen and estrogen receptor status in breast cancer: treatment prediction and prognosis in a population-based prospective cohort[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(16): 3640-3650.
- [10] Cogliati P, Ciniselli CM, Agresti R, et al. Androgen receptor CAG repeat length and estrogen receptor status in postmenopausal breast cancer prognosis[J]. Int J Biol Markers, 2015, 30(4): e418-424.
- [11] Hardin C, Pommier R, Calhoun K, et al. A new hormonal therapy for estrogen receptor-negative breast cancer[J]. World J Surg, 2007, 31(5): 1041-1046.
- [12] Peters AA, Buchanan G, Ricciardelli C, et al. Androgen receptor inhibits estrogen receptor-alpha activity and is prognostic in breast cancer[J]. Cancer Res, 2009, 69(15): 6131-6140.
- [13] Need EF, Selth LA, Harris TJ, et al. Research resource: interplay between the genomic and transcriptional networks of androgen receptor and estrogen receptor alpha in luminal breast cancer cells[J]. Mol Endocrinol, 2012, 26(11): 1941-1952.
- [14] Rizza P, Barone I, Zito D, et al. Estrogen receptor beta as a novel target of androgen receptor action in breast cancer cell lines[J]. Breast Cancer Res, 2014, 16(1): R21.
- [15] Haldosén LA, Zhao C, Dahlman-Wright K. Estrogen receptor beta in breast cancer[J]. Mol Cell Endocrinol, 2014, 382(1): 665-672.
- [16] Micello D, Marando A, Sahnane N, et al. Androgen receptor is frequently expressed in HER2-positive, ER/PR-negative breast cancers[J]. Virchows Arch, 2010, 457(4): 467-476.
- [17] Narita D, Raica M, Suciu C, et al. Immunohistochemical expression of androgen receptor and prostate-specific antigen in breast cancer[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2006, 44(3): 165-172.
- [18] Labrie F, Simard J, de Launoit Y, et al. Androgens and breast cancer[J]. Cancer Detect Prev, 1992, 16(1): 31-38.
- [19] Ingle JN, Suman VJ, Mailliard JA, et al. Randomized trial of tamoxifen alone or combined with fluoxymesterone as adjuvant therapy in postmenopausal women with resected estrogen receptor positive breast cancer. North Central Cancer Treatment Group Trial 89-30-52[J]. Breast Cancer Res Treat, 2006, 98(2): 217-222.
- [20] Peters AA, Ingman WV, Tilley WD, et al. Differential effects of exogenous androgen and an androgen receptor antagonist in the peri- and postpubertal murine mammary gland[J]. Endocrinology, 2011, 152(10): 3728-3737.
- [21] De Amicis F, Thirugnansampathan J, Cui Y, et al. Androgen receptor overexpression induces tamoxifen resistance in human breast cancer cells[J]. Breast Cancer Res Treat, 2010, 121(1): 1-11.
- [22] McNamara KM, Moore NL, Hickey TE, et al. Complexities of androgen receptor signalling in breast cancer[J]. Endocr Relat Cancer, 2014, 21(4): T161-181.

(收稿日期:2015-10-25)

(本文编辑:宗贝歌)

阎语,玉素甫·买买提,王昶文,等.雄激素受体表达程度与乳腺癌预后的关系[J/CD].中华乳腺病杂志:电子版,2016,10(3):146-150.