

HER2 阳性乳腺癌中 CD44v6 的表达与曲妥珠单抗耐药的关系

王延桂 高美华[△]

(青岛大学医学院免疫教研室 山东 青岛 266021)

摘要 目的:探讨曲妥珠单抗在治疗 HER2 阳性的转移性乳腺癌时,产生耐药性与 CD44v6 表达的相关性。方法:共 66 例 HER2 阳性转移性乳腺癌患者入组。接受曲妥珠单抗治疗的患者 37 例,其中 18 例获得了治疗前和治疗后转移性癌组织。采用免疫组化 S-P 法对治疗前、治疗后的不同乳腺组织进行 CD44v6 表达的研究。结果:CD44v6 在经曲妥珠单抗治疗产生耐药的活检组织中阳性表达程度明显高于治疗前。结论:CD44v6 的表达与曲妥珠单抗耐药相关。

关键词:乳腺癌;CD44v6;HER2;曲妥珠单抗;转移性乳腺癌

中图分类号:R737.9 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)02-310-04

Relationship between Expression of CD44v6 and Resistance of Trastuzumab Chemotherapy in Metastatic Breast Cancer Patients with HER2 Positive

WANG Yan-gui, GAO Mei-hua[△]

(Department of Immunology, Qingdao University Medical College, Qingdao, 266021, China)

ABSTRACT Objective: To explore the correlation between the expression of CD44v6 and resistance of trastuzumab chemotherapy for metastatic breast cancer patient with HER2 positive. **Methods:** 66 metastatic breast cancer patients with HER2 positive were eligible. Among 66 patients, 37 were received trastuzumab, and there were 18 patients who had tumor tissues before and after therapy. All species were analyzed by S-P immunohistochemical method using the monoclonal antibody CD44 v6. **Results:** CD44v6 in breast cancer tissues of resistance to trastuzumab were significantly higher than before the treatment. **Conclusion:** There may be correlation between the expression of CD44v6 and resistance to trastuzumab.

Key words: Breast cancer; CD44v6; HER2; Trastuzumab; Metastatic breast cancer

Chinese Library Classification(CLC): R737.9 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)02-310-04

肿瘤的靶向治疗已成为 21 世纪医学研究和实践的热点,其中针对乳腺癌 HER2 基因的人源化单克隆抗体 - 曲妥珠单抗 / 赫赛汀(Trastuzumab / Herceptin)已经用于乳腺癌的治疗。但单药赫赛汀的客观有效率并不高,为 12-34%,尽管曲妥珠单抗联合化疗提高了曲妥珠单抗的有效率,但还有很多初始接受赫赛汀治疗有效的病人常在 1 年内产生耐药^[1,8],加上其费用高昂,存在潜在的心脏毒性^[2],所以探讨其耐药机制并寻找能够预测赫赛汀疗效的生物学指标对于赫赛汀的临床应用有着重要的意义。

粘附因子 CD44 是一种和癌细胞侵袭和转移行为有密切关系的跨膜蛋白,CD44v6 是含 ExonII 的 CD44 蛋白变异体,其相对分子量为 190KD,在多种肿瘤的发生、发展、尤其是在肿瘤细胞的转移过程中起重要作用^[3,12]。但 CD44v6 在乳腺癌组织中的表达,目前国外研究尚且存在不一致的情况,而国内尚未见较大组别的对比研究。为进一步了解 CD44v6 在不同乳腺组织中的表达差异^[4,6],探讨其与乳腺癌转移的关系,我们采用 S-P 免疫组化染色方法,对 171 例不同乳腺组织标本的

CD44v6 表达进行分析研究,结果在 HER2 阳性转移性乳腺癌患者得到了新发现。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集烟台市烟台山医院乳腺科 2004 年~2010 年的乳腺癌患者病例。符合标准,入组的患者共 66 例,均为经病理组织学检查确诊的转移性乳腺癌女性患者,入院时 HER2 状态免疫组化检测均为(++)~(+++),接受曲妥珠单抗治疗的病人均被 FISH 证实阳性,该组病人共 37 例,3 例失访,5 例完全缓解(CR),6 例部分缓解(PR),11 例稳定(SD),12 例进展(PD),SD、PD 为化疗耐药患者。SD 病人有 8 例在治疗 16W 后获得活检组织,PD 病人 10 例在治疗 8 周后获得活检组织。未接受曲妥珠单抗治疗的患者共 29 例,2 例失访,1 例 CR,2 例 PR,8 例 SD,16 例 PD。SD 与 PD 患者,共 21 例在治疗后获得活检组织。所有组织和 9 例正常乳腺组织,均经 4%多聚甲醛液固定,常规石蜡包埋切片,每块标本切片厚 5μm,每片间隔 20μm;然后进行 HE 染色及免疫组织组化染色。

1.2 试剂

鼠抗人 CD44v6 单克隆抗体购自北京中山生物技术有限公司,,S-P 试剂盒为 BIOTECH 公司产品。鼠抗人 HER2/neu

作者简介:王延桂(1979-),男,硕士研究生,检验师,主要研究方向:分子免疫,电话 13405357710,E-mail:wangyangui0105@qq.com
[△]通讯作者:高美华,E-mail:Meihuagao@hotmail.com
(收稿日期:2010-10-08 接受日期:2010-10-31)

单克隆抗体,购自福州迈新公司产品。

1.3 方法

免疫组化采用 S - P 法染色, 步骤如下: 4μ m 切片脱蜡至水, 3 %H₂O₂ 甲醇溶液室温孵育 10 分钟, 微波抗原修复 10 分钟, 室温冷却后, 10 %羊血清 37 °C 孵育 20 分钟, 滴加一抗, 工作效价 1 : 50 , 4 °C 过夜, 生物素标记羊抗鼠 IgG 孵育 30 分钟, HRP - 标记链酶卵白素孵育 30 分钟, DAB 显色 5~10 分钟, 苏木素复染后, 脱水透明封片, 光镜下观察。PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 结果判断

从每一例标本的石蜡切片中随机取 5 张切片进行免疫组织化学染色。每个标本在显微镜下随机选取不重叠的 10 个高倍视野, 对癌细胞计数分析, 每张切片由两人双盲观测。结果的

判断参照何洁华等的评分方法^[5]: 光镜下细胞膜呈现棕黄色为阳性, < 5% 的阳性细胞为阴性(-); 5% ~ 25% 的阳性细胞为弱阳性(+); 26% ~ 75% 的阳性细胞为中度阳性(++); > 75% 的阳性细胞为强阳性(+++)。

1.5 统计学处理

简明统计 10.34 软件进行数据统计处理, 采用符号秩和检验(Wilcoxon 配对法), P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD44v6 在转移性乳腺癌中的表达

CD44v6 在正常组织中基本无表达, 在乳腺癌中主要在癌细胞的胞膜中表达, 有时可见胞浆中弱阳性表达, 见图 1(Fig. 1)。

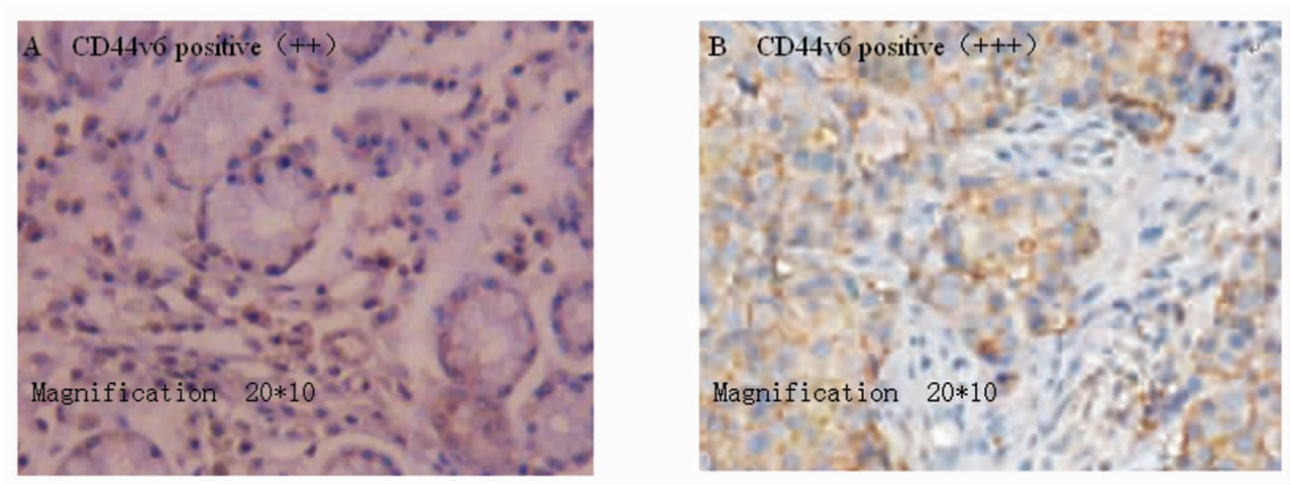


图 1 A、B 为转移性乳腺癌石蜡切片
Fig. 1 A and B is paraffin-section of metastatic breast cancer

2.2 HER2 治疗前、后活检组织表达程度

HER2 在曲妥珠单抗治疗后产生耐药的患者, 其治疗前、

后活检组织石蜡切片表达程度没有显著性差异, P>0.05 (见表 1)。

表 1 HER2 在曲妥珠单抗耐药患者治疗前、后石蜡切片表达程度结果

Table 1 The expression of HER2 results for paraffin-section befor and after therapy With resistance to trastuzumab

After therapy	Befer therapy				Total
	-	+	++	+++	
-	0	0	0	0	0
+	0	0	0	0	0
++	0	0	8	5	13
+++	0	0	4	1	5
Total	0	0	12	6	18

* 差值不等于 0 的例数(n)=9, 最小秩和(T-)=20.00, P>0.05

*The number of the cases that The difference is not equal to 0 is 9, the minimum rank(T-)= 20.00, P>0.05

2.3 治疗前、后活检组织表达程度

在未用曲妥珠单抗治疗的患者, 其治疗前、后活检组织的石蜡切片, CD44v6 表达程度没有显著性差异, P>0.05 (见表 1, Table 1)。

2.4 经曲妥珠单抗治疗产生耐药患者的 CD44V6 阳性表达程度

在经曲妥珠单抗治疗产生耐药患者的活检组织石蜡切片, CD44V6 阳性表达程度明显高于治疗前, 前、后比较有显著性差异, P<0.05(见表 2, Table 2)。

表 2 未用曲妥珠单抗治疗前、后石蜡切片 CD44v6 表达程度结果

Table 2 The expression of CD44v6 results for paraffin-section before and after therapy Without trastuzumab

After therapy	Before therapy				Total
	-	+	++	+++	
-	0	0	0	0	0
+	0	4	3	0	7
++	0	2	8	1	9
+++	0	1	1	1	3
Total	0	7	12	2	21

* 差值不等于 0 的例数(n)=8,最小秩和(T+)=16.00,P>0.05

*The number of the cases that The difference is not equal to 0 is 8, the minimum rank(T+) = 16.00,P>0.05

表 3 曲妥珠单抗耐药患者治疗前、后石蜡切片 CD44v6 表达程度结果

Table 3 The expression of CD44v6 results for paraffin-section before and after therapy With resistance to trastuzumab

After therapy	Before therapy				Total
	-	+	++	+++	
-	0	0	0	0	0
+	0	0	1	0	1
++	0	4	1	0	5
+++	0	6	5	1	12
Total	0	10	7	1	18

* 差值不等于 0 的例数(n)=16,最小秩和(T+)=5.50,P<0.05。

*The number of the cases that The difference is not equal to 0 is 16, the minimum rank(T+) = 5.50,P<0.05.

3 讨论

HER2 过表达的乳腺癌疾病进展快,预后不良。近 10 年的随机临床试验研究发现,在转移性乳腺癌及早期乳腺癌中,化疗联合赫赛汀在提高生存率方面效果明显^[7,8],可是大部分赫赛汀治疗有效者常在 1 年内产生耐药,所以探讨赫赛汀的耐药机制以及寻找能预测赫赛汀疗效的生物学指标对预防耐药、个体化治疗是十分重要的^[9,10]。

赫赛汀作为 HER2 的单克隆抗体,要发挥其作用必须与 HER2 有效结合。本次研究发现经曲妥珠单抗治疗产生耐药的活检组织石蜡切片,HER2 的表达程度与治疗前的差异没有统计学意义(P>0.05),即曲妥珠单抗耐药与治疗前 HER2 的表达程度无关。众所周知,细胞内的信号通路互相联系,形成一个复杂的网络体系,赫赛汀虽然能够抑制 HER2 同源或异源二聚体的形成从而阻断下游信号通路^[11],但肿瘤细胞可通过膜表面其它受体旁路激活 HER2 的下游信号通路,导致赫赛汀耐药现象发生^[9]。

CD44 是细胞表面的一种跨膜蛋白,属于表面黏附分子,主要参与细胞间、细胞与基质间的特异性黏附过程,为肿瘤细胞的增殖、分化、转移和侵袭提供微环境,CD44v6 是 CD44 的变异体^[6]。许多的研究都发现,CD44v6 在乳腺癌组织中过度表达^[6],与乳腺癌的转移和预后关系密切,CD44 v6 过度表达是预后差的乳腺癌标志^[11,12]。CD44 v6 与乳腺癌化疗耐药,尤其是与曲妥珠单抗耐药是否相关,目前研究尚不十分清楚。

本研究收集了 66 例 HER2 阳性的转移性乳腺癌,其中 37 例接受曲妥珠单抗联合紫杉醇等其它药物治疗,其中 18 例在治疗前后都取得活检组织的石蜡切片;另外 29 例未接受曲妥珠单抗治疗,其中 21 例获得治疗前后的活检组织的石蜡切片。结果发现 CD44v6 在曲妥珠单抗耐药的患者的治疗前后的差异有统计学意义(P<0.05),CD44 v6 在没有接受曲妥珠单抗治疗的患者的治疗前后的差异没有统计学意义(P>0.05)。因此有理由相信 CD44 v6 的过表达与曲妥珠单抗耐药相关。

CD44v6 与曲妥珠单抗耐药相关的具体分子机制目前尚不清楚,需要做进一步的研究。我们考虑:一,CD44 v6 表达上调,由于空间位阻,,或者是由于与其配体透明质酸的结合,阻碍了曲妥珠单抗与 HER2 的有效结合^[11];二,CD44 v6 过表达,重新启动了 HER2 的下游信号通路,造成了曲妥珠单抗耐药。

参考文献(References)

- [1] 孙燕,李丽庆,宋三泰,等.注射用曲妥珠单抗治疗晚期乳腺癌临床验证结果[J].中华肿瘤杂志,2003,25(6):581-583
Sun Yan,Li Li-qin,Song San-tan, et al. Result of phase II clinical trial on herceptin in advanced Chinese breast cancer patients [J]. Chinese Journal of Oncology ,2003, 25 (6):581-583(In chinese)
- [2] Dent S, Messersmith H, Trudeau M. Gemcitabine in the management of metastatic breast cancer: a systematic review[J]. Breast Cancer Res Treat, 2008, 3: 319 - 331
- [3] Draffin JE,Mc Farlane S, Hill A, et al. CD44 potentiates the adherence of metastatic prostate and breast cancer cells to bone marrow endothe-

- lial cells[J]. Cancer Res, 2004, 64 (16) : 5702 - 5711
- [4] Watanabe O, Kinoshita J, Shimizu T, et al. Expression of a CD44 variant and VEGF- C and the implications for lymphatic metastasis and long- term prognosis of human breast cancer [J]. JExp Clin Cancer Res, 2005, 24(1): 75- 82
- [5] 何洁华, 梁小曼, 候景辉, 等. 乳腺导管内乳头状瘤及其癌变组织 CD44v6 蛋白表达的研究[J]. 癌症, 2002, 21 (6): 615 - 618
He Jie-hua, Liang Xiao-man, Hou Jing-hui, et al. Study of CD44v6 protein expression in intraductal pappolloma and its maligant transformation of breast[J]. Chinese Journal of Cancer, 2002, 21 (6): 615-618(In chinese)
- [6] Auvinen P, Tammi R, Tammi M, et al. Expression of CD44s, CD44v3 and CD44v6 in benign and malignant breast lesions: correlation and colocalization with hyaluronan [J]. Histopathology, 2005, 47(4): 20- 28
- [7] Bruno R, Washington CB, Lu JF, et al. Population pharmacokinetics of trastuzumab in patients with HER2 + metastatic breast cancer [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2005, 56(36): 1- 9
- [8] G.N. Hortobagyi. Trastuzumab in the treatment of breast cancer[J]. N. Engl. J. Med, 2005, 353 : 1734-1736
- [9] A.M. Gonzalez-Angulo, G.N. Hortobágyi, F.J. Esteva. Adjuvant therapy with trastuzumab for HER-2 /neu-positive breast cancer [J]. Oncologist, 2006, 11: 857-867
- [10] X. Li, M.T. Lewis, J. Huang, et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy, J. Natl. Cancer Inst, 2008, 100 : 672-679
- [11] Liu Y J, Yan P S, Li J, et al. Expression and significance of CD44s, CD44v6, and nm23 mRNA in human cancer [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(42): 6601- 6606
- [12] Bendardaf R, Elzagheid A, Lamlum H, et al. E-cadherin, CD44s and CD44v6 correlate with tumour differentiation in colorectal cancer [J]. Oncol Rep, 2005, 13(5) : 831- 835
- [13] P. Nagy, E. Friedländer, M. Tanner, et al. Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line [J]. Cancer Res, 2005, 65: 473-482.
-
- (上接第 309 页)
- [6] Hang LW, Hsia TC, Chen WC, et al. Interleukin-10 gene -627 allele variants, not interleukin-I beta gene and receptor antagonist gene polymorphisms, are associated with atopic bronchial asthma[J]. J Clin Lab Anal, 2003, 17(5): 168-173
- [7] Chen J, Deng Y, Zhao J, et al. The polymorphism of IL-17 G-152A was associated with childhood asthma and bacterial colonization of the hypopharynx in bronchiolitis [J]. J Clin Immunol, 2010, 30(4): 539-545
- [8] Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma [J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(4): 271-283
- [9] Oh JW, Seroogy CM, Meyer EH, et al. CD4 T-helper cells engineered to produce IL-10 prevent allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation[J]. J Allergy Clin Immunol, 2002, 110(3): 460-468
- [10] Ke Y, Liu K, Huang GQ, Cui Y, Kaplan HJ, Shao H et al. Anti-inflammatory role of IL-17 in experimental autoimmune uveitis [J]. J Immunol, 2009, 182(5): 3183-3190
- [11] Eskdale J, Gallagher G, Verweij CL, et al. Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(16): 9465-9470
- [12] 张嘉琳, 陈虹, 胡良平, 等. 白细胞介素 4 和 10 基因多态性与儿童哮喘的相关性及对细胞因子表达的影响 [J]. 中华医学杂志, 2002, 82(2): 114-118
Zhang Jia-lin, Chen Hong, Hu Liangping, et al. Correlation between polymorphism of IL-4 and I L-10 gene promoter and childhood asthma and their impact upon cytokine expression [J]. Natl Med J China, 2002, 82(2): 114-118(in Chinese)
- [13] Lim S, Crawley E, Woo P, et al. Haplotype associated with low interleukin-10 production in patients with severe asthma[J]. Lancet, 1998, 352(9122): 113
- [14] Nordang GB, Viken MK, Hollis-Moffatt JE, et al. Association analysis of the interleukin 17A gene in Caucasian rheumatoid arthritis patients from Norway and New Zealand[J]. Rheumatology (Oxford), 2009, 48 (4): 367-370
- [15] Arisawa T, Tahara T, Shibata T, et al. The influence of polymorphisms of interleukin-17A and interleukin-17F genes on the susceptibility to ulcerative colitis[J]. J Clin Immunol, 2008, 28(1): 44-49
- [16] Wang JY, Shyr SD, Wang WH, et al. The polymorphisms of interleukin 17A (IL17A) gene and its association with pediatric asthma in Taiwanese population[J]. Allergy, 2009, 64(7): 1056-1060
- [17] Chen J, Deng Y, Zhao J, et al. The polymorphism of IL-17 G-152A was associated with childhood asthma and bacterial colonization of the hypopharynx in bronchiolitis [J]. J Clin Immunol, 2010, 30(4): 539-545