

SIAH2 和 HIF-1 α 在乳腺浸润性导管癌中的表达及意义

安淑香¹, 孙硼朋², 雷丽¹, 甘畅¹, 刘景涛¹

(1.阜新市中心医院, 辽宁 阜新 123000; 2.阜新市五院, 辽宁 阜新 123000)

摘要: [目的] 研究 SIAH2 和 HIF-1 α 蛋白在乳腺浸润性导管癌组织中的表达及其与临床病理特征的关系。[方法] 采用免疫组织化学方法检测 80 例乳腺浸润性导管癌组织和 10 例乳腺癌旁正常组织中 SIAH2 和 HIF-1 α 的表达; 采用 Western Blot 法检测 25 例乳腺浸润性导管癌和 20 例乳腺纤维腺瘤中 SIAH2 和 HIF-1 α 蛋白的表达。[结果] 乳腺浸润性导管癌组织中 SIAH2 及 HIF-1 α 的阳性表达率分别为 60% 和 65%, 癌旁正常组织中均未见表达。SIAH2 和 HIF-1 α 表达存在正相关关系($r=0.310, P<0.05$)。两种蛋白表达与肿瘤的组织学分级、临床分期和淋巴结转移密切相关, 而与肿瘤大小、年龄无显著相关性。Western Blot 结果表明 SIAH2 和 HIF-1 α 两种蛋白在乳腺癌组织中的表达均高于乳腺纤维腺瘤中的表达(P 均为 0.00)。[结论] SIAH2 及 HIF-1 α 过表达在乳腺癌的发展及浸润转移中具有重要的作用。

关键词: SIAH2; HIF-1 α ; 乳腺肿瘤; 临床病理特征

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)02-0097-05

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2014.02.B004

Expressions of SIAH2 and HIF-1 α in Breast Invasive Ductal Carcinoma and Their Significances

AN Shu-xiang¹, SUN Peng-peng², LEI Li¹, et al.

(1. Fuxin Center Hospital, Fuxin 123000, China; 2. Fuxin Fifth Hospital, Fuxin 123000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expressions of SIAH2 and HIF-1 α in breast invasive ductal carcinoma and their relationship with the clinicopathological factors. [Methods] The expressions of SIAH2 and HIF-1 α were determined by immunohistochemical staining in 80 cases with breast invasive ductal carcinoma and 10 cases with cancer adjacent tissues. The expressions of SIAH2 and HIF-1 α were also detected by Western Blot in 25 cases with breast invasive ductal carcinoma and 20 cases with breast fibroadenoma. [Results] The positive expression rates of SIAH2 and HIF-1 α in breast invasive ductal carcinoma were 60% and 65%, respectively. No expression was found in cancer adjacent tissues. Positive relationship was found between SIAH2 and HIF-1 α expressions($r=0.310, P<0.05$). The expressions of SIAH2 and HIF-1 α correlated with histological grade, TNM stage and lymph node metastasis, but no relationship was found between their expressions and patients' age or tumor size. Western Blot analysis results showed expression of SIAH2 and HIF-1 α protein was higher in breast cancer tissues than those in breast fibroadenoma tissues($P=0.00$). [Conclusion] The over expressions of SIAH2 and HIF-1 α might play an important role in progression, invasion and metastasis of breast cancer.

Subject words: SIAH2; HIF-1 α ; breast neoplasms; clinical pathological factors

SIAH2 是保守的 E3 泛素连接酶, 可调节一些蛋白的泛素化和降解, 通过其作用的底物在细胞分裂周期、转录调控和凋亡、低氧应激等方面发挥重要作用。近来研究发现 SIAH2 参与多条信号通路成为重要的肿瘤因子^[1,2]。SIAH2 在肺癌及胰腺癌细胞系中的研究表明 SIAH2 可通过下调 P-ERK 抑制肿瘤

生长^[3,4]。低氧诱导因子 HIF-1 α 在细胞缺氧反应中起关键作用, HIF-1 α 的表达与肿瘤生成和转移有关^[5]。SIAH2 通过其底物蛋白 PHD3 调节 HIF-1 α 稳定性^[6]。Qi 等^[7]发现在鼠黑色素瘤 SIAH2 通过 HIF-1 α 依赖的方式调节肿瘤转移; Möller 等^[8]也发现 SIAH2 在乳腺转移瘤里发挥作用, 在鼠的合成乳腺模型里, 抑制 SIAH2 后 HIF-1 α 表达减少, 肿瘤减慢生长, 鼠的生存期延长。

SIAH2 的研究大多集中在体外, 在乳腺癌组织

通讯作者: 安淑香, 主治医师, 硕士; 阜新市中心医院病理科, 辽宁省阜新市海州区中华路 74 号(123000); E-mail: blog1001@163.com
收稿日期: 2013-08-01; **修回日期:** 2013-09-18

中 SIAH2 表达研究鲜见报道, HIF-1 α 在乳腺癌组织中高表达, 其表达促进乳腺癌的转移^[9]。在鼠黑色素瘤里 SIAH2 通过 HIF-1 α 依赖的方式调节肿瘤转移, 那么在乳腺癌组织中两者的表达是否存在一定的相关性。本实验通过研究 SIAH2 和 HIF-1 α 在乳腺癌组织中的表达及其与临床病理因素的关系, 探讨 SIAH2 和 HIF-1 α 在乳腺癌发生发展中发挥的作用。

1 资料与方法

1.1 临床资料

80 例乳腺浸润性导管癌组织和 10 例癌旁正常组织蜡块取自阜新市中心医院病理科, 为 2009~2012 年手术切除标本。标本经 10% 中性福尔马林固定, 石蜡包埋, HE 常规染色后明确诊断。依据 WHO 2003 年所推荐的乳腺癌组织学分类标准进行分类, 80 例均为浸润性导管癌。另收集 45 例外科手术切除的新鲜乳腺组织标本, 标本取出后立即置 -70℃ 冰冻保存。其中 25 例为乳腺浸润性导管癌, 20 例为乳腺纤维腺瘤。

1.2 实验试剂

SIAH2(24E6H3) 鼠单克隆抗体(sc-81787)、HIF-1 α (28b) 鼠单克隆抗体(sc-13515)均购自 Santa Cruz Biotech Inc。辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠(IE-0041)二抗购自北京中山生物技术有限公司, S-P 超敏免疫组化试剂盒、DAB 酶底物显色试剂盒购自福州迈新生物技术有限公司。

1.3 免疫组织化学(SP)法

标本经 10% 中性福尔马林固定, 石蜡包埋, 4 μ m 厚连续切片, 采用 SP 法, 按试剂盒说明书步骤进行抗 SIAH2(1:150)、HIF-1 α (1:100)抗体免疫组织化学染色, PBS 代替一抗作为阴性对照, 用已知阳性片作阳性对照。结果判定: SIAH2 蛋白阳性表达位于乳腺癌细胞核内, HIF-1 α 蛋白阳性表达主要分布于乳腺癌细胞核。每张切片在光镜下随机选取 5 个视野, 每个视野计数 100 个瘤细胞, 0 分无阳性细胞, 1 分阳性细胞 $\leq$ 50%, 2 分阳性细胞 50%~75%, 3 分阳性细胞 $\geq$ 75%; 按染色强度: 0 分无阳性细胞, 1 分呈浅黄色, 2 分呈黄色, 3 分呈棕黄色。阳性细胞数评分与染色强度评分相乘后得出综合评分。综合评分 $\geq$ 4 为阳性表达。

1.4 Western Blot 试验

检测于 4℃ 下取 1~2g 标本, 加入约 5 倍湿重的

裂解缓冲液, 粉碎匀浆后, 4℃ 静置 24h, 低温高速离心(4℃, 12 000r/min, 40min), 提取上清即为总蛋白。经电泳、转印, 5% BSA 封闭, 抗 SIAH2(1:200)、HIF-1 α (1:300)和抗 β -actin(1:5 000)4℃ 下孵育, 过夜; 与二抗室温下孵育 2h。ECL 显色, X 线胶片曝光成像, 经自动电泳凝胶成像分析仪采集图像。每组结果均为相同条件重复 3 次。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 11.5 统计学软件进行 χ^2 检验、t 检验和 Pearson 相关分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SIAH2 和 HIF-1 α 蛋白在乳腺浸润性导管癌中的表达及相关性

免疫组化结果显示, SIAH2 和 HIF-1 α 在癌旁组织中不表达(Figure 1、2)。在乳腺浸润性导管癌中, SIAH2 蛋白阳性表达位于细胞核内, 呈棕黄色颗粒, 阳性率为 60%(48/80); HIF-1 α 蛋白阳性表达亦主要分布于细胞核内, 少量分布于细胞浆, 呈棕黄色颗粒, 阳性率为 65%(52/80)。两者在分化好的低级别浸润性导管癌里散在少量表达(Figure 3、4), 而在高级别的浸润性导管癌里强表达(Figure 5、6)。SIAH2 和 HIF-1 α 表达均为阳性的标本共 37 例, 表达均为阴性的标本共 17 例。经统计学分析, 两者表达呈密切正相关($r=0.310$, $P<0.05$) (Table 1)。

2.2 乳腺浸润性导管癌组织中 SIAH2 和 HIF-1 α 表达与临床病理特征的关系

统计学分析显示, SIAH2 蛋白和 HIF-1 α 蛋白的表达水平与乳腺浸润性导管癌组织学分级、TNM 分期、淋巴结转移情况有关(P 均 <0.05), 组织学分级越高, 蛋白阳性表达率越高, III~IV 期乳腺癌患者高于 I~II 期患者, 在有淋巴结转移的乳腺癌患者中高于无淋巴结转移患者。而与患者年龄、肿瘤大小无明显相关性(Table 2)。

2.3 SIAH2 和 HIF-1 α 在乳腺浸润性导管癌和乳腺纤维腺瘤中的表达

参照 DNA 分子量标准, SIAH2 和 HIF-1 α 蛋白表达在乳腺浸润性导管癌组织可见而在乳腺纤维腺瘤组织中微弱表达(Figure 7)。统计分析显示, SIAH2 和 HIF-1 α 蛋白在乳腺浸润性导管癌组织中的表达均高于乳腺纤维腺瘤组织(P 均为 0.00)(Table 3)。

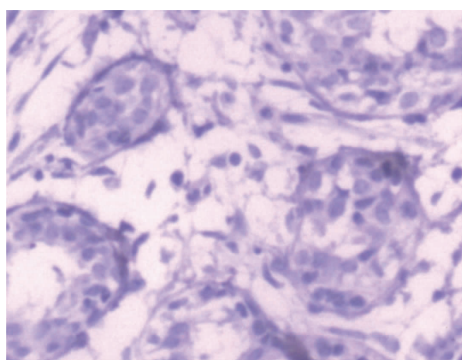


Figure 1 Expression of SIAH2 in cancer adjacent tissues(SP ×200)

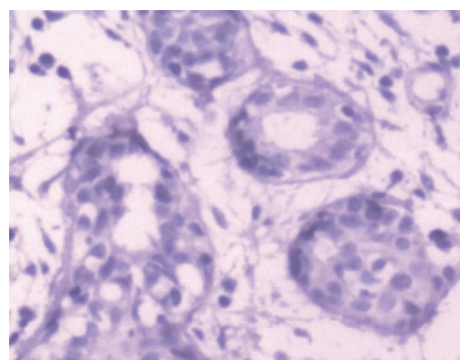


Figure 2 Expression of HIF-1α in cancer adjacent tissues(SP ×200)

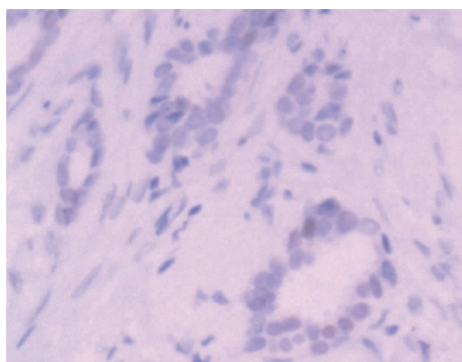


Figure 3 Expression of SIAH2 in moderately-differentiated breast invasive ductal carcinoma tissues(SP ×200)

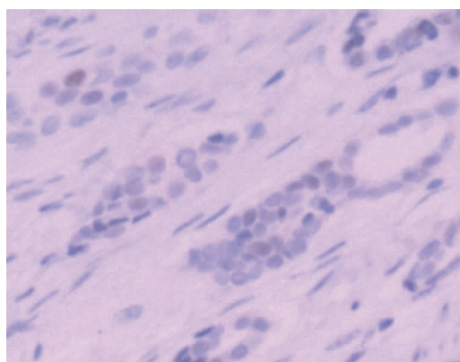


Figure 4 Expression of HIF-1α in moderately-differentiated breast invasive ductal carcinoma tissues(SP ×200)

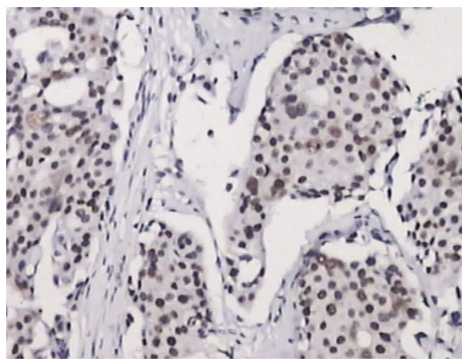


Figure 5 Expression of SIAH2 in poorly-differentiated breast invasive ductal carcinoma tissues(SP ×200)

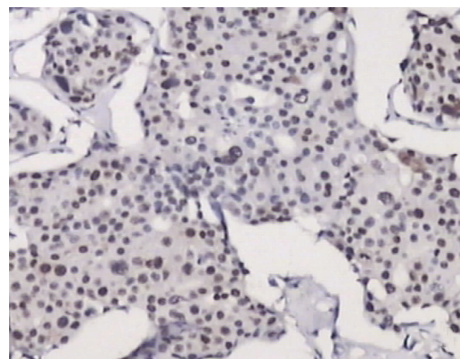


Figure 6 Expression of HIF-1α in poorly-differentiated breast invasive ductal carcinoma tissues(SP ×200)

3 讨 论

SIAH 家族蛋白是果蝇 SINA 同源蛋白。人类中有 SIAH1 和 SIAH2 两个基因同系物,是保守的 E3 泛素连接酶,具有调节蛋白的泛素化和降解的功能^[10],

其作用底物有 PHD1/3^[7]、Sprouty2^[11]、P53^[12]等。SIAH2 参与 SPRY2/Ras/ERK 和 PHD3/HIF-1α 等多条信号通路在肿瘤的发生及转移中发挥重要作用^[2]。研究发现 SIAH2 在几乎所有类型肺癌组织中都有表达,并且随着肺癌分化程度的降低 SIAH2 的表达显著

Table 1 Relationship between the expression of SIAH2 and HIF-1α

		HIF-1α		r	P
		+	-		
SIAH2	+	37	11	0.310	0.005
	-	15	17		

Table 2 Relationship between SIAH2,HIF-1α expression and clinicopathological factors in 80 cases with breast invasive ductal carcinoma

Clinicopathological factors	N	SIAH2			HIF-1α		
		Positive(%)	χ ²	P	Positive(%)	χ ²	P
Age (years)							
≤45	33	17(51.5%)	1.685	0.194	24(72.7%)	1.474	0.225
>45	47	31(66.0%)			28(59.6%)		
Tumor size (cm)							
<3	36	19(52.8%)	1.423	0.233	22(61.1%)	0.435	0.509
≥3	44	29(65.9%)			30(68.2%)		
Histological grade							
I + II	48	22(45.8%)	10.035	0.002	26(54.2%)	6.190	0.013
III	32	26(81.3%)			26(81.3%)		
Stage							
I + II	46	23(50.0%)	4.510	0.034	25(54.3%)	5.398	0.020
III+IV	34	25(73.5%)			27(79.4%)		
Lymphatic metastasis							
+	49	34(69.4%)	4.643	0.031	37(75.5%)	6.140	0.013
-	31	14(45.2%)			15(48.4%)		

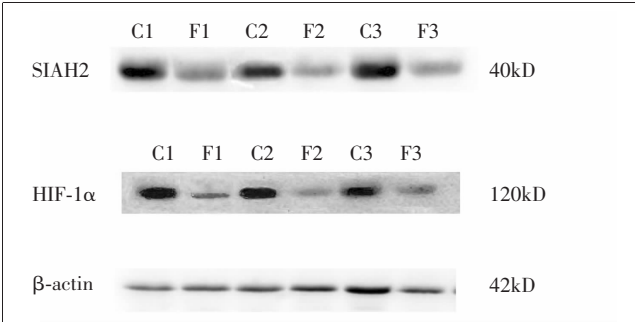


Figure 7 Western Blot showed expression of SIAH2, HIF-1α in breast invasive ductal carcinoma(C)and fibroadenoma(F) tissues

Table 3 The ratios between the optical density of SIAH2 and β-actin,HIF-1α and β-actin

Types	N	SIAH2			HIF-1α		
		$\bar{x}\pm s$	t	P	$\bar{x}\pm s$	t	P
Fibroadenoma	20	0.94±0.31	8.60	0.00	0.87±0.30	9.25	0.00
IDC	25	1.81±0.36			1.78±0.32		

增加,而在正常肺组织中不表达^[3],表明 SIAH2 促进肿瘤生成。致瘤环境导致慢性缺氧,随着癌细胞生长,缺氧区和脉管区相连接,缺氧持续,就会产生细

胞因子如 VEGF 促进血管化,肿瘤建立脉管网,促进其生长及转移^[13]。低氧诱导因子 HIF-1α 在细胞缺氧反应中起关键作用。研究发现抑制 SIAH2 后,HIF-1α 表达下调,血管生成减少,肿瘤生长减慢,化疗效果敏感^[14]。SIAH2 可通过 PHD3/HIF-1α 信号通

路促进肿瘤的转移。在鼠黑色素瘤模型里,抑制 SIAH2 后,降低 HIF-1α 的表达,抑制肿瘤的增殖和转移。SIAH2 通过激活 HIF-1α 与 FoxA2 形成转录复合体在侵袭性强的具有神经内分泌特征的前列腺癌里表达,可成为前列腺癌新的肿瘤标志物和治疗的靶点^[15]。因此SIAH2 可能作为癌基因促进肿瘤发展及转移。

SIAH2 和 HIF-1α 在乳腺癌组织中存在怎样的关系? 我们的研究发现,SIAH2 和 HIF-1α 在乳腺浸润性导管癌组织中高表达,而在癌旁正常组织中不表达,Western Blot 结果表明 SIAH2 和 HIF-1α 蛋白含量在乳腺癌组织中的表达显著高于良性乳腺纤维腺瘤组织中的表达,并且 SIAH2 的蛋白表达和组织学分级存在明显正相关,且组织学分级越高,蛋白阳性表达率越高。这与 Chan 等^[16]的研究结果相同,SIAH2 在乳腺癌组织里高表达。研究还发现 SIAH2 和 HIF-1α 在乳腺癌组织中表达均为阳性的标本共 37 例,表达存在正相关。两种蛋白表达和临床分期及淋巴结转移存在相关,提示 SIAH2 在乳腺癌的发展中发挥重要作用,SIAH2 作为 HIF-1α 的上游因子可能通过调控 HIF-1α 的表达从而在乳腺癌的发展中发挥作用。

综上所述,SIAH2 在乳腺浸润性导管癌组织中高表达,与 HIF-1α 的表达存在正相关,两者在乳腺癌的进展中发挥协调作用。深入研究 SIAH2 及其上下游调控因子可为乳腺癌的靶基因治疗提供新的思路。

参考文献:

[1] Nakayama K,Qi J,Ronai Z. The ubiquitin ligase Siah2

- and the hypoxia response[J]. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(4): 443–451.
- [2] House CM, Möller A, Bowtell DD. Siah proteins; novel drug targets in the Ras and hypoxia pathways[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(23): 8835–8838.
 - [3] Ahmed AU, Schmidt RL, Park CH, et al. Effect of disrupting seven-in-absentia homolog 2 function on lung cancer cell growth[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2008, 100(22): 1606–1629.
 - [4] Schmidt RL, Park CH, Ahmed AU, et al. Inhibition of RAS-mediated transformation and tumorigenesis by targeting the downstream E3 ubiquitin ligase sevenin absentia homologue[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(24): 11798–11810.
 - [5] Tang CM, Yu J. Hypoxia-inducible factor-1 as a therapeutic target in cancer [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013, 28(3): 401–405.
 - [6] Nakayama K, Gazdoui S, Abraham R, et al. Hypoxia-induced assembly of prolyl hydroxylase PHD3 into complexes; implications for its activity and susceptibility for degradation by the E3 ligase Siah2 [J]. *Biochem J*, 2007, 401(1): 217–226.
 - [7] Qi J, Nakayama K, Gaitonde S, et al. The ubiquitin ligase Siah2 regulates tumorigenesis and metastasis by HIF-dependent and -independent pathways[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(43): 16713–16718.
 - [8] Möller A, House CM, Wong CS, et al. Inhibition of Siah ubiquitin ligase function[J]. *Oncogene*, 2009, 28(2): 289–296.
 - [9] Schito L, Rey S, Tafani M, et al. Hypoxia-inducible factor 1-dependent expression of platelet-derived growth factor B promotes lymphatic metastasis of hypoxic breast cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(40): E2707–E2716.
 - [10] Hu G, Chung YL, Glover T, et al. Characterization of human homologs of the *Drosophila* seven in absentia (sina) gene[J]. *Genomics*, 1997, 46(1): 103–111.
 - [11] Nadeau RJ, Toher JL, Yang X, et al. Regulation of Sprouty 2 stability by mammalian Seven-in-Absentia homolog 2[J]. *J Cell Biochem*, 2007, 100(1): 151–160.
 - [12] Grishina I, Debus K, García-Limones C, et al. SIAH-mediated ubiquitination and degradation of acetyl-transferases regulate the p53 response and protein acetylation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 23(12): 2287–2296.
 - [13] Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of O₂ availability on human cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(12): 967–975.
 - [14] Wong CS, Sceneay J, House CM, et al. Vascular normalization by loss of Siah2 results in increased chemotherapeutic efficacy[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(7): 1694–1704.
 - [15] Qi J, Pellicchia M, Ronai ZA. The Siah2-HIF-FoxA2 axis in prostate cancer-new markers and therapeutic opportunities[J]. *Oncotarget*, 2010, 1(5): 379–385.
 - [16] Chan P, Möller A, Liu MC, et al. The expression of the ubiquitin ligase SIAH2 (seven in absentia homolog 2) is mediated through gene copy number in breast cancer and is associated with a basal-like phenotype and p53 expression[J]. *Breast Cancer Res*, 2011, 13(1): R19.