

## 基底细胞样乳腺癌组织 Apaf-1 蛋白表达临床意义

张丙信<sup>1,2</sup>, 张金库<sup>2\*</sup>, 陈雪<sup>2</sup>, 赵霞<sup>3</sup>, 李金梅<sup>2</sup>, 赵文明<sup>2</sup>

1.承德医学院研究生部, 河北 承德 067000; 2.保定市第一中心医院病理科, 河北 保定 071000;

3. 保定市第一中心医院肿瘤内科, 河北 保定 071000

**摘要:**目的 检测凋亡蛋白酶活化因子(Apaf-1)在基底细胞样乳腺癌(BLBC)中的表达,分析 Apaf-1 与 BLBC 临床病理特征的关系。方法 采用免疫组化方法检测 43 例 BLBC、57 例 non-BLBC 和 60 例癌旁正常乳腺组织中 Apaf-1 蛋白的表达。结果 免疫组化检测结果显示,在 BLBC 及 non-BLBC 中 Apaf-1 的表达的阳性率分别为 23.26% 和 49.12%,明显低于癌旁正常乳腺组织的 75.00%,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ); Apaf-1 的表达与患者年龄无关,与 BLBC 淋巴结转移、肿瘤大小及临床分期负相关( $P<0.05$ )。结论 BLBC 组织低表达 Apaf-1, Apaf-1 可能与 BLBC 的发生、发展密切相关。

**关键词:**乳腺肿瘤;基底细胞样乳腺癌;凋亡蛋白酶活化因子**中图分类号:**R737.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1009-9727(2014)9-1096-03

## Expression of Apaf-1 in basal-like breast carcinoma and its clinical significance

ZHANG Bing-xin<sup>1,2</sup>, ZHANG Jin-ku, CHEN Xue, ZHAO Xia, LI Jin-mei, ZHAO Wen-ming

1. Department of Postgraduates of Chengde Medical University, Chengde 067000, Hebei, P.R. China

2. Department of Medical Pathology of the First Central Hospital of Baoding, Baoding 071000, Hebei, P.R. China

Corresponding author: ZHANG Jin-ku, E-mail: 2286917939@qq.com

**Abstract:** Objective To detect and analyze the expression of Apaf-1 in basal-like breast cancer (BLBC) and correlation between Apaf-1 expression and clinicopathology features of BLBC. **Methods** The expression of Apaf-1 was detected in 43 cases of BLBC, 57 cases of non-BLBC and 60 cases of normal breast tissue by immunohistochemistry. **Results** The positive rate of Apaf-1 in BLBC and non-BLBC group were 23.62% and 49.12%, respectively, which were much lower than that in normal breast tissue (75.00%) ( $P<0.05$ ). The expression of Apaf-1 wasn't negatively correlated with age, but it was correlated with lymph nodes metastasis, tumor size and pTNM staging of BLBC ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The expression level of Apaf-1 is lower and might be correlated with the carcinogenesis and development of BLBC.

**Key words:** Breast tumor; Basal-like breast cancer (BLBC); Apaf-1

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,每年全世界新发病例近百万,严重威胁着女性健康<sup>[1]</sup>。2000年 Perou 等<sup>[2]</sup>首次将乳腺癌分为 5 种亚型,即管腔 A 型(luminal subtype A)、管腔 B 型(luminal subtype B)、HER-2 过表达型(HER-2 over-expression subtype)、正常乳腺样型(normal breast like subtype)、及基底细胞样型(basal-like subtype)。基底细胞样乳腺癌(basal-like breast carcinoma, BLBC)占全部乳腺癌的 15%~25%,其病理组织学、临床表现及免疫表型都很具特征性,并且因具有较高的增殖指数和预后不良的生物学行为,而引起学者们的广泛关注。乳腺癌的发生、发展是一个多因素、多基因作用的复杂过程。凋亡与肿瘤的发生、发展有着密切的关系,研究发现乳腺癌细胞存在多种凋亡基因异常。其中 Apaf-1 是一种分子量为 130kD 的蛋白质,由三个结构域组成。是线粒体凋亡途径的关键蛋白质。Apaf-1 在成人脾、外周血白细胞和胚胎、肺、肾的表达最高,与这些组织内高水平的

凋亡发生率相一致。凋亡又称程序性细胞死亡,相关研究表明,凋亡失调与肿瘤、神经变性、自身免疫病、心脏病和其他一些功能紊乱的发生密切相关。本研究采用免疫组织化学的方法检测 Apaf-1 在正常乳腺组织、BLBC 及 non-BLBC 中表达的情况并探讨了 Apaf-1 表达与 BLBC 患者临床病理特征的关系。

### 1 材料与方法

1.1 标本来源及试剂 收集保定第一中心医院病理科 2006 年 1 月-2013 年 12 月手术切除的乳腺癌标本。患者均为女性,术前均未行放、化疗等一切治疗。所有切片均由两名资深病理医师复检,按照 2003 年 WHO 乳腺肿瘤病理学分类形态学诊断标准和目前的 BLBC 的免疫表型诊断标准即 ER、PR、HER2 阴性,CK5/6 和(或)表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)阳性,筛选出 BLBC 病例 43 例,平均年龄 54.5 岁;non-BLBC 病例 57 例,平均年龄 60.7 岁;正常癌旁乳腺组织(距肿瘤边缘 5cm)60

作者简介:张丙信(1981~),男,硕士,主治医师,研究方向:肿瘤病理。

\*通讯作者:张金库, E-mail: 2286917939@qq.com

例,平均年龄49.5岁。标本经过常规取材,中性福尔马林固定,石蜡包埋和4μm厚连续切片。兔抗人Apaf-1多克隆抗体购自Affinity Biosciences公司,兔抗人PR(RMA-0502)、兔抗人ER(RMA-0501)、兔抗人CerbB-2(RAI3-0156)、鼠抗人CK5/6(MAPr0276)鼠抗人EGFR(MAI3-0586)即用型免疫组化MaxVision™检测试剂盒(KIT-5020)、氨基联苯胺(DAPr0031)显色试剂盒全部购自福州迈新生物科技有限公司。

1.2 方法 采用免疫组化二步法检测BLBC、non-BLBC及癌旁正常乳腺组织中Apaf-1的表达情况。按照产品说明书进行操作,高温高压修复抗原,以Apaf-1阳性的胃组织作为阳性对照,以磷酸盐缓冲液(PBS)替代一抗作为阴性对照,对氨基联苯胺(DAB)显色,苏木精对比染色,中性树胶封片。

1.3 结果判定 细胞质中出现明确棕黄色颗粒者为蛋白阳性表达,不着色或着色浅而不特异者为阴性。

1.4 统计学分析 数据处理采用SPSS 17.0统计软件,Apaf-1的表达及其与BLBC的临床病理因素的分析采用χ²检验。检验水准α=0.05。

2 结果

2.1 Apaf-1在各组病例细胞中的表达 Apaf-1蛋白主要定位于乳腺组织细胞质中,染色呈淡黄至棕黄色,见图1~2。Apaf-1在BLBC及non-BLBC中的阳性率分别为23.26%(10/43)和49.12%(28/57),均明显低于其在正常乳腺组织中的表达75.00%(45/60)(P<0.05),两组比较差异有统计学意义(P<0.05),见表1。

2.2 Apaf-1蛋白的表达与BLBC临床病理学特征的关系 组间差异比较结果显示,Apaf-1的表达与BLBC患者的年龄无关(P>0.05),而与肿瘤大小、淋巴结转移和临床分期有关(P<0.05),见表2。

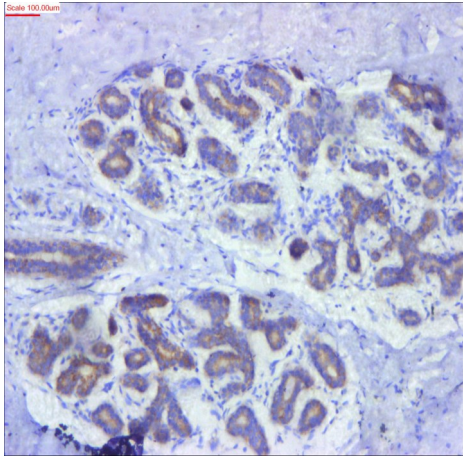


图1 Apaf-1在癌旁正常乳腺组织中的表达(IHC×200)  
Fig.1 Expression of Apaf-1 in normal breast tissue

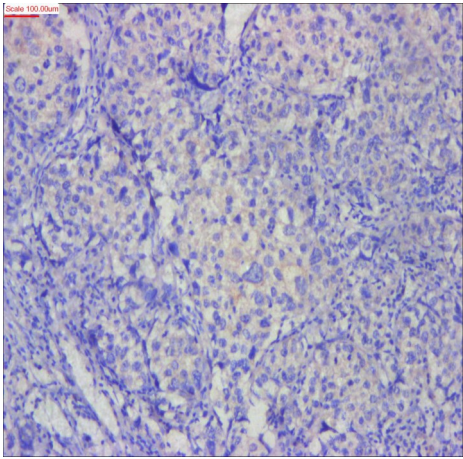


图2 Apaf-1在BLBC中的表达减低(IHC×200)  
Fig.2 Lower expression of Apaf-1 in BLBC SP×200

表1 Apaf-1在BLBC, non-BLBC及正常乳腺组织中的表达  
Table 1 Expression of Apaf-1 in BLBC, non-BLBC and normal breast tissue

分组 Group	n	Apaf-1		P
		阳性 Positive	阴性 Negative	
BLBC	43	10	33	0.000*, 0.008*
Non-BLBC	57	28	29	0.004▲
正常乳腺组织 Normal breast tissue	60	45	15	

注: ★ BLBC 与正常乳腺组织比较(χ²=26.951, P<0.01); ▲ Non-BLBC 与正常乳腺组织比较(χ²=8.342, P<0.01); \*BLBC 与 Non-BLBC 比较(χ²=6.961, P<0.01)。

Note: ★ BLBC was compared with normal breast tissue (χ²=26.951, P<0.01); ▲ Non-BLBC was compared with normal breast tissue (χ²=8.342, P<0.01); \*BLBC was compared with Non-BLBC (χ²=6.961, P<0.01)。

表2 Apaf-1表达与BLBC临床病理特征的关系  
Table 2 Correlation between Apaf-1 expression and clinicopathology features of BLBC

因素 Factor	n	Apaf-1		χ²	P
		阳性 Positive	阴性 Negative		
年龄 Age/year					
≥50	16	3	13	0.027	0.869
<50	27	7	20		
肿瘤直径(cm) Tumor size					
<2	25	9	16	3.863	0.049
≥2	18	1	17		
TNM分期 stage					
I-II	16	7	9	4.307	0.038
III-IV	27	3	24		
淋巴结转移 Lymph node metastasis					
有	23	2	21	4.251	0.039
无	20	8	12		

### 3 讨论

BLBC是一组乳腺癌亚型,目前被广泛采用的诊断标准是ER, PR 和HER-2 阴性表达,同时至少一种基底细胞角蛋白(CK17, CK14 或CK5/6 等)和(或)EGFR 表达阳性。BLBC 癌组织呈实性片状分布为主,常见地图样或粉刺样坏死。BLBC 患者比其它亚型乳腺癌患者复发率高,更易发生远处转移。BLBC 因其独特的临床病理和分子表型成为近期乳腺癌的研究热点。

细胞凋亡抑制与细胞增殖加强都是肿瘤发生的生物学基础,而细胞的抗凋亡作用是肿瘤发生的一个重要因素。近年研究显示,细胞凋亡有两条主要通路:Fas/TNFR1 介导的死亡受体途径及线粒体依赖途径。其中线粒体参与很多凋亡信号通路,因此被定位为凋亡通路中的“门卫”<sup>[3]</sup>。

Apaf-1 是线粒体依赖途径的关键蛋白酶,是一种重要的凋亡激活剂,近来已在细胞因子诱导的肥大细胞凋亡中得到证实,CytC/Apaf-1/caspase 途径的激活依赖于Apaf-1<sup>[4]</sup>。当细胞的凋亡刺激启动凋亡后,Bax 蛋白由胞液转移至线粒体膜上,在此构建通道,细胞色素C 通过该通道进入胞液,在dATP 的参与下,Apaf-1 发生构象变化进而活化,活化后的Apaf-1 借助N 端的CARD 结构域经同源作用与pro-Caspase-9 分子中的CARD 结构域寡聚化,形成凋亡小体(apoptosome),促使 pro-Caspase-9 自身活化,活化的Caspase-9 激活下游的Caspase-2,3,6,7,8 和10 前体,切割相应的凋亡底物,诱导细胞凋亡<sup>[5-8]</sup>。

本研究通过免疫组化方法发现43 例基底细胞样乳腺癌中有33 例出现了Apaf-1 基因表达的明显下调,而Non-BLBC 和癌旁正常乳腺组织此基因表达相对较强,差异具有统计学意义,提示凋亡基因Apaf-1 与BLBC 的发生相关。肿瘤直径 $\geq 2$ cm 者Apaf-1 基因表达率低于肿瘤直径 $< 2$ cm 者,TNM 分期高者Apaf-1 基因表达率明显低于TNM 分期低者,有淋巴结转移

者Apaf-1 基因表达率明显低于无淋巴结转移者,提示Apaf-1 基因表达下调的BLBC 具有较高的恶性生物学行为,与肿瘤预后密切相关,因此检测Apaf-1 基因表达水平对预测BLBC 病情轻重有一定价值,可能成为判断BLBC 患者预后的新指标。

综上所述,Apaf-1 在BLBC 中的表达明显降低,其表达与患者淋巴结转移、肿瘤大小和pTNM 分期指标呈明显正相关,可能介导了BLBC 淋巴结转移及其进展,通过检测Apaf-1 的表达可能有助于评估BLBC 的淋巴结转移情况及预后判断。

### 参考文献

- [1] 刘起胜.老年乳腺癌GST $\pi$ 、p53 表达与淋巴结转移的相关性研究[J]. 中国煤炭医学杂志,2010,13(10):1457-1458.
- [2] Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumors [J]. Nature,2000,406(6797):747-752.
- [3] 郑天胜,李翔.线粒体凋亡通路的研究进展[J]. 医学综述,2013,19(18):3282-3285.
- [4] Marsden VS,Kaufmann T,O reilly LA,et al,Apaf-1 and caspase-9 are required for cytokine withdrawal-induced apoptosis of mast cells but dispensable for their functional and clonogenic death [J]. Blood,2006,107(5):1872-1877.
- [5] Ruiz-Vela A, Korsmeyer SJ. Proapoptotic histone H1.2 induces CASP-3 and -7 activation by forming a protein complex with CYT c, APAF-1 and CASP-9 [J]. FEBS Lett 2007,581:3422-3428.
- [6] Orzaez M, Mondragon L, Marzo I, et al. Conjugation of a novel Apaf-1 inhibitor to peptide-based cell-membrane transporters: effective methods to improve inhibition of mitochondria-mediated apoptosis [J]. Peptides, 2007, 28:958-968.
- [7] Ashraf QM,Mishra OP,Delivoria-PapadopoulosM.Mechanisms of expression of apoptotic protease activating factor-1(Apaf-1)in nuclear, mitochondrial and cytosolic fractions of the cerebral cortex of newborn piglets [J]. Neurosci Lett, 2007, 415:253-258.
- [8] Anichini A,Mortarini R,Sensi M,et al.APAF-1 signaling in human melanoma [J]. Cancer Lett, 2006, 238,168-179.

收稿日期:2014-05-20 编辑:符式刚