

## · 临床论著 ·

# 卵泡抑素、MUC1 基因在乳腺癌患者血清中的表达及其临床意义

张录民 杨瑞光 姚健

**【摘要】 目的** 研究乳腺癌患者血清中卵泡抑素(FS)和黏蛋白 MUC1 表达与肿瘤的发生发展与转移的关系及其临床意义。**方法** 采集 60 例乳腺疾病入院患者的血清样本,其中乳腺癌 40 例,乳腺良性疾病 20 例,分别采用 ELISA 法和 CanAgMUC1 检测试剂盒检测其血清中 FS 和 MUC1 含量。**结果** 在 40 例乳腺癌患者血清中 FS 和 MUC1 的血清含量分别为  $(3.75 \pm 1.32)$  ng/ml 和  $(37.63 \pm 23.22)$  U/ml,FS 和 MUC1 的阳性率分别为 32.50% 和 47.50%,均明显高于对照组( $P < 0.01$ ),乳腺癌患者 FS 和 MUC1 血清含量和阳性率与组织学分级、肿瘤大小、腋窝淋巴结转移有关( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。**结论** FS、MUC1 与肿瘤发生、发展、生物学特征以及转移密切相关,联合检测这些指标有利于乳腺癌的早期诊断以及预后判断。

**【关键词】** 乳腺肿瘤; 卵泡抑素; 黏蛋白类; 酶联免疫吸附测定

## Expression of FS, MUC1 proteins in the breast cancer patients serum and the clinical significance ZHANG

Lu-min, YANG Rui-guang, YAO Jian. Department of Thoracic Surgery, Jilin Province People's Hospital, Changchun 130021, China

Corresponding author: ZHANG Lu-min, Email: zhanglumin2008@sina.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the connection between the expression of FS and MUC1 proteins in the breast cancer patients serum and tumor growth and metastasis, and to explore the clinical significance. **Methods** By using ELISA method and CanAgMUC1 to examine the expression levels of FS and MUC1 proteins in 40 serum samples of breast cancer patients and 20 serum samples of breast benign disease. **Results** In 40 cases of breast cancer patients serum, the content of FS and MUC1 were  $(3.75 \pm 1.32)$  ng/ml and  $(37.63 \pm 23.22)$  U/ml, the positive rate were 32.50% and 47.50%, which were significantly higher than those in the control group ( $P < 0.01$ ). The content and positive rate of FS and MUC1 proteins in the breast cancer patients serum were positively correlated to histological grade, tumor size, axillary lymph node metastatic carcinoma ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). **Conclusions** FS and MUC1 proteins were closely related to tumoral occurrence, development, biological characteristics and transfer, and testing of the two proteins together will be helpful to the early diagnosis of breast cancer and prognostic judgement.

**【Key words】** Breast neoplasms; Follistatin; Mucins; Enzyme-linked immunosorbent assay

乳腺癌是危害妇女健康最常见的恶性肿瘤之一,其发病率在世界范围内呈逐年上升趋势,乳腺癌在诊断及治疗方面虽然取得了很大的进展,但一部分乳腺癌患者,主要是晚期乳腺癌患者,最终仍死于乳腺癌的复发或转移。如何提高乳腺癌的早期诊断、早期发现复发与转移,一直是临床研究的重点之一。卵泡抑素(follistatin, FS),又称激活素结合蛋白,血清中 FS 水平变化与女性妊娠以及肿瘤等有关<sup>[1-2]</sup>。癌基因学说认为,乳腺癌的转移与转移基因突变和转移抑制基因失活等多因素相关,Kondo 等<sup>[3]</sup>和 Dian 等<sup>[4]</sup>研究认为,MUC1 基

因编码的蛋白是重要的乳腺癌相关抗原,且有可能是乳腺癌转移细胞的基因标志物。本研究分别采用 ELISA 法和 CanAgMUC1 检测试剂盒检测其血清中 FS 和 MUC1 含量。探讨两者在乳腺癌发生发展的作用机制,为乳腺癌的早期临床诊断和治疗提供新的实验依据。

## 资料与方法

### 一、一般资料

随机收集吉林省人民医院 2011 年 1~12 月原发性乳腺癌 40 例,均行改良乳腺癌根治术,并经病理诊断。其中乳腺浸润性导管癌 23 例,乳腺小叶癌 14 例,乳腺髓样癌 3 例,全部为女性,年龄 29~79 岁,平均 48 岁。对照组:乳腺良性疾病 20 例,其中经病理诊断为小叶增生 6 例,乳腺纤维腺瘤 14 例,亦全部为女性,年龄 17~48

岁,平均32岁。全组病例术前均未行放疗。

## 二、方法

采集患者空腹静脉血3 ml,经3000 r/min离心10 min,置-80℃冰冻保存待检,采用FS双位点ELISAE<sup>[5]</sup>。酶联免疫测定仪测490 nm吸收值(A490),绘制标准曲线,通过标准曲线计算样本中FS含量,血清正常参考值2.8 ng/ml。采用CanAgMUC1检测试剂盒检测其血清中MUC1含量。血清CanAg-MUC1试剂盒由Centocor公司生产,正常值20 U/ml,按说明书操作。高于正常值为阳性。组织学分级:采用Bloom-Richardson系统Nottingham改良方案<sup>[6]</sup>,将分化程度从高到低分为I、II、III级。FS和MUC1联检中如果有一项为阳性者即为阳性病例。

## 三、统计学处理

采用SPSS 10.0软件。检验数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用t检验分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 乳腺癌组和良性对照组FS、MUC1表达的比较:乳腺癌组FS的血清含量及阳性率分别为( $3.75 \pm 1.32$ ) ng/ml、32.50%,对照组FS血清含量及阳性率分别为( $2.83 \pm 0.31$ ) ng/ml、0%,其血清含量均小于参考值。乳腺癌组MUC1的血清含量及阳性率分别为( $37.63 \pm 23.22$ ) U/ml、47.50%,对照组乳腺小叶增生有1例呈阳性,但其血清值均 $< 37.63$  U/ml,其余均小于参考值。乳腺癌组和对照组此两项指标比较均有统计学差异( $P < 0.01$ )。见表1。

2. 乳腺癌患者血清中FS、MUC1表达与组织学分

级、肿瘤大小及腋窝淋巴结转移的关系:乳腺癌III级分化组FS、MUC1血清含量及阳性率均高于I级分化组,有统计学差异( $P < 0.01$ ),肿瘤 $> 5$  cm组FS、MUC1血清含量高于2~5 cm组与 $< 2$  cm组( $P < 0.05$ ), $> 5$  cm组FS、MUC1阳性率亦高于 $< 2$  cm组( $P < 0.01$ ),淋巴结转移组FS、MUC1血清含量及阳性率高于无淋巴结转移组,有统计学差异( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ )。见表1。

3. 乳腺癌患者血清中FS表达与MUC1表达的关系:乳腺癌患者血清中FS阳性组MUC1含量高于FS阴性组,有显著差异( $P < 0.01$ ),FS阳性组的MUC1阳性率亦高于FS阴性组,有统计学差异( $P < 0.01$ )。见表2。

表2 乳腺癌患者血清中FS表达与MUC1表达的关系

组别	例数	MUC1			
		$\bar{x} \pm s$ (ng/ml)	-(例)	+(例)	阳性率(%)
FS 阴性	27	16.63 ± 7.32	17	10	37.03
FS 阳性	13	26.47 ± 6.60 <sup>a</sup>	2	11	84.62 <sup>a</sup>

注:与FS阴性组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$

## 讨 论

肿瘤标志物目前日益广泛应用于肿瘤的诊断,临床监测,判断疗效及预后等方面。目前已被美国肿瘤学会批准应用的乳腺癌标记物<sup>[7-8]</sup>:CEA、CA153、21基因等。但其诊断的阳性率较低,而且还存在假阳性率。虽然<sup>18</sup>F-FDG PET-CT对乳腺癌诊断阳性率较高,但对早期乳腺癌诊断的阳性率较低<sup>[9]</sup>。故需进一步寻找乳腺癌的肿瘤标志物。

FS是近年来发现的具有激素样活性的新细胞因子,主要由垂体细胞和卵巢颗粒细胞分泌,具有直接抑

表1 乳腺癌患者血清FS、MUC1表达与组织学分级、肿瘤大小及腋窝淋巴结转移的关系

项目	例数	FS			MUC1				
		$\bar{x} \pm s$ (ng/ml)	-(例)	+(例)	阳性率(%)	$\bar{x} \pm s$ (U/ml)	-(例)	+(例)	阳性率(%)
乳腺良性病变	20	2.83 ± 0.31	20	0	0	15.35 ± 4.66	19	1	2.50
乳腺癌	40	3.75 ± 1.32 <sup>a</sup>	27	13	32.50 <sup>a</sup>	37.63 ± 23.22 <sup>a</sup>	21	19	47.50 <sup>a</sup>
组织学分级									
I	11	3.10 ± 0.25	9	2	18.18	25.31 ± 16.87	7	4	36.36
II	16	3.98 ± 1.26 <sup>b</sup>	12	4	25.00 <sup>b</sup>	29.33 ± 21.36 <sup>a</sup>	9	7	43.75 <sup>a</sup>
III	13	5.65 ± 2.53 <sup>a</sup>	6	7	53.85 <sup>a</sup>	58.25 ± 31.43 <sup>a</sup>	5	8	61.53 <sup>a</sup>
肿瘤大小									
< 2 cm	7	3.53 ± 1.19	6	1	14.29	24.91 ± 23.22	5	2	28.57
2~5 cm	21	3.54 ± 1.38 <sup>a</sup>	14	7	33.33 <sup>a</sup>	31.63 ± 20.23 <sup>a</sup>	12	9	42.86 <sup>a</sup>
> 5 cm	12	4.98 ± 1.31 <sup>b</sup>	7	5	41.67 <sup>b</sup>	56.65 ± 19.32 <sup>a</sup>	4	8	66.66 <sup>a</sup>
淋巴结转移									
无	18	3.62 ± 1.63	13	5	27.77	25.73 ± 25.02	10	8	43.75
有	22	4.96 ± 2.29 <sup>b</sup>	14	8	36.36 <sup>b</sup>	49.53 ± 21.43 <sup>a</sup>	11	11	50.00 <sup>a</sup>

注:与乳腺良性病变组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ,<sup>b</sup> $P < 0.05$

制垂体 FSH 合成、分泌作用,还能作为特异性结合蛋白与激活素不可逆性结合并使之失活,间接抑制 FSH 分泌,从而调节体内性激素水平的变化,参与多种生理功能的调节。在胚胎的形成到机体的成熟整个过程中发挥重要作用。随着研究发现 FS 组织分布广泛,同时对 FS 的生物学活性、免疫学活性以及与疾病的关系等方面开展了大量研究。

目前研究表明:FS 在肝、肺纤维化,肾、皮肤、脑损伤,动脉粥样硬化,多卵巢综合征,生殖、性腺疾病的形成中具有一定作用。为进一步探讨 FS 在乳腺癌发生、发展和诊断中的可能意义,初步选择了乳腺癌组:其中包括乳腺浸润性导管癌、乳腺小叶癌、乳腺髓样癌。乳腺良性疾病组:其中包括乳腺小叶增生,乳腺纤维腺瘤。采用 ELISA 法对以上患者外周血循环 FS 水平进行了检测,结果显示,乳腺癌组外周血循环 FS 的血清含量及阳性率分别为  $(3.75 \pm 1.32)$  ng/ml, 32.50%, 对照组 FS 血清含量及阳性率分别为  $(2.83 \pm 0.31)$  ng/ml, 0%, 其血清含量均小于参考值。乳腺癌组和对照组此两项指标比较均有统计学差异 ( $P < 0.01$ )。这一研究结果表明具有组织分布广泛,参与多种生物学活性的 FS,在乳腺癌患者外周血中高表达,乳腺癌患者外周血 FS 的升高可能来源于肿瘤细胞的直接分泌,肿瘤细胞分泌 FS 与 ACTH 分泌有关。提示肿瘤细胞分布的 FS 及外周血循环 FS 水平对乳腺癌的临床诊断、分型亦有重要的辅助诊断价值。但其异常高水平表达是肿瘤发生的原因还是肿瘤形成的后果值得进一步探讨。

黏蛋白(mucin,简称 MUC)是广泛分布于机体正常黏膜表面的高分子量( $>200$  kD)糖蛋白,其分子由肽核心和糖链组成。表达于很多具有分泌性器官的细胞膜顶端,如乳腺、唾液腺、肺泡等器官。对正常的上皮起润滑和保护作用,还有介导信号转导、细胞黏附功能、免疫活化和抑制作用,诱导 T 淋巴细胞凋亡等多种功能<sup>[10-11]</sup>。而在乳腺肿瘤组织中 MUC1 多出现量和质的异常表达。因此,MUC1 可能成为一种新的肿瘤标志物,用于乳腺癌的早期诊断、治疗和预后判断。MUC1 基因的一个重要特征是其多态性(polymorphism),有报道 MUC1 在乳腺正常及癌组织中均有表达<sup>[12]</sup>,但对其在不同乳腺病变组织中表达水平的报道不完全一致<sup>[13]</sup>。

肿瘤细胞膜上的 MUC1 可能通过表达增多而干预整合素和钙黏连素的表达,影响胶原酶的分泌,MUC1 亦可通过在细胞表面的过度表达减少细胞-细胞、细胞-细胞外基质的黏附使肿瘤细胞易于从原发肿瘤脱离,从而更有利于肿瘤细胞的转移。MUC1 在肿瘤组织中

存在畸形糖基化和不完全糖基化,使 MUC1 的核心蛋白暴露出新的蛋白表位或新的糖抗原,分布于整个癌细胞表面,可为免疫系统识别,成为肿瘤特异的抗原<sup>[14-15]</sup>,大约有 90% 以上的乳腺癌有 MUC1 的过度表达<sup>[16]</sup>。

多因素相关分析表明,腋窝淋巴结有无转移是判断乳腺癌患者预后重要的指标,同时也是肿瘤分期及选择治疗方案的重要依据<sup>[17]</sup>,常规 HE 染色显示腋窝淋巴结阴性的患者中,仍有近 30% 在 5 年内出现复发或转移。黏蛋白 MUC1 近年已经成为检测乳腺癌患者淋巴结微小转移的指标。

1984 年 Hilkrms 等用人乳腺脂肪球膜糖蛋白 MAM-6 制成小鼠单抗 DF-3,这些抗体识别出 MUC1<sup>[18]</sup>,有 30% ~ 50% 的乳腺癌患者 MUC1 增高,出现转移时增高可达 80%,当乳腺癌发生肝转移,尤其是骨转移时 MUC1 会显著升高,阳性率可达 100%<sup>[19]</sup>,Essmann-Seboth 等<sup>[20]</sup>曾报道有 MUC1 检测比临床及影像检查早 48 个月发现乳腺癌转移复发的病例,因此它对乳腺癌的动态追踪、判断复发转移很有价值。为了进一步证实 MUC1 对乳腺癌的辅助诊断价值以及与组织学分级、肿瘤大小和腋窝淋巴结转移的关系,本试验采用了 CanAgMUC1 检测试剂盒对乳腺癌患者血清 MUC1 蛋白进行了检测,结果显示,乳腺癌组 MUC1 的血清含量及阳性率均明显增高,而且与组织学分级、肿瘤大小和腋窝淋巴结转移有关,以上差异均有显著性意义,这与上述报道基本一致,由此可见 MUC1 可作为乳腺癌早期诊断、监测转移、预后判断的辅助诊断指标。

综上所述,黏蛋白 MUC1 与多种肿瘤的发生、发展、侵袭、转移、预后等有密切的关系,且其特有的结构和功能特点使其成为一种新型的肿瘤标志物和肿瘤治疗的一个理想的靶分子。随着分子生物学理论和技术的高速发展,为人们研究黏蛋白结构和功能提供了有力的工具,在这方面也取得了很大的进展,如 MUC1 的克隆成功及相应的蛋白序列的阐明,黏蛋白与肿瘤的关系,黏蛋白疫苗的研制等。虽然如此,但对其作用的分子机制及其潜在的其他功能以及应用于临床,还有待于进一步深入研究。

总之,我们认为,对乳腺癌的诊断不能依靠单项检测,应该联合检测,尤其是 FS 与 MUC1 的联合检测,可以大大提高乳腺癌的阳性检出率,为临床提供更可靠的实验数据,能够更好的应用于临床。

#### 参 考 文 献

- [1] Wakatsuki M, Shintani M, Abe M, et al. Harnunoradiometric assay for follistatin; Serum Immunoreactive follistatin level in nonnal adult and pregnantwomen. J Clin Endocrinol Metal, 1996, 81: 630.
- [2] Liu ZH, Shintani Y, Sakamoto Y, et al. Effects ofLHRH, FSH and ac-

- tivin A Oil follistatin secretion from cultured rat anterior pituitary cells III. *Endocrine J*, 1996, 43: 321.
- [3] Kondo K, Kohno N, Yokoyama A, et al. Decreased MUC1 expression induces E-cadherin-mediated cell adhesion of breast cancer cell lines. *Cancer Res*, 1998, 58: 2014-2019.
- [4] Dian D, Janni W, Kuhn C, et al. Evaluation of a novel anti-mucin 1 (MUC1) antibody (PankoMab) as a potential diagnostic tool in human ductal breast cancer; comparison with two established antibodies. *Onkologie*, 2009, 32: 238-244.
- [5] 董辉, 汪丽, 韩宏伟, 等. 两种卵泡抑素免疫检测方法的比较. *中华检验医学杂志*, 2002, 25: 342.
- [6] 孙龙安, 李龙, 林钢. *医学特种检验与实验室诊断*. 北京: 人民军医出版社, 2001: 153.
- [7] Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol*, 2007, 25: 118-145.
- [8] Park S, Ahn HK, Park LC, et al. Implications of different CA 15-3 levels according to breast cancer subtype at initial diagnosis of recurrent or metastatic breast cancer. *Onkologie*, 2009, 82: 180-187.
- [9] 廖翔鹤, 王荣福.  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT 在乳腺癌原发病灶诊断及分期的应用价值[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2010, 4: 1946.
- [10] Felton T, Harris GC, Pinder SE, et al. Identification of carcinoma cells in peripheral blood samples of patients with advanced breast carcinoma using RT-PCR amplification of CK7 and MUC1. *The Breast*, 2004, 13: 35-41.
- [11] Brayman MJ, Dharmaraj N, Lagow E, et al. MUC1 expression is repressed by protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription- $\gamma$ . *Mol Endocrinol*, 2007, 21: 2725-2737.
- [12] Rahn JJ, Dabbagh L, Pasdar M, et al. The importance of MUC1 cellular localization in patients with breast carcinoma: An immunohistologic study of 71 patients and review of the literature. *Cancer*, 2001, 91: 1973-1982.
- [13] Diaz LK, Wiley EL, Morrow M, et al. Expression of epithelial mucins MUC1, MUC2, and MUC3 in ductal carcinoma in situ of breast. *Breast J*, 2001, 7: 40-45.
- [14] Carr-Brendel V, Markovic D, Ferrer K, et al. Immunity to murine breast carcinoma cells modified to express MUC1, a human breast carcinoma antigen, in transgenic mice tolerant to human MUC1. *Cancer Res*, 2000, 60: 2435-2443.
- [15] Musselli C, Ragupathi G, Gilewski T. Reevaluation of the cellular immune response in breast carcinoma patients vaccinated with MUC1. *Int J Cancer*, 2002, 97: 660-667.
- [16] Adriance MC, Gndler SJ. Downregulation of MUC1 in MMTVc-Neu tumors. *Oncogene*, 2004, 23: 697-705.
- [17] Rampaul RS, Miremadi A, Pinder SE, et al. Pathological validation and significance of micrometastasis in sentinel nodes in primary breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2001, 3: 113-116.
- [18] Hages DF. Tumor markers for breast cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*, 1994, 8: 485-506.
- [19] 陈智周, 范振符, 杨剑, 等. 肿瘤标记物 CA153 的免疫放射分析及临床应用. *中华肿瘤杂志*, 1998, 20: 125-127.
- [20] Essmann-Seboth D, Fuchs I, Jakesz R, et al. CA15-3 in the postoperative follow-up of breast cancer patients // Klapdor R. *Current tumor diagnosis; application, clinical relevance, research, trends*. New York; W Zuckschwerdt Verlag, 1994: 158-159.

(收稿日期: 2012-10-15)

(本文编辑: 马超)

张录民, 杨瑞光, 姚健. 卵泡抑素、MUC1 基因在乳腺癌患者血清中的表达及其临床意义[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7(4): 1458-1461.

中华医学会