

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.26.007
文章编号: 1005-8982 (2018) 26-0045-06

临床研究·论著

HIF-2 α 和 Twist2 在乳腺癌中的表达及其与预后的关系

刘琼雯, 李秋雨, 孙松, 李惠翔

(郑州大学第一附属医院 病理科, 河南 郑州 450052)

摘要: 目的 探讨缺氧诱导因子-2 α (HIF-2 α) 和 Twist2 在乳腺癌中的表达及其与预后的关系。
方法 采用免疫组织化学 SP 法分别检测乳腺癌、纤维腺瘤及癌旁正常组织中 HIF-2 α 、Twist2 的表达, 并对 92 例乳腺癌患者的生存结局进行随访。**结果** 乳腺癌组 HIF-2 α 、Twist2 的表达高于癌旁正常组织组及纤维腺瘤组 ($P < 0.05$)。不同肿瘤大小、有无淋巴结转移乳腺癌患者的 HIF-2 α 阳性率比较有差异 ($P < 0.05$)。不同组织学分级、有无淋巴结转移及雌激素受体乳腺癌患者的 Twist2 阳性率比较有差异 ($P < 0.05$)。乳腺癌中 HIF-2 α 与 Twist2 的表达呈正相关 ($P < 0.05$)。HIF-2 α 和 Twist2 阳性乳腺癌患者术后 5 年生存率均低于阴性患者 ($P < 0.05$)。**结论** HIF-2 α 和 Twist2 在乳腺癌中高表达, 两者共同促进肿瘤的浸润、转移, HIF-2 α 高表达提示患者预后不良, 可作为预测乳腺癌患者预后的影响因素之一。

关键词: 乳腺癌; HIF-2 α ; Twist2; 转移; 预后

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

Expressions of HIF-2 α and Twist2 in breast carcinoma and their relationships with clinical prognosis

Qiong-wen Liu, Qiu-yu Li, Song Sun, Hui-xiang Li

(1. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China)

Abstract: Objective To investigate the expressions of HIF-2 α and Twist2 in breast carcinoma and their relationships with tumor metastasis and prognosis. **Methods** The expressions of HIF-2 α and Twist2 proteins in breast carcinoma, adjacent tissues and fibroadenoma were detected by immunohistochemical SP method. Survival outcomes of 92 breast cancer patients were followed up. **Results** The positive rates of HIF-2 α and Twist2 proteins in the breast carcinoma were higher than those in the fibroadenoma and the adjacent normal tissues ($P < 0.05$). The high expression of HIF-2 α in the breast carcinoma was correlated with tumor size and lymph node metastasis ($P < 0.05$). The high expression of Twist2 in the breast carcinoma was correlated with tumor grade, lymph node metastasis and ER level ($P < 0.05$). HIF-2 α expression was positively correlated with Twist2 expression in the breast carcinoma ($P < 0.05$). The 5-year overall survival rates of the patients with HIF-2 α -positive and Twist2-positive breast carcinoma were lower than those of the HIF-2 α -negative and Twist2-negative patients ($P < 0.05$). **Conclusions** HIF-2 α and Twist2 are highly expressed in breast carcinoma, both may play promoting roles in tumor invasion and metastasis and affect prognosis. HIF-2 α over-expression means poor prognosis, this may be one of the independent factors for predicting the prognosis of the patients with breast cancer.

Keywords: breast carcinoma; HIF-2 α ; Twist2; metastasis; prognosis

收稿日期: 2018-02-08

[通信作者] 李惠翔, E-mail: lihuixiang19@126.com

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤。缺氧微环境是恶性肿瘤浸润和转移的始动因素,缺氧诱导因子-2 α (hypoxia-inducible factors, HIF-2 α) 是为适应缺氧而衍生出的一种碱性-螺旋-环-螺旋 (basic-helix-loop-helix, bHLH)-PAS 蛋白家族转录因子,对促进血管生成、调节增殖凋亡及诱导侵袭转移至关重要^[1-2]。Twist2 也称为 Dermo1,参与肿瘤细胞上皮-间质转化,是癌细胞获得迁徙、侵袭及转移能力的主要因子之一。有研究表明, Twist2 是 HIF-2 α 的特异靶基因之一^[3]。本实验将进一步探讨两者在乳腺癌中的表达及与预后的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2011 年 8 月-2012 年 1 月郑州大学第一附属医院病理科存档的乳腺组织石蜡标本 143 例。其中,乳腺非特殊浸润性癌 92 例作为乳腺癌组,癌旁正常组织 30 例作为癌旁正常组织组,纤维腺瘤 21 例作为纤维腺瘤组。92 例乳腺癌组织来源于女性,年龄 27~83 岁,中位年龄 47.50 岁,平均年龄 49.51 岁;组织学分级 I 级 11 例, II 级 62 例, III 级 19 例; TNM 分期 I 期 6 例, II 期 7 例, III 期 78 例, IV 期 1 例;伴有腋窝或锁骨下淋巴结转移者 51 例,未见转移者 41 例。患者术前均未行放化疗及内分泌治疗,手术切除标本经甲醛固定、石蜡包埋及切片染色,并由 2 位病理医生进行阅片及分类。

1.2 试剂

鼠抗人 HIF-2 α 单克隆抗体 (ab8365) 及鼠抗人 Twist2 单克隆抗体 (ab57997) 购于美国 Abcam 公司,免疫组织化学检测试剂盒 (SP-9000) 及浓缩型二氨基联苯胺 (Diaminobenzidine, DAB) 试剂盒购于北京中杉金桥有限公司。

1.3 免疫组织化学染色

免疫组织化学染色运用过氧化物酶标记的链霉卵白素 SP 三步法,具体步骤如下:石蜡切片脱蜡、梯度酒精水化,抗原高压热修复、阻断及封闭,滴加一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜 (HIF-2 α 单克隆抗体 1:2 000、Twist2 单克隆抗体 1:200),滴加生物素标记的通用二抗及链霉卵白素-过氧化物酶, DAB 染色、苏木精复染,梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树胶封片。本实验以 PBS 替代一抗作阴性对照,已知阳性的乳腺癌切片作为阳性对照。

1.4 判定标准

在光镜下呈现棕黄色细颗粒状物质即为显色, HIF-2 α 蛋白阳性染色主要定位于胞核,部分胞浆中也可见, Twist2 蛋白阳性染色主要定位于胞浆。在高倍镜 (10 \times 40) 下对每张切片随机选择 8~10 个视野进行计数,染色强度从无色到浅黄、棕黄及棕褐色分别计 0~3 分;阳性细胞数从 0%、>0%~10%、>10%~25%、>25%~50%、>50% 分别计 0~4 分;将染色强度和阳性百分比相乘,所得数值 >3 即为阳性表达^[4]。

1.5 随访

患者的生存结局经查阅病历、电话等形式获得,从术后第 1 天开始计算到患者死亡或末次随访止为总生存时间,随访日期截止到 2016 年 12 月 31 日,最长随访时间 59 个月,平均随访时间为 44.78 个月,中位随访时间为 47.00 个月。

1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计学软件,计数资料以率 (%) 表示,比较用 χ^2 或 Fisher 检验, Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,比较用 Log-rank χ^2 检验,相关性分析用 Pearson 法,影响因素的分析用 Cox 比例风险回归模型, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组的 HIF-2 α 、Twist2 蛋白表达

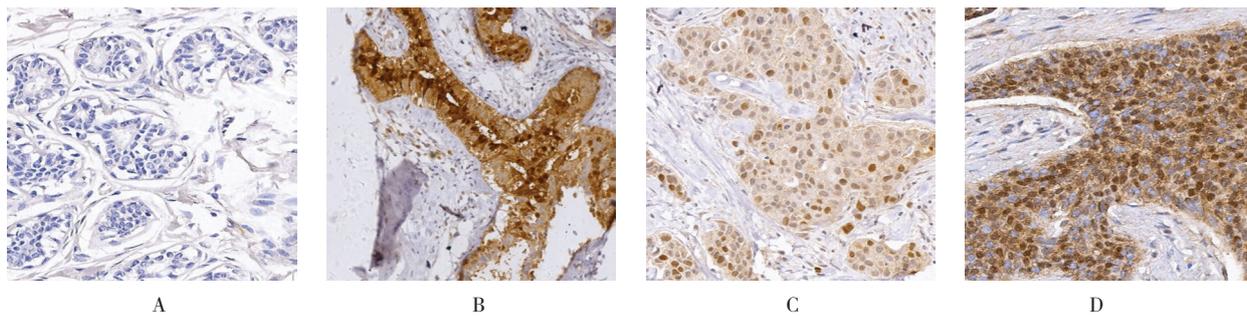
乳腺癌组、癌旁正常组织组及纤维腺瘤组 HIF-2 α 蛋白阳性率分别为 71.73%、36.66% 和 42.85%,其中 92 例乳腺癌中, HIF-2 α 阴性(-) 26 例 (28.26%), 弱阳性 (+、++) 49 例 (53.26%), 强阳性 (+++) 17 例 (18.47%)。3 组 HIF-2 α 表达阳性率比较,经 χ^2 检验,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),乳腺癌组高于纤维腺瘤组和癌旁正常组织组。3 组 Twist2 蛋白阳性率比较,经 χ^2 检验,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),乳腺癌组高于纤维腺瘤组和癌旁正常组织组。见表 1 和图 1、2。

2.2 各临床病理特征乳腺癌患者的 HIF-2 α 、Twist2 阳性率比较

不同肿瘤大小、有无淋巴结转移乳腺癌患者的 HIF-2 α 阳性率比较,经 χ^2 检验,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。不同组织学分级、有无淋巴转移及雌激素受体乳腺癌患者的 Twist2 阳性率比较,经 χ^2 检验,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

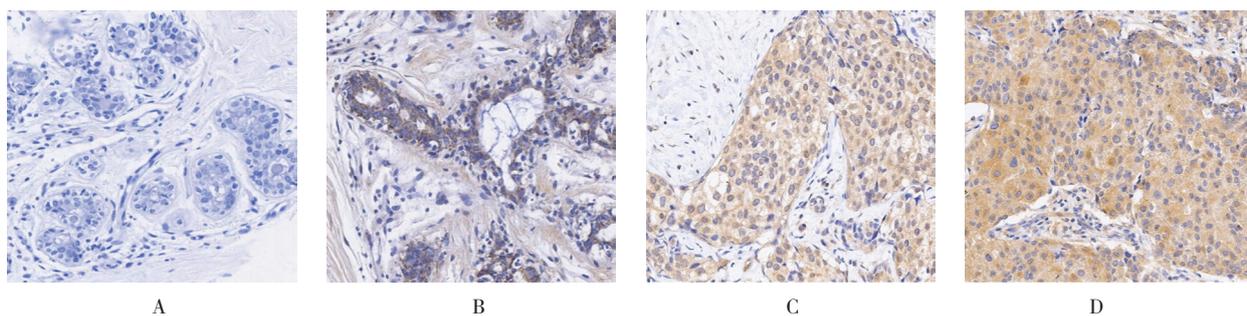
表 1 各组 HIF-2 α 、Twist2 蛋白的比较

组别	HIF-2 α 表达 / 例			阳性率 / %	χ^2 值	P 值	Twist2 表达 / 例			阳性率 / %	χ^2 值	P 值
	阴性	弱阳性	强阳性				阴性	弱阳性	强阳性			
乳腺癌组 (n=92)	26	49	17	71.73			39	44	9	57.60		
纤维腺瘤组 (n=21)	12	6	3	42.85	14.676	0.001	17	3	1	19.04	21.364	0.001
癌旁正常组织组 (n=30)	19	9	2	36.66			25	5	0	16.66		



A: 癌旁正常组阴性表达; B: 纤维腺瘤组阳性表达; C: 乳腺癌组低表达; D: 乳腺癌组高表达

图 1 各组 HIF-2 α 蛋白的表达 (SP \times 200)



A: 癌旁正常组阴性表达; B: 纤维腺瘤组阳性表达; C: 乳腺癌组低表达; D: 乳腺癌组高表达

图 2 各组 Twist2 蛋白的表达 (SP \times 200)

表 2 各临床病理特征乳腺癌患者的 HIF-2 α 、Twist2 阳性率比较

因素	例数	HIF-2 α 阳性例 (%)	χ^2 值	P 值	Twist2 阳性例 (%)	χ^2 值	P 值
年龄							
≤ 45 岁	36	21 (58.33)			17 (47.22)		
46 ~ 55 岁	35	22 (62.86)	0.165	0.921	15 (42.86)	0.179	0.915
>55 岁	21	13 (61.90)			10 (47.62)		
肿瘤大小							
≤ 2 cm	37	26 (70.27)			30 (81.08)		
>2 cm	55	49 (89.09)	5.210	0.023	43 (78.18)	0.113	0.736
组织学分级							
I 级	11	7 (63.64)			5 (45.45)		
II 级	62	41 (66.13)	1.139	0.566	49 (79.03)	-	0.048
III 级	19	10 (52.63)			12 (63.16)		

续表 2

因素	例数	HIF-2 α 阳性例 (%)	χ^2 值	P 值	Twist2 阳性例 (%)	χ^2 值	P 值
TNM 分期							
I、II 级	13	11 (84.62)	-	0.209	8 (61.54)	0.096	0.757
III、IV 级	79	51 (64.56)			45 (56.96)		
淋巴结转移							
-	41	20 (48.78)	6.458	0.011	24 (58.54)	6.359	0.012
+	51	38 (74.51)			42 (82.35)		
雌激素受体							
-	50	29 (58.00)	0.727	0.394	36 (72.00)	6.592	0.010
+	42	28 (66.67)			39 (92.86)		
孕激素受体							
-	53	34 (64.15)	2.961	0.085	32 (60.38)	0.146	0.703
+	39	18 (46.15)			22 (56.41)		
HER-2							
0 ~ 1+	40	27 (67.50)	1.509	0.219	21 (52.50)	1.561	0.212
2+ ~ 3+	52	41 (78.85)			34 (65.38)		
Ki-67							
<14%	15	15 (100.00)	-	0.085	7 (46.67)	1.282	0.257
$\geq 14\%$	77	63 (81.82)			48 (62.34)		

2.3 乳腺癌组中 HIF-2 α 、Twist2 蛋白表达的相关性

乳腺癌组中 HIF-2 α 、Twist2 蛋白均阳性表达 35 例 (38.04%)，均阴性表达 14 例 (15.22%)，HIF-2 α 蛋白阳性而 Twist2 蛋白阴性患者 5 例 (5.43%)，HIF-2 α 蛋白阴性而 Twist2 蛋白阳性患者 9 例 (9.78%)，乳腺癌中 HIF-2 α 与 Twist2 的表达呈正相关 ($r=0.452, P=0.000$)。

2.4 HIF-2 α 、Twist2 蛋白表达与乳腺癌患者预后的关系

乳腺癌 HIF-2 α 、Twist2 蛋白阴性患者 5 年生存率分别为 96.1% 和 89.2%，乳腺癌 HIF-2 α 、Twist2 蛋白阳性患者 5 年生存率分别为 80.3% 和 78.6%，HIF-2 α 、Twist2 蛋白阴性与阳性患者 5 年生存率比较，差异有统计学意义 ($\chi^2=5.599$ 和 5.515, $P=0.018$ 和 0.023)，两者均为影响乳腺癌预后的因素。无论 HIF-2 α 还是 Twist2 蛋白，其阴性患者生存曲线均较平缓，相对于阳性患者拥有更高的 5 年生存率及更长的生存期。见图 3、4。

将年龄、肿瘤大小、分级、分期等因素纳入 Cox 比例风险回归模型中，多因素生存分析显示，淋巴结转移、HIF-2 α 阳性和肿瘤直径 >2 cm 可作为乳腺癌患者预后的影响因素 ($P<0.05$)。见表 3。

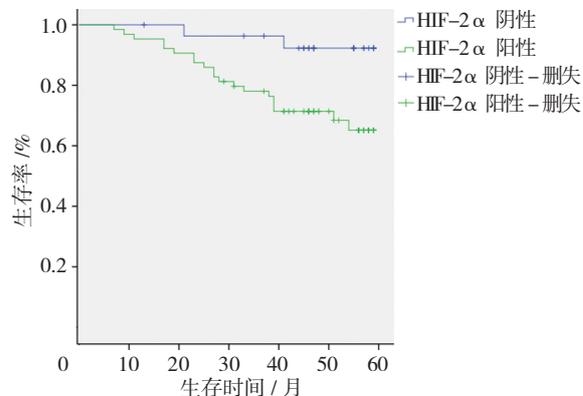


图 3 乳腺癌 HIF-2 α 阳性与阴性患者的生存曲线

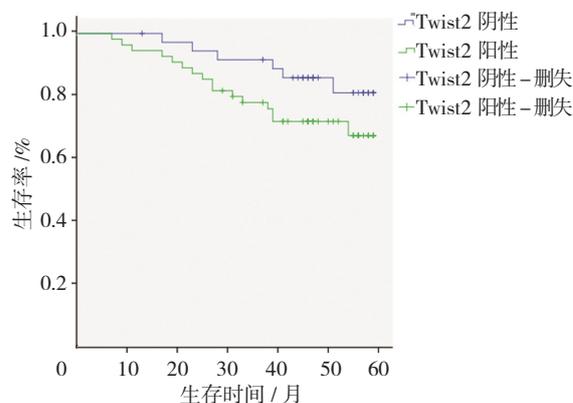


图 4 乳腺癌 Twist2 阳性与阴性患者的生存曲线

表 3 乳腺癌患者预后影响因素的 Cox 多因素分析

因素	b	S _b	Wald χ^2	P 值	\hat{RR}	95%CI	
						下限	上限
淋巴结转移	1.795	0.381	22.162	0.000	6.022	2.852	12.717
HIF-2 α 阳性	1.341	0.639	4.399	0.036	3.821	1.092	13.372
肿瘤直径 >2 cm	0.964	0.432	4.966	0.026	2.621	1.123	6.117

3 讨论

HIF-2 α 是 20 世纪 90 年代末提取出来的细胞因子, 包涵 bHLH-PAS 结构域成分^[5]。HIF-2 α 和最先在人类基因组中发现且研究较为普遍的缺氧诱导因子-1 α 在结构上有 48% 的氨基酸序列同源性。可被缺氧环境诱导表达, 在肾透明细胞癌、胰腺癌及肝癌等众多肿瘤中异常表达, 且与肿瘤的发生发展、侵袭转移及生存预后均存在关联^[6-9]。Twist2 也称为 Dermo1, 该细胞因子的主要作用之一是与真皮发育相关, 在进化过程中高度保守, Twist 蛋白家族是一种含有 bHLH 结构的转录因子, Twist2 和 Twist1 相比, 其结构相似性高达 66%, 但是两者的功能尚不一致^[10]。Twist2 在多数非癌组织中呈低表达或不表达, 而在众多实体瘤中呈高表达, 并参与细胞上皮间质转化过程, 是癌细胞发生浸润转移的主要影响因素之一^[11]。HIF-2 α 和 Twist2 均归属于 bHLH-PAS 家族成员, Twist 家族是 HIF-2 α 的特异靶基因, 两者参与调控细胞增殖分化、新生血管形成、肿瘤增殖和转移等过程^[12]。研究显示, 缺氧微环境及 HIFs 介导的众多低氧信号通路在诱发上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 过程中起到了关键作用^[13]。YANG 等^[14]研究发现, HIF-2 α 在胰腺癌 EMT 中起关键作用, 通过介导 Twist2 对 E-cadherin 进行下调而引发 EMT, 从而引起肿瘤侵袭转移。HIF-2 α 可以促进体外癌细胞迁移侵袭, 并调节 E-cadherin 和基质金属蛋白酶的表达, 对 EMT 的发生和进行至关重要。ZHOU 等^[15]发现高转移性胰腺癌细胞 HIF-2a 和 Twist2 的表达均高于低转移性胰腺癌细胞, 唾液腺胰腺癌 HIF-2a 和 Twist2 阳性表达与肿瘤周围神经侵犯、局部复发和远处转移均密切相关, 并推测缺氧环境与 EMT 之间存在相关性。

淋巴结转移是明确的判断乳腺癌预后指标之一,

乳腺癌中 HIF-2 α 和 Twist2 蛋白的阳性表达提示患者预后不良。HIF-2 α 可能通过 Twist2 介导乳腺癌细胞的上皮间质转化, 促进肿瘤转移, 缩短生存期。HIF-2 α 和 Twist2 有可能作为乳腺癌预后判断和靶向治疗的生物学标志物。

参 考 文 献:

- [1] JI R C. Hypoxia and lymphangiogenesis in tumor microenvironment and metastasis[J]. *Cancer Lett*, 2014, 346(1): 6-16.
- [2] GARVALOV B K, ACKER T. Implications of oxygen homeostasis for tumor biology and treatment[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2016, 903: 169-185.
- [3] CX Z, ZE Y. Biological function and molecular mechanism of Twist2[J]. *Yi Chuan*, 2015, 37(1): 17-24.
- [4] 张玲玲, 张亚男, 耿翠芝, 等. Caspase-3、DIAPH-3 蛋白在浸润性乳腺癌中的作用研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2016, 05: 36-41.
- [5] TIAN H, MC KNIGHT S L, RUSSELL D W. Endothelial PAS domain protein1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells[J]. *Genes & Development*, 1997, 11(1): 72-82.
- [6] CHEN W, HILL H, CHRISTIE A, et al. Targeting renal cell carcinoma with a HIF-2 antagonist[J]. *Nature*, 2016, 539(7627): 112-117.
- [7] WANG M, CHEN M Y, GUO X J, et al. Expression and significance of HIF-1 α and HIF-2 α in pancreatic cancer[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2015, 35(6): 874-879.
- [8] YANG S L, LIU L P, NIU L, et al. Downregulation and pro-apoptotic effect of hypoxia-inducible factor 2 alpha in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(23): 34571-34581.
- [9] RANKIN E B, GIACCIA A J. Hypoxic control of metastasis[J]. *Science*, 2016, 352(6282): 175-180.
- [10] LI L, CSERJESI P, OLSON E N. Dermo-1: a novel twist-related bHLH protein expressed in the developing dermis[J]. *Dev Biol*, 1995, 172(1): 280-292.
- [11] FANG X, CAI Y, LIU J, et al. Twist2 contributes to breast

- cancer progression by promoting an epithelial-mesenchymal transition and cancer stem-like cell self-renewal[J]. *Oncogene*, 2011, 30(47): 4707-4720.
- [12] GORT E H, VAN-HAAFTEN G, VERLAAN I, et al. The TWIST1 oncogene is a direct target of hypoxia-inducible factor-2alpha[J]. *Oncogene*, 2008, 27(11): 1501-1510.
- [13] AZAB A K, HU J, QUANG P, et al. Hypoxia promotes dissemination of multiple myeloma through acquisition of epithelial to mesenchymal transition-like features[J]. *Blood*, 2012, 119(24): 5782-5794.
- [14] YANG J, ZHANG X, ZHANG Y, et al. HIF-2 α promotes epithelial-mesenchymal transition through regulating Twist2 binding to the promoter of E-cadherin in pancreatic cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 3: 26-35.
- [15] ZHOU C, LIU J, TANG Y, et al. Coexpression of hypoxia-inducible factor-2alpha, TWIST2, and SIP1 may correlate with invasion and metastasis of salivary adenoid cystic carcinoma[J]. *J Oral Pathol Med*, 2012, 41(5): 424-431.

(李科 编辑)