

肿瘤特异性蛋白 70 用于乳腺肿瘤良恶性鉴别

浦 春^{1,2}, 秦明明², 刘 夏², 王文军³, 顾春荣¹, 徐 建¹, 王 悦¹, 刘京萍¹, 顾 敏¹, 朱娟娟¹, 潘世扬^{1*}

(¹南京医科大学第一附属医院检验学部, 江苏 南京 210029; ²皖南医学院第一附属医院检验科, ³病理科, 安徽 芜湖 241001)

[摘要] 目的:探讨肿瘤特异性蛋白 70(tumor specific protein 70, SP70)在乳腺肿瘤组织及血液中的表达情况及其对乳腺肿瘤良恶性鉴别的意义。方法:乳腺肿瘤患者 125 例(乳腺癌 65 例、良性病变 60 例),免疫组化法检测切片中 SP70 的表达。ELISA 检测 120 例乳腺肿瘤患者(58 例乳腺癌、62 例乳腺良性疾病)和 60 例健康体检者血清中 SP70 蛋白的水平。结果:SP70 在乳腺癌组织中的表达阳性率(55.38%)高于乳腺良性疾病(15.00%),差异有统计学意义($\chi^2=23.846, P<0.001$)。乳腺癌患者血清中 SP70 的水平显著高于乳腺良性疾病患者和健康对照,差异有统计学意义($F=11.884, P<0.001$)。SP70 在血清中的敏感性高于 CA153(53.45% vs. 44.82%),且血清中 SP70 和 CA153 的表达无显著相关性($r=0.132, P=0.324$),两者联合能够明显提高检测敏感性(84.38%)。结论:检测乳腺肿瘤组织和血液中 SP70 的表达对其良恶性的鉴别有重要临床价值。

[关键词] 肿瘤特异性蛋白 70; 乳腺肿瘤; 鉴别诊断

[中图分类号] R737.9

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)09-1177-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20170921

The application of tumor specific protein 70 on differentiation of benign and malignant breast tumor

Pu Chun^{1,2}, Qin Mingming², Liu Xia², Wang Wenjun³, Gu Chunrong¹, Xu Jian¹, Wang Yue¹, Liu Jingping¹, Gu Min¹, Zhu Juanjuan¹, Pan Shiyang^{1*}

(¹Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Laboratory Medicine, ³Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of tumor specific protein 70 (SP70) in breast cancer tissues and blood to evaluate whether SP70 could differentiate the benign breast tumor and malignant breast tumor. **Methods:** The SP70 expressions of paraffin sections in the tissues of 65 malignant breast tumors and 60 benign breast tumors were studied by immunohistochemistry(IHC) technique. The levels of SP70 in the serum of 58 malignant breast tumors, 62 benign breast tumors and 60 healthy subjects were studied by enzyme-linked immuno sorbent assay(ELISA). **Results:** The expression positive rate of SP70 was 55.38% in the tissues of malignant breast tumors, whereas, only 15.00% in benign breast tumors. The difference was statistically significant ($\chi^2=23.846, P<0.001$). The serum SP70 level of patients with malignant breast tumors was significantly higher than that in patients with benign breast tumors and healthy controls($F=11.884, P<0.001$). The sensitivity of serum SP70 for diagnosis of malignant breast tumors was significantly higher than that of serum CA153 (53.45% vs. 44.82%), a significant association between serum SP70 and serum CA153 had not been found ($r=0.132, P=0.324$). The combine of serum SP70 and serum CA153 could significantly improve the sensitivity (84.38%). **Conclusion:** SP70 may be used to differentiate diagnosis of malignant breast tumors and benign breast diseases.

[Key words] tumor specific protein 70; breast tumors; differential diagnosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(09): 1177-1181]

乳腺癌是女性最常见的肿瘤^[1],降低乳腺癌病死率的关键在于早期发现、早期诊断、早期治疗。有

研究表明,乳腺癌的影像检查,如 X 线、超声、核磁共振成像(nuclear magnetic resonance imaging, MRI)等有较高的敏感性,广泛应用于乳腺癌的临床诊断^[2-3],但有不宜筛查大规模人群、假阳性率高等缺点^[4]。特异性微小 RNA(micro RNA, miRNA)目前也用于乳腺癌的检测,但其临床应用有待进一步研究^[5];外周血肿瘤标志物如糖类抗原 153(carbohydrate

[基金项目] 国家自然科学基金(81672100);江苏省实验诊断学重点实验室,国家临床重点专科建设项目;江苏省卫生计生委科研课题(H201609)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: sypan@njmu.edu.cn

antigen 153, CA153)、癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)等作为临床常规的筛查指标,敏感度和特异性都较低。因此,发现一个能够早期、简单、准确鉴别诊断乳腺肿瘤良恶性的新指标十分重要。

肿瘤特异性蛋白70(tumor specific protein 70, SP70)是单克隆抗体 NJ001 识别的特异性抗原,前期工作表明在非小细胞肺癌组织上的表达率为80%~90%,并已经证实在肺癌、胰腺癌等多种肿瘤细胞中有该抗原的表达,而且初步验证在乳腺癌组织中也有表达^[6-8]。本研究旨在进一步探讨 SP70 在乳腺肿瘤组织和血清中的表达情况以及在乳腺良恶性肿瘤鉴别方面的临床意义。

1 对象与方法

1.1 对象

2015年10月—2017年1月,在皖南医学院第一附属医院确诊为乳腺癌的患者65例和诊断为乳腺良性疾病的患者60例,收集患者组织标本。60例乳腺良性疾病患者的平均年龄为(39.53±9.72)岁,其中包括50例腺病并纤维腺瘤、4例导管乳头状瘤,3例乳腺炎性病,3例乳腺囊性增生。65例乳腺癌患者的平均年龄为(55.06±11.80)岁,包括浸润性导管癌48例、导管内癌8例、黏液癌2例、浸润性乳头状癌2例、浸润性小叶癌1例、混合型癌4例。2016年9月—2017年2月,收集58例乳腺癌患者[平均年龄(52.66±9.13)岁]、62例乳腺良性疾病患者[平均年龄(42.65±12.17)岁]、60例健康体检者[平均年龄(48.15±7.68)岁]的血清标本,收集到血清标本后立即放入-80℃的冰箱中保存。所有患者均经术后病理检查确诊,且术前未接受放疗、化疗或其他治疗。

1.2 方法

1.2.1 实验方法

SP70 免疫组织化学染色方法:采用免疫组织化学染色。收集术后确诊患者的石蜡标本,进行切片、固定,顺序滴加单克隆抗体 NJ001(江苏科德生物医药科技有限公司)和酶标羊抗鼠 IgG(福州迈新生物技术开发公司),然后加 DAB 显色液(北京中杉金桥生物技术有限公司),镜下观察到阳性信号后,立即放入 PBS 缓冲液中终止显色;冲片,苏木素复染,再冲片,1%盐酸酒精分化,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,在光学显微镜下观察。在400倍高倍镜下计数200个肿瘤细胞中阳性细胞所占百分率,随机做5次。

血清 SP70 检测方法:把保存在-80℃冰箱中的

血清标本取出,室温复融,采用血清 SP70 检测试剂盒(江苏科德生物医药科技有限公司),用双抗体夹心 ELISA 法,严格按照仪器的操作规程和说明书进行操作,统一检测血清中 SP70 的水平(正常参考值范围是0~7.5 ng/mL)。

血清 CA153 检测方法:采用电化学发光法,仪器为罗氏 Cobas E602 全自动电化学发光免疫分析仪,检测试剂、校准品及质控品均为罗氏诊断公司生产的原装配套产品。按照说明书进行操作。

1.2.2 结果判断

免疫组织化学染色:SP70 抗原主要存在于组织细胞内及细胞膜上,阳性信号主要定位于胞浆,呈棕黄色颗粒。根据肿瘤细胞阳性反应百分率和染色程度进行综合评定和分析。阳性率计分标准:0分(阳性百分率0),1分(>0~33%),2分(>33%~66%),3分(>66%~100%);染色程度计分标准:0分(无染色),1分(浅黄色),2分(棕黄色),3分(棕褐色)。结果判断:(-)和(+)为阴性,(++)为低表达阳性,(+++为高表达阳性。

血清检测:根据检测试剂盒说明书,血清中 SP70 水平超过 7.5 ng/mL 为阳性。

1.3 统计学方法

采用 SPSS20.0 统计软件对资料进行分析。计量资料用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间结果比较采用方差分析;计数资料用率或百分比表示,结果比较采用卡方检验,或用 Fisher 精确概率法直接计算概率;检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

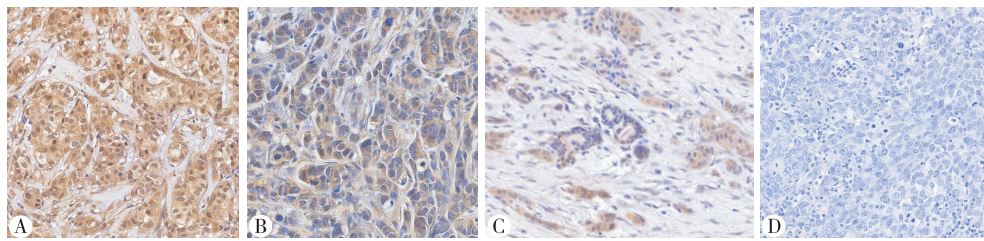
2 结果

2.1 SP70 在乳腺癌组织及乳腺良性疾病组织中的表达情况

SP70 的阳性表达为胞浆中出现棕黄色颗粒。SP70 在大部分乳腺良性疾病组织中低表达,以++为主;SP70 在乳腺癌组织表达以+++为主,出现较多棕黄色或棕褐色颗粒(图1)。SP70 在乳腺癌及乳腺良性疾病组织中的阳性率分别为75.38%和66.67%,差异无统计学意义($\chi^2=1.156, P=0.282$),但高表达阳性率为55.38%和15.00%,差异有统计学意义($\chi^2=23.846, P<0.001$,表1)。作为乳腺癌的肿瘤标志物,组织中 SP70 的敏感性、特异性、阳性预测值和阴性预测值分别为55.38%、68.97%、80.00%和55.56%。

2.2 SP70 表达与乳腺癌临床病理特征之间的相关性

SP70 的表达与乳腺癌患者的年龄、肿瘤直径、病理分级、淋巴结转移、以及免疫组化指标雌激素受



A,B,C 均为浸润性导管癌,D 为乳腺良性疾病。SP70 在 A、B、C、D 图中的表达情况分别为+++、++、+、-。

图 1 SP70 在乳腺肿瘤组织中的表达(免疫组织化学染色,×400)

Figure 1 SP70 expression in tissues of benign and malignant breast tumor(IHC, ×400)

表 1 SP70 在良恶性乳腺组织中的表达
Table 1 SP70 expression in tissues of benign and malignant breast tumor

组别	例数	SP70 表达			阳性率 (%)	高表达阳性率 (%)
		-或+	++	+++		
乳腺癌组	65	16	13	36	75.38	55.38
乳腺良性疾病组	60	20	31	9	66.67	15.00
χ^2 值					1.156	23.85
P 值					0.282	<0.001

体(estrogen receptor,ER)、孕激素受体(progesterone receptor,PR)、erb-b2 受体酪氨酸激酶 2 (erb-b2 receptor tyrosine kinase 2,C-erbB2)、Ki67 没有显著相关性(表 2)。

表 2 SP70 的表达与乳腺癌临床病理指征之间的相关性
Table 2 Correlations of SP70 expression with clinicopathological characteristics of breast cancer

病理参数	例数	SP70			阳性率(%)	χ^2 值	P 值
		-或+	++	+++			
年龄					2.572	0.276	
≤50 岁	27	4	12	11	40.74		
>50 岁	38	12	12	14	38.84		
肿瘤直径					2.091	0.351	
≤2 cm	20	4	10	6	30.00		
>2 cm	45	12	14	19	42.22		
病理分级					0.889	0.641	
I 或 II 级	46	12	18	16	34.78		
II~III 或 III 级	19	4	6	9	47.36		
淋巴结转移					-	0.238*	
是	6	1	1	4	66.67		
否	59	15	23	21	35.59		
ER					1.783	0.410	
阳性	45	9	17	19	42.22		
阴性	20	7	7	6	30.00		
PR					0.690	0.966	
阳性	39	10	14	15	38.46		
阴性	26	6	10	10	34.48		
C-erbB2					2.213	0.331	
阳性	37	11	11	15	40.54		
阴性	28	5	13	10	35.71		
Ki67 阳性率					2.061	0.357	
≤10%	17	3	5	9	52.94		
>10%	48	13	19	16	33.33		

*:表示采用 Fisher 确切概率法。

2.3 乳腺癌患者、乳腺良性疾病患者和健康对照组血清中 SP70 水平比较

乳腺癌患者术前血清中 SP70 的水平高于乳腺良性疾病与健康对照组, 差异有统计学意义 ($F=11.884, P<0.001$); 但乳腺良性疾病患者血清中 SP70 水平与健康对照组差异无统计学意义 ($P>0.05$, 表 3)。

表 3 乳腺癌、乳腺良性疾病患者以及健康体检者血清中 SP70 水平比较

Table 3 Comparison of serum SP70 levels in patients with breast cancer, benign diseases and healthy controls

组别	例数	SP70 (ng/mL)	SP70 阳性 ^a [n(%)]
乳腺癌组	58	9.55±7.40 [#]	31(53.45)
乳腺良性疾病组	62	6.67±3.13	14(22.58)
健康对照组	60	5.48±1.40	4(6.67)
F/χ^2 值		11.884	33.610
P 值		<0.001	<0.001

a: 检测结果>7.5 ng/mL 判断为阳性, 健康参考区间: 0~7.5 ng/mL。与乳腺良性疾病组相比, [#] $P<0.05$; 与健康对照组相比, [#] $P<0.001$ 。

2.4 血清中 SP70 与 CA153 联合与单一检测的比较

血清 SP70 的敏感性、特异性、阳性预测值和阴性预测值分别为 53.45%、77.42%、68.89% 和 64.00%; 敏感性高于 CA153 (44.82%), 特异性相近; 两者联合检测可明显提高敏感性 (84.38%, 表 4)。

表 4 血清 SP70、CA153 及其联合检测的诊断效能
Table 4 Diagnostic values of serum SP70, CA153 and their combination test

检测指标	阳性情况	敏感性 (%)	特异性 (%)
CA153	阳性	44.82	76.67
SP70	阳性	53.45	77.42
SP70+CA153	两者任一阳性	84.38	57.50

2.5 乳腺癌患者血清中 SP70 与 CA153 表达的相关性

Spearman 相关性分析, 乳腺癌患者血清中 SP70 与 CA153 的表达无显著相关 ($r=0.132, P=0.324$, 表 5), 说明两者的表达具有独立性, 联合检测对乳腺癌的诊断具有更大意义。

表 5 乳腺癌患者血清中 SP70 与 CA153 表达的相关性
Table 5 Correlation between the expression of SP70 and CA153 in serum of patients with breast cancer (n)

SP70	CA153	
	阳性	阴性
阳性	12	19
阴性	14	13

$r=0.132, P=0.324$ 。

3 讨论

NJ001 是一种能够与非小细胞肺癌等肿瘤抗原反应的单克隆抗体^[7]。因其特异性识别的靶抗原分子质量为 70 kDa, 被命名为 SP70。有研究表明, SP70 与胰腺癌、卵巢癌及非小细胞肺癌等肿瘤的发生、发展、预后密切相关, 有可能成为一种新的肿瘤诊断与治疗靶点^[6-10]。

乳腺癌是当今世界女性常见的恶性肿瘤之一, 近年来乳腺癌的发病率呈增加趋势, 患者的年龄也逐渐年轻化^[11]。然而乳腺癌是少数早期发现可以提高存活率的肿瘤之一^[12], 目前临床上有许多诊断方法和指标。影像学检查是临床常用方法^[13-14]; CA153 是目前临床常规筛查的肿瘤标志物, 但诊断乳腺癌的敏感性和特异性较低^[15]。影像学方法与肿瘤标志物联合应用有助于提高诊断率, 血液标志物检测更有利于乳腺癌的动态监测。

本研究结果显示, 乳腺癌组织中 SP70 高表达, 而乳腺良性病变组织主要以中低度表达为主。SP70 在乳腺癌组织中高表达阳性率达 55.38%, 高于乳腺良性疾病组织 (15.00%), 提示 SP70 的阳性表达程度与乳腺肿瘤的良恶性具有相关性。通过对 SP70 与临床病理特征联系的初步研究表明, SP70 的表达与乳腺癌患者的年龄、肿瘤直径、病理分级、淋巴结转移、以及免疫组化指标: ER、PR、C-erbB2、Ki67 均没有显著关系, 这提示 SP70 在乳腺癌中的表达具有独立性, 但有待于进一步扩大样本进行验证。

相关研究表明, SP70 存在于肺癌患者的血清和胸腔积液中^[8,16], 检测体液中的 SP70 对于恶性肿瘤的诊断具有较高价值。本研究对部分乳腺癌患者的血清标本进行 SP70 抗原的检测, 发现乳腺癌患者血清中 SP70 的含量显著升高, 大于乳腺良性疾病患者和健康对照; 乳腺良性疾病与健康对照的 SP70 含量无显著差异, 乳腺癌患者血清中 SP70 的表达阳性率 (53.45%) 也大于乳腺良性疾病者 (22.58%)。提示血清中 SP70 的升高对乳腺癌的诊断和乳腺良恶性肿瘤的鉴别诊断具有重要价值。通过对 SP70 和 CA153 在乳腺癌和乳腺良性疾病患者血清中表达情况的分析, 发现 SP70 的敏感性显著高于传统标志物 CA153, 且两者联合检测能够明显提高诊断敏感性。对血清中 SP70 表达与乳腺良恶性疾病关系的进一步研究, 有望给临床提供一个敏感度更高的新型肿瘤标志物。

本研究通过检测组织和血清中 SP70 的表达, 探

讨其对乳腺良恶性肿瘤鉴别诊断的意义。结果显示,组织中 SP70 的高表达在乳腺癌和乳腺良性疾病中有明显差异,乳腺癌患者血清 SP70 水平明显高于乳腺良性疾病患者,提示组织和血清中 SP70 的检测有助于乳腺癌良恶性的鉴别。

[参考文献]

[1] Siegel R, Ma JM, Zou ZH, et al. Cancer statistics, 2014 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64(1): 9-29

[2] Sardaneli F, Podo F, Santoro F, et al. Multicenter surveillance of women at high genetic breast cancer risk using mammography, ultrasonography, and contrast-enhanced magnetic resonance imaging (the high breast cancer risk Italian 1 study): final results [J]. *Invest Radiol*, 2011, 46(2): 94-105

[3] Nadler M, Al-Attar H, Warner E, et al. MRI surveillance for women with dense breasts and a previous breast cancer and/or high risk lesion [J]. *Breast*, 2017, 34: 77-82

[4] Marmot MG, Altman DG, Cameron DA, et al. The benefits and harms of breast cancer screening: an independent review [J]. *Br J Cancer*, 2013, 108: 2205-2240

[5] Hasanzadeh A, Mesrian Tanha H, Ghaedi K, et al. Aberrant expression of miR-9 in benign and malignant breast tumors [J]. *Mol Cell Probes*, 2016, 30(5): 279-284

[6] 韩 月,王 芳,徐 婷,等. NJ001 特异性抗原在肺癌中的表达及临床意义 [J]. *中华检验医学杂志*, 2013, 36(10): 895-898

[7] Pan SY, Wang F, Huang PJ, et al. The study on newly developed McAb NJ001 specific to non-small cell lung cancer and its biological characteristics [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33009

[8] 彭 雯,潘世扬,王 芳,等. 非小细胞肺癌患者血清中 SP70 的检测及其临床意义 [J]. *中华检验医学杂志*, 2012, 35(6): 554-558

[9] 吴 蕾,李大千,荆俊鹏,等. NJ001 特异性抗原在胰腺癌组织中表达的初步研究 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(8): 1127-1130

[10] 李月梅,荆俊鹏,吴 蕾,等. SP70 在卵巢癌组织中的表达及临床病理意义 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(1): 65-68

[11] Catsburg C, Miller AB, Rohan TE. Adherence to cancer prevention guidelines and risk of breast cancer [J]. *Int J Cancer*, 2014, 135(10): 2444-2452

[12] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12): 2893-2917

[13] Yip CH, Cazap E, Anderson BO, et al. Breast cancer management in middle-resource countries (MRCs): consensus statement from the Breast Health Global Initiative [J]. *Breast*, 2011, 20(Suppl 2): S12-19

[14] Dinkel HP, Trusen A, Gassel AM, et al. Predictive value of galactographic patterns for benign and malignant neoplasms of the breast in patients with nipple discharge [J]. *Br J Radiol*, 2000, 73(871): 706-714

[15] Zhang Y, Zhang K, Luo Z, et al. Circulating long non-coding HOX transcript antisense intergenic ribonucleic acid in plasma as a potential biomarker for diagnosis of breast cancer [J]. *Thorac Cancer*, 2016, 7(6): 627-632

[16] 杨瑞霞,潘世扬,王 芳,等. 良恶性胸腔积液鉴别中 SP70 检测的临床意义 [J]. *中华检验医学杂志*, 2012, 35(12): 1150-1154

[收稿日期] 2017-06-25

(上接第 1135 页)

IL-1 β in human macrophages through common signaling pathways [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33822

[20] Nguyen L, Kaushal N, Robson MJ, et al. Sigma receptors as potential therapeutic targets for neuroprotection [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 743: 42-47

[21] Ding F, Li Y, Hou X, et al. Oxymatrine inhibits microglia activation via HSP60-TLR4 signaling [J]. *Biomed Rep*, 2016, 5(5): 623-628

[22] Wu D, Zhang X, Zhao M, et al. The role of the TLR4/

NF- κ B signaling pathway in A β accumulation in primary hippocampal neurons [J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2015, 67(3): 319-328

[23] Vollmar P, Kullmann JS, Thilo B, et al. Active immunization with amyloid-beta 1-42 impairs memory performance through TLR2/4-dependent activation of the innate immune system [J]. *J Immunol*, 2010, 185(10): 6338-6347

[收稿日期] 2016-08-01