

乳腺癌组织 *cystatin M* 基因的表达及其临床病理意义

Clinicopathological Significance of *Cystatin M* Gene Expression in Human Breast Cancer

WAN Rong, XIAO Zhi-yun, WANG Hai-yan, GAO Mei-qin
(Department of Pathology, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, Fujian, China)

万 榕/肖志芸/王海燕/高美钦

(福建医科大学病理学系, 福建 福州 350004)

【摘要】背景与目的: 探讨 *cystatin M* 基因在人乳腺癌组织中的表达及生物学意义。材料与方法: 采用半定量 RT-PCR 方法和免疫组织化学法检测 50 例乳腺癌组织和配对癌旁乳腺组织半胱氨酸蛋白酶抑制剂 *cystatin M* mRNA 和蛋白表达及其与临床病理特征的关系。结果: 乳腺癌组织 *cystatin M* mRNA 表达阳性率为 62% (31/50), 其配对癌旁乳腺组织为 94% (47/50), 在乳腺癌细胞系 MDA-MB-435S 中未见其表达。乳腺癌组织 *cystatin M* mRNA 的表达指数为 0.412 ± 0.021 , 明显低于配对的癌旁乳腺组织 (0.541 ± 0.020), 二者差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。 *cystatin M* 蛋白在乳腺癌及癌旁组织表达阳性率分别为 58% (29/50) 和 92% (46/50); 其平均光密度值为 0.318 ± 0.058 , 显著低于癌旁乳腺组织 (0.428 ± 0.064 , $P < 0.01$); *cystatin M* 表达下调与乳腺癌淋巴结转移和临床 TNM 分期显著相关 ($P < 0.05$), 而与肿瘤的大小、病理分级、ER 和 PR 状况无关 ($P > 0.05$)。结论: 人乳腺癌组织存在 *cystatin M* 基因表达显著下调且与肿瘤的浸润和转移有关。

【关键词】乳腺癌; *cystatin M*; 基因表达; 转移

中图分类号: R73

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2006)01-0054-04

【ABSTRACT】 BACKGROUND & AIM: To explore the expression of *cystatin M*, a major cysteine protease inhibitor, in human breast cancer and its significance. MATERIAL AND METHODS: A semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction and immunohistochemical methods were performed to evaluate the expression of *cystatin M* in cancerous and noncancerous tissues of fifty pairs of human invasive ductal adenocarcinoma of breast. The relationship between the expression of *cystatin M* gene in human breast carcinoma and clinicopathological features was analyzed. RESULTS: Reduced expression level of *cystatin M* gene mRNA and protein has been noted in breast carcinoma cells compared to adjacent noncancerous breast tissue ($P < 0.01$). The lower expression levels in breast carcinoma cells was related with clinicopathological features including lymph-node metastasis and TNM staging ($P < 0.05$) but not with the histological grade nor the estrogen and progesterone receptor status ($P > 0.05$). CONCLUSION: The expression of *cystatin M* gene mRNA and protein was reduced in human invasive breast carcinoma. Down-regulated expression of *cystatin M* in breast carcinoma might be associated with tumor invasion and metastasis.

【KEY WORDS】 breast carcinoma; *cystatin M* gene; gene expression; metastasis

半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (*cystatin*) 是广泛分布于生物体内的溶酶体半胱氨酸蛋白酶高效抑制剂^[1], *cystatin* 通过与半胱氨酸蛋白酶形成高亲和性复合物

调控靶酶的功能^[2,3]。近年来研究已证实 *cystatin* 的活性异常与表达失调和肿瘤侵袭转移密切相关^[4-7], *cystatin M* 是 1997 年 Sotiropoulou 等应用 mRNA 差异显

收稿日期: 2005-06-27; 修订日期: 2005-07-28

作者简介: 万 榕 (1965-), 女, 湖北省鄂州市人, 副教授, 博士, 研究方向: 肿瘤病理。Tel: 86-591-83569484, E-mail: wanmr88@126.com

示技术从原发性乳腺癌上皮细胞中分离获得^[8], 研究发现, *cystatin M* 可表达于正常的乳腺上皮细胞, 在转移性乳腺癌组织存在表达缺失, *cystatin M* 有望成为乳腺癌新的候选抑癌基因。本研究应用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 和免疫组织化学方法检测 *cystatin M* 在乳腺癌组织的表达情况, 并探讨其与乳腺癌生物学行为的关系。

1 材料与方法

1.1 肿瘤标本 随机选取福建医科大学病理学系及附属第一医院 1997~2001 年经病理确诊为乳腺浸润性导管癌的手术根治标本 50 例, 术前均未化疗、放疗和内分泌治疗。年龄 30~75 岁 (中位年龄 48 岁), 均为女性。其中伴腋淋巴结转移 21 例, 不伴腋淋巴结转移 29 例。上述标本直接取自手术切除物, 每份标本均取 2 份, 1 份取材后立即置液氮中速冻后, -80°C 冰箱保存备用; 另 1 份标本经 4% 甲醛固定, 常规石蜡包埋, 4 μm 厚连续切片。乳腺癌细胞系 MDA-MB-435S 引自中国科学院上海细胞库。

1.2 引物序列和合成 根据 *cystatin M* cDNA、 β -actin cDNA 序列设计相应引物并由上海博亚生物技术有限公司合成。*Cystatin M* cDNA 引物, 上游: 5'-TGG TCG CAT TCT GCC TCC T-3'; 下游: 5'-AAACCCAAT-GGCCTTCGC-3'。 β -actin cDNA 引物, 上游: 5'-AGCGGG-AAATCGTCCGTG-3'; 下游: 5'-CAGGGTACATGGTGGTG-CC-3'

1.3 RT-PCR 反应 组织总 RNA 的提取和 RT-PCR 扩增反应分别按 Trizol (R) (Gibco/BRL 公司) 试剂盒说明书和 Titan One Tube RT-PCR System (Roche 公司) 说明书进行。所提取的总 RNA 经紫外分光光度仪测定其浓度和纯度, 取 1 μg 的总 RNA 用于 RT-PCR 扩增反应。反应条件为: 55°C 孵育 30 min, 94°C 预变性 2 min 后, 94°C 30 s; 55°C 30 s; 72°C 30 s, 共 30 个循环, 72°C 延伸 7 min。取 5 μl 产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, Bio-rad GelDOC-1000 型凝胶成像分析系统分别测定 *cystatin M* 和 β -actin 扩增条带的积分吸光度值 (A), 以 β -actin 作为内参照, 计算 *cystatin M* 基因 mRNA 表达指数 (I), $I_{\text{cystatin M}} = A_{\text{cystatin M}} / A_{\beta\text{-actin}}$, 以相应的表达指数代表该基因 mRNA 表达水平。

1.4 免疫组织化学染色 组织切片常规脱蜡水化, 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液高压热修复, 滴加 3% 过氧化氢浸泡 20 min, 以抑制内源性过氧化物酶活性; PBS 洗涤后加入正常非免疫山羊血清 37°C 封闭 15 min; 一抗 (鼠抗人 *cystatin M* 单克隆抗体, R&D 公司

产品) 染色按相应试剂盒说明书进行, DAB 显色后苏木素复染, 脱水透明, 中性树胶封片。以已知乳腺癌组织阳性切片作阳性对照, 以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

染色结果半定量分析 应用真彩色图像分析仪检测 *cystatin M* 染色强度, 以细胞浆呈细颗粒状棕黄色、棕褐色为染色阳性, 低倍镜下观察阳性表达情况, 高倍镜下随机选取 4 个高倍视野 ($\times 400$ 倍), 测定其光密度值 (OD 值), 其均值作为该标本阳性指标的平均表达强度。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 10.0 统计软件包进行方差分析、*t* 检验, 以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 Cystatin M mRNA 在乳腺癌组织和乳腺癌细胞系的表达 *cystatin M* mRNA、 β -actin mRNA 经 RT-PCR 扩增后分别见 441 bp 和 309 bp 的特异性条带, RT-PCR 检测结果如图 1 所示。正常肺组织见 *cystatin M* mRNA 表达, MDA-MB-435S 细胞系中未检见其表达。50 例乳腺癌组织 *cystatin M* mRNA 表达阳性率为 62% (31/50), 其配对癌旁乳腺组织表达阳性率为 94% (47/50)。乳腺癌组织 *cystatin M* mRNA 的表达指数 0.412 ± 0.021 , 明显低于癌旁乳腺组织 (0.541 ± 0.020), 二者差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

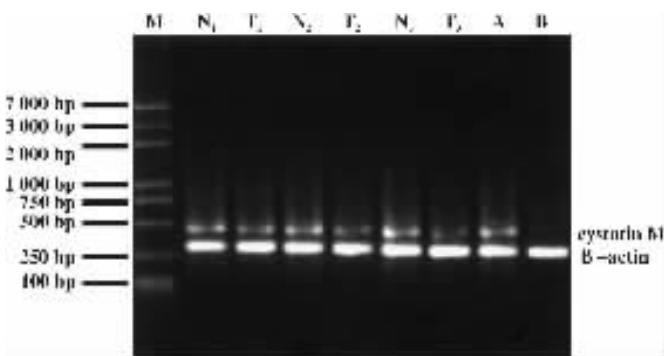


图 1 *Cystatin M* RT-PCR 检测结果。N: 癌旁乳腺组织; T: 乳腺癌组织; M: 7 kb DNA 分子量标准; A: 正常肺组织 B: MDA-MB-435S
Figure 1 Analysis of *cystatin M* RT-PCR in breast cancer. N: noncancerous tissue of breast carcinoma; T: breast carcinoma M: 7 kb DNA Marker; A: normal lung tissue; B: MDA-MB-435S Cell

2.2 Cystatin M 蛋白在乳腺癌组织的表达 免疫组织化学法检测 *cystatin M* 蛋白阳性物质主要表达于乳腺小叶腺泡、导管上皮、部分肌上皮细胞和癌细胞胞质中, 呈棕黄色或棕褐色颗粒状 (图 2、3), 少数见于癌细胞胞膜。50 例乳腺癌 *cystatin M* 蛋白阳性表达率为 58% (29/50), 而配对癌旁乳腺组织为 92% (46/50)。图像分析结果显示: 乳腺癌组织 OD 值为 0.318 ± 0.058 , 低于癌旁乳腺组织 (0.428 ± 0.064), 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

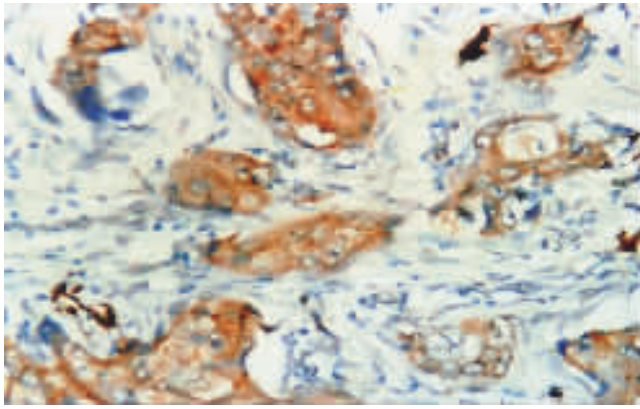


图 2 乳腺浸润性导管癌 cystatin M 蛋白阳性表达 (SP 法, $\times 400$)
Figure 2 Positive expression of cystatin M protein in human invasive ductal adenocarcinoma of breast (SP method, $\times 400$)

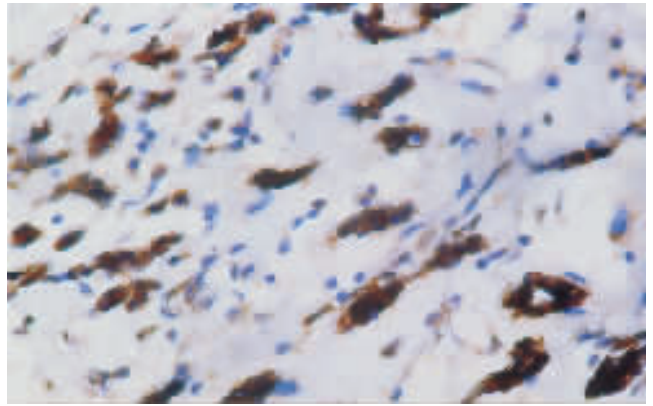


图 3 乳腺浸润性导管癌旁组织 cystatin M 蛋白阳性表达 (SP 法, $\times 400$)

Figure 3 Positive expression of cystatin M protein in noncancerous tissue of breast invasive ductal adenocarcinoma (SP method, $\times 400$)

2.3 cystatin M 表达与乳腺癌临床病理的关系

由表 1 可见, cystatin M 的 mRNA 和蛋白表达的下调与乳腺癌临床 TNM 分期、腋淋巴结转移显著相关

($P < 0.05$), 而与肿瘤大小、病理分级和 ER、PR 受体无关 ($P > 0.05$)。发生远处转移的 6 例乳腺浸润性导管癌其中有 5 例 cystatin M 表达缺失, 占 83.3%。

表 1 Cystatin M 基因在乳腺癌组织的表达

Table 1 Expression of cystatin M gene in breast carcinoma

Groups	Cases	Expression of cystatinM mRNA			Expression of cystatinM protein		
		Positive	Means of index ($\bar{x} \pm s$)	P value	Positive	Means value of OD ($\bar{x} \pm s$)	P value
Controls	50	47	0.541 ± 0.020		46	0.428 ± 0.064	
Breast carcinoma	50	31	0.412 ± 0.021	< 0.01	29	0.318 ± 0.058	< 0.01
Tumor size							
$\leq 2\text{cm}$	19	14	0.410 ± 0.017		12	0.314 ± 0.041	
$> 2\text{cm}$	31	17	0.409 ± 0.019	> 0.05	17	0.315 ± 0.038	> 0.05
Histological grade							
I - II	31	21	0.410 ± 0.021		17	0.308 ± 0.024	
III	19	10	0.408 ± 0.012	> 0.05	12	0.310 ± 0.051	> 0.05
TNM stages							
I - II	33	23	0.423 ± 0.016		20	0.326 ± 0.018	
III	17	8	0.404 ± 0.014	< 0.05	9	0.311 ± 0.029	< 0.05
Axillary lymphnode metastasis							
No	29	20	0.424 ± 0.022		18	0.319 ± 0.027	
Yes	21	11	0.402 ± 0.017	< 0.05	11	0.300 ± 0.040	< 0.05
Status of ER							
-	20	12	0.411 ± 0.011		13	0.316 ± 0.029	
+	30	19	0.412 ± 0.015	> 0.05	16	0.317 ± 0.014	> 0.05
Status of PR							
-	27	17	0.412 ± 0.023		18	0.311 ± 0.028	
+	23	14	0.412 ± 0.021	> 0.05	11	0.313 ± 0.022	> 0.05

3 讨论

细胞外基质 (ECM) 是阻止肿瘤侵袭和转移的重要天然屏障, 乳腺癌细胞可分泌多种蛋白水解酶如基质金属蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、天冬酰氨蛋白酶等降解 ECM 成分, 促使癌细胞转移。半胱氨酸蛋白酶抑制剂 cystatin 超家族通过底物竞争性机制与半胱氨酸蛋白酶高效可逆地紧密结合, 阻止半胱氨酸蛋白酶对

细胞外基质的水解作用, 从而有效地发挥其抑制效应^[3], 在抑制肿瘤侵袭与转移的级联发展过程中发挥了重要作用。

Cystatin M 是 cystatin 超家族中的 II 型分泌型蛋白, 由 121 个氨基酸组成, 其 cDNA 全长 577 bp, 开放阅读框含 447 个核苷酸。在正常乳腺上皮细胞、胎盘、肺、胰腺组织均可检测到 cystatin M 的转录表达; 而大多数乳腺癌细胞系如 MCF-7、BT549、MDA-MB-435S、

MDA-MB-231 和 ZR-75-1 等存在 cystatin M 表达缺失,此外前列腺癌 PC-3 细胞、肺癌 A549 细胞、膀胱癌、黑色素瘤和舌鳞癌细胞也有 cystatin M 表达缺失^[8]。将 cystatin M 基因转染高转移性人乳腺癌 MDA-MB-435S 细胞后, cystatin M 的表达可明显抑制肿瘤细胞的体内、外生长和侵袭转移^[9]。采用激光捕获显微切割技术和实时定量 RT-PCR 分析显示,正常人乳腺上皮细胞常有稳定的 cystatin M 表达,而在 I 期至 IV 期的乳腺浸润性导管癌上皮细胞其表达则下降 86%,其中 3 例 IV 期乳腺浸润性导管癌有 2 例 cystatin M 表达缺失^[10],说明 cystatin M 的表达异常与乳腺癌侵袭和转移密切相关。

本组资料表明, cystatin M mRNA 和蛋白在乳腺癌组织的表达较癌旁正常对照乳腺组织表达明显降低,进一步证实了 cystatin M 在乳腺癌中存在转录和翻译水平的下调。本研究还观察到, cystatin M mRNA 和蛋白表达水平与乳腺癌临床病理分期和腋淋巴结转移有关,处于 III、IV 期(TNM 分期)的乳腺癌其 cystatin M 表达水平和阳性率明显低于 I、II 期者,发生腋淋巴结转移的病例其 cystatin M 表达水平和阳性率显著低于无转移者,而且发生远处转移的 6 例乳腺浸润性导管癌有 5 例 cystatin M 表达缺失,上述结果与 Zhang 等^[10]人的研究有一定的相似性,提示 cystatin M 表达下调或缺失与乳腺癌侵袭和转移相关。我们推测认为,乳腺癌中 cystatin M 的表达异常可能削弱了其对于半胱氨酸蛋白酶活性的调控作用,导致溶酶体半胱氨酸蛋白酶对细胞外基质成分的降解作用增强,促进乳腺癌细胞的侵袭转移。

参考文献

[1] Turk V, Bode W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases [J]. *FEBS Lett*, 1991, 28(5): 213-219.

- [2] Alvarez-Fernandez M, Barrett AJ, Gerhartz B, et al. Inhibition of mammalian legumain by some cystatins is due to a novel second reactive site [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 19 195-19 203.
- [3] Bode W, Engh R, Musil D, et al. Mechanism of interaction of cysteine proteinases and their protein inhibitors as compared to the serine proteinase-inhibitor interaction [J]. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1990, 371: 111-118.
- [4] Lah TT, Kokalj-Kunovar M, Turk V. Cysteine proteinase inhibitors in human cancerous tissue and fluids [J]. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1990, 371: 199-203.
- [5] Soderstrom KO, Laato M, Wu P, et al. Expression of acid cysteine proteinase inhibitor (ACPI) in the normal human prostate, benign prostatic hyperplasia and adenocarcinoma [J]. *Int J Cancer*, 1995, 62(1): 1-4.
- [6] Yano M, Hirai K, Naito Z, et al. Expression of cathepsin B and cystatin C in human breast cancer [J]. *Surg Today*, 2001, 31(5): 385-389.
- [7] Strojjan P, Oblak I, Svetic B, et al. Cysteine proteinase inhibitor cystatin C in squamous cell carcinoma of the head and neck: relation to prognosis [J]. *Br J Cancer*, 2004, 90(10): 1 961-1 968.
- [8] Sotiropoulos G, Anisowicz A, Sager R. Identification, cloning, and characterization of Cystatin M, a novel cysteine proteinase inhibitor, down-regulated in breast cancer [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 903-910.
- [9] Shridhar R, Zhang J, Song J, et al. Cystatin M suppresses the malignant phenotype of human MDA-MB-435S cells [J]. *Oncogene*, 2004, 23: 2 205-2 215.
- [10] Zhang J, Shridhar R, Dai Q, et al. Cystatin M: a novel candidate tumor suppressor gene for breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(19): 6 957-6 964.

环境与遗传损害国际研讨会暨中国环境诱变剂学会第十二届学术会议在渝召开

2005 年 11 月 3~7 日,由中国环境诱变剂学会主办,第三军医大学军事预防医学院承办的“环境与遗传损害国际研讨会暨中国环境诱变剂学会第十二届学术会议”在重庆市隆重召开。来自国际环境诱变剂学会、亚洲环境诱变剂学会、美国环保局、中国台湾毒理学会、香港城市大学以及我国大陆各省、市相关领域的专家学者共 250 多人共席了会议。

本次会议围绕环境致癌、遗传损害、环境与毒理基因组学、毒理学安全评价以及 GLP 实验室建设等方面的最新研究进展做了大会主旨报告。本次会议认为:随着经济全球化快速发展,环境问题已引起世界各国的高度关注,其中环境对人民群众健康的影响更是受到重视。特别是人类基因组计划的完成,生物芯片、纳米技术、生物信息学等新技术及平台大量使用,功能基因组学、环境与毒理基因组学、蛋白组学等相继开展,极大地推动了环境与毒理学研究向更广阔、更深入的方向发展。目前研究证明,已知众多疾病与损害均与外界环境对基因产生损害作用有关,积极探索其损害作用的分子机制,已成为当今科技界关注的热点。本次会议的召开对提高重庆市以及我国环境与健康研究水平具有重要的指导意义。

(第三军医大学预防医学院供稿)

