

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.07.005

乳腺癌 GPR30、HRG1 和 HER2 表达与淋巴结转移关系的研究*

阮姝琴¹, 李刚², 王善伟^{3,4}, 韩萍¹, 杨志祥^{1△}

(1. 重庆市中山医院肿瘤血液科 400012; 2. 重庆市中山医院病理科 400012;
3. 浙江大学肿瘤研究所, 杭州 310009; 4. 西安医学院病理教研室, 陕西 710021)

[摘要] **目的** 探讨乳腺浸润性导管癌中 G 蛋白偶联受体 30(GPR30)、HRG1 和 HER2 及其激活状态磷酸化 HER2(pHER2)的表达与淋巴结转移的关系。**方法** 采用免疫组织化学方法检测 72 例乳腺浸润性导管癌组织样本中 GPR30、HRG1、HER2 和 pHER2 的表达。**结果** GPR30 与 HRG1 表达呈中度相关性($r=0.597, P=0.000$); pHER2 与 GPR30 或 HRG1 的表达呈强相关性($r=0.742, P=0.000; r=0.615, P=0.000$); GPR30 和 pHER2 表达在淋巴结转移组明显高于淋巴结未转移组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** GPR30 与 HRG1-HER2 信号途径存在相互联系, 可能共同促进乳腺癌淋巴结转移, 联合抑制这两条途径有望成为乳腺癌治疗的新策略。

[关键词] 乳腺肿瘤; 淋巴转移; G 蛋白偶联受体 30; HRG1; HER2

[中图分类号] R737.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)07-0878-03

Expression of GPR30, HRG1 and HER2 in breast cancer and their relationship with lymphatic metastasis*

Ruan Shuqin¹, Li Gang², Wang Shanwei^{3,4}, Han Ping¹, Yang Zhixiang^{1△}

(1. Department of Oncology and Hematology, Chongqing Zhongshan Hospital, Chongqing 400012, China;
2. Department of Pathology, Chongqing Zhongshan Hospital, Chongqing 400012, China; 3. Cancer Institute,
Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310009, China; 4. Department of
Pathology, Xi'an Medical College, Xi'an, Shanxi 710021, China)

[Abstract] **Objective** To explore the expression of GPR30, HRG1 and HER2 including the activation status of HER2 (phosphorylated HER2) in invasive ductal breast cancers and their relationship with lymphatic metastasis. **Methods** The expression of GPR30, HRG1, HER2 and pHER2 in 72 cases of specimens of invasive ductal breast cancers were examined by immunohistochemistry method. **Results** A moderate correlation between GPR30 and HRG1 was disclosed ($r=0.597, P=0.000$). There was strong correlation between pHER2 and GPR30 or HRG1 ($r=0.742, P=0.000; r=0.615, P=0.000$). The expression of GPR30 and pHER2 in the lymphatic metastasis group was remarkably higher than in the group without lymphatic metastasis ($P<0.05$). **Conclusion** The interaction between GPR30 and HRG1-HER2 signal transduction pathways might be involved in the lymphatic metastasis in breast cancer. Blocking both of GPR30 and HRG1 signaling pathway could be a promising new strategy for breast cancer treatments.

[Key words] breast neoplasms; lymphatic metastasis; GPR30; HRG1; HER2

在恶性肿瘤的发生、发展过程中,不同细胞信号转导通路之间存在相互作用。大量研究证实,新的雌激素受体 G 蛋白偶联受体 30(G protein-coupled receptor 30, GPR30)与表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)家族成员之间存在交叉对话^[1]。目前的研究认为,EGFR 家族包括 EGFR、HER2、HER3 和 HER4 4 个成员,Heregulins 是一类 HER3 和 HER4 的配体,能促进 HER3 或 HER4 与其他 EGF 家族成员形成异二聚体从而激活下游信号转导途径并引发一系列生物学功能的改变。在恶性肿瘤尤其是乳腺癌中,HER2/HER3 是最常见也最重要的异二聚体形式^[2]。本课题组前期的工作已经发现,Heregulins 的主要亚型 HRG1 在多种乳腺癌细胞系均能通过 HER2/HER3-MAPK/ERK 信号途径上调 GPR30 表达并促进乳腺癌细胞的迁徙和侵袭^[3-4],可能与乳腺癌发生内分泌治疗耐药有关。然而迄今在人类乳腺癌组织样本中,GPR30 与 HRG1 两条信号途径之间的表达相关性研究还未见报道。

本研究采用免疫组织化学方法在人类浸润性乳腺导管癌石蜡组织样本中检测 GPR30、HRG1、HER2 及其激活状态磷酸化 HER2(pHER2)的表达,并分析这些指标与淋巴结转移的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取浙江大学医学院附属第二医院 2008 年 1 月至 2012 年 2 月收治的 72 例女性浸润性乳腺导管癌患者的术后标本,术前均未接受过化疗、放疗或内分泌治疗,年龄 31~78 岁,平均 46 岁。常规石蜡包埋并保存,均经病理检查证实。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 即用型快速免疫组织化学 Max Vision 试剂盒(兔)购自福建迈新生物公司。GPR30 兔抗人多克隆抗体购自 Abcam 公司(1:200),HRG1 兔抗人多克隆抗体购自 Epitomics 公司(1:75),HER2 兔抗人单克隆抗体购自 Epitomics 公司(1:250),pHER2(pY1221/Y1222)购自 Cell Signa-

ling Technology 公司(1:300)。

1.2.2 实验方法 采用免疫组织化学 Elivision Plus 法检测组织中 GPR30、HRG1、HER2 和 pHER2 酪氨酸激酶 1221/1222(pY1221/Y1222)位点的表达。用已知的阳性切片作阳性对照,用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照。

1.2.3 结果判断 由两位病理医师进行双盲法观察,对免疫组织化学结果进行评估。结果判读标准:以细胞膜或细胞质显棕黄色颗粒为阳性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件统计进行分析。相关性分析用 Spearman 法进行统计,组间计数资料比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GPR30 与 HRG1 表达的相关性 GPR30 的阳性率为 58.33%(53/72),HRG1 的阳性率为 61.11%(44/72),两者经 Spearman 相关性分析呈正相关($r=0.597, P < 0.05$)。

2.2 HER2 与 GPR30、HRG1 表达的相关性 HER2 的阳性率为 45.83%(33/72),经 Spearman 相关性分析 HER2 与 GPR30 呈正相关($r=0.269, P < 0.05$),与 HRG1 无相关性($r=0.048, P > 0.05$)。

2.3 pHER2 与 GPR30、HRG1 表达的相关性 pHER2 的阳性率为 52.78%(38/72),经 Spearman 相关性分析 pHER2 (pY1221/Y1222)与 GPR30 以及 HRG1 均呈显著正相关($r=0.742, P < 0.05; r=0.615, P < 0.05$)。

2.4 GPR30、HRG1、HER2 及 pHER2 表达与淋巴结转移的关系 在 72 例乳腺癌病例中,淋巴结转移率为 33.33%(24/72),其中 GPR30 表达阳性且淋巴结转移的病例占 23.61%(17/72),pHER2 (pY1221/Y1222)表达阳性且淋巴结转移的病例占 30.56%(22/72),因此淋巴组织转移者 GPR30 和 pHER2 的表达显著高于淋巴结未转移者,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。而 HRG1 表达阳性且淋巴结转移者占 25.00%(18/72),HER2 表达阳性且淋巴结转移者占 18.06%(13/72),因而淋巴结转移者 HRG1 和 HER2 的表达与淋巴结未转移者相比,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

尽管内分泌治疗是雌激素受体(estrogen receptor, ER)阳性乳腺癌患者的主要治疗手段之一,但只有约 60% 的患者能从中获益,其中近 40% 的患者在治疗期间发生耐药。大量的研究发现,ER 和 EGF 家族细胞信号转导通路之间的相互作用在乳腺癌发生、发展以及内分泌治疗耐药的形成中发挥重要作用^[5]。

GPR30 属于 G 蛋白偶联受体家族,是由 375 个氨基酸组成的 7 次跨膜受体,不仅能通过其他信号途径间接调节雌激素的功能,也能直接与内源性雌激素、环境雌激素、三苯氧胺、特异性激动剂 G-1 等结合影响下游的快速(非基因组)/慢速(基因组)效应^[6],因而被分类为雌激素受体。在 GPR30 与 ER 均阳性表达的乳腺癌,ER 拮抗剂三苯氧胺虽然能竞争性抑制雌激素与 ER 结合,但却能作为激动剂与 GPR30 结合继续发挥促肿瘤细胞生长的作用。有研究发现,GPR30 在约 60% 的浸润性乳腺导管癌中呈阳性表达,其过表达与肿瘤直径(> 2 cm)及 HER2 过表达呈正相关性,与肿瘤转移也有显著相关性($P < 0.05$)^[7]。

在人类的恶性肿瘤中,EGF 家族信号系统的功能失调是广泛存在的现象。Heregulins 作为 HER3 和 HER4 的配体,其主要亚型 HRG1 在约 30% 并不过表达 HER2 的乳腺癌中存

在过表达,以自分泌或旁分泌方式导致 HER2/HER3 异二聚体形成并激活下游信号途径,诱导乳腺上皮细胞恶性转化^[8]。各种研究还表明 Heregulins 也与乳腺癌抗雌激素治疗耐药的发生有关^[9]。

笔者对浸润性乳腺导管癌组织样本中对 HRG1 和 GPR30 的表达进行了检测,结果发现 GPR30 的阳性率为 58.33%(53/72),HRG1 的阳性率为 61.11%(44/72),两者的表达差异有统计学意义($r=0.597, P < 0.05$)。有研究结果提示,HRG1 与 GPR30 之间可能存在相互之间的表达调控^[3-4],而本文笔者前期在乳腺癌细胞系中的研究已经证实 HRG1 上调 GPR30 表达。

HER2 在 20%~30% 的乳腺癌中存在过表达现象,HER2 过表达提示肿瘤患者预后不良,对内分泌治疗反应降低。以往研究对 GPR30 与 HER2 相关性的结论很不一致,考虑到 EGFR 需要被磷酸化激活后才能发挥生理功能,因而可能检测 HER2 的激活状态更有意义。有文献报道,pHER2 的酪氨酸激酶 pY1221/Y1222 位点对无病生存期和总生存期都是独立的预测因子,该位点也被证明在免疫组织化学研究 HER2 激活状态中较其他位点更敏感^[10]。因此,本研究中选择对 pHER2 (pY1221/Y1222)进行了检测,结果表明 GPR30 表达与 HER2 表达呈弱相关性($r=0.269, P < 0.05$),但与 pHER2 呈显著正相关($r=0.742, P < 0.05$)。本研究也发现,HRG1 表达与 HER2 表达无相关性($r=0.048, P > 0.05$),但与 pHER2 呈显著正相关($r=0.615, P < 0.05$)。这些结果提示,HRG1 与 HER3 结合后并不会改变 HER2 的表达,主要是通过激活 HER2 及其下游的一系列信号转导途径影响 GPR30 表达,这与笔者之前对乳腺癌细胞系的研究结论相一致,即 HER2/HER3 异二聚体在 HRG1 上调 GPR30 表达的信号转导途径中处于中心环节^[3]。

淋巴结转移是乳腺癌重要的预后指标,既往的报道对 Heregulins 和 GPR30 与恶性肿瘤淋巴结转移的关系并没有得到一致的结论。在本研究中,GPR30 在淋巴结转移者的表达显著高于淋巴结未转移者($P < 0.05$),而 HRG1 与淋巴结转移差异无统计学意义($P > 0.05$)。以往的研究认为,在有淋巴结转移者中,HER2 阳性的乳腺癌患者预后差于 HER2 阴性者,但在无淋巴结转移者中仍存在争论,但大部分研究认为 HER2 表达水平与淋巴结转移情况无关^[11]。尽管本研究也没有得出 HER2 表达与淋巴结转移具有相关性的结论,但淋巴结转移且 pHER2 表达阳性的病例占 30.56%(22/72),pHER2 在淋巴结转移者的表达显著高于淋巴结未转移者且差异有统计学意义($P < 0.05$),提示激活的 HER2 对于乳腺癌淋巴结转移相较于 HER2 可能具有更重要的生物学意义。

HRG1 和 GPR30 之间存在的相互作用在乳腺癌组织样本和细胞系中均得到了证实,提示联合干预 HRG1 与 GPR30 信号途径可能是新的乳腺癌治疗策略,已有报道在乳腺癌细胞系联合给予 GPR30 拮抗剂 G-1 和 HER2 的特异性单抗曲妥珠单抗加大了对细胞增殖的抑制效应^[12]。进一步对乳腺癌细胞信号转导途径相互作用的研究将为制定新的治疗方案提供更多的理论依据。

参考文献

- [1] Filardo EJ. Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer[J]. J Steroid Biochem Mol

- Biol, 2002, 80(2): 231-238.
- [2] Sithanandam G, Anderson LM. The ERBB3 receptor in cancer and cancer gene therapy [J]. *Cancer Gene Ther*, 2008, 15(7): 413-448.
- [3] Ruan SQ, Wang ZH, Wang SW, et al. Heregulin- β 1-induced GPR30 upregulation promotes the migration and invasion potential of SkBr3 breast cancer cells via ErbB2/ErbB3-MAPK/ERK pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 420(2): 385-390.
- [4] Ruan SQ, Wang SW, Wang ZH, et al. Regulation of HRG- β 1-induced proliferation, migration and invasion of MCF-7 cells by upregulation of GPR30 expression [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(1): 131-138.
- [5] Shou J, Massarweh S, Osborne CK, et al. Mechanisms of tamoxifen resistance; increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2004, 96(12): 926-935.
- [6] Prossnitz ER, Maggiolini M. Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30 [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, 308 (1/2): 32-38.
- [7] Filardo EJ, Graeber CT, Quinn JA, et al. Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(21): 6359-6366.
- [8] Li Q, Ahmed S, Loeb JA. Development of an autocrine neuregulin signaling loop with malignant transformation of human breast epithelial cells [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(19): 7078-7085.
- [9] Mazumdar A, Wang RA, Mishra SK, et al. Transcriptional repression of oestrogen receptor by metastasis-associated protein 1 corepressor [J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(1): 30-37.
- [10] Frogne T, Laenkholm AV, Lyng MB, et al. Determination of HER2 phosphorylation at tyrosine 1221/1222 improves prediction of poor survival for breast cancer patients with hormone receptor-positive tumors [J]. *Breast Cancer Res*, 2009, 11(1): R11.
- [11] Eccles SA. The role of c-erbB-2/HER2/neu in breast cancer progression and metastasis [J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2001, 6(4): 393-406.
- [12] Lubig J, Lattrich C, Springwald A, et al. Effects of a combined treatment with GPR30 agonist G-1 and Herceptin on growth and gene expression of human breast cancer cell lines [J]. *Cancer Invest*, 2012, 30(5): 372-379.

(收稿日期: 2014-10-14 修回日期: 2014-12-17)

(上接第 877 页)

需要明确 PKC 表达水平与 PKC 磷酸化之间的联系。总之, 本研究表明 PKC δ 介导内皮细胞增殖、凋亡, 其可能与下游 Fas 等其他信号相关。

参考文献

- [1] Piro S, Spampinato D, Spadaro L, et al. Direct apoptotic effects of free fatty acids on human endothelial cells [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2008, 18(2): 96-104.
- [2] van den Oever IA, Raterman HG, Nurmohamed MT, et al. Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus [J]. *Mediators Inflamm*, 2010, 2010: 792393. doi:10.1155/2010/792393.
- [3] Schmitz-Peiffer C, Biden TJ. PKCdelta blues for the beta-cell [J]. *Diabetes*, 2010, 59(1): 1-3.
- [4] Zhu P, Chen G, You T, et al. High FFA-induced proliferation and apoptosis in human umbilical vein endothelial cell partly through Wnt/beta-catenin signal pathway [J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 338(1-2): 123-131.
- [5] Artwohl M, Graier WF, Roden M, et al. Diabetic LDL triggers apoptosis in vascular endothelial cells [J]. *Diabetes*, 2003, 52(5): 1240-1247.
- [6] Li H, Li H, Bao Y, et al. Free fatty acids induce endothelial dysfunction and activate protein kinase C and nuclear factor-kappaB pathway in rat aorta [J]. *Int J Cardiol*, 2011, 152(2): 218-224.
- [7] Mugabo Y, Mukaneza Y, Renier G. Palmitate induces C-reactive protein expression in human aortic endothelial cells. Relevance to fatty acid-induced endothelial dysfunction [J]. *Metabolism*, 2011, 60(5): 640-648.
- [8] Basu A, Pal D. Two faces of protein kinase C delta; the contrasting roles of PKCdelta in cell survival and cell death [J]. *The Scientific World Journal*, 2010, 10: 2272-2284.
- [9] Steinberg SF. Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase C delta [J]. *Biochem J*, 2004, 384(Pt 3): 449-459.
- [10] Brodie C, Blumberg PM. Regulation of cell apoptosis by protein kinase C delta [J]. *Apoptosis*, 2003, 8(1): 19-27.
- [11] Boccellino M, Giovane A, Servillo L, et al. Fatty acid mobilized by the vascular endothelial growth factor in human endothelial cells [J]. *Lipids*, 2002, 37(11): 1047-1051.
- [12] Nag A, Mitra G, Ghosh PC. A colorimetric assay for estimation of polyethylene glycol and polyethylene glycolated protein using ammonium ferrotiocyanate [J]. *Anal Biochem*, 1996, 237(2): 224-228.
- [13] Konishi H, Tanaka M, Takemura Y, et al. Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H₂O₂ [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(21): 11233-11237.
- [14] Bai X, Margariti A, Hu Y, et al. Protein kinase C{delta} deficiency accelerates neointimal lesions of mouse injured artery involving delayed reendothelialization and vasohibin-1 accumulation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(12): 2467-2474.
- [15] Geraldes P, Hiraoka-Yamamoto J, Matsumoto M, et al. Activation of PKC-delta and SHP-1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy [J]. *Nat Med*, 2009, 15(11): 1298-1303.

(收稿日期: 2014-10-10 修回日期: 2014-12-15)