

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.12.004

## EZH2 蛋白在三阴性乳腺癌中的表达及意义

武萍萍<sup>1</sup>, 梁志强<sup>1</sup>, 李仁哲<sup>1</sup>, 陶 然<sup>2</sup>, 冯 景<sup>3△</sup>

1. 山东省济宁市第一人民医院检验科, 山东济宁 272000; 2. 广州金域医学检验中心, 广东广州 510005; 3. 南方医科大学附属奉贤医院检验科, 上海 210404

**摘 要:**目的 探索组蛋白甲基转移酶同源序列 2 增强子(EZH2)蛋白在三阴性乳腺癌中的表达特点及其与主要临床病理参数的关系。**方法** 采用免疫组织化学 SP 法,检测 2010 年 12 月至 2019 年 5 月山东省济宁市第一人民医院和广州金域检验中心三阴性、非三阴性乳腺癌及三阴性乳腺癌患者的癌旁组织中 EZH2 蛋白的表达情况。采用 SPSS20.0 统计软件进行数据分析,采用  $\chi^2$  检验比较三阴性乳腺癌患者不同临床病理特征与 EZH2 表达情况的关系,采用多因素 logistic 回归分析与 EZH2 蛋白阳性表达有关的病理特征。**结果** EZH2 蛋白在三阴性、非三阴性乳腺癌组织和癌旁组织的阳性表达率分别为 84.7%、79.8% 和 40.0%;该蛋白在乳腺癌组织中的表达均高于癌旁组织,差异有统计学意义( $P<0.05$ );在三阴性乳腺癌中,EZH2 蛋白阳性表达与组织学分级、肿瘤直径、淋巴结转移有关,其中组织学分级为影响 EZH2 蛋白表达的主要因素。**结论** EZH2 蛋白的高表达与三阴性乳腺癌与分化、生长、转移有一定的关系,检测该蛋白可能对三阴性乳腺癌的预后判断更有价值。

**关键词:**三阴性乳腺癌; 非三阴性乳腺癌; EZH2; 免疫组织化学

**中图法分类号:**R737.9

**文献标志码:**A

**文章编号:**1672-9455(2020)12-1644-04

### Expression and significance of EZH2 in triple-negative breast carcinoma

WU Pingping<sup>1</sup>, LIANG Zhiqiang<sup>1</sup>, LI Renzhe<sup>1</sup>, TAO Ran<sup>2</sup>, FENG Jing<sup>3△</sup>

1. Department of Clinical Laboratory, Jining NO.1 People's Hospital, Jining, Shandong 272000, China; 2. Guangzhou KingMed Centre for Clinical Laboratory, Guangzhou, Guangdong 510005, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Fengxian Hospital Affiliates to Southern Medical University, Shanghai 210404, China

**Abstract:** **Objective** To study the expression and significance of EZH2 in triple-negative breast carcinoma and to explore the relationship between triple-negative breast carcinoma and main clinicopathological parameters. **Methods** The clinical and pathological data of breast cancer in Jining No. 1 People's Hospital and Guangzhou KingMed Center for Clinical Laboratory from December 2010 to May 2019 were analyzed retrospectively. Immunohistochemistry SP assay was used to determine EZH2 expression in the tissues of patients with triple-negative, non-triple-negative breast cancer and paracancer tissues of triple-negative breast cancer. SPSS20.0 software were used for and data analysis. The  $\chi^2$  test were used to compared the relationship between different clinicopathological features and EZH2 expression in the triple-negative breast cancer. Logistic regression analysis was applied to analyze the pathological features associated with positive EZH2 expression. **Results** The positive expression rate of EZH2 in triple-negative breast carcinoma, non-triple-negative breast carcinoma and adjacent breast tissue were 84.7%, 79.8% and 40.0% respectively, and the expression of this protein in breast cancer tissues was higher than that in adjacent tissues, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). In triple-negative breast cancer, EZH2 positive expression was associated with histological grade, tumor diameter, and lymph node metastasis. Multivariate analysis demonstrated that histological grade was the important factor affecting EZH2 expression. **Conclusion** The high expression of EZH2 has a certain relationship with triple-negative breast cancer and its differentiation, growth and metastasis, and detection of EZH2 expression maybe more valuable for the prognosis of triple-negative breast cancer.

**Key words:** triple-negative breast carcinoma; non-triple-negative breast cancer; EZH2; immunohistochemistry

三阴性乳腺癌(TNBC)是指雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)及人表皮生长因子受体 2 亚型

(HER-2)表达均为阴性的乳腺癌类型<sup>[1]</sup>,占乳腺癌总数的 10%~17%<sup>[2]</sup>,具有发病年龄小、肿瘤体积大、病理分级高、转移时间早、生存率低等特征<sup>[3]</sup>。研究发现,在 TNBC 发生、发展过程中,表观遗传学改变发挥着重要作用。表观遗传学改变是一种可遗传又不发生 DNA 序列变化的遗传形式,其中 DNA 启动子区域的甲基化是较为常见的表观遗传学改变。组蛋白甲基转移酶同源序列 2 增强子(EZH2)是 PcG 基因家族的重要成员之一,它是果蝇 *zeste* 基因增强子 E(z)的人类同源基因,可催化组蛋白 H3 的第 27 位氨基酸 K27 发生三甲基化(H3K27Me3)进而调节细胞增殖,同时该基因表达产物可以使抑癌基因发生沉默,在多种肿瘤演进过程中起重要作用<sup>[4-6]</sup>。本研究通过分析 EZH2 蛋白在 TNBC 中的表达情况及其与 TNBC 的临床病理特征和肿瘤演进的关系,探索 EZH2 成为早期诊断 TNBC 及预测肿瘤预后标记物的可能性。

# 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2010 年 12 月至 2019 年 5 月山东省济宁市第一人民医院和广州金域检验中心经手术及病理学检查证实为乳腺癌且资料齐全的患者 222 例,均为女性患者。其中非 TNBC 患者(非 TNBC 病例组)104 例,年龄 29~87 岁,平均(51.9±12.6)岁;TNBC 患者(TNBC 病例组)118 例,年龄 31~89 岁,平均(45.6±13.2)岁。另选取 TNBC 病例组中 65 例患者的癌旁组织标本作为对照,65 例患者年龄 31~89 岁,平均(49.2±12.5)岁。所有病例均按 2012 年世界卫生组织(WHO)乳腺肿瘤分类标准进行病理学分型。本研究经医院伦理委员会批准。

**1.2 方法** 采用免疫组织化学 SP 法进行染色。试剂采用购自 Cell Signal 公司的 EZH2 兔抗人单克隆抗体(1:400),使用 DAKO ChemMate EnVision 检测系统及 K500711 检测试剂盒。磷酸盐缓冲液(PBS)的 pH=7.2,Tris-乙二胺四乙酸(EDTA)抗原修复液的 pH=7.4,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 由 Novocastra 公司提供(3%)。PBS 代替一抗作为空白对照,扁桃体淋巴细胞作为阴性对照,已确认的乳腺癌样本做阳性对照。

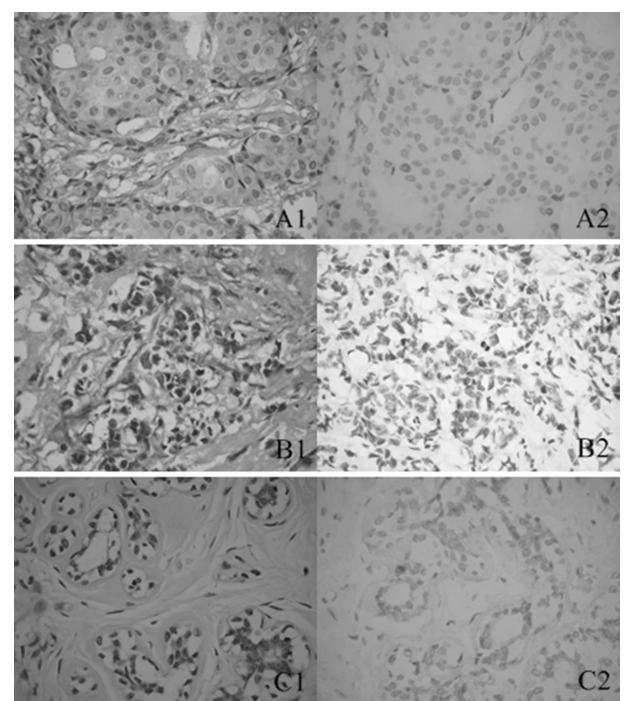
**1.3 结果判断** 所有切片的免疫组织化学染色均由 2 位从事乳腺肿瘤病理诊断 5 年以上的医生在同一条件下完成,要求显微镜下每个 400 倍视野至少有 200 个可用于评价的细胞,染色结果经联合阅片协商后给出。EZH2 蛋白定位于细胞核,表达阳性定义为观察到突出于背景、大小不等的棕黄色颗粒。依据染色强度及该强度下阳性细胞比例进行评分。无染色记 0 分;弱染色定义为在 40×物镜视野才能看到细胞染色,记 1 分;强染色定义为在 4×或 10×物镜视野能看到的细胞染色,记 3 分;中等染色介于强染色与弱染色之间,记 2 分。组织化学评分(HSCORE)=Σ

(I×PC),其中 I 代表染色强度得分,PC 代表在每个强度被染色细胞的比例。将 HSCORE>30 分定义为 EZH2 蛋白表达阳性,并计算阳性表达率。

**1.4 统计学处理** 所有数据均应用 SPSS20.0 统计分析软件处理。计数资料比较采用  $\chi^2$  检验,采用 logistic 回归对 EZH2 阳性表达的影响因素进行多因素分析, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

# 2 结果

**2.1 EZH2 蛋白在乳腺组织中的表达** EZH2 蛋白在非 TNBC 组织(图 A1、A2)阳性表达率为 79.8%,在 TNBC 组织(图 B1、B2)阳性表达率为 84.7%,在癌旁组织(图 C1、C2)阳性表达率为 40.0%。TNBC 组织与非 TNBC 组织 EZH2 蛋白表达均显著高于癌旁组织,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );TNBC 组织 EZH2 蛋白表达与非 TNBC 组织 EZH2 蛋白表达情况比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。



注:A1 为浸润性导管癌(非 TNBC 病例组)组织,A2 为 EZH2 免疫组织化学染色阳性,HSCORE 为 120 分;B1 为浸润性导管癌(TNBC 病例组)组织,B2 为 EZH2 染色阳性,HSCORE 为 180 分;C1 为浸润性导管癌(TNBC 病例组)癌旁组织,C2 为 EZH2 染色阳性,HSCORE 为 40 分。

图 1 3 种组织中 EZH2 蛋白的表达情况

**2.2 TNBC 病例组组织中 EZH2 蛋白的表达与临床病理特征的关系** TNBC 病例组患者中,EZH2 蛋白的表达与乳腺癌病理分级、乳腺癌直径、淋巴结转移有关( $P<0.05$ ),与乳腺癌病理类型、脉管神经浸润、患者年龄、绝经状态无关( $P>0.05$ )。见表 1。

**2.3 TNBC 中 EZH2 蛋白表达的多因素 logistic 回归分析** 组织学分级、肿瘤直径与 EZH2 蛋白阳性表达有相关性,且均为正相关( $P<0.05$ ),其中乳腺癌组

织学分级与 EZH2 蛋白阳性表达相关性最高。见表 2。

表 1 TNBC 病例组组织中 EZH2 蛋白的表达与临床病理特征的关系

| 临床病理参数          | <i>n</i> | EZH2 蛋白        |        | <i>P</i> |
|-----------------|----------|----------------|--------|----------|
|                 |          | 阳性( <i>n</i> ) | 阳性率(%) |          |
| 病理分级            |          |                |        | 0.001    |
| I               | 6        | 2              | 33.3   |          |
| II              | 48       | 40             | 84.0   |          |
| III             | 64       | 58             | 90.6   |          |
| 肿瘤直径            |          |                |        | 0.018    |
| <2 cm           | 43       | 32             | 74.4   |          |
| ≥2 cm           | 75       | 68             | 90.7   |          |
| 病理类型            |          |                |        | 0.290    |
| 浸润性导管癌          | 106      | 91             | 85.8   |          |
| 浸润性小叶癌          | 5        | 3              | 60.0   |          |
| 其他 <sup>a</sup> | 7        | 6              | 85.7   |          |
| 淋巴结转移           |          |                |        | 0.044    |
| 有               | 51       | 47             | 92.2   |          |
| 无               | 67       | 53             | 79.1   |          |
| 脉管神经浸润          |          |                |        | 0.596    |
| 有               | 63       | 54             | 85.7   |          |
| 无               | 55       | 46             | 83.6   |          |
| 年龄              |          |                |        | 0.805    |
| ≤45 岁           | 49       | 42             | 85.7   |          |
| >45 岁           | 69       | 58             | 84.1   |          |
| 绝经状态            |          |                |        | 0.504    |
| 未绝经             | 61       | 53             | 86.9   |          |
| 已绝经             | 57       | 47             | 82.5   |          |
| 合计              | 118      | 100            | 84.7   |          |

注：<sup>a</sup> 其他包括乳腺腺样囊腺癌 1 例，乳腺浸润性微乳头状癌 1 例，黏液癌 3 例，乳腺神经内分泌癌 1 例，乳腺高级别导管原位癌 1 例。

表 2 TNBC 病例组组织中 EZH2 蛋白表达的多因素 logistic 回归分析

| 临床病理参数 | $\beta$ | <i>P</i> ( <i>sig</i> ) | <i>Exp</i> ( $\beta$ ) |
|--------|---------|-------------------------|------------------------|
| 组织学分级  | 1.763   | 0.000                   | 6.319                  |
| 肿瘤直径   | 0.811   | 0.004                   | 0.543                  |
| 淋巴结转移  | 1.216   | 0.070                   | 3.367                  |

### 3 讨 论

EZH2 是果蝇 *zeste* 基因增强子 E(z)的人类同源基因,定位于染色体 7q35 上,是 PcG 基因家族的重要成员<sup>[7]</sup>。作为 PRC2 蛋白复合体的核心组分,EZH2 与 SUZ12 和 EED 共同组成多梳抑制型复合体。该复合体发挥组蛋白甲基转移酶的作用,催化组蛋白的甲基化修饰,研究发现组蛋白甲基化在 DNA 甲基化

的建立和维护中发挥重要作用<sup>[8-9]</sup>。另外,EZH2 可以通过改变核小体、重塑染色质,以及与其他转录因子相互作用影响基因的转录调控,在胚胎的发育、细胞增殖及细胞周期调节中起重要作用<sup>[10]</sup>。近年研究发现,EZH2 基因及其表达产物与肿瘤的演进、侵袭和转移有较高的相关性<sup>[11]</sup>,其在消化道肿瘤、宫颈癌、膀胱癌、前列腺癌等肿瘤中的表达显著高于健康对照人群<sup>[12-16]</sup>。

与其他系统肿瘤相同,乳腺癌的发生、进展、侵袭、转移是多基因表达调控失衡的共同结果,其中 DNA 甲基化与乳腺癌的关系最为密切。研究 DNA 甲基化对探索乳腺癌的病因及乳腺癌的诊疗具有重要的临床意义<sup>[17]</sup>。与胡一迪等<sup>[3]</sup>的流行病学统计一致,本研究中 TNBC 病例组患者年龄显著小于非 TNBC 病例组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。EZH2 和乳腺癌增殖和侵袭能力有重要关系。KLEER 等<sup>[18]</sup>通过对乳腺癌动物模型研究发现,EZH2 过表达时乳腺细胞能够产生致瘤性。GONZALEZ 等<sup>[19]</sup>发现,EZH2 过表达可以造成乳腺癌细胞产生异常的有丝分裂及基因组不稳定,敲除 EZH2 基因,可以抑制乳腺癌细胞的增殖。DIMRI 等<sup>[20]</sup>发现,EZH2 表达水平降低可以导致 EZH2 参与抑制的 E 钙黏蛋白和胰岛素样生长因子结合蛋白重新表达,从而降低乳腺癌细胞的侵袭能力。本研究发现,TNBC 和非 TNBC 组织中 EZH2 蛋白阳性表达率均显著高于癌旁组织,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),而 TNBC 与非 TNBC 组织中 EZH2 蛋白阳性表达率的差异无统计学意义( $P>0.05$ ),这与姚凡等<sup>[21]</sup>的研究不一致,其研究发现,EZH2 在 TNBC 组织中表达显著高于非 TNBC 组织,分析原因可能与本研究入组的 TNBC 病例组病例数明显高于非 TNBC 病例组有关。另外,乳腺癌本身具有高度异质性,也可能造成结果判读的不同。本研究还发现,EZH2 蛋白阳性表达组淋巴结转移显著高于 EZH2 蛋白表达阴性组,与 AZIZMOHAMMADI 等<sup>[22]</sup>在宫颈癌淋巴结转移中的结果相近。BACHMANN 等<sup>[23]</sup>认为,EZH2 表达量的异常升高与乳腺癌侵袭性和增殖能力存在密切关系。本研究发现,EZH2 蛋白表达阳性的 TNBC,其组织学级别显著高于 EZH2 蛋白表达阴性者,肿瘤体积显著大于 EZH2 蛋白表达阴性者。另外,WANG 等<sup>[24]</sup>研究乳腺癌和鼠胚胎干细胞时发现,乳腺癌侵袭性表型是 EZH2 与 BRCA1 相互影响抑制胚胎干细胞分化产生的。CHIEN 等<sup>[1]</sup>发现,EZH2 通过影响 TIMP2-MMP-2/-9 通路可以造成乳腺癌增殖能力的改变,对此本研究并没有深入分析。logistic 回归分析结果显示,EZH2 蛋白表达阳性率越高,提示 TNBC 病理分级会越高,肿瘤直径就越大,患者预后就越差,对于这类患者临



床诊治过程中更需要加以重视。

本研究上有一些不足之处,入组的病例数特别是癌旁组织的例数需要进一步增加,以期获得更为准确的结果。另外,没有增加同一病理学类型的 TNBC 和非 TNBC 组织 EZH2 表达情况的对比分析。

总之,尽管 EZH2 能否作为早期诊断 TNBC 的标志物尚需扩大样本进一步探索,但是 EZH2 蛋白与 TNBC 病理学行为有一定相关性,可能有助于早期预测 TNBC 患者的预后,并在 TNBC 患者临床治疗方案的合理选择中具有重要参考意义。

## 参考文献

- [1] CHIEN Y C, LIU L C, YE H Y, et al. EZH2 promotes migration and invasion of triple-negative breast cancer cells via regulating TIMP2-MMP-2/-9 pathway[J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(3): 422-434.
- [2] REIS-FILHO J S, TUTT A N. Triple negative tumours: a critical review[J]. *Histopathology*, 2008, 52(1): 108-118.
- [3] 胡一迪, 谢荣侠, 张辉, 等. 61 例三阴性乳腺癌的临床病理特征及预后因素分析[J]. *中华内分泌外科杂志*, 2018, 12(2): 118-123.
- [4] SCHUETTENGROBER B, BOURBON H M, DI CROCE L, et al. Genome regulation by polycomb and trithorax: 70 years and counting[J]. *Cell*, 2017, 171(1): 34-57.
- [5] SNEERINGER C J, SCOTT M P, KUNTZ K W, et al. Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(49): 20980-20985.
- [6] MARGUERON R, LI G, SARMA K, et al. Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms[J]. *Mol Cell*, 2008, 32(4): 503-518.
- [7] CARDOSO C, MIGNON C, HETET G, et al. The human EZH2 gene: genomic organisation and revised mapping in 7q35 within the critical region for malignant myeloid disorders[J]. *Eur J Hum Genet*, 2000, 8(3): 174-180.
- [8] WASENANG W, PUAPAIROJ A, SETTASATIAN C, et al. Overexpression of polycomb repressive complex 2 key components EZH2/SUZ12/EED as an unfavorable prognostic marker in cholangiocarcinoma[J]. *Pathol Res Pract*, 2019, 215(7): 152451-152456.
- [9] 王瑞娴, 徐建红. 基因组 DNA 甲基化及组蛋白甲基化[J]. *遗传*, 2014, 36(3): 191-199.
- [10] BATOOL A, JIN C, LIU Y X. Role of EZH2 in cell lineage determination and relative signaling pathways[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2019, 24: 947-960.
- [11] 张灵秀. EZH2 基因与恶性肿瘤侵袭和转移关系的研究进展[J]. *国际输血及血液学杂志*, 2014, 37(2): 163-167.

- [12] 唐梅, 尤共平, 林丽慧, 等. EZH2 和 Ki-67 在宫颈癌组织中的表达及其临床意义[J]. *中国妇产科临床杂志*, 2018, 19(1): 12-15.
- [13] KARAMI M G, RAD A, MOLAVI M, et al. Predicting the correlation of EZH2 and cancer stem cell markers in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *J Gastrointest Cancer*, 2018, 49(4): 437-441.
- [14] ZHAI R, TANG F, GONG J, et al. The relationship between the expression of USP22, BMI1, and EZH2 in hepatocellular carcinoma and their impacts on prognosis[J]. *Oncol Targets Ther*, 2016, 9: 6987-6998.
- [15] 苏燕胜, 李富军, 高云, 等. EZH2 在前列腺癌中的表达及临床意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2014, 22(6): 1351-1353.
- [16] 刘飞, 彭鄂军, 李有元, 等. EZH2 和 PTEN 在膀胱癌的表达及预后分析[J]. *中国肿瘤临床*, 2010, 37(21): 1220-1223.
- [17] CONNOLLY R, STEARNS V. Epigenetics as a therapeutic target in breast cancer[J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2012, 17(3/4): 191-204.
- [18] KLEER C G, CAO Q, VARAMBALLY S, et al. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(20): 11606-11611.
- [19] GONZALEZ M E, DUPRIE M L, KRUEGER H, et al. Histone methyltransferase EZH2 induces Akt-dependent genomic instability and BRCA1 inhibition in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(6): 2360-2370.
- [20] DIMRI M, BOMMI P V, SAHASRABUDDHE A A, et al. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids suppress expression of EZH2 in breast cancer cells[J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(3): 489-495.
- [21] 姚凡, 刘崇, 房月, 等. EZH2 在乳腺癌中的表达及其临床意义[J]. *中国微生态学杂志*, 2013, 25(2): 143-146.
- [22] AZIZMOHAMMADI S, AZIZMOHAMMADI S, SAFAARI A, et al. High-level expression of RIPK4 and EZH2 contributes to lymph node metastasis and predicts favorable prognosis in patients with cervical cancer[J]. *Oncol Res*, 2017, 25(4): 495-501.
- [23] BACHMANN I M, HALVORSEN O J, COLLETT K, et al. EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(2): 268-273.
- [24] WANG L, ZENG X, CHEN S, et al. BRCA1 is a negative modulator of the PRC2 complex[J]. *EMBO J*, 2013, 32(11): 1584-1597.