

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.12.015

YAP、p73 在乳腺癌组织中的表达及意义

何冬雷*, 刘 玉, 夏立平

Expressions and Significance of Yes-associated Protein and p73 in Breast Carcinoma

HE Dong-lei*, LIU Yu, XIA Li-ping

Cancer Institute, Hainan Medical College, Haikou 570102, China(*: Present; Department of Surgical Oncology, Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570102, China)

Corresponding Author: LIU Yu, E-mail: lamliuyu@tom.com

Abstract: Objective To investigate the expressions of YAP and p73 and their clinical significance in breast carcinoma. **Methods** The expressions of YAP and p73 in 60 cases of breast carcinoma tissue and 26 cases of normal breast tissue adjacent to breast carcinoma were detected by immunohistochemistry, and the relationship of the expressions of YAP and p73 to clinical and pathological features of breast cancer was analyzed. **Results** The expression of YAP was significantly higher in normal breast tissue adjacent to breast carcinoma than that of in breast carcinoma tissue, suggesting YAP gene deletion may be involved in the formation of breast cancer; The weakly or negative expression of p73 in normal breast tissue adjacent to breast carcinoma, but in breast carcinoma tissues, showing strongly positive expression. This suggested that the positive expression of p73 protein is related to the formation and development of breast cancer. **Conclusion** YAP and p73 might be valuable markers in predicting early diagnosis, prognosis of breast cancer and molecule targets for therapy. The combined detection of the YAP and p73 might be a more appropriate method to identify the formation and development of breast cancer and to predict the prognosis of breast cancer.

Key words: Breast cancer; YAP; p73; Immunohistochemical

摘 要:目的 探讨 YAP、p73 在乳腺癌组织中的表达与乳腺癌临床病理特征的关系及其临床意义。**方法** 应用免疫组织化学方法检测 60 例乳腺癌组织、26 例癌旁正常乳腺组织 YAP 和 p73 的表达情况,分析两者表达与乳腺癌临床病理特征的关系。**结果** YAP 在癌旁正常乳腺组织中呈现较高的表达率,而在乳腺癌组织中不表达或弱表达, YAP 基因蛋白缺失可能参与乳腺癌的形成; p73 在癌旁正常乳腺组织中呈现弱表达或不表达,而在乳腺癌中的表达升高,提示乳腺癌组织 p73 蛋白的过表达与乳腺癌的发生、发展关系密切。**结论** YAP 和 p73 可作为乳腺癌早期诊断、预后判断及肿瘤分期监测的有价值的指标,联合检测 YAP 和 p73 对预测乳腺癌的发生、发展及评估乳腺癌病人的预后有重要意义。YAP 和 p73 可能作为乳腺癌检测的肿瘤标志物和治疗分子靶点。

关键词: 乳腺癌; YAP; p73; 免疫组织化学

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)12-1401-04

0 引言

目前普遍的观点认为,正常细胞转变为癌细胞,浸润到邻近组织或转移到远隔器官是一个复杂的、多步骤的基因改变,即癌细胞与宿主细胞间相互作用的连续过程^[1];其中包括癌基因的激活和抑癌基因的失活在肿瘤的发生、发展中起着重要作用^[2-3]。YAP(Yes-associated protein)即 Yes 相关蛋白,是新发现的一个候选的癌基因,是一种连接蛋白和转录

共激活因子,在正常机体细胞内发挥着信号转导和基因转录调节的作用。近年研究发现, YAP 是 Hippo 通路中的靶因子,该通路通过抑制 YAP 的活性调控细胞增生和凋亡间平衡,抑制组织细胞过度生长。p73 是 p53 基因家族中的新发现成员基因,位于人类 1 号染色体短臂的着丝粒 1p36.33 区域,该区域是多个抑癌基因位点^[4]。我们通过免疫组织化学法观察 YAP、p73 在乳腺癌中的表达及其与临床病理特征的关系。

1 资料与方法

1.1 标本来源

选取我院 2007—2009 年间因乳腺癌行改良根治

收稿日期:2011-03-08;修回日期:2011-09-13

作者单位:570102 海口,海南医学院肿瘤研究所(*:现工作单位:570102 海口,海南医学院附属医院肿瘤外科)

通信作者:刘玉, E-mail: lamliuyu@tom.com

作者简介:何冬雷(1972-),男,硕士,副主任医师,主要从事乳腺与胃肠肿瘤诊断与治疗

治术的病理标本 60 例,患者术前均未接受放疗和化疗,均为女性,年龄 30~73 岁,平均年龄 51 岁。按组织学分级分为 I 级(高分化)12 例,II 级(中分化)31 例,III 级(低分化)17 例。按肿瘤直径大小分为小于 2 cm 的 11 例,2~5 cm 的 21 例,大于 5 cm 的 28 例。按有无腋窝淋巴结转移分类,有转移者 35 例,无转移者 25 例;对照组选癌旁经病理确诊为正常乳腺组织的标本 26 例。

1.2 主要试剂

YAP 兔抗人多克隆抗体、鼠抗人 p73 单克隆抗体、免疫组织化学 SP 试剂盒均购自北京中杉金桥生物公司。

1.3 方法

YAP、p73 检测采用免疫组织化学 SP 方法。切片常规脱蜡和水化后,PBS 漂洗 3 次,每次 3 min;于湿盒内用 3% 过氧化氢溶液(A 液)室温孵育 10 min,滴加 5%~10% 封闭用正常动物非免疫血清工作液(B 液)。滴加一抗工作液,YAP、p73 于 37℃ 培养箱内孵育 12 h,PBS 漂洗 3 次,每次 3 min。滴加生物素标记二抗工作液(C 液);滴加辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素工作液,配制新鲜的 DAB 显色剂。苏木精对比染色细胞核,染色时间 2 min。

1.4 结果判定

YAP 和 p73 的阳性部位均主要定位于细胞核,根据阳性细胞百分率和染色程度进行半定量分析。

(-):无显色反应;(+):阳性细胞数<25%,染色呈棕黄色;(++):阳性细胞数 25%~50%,染色呈棕黄或棕色;(+++):阳性细胞数>50%,染色呈棕色或深棕色;每例细胞染色积分 = A×B,按照积分分值可以分为:阴性表达或无表达(-),0~3 分;阳性表达(+),4~8 分强阳性表达(+++)。

1.5 统计学方法

所得数据采用 SPSS13.0 软件进行统计学处理,计数资料以百分率表示,采用 χ^2 检验对各组 YAP 阳性表达率之间的差异进行统计比较,计算 χ^2 值和 P 值,相关性分析采用 Spearman 等级相关性分析,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 YAP、p73 在各组织中的表达

YAP 蛋白在乳腺癌组织中的表达明显低于癌旁正常乳腺组织,差异有统计学意义($\chi^2=28.7, P<0.0001$)。p73 蛋白在乳腺癌组织中的表达明显高于癌旁正常乳腺组织,差异有统计学意义($\chi^2=9.72, P=0.0018$),见表 1、图 1~5。

2.2 YAP、p73 的表达与临床病理学指标间的关系

YAP 蛋白的阳性表达与肿瘤的组织分化程度、肿瘤大小和淋巴结转移无明显相关性,其差异无统计学意义($P>0.05$)。p73 蛋白的表达与肿瘤的组织分化程度、肿瘤大小和淋巴结转移相关,其差异具有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 1 YAP、p73 在癌旁正常乳腺组织和乳腺癌组织中的表达

Table 1 Expression of YAP, p73 in adjacent normal breast tissue and breast cancer tissues

Groups	Cases	YAP			χ^2	P	p73			χ^2	P
		+~ +++	-	Positive (%)			+~ +++	-	Positive (%)		
Normal	26	25	1	96.15			2	24	7.69		
Breast carcinoma	60	20	40	33.33	28.7	<0.0001	25	35	41.67	9.72	0.0018

表 2 乳腺癌组织中 YAP、p73 的表达与临床病理学指标间的关系

Table 2 Expression of YAP and p73 in breast cancer and the relationships between clinicopathological parameters

Groups	Cases	YAP			P	p73			P
		+~ +++	-	Positive(%)		+~ +++	-	Positive(%)	
Histological grade									
I	12	4	8	33.33		2	10	16.7	
II	31	9	22	29.03	0.39	14	17	45.2	0.0023
III	17	7	10	41.18		6	11	35.3	
Tumor size(cm)									
<2	11	3	8	27.27		1	10	9.09	
2~5	21	8	13	38.01	0.82	6	15	28.6	0.019
>5	28	9	19	32.14		18	10	64.3	
Lymph node metastasis									
No	25	8	17	32.0		6	19	24.0	
Yes	35	12	23	34.29	0.86	19	16	54.3	0.032

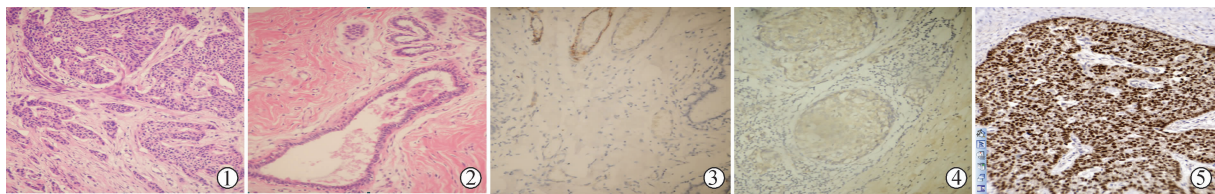


图 1 乳腺浸润性癌 (HE × 200)

Figure 1 Breast carcinoma (HE × 200)

图 2 癌旁乳腺组织 (HE × 200)

Figure 2 Carcinoma adjacent tissue(HE × 200)

图 3 癌旁乳腺组织 YAP 呈阳性表达(SP × 200)

Figure 3 The positive expression of YAP in carcinoma adjacent tissue (SP × 200)

图 4 乳腺癌组织 YAP 呈阳性表达(SP × 200)

Figure 4 The positive expression of YAP in carcinoma tissue(SP × 200)

图 5 乳腺癌组织 p73 呈阳性表达(SP × 200)

Figure 5 The positive expression of p73 in carcinoma tissue(SP × 200)

2.3 乳腺癌组织中 YAP 与 p73 表达的关系

经 χ^2 检验两者有相关性,经非参数的 Spearman 相关分析,乳腺癌组织中的 YAP 蛋白的表达与 p73 蛋白的表达呈正相关,见表 3。

表 3 YAP 和 p73 在乳腺癌中表达的关系

Table 3 The relationship between YAP expression and p73 expression in breast carcinoma

	p73 positive	p73 negative	χ^2	r	P
YAP positive	17	3			
YAP negative	8	32	23.18	0.615	<0.01

3 讨论

Sudol^[5]于 1994 年首次发现 YAP 绑定于非受体酪氨酸蛋白激酶 Src 家族成员 c-Yes 的 SH3 基序,将其命名为 Yes 相关蛋白。其基因定位于人类染色体 11q13^[6]而这一区域是人类许多肿瘤发生杂合性缺失的热点部位^[7-8];YAP 在正常机体内参与基因转录调节和细胞信号转导。近年研究发现,YAP 在一些肿瘤组织细胞中表达增高、活性增强,推测其可能作为致癌因子参与肿瘤的发生和发展。Udan 等^[9]研究发现 YAP 在果蝇中通过调控细胞的增殖与凋亡,控制组织器官的大小与肿瘤的形成,有可能成为区别肿瘤良恶性、恶性程度及预测转移、预后的指标。XU 等^[10]研究发现 YAP 在肝癌中呈现高表达,并且与血清中 AFP 的表达和肿瘤的分化相关,是肝癌患者的总生存率和无病生存率一个独立的预后指标。Modena^[11]研究发现 YAP 在原发性颅内室管膜瘤中出现明显的扩增。而 Olson^[12]研究发现,如果 YAP 表达缺失,将导致细胞无控制的生长,最终导致肿瘤形成,这说明 YAP 的表达缺失

与恶性肿瘤形成相关,有可能是各种恶性肿瘤形成早期的一个标志。

本研究结果提示在乳腺癌组织中 YAP 的表达与组织学分级、各不同大小的肿瘤分组间及淋巴结转移情况之间的差异均没有统计学意义,而 YAP 的表达在正常的乳腺组织和乳腺癌组织之间的差异显著,这说明 YAP 的表达与乳腺癌形成相关,有可能是乳腺癌形成早期的一个标志。

Kaghad 等^[13]1997 年意外发现一个 p53 基因的相似物,被命名为 p73 基因。p73 基因具有突变率低、多为单等位基因表达,且 p73 基因不被 DNA 损伤所诱导。Mai 进一步研究发现,p73 在肺癌组织中是双等位基因表达,而对应正常肺组织中却为单等位基因表达,认为 p73 在肺癌中发生印迹丢失,使沉寂的等位基因被激活^[14]。近来的研究对于“p73 是抑癌基因”的假说提出了疑问,因为 p73 不仅能在正常的肿瘤组织和细胞系中双等位基因表达,而且在肿瘤中发生突变的几率也非常低^[15]。Sunahara 等^[16]发现结直肠癌中 p73 表达水平高于正常黏膜。李陕区等^[17]均报道 p73 基因以等位基因缺失、高表达方式参与结肠癌的发生,即沉默基因也被激活表达。Dominguez 等^[18]在对乳腺癌进行研究时还发现 p73 的表达水平、杂合性缺失率与肿瘤的病理分型、分化程度及预后有明显相关性,p73 表达水平及杂合性缺失率升高可预示患者预后不良。本实验提示 p73 在乳腺癌中存在过度表达。由于大多数研究中均极少发现乳腺癌有 p73 基因的突变存在,故我们推测免疫组织化学方法检测到的 p73 蛋白可能是野生型,认为野生型 p73 蛋白可能在乳腺癌的发生中起一定的作用。本实验结果说明 p73 的表达率随临床分期的进展而逐渐增加,故我们认为 p73 蛋白

的过表达与乳腺癌的发展和转移有关,尤其是在乳腺癌发展的中晚期所起的作用更明显。所以在一定程度上,此指标也可为判断乳腺癌的恶性侵袭度及预后提供参考。

本研究结果发现在乳腺癌中 YAP 和 p73 表达呈正相关。关于 YAP 与 p73 相关性的研究发现在正常机体内,YAP 的 S127 位点被 PKB/AKT 磷酸化后与胞质蛋白 14-3-3 相结合而定位于细胞质,其在细胞核内的基因转录调节活性被抑制;当 DNA 受损后,AKT 的活性被抑制,活化的 YAP 在 PML (promyelocytic leukemia gene) 的介导下进入核体并与 p73 结构中的 PPXY 基序结合,从而增强转录因子 p73 的稳定性、激活 p73 的转录活性、加强 p73 介导的凋亡靶基因 p53AIP1 和 BAX 的活性,而 YAP 表达沉默则会降低 p73 介导的细胞凋亡。肿瘤细胞在受到顺铂刺激后,c-Jun 能增强 p73 的稳定性,促进细胞死亡,另外将 YAP、Itch 及 p73 共同表达于细胞系中发现,YAP 通过与 Itch 竞争 p73 结构中 PPXY 基序,明显削弱 Itch 与 p73 的结合,阻止 Itch 介导的 p73 水解,从而稳定 p73 介导的凋亡功能。Itch 是 E3 泛素蛋白酶,通过泛素化 p73,促进其水解。推测 YAP 通过两条途径促进 p73 功能发挥:YAP 通过增强 p73 对靶基因的转录功能,增强细胞凋亡;通过与 Itch 竞争 p73 位点,抑制 Itch 对 p73 的转录抑制,保证 p73 功能的正常发挥。

本研究结果显示,随着乳腺癌的发生、发展,YAP 的表达缺失和 p73 的高表达,提示两者均可能在乳腺癌的发生、发展中起着作用。联合检测两者在乳腺癌中的表达,敏感度显著升高,所以,YAP 和 p73 可作为一种临床诊断标志物,对乳腺癌的早期发现和早期诊断有一定的临床意义。

参考文献:

[1] Smith JS, Tachibana I, Passe SM, et al. PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme [J]. J Natl Cancer Inst, 2001, 93(16): 1246-1256.

[2] Ogawa M, Yamamoto H, Nagano H, et al. Hepatic expression of ANG2 RNA in metastatic colorectal cancer [J]. Hepatology, 2004, 39(2): 528-539.

[3] 贺荣芳,文继舫. 抑癌基因 PTEN 与肿瘤的研究进展 [J]. 国外医学(生理病理科学与临床分册), 2005, 25(3): 257-260.

[4] Dickman S. First p53 relative may be a new tumor suppressor [J]. Science, 1997, 277(5332): 1605-1606.

[5] Sudol M. Yes-associated protein (YAP65) is a proline-rich phosphoprotein that binds to the SH3 domain of the Yes proto-oncogene product. Oncogene, 1994, 9(8): 2145-2152.

[6] Sudol M. Structure and function of the WW domain [J]. Prog Biophys Mol Biol, 1996, 65 (1-2): 113-132.

[7] Overholtzer M, Zhang J, Smolen GA, et al. Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(33): 12405-12410.

[8] Zender L, Spector MS, Xue W, et al. Identification and validation of oncogenes in liver cancer using an integrative oncogenomic approach [J]. Cell, 2006, 125 (4): 1253-1267.

[9] Udan RS, Kango-Singh M, Nolo R, et al. Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway [J]. Nat Cell Biol, 2003, 5(10): 914-920.

[10] Xu MZ, Yao Ti, Lee NP, et al. Yes-associated protein is an independent prognostic marker in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer, 2009, 115(19): 4576-4585.

[11] Modena P, Lualdi E, Facchinetti F, et al. Identification of tumor-specific molecular signatures in intracranial ependymoma and association with clinical characteristics [J]. J Clin Oncol, 2006, 24(33): 5223-5233.

[12] Olson MF. Mechanisms of tumour cell invasion and metastasis [J]. J Mol Med, 2007, 85(6): 543-544.

[13] Kaghad M, Bonnet H, Yang A, et al. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers [J]. Cell, 1997, 90(4): 809-819.

[14] Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu onco-gene [J]. Science, 1987, 235(4785): 177-182.

[15] Kaelin WG Jr. The P53 gene family [J]. Oncogene, 1999, 18 (53): 7701-7705.

[16] Sunahara M, Ichimiya S, Nimura Y, et al. Mutational analysis of the p73 gene localized at chromosome 1p36.3 in colorectal carcinomas [J]. Int J Oncol, 1998, 13(2): 319-323.

[17] 李陕区, 崔大祥, 刘变英, 等. 结肠癌中 p73 基因改变的意义 [J]. 第四军医大学学报, 2000; 21(3): 314-316.

[18] Dominguez G, Silva JM, Silva J, et al. Wild type p73 overexpression and high-grade malignancy in breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2001 66(3): 183-190.

[编辑校对: 黄国玲]