

犬乳腺肿瘤中 MUC1 的表达及临床意义

刁洪秀, 李 艺, 林德贵, 张 迪*

(中国农业大学动物医学院, 北京 100193)

摘要: 为了检测 MUC1 在乳腺肿瘤的侵袭、转移及病理分级中的作用, 本研究通过 real-time PCR 检测了 47 例犬乳腺肿瘤组织(20 例良性, 27 例恶性)和 3 例健康犬乳腺组织中 MUC1 基因的转录情况, 通过 IHC 检测 MUC1 在犬乳腺组织中的表达情况, 并分析二者与肿瘤恶性程度分级的关系。结果发现: MUC1 基因和 MUC1 在犬乳腺肿瘤组织中高表达, 且在不同的恶性分级中差异显著($P < 0.05$)。研究显示 MUC1 基因和 MUC1 可作为犬乳腺肿瘤诊断和恶性程度评估的重要指标之一。

关键词: MUC1; 犬乳腺肿瘤; real-time PCR; 免疫组织化学

中图分类号: S857.26

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)07-1511-06

Expression of MUC1 and Its Clinical Value in Canine Mammary Tumors

DIAO Hong-xiu, LI Yi, LIN De-gui, ZHANG Di*

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: This study was conducted to assess the influences of MUC1 in cancer invasion, metastasis, classification and grade in mammary tumors. This work was designed to investigate the expression of MUC1 mRNA and MUC1 in canine mammary tissues. Forty-seven canine mammary gland tumors (20 benign and 27 malignant mammary tumors) and mammary gland tissues from 3 healthy dogs were investigated for MUC1 mRNA and MUC1 by Real-Time PCR and immunohistochemistry (IHC), respectively. The results showed that the expression levels of MUC1 gene and MUC1 in canine mammary tumors were significant higher than that in healthy mammary gland ($P < 0.05$), and a significant correlation was observed between the expression levels of MUC1 gene and MUC1 and malignance grades. In conclusion, the expression levels of MUC1 gene and MUC1 may become new and valuable biomarkers for diagnosis and malignance grade in canine mammary tumors.

Key words: MUC1; canine mammary tumors; real-time PCR; immunohistochemistry

乳腺肿瘤是兽医临床最常见的肿瘤之一, 在所有犬猫肿瘤性疾病中排名第二, 而犬乳腺肿瘤约占犬临床肿瘤性疾病的 50%^[1], 严重威胁宠物的健康。肿瘤是一个及其复杂的生物学进程, 多种原癌基因或抑癌基因的异常表达与乳腺肿瘤的发生、发展和预后密切相关。在人医研究中发现, MUC1 在肿瘤的侵袭过程中发挥关键作用^[2], 并能激活

MAPK、PI3K/AKT 和 Wnt 信号通路^[3], 促进肿瘤的发生发展, 但在兽医临床上尚未见到相应的报道。本研究通过荧光定量 PCR(real-time PCR)和免疫组织化学(IHC)检测 MUC1 基因和 MUC1 在犬乳腺肿瘤中的表达情况, 并分析其与肿瘤恶性分级的相关性, 为犬乳腺肿瘤的诊断、治疗和预后评估提供参考。

收稿日期: 2018-01-08

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31402260)

作者简介: 刁洪秀(1989-), 女, 吉林长春人, 博士生, 主要从事小动物外科学和肿瘤学研究, E-mail: diaohongxiu@yeah.net

* 通信作者: 张 迪, 副教授, E-mail: dzhangdvm@cau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 试验样本

本试验共检测了 47 例犬乳腺肿瘤病例,年龄 7~16 岁(11.29±2.43),所有病例均来自于 2014 年 5 月至 2015 年 12 月间来中国农业大学动物医院就诊的病例。无菌收集肿瘤组织,一部分迅速用液氮冷冻,随后转移至冻存管内于-80℃冰箱保存。另一部分于 4%多聚甲醛固定后制备病理切片,并进行免疫组化染色。

1.2 主要试验试剂

RNAgents^R Total Isolation System 试剂盒(Promega 公司),real-time PCR 试剂盒(SYBR[®] Premix DimerEraser[™]),Reverse Transcription PCR 试剂盒(TaKaRa 生物公司),2×EasyTaq SuperMix(全式金生物技术有限公司),MUC1 单克隆抗体(Abcam),SP-9002 生物素-链霉卵白素免疫组化检测试剂盒、DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物公司)等。

1.3 RNA 的提取和 cDNA 的合成

参照 RNAgents^R Total Isolation System 试剂盒说明提取样本中的 RNA,通过 NanoDrop 检测 RNA 的浓度和纯度, $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 的值在 1.8~2.0,说明提取的 RNA 纯度符合检测要求。cDNA 合成体系:RNA 1 μg、Oligo(dT) 1 μL、DEPC H₂O 10 μL、5×PrimeScript II Buffer 4 μL、dNTP Mixture (10 mmol·L⁻¹)1 μL、RTase M-MLV(200 U·μL⁻¹) 0.5 μL、RNase Inhibitor (40 U·μL⁻¹) 0.5 μL、RNase Free dH₂O 补充至 20 μL。将上述混合物 42℃延伸 1 h,70℃保温 15 min 后终止反应,cDNA 保存于-20℃备用。

1.4 MUC1 基因的扩增

参照 NCBI 上已经发表的犬 MUC1 基因的 mRNA 序列(GenBank 登录号为 AY703457),利用 Primer Premier 5.0 设计并合成一对特异性引物,上游引物:5'-GCCAACAAGGTGAAGACACAG-3';下游引物:5'-CAGACTTGAACGGGGCAGA-3',其目的产物片段长度为 118 bp。

以“1.3”合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增体系:模板 2 μL、上游引物(10 μmol·L⁻¹) 1 μL、下游引物(10 μmol·L⁻¹) 1 μL、2×EasyTaq SuperMix 12.5 μL、去离子水补充至 25 μL,充分混匀。反应条件:94℃变性 30 s,60℃退火 30 s,

72℃延伸 60 s,共 34 个循环,72℃延伸 7 min。

1.5 MUC1 基因的 real-time PCR 检测

通过比较 C_T 法进行相对定量,选用的内参基因是 βactin。参照 NCBI 上已经发表的犬 βactin 基因的 mRNA 序列(GenBank 登录号为 NM001195845),利用 Primer Premier 5.0 设计并合成一对特异性引物,上游引物:5'-ATATCGCT-GCGCTTGTGGTC-3';下游引物:5'-CCGTGCT-CAATGGGGTACTTC-3'。

构建标准曲线,将 cDNA 进行梯度稀释,得到 5 个梯度模板(10⁰、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴)进行 real-time PCR 检测,根据模板拷贝数的对数和 C_T 值绘制标准曲线。real-time PCR 反应体系:模板 1 μL、上游引物 0.5 μL、下游引物 0.5 μL、SYBR[®] Premix DimerEraser[™] 10 μL、ROX Reference Dye II (50×) 0.4 μL,去离子水补充至 20 μL,充分混匀。real-time PCR 反应程序:95℃变性 15 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,72℃数据采集 1 s,共 36 个循环。60~90℃溶解曲线,0.3℃·s⁻¹,60℃退火 15 s,终止反应。

1.6 组织病理切片的制作

肿瘤组织经 4%多聚甲醛固定过夜后,经过脱水、透化、浸蜡、包埋、切片等程序,切割成 3 μm 的石蜡切片。经 HE 染色中性树胶封片后,于显微镜下观察。

1.7 组织中 MUC1 的检测

将“1.6”中的石蜡切片经脱水、抗原修复、封闭、一抗孵育、二抗孵育、DAB 显色等过程进行 IHC 检测。

IHC 结果判读:细胞结构中出现黄色或棕黄色颗粒即存在 MUC1 蛋白的表达。对每个 IHC 样本随机选 5 个视野进行拍照,然后采用 Image Pro Plus 对照片平均光密度值(MOD)进行分析,阳性染色面积与目标蛋白的量成正比,染色的强度与目标蛋白的关系符合朗伯-比尔定律。

1.8 统计学分析

real-time PCR 反应中每个样品均重复三次,7500 Software v2.0 荧光分析软件自动进行定量。应用 SPSS18.0 对数据进行 T 检验和单因素方差分析,MOD 值以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,P<0.05 为差异显著。

2 结果

2.1 肿瘤组织学鉴定

本试验共收集乳腺肿瘤病例 47 例,参照 2011

年 Goldschmidt 等^[4]提出的犬乳腺肿瘤的分类和分级标准进行组织学分类和恶性程度分级,详见表 1

和表 2。恶性肿瘤 27 例,良性肿瘤 20 例,组织恶性程度分级见表 3。

表 1 组织恶性分级标准

Table 1 Criteria for histologic malignant grade

评分 Score	腺管形成 Adenosine formation	核多形性 Nuclear pleomorphism	高倍镜视野下染色 High power fields
1 分	腺管形成良好	轻度细胞核多形性和核染色	每个视野下偶尔有核深染和有丝分裂相
2 分	中等量腺管形成	中度细胞核多形性和核染色	每个视野下 2-3 个核深染或有丝分裂相
3 分	少量或无腺管形成	明显细胞核多形性和核染色	每个视野下多于 3 个核深染或有丝分裂相

表 2 乳腺肿瘤组织恶性分级

Table 2 Histologic malignancy grade of mammary neoplasms

总分 Score	恶性分级 Malignancy grade
3~5	I 级(低度恶性),高分化
6~7	II 级(中度恶性),中度分化
8~9	III 级(高度恶性),低分化

表 3 乳腺肿瘤组织恶性程度分级

Table 3 Malignancy grade of MGTs samples

恶性程度分级 Malignancy grade	数量 Number	比例/% Proportion
I	9	33.3
II	13	48.1
III	5	10.4

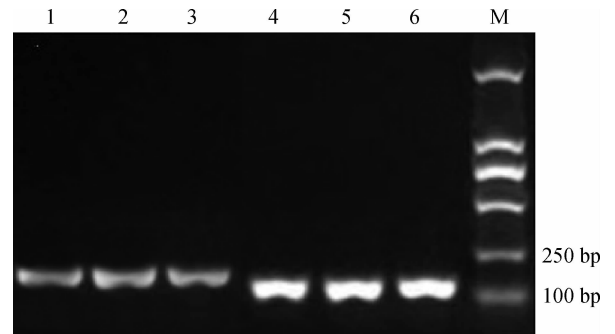
2.2 MUC1 基因表达

2.2.1 MUC1 和 β actin 基因的扩增 MUC1 和 β actin 基因 PCR 扩增得到如下琼脂糖凝胶电泳成像结果:在 100~200 bp 之间以及 200 bp 水平出现清晰的单一条带,与预测的 MUC1 和 β actin 特异性引物扩增条带大小相符(图 1)。

2.2.2 real-time PCR 标准曲线 以 Cycle 为横坐标,不同模板浓度的对数(log Quantity)为纵坐标绘制标准曲线,如图 2。相关系数(R^2)均大于 0.990,标准曲线可信度高,二者的扩增效率相近。

2.2.3 real-time PCR 动力学曲线 对样本中的 mRNA 转录所得 cDNA 进行 real-time PCR 试验,生成的扩增曲线如图 3。

2.2.4 real-time PCR 熔解曲线 MUC1 和 β actin 熔解曲线均为单峰,产物特异性高,详见图 4。



M. 相对分子质量标准;1~3. β actin;4~6. MUC1,均为恶性肿瘤样品

M. DNA marker; 1-3. β actin; 4-6. MUC1, all samples were malignant mammary tumors

图 1 MUC1 和 β actin 基因 cDNA PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR products of cDNA by canine MUC1 and β actin

2.2.5 MUC1 基因定量转录差异性分析 应用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 对 MUC1 基因的转录进行定量分析,详见图 5。在肿瘤组织($n=47$)和正常组织($n=3$)中 MUC1 基因相对转录量分别为 12.50 ± 4.95 和 1.55 ± 0.64 ,二者之间存在统计学差异($P=0.01$)。在不同的恶性分级中,MUC1 基因相对转录量差异较大(图 6)。在 I 级($n=9$)、II 级($n=13$)和 III 级($n=5$)中相对转录量依次为 2.25 ± 1.48 、 1.75 ± 1.41 和 30.24 ± 11.24 ,III 级中 MUC1 基因相对转录量显著高于 I 级和 II 级(P 值分别是 0.016 和 0.011)。

2.3 组织中 MUC1 的表达

乳腺肿瘤组织 MUC1 部分 IHC 结果见图 7, MUC1 在正常乳腺组织细胞质内呈低表达,在乳腺肿瘤组织中细胞质和细胞核的着色,呈强阳性表达。经 Image Pro Plus 计算得出,正常组织($n=3$)和肿瘤组织($n=47$)的 MOD 分别为 0.14 ± 0.02 和 0.19 ± 0.08 ,二者之间存在统计学差异($P=0.03$),详见图 8。

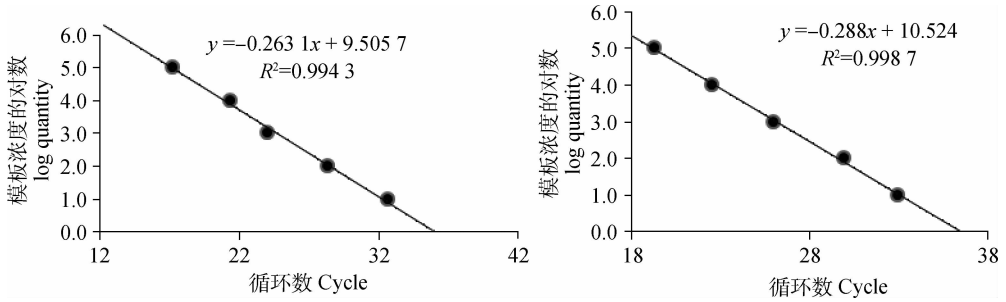


图 2 real-time PCR 标准曲线
Fig. 2 Standard curve of real-time PCR amplification

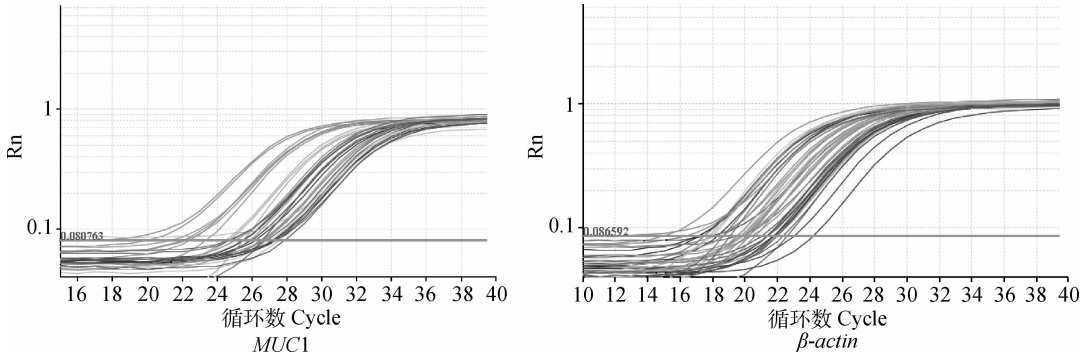


图 3 real-time PCR 动力学扩增曲线
Fig. 3 Dynamic curve of real-time PCR amplification

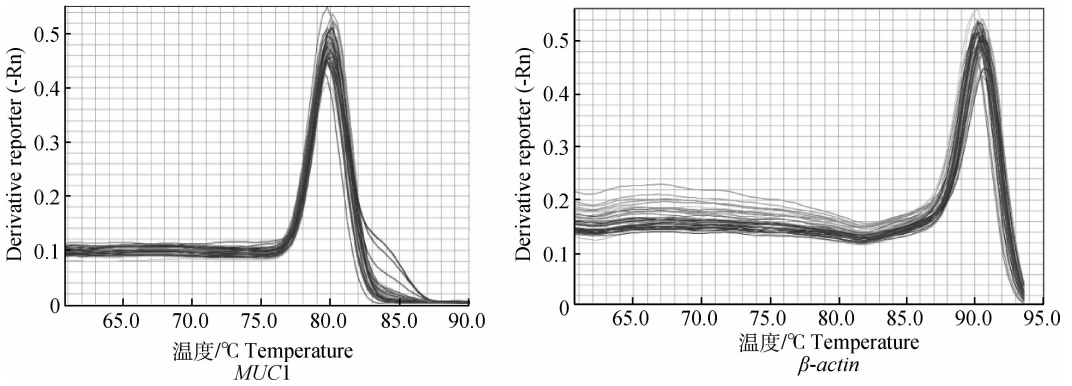
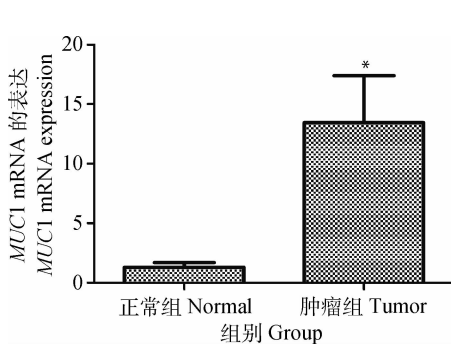
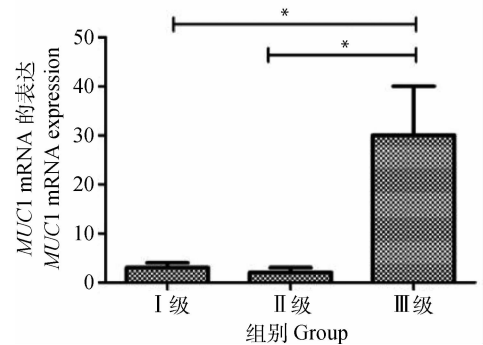


图 4 real-time PCR 熔解曲线
Fig. 4 Melting curve of real-time PCR amplification



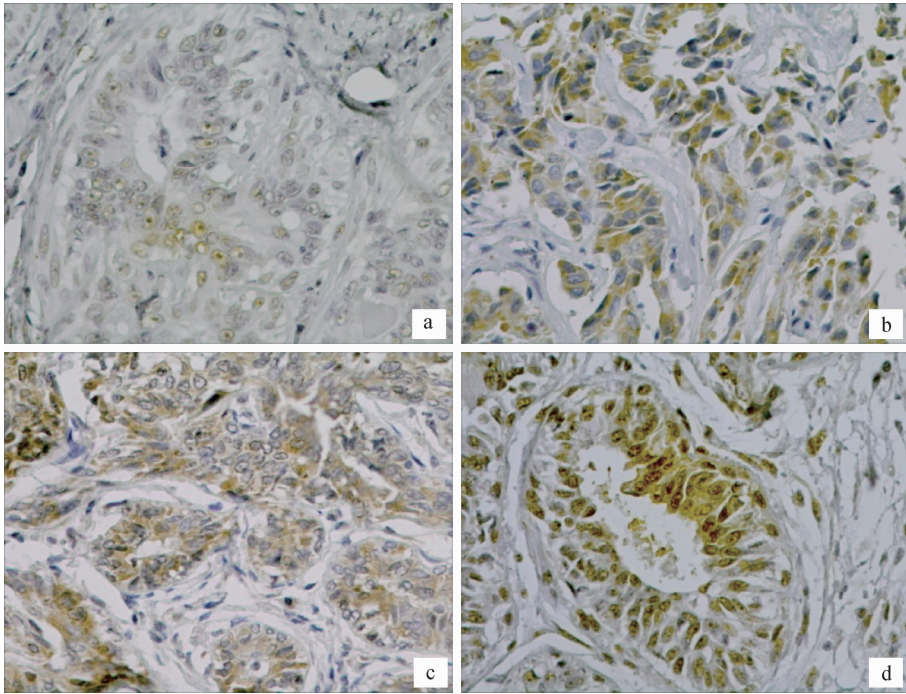
*. $P < 0.05$
图 5 肿瘤组和正常组 MUC1 基因相对转录量
Fig. 5 Relative transcription of MUC1 in different groups



*. $P < 0.05$
图 6 不同恶性级别中 MUC1 基因相对转录量
Fig. 6 Relative transcription MUC1 in different malignance grades

恶性肿瘤组织 ($n=27$) 和良性肿瘤组织 ($n=20$) 的 MOD 分别为 0.18 ± 0.08 和 0.21 ± 0.08 , 无统计学差异。在不同的恶性分级中 MUC1 表达有差异, I

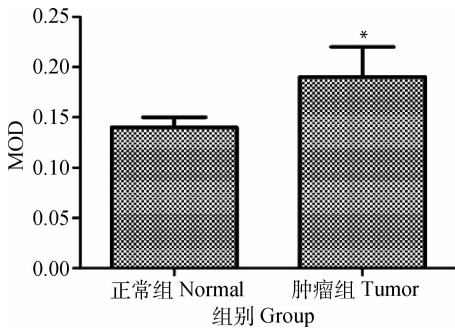
级 ($n=9$) 的 MOD 显著低于 II 级 ($n=13$) 和 III 级 ($n=5$) 的 MOD (P 值分别为 0.01 和 0.00), 见图 9。



a. 正常乳腺组织; b, c, d. 简单癌组织
a. Normal mammary tissue; b, c and d. Simple mammary cancer tissue

图 7 MUC1 在犬不同乳腺组织中的表达 400×

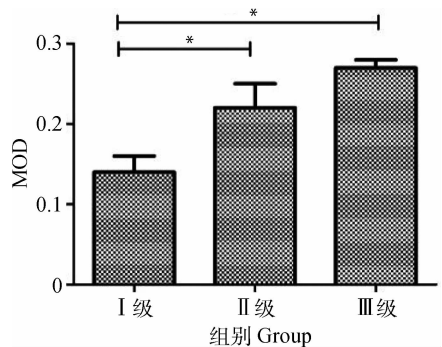
Fig. 7 Expression of MUC1 in canine mammary tumors 400×



*. $P < 0.05$

图 8 肿瘤组和正常组 MUC1 的 MOD

Fig. 8 MOD of MUC1 in different groups



*. $P < 0.05$

图 9 不同恶性级别 MUC1 的 MOD

Fig. 9 Expression of MUC1 in different malignance grades

3 讨论

MUC1 基因定位于染色体 1q21, 其表达的异常与肿瘤的发生发展密切相关^[5]。在癌症中, MUC1 基因通过提高基因数量和转录水平, 以及缺失转录后的调控来实现其过表达^[2]。此外, MUC1 在恶性肿瘤的侵袭和转移中发挥重要作用。在自发性乳腺

癌和胰腺癌小鼠模型中发现, MUC1^{-/-} 小鼠肿瘤的侵袭和转移要明显迟于 MUC1^{+/+} 的小鼠^[6-7]。本研究中, MUC1 在犬乳腺肿瘤组织相对表达量是正常乳腺组织的 12.5 倍, 且在肿瘤的恶性分级中差异显著, 组织恶性程度越高, MUC1 相对表达量越高, 说明 MUC1 基因的异常表达同样适用于犬乳腺肿

瘤的诊断和预后评估。MUC1 在正常上皮细胞表面呈极性分布, 润滑和保护底层上皮细胞免受干燥、pH 值变化以及污染物和微生物的入侵^[8], 在发生肿瘤时, MUC1 糖基化异常会影响其在细胞表面的排列, 并不断向细胞内聚集, 可能会增强致癌信号^[9]。本试验中 MUC1 在正常乳腺细胞顶部细胞质中呈低表达, 而在乳腺肿瘤组织的细胞质和细胞核内均呈现强阳性表达, 与前人研究相一致。有研究显示, MUC1 脱落的胞外结构域(MUC1-N)可作为癌症分级和治疗评估的生物标志物^[10], 且与预后不良呈明显的相关性^[11]。本试验中对 MUC1 的 IHC 检测发现, MUC1 的 MOD 值随着肿瘤恶性程度的增强而增加, 提示 MUC1 在犬乳腺肿瘤组织中的表达与组织恶性程度分级有关。

4 结 论

MUC1 基因和 MUC1 在犬乳腺肿瘤组织中高表达, 且与组织恶性程度分级密切相关, 可为犬乳腺肿瘤诊断和恶性程度评估提供参考, 为犬乳腺肿瘤的临床治疗提供理论数据。

参考文献 (References):

- [1] NAKAGAWA T, UYAMA R, OHASHI E, et al. The expression of sialyl Lewis X in canine and feline mammary gland tumors[J]. *J Vet Med Sci*, 2002, 64(10):949-952.
- [2] NATH S, MUKHERJEE P. MUC1: A multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression[J]. *Trends Mol Med*, 2014, 20(6):332-342.
- [3] HOLLINGSWORTH M A, SWANSON B J. Mucins in cancer: Protection and control of the cell surface [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(1):45-60.
- [4] GOLDSCHMIDT M, PEÑA L, RASOTTO R, et

al. Classification and grading of canine mammary tumors[J]. *Vet Pathol*, 2011, 48(1):117-131.

- [5] 孟迪, 冯晓燕, 进淑娟, 等. CD44v6、MUC1 及 VEGF 在三阴性乳腺癌组织中的表达及其临床意义 [J]. *肿瘤学杂志*, 2014, 20(2):91-96.
- MENG D, FENG X Y, JIN S J, et al. Expressions of CD44v6, MUC1 and VEGF in triple-negative breast cancer and their significances[J]. *Journal of Chinese Oncology*, 2014, 20(2):91-96. (in Chinese)
- [6] BESMER D M, CURRY J M, ROY L D, et al. Pancreatic ductal adenocarcinoma mice lacking mucin 1 have a profound defect in tumor growth and metastasis[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(13):4432-4442.
- [7] TINDER T L, SUBRAMANI D B, BASU G D, et al. MUC1 enhances tumor progression and contributes toward immunosuppression in a mouse model of spontaneous pancreatic adenocarcinoma[J]. *J Immunol*, 2008, 181(5):3116-3125.
- [8] KUFEL D W. Mucins in cancer: Function, prognosis and therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(12):874-885.
- [9] ALTSCHULER Y, KINLOUGH C L, POLAND P A, et al. Clathrin-mediated endocytosis of MUC1 is modulated by its glycosylation state [J]. *Mol Biol Cell*, 2000, 11(3):819-831.
- [10] MARTÍN A, CORTE M D, ÁLVAREZ A M, et al. Prognostic value of pre-operative serum CA 15.3 levels in breast cancer [J]. *Anticancer Res*, 2006, 26(5B):3965-3971.
- [11] WINTER J M, TANG L H, KLIMSTRA D S, et al. A novel survival-based tissue microarray of pancreatic cancer validates MUC1 and mesothelin as biomarkers [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7):e40157.

(编辑 白永平)