

- 15 王建平, 崔俊南, 陈仲庚, 等. 癌症患者生活质量状况及影响因素研究. 中国临床心理学杂志, 2000, 8(1): 23-26.
- 16 刘华, 王蔚, 王平根, 等. 非躯体因素对癌症患者生存质量的影响. 中国肿瘤, 2001, 10(2): 88-89.
- 17 Aarstad HJ, Aarstad AK, Birkhaug EJ, et al. The personality and quality of life in HNSCC patients following treatment. Eur J Cancer, 2003, 39(13): 1852-1860.
- (收稿日期: 2006-04-03 修回日期: 2006-05-08)

· 综述 ·

人乳腺珠蛋白与乳腺癌

郭建秀 刘秀娜综述 胡川闽审校

【摘要】 人乳腺珠蛋白(hMAM)是乳腺组织特异性表达的分泌性蛋白,目前被认为是一种具有临床应用前景的乳腺肿瘤标志物。现就 MAM 在乳腺癌肿瘤免疫治疗中的应用、作为乳腺癌肿瘤标志物的诊断现状和存在问题等方面探讨 MAM 在乳腺癌肿瘤疫苗的设计、诊断及转移检测的作用。

【关键词】 珠蛋白; 乳腺肿瘤; 免疫逃逸; 肿瘤标记, 生物学

【中图分类号】 R730.53; R737.9 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-422X(2006)11-0831-04

Human mamaglobin and mammary carcinoma GUO Jian-xiu. Department of Clinical Biochemistry, College of Laboratory Medicine, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

【Abstract】 Human mamaglobin (MAM), a secretory glycoprotein specifically expressed in mammary tissue, is considered as a promising marker for breast cancer in clinical research. This article reviews the effects and current status of this molecule in the immunotherapeutic vaccine design, diagnosis and metastasis monitoring of breast carcinoma and some conflicts in its application.

【Key words】 Globin; Mammary neoplasms; Escape of immune surveillance; Tumor markers, biology

1 乳腺珠蛋白的分子生物学特征

乳腺珠蛋白(mamaglobin, MAM)基因编码大约 10 000 的分泌性糖蛋白,在蛋白质一级结构上属于珠蛋白基因家族。尽管 MAM 主要表达在乳腺组织,但是 MAM 的细胞来源以及与乳腺癌发生的关系并不清楚。MAM 的表达也与乳腺癌的分期、病理分型以及激素水平没有明显相关性。20% 的乳腺癌 MAM 表达在不同期且不能用原位杂交的方法检出;40% 的乳腺癌在原位到浸润期 MAM 的变化不显著,40% 则呈显著增加。这种表达的复杂性可能与 MAM 的染色体定位有关。因为在乳腺癌中,染色体 11q13 区是常发生基因修饰的区域,11q13 的修饰可能导致 MAM 在正常乳腺组织与乳腺癌之间的差异表达。

MAM 在乳腺组织内与人亲脂素 B(Lipophilin B, BU101)以头尾连接形成共价复合物^[1,2]。BU101 在

大约 70% 乳腺癌组织中过表达,其表达及分布在 mRNA 和蛋白水平均与 MAM 呈正相关。MAM 与 BU101 形成的复合物是否与其受体或信号传导有关并不清楚,但共转染 MAM 与 BU101 基因能增加 MAM 与 BU101 的表达,说明形成复合物对 MAM 及 BU101 稳定性的重要性。MAM 与 BU101 复合物可分泌到血液中,在乳腺癌患者血液中可检出 BU101 的抗体^[3]。晚期乳腺癌患者血液中 BU101 抗体的滴度较高,在前列腺癌及卵巢癌患者也可检出低滴度的抗体,但肺癌及正常人均呈阴性。BU101 的基因多态性并不影响血液抗体的反应性。MAM 在乳腺组织中主要有 2 种形式,分子量分别为 18 000 和 25 000。O'Brien^[4]等用蛋白印迹方法研究了这 2 种形式 MAM 在乳腺癌、纤维腺瘤以及非乳腺组织中的表达,它们在乳腺癌的检出率明显高于纤维腺瘤。25 000 的 MAM 在激素受体阳性乳腺癌的表达及检出均高于激素受体阴性乳腺癌,并且与肿瘤分级及增生指数呈负相关。因而,该分子量的 MAM 可能有利于肿瘤的发展。二者区别并不明了也许是同源或异源复合物以

基金项目:重庆市科委自然科学基金资助项目(2004BA5017)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学检验医学系临床生化教研室(现工作单位:第三军医大学学报编辑部)

及糖基化的结果。

由于 MAM 等子宫珠蛋白基因家族成员具有相似蛋白质一级结构,都含有保守的分泌肽、都由上皮细胞分泌且由类固醇在转录水平调节,因而人们趋向称该家族为分泌性珠蛋白基因家族 (secretoglobulin gene family)^[5]。子宫珠蛋白具有抗炎反应;抑制中性粒细胞及单核细胞的趋化作用。子宫珠蛋白基因敲除的小鼠表现为肿瘤易感性及严重的 IgA 肾病^[6]。MAM 的生物学特点是转录调控主要发生在乳腺组织,而过度表达也发生在乳腺癌细胞;MAM 在乳腺细胞增生时合成增加,在细胞分化时合成停止,因而 MAM 可能参与了乳腺细胞的增生过程。

2 MAM 与乳腺癌肿瘤免疫

自从发现 MAM 在乳腺癌细胞特异性表达后, MAM 被认为是乳腺癌的相关基因及肿瘤相关抗原,以 MAM 为目标的肿瘤细胞免疫治疗及肿瘤疫苗是 MAM 研究的新方向。

机体对肿瘤细胞的监控主要通过细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocytes, CTL) 实现。其中,重要的是含有 CD8 糖蛋白的 T 淋巴细胞。CD8⁺ T 淋巴细胞识别并结合主要组织相容性复合物,此复合物在人类细胞中表现为人类白细胞抗原 (human leucocyte antigen, HLA)。主要组织相容性复合物、HLA 被称为抗原提呈分子,能够与肿瘤相关抗原中的 9~10 个氨基酸的多肽片段结合,将含有肿瘤相关抗原的肿瘤细胞“提呈”给 CTL-CD8⁺ T 淋巴细胞继而诱导其对肿瘤细胞的免疫杀伤作用。

Jaramillo 等^[7]首先分析了乳腺癌患者外周血淋巴细胞,与正常人相比乳腺癌患者含有非常高的 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 淋巴细胞。利用生物信息学方法,他们分析了 MAM 不同结构片段与 HLA-A3 提呈分子的结合作用,并按结合作用大小筛选了 8 个多肽片段。体外 T 淋巴细胞毒性试验证明来源于乳腺癌患者的 CD8⁺ T 淋巴细胞与其中的 4 种 MAM 多肽反应,分别为 PLEENVICK、KLLMVLMLA、TTNAIDELK、AIDELKECF。另外,以 HLA-0301 分子为基础在体外建立了对 MAM 特异的 CD8⁺ T 淋巴细胞系,该 CTL 细胞仅对表达 MAM 的乳腺癌细胞有杀伤作用,对 MAM 阴性细胞没有作用。

Tanaka 等^[8]则以 HLA-A2 为提呈分子,分析了 7 种 MAM 多肽片段诱导 CD8⁺ T 淋巴细胞的能力,发现只有其中的 2 种能够诱导 T 细胞,而且仅 FMQLIYDSSL 片段诱导的 T 细胞对乳腺癌细胞具有识别作用。在另一研究中^[9]同样以 HLA-A2 为提呈分子,发现 7 种 MAM 多肽片段中有 5 种能与乳腺癌

患者 CD8⁺ CTL T 淋巴细胞反应,分别为 LIYDSSL-CDL、KLLMVLMLA、LMVLMLAAL、FLNQTDETL、TIN-PDVSKT。其中 KLLMVLMLA 与 80% 的健康人 CD8⁺ T 淋巴细胞反应。在转基因动物模型中,LIYDSSL-CDL 的 DNA 疫苗不仅能够显著诱导 CD8⁺ CTL 细胞而且对 MAM 阳性乳腺癌细胞具有识别作用。有意义的是将体外培养的 MAM 诱导的 CD8⁺ CTL 细胞输入动物模型后,接种的乳腺肿瘤明显缩小^[10]。

同样是以 MAM 分子片段为抗原,但诱导 CD8⁺ CTL 细胞的效果却差别较大。原因可能与 HLA 提呈分子亚型有关外, MAM 在体内的稳定性及与类固醇激素诱导的 MAM 表达水平也有关系。由于患者个体之间的差异,多种 MAM 表型的相关多肽疫苗比单纯一种在诱导 CD8⁺ CTL 杀伤作用上更有效。

3 MAM 作为乳腺癌肿瘤标志物的诊断价值

目前乳腺癌诊断所参考的肿瘤标志物如癌胚抗原等因缺乏特异性而价值有限。Goedegebuure 等^[11]从各种不同组织制备了 mRNA,并以 MAM 探针检测 MAM 的组织表达,结果发现 MAM 仅在乳腺组织中表达;以抗 MAM 抗体对 100 例原发性乳腺癌进行的免疫组织化学分析证明 80% 的腺管型乳腺癌 MAM 呈阳性反应, MAM 的表达与癌细胞分化没有关系。MAM 表达在肺癌、前列腺癌、结肠癌以及卵巢癌等呈阴性,仅在宫颈癌中有少数阳性反应 (6%)。MAM 的组织特异性表达以及分泌性蛋白的特点使其在乳腺癌临床诊断上具有潜在的应用价值。

3.1 乳腺癌组织 MAM 免疫组织化学分析

Watson 等以 MAM 蛋白羧基端 16 个氨基酸的片段 (EVFMQLIYDSSLCDLF) 制备了多克隆抗体,在 100 例乳腺癌组织中 81% 呈 MAM 阳性,分布特点是细胞质呈弥散性强染色,而且染色强弱与肿瘤分期及组织类型无关;正常乳腺组织中,10% 呈点状分散弱染色。

3.2 乳腺癌组织及转移淋巴结原位杂交、逆转录-聚合酶链反应分析

RNA 印迹对原发乳腺癌的检出率为 23%,原位杂交的检出率为 77%,原位杂交对转移淋巴结的检出率为 77%;而逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 对原发乳腺癌的检出率为 80%,对转移淋巴结的检出率是 100%。

3.3 外周血脱落乳腺癌细胞的 RT-PCR 检测

用巢式 RT-PCR 方法对脱落细胞 MAM mRNA 的检测发现^[12],43% 发生乳腺癌转移的患者外周血可检出 MAM,术前为 4%,术后为 8%,I~III 期患者阳性率为 3%。外周血脱落细胞的 MAM RT-PCR 分

析可以及早发现乳腺癌转移和复发。

3.4 外周血脱落乳腺癌细胞的实时定量 PCR 检测

实时定量 PCR 的敏感性很高,可以检出每 ml 外周血中 5 个以上的脱落乳腺癌细胞。Chen^[13] 等对 102 例乳腺癌患者外周血脱落细胞同时分析与乳腺癌相关的标志物细胞角蛋白 19、癌胚抗原、c-Met、her2 以及 MAM 5 种标志物的符合检出率为 80.6%, 特异性为 83.8%。该方法极大地提高了乳腺癌的检出率。

3.5 外周血 MAM 的酶联免疫测定

Fanger 等^[14] 以抗 MAM 单克隆抗体为基础建立了 MAM 的酶联免疫吸附试验(ELISA)方法,正常人 MAM 的范围是(0.04 ± 0.02) ng/ml,而乳腺癌患者的 MAM 值为(1.61 ± 0.30) ng/ml。该方法对乳腺癌的检出率大约为 50%。抗 MAM 抗体在乳腺癌组织中的检出率为 80%。ELISA 方法检出率低的原因可能与 MAM 是以异源二聚体存在有关,同时测定 MAM 与 BU101 可能会提高 ELISA 方法的敏感性和乳腺癌的检出。由于异源二聚体以复合物存在,因而建立以该复合物为基础的 ELISA 方法对 MAM 的检测有改善^[15]。

4 关于 MAM 在乳腺癌及其转移检测作用的争论

Span 等^[16] 研究 280 例原发乳腺癌组织 MAM 的 mRNA 表达情况,认为 6.8% 的乳腺癌组织呈 MAM 阴性,MAM 表达水平的差异在乳腺癌组织很大;以 EVFMQLIYDSSLCDLF 的 MAM 片段产生的抗体进行的免疫组织化学研究显示 MAM 表达与其 mRNA 表达不一致。MAM mRNA 的高表达发生在雌激素、孕激素受体阳性乳腺癌;MAM mRNA 的高表达也发生在高龄、绝经后的乳腺癌患者;而且 I 期及 II 期乳腺癌 MAM 的表达也高于 III 期乳腺癌组织;同时,接受三苯氧胺辅助治疗的乳腺癌患者高表达 MAM 预示着较长的存活期,这与其他研究结果正相反^[12]。普遍认为 MAM 是子宫珠蛋白的成员,其表达也受类固醇激素的调节^[5]。Span 等^[16] 发现 MAM 的高表达却发生在高龄、绝经后乳腺癌患者,似乎不支持 MAM 受类固醇激素调节的观点。研究发现在 MAM 基因的启动子内含有类固醇激素的反应组件,但是并没有发现激素对 MAM 转录的调节作用。

由于 Span 发现 MAM 在雌激素受体阳性乳腺癌高于雌激素受体阴性乳腺癌,因此对外周血脱落细胞的 MAM 检测可能会遗漏雌激素受体阴性乳腺癌。Span 等^[16-18] 认为 MAM 表达在乳腺癌较大差异使其不适合作为一个循环肿瘤细胞的标志物。但是,作为乳腺癌的特异蛋白,MAM 在指导乳腺癌患者个体化

治疗上有积极作用。Zach 等^[19] 则认为 MAM 在肿瘤组织的高表达对预后的作用并不能否认 MAM 仍是乳腺癌脱落细胞的最佳标志物,而且采用巢式 RT-PCR 方法也可以提高 MAM 的检出率。但 Span 等^[18] 对巢式 RT-PCR 的结果并不那么相信并对 Mikhitarian 等^[20] 的论文质疑。Mikhitarian 在“作者答复”中回答 Span 等^[18] 时指出,雌激素受体阳性乳腺癌患者腋下淋巴结 MAM 的检出率为 80%,雌激素受体阴性乳腺癌患者腋下淋巴结检出率为 72%。因此认为,MAM 在雌激素受体阳性乳腺癌高表达,在雌激素受体阴性乳腺癌仍是理想的标志物。

5 结语

MAM 被认为是乳腺癌的相关基因及肿瘤相关抗原,可作为肿瘤细胞免疫治疗及肿瘤疫苗设计的靶点;它在乳腺组织特异性表达和分泌性蛋白的特点使其在乳腺癌临床诊断上具有潜在的应用价值,这两方面的研究结果都存在不同实验室结果不一致的问题。这可能与目前人们对 MAM 的组织来源、生物学功能以及是否存在不同的异构体等方面还不清楚有关,需要进一步研究。总而言之,MAM 在乳腺癌中特异性高表达是不争的事实,在乳腺癌的诊断治疗中必将发挥重要作用。

参 考 文 献

- Colpitts TL, Billing Medel P, Friedman P, et al. Mammaglobin is found in breast tissue as a complex with BU101. *Biochemistry*, 2001, 40 (37): 11048-11059.
- Carter D, Douglass JF, Cornelson CD, et al. Purification and characterization of the mammaglobin/lipophilin B complex, a promising diagnostic marker for breast cancer. *Biochemistry*, 2002, 41 (21): 6714-6722.
- Carter D, Dillon DC, Reynolds LD, et al. Serum antibodies to lipophilin B detected in late stage breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(2): 749-754.
- O'Brien NA, O'Donovan N, Ryan B, et al. Mammaglobin A in breast cancer: existence of multiple molecular forms. *Int J Cancer*, 2005, 114 (4): 623-627.
- Klug J, Beier HM, Bernard A, et al. Uteroglobins/Clara cell 10-kDa family of protein; nomenclature committee report. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 923: 348-354.
- Kundu GC, Zhang Z, Mantile Selvaggi G, et al. Uteroglobins binding proteins; regulation of cellular motility and invasion in normal and cancer cells. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 923: 234-248.
- Jaramillo A, Majumder K, Manna PP, et al. Identification of HLA-A3-restricted CD8⁺ T cell epitopes derived from mammaglobin-A, a tumor-associated antigen of human breast cancer. *Int J Cancer*, 2002, 102 (5): 499-506.
- Tanaka Y, Amos KD, Fleming TP, et al. Mammaglobin-A is a tumor-associated antigen in human breast carcinoma. *Surgery*, 2003, 133(1):

- 74-80.
- 9 Jaramillo A, Narayanan K, Campbell LG, et al. Recognition of HLA-A2-restricted mammaglobin-A-derived epitopes by CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes from breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 2004, 88(1):29-41.
 - 10 Narayanan K, Jaramillo A, Benshoff ND, et al. Response of established human breast tumor to vaccination with mammaglobin-A cDNA. *J Natl Cancer Inst*, 2004, 96(18):1388-1396.
 - 11 Goedegebuure PS, Watson MA, Viehl CT, et al. Mammaglobin-based strategies for treatment of breast cancer. *Curr Cancer Drug Targets*, 2004, 4(6):531-542.
 - 12 Zach O, Kasparu H, Wagner H, et al. Mammaglobin as a marker for the detection of tumor cells in the peripheral blood of breast cancer patients. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 923:343-345.
 - 13 Chen CC, Hou MF, Wang JY, et al. Simultaneous detection of multiple mRNA markers CK19, CEA, c-Met, Her2/neu and hMAM with membrane array, an innovative technique with a great potential for breast cancer diagnosis. *Cancer Lett*, 2005, 240(2):279-288.
 - 14 Fanger GR, Houghton RL, Retter MW, et al. Detection of mammaglobin in the sera of patients with breast cancer. *Tumour Biol*, 2002, 23(4):212-221.
 - 15 Zehentner BK, Persing DH, Deme A, et al. Mammaglobin as a novel breast cancer biomarker; multigene reverse transcription-PCR assay and sandwich ELISA. *Clin Chem*, 2004, 50(11):2069-2076.
 - 16 Span PN, Wamnders E, Manders P, et al. Mammaglobin is associated with low-grade, steroid receptor-positive breast tumors from postmenopausal patients, and has independent prognostic value for relaps-free survival time. *J Clin Oncol*, 2004, 22(4):691-698.
 - 17 Span PN, Grebenchtchikov NI, Geurts-Moespot A, et al. Concern about Mammaglobin assay. *Clin Chem*, 2005, 51(2):474-475.
 - 18 Span PN, Sweep FC. Mammaglobin as molecular marker of breast cancer micrometastases. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(19 Pt 1):7043.
 - 19 Zach O, Lutz D. Mammaglobin remains a useful marker for the detection of breast cancer cells in peripheral blood. *J Clin Oncol*, 2005, 23(13):3160-3161.
 - 20 Mikhitarian K, Gillanders WE, Almeida JS, et al. An innovative microarray strategy identifies informative markers for the detection of micrometastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(10):3697-3704.

(收稿日期:2006-04-19 修回日期:2006-06-20)

· 消息 ·

《中国肿瘤生物治疗杂志》2007 年度征订启事

《中国肿瘤生物治疗杂志》是由中国免疫学会和中国抗癌协会联合主办的国家级医学学术期刊(刊号为 CN31—1725/R), 双月刊。本刊为中国科技论文统计源期刊、医学核心期刊, 已被《中国科技论文与引文数据库》、《中国科学引文数据库》、《中国学术期刊综合评价数据库》、《中文生物医学期刊文献数据库》、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国学术期刊文摘》、《中国医学文摘》及美国《化学文献》(CA)等国内外多数权威数据库和文摘刊物收录。

本刊为中国肿瘤生物治疗领域唯一的高级学术刊物, 重点报道我国肿瘤生物治疗方面基础理论与临床的最新研究成果、新实验技术及其学术进展, 宣传我国肿瘤生物治疗的政策和发展策略。主要栏目有述评、专家论坛、论著、研究快报、学术争鸣、技术方法、文献综述、专题讲座、科技动态等。以肿瘤防治专业的中高级临床和科研工作者、医药院校师生及其他相关学科的科技人员为读者对象。

《中国肿瘤生物治疗杂志》每期定价 8.00 元, 全年定价 48.00 元, 邮发代号:4-576, 请通过邮局订阅。若错过, 可从本刊编辑部补订, 请将 48.00 元(优惠免邮资)寄本刊编辑部, 并注明详细通讯地址及邮政编码, 编辑部将负责如期寄至您的手中。

联系地址:上海市翔殷路 800 号第二军医大学免疫楼

《中国肿瘤生物治疗杂志》编辑部

联系人:王莹, 韩丹

邮政编码:200433, 联系电话:021-55620605 × 22, 021-25070316 × 22, 传真:021-25074547, <http://www.biother.org>, E-mail:cjcb@biother.org