

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.11.012

乳腺浸润性导管癌组织中 P33/ING1 和 HIF-1 α 的表达及分析

朱崇先, 齐贵胜

Expression and Analysis of P33/ING1 and HIF-1 α in Invasive Ductal Carcinoma of Breast

ZHU Chong-xian, QI Gui-sheng

Department of Pathology and Pathophysiology, Liaocheng Vocation and Technical College, Liaocheng 252000, China

Abstract: Objective To study the expression and significance of P33/ING1 and HIF-1 α in invasive ductal carcinoma of breast(IDC). **Methods** Immunohistochemical SP method was performed to detect the expression of P33/ING1 and HIF-1 α in 68 cases of IDC and 20 cases of breast fibroadenoma and the relationship between the expression and clinical-pathological characteristics was analyzed. **Results** The positive expression rates of P33/ING1 protein in IDC was significant lower than that in breast fibroadenoma (60.29% vs. 95%; $P < 0.01$); and negatively correlated with tumor size, axillary lymph node metastasis and histologic grade ($P < 0.05$). The positive expression rates of HIF-1 α protein in IDC was significant higher than that in breast fibroadenoma (52.94% vs. 10%; $P < 0.01$) and positively correlated with axillary lymph node metastasis and histologic grade ($P < 0.05$). There was a negative correlation between P33/ING1 and HIF-1 α in IDC ($r = -0.283$; $P < 0.05$). **Conclusion** There were low-expression of P33/ING1 and over-expression of HIF-1 α in IDC. P33/ING1 and HIF-1 α proteins were significantly correlated with the clinicopathological characteristics in IDC. Combined detection of P33/ING1 and HIF-1 α might calculate the biological behaviors of IDC.

Key words: P33/ING1; HIF-1 α ; IDC; Immunohistochemistry; Analysis

摘要:目的 探讨 P33/ING1 和 HIF-1 α 在乳腺浸润性导管癌组织中的表达及其临床意义。**方法** 采用免疫组织化学 SP 法检测 68 例乳腺浸润性导管癌及 20 例乳腺良性病变(乳腺纤维腺瘤)组织中 P33/ING1 和 HIF-1 α 的表达,并结合临床病理特点进行分析。**结果** P33/ING1 在乳腺浸润性导管癌组织中的阳性表达率为 60.29%,明显低于乳腺良性病变中的表达率 95% ($P < 0.01$);P33/ING1 阳性表达与乳腺浸润性导管癌肿瘤大小、腋窝淋巴结转移、组织学分级呈负相关(P 均 < 0.05)。HIF-1 α 在乳腺浸润性导管癌组织中的阳性表达率为 52.94%,明显高于乳腺良性病变中的表达率 10% ($P < 0.01$);HIF-1 α 的阳性表达与乳腺浸润性导管癌腋窝淋巴结转移、组织学分级呈正相关(P 均 < 0.05)。乳腺浸润性导管癌组织中 P33/ING1 与 HIF-1 α 的表达呈显著负相关($r = -0.283$, $P < 0.05$)。**结论** 乳腺浸润性导管癌组织中 P33/ING1 表达下调而 HIF-1 α 表达明显增强,两者与乳腺浸润性导管癌临床病理特征密切相关,对两者进行联合检测,有可能反映乳腺浸润性导管癌生物学行为的指标。

关键词: P33/ING1; HIF-1 α ; 乳腺浸润性导管癌;免疫组织化学;分析**中图分类号:** R736.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)11-1264-04

0 引言

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,其发生、发展是一个多因素参与、多阶段变化的过程。近年

来研究表明,抑癌基因 P33/ING1、缺氧诱导因子 HIF-1 α 通过不同的途径在肿瘤发生、发展和转移等方面起着重要的作用。目前关于乳腺肿瘤组织中 P33/ING1 表达与 HIF-1 α 表达的关系研究较少,在乳腺浸润性导管癌(invasive ductal carcinoma of breast, IDC)组织中 P33/ING1 和 HIF-1 α 表达的相关性国内尚未见报道。因此,我们采用免疫组织化学法检测 IDC 组织中 P33/ING1、HIF-1 α 的表达,并分析两者表达的相关性及其与 IDC 临床病理特

收稿日期: 2011-02-25; **修回日期:** 2011-05-17**基金项目:** 聊城职业技术学院科研基金资助项目(2009LZY27)**作者单位:** 252000 山东聊城,聊城职业技术学院病理学与病理生理学教研室**作者简介:** 朱崇先(1980-),男,硕士在读,主要从事病理学与病理生理学教学研究

征之间的关系。

1 资料与方法

1.1 标本来源

收集聊城市医院病理科存档的 2009 年 6 月—2010 年 6 月外检 IDC 组织标本蜡块 68 例(术前均未经放疗、化疗及激素治疗),均为女性,年龄 32~75 岁(平均 51.04 岁)。患者年龄 ≤ 50 岁者 31 例, > 50 岁者 37 例;肿块直径 ≤ 2 cm 者 32 例,2~5 cm 者 20 例, ≥ 5 cm 者 16 例;伴有腋窝淋巴结转移者 31 例,无腋窝淋巴结转移者 37 例;根据 Elson and Ellis 半定量分级法进行组织学分级:I 级 23 例,II 级 32 例,III 级 13 例。20 例乳腺良性病变(乳腺纤维腺瘤)为对照组。病理诊断经两位病理学专家复核证实。

1.2 试剂

鼠抗人 P33/ING1 单克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品(工作浓度为 1:100);鼠抗人 HIF-1 α 单克隆抗体(即用型)及免疫组织化学试剂盒均购自福州迈新生物技术有限公司,操作步骤按说明书进行。

1.3 方法

所有标本均经 10% 中性福尔马林固定,常规脱水,石蜡包埋。将每一例蜡块作 4 μ m 厚的连续切片,免疫组织化学采用 SP 法检测组织中的 P33/ING1 和 HIF-1 α 表达。用已知的阳性切片作为阳性对照,用 PBS 代替一抗体作为阴性对照。

1.4 结果判断

具体标准为:P33/ING1 蛋白主要定位于细胞核,少量出现在胞质;HIF-1 α 以胞质或胞核内出现棕黄色颗粒为阳性细胞。参照文献^[1]以半定量判断 P33/ING1、HIF-1 α 免疫组织化学结果:光学显微镜下随机观察免疫组织化学染色切片 5 个高倍镜视野,每个视野分别计算 200 个细胞,共计数 1 000 个细胞,从两方面对其评分。按阳性着色程度评分:0 分为无着色,1 分为浅黄色,2 分为棕黄色,3 分为棕褐色;再按阳性细胞所占比例评分:0 分为无着色,1

分为浅黄色,2 分为棕黄色,3 分为棕褐色;按阳性细胞所占比例评分:0 分为阴性,1 分为 $\leq 10\%$,2 分为 $> 10\% \sim 50\%$,3 分为 $> 50\% \sim 75\%$,4 分为 $> 75\%$,以两者乘积判定结果: ≥ 4 分为阳性, < 4 分为阴性。

1.5 统计学方法

采用 SPSS13.0 软件包进行统计学处理,组间比较采用卡方检验;P33/ING1、HIF-1 α 表达的相关分析采用 Spearman 检验,显著性水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 P33/ING1、HIF-1 α 蛋白在 IDC 组织和乳腺纤维腺瘤组织中的表达比较

P33/ING1 蛋白在 IDC 组织中的阳性表达率为 60.29%,明显低于其在乳腺纤维腺瘤中阳性表达率 95%,($\chi^2 = 10.364, P < 0.01$);HIF-1 α 蛋白在 IDC 组织中的阳性表达率为 52.94%,明显高于其在乳腺纤维腺瘤中阳性表达率 10%,($\chi^2 = 11.615, P < 0.01$),见表 1。

2.2 P33/ING1、HIF-1 α 表达水平与 IDC 临床病理特征的关系

P33/ING1 阳性表达率与 IDC 肿瘤大小、腋窝淋巴结转移、组织学分级呈显著负相关($\chi^2 = 8.033, P < 0.05$; $\chi^2 = 8.021, P < 0.01$; $\chi^2 = 7.325, P < 0.05$);HIF-1 α 阳性表达率与 IDC 腋窝淋巴结转移、组织学分级呈显著正相关($\chi^2 = 5.010, P < 0.05$; $\chi^2 = 6.186, P < 0.05$)。P33/ING1、HIF-1 α 表达皆与患者年龄无关($P > 0.05$),见表 2。

2.3 IDC 组织中 P33/ING1、HIF-1 α 表达的相关性

68 例 IDC 组织中 P33/ING1 阳性表达而 HIF-1 α 阴性表达者 24 例,占 35.29%(24/68);P33/ING1 阴性表达而 HIF-1 α 阳性表达者 19 例,占 27.94%(19/68)。经统计学非参数 Spearman 检验($r = -0.283, P < 0.05$),说明 P33/ING1 表达与 HIF-1 α 表达呈显著负相关,见表 3。

表 1 P33/ING1 和 HIF-1 α 在 IDC 及乳腺纤维腺瘤组织中的表达
Table 1 Expressions of P33/ING1 and HIF-1 α in IDC and breast fibroadenoma

	IDC				Breast fibroadenoma				χ^2	P
	n	-	+	Positive rate(%)	n	-	+	Positive rate(%)		
P33/ING1	68	27	41	60.29	20	1	19	95	8.581	0.003*
HIF-1 α	68	32	36	52.94	20	18	2	10	11.615	0.001*

Note: *: $P < 0.01$

表 2 P33/ING1、HIF-1 α 表达与 IDC 临床病理特征的关系Table 2 Relation between the feature of clinical pathology and expression of P33/ING1 and HIF-1 α

Pathologic indexs	P33/ING1						HIF-1 α				
	<i>n</i>	–	+	Positive rate(%)	χ^2	<i>P</i>	–	+	Positive rate(%)	χ^2	<i>P</i>
Age(years)											
≤50	31	15	16	51.61			13	18	58.06		
>50	37	12	25	67.56	1.793	0.181	19	18	48.65	0.600	0.438
Tumor diameter											
≤2 cm	32	7	25	78.12			17	15	46.88		
2~5 cm	20	11	9	45.00	8.033	0.018 Δ	9	11	55.00	1.093	0.579
>5 cm	16	9	7	43.75			6	10	62.50		
Lymphonodus divert											
No	37	9	28	75.67			22	15	40.54		
Yes	31	18	13	41.96	8.021	0.005*	10	21	67.74	5.010	0.025 Δ
Histologic classification											
I	23	5	18	78.26			15	8	34.78		
II	32	17	15	46.88	7.325	0.026 Δ	14	18	56.25	6.186	0.045 Δ
III	13	8	5	38.46			3	10	6.92		

Note: Δ : $P < 0.05$; *: $P < 0.01$ 表 3 IDC 组织中 P33/ING1、HIF-1 α 表达的相关性Table 3 Correlation between P33/ING1 and HIF-1 α expression in IDC

P33/ING1 expression				<i>r</i>	<i>P</i>
–	+	Total			
HIF-1 α expression					
–	8	24	32	– 0.283	0.019
+	19	17	36		
Total	27	41	68	<i>P</i> < 0.05	

3 讨论

抑癌基因 ING1 定位于人类染色体 13q33-34, P33/ING1 蛋白为 ING1 基因的主要翻译产物。ING1 主要作用是参与细胞生长的负性调节、细胞衰老控制及凋亡^[2]。研究表明: P33/ING1 蛋白的过表达可抑制细胞生长并促进细胞凋亡, 而 P33/ING1 蛋白的低表达或功能丧失则可通过减少细胞凋亡而引起肿瘤发生^[3], ING1 基因的功能下调和许多人类恶性肿瘤, 如大肠癌、胃癌、肝癌、乳腺癌等的发生发展密切相关^[4]。Nouman 等^[5]研究报道在乳腺癌中 ING1 表达明显下调, p33/ING1 表达情况与乳腺癌浸润、分化、远隔转移呈负相关。赵增虎等^[6]研究表明 p33/ING1 在乳腺癌的阳性表达率为 61.7%, 其表达与肿瘤分化程度、淋巴结转移及激素受体呈明显负相关。黄卫^[7]研究发现乳腺癌细胞 P33/ING1 阳性表达率明显低于癌旁正常组织 ($P < 0.05$), P33/ING1 表达与 ER 及 PR 表达呈正相关, 与肿瘤大小、腋窝淋巴结有无转移呈负相关; 与患者

年龄、组织分级、远处转移及生存期无明显相关性。本实验结果发现 IDC 组织中 P33/ING1 的阳性表达率为 60.29%, 明显低于对照组 95% ($P < 0.01$), P33/ING1 的阳性表达与肿瘤大小、腋窝淋巴结转移、组织学分级呈显著负相关 ($P < 0.05$), 与患者年龄无关 ($P > 0.05$), 与文献报道相似, 提示 P33/ING1 表达缺失与乳腺浸润性导管癌的发生、发展密切相关。

缺氧诱导因子 HIF-1 α 是与恶性肿瘤发生、发展密切相关的转录调节因子。肿瘤组织缺氧是恶性肿瘤的重要生物学特征, 缺氧条件下, HIF-1 α 可调控瘤细胞内某些缺氧反应基因 (hypoxia response gene, HRG) 转录启动, 生成相应的蛋白质产物, 这些产物在肿瘤细胞能量代谢、适应缺氧、肿瘤血管生成及瘤细胞增殖、转移中起重要作用。肿瘤细胞缺氧状态及基因变异共同调控 HIF-1 α 表达水平及其活性, 研究表明人体多数肿瘤组织 HIF-1 α 表达水平上调, 尤其是存在缺氧的肿瘤组织^[8-9], 且与恶性肿瘤预后密切相关^[10]。王洪远等^[11]研究发现 HIF-1 α 在乳腺导管增生组织中几乎不表达, 在乳腺导管内癌组织中低表达, 在乳腺浸润性导管癌组织中高表达, 与组织学分级、淋巴结及远处转移呈正相关。本实验结果表明: IDC 组织中 HIF-1 α 的阳性表达率为 52.94%, 明显高于对照组 10% ($P < 0.01$), HIF-1 α 的阳性表达与患者的腋窝淋巴结转移、组织学分级呈显著正相关 ($P < 0.05$), 与患者年龄及肿瘤大小无关 ($P > 0.05$), 结果与文献报道一致。提

示 HIF-1 α 过表达不仅参与了乳腺导管增生、癌变的演进过程,而且在乳腺浸润性导管癌的恶性进程中起重要作用。

本实验研究说明乳腺浸润性导管癌组织中 P33/ING1 表达缺失增强了 HIF-1 α 的表达。其机制可能为 P33/ING1 作为 p53 蛋白的“分子伴侣”,是 p53 蛋白发挥正常功能所必需的^[3],P33/ING1 表达下降可削弱 p53 的功能^[12]。p53 可促进 MDM2 介导的 HIF-1 α 降解,肿瘤细胞野生型 p53 缺失或突变,可使肿瘤细胞内的 HIF-1 α 明显积聚^[13]。因此,我们推测 P33/ING1 表达下降可通过抑制 p53 的功能,促进 HIF-1 α 的表达。另一方面,P33/ING1 表达缺失丧失了抑制肿瘤细胞增殖、诱导凋亡作用,使肿瘤细胞增殖加快,从而加重肿瘤的内部缺氧状态,缺氧促使 HIF-1 α 过表达及活性增加。乳腺癌的发生、发展是一个多种癌基因参与的复杂过程,P33/ING1、HIF-1 α 在肿瘤发生、发展过程中的内在关系尚需进一步研究。

综上所述,乳腺浸润性导管癌组织中 P33/ING1 蛋白表达和 HIF-1 α 表达显著负相关,并与乳腺浸润性导管癌临床病理特征有密切关系,提示 P33/ING1 和 HIF-1 α 在乳腺浸润性导管癌发生、发展中发挥着重要作用,对两者进行联合检测,可作为反映乳腺浸润性导管癌生物学行为的指标。

参考文献:

- [1] 齐贵胜,李玉红. 63 例乳腺癌组织中 Twist 和 VEGF 的表达及相关性分析[J]. 重庆医学,2010,39(23):3170-3172.
- [2] Cheung KJ Jr, Li G. The tumor suppressor ING1: Structure and function[J]. Exp Cell Res,2001,268(1):1-6.
- [3] Garkavtsev I, Kazarov A, Gudkov A, et al. Suppression of the

novel growth inhibitor p33ING1 promotes neoplastic transformation[J]. Nat Genet,1996,14(4):415-420.

- [4] 张安平,杨永珠,黄维坤,等. P33ING1 和 Survivin 及 Ki67 蛋白在食管癌发生发展中的作用[J]. 中国肿瘤临床与康复,2008,15(4):306-309.
- [5] Nouman GS, Anderson JJ, Crosier S, et al. Downregulation of nuclear expression of the p33(ING1b) inhibitor of growth protein in invasive carcinoma of the breast[J]. J Clin Pathol,2003,56(7):507-511.
- [6] 赵增虎,张建宇,刘俊堂,等. p33ING1 基因和 MVD 在乳腺癌中的表达及其意义[J]. 中国肿瘤临床与康复,2007,14(6):503-505.
- [7] 黄卫. 乳腺癌组织中 P33ING1b 的表达及意义[J]. 江西医学院学报,2007,47(3):13-19.
- [8] Yang QC, Zeng BF, Dong Y, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha in human osteosarcoma: correlation with clinicopathological parameters and survival outcome[J]. Jpn J clin Oncol,2007,37(2):127-134.
- [9] Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1[J]. Blood,2005,105(2):659-669.
- [10] Schindl M, Schoppmann SF, Samonigg H, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is associated with an unfavorable prognosis in lymphnode-positive breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2002,8(6):1831-1837.
- [11] 王洪远,王刚平,王绍田,等. COX-2、TGF- β 1 和 HIF-1 α 表达与乳腺癌侵袭转移的关系[J]. 临床肿瘤学杂志,2008,13(5):417-420.
- [12] Shimada H, Liu TL, Ochiai T, et al. Facilitation of adenoviral wild-type p53-induced apoptotic cell death by overexpression of p33 (ING1) in T. Tn human esophageal carcinoma cells[J]. Oncogene,2002,21(8):1208-1216.
- [13] Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, et al. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 alpha[J]. Genes Dev,2000,14(1):24-44.

[编辑:黄国玲;校对:杨 卉]