

芳香化酶与乳腺癌

齐英 冯雪 刘贵建

作者单位:100053 北京市,中国中医科学院广安门医院检验科

通讯作者:刘贵建, E-mail: liugujian@hotmail.com

雌激素作用于乳腺上皮细胞,可促进细胞 DNA 合成,诱发乳腺芽体成熟^[1]。在乳腺癌发生发展的过程中,雌激素分别与不同的核受体结合,激活或者抑制下游靶基因的转录和表达,导致正常细胞表型及生物学特性改变,诱发肿瘤生成^[2]。雌激素除了通过核受体,还可以通过细胞膜受体参与乳腺细胞的癌变^[3]。体内雌激素的代谢平衡紊乱可以导致有“基因毒性”的自身中间代谢产物异常增多,使 DNA 突变率显著提高,从而诱发乳腺肿瘤的发生。此外,雌激素直接参与调控细胞周期蛋白如细胞周期素 D1 的表达,而细胞周期蛋白过度表达可导致乳腺细胞增殖异常^[4]。可见,雌激素与乳腺癌的发生和发展是密不可分的。而芳香化酶即雌激素合成酶,成为近年来科学家们研究乳腺癌的重点。芳香化酶简称 CYP19,是由 503 个氨基酸构成的蛋白酶,基因定位于 15q^{21.1},是雌激素合成中的限速酶,能催化雄激素转化为雌激素。研究表明芳香化酶属于细胞色素 P450 家族,故又叫做芳香化酶细胞色素 P450。该酶见于卵巢、胎盘、睾丸、脑、乳腺组织及某些病理组织如乳腺癌、子宫内膜肿瘤、异位的子宫内膜、子宫平滑肌瘤组织,正常成年人肝脏、肾上腺和子宫组织未见芳香化酶的表达。研究表明,由芳香化酶催化雄激素转化得到的雌激素不仅作用于生殖系统也与肿瘤的发生紧密关联。本文就近年来芳香化酶在肿瘤组织尤其是乳腺癌中的表达、检测与临床研究作一简单的综述。

1 乳腺癌组织中芳香化酶的表达

人类雌激素依赖性肿瘤如乳腺癌、子宫内膜癌、恶性卵巢肿瘤、卵巢上皮和基底肿瘤中都有芳香化酶的过度表达。脂肪、成纤维细胞及子宫内膜衍生的基质细胞、睾丸、肝、肾上腺及子宫肿瘤中芳香化酶的过度表达与这些组织中局部升高的雌激素浓度有关。在对子宫内膜癌、子宫平滑肌瘤、异位的子宫内膜组织、乳腺癌的癌旁脂肪组织的研究中,发现以上组织均有芳香化酶活性及其转录水平的过度表达^[5]。

目前,研究最多的就是芳香化酶和乳腺癌。芳香化酶细胞色素 P450 在正常乳腺组织中无阳性表达,在乳腺不典型增生病变中表达异常,并且在中度不典型增生存在癌变时,其阳性表达率增高,在乳腺癌组织中显著增高。近期,一些科

学家在对癌旁组织的研究中发现,在邻近或远离恶性病变组织的非癌变区域中,形态上正常及增生的乳腺上皮细胞可以表现为一系列的与恶性病变相关的免疫组织化学变化。约 60%~70% 的乳腺癌的生长是依赖于雌激素的,雌激素与其受体结合形成复合物,进而与靶基因调节区的雌激素效应要素结合介导一系列基因的表达。ICC、ISH、RT-PCR 及芳香化酶活性分析表明,约 96% 的乳腺癌组织中有高于正常水平的芳香化酶表达^[6];进一步的研究表明癌细胞局部表达的芳香化酶能促进癌细胞本身的生长。比如,向能稳定表达芳香化酶的乳腺癌 MCF-7 细胞株的细胞培养液中加入芳香化酶的底物雌激素,可以促进细胞的生长,而这一促进作用可以被芳香化酶抑制剂所消除^[7,8]。一些科学家在对 46 例乳腺癌患者的生物化学活性的研究中发现,在乳腺癌组织的基质和间质细胞中有芳香化酶的过度表达。以上实验为芳香化酶活性能促进肿瘤生长提供了直接的证据。

2 乳腺癌组织中芳香化酶的检测

对于雌激素中的雌二醇(E2)水平的测量是预测乳腺癌发展的有效方法。更年期时和更年期后的 E2 含量高于更年期前 E2 含量的 50 倍。因此在乳腺组织中,测量雌激素水平有其实际意义。一些科学家在对 500 名无症状的绝经后女性血浆中 E2 水平的测量研究中发现,血浆中的 E2 水平预示着 5~10 年的乳腺癌的发展^[9]。说明乳腺癌组织雌激素水平可能和病情发展情况广泛关联。芦苇和米勒等科学家的研究发现绝经后女性的乳腺组织中有 30%~100% 的雌激素的合成是在组织中,然而从血浆中吸取的只占了很少的一部分。所以在以前的研究中,大多采用对于乳腺组织的活体检查,活体的测量需要使用放射性同位素,并且有一定的技术要求。通常用氘化水形成体外检测,这样仅能检测到乳腺癌患者体内 2/3 的芳香化酶。这种检测方法对患者本身存在伤害,灵敏性也不是很高,因此不能用于日常检测。为此,我们需要一种用于人类乳腺样本芳香化酶日常评估检测的物质,它应该具有高灵敏性,适宜体外分析检测。

在此基础上,研究者运用组织基因表达分析、放射免疫分析和色谱分析对芳香化酶进行了研究。在组织基因表达分

析方面,通过对恶化组织癌前变化和对乳腺组织生物学变化的研究,使得近年来研究的重点转向了乳头抽吸物,导管引流液和细针抽吸的方法研究,这些技术比起活组织检查更能够被患者接受。但是只能获得很少的组织,所以需要高敏感且精密的获取生物标记物的方法。Liu 等^[10]人运用了高敏感性的巢式 PCR(Q-PCR)的方法先后对小鼠的胸腺组织及人的乳腺组织中的芳香化酶进行研究,获得在人类乳腺癌活组织检查中导管引流液、细针抽吸液中均得到了芳香化酶的高度表达的结果,研究结果说明了这种方法对于人类乳腺癌中芳香化酶的测定具有高度的敏感性及可行性。在放射免疫方面,一直都未研制出适合检测芳香化酶抑制剂发挥作用后测量雌激素水平的试剂盒,是因为使用芳香化酶抑制剂后检测出的数值接近于绝经后女性雌激素的基线水平。为此一些研究者优化了放射免疫测定法,使该方法适用于较低水平的雌激素测定并且可用于芳香化酶抑制剂的研究和检测其它药物对雌激素的影响^[11]。在色谱分析方面,有些研究者还对尿液中的雌激素结合物运用液相色谱仪进行光谱测定研究,结果发现在使用芳香化酶抑制剂前后的患者雌激素的结合物有明显的变化^[12]。Delvoux 等^[13]还研究了一种高敏感的高效液相色谱法用以鉴定雌激素的代谢转化。其研究机理是富含雌激素的敏感组织的新陈代谢常常伴随着甾族化合物色差改变,这些改变多数是因酶类新陈代谢后表达的改变。该方法是以前以雌激素的固体萃取为基础,之后让其衍生为类固醇,用于检测胎盘和子宫内膜中溶胞产物中芳香化酶和硫酸酯酶的活性,该方法是否适用于乳腺癌中芳香化酶的研究,还需要继续考证。Santen 等^[14]运用气相色谱仪中的质谱测定法对 E2 进行测定,用于对芳香化酶抑制剂治疗情况的监控。气、液相色谱分析法对于芳香化酶的检测还未真正的进入到临床实践阶段,很多数据都需要进一步的验证。由于近几年的研究数据表明血浆中 E2 的测定结果预示着乳腺癌在正常绝经后女性体内的危险程度。有些研究中,对于较低浓度的 E2 水平的测试总是存在着分析敏感度、分析特异性和分析精密度的问题。针对这些问题一些研究者进行了一种超敏感性的重组细胞的生物学鉴定方法来测量绝经后女性体内 E2 的水平。结果在 30 例绝经后妇女中有 28 例运用该方法检测出其雌激素水平维持在青春期的标准范围内。该结果与报道相同,但与很少应用的酵母生物学鉴定法结果相类似。这种方法可以被用来判断是否对患者进行药物治疗以预防乳腺癌的发生进行筛选,但是该方法在其它水平上还需要进一步的测试^[15]。

3 芳香化酶抑制剂与乳腺癌的治疗

由于乳腺癌组织及其癌旁组织内有芳香化酶的过度表达。因此,在很早以前人们就开始把芳香化酶的抑制剂用于临床的研究。芳香化酶抑制剂的研究最早见于 20 世纪 70 年

代,此后就被用于乳腺癌的临床治疗,国外先后已应用多种芳香化酶抑制剂来治疗绝经后妇女的乳腺癌。芳香化酶抑制剂的机理主要是通过抑制组织中芳香化酶的活性,阻止绝经后妇女体内雌激素的生成从而降低雌激素水平^[16]。研究表明乳腺癌的基质和间质细胞中有芳香化酶的过度表达,其可以合成雌激素从而刺激激素敏感性乳腺癌细胞的增殖。通过采用芳香化酶抑制剂对乳腺癌的新辅助内分泌治疗的临床研究提示,芳香化酶抑制剂作用机理可能主要是通过抑制乳腺癌组织内高表达芳香化酶的活性而起作用,并不是通过降低循环血内的雌激素水平起作用^[17]。芳香化酶抑制剂适用于绝经后激素敏感性乳腺癌患者。如绝经前患者使用芳香化酶抑制剂抑制雌激素的合成,会减弱了雌激素对下丘脑和垂体的负反馈抑制作用,从而导致促性腺激素分泌增加促进雌激素的分泌对抗雌激素的减少,还会诱发卵巢排卵导致意外妊娠。第一代芳香化酶抑制剂——氨基甾类最初作为抗惊厥药物用于临床,1969 年被临床用于治疗乳腺癌。除抑制芳香化酶活性外,还刺激肝脏混合功能氧化酶活性,促进雌激素代谢及加速其在血浆中的清除。它能抑制肾上腺所有类固醇激素的合成,起到药物性肾上腺切除的作用。在使用时需要补充皮质内固醇激素,存在使用不方便、选择性差且毒副作用较大等问题^[18]。第二代芳香化酶抑制剂——福美坦,1993 年进入临床使用,其能选择性的与芳香化酶活性部分共价结合,使酶丧失活性,具有较强的选择性和较少的不良反应。但按推荐剂量使用,对 E2 的抑制作用不稳定,且有明显的首过作用,该药必须每月肌内注射两次,大约有 17% 的患者会出现局部注射反应^[19]。第三代芳香化酶抑制剂——阿那曲唑、来曲唑和依西美坦是近年来研究最多且最深入的新一代芳香化酶抑制剂。与第一代和第二代相比,其抑制全身芳香化酶活性和雌激素水平的效力达 97% 以上^[20],具有选择性更好、特异性更强、耐受性更好且无交叉耐药性及不良反应小,对皮质醇或醛固酮代谢几乎没有影响。依西美坦能不可逆地与芳香化酶结合导致所结合的蛋白酶永久性失活,又称为致死性芳香化酶抑制剂,被称为 I 型抑制剂。因其具有与甾体类激素相似结构,故又称为甾体类抑制剂。而来曲唑和阿那曲唑对芳香化酶的抑制作用是其与底物竞争性结合,具有可逆性,称为芳香化酶的竞争性抑制剂,被称为 II 型抑制剂,因其不具有甾体类激素相类似的结构,又可称为非甾体类抑制剂。总的来说,这些芳香化酶抑制剂的作用原理为抑制芳香化酶活性或基因表达,从而降低患者体内的雌激素水平,如术前用芳香化酶抑制剂药物 7 d 后芳香化酶活性下降至 89%、雌酮与 E2 的水平分别下降至 64% 和 80%,其作用迅速,抑制力强,治疗效果不低于甚至优于抗雌激素类药物三苯氧胺,几乎没有激动剂效应,副作用小,主要副作用有胃肠紊乱、头痛、骨痛、背痛、无力、外周水肿等^[21]。由于目前还缺乏直接的

比较研究,很难说究竟哪一种芳香化酶抑制剂效果更好。虽然很多试验已表明第三代芳香化酶抑制剂的内分泌辅助治疗可能比他莫西芬标准治疗更有效,且阿那曲唑和依西美坦在子宫内膜增生、癌变、阴道出血、血栓形成、潮热和脑血管缺血的发生率要低于他莫西芬。但芳香化酶抑制剂仅适用于绝经后的乳腺癌患者,我国乳腺癌发病年龄较轻,其中 70% 是绝经前的患者,用药范围较他莫西芬小,而且第三代芳香化酶抑制剂的应用对骨骼系统产生一定的不良反应,增加骨质疏松、骨折的危险性^[2]。沈坤炜^[2]和 2006 年美国 NCCN 乳腺癌治疗指南中提出,由于他莫西芬辅助治疗的益处长期存在,仍然是可以接受的选择,但他莫西芬已经不再作为金标准。第三代芳香化酶抑制剂被推荐用于绝经后、内分泌治疗敏感的乳腺癌辅助治疗。芳香化酶抑制剂作为治疗乳腺癌的二线或三线药物在美国、日本等已经广泛用于乳腺癌的临床治疗,其前景非常广阔。

4 芳香化酶基因表达的调控

在不同的组织中芳香化酶表达的调控是不相同的,如促卵泡成熟激素 (follicle stimulating hormone, FSH) 刺激卵巢芳香化酶活性与 mRNA 的表达,佛波酯和视黄酸受体的配体刺激绒毛膜癌细胞芳香化酶的表达,雄激素刺激下丘脑芳香化酶的表达^[2]。每个组织专一性启动子侧翼都有独特的调控元件,因而有着独特的调控途径,如胎盘组织特有的启动子 Ia 受视黄酸调节,卵巢特异的启动子 II 主要受环磷腺苷调节,脂肪组织特异的启动子受 IL-6、IL-1、TNF- α 调节^[2]。

研究表明,这种组织专一性仍是利用了同启动子的缘故,芳香化酶基因表达的调控选择性地利用了多个启动子专一性的第一外显子。人芳香化酶基因的组织专一性调节表现为对多个外显子的选择性利用,如 I.1 主要见于胎盘;I.3、I.4 和 P II 见于脂肪组织^[2];卵巢主要为 P II;脑主要为 If 和 Id;I.2 也见于脂肪与胎盘,I.5 主要见于胎肝、肠和肺,且表达极低;II a 仅见于胎盘;正常的睾丸和骨表达 I.6,肝癌和睾丸肿瘤也有 I.6 高表达,而胎肝只有低表达。

约 96% 的乳腺癌组织有高于正常水平的芳香化酶表达,这种表达主要受启动子 I.3 和 P II 调节 (这两个启动子均受 cAMP 调控),而正常乳腺组织和脂肪基质细胞中芳香化酶的表达主要受启动子 I.4 调节,提示在乳腺癌的发生过程中起主导作用的启动子由正常情况下的 I.4 变为 I.3 和/或 P II。进一步的研究表明,在正常的乳腺基质细胞中芳香化酶的表达由启动子 I.4 驱动,而启动子 I.3 和 P II 的转录被沉默子抑制;在癌组织中某些尚不为我们知悉的因素使 cAMP 水平升高,解除沉默子对启动子 I.3 和 P II 转录的抑制,增强了依赖于 cAMP 的启动子 I.3 和 P II 的转录活性进而导致癌变^[2]。

5 展望

肾上腺和卵巢组织中的芳香化酶在将雄激素转化为雌

激素的过程中发挥了重要的作用,肿瘤组织内部合成的 E2 水平高于从外周组织中摄取的 E2 水平,显示出肿瘤组织中的 E2 水平对肿瘤的生长有着很强的刺激作用^[2]。分析雌激素依赖性肿瘤中芳香化酶的重要性,不仅有助于理解这些肿瘤的发育与生物学行为,更有助于利用芳香化酶抑制剂抑制肿瘤组织内的芳香化酶,并对这些患者进行内分泌治疗提供新的思路。深入研究芳香化酶的检测技术不但将为芳香化酶检测的敏感性、特异性及准确性提供更好的试验条件,还将减轻患者的痛苦,全面的提高检测质量。但是,现在所研究的这些检测技术上都有一些不完善的地方,如在酶类及蛋白质方面的更深入的研究,我们要进一步完善,使其能够尽快的应用于临床实践。对于芳香化酶抑制剂第三代药物,虽然疗效比他莫西芬好,但是芳香化酶仅适用于绝经后的乳腺癌患者,我国乳腺癌发病年龄较轻,其中 70% 发病于绝经前,对于我国乳腺癌发病的年龄特点,找到更适合的药品还有待进一步的研究。从目前的试验研究显示,在无瘤生存率方面第三代芳香化酶抑制剂要优于他莫西芬,但长期疗效还有待继续研究。

6 参考文献

- 1 Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29: 2905-2919.
- 2 Saunders PT, Millar MR, Williams K, et al. Expression of oestrogen receptor beta (ERbeta) protein in human breast cancer biopsies. *Br J Cancer*, 2002, 86: 250-256.
- 3 Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, et al. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell*, 2001, 104: 719-730.
- 4 Planas-Silva MD, Shang Y, Donaher JL, et al. AIB1 enhances estrogen dependent induction of cyclin D1 expression. *Cancer Res*, 2001, 61: 3858-3862.
- 5 Bulun SE, Simpson ER. Aromatase expression in women's cancers. *Adv Exp Med Biol*, 2008, 630: 112-132.
- 6 Sasano H, Anderson TJ, Silverberg SG, et al. The validation of new aromatase monoclonal antibodies for immunohistochemistry a correlation with biochemical activities in 46 cases of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2005 May, 95: 35-39.
- 7 Sun XZ, Zhou D, Chen S. Autocrine and paracrine actions of breast tumor aromatase. A three-dimensional cell culture study involving aromatase transfected MCF-7 and T-47D cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1997, 63: 29-36.
- 8 Veneziani BM, Criniti V, Cavaliere S, et al. In vitro expansion of human breast cancer epithelial and mesenchymal stromal cells: optimization of a coculture model for personalized therapy approaches. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6: 3091-3100.

9 Geisler J, Ekse D, Helle H, et al. An optimised, highly sensitive radioimmunoassay for the simultaneous measurement of estrone, estradiol and estrone sulfate in the ultra-low range. In human plasma samples J Steroid Biochem Mol Biol, 2008, 109:90-95.

10 Liu GJ, Wu YS, Brenin D, et al. Development of a high sensitivity, nested Q-PCR assay for mouse and human aromatase. Breast Cancer Res Treat, 2008, 111:343-351.

11 Geisler J, Ekse D. An optimised highly sensitive radioimmunoassay for the simultaneous measurement of estrone, estradiol and estrone sulfate in the ultra-low range in human plasma samples. J Steroid Biochem Mol Biol, 2008, 109:90-95.

12 Qin F, Zhao YY, Sawyer MB, et al. Hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of estrogen conjugates in human urine. Anal Chem, 2008, 80: 3404-3411.

13 Delvoux B, Husen B, Alenhoff Y, et al. A sensitive HPLC method for the assessment of metabolic conversion of estrogens. J Steroid Biochem Mol Biol, 2007, 104:246-251.

14 Santen RJ, Demers L, Ohorodnik S, et al. Superiority of gas chromatography/tandem mass spectrometry assay (GC/MS/MS) for estradiol for monitoring of aromatase inhibitor therapy. Steroids, 2007, 72:666-671.

15 Wang S, Paris F, Sultan CS, et al. Recombinant cell ultrasensitive bioassay for measurement of estrogens in postmenopausal women. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90:1407-1413.

16 Miller WR. Aromatase inhibitors: mechanism of action and role in the treatment of breast cancer. Semin Oncol, 2003, 30:3-11.

17 Miller WR, Dixon JM. Local endocrine effects of aromatase inhibitors with the breast. J Steroid Biochem Mol Biol, 2001, 79:93-102.

18 Lonning PE, Johannessen DC. Treatment of breast cancer with aromatase inhibitors. Drugs Today, 1991, 27:117-119.

19 Goss PE, Powles TJ, Dowsett M, et al. Treatment of advanced postmenopausal breast cancer with the aromatase inhibitor, 4-hydroxyandrostenedione: Phase II report. Cancer Res, 1986, 46: 4823-4826.

20 Geisler J, Haynes B, Anker G, et al. Influence of letrozole and anastrozole on total body aromatization and plasma estrogen levels in postmenopausal breast cancer patients evaluated in a randomized, crossover study. J Clin Oncol, 2002, 20: 751-757.

21 Bria E, Cuppone F, Milella M, et al. Trastuzumab cardiotoxicity: biological hypotheses and clinical open issues. Expert Opin Biol Ther, 2008, 8:1963-1971.

22 Baum M, Budzar AU, Cuzick J, et al. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the AT-AC randomised trial. Lancet, 2002, 359:2131-2139.

23 沈坤伟. 2005 St. Gallen 国际乳腺癌治疗共识. 实用临床医药杂志, 2006, 10: 30-32.

24 Abe-Dohmae S, Tanaka R, Takagi Y, et al. In vitro increase of aromatase mRNA in diencephalic neurons. Neuroendocrinol, 1996, 63: 46-52.

25 Vanselow J, Fürbass R, Tiemann U. Cultured bovine trophoblast cells differentially express genes encoding key steroid synthesis enzymes. Placenta, 2008, 29:531-538.

26 Clyne CD, Speed CJ, Zhou J, et al. Liver receptor homologue-1 (LRH-1) regulates expression of aromatase in preadipocytes. J Biol Chem, 2002, 277: 20591-20597.

27 Bulun SE, Simpson ER. Aromatase expression in women's cancers. Adv Exp Med Biol, 2008, 630:112-132.

28 Suzuki T, Miki Y, Akahira J, et al. Aromatase in human breast carcinoma as a key regulator of intratumoral sex steroid concentrations. Endocr. J, 2008, 55:455-463.

(收稿日期:2009-07-27)

(本文编辑:赵文君)



《实用检验医师杂志》广告业务招商

《实用检验医师杂志》于 2009 年 7 月 21 日获得中华人民共和国新闻出版总署批准的中华人民共和国期刊出版许可证,京期出证第 5864 号;2009 年 8 月 19 日获得天津市工商局批准的广告经营许可证,许可证号:1201034000665。广告经营范围:设计、制作印刷品广告,利用自有《实用检验医师杂志》发布广告。本刊为新刊,国内外公开发行。目前本刊编辑部已开发广告业务,欢迎需要在本刊刊登广告的客户联系我们。联系电话:022-28304377;022-28337293;13323389391 联系人:杨军。

本刊编辑部