

乳腺癌患者血清脂质运载蛋白-2 和基质金属蛋白酶-9的表达及临床意义*

张 萍,任世云,张 雷 (长白山保护开发区中心医院检验科,吉林长白山 133613)

摘要:目的 探讨血清脂质运载蛋白-2(LCN-2)和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)在乳腺癌中的表达及临床意义。方法 应用酶联免疫吸附法(ELISA)检测 96 例乳腺癌患者血清 LCN-2 和 MMP-9 的表达水平,并与 42 例乳腺良性病变患者和 27 例健康对照者比较,分析其与肿瘤大小、TNM 分期、分化程度、淋巴结转移以及 ER、PR 表达的关系。结果 乳腺癌患者血清 LCN-2 表达量为 89.76 ± 28.38 ng/ml,明显高于乳腺良性病变组的 56.44 ± 21.15 ng/ml 和健康对照组的 44.32 ± 16.84 ng/ml,差异均具有统计学意义($P < 0.05$),而乳腺良性病变组与健康对照组无明显差异($P > 0.05$)。乳腺癌患者血清 MMP-9 的表达量为 96.34 ± 23.26 ng/ml,明显高于乳腺良性病变组的 28.16 ± 11.57 ng/ml 和健康对照组的 23.54 ± 13.61 ng/ml,差异均具有统计学意义($P < 0.05$),而乳腺良性病变组与健康对照组无明显差异($P > 0.05$);相关分析显示,乳腺癌患者血清 LCN-2 和 MMP-9 水平之间呈正相关($r = 0.5135$, $P < 0.05$)。乳腺癌患者血清 LCN-2 和 MMP-9 的表达水平与肿瘤大小、淋巴结转移情况、ER 和 PR 表达、TNM 分期明显相关($P < 0.05$);但与肿瘤分化程度无明显相关性($P > 0.05$)。结论 LCN-2 和 MMP-9 可能在乳腺癌的发生、发展中起着重要作用,两者联合检测对于乳腺癌的辅助诊断、疗效监测及预后判断具有一定的临床意义。

关键词:乳腺癌;脂质运载蛋白-2;基质金属蛋白酶-9;淋巴结转移

中图分类号:R737.9;R730.43 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2015)01-072-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2015.01.019

Expression and Clinical Significance of Serum LCN-2 and MMP-9 in Patients with Breast Cancer

ZHANG Ping, REN Shi-yun, ZHANG Lei (Department of Clinical Laboratory,
Center Hospital of Changbaishan Protection Zones, Jilin Changbaishan 133613, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the expression and its clinical significance of serum LCN-2 and MMP-9 in human breast cancer. **Methods** 96 patients with breast cancer, 42 patients with benign breast diseases and 27 healthy controls were recruited in this study. The LCN-2 and MMP-9 levels were measured by ELISA in the serum of 96 patients with breast cancer, 42 patients with benign breast disease, and 27 healthy controls. **Results** The level of serum LCN-2 in the breast cancer group (89.76 ± 28.38 ng/ml) was significantly higher than those in benign breast diseases (56.44 ± 21.15 ng/ml) and healthy controls (44.32 ± 16.84 ng/ml) ($P < 0.05$). The level of serum MMP-9 in the breast cancer group (96.34 ± 23.26 ng/ml) was significantly higher than those in benign breast diseases (28.16 ± 11.57 ng/ml) and healthy controls (23.54 ± 13.61 ng/ml) ($P < 0.05$). No obvious difference in the levels of serum LCN-2 and MMP-9 was observed between benign breast disease and healthy controls ($P > 0.05$). Correlation analysis showed that a positive correlation was found between the levels of serum LCN-2 and MMP-9 in breast cancer patients ($r = 0.5135$, $P < 0.05$). The levels of serum LCN-2 and MMP-9 were significantly associated with tumor size, lymph node metastasis, the expression of ER and PR, TNM stage, but were not associated with tumor differentiation ($P > 0.05$). The correlation analysis showed that the LCN-2 level was positive correlated with the MMP-9 level ($P < 0.05$). **Conclusion** LCN-2 and MMP-9 could play a role in the tumorigenesis and development of breast cancer. Measuring of serum LCN-2 and MMP-9 may be a useful tool for diagnosis, effect monitoring and prognosis in breast cancer.

Keywords: breast cancer; lipocalin-2; matrix metalloproteinase-9; lymph node metastasis

乳腺癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一,乳腺癌细胞的侵袭和转移是导致患者死亡的主要原因,但乳腺癌的发病机制尚不清楚^[1]。脂质运载蛋白-2(lipocalin-2, LCN-2)是新发现的脂肪细胞因子,是脂质运载蛋白家族的 2 号成员。研究表明,LCN-2 与肺癌等恶性肿瘤的发生密切相关^[2,3]。基质金属

蛋白酶-9(MMP-9)在肿瘤侵袭转移中发挥重要作用,多种恶性肿瘤外周血 MMP-9 水平与肿瘤生物学行为关系密切^[4]。本研究通过联合检测乳腺癌患者血清中 LCN-2 和 MMP-9 表达的变化及两者的相关性,探讨其在乳腺癌中的作用及临床意义。

1 材料与方法

* 作者简介:张 萍(1974-),女,大专,主管检验师,研究方向:临床检验及肿瘤研究,E-mail:zhping1974@yeah.net。

1.1 材料 选取2010年5月~2014年4月在长白山保护开发区中心医院收治的临床诊断为乳腺癌的患者138例,年龄29~77岁,平均年龄61岁,其中:乳腺癌良性病变组42例;乳腺癌组96例,有淋巴结转移者25例,无淋巴结转移者71例。选取27例健康体检合格者作为对照组,年龄30~67岁,平均年龄53岁。术前未接受放、化疗,术后经病理学确诊其病理类型、有无淋巴转移,病理分期等。所有受试者均签署知情同意书并经过我院医学伦理委员会批准。

1.2 方法 血清标本采集及处理:分别于入院次日清晨空腹采集所有实验对象的外周静脉血5 ml,室温放置30 min后,于离心机上以 $2\,500\times g$ 离心10 min,收集血清, -80°C 冰箱保存备用。采用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)定量检测所有受试者血清 LCN-2 和 MMP-9 的表达水平,LCN-2 检测试剂盒购于 R&D 公司,MMP-9 检测试剂盒购于深圳晶美生物技术有限公司,实验方法和操作均严格按试剂盒说明书进行,根据标准曲线计算 LCN-2 与 MMP-9 表达量,所有样品设立复孔。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 15.0 统计软件进行处理,所有数据均用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,采用 Spearman 分析 LCN-2 和 MMP-9 的相关性, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌患者血清 LCN-2, MMP-9 表达水平

见表1。乳腺癌患者血清 LCN-2 的表达水平明显高于正常对照组及良性病变组,差异有统计学意义($t=9.35, P<0.05$; $t=7.68, P<0.05$)。乳腺癌患者血清中 MMP-9 的表达水平明显高于正常对照组及良性病变组,差异有统计学意义($t=11.24, P<0.05$; $t=8.53, P<0.05$); LCN-2, MMP-9 在良性病变组与正常对照组表达无明显变化,差异无统计学意义($t=2.32, P>0.05$)。

表1 乳腺癌患者血清 LCN-2, MMP-9 含量($\bar{x}\pm s, \text{ng/ml}$)

| 组别 | <i>n</i> | LCN-2 | MMP-9 |
|----------|----------|--------------------|--------------------|
| 健康对照组 | 27 | 44.32 \pm 16.84 | 23.54 \pm 13.61 |
| 乳腺癌良性病变组 | 42 | 56.44 \pm 21.15 | 28.16 \pm 11.57 |
| 乳腺癌组 | 96 | 94.76 \pm 28.38* | 96.34 \pm 23.26* |

2.2 乳腺癌患者血清中 LCN-2 和 MMP-9 含量与临床病理特征的关系 见表2。乳腺癌患者血清中 LCN-2 和 MMP-9 的表达与肿瘤大小、ER 和 PR 阳性表达、TNM 分期、淋巴结转移情况均明显相关,差异均具有统计学意义($P<0.05$),而 LCN-2 和 MMP-9 与分化程度无明显相关,差异无统计学意义($P>0.05$)。

表2 乳腺癌患者血清中 LCN-2, MMP-9 的表达水平与临床病理特征的关系($\bar{x}\pm s, \text{ng/ml}$)

| 参数 | <i>n</i> | LCN-2 | MMP-9 |
|-------------|----------|---------------------|---------------------|
| 肿瘤大小 <2 cm | 32 | 68.52 \pm 25.48 | 79.41 \pm 27.65 |
| ≥ 2 cm | 64 | 127.54 \pm 48.32* | 143.78 \pm 44.57* |
| 淋巴结转移 无 | 39 | 67.52 \pm 31.24 | 52.64 \pm 19.44 |
| 有 | 57 | 97.76 \pm 29.76* | 114.32 \pm 31.56* |
| ER 阳性 | 70 | 95.16 \pm 42.33 | 124.14 \pm 21.21 |
| 阴性 | 26 | 81.61 \pm 31.85* | 94.84 \pm 38.34* |
| PR 阳性 | 58 | 99.06 \pm 28.43 | 107.22 \pm 33.59 |
| 阴性 | 38 | 77.45 \pm 17.57* | 84.74 \pm 24.55* |
| 分化程度 低分化 | 16 | 107.35 \pm 47.57 | 93.83 \pm 36.35 |
| 中分化 | 43 | 93.3 \pm 36.15 | 85.65 \pm 31.52 |
| 高分化 | 37 | 97.35 \pm 47.57 | 80.81 \pm 28.46 |
| TNM 分期 I-II | 65 | 73.38 \pm 16.15 | 87.22 \pm 27.54 |
| III-IV | 41 | 136.38 \pm 36.12* | 154.74 \pm 44.65* |

注: * $P<0.05$ 。

2.3 LCN-2 与 MMP-9 在乳腺癌患者血清中的相关性 Spearman 相关性分析表明,乳腺癌患者血清中 LCN-2 与 MMP-9 的表达呈正相关($r=0.5135, P<0.05$)。

3 讨论 乳腺癌是女性肿瘤中的一种多发病,其死亡率高,但发病机制尚不明确,对该病的早期诊断、检测及干预具有非常重要的意义^[1]。LCN-2 是人类的一种新癌基因,是 Kjeldsen 等^[2,3]在1993年发现的,研究发现在许多肿瘤中表达上调,推测其在肿瘤的发生发展中有重要功能。有研究表明 LCN-2 的表达与乳腺癌细胞的淋巴结转移、组织学分级、HER-2/neu 过表达以及类固醇激素受体等相关,还与 Ki67 呈正相关^[5]。在乳腺癌中过表达 LCN-2 可促进肿瘤的浸润与转移,沉默 LCN-2 基因可抑制乳腺癌的发生、肿瘤的增殖,且能阻止肿瘤细胞的转移;LCN-2 还能通过调节 vimentin/fibronectin 和 E-cadherin 的表达,诱导 EMT(epithelial to mesenchymal transition)发生,促进乳腺癌细胞侵袭及转移^[3,6]。对于乳腺癌血清中 LCN-2 的研究报道较少,Sung 等^[7]报道过在乳腺癌血清中 LCN-2 表达水平显著升高,且与乳腺癌患者生存期相关。

基质金属蛋白酶-9(MMP-9)是基质金属蛋白酶家族的一员,可使基底膜和细胞外基质发生降解,打破基底膜屏障,促进了癌细胞对周围组织浸润和转移,与肿瘤的发生发展关系密切^[4]。在正常成年人体内,MMP-9 的表达水平较低。当受到致癌因子刺激时,肿瘤细胞和癌旁间质细胞能够大量分泌 MMP-9 蛋白进入血液,通过测定外周血中的 MMP-9 浓度可了解肿瘤发展情况^[8]。Talvensaari-Mattila 和 Susskind 等^[9,10]认为检测血清中

MMP-9 浓度可以作为乳腺癌辅助鉴别诊断的一项提示性指标。

本研究采用 ELISA 对 96 例乳腺癌患者、42 例乳腺良性病变患者及 27 例健康人的血清中 LCN-2 和 MMP-9 蛋白的表达水平进行了分析,结果显示乳腺癌患者血清 LCN-2 和 MMP-9 的含量明显高于乳腺良性病变组和健康对照组 ($P < 0.05$),乳腺癌血清中 LCN-2, MMP-9 的阳性表达率明显高于良性病变组和正常对照组 ($P < 0.05$),结果提示乳腺癌患者血清中的 LCN-2 和 MMP-9 蛋白表达可能与乳腺癌发生、发展相关。进一步研究血清中 LCN-2 及 MMP-9 蛋白与临床病理特征的关系,得出 LCN-2 和 MMP-9 蛋白的表达与肿瘤大小、淋巴结转移、ER 及 PR 的阳性表达、TNM 分期相关,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而与肿瘤分化程度无明显相关性,差异无统计学意义。提示血清 LCN-2, MMP-9 表达水平不仅与乳腺癌发生密切相关,而且在乳腺癌的侵袭及转移中可能起着重要作用。

本研究中相关性分析发现,乳腺癌患者血清 LCN-2 水平与 MMP-9 水平之间呈显著正相关 ($P < 0.05$)。LCN-2 和 MMP-9 含量的增加可能是乳腺癌发生、发展及转移的重要因素之一,共同参与了乳腺癌的病理生理进程。体外研究发现,乳腺癌细胞过表达 LCN-2,能够降低 MMP-9 降解速度,证实了 LCN-2 对 MMP-9 有剂量依赖保护作用^[11]。LCN-2 可通过与 MMP-9 形成复合物,稳定 MMP-9 活性,减少其降解,促进癌细胞的浸润,且 NGAL/MMP-9 复合物高表达组患者的预后较差,总生存率较低表达组明显降低^[12,13]。Fernandez 等^[14]研究发现 LCN-2 可能通过保护并调节 MMP-9 的表达及活性而促进肿瘤生长和转移。这些结果与本研究结果一致,都显示 LCN-2 与 MMP-9 密切相关,且与癌症的发生发展相关。

因此,联合检测血清中 LCN-2 和 MMP-9 的水平,有助于乳腺癌的辅助诊断,对患者预后判断亦具有重要的价值,可能为乳腺癌的诊治提供了潜在的治疗靶点。

参考文献:

- [1] Scully OJ, Bay BH, Yip G, et al. Breast cancer metastasis[J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2012, 9(5): 311-320.
- [2] Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengelov H, et al. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase[J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(14): 10425-10432.
- [3] Yang J, Bielenberg DR, Rodig SJ, et al. Lipocalin 2 promotes breast cancer progression[J]. *Proc Natl*

Acad Sci USA, 2009, 106(10): 3913-3918.

- [4] Zheng L, Zhang YM, Zhan YZ, et al. Momordica cochinchinensis seed extracts suppress migration and invasion of human breast cancer ZR-75-30 cells via down-regulating MMP-2 and MMP-9[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(3): 1105-1110.
- [5] Bauer M, Eickhoff JC, Gould MN, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is a predictor of poor prognosis in human primary breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2008, 108(3): 389-397.
- [6] Berger T, Cheung CC, Elia AJ, et al. Disruption of the lcn 2 gene in mice suppresses primary mammary tumor formation but does not decrease lung metastasis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(7): 2995-3000.
- [7] Sung H, Choi JY, Lee SA, et al. The association between the preoperative serum levels of lipocalin-2 and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and prognosis of breast cancer[J]. *BMC Cancer*, 2012(12): 193.
- [8] Zucker S, Lysik RM, DiMassimo BI, et al. Plasma assay of gelatinase B: tissue inhibitor of metalloproteinase complexes in cancer[J]. *Cancer*, 1995, 76(4): 700-708.
- [9] Talvensaari-Mattila A, Turpeenniemi-Hujanen T. Preoperative serum MMP-9 immunoreactive protein is a prognostic indicator for relapse-free survival in breast carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2005, 217(2): 237-242.
- [10] Susskind H, Hymowitz MH, Lau YH, et al. Increased plasma levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in lung and breast cancer are altered during chest radiotherapy[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2003, 56(4): 1161-1169.
- [11] Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L, et al. The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(40): 37258-37265.
- [12] Nuntagawat C, Leelawat K, Tohtong R. NGAL knockdown by siRNA in human cholangiocarcinoma cells suppressed invasion by reducing NGAL/MMP-9 complex formation[J]. *Clinical Experimental Metastasis*, 2010, 27(5): 295-305.
- [13] Perrin C, Patard JJ, Jouan F, et al. The neutrophil gelatinase-associated lipocalin, or LCN 2, marker of aggressiveness in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Prog Urol*, 2011, 21(12): 851-858.
- [14] Fernández CA, Yan L, Louis G, et al. The matrix metalloproteinase-9/neutrophil gelatinase-associated lipocalin complex plays a role in breast tumor growth and is present in the urine of breast cancer patients[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(15): 5390-5395.

收稿日期: 2014-10-27

修回日期: 2014-12-27