

HDAC1 蛋白在乳腺癌中的表达及临床意义及与 ER、PR 的关系

崔世义¹ 孙 伟^{2△} 陈旭伟¹

(1 潍坊医学院 山东 潍坊 261053; 2 潍坊医学院附属医院普外科 山东 潍坊 261031)

摘要 目的: 探讨乳腺癌组织中组蛋白去乙酰化酶 1(HDAC1) 的表达及临床意义。**方法:** 应用免疫组织化学 SP 法检测 78 例乳腺癌组织和 20 例癌旁组织中 HDAC1 蛋白的表达情况并分析其与 ER、PR 之间的关系。**结果:** (1) HDAC1 蛋白在 78 例乳腺癌中的阳性表达率为 78.2%(61/78), 在癌旁组织中的阳性表达率为 5%(1/20), 两组差异有统计学意义($P<0.01$) (2) 乳腺癌组织中的 HDAC1 蛋白在 ER 或 PR 阴性乳腺癌组织中的表达分别高于其在 ER 或 PR 阳性乳腺癌组织中的表达 ($P<0.01$) **结论:** 乳腺癌组织中的 HDAC1 蛋白过度表达与肿瘤发生发展密切相关。

关键词: 乳腺肿瘤; 组蛋白去乙酰化酶; 免疫组织化学法

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2011)03-541-05

Expression of histone deacetylase 1 in breast carcinoma and its clinical significance

CUI Shi-yi¹, SUN Wei^{2△}, CHEN Xu-wei¹

(1. Department of postgraduate, Weifang Medical College;

2 Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Weifang Medical College Weifang, Shandong, China)

ABSTRACT: To investigate the expressions of HDAC1 protein and its clinical significance in the breast carcinoma tissue. **Methods:** The expression of HDAC1 protein was determined by immunohistochemistry with SP system. Its correlation to estrogen receptor(ER) and progesterone receptor(PR) was analyzed. **Results:** (1) The positive rate of HDAC1 protein was 78.2% in breast carcinoma, which was 5% in noncancerous tissue group. There were significant differences between them($P<0.01$). (2) The expression of HDAC1 had negative correlation to ER and PR. **Conclusion:** The overexpression of HDAC1 protein closely correlated with the tumor carcinogenesis.

Key Words: Breast neoplasms; Histone deacetylases; Immunohistochemistry

Chinese Library Classification(CLC): R737.9 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)03-541-05

前言

在真核细胞中, 染色质的基本单位是核小体, 而核小体是由核心组蛋白 (H2A、H2B、H3 和 H4)、H1 连接组蛋白及 DNA 组成, 其结构修饰是 DNA 复制、转录、修复过程中的关键步骤。越来越多的实验证据表明, 染色质中核小体构型的改变在转录的起始中有重要的调控作用。核心组蛋白的修饰中包括乙酰化和去乙酰化, 这两者与基因调控密切相关, 而负责组蛋白乙酰化和去乙酰化的是一对功能相互拮抗的蛋白酶——组蛋白乙酰化转移酶 (HAT) 和组蛋白去乙酰化酶 (HDAC), HAT 和 HDAC 之间的动态平衡调控着组蛋白的去乙酰化 / 乙酰化状态, 控制着基因转录的启动或关闭。

HDAC1 是 1996 年由美国哈佛大学 Taunton 发现的第一个哺乳动物的组蛋白去乙酰化酶^[1], 后来又相继发现多种组蛋白去乙酰化酶, 已有大量研究表明, 组蛋白去乙酰化酶在肿瘤的发生发展中起着重要作用, 本研究就 HDAC1 在乳腺癌中的

表达及关系进行探讨, 报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

病理存档石蜡包埋标本 78 例, 均由潍坊医学院附属医院病理科提供, 系 2009 年 8 月~2010 年 5 月乳腺癌手术切除标本中选取, 均经 10% 福尔马林常规固定, 石蜡包埋。78 例均为女性, 有完整的临床资料, 年龄 30~76 岁, 平均 48.6 岁。其中乳腺浸润性导管癌 52 例, 浸润性小叶癌 17 例, 特殊性癌 9 例。年龄 ≤ 40 岁 12 例, 年龄 41~60 岁 49 例, 年龄 ≥ 60 岁 17 例。按照 UICC 乳腺癌 TNM 分期标准: I 期 16 例, II 期 27 例, III 期 35 例; 有淋巴结转移者 29 例, 无淋巴结转移者 49 例; 绝经患者 42 例, 未绝经患者 36 例; ER(+) 47 例, ER(-) 31 例; PR(+) 45 例, PR(-) 33 例。患者手术前均未接受过任何抗肿瘤辅助治疗。对照组: 随机选取 20 例癌旁正常乳腺组织 (距肿瘤边缘 5cm 以外, 经病理科证实结构正常的乳腺组织)。纳入标准: (1) 经 HE 染色, 病理确诊为原发性乳腺癌。(2) 术前未曾进行放疗、化疗、内分泌等抗肿瘤治疗。(3) 术前临床及辅助检查未发现确切远处转移病灶。(4) 有完整的病理和病历资料。(5) 未合并其他全身疾病或肿瘤者。

1.2 免疫组织化学法检测 HDAC1 蛋白的表达

根据苏木精-伊红(HE)染色切片选取存档组织蜡块, 采

作者简介: 崔世义(1971-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 普通外科学, 电话: 13793606428, E-mail: qingzhou1993@163.com

陈旭伟, 潍坊医学院硕士研究生

△通讯作者: 孙伟, 潍坊医学院附属医院普外科主任, 主任医师, 教授

(收稿日期: 2010-10-12 接受日期: 2010-11-08)

用 SP 法行免疫组化染色。一抗 HDAC1 多克隆抗体(Abcam 公司),工作浓度 1:400;通用型二抗和 DAB 显色剂均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。分别用已知 HDAC1 阳性表达组织作为阳性对照,用 PBS 替代一抗作阴性对照。试验结果由两位病理科副主任医师采用双盲法判定。每张切片随机选取 5 个高倍视野($\times 400$),通过 HPIAS 2000 型病理图文分析系统处理,显微镜及摄影系统为日本奥林巴斯公司产品。染色阳性信号以细胞核着色为准。细胞染色强度明显高于背景呈棕黄色者为阳性。细胞蛋白表达强度根据阳性物质着色深浅及阳性细胞的多少分为四级:无阳性细胞或阳性细胞 $<10\%$ 或背景同空白对照者为“-”;每张切片仅有 $10\%\sim 25\%$ 的细胞明显阳性为“+”; $25\%\sim 50\%$ 细胞明显呈阳性为“++”; $>50\%$ 细胞呈阳性为“+++”。ER、PR 阳性物质呈棕黄色颗粒,主要位于癌细胞核内(见图 1),计数 500 个肿瘤细胞内每 100 个细胞的阳性细胞数 $\geq 15\%$ 为阳性, $<15\%$ 为阴性。

1.3 统计学处理

所有数据采用 SPSS16.0 统计软件包,进行 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为有统计学意义。分析 HDAC1 在乳腺癌组织及癌旁正常组织中的表达有无统计学意义,并分析其与乳腺癌病理分型、肿瘤大小、临床分期、淋巴结转、年龄、是否绝经、ER 及 PR 的状态等临床病理特征有无关系。

2 结果

2.1 HDAC1 在乳腺癌组织及癌旁正常组织中的表达情况

在乳腺癌中 HDAC1 表达阳性着色定位于乳腺癌细胞的细胞核和细胞质内,呈棕黄色颗粒状。在癌旁正常组织中的染色较弱。HDAC1 蛋白在乳腺癌组织中阳性表达率为 78.2% ($61/78$);在癌旁正常组织阳性表达率为 5% ($1/20$)。HDAC1 蛋白阳性表达率在癌组织与癌旁正常组织之间的差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

2.2 HDAC1 在乳腺癌中的表达与临床病理参数的关系

(1) 从病理分型来看:52 例浸润性导管癌中,有 41 例 HDAC1 呈阳性表达 (78.8%);17 例浸润性小叶癌中,有 13 例 HDAC1 呈阳性表达 (76.5%);特殊性癌共 9 例,其中有 7 例 HDAC1 呈阳性表达 (77.8%),比较三者差别无统计学意义 ($P=0.978$),且三者之间两两比较均无统计学意义。导致这个结果的可能性是 HDAC1 蛋白在乳腺癌中的表达与肿瘤的病理分型无关,也可能是因为选取样本量少的缘故,不足以说明其间的差异。见表 2。

(2) 从肿瘤大小方面来看:直径 $\leq 2\text{cm}$ 的 23 例患者中,有 18 例 HDAC1 呈阳性表达 (78.2%);直径在 $2\sim 5\text{cm}$ 之间的 36 例患者中,有 29 例 HDAC1 呈阳性表达 (80.6%);直径 $\geq 5\text{cm}$ 的 19 例患者中,有 14 例 HDAC1 呈阳性表达 (73.7%),统计分析显示三者间的表达差异无统计学意义 ($P=0.842$),表明 HDAC1 的表达与乳腺癌的大小无关。见表 3。

(3) 从临床分期来看:16 例 I 期患者中,有 12 例 HDAC1 呈阳性表达 (75.0%);27 例 II 期患者中,有 21 例 HDAC1 呈阳性表达 (77.8%);35 例 III 期患者中有 26 例 HDAC1 呈阳性表达 (74.3%)。统计分析显示三者间的表达差异无统计学意义 ($P=0.949$)。见表 4。

(4) 从淋巴结转移方面来看:29 例伴有腋窝淋巴结转移组乳腺癌中,有 20 例 HDAC1 呈阳性表达 (68.9%);49 例不伴有腋窝淋巴结转移组乳腺癌中,有 34 例 HDAC1 呈阳性表达 (69.4%)。统计分析显示两者之间的表达差异无统计学意义 ($P=0.969$)。见表 5。

(5) 从年龄方面来看:在年龄 ≤ 40 岁的 12 例患者中,有 8 例 HDAC1 呈阳性表达 (66.7%);年龄 $41\sim 60$ 岁的 49 例患者中,有 40 例 HDAC1 呈阳性表达 (63.3%);年龄 >60 岁的 17 患者中,有 13 例 HDAC1 呈阳性表达 (64.7%)。经比较三者之间的差异无统计学意义 ($P=0.521$)。见表 6。

(6) 乳癌组织中 ER、PR 与 HDAC1 阳性表达的关系:在 ER(+) 的 47 例患者中,有 20 例 HDAC1 呈阳性表达 (42.5%);在 ER (-) 的 31 例患者中,有 26 例 HDAC1 呈阳性表达 (83.9%)。经比较二者之间的差别有统计学意义 ($P=0.001$)。在 PR(+) 的 45 例患者中,有 20 例 HDAC1 呈阳性表达 (44.4%);在 PR (-) 的 33 例患者中,有 24 例 HDAC1 呈阳性表达 (72.8%)。经比较二者之间的差别有统计学意义 ($P=0.013$)。见表 7。

(7) 从有无月经方面来看:绝经后患者 42 例中,有 29 例 HDAC1 呈阳性表达 (69.0%);在绝经前患者 36 例中,有 26 例 HDAC1 呈阳性表达 (72.2%)。经分析显示两者不存在统计学上的明显差异 ($P=0.759$)。见表 8。

可见,HDAC1 的阳性表达从乳腺癌的病理分型,肿瘤大小、年龄、按临床分期、有无淋巴结转移、有无绝经患者方面分析,均无统计学意义 ($P>0.05$),在 ER 及 PR 的状态等因素方面统计分析,表明 HDAC1 的阳性表达存在着显著差异 ($P<0.05$)。

表 1 HDAC1 在乳腺癌及癌旁组织中的表达情况
Table 1 The Expression of HDAC1 in Breast Cancer and Noncancerous Tissue

组别(Group)	例数 (Number)	HDAC1				χ^2	P 值
		-	+	++	+++		
癌组织(Cancerous Tissue)	78	17	11	22	28	36.706	0.000
癌旁组织(Noncancerous Tissue)	20	19	1	0	0		

表 2 HDAC1 在乳腺癌病理分型组的情况
Table2 The Expression of HDAC1 in the Breast Cancer Pathology classification Group

病理分型 (Pathology classification)	例数 (Number)	HDAC1				x ²	P 值
		—	+	++	+++		
浸润性导管癌 (Invasive Ductal Carcinoma)	52	11	11	20	10	0.044	0.978
浸润性小叶癌 (Invasive lobular Carcinoma)	17	4	3	6	4		
特殊癌(Special Carcinoma)	9	2	1	4	2		

表 3 HDAC1 在乳腺癌肿瘤大小组中的表达情况
Table3 The Expression of HDAC1 in the Breast Tumor Size Group

肿瘤直径 (Carcinoma Diameter)	例数 (Number)	HDAC1				x ²	P 值
		—	+	++	+++		
≤ 2cm	23	5	3	5	10	0.345	0.842
2-5cm	36	7	6	10	13		
≥ 5cm	19	5	2	7	5		

表 4 HDAC1 在乳腺癌临床分期组中的表达情况
Table4 The Expression of HDAC1 in the Breast Cancer Clinical Stage Group

临床分期 (Clinical Stage)	例数 (Number)	HDAC1				x ²	P 值
		—	+	++	+++		
I 期 (I Period)	16	4	3	9	4	0.105	0.949
II 期 (II Period)	27	6	5	10	6		
III 期 (III Period)	35	9	4	12	10		

表 5 HDAC1 在乳腺癌有无淋巴结转移组中的表达情况
Table5 The Expression of HDAC1 in the Breast Cancer Lymph Node Metastasis Group

淋巴结转移 (Lymph Node Metastasis)	例数 (Number)	HDAC1				x ²	P 值
		—	+	++	+++		
有(Yes)	29	9	4	10	6	0.300	0.861
无(No)	49	15	5	10	19		

表 6 HDAC1 在乳腺癌年龄分组中的表达情况
Table6 The Expression of HDAC1 in the Breast Cancer Age Group

年龄 (Age)	例数 (Number)	HDAC1				x ²	P 值
		—	+	++	+++		
≤ 40	12	4	2	2	4	1.305	0.521
41-60	49	9	6	16	18		
≥ 60	17	4	3	4	6		

表 7 HDAC1 在乳腺癌 ER 及 PR 的状态组中的表达情况
Table7 The Expression of HDAC1 in the Breast Cancer ER and PR Condition Group

组别 (Group)	例数 (Number)	HDAC1		x ²	P 值
		(-)	(+)		
ER				13.180	0.000
(+)	47	27	20		
(-)	31	5	26		
PR				6.193	0.013
(+)	45	25	20		
(-)	33	9	24		

表 8 HDAC1 在乳腺癌有无绝经组中的表达情况
Table8 The Expression of HDAC1 in the Breast Cancer Postmenopause Group

绝经 (Postmenopause)	例数 (Number)	HDAC1				x ²	P 值
		-	+	++	+++		
有(Yes)	29	13	4	12	13	0.094	0.759
无(No)	49	10	7	10	9		

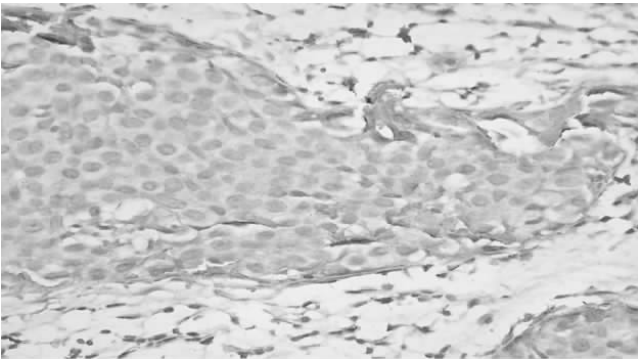


图 1 乳腺癌组织 HDAC1 阳性表达(SP× 400)
Picture1 The Positive Expression of HDAC1 in the Breast Cancer Tissue

3 讨论

随着美国癌症研究协会提出人类表观遗传学组计划概念^[2],肿瘤的表现基因修饰也越来越受到研究者的重视。基因的表达除了决定于 DNA 序列所传递的遗传学信息之外,还决定于 DNA 序列以外的表观遗传学信息。表观遗传编码可通过改变 DNA 双链与组蛋白间紧密度来调控基因转录表达的过程。组蛋白乙酰化在表观遗传中起着重要的作用。组蛋白乙酰化与基因活化有直接联系,组蛋白乙酰化状态呈多样性,核小体上有多个位点可以进行乙酰化,但特定基因部位的组蛋白乙酰化和去乙酰化是非随机的,作用的位点有特异的区域,可以说组蛋白乙酰化是染色质的定点修饰作用。

人类 HDAC 基因大多定位于染色体上易于断裂、突变、易位、缺失的区域,因此,组蛋白去乙酰化状态的失衡与许多恶性肿瘤的发生发展密切相关。组蛋白乙酰化修饰在基因表达调控中有非常重要的作用和意义^[3]。组蛋白是与细胞内遗传物质

DNA 密切结合、相互作用的核蛋白,在组蛋白的尾部有多种化学修饰作用,可以改变和 DNA 的结合状态,进而影响基因的表达。组蛋白尾部这种特殊修饰的组合形式,提供了转录调控效应蛋白结合位点,从而控制 DNA 结合蛋白进入的通道,达到有效调节染色质转录状态的动力学转换。HDAC1 可以接到核小体结构改变和调节基因表达,参与细胞周期进程和分化,已经发现 HDAC1 可介导以为点特异 DNA 结合的转录一直自得转录抑制作用^[4],HDAC1 还可以通过线粒体转位促进癌基因合成,导致细胞凋亡和分化障碍^[5]。所以,组蛋白不仅有包装 DNA 的作用,组蛋白密码还扩大了基因组信息的储存,并且可以在细胞世代间传递,对特定的因子作出转录反应。组蛋白的乙酰化修饰在基因的转录调控中起着非常重要的作用。基因有序的转录调控是机体细胞维持正常功能的前提,如果基因转录调控功能紊乱,细胞可以发生癌变。而乳腺癌癌变过程中,就存在癌基因的突变和抑癌基因的转录抑制。当然,调控基因转录的机制中,除了染色质和核小体构型的改变外,还有中心组蛋白的乙酰化修饰和基因的甲基化修饰等多种机制^[6],各种调控机制互相影响。细胞及有机体内组蛋白的乙酰化和去乙酰化之间存在着一种平衡,这种平衡是受到严格控制的,是调节基因表达的一子、细胞周期素以及信号级联分子等非组蛋白的乙酰化。p21 是分化相关的基因,阻断周期素依赖性激酶活性,对细胞生长阻滞发挥重要作用,组蛋白乙酰化酶抑制剂诱导 p21 基因相关的染色质乙酰化组蛋白累积,并与转录增加相关^[11]。p27Kip1 是细胞内广泛的调控细胞周期并抑制细胞分裂的重要因子,组蛋白去乙酰化酶抑制剂所介导的细胞周期 G1 期阻滞与细胞内 p27Kip1 表达增加密切相关^[12]。p27Kip1 作为细胞周期素依赖性激酶抑制因子参与细胞周期的负性调控,在多种肿瘤细胞内 p27Kip1 蛋白低水平表达,且错位分布于细胞核外。p27Kip1

被认为是人类多种肿瘤独立的预后因子和未来可能的肿瘤治疗靶点。多项研究也提示磷酸化位点人工诱变后并没有明显改变其细胞周期阻滞和生长抑制作用^[3],提示乙酰化修饰可能参与调控 p27Kip1 的生物学活性。可见,通过改变组蛋白乙酰化修饰来调控 p27Kip1 蛋白表达和分布可能成为未来肿瘤治疗的潜在思路。

乳腺癌是一种世界范围内严重危害妇女健康生命的恶性肿瘤,其发病率在女性恶性肿瘤中居首位,并且其发病率还在以每年 2% 的速度递增。本实验发现,HDAC1 在乳腺癌组织比在癌旁正常组织表达高,同时发现在激素受体阴性癌组织中高表达,可能与 HDAC1 参与了 ER、PR 转录表达过程,抑制了 ER、PR 的基因转录,导致表达下调有关^[4]。HDAC1 作为近年来被证实的一种与肿瘤转移相关的基因,其在恶性肿瘤浸润转移过程中的作用正日益受到广泛的关注,而与乳腺癌的关系,随着研究的深入,有望为深入了解乳腺癌的浸润转移机制提供了一个视角。随着研究的逐渐深入,HDAC1 有可能作为转移相关基因标志物来预测癌转移的趋势,判断癌的预后并可望成为新的抗转移治疗靶点。

参考文献(References)

- [1] Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL. A mamm histone deacetylase related to the yeast transcript regulator Rpd3p [J]. Science, 1996, 272 (5260):408-411
- [2] Fraga M F, Esteller M. Towards the human cancer epigenome: a first draft of histone modifications [J]. Cell Cycle, 2005, 4(10): 1377-1381
- [3] Mizzen CA, Allice CD, et al. Cell Linking histone acetylation to transcriptional regulation Mlo Life Sci, 1998; 54(1):6-20
- [4] Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(1):38-51
- [5] Smith KT, Workman JL. Histone deacetylase inhibitors: anticancer compounds [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009, 41(1):21-25
- [6] Luczak MW, Jagodzinski PP. The role of DNA methylation in cancer development [J]. Folia Histochem Cytobiol, 2006, 44(3):143-154
- [7] Mahlknecht U, Hoelzer D. Histone acetylation modifiers in the pathogenesis of malignant disease [J]. Mol Med, 2000, 6(8):623-644
- [8] Kouzarides T. Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation [J]. Curr Opin Genet Dev, 1999, 9:40-48
- [9] Weidle U H, Grossmann A. Inhibition of histone deacetylases: a new strategy to target epigenetic modifications for anticancer treatment, Anticancer Res, 2000, 20:1471-1486
- [10] Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, et al. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. Gene 2005 Dec 19; 363:15-23
- [11] Zhao Y, Lu S, Wu L, et al. Acetylation of p53 at lysine 373/382 by the histone deacetylase inhibitor depsipeptide induces expression of p21 Waf1/Cip1 [J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(7):2782-2790
- [12] Kim S, Kang J K, Kim Y K. Histone deacetylase inhibitor apicidin induces cyclin E expression through Sp1 sites [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 342(4):1168-1173
- [13] Guan X, Chen L, Wang J, et al. Mutations of phosphorylation sites Ser10 and Thr187 of p27Kip1 abolish cytoplasmic redistribution but do not abrogate G0/1 phase arrest in the HepG2 cell line [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 347(3):601-607
- [14] Margueron R, Duong V, Bonnet S, et al. Histone deacetylase activity and estrogen receptor alpha levels modulate the transcriptional activity of partial antiestrogens [J]. J Mol Endocrinol, 2004, 32(2):1957