

## Hsp27在乳腺浸润性微乳头状癌中的表达及其意义\*

高霞 钱晓龙 李崖青 任美敬 付丽

**摘要 目的:**乳腺浸润性微乳头状癌(IMPC)具有特殊的组织学形态特征及淋巴结转移率高的生物学特性。本研究旨在通过比较蛋白质组学技术筛选,并验证乳腺IMPC与最常见的非特殊型浸润性导管癌(IDC-NOS)间差异表达的蛋白,从蛋白质角度研究探讨乳腺IMPC的特殊组织学形态及生物学行为机制。**方法:**双向电泳筛选1例乳腺IMPC和1例乳腺IDC-NOS冻存组织的蛋白表达差异点,质谱鉴定其所对应的蛋白质,免疫组织化学染色检测验证其在43例IMPC和30例IDC-NOS组织切片中的表达。**结果:**筛选出表达稳定差异的蛋白—热休克蛋白27(Hsp27),且Hsp27在IMPC中表达上调。免疫组织化学染色验证了Hsp27主要表达于肿瘤细胞质中,其在IMPC中的表达明显高于IDC-NOS( $Z=-3.236, P=0.001$ ),并与ER( $r=0.319, P=0.037$ )及淋巴结转移数( $r=0.444, P=0.003$ )呈正相关,而与患者年龄、病理学分期、PR和HER-2表达无明显相关性。**结论:**Hsp27在乳腺IMPC中过表达,且与淋巴结转移数呈正相关,提示Hsp27可能在IMPC淋巴结转移以及特殊的病理形态形成中起着重要作用。

**关键词** 乳腺浸润性微乳头状癌 热休克蛋白27 淋巴结转移

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2013.09.009

### Expression and significance of Hsp27 in invasive micropapillary carcinoma of the breast

Xia GAO, Xiaolong QIAN, Yaqing LI, Meijing REN, Li FU

Correspondence to: Li FU; E-mail: fulijyb@hotmail.com

Department of Breast Cancer Pathology and Research Laboratory, Key Laboratory of Breast Cancer Research Prevention and Therapy, Key Laboratory of Cancer Research Prevention and Therapy, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060, China

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (30930038) and the National "973" Program of China (2009CB521700)

**Abstract Objective:** Compared with invasive ductal carcinoma-not otherwise specified (IDC-NOS), invasive micropapillary carcinoma (IMPC) shows more distinctive morphologic characteristics and a biological feature with high incidence of axillary lymph node metastases. This study used comparative proteomics technology to find the differentially expressed proteins between IMPC and IDC-NOS, followed by verification. Afterward, the mechanisms of the special pathological morphology and biological behavior of IMPC was explored from the point view of proteomics. **Methods:** Candidate molecules were obtained by examining the differential expression spots in the frozen tissues of one IMPC and one IDC-NOS. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrum were used as tools for analysis. The immunohistochemical stain assay was used to verify the expression of these candidate molecules in the tissue sections of 43 IMPC and 30 IDC-NOS frozen samples. **Results:** One differentially expressed protein, namely, Heat shock protein 27 (Hsp27), was screened out. The expression of Hsp27 was up-regulated in IMPC compared with that in IDC-NOS. Hsp27 was mainly expressed in the plasma of tumor cells, and the expression was significantly higher in IMPC than in IDC-NOS ( $Z=-3.236, P=0.001$ ). The expression of Hsp27 positively correlated with the estrogen receptor ( $r=0.319, P=0.037$ ) and metastasis in lymph nodes ( $r=0.444, P=0.003$ ). No correlation was found between Hsp27 and the patient's age, pathologic stage, and progesterone receptor or human epidermal growth factor receptor 2. **Conclusion:** Hsp27 shows over-expression in IMPC and is positively correlated with metastasis in lymph nodes. Hsp27 may play an important role in the formation of the special pathological morphology of IMPC, as well as the high rate of lymph node metastasis.

**Keywords:** invasive micropapillary carcinoma, Hsp27, lymph node metastasis

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,浸润性微乳头状癌(invasive micropapillary carcinoma, IMPC)曾作为非特殊型浸润性导管癌(invasive ductal carcinoma not otherwise specified, IDC-NOS)的一种亚型被

报道,后因其特殊的组织学形态、淋巴结转移率高等特性<sup>[1]</sup>而逐渐引起病理和临床医生的重视。2003年

作者单位:天津医科大学附属肿瘤医院乳腺病理研究室,天津市肿瘤防治重点实验室,乳腺癌防治教育部重点实验室(天津市300060)

\*本文课题受国家自然科学基金(编号:30930038)和国家重点基础研究计划“973计划”项目(编号:2009CB521700)资助

通信作者:付丽 fulijyb@hotmail.com

WHO乳腺癌新分类将IMPC作为乳腺上皮性肿瘤的一种新类型单独列出<sup>[2]</sup>。蛋白质组学技术可高通量的对比正常组织与肿瘤组织之间或者不同肿瘤组织之间的蛋白表达谱,从而在细胞整体水平上显示出肿瘤发生、发展过程中蛋白表达谱的变化,将有助于寻找特异的肿瘤早期诊断生物标志物。本研究利用比较蛋白质组学技术进行了IMPC和IDC-NOS组织的双向电泳图谱鉴定,筛选了热休克蛋白27(heat shock protein 27, Hsp27)这个表达差异点,并通过免疫组织化学染色,检测Hsp27在IMPC与IDC-NOS中的表达情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 病例资料

选取天津医科大学附属肿瘤医院乳腺病理研究室,2010年1月至2012年12月乳腺癌手术切除标本冻存组织IMPC和IDC-NOS各1例,石蜡标本IMPC 43例和IDC-NOS 30例。将患者分为两组,IMPC组和IDC-NOS组。患者均为女性,年龄为32~73岁,中位年龄53岁。本研究得到了天津医科大学附属肿瘤医院伦理委员会的认可,且患者均签署了相关知情同意书。

### 1.2 方法

1.2.1 组织蛋白质的双向电泳和质谱鉴定 将组织蛋白裂解并纯化,用水化上样缓冲液溶解100 μg蛋白质裂解物,加入固定化pH梯度(immobilized pH gradient, IPG)电泳槽中,以IPG干胶条轻覆,第一向电泳操作及第二向电泳前的胶条平衡过程按照蛋白质双向电泳实验操作手册(Bio-Rad公司,美国)进行。电泳结束后选取重复性和分辨率均较好,且差异较为稳定的斑点进行质谱鉴定。将1例IMPC和1

例IDC-NOS冻存组织作为一组,同时进行双向电泳和斑点的分析,独立重复3次,选择3次可以重复差异的斑点进行下一步研究。

1.2.2 免疫组织化学染色及结果判定 采用非生物素二步法,Hsp27抗体稀释浓度为1:100。实验步骤均按照试剂盒说明进行。结果判定采用双盲法,由两位病理医生独立观察。Hsp27判定标准<sup>[3]</sup>:细胞质内有棕色颗粒为阳性细胞,在高倍显微镜下( $\times 400$ ),同时评价染色强度及阳性细胞百分数。染色强度分为:无着色为0分,弱着色为1分,中等着色为2分,强着色为3分。阳性细胞百分比分为: $\leq 5\%$ 为0分,6%~25%为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分,>75%为4分。阳性强度和阳性细胞所占比例得分相乘为最后得分:0分为(-),1~4分为(+),5~8分(++),9~12分(+++)。ER、PR、HER-2的评定均按照美国临床肿瘤学会与美国病理医师学会指南进行<sup>[4]</sup>。

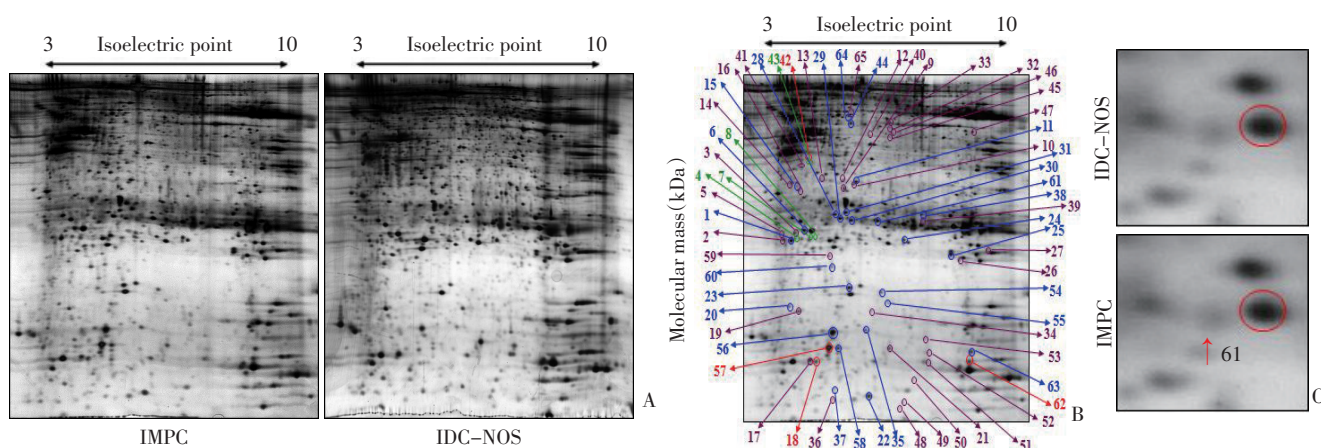
### 1.3 统计学处理

应用SPSS 20.0软件进行统计分析,组间比较采用非参数检验,各指标间的相关性采用Spearman秩相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 乳腺IMPC与IDC-NOS组织蛋白质的表达差异点

对IMPC和IDC-NOS组织蛋白质进行了双向电泳和银盐染色(图1A)。PDQuest软件分析显示共计有65个蛋白质斑点在IMPC和IDC-NOS两组蛋白质间表达具有可重复的差异,差异点分布在等电点3.0~10.0、分子量为14.0~97.0 kDa。其中表达上调的斑点为25个,表达下调的斑点为32个,新增4个斑点,消失4个斑点(图1B)。选取其中表达差异最为明显的一个斑点(61号)进行了分析(图1C)。



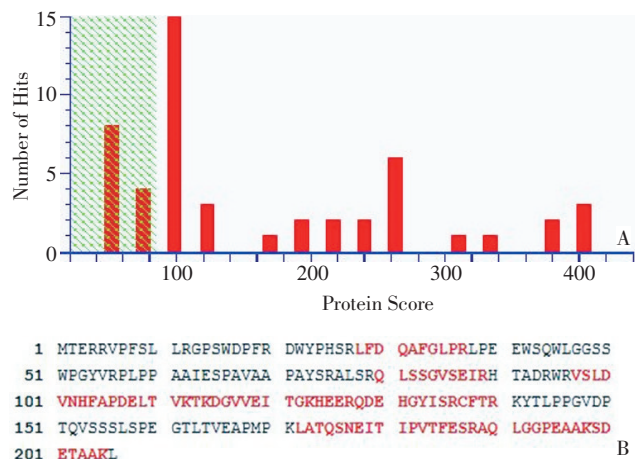
A: Two-dimensional electrophoresis pattern of IMPC and IDC-NOS; B: Blue represents up-regulated protein spots, purple represents down-regulated protein spots, red represents newly-emerged protein spots, and green represents disappeared protein spots; C: No. 61 spot area enlarged, with the arrow indicating up-regulation

图1 乳腺IMPC与IDC-NOS组织蛋白质的双向电泳图谱的比较

Figure 1 Comparison of 2-DE profiles between IMPC and IDC-NOS

### 2.2 差异点的质谱鉴定

根据质谱鉴定及数据库 Mascot 检索的结果, Mowse 分数大于 38 即可认为  $P < 0.05$ 。61 号点被鉴定为 Hsp27, Mowse 分数为 401, 匹配的序列覆盖率为 47%, 相对分子量为 22.882 kDa, 等电点为 5.98。鉴定结果可信并与双向电泳点的位置相符(图 2)。



A: MOWSE score of No. 61 spot; B: Peptide matches of No. 61 spot (red indicates the matching peptide)

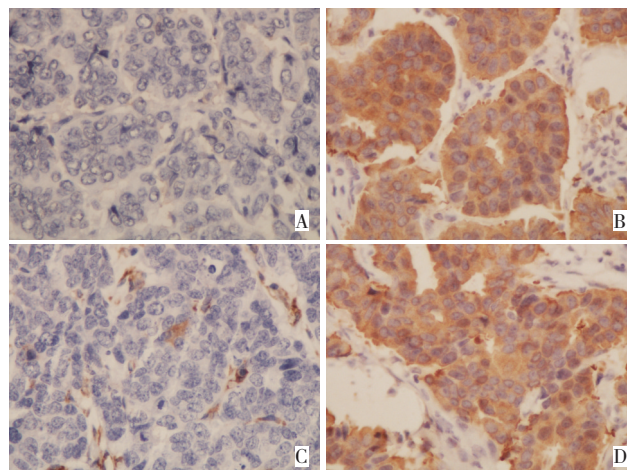
图 2 差异点的质谱鉴定

Figure 2 Mass spectrum for differential expression spots

### 2.3 Hsp27 在乳腺 IMPC 和 IDC-NOS 中的表达

免疫组织化学染色结果显示 Hsp27 主要表达于肿瘤细胞质中(图 3), Hsp27 在 IMPC 组 97.67%(42/43) 阳

性表达, 明显高于 IDC-NOS 组的 86.66%(26/30), 且 IMPC 组以 ++ 和 +++ 表达为主, 而 IDC-NOS 组则以 + 表达为主(表 1)。



A: Staining of Hsp27 in IMPC was negative; B: Staining of Hsp27 in IMPC was positive for +++; C: Staining of Hsp27 was negative in IDC-NOS; D: Staining of Hsp27 in IDC-NOS was positive for +++

图 3 Hsp27 免疫组织化学染色判断标准(×400)

Figure 3 IHC criteria for Hsp27 (×400)

### 2.4 Hsp27 的表达与乳腺 IMPC 临床病理学特征的关系

Hsp27 的表达与 ER 及淋巴结转移数呈正相关 ( $P < 0.05$ ), 而与患者年龄、病理学分期、PR 及 HER-2 表达无显著相关性(表 2)。

表 1 Hsp27 在乳腺 IMPC 和 IDC-NOS 中的表达

Table 1 Expression of Hsp27 in IMPC and IDC-NOS

Items	n	Expression of Hsp 27 (%)				Z	P
		-	+	++	+++		
IMPC	43	2.3(1/43)	25.6(11/43)	46.5(20/43)	25.6(11/43)	-3.236	0.001
IDC-NOS	30	13.3(4/30)	53.3(16/30)	23.3(7/30)	10.0(3/30)		

表 2 乳腺 IMPC 中 Hsp27 表达与临床病理学特征的关系 (n=43)

Table 2 Relationship among the expression of Hsp27 and various pathologic parameters of IMPC

Items	Expression of Hsp27 (n)				r	P
	-	+	++	+++		
Age					0.105	0.504
<55	1	6	10	5		
≥55	0	5	10	6		
pTNM stage*					-0.016	0.919
I	1	6	4	2		
II	0	3	8	2		
III	0	2	4	2		
IV	0	0	0	1		
ER					0.319	0.037
Negative	0	5	1	1		
Positive	1	6	19	10		

表2 乳腺 IMPC 中 Hsp27 表达与临床病理学特征的关系 (续表 2, n=43)

Table 2 Relationship among the expression of Hsp27 and various pathologic parameters of IMPC (Continued table 2, n=43)

Items	Expression of Hsp27				r	P
	-	+	++	+++		
PR					0.150	0.337
Negative	0	4	1	2		
Positive	1	7	19	9		
HER-2					-0.206	0.186
Negative	1	3	14	6		
Positive	0	8	6	5		
Number of lymph node metastasis					0.444	0.003
N0	0	3	1	2		
N1	1	5	4	0		
N2	0	2	8	2		
N3	0	1	7	7		

\*missing 8 values

### 3 讨论

IMPC 是一种具有独特的病理学形态及高淋巴结转移率的特殊类型乳腺癌。这种高侵袭、淋巴结转移率高的特性往往预示着 IMPC 患者的预后不良,因此,迫切需要寻找在 IMPC 发生高度侵袭中起重要作用的关键分子,为 IMPC 的治疗研究提供靶点。

本研究应用蛋白质组学技术,进行了 IMPC 和 IDC-NOS 的蛋白质表达谱分析,发现 Hsp27 在 IMPC 和 IDC-NOS 中的表达是有显著差异的。Hsp27 是小分子量热休克蛋白家族中重要的一员,作为一种分子伴侣在细胞受到各种氧化应激、热应激及有毒物质等刺激的情况下出现表达增加,发挥保护细胞的功能。在多种恶性肿瘤,如结肠癌、卵巢癌及乳腺癌中均出现过表达<sup>[5]</sup>。既往研究发现,Hsp27 可以通过多种方式促进肿瘤细胞的转移,包括与血管内皮生长因子 A、C (VEGF-A、VEGF-C) 及碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 相互作用,促进肿瘤血管的生成<sup>[6]</sup>,从而为肿瘤侵袭提供必要条件。Hsp27 作为 p38MAPK 通路下游的一个调节分子,可以被 MAPKAPK2 磷酸化,引起肌动蛋白的聚集,导致细胞形态的改变,细胞伸出伪足,促进肿瘤细胞的移动、侵入<sup>[7-8]</sup>。

此外,Hsp27 和 MAPKAPK2 还可以激活转化生长因子 $\beta$ ,从而上调基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)2 和 9<sup>[9-10]</sup>,溶解细胞外基质,促进癌细胞浸润转移。本研究中,Hsp27 的表达与淋巴结转移数呈正相关,进一步证实了 Hsp27 能够促进肿瘤细胞的转移。据此推测,Hsp27 可能通过以上某种途径促进了 IMPC 的淋巴结转移,但具体的分子机制还需要后续实验进一步探讨。

IMPC 肿瘤细胞排列成不含纤维脉管束的微小乳头状或小腺管状,且转移病灶中肿瘤细胞均能保持与原发

病灶相同的组织学特征。E-钙黏附素(E-cadherin; E-CD)主要表达在微乳头状肿瘤细胞集团内的细胞间连接面,而在细胞集团面向间质侧的表达明显减弱或不表达。在正常细胞中,钙黏附素-连接素蛋白系统对细胞间的黏附很重要,而且 E-CD 需与 $\beta$ -连接素( $\beta$ -catenin)和斑珠蛋白结合成复合体才能发挥作用。Fanelli 等<sup>[11]</sup>研究发现正常情况下 $\beta$ -catenin 是强表达于细胞膜的,而乳腺癌 Hsp27 过表达时,Hsp27 可以结合 $\beta$ -catenin,使其由胞膜转入细胞质,并在细胞质聚集。据此推测也许是 Hsp27 引起 $\beta$ -catenin 的异位,导致 IMPC 细胞面向间质侧 E-CD 的表达缺失或者减弱,从而形成了 IMPC 细胞集团这种特殊的病理学形态。

本研究发现 Hsp27 的蛋白表达与 ER 呈正相关,而与 PR 无明显相关性,这与 Ioachim 等<sup>[12]</sup>的研究结果是一致的。以往的研究证明 PR 是 ER 功能的佐证,提示即使 IMPC 中 ER 高表达,如果 PR 不表达,其生物学行为比两者都表达时欠佳,预示着患者的预后不良<sup>[13]</sup>。Hsp27 对雌激素信号通路的作用主要表现在两方面:一方面 Hsp27 是一种雌激素诱导的蛋白,既可以和雌激素结合,又可以和胞核 ER 结合,从而抑制雌激素信号通路<sup>[14]</sup>;另一方面,Hsp27 也可以结合胞膜 ER,引起快速的信号转导而发挥促进激素敏感性肿瘤细胞的存活与增殖的作用<sup>[15]</sup>。究竟 Hsp27 是通过哪一种 ER 参与乳腺癌发生发展的过程,亦或是同时和两种 ER 相互作用,目前还无统一的定论。

综上所述,本研究证明了 Hsp27 在 IMPC 和 IDC-NOS 中表达是存在显著差异的,且在 IMPC 中的表达要高于 IDC-NOS。结合已知 Hsp27 在恶性肿瘤侵袭转移中的作用,以及本研究结果得出的 Hsp27 与 IMPC 淋巴结转移数呈正相关,推测 Hsp27 可能在 IM-

(下转第 538 页)