

303-305.

【基础研究】

通信作者:王建国(1964-),男,河南新乡人,硕士,教授,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:肝胆胰脾疾病;E-mail:565078808@qq.com。

control, UICC)第7版的肿瘤淋巴结转移(tumor node metastasis, TNM)分期,其中Ⅰ期10例,Ⅱ期24例,Ⅲ期16例;病理组织学分级按世界卫生组织推荐分级法,Ⅰ级13例,Ⅱ级22例,Ⅲ级15例;淋巴结转移者30例,无淋巴结转移者20例。

1.2 标本收集 取所选乳腺癌患者术中切除的癌组织、癌旁5 cm 正常乳腺组织各2块,编号后分为2份,1份液氮速冻后放入-80℃冰箱保存,1份中性甲醛固定后做石蜡包埋处理。

1.3 主要试剂 组织RNA提取试剂盒及二步法RT-PCR试剂盒均购自北京康为世纪公司;兔抗人HPSE多克隆抗体购于英国Abcom公司;免疫组织化学试剂盒购自上海基因科技公司。

1.4 RT-PCR检测组织中HPSE mRNA表达 取15 mg组织在液氮保护下研磨,使用组织RNA提取试剂盒提取总RNA,然后在质量分数2%琼脂糖凝胶中电泳,将凝胶移至紫外照射仪下,以300 nm紫外光照射下进行观察,验证RNA的完整性,并进行RNA定量。HPSE上游引物:5'-ATCAATGGGTCGCAGT-TAGG-3',下游引物:5'-AAAGGTGTCGGATAG-CAAGG-3',扩增片段长度369 bp;采用β-actin作为内参对照,上游引物:5'-AGCGAGCATCCCCAAA-GTT-3',下游引物:5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3',扩增片段长度285 bp。以上引物均由上海生工生物工程有限公司合成。反应条件:37℃反转录60 min,95℃预变性5 min,90℃变性30 s,57℃退火30 s,72℃延伸30 s,循环40次,最后再72℃延伸5 min。取5 μL扩增产物于质量分数1.5%琼脂糖凝胶中电泳,DNA凝胶成像扫描进行摄像。

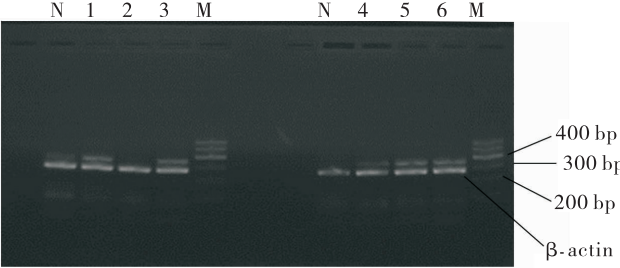
1.5 免疫组织化学法测定HPSE表达 蜡块切成4 μm厚的连续组织切片,常规脱蜡至水,体积分数0.3%过氧化氢浸泡15 min,以阻断内源性过氧化物酶。0.01 mol·L⁻¹磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)冲洗3次,每次5 min,0.01 mol·L⁻¹柠檬酸盐抗原修复液微波抗原修复;体积分数5%牛血清蛋白常温封闭20 min;余按试剂盒说明书步骤操作(一抗稀释度1:100,4℃过夜),二氨基联苯胺显色,苏木精复染。用PBS替代一抗作为阴性

对照,用已知阳性切片作为阳性对照。结果判定:以细胞膜和(或)细胞质中出现棕黄色颗粒为阳性显色,以染色强度和阳性细胞比例评定阳性表达。每张切片随机选10个高倍视野(×400)各计数100个细胞。阳性细胞数计分方法:阳性细胞数≤50%为0分,51%~75%为1分,≥76%为2分;染色强度分级如下:无着色为0分,淡黄色为1分,黄色及更深颜色为2分。2项得分相加结果≥2分为阳性表达。

1.6 统计学处理 应用SPSS 19.0软件进行统计分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用t检验,计数资料比较采用 χ^2 检验,相关性检验采用Spearman等级相关分析法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌组织及癌旁正常组织中HPSE mRNA表达 乳腺癌组织中HPSE mRNA表达阳性率为70.0%(35/50),癌旁正常组织中HPSE mRNA表达阳性率为25.0%(5/20),乳腺癌组织中HPSE mRNA表达阳性率高于癌旁正常组织($P < 0.01$)。内参基因β-actin扩增产物在所有组织中均有稳定表达(图1)。

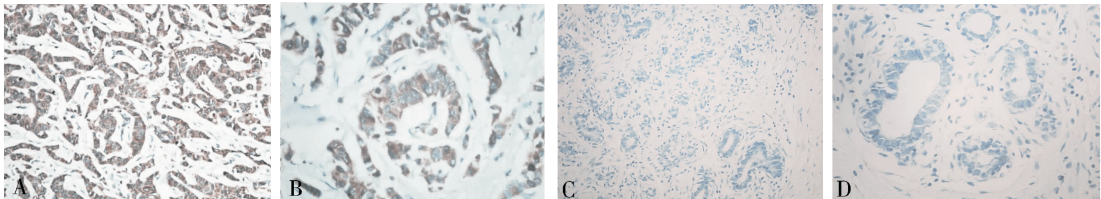


M:Marker;1~6:乳腺癌组织;N:癌旁正常乳腺组织。

图1 HPSE mRNA电泳图

Fig.1 Electropherogram of HPSE mRNA

2.2 乳腺癌组织及癌旁正常组织中HPSE蛋白表达 结果见图2。免疫组织化学检测结果显示,HPSE主要在癌细胞的细胞质及细胞膜内呈颗粒状表达。50例乳腺癌组织中HPSE蛋白阳性表达34例,阳性率为68.0%;而20例癌旁正常组织未见HPSE蛋白阳性表达,阳性率为0.0%。HPSE蛋白中在乳腺癌组织的阳性表达率高于癌旁正常组织($P < 0.01$)。



A:乳腺癌组织(×200);B:乳腺癌组织(×400);C:癌旁正常组织(×200);D:癌旁正常组织(×400)。

图2 乳腺癌组织和癌旁正常组织中HPSE蛋白阳性表达(免疫组织化学染色)

Fig.2 Positive expression of HPSE protein in breast carcinoma and normal breast tissue(immunohistochemical staining)

2.3 HPSE mRNA 和蛋白表达与乳腺癌临床病理特征的关系 结果见表 1。HPSE mRNA 和蛋白与乳腺癌组织学分级、TNM 分期、淋巴结转移相关 ($P<0.05$)。

表 1 HPSE 表达在乳腺癌组织中表达情况与临床病理特征的关系

Tab.1 Relationship among clinicopathological parameters and expression of HPSE

临床病理特征	<i>n</i>	HPSE mRNA 阳性表达/例	<i>P</i>	HPSE 蛋白 阳性表达/例	<i>P</i>
年龄					
≤50 岁	26	20	>0.05	19	>0.05
>50 岁	24	15		15	
肿瘤直径					
≤2 cm	13	6	<0.05	5	<0.01
>2 cm	37	29		29	
组织学分级					
I + II	35	20	<0.05	20	<0.05
III	15	15		14	
TNM 分期					
I + II	34	19	<0.01	18	<0.01
III	16	16		16	
淋巴结转移					
是	30	25	<0.05	25	<0.01
否	20	10		9	

3 讨论

中国城乡女性乳腺癌的发病呈逐年上升趋势,乳腺癌城乡病死率持续上升,农村上升速度更快^[5]。目前对乳腺癌的治疗除传统的手术、放射及化学治疗外,分子靶向治疗已逐渐成为临床重要而有效的辅助治疗手段。研究发现,HPSE 具有促进肿瘤转移和肿瘤血管生成的作用,可以作为评估肿瘤侵袭转移能力的标志物,并可能成为肿瘤治疗的新靶点^[6]。

ECM 及基底膜是限制肿瘤细胞向外周循环转移的首要屏障,HPSE 是目前发现的唯一一种能切断 ECM 内蛋白多糖主要成分硫酸乙酰肝素蛋白聚糖上的线性硫酸乙酰肝素侧链的内切糖苷酶,通过破坏 ECM 及基底膜的完整性,使肿瘤细胞更容易进入邻近组织或血液、淋巴循环系统。肿瘤持续生长和侵袭转移离不开肿瘤新生血管的营养供应,HPSE 在降解 ECM 过程中,释放以无活性形式与硫酸乙酰肝素相结合的 β-成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF),此外,被固化在硫酸乙酰肝素蛋白聚糖上无活性的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)在此过程中也得到释放并被激活,与 bFGF 共同诱导肿瘤血管生成,HPSE 也可直接促进血管内皮细胞的芽生和侵袭性生长^[7]。已有大量研究证明 HPSE mRNA 及蛋

白在多种恶性肿瘤中高表达,且对肿瘤扩散及转移具有促进作用^[8]。

既往实验主要是对肿瘤组织中 HPSE mRNA 和蛋白分别进行检测,同时检测 mRNA 和蛋白的表达并对二者相关性进行分析少见报道。本实验应用 RT-PCR 技术对癌组织及癌旁正常乳腺组织检测发现,乳腺癌组织 HPSE mRNA 阳性表达率显著高于癌旁正常组织,与任小龙等^[9]在胃癌组织中的研究结果一致。本实验显示 HPSE mRNA 与肿瘤大小、组织学分级、TNM 分期、淋巴结转移相关,与患者年龄无关。进一步应用免疫组织化学法对乳腺癌及癌旁正常组织中 HPSE 蛋白的表达水平进行分析,乳腺癌组织 HPSE 蛋白表达阳性率明显高于癌旁正常组织,且与肿瘤大小、组织学分级、TNM 分期及淋巴结转移相关,结果与 Tang 等^[10]报道一致,表明乳腺癌组织中 HPSE 的高表达促进了乳腺癌的侵袭与转移,检测 HPSE 有助于评估肿瘤的生物特性。

综上所述,HPSE mRNA 及其蛋白在乳腺癌中高表达,且与肿瘤的侵袭转移有关,可以作为乳腺癌治疗的靶点及判断肿瘤生物学特性的标志物。如果能抑制 HPSE 的表达,就有可能限制肿瘤的生长及转移,提高乳腺癌患者的生存率。

参考文献:

[1] 范银亮,戚麟. 阴性乳腺癌的诊断与资料方案探讨[J]. 医药论坛杂志,2011,32(11):38-39.

[2] 周怀龙,黎才海,李其云. 乙酰肝素酶在肿瘤侵袭、转移及治疗作用中的研究进展[J]. 实用癌症杂志,2010,25(1):104-106.

[3] 于方舟,王利东,孙小单. HPSE-1 与乳腺癌[J]. 中国中医药咨讯,2010,2(10):176-177.

[4] 黄琴,张清富,陈莉,等. 乳腺癌乙酰肝素酶、bFGF、VEGF 的表达及其与肿瘤血管生成的关系[J]. 中国组织化学与细胞学杂志,2008,17(2):180-185.

[5] 李霓,郑荣寿,张思维,等. 中国城乡女性乳腺癌发病趋势分析和预测[J]. 中华预防医学杂志,2012,46(8):703-707.

[6] González-Alva P, Kikuchi K, Miyazaki Y, et al. Expression of Heparanase: a possible role in invasiveness and aggressive clinical behavior of ameloblastomas[J]. J Oral Sci,2010,52(1):39-47.

[7] Zetser A, Bashenko Y, Edovitsky E, et al. Heparanase induces vascular endothelial growth factor expression: correlation with p38 phosphorylation levels and Src activation[J]. Cancer Res,2006,66(3):1455-1463.

[8] 刘嘉琳,倪志. 乙酰肝素酶与肿瘤侵袭转移[J]. 海南医学院学报,2007,13(1):75-78.

[9] 任小龙,朱任之,王丽京,等. 乙酰肝素酶 mRNA 表达和血管生成与胃癌发展的关系[J]. 中华肿瘤杂志,2003,25(4):368-371.

[10] Tang D, Piao Y, Zhao S, et al. Expression and correlation of matrix metalloproteinase-9 and heparanase in patients with breast cancer[J]. Med Oncol,2014,31(7):26.

(本文编辑:王 燕 英文编辑:王 燕)