

雄激素受体、Ki-67在三阴性乳腺癌中的表达以及与预后的关系

王维斯¹, 国士刚^{2*}, 李国明², 付新澳³, 李居尚³, 范宗奇²

(1.承德医学院研究生学院, 河北承德 067000; 2.朝阳市中心医院; 3.中国医科大学朝阳市中心医院)

摘要: **目的** 探讨雄激素受体和Ki-67在三阴性乳腺癌(TNBC)中的表达,并研究它们与患者预后的关系。**方法** 选择了朝阳市中心医院2015年1月~2020年5月期间治疗的TNBC女性患者88例作为观察组,同时纳入了非三阴性乳腺癌(NTNBC)女性患者89例作为对照组。我们检测了AR和Ki-67的表达情况,并观察它们在TNBC中的表达差异,同时分析了它们与患者预后的关系。**结果** AR在观察组的表达率低于对照组($P<0.05$),而Ki-67在观察组中的表达率高于对照组($P<0.05$)。AR和Ki-67的表达均与肿瘤直径以及淋巴结转移个数有关($P<0.05$)。COX回归分析显示,病理分级、淋巴结转移个数、AR和Ki-67表达情况是影响TNBC预后的独立影响因素($P<0.05$)。**结论** AR和Ki-67与TNBC的预后密切相关,AR阳性表达和Ki-67低表达的患者提示预后较好,生存时间更长。

关键词: 三阴性乳腺癌; AR; Ki-67; 预后

中图分类号: R737.9

文献标志码: A

文章编号: 1004-6879(2024)01-0015-06

Expression of Androgen Receptor and Ki-67 in Triple-negative Breast Cancer and Its Association with Prognosis

WANG Wei-si¹, GUO Shi-gang^{2*}, LI Guo-ming², FU Xin-ao³, LI Ju-shang³, FAN Zong-qi²

(1. Graduate School of Chengde Medical University, Chengde, Hebei, 067000, China; 2. Chaoyang City Centre Hospital;

3. Chaoyang City Centre Hospital, China Medical University)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of androgen receptor (AR) and Ki-67 in triple-negative breast cancer, and to study their relationship with patients' prognosis. **Methods** Eighty-eight female TNBC patients treated at Chaoyang Central Hospital from January 2015 to May 2020 were included in the observation group, while 89 female NTNBC patients were included as a control group. We examined the expression of AR and Ki-67 and observed the differences in their expression in triple-negative breast cancer, and analysed their relationship with patients' prognosis. **Results** The expression rate of AR in the observation group was lower than that in the control group ($P<0.05$), while the expression rate of Ki-67 in the observation group was higher than that in the control group ($P<0.05$). The expression of AR and Ki-67 is related to tumor diameter and the number of lymph node metastases ($P<0.05$). COX regression analysis showed that pathological grade, number of lymph node metastases, AR and Ki-67 expression were independent influences on the prognosis of triple-negative breast cancer ($P<0.05$). **Conclusion** AR and Ki-67 were closely related to the prognosis of triple-negative breast cancer. Patients with positive AR expression and low Ki-67 expression suggested a better prognosis and longer survival time.

Key words: triple negative breast cancer; androgen receptor; Ki-67; prognosis

*通讯作者

乳腺癌(breast cancer, BC)是目前女性最常见的恶性肿瘤^[1],据国际癌症研究机构报告显示,2020年全球癌症患者的总人数增加约1900万,其中新增的乳腺癌人数约为226万,占比11.7%^[2]。三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)是乳腺癌的一种特殊亚型,其特点是患者的雌激素受体(estrogen receptor, ER)为阴性表达、孕激素受体(progesterone receptor, PR)和人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER-2)为阴性表达^[3,4],目前TNBC还未找到特定的治疗靶点,缺乏有效治疗手段,患者无法从靶向治疗中受益^[5]。雄激素受体(androgen receptor, AR)是一种类固醇受体,不仅与生殖密切相关,还在维持人体激素平衡中有重大作用。Ki-67是一种核蛋白,在细胞处于静止期时不表达,可用来提示细胞的增殖分化程度。本研究通过分析AR、Ki-67在TNBC中的表达情况,结合患者临床资料分析其临床意义,探究其与TNBC患者预后的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取朝阳市中心医院2015年1月~2020年5月诊治的TNBC女性患者88例作为观察组,同时纳入了NTNBC女性患者89例作为对照组。纳入标准:(1)在我院进行手术治疗,且通过病理诊断确诊;(2)术前未进行新辅助治疗;(3)完整的石蜡组织块和临床资料。排除标准:(1)乳腺癌手术史;(2)合并其他系统恶性肿瘤者;(3)乳腺癌复发。观察组年龄17~83岁,平均年龄(54.64±11.67)岁;体重指数(BMI)16.30~34.48,平均BMI(24.45±3.70)。对照组年龄29~81岁,平均年龄(55.35±10.35)岁;体重指数(BMI)17.58~37.22,平均BMI(25.78±3.80)。2组资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究符合医学伦理会审核标准。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化 提取乳腺癌组织的石蜡标本,切片厚度为5 μ m。进行常规脱蜡和水化处理,随后进行相应的抗原修复。在免疫组化实验中使用SP法检测AR和Ki-67的表达。在实验实际操作中,严格按照说明书进行SP法检测。在阴性对照中,使用磷酸盐缓冲液替代一抗,采用已知抗体阳性标本作为阳性对照。

1.2.2 判定标准 细胞核内出现呈浅黄、棕黄的细小颗

粒视为阳性细胞,当AR阳性细胞数量占所有肿瘤细胞数量比例 $\geq 1\%$ 时,则判定为阳性。Ki-67阳性标志是细胞核内出现棕黄色颗粒,Ki-67指数临界值为 $\leq 30\%$ 时定义为低表达, $>30\%$ 时定义为高表达^[6]。

1.2.3 随访 患者出院后,通过电话随访和门诊复查随访,随访结局事件为患者死亡或截止值2023年5月,随访内容为患者的总生存时间(overall survival, OS)。OS定义为患者从术后第1天起至死亡日期或末次随访时间。

1.3 统计学处理

采用SPSS 26.0和R3.6.3软件进行统计分析。计数资料用($n, \%$)表示,组间差异比较采用 χ^2 检验或Fisher精确概率法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AR、Ki-67在TNBC及NTNBC中的表达

AR在TNBC中阳性表达为棕黄色,在细胞核中表达(图1A),Ki-67在TNBC中阳性表达为棕褐色,在细胞核中表达(图1B)。

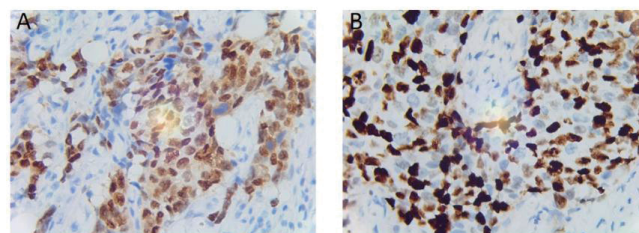


图1 AR、Ki-67在癌组织中的不同表达情况(SP×400)

A. AR在癌组织细胞核内呈棕黄色颗粒;B. Ki-67在癌组织细胞核内呈棕褐色颗粒

AR在NTNBC中的表达较显著(图2A),在TNBC中的表达较弱(图2B),Ki-67在TNBC中的表达显著(图3A),在NTNBC中的表达较弱(图3B)。

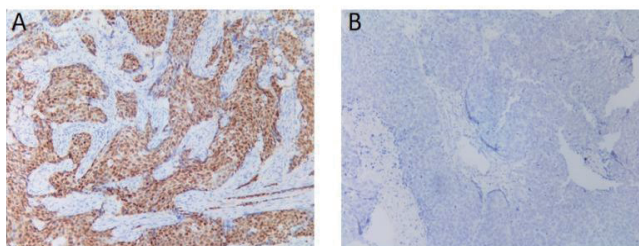


图2 AR在不同组织中的表达情况(SP×100)

A. NTNBC组织中AR阳性表达;B. TNBC组织中AR阴性表达

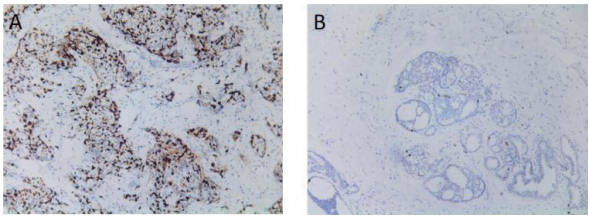


图3 Ki-67在不同组织中的表达情况(SP×100)

A. TNBC组织中Ki-67高表达;B. NTNBC组织中Ki-67低表达

结果显示,AR在NTNBC组织中表达率高于TNBC中

的表达率,Ki-67在TNBC中表达率高于NTNBC组织。差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 AR、Ki-67的表达与TNBC临床特征之间的关系

在TNBC组织中,AR的表达情况与淋巴结转移个数相关($P=0.033$)。Ki-67的表达情况与肿瘤直径相关($P=0.027$),与淋巴结转移个数也相关($P=0.042$),见表1。

表1 AR、Ki-67的表达与TNBC临床特征之间的关系

项目		AR($n=88$)		P	Ki-67($n=88$)		P
		+(%)	-(%)		高表达	低表达	
年龄	< 45	5(17.2)	12(20.3)	0.729	13(21.3)	4(14.8)	0.477
	≥ 45	24(82.8)	47(79.7)		48(78.7)	23(85.2)	
绝经	否	11(37.9)	20(33.9)	0.710	22(36.1)	9(33.3)	0.805
	是	18(62.1)	39(66.1)		39(63.9)	18(66.7)	
BMI	< 24.0	10(34.5)	26(44.1)	0.390	27(44.3)	9(33.3)	0.336
	≥ 24.0	19(65.5)	33(55.9)		34(55.7)	18(66.7)	
肿瘤大小	≤ 2	16(55.2)	22(37.3)	0.317	26(42.6)	12(44.4)	0.027*
	2~5	10(34.5)	29(49.2)		31(50.8)	8(29.6)	
	> 5	3(10.3)	8(13.6)		4(6.6)	7(25.9)	
病理分级	中、低分化	17(58.6)	22(37.3)	0.058	23(37.7)	16(59.3)	0.061
	高分化	12(41.4)	37(62.7)		38(62.3)	11(40.7)	
	0	11(37.9)	31(52.5)		24(39.3)	18(66.7)	
淋巴结转移	1~3	10(34.5)	24(40.7)	0.033*	26(42.6)	8(29.6)	0.042*
	> 3	8(27.6)	4(6.8)		11(18.0)	1(3.7)	

* $P<0.05$

2.3 AR与Ki-67与预后之间的关系

AR阳性表达组和AR阴性表达组中,患者3年总生存率分别为89.21%和57.63%。Kaplan-Meier生存分析显示:AR阳性表达组和阴性表达组的3年总生存率相比,差异有统计学意义,见图4A。

Ki-67高表达组和Ki-67低表达组的3年总生存率分别为57.38%和81.48%。Kaplan-Meier生存分析显示:Ki-67高表达组与Ki-67低表达组3年总生存率相比,差异有统计学意义,见图4B。

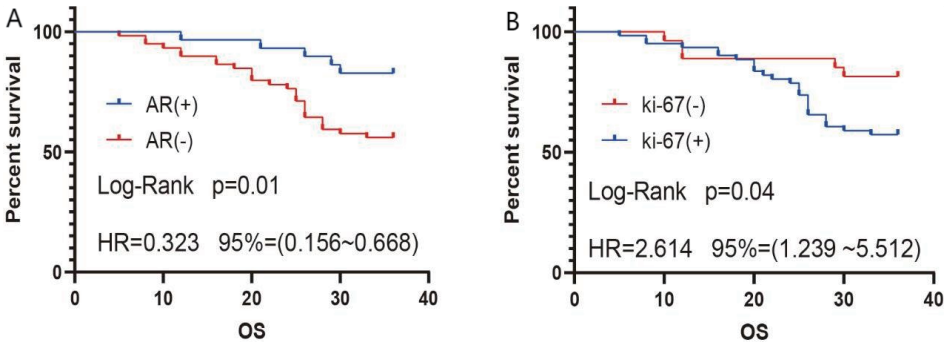


图4 Kaplan-Meier生存分析曲线图

A. AR(+)和AR(-)组生存曲线;B. Ki-67(+)和Ki-67(-)组生存曲线;为方便描述,将Ki-67高表达记为Ki-67(+),Ki-67低表达记为Ki-67(-)

2.4 AR与Ki-67相关性分析

在本研究88例TNBC中,有14例患者AR呈阳性表达、Ki-67高,47例表现为AR阴性表达、Ki-67高表达,12例表现为AR呈阴性表达、Ki-67低表达,15例表现AR阳性表达、Ki-67低表达。AR与Ki-67在TNBC中的表达呈负相关性关系($r=-0.320, P<0.05$),见表2。

表2 AR与Ki-67相关性分析

		AR		<i>r</i>	<i>P</i>
		+(%)	-(%)		
Ki-67	高表达	14(48.3)	47(79.7)	-0.320	0.002**
	低表达	15(51.7)	12(20.3)		

** $P<0.01$

2.5 生存分析及列线图的构建

表3 生存分析

因素		单因素 COX		多因素 COX	
		HR(95% CI)	<i>P</i> 值	HR(95% CI)	<i>P</i> 值
年龄		0.983(0.403~2.397)	0.970		
	绝经	0.739(0.362~1.509)	0.409		
BMI	< 24	Reference	0.399		
	≥ 24	1.372(0.657~2.865)			
肿瘤直径	≤ 2	Reference		Reference	
	2~5	2.169(1.061~4.434)	0.034*	1.864(0.739~4.704)	0.187
	> 5	2.412(0.733~7.942)	0.148	1.562(0.346~7.043)	0.562
病理分级		4.428(1.812~10.820)	0.001**	3.178(1.194~8.457)	0.021*
	0	Reference		Reference	
淋巴结转移	0~3	1.349(0.665~2.737)	0.407	1.333(0.544~3.268)	0.530
	> 3	2.211(0.951~5.141)	0.065	6.147(1.935~19.521)	0.002*
AR和 Ki-67融合	AR(+) /Ki-67(-)	Reference		Reference	
	AR(+) /Ki-67(+)	0.523(0.159~1.720)	0.286	3.385(0.496~23.122)	0.214
	AR(-) /Ki-67(-)	0.710(0.216~2.334)	0.572	5.058(0.788~32.481)	0.088
	AR(-) /Ki-67(+)	2.979(1.330~6.672)	0.008**	5.019(1.093~23.046)	0.038*

* $P<0.05$; ** $P<0.01$

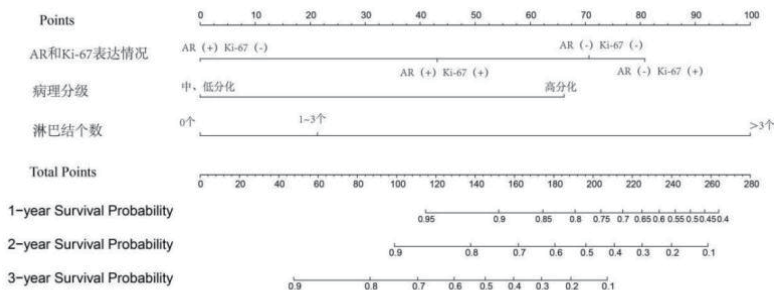


图5 预测TNBC总生存时间的列线图

采用COX单因素回归分析方法,分析结果显示,肿瘤直径、病理分级以及AR、Ki-67的表达情况是乳腺癌预后影响因素($P<0.05$)。淋巴结转移个数在实际临床应用中患者的预后有意义,因此也纳入COX多因素回归分析的指标,结果显示,病理分级,淋巴结转移个数、AR、Ki-67的表达情况是乳腺癌预后的影响因素($P<0.05$),见表3。

基于COX单因素以及多因素的筛选构建TNBC的OS的列线图预测模型,见图5。在本研究中,1年生存率、2年生存率、3年生存率列线图模型的AUC分别为0.843、0.868、0.806,提示列线图模型有较好的区分度,见图6。

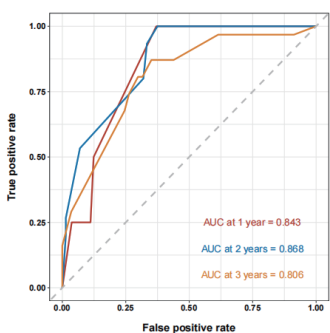


图6 列线图预测患者1年、2年、3年总生存时间的ROC曲线

3 讨论

根据国际癌症研究机构最新报告显示,乳腺癌发病率已经超过肺癌,占有所有肿瘤的11.7%,成为女性中最常见的癌症,是全球第五大癌症死因,也是女性癌症死亡的主要原因^[2]。作为乳腺癌的一种特殊亚型,TNBC仍然是目前最具挑战性的一种^[7]。主要采用的治疗手段仍然是手术为主,辅以放疗或化疗^[8]。TNBC发生早期复发和远处转移的风险较其他类型的乳腺癌更高,给患者的身心健康带来了极大的负担和痛苦。因此,寻找精确的治疗靶点、以使患者获益,仍然是当前研究的焦点和难题。

AR是一种核受体^[9],基因位于Xq11-12号染色体上,有四个不同的功能区:N端区域、氨基末端的调节域(AF-1位点)、由两个锌指组成的DNA结合域、带有核定位信号的铰链区和C端配体结合域(AF-2位点),N端主要负责参与转录激活^[10-12]。AR在乳腺癌癌变中的作用机制不是一成不变的,并且十分复杂。在没有配体的情况下,AR存在于细胞质中,并且与热休克蛋白及其伴侣复合物组成较为稳定的复合物^[13]。当C端配体结合域结合循环中的雄激素,导致构象改变,使AR二聚体化。此时形成的受体-激素复合物由细胞核外进入到细胞核内,以促进由同一个激活剂介导的靶基因转录(AR激活的转录/基因组模式)进程,并通过负反馈作用使AR转录失活^[13]。

乳腺癌是一种激素依赖性的肿瘤,AR在乳腺癌中的地位不可忽略。AR在正常乳腺组织与乳腺癌组织的表达水平略有不同^[14],在本研究中,AR在TNBC中的表达低于NTNBC的表达也证实了这一观点。文献中报道,AR在TNBC中的阳性表达占比超过30%,而且其表达水平在TNBC分子亚型中差异很大^[15,16]。在本研究中,TNBC中AR阳性表达占比为33.0%,该结果与其他研究结果一致^[17,18]。对于TNBC来说,研究^[19]显示AR是一个坚实的潜在治疗目标。一项关于AR表达与TNBC相关性研究的meta分析结果显示,AR阳性与TNBC低复发风险相关^[18]。进一步的研究将AR与更好的总生存期($P=0.04$)联系起来。因此,类如前列腺癌中AR抑制剂的应用以及取得的有效成果,大量的AR抑制剂开始在TNBC中进行使用,目前研究较多的抑制剂,如比卡鲁胺、恩杂鲁胺、阿比特龙,在多项实验中均显示其在AR阳性表达的TNBC中能够有效的抑制肿瘤细胞的增殖,增加细胞凋亡,减缓疾病的进

程^[20]。虽然,目前AR在TNBC中的具体作用机制还未明了,但现有的这些研究都能不同程度的验证AR抑制剂在TNBC预后中的积极意义。这些结果表明,AR为TNBC患者的靶向治疗展露了曙光。

核Ki67蛋白通常只在增殖细胞中表达^[21]。Ki67在细胞间期主要位于核皮质,在有丝分裂期被招募到凝集的染色体上^[22]。Ki67蛋白在除G0期外的G1,S,G2期和有丝分裂的细胞核中均能检测到^[23]。免疫染色是Ki67表达的金标准^[24]。Ki67指数在前列腺癌患者的预后中已成为独立的影响因素^[25]。Ki-67指数是增殖活性的指标,并已被广泛研究为治疗反应的预测标志物^[23,26]。多项研究^[27,28]显示,获得pCR的患者与未获得pCR的患者相比,Ki-67的表达具有显著统计学意义。一些研究报道^[29]显示,仅使用Ki-67表达不足以预测pCR,这表明预测模型还需要除Ki-67外其他标志物。AR阳性TNBC的Ki-67指数低于AR阴性TNBC,对化疗的敏感性可能较低^[28],在本实验中也验证这一结果。本研究中发现AR与Ki67的表达有相关性,因此在实验中将AR和Ki67进行融合,构建新的分类变量,以期望提高预测患者预后的准确性。本研究中的结果显示,AR(-)/Ki-67(+)表达的患者发生死亡风险是AR(+)/Ki-67(-)表达患者的5倍。AR(+)/Ki-67(-)表达的患者生存时间最长。

本研究仍存在一定的局限性。其一,样本均来源于朝阳市中心医院,因此样本的来源具有地域性,选择性偏倚无法避免;其二,本研究随访时间为3年,由于朝阳市中心医院TNBC患者量较少,横跨年限时间较长,因此部分患者出现失访,导致现有样本量不够充足的局限性,未对样本进行不同分子亚型的分组研究。另外,由于本研究是单中心研究,且样本量较为有限,因此未对列线图进行内部或外部验证,有待于扩大样本容量实施进一步的研究和验证。

参考文献

- [1] Wilkinson L, Gathani T. Understanding breast cancer as a global health concern[J]. Br J Radiol, 2022, 95(1130): 20211033.
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

- [3] Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update[J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(31): 3997-4013.
- [4] Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, et al. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016, 13(11): 674-690.
- [5] Baranova A, Krasnoselskiy M, Starikov V, et al. Triple-negative breast cancer: current treatment strategies and factors of negative prognosis[J]. *J Med Life*, 2022, 15(2): 153-161.
- [6] Zhu X, Chen L, Huang B, et al. The prognostic and predictive potential of Ki-67 in triple-negative breast cancer[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 225.
- [7] Leon-Ferre RA, Goetz MP. Advances in systemic therapies for triple negative breast cancer[J]. *Bmj*, 2023, 381: e071674.
- [8] 许人元, 王晓东. TNBC的治疗进展[J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2020, 27(8): 1033-1037.
- [9] Wasmuth EV, Broeck AV, Laclair JR, et al. Allosteric interactions prime androgen receptor dimerization and activation[J]. *Mol Cell*, 2022, 82(11): 2021-2031.
- [10] Tan MH, Li J, Xu HE, et al. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2015, 36(1): 3-23.
- [11] Li D, Zhou W, Pang J, et al. A magic drug target: Androgen receptor[J]. *Med Res Rev*, 2019, 39(5): 1485-1514.
- [12] Yu X, Yi P, Hamilton RA, et al. Structural Insights of Transcriptionally Active, Full-Length Androgen Receptor Coactivator Complexes[J]. *Mol Cell*, 2020, 79(5): 812-823.e4.
- [13] Anestis A, Zoi I, Papavassiliou AG, et al. Androgen Receptor in Breast Cancer-Clinical and Preclinical Research Insights[J]. *Molecules*, 2020, 25(2): 358-368.
- [14] Yin L, Duan JJ, Bian XW, et al. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress[J]. *Breast Cancer Res*, 2020, 22(1): 61.
- [15] Gucalp A, Tolaney S, Isakoff SJ, et al. Phase II trial of bicalutamide in patients with androgen receptor-positive, estrogen receptor-negative metastatic Breast Cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(19): 5505-5512.
- [16] Astvatsaturyan K, Yue Y, Walts AE, et al. Androgen receptor positive triple negative breast cancer: Clinicopathologic, prognostic, and predictive features[J]. *PLoS One*, 2018, 13(6): e0197827.
- [17] McNamara KM, Yoda T, Takagi K, et al. Androgen receptor in triple negative breast cancer[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2013, 133: 66-76.
- [18] Wang C, Pan B, Zhu H, et al. Prognostic value of androgen receptor in triple negative breast cancer: A meta-analysis[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(29): 46482-46491.
- [19] Safarpour D, Pakneshan S, Tavassoli FA. Androgen receptor (AR) expression in 400 breast carcinomas: is routine AR assessment justified?[J]. *Am J Cancer Res*, 2014, 4(4): 353-368.
- [20] Traina TA, Miller K, Yardley DA, et al. Enzalutamide for the Treatment of Androgen Receptor-Expressing Triple-Negative Breast Cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(9): 884-890.
- [21] Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown[J]. *J Cell Physiol*, 2000, 182(3): 311-322.
- [22] Isola J, Helin H, Kallioniemi OP. Immunoelectron-microscopic localization of a proliferation-associated antigen Ki-67 in MCF-7 cells[J]. *Histochem J*, 1990, 22(9): 498-506.
- [23] Gerdes J, Lemke H, Baisch H, et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67[J]. *J Immunol*, 1984, 133(4): 1710-1715.
- [24] Ibrahim T, Farolfi A, Scarpi E, et al. Hormonal receptor, human epidermal growth factor receptor-2, and Ki67 discordance between primary breast cancer and paired metastases: clinical impact[J]. *Oncology*, 2013, 84(3): 150-157.
- [25] Nagao K, Yamamoto Y, Hara T, et al. Ki67 and BUBR1 may discriminate clinically insignificant prostate cancer in the PSA range <4 ng/ml[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2011, 41(4): 555-564.
- [26] van den Ende NS, Nguyen AH, Jager A, et al. Triple-Negative Breast Cancer and Predictive Markers of Response to Neoadjuvant Chemotherapy: A Systematic Review[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 2969-2980.
- [27] Liu J, Wang S, Wang C, et al. Prognostic value of using glucosylceramide synthase and cytochrome P450 family 1 subfamily A1 expression levels for patients with triple-negative breast cancer following neoadjuvant chemotherapy[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(3): 247.
- [28] Guestini F, Ono K, Miyashita M, et al. Impact of Topoisomerase II α , PTEN, ABCC1/MRP1, and Ki67 on triple-negative breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2019, 173(2): 275-288.
- [29] Oshi M, Newman S, Murthy V, et al. ITPKC as a Prognostic and Predictive Biomarker of Neoadjuvant Chemotherapy for Triple Negative Breast Cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(10): 2758.

(收稿日期:2023-07-26)