

0.05);转移者与无转移者 TGF- β 1 灰度值分别为 59.47% $\pm$ 3.26%、17.51% $\pm$ 1.64%, MMP-2 分别为 76.92% $\pm$ 5.48%、14.22% $\pm$ 1.35%,比较均有显著性差异($P < 0.05$);相关性分析显示二者表达与肿瘤浸润转移显著相关。TGF- β 1 和 MMP-2 在口腔鳞状细胞癌中高表达,其表达与肿瘤浸润和转移密切相关,具体机制则需进一步研究探讨。

参考文献

- 1 陈中,张素欣,张雨温. MMP1、TIMP1 和 TIMP3 在口腔鳞状细胞癌中的表达及临床意义[J]. 现代口腔医学杂志,2011,25(6):408-412
- 2 Becher N,Hein M,Uldbjerg N,et al. Balance between matrix metalloproteinases (MMP) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in the cervical mucus plug estimated by determination of free non-complexed TIMP [J]. Reprod Biol Endocrinol,2008,6(2):45-49
- 3 柳海,李秀,吴强. MMP-2、TIMP-2 在口腔鳞状细胞癌中表达的

- 临床病理研究[J]. 中国肿瘤,2009;15(6):251-254
- 4 李峰,满大鹏,南晓利,等. CD147 和 MMP-2 在口腔鳞状细胞癌中的表达及意义[J]. 黑龙江医药,2011,34(4):25-26
 - 5 Vasala K,Pakko P,Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) immunoreactive protein in urinary bladder cancer: a marker of favorable prognosis [J]. Anticancer Res,2009,28(3):1757-1761
 - 6 叶金海,邢树忠,吴煜农. 口腔鳞状细胞癌上皮型钙依赖黏附蛋白及基质金属蛋白酶-2 表达的意义[J]. 口腔医学,2008,24(6):331-333
 - 7 孙桃姣,朱友家,陈建刚. 转化生长因子 β 1 和转化生长因子 β II 受体蛋白在口腔鳞状细胞癌中的表达[J]. 武汉大学学报,2010,25(5):542-544
 - 8 胡晓宁,李玉兰,金磊. MMP-2 和 TIMP-2 在口腔鳞状细胞癌中表达的意义[J]. 中国肿瘤临床与康复,2010,15(6):503-505
- (收稿日期:2012-07-30)
(修回日期:2012-10-15)

IMP3 在三阴性乳腺癌中的表达及其临床意义

邓再兴 陈莉萍 朱 凯 赖世平 纪存丽

摘 要 目的 研究胰岛素样生长因子 II mRNA 结合蛋白 3(insulin-like growth II mRNA-binding protein 3,IMP3)在三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer,TNBC)的表达及其临床意义。**方法** 收集 62 例 TNBC 组织标本,免疫组织化学法检测 ER(estrogen receptor)、PR(progesteronereceptor)和 HER-2(human epidermal growth factor receptor 2)的表达,同时随机挑选 60 例非 TNBC(non-triple-negative breast cancer,non-TNBC)作为对照组,并分析 IMP3 表达与乳腺癌患者临床病理特征的关系。**结果** IMP3 蛋白在 TNBC 组和 non-TNBC 组的阳性表达率分别为 56.5% 和 8.3%,IMP3 在 TNBC 组和 non-TNBC 组表达差异有统计学意义($P < 0.001$)。IMP3 的表达与组织学分级、Ki67 指数间有统计学意义($P < 0.01$),组织学分级越高及 Ki67 指数高者 IMP3 的表达越高。**结论** TNBC 高表达 IMP3 蛋白。IMP3 与肿瘤的增殖和高侵袭性相关,并有可能成为 TNBC 靶向治疗的潜在靶点。

关键词 乳腺肿瘤 三阴性乳腺癌 IMP3 免疫组织化学

Expression and Clinical Significance of IMP3 in Triple-negative Breast Cancer. Deng Zaixing, Chen Liping, Zhu Kai, Lai Shiping, Ji Cunli. Department of Pathology, Huzhou Maternity & Child Health Hospital, Zhejiang 313000, China

Abstract Objective To study the expression of Insulin-like growth II mRNA-binding protein 3 (IMP3) in triple-negative breast cancer(TNBC) and its clinical significance. **Methods** A total of 62 triple-negative breast cancer samples were collected. Expression of ER, PR and HER-2 was detected by immunohistochemical staining, and compared with those of 60 cases of non-TNBC, then the correlation of IMP3 expression with patients' clinical and pathological features was analyzed. **Results** The positive expression rates of IMP3 in TNBC and non-TNBC were 56.5% and 8.3% respectively and its difference had statistical significance ($P < 0.001$). The expression of IMP3 was correlated to histological grade and Ki67 index and its difference had statistical significance ($P < 0.01$). There was high positive rate in high grade and high Ki67 index patients. **Conclusion** IMP3 protein highly expressed in TNBC. IMP3 is association with tumor proliferation and invasiveness, and it may be a potential target for targeted therapy of TNBC.

Key words Breast neoplasmas; Triple-negative breast cancer; IMP3; Immunohistochemistry

基金项目:浙江省医药卫生研究计划基金资助项目(2011KYA152);湖州市科技局自然科学基金资助项目(2011Y203)

作者单位:313000 浙江省湖州市妇幼保健院病理科(邓再兴、陈莉萍、朱凯、赖世平);乳腺外科(纪存丽)

三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TN-BC)是指雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)和人表皮生长因子受体 2(HER-2)均为阴性(ER-/PR-/HER-2-)的乳腺癌,具有特殊的病理学特征和生物学行为,是近年来国内外研究热点^[1]。IMP3(Insulin-like growth II mRNA-binding protein 3)是胰岛素样生长因子 II mRNA 结合蛋白家族的一员。已有研究证明,IMP3 在肺癌、胰腺癌、肾癌、宫颈原位腺癌、肝癌、骨肉瘤、膀胱癌和子宫内膜浆液性癌等呈高表达^[2-4]。在肾癌、膀胱癌和子宫内膜浆液性癌中 IMP3 的表达与肿瘤的侵蚀性的生物学行为、进展、转移和预后不良相关^[2,4]。本研究采用免疫组化学方法分析 IMP3 在 TNBC 中的表达情况,并探讨其与临床病理特征和预后的关系。

资料与方法

1. 临床资料:收集湖州市妇幼保健院 2002 年 1 月~2011 年 12 月 62 例手术切除且有完整随访资料的 TNBC 患者,术前未行放化疗;TNBC 的判断标准为 ER, PR, HER-2 均为阴性的患者。所有标本经 4% 甲醛固定,石蜡包埋。患者年龄 29~81 岁,平均年龄 50.6 岁,中位年龄 48 岁。 ≤ 50 岁者 47 例, > 50 岁者 15 例。其中组织学分级 I 级 3 例, II 级 26 例, III 级 33 例。TNM 分期, I 期 13 例, II 期 28 例, III 期 21 例。肿瘤最大径 ≤ 2 cm 者 26 例, > 2 cm 者 36 例。淋巴结未转移 24 例(-), 转移 38 例(+). 并随机抽取此段时间在笔者医院治疗的 60 例非 TNBC 患者为对照组。诊断、分级及分期标准参照 2003 年 WHO 乳腺和女性生殖系统肿瘤病理学和遗传学^[5]。

2. 试剂及实验方法:所有标本均行 ER, PR, HER-2, Ki67, IMP3 染色。ER, PR, HER-2, Ki67 工作液试剂均为福州迈新公司产品, IMP3 原液试剂购自 Abcam 香港公司。采用 EnVision 二步法进行免疫组织化学染色。免疫组化操作如下:组织蜡块 4 μ m 连续切片,脱蜡,新配制的 3% 过氧化氢灭活内源性酶 15 min,微波炉加热 15 min,修复抗原,自然冷却。然后滴加非免疫羊血清以阻断组织中的非特异性结合,接着依次滴加一抗(鼠抗人 IMP3 单抗,稀释度 1:50)、二抗(羊抗鼠 IgG)、DAB 显色 3~5 min。苏木精复染,脱水,透明,中性树脂封片,显微镜下观察。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

3. 阳性结果判断:ER、PR 阳性为在浸润性乳腺癌细胞核中出现阳性着色;HER-2 判断以乳腺癌 HER-2 检测指南(2009 版)为标准,0 及 + 为阴性, ++ 及 +++ 为阳性;Ki67 阳性为细胞核内出现黄褐色颗粒,计算阳性细胞的百分比^[6]。IMP3 阳性为肿瘤细胞的胞质内出现黄褐色颗粒,0:无肿瘤细胞的胞质染色, + 至少 10% 的肿瘤细胞的胞质弱染色, ++ 至少 10% 的肿瘤细胞的胞质中等强度染色, +++ 至少 10% 的肿瘤细胞的胞质强染色。切片由 2 位高年资医生单独阅片。

4. 统计学方法:应用 SPSS 12.0 统计软件进行处理。计数资料采用 χ^2 检验, Kaplan-Meier 法绘制生存曲线, $P < 0.05$

为差异有统计学意义。

结 果

1. IMP3 蛋白表达的免疫组化结果:IMP3 蛋白阳性颗粒定位于细胞质,着色不均(图 1、图 2)。IMP3 在三阴性组和非三阴性组阳性表达率分别为 56.5% (35/62) 和 8.3% (5/60)。IMP3 在三阴性组和非三阴性组表达差异有统计学意义($P < 0.001$)。癌旁正常及增生的乳腺组织只在 2 例 IMP3 癌组织阳性者有弱阳性表达。

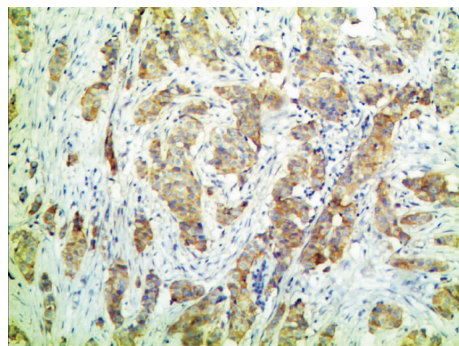


图 1 IMP3 表达于细胞质(EnVision, $\times 200$)

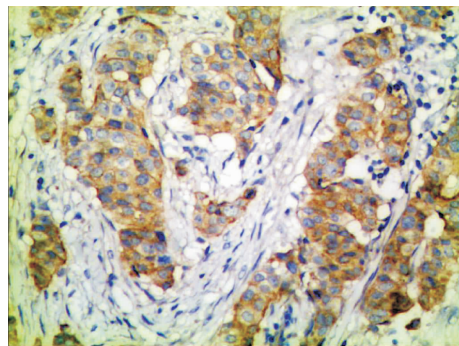


图 2 IMP3 表达于细胞质(EnVision, $\times 400$)

2. TNBC IMP3 的表达与临床病理特征间关系:IMP3 的表达与患者年龄、肿瘤大小、临床分期及淋巴结转移均无统计学意义,与组织学分级、Ki67 指数间有统计学意义, $P < 0.05$, 组织学分级越高及 Ki67 指数高者 IMP3 的表达越高(表 1)。

讨 论

乳腺癌是一类异质性的疾病,没有一个金标准适用于所有乳腺癌的治疗。传统的乳腺癌病理学分型以组织病理形态为基础,按肿瘤大小、TNM 分期和组织病理学分级进行分型,尽管淋巴结转移、组织学分级、激素表达、肿瘤基因如 HER-2、p53 基因突变等已认为与预后有关,但单个预后因素如何影响其生物学行为仍不十分清楚。近年来, TNBC 引起了研究者

表 1 TNBC IMP3 的表达与临床病理特征间关系 (n)

临床病理参数	n	IMP3		χ^2	P
		+	-		
年龄 (岁)					
≤50	47	26	21	0.010	0.750
>50	15	9	6		
肿瘤大小 (cm)					
≤2	26	14	12	0.124	0.725
>2	36	21	15		
组织学分级					
I	3	0	3	0.000*	
II	26	8	18		
III	33	27	6		
TNM 分期					
I	13	7	6	0.045	0.975
II	28	16	12		
III	21	12	9		
淋巴结转移					
无	24	13	11	0.083	0.773
有	38	22	16		
Ki67 指数					
≤25	14	2	12	13.078	0.000
>25	48	33	15		

* Fisher's Exact 法检验

的关注, TNBC 占全部乳腺癌的 10.0% ~ 17.0%, 常见于较为年轻的 (<50 岁) 绝经前妇女。TNBC 以侵袭性的临床表现为特征, 与其他类型相比, 有着较差的总生存率和无病生存期^[1]。

IMP3 基因于 1996 年首先在胰腺癌中发现, 随后在 1999 年分离成功^[7,8]。IMP3 与 IMP1、IMP2 均是胰岛素样生长因子 II (IGF II) mRNA 结合蛋白家族的一员, 1999 年首先从人类的横纹肌肉瘤细胞株中分离出来。该家簇成员在胚胎形成早期的 RNA 运输、稳定、细胞生长和迁移中起着重要作用。IGF II 的表达是间接通过 IMP3 蛋白和其他 IMP 家簇成员蛋白调控的。IGF II 过表达与多个器官系统的肿瘤的发病机制有关, 如 Beckwith - Wiedemann 综合征, 也与转基因小鼠模型乳腺癌、肝癌以及在病毒性肝炎小鼠模型的肝细胞癌发展有关。因此, 认为 IMP 家簇成员蛋白通过稳定 IGF II mRNA 而与致癌作用有关。然而, IMP 家簇成员蛋白结合并影响其他 mRNAs, 这也可影响细胞的恶性潜能^[9]。Vikesaa 等^[10]研究表明, IMP 家簇成员蛋白在肿瘤侵犯也起着非常重要的作用, 它们通过调节其他黏附分子包括 CD24、CD44、细胞黏附分子 (ALCAM、SynCAM、MCAM) 和基质金属蛋白酶 1 促进癌细胞黏附, 形成树突状伪足, 而出

现侵犯作用。IMP3 在人和鼠胚胎形成过程中, 可在发育中的上皮组织、肌肉和胎盘表达, 但在成人组织, 它的表达水平极低而难以检测^[8]。

Walter 等^[11]采用免疫组织化学方法检测 138 例乳腺癌患者肿瘤组织中 IMP3 的表达, 发现 IMP3 表达与乳腺癌的组织学分级、有无坏死、是否三阴性明显相关。IMP3 在高级别乳腺癌, TNBC 中表达率高, 认为 IMP3 可以作为在 TNBC 的一种新的标志物。本研究中的 62 例 TNBC 病例, IMP3 的表达率为 56.5%, 而非 TNBC 仅为 8.3%。多数研究表明^[2-4,11], IMP3 的高表达与肿瘤的增殖和高侵袭性相关。本研究中, IMP3 表达与组织学分级、Ki67 指数间有统计学意义, 组织学分级越高及 Ki67 指数高者 IMP3 的表达越高, 因组织学分级及 Ki67 指数与预后有关, 提示 IMP3 阳性表达者预后不良。TNBC 内分泌治疗和曲妥珠单抗的靶向治疗无效, 本研究表明, 该型乳腺癌高表达 IMP3 蛋白, 提示它有可能成为 TNBC 靶向治疗的一个新靶点^[1]。伴随乳腺癌的分子病理和基因分型的推广和采用, TNBC 越来越被关注, 这类乳腺癌具有自身独特的临床病理和分子生物学特征, 我们期待着这些临床研究能够为我们寻找更好的治疗方案, 从而改善基底细胞样型乳腺癌患者的治疗疗效和预后。

综上所述, TNBC 高表达 IMP3 蛋白, IMP3 蛋白与肿瘤的增殖和高侵袭性相关, 并有可能成为 TNBC 靶向治疗的潜在靶点。TNBC 检测 IMP3 蛋白, 有重要的临床意义, 更好地指导临床治疗及预测病人预后。

参考文献

- de Ruijter TC, Veeck J, de Hoon JP, *et al.* Characteristics of triple - negative breast cancer [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137(2): 183 - 192
- Sitnikova L, Mendese G, Liu Q, *et al.* IMP3 predicts aggressive superficial urothelial carcinoma of the bladder [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(6): 1701 - 1706
- Jiang Z. Prognostic biomarkers in renal cell carcinoma [J]. Expert Rev Mol Dign, 2007, 7(3): 293 - 307
- Zheng W, Yi X, Fadare O, *et al.* The oncofetal protein IMP3: a novel biomarker for endometrial serous carcinoma [J]. Am J Surg Pathol, 2008, 32(2): 304 - 315
- Tavassoli FA, Devilee P. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of breast and female genital organs [M]. Lyon: IARC Press, 2003: 10 - 23
- 《乳腺癌 HER2 检测指南 (2009 版)》编写组. 乳腺癌 HER2 检测指南 (2009 版) [J]. 中华病理学杂志, 2009, 38(12): 836 - 840
- Nielsen J, Christiansen J, Lykke - Andersen J, *et al.* A family of in-

sulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses trans-
lation in late development [J]. Mol Cell Biol, 1999;19(2): 1262 -
1270

8 Li C, Rock KL, Woda BA, *et al.* IMP3 is a novel biomarker for ade-
nocarcinoma in situ of the uterine cervix: an immunohistochemical
study in comparison with p16(INK4a) expression [J]. Mod Pathol,
2007,20(2):242-247

9 Li HG, Han JJ, Huang ZQ, *et al.* IMP3 is a novel biomarker to pre-
dict metastasis and prognosis of tongue squamous cell carcinoma [J].
J Craniofac Surg, 2011,22(6): 2022-2025

10 Vikesaa J, Hansen TV, Jonson L, *et al.* RNA-binding IMPs pro-
mote cell adhesion and invadopodia formation [J]. Embo J, 2006,25
(7):1456-1468

11 Walter O, Prasad M, Lu S, *et al.* IMP3 is a novel biomarker for triple
negative invasive mammary carcinoma associated with a more aggres-
sive phenotype [J]. Hum Pathol, 2009,40(11): 1528-1533

(收稿日期:2012-08-20)
(修回日期:2012-09-07)

人咽缩肌细胞体外复合培养的研究

陈静静 沈志森 竺亚斌 康 骋

摘 要 目的 探索人咽缩肌细胞体外培养的条件,观察其在相应的生物支架上生长情况,为体外构建人下咽肌组织瓣做前期研究。**方法** 取 9 例下咽癌志愿者癌旁正常的咽缩肌组织进行原代培养,当细胞传代至第 4 代时,将细胞接种于改性的 1mm³ 平面或立体凹槽聚氨酯(polyurethane, PU)生物支架上进行复合培养。通过倒置相差显微镜、免疫荧光和电镜观察鉴定细胞的形态及增殖、分化的状况。**结果** 咽缩肌最佳的体外培养条件是 37℃、5% CO₂ 孵箱环境,选择 DMEM 培养基并添加 20% 胎牛血清,采用组织块培养法可获得足够数目成活的咽缩肌细胞,此细胞在接枝丝素蛋白的凹槽 PU 支架上增殖分化良好并具备定向生长的能力,从而模拟了体内生长的状况。**结论** 组织块培养法获得的咽缩肌细胞与接枝丝素蛋白的凹槽 PU 支架复合培养时其生长状况佳,这为体外构建下咽组织瓣提供了一定的基础。

关键词 人咽缩肌 复合培养 生物支架 丝素蛋白

In vitro Culture of Human Musculus Constrictor Pharyngis Superior Cells for Tissue Engineering Research. Chen Jingjing, Shen Zhisen, Zhu Yabin, Kang Cheng. The Medical School of Ningbo University, Lihuili Hospital of Ningbo University, Zhejiang 315211, China

Abstract Objective To explore in vitro culture condition of human pharyngeal constrictors cell, observe its growth status in the polymeric scaffolds. **Methods** Human pharyngeal constrictors cells from body tissue of nine volunteers of hypopharyngeal carcinoma patients were isolated by explanting method. The 4th generation cells for growing on modified polyurethane (PU) scaffolds were collected with linearly aligned microgrooves. The cell morphology and the status of the proliferation and differentiation were identified by morphology observation and immunohistochemistry analysis. **Results** Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 20% foetal bovine serum (FBS) under conditions of 37℃, 5% CO₂ as the best condition for vitro culture. Silk fibroin (SF) grafting greatly improved scaffold's biological activity which led to the high cell biocompatibility. **Conclusion** The findings demonstrate that cells obtained from explanting method seeded on such scaffolds hold, which is promise for guiding human pharyngeal constrictors tissue construction.

Key words Human pharyngeal constrictors ; In vitro culture ; Polyurethane scaffold; Silk firbrin

头颈部恶性肿瘤是常见恶性肿瘤之一,约占全部恶性肿瘤患者的 8%。近年来,尽管医疗技术不断进步,咽喉癌为主体的头颈部恶性肿瘤发生率居高不下,总体生存率改善不明显^[1]。而目前咽喉肿瘤多

采用以手术为主的综合治疗,但是手术后往往伴随着咽喉头颈部组织缺损,吞咽、发音及呼吸功能的障碍,严重影响了患者尤其是中晚期患者的生存率与生存质量^[2]。咽缩肌组织是人体重要构件,其收缩和放松活动是人体完成吞咽的基础。各种外界刺激可引起肌组织的损伤及坏死,而肌组织修复能力有限,其修复是一个由外部力学因素和内部细胞因素两者共同协调完成的复杂且呈多阶段的过程,因此无法达到功能和解剖上的恢复,这极大的影响了人们的生

基金项目:浙江省杰出青年团队项目(R2101166);宁波市重大(重点)课题(2008C50019)
作者单位:315211 宁波大学医学院(陈静静、竺亚斌、康骋);
315040 宁波市医疗中心李惠利医院(沈志森)
通讯作者:沈志森,电子信箱:szs7216@163.com