

〔临床基础研究/论著〕

三阴性乳腺癌组织 DJ-1 和 PTEN 及 AR 表达 与预后相关性分析

方茅¹ 翁泽平² 关弘³ 孙艳花³ 龙捷¹ 陈启宪¹ Thoidingjam Bidyarani Chanu¹
单伟清¹ 邓素琪¹ 张化儒¹

1. 广州医学院病理教研室, 广东 广州 510000

2. 广州市华侨医院病理科, 广东 广州 510000

3. 深圳市第二人民医院病理科, 广东 深圳 518000

【摘要】 目的:探讨三阴性乳腺癌(TNBC)组织中帕金森相关蛋白(DJ-1)、第 10 号染色体同源缺失性磷酸酶—张力蛋白基因(PTEN)和雄激素受体(AR)的表达及其与临床病理因素和预后的关系。方法:免疫组织化学 SP 法检测 DJ-1、PTEN 和 AR 蛋白在 68 例 TNBC 组织和 30 例正常乳腺组织中的表达,并分析其与 TNBC 临床病理因素的关系,及其对预后的影响。结果:TNBC 组织中 DJ-1 阳性表达率为 70.6%(48/68),AR 阳性表达率为 36.8%(25/68)。正常乳腺组织中 DJ-1 阳性表达率为 6.7%(2/30),无 AR 表达。TNBC 组织中 DJ-1、AR 阳性表达率明显高于正常乳腺组织, χ^2 值分别为 7.09 和 6.72, P 值分别为 0.002 和 0.005。TNBC 组织中 PTEN 阳性表达率为 27.9%(19/68),正常乳腺组织中为 100.0%。TNBC 组织中 PTEN 阳性表达率显著低于正常乳腺组织, $\chi^2=5.94, P=0.008$ 。DJ-1、PTEN 和 AR 表达在 TNBC 组织中的表达与腋窝淋巴结转移、组织学分化和 TNM 分期密切相关, $P<0.01$ 。TNBC 组织中 DJ-1 和 AR 的表达均与 PTEN 蛋白的表达呈负相关, $r=-0.529, P=0.009$;而两者之间呈正相关, $r=0.496, P=0.011$ 。在 5 年无瘤生存率和 5 年总生存率方面,DJ-1 和 AR 表达阴性者明显高于阳性者, $P<0.01$;PTEN 表达阳性者高于阴性者, $P<0.01$ 。Cox 回归多因素分析结果表明,腋窝淋巴结转移、DJ-1、PTEN 及 AR 表达是影响 TNBC 患者 5 年无瘤生存率的独立预后因素, $P<0.05$ 。结论:TNBC 组织中 DJ-1 和 AR 过表达,而 PTEN 表达下调,三者均为 TNBC 患者预后的独立危险因素,参与调控 TNBC 的发生与预后。

【关键词】 三阴性乳腺癌;免疫组织化学;DJ-1;PTEN;AR;预后

中华肿瘤防治杂志,2013,20(10):761-764

Expression of DJ-1, PTEN and AR in triple-negative breast cancer and its correlation with relative clinical parameters and prognosis

FANG Mao¹, WENG Ze-ping², GUAN Hong³, SUN Yan-hua³, LONG Jie¹, CHEN Qi-xian¹,
Thoidingjam Bidyarani Chanu¹, SHAN Wei-qing¹, DENG Su-qi¹, ZHANG Hua-ru¹

1. Department of Pathology, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510000, P. R. China

2. Department of Clinical Pathology, Guangzhou Huaqiao Hospital, Guangzhou 510000, P. R. China

3. Department of Pathology, Second People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518000, P. R. China

【ABSTRACT】 **OBJECTIVE:** To investigate the association among the expression of DJ-1, PTEN and AR in triple-negative breast cancer tissues, and explore the correlation between the expression and its relative clinical parameters. **METHODS:** We collected 68 cases of TNBC and 30 cases of normal people to determine the expression of DJ-1, PTEN and AR by using immunohistochemical staining. **RESULTS:** The positive expression rates of DJ-1 and AR in TNBC were 70.6% (48/68) and 36.8% (25/68) respectively. In contrast, the positive expression of DJ-1 in normal tissues was only 6.7% (2/30). In normal tissues no AR expressed. Compare to normal tissues, the positive expression rates of DJ-1 and AR were significantly increased (χ^2 were 7.09 and 6.72, P were 0.002 and 0.005). The positive expression rate of PTEN in TNBC was only 27.9% (19/68), but positive expression in normal tissues was 100.0%. Compare to normal tissues, PTEN positive expression in TNBC was significantly decreased ($\chi^2=5.94, P=0.008$). The expression of DJ-1, PTEN and AR in TNBC were significantly associated with lymph node metastasis, differentiation and TMN stages ($P<0.01$). In 68 TNBC, DJ-1 and AR expression was negatively correlated with PTEN expressions ($r=-0.529, P=0.009$). DJ-1

【基金项目】 广东省自然科学基金(S2012040007232);广州医学院科学研究项目(L110503);2012-2013 年度广州医学院大学生课
外科技活动项目(2012A001;2012A006)

【通讯作者简介】 方茅,女,广东揭阳人,博士,讲师,主要从事肿瘤病理学的研究工作。

Tel: 86-20-81340347 E-mail: pathodream@gmail.com

was positively correlated with AR expression ($r=0.496, P=0.011$). Using Cox regression, lymph node metastasis, DJ-1, PTEN and AR were strong independent prognostic factors for five years of disease-free survival rate of TNBC patients ($P<0.05$). **CONCLUSIONS:** DJ-1, PTEN and AR may contribute to the development of TNBC and are valuable prognostic factors for TNBC patients. DJ-1 may regulate AR expression via inhibiting PTEN expression. The cooperation of these three proteins may be related to the prognosis of TNBC.

[KEYWORDS] Triple-negative breast cancer; immunohistochemistry; DJ-1; PTEN; AR; prognosis

Chin J Cancer Prev Treat, 2013, 20(10): 761-764

【中图分类号】 R737.9 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-5269(2013)10-0761-04

三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TN-BC) 是一类雌激素和孕激素受体以及表皮生长因子受体-2(human epidermal growth factor receptor-2, HER-2)均为阴性表达的高危乳腺癌,具有侵袭性强和容易远处转移的临床病理特征,预后较其他类型的乳腺癌差,同时由于无法进行针对激素受体的内分泌治疗和针对 HER-2 的 Herceptin(Trastuzumab)靶向治疗,给治疗带来极大困难^[1]。因此,探讨 TNBC 的发病机制,寻找新的有效诊断分子标志和治疗靶标,是提高 TNBC 治疗效果、改善患者预后的关键。本研究应用免疫组织化学方法检测帕金森相关蛋白(DJ-1)、第 10 号染色体同源缺失性磷酸酶-张力蛋白基因(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN)和雄激素受体(androgen receptor, AR)在 TNBC 组织中的表达,探讨三者表达与 TNBC 临床病理因素的关系及其对预后的影响。

1 材料与方法

1.1 标本来源

选择 2000-01-01-2004-10-30 深圳市第二人民医院手术切除且均经病理确诊的 TNBC 组织石蜡标本 68 例。患者均为女性,年龄 31~72 岁,平均年龄(51.6±6.5)岁,中位年龄 45 岁。30 例正常乳腺组织石蜡标本取自同期深圳市第二人民医院的乳腺纤维腺瘤切除手术,均经病理证实为正常乳腺组织。

1.2 免疫组织化学

所有标本均经 10% 中性甲醛固定,石蜡包埋,连续 4 μm 切片。采用免疫组织化学 SP 法检测 TNBC 组织及正常乳腺组织中 DJ-1、PTEN 和 AR 蛋白的表达。SP 试剂盒购自福建迈新生物技术有限公司, DJ-1 鼠抗人单克隆抗体(Novus 公司)、PTEN 兔抗人多克隆抗体和 AR 兔抗人单克隆抗体均购自 Cell Signaling Technology。操作程序按说明书进行。

1.3 结果判断标准

DJ-1 表达阳性为细胞质或细胞核呈现棕黄或棕褐色颗粒,AR 表达阳性为细胞核呈现棕黄或棕褐色颗粒,PTEN 表达阳性为细胞质呈现棕黄或棕褐色颗粒。采

用半定量评分法,随机选择 5 个视野,总共计数 200 个细胞。阳性染色强度:无色为 0 分;染色微弱为 1 分;染色清晰,细胞核或胞质中等强度棕黄色为 2 分;染色程度强,细胞核或胞质呈深棕色为 3 分。阳性细胞数:无阳性细胞为 0 分,阳性细胞≤20%为 1 分,阳性细胞占>20%~50%为 2 分,阳性细胞>50%为 3 分。上述两项评分相乘,0~2 分为阴性,≥3 分为阳性表达。

1.4 随访

所有患者均接受手术治疗,并根据患者情况予以放、化疗,均未进行内分泌治疗。通过门诊或电话随访 68 例 TNBC 患者的生存情况,包括患者总生存期和无病生存期。随访截至 2009-12-30。总生存期定义为自手术切除肿瘤日期开始至死亡或末次随访的时间。无病生存期定义为自手术切除肿瘤日期开始至发生复发或死亡的时间。

1.5 统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计软件。计数资料比较采用 χ^2 检验,生存资料作 Kaplan-Meier 生存曲线,并进行 Log-rank 检验和 Cox 多因素分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 DJ-1 和 PTEN 及 AR 的表达

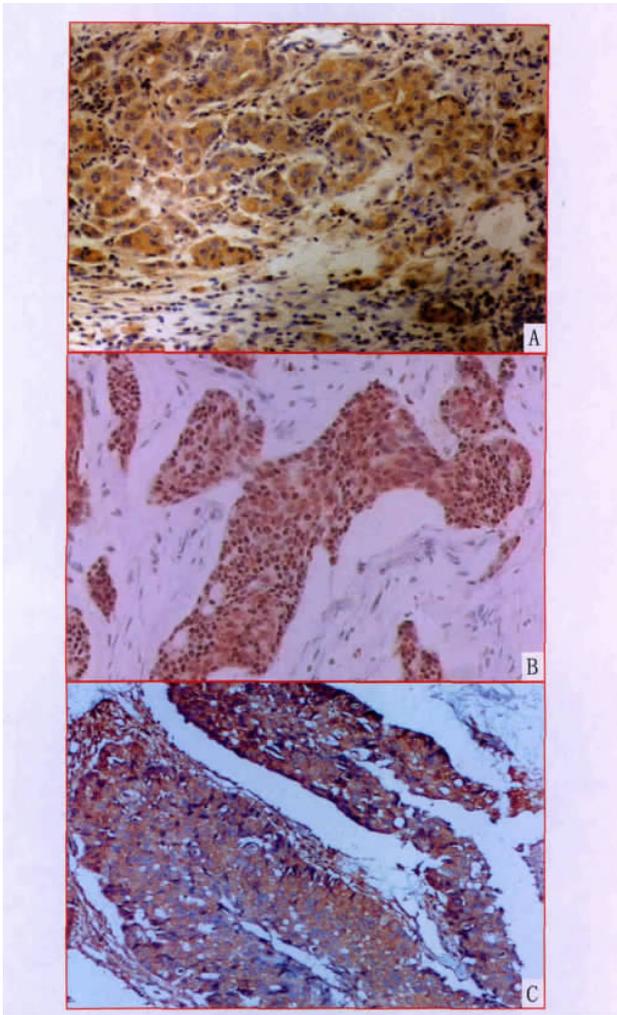
68 例 TNBC 组织,48 例呈 DJ-1 阳性表达(图 1A),表达率为 70.6%;25 例呈 AR 阳性表达(图 1B),表达率为 36.8%。30 例正常乳腺组织,2 例 DJ-1 呈弱阳性表达,表达率为 6.7%,无 AR 表达。TNBC 组织中 DJ-1、AR 阳性表达率明显高于正常乳腺组织, χ^2 值分别为 7.09 和 6.72, P 值分别为 0.002 和 0.005。

68 例 TNBC 组织中 19 例呈 PTEN 阳性表达(图 1C),表达率为 27.9%;而 30 例正常乳腺组织中均呈阳性表达,阳性表达率为 100.0%。TNBC 组织中 PTEN 阳性表达率显著性低于正常乳腺组织, $\chi^2=5.94, P=0.008$ 。

2.2 蛋白表达及其与 TNBC 临床特征的相关性

DJ-1、PTEN 和 AR 在 TNBC 组织中的表达与腋窝淋巴结转移、组织学分化和 TNM 分期密切相关, $P<0.01$;而与年龄、肿瘤大小和月经状况无关(表 1)。

68 例 TNBC 组织中, DJ-1 和 AR 的表达均和 PTEN 蛋白的表达呈负相关, $r = -0.529$, $P = 0.009$; 而两者之间呈正相关, $r = 0.496$, $P = 0.011$ 。



A: DJ-1 表达于细胞质; B: AR 表达于细胞核; C: PTEN 表达于细胞质

图 1 TNBC 组织 DJ-1 和 AR 及 PTEN 的
阳性表达 (SP×200)

2.3 蛋白表达对 TNBC 患者预后的影响

68 例 TNBC 患者获完整随访, 随访率 100.0%, 随访过程中, 死亡 19 例 (27.9%)。经 Kaplan-Meier 生存率曲线及 Log-rank 显著性检验 5 年无瘤生存率和 5 年总生存率, DJ-1 表达阴性者明显高于阳性者, $P < 0.01$; AR 表达阴性者明显高于阳性者, $P < 0.01$; 而 PTEN 表达阳性者明显高于阴性者, $P < 0.01$ 。

Cox 回归单因素分析结果显示, 腋窝淋巴结转移、DJ-1 和 PTEN 及 AR 表达是影响 TNBC 患者 5 年无瘤生存率的独立预后因素, $P < 0.05$ (表 2)。

3 讨论

TNBC 治疗的难点在于发病机制不清, 缺乏明确

的治疗靶点^[2-3]。因此, 探明 TNBC 的发病机制, 不仅有助于判断 TNBC 患者的预后; 同时, 为寻找和鉴定具有诊断和治疗价值的 TNBC 分子标志以及治疗靶点具有重要意义。

DJ-1 在乳腺癌、卵巢癌和前列腺癌等多种肿瘤组织中呈高表达, 并与恶性肿瘤演进与预后等密切相关, 是潜在的肿瘤治疗靶点^[4-5]。AR 是一种激素依赖性的肿瘤, 大多数的乳腺癌细胞都表达。李中琦等^[6]发现, AR 在 TNBC 中阳性表达率明显低于非 TNBC 组织。近年来研究发现, AR 通路是 TNBC 发病的关键机制, DJ-1 和 AR 有望成为 TNBC 靶向治疗的新靶点^[7-8]。但两者对 TNBC 的具体调节机制尚不明确。本研究结果表明, DJ-1、AR 的高表达在 TNBC 发生的早期过程中起重要作用, 同时也对 TNBC 的恶性增殖、淋巴结转移、侵袭性强和容易远处转移的生物学行为有重要影响。本研究随访了 TNBC 患者的 5 年无瘤生存率和 5 年总生存率发现, TNBC 组织中 DJ-1 表达阴性者明显高于阳性者, $P < 0.01$; AR 表达阴性者也明显高于阳性者, $P < 0.01$; 且 Cox 回归多因素分析结果提示, DJ-1 和 AR 表达与腋窝淋巴结转移一样, 是影响 TNBC 患者 5 年无瘤生存率的独立预后因素, $P < 0.05$ 。DJ-1 表达阳性和 (或) AR 表达阳性者, 其转移、侵袭的风险更高, 生存期短, 预后不良。因此, DJ-1 和 AR 可能成为判断 TNBC 患者预后和靶向治疗的新分子指标及靶点。

大量的信号传导通路和基因网络的形成参与了 TNBC 的发生, 研究 TNBC 信号传导通路的异常以及不同传导通路之间的联系有助于加深对病因的认识^[9-10]。PTEN 蛋白有阻止癌变倾向基因突变细胞产生的作用。一旦 PTEN 基因发生突变, 表达出现下降或缺失, 丧失了抑癌作用, 使细胞恶性增殖, 最终形成肿瘤。本研究发现, TNBC 组织中 PTEN 表达存在缺失, 显著性低于正常乳腺组织, $P < 0.01$; 提示 PTEN 表达缺失, 促进细胞恶性增殖和肿瘤形成。同时本研究还发现, PTEN 的表达与 TNBC 的腋窝淋巴结转移、组织学分化和 TNM 分期密切相关, $P < 0.01$ 。提示 PTEN 可能在 TNBC 的侵袭、转移和恶性进展过程中发挥重要作用。同时随访过程中发现, 68 例 TNBC 组织中 PTEN 表达阳性者的 5 年无瘤生存率和 5 年总生存率明显高于 PTEN 表达阴性者, $P < 0.01$; 且 Cox 回归多因素分析结果提示, PTEN 表达缺失是影响 TNBC 患者 5 年无瘤生存率的独立因素之一。表明 PTEN 表达下调或缺失, 可能提高癌细胞增殖和浸润能力, 促进癌组织恶性发展进程, 表达缺失的患者可能预后不良, 其抑癌作用可能为临床提供更直接、更有效的分子靶点治疗新策略。

表 1 68 例 TNBC 组织 DJ-1 和 PTEN 及 AR 表达与临床病理学特征的关系 n (%)

临床病理学特征	n	DJ-1 阳性表达	χ^2 值	P 值	PTEN 阳性表达	χ^2 值	P 值	AR 阳性表达	χ^2 值	P 值
年龄(岁)										
<50	48	34(70.8)	0.36	0.210	13(27.1)	0.42	0.150	18(37.5)	0.28	0.250
≥50	20	14(70.0)			6(30.0)			7(35.0)		
月经状况										
绝经前	50	35(70.0)	0.21	0.290	14(28.0)	0.32	0.230	18(36.0)	0.38	0.190
绝经后	18	13(72.2)			5(27.8)			7(38.9)		
肿瘤大小(cm)										
≤2	23	16(69.6)	0.59	0.130	6(26.1)	0.63	0.110	9(39.1)	0.46	0.150
>2	45	32(71.1)			13(28.9)			16(35.6)		
腋窝淋巴结转移										
有	36	33(91.7)	8.02	0.000	2(5.6)	7.36	0.004	20(55.6)	6.18	0.010
无	32	15(46.9)			17(53.1)			5(15.6)		
组织学分化										
高	12	3(25.0)	7.63	0.003	10(83.3)	6.52	0.006	2(16.7)	5.03	0.014
中	38	28(73.7)			8(21.1)			12(31.6)		
低	18	17(94.4)			1(5.6)			11(61.1)		
TNM 分期										
I~II	32	15(46.9)	6.93	0.004	15(46.9)	5.64	0.011	4(12.5)	6.24	0.007
III~IV	36	33(91.7)			4(11.1)			21(58.3)		

表 2 68 例 TNBC 患者 5 年无瘤生存率的 Cox 回归多因素分析

项目	B	SE	Wald	P 值	Exp(B)	95%CI
腋窝淋巴结转移	0.705	0.516	8.837	0.000	1.895	1.828~3.402
DJ-1 表达	0.326	0.214	9.162	0.021	1.438	0.571~1.729
PTEN 表达	0.869	0.817	6.489	0.023	1.519	1.406~2.893
AR 表达	0.728	0.129	4.849	0.011	2.095	1.478~2.103

近年研究发现, DJ-1 蛋白是一种关键的 PTEN 负性调节蛋白, 可以作为癌症发生的预警标志。Kim 等^[11] 研究结果支持 DJ-1 与 PTEN 的表达呈负相关的观点。Liu 等^[12] 报道, DJ-1 蛋白通过抑制 PTEN 表达, 促进 PI3K-Akt 通路的活化, 进而促进细胞生长、增殖。本研究对 TNBC 组织中 DJ-1、PTEN 和 AR 表达关系进行了分析, 结果显示 68 例乳腺癌组织中, DJ-1、AR 的表达均和 PTEN 蛋白的表达呈负相关, $r = -0.529, P < 0.05$; 而两者之间呈正相关, $r = 0.496, P < 0.05$ 。综合 DJ-1 与 AR 的调节作用机制, 推测 DJ-1 有可能通过抑制 PTEN, 阻遏 PTEN 与 AR 的结合, 抑制 TNBC 的发生发展。因此, 深入探讨 DJ-1 蛋白调节 AR 参与 TNBC 的发生发展及其作用机制, 将可能为学者们研发更直接、更有效的分子靶点提供新的方向, 具有广泛应用前景。

【参考文献】

[1] Rong H, Shaheen D, Michelle DH, et al. Androgen receptor expression and breast cancer survival in postmeno-pausal women [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(7):1867-1874.
 [2] 桑晶, 韩玉贞, 张志强, 等. 三阴性乳腺癌组织耐药蛋白 GST- π 和 LRP 及 TopoII 表达的研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2011, 18(7):608-610.
 [3] 蒋奕, 杨华伟, 唐玮, 等. 三阴性乳腺癌组织 Angs/Tie-2 和 VEGF 的表达及其意义的探讨 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2011, 18(7):604-607.

[4] Abdulkarim BS, Cuartero J, Hanson J, et al. Increased risk of locoregional recurrence for women with T₁₋₂ N₀ triple-negative breast cancer treated with modified radical mastectomy without adjuvant radiation therapy compared with breast-conserving therapy [J]. J Clin Oncol, 2011, 29(2):2852-2858.
 [5] Adamo B, Anders CK. Stratifying triple-negative breast cancer: which definition(s) to use? [J]. Breast Cancer Res, 2011, 13(5):105.
 [6] 李中琦, 郑怡, 腾晓东, 等. CK5/6 和 AR 在三阴性乳腺癌中的表达及其与临床病理特征的联系 [J]. 浙江医学, 2009, 31(1):49-51.
 [7] 智英辉, 尼杰, 田秀芳, 等. 雄激素受体在三阴性乳腺癌的表达及其预后意义 [J]. 重庆医学, 2012, 41(27):2812-2815.
 [8] Higgins MJ, Wolff AC. The androgen receptor in breast cancer: Learning from the past [J]. Breast Cancer Res Treat, 2010, 124(3):619-621.
 [9] 赵坡, 姜学革, 李晓瑛, 等. FISH 检测乳腺癌 HER-2 基因扩增及 17 号染色体多体状况及其临床病理学意义的分析 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2011, 7(9):47-50.
 [10] 郭红艳, 孙晓杰, 刘秀财, 等. 血清和糖皮质激素调节蛋白激酶 3 (SGK3) 过表达对乳腺癌细胞迁移的影响 [J]. 中国实验诊断学, 2012, 16(3):391-395.
 [11] Kim YC, Kitaura H, Taira T, et al. Oxidation of DJ-1-dependent cell transformation through direct binding of DJ-1 to PTEN [J]. Int J Oncol, 2009, 35(6):1331-1341.
 [12] Liu H, Wang M, Li M, et al. Expression and role of DJ-1 in leukemia [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 375(3):477-483.

收稿日期:2013-01-16 修回日期:2013-02-28
(编辑:杨靖)