

# 人类表皮生长因子、p53、雌激素受体及孕激素受体在不同临床期别乳腺浸润性导管癌组织中的表达

唐录英<sup>1</sup>, 金亦<sup>1</sup>, 刘勇<sup>1</sup>, 冯智英<sup>1</sup>, 邵春奎<sup>1</sup>, 任泽舫<sup>2</sup>

(1. 中山大学附属第三医院病理科, 广东 广州 510630; 2. 中山大学公共卫生学院, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】探讨不同临床期别乳腺浸润性导管癌组织中人类表皮生长因子(HER-2)、p53、雌激素受体(ER)及孕激素受体(PR)的表达及其相关性。【方法】利用免疫组化技术检测138例乳腺浸润性导管癌组织中各指标的表达,采用新的记分标准,结果数字化和半定量,以秩检验方法进行分析。【结果】高临床期别乳腺浸润性导管癌组织中HER2表达显著升高,而PR表达则显著降低,ER和p53的表达无明显变化。【结论】HER-2和PR能更好地反映乳腺癌的临床期别并可能与乳腺癌的预后相关。

**关键词:** 免疫组化; 人类表皮生长因子; p53; 雌激素受体; 孕激素受体; 秩检验

**中图分类号:** R737.9      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1672-3554(2009)04-0454-04

## Expressions of HER-2, p53, Estrogen Receptor, and Progesterone Receptor in Tissues of Invasive Ductal Breast Carcinoma with Different Clinical Stages

TANG Lu-ying<sup>1</sup>, JIN Yi<sup>1</sup>, LIU Yong<sup>1</sup>, FENG Zhi-ying<sup>1</sup>, SHAO Chun-kui<sup>1</sup>, REN Ze-fang<sup>2</sup>

(1. Department of Pathology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China;

2. School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 Expressions of human epidermal growth factor receptor 2(HER-2), p53, estrogen receptor (ER), and progesterone receptor (PR) in tissues of breast invasive ductal carcinoma are not only applied to determine the therapeutic regimen, but they may also be related to the prognosis. We investigated the levels of these proteins among different clinical stages and the correlations. 【Method】 One hundred and thirty-eight tissues from cases with breast invasive ductal carcinoma were tested with immunohistochemistry. New scoring standards and rank test were applied. The indices were digitalized and semi-quantified. 【Results】 In the tissues from high clinical stage, the expression of HER2 was significantly increased, while expression of PR was markedly decreased. 【Conclusion】 Expression of HER2 and PR might be better markers for predicting clinical stages and prognosis.

**Key words:** immunohistochemistry; HER-2; p53; ER; PR; rank test

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(4):454-457]

乳腺癌是一种异质性极高的疾病(除了<10%的家族性癌外),其发病和预后同时受到多种环境和遗传因素的影响<sup>[1]</sup>。临床上常规检测乳腺癌组织中的雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)、人类表皮生长因子受体(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)和抑癌蛋白p53等多种蛋白的表达水平来决定治疗方案或估计预后。免疫组织化学法是其

最常用的检测方法,结果的判断往往是根据视野中着色细胞的比例来定性决定。但实际上,这些蛋白的基因都存在于细胞内,其蛋白的表达只是数量多少罢了,所以定性判断他们的表达是不准确的,这也许是这些指标有时不能有效预测预后和决定治疗方案的原因之一<sup>[2]</sup>。Harvey等<sup>[3]</sup>早于1999年便提出对ER、PR和p53在乳腺癌组织中的表达应同时考虑染色强度和着色比例,结合两

收稿日期: 2008-09-26

基金资助: 广州市回国人员启动基金(2006)

作者简介: 唐录英, 副主任医师; \* 通讯作者: 任泽舫, E-mail: renzef@mail.sysu.edu.cn

者的分值得到一个总分值,作为半定量指标来衡量其蛋白的表达水平;最近,Payne等<sup>[2]</sup>再次强烈推荐此种记分方法,因为它有利于最佳治疗方案的确定,如ER的分值即使低至2时,仍可采用抗雌激素治疗。一直以来HER2的检测和判断标准也不统一,因此美国临床肿瘤学会/美国病理学医师学院(CPA)于2006年12月发布了“HER2检测临床实践指南”<sup>[4]</sup>,以期在美国或全球统一HER2的IHC诊断标准。本研究按这些标准回顾性研究了本院2004年10月至2008年8月间乳腺浸润性导管癌组织中ER、PR、p53和HER2的表达,并把其结果作为半定量指标,应用相应的统计方法分析了在不同临床分期的表达差异,以及各指标间的相关性,以进一步确认这些指标的应用价值。

## 1 材料与方 法

### 1.1 标本来源

组织标本均来源于中山大学附属第三医院2004年10月至2008年8月138例女性间乳腺浸润性导管癌切除的病例,年龄26至93岁,平均48.6岁。

### 1.2 试 剂

HER2一抗为兔抗人多克隆抗体(克隆号A0485),购自DAKO公司,工作稀释度1:300;ER和PR一抗为兔抗人单克隆抗体(克隆号分别为SP1和SP2),p53一抗为鼠抗人单克隆抗体(克隆号D0-07),均购自迈新生物技术开发有限公司,使用原工作液。免疫组织化学检测系统选用过氧化物酶标记的EnVision标准二步法检测试剂盒;显色试剂为高敏感二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒,也均购自Dako公司。

### 1.3 方 法

标本经40 mol/L甲醛固定12~24 h,石蜡包埋。4 μm厚切片常规脱蜡至水。切片置于柠檬酸钠缓冲液中(pH 6.0),微波加热(两次,5 min)修复抗原。待其自然冷却至室温后,PBS缓冲液洗3次;滴加工作浓度的一抗,放入预热湿盒,37℃,60 min,PBS冲洗,滴加辣根过氧化物酶标记的二抗,37℃孵化30 min,PBS洗脱,DAB显色,自来水冲洗;苏木精对比染色;脱水、透明,中性树胶封固,镜下观察。每一批号试剂用随试剂购买的乳腺癌阳性切片作为实验的阳性对照,PBS代替一抗

为阴性对照。

### 1.4 染色结果判断

ER、PR和p53均表达于细胞核,染成棕黄色,两个记分指标,一是染色强度,无着色为0,弱着色或淡黄色即1,强棕黄色即3分,中间为2;二是着色的细胞比例,无细胞着色为0,<1%为1,1%~10%为2,11%~33%的为3,34%~66%为4,67%~100%为5;两个指标的乘积为总得分<sup>[2]</sup>。典型的染色强度结果见图1。HER2位于细胞膜,亦染成棕黄色,小于10%的浸润性癌细胞有弱的不完整的细胞膜染色或无浸润性癌细胞染色,记分为0或1(阴性);>10%的浸润性癌细胞可见完整的不一致性的细胞膜染色,较弱但有明显的网络状分布,或<30%的浸润性癌细胞可见强的和完整的细胞膜染色,记分为2(可疑阳性);>30%的浸润性癌细胞可见强的一致性的细胞膜染色,记分为3(阳性;图2)<sup>[4]</sup>。

### 1.5 数据管理与统计分析

所有资料采用Windows Excel 97录入和储存数据,利用SPSS13.0进行统计分析。按以上标准计分结果的数据往往不呈正态分布,故在分析不同临床级别的表达差异时,采用了非参数的Mann-Whitney秩和检验;在分析各指标间的相关性时,采用了Spearman秩相关分析。

## 2 结 果

### 2.1 一般临床特征

根据肿瘤大小(T)、有无淋巴结转移及转移部位(N)和有无远处转移情况(M),把乳腺癌病例分成4个期别:I、II、III和IV,其例数分别为17、93、19和6例,另有3例资料不全,未分期。

### 2.2 各指标在不同临床期别组织中的表达及其差异

由于第IV期仅6例,故合并在第3期分析。从表1可见,PR的表达水平从I级到III或IV级逐渐降低,并相互间均具有统计学差异;HER2的表达则有逐级升高的趋势,III或IV级的水平显著高于I级的;ER和p53的表达在各级别间的差异则无统计学意义。

### 2.3 各指标表达水平的相关性

从表2可见,ER和PR及HER2与PR、ER和p53的相关性具有统计学意义,但其相关系数均较小。

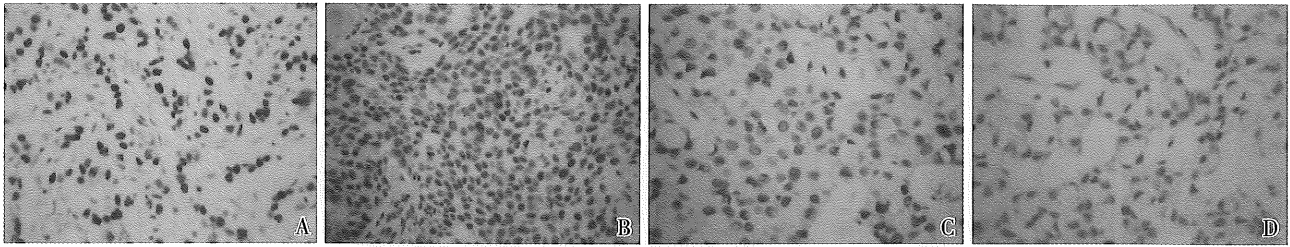


图 1 表达于胞核中的 ER、PR 和 p53 免疫组化染色结果

Fig.2 Staining density in immunohistochemistry for ER, PR, and p53 in breast cancer tissues

A: the highest density (score 3); B: moderate density (score 2); C: faint density (score 1); D: negative (score 0) × 200

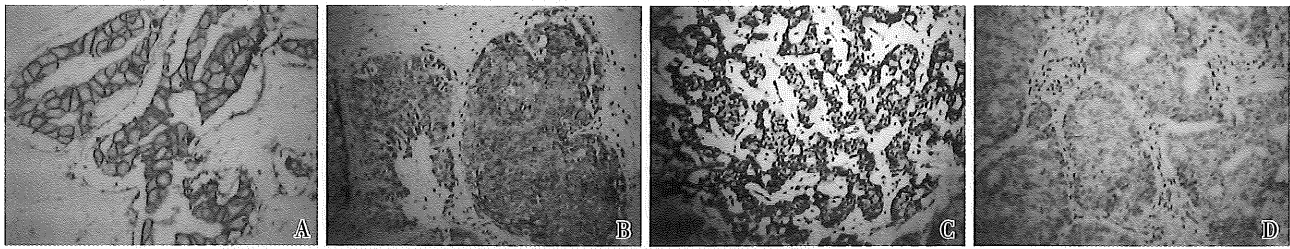


图 2 表达于胞膜的 HER2 免疫组化染色结果

Fig.2 HER2 immunohistochemistry staining in breast cancer tissues

A: Strong positive (score 3); B: Moderate positive (score 2); C: Weak positive (score 1); D: Negative (score 0) × 200

表 1 不同临床期别的 ER、PR、HER2 及 p53 表达水平比较 (Mann-Whitney 秩和检验)

Table 1 Comparison on expression levels of ER, PR, HER2, and p53 in tissues of invasive ductal breast carcinoma between different clinical stages with Mann-Whitney rank test

Clinical Stage	ER			PR			HER2			p53		
	<i>n</i>	<i>M</i>	MR	<i>n</i>	<i>M</i>	MR	<i>n</i>	<i>M</i>	MR	<i>n</i>	<i>M</i>	MR
I	16	6.50	53.34	16	8.00	60.59	16	1.00	46.16	15	2.00	45.70
II	66	4.5	51.92	66	4.5	51.86 <sup>1)</sup>	62	1.00	48.71	61	2.00	47.21
III-IV	21	4.00	51.21	21	3.00	45.88 <sup>1)2)</sup>	20	2.00	54.63 <sup>1)</sup>	18	2.00	49.97

*n*: number of cases; *M*: median; MR: mean of rank; 1) compared with stage I, *P* < 0.05; 2) compared with stage II, *P* < 0.05.

表 2 ER、PR、HER2 及 p53 表达水平的 Spearman 秩相关分析

Table 2 Correlation between expression levels of ER, PR, HER2, and p53 in tissues of invasive ductal breast carcinoma with Spearman rank analysis

	ER			PR			HER2			p53		
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>n</i>	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>n</i>
ER	1.00	-	103									
PR	0.50	<0.01	102	1.000	-	103						
HER2	-0.22	0.03	97	-0.23	0.03	96	1.00	-	98			
p53	-0.11	0.31	92	-0.14	0.18	92	0.24	0.02	91	1.000	-	94

*r*: correlation coefficient; *P*: significant probability; *N*: effective paired number

### 3 讨论

HER2 表达水平是临床上决定乳腺癌手术后治疗方案的主要因素。多项研究表明,HER2 阳性

肿瘤对环磷酰胺、氨甲喋呤、氟尿嘧啶联合化疗有一定抵抗性,对含蒽环类抗生素的联合化疗却敏感<sup>[5]</sup>,如对 HER2 单克隆抗体 Herceptin 的疗效显著<sup>[6]</sup>。HER2 本是一种癌基因,编码具有酪氨酸酶活性的细胞跨膜糖蛋白,参与细胞信号处理,增强

有丝分裂,促进肿瘤增殖及分化,其在乳腺癌细胞中过度表达,常提示恶性程度高,预后差<sup>[5]</sup>。本研究结果显示高临床分期病人癌组织中 HER2 表达显著高于低临床分期者,与已往的结论相符<sup>[6]</sup>。

癌组织中 ER、PR 表达是另一类决定治疗方案的标志物。ER 阳性的乳腺癌,其发展依赖于雌激素,雌激素与肿瘤细胞的 ER 结合后能促进靶基因的转录,合成下游蛋白,使细胞增殖,其中包括 PR 的合成<sup>[7]</sup>;ER 拮抗药(如 Tamoxifen)成为 ER 或 PR 阳性乳腺癌的常规内分泌治疗药物,它可阻断雌激素与癌细胞的 ER、PR 结合,从而抑制肿瘤生长<sup>[7]</sup>。本研究得到 ER 和 PR 的表达水平具有显著相关性的结果,与上述机制相符。另外,我们还发现,ER 在不同临床级别的癌组织中并没有显著性差别,而 PR 在早期临床级别癌组织中的表达则显著高于晚期临床级别的癌组织表达,我们原以为是样本量少的缘故,但后来发现 Coyle 等<sup>[8]</sup>最近也发现了 PR 而不是 ER 的表达才是反映早期乳腺癌的指标,并认为 PR 可以作为乳腺癌治疗的工具和靶点。

本研究结果显示,HER2 与 ER 和 PR 在乳腺癌组织中的表达水平之间存在负相关关系,这与其它研究结果也是完全一致的。如实验研究表明,HER2 基因与 ER 间存在交互作用,HER2/酪氨酸旁路与 ER 受体通路之间相互影响,HER2 过表达的乳腺癌细胞可在不含雌激素的环境中生长,对三苯氧胺更具有耐受性<sup>[9]</sup>;其它乳腺癌组织中的表达研究也表明,ER、PR 的表达与 HER2 的表达呈负相关<sup>[10]</sup>。P53 蛋白分子质量为 53 kU,本是一种抑癌磷蛋白,抑制细胞的生长和分裂,抑制癌基因活动,当 p53 基因突变后产生突变型 P53 蛋白,失去原有功能,导致细胞转化和癌变。免疫组化检测的 P53 蛋白皆为突变型<sup>[11]</sup>,本研究得到其表达与 HER2 呈显著的正相关关系,也就容易理解了。

利用 IHC 技术检测 ER、PR、HER2 和 P53 等在乳腺癌组织中的表达已成为临床诊治乳腺癌不可或缺的项目,但其检测过程和判断标准至今尚未完全统一。本研究采用了新的诊断标准并将其结果半定量化,较原定性方法检验效率高,值得推广应用。但临床上怎样根据这些半定量指标来决定治疗方案和估计预后,仍需要大样本的深入研究。

(中山大学 2004 级八年制的唐恬恬和彭超同学在资料的收集和整理过程中付出了辛勤的劳动,在此表示衷心感谢!)

#### 参考文献:

- [1] Rakha EA, El-Sayed ME, Reis-Filho JS, et al. Expression profiling technology: its contribution to our understanding of breast cancer [J]. *Histopathology*, 2008, 52(1):67-81.
- [2] Payne SJL, Bowen RL, Jones JL, et al. Predictive markers in breast cancer-the present [J]. *Histopathology*, 2008, 52 (1):82-90.
- [3] Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 1999, 17(5):1474-1481.
- [4] Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2007, 131 (1):18-43.
- [5] Gown AM. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer [J]. *Mod Pathol*, 2008, 21 (Suppl2):S8-S15.
- [6] Masox S. Assessment of HER-2 overexpression in primary breast cancers and their metastatic lesions: an immunohistochemical study [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2000, 30(3):259-265.
- [7] Montero Girard G, Vanzulli SI, Cerliani JP, et al. Association of estrogen receptor-alpha and progesterone receptor A expression with hormonal mammary carcinogenesis: role of the host microenvironment [J]. *Breast Cancer Res*, 2007, 9(2):R22.
- [8] Coyle YM, Xie XJ, Hardy DB, et al. Progesterone receptor expression is a marker for early stage breast cancer: implications for progesterone receptor as a therapeutic tool and target [J]. *Cancer Lett*, 2007, 258(2):253-261.
- [9] Witton CJ, Reeves JR, Going JJ, et al. Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer [J]. *J Pathol*, 2003, 200(3):290-297.
- [10] Konecny G, Pauletti G, Pegram M, et al. Quantitative association between HER2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor positive primary breast cancer [J]. *Natl Cancer Inst*, 2003, 95(2):142-153.
- [11] Linderholm BK, Lindahl T, Holmberg L, et al. The expression of vascular endothelial growth factor correlates with mutant p53 and poor prognosis in human breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(5): 2256-2260.

(编辑 徐杰)