DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.23.006
第25卷第23期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 23
2003年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2003

文章编号:1000-5404(2003)23-2073-04

论著

乳腺不典型增生及乳腺癌中层粘连蛋白及纤维连接蛋白的表达及意义

韩晓蓉,姜 军,马宏敏 (第三军医大学附属西南医院乳腺疾病中心,重庆 400038)

提 要:目的 观察层粘连蛋白(Laminin,LN)和纤维连接蛋白(Fibronectin,FN)在乳腺不典型增生及乳腺癌中表达的变化。方法 用S-P免疫组化染色法分别检测正常乳腺组织、Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ级不典型增生的乳腺组织及乳腺癌组织中LN和FN的表达情况。结果 正常乳腺组织中LN只在基底膜表达;FN表达于基底膜及少量间质细胞。Ⅰ级增生的乳腺组织中LN主要表达于基底膜及上皮细胞;FN表达近似正常组织。Ⅱ级不典型增生中LN于上皮细胞表达增多;FN主要表达于基底膜及上皮细胞。Ⅲ级不典型增生中LN的间质表达明显增多($P<0.05$),而上皮细胞表达明显减少($P<0.05$);FN则主要表达于上皮细胞及增生腺管周围的基质中。浸润性导管癌中LN主要表达于癌细胞,间质表达显著减少($P<0.05$);FN亦主要表达于癌细胞中。结论 乳腺不典型增生时LN表达部位的变化反映了乳腺上皮细胞的增生状态,不典型增生的乳腺组织中间质FN的表达是机体的一种防御反应。

关键词:不典型增生;乳腺肿瘤;层粘连蛋白;纤维连接蛋白
中图法分类号:R737.9;R394.2;Q51 文献标识码:A

Laminin and fibronectin expressions in atypical hyperplasia and breast cancer and the significance

HAN Xiao-rong, JIANG Jun, MA Hong-min (Breast Disease Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of laminin(LN) and fibronectin(FN) expressions in atypical hyperplasia and breast cancer. Methods LN and FN expressions in normal breast tissue, tissues from grade Ⅰ, Ⅱ and Ⅲ atypical hyperplasia and breast cancer were detected by means of S-P immunohistochemical staining method. Results In normal breast tissue, LN expression was found only in basement membrane, but FN expression in basement membrane and matrix. In grade Ⅰ hyperplasia, LN expression was found in basement membrane and epithelium, but FN expression was similar to that in normal tissue. In grade Ⅱ hyperplasia, more LN expression was found in epithelium, but FN expression in epithelium and matrix. In grade Ⅲ hyperplasia, LN expression increased significantly in matrix and decreased significantly in epithelium as compared with those in grade Ⅱ ($P<0.05$), but FN expression was found in epithelium and matrix around the hyperplastic duct. In infiltrating duct carcinoma, LN expression was found mainly in cancer cells, but less expression in matrix ($P<0.05$), but FN expression was found mainly in cancer cells, too. Conclusion Changes of position-dependent laminin expression may reflect the status of hyperplasia in breast epithelium. Expression of fibronectin in matrix in hyperplasia is a defensive reaction.

Key words: atypical hyperplasia; breast neoplasm; laminin; fibronectin

层粘连蛋白(Laminin, LN)和纤维连接蛋白(Fibronectin, FN)是细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)的主要成分。细胞培养及体外实验研究结果表明ECM能通过化学和物理信号传导之间的复杂的内在联系调节乳腺上皮细胞的生长、分化和凋亡,ECM成分的变化与乳腺癌的发生密切相关[1,2]。现有文献对不典型增生的乳腺组织中LN和FN的表达少有报道。本研究用免疫组化染色法检测了乳腺不典型增生和乳腺癌中LN及FN的表达情况,以加深对乳腺良性疾病经不典型增生癌变过程的了解。

作者简介:韩晓蓉(1969-),女,四川省成都市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事普通外科及乳腺疾病方面的研究。现在广州军区总医院普通外科工作,广州 510010。电话:(023)68754160
通信作者:姜 军,电话:(023)68754160
收稿日期:2003-08-26;修回日期:2003-09-30

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料和方法

1.1 材料

所有标本均取自我院手术切除的女性乳腺标本。其中正常乳腺组织10例，取自乳腺纤维腺瘤旁，经病理检查证实为正常乳腺组织，病人年龄19～35岁，平均24.2岁；乳腺囊性增生病30例，病人年龄20～52岁，平均35.8岁，其中有乳腺上皮细胞Ⅰ级增生和Ⅱ级及Ⅲ级不典型增生者各10例；乳腺癌10例，均为浸润性导管癌，病人年龄35～64岁，平均46.8岁。

1.2 乳腺囊性增生病上皮细胞增生程度分级

根据Page[3]的分级标准略加修改，将乳腺导管或腺泡上皮细胞增生程度分为3级：Ⅰ级，导管或腺泡上皮细胞增生多于2层而少于4层，分化良好；Ⅱ级，上皮细胞增生超过4层，突向管腔内，相互桥接或充满管腔，但极性存在，伴有轻度异型性；Ⅲ级，导管扩张，细胞簇集成乳头状或完全充满管腔，排列紧密，有明显异型性。其中，Ⅰ级增生细胞不存在异型性，故为一般性增生；Ⅱ级和Ⅲ级为不典型增生。

1.3 免疫组化染色

标本经10%甲醛固定，石蜡包埋，切片厚5 μm。采用S-P法(S-P试剂盒购自Maxim公司)。按下列步骤进行：①常规二甲苯及梯度乙醇脱蜡水化；②加0.3%过氧化氢/甲醇液置室温30 min以阻断内源性过氧化物酶；③加胰蛋白酶置37 ℃消化30 min；④加非免疫血清置37 ℃ 30 min，以封闭非特异性抗体；⑤加一抗(抗LN单克隆抗体，1∶30，Sigma公司)于湿盒内4 ℃孵育24 h；⑥加生物素标记的二抗，37 ℃孵育30 min；⑦加复合物37 ℃孵育30 min。以上各步骤间均用PBS液洗3次，每次5 min。最后用双蒸水洗5 min，DAB显色，苏木素复染。经脱水、透明、封片后光镜观察。用PBS代替一抗作空白对照。

1.4 阳性结果判断

阳性为棕黄色至深棕色染色，在不同类型的乳腺组织中，分别分布于基底膜、基底膜以外基质及上皮细胞和癌细胞胞浆中。

1.5 统计学方法

计数资料用χ^2检验。

2 结果

正常乳腺组织中，LN表达在基底膜上，可见完整连续的基底膜；FN则主要表达于基底膜及肌上皮细胞，可见连续的均匀一致的细线状基底膜，且有1例上皮细胞染色阳性，2例间质有少量染色阳性。Ⅰ级增生的乳腺组织中，LN阳性表达主要在基底膜上，但有一半病例上皮细胞中出现阳性染色，间质中也有少量表达；FN的表达与正常组织相比变化不大，仍以基底膜部位为主，基底膜完整，较均匀，亦可见肌上皮细胞染色，腺上皮细胞阳性较正常增多，占30%，间质中阳性者只有2例；不典型增生Ⅱ级的乳腺组织中，LN表达显示基底膜完整、增厚，上皮细胞阳性增多，间质中阳性较Ⅰ级增生无明显增多；FN除在基底膜表达外，上皮细胞及间质均表达增多，上皮细胞中可见较多阳性染色，间质中也有较多条索状阳性染色，二者阳性率分别为70%和60%；不典型增生Ⅲ级的乳腺组织中，LN表达于部分腺管周围，可见完整但明显厚薄不均的基底膜，同时可见大量条索状阳性间质细胞，但上皮细胞的阳性表达不明显；FN表达于增生腺管周围的基质中可见较明显的阳性表达，伴有大量强阳性上皮细胞。浸润性导管癌组织中，大部分病例中未见基底膜结构，仅个别癌细胞团周围可见残留的基底膜，间质中LN表达较不典型增生Ⅲ级减少，阳性者仅3例，癌细胞胞浆中有丰富的LN表达，但表达呈现明显异质性，染色强弱不一；而FN免疫组化染色则显示间质散在条索状或片状阳性，癌细胞中多呈阳性染色，且表达水平较间质细胞高。上述结果详见表1、2，图1～3。

表1 不同乳腺组织中LN表达的变化

Tab 1 Changes of LN expression in different breast tissues

Histology of breats tissue	n	Matrix+		Cell+	
		n	%	n	%
Normal	10	0	0	0	0
Grade Ⅰ atypical hyperplasia	10	2	20	5	50
Grade Ⅱ atypical hyperplasia	10	3	30	7	70
Grade Ⅲ atypical hyperplasia	10	8	80*	3	30#
Infiltrating duct carcinoma	10	3	30△	9	90

*: $P<0.05$ *vs* grade Ⅱ of atypical hyperplasia; △: $P<0.05$ *vs* grade Ⅲ of atypical hyperplasia; #: $P<0.05$ *vs* grade Ⅰ and Ⅱ of atypical hyperplasia and infiltrating duct carcinoma

表2 不同乳腺组织中FN表达的变化

Tab 2 Changes of FN expression in different breast tissues

Histology of breats tissue	n	Matrix+		Cell+	
		n	%	n	%
Normal	10	2	20	1	10
Grade Ⅰ atypical hyperplasia	10	2	20	3	30
Grade Ⅱ atypical hyperplasia	10	6	60	7	70
Grade Ⅲ atypical hyperplasia	10	8	80**	9	90**
Infiltrating ductal carcinoma	10	9	90**	9	90**

**: $P<0.01$ *vs* normal



图1 乳腺囊性增生病不典型增生Ⅱ级，基底膜及上皮细胞FN表达阳性，间质少量细胞FN表达阳性 (S-P×400)

Fig 1 In grade Ⅱ atypical hyperplasia of mammary cystic hyperplasia, positive immunostaining of FN is found in basement membrane, epithelium and some matrix (S-P×400)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

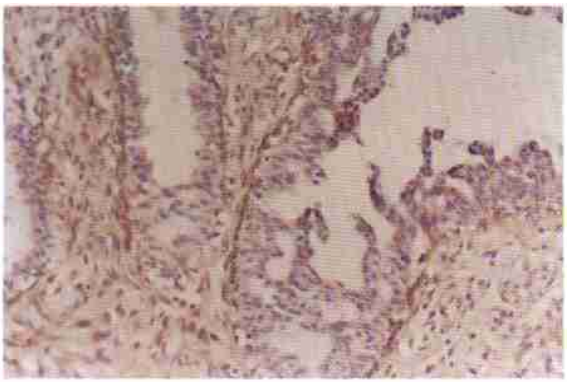
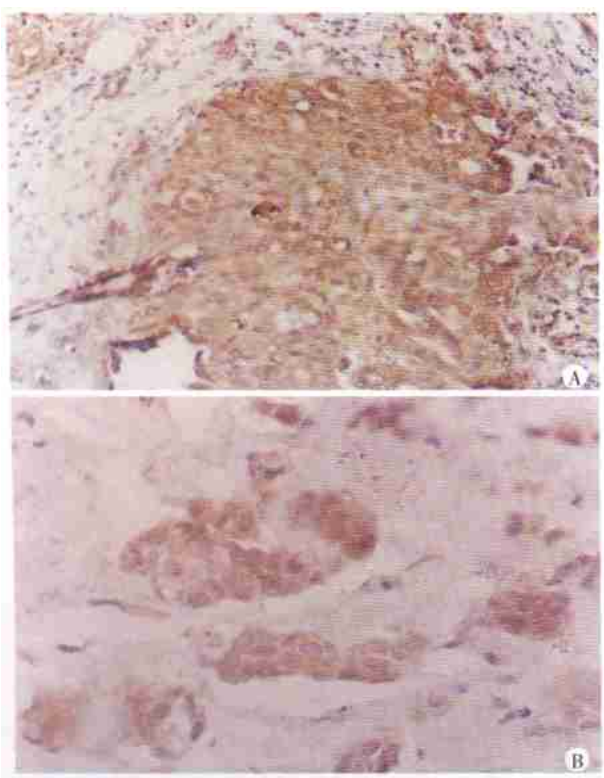


图 2　乳腺增生病不典型增生 II级, 间质及基底膜 LN 表达阳性, 可见基底膜着色深浅不一, 显示基底膜厚薄不均 (S-P× 400)

Fig 2　In grade Ⅲ atypical hyperpasia of mammary adenosis, positive immunostaining of LN is found in matrix and heterogeneous basement membrane (S-P× 400)



A: Post immunostaining of FN is found in carcinoma cells and matrix around small vessels (S-P× 200);

B: Post immunostaining of LN is found in carcinoma cells (S-P× 400)

图 3　乳腺浸润性导管癌

Fig 3　Infiltrating ductal carcinoma

3　讨论

LN 是大分子非胶原性糖蛋白, 其表达可直接影响 BM 的稳定性, 并通过与细胞表面 LN 受体的结合而介导细胞与基质的粘附, 影响细胞的生长、分化和运动, 在癌细胞的浸润和转移方面也起重要作用[4]。

以往多有文献报道正常乳腺组织及乳腺良性疾病中 LN 的表达限于基底膜, 细胞胞浆及乳腺间质呈阴性[5], 但所涉及的乳腺良性疾病仅限于乳腺囊性增生病、纤维腺瘤等, 并未将不典型增生作为一个影响因素来考虑。本研究表明在 II、III级不典型增生的乳腺组织中可见到 LN 染色阳性上皮细胞, 同时在浸润性导管癌中有部分癌细胞胞浆中出现 LN 阳性产物。本研究表明从正常乳腺经过不典型增生到乳腺癌的过程中, LN 的表达有一定规律的变化: 上皮细胞中 LN 的表达逐渐增多, 在不典型增生 II 级时达到高峰(70%), 当不典型增生发展到 III级时细胞中的表达明显减少($P<0.05$), 而在乳腺癌细胞胞浆中 LN 的表达异常丰富, 达 90%; 与此同时, 间质中 LN 的表达随着不典型增生的加重逐渐增多, 在不典型增生 III级时达到高峰, 而在乳腺癌中表达显著减少($P<0.05$)。这种变化趋势可能有其特定的意义。基底膜中的 LN 主要是由上皮细胞内质网合成并分泌到基质中的, 正常情况下合成的 LN 与 Ⅳ型胶原非特异结合参与基底膜构成, 而当上皮细胞发生不典型增生时, 细胞合成 LN 的功能变得活跃, 分泌 LN 的能力亦增加, 除参与基底膜合成外, 间质中出现少量 LN, 但由于分泌能力的增加并不与合成增加成正比, 故细胞中出现 LN 表达, 且随着不典型增生程度加重这种情况也变得明显; III级不典型增生时, 上皮细胞中 LN 表达减少可能与分泌能力的增加有关, 表现为间质 LN 明显增加, 有学者认为 LN 有促进 Ⅳ型胶原降解的作用[5,6], 是重度不典型增生细胞生物学行为变化的表现。而在乳腺癌中, 表现为癌细胞阳性而间质中很少阳性[7]。姜军等[8]的研究表明不典型增生的乳腺上皮细胞中高尔基复合体、内质网及核糖体均较正常增多, 这种变化是随不典型增生程度的加重而渐趋明显的, 乳腺癌细胞中除存在上述变化外, 还有内质网明显扩张, 并出现大量游离多聚核糖体。上皮细胞的这种超微结构的变化可能是 LN 表达变化的基础。上述变化趋势提示乳腺囊性增生病经不典型增生癌变是一个逐渐演变的过程, 不典型增生程度越重, 细胞的生物学行为越接近癌细胞。乳腺不典型增生癌变过程中 LN 表达部位的变化间接反映了乳腺上皮细胞的增生状态及预后情况[6,9]。

FN 是一种分子量约 500×10^3 的糖蛋白, 它可以通过增强细胞之间的亲和性, 保持基底膜的完整性, 加强间质细胞之间的粘附性, 从而维持宿主间质天然屏障[10]。本研究表明, 正常乳腺组织中 FN 主要在基底膜部位表达, 肌上皮细胞、少数上皮细胞胞浆及间质中

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

也有 FN 阳性表达;而在浸润性导管癌中间质有较多 FN 表达,个别癌细胞浆内也有表达,这部分与国内黄志勇等[11]的报道一致。国内张晓娟等[12]研究了乳腺癌中纤维连接蛋白的表达,认为癌周基底膜 FN 的表达降低可减少细胞与基底膜的粘附,改变细胞形态学和细胞骨架的组成,改变肿瘤细胞的游走和浸润能力,使癌细胞易于脱落,通过缺损的基底膜侵袭间质。Yashida 等[13]用原位杂交方法证实了癌间质及癌细胞中 FN mRNA 的存在,认为这与癌细胞的导管内扩散和早期浸润有关。而我们的研究发现在不典型增生的乳腺组织中,随着不典型增生程度的加重,间质及细胞中 FN 表达水平较正常组织的增加非常显著($P<0.01$);乳腺癌细胞中有丰富的 FN 表达,间质中的表达阳性较弱。据此我们推测,不典型增生的乳腺组织中细胞 FN 的表达增多可能是基因突变的结果,而间质 FN 的增加则起着抑制突变细胞向间质浸润的作用。乳腺癌中间质 FN 表达减弱,对癌细胞的抑制作用随之减弱,癌细胞得以突破基底膜发生浸润。不典型增生时间质 FN 的表达增加是机体的一种防御反应。

参考文献:

[1] Weaver V M, Fischer A H, Peterson O W, *et al*. The importance of the microenvironment in breast cancer progression: recapitulation of mammary tumorigenesis using an unique human mammary epithelial cell model and a three-dimensional culture assay[J]. Biochem Cell Biol, 1996, 74(6): 833—851.

[2] Ioachim E, Charchanti A, Briasoulis E, *et al*. Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin, fibronectin, collagen type IV and laminin in breast cancer: their prognostic value and role in tumour invasion and progression[J]. Eur J Cancer, 2002, 38(18): 2362—2370.

[3] Page D L. Cancer risk assessment in benign breast biopsies[J]. Hum Pathol, 1986, 17(9): 871—874.

[4] 徐 彤. 层粘连蛋白的结构及功能[J]. 国外医学免疫学分册, 1996, 19(5): 253—256.

[5] 王玉珍, 段惠军, 陈建国, 等. 层粘蛋白和Ⅳ型胶原在乳腺癌的表达[J]. 河北医科大学学报, 2001, 22(2): 69—71.

[6] Zheng W Q, Looi L M, Cheah P L. A comparison of the patterns of laminin expression in fibroadenoma, fibrocystic diseases, pre-invasive and invasive ductal breast carcinoma[J]. Pathology, 2001, 33(3): 303—306.

[7] 马文学, 邓甬川. 肿瘤细胞内层粘蛋白表达与乳腺癌预后的关系[J]. 实用肿瘤杂志, 2000, 15(3): 195—196.

[8] 姜 军, 陈意生. 乳腺囊性增生病癌变过程和阻止乳腺癌发生的病理学研究[J]. 第三军医大学学报, 1995, 17(4): 343—344.

[9] De-Iorio P, Midulla C, Pisani T, *et al*. Implication of laminin and collagen type Ⅳ expression in the progression of breast carcinoma[J]. Anticancer Res, 2001, 21(2B): 1395—1399.

[10] Yi M, Ruoslahti E. A fibronectin fragment inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(2): 620—624.

[11] 黄志勇, 诸宏伟, 张少峰. 乳腺癌组织中细胞外基质的免疫组织化学研究[J]. 中华病理学杂志, 1993, 22(4): 233—235.

[12] 张晓娟, 滕晓东, 刘宏斌. 纤维粘连蛋白在乳腺癌中的表达及与淋巴结转移的关系[J]. 河南肿瘤学杂志, 2000, 13(2): 79—80.

[13] Yoshida T, Matsumoto E, Hanamura N, *et al*. Co-expression of tenascin and fibronectin in epithelial and stromal cells of benign lesions and ductal carcinomas in the human breast[J]. J Pathol, 1997, 182(4): 421—428.

(编辑 刘洪娥)

(上接2072页)

某些良性血液病的有效手段,但血液病患者脾切除后较外伤脾切除者出现 OPSI 的几率高[1],因此对良性血液病患者越来越多的施行保留性脾手术,其中自体脾移植在临床上应用广泛。

在$^{99}Tc^{m}$-热变性红细胞法中,亚锡离子进入血液后穿过红细胞膜进入红细胞,把后来进入红细胞的$^{99}Tc^{m7+}$还原为$^{99}Tc^{m4+}$,使其与血红蛋白的珠蛋白稳定结合而标记红细胞,在红细胞被加热变性时也不脱落,再利用脾脏能摄取血液中变性的红细胞并吞噬到血窦中的特点进行显像,正常脾脏对热变性红细胞摄取率可达90%以上[2]。移植脾组织体积较小,移植术后早期功能差,因此采用$^{99}Tc^{m}$-热变性红细胞进行脾显像,可取得较好的结果,是目前观察早期移植脾功能较理想的显像方法,但也存在着操作复杂、显像剂制备环节多等问题。研究表明自体脾组织移植术后经"坏死、再生、生长"3个阶段[3],约在3个月后可长成具有一定结构的脾组织,并有部分脾脏功能。此时B超和CT检查通常难以判断移植脾成活与否和功能如何,免疫学指标较为灵敏[4],从表1可以看到术后3个月时CD3、CD8较术前有明显的增加,但不能直接观察移植脾是否成活。$^{99}Tc^{m}$-热变性红细胞法利用脾脏的功能进行显像,具有较高的特异性和灵敏度。本研究中22例自体脾移植患者术后1个月即有部分移植脾显淡影,表明移植脾组织已成活,但功能欠佳,3个月时全部移植脾显影,表明手术成功,移植脾成活,1年后复查结果也证实如此。因此术后3个月是显示移植脾手术成功与否的较佳时间,$^{99}Tc^{m}$-热变性红细胞法是直接观察早期移植脾成活、功能的有效方法。

关键词:放射性核素显像;脾脏;自体移植
中图法分类号:R817.4 文献标识码:B

参考文献:

[1] Mazzucconi M G, Arista M C, Paraino M, *et al*. Long-term follow-up of autoimmune thrombocytopenic purpura(ATP) patients submitted to splenectomy[J]. Eur J Haematol, 1999, 62(4): 219—222.

[2] Budihna N, Milicinski M, Heberle J. Long-term follow-up after heterotopic splenic autotransplantation for traumatic splenic rupture[J]. J Nucl Med, 1991, 32(2): 204—207.

[3] Holdsworth R J. Regeneration of the spleen and splenic autotransplantation[J]. Br J Surg, 1991, 78(3): 270—278.

[4] 王浩炜, 吴浩荣, 李军成. T细胞、sIL-2R和TNF检测对评价自体脾移植功能的临床意义[J]. 标记免疫分析与临床, 2002, 9(1): 12—15.

(编辑 刘洪娥)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net