

• 临床检验研究论著 •

乳腺癌患者血清 hMAM 检测的临床意义研究*

田 英¹, 姜专基^{2△}, 张志艳¹

(甘肃省肿瘤医院:1. 检验科;2. 乳腺科, 兰州 730050)

摘要:目的 通过检测乳腺癌患者外周血人乳腺珠蛋白(hMAM)水平,探讨其作为乳腺癌微转移检测指标的临床意义。
方法 用酶联免疫吸附实验(ELISA)法定量测定 164 例乳腺癌患者、40 例乳腺纤维腺瘤患者及 40 例健康志愿者血清 hMAM 含量;采用 SP 免疫组化法对乳腺癌患者的 ER、PR、Her-2、P53、Ki-67 进行检测并进行分子分型。**结果** 乳腺癌组血清 hMAM 水平显著高于纤维腺瘤组和健康对照组(P 均 <0.01)。乳腺癌淋巴结阳性组血清 hMAM 水平显著高于淋巴结阴性组;Ⅲ期患者血清 hMAM 水平显著高于Ⅰ+Ⅱ期患者;血清 hMAM 水平与肿瘤最大直径相关,随瘤体最大直径的增长,血清水平在增高,差异均有统计学意义($P=0.000$)。血清 hMAM 水平与患者年龄、月经状况、组织学分级、ER、PR、Her-2、P53、Ki-67、分子分型等无相关性。**结论** hMAM 在乳腺癌患者中特异性高表达,血清 hMAM 水平升高可能与肿瘤的形成、发展以及转移密切相关,有可能作为判断乳腺癌外周血微转移的标志物,并在乳腺癌微转移诊断和预后判断中具有重要意义。

关键词:乳腺肿瘤; 人乳腺珠蛋白; 微转移; 酶联免疫吸附测定
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.03.019 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2013)03-0302-03

Significance of serum hMAM testing in patients with breast cancer*

Tian Ying¹, Jiang Zhuangji^{2△}, Zhang Zhiyan¹

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Mammary Surgery, the Tumor Hospital of Gansu Province, Lanzhou, Gansu 730050, China)

Abstract: **Objective** To explore the significance of human mammaglobin(hMAM) in breast cancer. **Methods** The hMAM level was detected in 164 patients with breast cancer, 40 patients with mammary fibroadenoma and 40 healthy volunteers by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). The expressions of estrogen receptor(ER), progesterone receptor(PR), human epidermal growth factor receptor 2(Her-2), protein 53(P53) and Ki-67 in 164 patients with breast cancer were detected by immunohistochemistry method. Molecular types were classified by the status of ER, PR and Her-2. **Results** The hMAM level in patients with breast cancer was significantly higher than that in patients with mammary fibroadenoma and that in healthy volunteers($P < 0.01$). The hMAM level in lymph node positive group was significantly higher than that in lymph node negative group($P=0.000$), and the level of patients in stages Ⅲ were also significantly higher than that in stagesⅠ+Ⅱ($P=0.000$). The hMAM level was correlated with the tumor maximum diameter($P=0.000$), but it was uncorrelated with other clinical parameters(age, menstruation condition, histological grade, ER, PR, Her-2, P53, Ki-67 and molecular types). **Conclusion** The hMAM in peripheral blood might be specific highly expressed in patients with breast cancer. The rising of hMAM might have a close relationship with the causing, developing and metabasising of breast cancer. It could be used as a marker in detecting micrometastases and judging prognosis for breast cancer.

Key words: Breast neoplasms; human mammaglobin; micrometastasis; enzyme-linked immunosorbent assay

人乳腺珠蛋白(hMAM)是一个相对分子质量为 10×10^3 的分泌型差异表达蛋白,由 Waston 和 Fleming^[1]于 1996 年利用差式筛选和 cDNA 末端扩增技术从乳腺癌细胞中克隆获得,其基因位于染色体 11q12.3~13.1 的密集区,氨基酸序列与子宫珠蛋白超家族同源,属子宫珠蛋白家族中的乳腺特异性成员。国内外研究报道^[2-3],hMAM mRNA 特异性地表达于乳腺组织,几乎只在乳腺上皮细胞中表达并在乳腺癌组织中过度表达,其他肿瘤(如肠癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、恶性黑色素瘤等)不表达。本研究采用酶联免疫吸附实验(ELISA)方法对乳腺癌患者外周血 hMAM 进行检测,探讨其在乳腺癌患者血清检测中的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2010 年 3 月至 2011 年 9 月甘肃省肿瘤医院首诊,并经粗针穿刺病理学(CNB)检查确诊的 164 例女性乳腺癌患者为研究组(均未经过化疗、放疗或手术治疗),年龄 27~77 岁,平均 46.9 岁,中位年龄 46.2 岁,均无肝功能异常及免疫系统疾病。组织学类型按照 2003 版 WHO 乳腺肿瘤病理及遗传学分类^[4]:浸润性导管癌 120 例,髓样癌 10 例,黏液癌 6 例,浸润性小叶癌 15 例,混合型癌 13 例;TNM 分期按照第 6 版 AJCC 乳腺癌 TNM 分期^[5]:Ⅰ期 13 例,Ⅱ期 121 例,Ⅲ期 30 例。设立 CNB 确诊的女性乳腺纤维腺瘤 40 例作为良性病例对照组,年龄 16~55 岁,平均年龄 35.15 岁,中位年龄 35.50

* 基金项目:兰州市科技局社会发展基金资助项目(2011-2-36)。 作者简介:田英,女,副主任检验技师,主要从事肿瘤实验室诊断研究。
△ 通讯作者, E-mail:jiangzhuangji@163.com。

岁。设立体检健康的女性健康自愿者 20 例为健康对照组,年龄 26~54 岁,平均年龄 42.90 岁,中位年龄 43.00 岁。所有标本均同期收集。

1.2 仪器及试剂 美国 Rayto RT-6000 型全自动酶标仪,美国 Rayto RT-3000 型洗板机。ELISA 试剂盒购自上海拜力生物科技有限公司(美国进口分装),鼠抗人单克隆抗体及 SP 试剂盒采用福州迈新生物技术有限公司产品。

1.3 标本采集 各组受试对象均在未经任何治疗或穿刺前抽取清晨空腹静脉血 3 mL 于真空采血管内,30 min 内以 3 000 r/min 离心 10 min 分离血清,−80 ℃冰箱保存待测。

1.4 血清 hMAM 水平检测 试验分 3 组(病例研究组、纤维腺瘤组、健康对照组),血清 hMAM 采用 ELISA 法测定,检测步骤严格按试剂盒说明书进行。ELISA 数据由 MasterPlex ReaderFit 软件处理,依据标准曲线计算各样本对应的浓度值,单位:ng/mL。

1.5 免疫组化 SP 检测 Her-2、P53、Ki-67 乳腺癌患者癌组织雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、人表皮生长因子受体-2(Her-2)、P53、Ki-67 采用免疫组化 SP 法。严格按照试剂盒说明书操作步骤执行。ER、PR、P53、Ki-67 阳性为细胞核内出现棕黄色颗粒;Her-2 阳性为细胞膜染色,结果依照《乳腺癌 Her-2 检测指南》进行判读。

1.6 乳腺癌分子分型 根据癌组织免疫组化 ER、PR、Her-2 表达情况将乳腺癌分为 4 个近似分子亚型^[6],分别为 Luminal A 型(ER 和或 PR 阳性、Her-2 阴性)、Luminal B 型(ER 和/或 PR 阳性、Her-2 过表达)、Her-2 阳性型(ER 与 PR 阴性、Her-2 过表达)及基底样亚型(ER 与 PR 阴性、Her-2 阴性)。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,采用非参数统计方法,数据以中位数(M)及四分位数间距(QR)表示。两两比较采用 Mann-Whitney 检验,多组比较采用非参数检验中的 Kruskal-Wallis 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 术前乳腺癌、乳腺纤维腺瘤组血清 hMAM 检测结果 乳腺癌组术前 hMAM 水平为 37.15(28.13,48.23),高于纤维腺瘤组[23.19(19.13,26.03)],差异有统计学意义($Z=-7.782, P<0.01$);纤维腺瘤组和健康对照组之间比较差异无统计学意义($Z=-1.155, P>0.05$)。乳腺癌组术前 hMAM 水平高于健康对照组,差异有统计学意义($Z=-8.173, P<0.01$)。

表 1 hMAM 的表达和临床指数之间的关系			
临床指数	<i>n</i>	hMAM[M(QR),ng/mL]	<i>P</i>
临床分期			0.000
I+II	134	34.10(15.34	
III	30	50.30(17.91)	
组织学分级			0.510
G1	29	32.51(18.45)	
G2	100	37.15(18.33)	
G3	35	37.55(25.22)	
淋巴结状况			0.000
—	106	33.56(15.33)	
+	58	43.19(20.96)	
肿瘤最大直径(cm)			0.000

续表 1 hMAM 的表达和临床指数之间的关系			
临床指数	<i>n</i>	hMAM[M(QR),ng/mL]	<i>P</i>
≤2	21	22.67(5.07)	
>2~5	97	34.26(11.64)	
>5	46	50.46(14.70)	
年龄(岁)			0.212
≤35	12	36.18(21.15)	
>35~60	139	37.40(20.24)	
>60	13	30.72(16.13)	
月经状况			0.652
绝经前	112	37.24(21.98)	
绝经后	52	36.53(13.98)	
分子分型			0.504
Luminal A 型	94	35.56(20.44)	
Luminal B 型	20	34.97(18.72)	
Her-2 阳性型	16	33.91(21.78)	
基底样亚型	34	42.09(24.34)	
P53			0.226
—	64	37.42(20.11)	
+	100	36.57(18.70)	
Ki-67			0.378
—	50	37.24(21.45)	
+	114	37.15(18.03)	
Her-2			0.929
—+—++	128	37.24(21.21)	
+++	36	33.98(23.47)	
ER			0.506
—	53	37.55(16.40)	
+	111	37.10(22.63)	
PR			0.088
—	73	39.27(18.93)	
+	91	34.27(20.35)	

2.2 乳腺癌患者术前血清 hMAM 和临床病理学特征的关系 临床Ⅲ期患者水平显著高于临床Ⅰ、Ⅱ期患者;淋巴结阳性组水平显著高于淋巴结阴性组;随肿瘤直径增加,血清 hMAM 水平提高,差异具有统计学意义($P<0.01$)。术前血清 hMAM 水平与患者年龄、月经状态、组织学分级、病理学类型、ER、PR、Her-2、P53、Ki-67、分子分型等无关,见表 1。

3 讨 论

微转移是乳腺癌发展过程中的早期事件,与临床转移之间有着较为密切的关系^[7]。若能够在病期的较早阶段检测到乳腺癌的微转移,则对疾病的治疗和预后具有重要意义。乳腺癌患者外周血 hMAM 来源通常有 3 种:(1)脱落入血的肿瘤细胞所携带的 hMAM;(2)未脱落肿瘤细胞翻译出的 hMAM 蛋白质,经过一系列加工释放入血;(3)正常乳腺上皮低表达的 hMAM 释放入血。

本研究显示,乳腺癌患者血清 hMAM 水平显著高于乳腺纤维腺瘤患者和健康者,差异有统计学意义($P<0.01$)。提示检测外周血 hMAM 具有重要的临床意义,可以作为判断乳腺癌微转移的特异性标志物。国内外学者采用 PCR 法只在乳腺癌患者外周血中检出 hMAM mRNA,在良性肿瘤组和健康对照组中未能够检测到^[8-9]。本研究采用 ELISA 法在乳腺良性肿瘤和健康人群中均检测到较低浓度的 hMAM,可能与 hMAM 在正常乳腺上皮细胞中低表达但在乳腺癌组织中过度表达有关。

腋窝淋巴结状态、原发灶大小、肿瘤组织学分级、临床分期等为公认的判断乳腺癌预后的因子,腋窝淋巴结阳性通常提示患者预后不佳^[10]。本研究显示:hMAM 水平与患者 TNM 分期、淋巴结转移状态和肿瘤最大直径相关($P<0.05$),其血清水平随 TNM 分期的增加而升高;腋窝淋巴结阳性组 hMAM 水平显著高于淋巴结阴性组,说明血清 hMAM 水平能够反映腋窝淋巴结转移状态和临床分期,但血清 hMAM 与淋巴结转移数目之间的关系有待于进一步研究;血清 hMAM 还与肿瘤最大直径相关,随瘤体最大直径的增长,血清水平增高,这也反映了血清 hMAM 水平与肿瘤负荷或肿瘤实质的体积相关^[7]。肿瘤体积愈大,意味着肿瘤细胞数目愈多,分泌的 hMAM 释放入血和肿瘤细胞脱落入血的可能性愈高,乳腺癌发生微转移的风险相应增高。因此,循环血液中检测出较高浓度的 hMAM,在一定程度上意味着患者具有较强的转移倾向,有助于临床肿瘤的分期和治疗方案的选择。此外,hMAM 水平与患者年龄、月经状态、组织学分级、病理学类型、激素受体状态、Her-2、P53、Ki-67、分子分型等无关($P>0.05$),提示 hMAM 可能为独立于上述因素的可以反映乳腺癌微转移的标志物。

综上所述,hMAM 在乳腺癌患者中特异性高表达,血清 hMAM 水平升高可能与肿瘤的形成、发展和转移密切相关,对于乳腺癌的诊断、治疗及长期监测起着非常积极的作用^[11-12]。目前仍缺乏血清 hMAM 水平与乳腺癌远期生存与预后的较高质量的研究结论,故尚不推荐血清 hMAM 用于乳腺癌患者病情状态的常规判断,但可以作为组织学检测或 PCR 检测的有益补充。相信随着相关研究的不断深入,hMAM 的长期动态随访和更多合理使用该指标的临床证据的出现,其临床价值将会得到进一步证实。

参考文献

[1] Watson MA, Fleming TP. Mammaglobin a mammary-specific

(上接第 301 页)

系数为 0.563,UmAlb 与 CT 相关系数为 0.384,与 BGP 相关系数为 0.646,均呈正相关。由此可以看出,血清 Cys C 和 BGP、CT 浓度是反映糖尿病肾病发展及钙磷代谢紊乱的敏感指标,Cys C 早期的升高与钙调节相关蛋白呈明显正相关,因此对糖尿病肾病 Cys C 患者进行动态监测,有助于发现早期的骨丢失并有助于早期发现骨质疏松,对糖尿病肾功能损伤诊断和提供干预治疗具有重大意义。

综上所述,Cys C 在反映 GFR 变化及慢性心力衰竭所致肾脏的早期损伤等方面,具有其他指标不具备的优势,联合采用血清 Cys C 和 BGP、CT 在判断糖尿病肾病进展及骨代谢状况方面具有广阔的应用前景。

参考文献

[1] Chang J H, Gurley S B. Assessment of diabetic nephropathy in the akita mouse[J]. Methods Mol Biol, 2012, 933(1): 17-29.
[2] 屠霞,王振林. II 型糖尿病患者血清清和谷胱甘肽过氧化物酶浓度分析[J]. 国外医学:医学地理分册, 2010, 31(1): 49-51.
[3] Pei X, Bao L, Xu Z, et al. Diagnostic value of cystatin C and glomerular filtration rate formulae in Chinese nonelderly and elderly populations[J]. J Nephrol, 2012, 18(9): 511-514.

member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer[J]. Cancer Res, 1996, 56(15): 860-865.
[2] 田英,姜专基,司晓枫. 人乳腺珠蛋白检测与乳腺癌诊治[J]. 国际肿瘤学杂志, 2011, 38(2): 129-132.
[3] 黄雄,马桢,谢文彪. 原发性乳腺癌组织中人乳腺珠蛋白的表达及意义[J]. 肿瘤防治研究, 2010, 37(6): 667-670.
[4] 付丽,傅西林. 乳腺肿瘤病理学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2008: 288.
[5] 沈镇宙,邵志敏. 现代乳腺肿瘤学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2005: 147-155.
[6] 耿其荣,刘冬耕,史艳侠,等. 浸润性乳腺癌近似分子亚型的临床意义[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2009, 30(4): 458-467.
[7] Diel IJ, Cote RJ. Bone marrow and lymph node assessment for minimal residual disease in patients with breast cancer[J]. Cancer Treat Rev, 2000, 26(1): 53-65.
[8] Mercatali L, Valenti V, Calistri D, et al. RT-PCR determination of maspin and mammaglobin B in peripheral blood of healthy donors and breast cancer patients[J]. Ann Oncol, 2006, 17(4): 424-428.
[9] 颜蕴文,张敬杰,徐晓军,等. 联合检测乳腺癌患者外周血中细胞角蛋白 19 及人乳腺球蛋白 mRNA 的意义[J]. 中华乳腺病杂志(电子版), 2010, 4(2): 45-49.
[10] Yenidunya S, Bayrak R, Haltas H. Predictive value of pathological and immunohistochemical parameters for axillary lymph node metastasis in breast carcinoma[J]. Diagn Pathol, 2011, 6(18): 1-9.
[11] 吴国球,张臣,孙宏伟,等. 建立人乳腺珠蛋白 mRNA FQ-PCR 方法用于乳腺癌微小转移的诊断[J]. 临床检验杂志, 2006, 24(2): 85-88.
[12] 吕赛平,邹学森. 人乳腺珠蛋白检测在乳腺癌诊断中的临床应用进展[J]. 实用癌症杂志, 2010, 25(3): 321-322.

(收稿日期:2012-10-22)

[4] 王淑梅,曹峻岭. 生活方式对骨矿物盐密度及骨质疏松症流行的影响和预警[J]. 国外医学:医学地理分册, 2009, 30(1): 23-24.
[5] Urbchat A, Obermuller N, Haferkamp A. Biomarkers of kidney injury. [J]. Biomarkers, 2011, 16(Suppl 1): S22-S30.
[6] Weinert LS, Camargo EG, Soares AA, et al. Glomerular filtration rate estimation: performance of serum cystatin C-based prediction equations. [J]. Clin Chem Lab Med, 2011, 49(11): 1761-1771.
[7] Inker LA, Okparavero A. Cystatin C as a marker of glomerular filtration rate: prospects and limitations[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2011, 20(6): 631-639.
[8] Zhang Y, Zhang Q. Bone morphogenetic protein-7 and Gremlin: New emerging therapeutic targets for diabetic nephropathy[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 383(1): 1-3.
[9] Rastogi N, Mitra K, Kumar D, et al. Metal ions as cofactors for aggregation of therapeutic peptide salmon calcitonin [J]. Inorg Chem, 2012, 51(10): 5642-5650.
[10] Chen L, Li Q, Yang Z, et al. Osteocalcin, glucose metabolism, lipid profile and chronic low-grade inflammation in middle-aged and elderly Chinese[J]. Diabet Med, 2012, 15(6): 482-491.

(收稿日期:2012-08-18)