

乳腺癌组织中核仁纺锤体相关蛋白 1 表达与腋窝淋巴结转移的关系

张顺礼,王雅琪,胡继卫,马杰,谷峥,王宇,张景华
(唐山市人民医院,河北唐山 063001)

摘要: [目的] 探讨乳腺癌组织中核仁纺锤体相关蛋白 1 (nucleolus spinosa-related protein 1, NuSAP1) 的表达与腋窝淋巴结转移的关系。 [方法] 采用免疫组织化学染色法检测 100 例乳腺癌组织(浸润性导管癌)及其配对的癌旁组织(距离肿瘤边缘>3cm)中 NuSAP1、Hedgehog 信号通路相关蛋白(Smo 和 Gli-1)表达水平。采用 Logistic 多因素分析影响乳腺癌腋窝淋巴结转移的影响因素。 [结果] 乳腺癌组织中 NuSAP1 高表达率为 65%(65/100),明显高于癌旁组织的 18%(18/100)($\chi^2=45.945, P<0.001$)。NuSAP1 高表达组中 WHO 分级Ⅲ级、TNM Ⅲ期、腋窝淋巴结转移率均高于低表达组($P<0.05$)。WHO 分级Ⅲ级(OR=1.689, 95%CI: 1.240~3.333)、TNM Ⅲ期(OR=1.543, 95%CI: 1.345~3.602)、三阴性乳腺癌(OR=2.786, 95%CI: 1.764~4.002)和 NuSAP1 高表达(OR=2.507, 95%CI: 1.684~3.971)是乳腺癌患者腋窝淋巴结转移的独立影响因素($P<0.05$)。NuSAP1 表达水平与腋窝淋巴结转移数目呈正相关($r=0.561, P<0.001$)。NuSAP1 表达与 Smo、Gli-1 表达水平呈正相关(r 分别为 0.748 和 0.528, P 均 <0.001)。 [结论] NuSAP1 可能通过激活 Hedgehog 信号通路参与腋窝淋巴结的转移。

主题词: 乳腺癌;核仁纺锤体相关蛋白 1;淋巴结转移;免疫组织化学染色法

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)11-0957-05
doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.11.B006

Relationship Between Expression of Nucleolus Spinosa-related Protein 1 and Axillary Lymph Node Metastasis in Breast Cancer Patients

ZHANG Shun-li, WANG Ya-qi, HU Ji-wei, MA Jie, GU Zheng, WANG Yu, ZHANG Jing-hua
(Tangshan People's Hospital, Tangshan 063001, China)

Abstract: [Objective] To explore the relationship between expression of nucleolus spinosa-related protein 1(NuSAP1) and axillary lymph node metastasis in breast cancer. [Methods] Immunohistochemical staining was used to detect the expression levels of NuSAP1, Hedgehog signaling pathway-related proteins(Smo and Gli-1) in 100 breast cancer tissue samples(infiltrating ductal carcinoma) and corresponding adjacent tissue samples(>3 cm from the tumor edge). Multivariate Logistic analysis was used to analyze the risk factors of breast cancer axillary lymph node metastasis. [Results] The high expression rate of NuSAP1 in breast cancer tissues was significantly higher than that in adjacent tissues(65% vs 18%, $\chi^2=45.945, P<0.001$). In NuSAP1 high-expression group, the rates of WHO grade Ⅲ, TNM stage Ⅲ and axillary lymph node metastasis were higher than those in low expression group ($P<0.05$). WHO grade Ⅲ (OR=1.689, 95%CI: 1.240~3.333), TNM stage Ⅲ (OR=1.543, 95%CI: 1.345~3.602), triple negative breast cancer (OR=2.786, 95%CI: 1.764~4.002) and high expression of NuSAP1(OR=2.507, 95%CI: 1.684~3.971) were independent risk factors of axillary lymph node metastasis in breast cancer patients ($P<0.05$). The expression level of NuSAP1 was positively correlated with the number of metastatic axillary lymph nodes($r=0.561, P<0.001$). The expression levels of NuSAP1 were positively correlated with the expression levels of Smo and Gli-1, respectively ($r=0.748$ and $0.528, P<0.001$). [Conclusion] NuSAP1 may be involved in the axillary lymph node metastasis by activating the Hedgehog signaling pathway.

Subject words: breast cancer; nucleolus spinosa-related protein 1; lymph node metastasis; immunohistochemical staining

肿瘤转移和复发仍然是影响乳腺癌患者预后的

基金项目: 河北省卫生和计划生育委员会科研基金项目(20160874)
通信作者: 张景华, 主任医师, 博士; 河北省唐山市人民医院乳腺外科,
河北省唐山市路南区胜利路 65 号(063001); E-mail: pijiuchuo
9589@163.com

收稿日期: 2020-07-08; **修回日期:** 2020-08-07

主要原因。寻找评价乳腺癌转移的新型分子生物学标志物是临床和基础研究的重点内容。核仁纺锤体相关蛋白 1 (nucleolar spindle-associated protein 1, NuSAP1) 是新发现的脊柱动物蛋白, 主要在细胞有

丝分裂纺锤体组装过程中发挥重要作用,是保证细胞周期正常进行的重要调控分子。既往有研究发现, NuSAP1 与细胞增殖、侵袭和迁移有关,参与肿瘤的发生和发展^[1-3],但是其在乳腺癌中的表达及意义少有报道。研究显示 NuSAP1 可以调控 Hedgehog 信号通路^[4],该通路与乳腺癌侵袭和淋巴结转移密切相关。本研究采用免疫组织化学染色法检测乳腺癌组织中 NuSAP1 表达情况,分析其与临床病理特征和腋窝淋巴结转移的关系、以及与 Hedgehog 信号通路相关蛋白(Smo 和 Gli-1)表达水平的关系,旨在探讨 NuSAP1 在乳腺癌进展中的作用及可能机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2014 年 8 月至 2018 年 12 月唐山市人民医院进行手术切除的 100 例乳腺癌组织(浸润性导管癌)及其配对的癌旁组织(距离肿瘤边缘>3cm)。纳入标准:(1)年龄≥18 岁;(2)组织病理学检查证实为浸润性导管癌;(3)临床资料完整。排除标准:(1)合并其他部位癌症;(2)术前接受过放疗或化疗;(3)临床资料不全。入组患者年龄 26~81 岁,平均年龄(58.45±10.71)岁;绝经期 38 例;WHO 分级 I~II 级 68 例,III 级 32 例;TNM 分期 I~II 期 67 例,III 期 33 例;三阴性乳腺癌 18 例;发生腋窝淋巴结转移 42 例。本研究经医院伦理委员会批准(编号 20161207)。

1.2 主要试剂和仪器

兔抗人 NuSAP1 多克隆抗体(上海焱翎生物科技有限公司),兔抗人 Smo 和 Gli-1 单克隆抗体(北京美瑞克生物科技有限公司)、山羊抗兔 IgG(艾美捷科技有限公司)、免疫组化 SP 试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。IX-70 型倒置光学显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.3 免疫组织化学染色法检测组织 NuSAP1、Smo 和 Gli-1 表达

石蜡切片由医院病理科制作,厚度为 4μm。实验前将石蜡切片在 70℃下烤片 30min。用 Tris/EDTA 修复液进行抗原修复,羊血清封闭 30min,加入兔抗人 NuSAP1 多克隆抗体(稀释 500 倍)、兔抗人 Smo 单克隆抗体(稀释 100 倍)或 Gli-1 单克隆抗体(稀释 100 倍),4℃过夜,加入生物素标记山羊抗兔 IgG

(稀释 500 倍),37℃孵育 30min。随后用辣根标记的链霉素卵白素工作液和 DAB 显色液处理,苏木紫复染。经过脱水、透明、封片处理后在显微镜下观察。每张切片随机取 10 个视野,每个视野计数 100 个细胞,根据细胞的染色强度及阳性细胞比例判断目的蛋白表达情况。

染色强度评分:0 分(阴性),1 分(染色浅黄色),2 分(染色棕黄色),3 分(染色棕褐色)。阳性细胞比例评分:1 分(0%~10%),2 分(10%~50%),3 分(50%~80%),4 分(80%~100%)。将两项得分相乘得出最终结果:0 分(-),1~4 分(+),5~8 分(++),9~12 分(+++)。0~4 分为低表达,5~12 分为高表达^[5]。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析。计数资料组间比较采用 χ^2 检验;多因素分析采用 Logistic 回归分析;相关性分析采用 Spearman 秩相关分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NuSAP1 在乳腺癌组织中的表达

NuSAP1 在大多数乳腺癌组织中呈阳性表达,主要表达于细胞核,细胞浆中少见(Figure 1)。乳腺癌组织中 NuSAP1 阴性表达 8 例、弱阳性表达(+)27 例、中等阳性表达(++)39 例、强阳性表达(+++)26 例,高表达率为 65%;癌旁组织中 NuSAP1 阴性表达 39 例、弱阳性表达(+)43 例、中等阳性表达(++)18 例、强阳性表达(+++)0 例,高表达率为 18%。癌组织 NuSAP1 高表达率明显高于癌旁组织($\chi^2=45.945, P<0.001$)。

2.2 NuSAP1 表达与乳腺癌临床病理特征的关系

NuSAP1 高表达组 WHO 分级 III 级的比例、TNM 分期 III 期的比例、腋窝淋巴结转移率均高于低表达组($P<0.05$)(Table 1)。

2.3 乳腺癌患者腋窝淋巴结转移的影响因素

单因素和 Logistic 多因素分析结果显示,WHO 分级 III 级、TNM III 期、三阴性乳腺癌和 NuSAP1 高表达是乳腺癌患者腋窝淋巴结转移的独立影响因素($P<0.05$)(Table 2~3)。

2.4 NuSAP1 表达与腋窝淋巴结转移数目的关系

NuSAP1 表达水平与腋窝淋巴结转移数目呈正

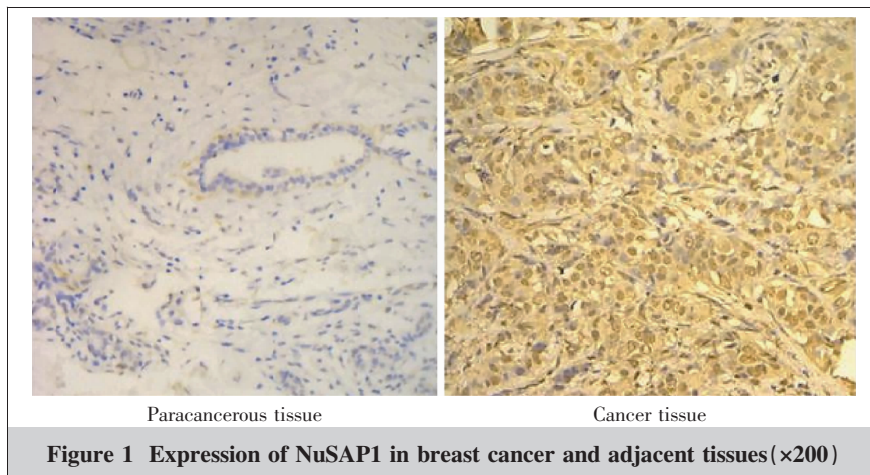


Figure 1 Expression of NuSAP1 in breast cancer and adjacent tissues($\times 200$)

Table 1 Relationship between NuSAP1 expression and features in breast cancer

Age(years-old)					
>55	46	29	17	0.143	0.705
≤ 55	54	36	18		
Menstrual state					
Menopause	38	27	11	0.987	0.320
Premenopause	62	38	24		
WHO grade					
I ~ II	68	38	30	7.765	0.005
III	32	27	5		
TNM stage					
I ~ II	67	39	28	4.116	0.042
III	33	26	7		
Tumor size(cm)					
>2	65	45	20	1.461	0.227
≤ 2	35	20	15		
Axillary lymph node metastasis					
Yes	42	34	8	8.100	0.004
No	58	31	27		
Subtypes					
Triple negative	18	14	4	1.575	0.209
Other	82	51	31		

相关($r=0.561$, $P<0.001$)(Table 4)。

2.5 NuSAP1 与 Smo 和 Gli-1 表达及其与腋窝淋巴结转移的关系

Smo 和 Gli-1 主要表达于细胞核细胞质中(Figure 2)。Smo 和 Gli-1 在乳腺癌组织中的高表达率分别为 71%(71/100)和 67%(67/100),均高于癌旁组织中的 22%(22/100)和 31%(31/100)(χ^2 分别为 48.256 和 25.930, P 均 <0.001)。

Logistic 多因素分析结果显示, Smo(OR=3.387, 95CI: 1.786~4.987)和 Gli-1(OR=2.198, 95CI: 1.463~3.876)是乳腺癌患者腋窝淋巴结转移的独立影响因素(P 均 <0.001)。相关性分析结果显示, NUSAP1 表达水平分别与 Smo、Gli-1 表达水平呈正相关(r 分别为 0.748 和 0.528, P 均 <0.001)。

3 讨论

寻找腋窝淋巴结转移的分子生物学标志物对改善乳腺癌预后具有重要意义。NuSAP1 在细胞有丝分裂中发挥重要作用,并且在增殖细胞中特异性表达。NuSAP1 功能失调可导致细胞周期 G₂/M 阻滞,使染色体分离异常、纺锤体组装异常和细胞分裂缺陷等^[6-7]。既往研究发现, NuSAP1 高表达参与了非小细胞肺癌^[8]、胶质母细胞瘤^[9]和结肠癌^[10]等肿瘤的发生和发展。但是既往也有学者发现, 宫颈癌组织中 NuSAP1 呈低表达,并与患者预后不良有关^[11]。本研究发现,乳腺癌组织中 NuSAP1 高表达率明显高于癌旁组织。Zhang 等^[12]发现, NuSAP1 在乳腺癌 MCF-7 细胞中高表达。研究提示, NuSAP1 可能作为促癌基因在乳腺癌中发挥作用。

NuSAP1 参与了多种肿瘤的进展^[1,4,13-14]。本研究发现, NuSAP1 高表达组 WHO III 级比例、TNM III 期比例、腋窝淋巴结转移率均高于低表达组,说明 NuSAP1 可能参与了乳腺癌的进展。NuSAP1 在乳腺癌中的作用机制既往尚未完全明确。Zhang 等^[12]发现, NuSAP1 可以通过调控 CDK1 基因和 DLGAP5 基因促进乳腺癌细胞的增殖和侵袭,并降低表柔比星的化疗敏感性。另一项研究显示, 过表达 NuSAP1 基因可以通过 Wnt/ β -catenin/EMT 信号通路促进三阴性乳腺癌细胞的增殖和侵袭^[15]。

Table 2 Univariate analysis of axillary lymph node metastasis in breast cancer

Pathological characteristics	N	Axillary lymph node metastasis		χ^2	P
		Yes(n=42)	No(n=58)		
Age(years-old)					
>55	46	21	25	0.466	0.495
≤55	54	21	33		
Menstrual state					
Menopause	38	20	18	2.844	0.092
Premenopause	62	22	40		
WHO grade					
I ~ II	68	34	34	5.583	0.018
III	32	8	24		
TNM stage					
I ~ II	67	37	30	14.575	<0.001
III	33	5	28		
Tumor size(cm)					
>2	65	30	35	1.315	0.251
≤2	35	12	23		
Subtypes					
Triple negative	18	12	6	5.483	0.019
Other	82	30	52		
NuSAP1					
High	35	30	5	42.240	<0.001
Low	65	12	53		

Table 3 Logistic multivariate analysis of axillary lymph node metastasis in breast cancer patients

Index	B	SE	Wald	P	OR	95%CI
WHO grade	1.109	0.261	6.210	0.028	1.689	1.240~3.333
TNM stage	1.231	0.345	6.934	0.001	1.543	1.345~3.602
Subtypes	1.352	0.463	7.003	<0.001	2.786	1.764~4.002
NuSAP1	1.674	0.544	8.298	<0.001	2.507	1.684~3.971

Table 4 Relationship between expression of NuSAP1 and the number of axillary lymph node metastasis

NuSAP1	N	Number of lymph node metastasis			
		0	1~3	4~10	>10
-	8	8	0	0	0
+	27	23	4	0	0
++	39	20	7	10	2
+++	26	7	2	8	9

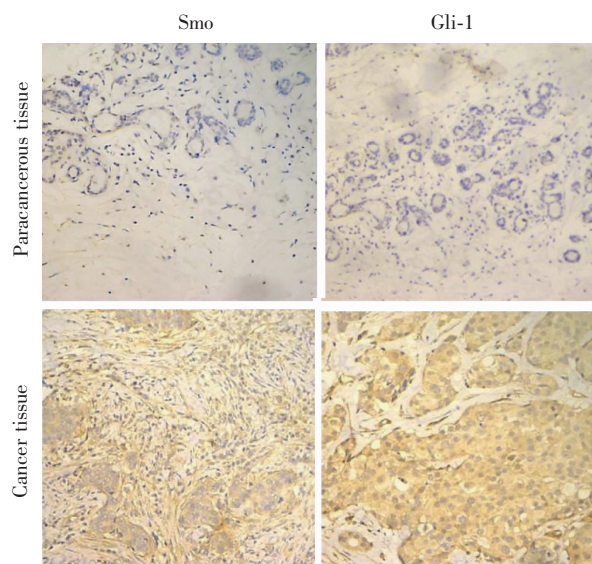
本研究发现,WHO 分级、TNM 分期和三阴性乳腺癌是乳腺癌患者腋窝淋巴结转移的独立影响因素,这与既往报道一致。研究显示,NuSAP1 与非小细胞肺癌淋巴结转移密切相关^[8]。本研究同样发现,NuSAP1 与乳腺癌患者腋窝淋巴结转移密切相关,并且 NuSAP1 表达水平与腋窝淋巴结转移数目呈正相关。肿瘤淋巴结转移的分子机制较为复杂,可能涉及侵袭、黏附等过程。Hedgehog 信号通路与乳腺癌淋巴结转移密切相关。本研究结果显示,Smo 和 Gli-1 也是乳腺癌患者腋窝淋巴结转移的独立影响因素。

Smo 和 Gli-1 是该通路的重要调控分子,Gli-1 可促进上皮间质转化,进而提高肿瘤侵袭性;Smo 可以上调细胞黏附分子的表达^[16-17]。既往研究发现,NuSAP1 可以激活 Hedgehog 信号通路促进瘤细胞侵袭^[4]。本研究发现,NuSAP1 表达水平分别与 Smo、Gli-1 表达水平呈正相关,初步证实 NuSAP1 可能调控 Hedgehog 信号通路在乳腺癌中发挥作用。

综上所述,乳腺癌组织中 NuSAP1 高表达率明显高于癌旁组织,并且 NuSAP1 与乳腺癌 TNM 分期、WHO 分级和分子分型有关,提示 NuSAP1 参与了乳腺癌的发生和发展。NuSAP1 可能通过激活 Hedgehog 信号通路促进乳腺癌腋窝淋巴结转移。但是,本研究也存在一些局限性,例如未对患者进行长期随访,NuSAP1 与乳腺癌患者生存预后的关系需要进一步探讨。

参考文献:

[1] Xu Z, Wang Y, Xiong J, et al. NUSAP1

**Figure 2 Expression of Smo and Gli-1 in breast cancer and adjacent tissues(×200)**

- knockdown inhibits cell growth and metastasis of non-small-cell lung cancer through regulating BTG2/PI3K/Akt signaling[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(4):3886–3893.
- [2] Gao S, Yin H, Tong H, et al. Nucleolar and spindle associated protein 1 (NUSAP1) promotes bladder cancer progression through the TGF- β signaling pathway [J]. *Oncotargets Ther*, 2020, 13:813–825.
 - [3] Ge Y, Li Q, Lin L, et al. Downregulation of NUSAP1 suppresses cell proliferation, migration, and invasion via inhibiting mTORC1 signalling pathway in gastric cancer[J]. *Cell Biochem Funct*, 2020, 38(1):28–37.
 - [4] Wu X, Xu B, Yang C, et al. Nucleolar and spindle associated protein 1 promotes the aggressiveness of astrocytoma by activating the Hedgehog signaling pathway[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1):127.
 - [5] Dong B, Yang Y, Han A, et al. Ectopic expression of HSD12 is related to cell proliferation and prognosis in breast cancer[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11:6531–6542.
 - [6] Mills CA, Suzuki A, Arceci A, et al. Nucleolar and spindle-associated protein 1 (NuSAP1) interacts with a SUMO E3 ligase complex during chromosome segregation[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(42):17178–17189.
 - [7] Garrido-Rodríguez M, Ortea I, Calzado MA, et al. SWATH proteomic profiling of prostate cancer cells identifies NuSAP1 as a potential molecular target for galiellalactone [J]. *J Proteomics*, 2019, 193:217–229.
 - [8] Yu Z, Li XM, Huai M, et al. Expression of NuSAP1 and its relationship with prognosis in non-small cell lung cancer [J]. *Chinese Journal of Oncology*, 2019, 41(7):522–526. [于哲, 李晓敏, 槐梅, 等. 核仁纺锤体相关蛋白 1 在非小细胞肺癌中的表达及其与患者预后的关系[J]. *中华肿瘤杂志*, 2019, 41(7):522–526.]
 - [9] Qian Z, Li Y, Ma J, et al. Prognostic value of NuSAP1 in progression and expansion of glioblastoma multiforme[J]. *J Neurooncol*, 2018, 140(2):199–208.
 - [10] Liu Z, Guan C, Lu C, et al. High NuSAP1 expression predicts poor prognosis in colon cancer[J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(7):968–973.
 - [11] Xie Q, Ou-Yang W, Zhang M, et al. Decreased expression of NUSAP1 predicts poor overall survival in cervical cancer[J]. *J Cancer*, 2020, 11(10):2852–2863.
 - [12] Zhang X, Pan Y, Fu H, et al. Nucleolar and spindle associated protein 1(NUSAP1) inhibits cell proliferation and enhances susceptibility to epirubicin in invasive breast cancer cells by regulating cyclin d kinase(CDK1) and DLGAP5 expression[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24:8553–8564.
 - [13] Guan C, Liu Z, Lu C, et al. Nucleolar spindle-associated protein 1 promotes tumorigenesis and predicts poor prognosis in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. *J Cell Biochem*, 2019, Feb 21. Online ahead of print.
 - [14] Liu L, Chen A, Chen S, et al. CCNB2, NUSAP1 and TK1 are associated with the prognosis and progression of hepatocellular carcinoma, as revealed by co-expression analysis [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(4):2679–2689.
 - [15] Sun L, Shi C, Liu S, et al. Overexpression of NuSAP1 is predictive of an unfavourable prognosis and promotes proliferation and invasion of triple-negative breast cancer cells via the Wnt/ β -catenin/EMT signalling axis[J]. *Gene*, 2020, 747:144657.
 - [16] Bhateja P, Cherian M, Majumder S, et al. The Hedgehog signaling pathway: a viable target in breast cancer? [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(8):1126.
 - [17] Riobo-Del Galdo NA, Lara Montero Á, Wertheimer EV. Role of Hedgehog signaling in breast cancer: pathogenesis and therapeutics[J]. *Cells*, 2019, 8(4):375.