

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2008.04.018

细胞外基质蛋白 1 在乳腺癌组织和细胞株中的表达及其意义

侯彦强¹, 仲人前^{2*}, 耿红莲², 倪健³, 孔宪涛² (1. 上海交通大学附属第一人民医院松江分院检验科, 上海 201600; 2. 第二军医大学附属长征医院实验诊断科全军临床免疫中心, 上海 200003; 3. 上海富纯中南生物技术有限公司, 上海 201702)

[摘要] 目的: 探讨细胞外基质蛋白 1 (extracellular matrix protein 1, ECM1) 在乳腺癌组织和细胞株中的表达及其意义。方法: 应用免疫组织化学和免疫细胞化学 EnVision 法检测乳腺癌手术切除标本中乳腺组织(正常组织和癌组织)和恶性程度不同的乳腺癌细胞株(MCF-7、Sk-Br-3 和 MDA-435)中 ECM1 的表达, 并比较正常乳腺组织和乳腺癌组织、淋巴结转移和未转移乳腺癌之间的 ECM1 表达差异。Western blotting 检测确定 ECM1 亚型蛋白。结果: ECM1 的表达在正常乳腺组织中阳性率为 8.7% (2/23), 在乳腺癌组织中阳性率为 60.4% (29/48); 其中乳腺癌淋巴结未转移者为 38.5% (10/26), 淋巴结转移者为 86.4% (19/22)。统计分析表明, ECM1 的表达在乳腺癌组织中高于正常组织 ($P < 0.01$), 在转移性乳腺癌中高于非转移性乳腺癌 ($P < 0.01$)。恶性程度低的乳腺癌细胞株 MCF-7、Sk-Br-3 中不表达 ECM1, 而恶性程度较高的 MDA-435 细胞株中高表达 ECM1。乳腺癌细胞中高表达的 ECM1 蛋白主要是相对分子质量为 68 000 的 ECM1a 亚型。结论: ECM1 (主要为 ECM1a 亚型) 在乳腺癌组织和恶性程度高的乳腺癌细胞中过表达, 并且与乳腺癌的淋巴结转移相关。

[关键词] 细胞外基质蛋白 1; 乳腺癌; 表达; 淋巴结转移

[中图分类号] R737.9; R730.23

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2008)04-0384-04

Expression of extracellular matrix protein 1 in breast cancer tissue and cell lines and its significance

HOU Yan-qiang¹, ZHONG Ren-qian^{2*}, GENG Hong-lian², NI Jian³, KONG Xian-tao² (1. Department of Clinical Laboratory, Songjiang Branch, the First People's Hospital of Shanghai, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201600, China; 2. Department of Laboratory Diagnostics, Clinical Immunology Center of PLA, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 3. Shanghai Fuchun Zhongnan Biotech Company, LTD; Shanghai 201702, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of extracellular matrix protein 1 (ECM1) in breast cancer tissues and cell lines and to assess its significance. **Methods:** Immunohistochemical and immunocytochemical EnVision methods were used to detect expression of ECM1 in the breast tissues (normal tissues and cancer tissues) and in breast cancer cell lines of different malignancies (MCF-7, Sk-Br-3, and MDA-435). The ECM1 positive rates were compared between normal tissues and cancer tissues and between cancer tissues with and without lymph node metastasis. Western blotting was used to identify the subtypes of ECM1. **Results:** The positive rate of ECM1 was 8.7% (2/23) in the normal breast tissues, 60.4% (29/48) in breast cancer tissues, 38.5% (10/26) in breast cancer tissues without lymph node metastasis, and 86.4% (19/22) in those with lymph node metastasis. Statistical analysis indicated that the ECM1 expression was higher in the breast cancer tissues than in the normal tissues ($P < 0.01$), and the expression in the metastatic breast cancer was higher than that in the primary cancer tissues ($P < 0.01$). Cell lines with low malignancy, such as MCF-7 and Sk-Br-3 cells, were negative of ECM1; cell lines with high malignancy, such as MDA-435 cells, were strongly positive of ECM1. Western blotting showed that the highly expressed ECM1 protein was mainly ECM1a subtype, with a relative molecular mass of 68 000. **Conclusion:** ECM1, mainly ECM1a subtype, is over-expressed in breast cancer tissues and cell lines of high malignancy, which is associated with the metastasis of breast cancer.

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30080027); 上海市基础研究重大项目基金资助(No. 02JC14005); 上海市松江区科学技术攻关基金资助项目(No. 06KG27). Supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 30080027); the Major Basic Research Program Foundation of Shanghai of China(No. 02JC14005); the Science and Technology Research Project of Songjiang District of Shanghai(No. 06KG27)

[作者简介] 侯彦强(1971-), 男, 山东省泰安市人, 博士, 副主任技师, 主要从事肿瘤基础及检验方面的研究

* Corresponding author. E-mail: rqzhong@guomai.sh.cn

[**Key words**] extracellular matrix protein 1(ECM1); breast neoplasms; expression; lymph node metastasis
[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(4): 384-387]

细胞外基质蛋白1(extracellular matrix protein 1, ECM1)是1994年 Mathieu 等^[1]在鼠的成骨基质细胞系 MN7 中分离出来的一种分泌性糖蛋白。近年来的研究发现,ECM1 具有多种功能,如 ECM1 基因的缺失可导致类脂蛋白沉积症的发生^[2-4];硬化性苔癣患者血清中存在高滴度的 ECM1 自身抗体^[5],并且一些慢性硬化性苔癣患者好并发恶性肿瘤,主要是鳞状细胞癌^[6]。目前已知细胞外基质在肿瘤的发生及转移等方面有重要作用,肿瘤细胞对细胞外基质的黏附、侵袭等都与肿瘤的转移密切相关^[7-8]。基于以上研究成果,本研究选取乳腺癌为研究对象,探讨 ECM1 在乳腺癌中的表达及其临床意义。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料和标本

MCF-7 乳腺癌细胞株(恶性程度低)由第二军医大学东方肝胆外科医院王红阳教授惠赠,Sk-Br-3 乳腺癌细胞株(恶性程度低)购自中国科学院细胞库,MDA-435 乳腺癌细胞株(恶性程度高)为本室保存。乳腺组织(正常组织和癌组织)标本收集自上海长征医院、瑞金医院的乳腺癌手术病例:48 例乳腺癌(38 例浸润性癌,10 例原位癌),年龄 31 ~ 63 岁,平均(46.3 ± 11.6)岁;23 例正常乳腺组织取自全乳腺切除标本中距肿块至少 5 cm 相对正常组织。病例选取条件:(1)所选病例具有完整的临床资料,手术前均未经任何抗癌治疗;(2)手术留取的标本经 10% 甲醛常规固定,脱水,包埋,蜡块保存备用;(3)所选标本未考虑年龄、职业等其他因素。EnVision 两步法免疫检测试剂盒购自 DAKO 公司。ECM1 多抗由倪健博士惠赠。ECL 显色试剂盒购自 Pierce Rockford IL 公司,Magical XP western protein standard 购自 invitrogen 公司。

1.2 免疫组化检测乳腺组织标本中 ECM1 的表达

免疫组化染色采用 EnVision 两步法,主要步骤如下:切片脱蜡,微波煮沸抗原修复 10 min,3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化酶 10 min,滴加 ECM1 抗体(1:300)孵育 30 min,滴加 EnVisionTM 孵育 30 min, DAB 显色,苏木精复染,透明封片。结果判定:在双盲的情况下由两名病理科医师对每张切片进行全面的观察,胞质着棕褐色细胞为表达阳性细胞;按阳性染色细胞数所占比例分为:(-),阳性细胞数 < 10%;(+),阳性细胞数 10% ~ 30%;(++) ,阳性细

胞数 31% ~ 60%;(+++),阳性细胞数 61% ~ 100%。

1.3 免疫细胞化学检测乳腺癌细胞株中 ECM1 的表达

制备 MCF-7、Sk-Br-3 和 MDA-435 细胞的爬片,采用免疫细胞化学染色 EnVision 两步法(主要步骤同上)检测细胞中 ECM1 的表达。

1.4 Western blotting 检测乳腺癌组织和细胞株中 ECM1 的表达

制备乳腺癌组织和细胞株蛋白样本,BCA 法测蛋白浓度,取 30 μg 样本上样检测,12% SDS-PAGE 胶分离蛋白,分离后蛋白转移至硝酸纤维素膜上,ECM1 抗体(1:1 000)室温孵育 1 h,HRP 结合的二抗室温孵育 1 h,膜放入 ECL 显色液中室温孵育 1 min,最后 X 线片在暗室中曝光 30 s 显影。

1.5 统计学处理

计数资料以百分率表示,应用 SPSS10.0 统计软件分析数据,采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 乳腺癌组织中 ECM1 表达的免疫组织化学检测结果

正常乳腺与乳腺癌组织 ECM1 表达的典型镜下观察见图 1。经免疫组化 EnVision 方法检测,正常乳腺组织 ECM1 的表达阳性率为 8.7%(2/23),乳腺癌组织 ECM1 表达的阳性率为 60.4%(29/48);其中淋巴结未转移组为 38.5%(10/26),淋巴结转移组为 86.4%(19/22)。统计分析结果表明,对 ECM1 的表达,乳腺癌组织明显高于正常乳腺组织,转移性乳腺癌组织明显高于非转移性乳腺癌组织(均 $P < 0.01$,表 1)。

2.2 乳腺癌细胞株中 ECM1 表达的免疫细胞化学检测结果

免疫细胞化学检测显示,恶性程度低的乳腺癌细胞株 MCF-7、Sk-Br-3 中不表达 ECM1,而恶性程度较高的 MDA-435 细胞株中高表达 ECM1(图 2)。

2.3 正常乳腺组织、乳腺癌组织和细胞株中 ECM1 亚型蛋白的鉴定

Western blotting 检测结果表明,正常乳腺组织可检测到少量 ECM1 蛋白,但蛋白的量明显少于高恶性的 MDA-435 细胞株和乳腺癌组织;乳腺癌细胞和乳腺癌组织之间无差异。从分子量上来判断,检测到的 ECM1 蛋白主要是相对分子质量为 68 000 的 ECM1a 亚型(图 3)。

表 1 ECM 1 在正常乳腺及乳腺癌组织中的表达
Tab. 1 Expression of ECM1 in normal breast and breast cancer tissues

Group	Number of case	ECM1(-)	ECM1(+ ~ 卅)	Positive rate(%)
Normal breast	23	21	2	8.7
Breast cancer	48	19	29	60.4**
Lymph node metastasis(+)	22	3	19	86.4 ^{△△}
Lymph node metastasis(-)	26	16	10	38.5

** P < 0.01 vs normal breast; ^{△△} P < 0.01 vs lymph node metastasis(-)

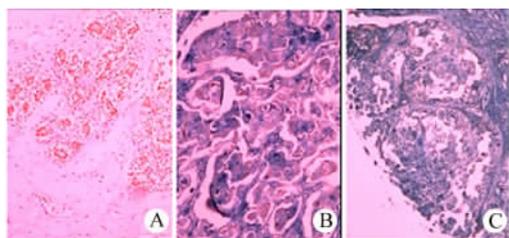


图 1 免疫组织化学法检测 ECM 1 在乳腺癌组织中的表达

Fig1 Expression of ECM 1 in breast cancer tissue by immunohistochemical staining

A: Normal breast (-) (× 100); B: Breast adenocarcinoma (卅) (× 400); C: Breast infiltrating ductal carcinoma (卅) (× 400)

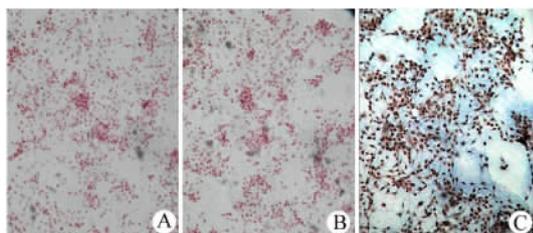


图 2 免疫细胞化学法检测 ECM 1 在乳腺癌细胞株中的表达(× 100)

Fig. 2 Expression of ECM 1 in breast cancer cell lines by immunocytochemical staining (× 100)

A: MCF-7 cells with low malignancy(-); B: Sk-Br-3 cells with low malignancy (-); C: MDA-435 cells with high malignancy(+)

3 讨论

细胞外基质蛋白 1 是从鼠的成骨基质细胞系 MN7 中分离出来的一种分泌性糖蛋白,之所以这样命名是因为该蛋白被发现存在于各种结缔组织蛋白中,包括胶原蛋白、骨连接素和骨涎液蛋白,尽管当时并不知道它是否与细胞外基质在生理和病理上有

相关性。ECM1 基因有 3 个不同的剪切体:ECM1a、ECM1b 和 ECM1c,它们分别编码 540、415 和 559 个氨基酸的蛋白质,其中 ECM1a 相对分子质量为 68 000,ECM1b 相对分子质量为 46 000。ECM1a 可表达于各种组织,但表达最丰富的是胎盘和心脏;ECM1b 为限制性表达模式,仅在扁桃体和角化细胞中可检测到;ECM1c 的表达现仍未确定,但在皮肤中约占 ECM1 RNA 的 15%^[9-10]。对于 ECM1 功能的研究,目前主要集中该分子在骨及皮肤中作用的研究,如现已发现 ECM1 是一种软骨内骨形成的负调节因子,可抑制碱性磷酸酶的活性和骨的矿化^[11]。ECM1 基因定位在染色体 1q21 的临近表皮分化复合体区,ECM1 可能在角化细胞分化中起作用^[12];ECM1 基因的功能性缺失可导致类脂蛋白沉积症的发生^[2];硬化性苔癣患者血清中存在高滴度的 ECM1 自身抗体,提示 ECM1 可能是硬化性苔癣患者体液免疫的一个作用靶点^[4]。

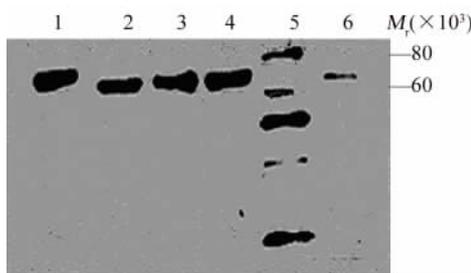


图 3 Western blotting 检测乳腺癌组织和细胞株中 ECM1 蛋白的表达

Fig. 3 Expression of ECM 1 protein in breast cancer tissue and cell lines by Western blotting

1: MDA-435 cells with high malignancy; 2, 3, 4: Breast cancer tissues; 5: Marker; 6: Normal breast tissue

对于 ECM1 与肿瘤的关系,目前的研究资料极少,但已有研究认为 ECM1 在肿瘤的发生、发展中会起一定作用^[13-14]。本实验采用免疫组化 EnVision

检测技术,在组织和细胞株两个水平进行了 ECM1 蛋白表达的检测。结果显示,对 ECM1 的表达,乳腺癌组织明显高于正常乳腺组织($P < 0.01$),乳腺癌淋巴结转移组织明显高于未转移组织($P < 0.01$);恶性程度低的乳腺癌细胞株 MCF-7、Sk-Br-3 中不表达 ECM1,而恶性程度较高的 MDA-435 细胞株中高表达 ECM1。由此可认为,ECM1 在乳腺癌组织中过表达,并且可能与肿瘤的转移相关。Wang 等^[15]在恶性上皮细胞肿瘤中也得出类似的结论。值得注意的是,对免疫组化染色标本的镜下观察发现,ECM1 的表达有很强的异质性,即使在同一张 ECM1 切片中着色也不一致,一些癌细胞着色很深,而另一些癌细胞着色浅甚至根本就不着色;各切片阳性细胞的所占比例也出现较大的不一致。根据以上结果分析,推测表达 ECM1 的癌细胞可能比不表达 ECM1 的癌细胞有更强的侵袭性,恶性程度更高。在许多切片中还发现,尽管癌细胞表达高水平的 ECM1,但局限分布在肿瘤细胞的胞质或细胞周围。

由于本研究免疫组化中用的 ECM1 抗体为多克隆抗体,尚不能确定是那种亚型的 ECM1。因此,本研究进一步对组织和细胞中的 ECM1 进行 Western blotting 检测,利用分子量的不同来确定 ECM1 蛋白的类型。检测结果显示,在正常乳腺组织中可检测到少量 ECM1 蛋白,但蛋白的量明显少于 MDA-435 细胞株和乳腺癌组织。从相对分子质量上来看,检测到的 ECM1 蛋白是 68 000 的 ECM1a。此结果表明,在乳腺癌组织中 ECM1a 蛋白的表达升高。

综上所述,ECM1 在乳腺癌中尤其是转移性乳腺癌中过表达,也许可作为一个肿瘤的标记分子,对肿瘤的诊断、治疗、监控及预后等有重要开发价值;而且由于 ECM1 是一种分泌性糖蛋白,患者血清中的 ECM1 浓度可能与某种类型肿瘤的存在或转移相关联,这些都还有待于进一步深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] Mathieu E, Meheus L, Raymackers J, *et al.* Characterization of the osteogenic stromal cell line MN7: identification of secreted MN7 proteins using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, western blotting and microsequencing [J]. *J Bone Miner Res*, 1994, 9(6): 903-913.
- [2] Hamada T, McLean WH, Ramsay M, *et al.* Lipoid proteinosis maps to 1q21 and is caused by mutations in the extracellular matrix

protein 1 gene (ECM1) [J]. *Hum Mol Genet*, 2002, 11(7): 833-840.

- [3] Chan I, Liu L, Hamada T, *et al.* The molecular basis of lipoid proteinosis: mutations in extracellular matrix protein 1 [J]. *Exp Dermatol*, 2007, 16(11): 881-890.
- [4] Han B, Zhang X, Liu Q, *et al.* Homozygous missense mutation in the ECM1 gene in Chinese siblings with lipoid proteinosis [J]. *Acta Derm Venereol*, 2007, 87(5): 387-389.
- [5] Oyama N, Chan I, Neill SM, *et al.* Autoantibodies to extracellular matrix protein 1 in lichen sclerosus [J]. *Lancet*, 2003, 362(9378): 118-123.
- [6] Tasker GL, Wojnarowska F. Lichen sclerosus [J]. *Clin Exp Dermatol*, 2003, 28(2): 128-133.
- [7] 李风和,俞光岩. 细胞外基质与肿瘤转移 [J]. *现代口腔医学杂志*, 2000, 14(3): 206-207.
- [8] 韩 韬,段国兰. 细胞外基质与肿瘤转移关系的研究进展 [J]. *医学综述*, 2000, 8(1): 22-24.
- [9] Smits P, Ni J, Feng P, *et al.* The human extracellular matrix gene 1 (ECM1): genomic structure, cDNA cloning, expression pattern and chromosomal localization [J]. *Genomics*, 1997, 45(3): 487-495.
- [10] Mongiat M, Fu J, Oldershaw R, *et al.* Perlecan protein core interacts with extracellular matrix protein 1 (ECM1), a glycoprotein involved in bone formation and angiogenesis [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(19): 17491-17499.
- [11] Deckers MM, Smits P, Karperien M, *et al.* Recombinant human extracellular matrix protein 1 inhibits alkaline phosphatase activity and mineralization of mouse embryonic metatarsals *in vitro* [J]. *Bone*, 2001, 28(1): 14-20.
- [12] Sercu S, Zhang M, Oyama N, *et al.* Interaction of extracellular matrix protein 1 with extracellular matrix components: ECM1 is a basement membrane protein of the skin [J]. *J Invest Dermatol*, 2008, 128(6): 1397-1408.
- [13] Sercu S, Zhang L, Merregaert J. The extracellular matrix protein 1: its molecular interaction and implication in tumor progression [J]. *Cancer Invest*, 2008, 26(4): 375-384.
- [14] Bergamaschi A, Tagliabue E, Sørbye T, *et al.* Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome [J]. *J Pathol*, 2008, 214(3): 357-367.
- [15] Wang L, Yu J, Ni J, *et al.* Extracellular matrix protein (ECM1) is over-expressed in malignant epithelial tumors [J]. *Cancer Lett*, 2003, 200(1): 57-67.

[收稿日期] 2008-03-26

[修回日期] 2008-07-01

[本文编辑] 韩 丹