

文章编号:1005-6947(2008)05-0444-05

· 乳腺外科专题研究 ·

## Pirh2 mRNA 在原发性乳腺癌中的表达意义

张超杰<sup>1,2</sup> 唐利立<sup>2</sup>, 欧阳慧英<sup>2</sup>, 任力锋<sup>3</sup>, 鄢玉辉<sup>2</sup>, 罗庚求<sup>4</sup>

(1. 湖南省人民医院 乳甲外科, 湖南 长沙 410005; 2. 中南大学湘雅医院 乳腺科, 湖南 长沙 410008;  
3. 中南大学生物医学工程研究院, 湖南 长沙 410008; 4. 中南大学湘雅医学院 病理学系, 湖南 长沙 410013)

**摘要:**目的 探讨 Pirh2 mRNA 在乳腺肿瘤组织中的表达及其与乳腺癌发生发展的关系。方法 回顾性分析湘雅医院乳腺科近 10 年间收治的乳腺肿瘤患者的临床资料, 其中包括 I, II 期乳腺癌 87 例, III, IV 期乳腺癌 27 例 Pirh2 mRNA 的表达, 并以纤维瘤组织 10 例和正常乳腺组织 6 例作为对照。结果 Pirh2 mRNA 在乳腺癌组织中阳性表达率为 43.9% (50/114), 10 例纤维瘤组织 1 例阳性, 6 例正常乳腺组织无表达。乳腺癌与纤维瘤和正常乳腺组织间的 Pirh2 mRNA 表达均有差异显著性 ( $P = 0.004$ )。I, II 期乳腺癌和 III, IV 期乳腺癌中阳性率分别为 37.9% (33/87) 和 63.0% (17/27), 差异有显著性 ( $P = 0.022$ )。114 例乳腺癌中 5 年内远处转移者 60 例, 其 Pirh2 mRNA 阳性率为 63.3% (38/60); 无瘤生存  $\geq 5$  年者 54 例, 其 Pirh2 mRNA 阳性率为 22.2% (12/54), 两者有差异有显著性 ( $P = 0.000$ )。结论 Pirh2 mRNA 在乳腺癌组织中呈较高表达, 而在乳腺纤维瘤和正常组织中几乎不表达; 在 III, IV 期阳性表达明显高于 I, II 期乳腺癌。Pirh2 mRNA 可能与乳腺癌的发生发展有密切关系。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(5):444-448]

**关键词:** 乳腺肿瘤/病理学; Pirh2 mRNA; 原位杂交

**中图分类号:** R 737.9      **文献标识码:** A

## The significance of Pirh2 mRNA expression in primary breast cancer

ZHANG Chaojie<sup>1</sup>, TANG Lili<sup>2</sup>, OUYANG Huiying<sup>2</sup>, REN Lifeng<sup>3</sup>, WU Yuhui<sup>2</sup>,  
LUO Gengqiu<sup>4</sup>

(1. Department of Breast and Thyroid Surgery, Pepole's Hospital of Hunan Province, Changsha 410005, China; 2. Department of Breast Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 3. Department of Bioengineering, Central South University, Changsha 410008 China; 4. Department of Pathology, Xiangya Medical College, Central South University, Changsha 410008, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression of Pirh2 mRNA in breast cancer tissue and its correlation to genesis and development of breast cancer. **Methods** A retrospectively analysis of pirh 2 mRNA expression in 87 cases of stage I and II breast cancer, 27 cases of stage III and IV breast cancer was made, and 10 cases of fibroma tissue and 6 cases of normal lacteal gland tissue as control, all of which were from Department of Breast Surgery, XiangYa Hospital in recent 10 years. The in situ hybridization was used to detect the expression of Pirh2 mRNA. **Results** The positive rate of Pirh2 mRNA in breast cancer tissue was 43.9% (50/114), 1 positive in 10 cases of fibroid tumor, and no expression in normal lacteal gland tissue. The expression of Pirh2 mRNA in breast cancer was significant higher than that in fibroid tumor and normal lacteal gland ( $P = 0.004$ ). The positive rate of the stage I or II breast cancer group and was 37.9% (33/87) and of stage III or IV was 63% (17/27) respectively, with a significant difference ( $P = 0.022$ ). In the 60 cases with metastasis occurred in less than 5 years the positive rate of Pirh2 mRNA

**基金项目:** 湖南省卫生厅课题资助项目 (B2005-021)。

**收稿日期:** 2008-03-20; **修订日期:** 2008-04-15。

**作者简介:** 张超杰, 男, 湖南省人民医院主治医师, 主要从事乳腺癌的基础与临床方面的研究。

**通讯作者:** 唐利立 E-mail: tlli77@medmail.com.cn

was 63.3% (38/60), and the positive rate of the 54 non-tumor survivors was 22.2% (12/54) ( $P = 0.000$ ). **Conclusions** Pirh2 mRNA is more highly expressed in breast cancer, while there is almost zero expression in lacteal gland fibroid and normal tissue. The positive expression in stage III or IV is significantly higher than breast cancer of stage I or II. Pirh2 mRNA is probably closely correlated to the genesis and development of breast cancer. [Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(5):444-448]

**Key words:** Breast Neoplasms/pathol; Pirh2 mRNA; In Situ Hybridization

**CLC number:** R 737.9

**Document code:** A

大量基础研究表明<sup>[1-6]</sup>, Pirh2 的高表达可能是导致恶性肿瘤发生发展的因素之一。笔者采用原位杂交方法检测 Pirh2 mRNA 在乳腺肿瘤等组织中的表达情况并将 Pirh2 mRNA 与 HER-2 的表达进行相关性分析, 试图了解 Pirh2 mRNA 在乳腺癌发生发展中所起的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源及分组

随机选取中南大学湘雅医院乳腺科 1996 年 1 月—2005 年 10 月手术切除的乳腺肿瘤及正常乳腺组织标本。按组织来源, 分为: (1) 乳腺癌组。I, II 期(按 2003 年 AJCC 的 TNM 分期)乳腺癌 87 例, III, IV 期乳腺癌 27 例, 均为女性, 年龄 26~71 岁, 中位年龄 44 岁。浸润性非特殊型癌 88 例, 浸润性特殊型癌 24 例, 非浸润性癌 2 例。(2) 乳腺良性肿瘤组。乳腺纤维瘤组织 10 例, 女性, 年龄 16~42 岁, 中位年龄 24 岁。(3) 正常组。正常乳腺组织 6 例(乳腺纤维瘤手术时, 取自纤维瘤旁 2~3 cm 正常腺体, HE 染色证实), 女性, 年龄 16~26 岁, 中位年龄 22 岁。

### 1.2 实验方法与试剂

本实验采用原位杂交法检测 Pirh2 mRNA 的表达。以已知 Pirh2 mRNA 阳性的乳腺癌切片作为阳性对照(由武汉博士德生物工程有限公司提供), 阴性对照组选用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)代替含探针的杂交液, 以排除假阳性和非特异性染色。操作步骤按试剂盒要求进行。Pirh2 原位杂交检测试剂盒(MK2580)购自武汉博士德生物工程有限公司。试剂盒内容: 胃蛋白酶( $\times 10$ , Reysin) 2 mL, 预杂交液 2 mL, Pirh2 寡核苷酸探针杂交液 2 mL, 封闭液 5 mL, 生物素化鼠抗地高辛 5 mL, SABC-POD 5 mL, 生物素化过氧化酶 5 mL。Pirh2 原位杂交检测试剂盒(MK2580)针对人 Pirh2 靶基因的 mRNA 序列为: 5'-AGGCCA CCTTG CTGTG ACAAG CTTTA TACTT GCCGC-3'; 5'-ACTTG TGAAG AATGT AGCAC ATTGT TTGGA GAATA-3'; 5'-CACAA GTGTA TTGAA AATGT GTCCC GACAG AATTG-3'。HER-2 的检测采用免疫组化 SABC 法(由湘雅医院病理科检测)。

### 1.3 Pirh2 mRNA 原位杂交结果的判断标准

结果判断均采用半定量的方法, 均采用双盲法观察评估。Pirh2 mRNA 在人的组织细胞中主要着色于细胞浆, 少量在细胞核上。按 DAB 显色强度和阳性细胞百分比之积判断是否为阳性。计数时先于低倍光学显微镜(40 倍及 100 倍)下观察整个切片染色情况, 在细胞浆着色较密集的区域随机观察 5 个高倍(400 倍)视野, 计数每个视野中阳性细胞百分比, 取 5 个视野的平均值为该片的 Pirh2 mRNA 阳性百分数(a), 分别记为: 0 分(无阳性细胞), 1 分(1%~10%), 2 分(11%~25%), 3 分(26%~50%), 4 分(51%~75%)和 5 分( $\geq 76\%$ )。阳性细胞着色强度(b), 分别记为: 0 分(无细胞着色), 1 分(淡黄色和黄色), 2 分(棕黄色)和 3 分(黄褐色)。按  $a \times b$  的得分分为: 0~2 分为阴性(-), 3~4 分为阳性(+), 5~6 分为中等阳性(++),  $\geq 6$  分为强阳性(+++)共 4 个等级。

### 1.4 统计学处理

统计学分析由 SPSS 11.5 for Window 统计软件包完成。率的比较用 Crosstable  $\chi^2$  检验。Kaplan-Meier 法描述生存曲线, Log-rank 法进行差别显著性检验。以  $\alpha = 0.05$  的双尾概率作为统计学检验的显著性水准。相关性分析采用 Nonparametric Correlations 的 Spearman's 相关。

## 2 结果

### 2.1 Pirh2 mRNA 在乳腺肿瘤组织及正常组织中的表达

乳腺癌组织中 Pirh2 mRNA 呈棕黄色, 灶性或弥漫状分布, 间质少有染色(图 1)。

Pirh2 mRNA 在乳腺癌组织中阳性表达率为 43.9% (50/114), 10 例纤维瘤组织 1 例阳性(10.0%), 6 例正常乳腺组织中无表达。乳腺癌与纤维瘤和正常乳腺组织间的 Pirh2 mRNA 表达差异存在显著性( $P = 0.004$ )(表 1); I, II 期乳腺癌和 III, IV 期乳腺癌中阳性率分别为 37.9% (33/87) 和 63.0% (17/27), 两者差异有显著性( $P = 0.022$ )(表 2)。

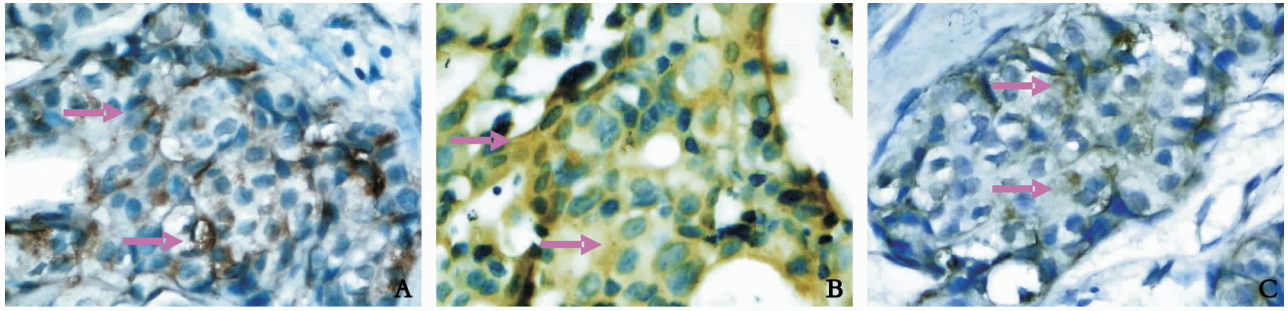


图1 乳腺癌组织 Pirh2 mRNA 阳性表达 A:阳性对照(×400); B:强阳性(×400); C:中等阳性(×400)

表1 Pirh2 mRNA 在乳腺癌与纤维瘤中的表达

Pirh2 mRNA	乳腺癌(114例)		纤维瘤(10例)		正常乳腺(6例)		$\chi^2$	P
	例	(%)	例	(%)	例	(%)		
(-)	64	(56.1)	9	(90.0)	6	(100)	8.325	0.004
(+)(++)(+++)	50	(43.9)	1	(10.0)	0	(0)		

注:将纤维瘤与正常乳腺组织合并后再和乳腺癌比较

表2 Pirh2 mRNA 在乳腺癌不同分期中的表达

Pirh2 mRNA	I,II期(87例)		III,IV期(27例)		$\chi^2$	P
	例	(%)	例	(%)		
(-)	54	(62.1)	10	(37.0)	5.244	0.022
(+)(++)(+++)	33	(37.9)	17	(63.0)		

## 2.2 Pirh2 mRNA 与乳腺癌远处转移的关系

单因素分析表明, Pirh2 mRNA 在5年内出现远处转移组和无瘤生存5年以上组的阳性率分别为63.3%和22.2%,两组间差异存在显著性( $P=0.000$ )(表3)。Pirh2 mRNA 的阳性表达对原发性乳腺癌预后(远处转移)有显著性影响, Pirh2 mRNA 在5年内出现远处转移组和无瘤生存5年以上组的不同表达水平的 Log-rank 检验差异存在显著性(Log-rank = 17.0,  $P=0.0000$ )(图2)。另外, Pirh2 mRNA 与 HER-2 的表达无相关性( $r=0.091$ ,  $P=0.336$ )(表4)。

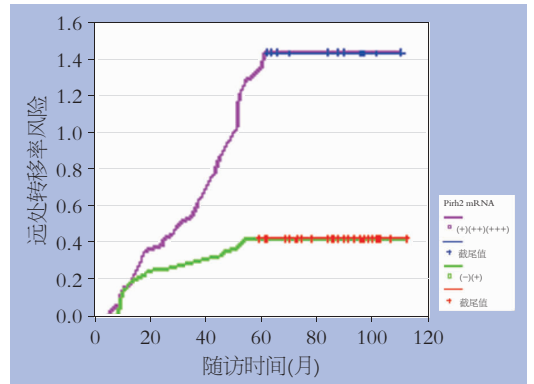


图2 Pirh2 mRNA 对乳腺癌远处转移的影响

表3 5年内转移组与无瘤生存5年以上组 Pirh2 mRNA 的表达率

Pirh2 mRNA	5年内转移(60例)		无瘤生存5年以上(54例)		$\chi^2$	P
	例	(%)	例	(%)		
(-)	22	(36.7)	42	(77.8)	19.508	0.000
(+)(++)(+++)	38	(63.3)	12	(22.2)		

表4 Pirh2 mRNA 与 HER-2 的表达的相关性

HER-2	Pirh2 mRNA		r	P	$\chi^2$	P
	(+)(++)(+++)	(-)				
(++)(+++)	20	20	0.091	0.336	0.944	0.331
(-)(+)	30	44				

### 3 讨论

Pirh2 (p53 induced RING-H2 protein, for p53-induced protein with a RING-H2 domain) 最初报道时称作雄激素受体氨基末端相互影响的蛋白质 (androgen receptor N-terminal interacting protein, ARNIP), 是从酵母双杂交系统 (the yeast two-hybrid system) 分离出来的<sup>[7]</sup>。ARNIP mRNA 的长度约为 1.7 kb, 人类 Pirh2 蛋白质在染色体 4q21 上, 编码 9 个外显子时其长度扩展到 32 kb。Pirh2 相对分子质量约为 30 kD, 包含 261 个氨基酸, 1 个 H2 锌环指区域 (C3H2C3), 该环指区域具有环状结构的共同序列: CXXCX (19, 39) CX (1, 3) HX (2, 3) C/HXXCX (4, 48) CXXC, X 代表着各种氨基酸; 其中 H2 环指富含 6 个半胱氨酸、2 个组氨酸以及共同具有的等位的 2 个锌离子结构<sup>[1,8-9]</sup>。Leng 等<sup>[1]</sup>在多种成年小鼠组织中, 用 Northern 印迹法证实两种 Pirh2 mRNA 转录产物的长度约为 1.7 kb 和 1.6 kb; 并发现在肝脏组织中 Pirh2 mRNA 表达水平最高, 睾丸与心脏其次, 肌肉与脾脏的表达水平最低。

人类的 Pirh2 分为野生型和突变型两类。Logan 等<sup>[2]</sup>对多种细胞系 (如 COS-7 细胞等) 用 Western 印迹 (蛋白印迹) 发现野生型 hPirh2 是一种不稳定的蛋白, 其半衰期为 3 ~ 5 h, 光密度分析显示其半衰期约为 3.5 h; 而突变型的 hPirh2 表达水平稳定。

Pirh2 在恶性肿瘤的主要生物学行为与其所特有的分子结构锌指 H2 环状区域密切相关。研究证明, 锌指 H2 环状区域具有内在的“泛素化”蛋白连接酶 E3 活性<sup>[10]</sup>; 它通过自身相互作用和“泛素化”介导的蛋白质降解的作用负反馈调节野生型 p53 的表达。目前, 除 Pirh2 在基础方面的研究外<sup>[1-6,11]</sup>, 临床研究很少, 国内外研究<sup>[12-14]</sup>发现, Pirh2 表达水平在 89% 的前列腺癌和 84% 的肺癌中高于正常组织中。而尚未见 Pirh2 在乳腺癌方面的报道。

本研究发现 Pirh2 mRNA 在乳腺癌组织中总的阳性表达率明显高于纤维瘤和正常乳腺组织, ( $P = 0.004$ ); 其中, I, II 期乳腺癌阳性率显著低于 III, IV 期乳腺癌, ( $P = 0.022$ )。由此可推测, Pirh2 mRNA 的表达和乳腺癌的发生发展相关, 它可能是乳腺癌的促癌基因。

本组乳腺癌中, 5 年内出现远处转移的 Pirh2 mRNA 阳性率为 63.3%, 而无瘤生存  $\geq 5$  年的

Pirh2 mRNA 阳性率仅为 22.2%, 两者有差异显著性 ( $P = 0.000$ ) (表 3)。Pirh2 mRNA 在乳腺癌不同预后中的阳性表达率均存在差异显著性, ( $P = 0.000, 0.0000$ ) (表 3)。Kaplan-Meier 生存分析示 Pirh2 mRNA 的阳性表达对乳腺癌远处转移率的风险明显增加 ( $\text{Log-rank} = 17.0, P = 0.0000$ ) (图 2)。而 Pirh2 mRNA 的阳性表达与 HER-2 的表达无关联性 ( $r = 0.091, P = 0.336$ ) (表 4)。由此推测, Pirh2 mRNA 可能是原发性乳腺癌预后的独立高危因素, 且与 HER-2 之间无相关性; 表明它们对早期乳腺癌预后的影响是相互独立的。

然而, 由于目前尚缺乏 Pirh2 在乳腺癌中表达的大样本和前瞻性研究, 以及采用免疫组织化学逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 等技术进一步证实, 故本研究检测的 Pirh2 mRNA 是否只是突变型, 以及 Pirh2 mRNA 在乳腺癌中的表达意义及其对预后的评估价值尚待深入研究证实。

#### 参考文献:

- [1] Leng RP, Lin YP, Ma WL, *et al.* Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation [J]. *Cell*. 2003, 112 (6): 779 - 791.
- [2] Logan IR, Sapountzi V, Gaughan L, *et al.* Control of human PIRH2 protein stability: involvement of TIP60 and the proteasome [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (12): 11696 - 11704.
- [3] Corcoran CA, Huang Y, Sheikh MS. The p53 paddy wagon: COP1, Pirh2 and MDM2 are found resisting apoptosis and growth arrest [J]. *Cancer Biol Ther*, 2004, 3 (8): 721 - 725.
- [4] Brooks CL, Gu W. p53 ubiquitination: Mdm2 and Beyond [J]. *Mol Cell*, 2006, 21 (3): 307 - 315.
- [5] Chen M, Cortay JC, Logan IR, *et al.* Inhibition of ubiquitination and stabilization of human ubiquitin E3 ligase PIRH2 by measles virus phosphoprotein [J]. *J Virol*, 2005, 79 (18): 11824 - 11836.
- [6] Zhang LP, Li JJ, Wang CY, *et al.* A new human gene hNTKL-BP1 interacts with hPirh2 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 330 (1): 293 - 297.
- [7] Beitel LK, Elhaji YA, Lumbroso R, *et al.* Cloning and characterization of an androgen receptor N-terminal-interacting protein with ubiquitin-protein ligase activity [J]. *J Mol Endocrinol*, 2002, 29 (1): 41 - 60.
- [8] Borden KL. RING domains: master builders of molecular scaffolds? [J]. *J Mol Biol*, 2000, 295 (5): 1103 - 1112.
- [9] Capili AD, Edghill EL, Wu K, *et al.* Structure of the C-terminal RING finger from a RING-IBR-RING/TRIAD Motif Reveals a novel zinc-binding domain distinct from a RING [J]. *J Mol Biol*, 2004, 340 (5): 1117 - 1129.

- [10] Leng RP, Lin Y, Ma W, *et al.* Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation [J]. *Cell*, 2003, 112(6):779-791.
- [11] Maruyama S, Miyajima N, Bohgaki M, *et al.* Ubiquitylation of epsilon-COP by PIRH2 and regulation of the secretion of PSA [J]. *Mol Cell Biochem*, 2008, 307(1-2):73-82.
- [12] Duan W, Gao L, Druhan LJ, *et al.* Expression of Pirh2, a newly identified ubiquitin protein ligase, in lung cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2004, 96(22):1718-1721.
- [13] Logan IR, Gaughan L, McCracken SR, *et al.* Human PIRH2 enhances androgen receptor signaling through inhibition of histone deacetylase 1 and is overexpressed in prostate cancer [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(17):6502-6510.
- [14] 苏远, 白明, 朱莉萍, 等. 泛素连接酶 pirh2 短发夹状 RNA 对肺癌细胞生长抑制的实验研究 [J]. *中华医学杂志*, 2007, 87(17):1199-1203.

文章编号:1005-6947(2008)05-0448-01

· 病案报告 ·

## 腹膜后骨外骨瘤 1 例

张好生<sup>1</sup>, 李沛雨<sup>2</sup>, 刘洪一<sup>2</sup>

(1. 山东省烟台市烟台山医院 普外一科, 山东 烟台 264001; 2. 解放军总医院 普外一科, 北京 100853)

**关键词:** 腹膜后肿瘤; 骨瘤; 病例报告

**中图分类号:** R 735.5 **文献标识码:** D

**患者** 女, 45 岁。7 年前化脓性阑尾炎术后不久逐渐出现臀部和右下肢后部疼痛、麻木不适, 当地医院就诊, 诊断为腰椎间盘突出症, 后时常出现右下肢不适, 于 4 个月前疼痛加重, 到当地医院行甲基强的松龙椎管内注射, 无效果。10 d 前行 CT 检查发现“腹膜后占位”, 转入解放军总医院。既往无结核病史。体查: 全腹无压痛, 右下腹阑尾切口偏内侧扪及一约 5 cm × 4 cm 大小的肿块, 质硬、固定, 无压痛。直腿抬高试验阳性, 沿坐骨神经区域压痛, 右足背前侧感觉减退。腹部 CT 示: 平 L5/S1 水平右侧腰大肌内前方见不规则状高密度影, 边界清, 长径 3.85 cm, CT 值 900-1300 HU; 相邻右侧髂总动静脉受压推移变形。脊柱未见明显异常 (图 1-2)。行剖腹探查, 术中见肿物位于腹膜后, 大小为 4 cm × 3.5 cm × 3.5 cm, 灰白色, 骨样、无

包膜, 表面光滑, 与脊柱无融合, 右输尿管和髂总动静脉接触面有压痕。病理诊断: (腹膜后) 骨外骨瘤。

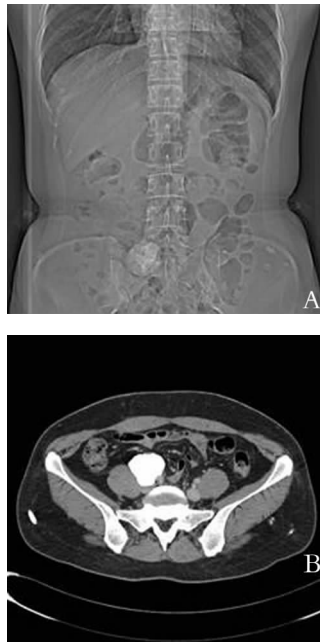


图 1 患者术前影像资料 A: 腹部平片; B: CT 平扫

**讨论** 骨瘤是骨膜性成骨过程异常引起的骨组织过度增殖所形成的一种良性肿瘤, 生长缓慢, 临床症状一般不明显。好发于颅面骨。偶尔见于软组织, 称骨外骨瘤, 本病例腰椎间盘突出症状明显, 而术后症状消失实属罕见。软组织骨瘤发病机制至今尚未明确。有学者认为骨外骨瘤由原始间叶细胞分化而来, 由膜内成骨而成熟。本病例发病前有明确的化脓性阑尾炎手术史, 肿瘤位置恰位于平 L5/S1 水平右侧腰大肌内前方, 不能排除两者无联系, 李希波等 (李希波, 卢绮媚. 腹腔间隙孤立性骨瘤 1 例 [J]. 罕见疾病杂志, 2006; 13(6): 52-53) 亦报道 1 例位置与本例类似, 但无症状, 此瘤是否由周围炎症组织钙化引起, 或结核钙化等引起尚有待于进一步考证。

**收稿日期:** 2008-04-30。

**作者简介:** 张好生, 男, 山东省烟台市烟台山医院主治医师, 主要从事普外临床和缺血再灌注损伤方面的研究。

**通讯作者:** 张好生 E-mail: huweizhang13579@163.com