

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.10.008

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.10.008

乳腺浸润性导管癌中NEDD9和EZH2表达的相关性及与临床病理特征的关系

张果, 杨金花, 杨迷玲, 徐小艳

(郑州人民医院病理科, 郑州 450003)

[摘要] 目的: 探讨NEDD9和EZH2在乳腺浸润性导管癌中的表达及其与临床病理参数的关系, 并分析其相关性。方法: 收集郑州人民医院病理科2013年1月至2017年5月存档乳腺浸润性导管癌蜡块120例及30例正常乳腺组织, 采用免疫组织化学Envision检测标本中NEDD9和EZH2蛋白的表达情况。结果: 乳腺浸润性导管癌组织中NEDD9和EZH2的阳性率分别为65%和80%, 均高于正常乳腺组织, 差异有统计学意义($P < 0.05$); NEDD9蛋白的表达与淋巴结转移、组织学分级、HER-2、雌激素受体(estrogen receptor, ER)及Ki-67增殖指数之间有统计学意义($P < 0.05$), 与乳腺浸润性导管癌患者的年龄、肿瘤直径、TNM分期、孕激素受体(progesterone receptor, PR)均无统计学意义($P > 0.05$); EZH2蛋白的表达与淋巴结转移、HER-2、ER及Ki-67增殖指数之间有统计学意义相关($P < 0.05$), 与乳腺浸润性导管癌患者的年龄、组织学分级、肿瘤直径、TNM分期、PR均无统计学意义($P > 0.05$); EZH2与NEDD9蛋白表达呈正相关($r_s = 0.308, P < 0.05$)。结论: 乳腺浸润性导管癌中EZH2和NEDD9可能存在协同作用, 二者高表达共同促进了乳腺浸润性导管癌的浸润、转移。

[关键词] 乳腺浸润性导管癌; NEDD9; EZH2; 相关性

Expression of EZH2 and NEDD9 in invasive ductal breast carcinoma and its association with clinicopathologic features

ZHANG Guo, YANG Jinhua, YANG Miling, XU Xiaoyan

(Department of Pathology, People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450003, China)

Abstract **Objective:** To investigate the expression of EZH2 and NEDD9 in invasive ductal carcinoma of breast cancer, and to analyze the correlation with clinic pathological indicators. **Methods:** A total of 120 cases of invasive ductal mass and 30 cases of normal tissue from January 2013 to May 2017 were collected. The expressions of NEDD9 and EZH2 protein were detected by Envision immunohistochemical. **Results:** The positive rates of EZH2 and NEDD9 protein in invasive ductal carcinoma of breast was 80% and 65% in breast cancer respectively, which

收稿日期 (Date of reception): 2019-01-18

通信作者 (Corresponding author): 杨金花, Email: jinhuay65@sina.com

基金项目 (Foundation item): 河南省科技公关计划 (182102310355)。This work was supported by the Henan Provincial Science and Technology Tackling Key Project Foundation, China (182102310355).

was higher than that in the normal breast tissue ($P < 0.05$). There were significant correlations between NEDD9 expression and lymph node metastasis, TNM stage, HER-2, ER, and Ki-67 index in invasive ductal carcinoma of breast ($P < 0.05$), but no significant correlation between NEDD9 expression and age, tumor diameter, TNM stage and PR in invasive ductal carcinoma of breast. There were significant correlations between EZH2 expression and lymph node metastasis, HER-2, ER, and Ki-67 index in invasive ductal carcinoma of breast ($P < 0.05$), but no significant correlation between NEDD9 expression and age, tumor diameter, TNM stage and PR in invasive ductal carcinoma of breast. In addition, EZH2 was correlated with NEDD9 ($r_s = 0.308$, $P < 0.05$). **Conclusion:** The high expression of EZH2 in breast cancer may promote the invasion and metastasis of breast cancer cells, which indicates that they may have synergistic action in the development of breast invasive ductal carcinoma.

Keywords breast cancer; NEDD9; EZH2; correlation

乳腺浸润性导管癌是女性最常见的恶性肿瘤^[1]。流行病学研究^[2]显示: 每年死于乳腺浸润性导管癌的患者超过40万。造成乳腺浸润性导管癌死亡的主要原因是复发和转移^[3]。因此, 探索肿瘤浸润、转移的机制成为当前研究的热点。NEDD9(neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 9)是一个与发育相关的基因, 在细胞的增殖与发育中起着重要的作用。EZH2是果蝇基因增强子的人类同源基因, 参与细胞增殖调控、细胞的侵袭和转移。文献[4-5]表明: NEDD9和EZH2均参与了EMT过程, 并且二者均能增加MMP9的活性, 那么二者在浸润性乳腺导管癌中表达是否有相关性。本研究采用免疫组织化学的方法检测NEDD9和EZH2在乳腺浸润性导管癌组织中的表达情况, 分析二者其在乳腺浸润性导管癌组织中的相关性及临床病理特征, 以期对乳腺癌发生、发展和浸润转移提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 病例资料

收集郑州人民医院病理科2013年1月至2017年5月间的乳腺浸润性癌(非特殊类型)病理活检标本, 患者年龄30~81(中位55)岁, 患者术前均未接受放疗或化疗, 并由两位高年资病理医师双盲阅片, 根据WHO(2012)乳腺肿瘤分类及标准对所有病例进行组织分型。取30例正常乳腺组织作为正常对照。

1.2 试剂与方法

标本均以10%中性甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 5 μm 连续切片, 常规HE染色和免疫组织化学染色。NEDD9鼠抗人单克隆抗体购自英国Abcam公司;

EZH2小鼠抗人单克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 即用型Ki-67、雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)、HER-2抗体、免疫组织化学通用型EnVision两步法试剂盒及DAB显色剂均购自福州迈新生物技术有限公司。具体操作步骤按试剂盒说明书进行, 用已知NEDD9和EZH2阳性的乳腺浸润性导管癌组织和PBS分别代替一抗作为阳性和空白对照。

1.3 结果判断

判断NEDD9以细胞质出现均质的淡黄色至棕褐色颗粒为阳性。参照Liu等^[6]的标准, 随机观察10个高倍镜($\times 400$)视野, 平均每高倍镜视野下切片的阳性细胞数百分比; EZH2以胞核出现弥漫均质的淡黄色至棕褐色颗粒为阳性, 每张切片随机选取5个高倍视野观察, 采用半定量评分标准判断^[7]。1)染色强度: 无着色为0分, 弱染色为1分, 中等染色为2分, 强染色为3分; 2)阳性细胞百分比: 无阳性细胞及为0, $\leq 25\%$ 为1分, $26\% \sim 50\%$ 为2分, $51\% \sim 75\%$ 为3分, $> 75\%$ 为4分。两项结果相乘: 0分为阴性组, 1~4分为低表达组, 分析时将阴性和低表达组合并统计; 6~12分为高表达组。

1.4 统计学处理

采用SPSS 19.0软件进行数据分析, 分类数据的比较采用卡方检验, 相关性分析应用Spearman等级相关检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NEDD9 及 EZH2 在乳腺浸润性导管癌及正常乳腺组织中的表达

NEDD9蛋白呈黄色或棕黄色颗粒状, 主要

定位癌细胞的细胞质(图1); EZH2呈黄色或棕黄色颗粒状, 主要定位于癌细胞核(图2); NEDD9蛋白在中乳腺浸润性导管癌组织中阳性表达率65%(33/50), 正常乳腺组织表达率为33%(10/30)(图3), 两者差异有统计学意义($P < 0.05$); EZH2在乳腺浸润性导管癌组织中阳性表达率为中80%(97/120), 正常乳腺组织中表达率为43%(13/30)(图4), 差异有统计学意义($P < 0.05$, 表1)。

2.2 NEDD9 和 EZH2 表达与乳腺浸润性导管癌临床病理参数的关系

乳腺浸润性导管癌组织中, NEDD9高表达与肿瘤淋巴结转移、组织学分级、ER、Ki-67、HER2高表达均有关($P < 0.05$); 与患者年龄、肿瘤直径、TNM高分期、PR表达均无关($P > 0.05$); EZH2高表达与肿瘤淋巴结转移、ER、Ki-67、HER2高表达均相关($P < 0.05$); 与患者年龄、肿瘤直径、组织学分级、PR表达均无关($P > 0.05$, 表2)。

2.3 NEDD9 蛋白和 EZH2 蛋白表达的相关性分析

在乳腺浸润性导管癌中, NEDD9和EZH2同时高表达70例, 两者同时阴性/低表达15例。经Spearman等级相关检验, NEDD9和EZH2在乳腺浸润性导管癌组织中的表达呈表达正相关($r_s = 0.308$, $P < 0.05$, 表3)。

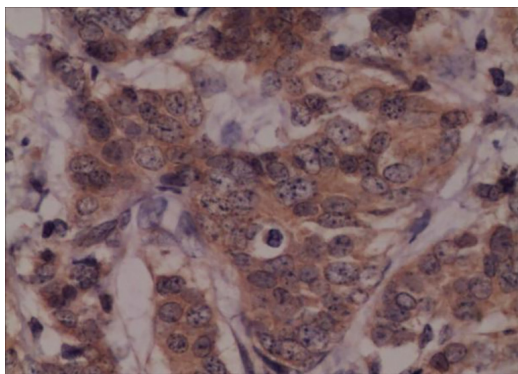


图1 乳腺浸润性导管癌组织中NEDD9高表达(EnVision, $\times 400$)

Figure 1 Expression of NEDD9 in breast cancer (EnVision, $\times 400$)

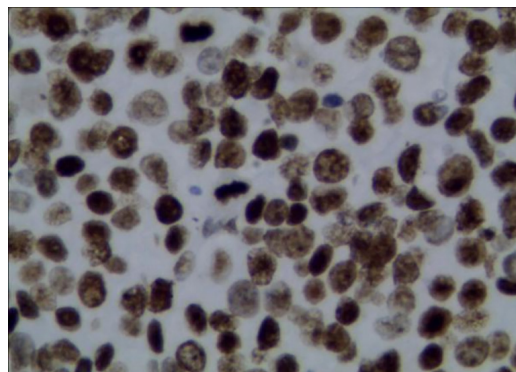


图2 乳腺浸润性导管癌组织中EZH2高表达(EnVision, $\times 400$)

Figure 2 Expression of EZH2 in breast cancer (EnVision, $\times 400$)

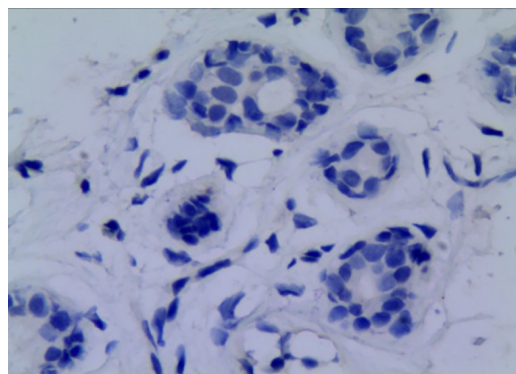


图3 正常乳腺组织中NEDD9的表达(EnVision, $\times 400$)

Figure 3 Expression of NEDD9 in normal breast (EnVision, $\times 400$)

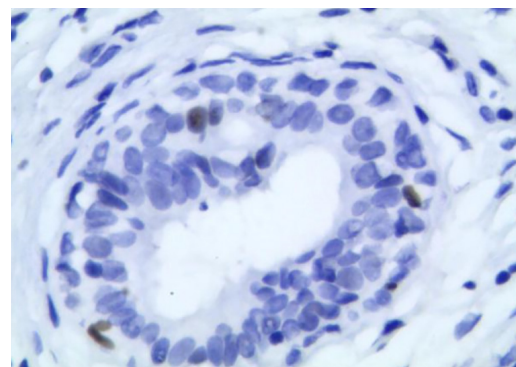


图4 正常乳腺组织中EZH2的表达(EnVision, $\times 400$)

Figure 4 Expression of EZH2 in normal breast (EnVision, $\times 400$)

表1 NEDD9和EZH2乳腺癌浸润性导管癌和正常组织中的表达

Table 1 Express of NEDD9 and EZH2 in normal breast and breast cancer

组别	n	NEDD9高表达/ [例(%)]	χ^2	P	EZH2高表达/ [例(%)]	χ^2	P
乳腺浸润性导管癌	120	78 (65)	9.925	0.002	97 (80)	17.259	<0.001
正常乳腺组织	30	10 (33)			13 (43)		

表2 NEDD9和EZH2表达与乳腺浸润性导管癌临床病理参数的关系

Table 2 Relationship between positive expression of NEDD9, EZH2 and clinicopatological features in breast cancer

临床病理参数	n	NEDD9		χ^2	P	EZH2		χ^2	P
		+	-			+	-		
年龄/岁				0.045	0.832			1.761	0.184
≤50	53	35	18			40	13		
>50	67	43	24			57	10		
肿瘤直径/cm				3.052	0.081			1.292	0.256
≤3	50	28	22			38	12		
>3	70	50	20			59	11		
组织分级				5.011	0.025			3.357	0.067
I + II	95	57	38			80	15		
III	25	21	4			17	8		
淋巴结转移				4.127	0.042			10.363	0.001
无	48	26	22			32	16		
有	72	52	20			65	7		
TNM分期				4.666	0.198			2.228	0.527
I	33	17	16			26	7		
II	40	30	10			30	10		
III	30	19	11			26	4		
IV	17	12	5			15	2		
ER				4.120	0.042			5.403	0.020
阴性	62	35	27			50	18		
阳性	58	43	15			47	5		
PR				3.329	0.068			2.718	0.099
阴性	65	47	18			49	16		
阳性	55	31	24			48	7		
HER2				11.56	0.003			6.387	0.041
0~1+	76	41	35			66	10		
2+	25	20	5			16	9		
3+	19	17	2			15	4		
Ki-67指数/%				5.486	0.019			10.855	0.001
<14	21	10	11			13	10		
≥14	99	68	31			84	13		

表3 乳腺浸润性导管癌组织中NEDD9和EZH2表达的相关性分析

Table 3 Correlation of EZH2 and NEDD9 in invasive ductal breast carcinoma

NEDD9	n	EZH2		r_s	P
		高表达	阴性表达		
高表达	78	70	8	0.308	0.001
阴性表达	42	27	15		

3 讨论

NEDD9在上世纪90年代初首次被提出, 又称为Cal-L, 属于骨架蛋白的CAS家族蛋白成员, 在介导细胞信号转导中起重要作用^[8]。研究^[4-5]表明: 通过上调NEDD9可增加细胞与细胞外基质的黏附, 诱导上皮-间充质转化及基质金属蛋白酶的表达来促进肿瘤细胞的浸润和转移。NEDD9在食管癌^[4]、肝癌^[9]、胰腺癌^[10]、乳腺浸润性导管癌^[11]等恶性肿瘤中均有高表达且与肿瘤的浸润、转移密切相关。本研究表明NEDD9蛋白表达与淋巴结转移有关, 这与以往文献^[11]研究NEDD9在恶性肿瘤的表达基本相似。本研究还发现NEDD9的表达与组织学分级、ER、HER2及Ki-67表达有关, 推测NEDD9蛋白在乳腺浸润性导管癌发展及侵袭过程中可能扮演了重要角色, 是乳腺癌预后不良的参考指标。

EZH2是多梳蛋白抑制复合物2 (polycomb recomplex 2, PRC2) 的重要组成成分, 在细胞增殖、周期调节及胚胎发育中起重要作用^[12]。研究^[5]表明: 在癌的发展过程中, EZH2高表达抑制TLIM基因的表达, 增加MMP9活性, 从而增加前列腺癌细胞浸润。Luo等^[13]报道EZH2通过H3K27me3抑制E-cadherin在喉部鳞状细胞癌中的表达, 并参与调控EMT, 在肿瘤侵袭和转移过程中发挥重要作用。通过对正常结肠组织、腺瘤及结肠癌组织研究^[14]发现: EZH2在结肠癌及腺瘤中的表达均高于正常组织, 而结肠癌明显高于腺瘤, 因此推测EZH2参与结肠癌的发生、发展。本实验结果显示EZH2在乳腺浸润性导管癌组织中表达率显著高于乳腺正常组织, 与文献^[14-15]报道相符。EZH2高表达与肿瘤淋巴结转移、ER、HER2、Ki-67高增殖指数等预后不良指标相关, 提示EZH2高表达可能在乳腺浸润性导管癌分化、增殖过程中发挥重要作用。但本研究结果显示癌旁正常乳腺组织中

EZH2较高表达。Beca等^[16]通过免疫组织化学的方法检测EZH2在正常乳腺上皮中的表达情况, 可以预测发生乳腺浸润性导管癌的风险; 另外, EZH2高表达及ER低表达发展为乳腺浸润性导管癌的风险是EZH2及ER均低表达情况的4倍。因此推测癌旁导管上皮过表达有发展为乳腺浸润性导管癌的可能, 这与本实验结果相符。

目前, 国内外尚未对NEDD9和EZH2在乳腺浸润性导管癌中的相关性的报道, 本研究发现EZH2高表达与NEDD9呈正相关, 二者均与肿瘤淋巴结转移相关, 提示NEDD9和EZH2在乳腺浸润性导管癌淋巴结转移中可能存在某种联系。通过本研究并结合文献报道, 发现两者都能促进MMP分泌及EMT的形成, 因此结合本研究EZH2和NEDD9可能存在协同作用, 二者高表达共同促进了乳腺浸润性导管癌的浸润、转移。本研究仅用免疫组织化学的方法得出上述论证尚不充分, 因此有必要在分子水平进一步探讨。

综上所述, NEDD9和EZH2蛋白的表达与淋巴结转移、HER-2的表达及Ki-67增殖指数相关, 二者存在正相关性, EZH2和NEDD9可能存在协同作用, 二者高表达共同促进了乳腺浸润性导管癌的浸润、转移。

参考文献

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12): 2893-2917.
2. Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents; defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(14): 2137-2150.
3. Lim B, Hortobagyi GN. Current challenges of metastatic breast cancer[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2016, 35(4): 495-514.
4. Stephane G, Amanda M, Casey O, et al. NEDD9 stimulated MMP9 secretion is required for invadopodia formation in oral squamous cell carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(39): 25503-25516.
5. Chien YC, Liu LC, Ye HY, et al. EZH2 promotes migration and invasion of triple-negative breast cancer cell via regulating TIMP2-MMP2/MMP9 pathway[J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(3): 422-434.
6. Liu N, Bi F, Pan Y, et al. Reversal of the malignant phenotype of gastric cancer cells by inhibition of Rho A expression and activity[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(18 Pt 1): 6239-6247.
7. Jin M, Yang Z, Ye W, et al. Prognostic significance of histone

- methyltransferase enhance of zeste homolog 2 in patients with cervical squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(2): 857-862.
8. Iida J, Dorchak J, Clancy R, et al. Role for chondroitin sulfate glycosaminogly in NEDD9 mediated breast cancer cell growth[J]. *Exp Cell Res*, 2015, 330(2): 358-370.
 9. Wang Z, Shen M, Lu P, et al. NEDD9 may regulate hepatocellular carcinoma cell metastasis by promoting epithelial-mesenchymal-transition and stemness via repressing Smad7[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(1): 1714-1724.
 10. Radulović P, Krušlin B. Immunohistochemical expression of NEDD9, E-cadherin and γ -catenin and their prognostic significance in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC)[J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2018, 18(3): 246-251.
 11. Li P, Sun T, Yuan Q, et al. The expressions of NEDD9 and e-cadherin correlate with metastasis and poor prognosis in triple-negative breast cancer patients[J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9: 5751-5759.
 12. Cao R, Wang L, Wang H, et al. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing[J]. *Science*, 2002, 298(5595): 1039-1043.
 13. Luo H, Jiang Y, Ma S, et al. EZH2 promotes invasion and metastasis of laryngeal squamous cells carcinoma via epithelial-mesenchymal transition through H3K27me3[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 479(2): 253-259.
 14. Ohuchi M, Sakamoto Y, Tokunaga R, et al. Increased EZH2 expression during the adenoma carcinoma sequence in colorectal cancer[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(4): 5275-5281.
 15. 甘艺, 吴正升, 吴强. 乳腺癌组织中SOX4、EZH2的表达及临床意义[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2017, 33(5): 477-480.
GAN Yi, WU Zhengsheng, WU Qiang. Expression and clinical significance of SOX and EZH2 protein in invasive ductal breast carcinoma[J]. *Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2017, 33(5): 477-480.
 16. Beca F, Kensler K, Glass B, et al. EZH2 protein expression in normal breast epithelium and risk of breast cancer: results from the Nurses' Health Studies[J]. *Breast Cancer Res*, 2017, 19(1): 21.

本文引用：张果, 杨金花, 杨迷玲, 徐小艳. 乳腺浸润性导管癌中NEDD9和EZH2表达的相关性及与临床病理特征的关系[J]. *临床与病理杂志*, 2019, 39(10): 2150-2155. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.10.008

Cite this article as: ZHANG Guo, YANG Jinhua, YANG Miling, XU Xiaoyan. Expression of EZH2 and NEDD9 in invasive ductal breast carcinoma and its association with clinicopathologic features[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2019, 39(10): 2150-2155. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.10.008