

• 临床检验研究论著 •

新辅助化疗对乳腺癌血清小黏蛋白的影响*

姜专基¹, 张斌明¹, 杨碎胜¹, 田 英²

(1. 甘肃省肿瘤医院乳腺科, 甘肃兰州 730050; 2. 甘肃省肿瘤医院检验科, 甘肃兰州 730050)

摘 要:目的 研究新辅助化疗(NAC)对乳腺癌患者外周血 SBEM 的影响。方法 应用酶联免疫吸附法测定 164 例乳腺癌患者 NAC 前后、术后血清 SBEM 水平和下降率的变化。结果 NAC 对乳腺癌患者血清 SBEM 水平有显著影响,在化疗有效组中 NAC 后 SBEM 水平低于 NAC 前水平,差异有统计学意义($P < 0.01$)。而化疗无效组(效果为 SD、PD)NAC 前后血清 SBEM 水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。SBEM 的下降率与肿瘤最大径和临床化疗效果有关,而与临床分期、组织学分级、淋巴结状态、年龄、月经状态、基因分型、ER、PR、Her-2、P53、Ki-67 等无关。结论 血清 SBEM 水平变化与下降率是 NAC 常规疗效判断标准的有益补充,可作为判断乳腺癌患者病情发展和预后的新指标。

关键词:乳腺肿瘤; 人乳腺小黏蛋白; 新辅助化疗

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.12.006

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)12-1505-03

Influence of neoadjuvant chemotherapy on serum SBEM in breast cancer*

Jiang Zhuanji¹, Zhang Binming¹, Yang Suisheng¹, Tian Ying²

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

Abstract:Objective To study the effect of neoadjuvant chemotherapy(NAC) on small breast epithelial mucin(SBEM) in peripheral blood of patients with breast cancer. **Methods** Enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the level of SBEM and its descending rate before and after NAC and post-operation in 164 patients with breast cancer. **Results** The level of SBEM was significantly affected by NAC in the effect of NAC for complete response or partial response group, and the level of SBEM level after NAC was lower than that before NAC. There was statistically significant difference between the SBEM before NAC and that after NAC($P < 0.01$). While in the ineffective group(stable disease + progressive disease), the level of SBEM had no significant difference before and after NAC($P > 0.05$). The descending rate of SBEM level was related with the diameter of the tumor and the effect of NAC, but unrelated with other clinical parameters(clinical stage, histological grade, lymph node status, age, menstrual status, gene subtype, estrogen receptor, progesterone receptor, human epidermal growth factor receptor 2, p53, Ki-67). **Conclusion** Changes of the serum level of SBEM and its descending rate after NAC can be used as a useful complement for judging NAC effect, and it may be used as a new biological index for judging progression and prognosis.

Key words: breast neoplasm; small breast epithelial mucin; neoadjuvant chemotherapy

人乳腺上皮小黏蛋白(SBEM)是一种由 SBEM mRNA 编码的 90 个氨基酸组成的低相对分子质量唾液酸糖蛋白。该基因位于染色体 12q13.2 上,具有一个分泌肽链和 3 条 8 肽前后序列重复的疏水核心。SBEM 由 Miksicek 等^[1]于 2002 年首次在《Cancer Research》杂志上报道,利用公共序列表达的同位素标记技术和基因表达分析数据库筛选到 SBEM-mRNA 并证明其仅在乳腺和唾液腺组织中表达,而在前列腺、肺、卵巢和睾丸等组织不表达;故 SBEM 具有高度特异性,被认为是一个较好的乳腺癌候选肿瘤标志物,在乳腺癌临床应用中具有较高的潜在价值^[2-3]。本院采用酶联免疫吸附法(ELISA)对乳腺癌新辅助化疗(NAC)前后血清 SBEM 水平进行检测,探讨 SBEM 水平变化与 NAC 疗效的关系及其能否成为预测 NAC 疗效的生物学标志物,现报道如下。

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穿刺病理确诊的 164 例乳腺癌患者外周血标本。均为女性,年龄 27~77 岁,平均 46.9 岁,中位年龄 46 岁。ECOG 评分小于或等于 1 分。所有患者均无肝功能异常及免

疫系统疾病。组织学类型按照 WHO 乳腺癌组织学标准分类: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 UICC 2003 年乳腺癌分期标准:I 期 13 例,II 期 121 例,III 期 30 例。所有患者术前均行 NAC 4~6 周期,在化疗过程中均未因出现严重毒副反应而中断化疗。剂量依照 NCCN 指南辅助化疗方案实施,并不低于标准剂量 85%。

1.2 仪器与试剂 RT-6000 型全自动酶标仪,洗板机为美国 Rayto RT-3000 型,ELISA 法试剂盒购自上海拜力生物科技有限公司(美国进口分装)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 所有患者于化疗前、化疗后、术后第 7 天抽取空腹静脉血 3 mL 于真空采血管内,20 min 内以 3 000 r/min 离心 10 min 分离,−80 ℃冰箱保存待测。

1.3.2 实验操作 SBEM 测定采用 ELISA 法,检测步骤严格按照试剂盒说明书进行,ELISA 数据由全自动酶标仪读取,SBEM 单位为 ng/mL。乳腺癌基因分型依照 2007 年瑞士圣加仑乳腺癌会议参照免疫组化方法替代基因分型进行确定(Lu-

* 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:姜专基,男,主治医师,主要从事乳腺肿瘤基础及临床研究。

minal 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;基底样亚型;ER 与 PR 阴性、Her-2 阴性)。

1.3.3 NAC 临床疗效的判定标准 NAC 临床疗效判定标准为 RECIST 实体瘤近期疗效评定标准:完全缓解(CR),即所有靶病灶消失,无新病灶出现,至少维持 4 周;部分缓解(PR),即靶病灶最大径之和减少大于或等于 30%,至少维持 4 周;稳定(SD),即靶病灶最大径之和缩小未达 PR,或增大未达 PD;进展(PD),即靶病灶最大径之和至少增加大于或等于 20%,且其绝对值增加至少 5 mm,出现新病变也视为 PD。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,Shapiro-Wilk 法行正态分布检验, $P>0.05$ 为满足正态分布;Levene's test 行方差齐性检验, $P>0.05$ 为满足方差齐性。满足正态分布和方差齐性条件下结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较行方差分析,采用 LSD 法进行两两比较。在不符合正态分布和方差不齐条件下结果以中位数(四分位间距)[M(QR)]表示,采用非参数检验中的 Kruskal-Wallis 检验,两两比较采用 Mann-Whitney 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 NAC 对血清 SBEM 水平的影响 CR 组化疗后水平低于化疗前,术后水平亦低于化疗前,差异有统计学意义($P<0.05$),但化疗后与手术后水平无显著性差异($P>0.05$);PR 组化疗后水平显著低于化疗前,术后水平低于化疗前,术后水平低于化疗后水平,差异有统计学意义($P<0.05$);SD+PD 组术后水平低于化疗前和化疗后,差异均有统计学意义($P<0.05$),但化疗后水平与化疗前相比无统计学差异($P>0.05$),见表 1。

表 1 不同化疗效果人群 SBEM 水平变化比较

组别	<i>n</i>	化疗前	化疗后	术后	总体 <i>P</i> 值
CR	19	44.17(25.67)	24.06(7.09) ^a	24.53(7.24) ^c	0.000
PR	106	44.36(21.76)	33.51(13.77) ^{ab}	20.68(14.06) ^c	0.000
SD+PD	39	42.03(17.42)	36.11(14.93) ^b	22.79(7.22) ^c	0.000

^a: $P<0.05$,与化疗前比较;^b: $P<0.05$,与术后比较;^c: $P<0.05$,与化疗前比较。

2.2 SBEM 下降率和临床病理学指数的关系 SBEM 的下降率与肿瘤最大径和 NAC 化疗效果有关,与临床分期、组织学分级、淋巴结状态、年龄、月经状态、基因分型、ER、PR、Her-2、P53、Ki-67 等无关,见表 2。

表 2 SBEM 的下降率和临床指数之间的关系

临床指数	<i>n</i>	下降率[<i>n</i> (%)]	<i>Z</i>	<i>P</i>
临床分期	—	—	—1.801	0.072
I+Ⅱ期	134	25.46(23.68)	—	—
Ⅲ期	30	32.63(18.52)	—	—
组织学分级	—	—	—	0.352
G1	29	30.42(20.19)	—	—
G2	100	25.70(22.29)	—	—
G3	35	23.02(28.37)	—	—
淋巴结状况	—	—	—0.552	0.581
—	106	26.09(23.46)	—	—
+	58	29.49(22.08)	—	—

续表 2 SBEM 的下降率和临床指数之间的关系

临床指数	<i>n</i>	下降率[<i>n</i> (%)]	<i>Z</i>	<i>P</i>
肿瘤直径(cm)	—	—	—	0.004
size≤2	21	10.45(30.37)	—	—
2<size≤5	97	27.59(54.73)	—	—
size>5	46	29.46(17.12)	—	—
年龄(岁)	—	—	—	0.583
≤35	12	20.69(18.21)	—	—
>35~60	139	27.83(22.68)	—	—
>60	13	30.44(35.08)	—	—
月经状况	—	—	—1.138	0.255
绝经前	112	26.59(22.74)	—	—
绝经后	52	29.55(25.58)	—	—
基因分型	—	—	—	0.921
Luminal A 型	94	27.25(23.89)	—	—
Luminal B 型	20	27.58(23.12)	—	—
Her-2 阳性型	16	28.61(21.62)	—	—
基底样亚型	34	26.55(24.21)	—	—
P53	—	—	—1.168	0.243
—	64	27.19(27.60)	—	—
+	100	28.07(18.38)	—	—
Ki-67	—	—	—0.355	0.722
—	50	28.74(23.28)	—	—
+	114	25.55(23.06)	—	—
HER-2(IHC)	—	—	—0.473	0.636
— — + +	128	27.19(23.68)	—	—
+ + +	36	28.61(20.15)	—	—
ER	—	—	—1.587	0.112
—	53	31.45(20.52)	—	—
+	111	25.62(22.40)	—	—
PR	—	—	—0.472	0.637
—	73	27.48(21.15)	—	—
+	91	27.59(23.71)	—	—
化疗效果	—	—	—	0.000
CR	19	46.75(25.79)	—	—
PR	106	29.24(18.09)	—	—
SD+PD	39	9.93(18.58)	—	—

—:无数据。

3 讨 论

NAC 作为部分乳腺癌的标准治疗模式目前已越来越受重视,它可使肿瘤病灶降级降期,消灭亚临床播散病灶并有助于了解化疗方案敏感性。虽然大部分患者可以从 NAC 中获益,仍有少数对其无反应而延误治疗。故寻找能够预测新辅助化疗疗效的生物学位标记物是近年来的热点之一。

目前国内外学者多采用 PCR 法及免疫组化法对 SBEM 进行研究^[4-5],但采用 ELISA 法对血清 SBEM 进行检测报道少见。笔者采用 ELISA 法检测 NAC 前、后及手术后血清

SBEM 水平,结果提示血清 SBEM 水平变化与肿瘤负荷化疗效果之间具有密切关系。NAC 有效的直接效应为肿瘤细胞坏死,造成肿瘤负荷减轻。效果为 CR 患者的肿瘤负荷下降更为明显可能是血清 SBEM 水平降低更为显著的直接原因。手术后 3 组间血清 SBEM 水平无显著性差异,可能与病灶切除后肿瘤负荷降至较为一致水平有关。

肿瘤最大径间接反映肿瘤负荷,直径愈大则肿瘤体积愈大、肿瘤细胞数目愈多、肿瘤细胞 SBEM 释放入血的概率愈高,在对 SBEM 的下降率进行分层分析时发现,NAC 后血清 SBEM 下降率与肿瘤最大径和 NAC 效果有关,直径愈大 SBEM 下降率愈高,这也说明体积愈大的肿瘤从新辅助化疗中获益的概率愈高,故对于肿瘤负荷较大的患者更应实施 NAC。NAC 后 SBEM 下降率与临床分期、组织学分级、淋巴结状态、年龄、月经状态、基因分型、病理学类型、ER、Her-2、P53、Ki-67、基因分型等无关,提示 SBEM 下降率可能为独立于上述因素的可以反映 NAC 效果的分子标志物。此外在研究时发现,随临床分期升高,NAC 后 SBEM 下降率有增加趋势,但差异无统计学意义,需增加病例数进一步研究。

Miksicek 等^[1]将 SBEM 用于检测乳腺癌骨髓孤立肿瘤细胞,结果显示:SBEM 在 ER(+)、分化较好的“Luminal 亚型”MCF-7、T-47D 和 ZR-75-1 乳腺癌细胞中有表达,但在 ER(-)、分化较差的“基底样亚型”MDA-MB-231 乳腺癌细胞中无表达,并在 ER(-)的亚组中显示出预后价值^[6]。但本研究未发现 SBEM 水平及其下降率在不同分子分型乳腺癌中的差异,有待于进一步积累病例研究明确。

综上所述,血清 SBEM 水平变化与 NAC 化疗反应性有关,可作为 NAC 疗效评价的一个有益补充,指导个体化治疗

方案的制定。但血清 SBEM 水平及 NAC 后 SBEM 下降率能否作为乳腺癌预后的判断因素及 SBEM 与乳腺癌微转移的关系有待于进一步研究明确。相信随着临床研究和医学转化性研究的不断深入,SBEM 在乳腺癌疗效预测及预后中的价值会得到进一步证实。

参考文献

- [1] Miksicek RJ, Myal Y, Watson PH, et al. Identification of a novel breast and salivary gland-specific, mucin-like gene strongly expressed in normal and tumor human mammary epithelium[J]. Cancer Res, 2002, 62(10): 2736-2740.
- [2] Liu ZZ, Xie XD, Qu SX, et al. Small breast epithelial mucin (SBEM) has the potential to be a marker for predicting hematogenous micrometastasis and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer[J]. Clin Exp Metastasis, 2010, 27(4): 251-259.
- [3] 刘兆喆, 郭放, 李兵, 等. SBEM 和 hMAM 在乳腺癌中的表达及临床意义[J]. 临床肿瘤学杂志, 2012, 17(9): 809-813.
- [4] Skliris GP, Hubé F, Gheorghiu I, et al. Expression of small breast epithelial mucin(SBEM) protein in tissue microarrays (TMAs) of primary invasive breast cancers[J]. Histopathology, 2008, 52(3): 355-369.
- [5] 陈忠, 陈聆, 孟凡祥, 等. 乳腺癌患者外周血 SBEM mRNA 的表达及意义[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(19): 2327-2328.
- [6] 崇梅红, 王水, 查小明, 等. 实时荧光定量 PCR 法检测乳腺癌外周血循环肿瘤细胞的临床价值[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2012, 32(2): 220-225.

(收稿日期: 2012-12-24)

(上接第 1504 页)

参与细胞转化、细胞分化、凋亡及细胞周期调控^[2-3],并与多种肿瘤的形成相关。在前期研究中,利用 RNA 干扰技术将胃黏膜 GES-1 细胞中 MYCT-1 基因沉默,发现 MYCT-1 表达降低虽然不能直接导致正常胃黏膜细胞恶性转化,但引起胃癌细胞增殖减慢,凋亡增加,细胞周期 S 期延长,提示 MYCT-1 基因的功能可能是抑制细胞 DNA 合成^[1]。

慢病毒载体是以人类免疫缺陷型病毒(HIV)为基础发展起来的基因治疗载体系统,它能高效地将目的基因导入动物和人的原代细胞或细胞系中,对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力。慢病毒载体基因组是正链 RNA,其进入细胞后,在细胞质中被其自身携带的反转录酶反转录,形成 DNA 整合前复合体,进入细胞核后,DNA 整合到细胞基因组中。整合后的 DNA 转录 mRNA,回到细胞质中,表达目的蛋白。因目的基因整合到宿主细胞基因组中,并随细胞基因组的分裂而分裂,因此慢病毒载体介导的基因表达作用持续且稳定,且感染效率高,能够被浓缩成高滴度,不易诱发宿主免疫反应,可在体内长期表达,具有安全性好等优点,优于腺病毒和逆转录病毒^[4],已成为当前基因转移载体研究的热点^[5]。

本研究所采用的慢病毒载体系统由 GV218 载体、pHelper1.0 载体及 pHelper2.0 载体三质粒组成。其中 GV218 载体是进行基因重组的靶载体;pHelper1.0 载体提供编码病毒所

需的结构蛋白和特异性酶;pHelper2.0 载体则提供包装病毒所需的包膜蛋白。本实验将 MYCT-1 基因与酶切后的慢病毒载体进行定向连接,成功构建出 MYCT-1 重组慢病毒表达载体,并通过三质粒共转染 293T 细胞成功包装慢病毒,获得可供后续实验转染用的滴度,为后续的动物实验及进一步研究该基因在肿瘤治疗及发生中的作用奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] 梅旭, 刘政, 邱广斌. MYCT-1 基因真核表达载体的构建及鉴定[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(8): 1161-1162.
- [2] 林源, 刘绍平, 罗汉传, 等. VEGF, p53, P21WAF/CIP1 和 C-myc 蛋白表达与肝细胞癌预后关系的研究[J]. 中国普通外科杂志, 2009, 18(8): 873-876.
- [3] 艾金霞. SBHL 对 HeLa 细胞 c-myc, H-ras 和 hTERT 基因表达的研究[J]. 北华大学学报: 自然科学版, 2009, 10(4): 319-321.
- [4] 黄学兰, 徐广贤, 贾伟, 等. 小鼠 miRNA-203 慢病毒过表达载体的构建及病毒包装与滴度测定[J]. 宁夏医科大学学报, 2011, 33(7): 605-608.
- [5] Dreyer JL. Lentiviral vector-mediated gene transfer and RNA silencing technology in neuronal dysfunctions[J]. Methods Mol Biol, 2010, 614: 3-35.

(收稿日期: 2012-12-18)