

异黏蛋白在复发转移性乳腺癌表达及其临床意义的研究

靳鹏¹, 谢晓冬¹, 刘兆喆¹, 宋福林²

辽宁医学院 研究生院校外联合培养基地沈阳军区总医院, 辽宁沈阳 110840 ¹肿瘤科; ²病理科

摘要: **目的** 探讨异黏蛋白 (metadherin, MTDH) 基因在复发转移乳腺癌患者的表达。**方法** 采用细胞免疫化学方法检测乳腺癌 MCF-7、SK-BR3、MDA-MB-231 细胞系 MTDH 基因的表达情况, 免疫组化方法检测 60 例乳腺癌患者术后石蜡组织标本中 MTDH 基因的表达情况。**结果** MTDH 在乳腺癌细胞株中主要表达于细胞膜及细胞浆中, MTDH 基因在复发转移乳腺癌患者中阳性率为 73.8%, 而原发乳腺癌患者为 38.9% ($P < 0.05$)。MTDH 基因的表达情况与肿瘤的临床分期 ($P=0.010$)、转移部位 ($P=0.003$)、疾病进展时间 (time to progression, TTP) ($P=0.002$)、Ki67 ($P=0.029$)、P53 ($P=0.022$) 以及组织分型 ($P=0.023$) 有明显的相关性。但与年龄 ($P=0.970$)、原发淋巴结转移 ($P=0.694$)、HER-2 ($P=0.282$)、ER ($P=0.056$)、PR ($P=0.428$) 等无明显相关性。**结论** MTDH 基因有望成为乳腺癌患者重要的独立预后因子。

关键词: 乳腺癌; MTDH; 免疫组化; 预后

中图分类号: R 737.9 文献标志码: A 文章编号: 2095-5227(2013)02-0133-04 DOI: 10.3969/j.issn.2095-5227.2013.02.012

网络出版时间: 2012-09-29 09:01 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3275.R.20120929.0901.001.html>

Expression of metadherin gene in metastatic breast cancer and its clinical significance

JIN Peng¹, XIE Xiao-dong¹, LIU Zhao-zhe¹, SONG Fu-lin²

¹Department of Oncology; ²Department of Pathology General Hospital of Shenyang Military Area Command-United Training Base of Graduate School of Liaoning Medical University, Shenyang 110840, Liaoning Province, China

Corresponding author: XIE Xiao-dong. Email: xiexiaodong@csc.org.cn; SONG Fu-lin

Abstract: Objective To study the expression of metadherin(MTDH) in patients with metastatic breast cancer. **Methods** Expressions of human breast cancer cell lines MCF-7, SK-BR3 and MDA-MB-231 of MTDH gene were detected with cellular immunochemical method. Expression of MTDH gene was detected in paraffin samples from 60 metastatic breast cancer patients with immunohistochemical method. **Results** The MTDH gene was mainly expressed in cell membrane or cytoplasm of human breast cancer cell lines. The positive MTDH gene expression rate was significantly higher in metastatic breast cancer patients than in primary breast cancer patients(73.8% vs 38.9%, $P < 0.05$). The expression of MTDH gene was significantly related with the clinical stage, metastatic site, progress time, Ki67, P53 and histological type of breast cancer($P < 0.05$), but not related with the age, primary lymph node metastasis, HER-2, ER, and PR($P > 0.05$). **Conclusion** MTDH gene can be expected to become an independent factor for the prognosis of breast cancer patients **Key words:** breast cancer; metadherin; immunohistochemistry; prognosis

探讨乳腺癌复发转移的机制, 对降低乳腺癌患者死亡率具有重要意义。异黏蛋白 (metadherin, MTDH) 是近年来发现的癌基因。MTDH 基因可激活多条经典的信号转导通路, 如 Ha-ras, PI3K/Akt, NF- κ B, Wnt/ β -catenin^[1]; 并且能够改变 c-Myc、Ha-ras 等相关基因的表达水平。MTDH 基因的表达可能与乳腺癌的复发转移、血管生成、肿瘤细胞的增殖、凋亡、耐药等有密切的相关性。本研究旨在进一步明确该基因在复发转移乳腺癌患者的表达及临床意义。

材料和方法

1 标本来源 本研究选取样本 60 例, 均来自沈阳军区总医院肿瘤科 2006 年 1 月 -2012 年 1 月收治的乳腺癌患者。其中 42 例为复发转移患者, 18 例为原发乳腺癌患者。均为女性, 中位年龄 56(27~69) 岁, 均经过手术治疗与化学治疗, 部分患者接受局部放射治疗。本研究组织样本来自于沈阳军区总医院病理科乳腺癌患者手术存档组织标本, 所选组织标本均经病理确认。

2 试剂及设备 乳腺癌细胞株 MCF-7、SK-BR3、MDA-MB-231 细胞株购自中科院上海细胞研究所; 改良 RPMI-1640 培养基购自 Hyclone 公司; 即用型兔抗人 MTDH 单克隆抗体购自美国 Invitrogen 公司, 兔抗人雌激素受体蛋白 (estrogen receptor, ER)、孕酮受体 (progesterone receptor, PR)、HER-2 单克隆抗体,

收稿日期: 2012-06-25 修回日期: 2012-08-02

基金项目: 辽宁省自然科学基金项目 (20082070)

Supported by Liaoning natural science fund aids a project financially

作者简介: 靳鹏, 男, 医师, 硕士。Email: jingpeng1027@163.com

通信作者: 谢晓冬, 男, 主任医师, 教授。Email: xiexiaodong@csc.org.cn

宋福林, 男, 主任医师。

羊抗兔二抗试剂盒, SP 试剂盒, DAB 显色试剂盒等均购自北京中山金桥生物技术公司。连续切片机(德国 Leica); 微波炉(格兰仕); 水浴箱(德国 Leica); 恒温箱德国(德国 Leica); 电冰箱(4℃)(中国海尔); 数码相机(日本 Nikon); 光学显微镜(日本 Olympus)。

3 细胞培养及细胞免疫化学 乳腺癌 MCF-7、SK-BR3、MDA-MB-231 细胞株在含有 10% 胎牛血清及青霉素、链霉素的 RPMI-1640 培养基中常规培养, 在 37℃ 含 25% CO₂ 条件下培养, 细胞贴壁生长, 约 70%~80% 的细胞发生融合时, 使用含有 0.25% 胰酶和 0.02% 的 EDTA 消化液进行消化传代。细胞免疫化学检测中, 分别将每种细胞系分为 2 组, 每组包含阴性对照组及实验组, 对照组使用 PBS 缓冲液进行孵育, 实验组加入 MTDH、ER、PR 及 HER-2 抗体。收集细胞并配成细胞悬液接种至 96 孔板, 待细胞贴壁后用 0.01% 甲醛固定, 0.1% Triton X-100/PBS 破膜, 加入过氧化酶阻断液孵育, 冲洗后滴加正常非免疫动物血清孵育, 除去血清, 加入 MTDH、ER、PR 及 HER-2 抗体 25 μl(1:50 稀释), 4℃ 过夜, 次日冲洗后加入生物素标记的二抗室温孵育, 并 DAB 染色, 苏木素复染, 完成后镜下拍照。

4 免疫组化 组织切片经过脱蜡、水化、加热修复抗原、3% 过氧化氢甲醇溶液消除内源性过氧化物酶活性, 山羊血清封闭抗原, 分别依次滴加抗 MTDH、ER、PR 及 HER-2 抗体过夜(工作浓度 1:100), 生物素化二抗及 ABC 复合物, DAB 显色, 苏木素复染后封片, 光镜下观察, 以 PBS 缓冲液为阴性对照, 已知的乳腺癌阳性标本作为阳

性对照。经 DAB 染色后, 细胞核和细胞质呈棕黄色颗粒沉着。每例标本选 5 个高倍镜视野, 根据细胞质染色程度和阳性染色细胞所占的百分比进行评分。染色程度: 不着色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分; 阳性染色细胞百分比: 阳性细胞 < 25% 为 0 分, 25%~50% 为 1 分, 50%~75% 为 2 分, > 75% 为 3 分; 前两项评分结果相加后, 评分 0~1 分为阴性, > 2 分为阳性。

5 统计学方法 本研究结果使用 SPSS17.0 统计软件进行统计学分析, 多组间比较采用 χ^2 进行分析, MTDH 基因表达情况与乳腺癌患者疾病进展时间的关系采用 Kaplan-Meier 进行分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结果

1 MTDH、ER、PR 及 HER-2 在乳腺癌的表达 在细胞免疫化学检测中, 主要检测了 MTDH 基因在 MCF-7、BR3、以及 231 细胞中的表达情况, 发现 MTDH 均表达于细胞膜与细胞浆。在乳腺癌组织免疫组化检测中 MTDH 同样表达于肿瘤的细胞膜与细胞浆, 但是少部分表达于细胞核, 其阳性率为 56.3%。同时对乳腺癌患者的 ER、PR、HER-2 进行了检测, ER 在乳腺癌细胞的细胞核与细胞浆中均有表达, 阳性率为 56.7%; PR 表达位于细胞核与细胞浆, 阳性率为 43.3%; HER-2 基因表达位于细胞膜上, 阳性率为 63.3%。见图 1、表 1。

2 MTDH 与临床特征的关系 在乳腺癌的病理分型中, 浸润性导管癌 MTDH 阳性率为 63.2%, 浸润型混合癌阳性率为 71.4%, 其他组织学类型的阳

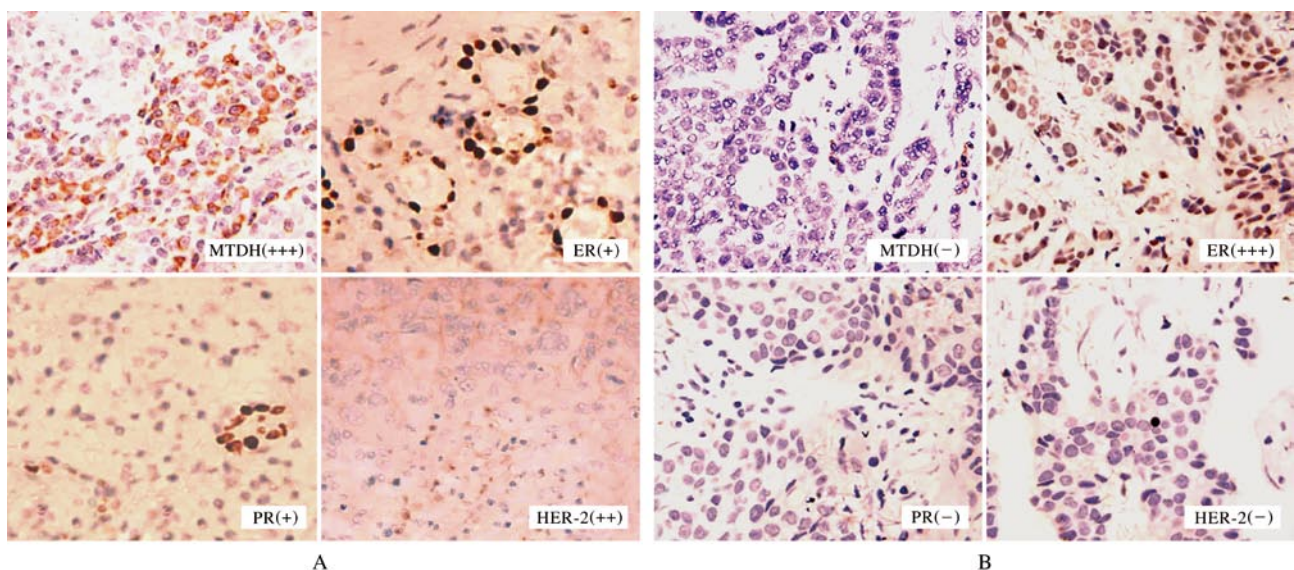


图 1 MTDH、ER、PR、HER-2 在乳腺癌细胞中的表达(×400) A: 转移性乳腺癌; B: 原发性乳腺癌

Fig.1 Expression of MTDH, ER, PR, HER-2 in metastatic breast cancer(×400) A: Metastatic breast cancer; B: Primary breast cancer

性率为 50% ($P < 0.05$)。而在复发转移的乳腺癌患者中, 浸润性导管癌占 73.7%, 浸润性混合癌占 71.4%。MTDH 的表达情况与年龄、手术前淋巴结转移情况无相关性 ($P > 0.05$)。见表 1、2。

表 1 乳腺癌患者临床资料与 MTDH 基因表达关系
Tab. 1 Relation between clinical data about breast cancer patients and MTDH expression

Characteristics	Case(n)	MTDH expression(n)		P
		Positive	Negative	
Age				0.970
< 50	22	14	8	
> 50	3	24	14	
Gread				0.010
Primary	18	7	11	
Metastasis	42	31	11	
Lymph node metastasis				0.694
0	20	11	9	
< 3	12	8	4	
> 3	28	19	9	
TTP(months)				0.002
0	18	8	10	
< 24	22	19	3	
24~60	16	11	5	
> 60	4	0	4	
Metastasis sites				0.003
Liver	16	7	9	
Bone	24	18	6	
Lymph node	18	9	9	
Lung	10	10	0	
Chest	4	0	4	

表 2 乳腺癌患者病理资料与 MTDH 基因表达关系
Tab. 2 Relation between pathologic data about breast cancer patients and MTDH expression

Characteristics	Case(n)	MTDH expression(n)		P
		Positive	Negative	
ER				0.056
Negative	26	20	6	
Positive	34	18	16	
PR				0.428
Negative	34	23	11	
Positive	26	15	11	
HER-2				0.282
Negative	22	12	10	
Positive	38	26	12	
Ki67				0.029
Negative	22	10	12	
Positive	38	28	10	
P53				0.022
Negative	24	11	13	
Positive	36	27	9	
Tissue typing				0.023
IDC	38	24	14	
Others	22	14	8	

ER: Estrogen receptor; PR: Progesterone Receptor

3 MTDH 与 ER、PR、HER-2 的关系 MTDH 表达与乳腺癌患者 ER、PR、HER-2 表达无相关性 ($P > 0.05$)。在 Ki67 以及 P53 的研究中, MTDH 表达与 Ki67 以及 P53 表达存在相关性 ($P < 0.05$)。见表 2。

4 MTDH 与复发转移及转移部位的关系 原发性乳腺癌患者 MTDH 表达率为 38.9%, 复发转移乳腺癌患者 MTDH 表达率为 73.8% ($P < 0.05$) (表 1)。统计分析示 MTDH 表达与乳腺癌发生转移的部位有相关性 ($P < 0.05$)。以肺转移最为显著, 本组 10 例乳腺癌肺转移患者均为 MTDH 高表达。患者的无病生存期 (disease-free survival, DFS) 与乳腺癌 MTDH 表达在统计学上存在相关性 ($P=0.036$)。见图 2。

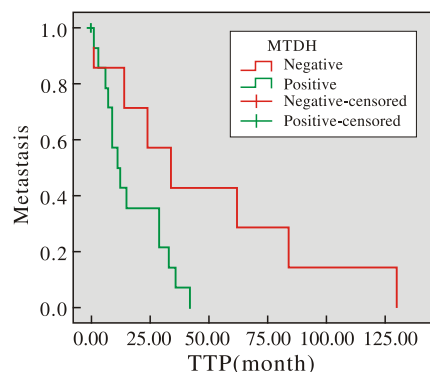


图 2 MTDH 的表达与乳腺癌患者发生复发转移时间的关系
Fig.2 Relation between MTDH expression and breast cancer metastatic time

讨论

MTDH 最早在人原始胚胎星形细胞中发现^[2], 正常组织中不表达或低表达, 肿瘤组织中高表达, 并对肿瘤的发生发展有重要作用。在小鼠体内噬菌体筛查时, 发现 MTDH 在乳腺癌的肺转移中具有重要作用^[3]。MTDH 主要定位于染色体 8q22^[4], 完整的 MTDH 基因总共 3 611bp, 含有 12 个外显子和 11 个内含子, 其中第 22 到 1 968 为其主要的表达序列。其编码产物异黏蛋白, 是一种高碱性的 Ib 性跨膜蛋白, 主要定位于 51 到 72 的氨基酸残基^[5]。

MTDH 主要表达在肿瘤细胞的胞膜及胞浆, 并通过与 NF- κ B 中的 p56 相互作用, 激活 NF- κ B 信号通路^[6-7], 使 NF- κ B 可以调节人体的炎症反应、免疫功能、细胞增殖以及凋亡^[8]。研究发现 MTDH 的表达绝大多数集中在细胞膜及细胞浆中, 部分样本在胞核有表达。这与 Hu、Li、Su^[4,9-10] 等的研究结果相吻合。MTDH 表达位置由细胞浆至细胞核的转移过程, 可能受到 TNF- α 、HIF-1 α 等基因影响^[1,11], 这种改变与乳腺癌患者发生复发转移有密切的相关性, 其转移与肿瘤细胞的 P53 基因相互作

用从而促进肿瘤细胞的增殖^[9],从而加速乳腺癌疾病进展,缩短无病生存时间。

本研究中乳腺癌的复发转移与 MTDH 的表达密切相关 ($P < 0.05$)。不仅如此,疾病进展时间 (time to progression, TTP) 也与 MTDH 表达有相关性。MTDH 高表达者的 TTP 要明显短于 MTDH 基因低表达者 ($P < 0.05$)。本组 10 例肺转移患者均检测到 MTDH 表达阳性。骨转移患者 MTDH 表达的阳性率达到了 75%,提示 MTDH 不仅能够促进肺转移,同时对骨转移有作用^[1]。MTDH 与转移部位的密切相关性,有可能为预测乳腺癌患者复发转移部位提供可靠依据。

ER、PR、HER-2 是乳腺癌内分泌治疗的依据,研究证实 MTDH 与 ER、PR、HER-2 无相关性^[1]。Ki67 是细胞增殖的重要标记物,其表达对乳腺癌预后判断有重要意义。统计学分析发现 Ki67 表达情况与 MTDH 有统计学差异。而 P53 作为一种抑癌基因是否突变,对肿瘤细胞的生长、凋亡以及 DNA 的修复有重要的调控意义。本研究中 P53 表达情况与 MTDH 具有相关性,Ki67、P53 的分析说明 MTDH 对乳腺癌复发转移有重要意义,为其成为预后因子提供了证据。

综上所述,MTDH 的表达情况与患者的年龄、早期淋巴结转移情况、ER、PR、HER-2 等因素无相关性;而与临床分期、组织学类型、TTP、转移部位、以及 Ki67、P53 等预后因素有明显的相关性。MTDH 高表达者发生转移的风险明显高于低表达者,可见其与复发转移有密切关系。MTDH 与乳腺癌转移部位有密切相关性,可为乳腺癌患者的

治疗提供新的切入点,随着研究的深入其完全有可能成为乳腺癌复发转移治疗的新靶点。

参考文献

- 1 Hu G, Wei Y, Kang Y. The multifaceted role of MTDH/AEG-1 in Cancer progression [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15 (18): 5615-5620.
- 2 Brown DM, Ruoslahti E. Metadherin, a cell surface protein in breast tumors that mediates lung metastasis [J]. Cancer Cell, 2004, 5 (4): 365-374.
- 3 Su ZZ, Chen Y, Kang DC, et al. Customized rapid subtraction hybridization (RaSH) gene microarrays identify overlapping expression changes in human fetal astrocytes resulting from human immunodeficiency virus-1 infection or tumor necrosis factor-alpha treatment [J]. Gene, 2003, 306: 67-78.
- 4 Hu G, Chong RA, Yang Q, et al. MTDH activation by 8q22 genomic gain promotes chemoresistance and metastasis of poor-prognosis breast Cancer [J]. Cancer Cell, 2009, 15 (1): 9-20.
- 5 Kang DC, Su ZZ, Sarkar D, et al. Cloning and characterization of HIV-1-inducible astrocyte elevated gene-1, AEG-1 [J]. Gene, 2005, 353 (1): 8-15.
- 6 Emdad L, Sarkar D, Su ZZ, et al. Activation of the nuclear factor kappaB pathway by astrocyte elevated gene-1: implications for tumor progression and metastasis [J]. Cancer Res, 2006, 66 (3): 1509-1516.
- 7 Sarkar D, Park ES, Emdad L, et al. Molecular basis of nuclear factor-kappaB activation by astrocyte elevated gene-1 [J]. Cancer Res, 2008, 68 (5): 1478-1484.
- 8 Bharti AC, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappa B and Cancer: its role in prevention and therapy [J]. Biochem Pharmacol, 2002, 64 (5): 883-888.
- 9 Li J, Zhang N, Song LB, et al. Astrocyte elevated gene-1 is a novel prognostic marker for breast Cancer progression and overall patient survival [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14 (11): 3319-3326.
- 10 Su P, Zhang Q, Yang Q. Immunohistochemical analysis of Metadherin in proliferative and cancerous breast tissue [J]. Diagn Pathol, 2010, 5: 38.
- 11 Li C, Li R, Song H, et al. Significance of AEG-1 expression in correlation with VEGF, microvessel density and clinicopathological characteristics in triple-negative breast Cancer [J]. J Surg Oncol, 2011, 103 (2): 184-192.