

CD44⁺/CD24⁻表型与 BRCA1 及 basal-like 乳腺癌的相关性

林 帅, 吴诚义

Relationship between CD44⁺/CD24⁻ Phenotype and BRCA1, basal-like Breast Cancer

LIN Shuai, WU Cheng-yi

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

Corresponding Author: WU Cheng-yi, E-mail: NFMWK1192@hospital-cqmu.com

Abstract: Objective To study the expression of CD44⁺/CD24⁻ phenotype and its association with the basal-like breast cancer and BRCA1 in breast cancer. **Methods** Using immunostaining ER, PR, HER2 and CK5/6 to classify the material into five tumor subgroups: basal-like subgroup, Luminal A subgroup, Luminal B subgroup, Her2 over-expressing subgroup and normal breast-like subgroup. Double-staining immunohistochemistry (IHC) was applied to the detection of CD44⁺/CD24⁻ cells and single-staining (IHC) for CK5/6, BRCA1. The correlations of the expression of the CD44⁺/CD24⁻ to basal-like and BRCA1-associated breast cancer were analyzed. **Results** In 217 cases of breast cancer, Luminal A subgroup: 130 cases, Luminal B subgroup: 15 cases, Her2 over-expressing subgroup: 21 cases, basal-like subgroup: 29 cases, Normal breast-like subgroup: 22 cases. BRCA1-associated breast cancer: 57 cases. The expression rates of BRCA1 was low in basal-like breast cancer, which was significantly different from the other subgroups ($P < 0.001$). The expression rates of CD44⁺/CD24⁻ phenotype was high in basal-like breast cancer (20/29, 69%) and BRCA1-associated breast cancer (53/57, 93%), which was significantly different from the other subgroups ($P = 0.003$). **Conclusion** The mutation of BRCA1 is association with basal-like breast cancer; and the CD44⁺/CD24⁻ breast cancer stem cells in tumor tissue is association with BRCA1-associated breast cancer and basal-like breast cancer.

Key words: Basal-like breast cancer; CD44⁺/CD24⁻ phenotype; Double-immunostaining; BRCA1

摘要:目的 探讨 CD44⁺/CD24⁻表型与 BRCA1 及 basal-like 乳腺癌的相关性。**方法** 收集经病理诊断为乳腺癌患者的手术切除石蜡标本共 217 例,根据免疫学标志物把 217 例乳腺癌划分为 5 类分子亚型:basal-like 型、luminal A 型、luminal B 型、Her2 过表达型和 normal breast-like 型。应用免疫组织化学检测 CK5/6、BRCA1 和 CD44/CD24 双染的情况,分析 CD44⁺/CD24⁻表型与 basal-like 乳腺癌及 BRCA1 相关性乳腺癌的关系。**结果** 217 例乳腺癌标本例中, luminal A 型 130 例、luminal B 型 15 例、HER2 过表达型 21 例、basal-like 型 29 例、Normal breast-like 型 22 例。BRCA1 相关性乳腺癌 57 例。basal-like 乳腺癌组织中 BRCA1 缺失率 86% (25/29),明显高于乳腺癌其他分子亚型 ($P < 0.001$)。basal-like 乳腺癌组织中含 CD44⁺/CD24⁻肿瘤细胞者 20 例 (20/29, 69%),明显高于乳腺癌其他分子亚型 ($P = 0.003$); BRCA1 相关性乳腺癌中含 CD44⁺/CD24⁻肿瘤细胞者 53 例 (53/57, 93%)。**结论** BRCA1 基因突变与 basal-like 乳腺癌有关; CD44⁺/CD24⁻干细胞表型主要存在于 basal-like 乳腺癌及 BRCA1 相关性乳腺癌中。

关键词: basal-like 乳腺癌; CD44⁺/CD24⁻表型; 双重免疫组织化学染色; BRCA1

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2010)07-0769-04

0 引言

近年的研究认为 CD44⁺/CD24⁻干细胞表型与

basal-like 乳腺癌,特别与 BRCA1 相关性乳腺癌有关, BRCA1 的突变可能阻断乳腺干细胞的分化,导致基底细胞样型 (basal-like) 乳腺癌的发生^[1]。但目前国内对这方面的研究尚未见报道,为此本试验采用免疫组织化学检测 217 例乳腺癌患者肿瘤组织中 BRCA1 和 CD44/CD24 的表达,探讨 CD44⁺/CD24⁻干细胞表型与 BRCA1 及 basal-like 乳腺癌之间的相关性。

收稿日期:2009-07-17;修回日期:2010-01-25

作者单位:400016 重庆医科大学附属第一医院内分泌科

通信作者:吴诚义, E-mail: NFMWK1192@hospital-cqmu.com

作者简介:林帅(1983-),男,硕士在读,主要从事乳腺癌基础及临床方面研究

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集重庆医科大学附属第一医院 2006 年 3 月—2008 年 12 月手术切除的乳腺癌石蜡标本 217 例,均经病理组织学检查证实。术前均未接受过放、化疗。217 例患者均为女性,年龄 28~89 岁。根据重庆医科大学病理诊断中心报告 217 例乳腺癌中 ER(+)120 例,ER(-)97 例;PR(+)110 例,PR(-)107 例;HER2(+++)36 例,HER2(-)181 例;p53(+)136 例,p53(-)81 例。三阴乳腺癌(ER-、PR-、HER2-)51 例。

1.2 病例分组

Sorlie 和 Nielsen 等^[2-3]提出根据乳腺癌组织中 ER、PR、HER2、CK5/6 的表达情况,把乳腺癌划分为 5 个分子亚型: luminal A [ER 和(或)PR+、HER2-]、luminal B [ER 和(或)PR+、HER2+]、HER2 过表达(ER-和 PR-,HER2+)、basal-like (ER-、PR-、HER2-、CK5/6+)、Normal breast-like (ER-、PR-、HER2-、CK5/6-)。HER2 免疫组织化学检测阳性标准^[4]:根据 4 级系统(0~++)进行评估,当评分为+++时认定 HER2 阳性,评分为 0~++ 为阴性。

1.3 主要试剂

CK5/6 鼠抗人单克隆抗体,CD44 鼠抗人单克隆抗体,SP-9002 免疫组织化学染色试剂盒,单染试剂盒(DAB),双染试剂盒均购自北京中杉生物技术有限公司。CD24 兔抗人单克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司。BRCA1 兔抗人多克隆抗体及 SA1022 免疫组织化学染色试剂盒购自武汉博士德生物有限公司。

1.4 主要步骤

1.4.1 免疫组织化学检测 BRCA1、CK5/6 表达
BRCA1 抗体工作浓度为 1:100,CK5/6 抗体工作液浓度为 1:50。按照试剂盒操作步骤,切片经二甲苯脱蜡及梯度乙醇逐步水化后,微波炉修复(BRCA1)及高温抗原热修复(CK5/6)15 min,凉至室温。3% H₂O₂ 浸泡 10 min,5% BSA 封闭液(BRCA1)及正常羊血清(CK5/6)孵育 20 min,依次加一抗(BRCA1,CK5/6)4℃过夜,二抗(生物素标记)37℃放置 20 min,滴加 SABC(BRCA1)及 SP(CK5/6),37℃放置 20 min,DAB 显色,苏木精对比染色,脱水封片。每次实验均以已知阳性组织切片为阳性对照,以 PBS 缓冲液为一抗作阴性对照。

1.4.2 免疫组织化学双染检测 CD44/CD24 的表达
标本切片常规脱蜡水化后,用微波炉进行抗原修复。在 3% 的 H₂O₂ 中孵育 10 min,用即用型封闭液孵育 10 min 后 PBS 液漂洗 3 次,然后将 CD24

一抗(工作浓度为 1:75)和 CD44 一抗(工作浓度为 1:50)混合物加入切片上,4℃冰箱孵育过夜。第二天取出在 37℃中孵育 40 min 后 PBS 液(含 0.05% Tween20)漂洗 3 次滴加生物素标记的第二抗体(CD44、CD24 两种二抗等量混合)。湿盒中孵育 30min 后 PBS 液(含 0.05% Tween20)漂洗 3 次。按照试剂盒说明配好 DAB 显色液和 AP-Red 显色液进行显色。蒸馏水冲洗后进行苏木精对比染色,自来水冲洗 2~3min 放入 PBS 中返蓝,去离子水冲洗后用封片剂覆盖组织不加盖玻片,水平放置切片 50℃烤箱孵育 30min。为了证明 CD44/CD24 双染的可靠性,用 CD44 和 CD24 单染免疫组织化学做对照。

1.5 阳性结果判断

(1)CK5/6 表达于乳腺癌细胞质中。抗体染色阳性评定:阳性细胞≥5%为(+),<5%为(-);(2)正常乳腺组织中 BRCA1 蛋白分布于乳腺导管上皮细胞核内,而乳腺癌组织中 BRCA1 蛋白阳性表达分布于胞质中^[5]。BRCA1 以胞质内出现棕黄色颗粒为阳性,阳性细胞数≥5%为(+),<5%为(-);(3)CD44 阳性细胞为细胞膜棕红色,CD24 阳性细胞为细胞质红色。棕黄色染色无红色的细胞鉴定为 CD44⁺/CD24⁻。结果判断参照 Honeth 等^[6]的评定方法:阳性细胞>0 为(+)

1.6 统计学方法

数据采用 SPSS16.0 统计软件进行分析。计数资料采用卡方检验或 Fisher 确切概率法检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CK5/6 在三阴乳腺癌中的表达

CK5/6 阳性表达在乳腺癌细胞质中呈棕黄色,见图 1a、1b。217 例乳腺癌组织标本中,三阴乳腺癌 51 例(23%),其中 CK5/6 阳性表达 29 例,阴性表达 22 例,即 basal-like 型 29 例(13%),Normal breast-like 型 22 例(10%);luminal A 型 130 例(60%);luminal B 型 15 例(7%);HER2 过表达型 21 例(10%)。

2.2 BRCA1 在乳腺癌组织中的表达

BRCA1 阳性表达在乳腺癌细胞质中呈棕黄色,见图 1c、1d。217 例乳腺癌组织标本中,BRCA1 阳性表达 160 例(73.3%),阴性表达 57 例(26%)。BRCA1 缺失乳腺癌即 BRCA1 相关性乳腺癌 57 例中含:basal-like 型 25 例(86%);luminal A 型 12 例(9%);luminal B 型 2 例(13%);HER2 过表达型 4 例(19%);Normal breast-like 型 14 例(63%)。basal-like 乳腺癌组织中 BRCA1 缺失率明显高于乳腺癌其他分子亚型($P < 0.001$),见表 1。

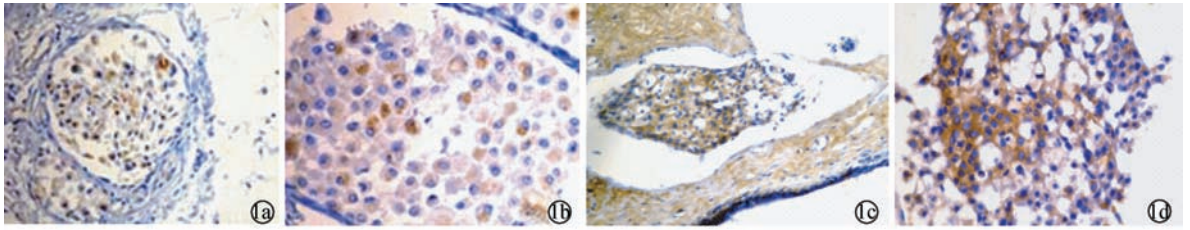


图 1 CK5/6、BRCA1 在乳腺癌细胞质中的阳性表达 (SP 1a, 1c×200, 1b, 1d×400)

Figure 1 Cytoplasmic of CK5/6 and BRCA1 expression in breast cancer (SP 1a, 1c×200, 1b, 1d×400)

表 1 BRCA1 与乳腺癌各分子亚型之间的关系

Table 1 Association of BRCA1 with breast cancer subgroups

Subgroups	Cases	BRCA1		P
		Negative cases	(%)	
Basal-like	29	25	86	<0.001
Luminal A	130	12	9	
Luminal B	15	2	13	
Her2 over-expressing	21	4	19	
Normal breast-like	22	14	63	

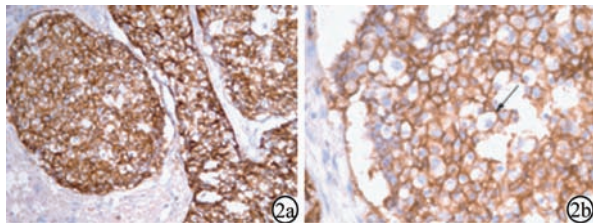
表 2 CD44⁺/CD24⁻ 表型与乳腺癌各亚型之间的关系

Table 2 Association of CD44⁺/CD24⁻ phenotypes with breast cancer subgroups

Subgroups	Cases	CD44 ⁺ /CD24 ⁻		P
		Negative cases	(%)	
basal-like	29	20	69	0.003
luminal A	130	47	36	
luminal B	15	4	27	
Her2 over-expressing	21	4	19	
Normal breast-like	22	7	32	

2.3 CD44⁺/CD24⁻ 在乳腺癌中的表达

双重免疫组织化学检测 CD44 和 CD24, CD44 表达于细胞膜上呈棕黄色, CD24 表达于细胞质中呈红色。呈棕黄色无红色的细胞鉴定为 CD44⁺/CD24⁻ 肿瘤细胞, 见图 2。



CD44 is stained with diaminobenzidine (DAB) and CD24 with Ap-Red. Almost all cells in this tumor are CD44⁺/CD24⁻. No CD24 staining is seen (black arrow).

图 2 免疫双染检测乳腺癌组织中 CD44、CD24 的表达 (2a×200, 2b×400)

Figure 2 Immunohistochemical double-staining of human breast tumors for CD44 and CD24 (2a×200, 2b×400)

BRCA1 相关性乳腺癌组织中含 CD44⁺/CD24⁻ 肿瘤细胞者 53 例 (53/57, 93%)。basal-like 乳腺癌组织中含 CD44⁺/CD24⁻ 肿瘤细胞者 20 例 (20/29, 69%), 明显高于乳腺癌其他分子亚型 (P = 0.003), 见表 2。

3 讨论

BRCA1 是遗传性乳腺癌的易感基因, 其突变与 30%~45% 的家族性乳腺癌、卵巢癌有关。basal-like 乳腺癌是基于基因谱被鉴定的一种乳腺癌亚

型^[2], 其大多数是散发性 (无家族遗传史)。很多研究发现 BRCA1 与 basal-like 乳腺癌有相关性, Turner 等^[7]发现 basal-like 乳腺癌与携带 BRCA1 基因突变乳腺癌在形态学、免疫组织化学、分子特征上有很显著的相似性。Sorlie 等^[2]对 18 例 BRCA1 突变、2 例 BRCA2 突变及 96 例散发性乳腺癌样本的基因谱进行分析, 发现 BRCA1 突变多为 basal-like 亚型, 表明 BRCA1 基因突变与 basal-like 乳腺癌有着很紧密的关系。Richardson 等^[8]研究发现 basal-like 乳腺癌与 BRCA1 相关性乳腺癌均存在较高频率的 X 染色体异常, 特别是 X 染色体的单亲二体型 (isodisomy) 伴 X 染色体小部分区域高表达。Furuta 等^[9]通过在试管内三维培养体系证实 BRCA1 可以间接调控乳腺上皮细胞分化形成腺泡, 通过 RNA 干扰减少乳腺上皮细胞中的 BRCA1 的表达从而阻碍腺泡的形成, 但却增加了上皮细胞的增殖, 进一步解释了 BRCA1 的丢失和减少可导致 basal-like 乳腺癌的发生。Saal 等^[10]通过小鼠实验发现敲除肿瘤抑制基因 PTEN 后导致 basal-like 乳腺癌的形成, 并且 PTEN 的缺失与 BRCA1 相关遗传性乳腺癌及 basal-like 乳腺癌有显著的联系, 此外在 BRCA1 相关遗传性乳腺癌中 PTEN 基因突变频繁, 包括基因内染色体断裂、倒置、缺失和微型拷贝数畸变, 揭示了 PTEN 突变是 BRCA1 基因突变导致乳腺癌发生的机制。与上述研究相一致, 本实验检测 217 例乳腺癌组织标本中 BRCA1 蛋白发现 basal-like 乳腺癌组织中 BRCA1 缺失率为 86%

(25/29), 明显高于乳腺癌其他分子亚型 ($P < 0.001$) (见表 1), 表明 BRCA1 基因突变与 basal-like 乳腺癌有相关性。

由上可知, 携带 BRCA1 基因突变的乳腺癌通常是 basal-like 亚型, 然而大多数散发性乳腺癌都是管腔亚型^[11]。因此有学者提出 BRCA1 可能是乳腺干细胞的调节器, basal-like 乳腺癌起源于已经阻断分化的干细胞^[12-13]。Wright 等^[14]通过研究来自 5 个不同的 BRCA1 基因缺陷小鼠乳腺肿瘤的 16 个细胞系, 发现含有 BRCA1 基因缺陷的肿瘤包含 CD44⁺CD24⁻ 肿瘤细胞, 只有包含了这些标志物的细胞才能形成没有预先分类的球形结构, 在体外实验中扩张这些球形体可导致自发性增加含有干细胞标志物的细胞, 表明 BRCA1 基因缺陷的小鼠乳腺癌中含有部分乳腺癌干细胞特性的异质群体细胞即含 CD44⁺CD24⁻/low 的 BRCA1 基因缺陷的肿瘤与乳腺癌干细胞之间有关联。Liu 等^[15]通过实验证实了 BRCA1 在 ALDH1(+)/ER(-) 乳腺干/祖细胞分化为 ALDH1(-)/ER(+) 上皮细胞或上皮细胞的存活是必需的, BRCA1 功能丢失导致 ALDH1(+)/ER(-) 乳腺干/祖细胞的遗传不稳定的积累, 管腔分化的迷乱和可能影响管腔细胞的生存从而形成 ER(-) 乳腺癌, 进一步支持了干细胞自我更新和分化的失调可能导致 basal-like 乳腺癌的发生。另外, 阻断导管分化可能导致 basal-like 乳腺癌的形成, 其中常常包含大量的 CD44⁺/CD24⁻ 细胞^[1]。相应的, 本实验通过双重免疫组织化学测定 217 例乳腺癌组织标本乳腺癌干细胞表型 (CD44⁺/CD24⁻) 的表达情况, 发现 BRCA1 相关性乳腺癌组织中含 CD44⁺/CD24⁻ 肿瘤细胞者 53 例 (53/57, 93%), basal-like 乳腺癌组织中含 CD44⁺/CD24⁻ 肿瘤细胞 20 例 (20/29, 69%), 明显高于乳腺癌其他分子亚型 ($P = 0.003$), 见表 2, 更证实乳腺癌干细胞表型 (CD44⁺/CD24⁻) 与 basal-like 乳腺癌和 BRCA1 相关性乳腺癌之间有密切关联。

参考文献:

- [1] Dontu G. Breast cancer stem cell markers- the rocky road to clinical applications[J]. Breast Cancer Res, 2008, 10(5):110.
- [2] Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(14):8418-8423.
- [3] Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10 (16): 5367-5374.
- [4] Van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R, et al. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome[J]. Am J Pathol, 2002, 161 (6): 1991-1996.
- [5] Chen Y, Chen CF, Riley DJ, et al. Aberrant subcellular localization of BRCA1 in breast cancer [J]. Science, 1995, 270 (5237):789-791.
- [6] Honeth G, Bendahl PO, Ringnér M, et al. The CD44⁺/CD24⁻ phenotype is enriched in basal-like breast tumors[J]. Breast Cancer Res, 2008, 10(3):R53.
- [7] Turner NC, Reis-Filho JS. Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype[J]. Oncogene, 2006, 25(43):5846-5853.
- [8] Richardson AL, Wang ZC, De Nicolo A, et al. X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer [J]. Cancer Cell, 2006, 9(2):121-132.
- [9] Furuta S, Jiang X, Gu B, et al. Depletion of BRCA1 impairs differentiation but enhances Proliferation of mammary epithelial cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(26):9176-9181.
- [10] Saal LH, Gruvberger-Saal SK, Persson C, et al. Recurrent gross mutations of the PTEN tumor suppressor gene in breast cancers with deficient DSB repair[J]. Nat Genet, 2008, 40(1): 102-107.
- [11] Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(10):814-819.
- [12] Foulkes WD. BRCA1 functions as a breast stem cell regulator [J]. J Med Genet, 2004, 41(1):1-5.
- [13] Dontu G, El-Ashry D, Wicha MS. Breast cancer, stem/progenitor cells and the estrogen receptor [J]. Trends Endocrinol Metab, 2004, 15(5):193-197.
- [14] Wright MH, Calcagno AM, Salcido CD, et al. Brca1 breast tumors contain distinct CD44⁺/CD24⁻ and CD133⁺ cells with cancer stem cell characteristics[J]. Breast Cancer Res, 2008, 10(1):R10.
- [15] Liu S, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, et al. BRCA1 regulates human mammary stem/progenitor cell fate [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(5):1680-1685.

[编辑:杨 卉;校对:刘红武]