

文章编号:1005-6947(2008)11-1079-05

· 基础研究 ·

# 转移相关蛋白与乳腺癌转移潜能的相关性分析

房爱菊, 高永生, 李盛梅, 刘文君, 孟斌

(山东大学齐鲁医院 病理科, 山东 济南 250012)

**摘要:**目的 探讨与肿瘤转移相关的蛋白在乳腺浸润性导管癌中的表达及其意义。方法 应用组织芯片技术及SP免疫组化方法检测247例乳腺浸润性导管癌中 $\alpha$ -B晶体蛋白, CD44v6, MMP-2, TIMP-2的表达, 并分析它们与乳腺癌临床病理特征的关系。结果 (1) 在浸润性导管癌中,  $\alpha$ -B晶体蛋白, CD44v6, MMP-2, TIMP-2的阳性表达率分别为70.0%, 61.5%, 57.5%, 57.1%; 与正常组织比较差异有统计学意义( $P < 0.001$ ); (2) 单因素分析显示 $\alpha$ -B晶体蛋白, CD44v6, MMP-2的表达与淋巴结转移呈正相关( $r = 0.317, 0.623, 0.705$ ), 而TIMP-2的表达与之呈负相关( $r = -0.532$ ); (3) 多因素分析显示淋巴结转移与 $\alpha$ -B晶体蛋白, CD44v6, MMP-2, TIMP-2的表达相关, 该4项指标联合对淋巴结转移的预测率达89.5%。结论  $\alpha$ -B晶体蛋白, CD44v6, MMP-2, TIMP-2的表达情况与乳腺浸润性导管癌的转移密切相关, 通过对原发瘤多种转移相关蛋白的检测可以预测乳腺癌的转移能力。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(11):1079-1083]

**关键词:** 乳腺肿瘤; 肿瘤转移; 组织芯片; 因素分析

中图分类号: R 737.9

文献标识码: A

## Investigation of the correlation between a group of metastasis-associated proteins and metastatic potency in breast carcinoma

FANG Aiju, GAO Yongsheng, LI Shengmei, LIU Wenjun, MENG Bin

(Department of Pathology, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression and the significance of a group of metastasis-associated proteins in invasive ductal breast carcinoma (IDC). **Methods** Tissue microarray containing 247 IDC specimens was constructed. The expressions of  $\alpha$ -B crystallin, CD44v6, MMP-2 and TIMP-2 were detected by immunohistochemistry, and the relation between the expression of these proteins and the clinicopathologic character was analyzed. **Results** (1) The expression rates of  $\alpha$ -B crystallin, CD44v6, MMP-2 and TIMP-2 in IDC were 70.0%, 61.5%, 57.5% and 57.1% respectively, and significantly higher than those of normal breast tissues ( $P < 0.001$ ); (2) Univariate analysis indicated that there were significant positive correlations between the expression of  $\alpha$ -B crystallin, CD44v6, MMP-2 and lymph node metastasis of breast carcinomas ( $r$  value is 0.317, 0.623 and 0.705 respectively), and significant negative correlations with TIMP-2 ( $r = -0.532$ ). (3) Logistic stepwise regression analysis indicated that the expression of  $\alpha$ -B crystallin, CD44v6, MMP-2 and TIMP-2 were significantly related with the lymph node metastasis, and the predicted percentage for the metastasis was 89.5% by these four proteins together.

**Conclusions** The expressions of  $\alpha$ -B crystallin, CD44v6, MMP-2 and TIMP-2 was significantly correlated

基金项目: 山东省自然科学基金(Y2007C015)。

收稿日期: 2008-02-19; 修订日期: 2008-06-30。

作者简介: 房爱菊, 女, 山东大学齐鲁医院硕士研究生, 主要从事肿瘤病理学方面的研究。

通讯作者: 孟斌 E-mail: mengbin@sdu.edu.cn

with the metastasis of IDC. It is possible to estimate the metastatic potency of breast carcinoma by testing metastasis-associated proteins. [Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(11):1079-1083]

**Key words:** Breast Neoplasms; Neoplasms Metastasis; Tissue Microarray; Factor Analysis

**CLC number:** R 737.9

**Document code:** A

腋淋巴结转移与否是乳腺癌最重要的预后指标,但并不十分精确,漏诊率为12%~31%<sup>[1]</sup>。目前对术后未发现淋巴结转移的浸润性乳腺癌患者仍常规给予辅助化疗。这不仅给无转移的患者增加了精神和经济负担,也给其机体造成了不必要的损害。因此准确判定乳腺癌的转移活性具有重要的临床意义。本研究观察一组与肿瘤转移相关的蛋白在浸润性乳腺癌中的表达及其与临床病理特征的关系,旨在探讨该组蛋白的表达与乳腺癌淋巴结转移的关系,以评价其预测乳腺癌转移能力的可能性。

## 1 材料及方法

### 1.1 病例资料

(1)乳腺癌组:收集本院2005—2007年乳腺浸润性导管癌手术标本247例,均为女性,年龄25~78(平均46.7)岁。所有患者术前未接受放疗和/或化疗,并有完整的临床资料。组织学类型采用2003年世界卫生组织(WHO)分类标准<sup>[2]</sup>;组织学分级参照Elston和Ellis分级标准<sup>[3]</sup>。(2)对照组:20例乳腺增生症切除标本,均为女性,年龄25~42(平均32.5)岁。标本均经10%福尔马林液固定,常规石蜡包埋。切片经2名高年资病理医师复诊。

### 1.2 材料及试剂

鼠抗 $\alpha$ -B晶体蛋白单克隆抗体(浓缩型)购自加拿大Stressgen生物公司(SPA-222),鼠抗CD44v6单克隆抗体,兔抗人MMP-2及TIMP-2多克隆抗体,雌激素受体(ER),孕激素受体(PR),cerb-B2和Ki67单克隆抗体均购自北京中杉生物公司。

### 1.3 实验方法

1.3.1 组织芯片制作 根据HE切片确定具有代表性的病变区并标记,应用组织微阵列仪(朝阳恒泰科技有限公司)制备组织芯片,行HE染色与常规切片核对无误后用于后续实验。

1.3.2 免疫组织化学(免疫组化)检测相关蛋白

切片经微波抗原修复,免疫组化方法按照试剂盒说明进行。以已知阳性片作为阳性对照,以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。

1.3.3 结果判定 用显微摄像计算机图像分析系统,每个组织点随机选取5个视野计算阳性细胞和肿瘤细胞数量。判断标准: $\alpha$ -B晶体蛋白,MMP-2及TIMP-2均为细胞胞质及胞膜着色,CD44v6为胞膜着色。根据细胞染色强度和染色面积评分。染色强度分为:无着色0分,浅黄色1分,黄色2分,棕黄色3分。染色面积分为:着色细胞数<5%为0分,5%~25%为1分,>25%~50%为2分,>50%为3分。2项相加积分为:0~2分为阴性,>2分为阳性。ER,PR,cerb-B2及Ki67的判定标准参照相关文献<sup>[4]</sup>。染色结果均经3次重复观察。

### 1.4 统计学处理

采用SPSS 12.0统计软件。不同组间显著性检验用 $\chi^2$ 检验;用Spearman等级相关进行相关性分析;采用logistic回归进行多变量分析。 $P \leq 0.05$ 为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 $\alpha$ -B晶体蛋白,CD44v6,MMP-2及TIMP-2的表达

浸润性导管癌中 $\alpha$ -B晶体蛋白,CD44v6,MMP-2和TIMP-2的阳性率分别为70.0%(173/247),61.5%(152/247),57.5%(142/247)和57.1%(141/247)(图1)。而在非癌乳腺组织中,MMP-2及TIMP-2的阳性率分别为10%(2/20)和90%(18/20), $\alpha$ -B晶体蛋白及CD44v6在腺上皮表达阴性,仅在导管肌上皮弱表达。两组比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$ )。

### 2.2 $\alpha$ -B晶体蛋白,CD44v6,MMP-2及TIMP-2的表达及与患者临床病理学特点的关系

单因素分析显示,浸润性导管癌中 $\alpha$ -B晶体蛋白,CD44v6,MMP-2及TIMP-2的表达均与月经情况、肿瘤大小、组织学分级及Ki67的表达无关,上述各特征的分组间差异无显著性(均 $P > 0.05$ ),而均与淋巴结转移与否之间差异有显著性(均 $P < 0.05$ ); $\alpha$ -B晶体蛋白,CD44v6及MMP-2表达与淋巴结转移呈正相关( $r = 0.317, 0.623, 0.705$ ),而TIMP-2的表达与之呈负相关( $r = -0.532$ )。 $\alpha$ -B晶体蛋白另外还与cerb-B2表达

呈正相关( $r = 0.181$ ),与ER表达呈负相关( $r = -0.309$ );CD44v6的表达与cerb-B2表达有关( $P = 0.028$ );MMP-2表达与cerb-B2表达有关( $P = 0.032$ )(表1)。

### 2.3 乳腺癌淋巴结转移相关因素多元分析

把各项临床病理学指标进行多元分析(表2),得出判断淋巴结转移的概率P为:

$$P = \frac{\exp(-1.233x_8 + 2.969x_7 + 2.301x_9 + 1.108x_{10})}{1 + \exp(-1.233x_8 + 2.969x_7 + 2.301x_9 + 1.108x_{10})}$$

整个模型经似然比检验(likelihood ration test):

$\chi^2 = 193.716, P < 0.01$ 。患者的月经情况、肿瘤大小、组织学分级及ER、cerb-B2和Ki67的表达与淋巴结转移的关系不大,未能进入预测模型;而淋巴结转移与 $\alpha$ -B晶体蛋白,CD44v6,MMP-2,TIMP-2的表达关系显著,经回代分析,该4个变量预测淋巴结转移的符合率达89.5%(表3)。但在模型预测为淋巴结转移的病例中,有15例实际未检测出转移;而在模型预测未发生淋巴结转移的病例中,有11例实际检测已发生转移。

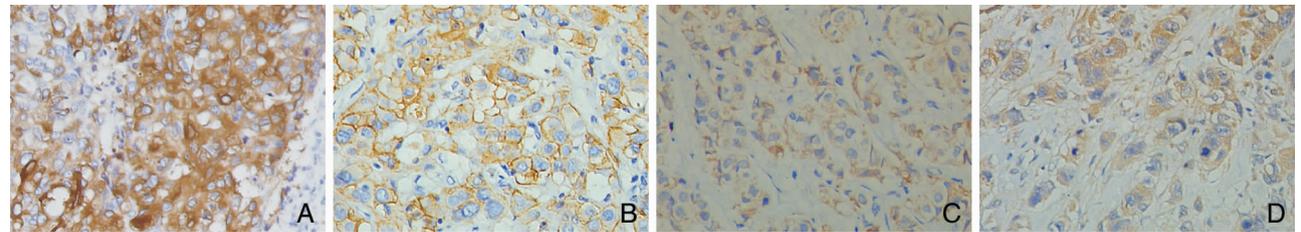


图1 转移相关蛋白在乳腺癌组织中的表达 A: $\alpha$ -B晶体蛋白;B:CD44v6;C:MMP-2;D:TIMP-2(SP $\times$ 400)

表1  $\alpha$ -B晶体蛋白,CD44v6,MMP-2及TIMP-2的表达与乳腺癌临床病理特点的关系

临床病理学指标	总例数 (n=247)	$\alpha$ -B crystallin		CD44V6		MMP-2		TIMP-2	
		例数(%)	P值	例数(%)	P值	例数(%)	P值	例数(%)	P值
月经情况									
绝经前	123	87(70.7)	0.461	83(67.5)	0.078	76(61.8)	0.173	66(53.7)	0.305
绝经后	124	86(69.4)		71(57.3)		66(53.2)		75(60.5)	
肿瘤大小(cm)									
$\leq 2.0$	79	55(69.6)	0.571	43(54.4)	0.088	42(53.2)	0.408	52(65.8)	0.057
$> 2.0$	168	118(70.2)		111(66.1)		142(57.5)		89(56.0)	
组织学分级									
I	78	53(67.9)		41(52.6)		37(47.4)		50(64.1)	0.287
II	77	56(72.7)	0.804	52(67.5)	0.097	46(59.7)	0.080	40(51.9)	
III	92	64(69.6)		61(66.3)		59(64.1)		51(55.4)	
淋巴结转移									
无转移	127	71(55.9)	0.000	42(33.1)	0.000	30(23.6)	0.000	105(82.7)	0.000
有转移	120	102(85.0)		112(93.3)		112(93.3)		36(30.0)	
ER表达									
阴性	97	85(87.6)	0.000	62(63.9)	0.788	63(64.9)	0.065	53(54.6)	0.599
阳性	150	88(58.7)		92(61.3)		79(52.7)		88(58.7)	
cerb-B2表达									
阴性	209	139(66.5)	0.004	124(59.3)	0.028	114(54.5)	0.032	120(57.4)	0.859
阳性	38	34(89.5)		30(78.9)		28(73.7)		21(55.3)	
Ki67表达(%)									
$< 25$	158	107(67.7)		97(61.4)		83(52.5)		98(62.0)	0.070
$> 25 \sim 50$	45	30(66.7)	0.169	28(62.2)	0.861	28(62.2)	0.081	24(53.3)	
$> 50$	44	36(81.8)		29(65.9)		31(70.5)		19(43.2)	

表 2 多因素分析结果

变量	回归系数	回归系数标准误	Wald 值	危险度	P 值
X8 (TIMP-2)	-1.233	0.458	7.249	0.291	0.007
X7 (MMP-2)	2.969	0.508	34.198	19.465	0.000
X9 (CD44v6)	2.301	0.495	21.611	9.980	0.000
X10 ( $\alpha$ -B crystallin)	1.108	0.503	4.853	3.028	0.028
Constant	-1.1473	1.146	1.652	0.229	0.199

表 3 概率模型的回代分析结果

病理诊断	回归分析判别结果		合计	符合率(%)
	转移	无转移		
转移	109	11	120	90.8
无转移	15	112	127	88.2
合计	123	124	247	89.5

### 3 讨论

研究表明乳腺癌患者临床治愈率和整体生存率随淋巴结转移率的增加而降低<sup>[5]</sup>。约 10% ~ 20% 的患者常规病理检查并未发现淋巴结转移,但经连续切片和/或上皮标记免疫组化染色发现淋巴结有转移<sup>[1-2]</sup>。新辅助化疗治疗乳腺癌的适应证一般遵照 St. Gallen 标准<sup>[6]</sup>,依据此标准,有 90% 以上淋巴结转移阴性的年轻乳腺癌患者需接受系统的辅助化疗,但有 70% ~ 80% 淋巴结转移阴性患者在 5 年内不发生转移。另一方面,在不具备辅助化疗适应证的患者中,有近 30% 发生复发和转移<sup>[7]</sup>。因此,如何对乳腺癌的转移状况做出及时、准确的判断具有十分重要的实际意义。

$\alpha$ -B 晶体蛋白属于小分子热休克蛋白 (small HSP) 家族,在蛋白质聚集折叠、跨膜转运、细胞骨架稳定等方面均发挥重要功能,而且还可通过结合 caspase-3 前体的活化中间产物 p24,阻止其水解活化,从而抑制细胞凋亡<sup>[8]</sup>。本研究结果显示  $\alpha$ -B 晶体蛋白在有淋巴结转移的乳腺癌中阳性率明显高于无淋巴结转移者<sup>[9]</sup>。此结果与 Moyano 及 Chelouche 等<sup>[10-11]</sup> 的研究结果一致。

CD44 标准体 (CD44S) 代表由多种黏附分子组成的分布广泛的细胞表面跨膜糖蛋白,它通过细胞外受体和相关配体结合而参与细胞与细胞、细胞与细胞外基质的黏附。CD44v6 是 CD44S 的变异体,主要表达于肿瘤组织。Ma 等<sup>[12]</sup> 的研究结果显示 CD44v6 与肿瘤大小、淋巴结转移及

TNM 分期呈正相关。也有学者认为 CD44v6 与肿瘤大小、组织学分级、淋巴结状况等无明显关系<sup>[13]</sup>。MMP-2 属 IV 型胶原酶类,主要降解基底膜 IV, V 和 VII 型胶原。TIMP-2 是胶原酶家族的抑制酶,并且能抑制细胞增殖;乳腺癌中 TIMP-2 表达下降或消失,或 MMPs 表达增强,都可导致基质降解、肿瘤转移<sup>[14]</sup>。本研究中,CD44v6, MMP-2 及 TIMP-2 的表达在淋巴结转移与否的两组间差异有极显著性 (均  $P < 0.01$ ),提示 CD44v6, MMP-2 及 TIMP-2 与乳腺癌的转移有密切的关系。

本研究结果经 logistic 逐步回归分析显示  $\alpha$ -B 晶体蛋白, CD44v6, MMP-2 及 TIMP-2 均进入预测模型,应用这 4 个变量预测淋巴结转移与病理诊断总符合率为 89.5%,说明如果能选择出合适的预测指标,是对原发癌的转移能力作出准确预测的。但在预测模型中有 11 例预测无淋巴结转移者实际为已发生转移,而 15 例预测发生转移者实际未检测出转移,说明本研究中预测模型还存在一定的误差。目前发现的与肿瘤转移相关的因素很多,可能还存在尚未发现的因素。因此笔者的工作仅是初步的,需要更完善的随访和研究。

(致谢:本文统计学部分由山东大学公共卫生学院李菲菲及刘言训老师给予指导,特此致谢)

#### 参考文献:

- [1] Reed W, Bohler PJ, Sandstad B, *et al.* Occult metastases in axillary lymph nodes as a predictor of survival in node-negative breast carcinoma with long-term follow-up [J]. *Breast J*, 2004, 10(3): 174-180.
- [2] Tavassoli FA, Devilee P. Invasive breast carcinoma [A]. In: *Pathology & genetics tumor of the breast and female genital organs* [M]. Lyon: IARC Press, 2003. 6-38.
- [3] Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up [J]. *Histopathology*, 1991, 19(5): 403-410.
- [4] Rodríguez-Pinilla SM, Sarrió D, Honrado E, *et al.* Vimentin and laminin expression is associated with basal-like pheno-

- type in both sporadic and BRCA1-associated breast carcinomas [J]. *J Clin Pathol*, 2007, 60(9):1006-1012.
- [5] Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, *et al.* Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999 [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2000, 124(7):966-978.
- [6] 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. 中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2007版) [J]. *中国癌症杂志*, 2007, 17(5):410-428.
- [7] Braun S, Vogl FD, Naume B, *et al.* A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(8):793-802.
- [8] Kamradt MC, Chen F, Sam S, *et al.* The small heat shock protein alpha B-crystallin negatively regulates apoptosis during myogenic differentiation by inhibiting caspase-3 activation [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(41):38731-38736.
- [9] 房爱菊,孟斌,刘文君等.  $\alpha$ -B crystallin 在乳腺浸润性导管癌中的表达及意义 [J]. *山东大学学报, 医学版* 2008, 46(3):280-283.
- [10] Moyano JV, Evans JR, Chen F, *et al.*  $\alpha$ B-Crystallin is a novel oncoprotein that predicts poor clinical outcome in breast cancer [J]. *Clin Invest*, 2006, 116(1):261-270.
- [11] Chelouche-Lev D, Kluger HM, Berger AJ, *et al.*  $\alpha$ B-Crystallin as a marker of lymph node involvement in breast carcinoma [J]. *Cancer*, 2004, 100(12):2543-2548.
- [12] Ma W, Deng Y, Zhou Y. The prognostic value of adhesion molecule CD44v6 in women with primary breast carcinoma: a clinicopathologic study [J]. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2005, 17(4):258-263.
- [13] Berner HS, Suo Z, Risberg B, *et al.* Clinicopathological associations of CD44 mRNA and protein expression in primary breast carcinomas [J]. *Histopathology*, 2003; 42(6):546-554.
- [14] 申培红,张云汉,李惠翔. MMP-2 和 TIMP-2 蛋白在乳腺癌组织中的表达及其与肿瘤转移的关系 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(5):375-377.

## 本刊启用远程稿件处理系统

为了提高办公效率,《中国普通外科杂志》编辑部将于2008年1月1日起正式启用“网络编辑管理系统”。请作者登陆网站 <http://www.zpwz.net> 按照以下步骤进行在线投稿。

### 投稿步骤

1. 选择“作者投稿”一栏,进入“作者投稿”界面。

如果是第一次投稿,需要先注册本系统:点“注册”进入注册流程,按照系统提示进行注册,请注意,“\*”选项为用户必填项!

2. 点“作者投稿”,选择左边的“我要投稿”一栏,按照投稿向导的提示进行。

(1) 输入稿件中文文题和英文文题。

(2) 输入作者。若所投稿件为多人撰写,在作者信息下添加该文的合作作者,合作作者可以只添加姓名即可。此处需注意,如该文为n位作者撰写,需在填写完n位作者后,再点一下“继续添加作者”后方可点“下一步”,否则最后一个作者本系统将不会显示。

(3) 第三步“学科类型”、“专业类型”、“创作类型”、“投稿栏目”、“文章分类号/PACS码”可以不选。

如果该文有基金支持,请在“基金类型”下的长条框中输入(包括基金号);如果有多个,请用分号分开。输完以后点“下一步”。

(4) 输入关键词。请注意各词之间一定要用分号隔开。然后点击“添加”。再点“下一步”。

(5) 输入中英文摘要后再单击“下一步”

(6) 根据系统提示在相应的栏目中输入你要回避或推荐的专家,也可以不写。单击“下一步”,检查稿件的基本信息,如有需要修改的地方,点击“修改”;再确认无误后,单击“下一步”进入稿件上传步骤。

(7) 在“稿件上传操作区”点“浏览”,选中要上传的稿件后,点击右边的“上传稿件”。待弹出“稿件上传完毕,请继续下一步”的对话框时,点“确定”,再点“下一步”继续投稿。请注意,这一步可能因您的网速和稿件的大小,所需时间略有不同,请耐心等待,如果长时间仍没有弹出“稿件上传完毕,请继续下一步”的对话框,可重新尝试,确保稿件上传方可进行下一步。

(8) 核对完所投稿件的信息后请点“下一步”。如果您对编辑部有什么特别的要求或说明,请在“给编辑部留言”框中留下您的意见,点“立即提交”,系统会提示“\*\*\*同志:非常感谢您对本刊物的支持!您的来稿《\*\*\*》我们已经收到,请等待编辑部通知。查询请登录编辑部网站 <http://www.zpwz.net> 或咨询编辑部邮箱:pw4327400@126.com”。

### 友情提示

网上投稿后,请邮寄1份纸质稿(题名页与正文页均需用A4纸4号字隔行打印)、单位介绍信(注明材料真实可靠,无一稿多投和无科研机密资料泄密)及60元稿件处理费至本编辑部。

为防作者上传稿件不成功,请作者E-mail致本编辑部,信中请注明投稿时间、文题、作者姓名,并将稿件以附件形式发过来。

编辑部地址:湖南省长沙市湘雅路87号中国普通外科杂志编辑部

E-mail: pw4327400@126.com; jcgxxyh@126.com. 联系电话 0731-4327400。