

外周血中芳香烃受体及芳香烃代谢酶活性与乳腺癌关系的研究

王天航¹ 鲁英¹ 杨晓燕¹ 欧江华²

1. 新疆医科大学公共卫生学院, 新疆 乌鲁木齐 833000;
2. 新疆医科大学附属肿瘤医院乳腺外科, 新疆 乌鲁木齐 833000

[摘要] 背景与目的: 大量研究表明, 活化的芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)可能参与了由多环芳烃诱导的乳腺癌的发生, AhR作为公认的配体激活的转录因子, 可诱导多种酶表达。本研究旨在探讨芳香烃受体和芳香烃代谢酶在人体内蛋白水平与乳腺癌及其病理指标间的关系。**方法:** 以1:1配对进行病例对照研究, 共收集65对血样, 采用酶联免疫吸附法检测血液中芳香烃受体及芳香烃代谢酶蛋白水平, 同时收集病理资料。计量资料使用秩和检验进行统计分析, 相关性分析使用Spearman检验。**结果:** 秩和检验发现对照组与病例组间醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, ALDH)、细胞色素(cytochrome P450, CYP450)差异无统计学意义($Z=0.196, P=0.845; Z=0.269, P=0.788$); AhR、醌氧化还原酶(quinone oxido-ereductase 1, NQO1)、谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-S-transferases, GST)对照组平均浓度低于病例组, 差异有统计学意义($Z=1.956, P=0.041; Z=2.627, P=0.009; Z=3.272, P=0.001$)。相关性分析结果显示, 病例组中AhR与GST和NQO1相关性较高($r=0.665, P<0.01; r=0.704, P<0.01$)。以病理指标(ER、PR、HER-2)-、+、++、+++分组, 发现以雌激素受体ER分组的AhR、GST蛋白表达水平差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论:** 实验结果显示芳香烃受体及芳香烃代谢酶蛋白水平对乳腺癌发生可能有重要影响, 检测酶蛋白水平可能对乳腺癌的早期发现有帮助, 对治疗方案的选择及预后有一定意义。

[关键词] 乳腺癌; 芳香烃受体; 血清蛋白质浓度

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2014.07.006

中图分类号: R737.9 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2014)07-0512-05

A study on the relationship of the activity of aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon metabolic enzymes in peripheral blood and breast cancer WANG Tian-hang¹, LU Ying¹, YANG Xiao-yan¹, OU Jiang-hua² (1.The Public Health College of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang 833000,China; 2. Department of Breast Surgery, Affiliated Cancer Hospital of XinJiang Medical University, Urumqi Xinjiang 833000, China)

Correspondence to: YANG Xiao-yan E-mail: 390068143@qq.com

[Abstract] **Background and purpose:** Previous studies showed activated aryl hydrocarbon receptor (AhR) might be involved in the development of breast cancer induced by polycyclic aromatic hydrocarbons (PHAs) and AhR which was regarded as transcription factors activated by ligand could induced many enzymes expression. Therefore, this study aimed to explore the protein level of AhR and aryl hydrocarbon metabolic enzymes *in vivo* with a relationship of the breast cancer and pathology indicators. **Methods:** A case-control study was 1 : 1 matched and 65 pairs blood samples were collected, the ELISA was used in testing blood protein levels of the aromatic hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon metabolic enzymes. Meanwhile pathological data was collected. The Rank sum test statistical analysis was used in analyzing measurement data, Spearman test was used in correlation analysis. **Results:** Statistical analysis revealed that there was no statistical difference in aldehyde dehydrogenase(ALDH), cytochrome P450(CYP450) between the case group and the control group ($Z=0.196, P=0.845; Z=0.269, P=0.788$); and the AhR, NQO1, GST control group concentrations were lower than that in the case group. There were statistical differences of AhR, quinone oxido-ereductase 1(NQO1), glutathione-S-transferases(GST) between the control group and the case

group($Z=1.956, P=0.041; Z=2.627, P=0.009; Z=3.272, P=0.001$). Correlation analysis showed that AhR has a higher correlation in case group with GST, NQO1 ($r=0.665, P<0.01; r=0.704, P<0.01$). Grouping with the pathology indicators (ER, PR, HER-2) -, +, ++, +++, found that the level of grouping by ER, AhR protein levels and GST protein levels have a discrepancies ($P<0.05$). **Conclusion:** These results might suggest that the protein levels of AhR and aryl hydrocarbon metabolic enzymes have a significant impact on breast cancer. Detection of enzyme protein levels may be helpful for early detection of breast cancer, prompt treatment options and prognosis are meaningful.

[Key words] Breast cancer; Aryl hydrocarbon receptor; Plasma protein concentration

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤^[1], 其发病率以每年3%的速度递增, 部分大中城市报告乳腺癌已占女性恶性肿瘤之首^[2], 而新疆女性的乳腺癌发病率仅次于宫颈癌, 位居第二^[3]。乳腺癌不仅是一种局限性疾病, 更是一种全身性疾病, 早期就可发生全身播散^[4]。本研究旨在通过检测芳香烃受体及芳香烃代谢酶在患者组与对照组之间不同的蛋白水平, 讨论是否可以通过血液中酶蛋白浓度的检测进行乳腺癌的早期提示, 增加早期乳腺癌的发现概率。同时讨论酶蛋白水平与病理指标雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)、人类表皮生长因子受体(human epidermal growth factor receptor-2, HER-2)的关系; 以进一步了解酶蛋白水平对乳腺癌的发生、发展的影响以及提示治疗方案与预后的可能性。

1 资料和方法

1.1 临床资料

2011年5月—2012年7月入住新疆医科大学某附属肿瘤医院的新疆常住各族女性已确诊的原发性乳腺癌患者和体检健康人, 各65例, 按年龄相差(± 2 岁)、同民族的原则, 1:1配对进行病例对照研究, 收集其血液标本。收集并分析临床病理资料: 患者均为女性, 年龄31~74岁, 平均年龄50岁, 其中31~50岁38例, ≥ 50 岁27例; 绝经后25例, 绝经前40例; 其中哈萨克族1例, 维吾尔族15例, 汉族49例; 患者术前均未行放化疗; 组织学分级: 高分化21例, 中分化38例, 低分化5例; 伴腋窝淋巴结转移32例, 无腋窝淋巴结转移33例; ER表达阳性43例, 阴性22例; PR表达阳性31例, 阴性34例;

HER-2表达阳性49例, 阴性16例; 三阴乳腺癌6例, 非三阴乳腺癌乳腺癌59例。

1.2 试剂和方法

取血液样本3 mL, 于EDTA抗凝管中, 室温静置30 min, 3 000 r/min, 离心10 min后, 当天取回并离心将剩余血-80 °C低温冰箱保存。实验采用生物素双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)测定样品, 包被抗体: 人谷胱甘肽S转移酶单克隆抗体, 人醌氧化还原酶单克隆抗体, 人醛脱氢酶单克隆抗体, 人细胞色素P450氧化酶单克隆抗体, 人芳香烃受体单克隆抗体。检测抗体为辣根过氧化物酶(HRP)。所有实验试剂实验稀释浓度均为1:5。所有试剂均购自北京永辉生物科技有限公司。

①加样: 分别设置空白孔、标准孔、待测样品孔。空白孔加样品稀释液100 μ L, 其余空分别加标准品或待测样品, 过程避免产生气泡, 将样品加于酶标板底孔部, 尽量不触及孔壁, 轻微晃动混匀, 酶标板加上盖或覆膜。37 °C水浴反应120 min。②弃去孔内溶液: 甩干, 不用洗涤, 每孔加生物素标记抗体工作液100 μ L, 37 °C静置60 min。③温浴60 min后, 弃去孔内液体, 甩干, 洗板3次。每次浸泡1 min。④每孔加辣根过氧化物酶标记亲和素工作液100 μ L, 37 °C, 60 min。⑤温浴60 min后, 弃去孔内液体, 甩干, 洗板3次, 每次浸泡1 min, 甩干。⑥依序每孔底加入底物溶液90 μ L, 37 °C避光显色30 min。⑦依序每孔加终止溶液50 μ L, 终止反应。终止液的加入顺序应该尽量与底物液的加入顺序相同, 为了保证实验结果的准确性, 第五反应时间到后应尽快加入终止液。⑧用酶联仪在450 nm波长依序测量各孔的光密度(A值)。在加入终止液后10 min内

进行检测并打印结果。

1.3 统计学处理

依据标准品测算出标准曲线, 使用Excel表格通过吸光度换算出酶蛋白浓度; 使用SPSS 18.0统计软件进行统计分析, 计量资料使用秩和检验, 相关性分析使用Spearman检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 酶蛋白水平的病例对照研究

数据呈正偏态分布, 秩和检验发现对照组与病例组间醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase,

ALDH)、细胞色素 (cytochrome P450) 差异无统计学意义($P > 0.05$)。芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)、醌氧化还原酶(quinone oxido-ereductase 1, NQO1)、谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-S-transferases)病例组平均浓度高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 表1)。

2.2 外周血中AhR与GST, NQO1的相关性研究

血液中AhR与GST、NQO1的相关性分析结果显示, AhR在病例组中与GST、NQO1相关性较高($r = 0.665$, $P < 0.01$; $r = 0.704$, $P < 0.01$, 表2)。

表1 病例组与对照组多环芳烃代谢相关酶的比较

Tab. 1 The comparison of metabolic enzymes related to PAHs of case group and control group

| | ALDH | | AhR | | NQO1 | | CYP450 | | GST | |
|---------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | Case | Control | Case | Control | Case | Control | Case | Control | Case | Control |
| M(Q) | 2.72(3.68) | 2.78(3.11) | 3.99(3.36) | 3.36(2.13) | 4.00(3.793) | 3.04(3.01) | 2.85(4.57) | 2.77(3.35) | 5.65(6.45) | 3.17(3.45) |
| Z | | 0.196 | | 1.956 | | 2.627 | | 0.269 | | 3.272 |
| P value | | 0.845 | | 0.041* | | 0.009* | | 0.788 | | 0.001* |

*: $P < 0.05$.

表2 AhR与GST、NQO1在正常人血清和乳腺癌患者血清中相关性表达

Tab. 2 Expression correlation between AhR and GST, NQO1 in normal human serum and serum of breast cancer patients

| | Control group | | Case group | |
|---------|---------------|-------|------------|-------|
| | GST | NQO1 | GST | NQO1 |
| Number | 65 | 65 | 65 | 65 |
| r | 0.503 | 0.533 | 0.665 | 0.704 |
| P value | 0.00* | 0.00* | 0.00* | 0.00* |

*: $P < 0.01$.

2.3 病理指标分组的酶蛋白秩和检验

根据ER、PR、HER-2以阴性(-), 阳性(+、++、+++)分为三阴乳腺癌组和非三阴乳腺癌组, 经统计学比较, 未发现三阴乳腺与非三阴乳腺癌蛋白水平差异有统计学意义($P > 0.05$), 以临床分期1、2、3级分组未发现差异有统计学意义($P > 0.05$), 发现ER、PR、HER-2以(-、+、++、+++)分组AhR、GST蛋白水平出现差异有统计学意义, 但NQO1、CYP450、ALDH未发现差异有统计学意义(表3)。

表3 病例组AhR、GST与病理指标的分析

Tab. 3 The analysis of case group AhR, GST with pathological indicators

| | | ER | | | PR | | | HER-2 | | |
|-----|-------|----|----------|---------|----|----------|---------|-------|----------|---------|
| | | n | χ^2 | P value | n | χ^2 | P value | n | χ^2 | P value |
| AhR | 0 | 22 | 34.75 | | 34 | 31.91 | | 16 | 35.09 | |
| | 1 | 8 | 19.63 | | 5 | 28.10 | | 22 | 26.27 | |
| | 2 | 21 | 40.02 | 0.04* | 14 | 36.14 | 0.824 | 12 | 41.96 | 0.128 |
| | 3 | 14 | 27.36 | | 12 | 34.46 | | 15 | 33.47 | |
| | Total | 65 | | | 65 | | | 65 | | |
| GST | 0 | 22 | 35.07 | | 34 | 32.29 | | 16 | 33.38 | |
| | 1 | 8 | 11.88 | | 5 | 26.40 | | 22 | 27.14 | |
| | 2 | 21 | 38.00 | 0.008* | 14 | 37.46 | 0.695 | 12 | 35.75 | 0.274 |
| | 3 | 14 | 34.32 | | 12 | 32.54 | | 15 | 39.00 | |
| | Total | 65 | | | 65 | | | 65 | | |

*: $P < 0.05$.

3 讨 论

多环芳香烃类物质是环境中严重危害人类健康的污染物,已有研究表明,此类物质对哺乳动物有致癌性、致畸性、致突变性及免疫毒性等^[5]。而在对多环芳香烃类物质的毒性和代谢机制研究中发现AhR与其外源性化学物调节元件(xeno-biotic regulative element, XRE)结合可以引起一系列靶基因的表达,这些表达一方面会起到一定的保护作用,另一方面可能会导致一些具有较高致癌性的中间产物产生,从而促使癌症的发生^[6]。AhR又称二恶英受体,是一种以多环芳香烃类化合物为配体的信使蛋白,在信号转导与基因转录中发挥作用,也是一种细胞信号通路的调节因子。可诱导多种外源化合物代谢酶的表达,还参与多种毒性反应以及其他一些重要的生物学过程,如信号转导、细胞分化、细胞凋亡等。AhR通过调控外源性化合物代谢酶,包括I相酶(主要是细胞色素P450超家族成员,比如CYP1A1/1A2/1B1等)和II相酶(如谷光甘肽转移酶,葡萄糖醛酸转移酶等)的表达,从而使机体对外源性化合物发生适应性及毒性反应^[7]。这种调控作用一方面可以加强机体对毒物的氧化代谢,起到保护机体的作用,但与此同时在解毒过程中产生的某些高致癌代谢物将使机体产生毒性反应并促进肿瘤的发生^[8]。

大量研究表明,活化的AhR可能参与了由多环芳烃诱导的乳腺癌的发生,AhR作为公认的配体激活转录因子,通过AhR途径可以诱导多种酶表达,AhR在乳腺癌组织中的表达明显高于正常乳腺肌上皮和导管上皮。芳香烃受体介导的基因表达过程可分为以下几个基本过程:①二恶英类化学物进入细胞;②化合物与芳香烃受体结合;③配体-受体复合物与DNA识别位点结合;④特异基因的转录及翻译;⑤表达蛋白发挥作用。二恶英类化学物质(dioxin-type chemicals, DTCs)进入细胞质后即与细胞质中的芳香烃受体结合,该结合过

程将导致芳香烃受体激活,配体-受体复合物进入细胞聚集在细胞核中,进一步激活多种基因的表达,包括CYP1A1、CYP1A2、GST、醌氧化还原酶(NQO1)和醛脱羟酶等(ALDH)^[9]。在此次实验中,AhR、GST、NQO1病例组蛋白水平升高可能原因是癌细胞导致正常细胞的细胞质被破坏,使得酶蛋白大量进入血液,这提示将蛋白浓度异常升高当作早期乳腺癌的征兆是有意义的。

目前已知的GST中, π 型的GST与恶性肿瘤的关系最密切,有研究报道胃癌、卵巢癌、尿道癌、结直肠癌、子宫内膜癌、前列腺癌和胶质细胞瘤等恶性肿瘤中GST- π 水平显著比对照组高^[10],NQO1又称DT-硫辛酰胺脱氢酶,为机体一重要的双相解毒酶,有研究^[11]表明NQO1专性催化醌两电子还原反应,具有化学保护和生物激活作用,在多种肿瘤细胞特别是肺癌、结肠癌、乳腺癌细胞中的表达远高于正常组织,其对醌及其衍生物有解毒作用,另一方面还可活化一些确定的抗癌药物,NQO1既可诱导一些前致癌物成为终致癌物,同时也可降解一些致癌物^[12]。实验中发现乳腺癌患者外周血中AhR与GST、NQO1相关系数表达较高,但是对照组中AhR与GST、NQO1也是有相关性,但是相关系数表达较低,这提示相关系数的高低可能与蛋白浓度有关,AhR浓度升高,对外源性化合物代谢酶的调控能力就越强,从而对乳腺癌的发生产生一定影响。

雌激素在乳腺癌发生过程中扮演了一个重要角色^[13],雌激素可以与ER结合,引起ER构象的改变,然后与雌激素反应元件(estrogen response elements, ERE)相互作用,与转录因子和辅助激活子的多蛋白复合体一起激活转录。这形成了在致癌过程中起重要作用的E2-ER-ERE通路。AhR-ER抑制性交互应答可能表现为对E2-ER-ERE通路的某些环节的抑制,其中AhR配体诱导雌激素受体降解可能是机制之一^[14]。大量研究指出AhR能促进乳腺癌细胞生长、抑制凋亡等,如AhR表达与epiregulin、Wnt信号通路和NF- κ B激活有关,这3种信号通

路与乳腺癌细胞的浸润转移及恶性转化密切相关^[15], 提示AhR高表达对乳腺癌的发展有重要影响, 与ER的关联密切。乳腺癌的化疗治疗是综合治疗的重要措施, 然而许多患者会因为癌细胞的耐药性, 导致化疗效果达不到理论效果, 如果想提高化疗效果, 首先应当了解各个患者癌组织中多药耐药相关基因蛋白的表达状况, 研究表明GST- π 是乳腺癌中阳性表达率较高的耐药相关基因蛋白, 因此GST- π 在乳腺癌细胞中表达的高低, 会直接影响化疗方案的选择, 而合理地用药能为患者节约大量开支以及减少痛苦和不良反应^[4]。在本次研究中未发现ER阴性组和阳性组病例对照研究有差异, 但是以ER(-、+、++、+++)⁴个水平检验发现AhR, GST蛋白水平($P < 0.05$)有差异, 提示在ER阳性的患者中, 蛋白水平的高低也许会影响到治疗方案的选择以及预后。

目前国内多数研究都是检测乳腺癌中芳香烃受体及芳香烃代谢酶类的阳性率, 罕见外周血芳香烃受体检测的研究, 但是采用免疫组化的检测方式对癌症的早期发现和早期预防的意义不大, 在乳腺癌发生早期如能在外周血中检测蛋白浓度提示癌症的发生是非常有意义的, 本次研究就此作出尝试。同时讨论酶蛋白浓度与ER的关系, 提示蛋白浓度会影响乳腺癌的治疗及预后。当然, 还需要扩大样本量, 进行多因素的相关性分析来进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] 张洪斌, 高鹏飞. 乳腺癌组织中PPAR γ 的表达及其预后意义 [J]. 现代预防医学, 2011, 38(23): 4848-4849.

- [2] 李鸿涛, 阿力比亚提·艾尼, 马斌林, 等. 新疆维吾尔族女性散发性乳腺癌组织中BRCA1、C-erBb-2的表达分析及其临床意义 [J]. 中国癌症杂志, 2010, 20(9): 659-662.
- [3] 成芳, 木克代斯, 司马义, 等. 新疆维吾尔族女性乳腺癌危险因素病例对照研究 [J]. 中国卫生统计, 2010, 27(4): 364-367.
- [4] 孙晶波, 张丽杰. 谷胱甘肽 S 转移酶在乳腺癌中的表达 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2010, 31(19): 3025-3026.
- [5] 谭玉凤, 吴南翔. 芳香烃受体的研究进展 [J]. 浙江省医学科学院学报, 2007, 12(4): 35-37.
- [6] 尹小菲, 陈洁, 陈旻湖. 芳香烃受体与肿瘤发生和发展的关系 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2011, 18(1): 255-228.
- [7] 肖佳, 黄俊辉. AhR及ARNT在人乳腺癌良、恶性病变组织中的表达及意义 [D]. 中南大学, 2011, 5: 16-17.
- [8] 安杜娟. 多环芳烃的致癌的分子毒理学研究进展 [J]. 国外医学卫生学分册, 2005, 32(1): 10-13.
- [9] 张志仁, 徐顺清. 二恶英类化学物质毒性的分子机理 [J]. 环境与健康杂志, 2000, 17(5): 316-319.
- [10] PROCOPIO A, AICARO S, CUNARI S, et al. Molecular modeling synthesis, and preliminary biological evaluation of glutathione-S-transferase inhibitors as potential therapeutic agents [J]. J Med Chem, 2005, 48(19): 6084-6089.
- [11] LIAO K, NIU F, HAO H P, et al. Advances on structure-activity relationship of NQO1-targeting antitumor quinones [J]. Chin J Nat Med, 2012, 10(3): 170-176.
- [12] 邹煦. GSTT1、GSTM1、NQO1和MTHFR基因型与骨髓增生异常综合症关系 [D]. 中国协和医科大学, 2004, 5(1): 7-31.
- [13] LONGA J R, EGANA K M, DUNNING L, et al. Population-based case-control study of AhR(aryl hydrocarbon receptor) and CYP1A2 polymorphisms and breast cancer risk [J]. Pharmacogenet Genomics, 2006, 16(4): 237-243.
- [14] 胡蕾蕾. 芳香烃受体与乳腺癌 [J]. 医学综述, 2011, 17(18): 2751-2754.
- [15] 薛丹凤, 张谷, 邵喜英, 等. AhR在乳腺癌组织中的表达及其与预后相关性的研究 [J]. 临床肿瘤医学杂志, 2010, 15(10): 874-878.

(收稿日期: 2014-04-10 修回日期: 2014-05-30)