

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.12.027

乳腺癌组织中人乳腺球蛋白的表达水平及其与乳腺癌发生和发展的关系

王 刚, 廖翠屏, 刘 敏, 温亚楠

(四川省成都市温江区妇幼保健院检验科 611130)

摘要:目的 研究乳腺癌组织中人乳腺球蛋白的表达水平及其与乳腺癌发生和发展的关系。方法 收集该院 2015 年 1 月至 2017 年 8 月乳腺癌组织(A 组)、癌旁正常组织(B 组)及乳腺良性病变组织(C 组)标本各 40 例,通过组织微阵列技术与免疫组化方法对 3 组中人乳腺球蛋白的表达水平进行测定,并通过反转录聚合酶链反应对 3 组中人乳腺球蛋白 mRNA 表达进行测定,比较 3 组人乳腺球蛋白及其 mRNA 表达情况。结果 A 组人乳腺球蛋白阳性率明显高于 B、C 组,且其 mRNA 表达水平也明显高于 B、C 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);而 B 组与 C 组人乳腺球蛋白阳性率及其 mRNA 表达水平比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。乳腺癌组织中人乳腺球蛋白的表达与组织学分级、淋巴结转移及雌激素受体(ER)密切相关($P < 0.05$),而与病理类型、TNM 分期、肿瘤大小及孕激素受体(PR)均无明显相关性($P > 0.05$)。多因素 Logistic 回归分析发现,乳腺癌组织中人乳腺球蛋白的表达与组织学分级、PR 及 ER 水平均存在明显关系($P < 0.05$)。结论 人乳腺球蛋白在乳腺癌组织中呈高表达水平,并且与组织学分级、PR 及 ER 密切相关,可能参与乳腺癌的发病过程,可作为评估患者肿瘤侵袭能力及恶性程度的重要指标。

关键词:乳腺癌; 乳腺良性病变; 人乳腺球蛋白

中图分类号:R737.9

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)12-1789-04

Expression of human mammary globulin in breast cancer tissues and its relationship with the occurrence and development of breast cancer

WANG Gang, LIAO Cui ping, LIU Min, WEN Yanan

(Department of Clinical Laboratory, Maternal and Child Health Care Hospital in Wenjiang District, Chengdu, Sichuan 611130, China)

Abstract: Objective To study the expression of human mammary globulin in breast cancer and its relationship with the occurrence and development of breast cancer. **Methods** The breast cancer tissues (group A) and adjacent normal tissues (group B) and benign breast lesion tissues (group C) were selected in the hospital, with 40 cases in each group. The the expression levels of human mammary globulin in the three groups were determined by tissue microarray technique and immunohistochemistry, and the human mammary globulin mRNA expression in the three groups was determined by reverse transcription polymerase chain reaction. The expression of human mammary globulin and its mRNA were compared among the three groups. **Results** The positive rate of human mammary globulin in the group A was significantly higher than that in the group B and group C, and the expression level of mRNA in the group A was significantly higher than those in the group B and group C ($P < 0.05$), but there was no significant difference between group B and group C ($P > 0.05$). The expression of human mammary globulin in breast cancer tissues was significantly related to histological grade, lymph node metastasis and estrogen receptor (ER) ($P < 0.05$), but had no significant correlation with the pathological type, TNM stage, tumor size and progesterone receptor (PR) ($P > 0.05$). Multivariate Logistic regression analysis showed that there were significant correlation between the expression of human breast globulin and histological grade, PR and ER ($P < 0.05$). **Conclusion** Human mammary globulin shows high expression levels in breast cancer tissues, and it is significant correlated to the histological grade, PR and ER, indicating that it may be involved in the pathogenesis of the breast cancer, so it can be used as an important index to evaluate the tumor invasion and malignant degree of breast cancer.

Key words: breast cancer; benign breast lesion; human mammary globulin

人乳腺球蛋白是由乳腺癌上皮细胞克隆而来的乳腺癌相关蛋白,其在约 85% 的乳腺癌中呈过高表

达,但并不表达于其他癌组织,因此有较高的乳腺癌组织特异性^[1-2]。本研究选取乳腺癌组织、癌旁正常

组织及乳腺良性病变组织标本,通过免疫组化方法、组织微阵列技术及反转录聚合酶链反应(RT-PCR)对上述组织标本中人乳腺球蛋白及其 mRNA 表达水平进行检测,分析其表达水平与乳腺癌临床病理特征的相关性,分析其与乳腺癌发生和发展的关系,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院 2015 年 1 月至 2017 年 8 月乳腺癌组织(A 组)、癌旁正常组织(B 组)及乳腺良性病变组织(C 组)标本各 40 例。A 组患者年龄 24~65 岁,平均(49.95±6.57)岁;B 组患者年龄 21~68 岁,平均(51.06±7.47)岁;C 组患者年龄 22~69 岁,平均(50.63±7.48)岁。3 组的年龄、病理分型等一般资料比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。40 例乳腺癌的病理分型:浸润型 35 例,非浸润型 5 例;TNM 分期:Ⅰ期 11 例,Ⅱ期 21 例,Ⅲ期 7 例,Ⅳ期 1 例;发生腋窝淋巴结转移 24 例。本研究内容已通过本院医学伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 引物设计 按照人乳腺球蛋白 mRNA 序列,通过 Primer Premier 5.0 软件对 PCR 引物上、下游序列进行设计,其中人乳腺球蛋白 mRNA 引物序列长度为 320 bp,β-actin 序列长度为 490 bp;引物由金斯瑞生物科技有限公司合成和纯化。

1.2.2 RT-PCR 检测 采用 Trizol 提取液一步法提取细胞总 RNA。并通过一步法进行 RT-PCR 操作,严格按照 PCR 试剂盒(购自上海吉玛制药技术有限公司)说明书进行检测。反应条件:94℃预变性 5 min,以相同温度进行变性 30 s,58℃退火 40 s,共进行 40 个循环;循环结束后,在 62℃延伸 3 min,72℃总延伸 5 min;反转录合成 cDNA(Quit eDNA 第一链合成试剂盒),将 β-actin 作为内参照。根据 PCR 扩增仪(购自美国 ABI 公司,型号 2720 型)及 SYBRGreen 试剂盒说明书完成操作,其反应条件为:94℃预变性 5 min,以相同温度变性 30 s,58℃退火 30 s,共进行 40 个循环;循环结束后,在 62℃延伸 60 s,68℃总延伸 3 min。

1.2.3 免疫组化检测 全部标本均经 10%中性甲醛进行固定处理,并用石蜡进行包埋,制成微阵列芯片(孔径 3 mm,含 40 个组织芯),4 mm 切片;选用 2 张用于免疫组织化学染色,另选 1 张用于 HE 染色;通过磷酸盐缓冲液代替一抗作为阴性对照,严格按试剂盒说明书完成相应操作。

1.3 免疫组化结果判读标准^[3] 人乳腺球蛋白阳性定义:胞浆、细胞膜存在棕色颗粒,反之为阴性。随机选取 10 个高倍视野,观察阳性细胞的染色强度,0 分:无显色;1 分:淡黄色;2 分:棕黄色;3 分:棕褐色。并对阳性细胞在总细胞数所占百分比进行评分,阴性:0 分;阳性细胞在 25%及以下:1 分;阳性细胞>25%~50%:2 分;阳性细胞>50%~75%:3 分;阳性细胞>

75%~100%:4 分。将阳性细胞的染色强度及其百分比得分相加,其中 0~3 分为阴性,>3~7 分为阳性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS23.0 统计学软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK-*q* 检验;计数资料以百分率表示,采用 χ^2 检验和 Fisher 确切概率法,并采用多因素 Logistic 回归分析乳腺癌组织中乳腺球蛋白的表达与临床病理特征的相关性。检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组人乳腺球蛋白阳性结果及其 mRNA 表达水平比较 见表 1。A 组人乳腺球蛋白阳性率明显高于 B、C 组,且其 mRNA 表达水平也明显高于 B、C 组,差异均有统计学意义($P<0.05$);而 B 组与 C 组 mRNA 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 3 组人乳腺球蛋白阳性结果及其 mRNA 表达水平比较

组别	<i>n</i>	蛋白阳性[n(%)]	mRNA 表达水平($\bar{x} \pm s$)
A 组	40	25(62.50)*	2.81±0.63*
B 组	40	0(0.00)	0.13±0.39
C 组	40	0(0.00)	0.00±0.00

注:与 B、C 组比较,* $P<0.05$

2.2 乳腺癌组织中乳腺球蛋白阳性率与临床病理特征的相关性 见表 2。乳腺癌组织中乳腺球蛋白的表达与组织学分级、淋巴结转移及雌激素受体(ER)水平均密切相关($P<0.05$),其中组织学分级为Ⅱ~Ⅲ级、发生腋窝淋巴结转移及 ER 阳性者人乳腺球蛋白的阳性率明显高于组织学分级为Ⅰ级、无淋巴结转移及 ER 阴性者;而人乳腺球蛋白阳性率与病理类型、TNM 分期、肿瘤大小及孕激素受体(PR)均无明显相关性($P>0.05$)。

表 2 乳腺癌组织中乳腺球蛋白阳性率与临床病理特征的相关性[n(%)]

项目	<i>n</i>	阳性	χ^2	<i>P</i>
组织学分级				
Ⅰ级	9	3(33.33)	7.43	< 0.01
Ⅱ~Ⅲ级	31	22(70.97)		
病理类型				
浸润型癌	35	22(62.86)	0.11	0.88
非浸润型癌	5	3(60.00)		
TNM 分期				
Ⅰ~Ⅱ	32	20(62.50)	0.00	1.00
Ⅲ~Ⅳ	8	5(62.50)		
肿瘤大小				
T1	14	9(64.29)	0.89	0.33
T2	15	9(60.00)		
T3	11	7(63.64)		

表 2 乳腺癌组织中人乳腺球蛋白阳性率与临床病理特征的相关性[n(%)]

项目	n	阳性	χ^2	P
淋巴结转移				
是	24	17(70.83)	6.36	0.01
否	16	8(50.00)		
ER				
阳性	27	20(74.07)	7.25	< 0.01
阴性	13	5(38.46)		
PR				
阳性	26	16(61.54)	0.21	0.81
阴性	14	9(64.29)		

2.3 多因素 Logistic 回归分析结果 见表 3。将乳腺癌组织中人乳腺球蛋白作为因变量,临床病理特征各项指标作为自变量进行多因素 Logistic 回归分析。提示乳腺癌组织中人乳腺球蛋白的表达与组织学分级、PR 及 ER 水平均存在明显关系($P < 0.05$)。

表 3 多因素 Logistic 回归分析结果

指标	SE	Wald	χ^2	P	OR	95%CI
组织学分级	1.71	0.36	22.56	<0.01	5.53	2.73~11.20
PR	1.27	0.62	4.20	0.04	3.56	1.06~12.00
ER	1.88	0.93	4.09	0.04	6.55	1.06~36.77

3 讨 论

远处转移是引起乳腺癌患者死亡的主要因素之一。有研究报道,早期乳腺癌不排除远处转移的可能性^[4-5]。近年来,肿瘤标志物广泛应用于肿瘤的诊断、疗效及预后评价中,并且也广泛用于高危人群的随访研究中。其中糖类抗原 153(CA153)、癌胚抗原(CEA)及 CA125 均为目前临床常用的肿瘤标志物,但因其灵敏度和组织脏器特异度通常低于 25%,因此并非是诊断乳腺癌和疾病复发、转移的确切指标^[6-8]。所以,探索一种或多种更为确切有效的乳腺癌特异性标志物对提高疾病的准确率及转移判断显得尤为重要。人乳腺球蛋白是经 93 个氨基酸序列组合而成,其基因处于染色体 11q13。既往有研究指出,人乳腺球蛋白有理想的乳腺癌组织特异度,可作为诊断乳腺癌的重要指标^[9]。

本研究采用 RT-PCR 和免疫组织化学法对乳腺癌组织、癌旁正常组织及乳腺良性病变组织中人乳腺球蛋白及其 mRNA 表达情况进行检测发现,A 组人乳腺球蛋白阳性率明显高于 B、C 组,并且其 mRNA 表达水平也明显高于 B、C 组;但 B 组与 C 组及其 mRNA 表达水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),与文献[10-11]研究报道吻合。本研究结果表明,人乳腺球蛋白及其 mRNA 在乳腺癌组织中表达较高,在癌旁正常组织的表达较低,而在乳腺良性病变组织中并无表达。此外,本研究发现,乳腺癌组织

中人乳腺球蛋白的表达与组织学分级、淋巴结转移及 ER 均密切相关,其中组织学分级为 II~III 级、发生腋窝淋巴结转移及 ER 阳性者人乳腺球蛋白的阳性率明显高于组织学分级为 I 级、无淋巴结转移及 ER 阴性者,与文献[12]报道一致;而人乳腺球蛋白阳性率与病理类型、TNM 分期、肿瘤大小及 PR 均无明显相关性。多因素 Logistic 回归分析发现,乳腺癌组织中人乳腺球蛋白的表达与组织学分级、PR 及 ER 均存在明显关系。本研究结果表明,组织学分级、PR 及 ER 可能是人乳腺球蛋白表达的影响因素,可进一步推断人乳腺球蛋白可能在乳腺癌的发生、发展过程中发挥一定作用,并且随着其表达水平升高,肿瘤分化程度加重,进而导致其恶性程度升高、肿瘤侵袭性提高。所以,人乳腺球蛋白可能是评估乳腺癌肿瘤侵袭能力及恶性程度的重要指标。

目前,有关人乳腺球蛋白的表达水平与乳腺癌 ER、PR 相关性的看法尚未明确,但有研究指出,乳腺癌组织中人乳腺球蛋白的阳性率与 ER 并无明显关系,而与 PR 存在明显关系^[13]。另有研究指出,乳腺癌组织中人乳腺球蛋白的阳性率与 ER 存在明显关系,而与 PR 并无明显关系^[14-15]。本研究结果表明,人乳腺球蛋白阳性率与 ER 密切相关,而与 PR 阳性与否并无明显关系;进一步采用多因素 Logistic 回归分析发现,乳腺癌组织中人乳腺球蛋白的表达与 PR 及 ER 均存在明显关系。与上述研究存在争议的原因可能因 χ^2 检验是独立样本量百分率的基因,并不会受混杂因素的影响;而 Logistic 回归分析作为多变量分析方法之一,是分析二分类观察结果与某些因素间的关系,所以其受混杂因素的干扰较大。并且,雌二醇作为孕酮受体合成的启动因素,PR 需在 ER 存在时才能起到一定作用。所以,单独 PR 阳性表达可能对人乳腺球蛋白表达的影响较小,故二者并未存在密切联系。但 PR 与 ER 同时呈阳性表达时可能起到彼此协同作用而使人乳腺球蛋白表达水平升高、阳性率升高,但有关具体影响机制尚未定论,仍需今后进一步探讨。

综上所述,人乳腺球蛋白在乳腺癌组织中呈高表达,并且其与组织学分级、PR 及 ER 密切相关,其可能参与乳腺癌的发病过程,可作为评估患者肿瘤侵袭能力及恶性程度的重要指标。

参考文献

[1] LAPEIRE L, DENYS H, COCQUYT V, et al. When fat becomes an ally of the enemy: adipose tissue as collaborator in human breast cancer[J]. Horm Mol Biol Clin Invest, 2015, 23(1): 21-38.
 [2] 侯永强, 刘金彪, 王新征, 等. 人乳腺球蛋白在乳腺癌中的表达及临床意义[J]. 实用医学杂志, 2012, 28(9): 1572-1573.

MM 血液透析患者生存状况的危险因素,但其并未将 ISS 分析、化疗方案、化疗疗效等指标纳入其中^[12]。本研究 MM 中 90.6% (58/64) 的患者血液透析时血管通路为导管,而多因素分析显示,血管通路为导管是影响 MM 血液透析患者生存状况的危险因素,与文献^[13]报道结果一致。因此,改善血液透析时血管通路可以降低患者的死亡风险。

综上所述,MM 血液透析患者与非 MM 血液透析患者比较,血红蛋白水平较低,血钙水平较高,血小板水平较低,合并糖尿病史患者例数较少,合并肺部感染患者例数较多;年龄 ≥ 65 岁、血管通路为导管、血小板 < 100 × 10⁹ /L、清蛋白 < 30 g/L、化疗疗效未达 PR 为影响 MM 血液透析患者生存状况的危险因素,对其预后有一定预测价值。

参考文献

[1] 卢静,侯健,张春阳,等. 硼替佐米再治疗多发性骨髓瘤 76 例疗效及安全性分析[J]. 中华血液学杂志, 2013, 34(4): 309-312.

[2] 黄艳,马付坚,黄枝宁,等. 多发性骨髓瘤骨病 89 例临床分析[J]. 重庆医学, 2013, 42(22): 2651-2652.

[3] 中国医师协会血液科医师分会,中华医学会血液学分会,中国多发性骨髓瘤工作组. 中国多发性骨髓瘤诊治指南(2013 年修订)[J]. 中华内科杂志, 2013, 52(9): 791-795.

[4] 咸伟,申捷,王素娟,等. 多发性骨髓瘤肾病并发慢性肾功能衰竭行连续性血液滤过的治疗观察[J]. 中国医药科学, 2013, 3(17): 69-71.

[5] ANDERSON K C, ALSINA M, ATANACKOVIC D, et al. Multiple myeloma, version 2. 2016: clinical practice

guidelines in oncology[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2015, 13(11): 1398-1435.

[6] 张莉,张萍,陈江华. 多发性骨髓瘤血液透析患者的临床特点及预后分析[J]. 中华医学杂志, 2017, 97(8): 592-597.

[7] 张丹荔. 多发性骨髓瘤肾损害治疗的研究进展[J]. 国际输血及血液学杂志, 2013, 36(5): 448-452.

[8] 朱晶晶,陈海飞. 多发性骨髓瘤合并肾功能损害的诊断及治疗[J]. 国际输血及血液学杂志, 2016, 39(6): 530-538.

[9] 梁贻隍,任汉云,岑溪南,等. 硼替佐米为基础的化疗方案治疗多发性骨髓瘤患者的疗效及预后因素分析[J]. 中华血液学杂志, 2014, 35(3): 225-230.

[10] TSAKIRIS D J, STEL V S, FINNE P, et al. Incidence and outcome of patients starting renal replacement therapy for end-stage renal disease due to multiple myeloma or light-chain deposit disease: an ERA-EDTA Registry study[J]. Nephrol Dial Transplant, 2010, 25(4): 1200-1206.

[11] MURPHY P T, BALDEO C, O'KELLY P, et al. Dialysis-dependent renal failure at diagnosis continues to be associated with very poor outcome in multiple myeloma[J]. Br J Haematol, 2014, 165(6): 890-891.

[12] REULE S, SEXTON D J, SOLID C A, et al. ESRD due to Multiple Myeloma in the United States, 2001-2010[J]. J Am Soc Nephrol, 2016, 27(5): 1487-1494.

[13] 张津京,李艳. 初诊多发性骨髓瘤合并肾功能不全患者的临床特点和疗效分析[J]. 中国医科大学学报, 2016, 45(6): 494-498.

(收稿日期: 2017-10-12 修回日期: 2018-01-30)

(上接第 1791 页)

[3] 何子平,陈琼驹,欧阳思旗,等. 乳腺癌患者中乳腺球蛋白的表达及其临床意义[J]. 中国当代医药, 2013, 20(14): 79-80.

[4] COLDITZ G A, BOHLKE K, BERKEY C S. Breast cancer risk accumulation starts early; prevention must also [J]. Breast Cancer Res Treat, 2014, 145(3): 567-579.

[5] 胡园园,陈旭,刘佩佩,等. 乳腺球蛋白在乳腺癌中的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2017, 25(17): 2836-2839.

[6] 许建华. 乳腺癌前哨淋巴结中 hMAM mRNA 的检测及其临床意义[J]. 中国普通外科杂志, 2012, 21(11): 1456-1458.

[7] AZAB B N, BHATT V R, VONFROLIO S, et al. Value of the pretreatment albumin to globulin ratio in predicting long-term mortality in breast cancer patients[J]. Am J Surg, 2013, 206(5): 764-770.

[8] ROSE D P, GRACHECK P J, VONA-DAVIS L. The interactions of obesity, inflammation and insulin resistance in breast cancer[J]. Cancers (Basel), 2015, 7(4): 2147-2168.

[9] SAMAVAT H, KURZER M S. Estrogen metabolism and breast cancer[J]. Cancer Lett, 2015, 356(2): 231-243.

[10] 左思,杨伟萍,韦长元,等. 细胞角蛋白 19 和人乳腺球蛋白在乳腺癌阴性前哨淋巴结中的表达及临床意义[J]. 实用老年医学, 2012, 26(3): 242-244.

[11] 侯永强,刘金彪,王新征,等. 人乳腺球蛋白及 Ki-67 在乳腺癌中的表达及临床意义[J]. 河南科技大学学报(医学版), 2012, 30(1): 15-17.

[12] CHANG Y W, SINGH K P. Long-term exposure to estrogen enhances chemotherapeutic efficacy potentially through epigenetic mechanism in human breast cancer cells[J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0174227.

[13] 黄英,刘新兰,厚玉瑾,等. hMAM, VEGF-C 和 VEGF-D 在乳腺癌原发灶及腋淋巴结中的表达[J]. 广东医学, 2016, 37(1): 117-119.

[14] 何凡,阮剑,宁晓洁,等. RT-PCR 检测人乳腺球蛋白在乳腺癌 SLN 微转移灶检出率及假阴性作用分析[J]. 实用临床医药杂志, 2017, 21(11): 90-93.

[15] ROSE D P, VONA-DAVIS L. Biochemical and molecular mechanisms for the association between obesity, chronic inflammation, and breast cancer[J]. Biofactors, 2014, 40(1): 1-12.

(收稿日期: 2017-10-24 修回日期: 2018-01-26)