

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.06.010

文章编号: 1005-8982(2017)06-0050-04

## 果蝇 EZH2 与乳腺癌分子分型及 临床病理特征的关系\*

李杰宝, 喻晓程, 田野

(湖北省武汉市第一医院, 湖北 武汉 430000)

**摘要:目的** 探讨果蝇 *Zeste* 基因增强子人类同源物 2 (EZH2) 与乳腺癌分子分型及临床病理参数的关系。**方法** 根据新型乳腺癌分子分型标准, 将乳腺癌进行分子分型; 免疫组织化学方法检测乳腺癌组织石蜡切片中 EZH2 的表达; 采用  $\chi^2$  检验分析 EZH2 表达与乳腺癌新型分子分型, 以及临床病理参数之间的关系; 采用 Kaplan-Meier 法分析 EZH2 表达与乳腺癌患者无病生存率 (DFS) 的关系。**结果** 13 例管腔上皮 A 型乳腺癌患者中, 3 例为 EZH2 高表达 (23.08%); 10 例管腔上皮 B 型乳腺癌患者中, 5 例为 EZH2 高表达 (50.00%); 7 例人表皮生长因子受体 2 过表达型乳腺癌患者中, 3 例为 EZH2 高表达 (42.86%); 12 例三阴性型乳腺癌患者中, 10 例为 EZH2 高表达 (83.33%)。乳腺癌各分子亚型间 EZH2 表达的比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。EZH2 高表达与 EZH2 低表达患者 DFS 比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论** EZH2 可能是预测乳腺癌预后的指标之一。

**关键词:** 果蝇 *Zeste* 基因增强子人类同源物 2; 乳腺癌; 分子分型; 免疫组织化学

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

## Correlations of enhancer of *Drosophila zeste* homolog 2 with molecular subtypes and clinicopathological parameters of breast cancer\*

Jie-bao Li, Xiao-cheng Yu, Ye Tian

(The First Hospital of Wuhan, Wuhan, Hubei 430000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the correlations of enhancer of *Drosophila zeste* homolog 2 (EZH2) with molecular subtypes and clinicopathological parameters of breast cancer. **Methods** The breast cancers were classified into several molecular subtypes, according to the new standard of molecular classification of breast cancer. The expression of EZH2 in paraffin sections of breast cancer tissues was tested through immunohistochemistry method. The correlations of EZH2 with clinicopathological parameters and new molecular subtypes of breast cancers were analyzed and compared through Chi-square test. The correlation between EZH2 and disease-free survival of the breast cancer patients was analyzed through Kaplan-Meier method. **Results** In the 13 cases of Luminal A subtype, 3 cases had high EZH2 expression (23.08%). In the 10 cases of Luminal B subtype, 5 cases had high EZH2 expression (50.00%). In the 7 cases of Her-2 over-expression subtype, there were 3 cases of high EZH2 expression (42.86%). In the 12 cases of triple-negative breast cancer subtype, there were 10 cases of high EZH2 expression (83.33%). Significant differences existed in the expression of EZH2 among the four groups of molecular subtypes of breast cancer ( $P < 0.05$ ). There was significant difference in the disease-free survival between the breast cancer patients with high EZH2 expression and those with low EZH2 expression ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** EZH2 might be one of the indexes to predict the prognosis of breast cancer.

**Keywords:** enhancer of *Drosophila zeste* homolog 2; breast cancer; molecular subtype; immunohistochemistry

收稿日期: 2016-08-09

\* 基金项目: 湖北省 2015 年武汉市卫计委临床医学课题 No: WX15B17)

乳腺癌是女性高发的恶性肿瘤之一,其具有高度异质性且近年来的发病率呈现逐年递增的趋势,但其发病机制尚未完全阐明<sup>[1]</sup>。新型乳腺癌分子分型根据乳腺癌患者肿瘤组织中的雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素受体 (progesterone receptor, PR)、人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor-2, HER-2) 和 Ki67 的表达差异,将乳腺癌分为管腔上皮 A 型、管腔上皮 B 型、Her-2 过表达型和三阴性型<sup>[2-3]</sup>。果蝇 Zeste 基因增强子人类同源物 2 (enhancer of zeste homolog 2, EZH2) 是果蝇 Enhancer of zeste 基因的人类同源基因,作为多梳基因 (polycomb group genes, PcG) 家族的重要成员之一,其参与细胞分化,并与多种肿瘤的发生、发展密切相关<sup>[4-5]</sup>。本研究根据新型乳腺癌分子分型将 42 例患者分为管腔上皮 A 型、管腔上皮 B 型、Her-2 过表达型和三阴性型,采用免疫组织化学方法检测各分型乳腺癌组织石蜡切片中 EZH2 的表达,以探讨 EZH2 与乳腺癌分子分型及临床病理参数的关系。

## 1 资料与方法

### 1.1 乳腺癌石蜡标本收集

选取 2004 年 5 月 - 2008 年 10 月在华中科技大学附属医院确诊为乳腺癌并行手术治疗的女性乳腺癌患者 42 例,其临床、病理和随访资料完整,切除的乳腺癌石蜡标本保存完好。实验所需兔抗人 EZH2 多克隆抗体购自美国 GeneTex 公司,鼠抗人 Ki67 单克隆抗体 (即用型)、抗体稀释液和生物素标记二抗购自武汉博士德生物工程有限公司。

### 1.2 免疫组织化学法

将每例患者手术切除的乳腺癌组织石蜡样本分别连续切片 5 张,其中 1 张进行常规苏木精 - 伊红染色法染色,观察乳腺癌的形态学;2 张用于免疫组织化学法染色,观察 EZH2 在乳腺癌组织、细胞中的表达情况;另 2 张备用。

### 1.3 免疫组织化学法染色结果判断

EZH2 的免疫组织化学法结果主要为核染色,分别由 2 名不知道切片病理诊断结果的观察者判断切片的 EZH2 染色情况,无细胞核染色计 1 分,细胞核染色 <25% 计 2 分,细胞核染色在 25%~75% 计 3 分,细胞核染色 >75% 计 4 分<sup>[6]</sup>。3~4 分为 EZH2 高表达,1~2 分为 EZH2 低表达。

Ki67 的免疫组织化学法结果为细胞核呈棕褐

色着色。分别由 2 位不知道切片病理诊断结果的观察者判断切片的 Ki67 染色情况。随机选取高倍镜下 10 个视野,计数每个视野中 100 个细胞中阳性表达的百分比,最后取 10 个高倍镜视野百分数的平均值。

新型乳腺癌分子分型:ER+ 和 / 或 PR+,Her-2-, Ki67<14% 为管腔上皮 A 型;ER+ 和 / 或 PR+,Her-2+ 或 ER+ 和 / 或 PR+,Her-2-, Ki67≥14% 为管腔上皮 B 型;ER-,PR-,Her-2+ 为 Her-2 过表达型;ER-,PR-,Her-2- 为三阴性型。

### 1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件,计数资料以率 (%) 表示,用  $\chi^2$  检验;两组生存率的比较采用 Log-rank  $\chi^2$  检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 免疫组织化学染色法结果

42 例乳腺癌患者中,13 例为管腔上皮 A 型 (30.95%);10 例为管腔上皮 B 型 (23.81%);7 例为 Her-2 过表达型 (16.67%);12 例为三阴性型 (28.57%)。在 42 例乳腺癌患者中,21 例为 EZH2 高表达 (50.00%)。

### 2.2 EZH2 表达与乳腺癌分子分型的关系

13 例管腔上皮 A 型乳腺癌患者中,3 例为 EZH2 高表达 (23.08%);10 例管腔上皮 B 型乳腺癌患者中,5 例为 EZH2 高表达 (50.00%);7 例 Her-2 过表达型乳腺癌患者中,3 例为 EZH2 高表达 (42.86%);12 例三阴性型乳腺癌患者中,10 例为 EZH2 高表达 (83.33%)。乳腺癌各分子亚型间 EZH2 的表达比较,差异有统计学意义 ( $\chi^2=9.240, P=0.020$ )。

### 2.3 EZH2 表达与乳腺癌临床病理特征的关系

EZH2 表达在患者年龄及患者绝经状态之间比较,差异无统计学意义 ( $P>0.05$ );EZH2 表达的高低在肿瘤大小、淋巴结是否转移及术后分期之间比较,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。与 EZH2 低表达的乳腺癌患者比较,EZH2 高表达的乳腺癌患者肿瘤生长速度较快、发生淋巴结转移的概率较大、术后分期较晚。见附表。

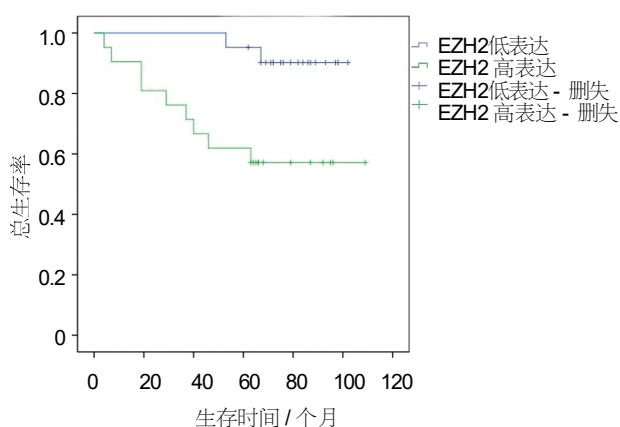
### 2.4 EZH2 表达与乳腺癌预后的关系

42 例乳腺癌患者随访 >5 年,21 例 EZH2 高表达的乳腺癌患者中,有 6 例死亡,2 例发生复发和转移;21 例 EZH2 低表达的乳腺癌患者中,有 2 例死亡,1 例发生复发和转移。采用 Kaplan-Meier 法对 42 例乳腺癌患者进行生存分析,对 EZH2 高表达和 EZH2

低表达患者的无病生存率 disease free survival, DFS) 进行 Log-rank 检验, 差异有统计学意义 ( $\chi^2=7.041$ ,  $P=0.008$ )。见附图。

附表 乳腺癌患者临床病理特征与 EZH2 高表达的关系 (例 %)

临床病理特征	EZH2 高表达	$\chi^2$ 值	P 值
<b>年龄</b>			
>50 岁 (n=23)	12 (52.17)	0.096	0.750
≥ 50 岁 (n=19)	9 (47.37)		
<b>绝经状态</b>			
是 (n=20)	9 (45.00)	0.382	0.530
否 (n=22)	12 (54.55)		
<b>肿瘤大小</b>			
≤ 2 cm (n=20)	5 (25.00)	9.545	0.002
>2 cm (n=22)	16 (42.86)		
<b>淋巴结转移</b>			
有 (n=24)	17 (72.73)	7.875	0.005
无 (n=18)	4 (22.22)		
<b>术后分期</b>			
I 期 (n=15)	3 (20.00)	10.374	0.006
II 期 (n=19)	11 (57.89)		
III、IV 期 (n=8)	7 (87.50)		



附图 不同 EZH2 表达水平乳腺癌患者的 DFS 生存曲线

### 3 讨论

乳腺癌是一种严重威胁女性健康的恶性肿瘤, 具有高度异质性以及较高的发生率, 且其发病机制尚未完全阐明, 已成为近年来的研究热点<sup>[7]</sup>。GOLDHIRSCH 等<sup>[8]</sup>确立新型的乳腺癌分子分型, 根据乳腺癌患者肿瘤组织中的 ER、PR、HER-2 和 Ki67 的表达差异, 将乳腺癌分为管腔上皮 A 型、管

腔上皮 B 型、Her-2 过表达型和三阴性型。刘佳等<sup>[9]</sup>通过检测 80 例乳腺癌组织中 ER、PR、HER-2、CK5/6、CK14、EGFR 以及 EZH2 蛋白的表达, 将乳腺癌分为腔型、HER-2 (+) 型、基底细胞样型和正常乳腺样型, 其所占比例分别为 61.25%、10.00%、25.00% 和 3.75%, 其中管腔上皮型在各分子亚型中的比例最高。WIECHMANN 等<sup>[10]</sup>的研究中, 管腔上皮型在乳腺癌各分子亚型中所占的比例最高且预后相对较好。本研究根据 ST.Gallen 的新型乳腺癌分子分型标准, 将 42 例乳腺癌患者分为管腔上皮 A 型 (30.95%)、管腔上皮 B 型 (23.81%)、Her-2 过表达型 (16.67%) 和三阴性型 (28.57%)。其中由 A 型和 B 型组成的管腔上皮型所占比例最高, 为 53.76%, 该结果与其他研究一致。

EZH2 是果蝇 Enhancer of zeste 基因的人类同源基因, 作为 PcG 基因家族的重要成员之一, 其参与细胞分化, 并与多种肿瘤的发生、发展密切相关<sup>[4]</sup>。EZH2 是一种转录阻遏因子, 其高表达可抑制肿瘤细胞的凋亡, 与肿瘤的发生与转移密切相关<sup>[10]</sup>。RAAPHORST 等<sup>[11]</sup>研究 EZH2 基因在正常乳腺组织、癌前病变乳腺组织及浸润性乳腺癌组织中的表达差异, 结果显示 EZH2 在正常乳腺组织中无表达, 而在乳腺癌组织中的表达明显高于癌前病变乳腺组织。姚凡等<sup>[12]</sup>通过对 105 例乳腺癌患者肿瘤组织的检测发现, 其中 69.50% 乳腺癌组织中出现 EZH2 阳性表达, 且 EZH2 表达与乳腺癌患者的年龄、肿瘤大小、术后分期、PR 表达及 c-erbB-2 表达等无相关性。徐静等<sup>[13]</sup>对 82 例乳腺癌患者的研究表明, 出现 EZH2 阳性表达的乳腺癌患者高达 51.20%, EZH2 阳性表达患者的组织分化较差、肿瘤直径较大且更容易发生淋巴结转移。本研究旨在探讨 EZH2 表达高低与乳腺癌分子分型及临床病理特征的关系, 结果表明在 12 例三阴性型患者中, EZH2 高表达者 10 例 (83.33%), 肿瘤大小、淋巴结是否转移及不同术后分期 EZH2 高表达例数比较, 差异有统计学意义, 提示 EZH2 表达可能与乳腺癌的病情程度相关, 病情越严重, EZH2 高表达的可能性越大。且 EZH2 高表达的乳腺癌患者肿瘤生长速度较快、发生淋巴结转移的概率较大、术后分期较晚, 表明 EZH2 高表达可能会加快患者的病情发展, 与其他研究结果一致。

已有研究表明, EZH2 高表达患者比低表达患者的无病生存率更低, 差异有统计学意义, EZH2 高表达患者比低表达患者的预后更差, 其发生复发转移

的概率更高<sup>[4]</sup>。本研究对 42 例乳腺癌患者随访≥ 5 年,统计发现,21 例 EZH2 高表达的乳腺癌患者中,有 6 例死亡,2 例发生复发和转移;21 例 EZH2 低表达的乳腺癌患者中,有 2 例死亡,1 例发生复发和转移。表明 EZH2 高表达患者比低表达患者更易发生复发转移,其与之前的研究报道一致。

综上所述,EZH2 高表达多发生在病情更为严重的三阴性型乳腺癌患者中,EZH2 表达的高低在肿瘤大小、淋巴结是否转移及术后分期之间比较,差异有统计学意义,且 EZH2 高表达的乳腺癌患者往往预后不良,总生存率较低。因此,EZH2 可能是预测乳腺癌病情以及乳腺癌预后的指标之一。

#### 参 考 文 献:

- [1] 张林. 乳腺癌筛查和预防[J]. 中国医师进修杂志, 2016, 39(6): 484-486.
- [2] 南昊成, 吴立刚, 刘奇伦. 乳腺癌分子标志及分子分型研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2013, 21(9): 2143-2146.
- [3] GOLDHIRSCH A, WOOD W C, COATES A S, et al. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the st. gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011[J]. *Annals of Oncology*, 2011, 22(8): 1736-1747.
- [4] XIAO Y. Enhancer of zeste homolog 2: A potential target for tumor therapy[J]. *International Journal of Biochemistry Cell Biology*, 2011, 43(4): 474-477.
- [5] 冯浩, 高兴春, 沙保勇, 等. EZH2: 调节癌症发展的多重表观遗传因子[J]. *生命科学*, 2015, 27(7): 876-882.
- [6] KLEER C G, CAO Q, VARAMBALLY S, et al. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100(20): 11606-11611.
- [7] SI-HYONG J, EUN L J, MEE-HYE O, et al. High EZH2 protein expression is associated with poor overall survival in patients with luminal a breast cancer[J]. *Journal of Breast Cancer*, 2016, 19(1): 53-60.
- [8] 刘佳, 王鸿雁, 邓元, 等. EZH2 与乳腺癌分子亚型的关系及对临床病理的意义[J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2013, 42(4): 443-449.
- [9] WIECHMANN L, SAMPSON M, STEMPEL M, et al. Presenting features of breast cancer differ by molecular subtype[J]. *Annals of Surgical Oncology*, 2009, 16(10): 2705-2710.
- [10] ITALIANO A. Role of the EZH2 histone methyltransferase as a therapeutic target in cancer [J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2016, 165: 26-31.
- [11] RAAPHORST F M, MEIJER C J L M, FIERET E, et al. Poorly differentiated breast carcinoma is associated with increased expression of the human polycomb group EZH2 gene[J]. *Neoplasia*, 2003, 5(6): 481-488.
- [12] 姚凡, 刘崇, 房月, 等. EZH2 在乳腺癌中的表达及其临床意义[J]. *中国微生态学杂志*, 2013, 25: 143-146.
- [13] 徐静, 刘丽丽, 赵瑞霞, 等. EZH2 与乳腺癌及三阴性乳腺癌相关性的研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2010, 17(24): 2026-2029.
- [14] PIETERSEN A M, HORLINGS H M, HAUPTMANN M, et al. EZH2 and BMI1 inversely correlate with prognosis and TP53 mutation in breast cancer[J]. *Breast Cancer Research Bcr*, 2008, 10(6): R109.

(李科 编辑)