论著

文章编号:1000-5404(2010)10-1064-04

人防御素-alpha1-3在乳腺癌组织中的表达及意义

张 伟[1],顾 敏[2] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院普外科[1];401220 重庆 长寿,长寿区中医院普外科[2])

[摘要] **目的** 探讨人防御素-alpha1-3(HNP1-3)在乳腺癌组织中的表达及其临床意义。**方法** 采用免疫组化法检测20例乳腺组织及59例乳腺癌组织中HNP1的表达,并结合乳腺癌患者年龄、临床分期、组织学分级、淋巴结转移以及PR/ER/C-erB-2表达进行相关性分析。**结果** ①HNP1-3在正常乳腺组织中为强阳性表达,表达率为95%;②HNP1-3在癌组织中差异表达,在淋巴结转移患者的强阳性表达为45%,而淋巴结未转移患者表达强阳性率81.08%($P<0.05$),强阳性率在组织学Ⅰ级为85.71%,Ⅱ级72.22%,Ⅲ级45%($P<0.05$);③HNP1-3在乳腺癌中的表达与肿瘤患者年龄、临床分期、PR/ER/C-erB-2表达无显著差异($P>0.05$)。**结论** HNP1-3在乳腺癌的发展过程中起重要作用,其表达水平可能是反映乳腺癌预后的标记。

[关键词] 乳腺癌;防御素-alpha1-3(HNP1-3);预后;生物标记

[中图法分类号] R392.13; R730.23; R737.9 **[文献标志码]** A

Expression and significance of human defensin-alpha1-3 in breast cancer

Zhang Wei[1], Gu Min[2] ([1]Department of General Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of General Surgery, Changshou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Changshou District, Chongqing, 401220, China)

[Abstract] Objective To investigate the expression of human defensin-alpha1-3 (HNP1-3) in breast cancer and in normal tissues and determine whether there exists a relationship between HNP1-3 expression and clinicopathologic features. Methods Immunohistochemical staining was used to detect the expression levels of HNP1-3 in 59 breast cancer specimens, and 20 normal tissues (fibroadenoma of breast or tumor-adjacent tissues). The relationship of the expression levels of HNP1-3 with patient's age, clinical stage, histological grade, lymph node metastases and expression of PR/ER/C-erB-2 was analyzed. Results High level expression of HNP1-3 (95%) was expressed in those normal breast tissues. Different expression of HNP1-3 was found in breast cancer specimens and closely correlated with tumor histological stage and lymph node metastases ($P<0.05$). There was no relation with ages, clinical stage and expression of PR/ER/C-erB-2 ($P<0.05$). Conclusion HNP1-3 may play an important role in the pathogenesis of breast cancer, and regard as a biomarker for prognosis.

[Key words] breast cancer; human defensin-alpha1-3; prognosis; biomarker

Corresponding author: Zhang Wei, Tel: 86-23-89011170, E-mail: cqlhj_520@126.com

人alpha防御素(human alpha defensin)主要来自中性粒细胞,又称为人中性粒细胞多肽(human neutrophil peptides,HNPs),包括HNP1-4,其中HNP1-3也可表达在单核细胞、NK细胞和部分黏膜细胞[1,2]。HNP1-3的氨基酸序列具有高度保守性(96.67%),除表现出明显抗菌活性外,HNP1-3都有6个半胱氨酸残基,具有趋化因子活性,能够趋化幼稚的树突状细胞(immature dentritic cells)、单核细胞和T细胞,被认为是介导天然免疫和适应性免疫的桥梁[3]。

近年来的研究表明,HNP1-3表达在多种肿瘤组织,其表达可能与肿瘤预后相关[4,5],也可能参与宿主的抗肿瘤免疫[6],HNP1-3在乳腺癌的表达及其意义目前少见报道。本研究通过免疫组化分析了HNP1-3在乳腺癌组织中的表达与年龄、病理类型、雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progeslerone receptor, PR)以及C-erB-2蛋白表达关系及其临床意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料

59例乳腺癌患者为我院2006年1-12月的手术患者,另取20例乳腺纤维瘤或瘤周的正常乳腺组织作为乳腺组织对照,均为女性,年龄28~65(47±12.59)岁,术后经病理切片证

[通信作者] 张 伟,电话:(023)89011170,E-mail:cqlhj_520@126.com

实,并已检测 ER、PR、C-erB-2,其中导管癌 32 例,小叶癌 27 例,Ⅰ期 12 例,Ⅱ期 26 例,Ⅲ期 21 例,组织学分级Ⅰ级 21 例,Ⅱ级 18 例,Ⅲ级 20 例,淋巴结转移阳性 22 例,ER 阳性 35 例,PR 阳性 37 例,C-erB-2 阳性 34 例。

1.2 S-P 免疫组化检测 HNP1-3 的表达

小鼠抗人 HNP1 抗体(MCA1465)购自 Serotec 公司,DAB 显色试剂盒购自 Vector Laboratories 公司,染色方法参照其说明书严格进行,抗体工作浓度为 1∶200。使用微波抗原热修复,抗原修复液为 pH 6.0 的柠檬酸缓冲液,PBS 缓冲液代替一抗作阴性对照,经 DAB 显色, 苏木精复染,中性树胶封片。

1.3 判断标准

与国外的研究报道一致,HNP1-3 在正常组织和肿瘤均有表达,阳性反应呈现棕黄色颗粒,瘤内或瘤周均表现为灶性表达,局部浓聚,难以肿瘤细胞阳性染色所占百分比确定判断标准[4],因此本研究在病理科医师指导下,依据阳性表达的范围和显色的深度,将高倍视野下(×400)的阳性灶数目和表达方式作为判断标准:随机 5 个视野下至少有 3 个或 3 个以上视野观察到 5 个或 5 个以上的灶性表达为强阳性(++),否则为弱阳性(+/ -),此外将包绕肿瘤的瘤周组织环状表达视为强阳性。

1.4 统计学方法

用 SPSS 11.5 统计软件,χ^2 检验和 fisher's 确切概率法检验。

2 结果

2.1 HNP1-3 在正常乳腺组织中和乳腺癌中的表达

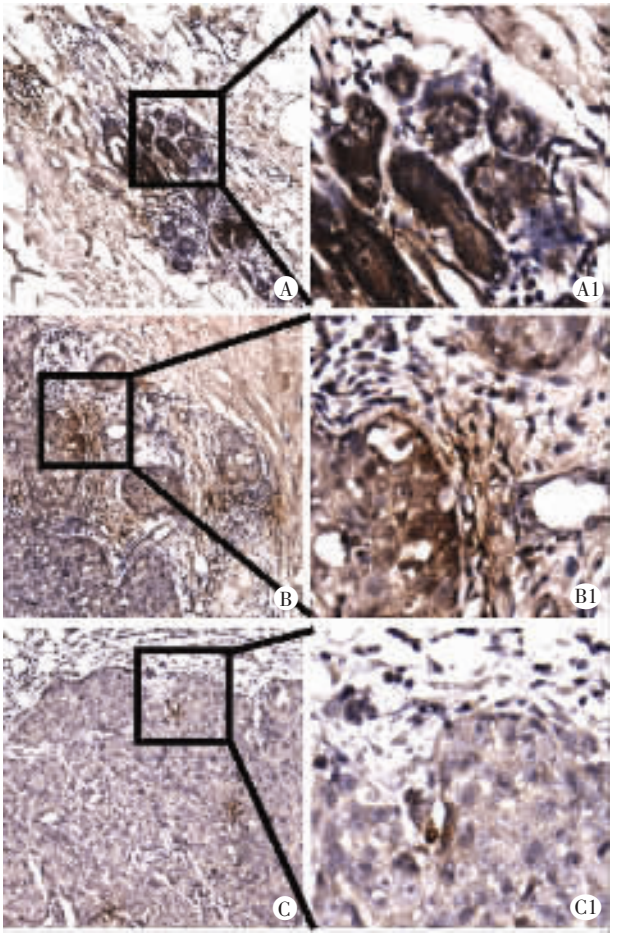
59 例乳腺癌和 20 例乳腺组织中均发现有不同程度 HNP1-3 的表达,其中,在乳腺组织中,HNP1-3 主要集中于腺管细胞及腺管周表达,且表达为强阳性(强阳性表达率为 95%,图 1A);在乳腺癌中,在不同分化程度和类型的乳腺癌中的表达呈现不同方式,存在统计学差异($P<0.05$,表 1),在中-高分化肿瘤中,瘤内及瘤周组织表达均较明显,局部浓集,多为强阳性表达(图 1B),而在分化程度中到低的肿瘤组织内呈较低浓度弥散分布,浓集程度较弱,多为弱阳性表达(图 1C)。

2.2 HNP1-3 在早期乳腺癌中的表达

乳腺癌组织中的 HNP1-3 表达与病理分期并没有明显差异(表 1),但表达分布却显示明显特征,在原位癌的表达与正常组织没有差异性,在粉刺癌中,不仅在瘤内可见 HNP1-3 的表到,在瘤周组织的表达呈现环绕表达(图 2A),而在早期的高分化肿瘤局部及瘤周均有较高表达,并伴有肿瘤的局部坏死,与国外在肾癌中的发现一致(图 2B)。

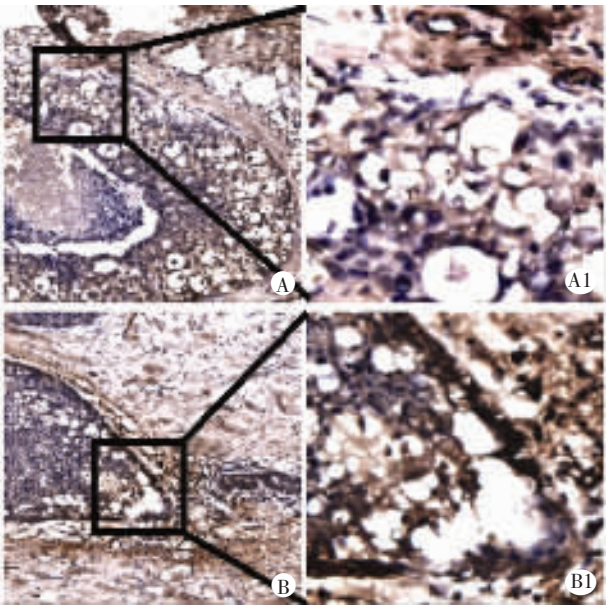
2.3 乳腺癌组织中 HNP1 的表达与各种预后因素的关系

HNP1 表达与肿瘤大小、ER、PR 表达以及 C-erbB-2 表达均无显著差异($P>0.05$)。与腋下淋巴结转移关系密切,淋巴结阴性组 HNP1 的强阳性表达较多,而淋巴结转移阳性组表达水平较低,有显著性差异($P<0.01$),此外,HNP1 的表达随着组织学分级的增高,HNP1 强阳性表达率下降,Ⅰ级 85.71%,Ⅱ级 72.22%,Ⅲ级 45.00%,差异有统计学意义($P<0.01$),见表 1。



A:正常腺体组织;B:中-高分化乳腺癌;C:中-低分化乳腺癌;A1、B1、C1:A、B、C 的局部放大

图 1　免疫组化观察 HNP1-3 在乳腺癌癌旁组织及乳腺癌中的表达　(S-P ×200)



A:粉刺癌;B:高分化乳腺癌;A1、B1:A、B 的局部放大

图 2　免疫组化观察 HNP1-3 在早期乳腺癌的表达　(S-P ×200)

表1 HNP1-3在乳腺癌中的表达与临床病理预后因素的关系

因素	*n*	HNP1-3(++)	HNP1-3(+/-)	*P*
肿瘤大小				
≤2 cm	9	6(66.67)	3(33.33)	
>2,≤5 cm	34	23(67.65)	11(32.35)	>0.05
>5 cm	16	11(68.75)	5(31.25)	
淋巴结转移				
+	22	10(45.45)	12(54.55)	<0.01
-	37	30(81.08)	7(18.92)	
TNM分期[a]				
Ⅰ	12	8(66.67)	4(33.33)	
Ⅱ	26	18(68.23)	8(30.77)	>0.05
Ⅲ	21	14(66.67)	7(33.33)	
组织学分级				
Ⅰ	21	18(85.71)	3(14.39)	
Ⅱ	18	13(72.22)	5(27.78)	<0.01
Ⅲ	20	9(45.00)	11(55.00)	
ER				
+	35	25(71.42)	10(28.58)	>0.05
-	24	15(62.50)	9(37.50)	
PR				
+	37	25(67.57)	12(32.43)	>0.05
-	22	15(68.18)	7(31.82)	
C-erB-2				
+	34	22(64.70)	12(35.30)	>0.05
-	25	18(72.00)	7(28.00)	

a:TNM分期采用的是国际抗癌联盟(UICC)的分期标准

3 讨论

近年来的研究表明,人HNP1-3表达于部分肿瘤组织,可能与肿瘤的预后相关[5,7]。Muller等[4]发现,部分肾癌细胞表达HNP1-3,在肾癌组织内HNP1-3的表达能直接促进肾癌细胞的坏死。也有研究表明,HNP1-3的抗肿瘤作用为浓度依赖,在低浓度时可能促进肿瘤生长,在高浓度时能够导致肿瘤细胞凋亡[4,8,9]。Albrethsen等[5]从结肠癌组织中分离了HNP1-3,发现获得的HNP1-3能够有效抑制肿瘤生长,认为HNP1-3的表达对患者是有益的,但目前HNP1-3在肿瘤中的表达究竟是有利还是有害目前还尚无定论。

HNP1-3对多种肿瘤细胞显示独特的细胞毒性,能够诱导肿瘤细胞的凋亡[10,11]。HNP1-3可以破坏肿瘤细胞的膜完整性,在细胞膜上形成"孔洞"造成细胞膜的不可逆的损伤[12],并进一步进入肿瘤细胞内,破坏线粒体,激发线粒体凋亡途径[10]。另一方面,HNP1-3能够促进淋巴细胞释放肿瘤坏死因子TNF-α,作用于死亡受体Fas受体,可激发受体介导的凋亡途径[13]。此外,HNP1-3具有免疫活性,能够趋化免疫细胞,尤其是抗原呈递细胞和T细胞,最近的研究表明,HNP1可参与诱导抗肿瘤免疫[14]。因此,目前更多的观点更倾向HNP1-3在瘤内高水平的表达可能产生一个有益的作用[5,9,14]。

在本研究中,我们报道了HNP1-3在乳腺癌及正常乳腺组织中的表达,发现HNP1-3既表达在瘤周组织也表达在肿瘤组织中。与之前的研究不同,在本研究中我们通过免疫组化分析了HNP1-3的表达,分析了与乳腺癌发病年龄、病理分期、组织学分级、PR/ER/C-erB-2表达之间的关系,初步结果显示HNP1-3在肿瘤组织内表达呈现差异,表达水平与年龄、分期以及PR/ER/C-erB-2无关,而与肿瘤的组织分级有关,在分化较好的肿瘤内及瘤周可见HNP1-3的强阳性表达,并观察到肿瘤的局部坏死,而在分化较差的肿瘤,HNP1-3表达水平较低。我们的研究表明,在分化较好的乳腺癌组织中,HNP1-3高表达,可能发挥的是抑制肿瘤的作用,而在分化较差的乳腺癌组织中低表达,可能发挥促进肿瘤生长的作用,这与国外报道低剂量HNP1-3促进肿瘤生长,高剂量诱导肿瘤细胞凋亡一致[4,8]。此外,我们的研究还发现,HNP1-3的表达与肿瘤淋巴结转移负相关,其强阳性表达可能抑制乳腺癌的淋巴结转移,我们推测,这可能与HNP1-3本身具有抗肿瘤作用并能介导抗肿瘤免疫相关[14]。近年来,国内学者也对乳腺癌的雌激素受体表达与临床病理及预后标志物的关系,淋巴结转移与抑癌基因之间的关系作了深入研究[15,16],HNP1-3在乳腺癌中的表达是否与这些预后因子以及抑癌基因之间具有联系,还有待进一步研究。

总之,我们的研究提示HNP1-3在乳腺癌中的表达可能与肿瘤细胞的分化程度相关,并可能抑制肿瘤的生长和转移,HNP1-3在瘤内的强阳性表达是与乳腺癌预后相关的一个有益因素,而弱阳性表达可能是预后的不良因素。

参考文献:

[1] Agerberth B, Charo J, Werr J, *et al*. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations[J]. Blood, 2000, 96(9): 3086-3093.

[2] Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity[J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3(9): 710-720.

[3] Yang D, Chen Q, Chertov O, *et al*. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells[J]. J Leukoc Biol, 2000, 68(1): 9-14.

[4] Muller C A, Markovic-Lipkovski J, Klatt T, *et al*. Human alpha-defensins HNPs-1, -2, and -3 in renal cell carcinoma: influences on tumor cell proliferation[J]. Am J Pathol, 2002, 160(4): 1311-1324.

[5] Albrethsen J, Bogebo R, Gammeltoft S, *et al*. Upregulated expression of human neutrophil peptides 1, 2 and 3 (HNP 1-3) in colon cancer serum and tumours: a biomarker study[J]. BMC cancer, 2005, 5: 8.

[6] Hubert P, Herman L, Maillard C, *et al*. Defensins induce the recruitment of dendritic cells in cervical human papillomavirus-associated (pre)neoplastic lesions formed *in vitro* and transplanted *in vivo*[J]. FASEB J, 2007, 21(11): 2765-2775.

[7] Escher N, Spies-Weisshart B, Kaatz M, *et al*. Identification of HNP3 as

a tumour marker in CD4 + and CD4- lymphocytes of patients with cutaneous T-cell lymphoma[J]. Eur J Cancer, 2006, 42(2): 249 – 255.
[8] Aarbiou J, Tjabringa G S, Verhoosel R M, *et al*. Mechanisms of cell death induced by the neutrophil antimicrobial peptides alpha-defensins and LL-37[J]. Inflamm Res, 2006, 55(3): 119 – 127.
[9] Xu N, Wang Y S, Pan W B, *et al*. Human alpha-defensin-1 inhibits growth of human lung adenocarcinoma xenograft in nude mice[J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(6): 1588 – 1597.
[10] Lichtenstein A. Mechanism of mammalian cell lysis mediated by peptide defensins. Evidence for an initial alteration of the plasma membrane[J]. J Clin Invest, 1991, 88(1): 93 – 100.
[11] Lichtenstein A, Ganz T, Selsted M E, *et al*. In vitro tumor cell cytolysis mediated by peptide defensins of human and rabbit granulocytes [J]. Blood, 1986, 68(6): 1407 – 1410.
[12] Wimley W C, Selsted M E, White S H. Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores[J]. Protein Sci, 1994, 3(9): 1362 – 1373.
[13] Chaly Y V, Paleolog E M, Kolesnikova T S, *et al*. Neutrophil alpha-defensin human neutrophil peptide modulates cytokine production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells[J]. Eur Cytokine Netw, 2000, 11(2): 257 – 266.
[14] Wang Y S, Li D, Shi H S, *et al*. Intratumoral expression of mature human neutrophil peptide-1 mediates antitumor immunity in mice[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(22): 6901 – 6911.
[15] 岳志强,姜军,范林军, 等. 乳腺癌淋巴结转移、微转移和孤立肿瘤细胞状态下肌动蛋白和 PTEN 的表达及意义[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(12): 1258 – 1260.
[16] 周艳, 张毅, 梁燕, 等. 乳腺癌雌激素受体 β 表达与临床病理及预后标志物的关系[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(11): 1090 – 1092.

(**收稿**:2009-12-07;**修回**:2010-01-26)
(编辑　王　红)

(上接 1063 页)

后并发症。移植脂肪每次存活 30% ~70%,经 2 ~4 次注射,面部老化明显改善,恢复了比较年轻的面容,手术效果满意。

典型病例:女性,35 岁,诊断:面部老化。

治疗 23 个月后,脂肪大部存活,面容改善明显(图 1)。



A:术前划线设计;B:面部脂肪再平衡术后 23 个月
第 1 次手术:①1.2 ml;②4 ml;③2.5 ml;④4 ml;⑤1.6 ml;⑥2 ml;⑦3 ml;⑧9 ml;⑨2 ml;⑩2 ml;6 个月后,第 2 次手术:①0.8 ml;②2 ml;③2.5 ml;④2 ml;⑦1 ml;⑧5 ml;⑨1 ml。14 个月后,第 3 次手术:①0.5 ml;⑥0.8 ml;⑧2 ml;本病例面型消瘦,故无脂肪抽吸,均为脂肪移植,图示两侧基本对称,脂肪移植总量为 97.8 ml

图 1　脂肪再平衡术矫治面部老化前后对比观察

3　讨论

除重力作用造成的软组织松弛等因素,面部老化的形态学变化之一是继发于脂肪的改变,所以使老化面部焕发青春的有效途径之一是重构脂肪。2002 年,Donofrio[3] 提出了"脂肪再平衡术"的概念。即针对某些部位皮下脂肪组织的不断萎缩,予以脂肪注射充填;而针对其他部位皮下脂肪组织的相对增多,予以脂肪抽吸。

我们认为:手术的成功关键在于提高手术的精准度。①高质量的脂肪颗粒可以提高移植脂肪的成活率。Zuk 等[4] 在大腿和臀部抽吸的脂肪组织悬液中,分离出大量脂肪干细胞(ASCs),而 ASCs 能分化成脂肪细胞,并且支持新血管的生成。大腿和臀部可提供足量、高质的脂肪颗粒。②掌握正确的手术技巧,改进注射层次,为脂肪细胞提供良好的血管床。不同于文献[5 – 8]报道,我们采用多点多层次、三维交叉注射填充术,使脂肪颗粒获得尽可能多的组织接触,以便尽快建立血供,提高存活。③提高脂肪注射移植的精度:注射范围在于面部脂肪萎缩、凹陷区,不要只填充皱褶。每次注射剂量超需要量 15% ~20%,以保证脂肪吸收后的效果。但是,不要一次注射太多的脂肪,以免引起脂肪组织的移位或形成硬结。④面部脂肪微量抽吸术时,应注意患者的皮肤弹性情况。一般情况下,每个部位只需抽吸1 ~3 ml 脂肪。随着皮肤回缩,即可达到手术目的。

我们采用面部脂肪再平衡术矫治面部老化患者 58 例,取得了满意疗效。面部脂肪再平衡术为面部老化的矫治提供了一种安全、有效的方法。

参考文献:

[1] Coleman S R, Grover R. The anatomy of the aging face: volume loss and changes in 3 – dimensional topography[J]. Aesthet Surg J, 2006, 26(1S): S4 – S9.
[2] Donofrio L M. Panfacial volume restoration with fat[J]. Dermatol Surg, 2005, 31(11 Pt 2): 1496 – 1505.
[3] Donofrio L M. Fat rebalancing: the new "Facelift"[J]. Skin Therapy Lett, 2002, 7(9): 7 – 9.
[4] Zuk P A, Zhu M, Mizuno H, *et al*. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell – based therapies[J]. Tissue Eng, 2001, 7(2): 211 – 228.
[5] 谢芸, 李青峰, 郑丹宁. 半面萎缩的自体脂肪颗粒移植治疗[J]. 中国修复重建外科杂志, 2007, 21(12): 1308 – 1311.
[6] 林立新,柳大烈,梁忠军,等. 自体颗粒脂肪移植在面部年轻化及轮廓重塑中的应用[J]. 中国美容医学. 2008, 17(1): 28 – 30.
[7] Coleman S, Saboeiro A, Sengelmann R. A comparison of lipoatrophy and aging: volume deficits in the face[J]. Aesthetic Plast Surg, 2009, 33(1): 14 – 21.
[8] Donofrio L M. Techniques in facial fat grafting[J]. Aesthet Surg J, 2008, 28(6): 681 – 687.

(**收稿**:2010-03-14;**修回**:2010-04-22)
(编辑　王　红)