

mRNA 和蛋白表达水平,发现转染后的肝癌细胞 TSPY1 mRNA 和蛋白表达水平比对照组明显升高。通过 CCK-8 细胞增殖实验进一步发现,过表达的 TSPY1 可以促进肝癌 Huh7 和 SMCC7721 细胞增殖,表明 TSPY1 在男性肝癌中起到促进其发生发展的作用。本研究初步探讨了 TSPY1 与肝癌间的联系,有助于肝癌病理机制的阐明,它很有可能是导致 HBV 相关肝细胞癌男女性别差异的重要因子,为肝癌的诊断和治疗研究提供新的靶点。

参考文献

- 1 El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and molecular carcinogenesis[J]. *Gastroenterology*, 2007,132(7): 2557-2576.
- 2 黄 珊. 乙型肝炎病毒相关肝细胞癌性别差异的蛋白质组学研究[D]. 广西医科大学, 2012.
- 3 Weissenbach J, Goodfellow PN, Smith KD. Report of the committee on the genetic constitution of the Y chromosome[J]. *Cytogenet Cell Genetics*, 1989,51(1-4):438-449.
- 4 Hertel JD, Huettner PC, Dehner LP, et al. The chromosome y-linked testis-specific protein locus tsyp1 is characteristically present in gonadoblastoma[J]. *Hum Pathol*, 2010,41(11):1544-1549.
- 5 Schnieders F, Dork T, Arnemann J, et al. Testis-specific protein, y-encoded(tspy) expression in testicular tissues[J]. *Hum Mol Genet*, 1996,5(11):1801-1807.
- 6 Lau YF, Li Y, Kido T. Gonadoblastoma locus and the TSPY gene on the human Y chromosome[J]. *Birth Defects Res C. Embryo Today*, 2009,87(1):114-122.
- 7 Kido T, Lau YF. The Y-located gonadoblastoma gene TSPY amplifies its own expression through a positive feedback loop in prostate cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014,446(1):206-211.
- 8 Oram SW, Liu XX, Lee TL, et al. TSPY potentiates cell proliferation and tumorigenesis by promoting cell cycle progression in HeLa and NIH3T3 cells[J]. *BMC Cancer*, 2006,6(1):154.
- 9 Kido T, Lau YF. The human y-encoded testis-specific protein interacts functionally with eukaryotic translation elongation factor eef1a, a putative oncoprotein[J]. *Int J Cancer*, 2008,123(7):1573-1585.
- 10 Yin YH, Li YY, Qiao H, et al. Tspy is a cancer testis antigen expressed in human hepatocellular carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2005,93(4):458-463.

[收稿日期 2014-03-26][本文编辑 黄晓红 韦 颖]

课题研究 · 论著

广西乳腺癌非前哨淋巴结转移相关影响因素分析及新转移预测模型的建立

罗 铭, 李 富, 何留生, 李天罡, 曾 健

基金项目: 广西卫生厅科研课题(编号:Z2008147)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学第一附属医院胃肠腺体外科

作者简介: 罗 铭(1986-), 男, 医学硕士, 研究方向: 乳腺与甲状腺疾病临床与基础研究。E-mail:15077194097@163.com

通讯作者: 曾 健(1965-), 男, 医学硕士, 主任医师, 教授, 研究方向: 乳腺与甲状腺的临床与基础研究。E-mail:zengjian125@hotmail.com

【摘要】 目的 回顾性分析与广西前哨淋巴结(SLN)阳性乳腺癌患者非前哨淋巴结(NSLN)癌转移相关的临床病理因素,建立预测模型量化 NSLN 的转移风险,使低危的 SLN 阳性患者避免不必要的腋窝淋巴结清扫(ALND)。方法 共有 83 例 SLN 阳性并行补充 ALND 的乳腺癌患者纳入该研究。对与 NSLN 转移相关的临床病理因素进行单因素及多因素分析,建立一个多变量的 NSLN 转移风险预测模型。并将新建模型运用于 83 例研究对象,计算受试者操作曲线下面积(AUC)评估该模型预测的准确度。连续变量用 Mann-Whitney U 检验,分类变量用 χ^2 检验或确切概率法。结果 肿瘤大小、肿瘤分级、有无血管淋巴管浸润、SLN 癌灶大小等四个影响因素在 logistic 回归分析中被证实是 NSLN 转移的独立预测因素,并纳入最终的 NSLN 转移预测模型。将新建模型运用于 83 例研究对象,AUC 为 0.832(95% CI=0.744~0.919)。结论 新建立的预测模型能较好地地区分广西乳腺癌 SLN 阳性患者 NSLN 有无肿瘤侵犯,但新建模型预测的准确度,仍需要进行前瞻性的中心内部验证及外部验证进行评估。

【关键词】 乳腺癌; 非前哨淋巴结; 风险预测模型

[中图分类号] R 737 [文献标识码] A [文章编号] 1674-3806(2014)06-0488-05

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2014.06.02

Analysis of variables predicting non-sentinel lymph node involvement in breast cancer patients from Guangxi and development of a new predictive model LUO Ming, LI Fu, HE Liu-sheng, et al. Department of Gastrointestinal Surgery, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To analyse the clinical pathologic factors predicting non-sentinel node (NSLN) involvement and develop a new model to quantify the risk of NSLN metastasis in sentinel lymph nodes (SLN)-positive breast cancer patients from Guangxi, in order to avoid unnecessary axillary lymph node dissection (ALND) in low-risk patients with positive SLN. **Methods** Eighty-three patients with positive sentinel lymph node biopsy (SLNB) followed by ALND were enrolled into our retrospective study. Univariate and multivariate analysis was used to identify variables predicting non-sentinel node involvement and a multivariable predictive model was developed. In order to assess the accuracy, new model was applied to the original series of 83 patients and the area under the receiver operating characteristic curve (AUC) was calculated. Distribution of continuous variables was analyzed using the Mann-Whitney U test, and the χ^2 test was used for categorical variables. **Results** Size of the primary tumor, histological grade, lymphovascular invasion and size of SLN metastasis were revealed to be independent predictors of NSLN involvement in multivariate logistic regression and included in the final predictive model. For the original series of 83 patients, the AUC was 0.832 (95% CI = 0.744 to 0.919). **Conclusion** In our study, new predictive tool was developed to assess the risk of additional axillary metastases after positive SLNB in breast cancer and represent considerable discrimination in our own population. but its accuracy needs to be assessed by prospective validation in both internal center and external centers.

[Key words] Breast cancer; Non-sentinel lymph node; Predictive model

腋窝淋巴结的状态不仅是判断乳腺癌患者预后的一个重要因素,而且还可以为患者辅助治疗计划的制定提供依据。因此,腋窝淋巴结分期一直是乳腺癌手术中非常重要的一部分。而腋窝淋巴结清扫 (ALND) 作为腋窝淋巴结分期及肿瘤局部控制的一种手段,存在着诸如血肿、感染、淋巴水肿等相关并发症的风险。前哨淋巴结活检 (SLNB) 因此被提出来作为明确淋巴结分期及减少术后并发症的一种手术方式。根据既往研究报道,有将近 20% ~ 40% 的乳腺癌患者在行 SLNB 后病理确认前哨淋巴结 (SLN) 为阳性。在 SLN 阳性的乳腺癌患者中,大约 40% ~ 60% 的病人并未发现非前哨淋巴结 (NSLN) 有癌细胞转移,对于这部分病人,行 ALND 可能会带来血肿、感染、淋巴水肿等手术并发症,且并不会得到额外的生存获益。本研究对广西 SLN 阳性乳腺癌患者的临床病理因素进行分析,建立 NSLN 转移风险预测模型,筛选出一部分虽有阳性 SLN 但其他 NSLN 同时存在肿瘤细胞转移的概率足够低的患者,使其避免不必要的腋窝清扫手术。

1 对象与方法

1.1 研究对象 通过广西医科大学第一附属医院电子病历系统检索 2011-07 ~ 2013-03 “前哨淋巴结活检术”相关资料,共检索出 278 例进行 SLNB 的乳

腺癌患者。纳入标准:(1) 女性;(2) 术前经细胞学涂片、穿刺病理活检或局部肿物切除证实为乳腺癌;(3) 术前体格检查患者患侧腋窝未触及肿大淋巴结;(4) 均行 SLNB, 并成功检出 SLN;(5) SLN 状态经术中冰冻切片或术后常规病理证实存在有肿瘤细胞转移;(6) 术中或术后行补充腋窝淋巴结清扫手术, NSLN 状态有明确的病理证实。排除标准:术前经过系统治疗如化疗、内分泌治疗、放射治疗的乳腺癌患者。278 例行 SLNB 的患者中共有 83 例符合纳入研究标准。

1.2 SLNB 方法 术中取 1% 的亚甲蓝 (methylthioninium) 2 ml 于乳晕边缘 3 点、6 点、9 点、12 点钟方向分别向皮下组织注射 0.5 ml, 并轻按压 5 ~ 10 min。沿腋窝中皮纹方向做一弧形切口长约 2.5 cm, 然后依次切开皮肤、皮下组织及筛板, 于胸外侧血管分支的后内侧分离显露蓝染的淋巴管, 蓝染淋巴管指向的淋巴结和蓝染的淋巴结, 均视为 SLN。术中触及可疑的淋巴结一并切除, 并归为 SLN。SLN 取出后进行术中冰冻切片, 冰残组织术后进行常规石蜡包埋切片 HE 染色。根据术中或术后病理结果, 判断是否补充行 ALND。

1.3 统计学方法 应用 SPSS16.0 统计软件进行数据处理。对临床病理特征进行单因素分析, 连续性

变量运用 Mann-Whitney U 检验,分类变量运用 χ^2 检验或确切概率法。对于单因素分析中 $P < 0.05$ 的变量纳入多因素 Logistic 回归分析。将 Logistic 回归分析中 $P < 0.1$ 的变量纳入最终的 NSLN 转移风险预测模型。

2 结果

83 例患者均为女性,其中行保乳手术 24 例,行乳房全切术 59 例;汉族 57 例(占 68.7%),壮族 24 例(占 28.9%),瑶族 1 例、仫佬族 1 例;33 例(39.8%)患者存在 NSLN 转移,其中汉族 23 例,壮族 10 例。根据单因素分析结果(见表 1),患者原发肿瘤大小、原发肿瘤分级、原发肿瘤有无血管淋巴管浸润、SLN 癌灶大小等影响因素与患者 NSLN 转移相关($P < 0.05$)。因此,将以上影响因素纳入 Logistic 回归分

析,根据多因素 Logistic 回归分析的结果(见表 2),以上 4 个影响因素均为 NSLN 转移的独立预测因素($P < 0.1$)。根据 Logistic 回归分析建立 NSLN 转移风险预测的数学模型, P 值代表 NSLN 转移的概率: $\text{Logit}(P) = -6.374 + 0.067 \times a + 1.103 \times b + 1.628 \times c + 1.244 \times d$ 。公式中的字母代表预测模型中相关的变量: a = 原发肿瘤的大小(单位 mm), b = 原发肿瘤组织学分级(1 级 = 1,2 级 = 2,3 级 = 3), c = 原发肿瘤有无血管淋巴管浸润(无 = 0,有 = 1), d = SLN 转移癌灶的大小(≤ 2 mm = 0, > 2 mm = 1)。将新建模型运用于 83 例研究对象,描绘出受试者操作曲线(ROC)(图 1)。经计算 ROC 曲线下面积为 0.832 (95% CI 0.744 ~ 0.919, $P = 0.000$);Hosmer 和 Lemeshow 拟合优度检验 $P = 0.529$ 。

表 1 NSLN 转移与无转移临床病理因素比较($n = 83$)

组 别	例数	中位年龄 (年)	肿瘤中位大小 (mm)	肿瘤位置(象限)					血管淋巴管浸润		多灶性		ER		PR	
				外上	外下	内上	内下	中央	是	否	是	否	阳性	阴性	阳性	阴性
NSLN 转移	33	50.0	30.0	20	4	6	1	2	28	5	7	26	20	13	21	12
NSLN 无转移	50	44.5	18.5	22	9	12	3	4	22	28	9	41	33	17	32	18
U/χ^2	-	620.5	509.5						13.849		0.132		0.251		0.001	
P	-	0.057	0.003				0.741 ^c		0.000		0.717		0.617		0.973	

组 别	例数	Her-2			Ki-67		“三阴” ^a		“三阳” ^b		原发肿瘤组织学分级			原发肿瘤组织学类型			SLN 转移癌灶大小	
		阳性	阴性	可疑	>14%	≤14%	是	否	是	否	1 级	2 级	3 级	导管癌	小叶癌	混合	>2 mm	≤2 mm
NSLN 转移	33	6	21	6	26	7	4	29	1	32	2	22	9	32	1	0	28	30
NSLN 无转移	50	12	34	4	38	12	5	45	2	48	14	31	5	48	0	2	5	20
U/χ^2	-	2.078			0.088		0.000		0.000		8.548						5.832	
P	-	0.354			0.767		1.000		1.000		0.014			0.302 ^c			0.016	

组 别	例数	SLN 包膜外浸润		SLN 检出数量			阳性 SLN 检出数量			阴性 SLN 检出数量			SLN 阳性率			
		是	否	1 枚	2 枚	≥3 枚	1 枚	2 枚	3 枚	0 枚	1 枚	2 枚	3 枚	0<R<0.5	0.5≤R<1	R=1
NSLN 转移	33	17	16	4	8	21	15	9	9	5	9	7	12	13	15	5
NSLN 无转移	50	17	33	4	7	39	29	13	8	6	8	4	32	29	14	7
U/χ^2	-	2.522						1.836								
P	-	0.112			0.354 ^c			0.399			0.076 ^c			0.208 ^c		

注:^a 雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、Her-2 均为阴性;^b 雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、Her-2 均为阳性;^c 运用确切概率法计算得到的 P 值

表 2 多因素 Logistic 回归分析结果

变 量	回归系数	标准误	Wald 值	P	OR	95% 可信区间	
						下限	上限
SLN 癌灶大小	1.244	0.690	3.252	0.071	3.469	0.898	13.408
原发肿瘤大小	0.067	0.028	5.615	0.018	1.945	1.122	3.372
组织学分级	1.103	0.517	4.550	0.033	3.013	1.094	8.303
血管淋巴管浸润	1.628	0.623	6.828	0.009	5.091	1.502	17.259
常数项	-6.374	1.566	16.567	0.000	0.002		

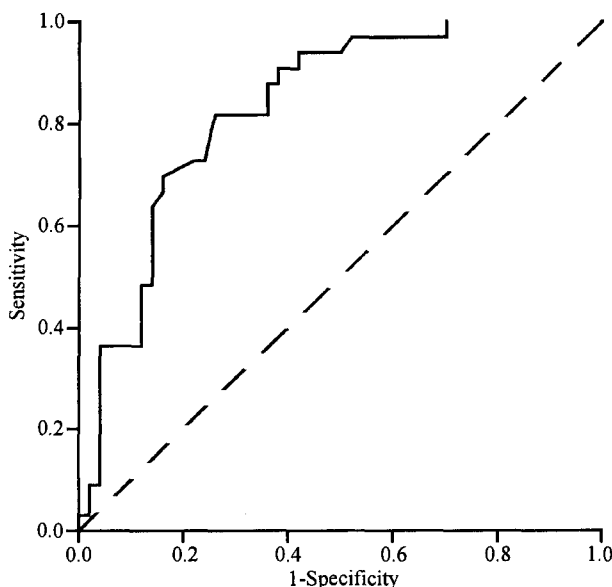


图 1 新建 NSLN 转移风险预测模型运用于 83 例研究对象的 ROC 曲线

3 讨论

3.1 乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤。对于早期的乳腺癌患者,较为保守的手术方式有利于降低术后的潜在并发症。SLNB 作为早期乳腺癌标准的腋窝处理方式被许多肿瘤中心所接受。SLNB 可以减少由 ALND 所造成的淋巴水肿、神经损伤、肩部活动受限、疼痛等术后并发症^[1]。既往研究表明 40% ~ 60% 的 SLN 阳性的患者,在 NSLN 中并未找到肿瘤细胞。在 ACOSOG Z0011 临床试验中发现,对于在保乳手术中发现 SLN 阳性的早期乳腺癌患者,以 SLNB 替代 ALND 在系统辅助治疗后并不损害患者的生存预后^[2]。以上证据说明,对于病理证实 SLN 阳性的乳腺癌特定人群,单纯行 SLNB 亦是可行的。

3.2 本研究新建立的模型是一个包含多变量的 logistic 回归模型,根据各个风险预测因素计算得出的概率估计患者 NSLN 的转移风险。Meretoja 等^[3]认为,以数学方程式作为预测模型能够更准确地预测 NSLN 的转移风险并且更易于整合入不同的计算平台,使模型的运用变得更为便利。

3.3 在单因素分析中,对年龄这个因素进行分析后发现,NSLN 癌转移病人的中位年龄大于 NSLN 无癌转移病人, $P = 0.057$, 接近 0.05 的检验水准。这是提示老年女性乳腺癌患者可能为 NSLN 转移的高发人群,查阅患者原始病历发现,研究纳入的病例老年乳腺癌患者的病史往往较长,由于地域及文化程度的原因,不少老年乳腺癌患者不能做到早期诊断,这可能解释为什么 NSLN 癌转移病人的中位年龄大于无 NSLN 癌转移病人。先前有研究将阳性 SLN 个数

与阴性 SLN 个数作为 NSLN 转移风险的预测因素^[3,4]。在本研究中,阳性 SLN 个数与阴性 SLN 个数的 P 值均未达到 0.05 的检验水准,未纳入多因素分析。

3.4 在多因素分析中,共有 4 个相关的临床病理因素在 Logistic 回归分析中具有统计学意义并最终纳入新建立的风险预测模型,包括组织学分级、肿瘤的大小、血管淋巴管浸润及 SLN 转移癌灶大小。组织学分级是英国剑桥预测模型^[5]中三大预测因素之一,与 NSLN 转移密切相关。van la Parra RF 等^[6]在 2011 年发表的荟萃分析结果表明,肿瘤大小、血管淋巴管浸润及 SLN 转移癌灶大小等因素是与 NSLN 转移相关的预测因素,且相对危险度较高 ($OR > 2$)。

3.5 将新建模型运用于 83 例研究对象,描绘出 ROC 曲线(图 1)。经计算 ROC 曲线下面积为 0.832 (95% CI 0.744 ~ 0.919, $P = 0.000$),说明新建立的风险预测模型能够较好地预测 NSLN 有无癌转移。Hosmer 和 Lemeshow 拟合优度检验表明新建模型的拟合度较好 ($P = 0.529$)。

3.6 在 NSLN 转移风险预测模型真正进入临床使用之前,需要确定截断点将低危的不需行 ALND 的阳性 SLN 患者区分出来。在 NSABP B-32^[7] 临床试验中,SLN 活检的假阴性率为 9.8%;因此 Kai Chen 等主张将 NSLN 转移风险预测模型的假阴性率控制在 10% 以内^[8],即风险预测值低于截断点的 SLN 阳性乳腺癌患者,其 NSLN 状态的预测结果判定为阴性,且假阴性率不高于 10%,使得临床医生及患者能够接受。当新建模型截断点取 24% 时,假阴性 3 例,假阴性率为 9.09%,成功预测 NSLN 阴性患者 19 例。运用新建立的 NSLN 转移风险预测模型,可以使 38% 的患者避免行 ALND,而假阴性率并不高于 SLN 阴性的患者。

3.7 本研究新建立的预测模型能较好地地区分广西乳腺癌 SLN 阳性患者 NSLN 有无肿瘤侵犯。但新建模型预测的准确度,仍需要进行前瞻性中心内部验证及外部验证进行评估。

参考文献

- 1 Latosinsky S, Dabbs K, Moffat F. Canadian Association of General Surgeons and American College of Surgeons Evidence-Based Reviews in Surgery. 27. Quality-of-life outcomes with sentinel node biopsy versus standard axillary treatment in patients with operable breast cancer. Randomized multicenter trial of sentinel node biopsy versus standard axillary treatment in operable breast cancer: the ALMANAC Trial[J]. Can J Surg, 2008, 51(6): 483-485.
- 2 Giuliano AE, McCall L, Beitsch P, et al. Locoregional recurrence af-

- ter sentinel lymph node dissection with or without axillary dissection in patients with sentinel lymph node metastases: the American College of Surgeons Oncology Group Z0011 randomized trial [J]. *Ann Surg*, 2010, 252(3): 426-432.
- 3 Meretoja TJ, Leidenius MH, Heikkilä PS, et al. International multi-center tool to predict the risk of nonsentinel node metastases in breast cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2012, 104(24): 1888-1896.
- 4 Perhacek A, Perme MP, Hocevar M, et al. Ljubljana nomograms for predicting the likelihood of non-sentinel lymph node metastases in breast cancer patients with a positive sentinel lymph node [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, 119(2): 357-366.
- 5 Pal A, Provenzano E, Duffy SW, et al. A model for predicting non-sentinel lymph node metastatic disease when the sentinel lymph node is positive [J]. *Br J Surg*, 2008, 95(3): 302-309.
- 6 van la Parra RF, Peer PG, Ernst MF, et al. Meta-analysis of predictive factors for non-sentinel lymph node metastases in breast cancer patients with a positive SLN [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2011, 37(4): 290-299.
- 7 Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, et al. Technical outcomes of sentinel-lymph-node resection and conventional axillary-lymph-node dissection in patients with clinically node-negative breast cancer: results from the NSABP B-32 randomised phase III trial [J]. *Lancet Oncol*, 2007, 8(10): 881-888.
- 8 Chen K, Zhu L, Jia W, et al. Validation and comparison of models to predict non-sentinel lymph node metastasis in breast cancer patients [J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(2): 274-281.
- [收稿日期 2014-04-11][本文编辑 刘京虹 吕文娟]

课题研究 · 论著

腺病毒过表达及 siRNA 干扰人肝癌 HepG2 细胞对 11 β -羟基类固醇脱氢酶 I 表达的影响

隋靖喆, 李国平, 李 山

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81060199)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学第一附属医院检验科(隋靖喆, 李 山); 100730 北京, 国家卫计委北京老年医学研究所生化室(李国平)

作者简介: 隋靖喆(1986-), 女, 研究生学历, 硕士学位, 检验技师, 研究方向: 肝癌的发生机制。E-mail: 236149848@qq.com

通讯作者: 李 山(1962-), 男, 医学博士, 教授, 研究方向: 肝癌的蛋白组学等。E-mail: lis8858@126.com

[摘要] 目的 观察腺病毒(Ad-11 β -HSD1)过表达系统及特异性 siRNA(siRNA-11 β -HSD1)干扰人肝癌 HepG2 细胞对 11 β -羟基类固醇脱氢酶 I(11 β -HSD1)表达的影响。方法 应用 Ad-11 β -HSD1 以及 siRNA-11 β -HSD1 转染人肝癌 HepG2 细胞, 用实时荧光定量 PCR 及 Western Blot 检测 11 β -HSD1 表达。结果 转染 72 h 后, 对照组及腺病毒过表达组细胞中均可见明显 GFP 荧光, 且转染 48 h 后蛋白水平明显升高; siRNA 干扰 48 h 后, mRNA 及蛋白水平均明显降低。结论 腺病毒转染可有效过表达 11 β -HSD1, 而 siRNA 干扰可有效抑制 11 β -HSD1 表达。

[关键词] HepG2; 腺病毒; siRNA 干扰; 11 β -羟基类固醇脱氢酶 I

[中图分类号] R 44 [文献标识码] A [文章编号] 1674-3806(2014)06-0492-04

doi: 10.3969/j.issn.1674-3806.2014.06.03

The effects of overexpression and siRNA interference of the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 on the expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase I SUI Jing-zhe, LI Guo-ping, LI Shan. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To design a adenovirus vector based system and specific siRNA for exploring the effects of overexpression and siRNA interference of the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 on the expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase I. **Methods** A adenovirus overexpression vector and specific siRNA targeting the 11 β -HSD1 gene was designed and transfected into HepG2 cells. Expression of 11 β -HSD1 mRNA and