

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.24.007

术前中性粒细胞与淋巴细胞比值对乳腺肿瘤的预测价值及其与 Beclin1 的关系*

宦宇¹, 蔡徐山^{1△}, 焦家军², 张春利¹

(上海市嘉定区妇幼保健院:1. 检验科;2. 乳腺科 201821)

摘要:目的 分析术前外周血中性粒细胞与淋巴细胞计数比值(NLR)在乳腺肿瘤预测中的价值,探讨 NLR 与自噬相关基因 Beclin1 在乳腺癌中的关系。**方法** 回顾性分析 2016 年 1 月至 2017 年 8 月在该院接受手术治疗的 126 例原发性浸润性乳腺癌患者术前 NLR,分析 NLR 与不同临床病理特征的关系;以及反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 Beclin1 mRNA 的表达,初步探讨 Beclin1 与 NLR 的相关性。**结果** 乳腺癌组 NLR 明显高于乳腺良性肿瘤组,两组差异有统计学意义($P < 0.05$);NLR 在年龄、有无淋巴结转移、Ki67 表达率分组中差异有统计学意义($P < 0.05$),而在肿瘤直径大小、病理分级、雌激素受体、孕激素受体、人表皮生长因子受体 2 等其他临床病理特征中差异无统计学意义($P > 0.05$);RT-PCR 检测 Beclin1 mRNA 结果显示,肿瘤组织表达量明显低于癌旁组织;根据 Beclin1 mRNA 表达差异分组分析发现,Beclin1 mRNA 表达下调组 NLR 较高,与未下调组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** NLR 在乳腺肿瘤预测中有一定价值,炎症反应、自噬、肿瘤三者之间可能存在相互促进关系。

关键词:乳腺肿瘤; 中性粒细胞与淋巴细胞比值; 细胞自噬; Beclin1

中图分类号:R446.1;R737.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)24-3667-04

The Predictive value of preoperative neutrophil-to-lymphocyte ratio for breast cancer and its relationship with Beclin1*

HUAN Yu¹, CAI Xushan^{1△}, JIAO Jiajun², ZHANG Chunli¹

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Galactophore, Maternal and Child Health Hospital of Jiading District, Shanghai 201821, China)

Abstract: Objective To analyze the value of preoperative ratio of peripheral blood neutrophil to lymphocyte count (NLR) in predicting breast cancer, and to explore the relationship between NLR and autophagy-related gene Beclin1 in breast cancer. **Methods** The preoperative NLR values of 126 patients with primary invasive breast cancer treated in the hospital from January 2016 to August 2017 were retrospectively analyzed. The relationship between NLR and different clinicopathological features was analyzed. The expression of Beclin1 was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and the correlation between Beclin1 and NLR was preliminarily discussed. **Results** The NLR value of the breast cancer group was significantly higher than that of the benign group. There was a statistically significant difference between the two groups ($P < 0.05$). There was a statistically significant difference in the NLR values with age, lymph node metastasis, and Ki67 expression rates ($P < 0.05$). There was no significant difference with other clinicopathological features such as tumor diameter, pathological grade, estrogen receptor, progesterone receptor and CER-2 ($P > 0.05$). RT-PCR showed that the expression of Beclin1 in cancer group was significantly lower than that in adjacent group. According to the differential grouping analysis of Beclin1 expression, the NLR in the down-regulated Beclin1 expression group was higher than that in the adjacent group, and the difference between the two groups was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** NLR has a certain value in the prediction of breast tumors, and there is a mutually promoting relationship among inflammation, autophagy, and tumor.

Key words: breast neoplasm, neutrophil-lymphocyte ratio; cell autophagy; Beclin1

炎症反应与多种肿瘤相关,肿瘤的微环境在肿瘤进展中起重要作用,可促进肿瘤细胞增殖与转移。中

性粒细胞与淋巴细胞计数比值(NLR)已成为全身炎症反应简单且有效的指标。有研究证明,NLR增高

* 基金项目:上海市嘉定区卫生和计划生育委员会科研基金资助项目(QNKYJJ 2015-QN-04)。

作者简介:宦宇,女,主管技师,主要从事临床分子检验和微生物检验方面的研究。△ 通信作者,E-mail:cai139149@126.com。

在乳腺癌中可作为预后不良的独立危险因素^[1],且对乳腺癌复发和转移有预测价值^[2]。Beclin1 是形成自噬体的必须分子,可介导自噬相关蛋白定位于吞噬泡,并与多种蛋白反应调控自噬体形成与成熟。而自噬功能缺乏可刺激炎症小体形成,适度自噬可抑制炎症反应^[3]。本研究探讨外周血 NLR 与乳腺癌临床病理特征之间、自噬相关基因在乳腺癌中的表达情况,以及二者之间的关系。从而评估 NLR 对乳腺肿瘤的预测价值,同时试图对炎症反应、自噬、肿瘤三者之间的关系做简单解释。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 1 月至 2017 年 8 月在本院接受手术治疗,且经病理科证实为原发性浸润性乳腺癌的患者共 126 例作为乳腺癌组,均为女性,年龄 33~69 岁,中位年龄 56 岁,所有病例手术前均未做过任何化疗、放疗及生物治疗。另选取同期病理检查均为纤维腺瘤的良性乳腺肿瘤患者 102 例作为乳腺良性肿瘤组,乳腺良性肿瘤组病例也均为女性,年龄 31~67 岁,中位年龄 52 岁。乳腺癌肿瘤组织为术中取得,同时选取距离病灶位置至少 3 cm 处的癌旁组织进行比较,所有组织标本均置于 RNALater 保存液中-80 °C 冰箱保存。所有患者的临床资料,如肿瘤块大小、肿瘤级别、淋巴结入侵情况、雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、人表皮生长因子受体 2(HER2)的表达等均来自本院病理科。排除标准:70 岁以上患者;术前感冒或其他可影响血常规计数结果的疾病患者。

1.2 仪器与试剂 全自动血细胞分析仪 MEK-8222k 极其配套试剂(日本光电公司),荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪(ABI 7300),反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒(TAKARA 公司),RNALater(QIAGEN 公司),Tizol 试剂。

1.3 方法

1.3.1 血标本采集与处理 患者于术前 2 d 内采集晨起空腹外周静脉血 2 mL,乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝。采血当天无发热等临床感染征象。检测白细胞、中性粒细胞及淋巴细胞计数,外周血 NLR 由中性粒细胞计数/淋巴细胞计数获得,检测在 2 h 内完成。

1.3.2 RT-PCR 分析 按 Tizol 试剂说明书步骤提取组织总 RNA。Beclin1、GAPDH 引物均由上海英淮捷基公司合成。Beclin1 上游引物序列为 5'-GGC TGA GAG ACT GGA TCA GG-3',下游引物序列为 5'-CTG CGT CTG GGC ATA ACG-3',产物长度为 364 bp。GAPDH 上游引物序列为 5'-ACT TTG GTA TCG TGG AAG GAC TCA T-3',下游引物序列为 5'-GTT TTT CTA GAC GGC AGG TCA GG-3',产物长度为 255 bp。反转录扩增条件:37 °C 15 min;85 °C 5 s;4 °C 1 min。PCR 扩增条件:94 °C 5

min;94 °C 30 s,58 °C 45 s,70 °C 50 s,循环 40 次;70 °C 5 min。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外周血 NLR 与乳腺良、恶性肿瘤的关系 乳腺良性肿瘤组 NLR 为 1.22 ± 0.29 ,乳腺癌组为 2.10 ± 0.78 ,两组差异有统计学意义($t = 11.72, P < 0.05$)。

2.2 乳腺癌组术前外周血 NLR 与临床病理特征的关系 见表 1。不同年龄分组中 NLR 差异有统计学意义($P < 0.05$);无淋巴结转移患者 NLR 明显低于有淋巴结转移患者,差异有统计学意义($P < 0.05$);Ki67 表达率大于或等于 20% 的患者 NLR 明显高于表达率低于 20% 的患者,差异有统计学意义($P < 0.05$);而肿瘤直径、病理分级、ER、PR、HER-2 等临床病理特征分组中 NLR 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 乳腺癌组术前外周血 NLR 与临床病理特征的关系

病理特征	<i>n</i>	NLR($\bar{x} \pm s$)	<i>t</i>	<i>P</i>
年龄(岁)			2.423	0.017
≤45	31	2.39±0.92		
>45	95	2.01±0.70		
病理分级			-0.21	0.834
I~II	101	2.14±0.86		
III	25	2.10±0.75		
肿瘤直径(cm)			-1.029	0.306
≤2	73	2.18±0.84		
>2	53	2.07±0.69		
淋巴结转移			3.709	<0.001
无	98	1.97±0.62		
有	28	2.53±0.81		
ER			0.123	0.902
阴性	53	2.10±0.73		
阳性	73	2.08±0.84		
PR			-0.876	0.383
阴性	34	1.99±0.65		
阳性	92	2.13±0.84		
HER-2			-0.743	0.459
阴性	46	1.99±0.77		
阳性	80	2.11±0.81		
Ki67(%)			-3.267	0.001
<20	32	1.71±0.50		
≥20	94	2.23±0.85		

2.3 乳腺癌组织和癌旁组织中 Beclin1 mRNA 的表达 随机挑选 20 例乳腺癌组织和与其对应的癌旁组织,采用 RT-PCR 检测组织中 Beclin1 mRNA 表达水平。图 1 所示,乳腺癌组织中 Beclin1 mRNA 表达水平平均为 1.35 ± 0.96 ,而癌旁组织平均为 3.17 ± 1.59 ,两组差异有统计学意义($P < 0.05$)。在 80% (16/20) 的标本中发现,Beclin1 在乳腺癌组织标本中表达下调,另有 20% (4/20) 的标本中未发现 Beclin1 在乳腺癌组织中表达下调。

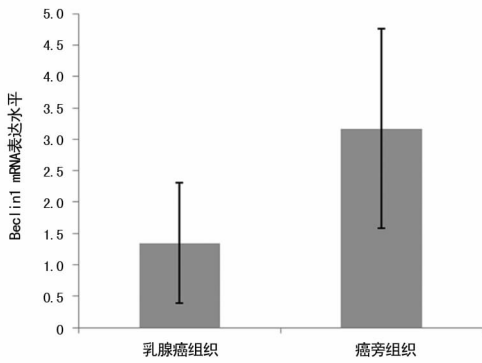


图 1 乳腺癌和癌旁组织标本中 Beclin1 mRNA 表达水平

2.4 Beclin1 mRNA 的表达和外周血 NLR 的关系

根据肿瘤组织和癌旁组织 Beclin1 mRNA 表达水平差异情况,将上述 20 例患者标本分为 Beclin1 mRNA 表达下调组和未下调组,结果显示,Beclin1 mRNA 下调组外周血 NLR 为 3.15 ± 1.54 ,未下调组为 1.07 ± 0.19 ,两组差异有统计学意义 ($t = -3.714, P < 0.05$)。

3 讨论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,近年其发病率已位居我国女性恶性肿瘤的首位,且逐年递增^[4-6]。近年研究发现,NLR 与多种实体肿瘤的预后相关,可能原因是升高的 NLR 与炎症反应相关^[7-10]。NLR 在临床中有获取简便,不额外增加检测费用,临床可操作性强等优点。细胞自噬是不同于凋亡且不依赖于 caspase 的一种程序性细胞死亡,它作为程序性细胞死亡的另一种形式,近年来受到广泛关注。第一个哺乳动物自噬基因是 Beclin1,它是哺乳动物参与自噬的特异性基因,广泛存在于人类正常组织中。

本研究发现,术前外周血乳腺癌组较乳腺良性肿瘤组 NLR 明显升高,提示 NLR 有助于判断乳腺良、恶性病变。NLR 所受干扰因素较多,如感冒、高血压、肾脏疾病、糖尿病、高胆固醇等,甚至吸烟、饮食、饮酒等生活习惯也会干扰其检测结果,所以目前 NLR 用于乳腺肿瘤良、恶性判断的临界值尚很难确定,临床工作中仍然最终需要病理活检作为诊断的金标准。但本研究结果提示,NLR 可作为判断乳腺肿瘤良、恶性病变的一项参考指标。

詹妍等^[1]研究发现,NLR 与淋巴结转移数目、TNM 分期及 ER、PR、HER2 相关,与年龄等因素无关;胡赞宏等^[2]研究发现,NLR 仅与淋巴结转移数目相关,与其他临床病理因素均无关。本研究结果显示,NLR 在年龄大小、有无淋巴结转移、Ki67 表达率高低患者间有明显差异。但未发现与其他乳腺癌相关临床特征相关,这可能是由于 NLR 受病理生理因素影响较大,不同的研究者统计分析结果存在差异,所以还需更大标本量的研究予以证实。另有研究发

现,NLR 可能与乳腺癌不同的分子分型相关^[11],这一结果为进一步研究提供了思路 and 方向。

有学者采用免疫组织化学法分析乳腺癌细胞系和乳腺癌及其与之对应的正常乳腺组织。Beclin1 免疫活性在正常乳腺上皮细胞中强烈表达,而乳腺癌组织中的表达水平却明显下降。本研究采用 RT-PCR 检测 Beclin1 mRNA 的表达水平,结果显示,Beclin1 mRNA 在乳腺癌组织的表达低于癌旁组织,与文献^[12-13]报道一致。

有研究发现,炎症反应介质中的活性氧细胞因子及炎症反应相关转录因子可调控自噬反应,而自噬反应又可通过 TLR、NLR 等信号通路来调节炎症反应,并且自噬反应是诱发炎症反应性疾病的重要因素^[14]。对于信号、转导通路及调节自噬体形成和成熟过程的相关信号通路的分子机制和功能研究表明,I 型磷酸肌醇 3-激酶-蛋白激酶 B 信号转导通路和腺苷酸活化蛋白激酶信号通路都可调节自噬反应的过程,换句话说自噬反应与癌症的发生和发展有关^[15]。本研究为了初步探讨炎症反应、自噬、肿瘤三者之间的关系,根据 Beclin1 mRNA 的表达下调情况将肿瘤患者进行分组分析发现,Beclin1 mRNA 表达下调组外周血 NLR 与未下调组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。但由于本研究标本量有限,且缺少相关机制研究,炎症反应、自噬反应、肿瘤三者之间的关系是否确实如本研究结果所示,还有待进一步验证。

参考文献

- [1] 詹妍,王博文,周福祥,等. 中性粒细胞/淋巴细胞比值在乳腺癌预后评估中的应用[J]. 武汉大学学报(医学版), 2013,34(3):391-394.
- [2] 胡赞宏,王铮元,崔嵘嵘,等. 中性粒细胞/淋巴细胞比值与血小板/淋巴细胞比值对乳腺癌复发转移的预测价值及乳腺癌预后影响因素研究[J]. 中国全科医学,2016,19(30):3657-3661.
- [3] BATTU S, AFROZ S, GIDDALURU J, et al. Amino acid starvation sensing dampens IL-1 β production by activating ribo-clustering and autophagy[J]. PLoS Biol, 2018, 16(4):e2005317.
- [4] FAN L, STRASSER-WEIPPL K, LI J J, et al. Breast cancer in China[J]. Lancet Oncol, 2014, 15(7):279-289.
- [5] 赵惠柳,罗元,黄蕾,等. 人附睾分泌蛋白 4 联合糖类抗原 153 在乳腺癌诊断中的临床意义及价值分析[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(15):2275-2277.
- [6] 张慧,赵瑞珂,顾国浩,等. 人乳腺癌患者部分外周血生化指标的变化及其意义[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(15):2153-2155.
- [7] LU X, WANG S, ZHANG G, et al. High Neutrophil-to-Lymphocyte ratio is a significant predictor of cardiovascular and All-Cause mortality in patients undergoing peritoneal dialysis[J]. Kidney Blood Press Res, 2018, 43(2): 490-499.

相关指标,这是本研究的不足之处。

3.3 减轻胰岛素抵抗及减少尿蛋白 早期研究发现,ADMA 升高伴随胰岛素抵抗发生,而胰岛素抵抗是糖尿病和高血压的共同发病基础^[10]。本研究发现,通过利格列汀干预治疗后,大鼠体质量明显下降,胰岛素抵抗明显改善,血糖得到较好控制。本研究推测,除 DPP4 抑制剂本身通过肠促胰岛素途径降低血糖外,利格列汀也可通过对 PRMT1-ADMA-DDAH1 轴的影响,改善胰岛素抵抗,从而改善血糖水平。另外,DPP4 抑制剂还有降低 DN 患者尿蛋白及改善肾脏功能的作用^[11]。本研究结果提示,利格列汀单药治疗 12 周后可明显减少糖尿病大鼠 24 h mALB、ACR 及血 Cr 水平。作者推测,血糖降低本身可从一定程度上改善肾功能和蛋白尿,但利格列汀除降糖机制的降尿蛋白作用外,还对肾功能起到一定保护作用。

综上所述,利格列汀可以通过对糖尿病大鼠肾脏中 PRMT1 表达的影响,起到改善氧化应激、抑制血管增生、改善肾脏血流动力学、缓解胰岛素抵抗和减少尿蛋白等作用,在一定程度上延缓和改善了 DN 的发生和发展。

参考文献

[1] THAHA M, NILAMSARI W P, YUSUF M, et al. Profile of PRMT-1 gene polymorphism in hemodialysis patients with increased ADMA levels [J]. *Acta Med Indones*, 2014, 46(2):97-103.

[2] POPE A J, KARUPPIAH K, CARDOUNEL A J. Role of the PRMT-DDAH-ADMA axis in the regulation of endothelial nitric oxide production[J]. *Pharmacol Res*, 2009, 60(6):461-465.

[3] 王楠楠,刘东方,林海玲,等. PRMT1-ADMA-DDAH1 代谢轴在糖尿病大鼠胰腺中的表达及普罗布考的干预影响[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(23):2497-2502.

[4] CHEN Y, XU X, SHENG M, et al. PRMT-1 and DDAHs-

induced ADMA upregulation is involved in ROS- and RAS-mediated diabetic retinopathy [J]. *Exp Eye Res*, 2009, 89(6):1028-1034.

[5] 梅希,刘东方,王楠楠,等. 替米沙坦对 2 型糖尿病大鼠肾脏 PRMT1-ADMA-DDAH1 表达的影响[J]. *中国糖尿病杂志*, 2012, 20(6):461-465.

[6] ALAM M A, CHOWDHURY M R H, JAIN P, et al. DPP-4 inhibitor sitagliptin prevents inflammation and oxidative stress of heart and kidney in two kidney and one clip (2K1C) rats[J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2015, 7(1):107-112.

[7] GAULT V A, LENNOX R, FLATT P R. Sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, improves recognition memory, oxidative stress and hippocampal neurogenesis and upregulates key genes involved in cognitive decline [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2015, 17(4):403-413.

[8] HU Y, LIU H, SIMPSON R W, et al. GLP-1-dependent and independent effects and molecular mechanisms of a dipeptidyl peptidase 4 inhibitor in vascular endothelial cells[J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(3):2273-2279.

[9] WANG D, ZHANG G, CHEN X, et al. Sitagliptin ameliorates diabetic nephropathy by blocking TGF-β1/Smad signaling pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(5):2784-2792.

[10] ZSUGA J, GESZTELYI R, TÖRÖK J, et al. Asymmetric dimethylarginine, a molecule responsible for the coexistence of insulin resistance and atherosclerosis via dual nitric oxide synthase inhibition[J]. *Med Hypotheses*, 2005, 65(6):1091-1098.

[11] GLORIE L L, VERHULST A, MATHEEUSSEN V, et al. DPP4 inhibition improves functional outcome after renal ischemia-reperfusion injury[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012, 303(5):F681-F688.

(收稿日期:2018-05-25 修回日期:2018-09-02)

(上接第 3669 页)

[8] 张兴,李森,郭忠武,等. 75 岁以上老年胃癌患者术前外周血中性粒细胞与淋巴细胞比值的临床意义[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2016, 19(5):526-529.

[9] 秦川,杜智勇,申忠华,等. 术前外周血中性粒细胞与淋巴细胞比值评估高级别 T1 期膀胱癌预后的临床价值[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2016, 37(9):685-689.

[10] 江慧洪,王晖,李阿建,等. 中性粒细胞/淋巴细胞比值对局部进展期结直肠癌患者预后的影响[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2017, 20(5):550-554.

[11] YAO M, LIU Y, JIN H, et al. Prognostic value of preoperative inflammatory markers in Chinese patients with breast cancer[J]. *Onco Targets Ther*, 2014, 7(36):1743-1752.

[12] MARONI P, MATTEUCCI E, BENDINELLI P A. Functions and epigenetic regulation of Wwox in bone metastasis from breast carcinoma: comparison with primary tumors[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(1):75-79.

[13] ZHANG F, WANG B, LONG H, et al. Decreased miR-124-3p expression prompted breast cancer cell progression mainly by targeting beclin-1 [J]. *Clin Lab*, 2016, 62(6):1139-1145.

[14] 陈华玲,马晓晴,袁圣亮. 自噬与炎症的关系研究进展[J]. *山东医药*, 2016, 56(23):100-102.

[15] 王梅,李庆林. 自噬与癌症的治疗[J]. *安徽医药*, 2010, 14(8):869-874.

(收稿日期:2018-05-23 修回日期:2018-08-28)