

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.30.008

文章编号: 1005-8982(2017)30-0046-05

端粒锌指相关蛋白在乳腺癌中的表达 及其临床病理意义

傅柳¹, 何潇²

(1. 南华大学附属第一医院 普通外科, 湖南 衡阳 421001; 2. 湖南省肿瘤医院 乳腺外科, 湖南 长沙 410006)

摘要:目的 端粒锌指相关蛋白(ZBTB48)在乳腺癌中的表达及其临床病理意义。方法 选取 2014 年 1 月 - 2015 年 12 月 90 例在湖南省肿瘤医院接受手术切除的乳腺癌标本及配对正常组织, 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 ZBTB48 的信使核糖核酸(mRNA)表达水平, 免疫组织化学检测 ZBTB48、Ki-67 的蛋白表达水平, 分析 ZBTB48 的表达水平与临床病理因素的相关性; 利用网络公共数据库, 分析 ZBTB48 的表达水平与患者预后的关系。结果 ZBTB48 mRNA 的表达水平在癌组织中比正常组织中低, 差异有统计学意义($P=0.029$); ZBTB48 蛋白的表达水平在癌组织中比正常组织低, 差异有统计学意义($P=0.000$); ZBTB48 蛋白的表达水平与 Ki-67 蛋白的表达水平呈负相关($P=0.0005$); ZBTB48 的 mRNA 表达水平与年龄、肿瘤大小、分化程度及 TNM 分期相关; ZBTB48 的表达水平低则乳腺癌患者的预后差。结论 ZBTB48 低表达与乳腺癌患者的年龄、肿瘤大小、分化程度及 TNM 分期有关, 是乳腺癌患者预后差的危险因素。

关键词: 端粒锌指相关蛋白; 端粒; 乳腺癌; 临床病理; 预后

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

Expression of telomeric protein ZBTB48 in breast cancer and clinical significance

Ye Fu¹, Xiao He²

(1. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of South China University, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Department of Breast Surgery, Hunan Cancer Hospital, Changsha, Hunan 410006, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of telomeric zinc finger-associated protein (ZBTB48) in breast cancer and its clinical significance. Methods A total of 90 cases of patients diagnosed with breast cancer were included in this study. Cancer tissue as well as paracancerous normal tissue was collected for further analysis. RT-PCR and Immunohistochemistry were utilized to measure expression levels of ZBTB48 and Ki-67. Correlation between ZBTB48 expression in cancer tissue and patients' clinical manifestation was analyzed under network public database. Results RT-PCR and Immunohistochemistry data suggested that expression levels of ZBTB48 in cancer tissue were significantly decreased compared with normal tissue ($P_1 = 0.0289$; $P_2 = 0.000$). The expression level of Ki-67 protein was negatively correlated with ZBTB48 ($P = 0.0005$). Concentration of ZBTB48 was closely correlated with age, size as well as differentiation of tumor and TNM stage. Overall data indicated that patients with low expression of ZBTB48 were more likely to experience poor outcome. Conclusions ZBTB48 in breast cancer tissue is closely associated with age, size and differentiation of tumor, and TNM stage of breast cancer; low expression of ZBTB48 is a risk factor of breast cancer.

收稿日期: 2017-04-21

[通信作者] 何潇, Tel: 18674830210; E-mail: doctorhexiao@163.com

Keywords: zinc finger and BTB domain 48; telomere; breast cancer; clinicopathological factor; prognosis

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一^[1],故研究调节乳腺癌发生发展相关的基因可为疾病的精准治疗寻找新靶点。端粒是真核生物染色体末端的特殊结构,其长度受多种分子的调节,当端粒长度保持相对稳定时,细胞则获得永生性,进一步可发生癌变^[2]。端粒锌指相关蛋白(zinc finger and BTB domain 48, ZBTB48)作为新近发现的端粒修剪分子,其在乳腺癌中表达水平及病理意义尚不清楚。本研究拟通过检测乳腺癌标本中 ZBTB48 的表达水平,并利用疾病大数据挖掘 ZBTB48 表达水平与乳腺癌预后的相关性,以明确 ZBTB48 在乳腺癌发生发展中的作用。

1 资料与方法

1.1 资料与试剂

1.1.1 病例资料 选取 2014 年 1 月 -2015 年 12 月湖南省肿瘤医院经手术切除后病理诊断明确的乳腺癌病例 90 例,按照美国癌症联合会(第 7 版)TNM 分期进行分期,所有病理切片均由 ≥ 2 位副主任病理医师根据世界卫生组织乳腺肿瘤病理学和遗传学分类标准复阅。所有收集并用于检测的人体组织标本,均经过医院伦理委员会同意和批准。

1.1.2 试剂 实时聚合酶链反应(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)引物, ZBTB48 正向引物:5'-GGCCTGGTGTTTAAGGCACA-3',反向引物:5'-CTGAGCCATCCCCGTAGAG-3'; β -actin 正向引物:5'-GCACCACACCTTCTACAATGAGC-3',反向引物:5'-GGATAGCACAGCCTGGATAGCAAC-3'。real-time PCR 主要试剂(购自日本 TaKaRa 公司),小鼠多克隆抗体 ZBTB48(购自美国 Abcam 公司),工作浓度为 1:200;兔多克隆抗体 Ki-67(购自美国 Abcam 公司),工作浓度为 1:300。SP 通用型试剂盒(购自福建省福州迈新生物技术开发有限公司)。

1.2 仪器与设备

7500-PCR 仪器(购自美国 ABI 公司),石蜡切片机(购自德 Leica 公司),全自动免疫组织化学机(购自瑞士 Roche 公司),电子天平(购自北京爱尚阳光科技有限公司),光学显微镜及切片机(购自德国 Leica 公司),低温高速台式离心机及微量移液枪(购自德国 Eppendorf 公司),微波炉(购自广东省佛山

Galanz 集团有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 real-time PCR 所有器皿去酶处理,采用染料法(SYBR Green I)试剂盒说明书,依次进行 RNA 抽提、RNA 电泳检测、逆转录及定量 PCR 实验。PCR 体系为:DNA 2 μ l, qPCR mix 10 μ l, 正向引物 0.6 μ l, 反向引物 0.6 μ l, 内参(Reference Dye, ROX) 0.3 μ l, 焦碳酸二乙酯水 6.5 μ l。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 退火 5 s, 60 $^{\circ}$ C 延伸 35 min, 共 30 个循环。PCR 结果分析:每个样本平行 3 次重复实验次,分别计算出目的基因和内参基因 β -actin 的平均 Ct 值。负 $\Delta\Delta$ Ct 为对照组样本 Δ Ct 的平均值与各样 Δ Ct 值之间的差,相对表达量则由公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算出来的数值来表示。

1.3.2 免疫组织化学(免疫组化)及结果判定 所有组织标本经中性甲醛固定,常规脱水、透明、包埋;石蜡块切成 4 μ m 白片,展片、贴片及烤片,苏木精-伊红染色法常规染色(hematoxylin-eosin staining, HE)。链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结(streptavidin-peroxidase, SP)二步法,均设阴性对照和阳性对照。雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)、ZBTB48 及 Ki67 阳性均为胞核着色。阳性细胞 $\leq 5\%$ 定义为阴性(-);阳性细胞数在 6%~25%者定义为弱阳性(+);26%~50%定义为阳性(++); $>50\%$ 定义为强阳性(+++)。本研究定义阳性强度在(+)以上者为阳性表达。

1.3.3 原癌基因人类表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor-2, HER2)的原位杂交 所有石蜡切片行二甲苯脱蜡,水洗;3% H_2O_2 室温作用 10 min,水洗 2 次;暴露 mRNA 核酸片段:3% 柠檬酸 1 ml+2 滴胃蛋白酶浓缩液,混匀,37 $^{\circ}$ C 消化 10~25 min;洗 3 次 \times 5 min,水洗 1 次;预杂交:湿盒底部加 20% 甘油保湿,每个蜡块 20 μ l 预杂交液,置温箱 38 $^{\circ}$ C 4 h;杂交:每个蜡块 20 μ l 杂交液,将原位杂交专用盖玻片盖在切片上,置温箱 42 $^{\circ}$ C 过夜;滴加封闭液,37 $^{\circ}$ C 30 min,甩去多余液体,不洗;滴加生物素化鼠抗地高辛,37 $^{\circ}$ C 60 min;滴加生物素化过氧化物酶 37 $^{\circ}$ C 20 min;洗 5 min \times 4 次;显色:二氨基联苯胺显色试剂盒中 1.7 ml 水加 A、B、C 各 4 滴滴加至切片上,显色 20~30 min;苏木精淡染,水洗;酒精脱水,二甲苯透明,封片。

1.3.4 分析 ZBTB48 对乳腺癌预后的影响 利用癌症基因组图谱(the cancer genome atlas,TCGA)中大数据信息,分析 ZBTB48 表达水平对乳腺癌患者预后的影响。登录 <http://kmplot.com/analysis/> 网站,分析 ZBTB48 mRNA 表达水平对乳腺癌($n=1\ 402$)总生存(overall survival,OS)的影响^[9];分析乳腺癌不同分子分型、ER、PR、HER2 表达情况下 ZBTB48 mRNA 表达水平对乳腺癌预后 OS 的影响。2013 年 St. Gallen 会议专家共识根据免疫组织化学指标对 Luminal B 型乳腺癌进行重新定义。HER-2 阴性:ER 阳性和 HER-2 阴性,且至少符合以下 1 项,①Ki-67 高表达;②PR 阴性或低表达;③多基因表达分析示高复发风险;HER-2 阳性:ER 阳性,HER-2 过表达或扩增,Ki-67 和 PR 任何水平。

1.4 统计学方法

数据分析采用 Prism 6 统计软件,ZBTB48 mRNA 及蛋白表达量与临床病例特征之间的关系用 Student's-*t* 检验和 chisquare 检验;正常组织与乳腺癌组织 mRNA 表达差异用 paired-*t* 检验;多组分析用 Student's *t* 检验或单因素方差统计分析;用 Spearman 检验分析 ZBTB48 与 Ki-67 蛋白间表达水平的相关性, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床资料

患者年龄 32~82 岁,平均 60 岁;未绝经 49 例,已绝经 41 例;肿瘤直径 0.5~6.5 cm,平均 2.4 cm;TNM 分期 I、II 期 56 例,III、IV 期 34 例;高分化 52 例,中低分化 38 例;ER 阳性率 55.0%(44/90),PR 阳性率 56.7%(51/90),HER-2 阳性率 46.3%(37/90)。

2.2 ZBTB48 mRNA 表达水平

在癌组织中的表达水平为(2.95 ± 1.08),在正常乳腺组织的表达水平为(3.28 ± 1.04),组间表达水平差异有统计学意义($P=0.0289$);ZBTB48 mRNA 在不同年龄、肿瘤大小、分化程度及 TNM 分期中差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1 和图 1。

2.3 ZBTB48 及 Ki-67 蛋白的表达水平

ZBTB48 及 Ki-67 蛋白阳性表达主要位于细胞核内(见图 1),ZBTB48 蛋白在癌组织及正常组织表达的阳性率分别为 28.9%(26/90)和 63.3%(57/90);Ki-67 蛋白在癌组织中的阳性为 69.8%(62/90);ZBTB48 与 Ki-67 蛋白在乳腺癌组织中的表达呈负相关。见表 2。

表 1 ZBTB48 mRNA 表达水平与临床病理特征的关系 ($n=90$)

临床特征	例数	ZBTB48 mRNA	t/χ^2 值	P 值
年龄				
<65 岁	40	2.67 ± 0.15	2.217	0.029
≥ 65 岁	50	3.16 ± 0.16		
月经				
有	41	2.97 ± 0.18	0.190	0.850
无	49	2.93 ± 0.15		
肿瘤大小				
<2 cm	34	3.45 ± 0.23	3.133	0.002
≥ 2 cm	56	2.62 ± 0.15		
TNM 分期				
I、II	37	3.28 ± 0.20	2.100	0.039
III、IV	53	2.77 ± 0.15		
分化程度				
高	38	3.42 ± 0.20	2.291	0.024
中低	52	2.86 ± 0.15		
ER				
-	44	2.74 ± 0.14	1.859	0.066
+	46	3.15 ± 0.18		
PR				
-	51	2.89 ± 0.13	0.570	0.570
+	39	3.02 ± 0.20		
HER-2				
-	37	2.66 ± 0.15	1.711	0.091
+	53	3.05 ± 0.16		

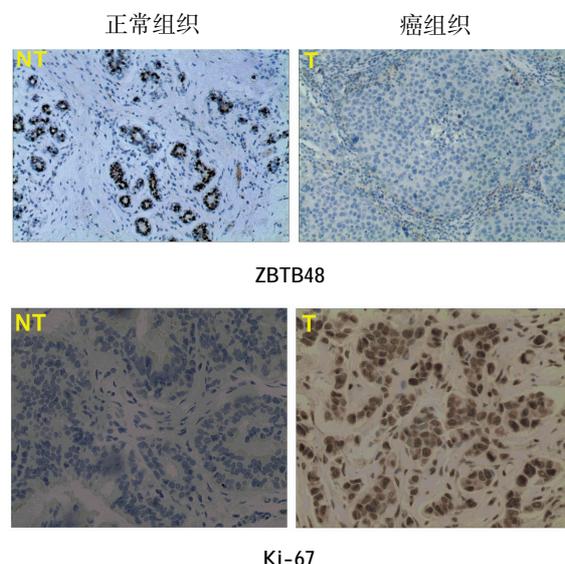


图 1 ZBTB48 及 Ki-67 蛋白阳性表达 ($\times 400$)

表 2 ZBTB48 与 Ki-67 蛋白在乳腺癌组织中的表达 例

组别	Ki-67		χ^2 值	P 值
	阳性	阴性		
ZBTB48 阳性	11	15	12.05	0.0005
ZBTB48 阴性	51	13		

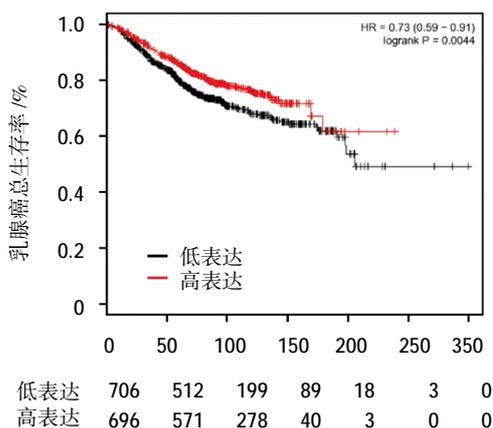


图 2 ZBTB48 mRNA 表达水平对乳腺癌患者 OS 的影响

2.4 ZBTB48 mRNA 表达水平与乳腺癌预后关系

利用乳腺癌大数据库的病例资料,结果显示,ZBTB48 mRNA 表达水平升高可延长乳腺癌的 OS;亚组分析显示 ZBTB48 mRNA 表达水平对 Luminal B 型乳腺癌的 OS 有影响。见表 3 和图 2、3。

3 讨论

端粒是真核生物染色体末端帽子样的结构,其主要功能是维持染色体稳定性和完整性。正常情况下,端粒会随细胞的分裂而逐渐缩短,最终被诱导凋亡;在恶性肿瘤的发生过程中,端粒受调节得以延长,并导致细胞脱离正常复制性衰老及凋亡的程序,最终形成永生化的肿瘤细胞。因此,调节端粒长度的分子在肿瘤的发生、发展起重要作用^[4]。研究证明,端粒的长度主要受端粒酶和一种被称作 Shelterin 的蛋白复合体调节,尚未发现特异性结合到端粒上的蛋白对端粒的长度进行调节^[5]。新近研究发现,ZBTB48,又名 TZAP,作为一种端粒结合蛋白,与端粒结合因子 TRF1 及 TRF2 竞争结合位点,倾向结合于含低密度 Shelterin 蛋白复合体的长端粒末端,对端粒长度进行修剪,进而影响细胞的衰老、凋亡及永生化的癌变过程^[6]。鉴于 ZBTB48 的特殊功能,有研究证明其作为肿瘤抑制因子参与神经母细胞瘤的发生^[7]。

本结果显示,ZBTB48 的表达水平在癌组织中低于正常组织,提示 ZBTB48 作为抑瘤因子,与乳腺

表 3 ZBTB48 mRNA 表达水平与乳腺癌预后(OS)的关系

OS	例数	HR	95%CI		P 值
			下限	上限	
总体	1 412	0.73	0.59	0.91	0.004
Luminal B	433	0.66	0.45	0.97	0.032

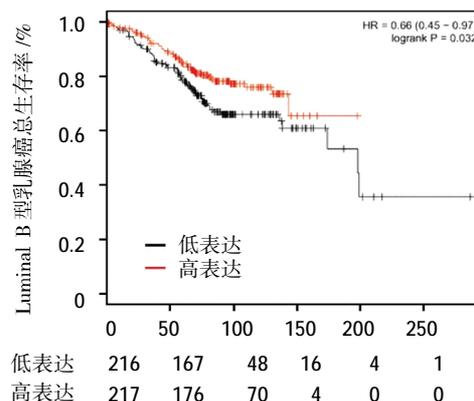


图 3 ZBTB48 mRNA 表达水平对 Luminal B 乳腺癌患者 OS 的影响

癌关系密切。且 ZBTB48 在 <65 岁、肿瘤直径大、分化差及 TNM 分期晚的患者中表达水平低;笔者推断 ZBTB48 的高表达水平作为端粒长度的负性调节因子,与患者的年龄密切相关,这也与其他端粒长度的负性调节因子在乳腺癌中的表达趋势基本一致^[8-9];同时,ZBTB48 作为抑瘤因子,与肿瘤大小、分化程度及病理分期相关,笔者认为 ZBTB48 可通过调节端粒长度而抑制肿瘤分化,促进肿瘤生长及进展。

Ki67 是细胞增殖特异相关的核抗原,目前作为一个可靠而全面的反映肿瘤细胞群体增殖活性的指标^[10]。研究已经证明,Ki67 在乳腺癌中的表达水平高于正常乳腺组织,笔者的结果也与此基本一致^[11]。同时,ZBTB48 与 Ki67 的蛋白表达水平在乳腺癌组织中呈负相关,提示 ZBTB48 的低表达水平协同 Ki67 促进乳腺癌的发生、发展。最后,本文利用 TCGA 大数据库资料^[12],分析 ZBTB48 mRNA 表达水平对乳腺癌预后的影响,发现 ZBTB48 mRNA 表达水平越高,患者的 OS 越长,亚组分析显示 ZBTB48 的表达水平对 PR 阳性及 Luminal B 型乳腺癌的 OS 有影响,该结果提示 ZBTB48 可作为判断乳腺癌患者预后的分子标志物。

本研究通过分析端粒修剪蛋白 ZBTB48 在乳腺癌中的表达及其临床病理意义,发现 ZBTB48 不仅在癌组织及正常组织的表达水平有差异,而且与乳腺

癌患者的临床病理因素及预后相关。故 ZBTB48 作为乳腺癌的抑瘤因子,在判断恶性程度、预测复发转移及判断预后中均有重要意义。同时,课题尚需在体内外实验中进一步证明 ZBTB48 对乳腺癌发生进展的影响,以最终实现以 ZBTB48 为靶点的精准治疗。

参 考 文 献:

- [1] CHEN W, ZHENG R, ZHANG S, et al. Cancer incidence and mortality in China in 2013: an analysis based on urbanization level[J]. *Chin J Cancer Res*, 2017, 29(1): 1-10.
- [2] MARTINEZ P, BLASCO M A. Telomere-driven diseases and telomere-targeting therapies[J]. *J Cell Biol*, 2017, 216(4): 875-887.
- [3] SZÁSZ A M, GREEN J E, LÁNCZKY A, et al. Cross-validation of survival associated biomarkers in gastric cancer using transcriptomic data of 1,065 patients [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(31): 49322.
- [4] MACIEJOWSKI J, DE LANGE T. Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(3): 175-186.
- [5] KUMAR M, LECHER A, GUNES C. Telomerase: The Devil Inside[J]. *Genes (Basel)*, 2016, 7(43): 1-13.
- [6] JS L, MF J, T S, et al. TZAP: A telomere-associated protein involved in telomere length control[J]. *Science*, 2017, 355(6325): 638-641.
- [7] MARIS J M, JENSEN J, SULMAN E P, et al. Human Kruppel-related 3 (HKR3): a candidate for the 1p36 neuroblastoma tumour suppressor gene[J]. *Eur J Cancer*, 1997, 33(12): 1991-1996.
- [8] ENNOUR-IDRISSI K, MAUNSELL E, DIORIO C. Telomere length and breast cancer prognosis: a systematic review[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2017, 26(1): 3-10.
- [9] ENNOUR-IDRISSI K, TETU B, MAUNSELL E, et al. Association of telomere length with breast cancer prognostic factors [J]. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0161903.
- [10] CUYLEN S, BLAUKOPF C, POLITI A Z, et al. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes[J]. *Nature*, 2016, 535(7611): 308-312.
- [11] LUPORSI E, ANDRE F, SPYRATOS F, et al. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 132(3): 895-915.
- [12] GYORFFY B, LANCZKY A, EKLUND A C, et al. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, 123(3): 725-731.

(王荣兵 编辑)