

浸润性导管型乳腺癌中金属硫蛋白 3 的表达及意义

王 瑜¹, 俞 乔²

(1.南京江北人民医院,江苏 南京 210000;2.江苏省肿瘤医院,江苏 南京 210009)

摘 要: [目的] 探讨金属硫蛋白 3(MT-3)在浸润性导管型乳腺癌中的表达,并分析 MT-3 表达与肿瘤临床病理及预后之间的关系。[方法] 选取 2012 年 3 月至 2014 年 3 月在南京江北人民医院和江苏省肿瘤医院接受治疗的浸润性导管型乳腺癌手术标本 112 例,采用免疫组织化学检测肿瘤组织和癌旁组织中 MT-3 的表达,并分析 MT-3 表达与乳腺癌患者临床病理之间相关性;采用 Kaplan-Meier 法分析 MT-3 表达与乳腺癌患者预后的关系。[结果] MT-3 蛋白在乳腺癌组织中的阳性表达率(72.3%)高于癌旁组织中的阳性表达率(25.9%)($P<0.05$)。MT-3 表达与乳腺癌组织的 TNM 临床分期、组织学分级以及淋巴结转移呈正相关($P<0.05$),而与乳腺癌患者的年龄及其肿瘤大小无明显相关性($P>0.05$)。生存分析结果显示,与 MT-3 低表达乳腺癌患者 5 年生存率(83.3%)相比,MT-3 高表达患者的 5 年生存率显著性降低(62.8%)($P<0.05$)。[结论] MT-3 在浸润性导管型乳腺癌中过表达,并与肿瘤的发生发展密切相关,有望为浸润性导管型乳腺癌的临床诊疗及预后评估提供新的思路。

关键词: 浸润性导管型乳腺癌;金属硫蛋白 3;预后

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)01-0039-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.01.B009

Expression of Metallothionein 3 in Invasive Ductal Breast Cancer and Its Significance

WANG Yu¹, YU Qiao²

(1. Jiangbei People's Hospital of Nanjing City, Nanjing 210000, China;

2. Jiangsu Cancer Hospital, Nanjing 210009, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression of metallothionein 3(MT-3) in invasive ductal breast cancer and its clinicopathological significance. [Methods] One hundred and twelve surgical specimens of invasive ductal breast cancer were collected in Jiangbei People's Hospital and Jiangsu Tumor Hospital from March 2012 to March 2014. The expression of MT-3 in ductal breast cancer and its paracancerous tissues was detected by immunohistochemistry. The correlation between the expression of MT-3 and the clinicopathological features of ductal breast cancer was analyzed. The Kaplan-Meier curve was used to evaluate the prognosis of patients. [Results] The positive expression of MT-3 in ductal breast cancer tissues (72.3%) was significantly higher than that in adjacent tissues (25.9%)($P<0.05$). Expression of MT-3 was positively correlated with TNM stage, histological grade and lymph node metastasis of ductal breast cancer ($P<0.05$), but had no significant correlation with the age of patients and tumor size ($P>0.05$). Kaplan-Meier survival analysis showed that, compared with MT-3 low expression patients, the 5-year survival rate in patients with MT-3 high expression was significantly decreased (83.3% vs. 62.8%, $P<0.05$). [Conclusion] MT-3 is overexpressed in invasive ductal breast cancer and is closely related to the progression of ductal breast cancer. It may provide a new marker for clinical diagnosis and prognosis evaluation of invasive ductal breast cancer.

Subject words: invasive ductal breast cancer; metallothionein 3; prognosis

乳腺癌是全球女性最常见的恶性肿瘤,其发病率高居女性恶性肿瘤的首位^[1]。因此寻找有效的分子标志蛋白对乳腺癌的临床诊断和治疗具有重要意

通信作者: 俞乔,主任医师,硕士;江苏省肿瘤医院乳腺外科,江苏省南京市百子亭 42 号(210009);E-mail: docyuqiao@163.com
收稿日期: 2019-04-03; **修回日期:** 2019-06-10

义^[2-3]。金属硫蛋白 3(metallothionein-3, MT-3)是一种主要分布于中枢神经系统的特异性生长抑制因子,在细胞分化细胞增殖、炎症反应以及肿瘤迁移和侵袭等生理病理过程中起着重要作用^[4-5]。研究显示 MT-3 在食管癌、前列腺癌、肺癌等多种肿瘤的发生

发展中扮演着重要的角色^[6]。本研究旨在探究 MT-3 在浸润性导管型乳腺癌中的表达及其与临床病理和预后间关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2012 年 3 月至 2014 年 3 月的医院收治的乳腺浸润型导管癌手术切除标本 112 例,均为女性,年龄 34~71 岁,平均年龄(51.5±6.8)岁。根据 WHO 乳腺浸润性导管癌标准分类标准, TNM 临床分期: I 期 36 例, II 期 49 例, III 期 27 例;组织学分级: I 级 25 例, II 级 53 例, III 级 34 例;淋巴结转移 55 例,无淋巴结转移 57 例;肿瘤直径≤2cm 30 例, >2cm 82 例。纳入标准:①经病理确诊为浸润性乳腺癌且超声分型为导管型;②术前均未接受放化疗及免疫治疗;③临床资料完整并签署知情协议书;④排除存在重大脏器疾病、内分泌疾病及其他免疫系统疾病患者。同时选取入选患者癌旁正常乳腺组织标本作为对照。

1.2 实验方法及试剂

免疫组化:组织标本经 10%多聚甲醛固定后,常规脱水、透明、包埋,制成 4μm 厚度的石蜡切片。常规脱蜡至水,将切片置于柠檬酸盐缓冲液中微波煮沸 15min,自然冷却至室温。PBS 洗 2 次,每次 5min。蒸馏水洗 2 次,每次 3min。向切片上滴加 3%过氧化氢以去除内源过氧化物酶活性,室温孵育 10min。PBS 洗 2 次,每次 3min。蒸馏水洗 3min。山羊血清封闭液室温封闭 10min。弃封闭液,滴加抗 MT-3 兔多克隆抗体(1:300,英国 Abcam 公司),4℃孵育过夜。PBS 冲洗 3 次,每次 3min。蒸馏水洗 3min。滴加生物素标记的羊抗兔二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司),37℃孵育 60min, PBS 冲洗 3 次,每次 3min。蒸馏水洗 3min。滴加 DAB 显色液(碧云天生物技术公司),显微镜下观察 3~10min,根据显色情况用自来水冲洗终止染色。苏木精染色液(北京中杉金桥生物技术有限公司)复染 1~2min 至细胞核变蓝,自来水冲洗 10min 反蓝。1%盐酸乙醇分化 5s,自来水冲洗 3min。依次采用 75%、85%、95%、100%酒精脱水 2min,二甲苯透明 2 次,每次 3min。中性树胶封片,显微镜(日本 Olympus 公司)观察染

色结果。评判标准:每张切片于光镜下随机选择 5 个高倍视野,以视野内出现棕黄色染色为阳性反应。

采用 Image J 软件对视野范围内的阳性细胞百分数和阳性细胞着色强度进行半定量。染色强度:棕褐色评分为 3 分,棕黄色评分为 2 分,浅黄色评分为 1 分,无着色评分为 0 分;阳性细胞数:阳性细胞数>75%评分为 3 分,阳性细胞数 25%~75%记为 2 分,阳性细胞数 5%~25%评分为 1 分,阳性细胞数<5%评分为 0 分。两者分值相加,总分 0~2 分为低表达,3~6 分为高表达。

1.3 随访

采用电话、信件以及查阅门诊住院病历等方式进行随访,追踪患者生存及复发转移情况。患者术后每 3 个月随访 1 次,2 年后每 6 个月通过相关影像学检查、病理活检等方法复查 1 次。随访截止日期为 2019 年 1 月 20 日,中位随访时间为 46.3 个月。

1.4 统计学处理

采用 SPSS21.0 统计学软件进行数据分析,计量资料采用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料采用率表示,组间比较采用 χ^2 检验。采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,生存率比较采用 Log-rank 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MT-3 在浸润性导管型乳腺癌中的表达

MT-3 阳性蛋白主要定位于乳腺癌细胞的细胞质内,呈浅棕色至深棕色颗粒状(Figure 1)。MT-3 蛋白在浸润性导管型乳腺癌组织和癌旁组织中的阳性表达率分别为 72.3%(81/112)和 25.9%(29/112),乳腺癌组织中 MT-3 阳性蛋白表达率显著性高于癌旁组织(*P*=0.020)。

2.2 MT-3 在浸润性导管型乳腺癌中的表达及其与临床病理之间关系

MT-3 表达与浸润性导管型乳腺癌的年龄和肿瘤大小无明显相关性(*P*>0.05),而与肿瘤的组织学分级、TNM 临床分期以及淋巴结转移具有明显的相关性(*P*<0.05)。随着乳腺癌组织学分级和 TNM 临床分期的增加,MT-3 蛋白阳性表达率增加;MT-3 在具有淋巴结转移的肿瘤组织中的表达率显著性高于非淋巴结转移肿瘤组织(*P*<0.05)。

2.3 MT-3 表达与浸润性导管型乳腺癌预后

112 例浸润性导管型乳腺癌患者中的 108 例具有完整随访资料,4 例患者失访 (其中 MT-3 高表达

3 例,MT-3 低表达 1 例)。Kaplan-Meier 生存分析显示,MT-3 低表达和高表达患者 5 年生存率分别为 83.3%(25/30)和 62.8%(49/78),MT-3 高表达乳腺癌患者的生存率显著性低于 MT-3 低表达患者 ($P=0.015$) (Figure 2)。

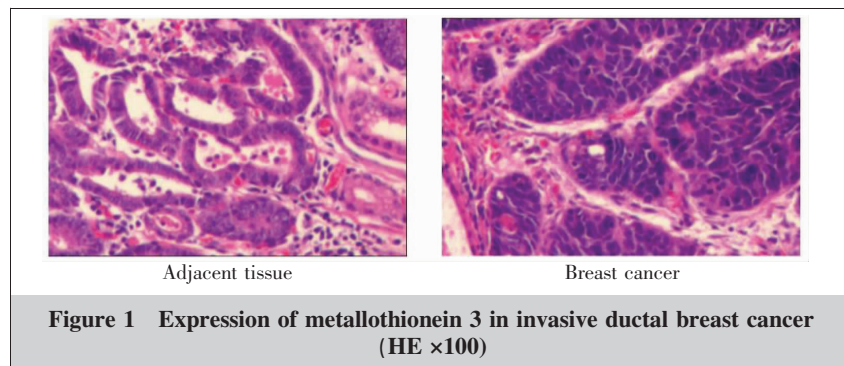
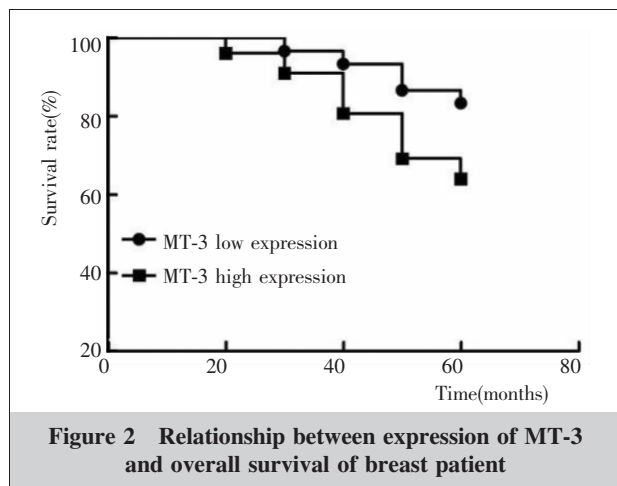


Table 1 Relationship between expression of MT-3 and clinical pathology of breast cancer

Features	N	MT-3 expression		P
		Low	High	
Age(years old)				
≤50	69	20(29.0)	49(71.0)	0.732
>50	43	11(25.6)	32(74.4)	
Tumor diameter(cm)				
>2	82	21(25.6)	61(74.4)	0.603
≤2	30	10(33.3)	20(66.7)	
Histological grading				
I	25	16(68.0)	14(56.0)	0.037
II	53	27(50.9)	39(73.6)	
III	34	10(29.4)	28(82.4)	
TNM stage				
I	36	15(41.7)	21(58.3)	0.034
II	49	12(24.5)	37(75.5)	
III	27	4(11.1)	23(88.9)	
Lymph node metastasis				
Yes	55	6(10.9)	49(89.1)	0.009
No	57	25(43.9)	32(56.1)	



3 讨论

金属硫蛋白家族是一类富含半胱氨酸的低分子量金属结合蛋白,包括 MT-1、MT-2、MT-3 和 MT-4 四种亚型,广泛分布于人体肝脏、肾脏、中枢神经系统、胰腺等各类器官及组织中,由于具有与金属离子可逆结合的特性,因此在自由基清除、离子稳态调节、重金属解毒、炎症反应以及抗细胞凋亡等各种应激反应和生理过程中发挥着至关重要的作用^[7-8]。MT-3 由 α 和 β 两个亚基构成,正常情况下主要表达于神经系统、泌尿系统以及胃肠道组织中,通过调节 Zn^{2+} 依赖性的转录因子活性,改变细胞内氧化还原、能量代谢以及蛋白合成水平,从而影响细胞分化、增殖、凋亡以及受损细胞的修复过程^[9-10]。近年来研究显示,MT-3 在肝癌、肺癌、宫颈癌以及前列腺癌等多种恶性肿瘤中异常表达,并与预后密切相关,提示 MT-3 功能异常在细胞癌变以及肿瘤发展中起着不容忽视的作用^[11-12]。

本研究显示,MT-3 在浸润性导管型乳腺癌中的蛋白表达水平显著性高于其癌旁组织,提示 MT-3 异常表达在乳腺癌的发生发展中扮演着重要角色。通过对 MT-3 表达与乳腺癌临床病理之间相关性分析发现,MT-3 表达与肿瘤的组织学分级、TNM 临床分期以及淋巴结转移呈正相关,而与患者的年龄和肿瘤大小无明显相关性,结果表明 MT-3 在浸润性导管型乳腺癌的肿瘤进程中起着癌基因的作用。可能是由于 MT-3 异常表达,导致锌指转录因子以及其他需锌蛋白质活性的失调,细胞增殖发生恶性转变,细胞分化、凋亡发生紊乱,同时细胞修复功能的受损也进一步导致肿瘤侵袭和迁移的发生。Wang 等^[13]研究显示 MT-3 在食管鳞癌组织中的阳性表达明显高于正常癌旁组织,并与肿瘤的分化程度、浸润深度以及淋巴结转移之间呈正相关。Tsui KH 等^[14]的研究也证明 MT-3 过表达可显著性促进膀胱癌细胞

的增殖和侵袭。

生存分析结果显示, MT-3 高表达乳腺浸润型导管癌患者的 5 年生存率低于 MT-3 低表达患者, 提示 MT-3 过表达与乳腺癌患者的不良预后密切相关。Sens MA 等^[15]研究也显示 MT-3 在乳腺癌中过表达, 并与肿瘤的预后不良相关, 但并未对 MT-3 表达与肿瘤发展之间的关系进行深入探讨。我们推测这可能与 MT-3 对金属离子正常调控功能的丧失有关, 金属离子的失调严重影响金属依赖性转录因子的活性, 进而导致机体蛋白质合成、氧化还原以及能量代谢的紊乱, 最终造成细胞增殖和凋亡的失衡; 也有研究认为 MT-3 异常表达可直接诱发肿瘤的产生。

综上所述, MT-3 在浸润性导管型乳腺癌中呈过表达, MT-3 下调导致乳腺癌细胞增殖能力下降。MT-3 表达与肿瘤组织的组织学分级、TNM 临床分期以及淋巴结转移相关, 是浸润性导管型乳腺癌患者不良预后的独立危险因素, 但具体参与乳腺癌的发生发展机制仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] Shah C, Tendulkar R, Smile T, et al. Adjuvant radiotherapy in early-stage breast cancer: evidence-based options[J]. *Ann Surg Oncol*, 2016, 23(12): 3880–3890.
- [2] Cedolini C, Bertozzi S, Londero AP, et al. Type of breast cancer diagnosis, screening and survival [J]. *Clin Breast Cancer*, 2014, 14(4): 235–240.
- [3] Lobbes MB, Vriens IJ, van Bommel AC, et al. Breast MRI increases the number of mastectomies for ductal cancers, but decreases them for lobular cancers [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2017, 162(2): 353–364.
- [4] Lee SJ, Koh JY. Roles of zinc and metallothionein-3 in oxidative stress-induced lysosomal dysfunction, cell death, and autophagy in neurons and astrocytes [J]. *Mol Brain*, 2010, 3(1): 30.
- [5] Faller P. Neuronal growth-inhibitory factor (metallothionein-3): reactivity and structure of metal-thiolate clusters[J]. *FEBS J*, 2010, 277(14): 2921–2930.
- [6] Tian ZQ, Xu YZ, Zhang YF, et al. Effects of metallothionein-3 and metallothionein-1E gene transfection on proliferation, cell cycle, and apoptosis of esophageal cancer cells[J]. *Genet Mol Res*, 2013, 12(4): 4595–4603.
- [7] Ziller A, Yadav RK, Capdevila M, et al. Metagenomics analysis reveals a new metallothionein family: sequence and metal-binding features of new environmental cysteine-rich proteins[J]. *J Inorg Biochem*, 2017, 167: 1–11.
- [8] Krizkova S, Kepinska M, Emri G, et al. Microarray analysis of metallothioneins in human diseases—a review [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 117: 464–473.
- [9] Santoro A, Wezynfeld NE, Stefaniak E, et al. Cu transfer from amyloid-β4-16 to metallothionein-3: the role of the neurotransmitter glutamate and metallothionein-3 Zn(ii)-load states [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2018, 54 (89): 12634–12637.
- [10] Lee SJ, Seo BR, Koh JY. Metallothionein-3 modulates the amyloid β endocytosis of astrocytes through its effects on actin polymerization[J]. *Mol Brain*, 2015, 8(1): 84.
- [11] Dutta R, Sens DA, Somji S, et al. Metallothionein isoform 3 expression inhibits cell growth and increases drug resistance of PC-3 prostate cancer cells [J]. *Prostate*, 2002, 52 (2): 89–97.
- [12] Felizola SJ, Nakamura Y, Arata Y, et al. Metallothionein-3 (MT-3) in the human adrenal cortex and its disorders[J]. *Endocr Pathol*, 2014, 25(3): 229–235.
- [13] Wang H, Lin F, Guo XG, et al. Expression of metallothionein-3(MT-3) and p73 protein in the tissues of esophageal cancer and its clinical significance[J]. *Chinese Journal of Clinicians (Electronic Edition)*, 2014, (18): 3225–3231. [王昊, 林飞, 郭晓光, 等. 金属硫蛋白-3 和 P73 蛋白在食管鳞癌组织中的表达及意义[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2014, (18): 3225–3231.]
- [14] Tsui KH, Hou CP, Chang KS, et al. Metallothionein 3 is a hypoxia-upregulated oncogene enhancing cell invasion and tumorigenesis in human bladder carcinoma cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(4): pii: E980.
- [15] Sens MA, Somji S, Garrett SH, et al. Metallothionein isoform 3 overexpression is associated with breast cancers having a poor prognosis[J]. *Am J Pathol*, 2001, 159(1): 21–26.