

血浆钙离子、25-羟基维生素 D、CaSR 及 E-cadherin 在乳腺癌中的表达及意义

韩 雪, 林 杉, 赵子伟

(大连大学附属中山医院, 辽宁 大连 116001)

摘 要: [目的] 探讨血浆钙离子、25-羟基维生素 D、组织中钙感受受体 (calcium sensitive receptor, CaSR) 及 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 在乳腺癌患者中表达水平及临床意义。[方法] 研究对象为 2015 年 2 月至 2017 年 2 月经手术切除治疗的乳腺癌患者 360 例 (A 组)、同期 100 例乳腺良性肿块患者 (B 组) 和 40 例乳腺癌旁组织标本 (距癌灶边缘 5cm) (C 组)。入院确诊后未经治疗前, 采用离子选择电极法检测 A 组、B 组血钙离子水平, 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测 A 组、B 组 25-羟基维生素 D 水平; 三组均实施 E-cadherin 及 CaSR 免疫组化。[结果] A 组血浆钙离子与 25-羟基维生素 D 水平均低于 B 组 ($P<0.05$); A 组 CaSR 阳性率高于 B 组、C 组 ($P<0.05$); A 组 E-cadherin 阳性率低于 B 组、C 组 ($P<0.05$); 乳腺癌 E-cadherin、CaSR、血钙、25-羟基维生素 D 表达与 TNM 分期、病理类型之间无统计学意义 ($P>0.05$), 但与淋巴结转移之间有统计学意义 ($P<0.05$)。[结论] 血浆钙离子、25-羟基维生素 D、CaSR 及 E-cadherin 与乳腺癌病变密切相关。

关键词: 乳腺癌; 血浆钙离子; 25-羟基维生素 D; CaSR; E-cadherin

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2019)01-0047-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.01.B011

Expressions of Plasma Calcium Ions, 25-Hydroxyvitamin D, CaSR and E-Cadherin in Breast Cancer and Clinical Significance

HAN Xue, LIN Shan, ZHAO Zi-wei

(Affiliated Zhongshan Hospital Dalian University Dalian 116001, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression of plasma calcium ions, 25-hydroxyvitamin D [25 (OH) D], calcium sensitive receptors (CaSR) and E-cadherin in breast cancer patients and their clinical significance. [Method] Three hundred and sixty patients with breast cancer receiving surgical resection in our hospital from February 2015 to February 2017 (group A), 100 patients with benign breast masses (group B) were enrolled in the study. Forty specimens of pericancerous tissue were collected from breast cancer patients were also collected (group C). The serum calcium ion levels were measured with by electrode method, 25 (OH)D levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the expression of E-cadherin and CaSR was detected by immunohistochemistry. [Results] The average plasma calcium ion and 25 (OH)D levels in group A were lower than those in group B ($P<0.05$). The positive rate of CaSR in group A was higher than that in group B and group C ($P<0.05$). The positive rate of E-cadherin in group A was lower than that in group B and group C ($P<0.05$). The expression of E-cadherin, CaSR, blood calcium and 25(OH) D was not correlated with TNM stage and pathological type ($P>0.05$), but correlated with lymph node metastasis ($P<0.05$). [Conclusion] Plasma calcium, 25-hydroxyvitamin D, CaSR and E-cadherin are associated with breast cancer.

Subject words: breast cancer; plasma calcium ion; 25-hydroxyl vitamin D; CaSR; E-cadherin

在乳腺疾病发生与发展过程中, 血钙、钙感受

受体、维生素 D 等指标异常表达发挥着重要的作用^[1]。本研究旨在探讨血浆钙离子、25-羟基维生素 D、组织中钙感受受体 (CaSR) 及 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 在乳腺癌中的表达及意义。

通信作者: 韩雪, 主治医师, 硕士; 大连大学附属中山医院乳腺外科, 大连市中山区解放街 6 号 (116001); E-mail: snowy.fairy1985@163.com

收稿日期: 2018-02-28; **修回日期:** 2018-07-12

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 2015 年 2 月至 2017 年 2 月经手术切除治疗的乳腺癌患者 360 例(A 组);同期 100 例乳腺良性肿块患者(B 组);40 例乳腺癌旁组织标本(距癌灶边缘 5cm)(C 组)。研究对象均为女性,并知情同意。A 组年龄 30~78 岁,平均年龄(49.65±9.68)岁;体质指数(22.65±3.06)kg/m²。B 组年龄 24~79 岁,平均年龄(43.05±6.65)岁;体质指数(21.98±2.87)kg/m²。77 例乳腺纤维瘤,14 例纤维囊性乳腺病,8 例乳腺导管内乳头状癌,1 例慢性炎性包块。C 组 30~75 岁,平均年龄(48.98±9.25)岁;体质指数(22.54±3.12)kg/m²。三组一般资料有可比性($P>0.05$)。排除近期服用过钙调节剂及进行过化疗、放疗等乳腺疾病治疗者。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂

北京普利莱基因技术有限公司提供的鼠抗人 E-cadherin、北京博奥森生物技术有限公司提供的 25(OH)D₃/25HVD₃ ELISA Kit 试剂盒、北京新凯龙生物科技有限公司提供的 PW-960 全自动酶标仪等。

1.2.2 血浆钙离子及 25-羟基维生素 D 检测方法

入院确诊后未经治疗前,抽取 A 组、B 组患者清晨空腹静脉血 5ml,经肝素抗凝,离心吸取上层血浆,及时送检。取 2ml 检测血钙离子。检测所用仪器为 IMS-972 电解质分析仪,离子选择电极法检测。

3ml 置于零下 20℃冰箱内保存,用于检测 25-羟基维生素 D。检测时,将冷冻血浆平衡至于室温,检测方法为酶联免疫吸附法(ELISA)。

1.2.3 E-cadherin 及 CaSR 免疫组化检测方法

三组标本均以 10%甲醛固定,常规石蜡包埋,4μm 厚连续切片 3 张,2 张用于 E-cadherin 及 CaSR 免疫组化染色,1 张备用。

免疫组化染色:二甲苯脱蜡、水化,微波热修复,冷却到室温。以 PBS 液冲洗 3 次,5min/次。内源性过氧化物酶以 0.3%过氧化氢溶液阻断,持续 10min。以 PBS 液冲洗 3 次,5min/次。分别滴加 E-cadherin 及 CaSR 一抗,4℃环境下,静置过夜。复温 1h,以 PBS 液冲洗 3 次,5min/次。滴加二抗,静待 2h,实施 DAB 染色。显微镜下观察 5~10min。以蒸馏水冲洗,

苏木精复染,自来水冲洗,梯度酒精干燥,中性树脂封固。

E-cadherin 阳性细胞表现为细胞膜或细胞质呈棕褐色或黄色,计算阳性细胞数占总细胞数百分比。百分比≤5%为 0 分,6%~25%为 1 分,26%~50%为 2 分,51%~75%为 3 分,>75%为 4 分。染色强度:1 分淡黄色,2 分棕色,3 分棕褐色。计算两积分乘积,0 分为(-),1~4 分为(+),5~8 分为(++),>9 分为(+++)^[2]。阳性包括(+)、(++、(+++)。

CaSR 阳性细胞表现为细胞膜或细胞质呈黄褐色或淡黄色,计算阳性细胞数占总细胞数百分比。0 分为百分比≤5%,6%~10%为 1 分,11%~30%为 2 分,>30%为 3 分。染色强度:1 分胞浆染色与周围间质可区分,3 分深棕黄色,2 分介于 1、3 分之间。计算两积分之和,<1 分为(-),1~3 分为(+),4~5 分为(++),>5 分为(+++)^[3]。阳性包括(+)、(++、(+++)。

1.3 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件分析数据资料。E-cadherin 及 CaSR 表达阳性率、病理类型等计数资料用 χ^2 检验。血浆钙离子水平、25-羟基维生素 D 水平等计量资料均用 $\bar{x}\pm s$ 表示, t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血浆钙离子与 25-羟基维生素 D 水平比较

A 组外周血中血浆钙离子与 25-羟基维生素 D 水平均低于 B 组($P<0.05$)(Table 1)。

Table 1 Plasma calciumions and 25-hydroxyl vitamin D levels between A and B group($\bar{x}\pm s$, nmol/L)

Group	N	Plasma calciumion	25-hydroxy vitamin D
Group A	360	2.24±0.13	4.10±3.02
Group B	120	2.35±0.14	5.39±2.54
t		7.586	4.587
P		<0.001	<0.001

2.2 E-cadherin 及 CaSR 免疫组化结果

E-cadherin 蛋白阳性表达为细胞膜和(或)细胞浆内出现棕黄色染色(Figure 1)。CaSR 阳性细胞表达标记定位在细胞膜、胞浆内,呈黄色至棕黄色(Figure 2)。

A 组 CaSR 表达阳性率高于 B 组、C 组($P<0.05$);A 组 E-cadherin 阳性率低于 B 组、C 组($P<0.05$)(Table 2)。

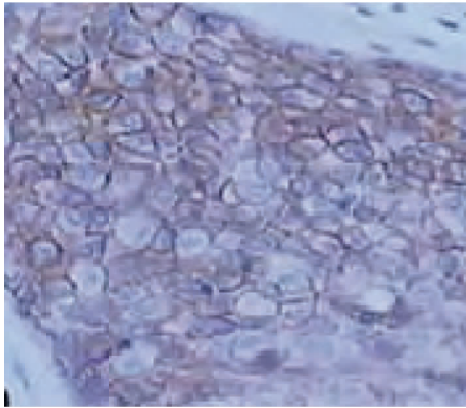


Figure 1 Positive expression of E-cadherin in breast cancer (+++) (Immunohistochemistry, $\times 200$)

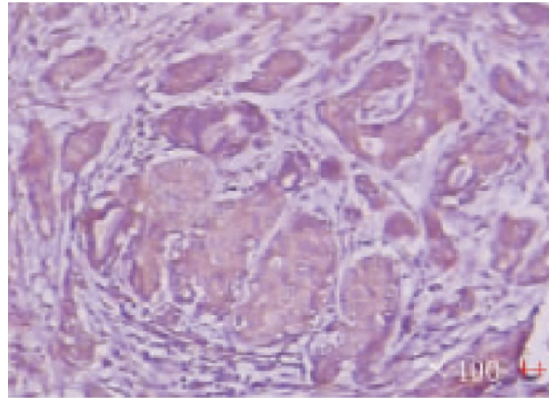


Figure 2 Positive expression of CaSR in breast cancer (++) (immunohistochemistry, $\times 400$)

2.3 E-cadherin、CaSR、血钙、25-羟基维生素 D 与乳腺癌临床病理相关性

乳腺癌 E-cadherin、CaSR、血钙、25-羟基维生素 D 表达与乳腺癌的病理类型、TNM 分期之间无统计学意义 ($P>0.05$), 但与淋巴结转移之间有统计学意义 ($P<0.05$) (Table 3)。

Table 2 Comparison of positive expression rate of E-cadherin and CaSR [n(%)]

Group	N	Positive E-cadherin	Positive CaSR
Group A	360	270 (75.00)	284 (78.89)
Group B	120	108 (90.00)	48 (40.00)
Group C	40	36 (90.00)	18 (45.00)
χ^2		12.10	63.82
P		<0.001	<0.001

3 讨论

研究发现乳腺癌患者存在明显 CaSR 表达异常, 且可能对患者预后及转移产生一定促进作用^[4]。CaSR 在多种恶性肿瘤的发生与进展中发挥着重要的作用。本研究发现, 乳腺癌 CaSR 阳性率较癌旁组织及乳腺良性肿块高。研究认为, 乳腺癌患者相关生化指标表达与临床病理特征密切相关^[7]。本研究发现, 乳腺癌患者 CaSR 表达与 TNM 分期、病理类型之间无统计学意义 ($P>0.05$), 但与淋巴结转移之间有统计学意义 ($P<0.05$)。因此, 我们推测乳腺癌组织中 CaSR 表达与疾病转移密切相关。

25-羟基维生素 D 能对癌细胞血管生成进行抑制, 与乳腺癌骨转移具有一定关系^[6]。血清 25-羟基

Table 3 Relationship between pathological features with E-cadherin, CaSR, 25-hydroxy vitamin D in breast cancer

Index	N	Positive E-cadherin [n(%)]	Positive CaSR [n(%)]	Plasma calciumion ($\bar{x}\pm s$, nmol/L)	25-hydroxy vitamin D ($\bar{x}\pm s$, nmol/L)
Pathological type					
Non-invasive cancer	6	5 (83.33)	5 (83.33)	2.31 $\pm$ 0.06	2.99 $\pm$ 2.85
Early invasive cancer	48	41 (85.42)	38 (79.17)	2.24 $\pm$ 0.13	2.77 $\pm$ 2.00
Invasive special cancer	20	16 (80.00)	17 (85.00)	2.27 $\pm$ 0.16	2.17 $\pm$ 1.30
Invasive non-specific cancer	286	208 (72.73)	224 (78.32)	2.25 $\pm$ 0.13	3.54 $\pm$ 1.01
TNM stage					
0	4	4 (100.00)	4 (100.00)	2.24 $\pm$ 0.12	4.48 $\pm$ 3.02
I	118	92 (77.97)	94 (79.66)	2.25 $\pm$ 0.12	2.52 $\pm$ 1.95
II	171	130 (76.02)	137 (80.12)	2.24 $\pm$ 0.13	5.04 $\pm$ 3.34
III	62	40 (64.52)	45 (72.58)	2.24 $\pm$ 0.13	3.86 $\pm$ 2.85
IV	5	4 (80.00)	4 (80.00)	2.27 $\pm$ 0.13	2.05 $\pm$ 0.85
Lymph node metastasis					
Yes	174	152 (87.36)	148 (85.06)	2.22 $\pm$ 0.14	4.15 $\pm$ 3.10
No	186	118 (63.44)	136 (73.12)	2.36 $\pm$ 0.11	5.42 $\pm$ 2.50

维生素 D 浓度变化密切相关,但仍未具体明确其作用机制。维生素 D 能对癌细胞增殖进行抑制,具有诱导癌细胞分化和凋亡的作用^[7]。本研究中,乳腺癌血浆钙离子、25-羟基维生素 D 水平较乳腺良性肿块低,提示这两项指标与乳腺癌发生具有一定相关性。此外,乳腺癌血钙、25-羟基维生素 D 表达与淋巴结转移之间有统计学意义($P<0.05$),提示血钙、25-羟基维生素 D 表达与淋巴转移存在一定相关性。我们认为,血钙、25-羟基维生素 D 影响乳腺癌的作用机制可能是通过调控基因靶细胞,对肿瘤细胞的转移及血管生成进行抑制。

E-cadherin 是一类介导细胞间黏附连接的细胞黏附分子家族成员,可直接参与细胞之间粘附作用。E-cadherin 在较多癌组织中表达缺失或下降,会降低癌细胞间黏附力,致使癌细胞脱离原发肿瘤,增加转移发生风险。E-cadherin 表达下降或缺失,会改变细胞极性,增强癌细胞侵袭能力^[8,9]。本研究中,乳腺癌组织中 E-cadherin 蛋白阳性表达主要是细胞膜和(或)细胞浆内出现棕黄色染色,且随着乳腺病变程度的加深,表达呈现缺失及异质性。而且,乳腺癌 E-cadherin 阳性率均低于乳腺良性肿块组及癌旁组织($P<0.05$)。此外,乳腺癌 E-cadherin 表达与淋巴结转移之间有统计学意义($P<0.05$),提示 E-cadherin 有望成为判断乳腺癌严重程度及评估预后的一个重要参考指标。

综上所述,在乳腺癌发生及发展过程中,血浆钙离子、25-羟基维生素 D、CaSR 及 E-cadherin 发挥着重要的作用。

参考文献:

- [1] He JM, Zhu SF, Huang W, et al. A case-control study of 25-hydroxyvitamin D, serum calcium, calcium sensitive receptors and E-cadherin against breast cancer risk [J]. Guangdong Medical, 2014, 35(2): 213-216. [何建明, 朱少芳, 黄伟, 等. 25-羟基维生素 D、血钙、钙敏感受体及 E-钙粘蛋白与乳腺癌发生风险的病例对照研究 [J]. 广东医学, 2014, 35(2): 213-216.]
- [2] Bai L, Gao ZA. The clinical significance of expression of 4. 1n and E-cadherin proteins in breast carcinoma [J]. Medicine and Philosophy, 2014, 35(8): 73-76. [白璐, 高志安. 乳腺癌中 4.1N 蛋白和 E-cadherin 蛋白表达的临床意义 [J]. 医学与哲学, 2014, 35(8): 73-76.]
- [3] Xie K, Xia CX, Feng B, et al. Association between calcium sensitive receptor (CaSR) gene in 986, 990 and urinary calculi [J]. Advances in Modern Biomedical Science, 2017, 17(10): 1953-1956. [谢坤, 夏成兴, 耿波, 等. 钙感受受体 (CaSR) 基因 986, 990 多态性与尿石症的相关性研究 [J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(10): 1953-1956.]
- [4] Zeng JY, Sun YH. Research progress and clinical application of calcium-sensing receptor [J]. Labeling Immunological Analysis and Clinical Practice, 2015, 22(2): 145. [曾敬雅, 孙铁华. 钙感受受体的研究及临床应用进展 [J]. 标记免疫分析与临床, 2015, 22(2): 145.]
- [5] Chen C, Zhou TY, Wen WR. Expression of Ki67 in breast cancer and its clinical significance: a meta-analysis [J]. Journal of Oncology, 2014, 20(4): 270-275. [陈崇, 周桃玉, 温旺荣. 乳腺癌组织中 Ki67 表达及其临床意义的 Meta 分析 [J]. 肿瘤学杂志, 2014, 20(4): 270-275.]
- [6] Wang SF, Ying J, Chen DB, et al. Plasma T helper cell 17 cytokine and 25(OH) vitamin D in patients with lung cancer and its clinical value [J]. Chinese Medical Journal, 2014, 16(1): 21-23. [王茂峰, 应俊, 陈德宝, 等. 血浆 Th17 细胞相关因子与 25-羟基维生素 D 检测对肺癌的临床价值 [J]. 中国医师杂志, 2014, 16(1): 21-23.]
- [7] Shuai Q, Zhang YZ, Wang H, et al. Association between plasma 25-hydroxy vitamin D levels and risk of colorectal neoplasms: a case-control study [J]. Journal of The Second Military Medical University, 2016, 37(5): 536-543. [帅群, 张永镇, 王华, 等. 血浆 25-羟基维生素 D 水平与结直肠癌肿瘤关系的病例对照研究 [J]. 第二军医大学学报, 2016, 37(5): 536-543.]
- [8] Qin YY, Kang DX, Liang SB, et al. Expression and correlation of HIF-1 α , Twist and E-cadherin in breast cancer [J]. Journal of Clinical Military Medicine, 2017, 45(5): 520-524. [秦优优, 康德新, 梁世博, 等. 乳腺癌组织中 HIF-1 α 、Twist 及 E-钙粘蛋白表达及临床意义 [J]. 临床军医杂志, 2017, 45(5): 520-524.]
- [9] Zhao JJ, Lv J, Li P. Expression and significance of cripto-1, E-cadherin and vimentin in breast cancer [J]. China Experimental Diagnostics, 2017, 21(1): 17-22. [赵俊军, 吕娇, 李平. Cripto-1 蛋白、E-钙粘蛋白和波形蛋白在乳腺癌中的表达及其意义 [J]. 中国实验诊断学, 2017, 21(1): 17-22.]