引用本文:刘磊,杨长俊.胶质瘤相关癌基因蛋白-1在管腔型乳腺癌组织中表达及其与预后的关系[J].安徽医药,2021,25(10):2067-2070.**DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.10.037.**

◇临床医学◇

胶质瘤相关癌基因蛋白-1在管腔型乳腺癌组织中表达及其与预后的关系

刘磊,杨长俊

作者单位:信阳市中心医院病理科,河南 信阳464000

通信作者:杨长俊,男,副主任医师,研究方向为肿瘤病理,Email:116589760@qq.com

摘要: **目的** 探讨胶质瘤相关癌基因蛋白-1(Gli1)在管腔(Luminal)型乳腺癌组织中表达及其与预后的关系。**方法** 选取信阳市中心医院2012年7月至2014年7月收治的68例Luminal型乳腺癌病人临床资料进行回顾性分析。采用免疫组化方法检测乳腺癌组织及癌旁组织Gli1蛋白表达情况,分析Gli1蛋白表达与Luminal型乳腺癌病理特征及预后关系。**结果** 乳腺癌组织Gli1高表达率(45.59%)高于癌旁组织Gli1高表达率(13.33%),χ^2=9.433,差异有统计学意义(P<0.05);Gli1蛋白高表达与Luminal型乳腺癌淋巴结转移密切相关(P<0.05);Gli1高表达5年无复发生存率(67.74%)低于Gli1低表达5年无复发生存率(89.19%),差异有统计学意义(P<0.05);淋巴结转移、Gli1高表达是影响Luminal型乳腺癌无复发生存时间的独立危险因素(P<0.05)。**结论** Gli1蛋白在Luminal型乳腺癌组织中表达上调,并且与Luminal型乳腺癌复发转移密切相关。

关键词: 乳腺肿瘤; 胶质瘤相关癌基因蛋白-1; Luminal型乳腺癌; 淋巴结转移; 无复发生存率

Expression of gli1 in luminal breast cancer tissue and its relationship with prognosis

LIU Lei,YANG Changjun

*Author Affiliation:Department of Pathology, Xinyang Central Hospital, Xinyang, Henan,*464000,*China*

Abstract: **Objective** To explore expression of glioma oncogene protein-1 (Gli1) in Luminal breast cancer tissue and its relationship with prognosis.**Methods** The clinical data of 68 patients with Luminal breast cancer who were admitted to the hospital from July 2012 to July 2014 were retrospectively analyzed. The expression of Gli1 in breast cancer tissue and para-cancerous tissue was detected by immunohistochemistry. The relationship between Gli1 expression and pathological features of Luminal breast cancer, prognosis was analyzed.**Results** The high expression rate of Gli1 in breast cancer tissue (45.59%) was higher than 13.33% in para-cancerous tissue (χ^2=9.433, P<0.05). The high expression of Gli1 was closely related to lymph node metastasis of Luminal breast cancer (P<0.05). The 5-year recurrence-free survival rate of Gli1 high expression (67.74%) was lower than 89.19% of Gli1 low expression (P<0.05). Lymph node metastasis and Gli1 high expression were independent risk factors influencing recurrence-free survival of Luminal breast cancer (P<0.05).**Conclusion** Gli1 is up-regulated in Luminal breast cancer tissue, which is closely related to recurrence and metastasis of Luminal breast cancer.

Key words: Breast neoplasms; Glioma oncogene protein-1; Luminal breast cancer; Lymph node metastasis; Recurrence-free survival

乳腺癌是威胁女性生命健康的常见恶性肿瘤,临床上一般根据雌激素受体(estorgen receptor,ER)、孕激素受体(progesterone receptor,PR)和人类表皮生长因子受体-2(human epidermal growth factor receptor-2,HER-2)表达情况对乳腺癌进行分类,包括管腔(Luminal)型、HER-2过表达型及基底样(Basal-like)型[1-2]。其中Luminal型又可分为Luminal A型和Luminal B型,预后相对较好,但远处转移、局部复发仍然存在[3]。Hedgehog信号通路可参与胚胎生长分化、器官形成、组织修复等生理过程,并与肿瘤发生密切相关。胶质瘤相关癌基因蛋白-1(glioma oncogene protein 1,Gli1)是作为Hedgehog信号通路中的下游转录因子,能反映Hedgehog信号通路活化状态及靶基因转录情况[4]。国外有研究显示,Gli1阳性表达与Luminal A型乳腺癌病人的临床预后较差有关[5],但国内尚无相关研究报道。鉴于此,本研究旨在分析Gli1蛋白在Luminal型乳腺癌组织中表达情况及其与预后的关系,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取信阳市中心医院2012年7月至2014年7月收治的68例Luminal型乳腺癌病人临床资料进行回顾性分析。纳入标准:(1)原发性乳腺癌;(2)术后病理检查为Luminal型乳腺癌;(3)术前未采取任何治疗;(4)无卵巢癌或乳腺癌史。排除标准:

(1)术前有远处转移者;(2)男性乳腺癌;(3)随访资料不完整者。入组病人年龄范围23~84岁,年龄(57.21±10.38)岁,Luminal A型28例,Luminal B型40例。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

1.2 主要试剂 鼠抗人Gli1单克隆抗体购自上海群己生物科技有限公司;SP免疫组化试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司;DAB显色试剂盒购自丹麦Dako公司。

1.3 免疫组化及判定方法 采用免疫组化SP法检测Gli1蛋白表达情况。根据SP试剂盒说明书步骤进行操作。结果判定:采用半定量法评估阳性细胞数及染色强度,阳性细胞数≤25%记1分,25%~50%记2分,51%~75%记3分,≥75%为4分;无染色记作0分,染色强记作3分。免疫反应评分(immunoreactivity score,IRS)=阳性细胞数评分×染色强度评分。IRS评分为0~6分记为Gli1蛋白低表达,IRS评分>6分记为Gli1蛋白高表达。

PR、ER、HER-2检测方法及阳性判定方法同文献[6]。

1.4 统计学方法 采用SPSS 20.0软件进行统计学分析,采用GraphPad Prism 6软件进行图片制作。计数数据用例(%)表示,组间比较行χ^2检验或校正χ^2检验。生存分析采用Kaplan Merier分析,组间比较采用Log-rank检验;采用Cox比例风险回归模型分析病人预后相关影响因素,变量筛选采用条件向前法,选入P≤0.05,剔除P>0.10变量,检验水准α=0.05,均为双侧检验。

2 结果

2.1 Gli1蛋白在乳腺癌组织及癌旁组织中表达情况分析 Gli1蛋白主要表达于细胞核和细胞浆中,以细胞核或细胞质染成黄棕色或黄褐色均匀颗粒状为阳性。乳腺癌组织Gli1高表达率45.59%(31/68)高于癌旁组织Gli1高表达率13.33%(4/30),χ^2值=9.433,P=0.002,差异有统计学意义。

2.2 Gli1蛋白与Luminal型乳腺癌病理特征关系 Gli1蛋白高表达与Luminal型乳腺癌淋巴结转移密切相关(P<0.05),见表1。

表1 Gli1蛋白与Luminal型乳腺癌病理特征关系

临床资料	例数	Gli1高表达	Gli1低表达	χ^2值	P值
年龄				0.330	0.565
≤50岁	26	13(50.00)	13(50.00)		
>50岁	42	18(42.86)	24(57.14)		
绝经情况				1.052	0.305
未绝经	22	12(54.55)	10(45.45)		
绝经	46	19(41.30)	27(58.70)		
肿瘤长径				1.675	0.196
≤2 cm	45	18(40.00)	27(60.00)		
>2 cm	23	13(56.52)	10(43.48)		
组织学分级				4.481	0.106
Ⅰ级	9	3(33.33)	6(66.67)		
Ⅱ级	41	16(39.02)	25(60.98)		
Ⅲ级	18	12(66.67)	6(33.33)		
淋巴结转移				5.403	0.020
无	43	15(34.88)	28(65.12)		
有	25	16(64.00)	9(36.00)		
PR				0.114	0.735
阴性	12	6(50.00)	6(50.00)		
阳性	56	25(44.64)	31(55.36)		
ER				0.562	0.453
阴性	3	2(66.67)	1(33.33)		
阳性	65	29(44.62)	36(55.38)		
HER-2				1.723	0.189
阴性	57	24(42.11)	33(57.89)		
阳性	11	7(63.64)	4(36.36)		

注:Gli1为胶质瘤相关癌基因蛋白-1,Luminal为管腔型乳腺癌,PR为孕激素受体,ER为雌激素受体,HER-2为人类表皮生长因子受体-2。

2.3 Gli1表达与Luminal型乳腺癌预后关系 所有病例均获得随访,随访截止时间为2018年7月,随访时间范围为6~60个月,中位随访时间为38个月;Gli1高表达5年复发人数为10人,无复发生存率为67.74%(21/31),Gli1低表达5年复发人数为4人,无复发生存率为89.19%(33/37),组间差异有统计学意义(P<0.05),见图1。

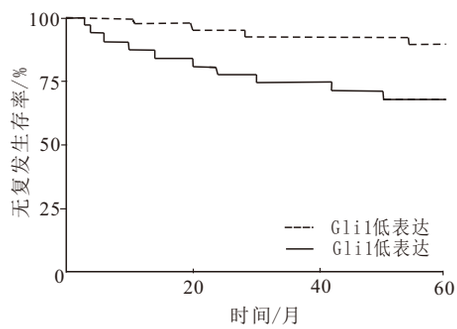

图1 胶质瘤相关癌基因蛋白-1(Gli1)表达情况与Luminal型乳腺癌无复发生存分析

2.4 影响Luminal型乳腺癌预后的COX回归分析 经COX单因素和多因素分析显示,淋巴结转移、Gli1高表达是影响Luminal型乳腺癌无复发生存时间的独立危险因素(P<0.05),见表2。

3 讨论

乳腺癌发病原因复杂,可能与环境因素、遗传因素、雌激素长期刺激等有关,发病机制尚未明确[7]。有研究显示,Hedgehog信号通路活化可能是引起乳腺癌发生的机制之一,在乳腺癌组织中发现Hedgehog信号通路相关分子的异常表达[8]。Hedge-

表2 影响Luminal型乳腺癌预后的COX回归分析

因素	单因素分析		多因素分析	
	HR(95%*CI*)	*P*值	*HR*(95%*CI*)	*P*值
年龄	0.768(0.453~1.102)	0.840		
绝经情况	0.651(0.405~0.851)	0.767		
肿瘤长径/cm	1.182(0.724~2.248)	0.235		
组织学分级	1.192(0.773~2.065)	0.229		
淋巴结转移	2.473(1.356~3.578)	0.021	2.153(1.142~3.137)	0.026
PR阳性	1.530(0.713~2.026)	0.162		
ER阳性	1.007(0.164~1.887)	0.155		
HER-2阳性	1.819(0.872~3.383)	0.048	1.604(0.866~2.984)	0.057
Gli1高表达	1.786(0.782~3.415)	0.041	1.687(0.803~3.113)	0.045

注:Gli1为胶质瘤相关癌基因蛋白-1,Luminal为管腔型乳腺癌,PR为孕激素受体,ER为雌激素受体,HER-2为人类表皮生长因子受体-2。

hog信号通路在胚胎细胞生长分化过程中起到调控作用,当该通路失活时,相关蛋白异常表达,从而引起肿瘤发生发展。Hedgehog信号通路主要包括Hh信号分子、信号分子受体Patched1(Ptc1)、GPCR类膜蛋白Smoothened(Smo)及转录因子Gli,Hedgehog蛋白通过与Ptc1结合,释放Smo蛋白,抑制Gli蛋白水解,未水解的Gli蛋白进入细胞核,促进原癌基因、细胞周期蛋白等靶基因转录,同时Gli蛋白还可进一步促进Hedgehog蛋白转录,具有正反馈调节作用,不断激活Hedgehog信号通路,使肿瘤恶化[9]。由此可见,Gli蛋白是Hedgehog信号通路中直接作用于靶基因,反应Hedgehog信号通路活化情况的关键蛋白。

Neelakantan等[10]研究发现,在人类乳腺癌中,上皮细胞-间充质转化与激活的Hedgehog信号通路密切相关,且Gli抑制剂能对上皮细胞-间充质转化诱导的Gli激活起作用,引起肿瘤发生。孟尚文、郑建云[11]研究显示,Gli1蛋白阳性表达是影响乳腺癌淋巴结转移的独立危险因素,可作为淋巴结转移的参考指标。但目前关于Gli1蛋白表达与Luminal型乳腺癌关系研究较少,本研究结果显示,Luminal型乳腺癌组织中,Gli1蛋白高表达率明显高于癌旁组织,且与淋巴结转移密切相关,伴有淋巴结转移者Gli1蛋白高表达率明显较高。对Gli1蛋白表达与Luminal型乳腺癌病人预后情况分析发现,Gli1蛋白高表达者5年无复发生存率明显低于Gli1蛋白低表达者,并且是影响Luminal型乳腺癌预后的独立危险因素,提示Gli1蛋白高表达预示着Luminal型乳腺癌早期转移复发。

Gli1诱导肿瘤发生的机制可能如下:(1)Gli1可直接诱导Bcl-2表达,抑制癌细胞凋亡;(2)Gli1可促进细胞周期蛋白表达,调控细胞周期,促进癌细胞增殖;(3)Gli1可直接促进上皮细胞-间充质转化发生,增强癌细胞侵袭能力[12-14]。丁斌等[15]研究发现环杷明作为Hedgehog信号通路抑制剂,处理人乳腺癌细胞MDA-MB-231后,Gli1蛋白和Bcl-2蛋白表达量明显降低,癌细胞增殖受到抑制,凋亡率升高,认为Gli1可能成为乳腺癌治疗的潜在靶点。Oladapo等[16]采用不同Gli拮抗剂处理乳腺癌细胞,结果发现Gli拮抗剂均显著下调了细胞周期素Cyclin D、Cyclin E等细胞周期相关蛋白,降低了癌细胞生长速度,认为Gli1的激活在促进细胞增殖、运动、肿瘤生长中起到重要作用,而Gli1拮抗剂可将此过程逆转。

综上所述,Luminal型乳腺癌组织中Gli1表达上调,高表达Gli1与Luminal型乳腺癌淋巴结转移相关,且是Luminal型乳腺癌复发转移的独立危险因素,对预后具有一定评估价值,同时也可成为临床治疗乳腺癌的潜在靶点。

参考文献

[1] 刘欣,毛大华. Ki-67在Luminal型乳腺癌患者中的表达水平及其与临床病理特征的关系[J]. 中国老年学杂志,2017,37(16):3954-3956.

[2] 宋方彬,李善宝,吴珺艺,等. Ki-67、PR在Luminal型乳腺癌中的表达及预后意义[J]. 中华普通外科杂志,2017,32(9):787-788.

[3] 王洁,朱信信,沈贵华,等. p-mTOR在Luminal型乳腺癌中的表达情况及预后[J]. 中国肿瘤临床与康复,2017,24(3):270-275.

[4] NI W, YANG Z, QI W, et al. Gli1 is a potential cancer stem cell marker and predicts poor prognosis in ductal breast carcinoma[J]. Hum Pathol,2017,69:38-45.

[5] RUDOLPH M, SIZEMORE ST, LU Y, et al. A hedgehog pathway-dependent gene signature is associated with poor clinical outcomes in Luminal A breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2018,169(3):457-467.

[6] 林兴滔,葛岩,王慧玲,等. 不同保存条件下石蜡切片乳腺癌PR、ER和HER-2状态的变化[J]. 临床与实验病理学杂志,2019,35(2):232-233.

[7] DESANTIS CE, MA J, GODING SAUER A, et al. Breast cancer statistics, 2017, racial disparity in mortality by state[J]. CA Cancer J Clin, 2017,67(6):439-448.

[8] ARNOLD KM, POHLIG RT, SIMS-MOURTADA J. Co-activation of hedgehog and wnt signaling pathways is associated with poor outcomes in triple negative breast cancer[J]. Oncol Lett, 2017, 14(5):5285-5292.

[9] HASSOUNAH NB, NUNEZ M, FORDYCE C, et al. Inhibition of ciliogenesis promotes hedgehog signaling, tumorigenesis, and metastasis in breast cancer[J]. Mol Cancer Res, 2017, 15(10): 1421-1430

[10] NEELAKANTAN D, ZHOU H, OLIPHANT M, et al. EMT cells increase breast cancer metastasis via paracrine GLI activation in neighbouring tumour cells[J]. Nat Commun, 2017,8:15773.

[11] 孟尚文,郑建云. Gli1在乳腺癌侵袭转移过程中的作用及与病理特征的关系[J]. 西南国防医药,2018,28(5):425-428.

[12] BENVENUTO M, MASUELLI L, DE SMAELE E, et al. In vitro

and in vivo inhibition of breast cancer cell growth by targeting the Hedgehog/GLI pathway with SMO (GDC-0449) or GLI (GANT-61) inhibitors[J]. Oncotarget, 2016,7(8):9250-9270.

[13] TONG W , QIU L , QI M , et al. GANT-61 and GDC-0449 induce apoptosis of prostate cancer stem cells through a GLI-dependent mechanism[J]. J Cell Biochem,2018, 119(4):3641-3652.

[14] ARMAS-LÓPEZ L, ZÚÑIGA J, ARRIETA O, et al. The Hedgehog-GLI pathway in embryonic development and cancer: implications for pulmonary oncology therapy [J]. Oncotarget, 2017, 8(36):60684-60703.

[15] 丁斌, 李建华, 王芳, 等. 红花多糖联合环杷明对乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2017, 34(11):1892-1896.

[16] OLADAPO HO , TARPLEY M , SAUER SJ , et al. Pharmacological targeting of GLI1 inhibits proliferation, tumor emboli formation and in vivo tumor growth of inflammatory breast cancer cells [J]. Cancer Lett, 2017, 411:136-149.

(收稿日期:2019-10-14,修回日期:2019-11-11)

引用本文:苏长英,孟艳红,吴美龄.内质网应激相关蛋白1过表达对缺氧/复氧诱导的H9c2心肌细胞凋亡的影响[J].安徽医药,2021,25(10):2070-2074.**DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.10.038.**

◇临床医学◇

内质网应激相关蛋白1过表达对缺氧/复氧诱导的H9c2心肌细胞凋亡的影响

苏长英[1],孟艳红[1],吴美龄[2]

作者单位:[1]枣庄矿业集团中心医院呼吸内科,山东 枣庄277500;

[2]枣庄市妇幼保健院健康管理中心,山东 枣庄277500

摘要: 目的 研究内质网应激相关蛋白1(SERP1)过表达对缺氧/复氧(H/R)诱导的大鼠胚胎H9c2心肌细胞凋亡的影响。**方法** 2018年1—12月将中国科学院上海细胞库大鼠H9c2心肌细胞系建立H/R损伤大鼠心肌细胞模型,采用pCMV6质粒为载体构建内质pCMV6-网应激相关蛋白1(pCMV6-SERP1)过表达重组质粒,分别设H9c2心肌细胞为正常对照组(NC组),H/R损伤(缺氧4 h/复氧4 h)H9c2心肌细胞为H/R组,H/R损伤H9c2心肌细胞转染pCMV6空质粒为H/R+ pCMV6组,H/R损伤H9c2心肌细胞转染pCMV6- SERP1过表达重组质粒为H/R+ pCMV6- SERP1组,采用噻唑蓝(MTT)法检测各种H9c2心肌细胞存活率,采用Annexin V-FITC/PI双染技术检测各组H9c2心肌细胞凋亡率,采用实时定量PCR(RT-qPCR)和免疫印迹法分别检测各组细胞SERP1蛋白及凋亡相关蛋白的表达水平。**结果** 与NC组[(1.06±0.21)、(0.41±0.07)]比较,H/R组、H/R+pCMV6组H9c2心肌细胞SERP1 mRNA[(0.47±0.09)、(0.48±0.08)]及蛋白表达水平[(0.25±0.04)、(0.26±0.05)]显著降低,H/R+ pCMV6-SERP1组H9c2心肌细胞SERP1 mRNA(2.94±0.52)及蛋白表达水平(0.83±0.12)显著增加(P<0.05),与H/R组、H/R+ pCMV6组比较,H/R+pCMV6-SERP1组H9c2心肌细胞中内质网应激相关蛋白1 微小RNA(SERP1 mRNA)及蛋白水平显著升高(P<0.05)。与NC组[(100.00±00.00)%、(4.45±0.62)%]比较,H/R组、H/R+pCMV6组、H/R+pCMV6-SERP1组H9c2心肌细胞存活率[(49.86±5.14)%、(48.75±5.23)%、(89.72±8.61)%]、B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)蛋白水平显著降低(P<0.05),H9c2心肌细胞凋亡率[(35.84±4.13)%、(33.66±4.07)%、(10.96±1.74)%]、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)蛋白表达水平显著增加(P<0.05);与H/R组、H/R+ pCMV6组比较,H/R+ pCMV6- SERP1组H9c2心肌细胞中存活率、Bac-l蛋白表达水平显著升高,细胞凋亡率、Bax、Caspase-3蛋白表达水平显著降低(P<0.05)。**结论** SERP1过表达可能通过上调Bacl-2蛋白,下调Bax、Caspase-3蛋白表达,对缺氧/复氧诱导的H9c2心肌细胞凋亡有一定保护作用。

关键词: 细胞凋亡; 心肌再灌注; 内质网应激相关蛋白1; 缺氧/复氧; 大鼠H9c2心肌细胞

Effect of SERP1 overexpression on hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis of H9c2 cardiomyocytes

SU Changying[1],MENG Yanhong[1],WU Meiling[2]

Author Affiliations:[1]Zaozhuang Mining Group Central Hospital, Department of Respiratory Medicine, Zaozhuang, Shandong 277500, China;[2]Health Management Center of Zaozhuang Maternal and Child Health Hospital, Zaozhuang, Shandong 277500, China

Abstract: Objective To study the effect of endoplasmic reticulum stress-related protein 1 (SERP1) overexpression on the apoptosis of rat embryonic H9c2 cardiomyocytes induced by hypoxia/reoxygenation (H/R).**Methods** The rat cardiomyocyte model of H/R in-