



· 论 著 ·

Prospero相关同源异形盒蛋白1在乳腺癌组织中的表达及与预后相关性分析

赵东丽, 梁宪斌, 王 艳, 张喜凤, 张维真

郑州市第三人民医院肿瘤内一科, 河南 郑州 450000

[摘要] **背景与目的:** Prospero相关同源异形盒蛋白1 (prospero-related homeobox 1, PROX1) 作为同源域转录因子家族成员, 参与多种恶性肿瘤的发生、发展过程, 与肿瘤细胞增殖、分化、凋亡、迁移和侵袭过程密切相关。该研究探讨了PROX1在乳腺癌组织中的表达及与预后相关性分析。**方法:** 选取2011年3月—2013年3月在郑州市第三人民医院择期行手术治疗且资料完整的乳腺癌患者85例, 采用免疫组织化学染色法检测乳腺癌和癌旁组织中PROX1蛋白水平, 所有患者术后随访。随访中, 失访4例, 随访截止日期为2018年3月31日, 生存分析采用Kaplan-Meier法和Log-rank检验, 乳腺癌患者预后影响因素分析采用Cox比例风险回归模型。**结果:** 乳腺癌组织中PROX1蛋白阳性率为71.76%, 癌旁组织则为28.57%, 差异有统计学意义 ($\chi^2=32.600, P<0.001$); 乳腺癌组织中PROX1蛋白水平在不同分化程度、TNM分期、雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、Ki-67标记指数和淋巴结转移患者之间的差异有统计学意义 ($P<0.05$); Kaplan-Meier生存分析结果显示, PROX1阳性表达组平均生存时间为 (36.73±2.73) 个月, PROX1阴性表达组则为 (56.36±2.13) 个月, Log-rank检验结果差异有统计学意义 ($\chi^2=11.803, P=0.001$); Cox比例风险回归模型结果显示, 分化程度、TNM分期、淋巴结转移和PROX1蛋白表达是影响乳腺癌患者预后的风险因素 ($P<0.05$)。**结论:** PROX1蛋白在乳腺癌组织中呈高表达, 且与乳腺癌发生、进展及预后密切相关, 是影响患者预后的风险因素。

[关键词] 乳腺癌; Prospero相关同源异形盒蛋白1; 预后; Cox比例风险回归模型

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2019.04.005

中图分类号: R737.9 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2019)04-0272-05

Expression of prospero-related homeobox 1 in breast cancer tissues and its correlation with prognosis ZHAO Dongli, LIANG Xianbin, WANG Yan, ZHANG Xifeng, ZHANG Weizhen (First Department of Medical Oncology, the Third People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450000, Henan Province, China)

Correspondence to: ZHANG Weizhen E-mail: 13937130192@126.com

[Abstract] **Background and purpose:** Prospero-related homeobox 1 (PROX1), a member of the homeodomain transcription factor family, is involved in the development and progression of a variety of malignant tumors, and is closely related to tumor cell proliferation, differentiation, apoptosis, migration and invasion. This study explored the expression of PROX1 in breast cancer tissues and its correlation with prognosis. **Methods:** A total of 85 patients with breast cancer underwent elective surgery, and complete data were collected from Mar. 2011 to Mar. 2013. Immunohistochemical staining was used to detect the protein level of PROX1 in breast cancer and adjacent tissues. All patients were followed up, and 4 patients were lost during follow-up. Follow-up deadline was Mar. 31, 2018. Kaplan-Meier method and Log-rank test were used for survival analysis. Cox proportional hazards regression model was used to analyze the prognostic factors of breast cancer. **Results:** The positive rate of PROX1 protein was 71.76% in breast cancer tissues and 28.57% in adjacent tissues ($\chi^2=32.600, P<0.001$). The expression of PROX1 protein in breast cancer tissues was significantly different in the degree of differentiation, TNM stage, estrogen receptor (ER), Ki-67 labeling index and lymph node metastasis compared with adjacent tissues ($P<0.05$). Kaplan-Meier survival analysis showed that the mean survival time of the PROX1 positive expression group was (36.73±2.73) months, and that of the PROX1 negative expression group was (56.36±2.13)

通信作者: 张维真 E-mail: 13937130192@126.com

months. The Log-rank test showed the difference in mean survival time was statistically significant between the two groups ($\chi^2=11.803$, $P=0.001$). The Cox proportional hazards regression model showed that the degree of differentiation, TNM stage, lymph node metastasis and PROX1 protein expression were risk factors for the prognosis of breast cancer patients ($P<0.05$). **Conclusion:** PROX1 is highly expressed in breast cancer tissues, and is closely related to the occurrence and progression of breast cancer and prognosis of patients. It is a risk factor affecting the prognosis of patients.

[Key words] Breast cancer; Prospero-related homeobox 1; Prognosis; Cox proportional hazards regression model

近年来,我国乳腺癌发病率呈逐年升高趋势,且出现年轻化趋势,已成为威胁我国女性健康的主要疾病类型^[1]。有研究指出^[2],复发和转移是影响乳腺癌患者预后的主要因素。患者一旦出现远处转移,生存率将显著下降^[3],但目前乳腺癌复发和转移的相关机制尚未完全清楚。Prospero相关同源异形盒蛋白1(prospero-related homeobox 1, PROX1)作为同源域转录因子家族成员,是多种组织器官发育过程中的关键性调节蛋白,同时参与淋巴管生成过程^[4],近年来研究发现,PROX1参与多种恶性肿瘤发生、发展过程^[5],与肿瘤细胞增殖、分化、凋亡、迁移和侵袭过程密切相关^[6]。本研究拟分析乳腺癌组织中PROX1蛋白水平,探讨其与临床病理学指标及预后的相关性,以期阐明乳腺癌发病机制提供参考资料。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取2011年3月—2013年3月在郑州市第三人民医院择期行手术治疗且资料完整的乳腺癌患者85例,术前均未接受放疗化疗,术后经病理学检查证实均为浸润性乳腺癌。患者均为女性,年龄31~79岁,中位年龄53岁;分化程度:低分化23例,中分化36例,高分化26例;参考第7版国际抗癌联盟(Union for International Cancer Control, UICC)与美国癌症联合会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)关于TNM分期标准:I期19例,II期38例,III~IV期28例;根据分子分型划分标准分为^[7]:Luminal A型25例,Luminal B型22例,人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)过表达型17例,三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)21例;发生淋巴

结转移39例。本研究已通过郑州市第三人民医院伦理委员会批准,所有患者均签署了知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色法检测

按照免疫组织化学SP法进行检测,试剂盒及配套试剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司。取乳腺癌和癌旁组织(距离癌缘>2 cm且经病理学检查排除乳腺癌)石蜡标本,按4 μm 厚度连续切片,二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,行微波抗原修复,室温下加入3% H_2O_2 反应30 min,加入山羊血清封闭10 min,加入一抗鼠抗人PROX1单克隆抗体(货号:ab33219,规格:0.2 mL,购自上海羽朵生物科技有限公司,1:200稀释),4 $^\circ\text{C}$ 温育过夜,加入辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG(货号:A0216,规格:100 μL ,购自上海碧云天生物技术有限公司,1:50稀释)二抗,室温反应30 min,二氨基联苯胺显色,苏木精复染,经脱水、透明、封片,显微镜下观察。以磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)替代一抗作为阴性对照,以已知阳性玻片作为阳性对照。结果判定:PROX1主要表达于细胞核,细胞质和细胞膜稍有染色,呈淡黄色或棕黄色颗粒状弥散分布。高倍镜下随机取5个视野,采用半定量法^[8]判定结果:

①染色程度:0分为不染色,1分为浅黄色,2分为棕黄色,3分为棕褐色;②阳性细胞比例:0分为<5%,1分为5%~25%,2分为26%~50%,3分为51%~75%,4分为>75%;③根据前两项评分乘积进行判定:阴性(-)为0~2分;阳性(+)为>2分。

1.2.2 病例随访

所有患者术后均进行随访,随访形式包括电话和门诊复查。随访中,失访4例,失访

率4.7%, 以术后第1天作为随访起始时间, 以患者死亡时间作为终点, 即总生存期 (overall survival, OS)。随访截止日期2018年3月31日, 随访时间3~60个月, 中位随访时间60个月, 平均随访时间 (48.22 ± 17.41) 个月。

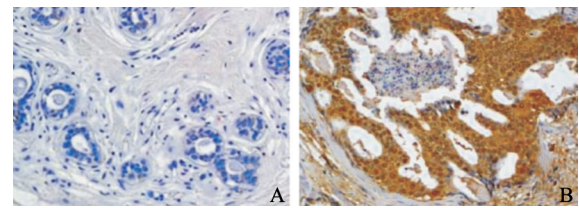
1.3 统计学处理

使用SPSS 13.0统计软件进行分析, 计数资料采用率值表示, 组间比较采用 χ^2 检验, 生存分析采用Kaplan-Meier法和Log-rank检验, 乳腺癌患者预后影响因素分析采用Cox比例风险回归模型。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌和癌旁组织中PROX1蛋白水平

乳腺癌组织中PROX1蛋白阳性率为71.76%, 癌旁组织则为28.57%, 差异有统计学意义 ($\chi^2=32.600$, $P < 0.001$, 图1)。



(SP, ×200)

图1 免疫组织化学法检测乳腺癌和癌旁组织中PROX1蛋白表达
Fig. 1 Expressions of PROX1 protein in breast cancer and adjacent tissues detected by immunohistochemistry

A: Para-cancerous tissues; B: Breast cancer

2.2 乳腺癌组织中PROX1蛋白在不同临床病理指标间的表达差异

乳腺癌组织中PROX1蛋白水平在不同年龄、肿瘤大小、孕激素受体 (progesterone receptor, PR)、HER2和分子分型患者之间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而在不同分化程度、TNM分期、雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、Ki-67和淋巴结转移患者之间的差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表1)。

表1 乳腺癌组织中PROX1蛋白在不同临床病理指标间的表达差异性

Tab. 1 Differential expressions of PROX1 protein in patients with different clinicopathological characteristics in breast cancer

Index	Case <i>n</i>	PROX1		χ^2	<i>P</i> value
		+	-		
Age/year					
≥55	31	23(74.19)	8(25.81)	0.142	0.706
<55	54	38(70.37)	16(29.63)		
Tumor size <i>D</i> /cm					
>2	46	34(73.91)	12(26.09)	0.228	0.633
≤2	39	27(69.23)	12(30.77)		
Differentiation					
Low differentiation	23	21(91.30)	2(8.70)	5.561	0.018
Medium-high differentiation	62	40(64.52)	22(35.48)		
TNM staging					
I - II	57	36(63.16)	21(36.84)	4.680	0.031
III - IV	28	25(89.29)	3(10.71)		
ER					
Positive	48	39(81.25)	9(18.75)	4.896	0.027
Negative	37	22(59.46)	15(40.54)		
PR					
Positive	29	20(68.97)	9(31.03)	0.170	0.680
Negative	56	41(73.21)	15(26.79)		
HER-2					
Positive	21	14(66.67)	7(33.33)	0.358	0.550
Negative	64	47(73.44)	17(26.56)		
Ki-67					
High	45	26(57.78)	19(42.22)	9.232	0.002
Low	40	35(87.50)	5(12.50)		
Molecular typing					
Luminal A	24	15(62.50)	9(37.50)	4.072	0.254
Luminal B	22	14(63.64)	8(36.16)		
HER2 overexpression	18	14(77.78)	4(22.22)		
TNBC	21	18(85.71)	3(14.29)		
Lymph node metastasis					
Yes	39	35(89.74)	4(10.26)	11.496	0.001
No	46	26(56.52)	20(43.48)		

TNBC: Triple-negative breast cancer

2.3 乳腺癌组织中PROX1蛋白水平与患者预后的关系

PROX1阳性表达组59例，死亡34例，5年总体生存率为42.37%；PROX1阴性表达组22例，死亡3例，5年总体生存率为86.36%，Kaplan-Meier生存分析结果显示，PROX1阳性组平均生存时间为(36.73±2.73)个月，PROX1阴性组则为(56.36±2.13)个月，Log-rank检验差异有统计学意义($\chi^2=11.803$, $P=0.001$, 图2)。

2.4 影响乳腺癌患者预后的多因素分析

Cox比例风险回归模型结果显示，分化程度、TNM分期、淋巴结转移和PROX1蛋白表达是影响乳腺癌患者预后的风险因素($P<0.05$, 表2)。

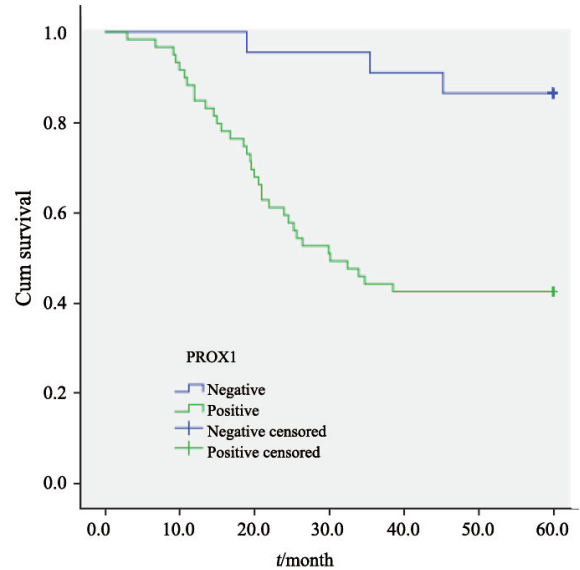


图2 Kaplan-Meier法分析乳腺癌组织中PROX1蛋白表达与患者预后的关系

Fig. 2 The relationship between the expression of PROX1 protein in breast cancer and prognosis of patients was analyzed by Kaplan-Meier analysis

表2 乳腺癌患者预后影响因素的Cox比例风险回归分析

Tab. 2 The prognostic factors of breast cancer patients were analyzed by Cox proportional hazard regression analysis

Index	B	SE	Wald	P value	HR(95%CI)
Age	0.560	0.364	2.370	0.124	1.751(0.858-3.573)
Tumor size	-0.263	0.552	0.226	0.634	0.769(0.261-2.269)
Differentiation	-1.063	0.480	4.914	0.027	0.345(0.135-0.884)
TNM staging	1.551	0.544	8.120	0.004	4.719(1.623-13.717)
ER	0.263	0.533	0.243	0.622	1.301(0.458-3.697)
PR	-0.660	0.488	1.828	0.176	0.517(0.198-1.345)
HER-2	0.681	0.494	1.897	0.168	1.976(0.750-5.208)
Ki-67	0.246	0.422	0.339	0.561	1.278(0.559-2.923)
Molecular typing	-0.335	0.193	3.020	0.082	0.715(0.490-1.044)
Lymph node metastasis	1.143	0.448	6.512	0.011	3.135(1.303-7.538)
PROX1 protein	1.463	0.716	4.179	0.041	4.319(1.062-17.565)

3 讨论

乳腺癌作为目前我国女性高发恶性肿瘤，发生机制复杂，涉及多因素、多基因、多步骤、多环节。多项研究表明^[9-11]，乳腺癌患者早期便可发生淋巴结转移，而淋巴结转移是影响患者疾病进展及预后的主要因素。因此，深入探讨与乳腺癌淋巴结转移相关敏感基因或机制对改善患者预后具有重要意义。PROX1作为一种高度保守的转录调节因子，其基因位于人染色

体1q32.2~32.3，在哺乳类动物淋巴管发育中发挥决定性作用，是胚胎发育中早期出现的淋巴分化标志^[12]，与淋巴管内皮细胞发育、成熟等密切相关^[13]，参与恶性肿瘤淋巴结转移过程^[14]，且与肿瘤细胞增殖、分化、侵袭等关系密切^[15]。Versmold等^[16]研究指出，原发性乳腺癌组织中PROX1基因的CpG岛甲基化显著增加，且在原发性乳腺癌的脑转移中亦观察到频繁的甲基化，PROX1可能成为在原发性和转移性乳腺癌中高甲基化和转录沉默的新靶基因。张逸群

等^[17]指出, PROX1在乳腺癌组织中的高表达可能与乳腺癌淋巴转移密切相关。本研究结果显示, 乳腺癌组织中PROX1蛋白阳性率高于癌旁组织, 说明PROX1蛋白在乳腺癌组织中呈高表达, 可能与乳腺癌发生密切相关。与临床病理学指标的相关性分析发现, 低分化、TNM分期为Ⅲ~Ⅳ期及发生淋巴结转移的乳腺癌组织中PROX1蛋白呈高表达, 说明PROX1蛋白可能参与了乳腺癌恶性化过程。同时, 本研究发现, PROX1蛋白高表达与ER阳性及Ki-67标记指数低有关, 我们推测PROX1蛋白表达可能通过影响ER活化及细胞增殖而参与乳腺癌进展过程, 但具体机制尚待进一步研究明确。

有研究指出^[18], PROX1高表达与涎腺腺样囊性癌预后差有关, 可能是判断涎腺腺样囊性癌预后的潜在预测因子。本研究结果显示, PROX1阳性组5年OS率低于PROX1阴性组, 且PROX1阳性组平均生存时间短于PROX1阴性组, 说明PROX1蛋白水平与乳腺癌患者预后有关, PROX1阳性表达可能是患者预后较差的预测指标。Cox比例风险回归分析结果显示, PROX1蛋白水平是影响乳腺癌患者预后的风险因素, PROX1蛋白阳性水平HR为4.319, 进一步说明PROX1蛋白水平与乳腺癌患者预后有关, 是影响患者预后的风险因素。

综上所述, PROX1蛋白在乳腺癌组织中呈高表达, 且与乳腺癌发生、发展密切相关, 其阳性表达与患者不良预后有关, 是影响患者预后的风险因素, 有望成为预测患者预后的因子及分子靶向治疗的潜在靶点。

[参 考 文 献]

[1] WEN D, WEN X, YANG Y, et al. Urban rural disparity in female breast cancer incidence rate in China and the increasing trend in parallel with socioeconomic development and urbanization in a rural setting [J]. *Thorac Cancer*, 2018, 9(2): 262-272.

[2] HUANG T T, PENNARUN N, CHENG Y H, et al. Gene expression profiling in prognosis of distant recurrence in HR-positive and HER2-negative breast cancer patients [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(33): 23173-23182.

[3] SHIAO J, THOMAS K M, RAHIMI A S, et al. Aspirin/antiplatelet agent use improves disease-free survival and

reduces the risk of distant metastases in stage II and III triple-negative breast cancer patients [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2017, 161(3): 463-471.

- [4] PAN Y, XIA L. Emerging roles of podoplanin in vascular development and homeostasis [J]. *Front Med*, 2015, 9(4): 421-430.
- [5] ZHANG S, YU N, WANG L, et al. Prox1 represses IL-2 gene expression by interacting with NFAT2 [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(41): 69422-69434.
- [6] RUDZINSKA M, LEDWON J K, GAWEL D, et al. The role of prospero homeobox 1 (PROX1) expression in follicular thyroid carcinoma cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(69): 114136-114155.
- [7] 黄三钱, 钟晶敏, 李晶, 等. 乳腺癌分子分型的研究进展 [J]. *现代生物医学进展*, 2016, 16(22): 4384-4387, 4269.
- [8] 张明明, 贾晓梅, 高伟. Vav1蛋白在胃癌中的表达及其临床意义 [J]. *中国现代医学杂志*, 2018, 28(8): 35-38.
- [9] KIM G R, CHOI J S, HAN B K, et al. Preoperative axillary US in early-stage breast cancer: potential to prevent unnecessary axillary lymph node dissection [J]. *Radiology*, 2018, 288(1): 55-63.
- [10] 税璘, 沈丹, 陈晓品. 早期乳腺癌前哨淋巴结阳性患者腋窝管理方式的研究进展 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2017, 22(7): 654-657.
- [11] JATOI I, BENSON J R. Surgical management of the axilla in early breast cancer [J]. *Curr Probl Surg*, 2018, 55(2): 47-65.
- [12] RAGUSA S, CHENG J, IVANOV K I, et al. PROX1 promotes metabolic adaptation and fuels out growth of Wnt (high) metastatic colon cancer cells [J]. *Cell Rep*, 2014, 8(6): 1957-1973.
- [13] LEE Y G, KOH G Y. Coordinated lymphangiogenesis is critical in lymph node development and maturation [J]. *Dev Dyn*, 2016, 245(12): 1189-1197.
- [14] XU X, WAN X, WEI X. PROX1 promotes human glioblastoma cell proliferation and invasion via activation of the nuclear factor- κ B signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(2): 963-968.
- [15] DROSOS Y, NEALE G, YE J, et al. Prox1-heterozygosis sensitizes the pancreas to oncogenic K-ras-induced neoplastic transformation [J]. *Neoplasia*, 2016, 18(3): 172-184.
- [16] VERSMOLD B, FELSBURG J, MIKESKA T, et al. Epigenetic silencing of the candidate tumor suppressor gene PROX1 in sporadic breast cancer [J]. *Int J Cancer*, 2007, 121(3): 547-554.
- [17] 张逸群, 叶双梅, 蒋学锋, 等. Prox1在乳腺癌组织中的表达及其与淋巴道转移的关系 [J]. *肿瘤防治研究*, 2010, 37(7): 777-780.
- [18] GAO T, MA C, LI Y, et al. High expression of prospero-related homeobox-1 (PROX1) is associated with poor prognosis in patients with salivary adenoid cystic carcinoma [J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2018, 76(7): 1440-1446.

(收稿日期: 2018-10-08 修回日期: 2018-12-30)