

PES1 蛋白在乳腺癌组织中的表达及临床意义

李树霞^{1,2} 孔庆暖³ 黄维清^{3△} 甄宏伟² 任永昌²

(¹ 青岛大学医学院, 青岛 266000; ² 临沂市中心医院, 沂水 276410; ³ 青岛市立医院, 青岛 266000)

摘要 目的 探讨核仁蛋白(Pescadillo, PES1)在乳腺癌组织中的表达,分析 PES1 与乳腺癌组织雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)及人表皮生长因子受体-2(human epidermal growth factor receptor-2, HER-2)间的关系,探讨其在乳腺癌发病机制及预后判断中的重要意义。**方法** 用免疫组织化学染色检测 PES1 蛋白在 60 例乳腺癌及癌旁组织中的表达,分析 PES1 蛋白在肿瘤组织中的表达水平以及与临床病理特征之间的关系,结合 ER、PR、HER-2、Ki67 表达的水平分析 PES1 在乳腺癌发病机制中的作用。**结果** PES1 蛋白主要在乳腺癌组织的表达显著高于癌旁组织。PES1 与 ER 表达具有关联性,与年龄、组织学类型、分级、分子分型及 PR、HER-2、Ki67 表达均无关。**结论** PES1 在乳腺癌肿瘤组织中高表达,与 ER 表达有关联,提示 PES1 可能通过激素通路参与乳腺癌的发病机制。

关键词 乳腺癌;核仁蛋白;雌激素受体

中图分类号:R737.3 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2018)06-180-05

The expression and clinical significance of PES1 protein in breast cancer

LI Shuxia^{1,2}, KONG Qingnuan³, HUANG Weiqing³, ZHEN Hongwei², REN Yongchang²

(¹ Medical College of Qingdao University, Qingdao 266000, China;

² Linyi Central Hospital, Yishui 276410, China;

³ Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of nucleolar protein (PES1, Pescadillo) in breast cancer tissue, and analyze the relationship among PES1, estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and human epidermal growth factor receptor-2 (HER-2) in breast cancer. And then the significance in breast cancer pathogenesis and prognosis was elucidated. **Methods** The immunohistochemistry staining detection PES1 was used for the expression of 60 breast cancer and para-carcinoma tissue, and PES1's expression level in tumor tissue and relationship with clinicopathologic feature were analysed, as well as the role of PES1's in pathogenesis according to the expression level of ER, PR, HER-2 and Ki67. **Results** PES1's expression in breast cancer tissue was significantly greater than that in para-carcinoma tissue. It had correlation between PES1 and ER expression, while no any correlation was observed among age, histological type, classification, molecular subtyping and PR, HER-2, Ki67. **Conclusion** It indicates that PES1 may participate in breast cancer's pathogenesis through hormone pathways according to PES1's high expression in breast cancer tumor tissue and the positive correlation property of ER expression.

Keywords: Breast cancer; PES1; Estrogen receptor

乳腺癌是女性常见恶性肿瘤,统计显示其发病率明显上升,位于女性恶性肿瘤的第二位^[1],且发病越来越年轻化^[2]。乳腺癌是激素依赖性肿瘤,多项研究表明雌激素在乳腺癌的发生发展过程中

起了重要作用^[3-9]。核仁蛋白(Pescadillo, PES1)主要分布于细胞的核仁中,也少量分布于胞浆^[10-11]。已有实验证实 PES1 在胃癌和结肠癌中的表达水平升高^[12]。早在 2007 年, Zhang H 等^[13]通过 Western blot 检测到乳腺癌组织中 PES1 的表达明显高于癌旁。最近研究报道显示 PES1 在多种乳

△[通信作者]黄维清, E-mail:18678909697@163.com

腺癌细胞系中的 mRNA 及蛋白表达水平都明显升高,而且在临床分期 I 到 IV 期的原发性乳腺癌中均发现 PES1 表达水平显著升高^[11]。为乳腺癌治疗及靶向药物的研发提供新的思路 and 方向,本文将应用免疫组化方法检测 PES1 蛋白在乳腺癌中的表达,分析 PES1 蛋白与乳腺癌组织雌激素受体(estrogenreceptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)及人表皮生长因子受体-2(human epidermal growth factor receptor-2, HER-2)表达之间的关系,并结合患者年龄、病理分型、组织学分级等分析 PES1 蛋白表达与临床病理特征之间的关系,以期发现 PES1 蛋白在乳腺癌发生发展过程中的重要作用。

1 资料和方法

1.1 一般资料

收集临沂市中心医院 2015 年 12 月 30 日至 2016 年 5 月 23 日手术切除乳腺癌的标本。所有蜡块均常规中性福尔马林固定,石蜡包埋,采用 4 μ m 连续切片,经 HE 染色后,由两名高年资病理诊断医师进行读片。选取病理诊断为浸润性癌的 60 例石蜡标本作为实验组,其中浸润性癌,非特殊型 36 例,小叶癌 22 例,特殊类型癌 2 例,用癌旁组织作为对照。采用 Scarff-Bloom-Richardson 分级系统^[14],根据乳腺癌组织中腺管形成与否、细胞核的多形性、异型性和核分裂像 3 项指标进行分级,腺管形成的能力:1)整个肿瘤可看到为 1 分;2)不容易发现为 3 分;3)1 分与 3 分之间为 2 分;细胞核的多形性:1)核规则、相当于乳腺上皮为 1 分;2)核明显不规则,明显多形和异型为 3 分;3)1 分与 3 分之间为 2 分;核分裂数($\times 400$):1)1/10 HPF 为 1 分;2)2/10 HPF 为 2 分;3)大于 2/10 HPF 为 3 分。3 项指标的分数相加,Ⅰ级为 3~5 分,Ⅱ级为 6~7 分,Ⅲ级为 8~9 分。

1.2 主要仪器和试剂

HM200 型切片机(MICROM 公司,德国)、显微镜 BX53(日本奥林巴斯)、一抗为兔多克隆抗体 PES1(1:200 Abcam 公司 ab72539)、单克隆兔抗人雌激素受体 ER(1:200 基因科技 GT205607)、单克隆兔抗人孕激素受体 PR(1:200 基因科技 GT205707)、单克隆兔抗人 C-erbB-2 癌蛋白(1:200 基因科技 GT210007)。

1.3 实验方法

应用 SP 免疫组织化学染色法:石蜡切片脱蜡、

水化,PBS 冲洗 3min $\times$ 3 次;非特异性染色剂阻断 10min,PBS 缓冲液冲洗 3min $\times$ 3 次;高温高压抗原修复;3% H₂O₂ 去除内源性酶,加入动物血清封闭,加第一抗体,4℃ 冰箱过夜;PBS 冲洗 3min $\times$ 3 次;加聚合物增强剂(试剂 A),室温下孵育 20min;PBS 冲洗 3min $\times$ 3 次;加新配制的 DAB 显色液,显微镜下观察 3~10min,阳性显色为黄色;自来水冲洗,苏木素复染,0.1% 盐酸分化,自来水冲洗,PBS 冲洗返蓝;梯度酒精脱水干燥,中性树脂封片。

1.4 结果判定

1) PES1 结果判定 随机选取十个高倍镜视野,计数阳性表达率,方法是计数阳性细胞的比率,取十个视野的平均数;评分标准:0 分为阴性;1 分为阳性表达率 $\leq 10\%$;2 分为 10%~50%;3 分为 50%~75%;4 分 $> 75\%$ 。根据染色强度评分:0 分无棕黄色产物,1 分为淡黄色,2 分为棕黄色,3 分棕褐色。最终评分为二者的乘积,以 > 3 分定为免疫反应阳性^[15]。

2) ER、PR、Ki67 结果判定 均采用细胞染色阳性的细胞数计算。ER、PR 结果参考 ASCO/CAP 激素受体免疫组化检测指南(2010 版),ER、PR $< 1\%$ 肿瘤细胞着色为阴性;ER、PR $\geq 1\%$ 肿瘤细胞着色为阳性。Ki67 的结果参考 St. Gallen 乳腺癌共识(2015)以 20% 为阳性截断值。HER-2 结果判定根据乳腺癌 HER-2 检测指南(2014 版)^[16]。0:无染色或 $\leq 10\%$ 的肿瘤细胞呈现不完整、微弱的细胞膜着色;1+: $> 10\%$ 的肿瘤细胞呈现不完整的、微弱的细胞膜着色;2+: $> 10\%$ 的肿瘤细胞呈现不完整和或弱至中等强度的细胞膜着色或 $\leq 10\%$ 的肿瘤细胞呈现强而完整的细胞膜着色;3+: $> 10\%$ 的肿瘤细胞呈现强而完整的细胞膜着色。分子亚型参考 St. Gallen 乳腺癌共识(2015)根据乳腺癌组织 ER、PR、HER-2 的表达分为:Luminal A 型(ER+,和/或 PR+,HER-2-);Luminal B 型(①ER+,和/或 PR+,HER-2+,Ki67 任何水平;②ER+,和/或 PR+,HER-2-,Ki67 $\geq 20\%$);HER-2 过表达型(ER-,PR-,HER-2+);三阴性(ER-,PR-,HER-2-)。

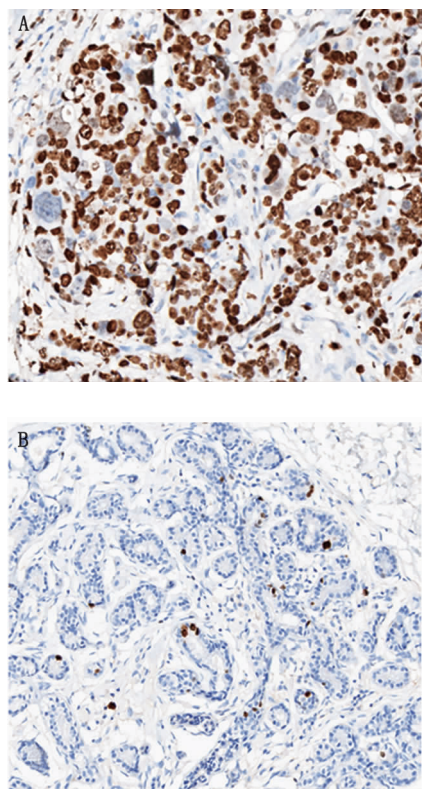
1.5 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行数据处理。

2 结果

2.1 PES1 在乳腺癌组织中表达情况

PES1 主要在乳腺癌组织的细胞核中表达,阳性表达时细胞核着色为棕黄色,可呈局部密集分布或弥散分布(图 1)。PES1 在乳腺癌组织中的表达显著高于癌旁组织,有统计学意义(表 1)。



注:A 为乳腺癌组织,B 为癌旁组织

图 1 免疫组化方法检测 PES1 在乳腺癌和癌旁组织中的表达($\times 200$)

表 1 PES1 在癌组织、癌旁组织中的表达比较(n/%)

组织	n	PES1 阳性 (n=80)	PES1 阴性 (n=40)	χ^2	P
癌组织	60	48/80.0	12/20.0	9.6	0.02
癌旁组织	60	32/53.3	28/46.7		

2.2 PES1 与乳腺癌临床病理特征的关系

本文结果表明 PES1 蛋白的表达与患者年龄,乳腺癌病理分型及组织学学分级均无相关性。见表 2。

2.3 PES1 与 ER、PR、HER-2 和 Ki67 的关系分析

ER 阳性组中, PES1 阳性表达率为 90.9% (40/44), ER 阴性组中, PES1 阳性表达率为 50.0% (8/16), PES1 的表达水平与 ER 具有关联性, PES1 的表达水平与乳腺癌孕激素受体、HER-2 和 Ki67 的表达无关。见表 3。

表 2 PES1 与临床病理特征之间的关系(n)

临床病理	PES1 阳性 (n=48)	PES1 阴性 (n=12)	χ^2	P
年龄				
≤40 岁	25	5	0.42	0.52
>40 岁	23	7		
病理类型				
浸润性癌,非特殊型	30	6	—	0.39
浸润性小叶癌	17	5		
特殊类型	1	1		
组织学分级				
1 级	12	3	—	0.68
2 级	20	5		
3 级	15	3		
其它	1	1		

表 3 PES1 与 ER、PR、HER-2 和 Ki67 的关系分析(n)

ER、PR、HER-2 和 Ki67	PES1 阳性 (n=48)	PES1 阴性 (n=12)	χ^2	P
ER				
阳性	40	4	5.46	0.02
阴性	8	8		
PR				
阳性	28	4	—	0.22
阴性	20	8		
HER-2				
阳性	30	5	1.71	0.19
阴性	18	7		
Ki67				
≥20%	25	3	2.83	0.09
<20%	23	9		

2.4 PES1 与乳腺癌分子亚型的关系

本文结果显示 PES1 蛋白表达与乳腺癌分子亚型无关。见表 4。

表 4 PES1 与乳腺癌分子亚型的关系分析(n)

分子亚型	PES1 阳性 (n=48)	PES1 阴性 (n=12)	P
Luminal A 型	10	2	0.54
Luminal B 型	14	4	
HER-2 过表达型	19	3	
三阴性	5	3	

3 讨论

乳腺癌是一种发生在乳腺腺上皮细胞的常见恶性肿瘤,近年来发病率迅速上升,严重威胁着女性的健康,乳腺癌具有发病率高和死亡率高的特点,所以乳腺癌的预防和治疗是国内外均急需解决的迫切问题。乳腺癌的发生发展是多基因、多因素和多阶段参与的过程,肿瘤细胞的生物学行为及发生发展过程受诸多因素影响。目前虽然已知乳腺

癌发病机制与 ER、PR、HER-2 等信号通路密切相关,但其具体分子生物学机制尚未明确,对乳腺癌发病机制的深入探讨不仅可以帮助我们理解肿瘤的发生发展特点,还可以通过发现新的生物学靶点为靶向药物的研制提供方向。

PES1 蛋白是一种新近发现的重要的核仁蛋白。研究发现其参与多种肿瘤的发生发展过程,PES1 基因如突变或缺陷,可导致细胞周期阻滞^[17]。近年来,人们越来越多的关注到 PES1 在诸多肿瘤发生发展过程中发挥的作用^[18-19],并发现 PES1 在乳腺癌中有表达。April H 用雌激素(E2)刺激人乳腺癌细胞的实验方法进行的基因筛查,发现表达显著变化的基因中存在 PES1 并且证明 PES1 在乳腺癌中表达可能受到雌激素水平的影响,进一步说明 PES1 与乳腺癌的发生有着密切关系。研究表明^[20],ER α 阳性的乳腺癌细胞中,PES1 的转录活性与 ER α 的蛋白表达呈正相关而与 ER β 的蛋白表达呈负相关,有可能 PES1 通过 ER 调节参与 E2 信号通路的调控。本文我们对于 PES1 的表达水平和 ER 有关联性,并且 PES1 的表达明显高于癌旁组织,PES1 蛋白可能通过参与 ER 激素受体通路促进肿瘤的发生发展及增殖。

本文结果表明,乳腺癌组织 PES1 阳性表达 48 例(80.0%),癌旁组织 PES1 阳性表达 32 例(53.3%),PES1 癌组织表达显著高于癌旁组织($P=0.02$)。本文结果与 2007 年 Zhang 等^[13]通过 Western blot 检测发现乳腺癌组织中 PES1 的表达明显高于癌旁的结果相符合。我们分析了 PES1 蛋白表达与临床病理参数间的关系,结果表明 PES1 蛋白的表达水平与患者年龄、病理分型及组织学分级均无关。同时本文结果还表明,PES1 蛋白的表达水平与乳腺癌分子亚型无关。而在研究 PES1 蛋白与激素受体关系时结果显示,ER 阳性组中,PES1 阳性表达率为 90.9%,ER 阴性组中,PES1 阳性表达率为 50.0%,PES1 的表达水平与 ER 具有关联性,PES1 的表达水平与乳腺癌 PR、HER-2 和 Ki67 的表达无关。我们的研究结果不仅进一步证实了 PES1 蛋白在乳腺癌组织中的高表达,而且在肿瘤组织中证实了 PES1 蛋白与 ER 受体表达有关联性,结果表明 PES1 蛋白可能通过参与 ER 通路在乳腺癌组织的发病机制中起到重要作用。

总之,本文通过免疫组化方法检测乳腺癌组织中 PES1 蛋白的表达及与临床病理特征、激素受体之间的关系进一步明确了 PES1 蛋白促进肿瘤细

胞增殖的重要作用,同时通过 PES1 蛋白与 ER 受体的正相关性我们推测 PES1 蛋白可能通过参与 ER 相关通路参与乳腺癌的发生和发展,也为靶向药物的研发提供新的思路。

参考文献:

- [1] McCarthy AM, Yang J, Armstrong K. Increasing disparities in breast cancer mortality from 1979 to 2010 for US black women aged 20 to 49 years [J]. Am J Public Health, 2015, 105 Suppl 3: S446-S448. DOI: 10.2105/AJPH.2014.302297.
- [2] Roth JA, Etzioni R, Waters TM, et al. Economic return from the Women's Health Initiative estrogen plus progestin clinical trial: a modeling study [J]. Ann Intern Med, 2014, 160(9): 594-602. DOI: 10.7326/M13-2348.
- [3] Lamb J, Ladha M H, McMahon C, et al. Regulation of the functional interaction between Cyclin D1 and the estrogen receptor [J]. Molecular and Cellular Biology, 2000, 20(23): 8667-8675. DOI: 10.1128/mcb.20.23.8667-8675.2000.
- [4] Toyama T, Iwase H. p33ING1b and estrogen receptor (ER) α [J]. Breast Cancer, 2004, 11(1): 33-37. DOI: 10.1007/bf02967999.
- [5] Gayther SA, Warren W, Mazoyer S, et al. Germline mutations of the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer families provide evidence for a genotype-phenotype correlation [J]. Nat Genet, 1995, 11(4): 428-433. DOI: 10.1038/ng1295-428.
- [6] Tilli MT, Reiter R, Oh AS, et al. Overexpression of an N-terminally truncated isoform of the nuclear receptor coactivator amplified in breast cancer 1 leads to altered proliferation of mammary epithelial cells in transgenic mice [J]. Mol Endocrinol, 2005, 19(3): 644-656. DOI: 10.1210/me.2004-0106.
- [7] Dobrzycka KM, Townson SM, Jiang S, et al. Estrogen receptor corepressors--a role in human breast cancer [J]. Endocr Relat Cancer, 2003, 10(4): 517-536. DOI: 10.1677/erc.0.0100517.
- [8] Shang Y, Brown M. Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs [J]. Science, 2002, 295(5564): 2465-2468. DOI: 10.1126/science.1068537.
- [9] Kawai H, Li H, Chun P, et al. Direct interaction between BRCA1 and the estrogen receptor regulates vascular endothelial growth factor (VEGF) transcription and secretion in breast cancer cells [J]. Oncogene, 2002, 21(50): 7730-7739. DOI: 10.1038/sj.onc.1205971.
- [10] Dunham I, Shimizu N, Roe BA, et al. The DNA sequence of human chromosome 22 [J]. Nature, 1999, 402

- (6761):489-495. DOI:10.1038/990031.
- [11] Kinoshita Y, Jarell AD, Flaman JM, et al. Pescadillo, a novel cell cycle regulatory protein abnormally expressed in malignant cells [J]. J Biol Chem, 2001, 276 (9): 6656-6665. DOI:10.1074/jbc.M008536200.
- [12] Li J, Yu L, Zhang H, et al. Down-regulation of pescadillo inhibits proliferation and tumorigenicity of breast cancer cells [J]. Cancer Sci, 2009, 100 (12): 2255-2260. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01325.x.
- [13] Zhang H, Li J, Wang X, et al. The antibody preparation and expression of human Pescadillo [J]. Sci China C Life Sci, 2007, 50 (3): 298-304. DOI:10.1007/s11427-007-0045-x.
- [14] Zhang R, Chen HJ, Wei B, et al. Reproducibility of the Nottingham modification of the Scarff-Bloom-Richardson histological grading system and the complementary value of Ki-67 to this system [J]. Chin Med J (Engl), 2010, 123 (15): 1976-1982.
- [15] 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准 [J]. 中国癌症杂志, 1996 (04): 229-231.
- [16] 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. DOI:10.1200/JCO.2013.50.9984.
- [17] Zhang Y, Opresko L, Shankaran H, et al. HER/ErbB receptor interactions and signaling patterns in human mammary epithelial cells [J]. BMC Cell Biol, 2009, 10: 78. DOI:10.1186/1471-2121-10-78.
- [18] Maiorana A, Tu X, Cheng G, et al. Role of pescadillo in the transformation and immortalization of mammalian cells [J]. Oncogene, 2004, 23 (42): 7116-7124. DOI: 10.1038/sj.onc.1207916.
- [19] Killian A, Le MN, Sesboté R, et al. Inactivation of the RRB1-Pescadillo pathway involved in ribosome biogenesis induces chromosomal instability [J]. Oncogene, 2004, 23 (53): 8597-8602. DOI: 10.1038/sj.onc.1207845.
- [20] 李杰萍. PES1 与雌激素受体的相互作用及其在乳腺癌中的意义 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2008.
- (收稿日期 2018-01-06)
(本文编辑:甘慧敏)

.....

(上接第 179 页)

- [7] Gu L, Xie J, Long J, et al. Epidemiology of major depressive disorder in mainland china: a systematic review [J]. PLoS ONE, 2013, 8 (6): e65356. DOI: 10.1371/journal.pone.0065356.
- [8] Jaracz J, Gattner K, Jaracz K, et al. Unexplained Painful Physical Symptoms in Patients with Major Depressive Disorder: Prevalence, Pathophysiology and Management [J]. CNS Drugs, 2016, 30 (4): 293-304. DOI:10.1007/s40263-016-0328-5.
- [9] Husain MM, Rush AJ, Trivedi MH, et al. Pain in depression: STAR * D study findings [J]. J Psychosom Res, 2007, 63 (2): 113-122. DOI: 10.1016/j.jpsychores.2007.02.009.
- [10] Brundin L, Bjrkqvist M, Petersén A, et al. Reduced orexin levels in the cerebrospinal fluid of suicidal patients with major depressive disorder [J]. Eur Neuropsychopharmacol, 2007, 17 (9): 573-579. DOI:10.1016/j.euroneuro.2007.01.005.
- [11] Brundin L, Petersén A, Bjrkqvist M, et al. Orexin and psychiatric symptoms in suicide attempters [J]. J Affect Disord, 2007, 100 (1-3): 259-263. DOI:10.1016/j.jad.2006.10.019.
- [12] Marcus JN, Aschkenasi CJ, Lee CE, et al. Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain [J]. J Comp Neurol, 2001, 435 (1): 6-25. DOI: 10.1002/cne.1190.
- [13] Abbas MG, Shoji H, Soya S, et al. Comprehensive Behavioral Analysis of Male Ox1r (-/-) Mice Showed Implication of Orexin Receptor-1 in Mood, Anxiety, and Social Behavior [J]. Front Behav Neurosci, 2015, 9: 324. DOI: 10.3389/fnbeh.2015.00324.
- [14] Scott MM, Marcus JN, Pettersen A, et al. Hertr1 and 2 signaling differentially regulates depression-like behaviors [J]. Behav Brain Res, 2011, 222 (2): 289-294. DOI:10.1016/j.bbr.2011.02.044.
- [15] Bingham S, Davey PT, Babbs AJ, et al. Orexin-A, an hypothalamic peptide with analgesic properties [J]. Pain, 2001, 92 (1-2): 81-90. DOI:10.1016/s0304-3959(00)00470-x.
- [16] Yamamoto T, Saito O, Shono K, et al. Activation of spinal orexin-1 receptor produces anti-allodynic effect in the rat carrageenan test [J]. Eur J Pharmacol, 2003, 481 (2-3): 175-180. DOI:10.1016/j.ejphar.2003.09.022.
- (收稿日期 2017-11-09)
(本文编辑:石俊强)