



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.05.018
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.05.018
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(5):707-711.

· 基础研究 ·

NuSAP 在乳腺癌中的表达及临床意义

何敢¹, 喻嫦娥¹, 吴海滨², 颜泽铭², 李贤勇², 黄胜超², 张远起², 李建文²

(1. 湖南省衡阳市中心医院 乳甲外科, 湖南 衡阳 421001; 2. 广东医学院附属医院 血管甲状腺乳腺外科, 广东 湛江 524001)

摘要

目的: 探讨乳腺癌组织中新型微管结合蛋白 NuSAP 的表达及临床意义。

方法: 选取乳腺癌组织 50 例, 与相应癌旁正常乳腺组织 37 例 (距癌灶 5 cm 以上) 以及乳腺良性病变组织 20 例, 分别用免疫组化与实时荧光定量 PCR 方法检测 NuSAP 蛋白与 mRNA 的表达, 分析 NuSAP 表达与乳腺癌患者临床病理特征的关系。

结果: NuSAP 蛋白与 mRNA 在乳腺癌组织中的表达水平明显高于癌旁正常组织和乳腺良性病变组织 (均 $P < 0.05$); NuSAP 蛋白与 mRNA 的表达均在有腋窝淋巴结转移、HER-2 表达阳性的乳腺癌组织中明显升高 (均 $P < 0.05$), 而与绝经状态、年龄以及 ER、PR、Ki-67 的表达无关 (均 $P > 0.05$)。

结论: NuSAP 在乳腺癌组织中的表达升高, 且可能与乳腺癌的发生、发展及侵袭密切相关。

关键词

乳腺肿瘤; 微管相关蛋白质类; 肿瘤转移

中图分类号: R737.9

NuSAP expression in breast carcinoma and its clinical significance

HE Gan¹, YU Chang'e¹, WU Haibin², YAN Zeming², LI Xianyong², HUANG Shengchao², ZHANG Yuanqi², LI Jianwen²

(1. Department of Breast and Thyroid Surgery, Hengyang Central Hospital, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Department of Vascular, Breast and Thyroid Surgery, the Affiliated Hospital, Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524001, China)

Abstract

Objective: To investigate the expression of the new microtubule-binding protein NuSAP in breast cancer tissue and its clinical significance.

Methods: Fifty specimens of breast cancer tissue together with 37 specimens of the adjacent normal breast tissue (>5 cm away from the tumor) and 20 breast specimens of benign disease were collected. The expressions of protein and mRNA in these tissues were detected by immunohistochemical staining and real-time quantitative PCR, respectively. The relations of NuSAP expression with clinicopathologic characteristics of breast cancer patients were analyzed.

Results: Both NuSAP protein and mRNA expression levels in breast cancer tissue were significantly higher than those in adjacent normal breast tissue and breast tissue from benign disease (all $P < 0.05$); both NuSAP protein and mRNA expression levels were significantly increased in breast cancer tissues with axillary lymph node metastasis and positive HER-2 expression (all $P < 0.05$), while they were irrelevant to age, menopausal status, and expressions

基金项目: 广东医学院青年基金资助项目 (Q2012032); 广东省湛江市 2012 年度财政资金科技专项竞争性分配项目 (2012C030248)。

收稿日期: 2015-01-04; **修订日期:** 2015-04-15。

作者简介: 何敢, 湖南省衡阳市中心医院住院医师, 主要从事乳腺癌诊疗方面的研究。

通信作者: 李建文, Email: xgjrwk@163.com

of ER, PR and Ki-67 (all $P>0.05$).

Conclusion: NuSAP expression is increased in breast cancer tissue, which may be closely associated with the occurrence, development and progression of breast cancer.

Key words Breast Neoplasms; Microtubule-Associated Proteins; Neoplasm Metastasis

CLC number: R737.9

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤，发病率约为14.2/10万^[1-3]。它的发生与环境因素、生活习惯、饮食习惯改变密切相关，是多基因变异累积逐渐演变的结果^[4]。而NuSAP是由Vanden等^[5]报告的一种在脊椎动物中的长约1.3 kb、分子量为55 kD的新型微管结合蛋白，它选择性的在增殖细胞中表达^[6]。NuSAP作为癌症的一种表型，在肝癌，前列腺癌，黑色素瘤中的增殖和侵袭中起着重要的作用，但在乳腺癌中的研究甚少。本研究检测乳腺癌组织中NuSAP的表达情况，探讨其在乳腺癌发展、侵袭和转移等的关系，旨在为乳腺癌的早期诊断、临床治疗和预后判断提供有价值的依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集广东医学院附属医院2012年6月—2013年1月手术切除并经病理证实的乳腺癌标本50例，部分得到相应癌旁组织标本（病理证实无癌性病变的正常乳腺组织）37例，乳腺良性病变组织20例。标本离体5 min内取材2份，1份标本用液氮速冻5 min后放置-70℃冰箱保存；另外1份标本均40 g/L缓冲中性福尔马林液固定，常规石蜡包埋，每个标本蜡块行4 μm厚度连续切片。50例乳腺癌中年龄在26~83岁；乳腺浸润性导管癌46例，乳腺黏液癌3例，混合型1例；腋窝淋巴结有转移27例，腋窝淋巴结无转移有23例。

1.2 主要试剂

兔抗人NuSAP单克隆抗体购自北京博奥森生物科技有限公司；SP免疫组化染色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司；内参及引物购自上海生工生物工程有限公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组化 按照标准流程进行制作石蜡切片及免疫组织化学SP染色。免疫组织化学结果判

断：NuSAP蛋白主要表达于细胞膜与细胞质，其染色结果根据相关文献^[7-9]制定，采用IP(intensity percentages)评分：(1) 0分（染色强度，细胞无染色）；1分（淡黄色）；2分（棕黄色）；3分（棕褐色）。(2) 0分（染色细胞数<10%）；1分（染色细胞数10%~30%）；2分（染色细胞数31%~60%）；3分（染色细胞数>60%）。两项乘积计分>2分为阳性，计分<2则为阴性。

1.3.2 荧光实时定量PCR 按TRIZol试剂盒说明书要求对所有标本组织进行总RNA的提取，依据试剂盒说明书进行荧光实时定量PCR实验。结果计算采用目前较为常用的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法来进行相对定量，Ct值是每个反应管内的荧光信号强度到达设定的域值时所经历的循环数，由电脑根据扩增曲线自动分析计算出。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示的是实验组目的基因的表达相对于对照组的倍数。

1.4 统计学处理

实验数据采用SPSS 17.0统计学软件分析，计量资料结果用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，组间差异比较用方差分析和q检验。分类资料的两组间差异比较用 χ^2 检验，相关性分析用Spearman相关性检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NuSAP蛋白在乳腺组织中的表达情况

NuSAP蛋白主要表达于胞膜与胞质，呈棕黄色或棕褐色不同强度的染色（图1）。在乳腺癌组织中NuSAP蛋白染色阳性率为70.0%（35/50），而在乳腺良性病变和癌旁正常乳腺组织中阳性率分别为40.0%（8/20）、37.8%（14/37）。NuSAP蛋白在乳腺癌组织阳性表达率明显高于癌旁正常组织和乳腺良性病变组织（均 $P<0.05$ ）；NuSAP蛋白阳性表达率在乳腺良性病变组织与在癌旁正常组织差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）（表1）。

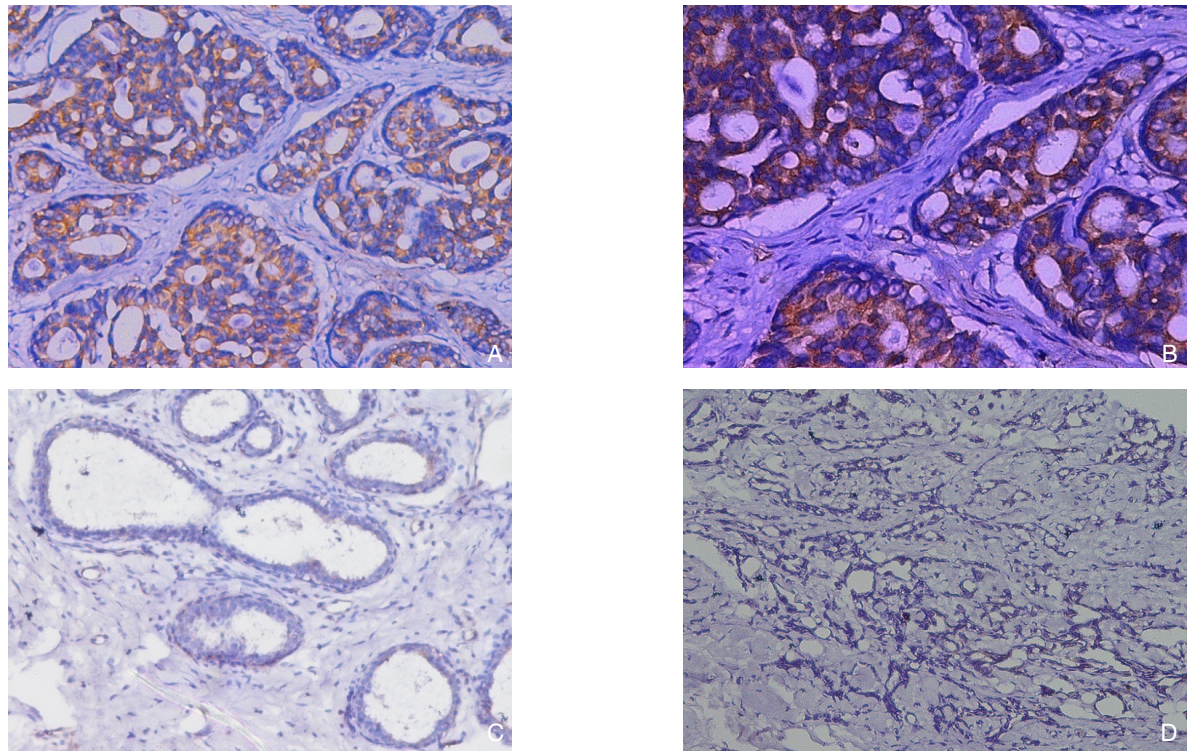


图1 免疫组化检测 NuSAP 蛋白的表达 A: 乳腺癌组织(×200); B: 乳腺癌组织(×400); C: 乳腺良性病变组织(×200); D: 癌旁正常组织(×200)

Figure 1 Immunohistochemical staining for NuSAP protein expression A: Breast cancer tissue (×200); B: Breast cancer tissue (×400); C: Breast tissue from benign disease (×200); D: Adjacent normal breast tissue (×200)

表1 NuSAP 蛋白在各组织中的表达比较 [n (%)]

Table 1 Comparison of NuSAP protein expression in different tissues [n (%)]

组织	n	NuSAP 蛋白		χ ²	P
		阳性	阴性		
乳腺癌组织	50	35 (70.0)	15 (30.0)	5.426	0.021 ¹⁾
良性病变组织	20	8 (40.0)	12 (60.0)	0.026	0.873 ²⁾
癌旁正常组织	37	14 (37.8)	23 (62.2)	8.941	0.003 ³⁾

注: 1) 乳腺癌组织与良性病变组织比较; 2) 良性病变组织与癌旁正常组织比较; 3) 乳腺癌组织与癌旁正常组织比较

Note: 1) breast cancer tissue vs. benign breast tissue; 2) benign breast tissue vs. adjacent normal breast tissue; 3) breast cancer tissue vs. adjacent normal breast tissue

2.2 NuSAP 蛋白表达与乳腺癌临床病理参数的关系

NuSAP蛋白在乳腺癌组织中的阳性表达与腋窝淋巴结转移、HER-2有关, NuSAP蛋白在淋巴结转移的乳腺癌组织阳性表达率高于无淋巴结转移的乳腺癌组织、HER-2阳性表达的乳腺癌组织较HER-2阴性表达的乳腺癌组织阳性表达率高(均 $P < 0.05$); NuSAP蛋白表达与绝经状态、年龄、ER、PR、Ki-67等表达无关(均 $P > 0.05$) (表2)。

表2 NuSAP 蛋白表达和乳腺癌临床病理参数的关系 [n (%)]

Table 2 Relations of NuSAP protein expression with clinicopathologic features of breast cancer [n (%)]

项目	n	NuSAP 蛋白阳性	χ ²	P
绝经状态				
绝经前	24	18 (75.0)	0.549	0.459
绝经后	26	17 (65.4)		
年龄 (岁)				
< 50	24	17 (70.8)	0.015	0.902
≥ 50	26	18 (69.2)		
肿瘤最大直径 (cm)				
≤ 2	19	12 (63.2)	0.683	0.409
> 2	31	23 (74.2)		
腋淋巴结转移				
无	22	13 (59.1)	2.139	0.019
有	28	23 (82.1)		
HER-2				
阳性	21	18 (85.7)	4.258	0.033
阴性	29	17 (58.6)		
ER				
阳性	43	29 (67.4)	0.957	0.328
阴性	7	6 (85.7)		
PR				
阳性	41	28 (68.2)	0.316	0.705
阴性	9	7 (77.8)		
Ki-67				
高	13	11 (84.6)	1.787	0.181
低	37	24 (64.8)		

2.3 NuSAP mRNA 在各乳腺组织中的表达情况

设置由系统自动调整基线和阈值, 计算各样本中NuSAP mRNA的平均表达量 (Δ CT值), 再取其对数, 比较NuSAP mRNA在各组中的表达差异。定量RT-PCR结果显示, 乳腺癌组织分别与癌旁正常组织、良性病变组织比较, NuSAP mRNA表达量差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), NuSAP mRNA在乳腺癌癌性组表达明显增高 (表3)。

2.4 NuSAP mRNA 表达与乳腺癌临床病理参数的关系

RT-PCR显示NuSAP mRNA在乳腺癌组织中的阳性表达率与腋窝淋巴结转移及HER-2有关, 腋窝淋巴结转移的乳腺癌组织NuSAP mRNA表

达阳性率明显高于早期的乳腺癌组织、HER-2高表达的乳腺癌患者NuSAP mRNA表达阳性率明显高于HER-2低表达的乳腺癌患者 (均 $P < 0.05$); NuSAP mRNA表达与绝经状态、年龄、ER、PR、Ki-67等表达无关 (均 $P > 0.05$) (表4)。

表3 不同组织 NuSAP mRNA 的相对表达量

Table 3 The relative expression levels of NuSAP mRNA in different tissues

组织	平均 Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT
癌旁正常组织	9.382	0.000	1.000
良性病变组织	8.535	-0.847	1.799
乳腺癌组织	7.117	-2.264	4.805

表4 乳腺癌组织中 NuSAP mRNA 表达和临床病理参数的关系

Table 4 Relations of NuSAP mRNA expression with clinicopathologic variables of breast cancer

项目	n	NuSAP mRNA	t	P	项目	n	NuSAP mRNA	t	P
绝经状态					HER-2				
绝经前	24	4.71 ± 0.25	0.946	0.331	阳性	21	4.86 ± 0.47	3.828	0.036
绝经后	26	4.74 ± 0.39			阴性	29	3.74 ± 0.61		
年龄 (岁)					ER				
< 50	24	4.78 ± 0.56	0.251	0.616	阳性	43	4.87 ± 0.32	0.078	0.783
≥ 50	26	4.69 ± 0.64			阴性	7	4.69 ± 0.64		
肿瘤最大直径 (cm)					PR				
≤ 2	19	4.86 ± 0.62	0.101	0.750	阳性	41	4.91 ± 0.71	0.133	0.716
> 2	31	4.74 ± 0.89			阴性	9	4.79 ± 0.56		
腋淋巴结转移					Ki-67				
无	22	4.59 ± 0.41	4.502	0.007	高	13	5.36 ± 0.23	0.434	0.252
有	28	5.25 ± 0.55			低	37	5.09 ± 0.34		

3 讨论

NuSAP蛋白含有一个SAP样的结构域, 近来的相关研究^[10-11]已经确定了此SAP域是一个DNA结合域, 可能有助于NuSAP参与转录调控、DNA修复、RNA的加工和凋亡染色质的退化。NuSAP在癌症的增殖和侵袭中起着重要的作用^[12-18], 而关于NuSAP与乳腺癌的发生与发展的研究尚未见报道。

在本研究中免疫组化发现NuSAP蛋白在乳腺癌组织中的阳性表达率明显高于乳腺良性病变和癌旁正常乳腺组织的阳性表达率, 而后两者阳性表达率无差别; RT-PCR法实时定量检测发现NuSAP mRNA在乳腺癌组织中呈高表达水平, 比癌旁正常组升高了3.805倍, 与正常组织及良性病变组织相比差异有统计学意义, 这与Satow等^[15]发现的NuSAP在肝癌组织较非肿瘤的肝组织表达明显上调的结果相符。而NuSAP mRNA在乳腺良性

病变组织中表达增高不明显, 乳腺良性病变组织及正常组织两组相比较无统计学差异。

本研究还通过统计分析了NuSAP与乳腺癌临床病理学参数之间的关系, 结果提示乳腺癌中NuSAP蛋白和NuSAP mRNA在乳腺癌组织中的阳性表达与腋窝淋巴结转移、HER-2有关, 而与绝经状态、年龄以及ER、PR、Ki-67表达无关。腋窝淋巴结转移作为判断乳腺癌预后的独立因素^[19-20], 常与乳腺癌的侵袭转移密切相关, 而NuSAP的表达与腋窝淋巴结转移呈正向关系, 表明NuSAP亦可以作为判断乳腺癌愈合的一种因素, 它与乳腺癌的发生发展转移密切相关。NuSAP在HER-2阳性表达的乳腺癌较HER-2阴性表达的乳腺癌组织阳性表达率高, 两者呈正向关系。HER-2阳性是乳腺癌生物靶向治疗的首选指标, 能否用NuSAP作为HER-2靶向治疗的中间桥梁, 有待进一步证实。

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] Chen W, Zheng R, Zhang S, et al. The incidences and mortalities of major cancers in China, 2009[J]. *Chin J Cancer*, 2013, 32(3):106-112.
- [3] 黄哲宙, 陈万青, 吴春晓, 等. 中国女性乳腺癌的发病和死亡现状[J]. *肿瘤*, 2012, 32(6):435-439.
- [4] 牛瑞芳, 杨毅, 刘红, 等. 乳腺癌中癌基因抗癌基因表达分析[J]. *中国肿瘤临床*, 2003, 30(3):167-171.
- [5] Vanden Bosch A, Raemaekers T, Denayer S, et al. NuSAP is essential for chromatin-induced spindle formation during early embryogenesis[J]. *J Cell Sci*, 2010, 123(Pt 19):3244-3255.
- [6] 谢萍, 李璐, 张令强, 等. 微管结合蛋白NuSAP的组织表达谱分析[J]. *军事医学科学院院刊*, 2010, 34(6):509-512.
- [7] Mattern J, Koonunägi R, Volln M, et al. Biological characterization of subgroup of squamous cell lung carcinomas[J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(6):1459-1463.
- [8] 付丽, 傅西林. 乳腺肿瘤病理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008:12-50.
- [9] 回允中. 肿瘤组织病理学诊断[M]. 第3版. 北京: 北京大学医学出版社, 2009:907-912.
- [10] Ribbeck K, Raemaekers T, Carmeliet G, et al. A role for NuSAP in linking microtubules to mitotic chromosomes[J]. *Curr Biol*, 2007, 17(3):230-236.
- [11] Aravind L, Koonin EV. SAP-a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization[J]. *Trends Biochem Sci*, 2000, 25(3):112-114.
- [12] Bogunovic D, O'Neill DW, Belitskaya-Levy I, et al. Immune profile and mitotic index of metastatic melanoma lesions enhance clinical staging in predicting patient survival[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(48):20429-20434.
- [13] Ryu BT, Lee JO, Kim CW, et al. Resolution enhancement techniques for halftoned images[J]. 2007, 6493: 6493(c).
- [14] Gulzar ZG, McKenney JK, Brooks JD. Increased expression of NuSAP in recurrent prostate cancer is mediated by E2F1[J]. *Oncogene*, 2013, 32(1):70-77.
- [15] Satow R, Shitashige M, Kanai Y, et al. Combined functional genome survey of therapeutic targets for hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(9):2518-2528.
- [16] Li L, Zhou Y, Sun L, et al. NuSAP is degraded by APC/C-Cdh1 and its overexpression results in mitotic arrest dependent of its microtubules' affinity[J]. *Cell Signal*, 2007, 19(10):2046-2055.
- [17] Kokkinakis DM, Liu X, Neuner RD. Modulation of cell cycle and gene expression in pancreatic tumor cell lines by methionine deprivation (methionine stress): implications to the therapy of pancreatic adenocarcinoma[J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(9):1338-1348.
- [18] Bouwknegt M, Knol AB, van der Sluijs JP, et al. Uncertainty of population risk estimates for pathogens based on QMRA or epidemiology: a case study of *Campylobacter* in the Netherlands[J]. *Risk Anal*, 2014, 34(5): 847-864.
- [19] 赵杰, 欧江华, 倪多, 等. 乳腺癌非前哨淋巴结转移的相关危险因素分析[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(5):661-664.
- [20] 白建平, 张霆, 覃大伟. TK1、Ki-67、p53在乳腺癌组织中的表达与其预后的关系[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(5):629-633.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 何敢, 喻嫦娥, 吴海滨, 等. NuSAP在乳腺癌中的表达及临床意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(5):707-711. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.05.018

Cite this article as: HE G, YU CE, WU HB, et al. NuSAP expression in breast carcinoma and its clinical significance[J]. *Chin J Gen Surg*, 2015, 24(5):707-711. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.05.018