

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.26.003

HuR 和 PDGFC 在乳腺癌组织中的表达及相关性分析*

罗年安 屈亚琦 张洪科 李人立 董 瑞[△]

(第四军医大学附属唐都医院普外科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:探讨 HuR 和 PDGFC 在乳腺癌组织中的表达及相关性。**方法:**选取 2008 年至 2009 年 80 例手术切除并有完整的临床与病理资料的乳腺癌患者为研究对象,采用免疫组化法对乳腺癌组织中 HuR 和 PDGFC 的表达进行检测,并进行统计学分析。分析两者的表达与乳腺癌 pTNM 分期的关系,以及两者之间的相关性。**结果:**乳腺癌组织中 HuR 和 PDGFC 的表达均与 pTNM 分期有相关性(均 $P < 0.05$),且两者的表达呈正相关($r = 0.608$, $P > 0.05$),具有统计学意义。**结论:**乳腺癌中 HuR 和 PDGFC 的高表达可能参与了乳腺癌的发生发展过程,有望影响乳腺癌的术后治疗。两者的表达产物呈正相关,HuR 的表达产物可能通过对 PDGFC 的表达进行调控促进乳腺癌的发生与发展。

关键词: 乳腺肿瘤;HuR;PDGFC;免疫组织化学

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)26-5011-03

Expressions of HuR and PDGFC in Breast Cancer and its Correlation Analysis*

LUO Nian-an, QU Ya-qi, ZHANG Hong-ke, LI Ren-li, DONG Rui[△]

(Department of general surgery, Tangdu Hospital, the fourth military medical university, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expressions of HuR and PDGFC in breast cancer and its correlation. **Methods:** From 2008 to 2009, 80 cases of surgical operation and clinical and pathological data of breast cancer patients as the research object. The expressions of HuR and PDGFC in breast cancer tissue samples were detected by immunohistochemical techniques and analyzed statistically. The correlation between expressions of both genes and pTNM stages were analysed as well as correlation between them. **Results:** Both of their expressions were correlated with pTNM stages($P < 0.05$), and there was positive correlation between expression of HuR and PDGFC ($r = 0.608$, $P > 0.05$), which is statistically significant. **Conclusions:** The high expressions of HuR and PDGFC possibly participated the procession of the tumogenesis growth and prognosis of breast cancer which may play a very important role in the therapy after operation. Their expressions are positively correlated, the products of HuR expression may play an important role on the in set and progression of breast cancer by regulating the expression of PDGFC.

Key words: Breast neoplasms; HuR; PDGFC; Immunohistochemistry

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

Article ID: 1673-6273(2014)26-5011-03

前言

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,近年来,其发病率日益增高并呈现年轻化趋势^[1-3]。

目前国内外公认的乳腺癌分期标准是 2003 年修改的国际抗癌联盟(UICC)和美国肿瘤联合会(AJCC)联合制定的 pTNM 分期法^[4],乳腺癌的临床分期是对乳腺癌患者已发展到何种程度作出的判定,对指导治疗及判断预后具有重大意义。乳腺癌的发生、发展过程与其他恶性肿瘤一样是多因素共同作用的结果,寻找新的生物学指标已经成为乳腺癌治疗领域研究的热点,近年来国内外研究显示 RNA 结合蛋白 HuR 与血小板源性生长因子 C(PDGFC)在乳腺癌的发生发展过程中发挥着重要

的作用。HuR 在肿瘤细胞中能增加 cox-2、IL-8、TNF- α 等的 mRNA 稳定性及蛋白表达,参与真核细胞基因的转录后调控^[5,6]。而 PDGFC 在肿瘤的发生发展过程中参与调节细胞有丝分裂、存活、凋亡及转化^[7,8]。本研究通过免疫组化法对 HuR 和 PDGFC 在乳腺癌组织中的表达进行研究,并探讨乳腺癌组织中两者表达与临床参数 pTNM 间关系,此外还将对两者在乳腺癌中表达的相关性进行分析。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

收集第四军医大学附属唐都医院普外科 2008 年至 2009 年手术切除并有完整的临床与病理资料的乳腺癌标本 80 例。

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(811001181)

作者简介:罗年安(1982-),男,硕士研究生,主要研究方向:乳腺肿瘤的生物学治疗,电话:18696580995, E-mail:719176489@qq.com

[△] 通讯作者:董瑞, E-mail:1924887592@qq.com

(收稿日期:2013-12-28 接受日期:2014-01-26)

我们选取肿瘤的 pTNM 分期作为研究的临床参数。按照 2003 年修改的国际抗癌联盟 (UICC) 和美国肿瘤联合会 (AJCC) 联合制定 pTNM 分类标准, 80 例乳腺癌标本中, I 期 31 例, II 期 25 例, III 期 15 例, IV 期 9 例。每例标本取 3 张切片分别作 HuR、PDGFC 检测和阴性对照。全部标本均经 10% 甲醛固定, 石蜡包埋, 切片厚 4 μm 。

1.2 试剂与方法

兔抗人 PDGFC 多克隆抗体, 购自 Gene Tex 生物技术公司 (GTX51652); 兔抗人 HuR 多克隆抗体, 购自 Proteintech 公司 (11910-1-AP); 采用基因科技 (上海) 有限公司 III 抗鼠 / 兔通用型免疫组化检测试剂盒 (GK500705)。

所有操作严格按照试剂盒推荐的方法进行实验, 用 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3 结果判定

由两位临床病理医生采用盲法观察, 分别计数 HuR 和 PDGFC 在组织中的染色强度。

HuR 结果判定: 每张切片选取染色良好区域, 随机选取 5 个高倍视野, 每个视野下观察 200 个细胞。结果采用半定量计分方法, 根据阳性细胞着色强度和阳性细胞率乘积来判定。阳性细胞着色强度评分标准: 0 分 (无特异染色)、1 分 (轻度染色)、2 分 (中度染色)、3 分 (强染色); 阳性细胞率的评分标准: 阳性细胞数 0 分 (无染色)、1 分 (1%~25%)、2 分 (26%~50%)、3 分 (51%~75%)、4 分 (>75%)。两项乘积: 0 分 (-)、1~4 分 (+)、5~8 分 (++)、9~12 分 (+++)。因 HuR 蛋白在乳腺癌中免疫反

应较强, 遂将中强度阳性 [(++)~(+++)] 归为高表达组, 将阴性与弱阳性 [(-)~(+)] 归为低表达组。

PDGFC 结果判定: 对每张切片的阳性细胞率和阳性细胞着色强度分别进行分级记分, 然后根据两项乘积确定其表达强度。阳性细胞着色强度评分标准: 0 分 (肿瘤细胞无染色)、1 分 (轻度染色)、2 分 (中度染色)、3 分 (强染色); 阳性细胞率的评分标准: 阳性细胞数 0 分 (无染色)、1 分 (1%~10%)、2 分 (11%~40%)、3 分 (41%~80%)、4 分 (>80%)。两项乘积: 0 分 (-)、1~4 分 (+)、5~8 分 (++)、9~12 分 (+++)。同样将中强度阳性 [(++)~(+++)] 归为高表达组, 将阴性与弱阳性 [(-)~(+)] 归为低表达组。

1.4 统计方法

采用 SPSS16.0 统计软件进行统计学分析。将乳腺癌的 pTNM 分期作为临床指标, HuR 和 PDGFC 的表达与乳腺癌 pTNM 分期的关系采用 spearman 等级相关进行相关性分析, 两者在乳腺癌组织中表达的相关性分析采用配对设计 χ^2 方检验、Pearson 列联系数。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HuR 与 PDGFC 在乳腺癌组织中的表达

乳腺癌组织中 HuR 蛋白的表达主要定位于细胞核, 呈现棕黄色弥漫性分布, 部分细胞浆也有表达 (图 1); PDGFC 主要位于肿瘤细胞胞浆中, 细胞核无表达, 为粗细不一的棕褐色颗粒 (图 2)。

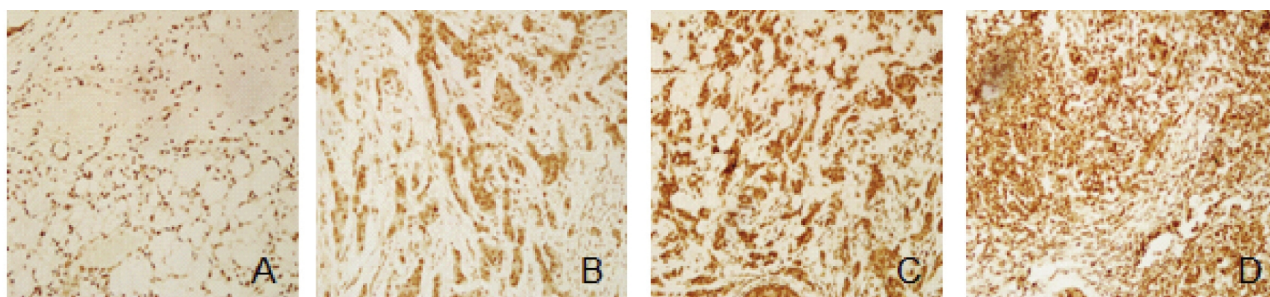


图 1 HuR 在不同 pTNM 分期中的表达 ($\times 200$): A: I 期 B: II 期 C: III 期 D: IV 期

Fig. 1 The expressions of HuR in different pTNM stages ($\times 200$): A: I stage B: II stage C: III stage D: IV stages

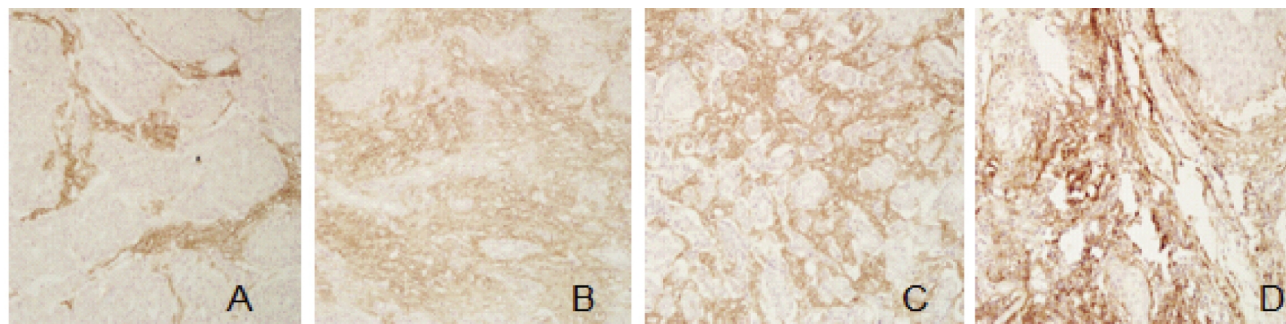


图 2 PDGFC 在不同 pTNM 分期中的表达 ($\times 200$): A: I 期 B: II 期 C: III 期 D: IV 期

Fig. 2 The expressions of PDGFC in in different pTNM stages ($\times 200$): A: I stage B: II stage C: III stage D: IV stages

2.2 HuR、PDGFC 的表达与乳腺癌的 pTNM 分期的关系

按照国际 pTNM 分期标准对标本进行分组: 80 例乳腺癌标本中, I 期 31 例, II 期 25 例, III 期 15 例, IV 期 9 例。见表 1。

从表 1 中可见 HuR、PDGFC 的表达与 pTNM 分期有关 (均 P<0.05)。

表 1 HuR、PDGFC 的表达与 pTNM 分期的关系

Table 1 The correlation between expressions of HuR, PDGFC and pTNM stages

pTNM stage	Expression of HuR				P	Expression of PDGFC				P
	-	+	++	+++		-	+	++	+++	
I	3	20	5	3	0.015	5	18	7	1	0.021
II	2	12	8	3		3	11	7	4	
III	1	1	11	2		1	2	10	2	
IV	0	1	1	7		0	1	2	6	

2.3 HuR 与 PDGFC 在乳腺癌组织中表达的相关性分析

在 80 例乳腺癌标本中, HuR 和 PDGFC 均为高表达的 19 例, 均为低表达的 48 例。配对设计 X^2 检验结果显示两者在乳腺癌的表达无明显差异 ($P=0.7132$), 进一步计算 Pearson 列联系数, 结果表明乳腺癌组织中 HuR 和 PDGFC 的表达具有较高的吻合度, 且二者的吻合度具有统计学意义, 表明二者表达存在一致性 ($r=0.608$ $P>0.05$) (表 2)。

表 2 HuR 和 PDGFC 表达的相关性

Table 1 The correlation between expressions of HuR and PDGFC

PDGFC	HuR	
	High-expressed	Lowly-expressed
Highly-expressed	19	6
Lowly-expressed	7	48

3 讨论

3.1 HuR 在乳腺癌组织中的表达及其临床意义

HuR 属于胚胎致死异常视觉 (embryonic lethal abnormal vision, ELAV) 家族的 RNA 结合蛋白, 位于 19p13.2, 在多种正常组织中表达, 主要分布于胞核, 在炎症因子、缺氧等因素的刺激下引起胞质表达增高, 是 ELAVL 家族中唯一的 mRNA 结合蛋白^[9,10]。在肿瘤中, HuR 与细胞增殖、肿瘤相关的炎症和血管生成等密切相关^[11,12]。HuR 通过与靶 mRNA 3'UTR 的 ARE 结合, 增加 mRNA 稳定性, 在转录后水平调控 RNA 的稳定性和蛋白表达^[13-15]。Heinonen 等^[16]对侵袭性乳腺导管癌进行组织学检查, 发现胞质中 HuR 相应增加, 从而证实了乳腺癌细胞中高表达 HuR 与肿瘤大小、不良预后有关。本研究 HuR 在 PTNM 分期不同情况下, 乳腺癌组织中 HuR 的表达水平比较差异有统计学意义, 与文献报道相一致, 提示 HuR 可作为乳腺癌临床诊断及预后的辅助指标。

3.2 PDGFC 在乳腺癌组织中的表达及其临床意义

PDGFC 属于血小板衍生生长因子 (platelet derived growth factor) 家族成员, 最先发现于血小板 α 颗粒, 在多种组织细胞广泛表达, 在多种肿瘤细胞也广泛表达, 而成纤维细胞也表达 PDGFC^[17-19]。Khajah 等^[20]研究发现在成纤维细胞存在的情况下, PDGFC 能增强乳腺癌细胞的侵袭力。本研究发现 PDGFC 的表达与乳腺癌的 pTNM 分期相关, 乳腺癌的 pTNM 分期与恶性程度相关, 在一定程度上反映了 PDGFC 的表达可能与乳腺癌的恶性程度相关, 与文献报道大相径庭。提示 PDGFC 对肿

瘤进展与转移尤其是对预后有影响。

3.3 乳腺癌中 HuR 与 PDGFC 之间的相关性

本研究中, 检测结果显示乳腺癌组织中 HuR 与 PDGFC 的表达与乳腺癌的 pTNM 分期有关, 对两者表达的相关性进行研究, 发现两者的表达呈正相关关系 ($r=0.608$)。说明 HuR 与 PDGFC 在乳腺癌的发生发展中具有重要作用, 提示在乳腺癌中 HuR 与 PDGFC 两者可能通过共同或相同的通路在肿瘤的发生发展中发挥作用, 高表达的 HuR 可能作为上游调控因子通过多种途径对 PDGFC 基因产生调控, 提高 PDGFC 的表达。由于本研究的方法及类型限制, 还不能明确这种因果关系。因此还需要通过进行体外实验等方式对 HuR 与 PDGFC 之间的作用机制行进一步研究。

综上所述, 乳腺癌组织中 HuR 与 PDGFC 的表达不但明显增高, 而且两者的表达具有正相关性, 这提示 HuR 和 PDGFC 可在相同或相近的作用途径参与乳腺癌的发生发展, 检测乳腺癌组织中 HuR 和 PDGFC 的水平对乳腺癌的早期诊断、疾病进展及预后具有一定的临床价值。已有的研究提示, RNA 干扰 HuR 的表达能抑制 MDR1 基因的表达, 增加耐药乳腺癌 MCF-7 / Adr 细胞对多柔比星的敏感性^[21]。不难预测以干预 HuR 作用途径的新型抗肿瘤药物应用于临床实践, 为临床有效防止肿瘤恶性演变提供新的思路和策略。

参考文献 (References)

- [1] Bleicher RJ, Ruth K, Sigurdson ER, et al. Preoperative delays in the US Medicare population with breast cancer[J]. J Clin Oncol, 2012, 30 (36): 4485-4492
- [2] Thomassen M, Tan Q, Burton M, et al. Gene Expression Meta-Analysis Identifies Cytokine Pathways and 5q Aberrations Involved in Metastasis of ERBB2 Amplified and Basal Breast Cancer [J]. Cancer Inform, 2013, 12: 203-219
- [3] Ilic M, Vlajinac H, Marinkovic J, et al. Abortion and breast cancer: case-control study[J]. Tumori, 2013, 99(4): 452-457
- [4] Uehiro N, Horii R, Iwase T, et al. Validation study of the UICC TNM classification of malignant tumors, seventh edition, in breast cancer[J]. World J Surg, 2013, 37(6): 1241-1248
- [5] Li Y, Yu J, DU D, et al. Involvement of post-transcriptional regulation of FOXO1 by HuR in 5-FU-induced apoptosis in breast cancer cells [J]. Oncol Lett, 2013, 6(1): 156-160
- [6] Wang J, Li D, Wang B, et al. Predictive and prognostic significance of cytoplasmic expression of ELAV-like protein HuR in invasive breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy [J]. Breast Cancer Res Treat, 2013, 141(2): 213-224

- [7] 周国兴,余清平,刘求梅,等.福尔马林致痛对大鼠脊髓和背根神经节的P2X3的影响[J].现代生物医学进展,2007,7(7):1051-1053
Zhou Guo-xing, Yu Qing-ping, Liu Qiu-mei, et al. Effect of Formalin Test on the Expression of P2X3 in the Spinal Cord and Dorsal Root Ganglion[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2007, 7(7): 1051-1053
- [8] Muradov JM, Hagg T. Intravenous infusion of magnesium chloride improves epicenter blood flow during the acute stage of contusive spinal cord injury in rats[J]. J Neurotrauma, 2013, 30(10): 840-852
- [9] Papa S, Rossi F, Ferrari R, et al. Selective nanovector mediated treatment of activated proinflammatory microglia/macrophages in spinal cord injury[J]. ACS Nano, 2013, 7(11): 9881-9895
- [10] Smith PD, Bell MT, Puskas F, et al. Preservation of motor function after spinal cord ischemia and reperfusion injury through microglial inhibition[J]. Ann Thorac Surg, 2013, 95(5): 1647-1653
- [11] Xie W, Liu X, Xuan H, et al. Effect of betamethasone on neuropathic pain and cerebral expression of NF-kappaB and cytokines. Neurosci Lett, 2006, 393(2-3): 255-259
- [12] Sribnick EA, Samantaray S, Das A, et al. Postinjury estrogen treatment of chronic spinal cord injury improves locomotor function in rats [J]. J Neurosci Res, 2010, 88(8): 1738-1750
- [13] Yu WR, Fehlings MG. Fas/FasL-mediated apoptosis and inflammation are key features of acute human spinal cord injury: implications for translational, clinical application[J]. Acta Neuropathol, 2011, 122(6): 747-761
- [14] Esposito E, Mazzon E, Paterniti I, et al. Olprinone attenuates the acute inflammatory response and apoptosis after spinal cord trauma in mice[J]. PLoS One, 2010, 5(9): e12170
- [15] Benedict AL, Mountney A, Hurtado A, et al. Neuroprotective effects of sulforaphane after contusive spinal cord injury [J]. J Neurotrauma, 2012, 29(16): 2576-2586
- [16] Yang ZZ, Li J, Li SX, et al. Effect of ginkgolide B on striatal extracellular amino acids in middle cerebral artery occluded rats [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 136(1): 117-122
- [17] Moon YJ, Lee JY, Oh MS, et al. Inhibition of inflammation and oxidative stress by Angelica dahuricae radix extract decreases apoptotic cell death and improves functional recovery after spinal cord injury[J]. J Neurosci Res, 2012, 90(1): 243-256
- [18] Nakajima Y, Osuka K, Seki Y, et al. Taurine reduces inflammatory responses after spinal cord injury[J]. Neurotrauma, 2010, 27(2): 403-410
- [19] Sang N, Zhang J, Chen C. COX-2 oxidative metabolite of endocannabinoid 2-AG enhances excitatory glutamatergic synaptic transmission and induces neurotoxicity[J]. J Neurochem, 2007, 102(6): 1966-1977
- [20] Prow NA, Irani DN. The inflammatory cytokine, interleukin-1 beta, mediates loss of astroglial glutamate transport and drives excitotoxic motor neuron injury in the spinal cord during acute viral encephalomyelitis[J]. J Neurochem, 2008, 105(4): 1276-1286
- [21] Hostettler ME, Knapp PE, Carlson SL. Platelet-activating factor induces cell death in cultured astrocytes and oligodendrocytes: involvement of caspase-3[J]. Glia, 2002, 38(3): 228-239

(上接第 5013 页)

- [7] Wiradjaja F, Cottle DL, Jones L, et al. Regulation of PDGFC signalling and extracellular matrix composition by FREM1 in mice [J]. Dis Model Mech, 2013, 6(6): 1426-1433
- [8] Bruland O, Akslen LA, Eiken HG, et al. Inverse correlation between PDGFC expression and lymphocyte infiltration in human papillary thyroid carcinomas[J]. BMC Cancer, 2009, 9: 425
- [9] Latorre E, Tebaldi T, Viero G, et al. Downregulation of HuR as a new mechanism of doxorubicin resistance in breast cancer cells [J]. Mol Cancer, 2012, 11: 13
- [10] Zhu Z, Wang B, Bi J. Cytoplasmic HuR expression correlates with P-gp, HER-2 positivity, and poor outcome in breast cancer [J]. Tumour Biol, 2013, 34(4): 2299-308
- [11] Kim MY, Hur J, eong S. Emerging roles of RNA and RNA-binding protein network in cancer cells[J]. BMB Rep, 2009, 42(3): 125-130
- [12] Mrena J, Wiksten JP, Kakkola A, et al. COX-2 is associated with proliferation and apoptosis markers and serves as an independent prognostic factor in gastric cancer[J]. Tumour Biol, 2010, 31(1): 1-7
- [13] Hasegawa H, Kakuguchi W, Kumshima T, et al. HuR is exposed to the cytoplasm in oral cancer cells in a different manner from that of normal cells[J]. Br J Cancer, 2009, 100(12): 1943-1948
- [14] Wang J, Zhao W, Guo Y, et al. The expression of RNA-binding protein HuR in non-small cell lung cancer correlates with vascular endothelial growth factor-C expression and lymph node metastasis [J]. Oncology, 2009, 76(6): 420-429
- [15] Pryzbylowski P, Obajimi O, Keen JC. Trichostatin A and 5Aza-2'-deoxycytidine decrease estrogen receptor mRNA stability in ER positive MCF7 cells through modulation of HuR [J]. Breast Cancer Res Treat, 2008, 111(1): 15-25
- [16] Heinonen M, Bono P, Narko K. Cytoplasmic HuR expression is a prognostic factor in invasive ductal breast carcinoma [J]. Cancer Res, 2005, 65(6): 2157-2161
- [17] Wiradjaja F, Cottle DL, Jones L, et al. Regulation of PDGFC signalling and extracellular matrix composition by FREM1 in mice [J]. Dis Model Mech, 2013, 6(6): 1426-33
- [18] Lai KK, Shang S, Lohia N, et al. Extracellular matrix dynamics in hepatocarcinogenesis: a comparative proteomics study of PDGFC transgenic and Pten null mouse models[J]. PLoS Genet, 2011, 7(6): e1002147
- [19] Liao D, Luo Y, Markowitz D, et al. Cancer associated fibroblasts promote tumor growth and metastasis by modulating the tumor immune microenvironment in a 4T1 murine breast cancer model [J]. PLoS One, 2009, 4(11): e7965
- [20] Khajah MA, Al Saleh S, Mathew PM, et al. Differential effect of growth factors on invasion and proliferation of endocrine resistant breast cancer cells[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e41847
- [21] 楚慧丽, 王俊, 朱忠鹏, 等. 沉默 HuR 的表达增加人乳腺癌耐药 MCF-7/Adr 细胞对多柔比星的敏感性 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2013, 20(2): 182-186
Chu Hui-li, Wang Jun, Zhu Zhong-peng, et al. Silencing HuR expression increases sensitivity of multidrug-resistant human breast cancer MCF-7/Adr cells to doxorubicin [J]. Chin J Cancer Biother, 2013, 20(2): 182-186