

· 实验研究 ·

Cystatin M 在乳腺癌及转移癌中的表达和临床意义

王欣 闫哲 李晓青 冯玉梅 曹旭晨

【摘要】 目的 探讨 cystatin M 在乳腺癌及转移癌中的表达和临床意义。**方法** 采用 RT-PCR 检测 108 例乳腺癌标本、30 例转移癌标本及 24 例癌旁正常乳腺组织中 cystatin M mRNA 表达水平,分析 cystatin M 基因表达与临床病理参数的关系。**结果** 乳腺癌标本中 cystatin M 在 I、II 期乳腺癌患者中表达较高,而在 III/IV 期乳腺癌患者中表达较低,两者间差异有统计学意义;cystatin M 在 5 cm 以下肿瘤中表达较高,而在 5 cm 以上肿瘤中表达较低,两者间差异有统计学意义;乳腺癌标本中 cystatin M 表达量与正常乳腺组织的差异无统计学意义;乳腺癌标本中 cystatin M 表达量与转移癌标本的差异也无统计学意义;乳腺癌标本中 cystatin M mRNA 表达水平与乳腺癌患者是否发生淋巴结转移、淋巴结转移数、组织学分级、病理学类型无关;乳腺癌标本和转移癌标本中 cystatin M mRNA 表达水平与人表皮生长因子受体 2 状态,雌激素受体状态及孕激素受体状态无关。**结论** Cystatin M 是否为监测乳腺癌浸润转移的可靠指标仍需探讨。

【关键词】 乳腺癌; Cystatin M; mRNA 表达; 转移

【中图法分类号】 R737.9 **【文献标识码】** A

Expression of cystatin M in breast cancer and metastatic cancer and its clinical significance WANG Xin, YAN Zhe, LI Xiao-qing, FENG Yu-mei, CAO Xu-chen. First Department of Breast Tumor, Cancer Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China

【Abstract】 Objective To explore the expression of cystatin M in breast

基金项目:天津医科大学肿瘤医院人才启动基金(编号 6-28)资助

作者单位:300060 天津,天津医科大学附属肿瘤医院乳腺一科(王欣、闫哲、曹旭晨);生化及分子生物研究室(李晓青、冯玉梅);乳腺癌防治教育部重点实验室(王欣、闫哲、李晓青、冯玉梅、曹旭晨)

cancer and its clinical significance. **Methods** RT-PCR was used to measure the level of cystatin M mRNA in 108 samples of breast cancer, 30 samples of metastatic cancer and 24 samples of normal breast tissues. The relationship between the expression of cystatin M gene in human breast cancer and clinicopathological features was analyzed.

Results The cystatin M expression level of breast cancer samples was high in stage I/II breast cancer patients, but low in stage III/IV breast cancer patients, and there was a statistical significance between them. The cystatin expression was high in < 5 cm tumors, but low in > 5 cm tumors, with a statistical significance between them. Cystatin M expression levels of breast cancer were correlated with TNM staging and clinical size of tumor. The expression levels of cystatin M in the breast cancer tissue were not significantly different from normal breast tissues and metastatic cancer tissues. Cystatin M expression levels of breast cancer were not correlated with lymph node metastasis, axillary lymph node status, histological grade or pathological type. Cystatin M expression levels of breast cancer and metastatic cancer were not correlated with HER-2, ER or PR status. **Conclusion** It needs to be discussed whether cystatin M can be a prognostic marker for breast cancer metastasis.

【 Key words 】 Breast neoplasms; Cystatin M; mRNA expression; Metastasis

乳腺癌的浸润和转移是乳腺癌患者治疗的重大障碍。对乳腺癌侵袭、转移相关指标的研究在预测肿瘤预后和指导临床治疗方面具有重要的意义^[1]。

细胞外基质是阻止乳腺癌细胞侵袭和转移的重要屏障。乳腺癌细胞分泌半胱氨酸蛋白酶降解细胞外基质,促使癌细胞转移。半胱氨酸蛋白酶抑制剂 cystatins 通过与半胱氨酸蛋白酶紧密结合,阻止半胱氨酸蛋白酶对细胞外基质的水解作用,在抑制癌细胞侵袭与转移方面发挥重要作用^[2]。Cystatin M 于 1997 年同时被 Ni 和 Sotiropoulou 等^[3-4]发现,它广泛分布于人类乳腺、胎盘、皮肤等多种组织中,主要表达于上皮细胞。2004 年 Keppler 的研究组提出 cystatin M 是新的乳腺癌抑制因子^[5]。他们首先在人乳腺癌细胞株试验中发现 cystatin M 抑制癌细胞增殖、分裂、基质层浸润以及肿瘤细胞和内皮细胞的黏附;后来,又分析了 11 例乳腺癌组织和 4 例正常对照组织,结果发现乳腺癌组织的 cystatin M 明显低于正常对照组织。动物实验表明, cystatin M 明显延迟原发肿瘤的发生以及减少肺和肝的远处转移。其他研究报道 cystatin M 在皮肤鳞癌基底细胞中减少或缺失^[6]。而 Vigneswaran 等^[7]利用激光捕获显微切割技术研究 17 例乳腺癌,结果未发现转移癌中 cystatin M 表达减少或缺失。

因此仍需大量病例研究以确定 cystatin M 表达和肿瘤分期、间质浸润程度、雌激素受体(ER)状态及孕激素受体(PR)状态等的联系。本研究通过检测乳腺癌标本、转移癌标本及正常乳腺组织中 cystatin M 的表达水平,探讨 cystatin M 在乳腺癌及其转移癌中的生物学意义。

1 材料与方法

1.1 标本取材及病例资料

108 例标本均为 2002 年 1 月至 2003 年 10 月本院乳腺癌患者手术切除标本。患者年龄为 29 ~ 73 岁,中位年龄 51 岁。108 例标本中有 7 例患者同时取得原发乳腺癌组织、癌旁正常乳腺组织和淋巴结转移癌组织标本,17 例只取得癌旁正常乳腺组织和原发乳腺癌组织标本,23 例只取得原发乳腺癌组织和淋巴结转移癌组织标本,余 61 例患者只取得原发乳腺癌组织标本。因此共 24 例乳腺癌有配对癌旁正常组织标本,30 例有配对转移癌组织标本。浸润性非特殊型癌 104 例(单纯癌 60 例、浸润性导管癌 25 例、髓样癌 12 例、腺癌 7 例)和浸润性特殊型癌 4 例(乳头状癌 2 例、黏液腺癌 2 例);临床分期 I 期 15 例,II 期 67 例,III 期 22 例,IV 期 4 例;组织学分级 I 级 12 例、II 级 73 例、III 级 23 例;淋巴结转移阴性 52 例,阳性 56 例;ER 阴性 37 例,阳性 67 例;PR 阴性 57 例,阳性 47 例;ER、PR 不明 4 例;人表皮生长因子受体 2(HER-2)阴性占 61 例,阳性占 33 例,不明占 14 例;双侧乳腺癌 3 例;随访 6 ~ 24 个月 6 例有远处转移(骨转移 2 例,肺转移 1 例,锁骨上转移 3 例)。ER、PR 采用免疫组化检测,阳性细胞数达 30% 以上为阳性;HER-2 采用免疫组化方法检测,阳性数达 10% 以上为阳性。每一病例均取经病理证实的原发癌组织及转移阳性淋巴组织。组织标本取材时所用器械均须经无 RNase 处理,标本取材后经液氮速冻保存于 -80 °C 冰箱。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞总 RNA 的提取:采用 TRAZOL 一步法快速提取细胞总 RNA。紫外分光光度法测定 RNA 的浓度和纯度;1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

1.2.2 cDNA 的合成:20 μ l SuperScriptTM II 反应体系中包括 5 μ g 总 RNA, 0.5 μ g Oligo dT(Invitrogen 公司,美国),10 nmol dNTP mix(Invitrogen 公司,美国),65 °C 变性 5 min,冰浴后加入 First-Strand Buffer,0.2 μ mol 二硫苏糖醇

(DTT) 和 40 U RNA 酶抑制剂, 42 °C 温育 2 min 后加入 SuperScript™ II (Invitrogen 公司, 美国) 200 U, 42 °C 反应 50 min。反应完成后 70 °C, 15 min 终止反应。

1.2.3 Cystatin M 及内参 GAPDH 的引物和 TaqMan 探针序列: Cystatin M 上游引物: 5'-TGGGCAGCAAC AGCATCTACT-3', 下游引物: 5'-TGCTCCCCATCTCCATCGT-3', Cystatin M 探针: 5'-(FAM)-AGCT GGCTCTGCCCTTGATGATGTG-(TAMRA)-3'。GAPDH 上游引物: 5'-GAAGGTGA-AGGTCGG AGTC-3', 下游引物: 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3', GAPDH 探针: 5'-(FAM)-CAAGCTTCCCCTTCTCAGCC-(TAMRA)-3'。引物和探针序列由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.4 定量 PCR 反应: PCR 反应使用 Platinum Quantitative PCR SuperMix -UDG 试剂盒 (Invitrogen 公司, 美国)。20 μl 反应体系中包括由 40 ng 总 RNA 反转录所得的 cDNA, 10 μl Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG, 10 μmol/L 的上下游引物和 TaqMan 探针各 0.4 μl。PCR 反应条件为 50 °C 温育 2 min, 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 30 s, 62 °C 1 min, 45 个循环。每个样本重复 3 次。实时荧光信号定量可以显示荧光信号达到设定阈值时所经过的循环数, 即 C_T 值^[8]。本研究 C_T 值的取值为荧光信号 0.026 时的循环数。目的基因的 C_T 值与管家基因 GAPDH 的 C_T 值之差为 ΔC_T , $2^{-\Delta C_T}$ 则为该样本中目的基因 mRNA 相对于 GAPDH 的相对表达量。

1.3 统计学分析

采用 SPSS10.0 软件进行秩和检验。病例数过少的分组与病理因素相近的分组合并后进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

在 108 例乳腺癌标本中, 24 例有配对癌旁正常组织标本, 30 例有配对转移癌组织标本。乳腺癌和癌旁正常组织 cystatin M 表达的差异无统计学意义。24 例乳腺癌标本和配对癌旁正常组织标本 cystatin M 表达量的正秩和为 10.67, 负秩和的绝对值为 13.60 ($P > 0.05$)。比较原发癌和转移癌组织 cystatin M 表达的差异, 也未见明显统计学意义。30 例乳腺癌标本和配对 30 例转移癌标本中 cystatin M 表达量的正秩和为 14.47, 负秩和的绝对值为 15.57 ($P > 0.05$)。

表 1 显示乳腺癌及其转移癌中 cystatin M mRNA 水平表达与临床病理因

数的关系。在临床分期中, Cystatin M 表达在 I/II 期乳腺癌患者较高, 而在 III/IV 期乳腺癌患者较低, 两组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。直径在 5 cm 以下(包括 5 cm)的肿瘤其 Cystatin M 表达比 5 cm 以上的肿瘤高, 两组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。本研究显示: 乳腺癌标本中 cystatin M 的表达水平与乳腺癌病理学类型、组织学分级、是否发生淋巴结转移以及淋巴结转移数无关; 乳腺癌标本和转移癌标本中 cystatin M 表达水平与 HER-2、ER 及 PR 无关。

表 1 乳腺癌及其转移癌中 cystatin M mRNA 表达与临床病理因数的关系

临床病理因数	例数	cystatin M 平均秩次	P 值
临床分期			
I + II	82	58.18	0.030
III + IV	26	42.90	
肿瘤直径			
≤5cm	93	57.14	0.029
>5cm	15	38.13	
病理学类型			
浸润性非特殊型癌	104	54.92	0.474
浸润性特殊型癌	4	43.50	
组织学			
I	12	45.04	0.538
II	73	55.50	
III	23	56.26	
淋巴结转移数			
0	52	54.31	0.914
1-3	22	57.57	
4-9	15	50.03	
≥10	19	55.00	
乳腺癌 ER 状态			
(+)	67	51.16	0.543
(-)	37	54.92	
转移癌 ER 状态			
(+)	15	15.40	0.534
(-)	13	13.46	
乳腺癌 PR 状态			
(+)	47	54.62	0.516
(-)	57	50.75	
转移癌 PR 状态			
(+)	6	14.83	0.911
(-)	22	14.48	
乳腺癌 HER-2 状态			
(+)	33	51.09	0.348
(-)	61	45.56	
转移癌 HER-2 状态			
(+)	12	13.50	1.000
(-)	14	13.50	

3 讨论

乳腺癌治疗失败的主要原因是肿瘤的复发和转移。细胞外基质是阻止乳腺癌细胞侵袭和转移的重要屏障。乳腺癌细胞分泌蛋白酶,降解细胞外基质,促使癌细胞转移。半胱氨酸蛋白酶抑制剂 cystatins 通过与半胱氨酸蛋白酶紧密结合,阻止半胱氨酸蛋白酶对细胞外基质的水解作用,从而在抑制癌细胞侵袭与转移方面发挥重要作用。

Cystatin M 是 cystatin 超家族中的 II 型分泌型蛋白,由 121 个氨基酸组成,它的表达很大程度上局限于表皮细胞^[3]。有研究表明,cystatin M 在乳腺癌细胞中相对于周边正常组织表达下调,在正常细胞和癌前细胞表达,而在转移乳腺癌细胞株不表达^[4]。

本研究利用实时定量 PCR 技术,进行原发癌和转移癌的配对标本比较。结果表明,cystatin M 表达水平和乳腺癌临床分期有关。在 I 期和 II 期的乳腺癌中,cystatin M 表达水平较高;而在 III 期和 IV 期的乳腺癌中,其 cystatin M 表达水平较低。这与万榕等^[9]的研究一致。万榕等认为,处于 III、IV 期的乳腺癌,其 cystatin M 表达水平明显低于 I、II 期者。本研究结果显示:cystatin M 表达水平和乳腺癌肿瘤大小有关;5 cm 以下的肿瘤,其 cystatin M 表达水平较高,大于 5 cm 的肿瘤,其 cystatin M 表达水平较低。这与 Vigneswaran 等^[7]的研究结果相反,可能与其研究例数较少有关。本研究表明,乳腺癌标本中 cystatin M 含量与正常乳腺组织中 cystatin M 含量的差异无统计学意义;乳腺癌标本中 cystatin M 含量与转移癌标本中 cystatin M 含量的差异也无统计学意义。因此,本研究未显示 cystatin M 与乳腺癌的侵袭和转移明显相关。另外,乳腺癌标本中 cystatin M 表达水平与乳腺癌组织学分级、病理学类型无关;乳腺癌标本中 cystatin M 表达水平和转移癌标本中 cystatin M 表达水平与 HER-2、ER、PR 无关。万榕等^[9]比较了 50 例乳腺癌组织和癌旁对照组织 cystatin M 的表达,发现 cystatin M 表达下调与乳腺癌病理学类型、ER、PR 状态无关。

目前,对 cystatin M 生物学意义的了解仍不完全。cystatin M 可通过底物竞争机制与一种半胱氨酸蛋白酶 cathepsin B (CatB) 的活性部分结合,对 catB 的活性起着负性调控作用^[10-11]。将 cystatin M 基因转染至高转移性乳腺癌 MDA-MB-435S 细胞,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。而高侵袭、高转移的肿瘤往往表现为半胱氨酸蛋白酶表达增强,

cystatin M 表达下调或酶活力的下降。乳腺癌中存在 catB 和 cystatin M 之间的表达失衡,可能削弱了 cystatin M 对 catB 活性的调控作用,导致乳腺癌细胞对细胞外基质和基底膜成分的降解作用增强,促进乳腺癌的侵袭与转移。另外, cystatin M 在口咽部鳞状细胞转移癌的表达较原发癌表达上调,并通过从肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)介导的凋亡中“挽救”癌细胞来促进转移^[12]。

综上所述, cystatin M 在乳腺肿瘤生长、浸润和转移过程中的作用机制仍需进一步阐明。利用基因剔除鼠和转基因鼠的临床前试验将会帮助学者们进一步了解 cystatin M 蛋白酶抑制剂的作用,以及了解 cystatin M 维持组织稳态及在细胞分化、增殖和凋亡的作用。Cystatin M 和乳腺癌之间的关系还需要进一步探讨。

参考文献

- [1] 柴凡,姜军,范林军. 乳腺癌预后相关分子标记物的研究进展. 中华乳腺病杂志(电子版),2007, 1:56-57.
- [2] Jedezsko C, Sloane B F. Cysteine cathepsins in human cancer. Biol Chem,2004,385:1017-1027.
- [3] Ni J, Abrahamson M, Zhang M, *et al.* Cystatin E is a novel human cysteine proteinase inhibitor with structural resemblance to family 2 cystatins. J Biol Chem,1997,272:10 853-10 858.
- [4] Sotiropoulou G, Anisowicz A, Sager R. Identification, cloning, and characterization of cystatin M, a novel cysteine proteinase inhibitor, down-regulated in breast cancer. J Biol Chem,1997,272:903-910.
- [5] Zhang J, Shridhar R, Dai Q, *et al.* Cystatin M: a novel candidate tumor suppressor gene for breast cancer. Cancer Res, 2004,64:6957-6964.
- [6] Zeeuwen P L, van Vlijmen Willems I M, Egami H, *et al.* Cystatin M / E expression in inflammatory and neoplastic skin disorders. Br J Dermatol,2002,147:87-94.
- [7] Vigneswaran N, Wu J, Muller S, *et al.* Expression analysis of cystatin C and M in laser-capture microdissected human breast cancer cells-a preliminary study. Pathol Res Pract,2005,200:753-762.
- [8] Li X, Cao X, Li X, *et al.* Expression level of insulin-like growth factor binding protein 5 mRNA is a prognostic factor for breast cancer. Cancer Sci, 2007,98:1592-1596.
- [9] 万榕,肖志芸,王海燕,等. 乳腺癌组织 cystatin M 基因的表达及其临床病理意义. 癌变·畸变·突变, 2006, 18:54-57.
- [10] Nishikawa H, Ozaki Y, Nakanishi T, *et al.* The role of cathepsin B and cystatin C in the mechanisms of invasion by ovarian cancer. Gynecol Oncol,2004,92:881-886.
- [11] Shridhar R, Zhang J, Song J, *et al.* Cystatin M suppresses the malignant phenotype of human MDA-MB-435S cells. Oncogene, 2004,23:2206-2215.
- [12] Vigneswaran N, Wu J, Sacks P, *et al.* Microarray gene expression profiling of cell lines from primary and metastatic tongue squamous cell carcinoma: possible insights from emerging technology. J Oral Pathol Med,2005,34:77-86.

(收稿日期:2008-03-05)

(本文编辑:罗承丽)

王欣,闫哲,李晓青,等. Cystatin M 在乳腺癌及转移癌中的表达和临床意义[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版,2008, 2(3):294-300.