

## · 论著 ·

## 乳腺癌患者外周血乳腺小黏蛋白的检测及其临床意义

姜专基 田英 刘鸿雁 司晓枫

【摘要】 目的 探讨不同人群外周血中乳腺小黏蛋白(small breast epithelial mucin, SBEM)水平以及乳腺癌患者外周血中 SBEM 水平与病理因素的关系和临床意义。方法 收集经病理证实的 68 例乳腺癌及 20 例乳腺纤维腺瘤和 20 例健康志愿者。采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测 3 组不同人群血清 SBEM 水平。分析乳腺癌患者外周血中 SBEM 水平与病理因素的关系。3 组均抽取空腹静脉血 3 ml。采集血样前乳腺癌患者及纤维腺瘤组患者均未接受放疗、化疗或生物治疗等干预措施及有创检查。统计分析,符合正态分布的,两组间比较采用独立样本  $t$  检验,多组间比较行方差分析, LSD 法进行两两比较。不符合正态分布的多组比较采用 Kruskal-Wallis  $H$  检验。结果 3 组间血清 SBEM 水平差异存在显著的统计学意义( $P < 0.050$ )。乳腺癌组血清 SBEM 水平均高于纤维腺瘤组和健康志愿者组( $P$  均  $< 0.001$ )。纤维腺瘤组与健康志愿者组相比,差异无统计学意义( $P > 0.050$ )。乳腺癌患者的血清 SBEM 水平与淋巴结转移状况和 TNM 分期有关( $P$  均  $< 0.001$ ),与患者的年龄、月经状况、病理类型、组织学分级、肿瘤大小、ER、PR、HER-2、P53、Ki-67、基因分型无关( $P$  均  $> 0.050$ )。乳腺癌 SBEM 血清水平随淋巴结分期增加而升高,不同淋巴结分期期间的 SBEM 水平差异有显著的统计学意义( $P < 0.001$ )。结论 SBEM 特异性表达于乳腺癌外周血。乳腺癌患者外周血 SBEM 水平在一定程度上能够反映临床分期和腋窝淋巴结情况,有望成为检测乳腺癌外周血微转移的标志物和判断乳腺癌病情发展和预后的指标。

【关键词】 乳腺肿瘤;乳腺小粘蛋白;酶联免疫吸附试验;外周血;疾病进展

【中图分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

**Detection of small breast epithelial mucin level in peripheral blood of breast cancer patients and its clinical significance** JIANG Zhuan-ji, TIAN Ying, LIU Hong-yan, SI Xiao-feng. Department of Mammary Surgery, Tumor Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730050, China

【Abstract】 **Objective** To explore the level of small breast epithelial mucin (SBEM) in peripheral blood in different populations, and its association with pathological factors of breast cancer patients as well as the clinical significance. **Methods** Pathologically confirmed 68 breast cancer and 20 mammary fibroadenoma patients and 20 healthy volunteers were enrolled in the study. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the serum SBEM level in the three different populations. The association of the serum SBEM level with pathological factors of breast cancer patients was analyzed. Empty stomach vein blood of 3 ml was obtained. Before blood sample collection, breast cancer and fibroadenoma patients did not have any administration of radiotherapy, chemotherapy, bioremediation or any invasive

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2012.02.003

基金项目:2011 年兰州市科技局社会发展基金资助项目(20110236)

作者单位:730050 兰州,甘肃省肿瘤医院乳腺科(姜专基),检验科(田英、司晓枫);730000 兰州,甘肃奇正藏药有限公司研发部(刘鸿雁)

examinations. Statistical analysis was done using *t* test for comparison of two groups, one-way variance analysis for more groups and LSD for multiple comparison, and Kruskal-Wallis test for comparison of groups of non-normal distribution and Mann-Whitney test for multiple comparison. **Results** There was statistical difference in the serum SBEM level between the three groups ( $P < 0.050$ ). The serum SBEM level in the breast cancer group was higher than in both the fibroadenoma group and the volunteer group ( $P < 0.001$ ), but there was no statistical difference between the fibroadenoma group and the volunteer group ( $P > 0.050$ ). In breast cancer patients, the serum SBEM level was correlated with axillary lymph nodes status and TNM stage ( $P < 0.001$ ), but not correlated with the age, menstruation condition, pathological type, histological grade, tumor maximum diameter, estrogen receptor, progesterone receptor, human epidermal growth factor receptor 2, p53 protein, Ki-67, and gene subtypes (all  $P > 0.050$ ). The serum SBEM level increased with increase of stage of lymph nodes, and between different lymph node stages there was statistical difference in the serum SBEM ( $P < 0.001$ ) in breast cancer patients. **Conclusion** SBEM specifically expresses in the peripheral blood of breast cancer patients. The Serum SBEM level in breast cancer patients can reflect clinical stage and lymph node status to a certain extent. SBEM is a promising marker detecting micro-metastasis and judging progression and prognosis of breast cancer.

**【Key words】** breast neoplasms; small breast epithelial mucin; enzyme-linked immunosorbent assay; peripheral blood; disease progression

乳腺癌是女性常见恶性肿瘤,其发病率已跃居中国女性恶性肿瘤首位,大约 30% 的患者最终发生远处转移<sup>[1-2]</sup>。循环血液中的肿瘤细胞是导致乳腺癌复发的重要原因。因此,寻找一种特异性指标,早期发现外周血循环肿瘤细胞对指导临床治疗和判断预后具有重要的意义。甘肃省肿瘤医院采用酶联免疫吸附试验法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)对乳腺癌外周血乳腺小黏蛋白(small breast epithelial mucin, SBEM)进行检测,探讨其临床意义。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

收集 2010 年 3 月至 2010 年 12 月甘肃省肿瘤医院首诊并经病理确诊的 68 例乳腺癌及 20 例纤维腺瘤患者外周血标本。68 例乳腺癌均为女性,年龄 26 ~ 77 岁,平均年龄 52.30 岁,中位年龄 48.50 岁。所有患者均无肝功能异常及免疫系统疾病。乳腺癌组织学类型:浸润性导管癌 49 例,髓样癌 5 例,黏液癌 4 例,浸润性小叶癌 3 例,混合型癌 7 例。按照 UICC2003 年制订的 TNM 分期标准:I 期 10 例,II 期 42 例,III 期 16 例。20 例纤维腺瘤患者均为女性,年龄 16.00 ~ 55.00 岁,平均年龄 35.15 岁,中位年龄 35.50 岁。收集同时期健康志愿者 20 例为对照,均为到本院体检的健康女性,年龄 26 ~ 54 岁,平均年龄 42.90 岁,中位年龄 43.00 岁。检测不同人群血清 SBEM 水平的差别及乳腺癌患者外周血 SBEM 水平与临床病理学因素的关系。

### 1.2 方法

**1.2.1 标本采集:**3 组均抽取空腹静脉血 3 ml 于真空采血管内,采血前乳腺

癌患者及纤维腺瘤组患者均未接受放疗、化疗或生物治疗等干预措施及有创检查,采集的样本 20 min 内以 3000 r/min、离心半径 8 cm,离心 10 min,分离, -80 ℃ 保存待测。

**1.2.2 试验方法:**采用 ELISA 法,试剂盒购自上海拜力生物科技有限公司(美国进口),检测步骤严格按说明书进行。洗板机为美国 Rayto. RT-3000 型;ELISA 数据由 Rayto. RT-6000 型全自动酶标仪读取。

### 1.3 统计学处理

统计分析采用 SPSS 13.0 软件。Shapiro-Wilk 法行正态分布检验,  $P > 0.050$ 。为满足正态分布;Levene' test 行方差齐性检验,  $P > 0.050$ 。为满足方差齐性。满足正态分布和方差齐性条件下结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用独立样本  $t$  检验,多组间比较行方差分析,采用 LSD 法进行两两比较。在不符合正态分布和方差不齐条件下结果以  $M(Q_R)$  表示,采用非参数检验中的 Kruskal-Wallis H test。  $P < 0.050$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 乳腺癌、纤维腺瘤、健康志愿者的 SBEM 检测结果

3 组经 Shapiro-Wilk 法检验,  $P < 0.050$ , 不符合正态分布;经 Levene' test 检验,  $P < 0.050$ , 方差不齐;采用 Kruskal-Wallis 检验。乳腺癌组术前 SBEM 水平与纤维腺瘤组、健康志愿者组的差异有显著的统计学意义( $P$  均  $< 0.001$ );良性肿瘤和健康志愿者之间无统计学差异( $P > 0.050$ , 表 1)。

表 1 不同人群外周血 SBEM 水平的比较

组别	例数	SBEM [ $M(Q_R)$ , ng/ml]
乳腺癌组 <sup>a</sup>	68	44.01 (26.14)
乳腺纤维腺瘤组 <sup>b</sup>	20	19.06 (9.87)
健康志愿者组 <sup>c</sup>	20	18.55 (6.11)
$\chi^2$ 值		62.452
$P$ 值		0.000

SBEM: 乳腺小黏蛋白; a: 与乳腺纤维腺瘤组比较  $P < 0.001$ ; b: 与健康志愿者组比较  $P > 0.050$ ; c: 与乳腺癌组比较  $P < 0.001$

### 2.2 乳腺癌外周血 SBEM 与临床病理学参数的关系

乳腺癌患者外周血 SBEM 经 Shapiro-Wilk 检验,  $P > 0.050$ , 经 Levene' test 检验,  $P > 0.05$ , 满足正态分布和方差齐性;采用  $t$  检验或方差分析法。乳腺癌组外周血 SBEM 水平与临床分期、腋窝淋巴结状态有关( $P < 0.050$ );临床 III 期患者水平显著高于临床 I、II 期患者,淋巴结阳性组水平显著高于淋巴结阴性组( $P$  均  $< 0.001$ );外周血 SBEM 水平与患者的年龄、月经状态、组织学分级、病理学类型、肿瘤最大径、ER、PR、HER-2、P53、Ki-67、基因分型无关(表 2)。

表 2 乳腺癌患者外周血乳腺小黏蛋白(SBEM)与临床病理学参数的关系

临床病理指数	例数	SBEM (ng/ml)	F 值	P 值
临床分期			0.009	0.000 <sup>a</sup>
I + II	52	42.39±16.23		
III	16	63.66±17.02		
组织学分级			1.733	0.185 <sup>b</sup>
1 级	14	45.44±17.87		
2 级	38	44.95±18.04		
3 级	16	54.90±19.89		
淋巴结状况			3.363	0.000 <sup>a</sup>
-	33	34.67±11.47		
+	35	59.39±16.01		
病理学类型			0.831	0.482
浸润性导管癌	49	47.82±19.92		
浸润性小叶癌	3	47.45±13.36		
混合性癌	7	54.29±15.22		
其他	9	39.71±14.33		
肿瘤最大径(cm)			2.123	0.128
≤2	5	39.42±31.37		
2~5	44	45.30±16.28		
>5	19	54.35±19.07		
年龄(岁)			1.351	0.266 <sup>b</sup>
≤35	7	57.14±15.54		
35<年龄≤60	56	46.80±19.21		
>60	5	40.38±12.54		
月经状况			0.147	0.555 <sup>a</sup>
绝经前	48	46.52±19.07		
绝经后	20	49.48±17.901		
基因分型			0.106	0.956 <sup>b</sup>
Luminal A 型	39	47.33±18.86		
Luminal B 型	7	43.95±13.34		
HER-2 阳性型	7	48.36±17.06		
基底样亚型	15	48.71±22.14		
P53			0.202	0.804 <sup>a</sup>
-	23	48.19±18.02		
+	45	46.99±19.16		
Ki-67			0.101	0.467 <sup>a</sup>
-	17	44.52±20.59		
+	51	48.35±18.08		
HER-2(IHC)			2.194	0.783 <sup>a</sup>
-~++	54	47.71±19.62		
+++	14	46.16±14.89		
ER			0.016	0.716 <sup>a</sup>
-	22	48.60±20.25		
+	46	46.82±18.04		
PR			0.262	0.302 <sup>a</sup>
-	31	49.96±18.61		
+	37	45.24±18.67		

a: t 检验; b: 方差分析



### 2.3 乳腺癌患者外周血 SBEM 与淋巴结分期的关系

乳腺癌患者外周血 SBEM 经 Shapiro-Wilk 检验不符合正态分布,采用 Kruskal-Wallis 检验。外周血 SBEM 水平随淋巴结分期增加而升高,不同淋巴结分期期间的 SBEM 水平差异有显著的统计学意义( $P < 0.001$ ) (表 3)。

表 3 乳腺癌患者外周血乳腺小黏蛋白(SBEM)与淋巴结分期的关系

淋巴结分期(枚)	例数	SBEM[ $M(Q_R)$ , ng/ml]
$N_0(0)$	33	33.01(9.54)
$N_1(1 \sim 3)$	25	52.59(13.17)
$N_2(4 \sim 9)$	9	79.30(26.81)
$N_3(\geq 10)$	1	80.01
$\chi^2$ 值		40.426
$P$ 值		0.000

因为  $N_3$  仅为 1 例,样本代表性差,未行各组间两两比较

## 3 讨论

乳腺癌死亡与早期转移密切相关,转移过程中有 2 个步骤非常重要,其一为肿瘤细胞脱落至血循环;其二为肿瘤细胞与血管内皮细胞黏附<sup>[3]</sup>,通过由其他物质降解的血管基底膜破损处,迁徙至机体其他地方形成新转移灶。外周血是最为重要、最为理想的检测途径,能够及时检测到外周血中循环肿瘤细胞或特异性抗体将会对乳腺癌的治疗产生深远的影响<sup>[4]</sup>。

SBEM 是一种由 SBEM-mRNA 编码的 90 个氨基酸组成的唾液酸糖蛋白。Richard<sup>[5]</sup> 于 2002 年首次报道,利用同位素标记技术和基因表达分析数据库筛选分离得到 SBEM-mRNA,证明 SBEM-mRNA 仅在乳腺和唾液腺组织中表达,而在其他组织中不表达,故具有乳腺组织特异性,可作为乳腺癌微转移检测的生物学标志物。

目前国内外关于 SBEM 的研究绝大多数是采用 PCR 法或免疫组织化学法,这些方法虽具有足够的可靠性和敏感性,但因其操作复杂及费用昂贵,不适合大规模临床筛查和门诊机会性筛查,亦不适合乳腺癌的门诊随访,更为重要的是免疫组织化学法无法反复对外周血中低含量循环肿瘤细胞进行精确测量。ELISA 法相对便捷。本试验采用 ELISA 法对不同人群外周血 SBEM 进行研究,发现乳腺癌外周血 SBEM 水平显著高于纤维腺瘤和健康志愿者,差异有显著的统计学意义( $P < 0.001$ ),纤维腺瘤组和健康志愿者组间差异无统计学意义。通过分析乳腺癌患者外周血 SBEM 与临床病理学参数的关系发现,乳腺癌患者外周血 SBEM 与年龄、月经状态、组织学分级、病理学类型、肿瘤最大径、激素受体状态(ER/PR)、HER-2、P53、Ki-67、基因分型无关,但与患者的 TNM 分期和淋巴结转移状态相关( $P < 0.001$ )。患者外周血 SBEM 水平随

TNM 分期的增加而升高,其中Ⅲ期患者的 SBEM 水平远高于Ⅰ和Ⅱ期患者的水平( $P<0.001$ )。这说明乳腺癌患者外周血 SBEM 水平能够反映临床分期情况,随临床分期增高,患者发生血道播散或微转移的风险就越高;这与杨华伟和仲雷等<sup>[6-7]</sup>研究结果相吻合。由于本试验样本含量小,样本构成中主要为Ⅱb和Ⅲa期患者,Ⅰ期患者例数较少,故样本代表性不够好,无法满足对该样本进一步分层分析。乳腺癌患者外周血 SBEM 水平与临床分期之间的关系将增大样本量做进一步研究。

腋窝淋巴结是乳腺癌重要预后因子,腋窝淋巴结阳性通常提示患者预后不佳。本研究显示,腋窝淋巴结阳性组外周血 SBEM 水平显著高于淋巴结阴性组[(59.39±16.01)ng/ml 比(34.67±11.47)ng/ml,  $P<0.001$ ]。腋窝淋巴结阳性组外周血 SBEM 水平随淋巴结分期增加而增高。这也说明淋巴结转移数目愈多,患者发生微转移的风险愈高。

基底样亚型乳腺癌是近年研究热点之一<sup>[8-9]</sup>,通常认为其局部复发和远处转移率均较高,预后较差,属于高危乳腺癌,而 Luminal 亚型通常预后较好。本研究分组结果显示,基底样亚型组中的 SBEM 水平略高于分化较好的 Luminal 亚型组的水平,但两者之间差异无统计学意义,故 SBEM 是否有望做为一种独立的乳腺癌不良预后因子,仍有待于进一步研究。而 Miksicek 等<sup>[5,10]</sup>研究结果显示,SBEM 在 ER(+)、分化较好的 Luminal 亚型的 MCF-7、T-47D 和 ZR-75-1 细胞株中有表达,但在 ER-、分化较差的基底样亚型的 MDA-MB-231 细胞株中无表达。结论有所不同可能与以下因素有关:(1)本试验样本为 68 例, Miksicek 的研究为 54 例,二者均为小样本研究,故误差较大;(2)本研究背景与 Miksicek 等不同,本研究为临床研究,而后者为基础研究;(3)研究方法和检测目标不同,本研究采用 ELISA 法,检测目标为外周血 SBEM 抗体,后者采用 RT-PCR 法,检测目标为播散肿瘤细胞的 SBEM-mRNA;(4)其他不可控制的因素偏差。

Ki-67 为判断肿瘤细胞增殖活性的指标之一,临床资料表明 Ki-67 增殖指数高低与肿瘤的分化程度、浸润转移以及预后密切相关,是评判肿瘤预后的重要参考指标<sup>[11]</sup>。本研究显示 Ki-67 高表达乳腺癌患者的 SBEM 水平有增高的趋势。

综上所述,乳腺癌患者外周血 SBEM 水平在一定程度上能够反映临床分期和腋窝淋巴结情况。

## 参考文献

- [1] Ignatiadis M, Kallergi G, Ntoulia M, et al. Prognostic value of the molecular detection of circulating tumor cells using a multimer reverse transcription-PCR assay for cytokeratin 19, mamaglobin A, and HER2 in early breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(9): 2593-2600.

- [2] 章涤,黄艳春. EGFR 和 SBEM 联合检测在乳腺癌外周血微转移中的意义[J]. 新疆医科大学学报, 2009, 32(3): 315-317.
- [3] 姜专基,高秉仁,杨碎胜. 血栓调节蛋白在乳腺癌组织中的表达[J]. 兰州大学学报(医学版), 2009, 35(4): 9-12.
- [4] Liu ZZ, Xie XD, Qu SX, et al. Small breast epithelial mucin (SBEM) has the potential to be a marker for predicting hematogenous micrometastasis and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer [J]. Clin Exp Metastasis, 2010, 27(4): 251-259.
- [5] Miksicek RJ, Myal Y, Watson PH, et al. Identification of a novel breast- and salivary gland-specific, mucin-like gene strongly expressed in normal and tumor human mammary epithelium[J]. Cancer Res, 2002, 62(10): 2736-2740.
- [6] 杨华伟,曹骥,杨南武,等. 乳腺癌患者外周血 SBEM mRNA 的检测及其临床意义[J]. 癌症, 2005, 24(7): 842-845.
- [7] 仲雷,张建国,郭宝良,等. 乳腺小黏蛋白在检测乳腺癌患者外周血微转移中的意义[J]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2008, 2(1): 40-47.
- [8] 杨钱,陈洁,李宏江,等. 不同分子亚型乳腺癌的临床病理特征及预后分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2011, 33(1): 42-46.
- [9] Lee HE, Kim JH, Kim YJ, et al. An increase in cancer stem cell population after primary systemic therapy is a poor prognostic factor in breast cancer[J]. Br J Cancer, 2011, 104(11): 1730-1738.
- [10] Lacroix M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells[J]. Endocr Relat Cancer, 2006, 13(4): 1033-1067.
- [11] Fasanella S, Leonardi E, Cantaloni C, et al. Proliferative activity in human breast cancer: Ki-67 automated evaluation and the influence of different Ki-67 equivalent antibodies[J]. Diagn Pathol, 2011, 6(1): 1-6.

(收稿日期 2011-06-23)

(本文编辑:赵彬)

姜专基,田英,刘鸿雁,等. 乳腺癌患者外周血乳腺小黏蛋白的检测及其临床意义[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2012, 6(2): 140-146.