

转录因子 Sp1 在乳腺癌组织中的表达及其预后意义

王晓冰¹, 彭伟强², 易智君¹, 朱淑玲¹, 甘启焕¹

Expression and Prognostic Value of Transcriptional Factor Sp1 in Breast Cancer

WANG Xiao-Bing¹, PENG Wei-Qiang², YI Zhi-Jun¹, ZHU Shu-Ling¹, GAN Qi-Huan¹

1. 广东医学院
附属惠州市中心医院
病理科,
广东 惠州 516001
2. 广东医学院
附属惠州市中心医院
肿瘤科,
广东 惠州 516001

1. Department of Pathology,
Affiliated Huizhou Central
Hospital,
Guangdong Medical College,
Huizhou, Guangdong, 516001,
P. R. China
2. Department of Oncology,
Affiliated Huizhou Central
Hospital,
Guangdong Medical College,
Huizhou, Guangdong, 516001,
P. R. China

通讯作者: 王晓冰

Correspondence to: WANG Xiao-Bing
Tel: 86-752-2288244
E-mail: hzwxb_168@yahoo.com.cn

基金项目: 广东省惠州市科技计划项目基金(No. 2006Y020)

Grant: Sci-Tech Research Project
Foundation of Huizhou, Guangdong
Province (No. 2006Y020)

收稿日期: 2006-12-18
修回日期: 2007-02-28

[ABSTRACT] BACKGROUND & OBJECTIVE: Transcriptional factor Sp1 is involved in many biological processes, such as cell proliferation, apoptosis, differentiation and transformation, and plays an important role in invasion and metastasis of tumors. However, the expression patterns of Sp1 in various tumors are different. This study was to investigate the correlations of Sp1 expression to metastasis, invasion, and prognosis of breast cancer. METHODS: The expression of Sp1 in 60 specimens of breast cancer and 12 specimens of adjacent breast tissue was detected by EnVision immunohistochemistry. Its correlation to clinicopathologic features of breast cancer was analyzed by Cox regression analysis. RESULTS: The positive rate of Sp1 was 71.67% in breast cancer tissues, and 33.33% in adjacent tissues. Sp1 staining in cancer tissue was positively correlated to TNM stage ($r=0.349$, $P<0.05$), tumor invasion ($r=0.407$, $P<0.01$), and lymph node metastasis ($r=0.314$, $P<0.05$). Univariate analysis indicated that the overall survival rate was significantly lower in Sp1-positive patients than in Sp1-negative patients (41.86% vs. 82.35%, $P<0.05$). Cox multivariate analysis showed that Sp1 expression, TNM stage, invasion and lymph node metastasis were independent prognostic factors of breast cancer. CONCLUSIONS: Sp1 maybe participate in the invasion and metastasis of breast cancer, and is one of the valuable markers indicating poor prognosis of breast cancer. Sp1 detection, with consideration of tumor invasion and clinical stage, may increase the accuracy of predicting prognosis of patients with breast cancer.

KEYWORDS: Transcriptional factor Sp1; Breast neoplasm; Prognosis

【摘要】背景与目的: 已知转录因子 Sp1 参与几乎所有的细胞功能, 包括细胞增殖、凋亡、分化和新生物的转化, 在恶性肿瘤侵袭与转移中发挥重要作用, 但不同来源肿瘤的 Sp1 表达也不尽相同。本研究旨在探讨 Sp1 在乳腺癌组织中的表达及其与乳腺癌侵袭、转移及预后的关系。方法: 用免疫组化 EnVision 法检测 60 例乳腺癌及 12 例癌旁乳腺组织中 Sp1 的表达情况。结果: Sp1 在乳腺癌组织中的阳性率为 71.67% (43/60), 在癌旁乳腺组织中的阳性率为 33.33% (4/12)。乳腺癌组织中 Sp1 表达与乳腺癌患者 TNM 分期呈正相关 ($r=0.349$, $P<0.05$), 与癌组织浸润呈正相关 ($r=0.407$, $P<0.01$), 与淋巴结转移呈正相关 ($r=0.314$, $P<0.05$)。单因素生存分析显示乳腺癌组织 Sp1 阳性组的总生存率低于阴性组 (分别为 41.86% 和 82.35%, $P<0.05$)。Cox 模型多因素分析显示乳腺癌组织 Sp1 表达、TNM 分期、癌组织浸润及淋巴结转移是影响乳腺癌患者预后的独立因素。结论: Sp1 可能参与了乳腺癌的侵袭与转移, 是乳腺癌预后不良因素之一; 检测 Sp1 的表达并结合肿瘤浸润和临床分期分析能提高对乳腺癌患者预后判断的准确性。

关键词: 转录因子 Sp1; 乳腺肿瘤; 预后

中图分类号: R737.9 文献标识码: A

文章编号: 1000-467X (2007) 09-0996-05

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一,患者死因大多是发生远处转移。但长期以来,除 TNM 分期等少数临床病理学指标外,能较为准确地预测乳腺癌预后的分子指标并不多见。转录因子 Sp1 (transcription factor Sp1) 是新近被发现的一种 DNA 结合蛋白,是 Sp1/Kruppel 样转录因子家族中最早被克隆的因子,它由 3 个保守的 Cys₂His₂ 锌指特异结合而形成,3 个锌指形成转录因子的 DNA 连接区域^[1,2]。通常认为 Sp1 以细胞和启动子特异性方式通过调控富含 GC 启动子的基因表达,参与调节细胞功能如细胞增殖、凋亡、分化和肿瘤形成^[1]。为了解 Sp1 对乳腺癌生物学行为的影响及其与预后的关系,我们用免疫组织化学技术对乳腺癌组织 Sp1 表达进行研究,以探讨其能否作为协助判断乳腺癌患者预后的一种新的分子指标。

1 材料与方法

1.1 标本来源

选取 2000 年 1 月~2001 年 11 月间在惠州市中心医院行乳腺癌根治手术的 60 例患者的乳腺癌组织石蜡包埋标本。本组患者均为女性,年龄 26~78 岁,中位年龄 52 岁,术前均未实施放、化疗。所有组织病理切片均经两位病理专家复检确认,其中导管内癌 6 例,浸润性导管癌 40 例,浸润性小叶癌 6 例,其他类型的浸润性癌 8 例。60 例患者中 39 例有腋淋巴结转移。选取病变典型部位的癌组织及 12 例作对照的乳腺癌旁组织进行实验。所有组织均经 10% 甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋,4 μm 厚连续切片,HE 染色。

1.2 免疫组化染色

Sp1 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司 (Code No: SC-59),一抗工作浓度 1:200,EnVisionTM 试剂盒购自 Dako 公司 (Code No: 4003),具体操作按说明书进行。用已知阳性组织切片(皮肤分化性鳞状细胞癌)作为阳性对照,用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.3 结果判断标准

1.3.1 乳腺癌组织学分级 参考 2003 年 WHO 乳腺癌组织学分类及分级标准^[3],根据肿瘤组织腺管形成将切片中有多数明显腺管者定为 1 分,有中度分化腺管者定为 2 分,癌细胞呈实性片块或条索状生长、腺管少或不形成腺管者定为 3 分;根据核异型程度将胞核大小、形态及染色质相互一致者定为 1 分,呈中度不规则者定为 2 分,呈明显

多型性者定为 3 分;根据核分裂相数目将每高倍镜视野偶见核分裂相者定为 1 分,每高倍镜视野有 2~3 个核分裂相者定为 2 分,每高倍镜视野核分裂相数多于 3 个者定为 3 分。上述 3 个指标所得分数相加,达 3~5 分者属 I 级(低度恶性),6~7 分者属 II 级(中度恶性),8~9 分者属 III 级(高度恶性)。

1.3.2 乳腺癌临床分期 采用国际抗癌学会 (UICC)2002 的临床分期法,即 TNM 分期法^[4]。

1.3.3 免疫组化染色结果 光镜下观察 Sp1 的分布、阳性细胞数、染色强度。以细胞核内出现棕黄色颗粒者为染色阳性,先按染色强度评分:0 分为无色,1 分为浅黄色,2 分为棕黄色,3 分为棕褐色;再按阳性细胞所占癌细胞总量的百分比评分,1 分为阳性细胞数 $\leq 10\%$,2 分为 $>10\% \sim 50\%$,3 分为 $>50\% \sim 75\%$,4 分为 $>75\%$,阳性强度评分与阳性细胞数评分乘积 >3 分判为阳性^[5]。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件包进行统计学分析,两组间差异的比较采用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率检验。应用 Kaplan-Meier 法进行单因素生存分析,log-rank 法检验;生存期的计算从手术日期到随访截止日期,或由于复发、转移而死亡的日期为止。应用 Cox 比例风险模型进行多因素分析。

2 结果

2.1 Sp1 在乳腺癌及癌旁组织中的表达结果

60 例乳腺癌组织中 Sp1 阳性率为 71.67% (43/60),阳性颗粒定位于癌细胞核(图 1A~C);12 例癌旁组织 Sp1 阳性率为 33.33% (4/12),阳性颗粒多定位于癌旁增生较为活跃的导管上皮细胞核(图 1D)。乳腺癌组织 Sp1 阳性率明显高于癌旁组织阳性率 ($P < 0.05$)。

2.2 Sp1 在乳腺癌组织中的表达与患者临床病理特征之间的关系

相关分析表明,乳腺癌组织的 Sp1 表达与 TNM 分期、肿瘤浸润及腋淋巴结转移呈正相关 (r 值分别为 0.349、0.407 和 0.314, P 值分别 < 0.05 、 < 0.01 和 < 0.05),而与患者年龄、肿瘤大小及组织学分级等无关(表 1)。

2.3 Sp1 表达与乳腺癌患者术后 5 年生存率的关系

Kaplan-Meier 生存曲线提示:Sp1 阴性患者的术后 5 年生存率为 82.35% (14/17),明显高于 Sp1

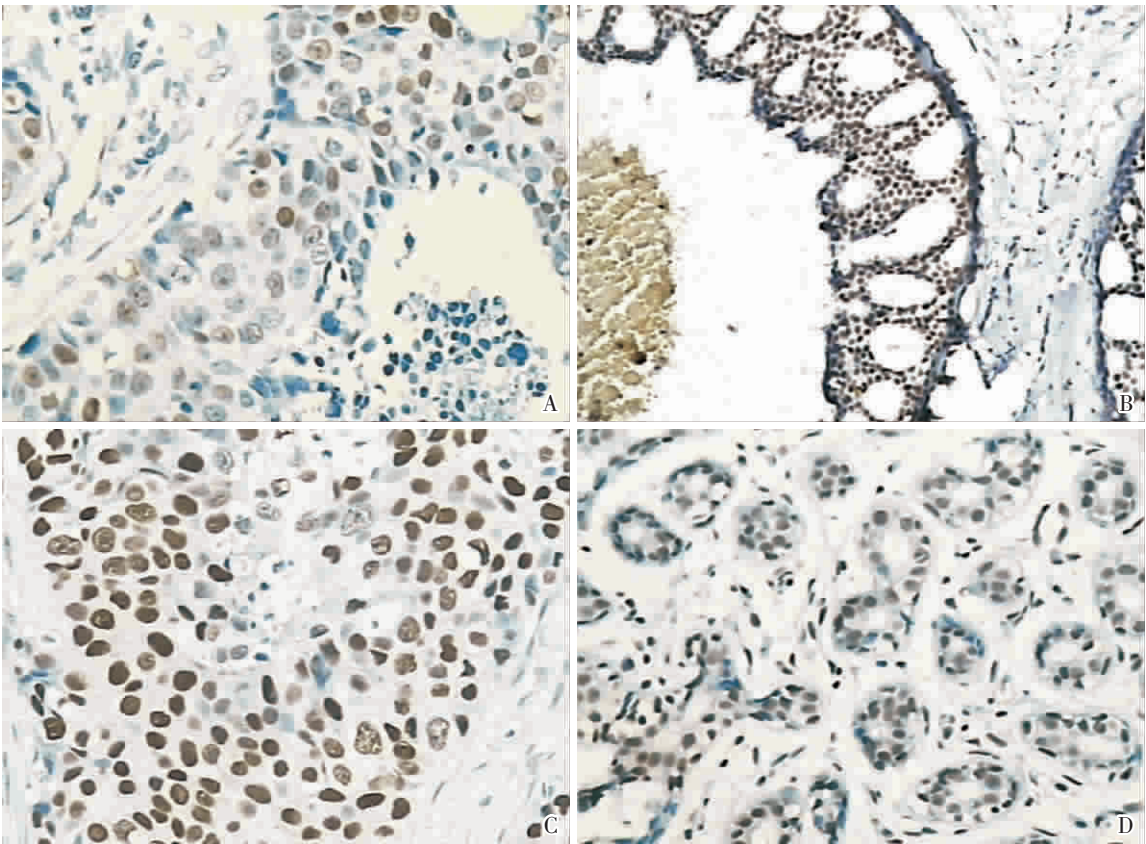


图 1 Sp1 在乳腺癌组织中的表达 (EnVision ×200)

Figure 1 Expression of Sp1 in breast cancer (EnVision ×200)

- A: Expression of Sp1 in nuclei of breast cancer cells of grade I.
B: Strong positive expression of Sp1 in nuclei of breast cancer cells of grade II.
C: Strong positive expression of Sp1 in nuclei of breast cancer cells of grade III.
D: Weak staining of Sp1 in normal adjacent breast tissue.

表 1 Sp1 表达与乳腺癌临床病理特征的关系
Table 1 Correlation of Sp1 expression to clinicopathologic features of breast cancer [cases (%)]

Item	Cases	Sp1 expression		χ^2 value	P value
		Negative	Positive		
Age					
≥52	27	8 (29.63)	19 (70.37)	0.04	0.84
<52	33	9 (27.27)	24 (72.73)		
Tumor size					
≥3 cm	36	10 (27.78)	26 (72.22)	0.01	0.91
<3 cm	24	7 (29.17)	17 (70.83)		
Histological grade					
I	11	4 (36.36)	7 (63.64)	1.14	0.57
II	16	3 (18.75)	13 (81.25)		
III	33	10 (30.30)	23 (69.70)		
TNM stage					
I – II	41	16 (39.02)	25 (60.98)	5.72	<0.05
III – IV	19	1 (5.26)	18 (94.74)		
Invasion					
No	6	5 (83.33)	1 (16.67)	7.15	<0.01
Yes	54	12 (22.22)	42 (77.78)		
Lymph node metastasis					
No	21	10 (47.62)	11 (52.38)	5.92	<0.05
Yes	39	7 (17.95)	32 (82.05)		

阳性患者的 41.86% (18/43) (图 2)。log-rank 检验提示: Sp1 阳性患者术后生存率明显低于 Sp1 阴性患者的术后生存率, 两者之间差异有统计学意义

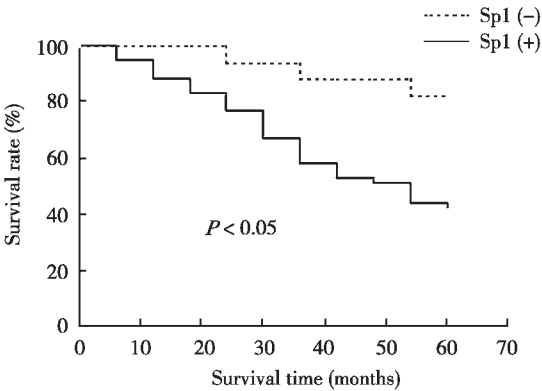


图 2 Sp1 阳性组与阴性组乳腺癌患者
Kaplan-Meier 生存曲线

Figure 2 Kaplan-Meier survival curves of breast cancer patients with positive or negative expression of Sp1

($P<0.05$), 表明 Sp1 表达与乳腺癌预后呈负相关。将乳腺癌患者年龄、肿瘤大小、组织学分级、临床分期、肿瘤浸润、腋淋巴结转移及 Sp1 表达等纳入

Cox 模型进行多因素预后分析,结果提示乳腺癌组织中 Sp1 的表达是影响乳腺癌患者术后生存率的独立因素之一(表 2)。

表 2 乳腺癌患者预后因素的 Cox 模型分析结果

Table 2 Cox multivariate prognostic analysis for the breast cancer patients

Variate	B	SE	Wald	df	P value	Exp (B)	95% CI
Age	0.638	0.492	0.708	1	0.400	0.726	0.631-6.616
Tumor size	0.590	0.397	1.709	1	0.190	0.490	0.762-3.660
Histological grade	0.667	0.467	2.223	1	0.156	0.663	0.685-5.411
TNM stage	0.528	0.367	5.560	1	0.025	1.687	0.967-2.857
Invasion	0.261	0.302	4.653	1	0.038	1.343	0.738-2.249
Metastatic lymph nodes	0.647	0.216	8.920	1	0.003	1.909	1.022-8.610
Sp1 expression	0.736	0.430	6.212	1	0.016	2.027	1.216-3.665

3 讨 论

Sp 蛋白家族是一类进化上高度相关的转录因子,目前已发现该家族含有 8 个成员(分别命名为 Sp1~Sp8),它们的同源序列为 C 端 3 个串联的 Cys₂His₂ 型锌指结构域,该结构域使家族成员以不同的亲和力特异性地识别 GC 盒(GGGCGGGG)与 GT 盒(GGTGTGGG),从而参与多种基因的转录调控^[6,7]。在 Sp 家族中,Sp1 蛋白对 GC 盒有很强的亲和力,被认为是该家族中功能最强的转录激活因子,参与几乎所有的细胞功能,包括细胞增殖、凋亡、分化和新生物的转化^[7]。现较为明确可受 Sp1 蛋白调节的基因有血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)、胰岛素样生长因子结合蛋白 I、成纤维细胞生长因子受体 I、类上皮生长因子受体及胸腺嘧啶激酶等。此外,Sp1 还可调节 Bcl-1、Bax 等细胞凋亡相关蛋白的启动子,通过调控细胞凋亡影响肿瘤细胞的生存和转移潜能^[7-10]。

近年愈来愈多的报道显示,Sp1 自身表达水平、结合的靶序列、磷酸化、糖基化等翻译后修饰、其他蛋白质的结合以及染色质结构与修饰等方面均能影响 Sp1 蛋白的转录活性^[8,9],它的异常表达和活化,可以通过促进相关肿瘤生长因子和血管生成基因的表达等机制,营造适宜肿瘤生长的局部微环境,正向调节肿瘤的增殖、血管生成和转移潜能^[10,11]。Milanini 等^[12]发现,因肿瘤增殖造成的局部组织缺氧、酸中毒、自由基增多等应激状态,可激活 p42/p44 有丝分裂原活化蛋白激酶旁路及 c-jun 氮端激酶相关信号转导系统,导致 Sp1 过度

表达。Shi 等^[11]发现,人胰腺癌中 Sp1 异常活化,可导致 VEGF 等下游因子过表达,通过增强肿瘤细胞血管生成效应而促进肿瘤的侵袭和远处转移。Wang 等^[5]研究认为 Sp1 蛋白的表达与胃癌的发生及进展密切相关,是胃癌患者预后不良的因素之一。在乳腺癌的研究中,Sp1 蛋白表达水平与乳腺癌临床预后相关性的研究报道并不多见。最近 Maor 等^[13]和 Han 等^[14]应用基因共转染、Southern 杂交、Northern 印迹杂交和免疫组化等技术,从 DNA、mRNA 和蛋白质多水平进行研究的结果显示,Sp1 通过与雌激素受体 α 协同作用,并与 DNA 结合形成复合体,通过其相互作用上调胰岛素样生长因子结合蛋白 I 表达并激活 LRP16 启动子转录活性,从而促进人乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖。

本研究应用免疫组织化学技术,从蛋白水平检测 Sp1 在乳腺癌组织中的表达,结果显示 60 例乳腺癌组织中,多数有 Sp1 蛋白表达,且阳性颗粒主要定位于癌细胞核内。Sp1 在乳腺癌组织中的表达显著高于癌旁组织($P<0.05$),揭示 Sp1 的异常表达可能在乳腺癌的组织发生中起一定作用,对乳腺良恶性病变的鉴别也有一定参考价值;而且伴有癌组织浸润、腋淋巴结转移及 TNM 分期较晚者 Sp1 阳性率均分别高于无浸润、无腋淋巴结转移及 TNM 分期早者($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。这一结果与 Han 等^[14]和 Safe^[15]在 mRNA 水平的研究发现基本一致。提示 Sp1 在蛋白水平的表达,同样可以作为了解乳腺癌的发生、侵袭和转移进程的一项分子指标;而临床上应用免疫组化方法检测 Sp1 蛋白表达,操作简单且结果稳定,值得推广。本组资料的生存统计结果提示,Sp1 阳性表达的乳腺癌患

者预后差,其术后5年生存率低于Sp1阴性者。Cox多因素分析表明,Sp1是乳腺癌相对独立的预后因素之一。

总之,本研究揭示Sp1的表达与乳腺癌的发生、浸润和淋巴结转移密切相关,可作为协助临床评估预后的综合指标之一。但有关乳腺癌细胞Sp1过表达的调控机制仍有待进一步研究和探讨。

[参 考 文 献]

- [1] Rieber M, Strasberg R M. Unequal nuclear Sp1/GC box DNA binding activity distinguishes proliferating from differentiated senescent or apoptotic cells [J]. *Int J Cancer*, 1999,83(3): 359-364.
- [2] Al-Sarraj A, Day R M, Thiel G. Specificity of transcriptional regulation by the zinc finger transcription factors Sp1, Sp3, and Egr -1 [J]. *J Cell Biochem*, 2005,94(1):153-167.
- [3] Tavassoli F A, Devilee P. World Health Organization of tumours. Pathology and genetics, tumours of the breast and female genital organs [M]. Lyon: IARC Press, 2003:10-19.
- [4] Sobin L H, Wittkind C H. TNM classification of malignant tumours [M]. 6th edition. New York: Wiley-Liss, 2002:131-141.
- [5] Wang L, Wei D, Huang S, et al. Transcription factor Sp1 is a significant predictor of survival in human gastric cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2003,9(17):6371-6380.
- [6] Yu B, Datta P K, Bagechi S. Stability of the Sp3-DNA complex is promoter specific: Sp3 efficiently competes with Sp1 for binding to promoters containing multiple Sp-sites [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003,31(18):5368-5376.
- [7] Suske G. The Sp-family of transcription factors [J]. *Gene*, 1999,238(2):291-300.
- [8] French S W, Malone C S, Shen R R, et al. Sp1 transactivation of the TCL1 oncogene [J]. *J Biol Chem*, 2003,278(2):948-955.
- [9] Li L, He S, Sun J M, et al. Gene regulation by Sp1 and Sp3 [J]. *Biochem Cell Biol*, 2004,82(4):460-471.
- [10] Grinstein E, Jundt F, Weinert I, et al. Sp1 as G1 cell cycle phase specific transcription factor in epithelial cells [J]. *Oncogene*, 2002,21(10):1485-1492.
- [11] Shi Q, Le X, Abbruzzese J L, et al. Constitutive Sp1 activity is essential for differential constitutive expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic adenocarcinoma [J]. *Cancer Res*, 2001,61(10):4143-4154.
- [12] Milanini J, Vinals F, Pouyssegur J, et al. p42/p44 MAP kinase module plays a key role in the transcriptional regulation of the vascular endothelial growth factor gene in fibroblasts [J]. *J Biol Chem*, 1998,273(29):18165-18172.
- [13] Maor S, Mayer D, Yarden R I, et al. Estrogen receptor insulin-like growth factor- I receptor gene expression in breast tumor cells: involvement of transcription factor Sp1 [J]. *J Endocrinol*, 2006,191(3):605-612.
- [14] Han W D, Mu Y M, Lu X C, et al. Up-regulation of LRP16 mRNA by 17beta-estradiol through activation of estrogen receptor alpha (ERalpha), but not ERbeta, and promotion of human breast cancer MCF-7 cell proliferation: a preliminary report [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2003,10(2):217-224.
- [15] Safe S. Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions [J]. *Vitam Horm*, 2001,62:231-252.

[编辑:谢汝华;校对:甘可建]

《中华放射肿瘤学杂志》征订启事

《中华放射肿瘤学杂志》是由中华医学会主办、中国医学科学院肿瘤医院编辑出版的肿瘤放射治疗专业学术期刊,是中华系列杂志之一。主要报道本领域领先的科研成果和临床诊疗经验,以及对临床有指导作用与临床紧密结合的基础理论研究。以广大肿瘤放射治疗专业的中高级医师和科研工作者为主要读者对象。本刊主要设置“论著”“综述”“短篇论著”“病例报告”“技术与方法”“经验交流”等栏目,欢迎投稿。

《中华放射肿瘤学杂志》1992年创刊,双月刊,大16开,80页,单月15日出版,每期定价20元,全年120元。刊号CN11-3030/R,ISSN 1004-4221。邮发代号82-240,欢迎在各地邮局订阅,请不要从中介机构订阅,请不要从本刊订阅,本刊可以破订,漏订的期册可汇款至北京市朝阳区潘家园南里17号《中华放射肿瘤学杂志》编辑部邮购。邮编:100021,电话:010-87788294;67700737(传真),E-mail:cjron@cma.org.cn。