

· 临床研究 ·

乳腺球蛋白在术前乳腺癌和腋窝淋巴结细针穿刺吸取组织中的表达及临床意义

方先勇 朱立强 江涛 朱玉秋

【摘要】 目的 探讨乳腺球蛋白(mammaglobin, MAM)在术前乳腺癌及腋窝淋巴结细针穿刺吸取组织中的表达及临床意义。**方法** 对 91 例原发性乳腺癌行术前细针穿刺,将吸取的组织制备涂片,采用免疫组织化学方法(EnVision 法)检测 MAM 表达,观察 MAM 表达与临床病理指标的关系。同时另收集 15 例原发性肺癌腋窝淋巴结转移患者,分析乳腺癌腋窝淋巴结转移、乳腺癌增生性淋巴结炎和肺癌腋窝淋巴结转移三者间术前腋窝淋巴结 MAM 表达的区别。统计分析采用 χ^2 检验。**结果** 在 91 例原发性乳腺癌患者中 MAM 的阳性表达率为 74.72% (68/91)。MAM 的阳性表达与雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、组织学分级、细胞学分级有关($P < 0.05$),与患者的年龄、肿瘤大小、淋巴结是否转移及 HER-2 状态无关($P > 0.05$)。腋窝淋巴结观察结果显示,MAM 在乳腺癌腋窝淋巴结转移患者中呈阳性表达,在乳腺癌增生性腋窝淋巴结炎和肺癌腋窝淋巴结转移患者中均为阴性表达。**结论** MAM 可表达于原发性和转移性乳腺癌,细针穿刺细胞学检查结合 MAM 的测定对乳腺癌的诊断及鉴别具有一定辅助判断价值。MAM 阳性表达与 ER、PR 状态、细胞学分级、组织学分级有关,有利于了解肿瘤的生物指标及判断预后。

【关键词】 乳腺肿瘤;腋窝淋巴结;乳腺球蛋白;细针穿刺细胞学检查;转移;免疫组织化学法

【中图法分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

Expression of mammaglobin in preoperatively aspirated breast cancer and axillary lymph node tissues and clinical significance FANG Xian-yong, ZHU Li-qiang, JIANG Tao, ZHU Yu-qiu. Clinic Laboratory of the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, 221002 Xuzhou, China

Corresponding author: ZHU Li-qiang, E-mail: fangxianyongxb@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the expression of mammaglobin (MAM) in preoperative breast carcinoma and axillary lymph node tissues using fine-needle aspiration (FNA) biopsy and its clinical significance. **Methods** Ninety-one cases of primary breast carcinoma were enrolled into the study. All cases received preoperative fine-needle aspiration biopsy. Immunocytochemistry for testing MAM was performed in all the cases using EnVision

基金项目:徐州市科技计划项目(XM08C089)

作者单位:221002 江苏徐州,徐州医学院附属医院细胞室

通信作者:朱立强, E-mail: fangxianyongxb@yahoo.com.cn

method to observe the relation between MAM positive expression and cytologic grading and clinicopathological parameters. In the meantime, 15 primary lung cancer patients were collected, with an intention of comparing the MAM expression in metastatic axillary lymph node of breast cancer, hyperplastic axillary lymphadenitis of breast cancer and metastatic axillary lymph node of primary lung cancer. Statistical analysis was performed using chi-square test. **Results** The positive rate of MAM in primary breast carcinoma patients was 74.72% (68/91). The positive expression of MAM was associated with estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), cytological grade and histologic grade ($P < 0.05$), while the MAM expression level was independent of age, tumor size, the status of axillary lymph node metastasis and HER-2 ($P > 0.05$). The observation of MAM expression in axillary lymph nodes showed MAM positively expressed in the metastatic axillary lymph node of breast cancer, but negatively expressed in the hyperplastic axillary lymphadenitis of breast cancer and the metastatic axillary lymph node of primary lung cancer. **Conclusion** MAM expresses in both primary and metastatic breast carcinomas. FNA combined with testing MAM may be helpful for diagnosis and identification of breast cancer. The correlation of MAM positive expression with the status of ER, PR, cytological grade and histologic grade may have a potential value for preoperatively assessing the biological characteristics and the prognosis of the patients.

【Key words】 breast neoplasms; axillary lymph node; mammaglobin; fine-needle aspiration; metastasis; immunocytochemistry

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一。近年来,我国乳腺癌发病率呈明显上升趋势。若能将敏感的肿瘤标志物应用于术前的诊断,发现淋巴结的转移,评价肿瘤侵袭性及预后,对提高乳腺癌的治愈率和生存率具有重要的临床意义。人乳腺球蛋白(mammaglobin, MAM)是近年来发现的乳腺组织特异性蛋白,具有较好的敏感性及特异性^[1]。细针穿刺细胞学检查(fine needle aspiration, FNA)是临床上常用的术前诊断乳腺癌的方法之一^[2],但其应用往往局限于病变的良、恶性判别上。然而,细胞学分级及免疫细胞化学的应用使得细针吸取细胞学能够在术前为临床提供更多、更可靠的肿瘤的内在特征及预后信息。本研究采用术前乳腺癌及腋窝淋巴结 FNA,旨在探讨 MAM 在原发及转移乳腺癌中的表达情况,观察 MAM 表达与细胞学分级及临床病理指标的关系。

1 材料与方法

1.1 一般资料

选取在本医院细胞室 2009 年 9 月至 2011 年 3 月间经穿刺细胞学诊断为

高度可疑乳腺癌及乳腺癌患者 91 例,均为女性,年龄 36 ~ 81 岁,平均年龄 53 岁。穿刺前询问病史、体格检查,仔细检查肿块的部位、大小、活动度和数目以及是否可触及腋窝淋巴结。所有患者在行细针穿刺前均未经任何放、化疗治疗,经术后病理组织学证实均为浸润性导管癌。91 例患者中有 26 例可以触摸到腋窝淋巴结(0.5 ~ 3.0 cm),其中经 FNA 证实 22 例有转移性癌细胞,组织学证实为乳腺癌腋窝淋巴结转移,4 例未检测到转移性癌细胞,为增生性腋窝淋巴结炎。同时,另收集经临床确诊组织学证实的 15 例原发性肺癌腋窝淋巴结转移患者,年龄 31 ~ 83 岁,平均年龄 50 岁,目的是观察 22 例乳腺癌腋窝淋巴结转移、4 例乳腺癌增生性淋巴结炎和 15 例原发性肺癌腋窝淋巴结转移三者间腋窝淋巴结 MAM 表达的区别。

1.2 穿刺与涂片

细针穿刺由一位有丰富经验的细胞学医师操作,穿刺选用 10 ml 一次性注射器,7 号针头。碘伏、75% 乙醇常规消毒患侧乳腺和淋巴结,以左手拇指和食指固定肿块(或在超声引导下进行),右手将针头刺入肿块,当刺入肿块后,将空针回抽 5 ml 产生一定的负压,针头在肿块内前后或上下进退多点抽吸,以获取不同部位的细胞。有少量组织进入空针后,放弃负压拔出针头,将抽吸细胞一部分涂于洁净的普通玻片上,行常规刘氏染色(快速瑞氏染色)作一般脱落细胞学检查,一部分涂于经防脱预处理的玻片上,95% 乙醇固定,行免疫细胞化学染色观察 MAM 表达情况。

1.3 免疫细胞化学染色

一抗采用福州迈新生物技术开发有限公司的 MAM 即用型抗体。检测系统采用福州迈新生物技术开发有限公司 EliVision 试剂盒。95% 乙醇固定的细胞涂片稍水洗后,采用枸橼酸盐修复液微波修复,高火加热 2 min 至沸腾,小火维持在沸腾状态加热 5 min,自然冷却至室温,PBS 冲洗。由于细胞涂片上抗原保存良好,也可免去此抗原修复步骤。加 3% 过氧化氢溶液作用 5 ~ 8 min 消除内源性过氧化物酶。PBS 溶液洗涤 2 min,重复 3 次。加第一抗体于湿盒中 4 ℃ 过夜。PBS 溶液洗涤 2 min,重复 3 次。滴加二步法 EliVision 试剂盒中的试剂 A(Polymer enhancer),室温下孵育 20 min。PBS 溶液洗涤 2 min,重复 3 次。加入试剂盒中的试剂 B(Polymerized HRP2 AntiMouse/Rabbit IgG),室温下孵育 30 min。PBS 溶液洗涤 2 min,重复 3 次。二氨基联苯胺(DAB)显色,在显微镜下观察显色反应,适时用流水冲洗以便终止显色反应。苏木精复

染,盐酸乙醇分化、自来水冲洗返蓝、脱水、透明、中性树胶封固。

结果判定:只记录单个或单层成团的癌细胞,细胞质中出现深于背景的棕色颗粒为阳性着色;阳性程度的评判^[3]参照表 1,0 ~ + 为阴性,++ ~ +++ 为阳性。

1.4 细胞学分级

盲法邀请两位有多年诊断经验的细胞学医师参照 Robinson^[4] 及 Taniguchi^[5] 的分级方法(表 2)对所有穿刺细胞涂片逐项进行打分评估,将每个病例的 7 项参数分值数相加,总分 7 ~ 11 分为 I 级,12 ~ 16 分为 II 级,17 ~ 21 分为 III 级。细胞学分级越高,肿瘤分化程度越差,预后不良。

表 1 免疫细胞化学染色阳性程度的判定系统

着色类型	分值	判定结果
≤10% 的肿瘤细胞未染色或微弱染色	0	阴性
>10% 的肿瘤细胞弱染色	+	阴性
>10% 的肿瘤细胞中等染色	++	阳性
>10% 的肿瘤细胞强染色	+++	阳性

表 2 乳腺癌细胞学分级的评分标准

指标	细胞学评分分值(分)		
	1	2	3
坏死物质	少量或无	少量	大量
细胞离散度	多数成团	部分成团、部分散在	大多散在
细胞大小	< 3 个红细胞	3 ~ 4 个红细胞	> 4 个红细胞
核浆比	< 50%	50% ~ 80%	>80%
核多形性	较规则	轻度异型	显著异型
核染色质颗粒	较细致	中等粗细	粗糙
核仁	不明显	可见	明显或多形

1.5 免疫组织化学方法及结果判定

采用常规 SP 法,按照试剂盒(购于福州迈新生物技术开发有限公司)要求进行操作。ER、PR 结果判定:阳性表达于细胞核内,当确切定位超过 10% 肿瘤细胞表达激素受体标记,则认为阳性;HER-2 结果判定:细胞膜可见棕黄色颗粒为阳性着色,细胞膜无着色或 ≤10% 的细胞膜轻微着色为阴性,>10% 的细胞膜轻微或不连续着色为+,>10% 的细胞膜中度连续着色为++,>10% 的细胞膜连续着色并形成网格状为+++,+++判为阳性^[6]。

1.6 统计学方法

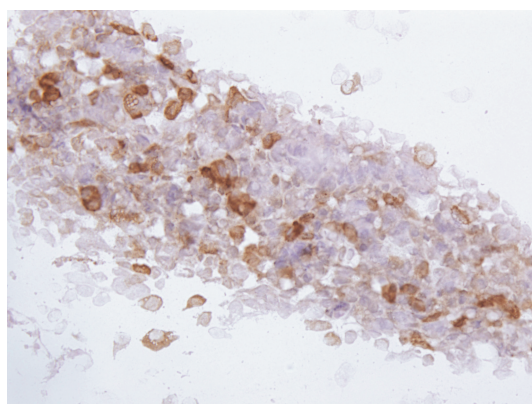
采用 SPSS11.5 统计软件包进行统计学分析,本组计数资料采用 2×2 表和

R×C χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MAM 在乳腺癌细胞中的表达

免疫细胞化学法测定 91 例乳腺癌细胞的 MAM 表达, 阳性染色主要定位于细胞的胞浆中(图 1)。68 例乳腺癌患者 MAM 呈阳性表达, 阳性表达率为 74.72%。相对应的石蜡切片经免疫组织化学检测, MAM 阳性率为 76.92% (70/91)。其中, 1 例细胞涂片 MAM 表达为阳性, 而对应的石蜡切片为阴性; 3 例石蜡切片 MAM 为阳性表达, 而对应的细胞涂片为阴性, 符合率为 95.6%。



浸润性导管癌细针穿刺吸取细胞涂片乳腺球蛋白(>10% 的肿瘤细胞)呈阳性表达。

图 1 病理图片(EnVision 法 ×400)

2.2 MAM 表达与细胞学分级及临床特征的关系

MAM 阳性表达与患者年龄、肿瘤大小、淋巴结是否转移无关($P > 0.05$), 但与 ER、PR、组织学分级及细胞学分级相关($P < 0.05$) (表 3)。将 91 例乳腺癌按术后免疫组织化学结果 ER、PR、HER-2 阳性和阴性分组, 发现 ER 和 PR 阳性组的 MAM 阳性率明显高于阴性组($P < 0.05$); 而 HER-2 阳性组和阴性组之间差异无统计学意义(表 3)。

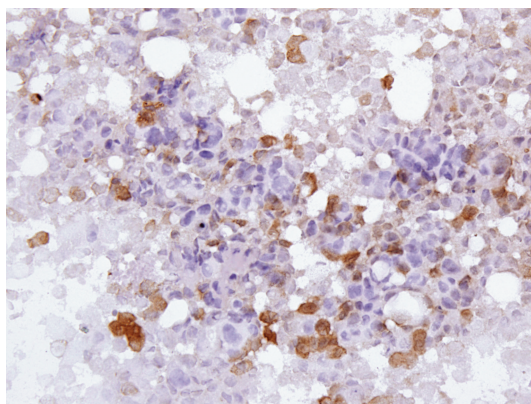
2.3 MAM 在术前触摸到腋窝淋巴结细针穿刺吸取细胞中的表达

26 例术前触摸到腋窝淋巴结患者中 22 例 FNA 证实有乳腺癌腋窝淋巴结转移, 免疫细胞化学方法检测其细针穿刺吸取细胞标本中 MAM 表达的结果显示, 15 例 MAM 阳性表达, MAM 阳性表达率为 68.18% (15/22); MAM 在其余 4 例增生性淋巴结炎及另搜集的 15 例原发性肺癌腋窝淋巴结转移患者中

均为阴性表达(0/19)(图 2~4)。

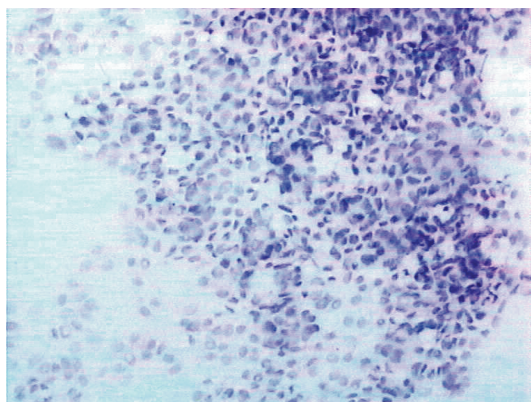
表 3 乳腺球蛋白(MAM)表达与临床病理因素的关系

临床病理因素	例数	MAM(例)		χ^2 值	P 值
		+(%)	-		
年龄(岁)				0.01	0.95
≤50	44	33(75.0%)	11		
>50	47	35(74.5%)	12		
肿瘤直径(cm)				3.06	0.08
≤2	42	35(83.3%)	7		
>2	49	33(67.3%)	16		
腋窝淋巴结转移				0.18	0.67
无	52	38(73.1%)	14		
有	39	30(76.9%)	9		
组织学分级				80.74	0.00
高分化	21	19(90.5%)	2		
中分化	44	33(75.0%)	11		
低分化	26	16(61.5%)	10		
细胞学分级				79.61	0.00
I 级	24	21(87.5%)	3		
II 级	41	31(75.6%)	10		
III 级	26	16(61.5%)	10		
雌激素受体				5.85	0.02
+	62	51(82.3%)	11		
-	29	17(58.6%)	12		
孕激素受体				13.30	0.00
+	60	52(86.7%)	8		
-	31	16(51.6%)	15		
HER-2				0.23	0.63
+	28	20(71.4%)	8		
-	63	48(76.2%)	15		



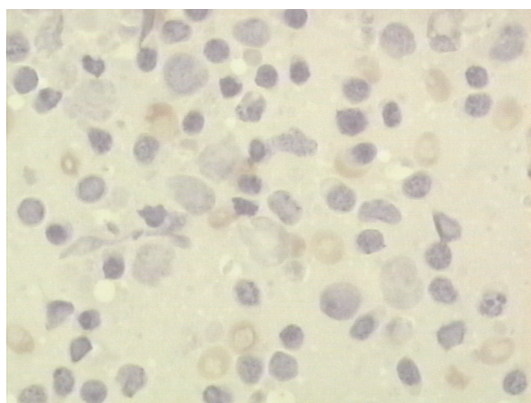
浸润性导管癌腋窝淋巴结转移,腋窝淋巴结细针穿刺吸取细胞涂片乳腺球蛋白(>10%的转移性癌细胞)呈阳性表达。

图 2 病理图片(EnVision 法 ×400)



原发性肺癌腋窝淋巴结转移,腋窝淋巴结细针穿刺吸取细胞涂片乳腺球蛋白呈阴性表达。

图3 病理图片(EnVision 法 ×400)



乳腺癌增生性淋巴结炎,腋窝淋巴结细针穿刺吸取细胞涂片乳腺球蛋白呈阴性表达。

图4 病理图片(EnVision 法 ×400)

3 讨论

MAM 是 Watson 等^[7] 1996 年首次在乳腺癌组织中发现的。MAM 基因位于 11q12.3 ~ 13.1 染色体区域,序列全长 503 bp,其翻译产物 MAM 是 1 个有 93 个氨基酸的蛋白质。由于 MAM 是乳腺特异性的分泌型球蛋白,因此在乳腺癌的早期诊断、鉴别诊断、治疗后随访和基因治疗、免疫治疗等方面具有潜在的临床应用价值。

在以往的研究中发现,MAM 在乳腺癌中具有较高的阳性表达率。O'Brien 等^[8] 在 81% 的乳腺癌患者中检测到 MAM 阳性表达,在 74% 原发性乳腺癌中检测到 MAM 阳性表达,在乳腺纤维腺瘤中,MAM 均为阴性。应用免疫组织化学技术检测 165 例早期原发乳腺癌患者的 MAM,发现其阳性率为 72.1%,提示 MAM 可用于乳腺癌的早期筛查与诊断^[9]。但以往检测 MAM 的

方法必须在术后组织切片上完成,对术前的病情评估、肿瘤生物学特征的认识等均有一定的局限性;对无法进行手术切除的乳腺癌患者的个性化治疗也失去了指导作用。

细针吸取细胞学是术前诊断乳腺癌的重要方法之一,具有快速、准确、经济、简便、创伤小的优点。美国一些医学中心资料显示,对可触及肿物,FNA 是极好的诊断工具;FNA 对恶性肿瘤诊断的敏感性、特异性均达到 99%^[10]。越来越多的临床医生信任细胞学报告并以此作为进一步治疗的依据,并期待给予更多的预后和肿瘤的分子生物学信息。近年来,随着免疫细胞化学技术的发展,越来越多的文献表明该技术不仅可以协助细胞学诊断、提高细胞学的确诊率,还可用于手术前激素受体、HER-2 等指标的检测^[3,11]。

本研究将细针抽吸与免疫细胞化学技术相结合,用穿刺方法获取乳腺癌组织或淋巴结的细胞涂片,通过免疫细胞化学染色得到某些生物学指标参数。本研究结果显示,细针穿刺吸取细胞涂片中 MAM 染色特征及阳性表达率与组织切片基本一致;MAM 阳性表达与患者年龄、肿瘤大小、是否淋巴结转移无关,但与低组织学级别及低细胞学级别有关,提示 MAM 可能成为乳腺癌潜在的预后预测标志物,但还需要大量的临床随访来证实。ER、PR、HER-2 状态是目前乳腺癌治疗上非常重要的参考指标。近些年,一些研究者通过基因表达谱分析或免疫组织化学技术对乳腺癌进行了分子分型,将乳腺癌清晰的分为腺腔型[ER/PR(+),HER-2(-)]、HER-2 过表达型[ER/PR(-),HER-2(+)]、基底样型[ER/PR(-),HER-2(-)]等几种亚型,并指出腺腔型[ER/PR(+),HER-2(-)]的预后优于其他各型^[12-13]。本研究结果显示,MAM 在 ER、PR 阳性组的乳腺癌中表达明显高于阴性组,且差异显著,与多数报道^[14-15]相一致,因而 MAM 的免疫细胞化学结果可作为术前制定治疗方案的辅助指标;对于某些 ER、PR 阴性而 MAM 阳性的患者,其对内分泌治疗的指导意义还需进一步研究。而 HER-2 阳性组和阴性组的 MAM 表达差异不显著,提示 HER-2 与 MAM 没有明显相关。

乳腺癌转移是一个级联过程,畸变癌细胞侵入血液及淋巴循环;在淋巴循环中可能首先到达腋窝淋巴结,淋巴结转移与疾病复发及患者生存时间直接相关。术前用细针吸取细胞学及免疫细胞化学检测腋窝淋巴结是否转移是很有价值的乳腺癌诊断及预后指标。有研究证实 MAM 具有乳腺很高的组织特异性,在其他癌组织中很少被检测到^[8,16]。本组 91 例乳腺癌患者中 39 例术

后证实有腋窝淋巴结转移,但术前只有 26 例可以触摸到明显的淋巴结肿大,对 22 例有淋巴结转移的患者行细针吸取细胞涂片,免疫细胞化学方法检测 MAM 的表达,其中 15 例(68.18%) MAM 为阳性表达;4 例无转移的淋巴结(乳腺癌增生性淋巴结炎)及 15 例原发性肺癌腋窝转移的淋巴结均未见 MAM 表达。因此,利用免疫细胞化学检测腋窝淋巴结 MAM 的表达,对于细胞形态似乳腺来源而未知原发灶的病例, MAM 阳性可作为支持乳腺来源诊断的依据之一。也有研究表明, MAM 不仅表达于乳腺,在生殖系统如子宫内膜、卵巢、宫颈、前列腺和汗腺的肿瘤中也有不同程度的表达^[17-18],但此类恶性肿瘤很少出现腋窝淋巴结的转移,因此,在应用时可结合临床情况综合判断。

综上所述,在乳腺癌的术前诊断中, FNA 结合 MAM 检测具有一定辅助判断价值。在某些细胞学形态类似乳腺癌来源而未知原发灶的病例, MAM 免疫细胞化学可有助于诊断,但需结合其他临床病理资料综合考虑。

参考文献

- [1] Watson MA, Dintzis S, Darrow CM, et al. Mammaglobin expression in primary, metastatic, and occult breast cancer [J]. Cancer Res, 1999, 59 (13): 3028-3031.
- [2] Tanaka K, Shoji T, Tominaga Y, et al. Statistical analysis of diagnostic failure of fine needle aspiration cytology (FNAC) in breast cancer [J]. J Surg Oncol, 2001, 76(2):100-105.
- [3] Rita N, Cecilia B, Pellegrino C, et al. Immunocytochemical evaluation of HER-2/neu on fine-needle aspirates from primary breast carcinomas [J]. Diagn Cytopathol, 2003, 28(3):142-146.
- [4] Robinsin IA, McKee G, Nicholson A, et al. Prognostic value of cytological grading of fine-needle aspirates from breast carcinomas [J]. Lancet, 1994, 343(8903):947-949.
- [5] Taniguchi E, Yang Q, Tang W, et al. Cytologic grading of invasive breast carcinoma: correlation with clinicopathologic variables and predictive value of nodal metastasis [J]. Acta Cytol, 2000, 44(4):587 - 591.
- [6] 《乳腺癌 HER2 检测指南》编写组. 乳腺癌 HER2 检测指南[J]. 中华病理学杂志, 2006, 35(10):631-633.
- [7] Watson MA, Fleming TP. Mammaglobin, a mammary specific member of the uteroglobin gene family is overexpressed in human breast cancer [J]. Cancer Res, 1996, 56 (4):860-865.
- [8] O'Brien N, Maguire TM, O'Donovan N, et al. Mammaglobin A: a promising marker for breast cancer [J]. Clin Chem, 2002, 48 (8):1362-1364.
- [9] Fritzsche FR, Thomas A, Winzer KJ, et al. Co-expression and prognostic value of gross cystic disease fluid protein 15 and mammaglobin in primary breast cancer [J]. Histol Histopathol, 2007, 22(11):1221-1230.
- [10] Ariga R, Bloom K, Reddy VB, et al. Fine-needle aspiration of clinically suspicious palpable breast masses with histopathologic correlation [J]. Am J Surg, 2002, 184(5):410-413.
- [11] Sneige N. Utility of cytologic specimens in the evaluation of prognostic and predictive factors of breast cancer: current issues and future directions [J]. Diagn Cytopathol, 2004, 30(3):158-165.
- [12] Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumors [J]. Nature, 2000, 406(17):747-752.
- [13] Liu H, Fan Q, Zhang Z, et al. Basal-HER-2 phenotype shows poorer survival than basal-like phenotype in hormone

- receptor-negative invasive breast cancers [J]. Hum Pathol, 2008, 39(2):167 - 174.
- [14] Guan XF, Hamedani MK, Adeyinka A, et al. Relationship between mammaglobin expression and estrogen receptor status in breast tumors [J]. Endocrine, 2003, 21(3):245-250.
- [15] Pan PN, Waanders E, Manders P, 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]. J Clin Oncol, 2004, 22 (4):691-698.
- [16] Houghton RL, Dillon DC, Moles DA, et al. Transcriptional complementarity in breast cancer: application to detection of circulating tumor cells [J]. Mol Diagn, 2001, 6 (2):79 - 91.
- [17] Zafrakas M, Petschke B, Donner A, et al. Expression analysis of mammaglobin A (SCGB2A2) and lipophilin B (SCGB1D2) in more than 300 human tumors and matching normal tissues reveals their co-expression in gynecologic malignancies [J]. BMC Cancer, 2006, 6:88.
- [18] Sjodin A, Guo D, Hofer PA, et al. Mammaglobin in normal human sweat glands and human sweat gland tumors [J]. J Invest Dermatol, 2003, 121 (2):428 - 429.

(收稿日期:2011-04-08)

(本文编辑:赵彬)

方先勇,朱立强,江涛,等. 乳腺球蛋白在术前乳腺癌与腋窝淋巴结细针穿刺吸取组织中的表达及临床意义[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2011, 5(6):660-669.