

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.02.016

新型雌激素受体 GPER 在乳腺癌组织中的表达及与预后的相关性

罗平, 罗浩军, 杨光伦, 涂刚

No Correlation between Expression of GPER and Prognosis of Patients with Primary Breast Cancer

Luo Ping, Luo Haojun, Yang Guanglun, Tu Gang

Department of Endocrine and Breast Surgery, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Corresponding Author: Tu Gang, E-mail: tugang68@126.com

Abstract: Objective To research the relationships between expression of G-protein coupled estrogen receptor (GPER) and patient prognosis in primary mammary cancers. **Methods** GPER from 241 tissues of primary breast cancer patients was detected by immunohistochemistry relationships between the expression of GPER and each of clinicopathological factors were analyzed by Chi-square and t-test. After a median 44.6 months follow-up, relationships between GPER expression and patient prognosis were analyzed by Kaplan-Meier method. **Results** GPER expression rate was 64.7%. There was a significant relationship among GPER and ER α , PR ($P < 0.05$), while no statistically association between GPER and HER-2 as well as other clinicopathological variables (patients age, menstruation status, tumor size, TNM stage, histological grade and pathological type) ($P > 0.05$). Disease-free survival and overall survival in patients with GPER+ tumors were longer than those in patients with GPER- ($P > 0.05$). There was no marked association between GPER expression and hormonal therapy resistance. **Conclusion** The expression of GPER was not significantly related with most clinicopathological variables and impact on prognosis of breast cancers patients, also not an independent prognostic determinant for breast carcinoma.

Key words: Breast carcinoma; Estrogen receptor; GPER; Prognosis

摘要: 目的 探讨新型雌激素受体 GPER 在乳腺癌中的表达及与患者预后的关系。**方法** 应用免疫组织化学 SP 法检测 241 例乳腺癌患者手术标本中 GPER 蛋白的表达, 利用 χ^2 检验和 t 检验分析其与临床病理变量的关系, 结合随访资料利用生存函数分析其与患者预后的关系。**结果** 乳腺癌组织中 GPER 阳性表达率为 64.7%, 其表达与 ER、PR 的表达显著相关 ($P < 0.05$), 与 HER-2 及其他临床病理指标 (年龄、月经情况、肿瘤大小、TNM 分期、组织学分级、病理类型) 无相关性 ($P > 0.05$)。中位随访时间 44.6 月, GPER 阳性肿瘤患者无进展生存时间和总生存时间较阴性患者长, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。GPER 的表达与乳腺癌患者内分泌治疗耐药也无相关性 ($P > 0.05$)。**结论** GPER 在大部分乳腺癌中阳性表达, 但对患者预后无显著影响, 可能不是乳腺癌的独立预后因子。

关键词: 乳腺癌; 雌激素受体; GPER; 预后

中图分类号: R737.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2012)02-0181-04

0 引言

雌激素通过雌激素受体 (estrogen receptor,

ER) 在乳腺癌的发生发展中起重要作用。以 ER α 为靶点的内分泌治疗在各期乳腺癌中疗效良好, ER α 作为独立的预后判断因子在临床上应用广泛。G 蛋白偶联雌激素受体 (G-protein coupled estrogen receptor, GPER) 是新近发现的 ER, 又被称为 GPR30, 与核受体 ER α 、 β 有显著差异^[1-2]。研究表明 GPER 能促进乳腺癌细胞增殖、迁移, 可能在乳腺癌进展中发挥重要作用^[3-4]。本研究通过免疫组织化学方法检测 GPER 蛋白在乳腺癌组织中的表达, 分析其与肿瘤临床病理因子及患者预后的关联, 探讨 GPER 对乳腺癌患者预后的影响。

收稿日期: 2011-04-28; 修回日期: 2011-06-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30872520); 教育部科学技术研究重点资助项目 (208113); 重庆市自然科学基金资助项目 (CSTC, 2008BB5200); 重庆市教委科技资助项目 (KJ080327)

作者单位: 400016 重庆, 重庆医科大学附属第一医院内分泌乳腺外科

通信作者: 涂刚, E-mail: tugang68@126.com

作者简介: 罗平 (1985-), 男, 硕士在读, 主要从事乳腺癌内分泌治疗的基础与临床研究

1 资料与方法

1.1 资料

随机选取重庆医科大学病理科 2006—2007 年存档的石蜡包埋乳腺癌标本 241 例,126 例(52.2%)为绝经后妇女,中位年龄 50.6(28~83)岁,其中 212 例(87.9%)为浸润性导管癌。TNM 分期中,II 和 III 期患者占 59.3%(143 例)。154 例(63.9%)患者组织学分级为 II 级。在所有患者中仅有 52 例接受了术前新辅助化疗。每例均经两名病理科教授阅片,证实诊断。临床病理特征见表 1。

表 1 患者临床病理特征

Table 1 Characteristics of the breast cancer specimens

Items	Number	GPER ⁺
Age($\bar{x} \pm s$)	50.6 ± 11.5	50.6 ± 11.3
Menstruation status		
Premenopause	115	76
Postmenopause	126	80
Tumor size	25.8 ± 13.8	25.8 ± 14.5
TNM stage(7th AJCC)		
0	5	2
I	68	50
II	93	56
III	50	30
IV	25	18
Histologic grade		
I	62	48
II	154	88
III	25	20
Histopathologic type		
Invasive ductal	212	135
Invasive lobular	5	3
DCIS	5	2
Mucinous	7	6
Medullary	4	3
Adenoid cystic	7	3
Others	1	1
Neoadjuvant chemotherapy		
Yes	52	35
No	189	121

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学 SP 法检测 兔抗人 GPER (ab12563)多克隆抗体购自英国 Abcam 公司。免疫组织化学试剂盒(SP9001)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

免疫组织化学染色过程按照说明书进行,微波抗原修复,一抗(GPER 工作浓度 1:200),PBS 代替一抗作阴性对照。

结果判断根据染色程度及阳性细胞数计算评

分:(1)染色程度:全部细胞阴性(-)为 0 分,染色细胞弱阳性(+)1 分,中等阳性(++)2 分,强阳性(+++)3 分;(2)阳性细胞数:着色强度高于背景非特异性染色者为阳性。随机选取肿瘤细胞分布密集区域的 6 个高倍视野进行记数,至少记数 100 个肿瘤细胞,观察其阳性表达情况。阳性表达率 < 1% 为 1 分,1%~10% 为 2 分,11%~33% 为 3 分,34%~66% 为 4 分,67%~100% 为 5 分。(1)、(2)之和 5~8 分者定为抗原表达阳性,否则为阴性^[5]。每张切片由两名病理医师分别评分,两者不一致时重新评估。ER、PR 及 HER-2 免疫组织化学结果由重庆医科大学病理科提供。

1.2.2 随访方法及预后判断标准 从患者完成必要的放化疗后开始规律门诊随访。并于 2010 年 8 月至 10 月进行了集中信访、电话访问,随访截至 2010 年 10 月 30 日。事件包括局部复发、远处转移、乳腺癌相关死亡。无进展生存期(Disease-free survival, DFS)为确诊至发现复发、转移时间段;总生存期(Overall survival, OS)为确诊至死亡、失访及最后随访时间段。内分泌治疗期间发生事件为耐药。

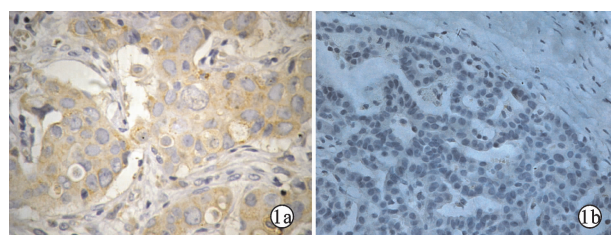
1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计分析软件进行 χ^2 检验、Fisher 精确检验(分类变量)及 *t* 检验(连续变量)分析 GPER 表达及与临床病理因子之间的关联。用寿命表分析 GPER 与患者预后之间的关系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GPER 在乳腺癌中的染色特点

在乳腺癌组织中,GPER 表达于癌细胞胞质,胞膜和胞核无表达,见图 1。



1a: positive expression of GPER in carcinomatous cell cytoplasm; 1b: negative expression of GPER in carcinomatous cell cytoplasm

图 1 GPER 蛋白在乳腺癌组织中的表达(DAB × 400)
Figure 1 The expression of GPER in breast cancer(DAB × 400)

2.2 GPER 的表达及与临床病理变量之间的关系

GPER 在 64.7% 的乳腺癌中阳性表达。GPER 和 ER 共同表达的肿瘤占总体的 31.9%,这两种雌激素受体的表达具有相关性($P = 0.03$)。GPER 与 PR 的表达显著相关,与 HER-2 及其他临床病理因子(年龄、月经情况、肿瘤大小、TNM 分期、组织学

分级、病理类型)不相关,见表 1、2。

表 2 GPER、ER α 、PR 及 HER-2 表达情况

Table 2 Distribution of GPER with ER α 、PR and HER-2

Items	Total	GPER ⁺
ER α expression [*]		
+	122	87
-	114	69
PR expression [*]		
+	98	46
-	143	110
HER-2 status		
-	110	66
+	62	42
++	43	31
+++	26	17

Note: * : $P < 0.05$

2.3 GPER 的表达及与患者预后的关系

截至 2010 年 10 月 30 日,对 241 例乳腺癌患者的随访时间为 3.5~56.9 月,中位随访时间为 44.6 月。随访期间失访 30 例,失访率为 12.4%。全组局部复发 11 例,远处转移 21 例(分别为骨转移 13 例、肺转移 4 例、肝转移 3 例、脑转移 1 例),死亡 6 例。ER α 和(或)PR 阳性患者共 138 例;其中 114 例接受了规范的内分泌治疗;13 例发生耐药,耐药率为 9.02%,耐药的发生与 GPER 表达无显著相关($P = 0.276$)。

寿命表分析显示 GPER 阳性组与阴性组比较,无进展生存时间(中位生存时间 56.0 月 vs. 54.0 月)和总生存时间更长(中位生存时间 59.0 月 vs. 57.0 月),但差异均无统计学意义($P = 0.188, P = 0.734$),见图 2、3。

将肿瘤分为 GPER⁺ER α ⁺、GPER⁻ER α ⁺、GPER⁺ER α ⁻、GPER⁻ER α ⁻ 四组进行比较,GPER⁻/ER α ⁻ 组患者生存时间最短,而 GPER⁺/ER α ⁺ 组患者生存时间最长,但差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 4、5。

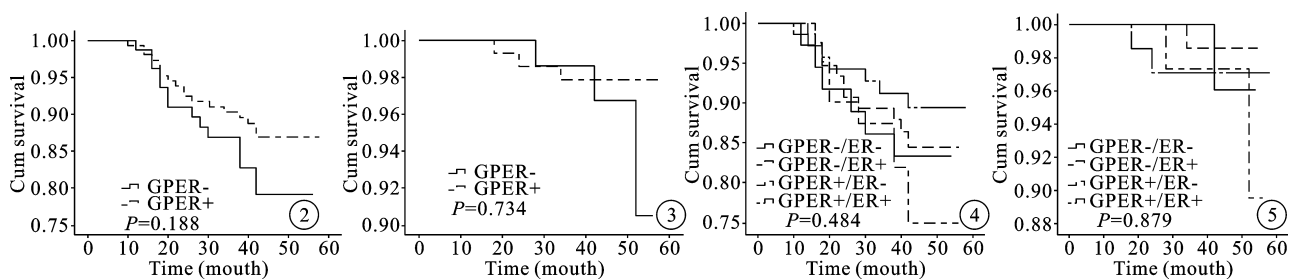


图 2 GPER 蛋白阳性和阴性表达肿瘤患者无进展生存曲线

Figure 2 Disease-free survival curve of patients with GPER positive and negative tumors

图 3 GPER 蛋白阳性和阴性表达肿瘤患者总生存曲线

Figure 3 Overall survival curve of patients with GPER positive and negative tumors

图 4 不同 GPER/ER α 表型肿瘤患者无进展生存曲线

Figure 4 Disease-free survival curve of patients with GPER/ER α expression phenotype tumors

图 5 不同 GPER/ER α 表型肿瘤患者总生存曲线

Figure 5 Overall survival curve of patients with GPER/ER α expression phenotype tumors

3 讨论

GPER 是 1997 年 Carmeci 等^[1]克隆出的新型 ER,属 G 蛋白偶联受体家族,可与雌激素特异性结合,通过反式激活表皮生长因子受体(Epidermal growth factor receptor,EGFR)及第二信使等介导雌激素样物质快速反应和转录调节^[2-3]。体外研究提示 GPER 可能参与肿瘤的发生发展,影响乳腺癌的综合治疗效果和预后。Pandey 等^[4]研究发现 GPER 结合雌二醇(Estradiol, E₂)可促进乳腺癌细胞增殖和迁移。Quinn 等^[6]认为 E₂ 与氟维司群均可通过 GPER 促进细胞黏附、播散和生存。还有报道指出 GPER 参与化疗药物耐受^[7]。但目前少有 GPER 与乳腺癌患者临床预后相关的报道。我们先前报道了 GPER 在乳腺癌组织中的表达及其与临床病理因子间的关系^[8],本文结合随访资料进一步评估 GPER 对患者预后的影响。

研究发现 GPER 可以通过影响转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 和 EGFR 等信号通路而导致对乳腺癌患者内分泌治疗耐药^[9-10]。本研究结果显示 GPER 的表达与 ER、PR 的表达显著相关,GPER 在 ER α 阳性的乳腺癌中表达率超过 60%,与先前报道结果基本一致^[8,10]。在这部分患者中,GPER 的表达可能与耐药和无反应有关。但我们的初步随访资料并未发现 GPER 的表达与内分泌治疗耐药有显著关联($P = 0.276$),可能与样本量及随访时间不足有关。基于 GPER 可介导雌激素的细胞增殖、迁移等效应及在乳腺癌中的广泛表达,靶向 GPER 的药物或可成为 ER α 阳性乳腺癌内分泌治疗的必要补充和 ER α 阴性乳腺癌的有用选择。

Filardo 等^[11]通过免疫组织化学染色 321 例浸润性乳腺癌发现 GPER 表达与 HER-2 过表达、肿瘤大小及远处转移相关,认为其为乳腺癌生物学进

展的指标之一。但后来台湾学者 Kuo 等^[12]并未发现类似的关联。本研究中, GPER 的表达与公认的乳腺癌预后判断相关因子 ER α 、PR 有一定的相关性, 但与 HER2 及其他的临床肿瘤病理变量无显著相关性。样本结构可能是导致结果差异的重要因素, Filardo 等^[11]的研究中 33% (106/321) 的患者已存在远处转移, 而本研究乳腺癌标本均限于 I ~ III 期。种族差异也可能是造成结果不一致的原因。

Smith 等^[13]长期随访研究结果提示 GPER 的阳性表达与卵巢癌及子宫内膜癌的预后不良有关。对于乳腺癌, GPER 的相关研究仅二篇有长期生存资料报道。Kuo 等^[12]对 118 例浸润性乳腺癌患者进行了长期随访, Cox 回归分析结果显示 GPER 的表达并不是乳腺癌独立的预后因子 ($P = 0.540$)。新近 Arias-Pulido 等^[14]报道了 88 例炎性乳腺癌患者生存情况与 GPER 表达的关系, 结果显示 GPER 阳性表达组患者无进展生存和总生存时间均较阴性组长, 但差异并没有统计学意义 (P 值分别为 0.305、0.675)。本研究中, GPER 表达阳性乳腺癌患者无进展生存时间及总生存时间均略长, 但差异均无统计学意义, 与上述结果一致。提示 GPER 在恶性肿瘤中的作用可能具有器官特异性, 在乳腺癌中并不是独立的预后因子。

GPER 与 ER α 在多种组织细胞中有协同表达现象, 研究认为它们可能存在相互作用^[3]。在 Kuo 等^[12]研究中, GPER⁺/ER α ⁺ 乳腺癌患者较 GPER⁻/ER α ⁻ 患者生存情况更好 ($P = 0.015$)。Arias-Pulido 等^[14]报道也发现 GPER⁺/ER α ⁺ 乳腺癌患者总生存 ($P = 0.033$) 和无进展生存 ($P = 0.057$) 更好, 而 GPER⁻/ER α ⁻ 乳腺癌患者总生存和无进展生存时间更短 (P 值均为 0.03)。本研究中 GPER⁺/ER α ⁺ 乳腺癌患者生存时间在各组中最长, 而 GPER⁻/ER α ⁻ 组最短, 与上述结果一致, 但差异没有统计学意义 ($P = 0.897$)。可能与随访时间不足有关。上述结果提示 GPER 可能是 ER α 的辅助因子, 临床实践中同时检测 ER α 和 GPER, 明确 ER 不同表型对更准确判断患者预后有一定帮助。GPER 在肿瘤中的作用及其机制需进一步研究明确, 其对乳腺癌患者预后的影响需大样本和更长时间的随访结果证实。

参考文献:

[1] Carmeci C, Thompson DA, Ring HZ, et al. Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in

breast cancer[J]. *Genomics*, 1997, 45(3):607-617.

- [2] Prossnitz ER, Maggiolini M. Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, 308(1-2):32-38.
- [3] Prossnitz ER, Barton M. Signaling, physiological functions and clinical relevance of the G protein-coupled estrogen receptor GPER[J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2009, 89(3-4):89-97.
- [4] Pandey DP, Lappano R, Albanito L, et al. Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF[J]. *EMBO J*, 2009, 28(5):523-532.
- [5] Leake R, Barnes D, Pinder S, et al. Immunohistochemical detection of steroid receptors in breast cancer: a working protocol. UK Receptor Group, UK NEQAS, The Scottish Breast Cancer Pathology Group, and The Receptor and Biomarker Study Group of the EORTC[J]. *J Clin Pathol*, 2000, 53(8):634-635.
- [6] Quinn JA, Graeber CT, Frackelton AR, et al. Coordinate regulation of estrogen-mediated fibronectin matrix assembly and epidermal growth factor receptor transactivation by the G-protein-coupled receptor, GPR30 [J]. *Mol Endocrinol*, 2009, 23(7):1052-1064.
- [7] Lapensee EW, Tuttle TR, Fox SR, et al. Bisphenol A at low nanomolar doses confers chemoresistance in estrogen receptor-alpha-positive and negative breast cancer cells [J]. *Environ Health Perspect*, 2009, 117(2):175-180.
- [8] Tu G, Hu D, Yang G, et al. The Correlation Between GPR30 and clinicopathologic variables in breast carcinomas [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2009, 8(3):231-234.
- [9] Kleuser B, Malek D, Gust R, et al. 17-Beta-estradiol inhibits transforming growth factor-beta signaling and function in breast cancer cells via activation of extracellular signal-regulated kinase through the G protein-coupled receptor 30 [J]. *Mol Pharmacol*, 2008, 74(6):1533-1543.
- [10] Ignatov A, Ignatov T, Roessner A, et al. Role of GPR30 in the mechanisms of tamoxifen resistance in breast cancer MCF-7 cells [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, 123(1):87-96.
- [11] 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.
- [12] Kuo WH, Chang LY, Liu DL, et al. The interactions between GPER30 and the major biomarkers in infiltrating ductal carcinoma of the breast in an Asian population [J]. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2007, 46(2):135-145.
- [13] Smith HO, Arias-Pulido H, Kuo DY, et al. GPR30 predicts poor survival for ovarian cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2009, 114(3):465-471.
- [14] Arias-Pulido H, Royce M, Gong Y, et al. GPR30 and estrogen receptor expression: new insights into hormone dependence of inflammatory breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, 123(1):51-58.

[编辑:安 凤;校对:刘红武]