

## · 临床研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.01.018

## 乳腺癌中肾上腺髓质素的表达及其与癌组织分化、转移间的关系

李云涛<sup>1</sup>, 崔娜<sup>2</sup>, 陈丽芬<sup>3</sup>, 李海平<sup>1\*</sup>, 范忠林<sup>1</sup>, 李勇<sup>4</sup> (1. 河北医科大学第四医院外一科, 石家庄 050011; 2. 河北大学附属医院 ICU, 河北保定 071000; 3. 北京市宣武医院教育处, 北京 100053; 4. 河北医科大学第四医院外三科, 石家庄 050011)

**[摘要]** 目的: 探讨乳腺癌组织中肾上腺髓质素(adrenomedullin, ADM)的表达情况及其临床意义。方法: 取河北医科大学第四医院外一科2005年3月至2005年4月手术切除的32例乳腺癌组织, 以及同组病例距癌组织外缘5 cm外的癌旁乳腺组织, 采用RT-PCR检测人乳腺癌细胞株MCF-7和32例乳腺癌组织及癌旁组织中ADM mRNA的表达情况, 免疫组织化学染色检测32例乳腺癌组织中ER、PR、C-erbB-2的表达情况, 并分析ADM mRNA与临床病理指标之间以及与ER、PR、C-erbB-2表达间的关系。结果: 人乳腺癌MCF-7细胞株呈ADM mRNA阳性表达。乳腺癌组织中ADM mRNA阳性表达率为75% (24/32), 显著高于癌旁5 cm外乳腺组织(0%, 0/32;  $P < 0.01$ )。人乳腺癌组织ADM mRNA的表达与肿瘤大小、TNM分期、病理类型、ER、PR和C-erbB-2等临床病理指标无关, 但与组织学分级( $P < 0.01$ )和腋窝淋巴结转移有关( $P < 0.05$ )。结论: ADM mRNA在乳腺癌组织中表达增加, 其强阳性表达与组织学分化差或腋窝淋巴结转移密切相关。

**[关键词]** 乳腺癌; 肾上腺髓质素; 组织学分化; 转移

**[中图分类号]** R737.9; R730.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2009)01-080-04

## Expression of adrenomedullin in breast cancer tissues and its relationship with differentiation and metastasis of breast cancer

LI Yun-tao<sup>1</sup>, CUI Na<sup>2</sup>, CHEN Li-fen<sup>3</sup>, LI Hai-ping<sup>1\*</sup>, FAN Zhong-lin<sup>1</sup>, LI Yong<sup>4</sup> (1. First Department of Surgery, Fourth Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China; 2. ICU, Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding 071000, Hebei, China; 3. Division of Education, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China; 4. Third Department of Surgery, Fourth Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression of adrenomedullin (ADM) in breast cancer tissues and its relationship with differentiation and metastasis of breast cancer. **Methods:** RT-PCR was used to examine ADM mRNA expression in 32 breast cancer tissues (the patients were treated in the Fourth Affiliated Hospital of Hebei Medical University from March 2005 to April 2005) and the corresponding adjacent tissues (5 cm away from tumors), as well as in MCF-7 cell line. Expressions of ER, PR and C-erbB-2 in breast cancer were examined by immunohistochemical staining. **Results:** Human breast cancer cell line MCF-7 was positive of ADM. ADM mRNA expression was detected in 75% (24/32) breast cancer samples, which was significantly higher than that in the corresponding adjacent tissues (0%, 0/32,  $P < 0.01$ ). We found that ADM expression was correlated with the differentiation degree and lymph node metastasis of breast cancer ( $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , respectively), and was not correlated with the expression of ER, PR or C-erbB-2, the tumor size, TNM staging, or the pathological types. **Conclusion:** The expression of ADM is increased in breast cancer tissues, which is correlated with the poor differentiation and lymph node metastasis of the breast cancer.

**[Key words]** breast cancer; adrenomedullin; histological differentiation; metastasis

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(1): 80-83]

**[基金项目]** 河北省科技厅科技攻关项目(No. 0527611D-57); 河北省普通高校强势特色学科资助项目(No. 200552). Supported by the Development Program of Science and Technology Commission of Hebei Province (No. 0527611D-57); the Strong Characteristic Subject of Colleges and Universities of Hebei Province (No. 200552)

**[作者简介]** 李云涛(1971-), 男, 河北保定人, 副主任医师, 在读博士研究生, 主要从事乳腺肿瘤方面的研究

\* 通讯作者( Corresponding author). E-mail: haiping8880@hotmail.com

肿瘤血管生成一直是研究的热点之一,在肿瘤血管生成过程中有多种因子参与,针对这些因子进行治疗是目前治疗恶性肿瘤的可行方法之一<sup>[1]</sup>。肾上腺髓质素(adrenomedullin, ADM)作为一种新发现的血管源性肽,表达在包括胰腺、结肠、前列腺、卵巢等来源的多种人肿瘤细胞上,是肿瘤发生、发展和转移过程中的一个重要因素<sup>[2-3]</sup>。ADM主要通过抑制免疫反应、抑制凋亡、促进血管生成、刺激有丝分裂等机制而发挥作用<sup>[4-5]</sup>。Miyazaki 实验室<sup>[6]</sup>证明,在上皮性卵巢癌中 ADM mRNA 表达水平增高提示预后不良,其原因可能是 ADM 具有促进血管生成的作用。本实验通过逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测乳腺癌组织中 ADM mRNA 的表达情况,从基因转录水平分析乳腺癌组织中 ADM 的表达情况及其与临床病理特征的关系,探讨 ADM 在乳腺癌发生、发展中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本的采集

标本来源于河北医科大学第四医院外一科 2005 年 3 月至 2005 年 4 月手术切除的 32 例乳腺癌组织及同组病例距癌组织外缘 5 cm 以外的癌旁乳腺组织。患者术前均未接受化疗和放疗。所有患者均为女性,年龄 28 ~ 80 岁,平均(52 ± 9.3)岁。病理分型:浸润性导管癌 18 例,浸润性小叶癌 9 例,其他 5 例(黏液腺癌 2 例,髓样癌 1 例,大汗腺样癌 1 例,乳腺增生癌变 1 例)。按照 2003 年 AJCC 乳腺癌 TNM 分类及分期标准,32 例肿瘤 TNM 分期:Ⅰ期 1 例,Ⅱ期 20 例,Ⅲ期 11 例。

### 1.2 主要材料与试剂

人乳腺癌 MCF-7 细胞株由河北医科大学第四医院科研中心单保恩教授惠赠。Trizol 裂解液购自 Invitrogen 公司,RT-PCR 试剂盒购自 Sino-American Biotechnology 公司,免疫组化试剂盒购自北京中杉生物技术公司。

### 1.3 RT-PCR 检测乳腺癌组织 ADM mRNA 的表达

ADM 引物序列:上游引物 5'-ACATGAAGGTCCTCTCG-3',下游引物 5'-GGTAGATCTGCTGTGCCAGC-3',其扩增片段长度为 162 bp。 $\beta$ -actin 引物序列:上游 5'-ACCCCACTGAAAAGATGAG-3',下游 5'-ATCTTCAAACCTCCATGATGC-3',扩增片段长度为 120 bp。Trizol 总 RNA 分离试剂盒一步法提取乳腺癌及癌旁组织总 RNA,紫外分光光度计测定光密度。逆转录合成 cDNA。按 20  $\mu$ l 反应体

系行 PCR 扩增,扩增条件:37  $^{\circ}$ C 50 min, 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,后转入 94  $^{\circ}$ C 变性 1 min,58  $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 35 个周期,然后再延伸 10 min。RT-PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,将电泳条带应用凝胶成像分析仪进行分析。若同一标本  $\beta$ -actin 表达阳性,而 ADM 无表达条带,则判定为阴性表达;若标本  $\beta$ -actin 和 ADM 均有特异性条带,则确定为 ADM 阳性表达。

### 1.4 免疫组织化学染色检测乳腺癌组织 ER、PR、C-erbB-2 的表达

免疫组织化学染色采用标准 SP 法。所有组织均用 10% 甲醛固定,石蜡包埋,连续切片厚 4  $\mu$ m,依次脱蜡,水化,抗原热修复。3%  $H_2O_2$  室温孵育 10 min,PBS 冲洗,再以 10% 山羊血清封闭 10 min,然后分别滴加 ER、PR 和 C-erbB-2 的一抗、二抗等,最后用 DAB 溶液显色,显色结束后以自来水充分冲洗,苏木精复染,中性树胶封片;以已知的乳腺癌阳性组织作为阳性对照,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

### 1.5 统计学处理

采用 SPSS11.5 统计软件,采用  $\chi^2$  检验及 Fisher 精确概率法计算  $P$  值,统计学显著性水平为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 人乳腺癌 MCF-7 细胞及乳腺癌组织中 ADM mRNA 的表达

人乳腺癌 MCF-7 细胞株呈 ADM mRNA 阳性表达,可见扩增片段长度 162 bp(ADM)和 120 bp( $\beta$ -actin)特异性条带。在 32 例乳腺癌组织中,ADM mRNA 阳性表达 24 例,阴性表达 8 例,阳性表达率为 75%;32 例癌旁乳腺组织未检测到 ADM mRNA 阳性表达,乳腺癌组织的 ADM mRNA 阳性表达与癌旁乳腺组织比较差异有统计学意义( $\chi^2 = 38.400$ ,  $P < 0.01$ ,图 1)。

### 2.2 人乳腺癌组织 ADM mRNA 表达与临床病理特征的关系

乳腺癌组织中 ADM mRNA 的表达与肿瘤的组织学分级有关( $\chi^2 = 9.565$ ,  $P < 0.01$ ),分化 I 级的阳性表达率(20.0%)明显低于分化 II 级(85.71%,  $P < 0.05$ )和 III 级(84.61%,  $P < 0.05$ )者,差异有统计学意义,II 级和 III 级比较无统计学差异(表 1)。腋窝淋巴结转移组的 20 例患者中,18 例乳腺癌组织呈 ADM mRNA 阳性表达(90.0%,18/20),而 12 例无腋淋巴结转移的乳腺癌组织仅 6 例呈阳性

表达(50.0%),差异有统计学意义( $\chi^2 = 6.40, P < 0.05$ ,表1)。ADM mRNA的表达与患者肿瘤的大小、TNM分期、病理类型、ER、PR和C-erbB-2等无关( $P > 0.05$ ,表1)。

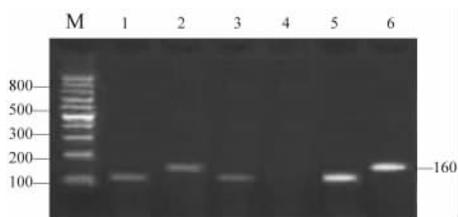


图1 RT-PCR检测ADM mRNA在乳腺癌组织中的表达

Fig. 1 ADM mRNA expression level in breast cancer

M: Molecular marker; 1:  $\beta$ -actin in breast cancer tissue; 2: ADM in breast cancer tissue; 3:  $\beta$ -actin in breast cancer adjacent tissue; 4: ADM in breast cancer adjacent tissue; 5:  $\beta$ -actin in MCF-7 cell line; 6: ADM in MCF-7 cell line

表1 乳腺癌组织中ADM的表达与临床病理指标间的关系

Tab. 1 Relationship between ADM expression and clinicopathological features in breast carcinoma

Clinicopathological feature	N	ADM [n(%)]	$\chi^2$	P
Tumor size (d/cm)				
<2	3	1(33.3)	3.460	>0.05
2~5	21	16(76.2)		
>5	8	7(87.5)		
TNM stage				
I~II	21	14(86.6)	2.263	>0.05
III	11	10(90.9)		
Histological type				
Ductal carcinoma	18	11(61.1)	4.919	>0.05
Lobular carcinoma	9	9(100)		
Others	5	4(80.0)		
Tissue differentiation				
I	5	1(20.0)	9.565	<0.01
II	14	12(85.7)		
III	13	11(84.6)		
Lymphatic metastasis				
pN0	12	6(50.0)	6.400	<0.05
pN1	20	18(90.0)		

### 2.3 人乳腺癌组织中ADM mRNA表达与ER、PR、C-erbB-2表达的关系

ER、PR阳性表达细胞胞核呈棕黄色颗粒,每张切片中阳性细胞 $\geq 25\%$ 为阳性, $< 25\%$ 或无阳性细胞为阴性。C-erbB-2阳性表达细胞胞质显示棕黄色颗粒,每张切片中阳性细胞数 $\geq 10\%$ 为阳性, $< 10\%$ 或无阳性细胞为阴性。本组资料中ER阳性率为78.12%(25/32),PR阳性率为93.75%(30/32),C-erbB-2的阳性率为90.63%(29/32)。ADM mRNA的表达与ER、PR、C-erbB-2表达的比较均无统计学意义(表2)。

表2 乳腺癌组织中ADM mRNA的表达与ER、PR、C-erbB-2表达间的关系

Tab. 2 Relationship between expression of ER, PR or C-erbB-2 and ADM mRNA expression in breast cancer

Group	N	ADM [n(%)]	$\chi^2$	P
ER				
Negative	7	4(57.1)	1.524	>0.05
Positive	25	20(80.0)		
PR				
Negative	2	1(50.0)	0.711	>0.05
Positive	30	23(76.6)		
C-erbB-2				
Negative	3	1(33.3)	3.065	>0.05
Positive	29	23(79.3)		

### 3 讨论

1996年Miller等<sup>[7]</sup>首次报道ADM是人肿瘤细胞的自分泌生长因子以来,越来越多的研究<sup>[8-9]</sup>证明ADM在许多肿瘤中表达增加,通过诸如产生增殖因子、抗凋亡能力、促血管生成、侵袭组织、无限复制的能力等作用来影响肿瘤的发生与发展。

前期研究应用流式细胞技术已发现乳腺癌组织中ADM蛋白的表达水平显著高于癌旁乳腺组织和乳腺纤维腺瘤,应用免疫组化方法发现ADM蛋白在乳腺癌组织中高表达,在乳腺腺病中低表达<sup>[10-11]</sup>。本组实验又发现在32例原发性乳腺癌组织中,ADM mRNA阳性表达率为75%,癌旁5cm乳腺组织未检测到ADM mRNA的阳性表达,两者比较差异有统计学意义( $P = 0.000$ )。从基因水平进一

步说明 ADM 与乳腺癌的发生发展有关联。

Hata 等<sup>[6]</sup>应用 RT-PCR 方法检测 60 例上皮性卵巢癌中 ADM mRNA 的表达,发现其表达水平与卵巢癌组织学分级呈显著正相关,肿瘤恶性程度越高,ADM mRNA 的表达越强,而且表达强者预后不良,手术完全切除后复发的病例 ADM mRNA 表达水平较无复发者要高。本组 RT-PCR 检测结果显示:乳腺癌组织中 ADM mRNA 的表达与肿瘤组织学分级有关( $P = 0.008$ ),组织学分化差的肿瘤 ADM mRNA 的阳性表达率高,分化 II 级(85.71%)和 III 级者(84.61%)明显高于 I 级者(20.0%)。此结果与 Hata 的研究结果类似,表明随着肿瘤恶性程度的增加,ADM 的表达水平增高,侵袭性强的乳腺癌组织 ADM mRNA 和蛋白均呈高表达,可能促进肿瘤分子生物学特性的改变,使肿瘤具有更高的侵袭与转移能力。

前期研究观察到,乳腺癌组织的 ADM 表达与腋窝淋巴结转移似乎有一定的联系,但是缺乏统计学资料证据<sup>[10-11]</sup>。而本次实验资料清楚地显示:乳腺癌组织的 ADM mRNA 阳性表达率与区域淋巴结转移情况有关,有腋窝淋巴结转移的乳腺癌组织 ADM mRNA 阳性表达率(90.0%,18/20)明显高于无淋巴结转移组(50.0%,6/12), $P = 0.030$ ,差异有统计学意义,表明 ADM 更多地表达在恶性程度高、侵袭性强和有区域淋巴结转移的乳腺癌。乳腺癌 ADM mRNA 表达有可能作为判断区域淋巴结转移状况的分子生物学指标。Oehler 等<sup>[12]</sup>的研究也显示腋窝淋巴结转移与肿瘤的 ADM 表达显著相关,提示 ADM 在乳腺癌淋巴结转移中可能有潜在的作用。

本次实验显示乳腺癌组织的 ADM mRNA 表达与肿瘤大小、TNM 分期、病理类型等临床生物学行为无关( $P > 0.05$ )。进一步分析可以看出:肿瘤  $\leq 2$  cm 组 ADM mRNA 阳性表达率为 33.3%,而  $2$  cm  $<$  肿瘤  $\leq 5$  cm 组和肿瘤  $> 5$  cm 组的 ADM mRNA 表达率分别为 76.2% 与 87.5%,结果显示出一定的趋势,即随着肿瘤增大 ADM mRNA 表达率有所增加,但可能病例较少而无法得出有统计学意义的结果。另外,乳腺癌组织 C-erbB-2 免疫组化阳性表达组的 ADM mRNA 表达率为 79.3%,而阴性组的 ADM mRNA 表达率为 33.3%,也显示乳腺癌的 ADM mRNA 表达与肿瘤的高侵袭性生物学指标之间可能有

一定联系,如加大样本量可能得出更确切的结论。

一般认为 ADM 作为一个血管生成因子和凋亡生存因子,可能存在着不同的作用机制,从而增加了乳腺癌患者肿瘤细胞的转移。以 ADM 为靶点可能成为一个新的治疗方向。

## [参考文献]

- [1] Idhah, A, Ducray F, Del Rio M S, *et al.* Therapeutic application of noncytotoxic molecular targeted therapy in gliomas: growth factor receptors and angiogenesis inhibitors [J]. *Oncologist*, 2008, 13(9): 978-992.
- [2] Ramachandran V, Arumngam T, Rosa FH, *et al.* Adrenomedullin is expressed in pancreatic cancer and stimulates cell proliferation and invasion in an autocrine manner via the adrenomedullin receptor, ADMR [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(6): 2666-2675.
- [3] Abasolo I, Montuenga LM, Calvo A. Adrenomedullin prevents apoptosis in prostate cancer cells [J]. *Regul Pept*, 2006, 133(1): 115-122.
- [4] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer [J]. *Cell*, 2000, 100(1): 57-70.
- [5] Yamamoto, H, Nagase T, Shindo T, *et al.* Adrenomedullin insufficiency increases allergen-induced airway hyperresponsiveness in mice [J]. *J Appl Physiol*, 2007, 102(6): 2361-2368.
- [6] Hata K, Takebayashi Y, Akiba S, *et al.* Expression of the adrenomedullin gene in epithelial ovarian cancer [J]. *Mol Hum Reprod*, 2000, 6(10): 867-872.
- [7] Miller MJ, Martinez A, Unsworth EJ, *et al.* Adrenomedullin expression in human tumor cell lines: its potential role as an autocrine growth factor [J]. *Biol Chem*, 1996, 271(38): 23345-23351.
- [8] Ouafik L, Sauze S, Boudouresque F, *et al.* Neutralization of adrenomedullin inhibits the growth of human glioblastoma cell lines *in vitro* and suppresses tumour xenograft growth *in vivo* [J]. *Am J Pathol*, 2002, 160(4): 1279-1292.
- [9] Guidolin D, Albertin G, Spinazzi R, *et al.* Adrenomedullin stimulates angiogenic response in cultured human vascular endothelial cells: involvement of the vascular endothelial growth factor receptor 2 [J]. *Peptides*, 2008, 29(11): 2013-2023.
- [10] 李海平,李云涛,陈丽芬,等.肾上腺髓质素在乳腺癌组织的表达及与临床病理特征的关系 [J]. *天津医药*, 2006, 34(4): 223-225.
- [11] 李海平,李勇,李云涛,等.乳腺癌组织及区域淋巴结 ADM 表达的研究 [J]. *中国肿瘤临床*, 2006, 33(13): 747-749.
- [12] Oehler MK, Fischer DC, Orłowska-Volk M, *et al.* Tissue and plasma expression of the angiogenic peptide adrenomedullin in breast cancer [J]. *Br J Cancer*, 2003, 89(10): 1927-1933.

[收稿日期] 2008-10-10

[修回日期] 2009-01-06

[本文编辑] 韩丹