

乳腺癌中 DAX-1 和 AR 的表达及临床意义

杨小敏 徐晓武 潘 丹 陈艳梅 郑 翔

摘要 **目的** 检测乳腺癌中先天性肾上腺发育不良症的关键基因 -1(DAX-1) 和雄激素受体(AR) 表达情况, 探讨两者与乳腺癌各临床病理指标的关系。**方法** 采用免疫组化法检测 DAX-1 和 AR 在 120 例乳腺癌中的表达, 并分析两者与临床各病理指标的关系。**结果** 120 例乳腺癌中 DAX-1 和 AR 阳性表达率分别为 75% (90/120) 和 75.83% (91/120)。DAX-1 和 AR 的表达呈正相关($r=0.66$, $P<0.05$)。DAX-1 和 AR 的表达与肿瘤直径、组织学分级及 ER 和 PR 的表达状态有关($P<0.05$), DAX-1 的表达与 TNM 分期也有关($P<0.05$), 两者表达与患者年龄、月经状态、淋巴结转移情况均无关($P>0.05$)。**结论** 乳腺癌中 DAX-1 和 AR 表达上调, 两者的表达与肿瘤直径、组织学分级及 ER 和 PR 的表达状态有关, DAX-1 表达与 TNM 分期也有关, 乳腺癌中 DAX-1 和 AR 的高表达可能预示良好的预后, 进一步研究两者对乳腺癌发生、发展的作用机制, 可能对判断乳腺癌患者预后及提供新的内分泌辅助治疗生物学标志物有一定的帮助。

关键词 乳腺癌 DAX-1 AR 免疫组化

中图分类号 R602

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.02.025

Study of the Expressions DAX-1 and AR and Their Clinical Significance in Human Breast Cancer. Yang Xiaomin, Xu Xiaowu, Pan Dan, et al. Department of Pathology, The People's Hospital of Wenzhou, Zhejiang 325000, China

Abstract **Objective** To detect the expressions of DAX-1 and AR in breast carcinoma and relationship with clinical pathological indicators. **Methods** The expressions of DAX-1 and AR in breast carcinoma were detected by immunohistochemical SP method. Analyzed their relationship with clinical pathological indicators. **Results** The positive rates of DAX-1 and AR were 75% (90/120) and 75.83% (91/120), respectively. There had positive correlation between DAX-1 and AR ($r=0.66$, $P<0.05$). The expressions of DAX-1 and AR were related to tumor size, histological grade, ER and PR expression status, and DAX-1 also was related to TNM stage. DAX-1 and AR expressions were not related to age, menopause and lymph node metastases. **Conclusion** The expressions of DAX-1 and AR are up-regulated in breast carcinoma. Their expressions have relationship with tumor size, histological grade, ER and PR expression status. And DAX-1 also has relationship with TNM stage. DAX-1 and AR high expression may indicate good prognosis. It may have help for judging prognosis and providing neoadjuvant endocrine therapy biomarker for the patients with breast cancer to make further efforts on mechanism of action about DAX-1 and AR.

Key words Breast cancer; DAX-1; AR; Immunohistochemical

乳腺癌是妇女最常见的恶性肿瘤之一, 在 14~54 岁女性癌症患者中, 乳腺癌是引起死亡的首要原因^[1]。乳腺癌的发生与发展与类固醇类激素有着很重要的关系。除雌、孕激素之外, 雄激素 (androgen receptor, AR) 在乳腺癌中的作用也越来越受到重视。AR 是核受体家族成员之一, 它能与雄激素结合, 形成激素受体复合物, 影响并调节相关蛋白的表达。研究发现, 雄激素能够通过不同的调控方式, 影响肿瘤细胞的增殖或凋亡^[2, 3]。DAX-1 (dosage-sensitive sex reversal, adre-

nal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1), 是不典型的孤核受体家族成员, 在肾上腺皮质形成和性别分化中具有重要作用, 研究发现其表达于肝细胞癌、子宫内膜癌、前列腺癌中^[4~6]。目前国内有关 DAX-1 在乳腺癌中的表达, 及其与 AR 的关系研究甚少, 本研究采用免疫组化法探讨乳腺癌中 DAX-1 和 AR 的表达及两者与临床各病理指标的关系。

材料与方法

1. 标本来源: 随机选取 2005 年 1 月~2008 年 12 月在温州医科大学附属第二医院行乳腺癌改良根治手术的石蜡包埋组织 120 例, 经病理学证实均为乳腺非特殊型浸润性导管癌, 临床资料完整。其中, 腋窝淋巴结: 有转移 70 例, 无转移 50 例。肿块最大直径 <2cm 32 例, 2~5cm 65 例, >5cm 23 例。按世界卫

基金项目: 温州市科技计划项目 (Y20120063)

作者单位: 325000 温州市人民医院病理科 (杨小敏、潘丹、陈艳梅、郑翔); 325027 温州医科大学附属第二医院普外科 (徐晓武)

通讯作者: 潘丹, 电子信箱: 2536786488@qq.com

生组织肿瘤病理学分级标准 I 级 29 例, II 级 35 例, III 级 56 例。ER 阳性 85 例, 阴性 35 例; PR 阳性 82 例, 阴性 38 例。所有患者均为女性, 患者中位年龄 49 (31 ~ 69) 岁, 术前均未接受放疗、化疗等治疗方法, 清除淋巴结数均大于 15 枚。

2. 主要试剂与方法: DAX-1 (polyclonal; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), AR 鼠抗人单克隆抗体 (AR441) 购于福州迈新生物技术开发有限公司, DAB 试剂盒及免疫组织化学 SP 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。石蜡组织切片, 厚约 4 μ m, 然后将切片脱蜡水化, 采用 SP 免疫组化法, 操作步骤按照试剂盒说明书。抗 DAX-1 和 AR 的工作液均经微波修复预处理, 抗原修复液为柠檬酸缓冲液 (pH 6.0)。一抗 DAX-1 和 AR 抗体的稀释度分别为 1:20、1:50, 阴性对照采用 PBS 代替一抗。

3. 结果判断: 有两位病理医师盲法阅片, 参照参考文献 [7, 8], DAX-1 和 AR 均以细胞核内出现棕黄色颗粒为阳性信号, 一张切片阳性细胞计数 < 10% 为阴性, $\geq$ 10% 为阳性。

4. 统计学方法: 采用 SPSS 17.0 统计软件, 相关性检验采用 Spearman 相关分析, 计数资料比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 乳腺癌中 DAX-1 和 AR 的表达: DAX-1 和 AR 主要在癌细胞核表达 (图 1)。120 例乳腺癌中 DAX-1 和 AR 阳性表达率分别为 75.00% 和 75.83%。

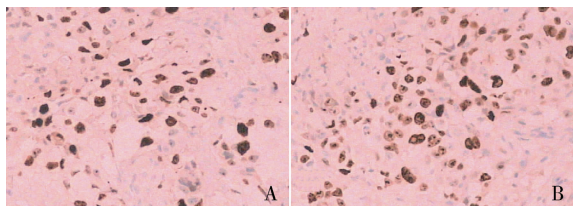


图 1 乳腺癌中 DAX-1 和 AR 的表达 ($\times 200$)

A. DAX-1 表达于癌细胞核; B. AR 表达于癌细胞核

2. 乳腺癌中 DAX-1 和 AR 表达的关系: 在 90 例 DAX-1 表达阳性的乳腺癌中, AR 有 83 例阳性表达; 而在 30 例 DAX-1 表达阴性的乳腺癌中, AR 有 8 例阳性表达; DAX-1 与 AR 表达呈正相关 ($r = 0.66$, $P < 0.05$, 表 1)。

表 1 乳腺癌中 DAX-1 与 AR 表达的关系

AR	DAX-1		r	P
	+	-		
+	83	8	0.66	0.00
3	7	22		

3. 乳腺癌中 DAX-1 和 AR 的表达与临床各病理指标的关系: DAX-1 的表达与肿瘤直径、组织学分级、TNM 分期、ER 和 PR 的表达状态有关 ($P < 0.05$), 与患者年龄、月经状态、淋巴结转移情况均无关 ($P > 0.05$), AR 的表达与肿瘤直径、组织学分级、ER 和 PR 的表达状态有关 ($P < 0.05$), 而与患者年龄、月经状态、TNM 分期、淋巴结转移情况无关, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 2)。

讨 论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 目前关于乳腺癌生物学标志物的研究很多^[9]。雌激素受体 (ER) 和孕激素受体 (PR) 在乳腺癌的发生、发展中起着重要的促进作用, 两者是乳腺癌内分泌治疗时推荐使用的重要生物学标志物^[10]。然而, 乳腺癌具有异质性, 传统的组织学分类方法及生物学标志物难以为所有乳腺癌患者的预后做出预测, 因此, 迫切需要寻找一种能为乳腺癌预后及治疗方案提供有效帮助的新生物学标志物^[11]。AR 是类固醇核受体超家族成员之一, 它的结构和功能与 ER、PR 具有相似性。近来研究发现, AR 在乳腺癌组织中有异常表达, 其与乳腺癌临床病理特征和生存预后的关系密切, AR 不仅可以作为判断乳腺癌预后转归的预测因子, 而且可能作为一个新靶点来指导临床个体化治疗^[12]。DAX-1 是一种非典型核受体家族成员, 它在人类下丘脑、垂体、肾上腺等部位均有表达^[13]。DAX-1 对性腺分化和类固醇激素合成有重要作用^[14]。目前国内有关 DAX-1 在乳腺癌中的表达, 及其与 AR 的关系研究甚少。

本研究采用免疫组化法检测乳腺癌中 DAX-1 和 AR 的表达。结果显示 DAX-1 和 AR 主要表达于癌细胞核, 120 例乳腺癌 DAX-1 和 AR 阳性表达率分别为 75% (90/120)、75.83% (91/120)。此结果与既往研究结果既有相似又有不同之处, Chae 等^[8]研究表明 DAX-1 和 AR 主要表达于细胞核, Zhang 等^[15]研究显示 DAX-1 在入选实验的所有乳腺癌病例均有表达, DAX-1 表达于细胞质、细胞核或质核均有表达。既往研究提示, 调节莱迪细胞中类固醇激素合成酶的表达能影响 DAX-1 的生物活性, 在无淋

表 2 乳腺癌中 DAX-1 和 AR 的表达与临床各病理指标的关系

临床病理指标	DAX-1		阳性率 (%)	χ^2	<i>P</i>	AR		阳性率 (%)	χ^2	<i>P</i>
	-	+				+	-			
年龄(岁)										
≤45	32	11	74.42	0.012	0.912	30	13	69.77	1.345	0.246
>45	58	19	75.32			61	16	79.22		
是否绝经										
否	52	18	74.29	0.011	0.915	50	20	71.43	1.779	1.182
是	38	12	76.00			41	9	82.00		
肿瘤直径(cm)										
<2.0	29	3	90.63	8.401	0.015	29	3	90.63	8.508	0.014
2.0~5.0	48	17	73.85			49	16	75.38		
>5.0	13	10	56.52			13	10	56.52		
组织学分级										
I	26	3	89.66	7.217	0.027	27	2	93.10	7.664	0.022
II	28	7	80.00			27	8	77.14		
III	36	20	64.29			37	19	66.07		
TNM 分期										
I~II	47	9	83.93	4.464	0.035	42	14	75.00	0.04	0.842
III	43	21	67.19			49	15	76.56		
淋巴结转移										
无	39	11	78.00	0.411	0.521	37	13	74.00	0.157	0.692
有	51	19	72.86			54	16	77.14		
ER										
+	71	14	83.53	11.310	0.001	70	15	82.35	6.760	0.009
-	19	16	54.29			21	14	60.00		
PR										
+	67	15	81.71	6.210	0.013	69	13	84.15	9.770	0.002
-	23	15	60.53			22	16	57.89		

巴结转移的乳腺癌中 DAX-1 与 AR 的表达呈正相关^[8,16]。本研究相关分析亦表明 DAX-1 和 AR 在乳腺癌中的表达呈正相关($r=0.66$, $P<0.05$)。据 Lanzino 等^[3]研究结论推断,这可能是由于配体激活的 AR 能够与 DAX-1 基因内的雄激素反应原件(androgen response element, ARE)结合,使 DAX-1 的转录活性增加,导致 DAX-1 表达增加。

本研究还发现,DAX-1 的表达与肿瘤直径、组织学分级、TNM 分期及 ER 和 PR 的表达状态有关($P<0.05$),与患者年龄、月经状态、淋巴结转移情况均无关($P>0.05$),AR 的表达与肿瘤直径、组织学分级及 ER 和 PR 的表达状态有关($P<0.05$),而与患者年龄、TNM 分期、月经状态、淋巴结转移情况无关,差异无统计学意义($P>0.05$)。有研究表明,下调鼠莱迪细胞瘤中 DAX-1 和 AR 的表达,能有效促进芳香化酶活性,并促进肿瘤细胞生长^[17]。乳腺癌中 AR 表达增加,促进 DAX-1 的表达,DAX-1 再与特异性芳香化酶启动子序列结合,从而抑制芳香化酶的基因转录,使芳香化酶合成减少,其作用类似芳香化酶

抑制剂,抑制由雄激素向雌激素的转化,导致 ER 活性降低,抑制乳腺癌细胞增殖,从而使肿瘤增殖活性下降有关^[3]。亦有研究表明 AR 可通过 DAX-1 下调细胞周期素(cyclinD1)的转录,抑制细胞由 G₁ 期进入 S 期,从而抑制肿瘤细胞增殖^[18]。因此,本研究中 DAX-1 和 AR 的表达与肿瘤直径有关可能是由于乳腺癌中 DAX-1 和 AR 的表达增加。另本研究发现,在肿瘤组织学级别较低、ER 和 PR 阳性的病例中 DAX-1 和 AR 的表达率较高,ER 阳性病例 DAX-1 和 AR 阳性率分别为 83.53%、82.35%,PR 阳性病例 DAX-1 和 AR 的阳性率分别为 81.71%、84.15%;ER、PR 阴性的病例表达率也不低,ER 阴性患者 DAX-1 和 AR 阳性率分别为 54.29%、60.00%,PR 阴性患者 DAX-1 和 AR 阳性率分别为 60.53%、57.89%。ER、PR 阳性是推荐内分泌治疗的有效依据,对乳腺的组织学分级亦有一定的影响。因此进一步探讨 DAX-1、AR、ER、PR 之间的相互作用关系及 DAX-1、AR 对三阴乳腺癌的影响,是今后研究的方向。

综上所述,乳腺癌中 DAX - 1 和 AR 的高表达可能预示良好的预后,然而,DAX - 1 和 AR 对乳腺癌细胞和相关分子的调控作用还存在很多疑点,有些研究得出不同的结论,因此,需进一步研究两者对乳腺癌发生、发展作用的机制,才可能对判断乳腺癌患者的预后及提供新的内分泌辅助治疗生物学标志物有一定的帮助。

参考文献

- Lu SM, Nelson JA, Fischer JP, *et al.* The impact of complications on function, health, and satisfaction following abdominally based autologous breast reconstruction: a prospective evaluation[J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2014, 67(5): 682 - 692
- Naderi A, Hughes - Davies L. A functionally significant cross - talk between androgen receptor and ErbB2 pathways in estrogen receptor negative breast cancer[J]. *Neoplasia*, 2008, 10(6): 542 - 548
- Lanzino M, Maris P, Sirianni R, *et al.* DAX - 1, as an androgen - target gene, inhibits aromatase expression: a novel mechanism blocking estrogen-dependent breast cancer cell proliferation[J]. *Cell Death Dis*, 2013, 7(4): e724
- Jiang HL, Xu D, Yu H, *et al.* DAX - 1 inhibits hepatocellular carcinoma proliferation by inhibiting β - catenin transcriptional activity [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34(3): 734 - 742
- Saito S, Ito K, Suzuki T, *et al.* Orphan nuclear receptor DAX - 1 in human endometrium and its disorders [J]. *Cancer Sci*, 2005, 96(10): 645 - 652
- Tong SJ, Liu J, Wang X, *et al.* MicroRNA181 promotes prostate cancer cell proliferation by regulating DAX1 expression[J]. *Exp Ther Med*, 2014, 8(4): 1296 - 1300
- 田慧玲,周风华,郑洁等, Ki - 67、AR 及 FRA 在三阴性乳腺癌中的表达及意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2014, 22(4): 830 - 833
- Chae BJ, Lee A, Bae JS, *et al.* Expression of nuclear receptor DAX - 1 and androgen receptor in human breast cancer[J]. *J Surg Oncol*, 2011, 103(8): 768 - 772
- 吴亮,王建明. 乳腺癌相关基因异常甲基化研究进展及其临床应用[J]. *医学研究杂志*, 2014, 43(2): 156 - 159
- Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, *et al.* Meeting highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer. Seventh International Conference on Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2001, 19(18): 3817 - 3827
- Park S, Koo J, Park HS, *et al.* Expression of androgen receptors in primary breast cancer[J]. *Ann Oncol*, 2010, 21(3): 488 - 492
- 吴晶晶. 乳腺癌相关雄激素受体的研究进展[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2014, 19(3): 280 - 283
- Lardone MC, Parda - Bustamante A, Ebensperger M, *et al.* DAX - 1 and DAX - 1A expression in human testicular tissues with primary spermatogenic failure[J]. *Mol Hum Reprod*, 2011, 17(12): 739 - 746
- Von Schalburg KR, Yasuike M, Yazawa R, *et al.* Regulation and expression of sexual differentiation factors in embryonic and extragonadal tissues of Atlantic salmon[J]. *BMC Genomics*, 2011, 22(12): 31 - 38
- Zhang H, Slewa A, Janssen E, *et al.* The prognostic value of the orphan nuclear receptor DAX - 1 (NROB1) in node - negative breast cancer[J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(2): 443 - 449
- Sadasivam M, Ramachandirin B, Balakrishnan S, *et al.* TNF - α - mediated suppression of Leydig cell steroidogenesis involves DAX - 1 [J]. *Inflamm Res*, 2015, 64(7): 549 - 556
- Maris P, Campan A, Barone I, *et al.* Androgens inhibit aromatase expression through DAX - 1: insights into the molecular link between hormone balance and Leydig cancer development[J]. *Endocrinology*, 2015, 156(4): 1251 - 1262
- Lanzino M, Sisci D, Morelli C, *et al.* Inhibition of cyclin D1 expression by androgen receptor in breast cancer cells - identification of a novel androgen response element[J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(16): 5351 - 5365
- (收稿日期:2015 - 06 - 26)
- (修回日期:2015 - 07 - 25)
- (接第 149 页)
- Zhang J, Yuan C, Wu J, *et al.* Polo - like kinase 1 - mediated phosphorylation of Forkhead box protein M1b antagonizes its SUMOylation and facilitates its mitotic function[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(6): 3708 - 3719
- Rokavec M, Li H, Jiang L, *et al.* The p53/miR - 34 axis in development and disease[J]. *J Mol Cell Biol*, 2014, 6(3): 214 - 230
- Liu J, Lu KH, Liu ZL, *et al.* MicroRNA - 100 is a potential molecular marker of non - small cell lung cancer and functions as a tumor suppressor by targeting polo - like kinase 1[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 519
- Biagioni F, Bossel BN, Fontemaggi G, *et al.* miR - 10b *, a master inhibitor of the cell cycle, is down - regulated in human breast tumours[J]. *EMBO Mol Med*, 2012, 4(11): 1214 - 1229
- Ando K, Ozaki T, Yamamoto H, *et al.* Polo - like kinase 1 (PLK1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(24): 25549 - 25561
- Dias SS, Hogan C, Ochocka AM, *et al.* Polo - like kinase - 1 phosphorylates MDM2 at Ser260 and stimulates MDM2 - mediated p53 turnover[J]. *FEBS Lett*, 2009, 583(22): 3543 - 3548
- Sanhaji M, Kreis NN, Zimmer B, *et al.* p53 is not directly relevant to the response of Polo - like kinase 1 inhibitors[J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(3): 543 - 553
- Sanhaji M, Louwen F, Zimmer B, *et al.* Polo - like kinase 1 inhibitors, mitotic stress and the tumor suppressor p53 [J]. *Cell Cycle*, 2013, 12(9): 1340 - 1351
- (收稿日期:2015 - 07 - 03)
- (修回日期:2015 - 08 - 02)