

## 论著

文章编号:1000-5404(2012)13-1322-04

# 髓样分化因子 MyD88 在乳腺癌与癌旁正常组织中的表达与意义

唐乐辉,任国胜 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院普外科)

**[摘要]** **目的** 探讨髓样分化因子 MyD88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 在乳腺癌及癌旁正常组织中的表达特点及分布。**方法** 收集本科及合川区人民医院普外科 35 例乳腺癌患者的临床病理资料(2010 年 1 月至 2011 年 9 月),平均年龄 52 岁。应用 RT-PCR、Western blot 方法检测 MyD88 在乳腺癌及癌旁正常组织中的基因和蛋白表达水平;应用免疫组化等方法检测 MyD88 在乳腺癌及癌旁正常组织结构中的分布,观察在该组织中的表达特点和变化规律。**结果** RT-PCR 结果显示,与癌旁正常组织相比,MyD88 在乳腺癌组织中表达明显增高( $P < 0.01$ );Western blot 结果显示,与癌旁正常组织相比,MyD88 在乳腺癌组织中表达明显增高( $P < 0.01$ );MyD88 蛋白在乳腺癌周围正常组织中也有部分表达,部分细胞呈弱阳性表达,在乳腺癌组织则呈现明显强烈高表达。不同细胞类型差异性表达 MyD88,且与肿瘤的 TNM 分期、肿瘤大小、淋巴侵袭转移密切相关。**结论** MyD88 可能在乳腺癌病理发生、发展过程中起到一定的调控作用。

**[关键词]** 乳腺癌;先天免疫;MyD88

**[中图分类号]** R394.3; R730.23; R737.9

**[文献标志码]** A

## Expression and significance of myeloid differentiation factor 88 in breast carcinomas and adjacent normal tissues

Tang Lehui, Ren Guosheng (Department of General Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

**[Abstract]** **Objective** To determine the expression profile and distribution of myeloid differentiation factor 88 (MyD88) in breast carcinomas and adjacent normal tissues to investigate the role of innate immune factors downstream signaling in the breast carcinoma. **Methods** Clinical data of 35 cases of pathologically diagnosed breast carcinomas who received radical resection in our department during January 2010 to September 2011 were collected in this study. RT-PCR and Western blot analysis were used to detect the expression of MyD88 at mRNA and protein levels in the breast carcinomas and adjacent normal tissue. Immunohistochemical assay was employed to study the distribution of MyD88 in these tissues for its expression profile and variation. **Results** RT-PCR showed that the expression rate of MyD88 was significantly increased in breast carcinoma, with statistically significant compared to adjacent normal tissues ( $P < 0.01$ ). Western blot analysis displayed similar results in protein expression of MyD88 in the two tissues ( $P < 0.01$ ). MyD88 was also mildly expressed in adjacent normal tissues, with some cells displaying weakly positive expression. In contrast, breast carcinoma tissue showed strong expression. The expression of MyD88 was differential in different cell types, and was closely related to TNM stages, tumor size, lymphatic invasion and metastasis. **Conclusion** MyD88 may play a regulatory role in breast cancer incidence and development process.

**[Key words]** breast carcinomas; innate immune; myeloid differentiation factor 88

Corresponding author: Ren Guosheng, E-mail: rgs726@163.com

持久性炎症性疾病可诱发癌症的形成,炎症与癌症具有密切相关性<sup>[1]</sup>。细胞因子和化学因子在促进血管生成、转移和破坏适应性免疫中发挥着至关重要

的作用,并且细胞因子和化学因子与癌症相关的炎症有关,代表一个有益临床研究的新诊断和治疗策略靶点<sup>[2]</sup>。Toll 样受体 (Toll like receptors, TLRs) 的发现是近年来在先天免疫研究方面最重要的进展之一。TLRs 通过识别病原体相关分子模式在抵御入侵微生物

**[通信作者]** 任国胜, E-mail: rgs726@163.com

物的宿主防御中起着重要作用<sup>[3]</sup>。研究<sup>[4]</sup>发现 TLR9 在人乳腺癌细胞株中强烈高表达,TLR9 的配体刺激体外侵袭,TLR9 的表达与肿瘤病理级别、预后及转移有密切的关系。目前对 TLR2 和 TLR4 与乳腺癌的关系也有新的发现<sup>[5-6]</sup>,如发现 TLR4 信号通路在乳腺癌的化疗和放疗中起着重要的作用,TLR2 信号通路为乳腺癌介导 NF-kappaB 炎性通路激活的重要信号因子。通常 TLRs 能够被激动剂激活,通过 MyD88 依赖性和非依赖性即 TRIF 途径启动下游信号转导,形成级联反应,但是目前少见对这两个通路和乳腺癌的相关性的报道。本研究对先天免疫 MyD88 信号与乳腺癌的关系进行初步的探讨,旨在深入研究先天免疫下游信号因子与乳腺癌发病机制的关系。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

经患者知情同意,收集本科和合川人民医院普外科 2010 年 1 月至 2011 年 9 月进行乳腺癌改良根治术且临床资料完整的 35 例患者标本,经病理确诊。均为女性,平均年龄 52(38~72)岁,其中绝经前 20 例,绝经后 15 例。以乳腺浸润性导管癌为主,以及 1 例黏液腺癌,1 例髓样癌。依照国际乳腺癌 TNM 分期分为: I 期 1 例, II 期 26 例, III 期 8 例。组织学分类:早期浸润性导管癌 1 例,浸润性非特殊性癌 32 例,浸润性特殊性癌 2 例。标本收集后,每例标本分成 2 份,1 份在术后立即置于液氮快速冷冻冻存,用于 PCR 和 Western blot 实验;另 1 份经 4% 多聚甲醛固定,用于 HE 和免疫组织化学染色。

### 1.2 组织总 RNA 提取及 RT-PCR 检测

按 Trizol 试剂盒(天根公司)说明书提取总 RNA。总 RNA 纯度和浓度使用紫外分光光度计(Nano Photometer, Germany)测定,经测定所用样品的  $D(260)/D(280)$  值都为 1.8~2.0。反转录过程也按试剂说明书进行操作。应用 Prime Premier 5.0 软件设计 MyD88 和内参 GAPDH 基因引物。引物由上海生工生物公司合成。MyD88 上游引物为 5'-CCTCCACATCCTCCCTCC-3',下游引物为 5'-GTCGCAGACAGTGATGAACCTC-3',扩增片段长度为 782 bp;GAPDH 上游引物为 5'-AGTCAACG-GATTTGGTCC-3',下游引物为 5'-CTCGCTCCTGGAAGATGG-3',扩增片段长度为 221 bp。PCR 循环条件:94 °C 预变性 3 min,94 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,35 个循环后于 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,Gold-View 染色。使用紫外光凝胶照相,经 Image 软件进行灰度测定,实验重复 3 次。将 MyD88 的灰度值与 GAPDH 灰度值的比值进行分析。

### 1.3 Western blot 表达检测

取出收集置 -80 °C 保存备用的临床标本,使用蛋白裂解试剂盒(碧云天公司生产)按说明书进行裂解,考马斯亮蓝 G-250 进行蛋白浓度定量,从标准曲线中确定待测样品的浓

度。制胶后,加入上样品,通电电泳。取下胶带,考马斯亮蓝染色。用 PVDF 膜进行转膜,加入兔抗 MyD88 一抗,4 °C 过夜,二抗杂交后显色,拍照。

### 1.4 免疫组织化学染色

切片常规脱蜡和水化后,将切片放入 0.01 mmol 的枸橼酸缓冲液(pH=6.0)中进行抗原热修复,自然冷却至室温后,滴加 3% 过氧化氢 50  $\mu$ l,室温孵育 15 min;滴加山羊血清(含 1% 的 Tween 100)封闭 20 min。后加入兔抗 MyD88 多抗(1:200)4 °C 孵育过夜。PBS 洗后分别滴加山羊抗兔二抗(1:500)。37 °C 孵育 40 min,PBS 冲洗后,加辣根过氧化物酶(HRP)标记的生物素卵白素复合物。显色、脱水、透明、封片后镜检。每张切片随机选取 3 个高倍视野( $\times 400$ )进行图像分析。

### 1.5 免疫组化结果判定

免疫组化阳性结果(细胞核或细胞质中出现棕黄色颗粒)的判读,根据以下两方面:①阳性细胞的百分比:<1% = 0;1%~10% = 1;>10%, $\leq 30\%$  = 2;>30%, $\leq 60\%$  = 3;>60% = 4。②阳性细胞的染色强弱:阴性 = 0;淡黄色 = 1;黄色 = 2;棕黄色 = 3。①+②即为标本的免疫组化评分:0~2 分为阴性(-),3~7 分为阳性(+,+++ 即强阳性)。

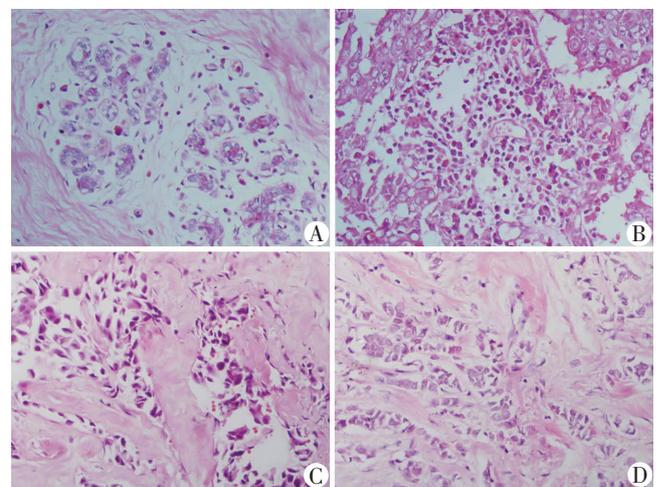
### 1.6 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件,计数资料组间比较采用确切概率法检验。

## 2 结果

### 2.1 HE 染色观察

乳腺癌周围正常组织显示乳腺小叶单位及周围间质结构正常,间质中散在少量炎症细胞浸润。终末导管及周围间质右下角见淋巴管样结构,管壁内衬扁平上皮(图 1A)。乳腺癌组织呈浸润性生长,癌组织周围大量炎症细胞浸润,毛细血管增生扩张充血(图 1B~D)。



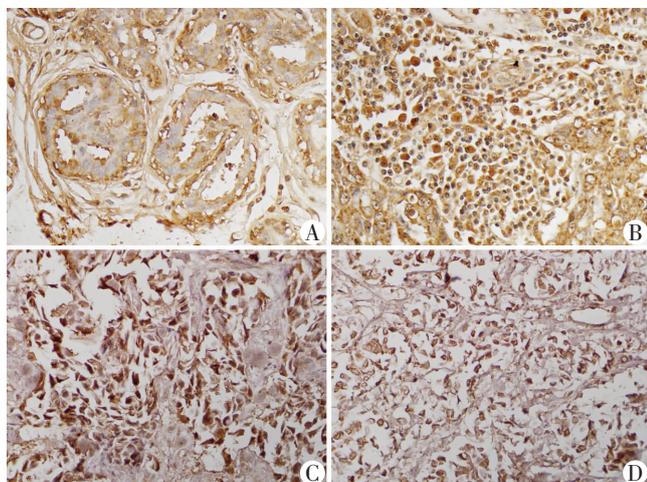
A: II 期癌旁正常组织;B: II 期乳腺癌组织;C: II 期乳腺癌组织;D: III 期乳腺癌组织

图 1 乳腺癌与癌旁正常组织病理学观察 (HE  $\times 400$ )

### 2.2 不同乳腺组织中 MyD88 的表达

免疫组化法检测发现,MyD88 在 35 例乳腺癌组织全部阳

性表达(图2),表达阳性率为100%。在乳腺癌周围正常组织中,MyD88在炎性细胞、肌上皮及梭形的成纤维细胞中可见表达,导管上皮未见表达;II A期乳腺癌组织癌细胞包括浆细胞均表达MyD88;II B期乳腺癌组织强烈与炎性细胞强烈高表达MyD88;III A期乳腺癌组织中癌细胞及炎性细胞强烈高表达MyD88。



A: 癌旁正常组织; B: II A 期乳腺癌组织; C: II B 期乳腺癌组织; D: III A 期乳腺癌组织

图2 乳腺癌与癌旁正常组织免疫组化观察 MyD88 的表达 (三步法 ×400)

### 2.3 乳腺癌组织中 MyD88 的表达与临床病理特征的关系

乳腺癌患者中,45岁前后 MyD88 的表达水平有差异,但无统计学意义( $P > 0.05$ ),MyD88 的阳性表达与临床肿瘤大小、受侵淋巴细胞数目、临床分期呈正相关( $P < 0.05$ ,表1)。

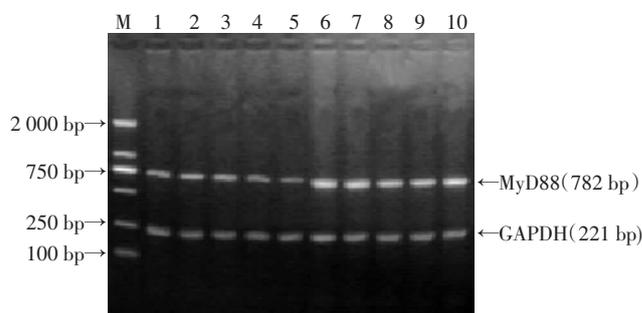
表1 乳腺癌组织中 MyD88 的表达与临床病理指标的关系( $\bar{x} \pm s$ )

病理学参数	n	MyD88
年龄		
<45岁	7	16.45 ± 6.76
≥45岁	28	17.23 ± 6.54
肿瘤直径(cm)		
<2	10	12.32 ± 5.03
2~5	20	17.91 ± 4.76 <sup>a</sup>
>5	5	23.74 ± 6.79 <sup>ab</sup>
受侵淋巴数		
0	17	12.28 ± 4.65
1~3	11	16.95 ± 3.79 <sup>c</sup>
>3	7	24.08 ± 6.04 <sup>cd</sup>
临床分期		
I	1	8.05 ± 0.01
II A	20	15.01 ± 5.63 <sup>ef</sup>
II B	6	17.22 ± 5.12 <sup>ef</sup>
III	8	25.14 ± 7.26 <sup>e</sup>

a:  $P < 0.05$ , 与 <2 cm 比较; b:  $P < 0.05$ , 与 2~5 cm 比较; c:  $P < 0.05$ , 与 0 比较; d:  $P < 0.05$ , 与 1~3 比较; e:  $P < 0.05$ , 与 I 期比较; f:  $P < 0.05$ , 与 III 期比较

### 2.4 基因检测结果

与癌旁正常组织 MyD88 基因表达( $1.1058 \pm 0.1167$ )相比,乳腺癌组织 MyD88 基因表达( $1.5445 \pm 0.1833$ )明显增强,差异有显著统计学意义( $P < 0.01$ ,图3)。

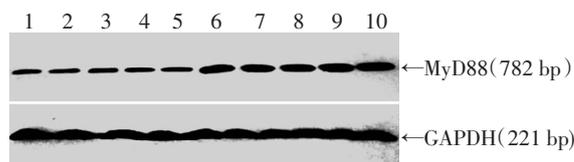


M: 标准; 1~5: 癌周正常组织; 6~10: 乳腺癌组织

图3 RT-PCR 检测乳腺癌与癌旁正常组织 MyD88 基因的表达

### 2.5 蛋白检测结果

与癌旁正常组织 MyD88 蛋白阳性目标面密度值( $0.7191 \pm 0.1102$ )相比,乳腺癌组织 MyD88 蛋白阳性目标面密度值( $1.0042 \pm 0.0523$ )明显增强( $P < 0.01$ ,图4)。



1~5: 癌周正常组织; 6~10: 乳腺癌组织

图4 Western blot 检测乳腺癌与癌旁正常组织 MyD88 蛋白的表达

## 3 讨论

寻找导致肿瘤侵袭和转移的原因是肿瘤治疗和研究的当务之急。尽管包括白细胞、细胞因子、补体等炎症肿瘤微环境的化合物成分在肿瘤微环境中与流行病学炎症并没有直接的相关性,但在特定的器官中,炎症环境可以增加患癌症的风险。近年的研究正逐步解开连接炎症和癌症的分子途径。慢性炎症的刺激导致肿瘤释放许多直接促进其自身生长的因子,从而构成了一个炎性微环境,极大地促进肿瘤的发生和发展<sup>[6]</sup>,以及恶性细胞的增殖和存活、血管生成和转移,说明炎症与癌症具有密切相关性,而持续性的炎症能诱导癌症的产生,有利于肿瘤的发生和发展。因此,与癌症相关的炎症的诊断和治疗成为肿瘤的创新战略目标<sup>[7]</sup>。通常 TLRs 能够被激动剂激活,通过 MyD88 依赖性和非依赖性即 TRIF 途径启动下游信号转导,形成级联

反应<sup>[8]</sup>。TLR3 主要依靠 TRIF 通路激活,而 TLR4 激活则通过 MyD88 和 TRIF 两条通路激活下游炎症信号通路<sup>[9]</sup>。研究<sup>[10]</sup>表明,TLRs 和相关细胞内信号分子构成了一个重要的细胞通路介导的炎症过程。有研究<sup>[4]</sup>显示 TLR2 是与 NF- $\kappa$ B 信号活性是一个关键受体信号,能够促进乳腺癌细胞的活性和增加侵袭性。相对于正常的乳腺癌上皮细胞,TLR9 的表达水平在乳腺癌中明显升高,并且这种表达与雌激素受体呈负相关,但相关病理生理学机制仍不明确。还有研究<sup>[5]</sup>发现,与携带正常的 TLR4 基因的患者相比,TLR4 功能丧失的乳腺癌患者在经过放疗和化疗后的复发率明显增加。新近研究<sup>[11]</sup>发现,TLR5 在乳腺癌中高度表达,TLR5 介导的先天免疫反应的激活,引起乳腺癌细胞本身抗肿瘤活性。从这些研究可以看出,TLRs 在乳腺癌的肿瘤细胞活性、侵袭性,以及乳腺癌放疗和化疗中都起着重要的作用。

当前一些研究都集中于 TLRs 上游信号,然而 TLRs 是通过 MyD88 依赖性和非依赖性即 TRIF 途径启动下游信号转导,激活炎症信号,MyD88 和 TRIF 信号通路在 TLRs 上游信号的炎性介导中的作用仍不清楚。本研究显示,MyD88 信号因子在乳腺癌细胞强烈高度反应和表达,无论是基因或是蛋白水平都呈现明显的高表达;在癌旁周围组织中,MyD88 弱表达于一些乳腺组织、炎细胞及部分梭形的成纤维细胞;而在乳腺癌组织中,癌细胞及炎性细胞、浆细胞、肌上皮均强烈高表达,甚至部分淋巴细胞表达弱阳性变化。乳腺癌组织中 MyD88 的基因和蛋白表达水平均高于周围正常乳腺组织。本组病理标本中,除 1 例黏液瘤炎性细胞浸润较少外,其他病例乳腺癌组织内均有炎性细胞浸润,并且恶性程度越高的组织,炎性细胞相对浸润越明显,而炎性细胞浸润越明显的乳腺癌组织,相对来说 MyD88 的表达更强烈。但是这种高表达特点并未与年龄呈正相关。与此同时,MyD88 的阳性表达与临床肿瘤大小、受侵淋巴细胞数、临床分期呈正相关。这些强烈高表达给我们一种提示,MyD88 与炎性细胞、肿瘤的生长有着密切的联系,不管它是抑制肿瘤的生长还是促进肿瘤的增长,对肿瘤细胞的转移等是有利作用或是副作用,都为进一步认识 MyD88 信号因子在

乳腺癌中的发病机制提供了较好的研究依据。MyD88 高表达特点说明,上游信号因子可能均通过它启动下游的相关因子,达到炎性激活或产生其他作用的目的,而其在炎症过程中到底具备什么角色仍需要进一步的研究。

总之,TLRs 作为启动炎症反应的主要信号因子在相关肿瘤疾病和乳腺癌疾病中的作用日趋突显。TLRs 信号在肿瘤产生、血管发生及转移、特异性免疫调节中发挥重要的作用。

#### 参考文献:

- [1] Bonecchi R, Locati M, Mantovani A. Chemokines and cancer: a fatal attraction[J]. *Cancer Cell*, 2011, 19(4): 434-435.
- [2] Costantini S, Capone F, Guerriero E, et al. An approach for understanding the inflammation and cancer relationship[J]. *Immunol Lett*, 2009, 126(1/2): 91-92.
- [3] Tsan M F. Toll-like receptors, inflammation and cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2006, 16(1): 32-37.
- [4] Jukkola-Vuorinen A, Rahko E, Vuopala K S, et al. Toll-like receptor-9 expression is inversely correlated with estrogen receptor status in breast cancer [J]. *J Innate Immun*, 2009, 1(1): 59-68.
- [5] Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy[J]. *Nat Med*, 2007, 13(9): 1050-1059.
- [6] Xie W, Wang Y, Huang Y, et al. Toll-like receptor 2 mediates invasion via activating NF- $\kappa$ B in MDA-MB-231 breast cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 379(4): 1027-1032.
- [7] Mantovani A. Molecular pathways linking inflammation and cancer [J]. *Curr Mol Med*, 2010, 10(4): 369-373.
- [8] Youn H S, Lee J Y, Fitzgerald K A, et al. Specific inhibition of MyD88-independent signaling pathways of TLR3 and TLR4 by resveratrol: molecular targets are TBK1 and RIP1 in TRIF complex[J]. *J Immunol*, 2005, 175(5): 3339-3346.
- [9] Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway[J]. *Science*, 2003, 301(5633): 640-643.
- [10] Ioannou S, Voulgarelis M. Toll-like receptors, tissue injury, and tumorigenesis[J]. *Mediators Inflamm*, 2010, pii: 581837.
- [11] Cai Z, Sanchez A, Shi Z, et al. Activation of Toll-like receptor 5 on breast cancer cells by flagellin suppresses cell proliferation and tumor growth[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(7): 2466-2475.

(收稿:2011-11-10;修回:2011-12-22)

(编辑 龙 亮)