

原发性乳腺癌组织中人乳腺珠蛋白的表达及意义

黄 雄¹,马 桢¹,谢文彪²

Expression and Significance of Human Mammaglobin in Primary Breast Cancer

HUANG Xiong¹,MA Zhen¹,XIE Wen-biao²

1. Department of General Surgery, Qingpu Centre Hospital, Shanghai 201700, China; 2. Department of Surgical Oncology, The Second Affiliated Hospital of Nanhua University
Corresponding Author: XIE Wen-biao, E-mail: XWB7317@sina. cn

Abstract: Objective To confirm whether hMAM is a mammary-specific marker, and to investigate the relationship between the hMAM expression and the clinicopathologic characteristics, and to estimate the prognostic value of hMAM. **Methods** One hundred and Forty-two primary breast cancer patients between 1996 to 2003, 103 various organ tumors, 30 normal breast tissues and 30 benign breast tumors were analyzed by immunohistochemical assay. **Results** hMAM was detected in 70. 4% primary breast cancer patients, and its expression was associated with positive expression of ER, but not with age, pathologic type, HER2 status, tumor size, clinicopathologic stage, or PR status. Kaplan-Meier survival analysis explored a significant difference between hMAM-positive and hMAM-negative expression, and the former had a better outcome. COX multivariate analysis revealed that pathologic stage, ER expression, age and hMAM significantly and independently affect overall survival. **Conclusion** hMAM was highly expressed in breast cancer patients and have an ideal sensitivity and specificity. Survival curve revealed that hMAM was a independent prognostic factor for primary breast cancer patient's outcome.

Key words: Human mammaglobin; Primary Breast Cancer; Prognosis

摘 要:目的 研究人乳腺珠蛋白(hMAM)在乳腺组织中表达的特异性, hMAM 的表达与各临床病理特征以及与乳腺癌预后的关系。**方法** 运用免疫组织化学的方法分析 142 例原发性乳腺癌组织, 103 例其他肿瘤组织, 30 例正常乳腺组织, 30 例乳腺良性肿瘤中的 hMAM 表达情况, 并结合乳腺癌患者的临床病理资料和生存情况进行分析。**结果** hMAM 只在乳腺组织中表达, 在原发性乳腺癌中有 70. 4% 的阳性表达。hMAM 的表达与年龄、临床分级分期、肿块大小、腋淋巴结状态、病理类型、PR、HER2 状态均无相关性, 与 ER 呈正相关。生存分析显示, hMAM 阳性患者预后明显好于 hMAM 阴性患者, Cox 回归示年龄、临床分期、ER、hMAM 状态均对乳腺癌的术后生存时间有影响。**结论** hMAM 具有理想的乳腺组织表达特异性, 在原发性乳腺癌组织中有较高的表达率同时具备较高的敏感度和特异性。生存分析显示 hMAM 可以作为评估原发性乳腺癌患者预后的重要参考指标。

关键词:人乳腺珠蛋白;原发性乳腺癌;预后

中图分类号:R737. 9 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8578(2010)06-0667-04

0 引言

人乳腺珠蛋白(human mammaglobin, hMAM)是 1996 年美国学者 Fleming 及 Waston^[1]利用差式筛选和 cDNA 末端扩增技术发现的具有高度乳腺组织表达特异性的新兴的肿瘤标志物, 本文利用免

疫组织化学的方法回顾性分析了 hMAM 在原发性乳腺癌组织中的表达及临床意义, 并对其预后价值作了初步的探讨。

1 资料和方法

1. 1 一般资料

142 例原发性乳腺癌标本选自湖南省南华大学附属第二医院 1996~2003 年间接接受手术并有完整临床病理资料的女性患者。其中原位癌 7 例, 浸润性导管癌 112 例, 浸润性小叶癌 20 例, 其他类型(包括髓样癌、腺癌等)3 例; 平均年龄 49. 6 岁; 临床分期

收稿日期:2009-01-19;修回日期:2009-08-05
作者单位:1. 201700 上海, 复旦大学附属中山医院青浦分院普外科; 2. 南华大学附属第二医院肿瘤外科
通信作者:谢文彪, E-mail: XWB7317@sina. cn
作者简介:黄雄(1978-)男, 硕士, 主治医师, 主要从事普外肿瘤临床研究

0 期 7 例,Ⅰ期 10 例,Ⅱ期 52 例,Ⅲ期 55 例,Ⅳ期 18 例;伴腋淋巴结转移的乳腺癌 110 例;ER 阳性 78 例;PR 阳性 77 例;HER-2 阳性 77 例。其中 60 例患者术前均未进行辅助放化疗,术后进行了同一方案化疗和(或)内分泌治疗(根据患者的 ER,PR 受体情况而定),且具有完整的术后随访资料。另外选取了 30 例乳腺良性肿瘤标本,30 例正常乳腺上皮(副乳)标本,103 例其他恶性肿瘤组织标本。

1.2 试验试剂及方法

鼠抗人 hMAM 单克隆抗体(0.5 ml,浓缩型)购自 Bioprime®公司(德国);二抗购自长岛公司 Super-Vision™试剂盒。一抗的最佳稀释工作浓度经多次预实验探索为 1:50。采用二步法 SuperVision,使用微波抗原热修复,抗原修复液为 pH 6.0 的柠檬酸缓冲液,PBS 缓冲液代替一抗作阴性对照,经 DAB 显色,苏木精对比染色后,中性树胶封片。

1.3 染色标准

乳腺癌组织中的 hMAM 染色分度标准为:阴性:无细胞染色或少于 5%的肿瘤细胞胞质染色阳性;阳性:大于 5%的肿瘤细胞胞质染色阳性。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计软件, Pearson χ^2 检验与秩检验分析 hMAM 表达与各临床病理因素之间的关系,若有统计学意义则作 Spearman 相关系数和 Kappa 一致性检验,总生存率(OS)定义为手术后至死亡或最后一次随访时的状态,以月为单位表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hMAM 在人体常见恶性肿瘤组织中的表达情况

在 20 例中枢神经系统恶性肿瘤、11 例甲状腺癌、9 例肺癌(小细胞与非小细胞)、33 例消化系统恶性肿瘤、20 例女性生殖系统恶性肿瘤以及 10 例泌尿系统恶性肿瘤中未见 hMAM 的阳性表达。

2.2 hMAM 在乳腺组织中的表达情况

hMAM 在 30 例正常乳腺上皮(副乳)中有 1 例弱阳性表达,在 30 乳腺良性肿瘤中有 2 例弱至中等强度阳性表达,两者的表达差异无统计学意义($P = 0.554$)。在 142 例乳腺癌中有 100 例阳性表达,其表达明显高于前两者($P = 0.000$),见图 1。

2.3 hMAM 表达与乳腺癌临床病理特征的关系

hMAM 的表达与年龄、原发灶大小、腋窝淋巴结状态、组织学分级、临床分期、病理类型,PR 状态、HER2 状态均无相关性,见表 1。ER 受体状态与 hMAM 表达之间差异存在统计学意义($P = 0.008$)。

ER 阳性比 ER 阴性的患者有更高的 hMAM 阳性表达率,两者的 Spearman 相关系数为 0.219,呈正相关。但平行效度检验 Kappa 值仅为 0.208,两者一致性欠佳,见表 2。

表 1 hMAM 表达与乳腺癌临床病理特征的关系
Table 1 Clinicopathological features of primary breast cancers according to hMAM expression

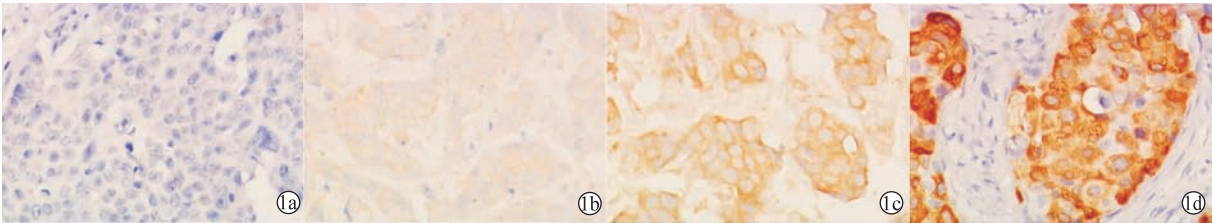
Clinicopathological features		n	hMAM expression		
			positive	%	P
Age distribution	<40	44	32	72.7	0.423
	≥40	98	68	69.4	
Tumor size	≤2 cm	19	11	57.9	0.178
	2~5 cm	77	59	76.6	
	>5 cm	46	30	65.0	
Axillary lymph status	Negative	32	20	62.5	0.184
	Positive	110	80	72.7	
Histological grade	Grade I	17	10	58.8	0.406
	Grade II	78	58	74.4	
	Grade III	47	32	68.1	
Clinical stage	Grade 0	7	4	57	0.198
	Grade I	10	5	50	
	Grade II	52	40	77	
	Grade III	55	41	75	
Tumor type	Grade IV	18	10	56	0.482
	DCIS	7	5	71.4	
	Invasive ductal	112	81	72.3	
	Invasive lobular	20	13	65	
PR status	Others	3	1	33.3	0.057
	Negative	65	41	63.1	
	Positive	77	59	76.6	
HER2 status	Negative	65	43	66.2	0.200
	Positive	77	57	74	

表 2 hMAM 的表达与 ER 的关系
Table 2 Relationship of expression between hMAM and ER status

	n	hMAM positive	(%)	P	spearman	Kappa
ER-negative	64	38	59.4	0.008 ($P = 0.009$)	0.219 ($P = 0.009$)	0.208 ($P = 0.009$)
ER-positive	78	62	79.5			

2.4 hMAM 对乳腺癌患者生存预后的影响

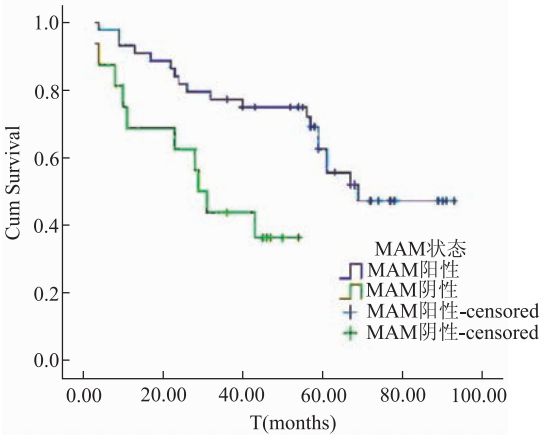
对 hMAM 不同表达的乳腺癌患者生存时间作单因素 Kaplan-Meier 统计显示:hMAM 表达阳性的患者其预后或生存期明显好于 hMAM 阴性患者,Log-rank 检验两者差异有统计学意义($\chi^2 = 8.318$, $P = 0.004$),见图 2。我们将年龄、肿瘤类型、临床分期、ER、PR、HER2、hMAM 状态进行两分法处理后,纳入



1a: Negative stain; 1b: Weak positive stain; 1c: Medium positive stain; 1d: Strong positive stain

图 1 乳腺癌组织中 hMAM 表达 (SuperVision×400)

Figure 1 hMAMexpression in primary breast cancer by immunohistochemical method(SuperVision×400)



Patients with hMAM-positive breast cancer had longer survival time than hMAM-negative breast cancer patients

图 2 K-M 生存曲线图 (SuperVision×400)

Figure 2 Kaplan - Meier curve (SuperVision×400)

Cox 比例风险模型分析,协变量赋值,见表 3。0 定义为乳腺癌预后的不利因素,1 定义为有利的预后因素。结果显示年龄、临床分期、ER 受体状态、hMAM 状态均对生存有贡献,见表 4。

表 3 Cox 分析协变量的赋值
Table 3 Definition of Cox's covariates

Covariate	Value	
Age	0 <40	1 ≥40
Clinical stage	0 III /IV	1 I / II
Tumor type	0 Invasive ductal	1 Non-invasive ductal
PR-status	0 Negative	1 Positive
HER2-status	0 Positive	1 Negative
hMAM-status	0 Negative	1 Positive
ER-status	0 Negative	1 Positive

表 4 Cox 统计分析结果
Table 4 Multivariate Cox Regression Analysis Result

	B	SE	Wald	Sig.	EXP(B)
Age	- 1. 526	0. 499	9. 360	0. 002	0. 217
Clinical stage	- 2. 057	0. 860	5. 721	0. 017	0. 128
hMAM status	- 0. 973	0. 482	4. 070	0. 044	0. 378
ER status	- 3. 665	0. 975	14. 132	0. 000	1. 026

3 讨论

3.1 hMAM 的乳腺组织表达特异性及可能的治疗应用前景

本研究中 103 例其他组织来源的肿瘤无一例表达 hMAM, 这与国外采用 RT-PCR 技术研究所得的结论相一致^[2]。而在乳腺组织中, hMAM 绝大部分表达于乳腺癌, 在良性乳腺肿瘤与正常乳腺上皮仅有少量弱至中等的表达。进一步分析显示, 免疫组织化学法测定 hMAM 诊断乳腺癌的灵敏度为 70. 4%, 漏诊率为 29. 6%, 特异度为 95%, 误诊率为 5%。正确诊断指数 (Youden Index) 为 65. 4%, 以上这些数据表明 hMAM 是迄今为止最理想的乳腺癌诊断方面的肿瘤学指标, 其敏感度及特异性均好于目前临床应用较多的 ER 与 PR 指标。hMAM 与病理的 Kappa 一致性检验为 0. 551, 说明两者在诊断乳腺癌方面一致性较好, 故免疫组织化学法检测 hMAM 可以为乳腺癌的诊断以及鉴别诊断提供重要参考, 特别是在诊断乳腺组织来源的转移癌有困难时: Eiichi Sasaki 等^[3]通过对 10 例已经确认的乳腺癌肺转移标本进行 hMAM 表达情况分析, 结果显示其中 6 例可见 hMAM 表达。由于业已证实 hMAM 在原发性肺癌组织中不表达 (我们的结果也支持这一结论), 故采用免疫组织化学法检测 hMAM 的表达, 有助于组织来源不明的转移性肿瘤的鉴别诊断。

目前对于 hMAM 是否只在乳腺癌中表达还是存在一些争议。Jae-Ho Han 等^[4]运用 RT-PCR 和多克隆抗体为基础的免疫组织化学分析发现 hMAM 在乳腺癌中有 84. 3% 的表达, 但是在非乳腺癌 (包括肺癌、甲状腺、子宫内膜、卵巢癌等) 中亦有 15% 的阳性表达。究其原因, 可能为当时的研究者对 Mammaglobin B 基因认识不够所致。Mammaglobin B 是用序列标记测定的一种新基因, 该基因与原来发现的 hMAM 基因高度同源, 原位荧光杂交显示 Mammaglobin B 和 hMAM 基因紧紧相邻于染色体 11q13, 也属于子宫珠蛋白超家族, 但是 Mammaglobin B 的表达缺乏乳腺组织特

异性,更多见于女性生殖系统尤其是子宫^[5]。而我们研究所用是重组纯化的商品化单克隆抗体,可以很好地区分 hMAM 与 Mammaglobin B 蛋白(目前 hMAM 与 Mammaglobin B 的单克隆抗体均已面世),从而提高试验精度,减少了试验的假阳性。

hMAM 高特异性乳腺组织表达的特性,不但为乳腺癌的诊断与鉴别诊断提供了重要参考,更为乳腺癌的靶向治疗提供了可能。有人提出^[6]利用 hMAM 表达的乳腺组织特异性,将 hMAM 基因启动子区域与凋亡诱导基因 Bax 进行基因重组,使 Bax 基因的表达仅受 hMAM 基因启动子区域的调控,从而进一步调控 hMAM 阳性表达的乳腺癌及部分正常乳腺上皮细胞的凋亡诱导过程,从而达到靶向杀伤作用,同时乳腺的脂肪组织及乳腺基质成分却不受其影响。而我们的研究结果,将为这种以 hMAM 介导的生物化学乳房切除术(Biochemical Mastectomy)应用于临床提供重要的参考。

3.2 hMAM 在乳腺癌中的预后价值

我们选取了 60 例相对匹配的患者资料进行生存分析,患者均为初次发病,术前无辅助放化疗,术后进行了同一方案化疗和(或)内分泌治疗(根据患者的 ER,PR 受体情况而定)。结果显示,hMAM 阳性的患者生存期明显好于 hMAM 阴性患者(Log-rank 检验 $P = 0.004$)。进一步将年龄、病理类型、临床分期、ER、PR、HER2 和 hMAM 状态七种因素进行多因素半定量生存分析,初步探讨了 hMAM 的预后价值。结果显示年龄、临床分期、ER、hMAM 状态均对生存有影响($P < 0.05$),其相对危险度分别为:0.217,0.128,1.026,0.378。对应的回归系数分别为:-1.526,-2.057,-3.665,-0.973(回归系数为负值与协变量的赋值有关)。通过 COX 回归分析,可以看出:年龄大于等于 40 岁,临床分期为 I/II 期,hMAM 表达阳性,ER 表达阳性的乳腺癌患者预后更好,有更长的生存期。

目前大部分的研究结果均显示 hMAM 对乳腺癌是一种保护性因素,hMAM 阳性的患者预后明显好于阴性患者^[7-8]。这为我们在制定术后辅助治疗方案及随访方面提供了重要的参考。

利用 hMAM 的理想的乳腺组织表达特异性,

借助于目前成熟的 hMAM 商品化单克隆抗体,应用便捷、快速的免疫组织化学染色方法,将可以广泛地应用于乳腺癌的早期诊断^[9]、鉴别诊断、判断预后、制定后期治疗方案以及乳腺癌的靶向治疗^[6,10]等方面。

参考文献:

[1] Waston MA, Fleming TP, Dintzis S, et al. Mammaglobin expression in primary, metastatic, and occult breast cancer[J]. Cancer Res, 1999, 59(13):3028-3031.

[2] Koga T, Horio Y, Mitsudomi T, et al. Identification of hMAM as a marker in the differential diagnosis of lung tumors in patients with a history of breast cancer by analysis of publicly available SAGE data[J]. J Mol Diagn, 2006, 8(3):391-393.

[3] Eiichi Sasaki, Nobuyuki Tsunoda, Yasushi Yatabe, et al. Breast-specific expression of MGB/mam-maglobin; an examination of 480 tumors from various organs and clinicopathological analysis of MGB-positive breast cancers[J]. Modern Pathology, 2007, 20(2):208-214.

[4] Jae-Ho Han, Yup Kang, Shin HC, et al. Mammaglobin expression in lymph nodes is an important marker of metastatic breast carcinoma[J]. Arch Pathol Lab, 2003, 127(10):1330-1334.

[5] Colpitts TL, Billing P, Granados E, et al. mammaglobin complexes with BU 101 in breast tissue[J]. Ann N Y Acad Sci, 2000, 923:312-315.

[6] Goedegebuure PS, Watson MA, Viehl CT, et al. mammaglobin-based strategies for treatment of breast cancer[J]. Current Cancer Drug Targets, 2004, 4(6):531-542.

[7] Pier Francesco Ferrucci, Cristina Rabascio, Chiara Mazzetta, et al. Mammaglobin Expression in Leukapheresis Products Is a Predictive Marker of Poor Prognosis in Women with High-Risk Breast Cancer[J]. Clinical Cancer Research, 2004, 10(18pt1):6039-6046.

[8] Paul N. Span, Esm Waanders, Peggy Manders, et al. Mammaglobin Is Associated With Low-Grade, Steroid Receptor Positive Breast Tumors From Postmenopausal Patients, and Has Independent Prognostic Value for Relapse-Free Survival Time[J]. Journal Of Clinical Oncology, 2004, 22(4):691-698.

[9] Wang Z, Spaulding B, Sienko A, et al. Mammaglobin, a valuable diagnostic marker for metastatic breast carcinoma[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2009, 2(4):384-389.

[10] Zuo L, Li L, Wang Q, et al. Mammaglobin as a potential molecular target for breast cancer drug delivery[J]. Cancer Cell Int, 2009, 9:8.

[编辑:周永红;校对:刘红武]