

- [J]. 内蒙古医学杂志, 2008, 40(10): 1247-1248.
- 19 刘锦宏, 毕慧玲, 李锐, 等. 精子动态与形态学关系及其临床应用价值[J]. 实用医技杂志, 2010, 17(3): 206-207.
- 20 冯播. 精子形态与精子活力、精子运动参数之间的关系[J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(28): 4592-4594.
- 21 汤洁, 张宁, 丁小平, 等. 精子形态学分析与动态分析中各参数间相关性研究[J]. 数理医药学杂志, 2002, 15(4): 315-316.
- 22 Katz DF, Diel L, Overstreet JW. Differences in the movement of morphologically normal and abnormal human seminal spermatozoa [J]. Biol Reprod, 1982, 26(4): 566-570.
- 23 熊承良, 吴明章, 刘继红, 等主编. 人类精子学[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2002: 2-8.
- [收稿日期 2015-05-28][本文编辑 吕文娟]

课题研究 · 论著

转化生长因子- $\beta 1$ 在乳腺纤维腺瘤中的表达及意义

郭巨江, 廖洪叶, 翁一尹, 郑良楷

基金项目: 厦门市科技计划社会发展项目(编号: 3502Z20114025)

作者单位: 361003 福建, 厦门市妇幼保健院乳腺外科

作者简介: 郭巨江(1973-), 男, 医学博士, 副主任医师, 研究方向: 乳腺疾病的诊治。E-mail: 3203095861@qq.com

[摘要] **目的** 研究转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 在乳腺纤维腺瘤组织以及其周围正常组织中的表达状况, 探讨其在乳腺纤维腺瘤发病中的作用。**方法** 标本来源为该科接受肿物切除术后病理诊断为乳腺纤维腺瘤的组织标本。收集新鲜组织标本 20 例(每例含肿瘤组织以及周围正常组织)液氮保存, 采用逆转录定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测 TGF- $\beta 1$ mRNA 表达水平。所获实验数据以 Student's *t* 检验进行统计分析。**结果** RT-qPCR 结果显示乳腺纤维腺瘤组织中 TGF- $\beta 1$ mRNA 的表达水平高于瘤旁正常组织($P=0.004$)。**结论** 乳腺纤维腺瘤组织中 TGF- $\beta 1$ mRNA 的表达水平高于瘤旁组织, 显示 TGF- $\beta 1$ 作为重要的间质发育的因子, 也参与了纤维腺瘤的形成过程, 其确切的作用过程仍待进一步的研究。

[关键词] 乳腺; 纤维腺瘤; 转化生长因子- $\beta 1$ **[中图分类号]** R 737.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2016)05-0383-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2016.05.05

The expression of TGF- $\beta 1$ and its clinical significances in female breast fibroadenoma GUO Ju-jiang, LIAO Hong-ye, WENG Yi-yin, et al. Department of Breast Surgery, the Maternal and Child Health Care Hospital of Xiamen, Fujian 361003, China

[Abstract] **Objective** To study the expression of transforming growth factor - beta 1 (TGF- $\beta 1$) and its clinical significances in female breast fibroadenoma. **Methods** Twenty pairs of fresh tissue specimens including the tumor tissue and the matched normal tissue were collected from the female patients with breast fibroadenoma and were preserved in liquid nitrogen. The reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the levels of TGF- $\beta 1$ mRNA in the samples. Student's *t*-test was used to analyze the data. **Results** The expression of TGF- $\beta 1$ mRNA was significantly elevated in the breast fibroadenoma tissues than that in the normal tissues ($P=0.004$). **Conclusion** As an important factor for the development of stroma, TGF- $\beta 1$ is involved in the formation process of fibroadenoma.

[Key words] Breast; Fibroadenoma; TGF- $\beta 1$

从病理特点看, 乳腺纤维腺瘤是一种向间质和上皮双向分化的良性肿瘤, 以间质纤维增殖占优势。从雌激素作用的信号通道可以看出, 雌激素发挥效

应需要通过与受体结合形成复合物, 然后在共调节因子的作用下启动相关基因的转录, 合成相应的细胞蛋白质调解细胞的生长代谢^[1,2]。激素受体的免

疫组织化学染色乳腺纤维腺瘤雌激素受体在上皮组织中高表达,而间质中并未发现雌激素受体的表达,说明雌激素对间质的增殖作用很有可能是间接通过细胞因子来实现。本文研究转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 在乳腺纤维腺瘤组织及其周围正常组织中的表达状况,探讨其在乳腺纤维腺瘤发病中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2014-05 ~ 2014-06 就诊于我院经手术证实为纤维腺瘤的病例共 20 例,患者均为女性,平均年龄 24.2 岁,平均肿瘤大小 2.67 cm。

1.2 取材方法 肿物及周边正常组织离体后 10 min 内切成约 0.5 g 的组织条标志好立即放入液氮罐保存。其余肿物及周边正常组织离体后以 4% 福尔马林固定液浸泡后送常规病理检查。

1.3 实验方法 (1) RNA 提取和质量检测:将组织进行匀浆,两相分离, RNA 沉淀及 RNA 清洗,重新溶解 RNA 沉淀,获得的 RNA 溶液保存于 -70°C , 紫外吸收测定法进行 RNA 浓度及纯度检测。(2) 变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性:制胶后,制备 RNA 样品至终浓度为 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$,加热至 70°C 孵育 5 min 使样品变性。电泳后于紫外透射光下观察并拍照。(3) cDNA 合成:以 mRNA 为模板, oligo (dT) 作为引物,在逆转录酶的催化下合成与 mRNA 互补的 cDNA 链。(4) 实时定量 PCR (Real-time-

qPCR):针对每一需要测量的基因和管家基因,选择一确定表达该基因的 cDNA 模板进行 PCR 反应。所有实验均重复至少 3 次。

1.4 Rt-qPCR 结果分析与计算 各样品的目的基因和管家基因分别进行 Rt-qPCR 反应。根据绘制的梯度稀释 DNA 标准曲线,各样品目的基因和管家基因的浓度结果直接由机器生成。每个样品的目的基因浓度除以其管家基因的浓度,即为此样品此基因的校正后的相对含量。

1.5 统计学方法 应用 SPSS16.0 (SPSS Inc, USA) 统计软件包进行数据分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用 Student's *t* 检验进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 样品 RNA 抽提的电泳结果 从液氮罐中取出保存的冻存组织标本,按照 RNA 抽提方法步骤,经组织匀浆、两相分离、RNA 沉淀等步骤收获 RNA 样本,将所得 RNA 一部分保存于 -80°C 冰箱,一部分用于 RNA 质量检测。所抽提 RNA 电泳结果表明,所有标本的 RNA 均呈现 3 条带,其中 28s 和 18s 核糖体 RNA 条带没有发生弥散且非常亮,28s 条带密度大约是 18s 条带密度的 2 倍(见图 1)。该结果表明,标本存储完好, RNA 完整性得到较好的保存,能够满足 RT-PCR 实验要求。

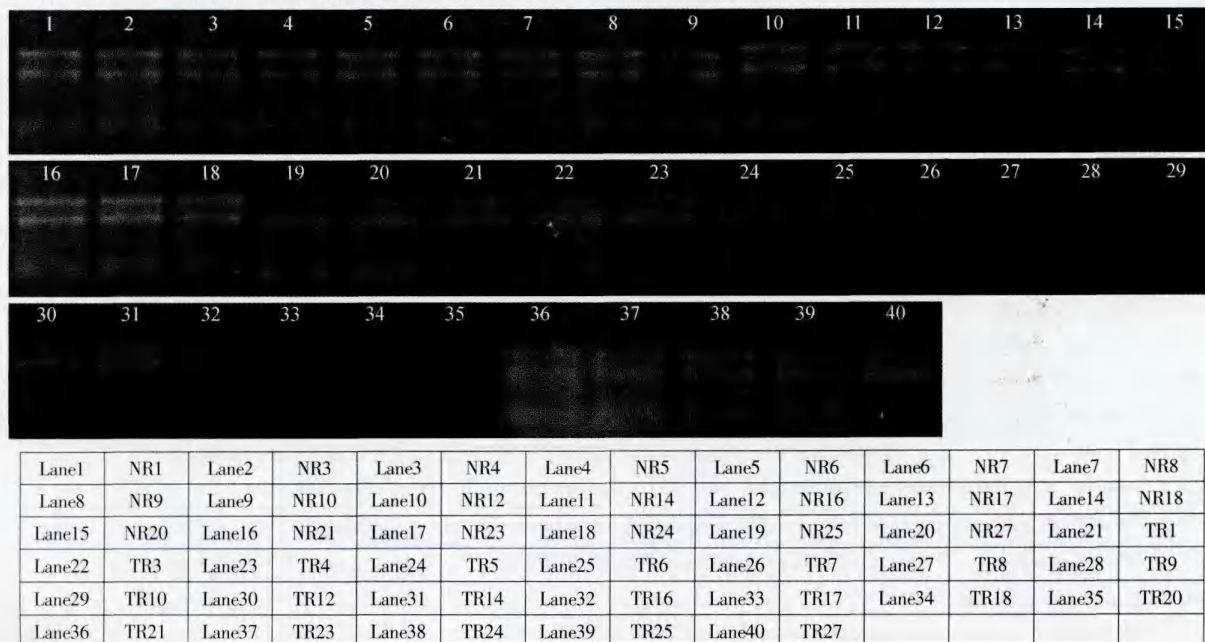


图 1 RNA 凝胶变性电泳图

2.2 TGF- $\beta 1$ 、GAPDH 标准样品的实时扩增曲线和标准曲线 收集新鲜的纤维腺瘤组织及其周围正常

组织迅速转移至液氮中保存,用于 RNA 抽提,所得 RNA 逆转获得第一链 cDNA,以第一链 cDNA 为模

版,实时检测 TGF- β 1 及 GAPDH 扩增过程中的荧光值绘制扩增曲线图(见图 2,3)。进行荧光定量 PCR 扩增。扩增反应结束后,分别以 TGF- β 1、GAPDH 起始模板浓度作为 x 轴,Ct 值为 y 轴作回归曲线,制作标准曲线。见图 4,5。

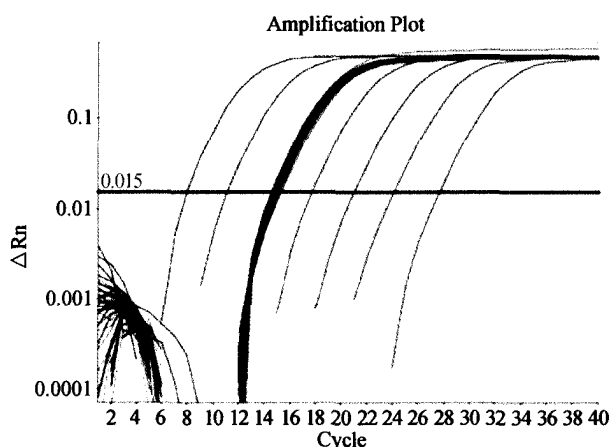


图 2 GAPDH 实时扩增曲线图

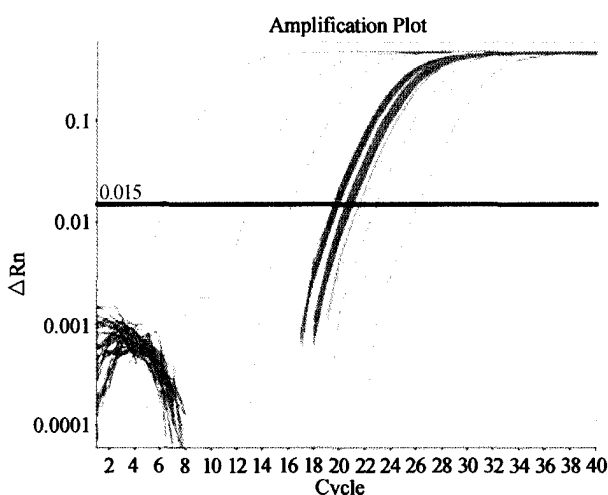
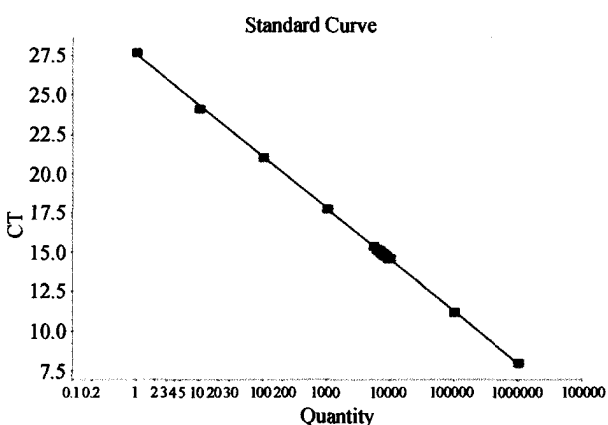
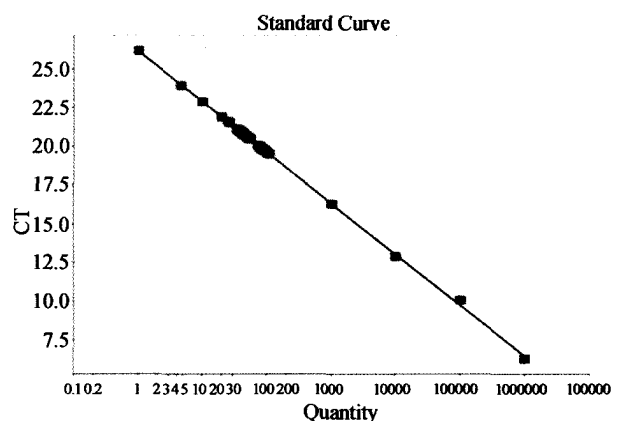


图 3 TGF- β 1 实时扩增曲线图



Target: Target 1 Slope: - 3.274 Y-Inter: 27.565 R^2 : 1 EFF%: 102.057 Error:0.02

图 4 GAPDH 标准曲线图



Target: Target 1 Slope: - 3.291 Y-Inter: 26.177 R^2 : 0.999 EFF%: 101.303 Error:0.034

图 5 TGF- β 1 标准曲线图

2.3 纤维腺瘤组织及其周围正常组织的 TGF- β 1 表达比较 PCR 检测结果表明,在纤维腺瘤组织及其周围正常组织中均能检测到 TGF- β 1 的表达,纤维腺瘤组织中 TGF- β 1 的基因拷贝数高于周围正常组织($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 纤维腺瘤组织及其周围正常组织的 TGF- β 1 表达比较($\bar{x} \pm s$)

样品分组	例数	GAPDH	TGF- β 1	TGF- β 1/GAPDH
纤维腺瘤组织	20	$(7.56 \pm 0.75) \times 10^3$	$(0.62 \pm 0.2) \times 10^2$	$(8.23 \pm 2.67) \times 10^{-3}$
周围正常组织	20	$(7.06 \pm 0.78) \times 10^3$	$(0.43 \pm 0.2) \times 10^2$	$(6.20 \pm 2.67) \times 10^{-3}$
<i>t</i>	-	2.066	3.004	2.404
<i>P</i>	-	0.045	0.004	0.021

3 讨论

3.1 转化生长因子 TGF- β 1 具有调节细胞生长、分化、凋亡和迁移的多种功能,能使正常的成纤维细胞的表型发生转化,并使细胞生长失去密度依赖的抑制作用,从而呈现过度生长^[3]。TGF- β 对间质起源的细胞起刺激作用,多种促进纤维增殖的因子均通过 TGF- β 1 信号通道在间质纤维组织增殖过程中发挥重要作用,如骨折修复^[4]、肺脏纤维化^[5]等。孙慧娟^[6]发现 miR-200c 能明显抑制人瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖及胶原合成,其机制可能与抑制 TGF- β 1 细胞外信号调节激酶等通路相关。TGF- β 1 促进乳腺纤维腺瘤间质细胞生长尚未有明确的研究报道。

3.2 在其他脏器纤维化的研究中发现,雌激素在 TGF- β 1 的分泌中扮演着很重要的角色,雌激素可能调控了 TGF- β 1 的产生与分泌,通过 TGF- β 1 促进间质细胞生长。有报道人工周期能减轻宫腔粘连程度,可能与人工周期降低了 TGF- β 1 的表达,减少细胞外基质的沉积有关^[7]。有实验显示大鼠成骨细

胞增殖随着雌激素浓度的增高, TGF- β 1 基因的表达也增高^[8], 有研究 Hela 细胞在淋球菌作用下合成 TSLP 和 TGF- β 增加, 提示雌、孕激素可促进淋球菌诱导的 TSLP 和 TGF- β 合成^[9]。中药二丁二仙汤可能通过上调雌激素水平及下调肾组织局部雌激素受体表达, 从而抑制肾组织纤维化^[10]。Loureiro 等^[11]使用体外和动物模型的方法证实了他莫昔芬抑制了腹膜纤维化疗效。以上研究均提示 TGF- β 1 可能介导雌激素效应在多脏器纤维化中的作用。

3.3 乳腺纤维腺瘤好发于生育期年龄女性, 认为纤维腺瘤的发生与雌激素刺激过度、孕激素水平不足有关^[12], 雌激素发挥作用主要是通过与其核受体结合而起作用, 国内也有大量的报告提示纤维腺瘤腺上皮的性激素受体强表达^[13-15]。Hinshelwood 等^[16]认为 TGF- β 1 在组织生长、修复及恶性转化过程中起重要的负性调节作用, 认为 TGF- β 1 作用于自分泌和旁分泌途径抑制乳腺导管上皮分化, 作者假设如果雌激素可以调控 TGF- β 1/Smad3 信号通路以促进乳腺间质细胞的增殖, 而 TGF- β 1 也促进 ER 的活性, 这符合纤维腺瘤间质纤维组织过度增殖, 过度增殖的纤维间质结缔组织对周围的乳腺腺管包裹、挤压, 变形, 正常的小叶形态消失, 呈现腺泡和导管呈裂隙状而间质纤维组织极度丰富的纤维腺瘤典型镜下特征。

3.4 雌激素、转化生长因子等在乳腺上皮及间质的稳态平衡中起重要的调节作用, 目前对雌激素受体、辅助调节因子 TGF- β 1 的研究主要集中在乳腺癌细胞, 尚无乳腺纤维腺瘤雌激素受体及 TGF- β 1 表达状况的报道, 本实验采用 PT-PCR 方法检测 TGF- β 1, 纤维腺瘤的 TGF- β 1 与激素的相互作用机制尚不明确, 还需要进一步的深入研究。

3.5 乳腺纤维腺瘤组织中 TGF- β 1 mRNA 的表达水平高于瘤旁组织, 显示 TGF- β 1 作为重要的间质发育的因子也参与了纤维腺瘤的形成过程, 其确切的作用过程仍待进一步的研究。

参考文献

1 Tanos T, Rojo LJ, Echeverria P, et al. ER and PR signaling nodes dur-

- ing mammary stand development [J]. *Breast Cancer Res*, 2012, 14 (4): 210.
- 2 Watson CJ, Olivera CH, Khaled WT. Cytokine signalling in mammary gland development [J]. *J Reprod Immunol*, 2011, 88 (2): 124 - 129.
- 3 Borthwick LA, Gardner A, De Soyza A, et al. Transforming growth Factor- β 1 (TGF- β) driven epithelial to mesenchymal transition (EMT) is accentuated by tumour necrosis factor α (TNF α) via crosstalk between the SMAD and NF-kappa pathways [J]. *Cancer Microenviron*, 2012, 5 (1): 45 - 57.
- 4 De Mattos CB, Binitie O, Dormans JP. Pathological fractures in children [J]. *Bone Joint Res*, 2012, 1 (10): 272 - 280.
- 5 Cho SJ, Weiden MD, Lee CG. Chitotriosidase in the pathogenesis of inflammation, interstitial lung diseases and COPD [J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2015, 7 (1): 14 - 21.
- 6 孙慧娟. miR-200c 抑制人瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖和胶原合成的研究. [J]. *临床皮肤科杂志*, 2013, 42 (4): 210 - 213.
- 7 何英新, 唐彩霞, 刘 珏, 等. 人工周期对宫腔粘连患者子宫内膜中 MMP-9 和 TGF- β 1 表达的影响 [J]. *重庆医学*, 2014, 43 (2): 167 - 169.
- 8 薛 歆, 董 进. 雌激素对成骨细胞增殖及 TGF- β 1、IGF-1 mRNA 表达的影响. [J]. *中国医药指南*, 2013, 11 (14): 88 - 90.
- 9 许 莉, 曾志良, 陈宏翔, 等. 雌、孕激素对淋球菌诱导的 Hela 细胞 TSLP 和 TGF- β 表达的影响. [J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2014, 28 (5): 448 - 450.
- 10 顾向晨, 徐震宇, 陈 敏, 等. 二丁二仙汤对去势反复尿路感染大鼠模型肾组织 TGF- β 1、 α -SMA 和雌激素受体表达的影响 [J]. *浙江中医杂志*, 2014, (2): 140 - 143.
- 11 Loureiro J, Sandoval P, Del PG, et al. Tamoxifen ameliorates peritoneal membr damage by blocking mesothelial to mesenchymal transition in peritoneal dialysis. [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (4): e61165.
- 12 El-wakeel H, Umpleby HC. Systematic review of fibroadenoma as a risk factor for breast cancer [J]. *Breast*, 2003, 12 (5): 302 - 307.
- 13 马守霞, 张玉洲, 李 彬. 性激素水平及 ER、PR 表达与乳腺纤维腺瘤的关系 [J]. *中国实用医刊*, 2014, 41 (7): 63 - 64.
- 14 黄婉文, 陶世明, 房惠琼, 等. 乳腺纤维腺瘤雌、孕激素受体的表达 [J]. *山东医药*, 2009, 49 (16): 57 - 58.
- 15 徐 红, 赵峰霞, 杨凯平, 等. 乳腺良、恶性疾病与血清雌、孕激素及雌孕激素受体的关系 [J]. *中华临床医师杂志 (电子版)*, 2013, 7 (12): 5275 - 5278.
- 16 Hinshelwood RA, Hushschscha LI, Melki J, et al. Concordant epigenetic silencing of transforming growth factor-beta signaling pathway genes OCCUrs early in breast carcinogenesis [J]. *Cancer Res*, 2007, 67 (24): 11517 - 11527.

[收稿日期 2015-09-18] [本文编辑 韦 颖]