

Secreted Frizzled-Related Protein 2 Expression in Canine Mammary Gland Tumors

Nusara Suwannachot¹ Suttisak Nopwinyoowong¹ Suthida Chanlun¹ Thanakarn Nasri^{1*}

Abstract

Objective - To evaluate the expression of Secreted Frizzled-Related Protein 2 (SFRP 2) in normal canine mammary gland and mammary gland tumors. SFRP 2 is a cell signaling protein, associated in inhibiting Wnt-Frizzle signaling pathways, plays a role in cell proliferation, anti-apoptosis and oncogenesis.

Material and method - Eighty samples of normal canine mammary gland and mammary gland tumors including mammary adenoma, mammary adenocarcinoma, mixed mammary gland tumor and mammary fibrosarcoma were selected at the Animal Diagnostic Unit, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, during 2008-2013. All tissues were fixed in 10% neutral buffered formalin, embedded in paraffin blocks, cut 5 µm. thick, immunohistochemically stained for SFRP 2.

Result - SFRP 2 expressed significantly in mammary gland tumors: mammary adenoma, mammary adenocarcinoma and mixed mammary gland tumor ($p < 0.05$) compared with normal mammary gland and mammary fibrosarcoma.

Conclusion - SFRP 2 is significantly expressed in mammary adenoma, mammary adenocarcinoma and mixed mammary gland tumor, but not found in mammary fibrosarcoma. It could not be used as tumor diagnostic marker for canine mammary gland tumors.

Keywords: Immunohistochemistry, Canine Mammary Gland Tumor

¹Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002.

*Corresponding author E-mail: tanakarn@kku.ac.th

การแสดงออกของโปรตีน Secreted Frizzled-Related Protein 2 ในเนื้องอกเต้านมสุนัข

นุสรา สุวรรณโชติ¹ สุทธิศักดิ์ นพวิญญวงส์¹ สุธิดา จันทรลุน¹ ธนาคาร นะศรี^{1*}

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อประเมินการแสดงออกของโปรตีน Secreted Frizzled-Related Protein 2 (SFRP 2) ในเนื้อเยื่อเต้านมปกติและเนื้องอกเต้านมในสุนัข โดย SFRP 2 เป็น Cell signaling protein ชนิด Extracellular antagonist ที่ทำการขัดขวางสัญญาณการกระตุ้นเซลล์ผ่าน Wnt-Frizzle signal transduction pathways ผลของการขัดขวางจะทำให้เซลล์เกิดการเพิ่มจำนวน เกิดเนื้องอก และเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการตายของเซลล์แบบ apoptosis

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ ทำการคัดเลือกตัวอย่างเนื้อเยื่อเต้านมปกติและเนื้องอกเต้านมของสุนัข ซึ่งแบ่งออกเป็นชนิด Mammary adenoma Mammary adenocarcinoma Mixed mammary gland tumor และ Mammary fibrosarcoma ที่ส่งมาชันสูตรที่หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นในช่วง พ.ศ. 2551-2556 จำนวน 80 ตัวอย่าง ที่ทำการตรึงชิ้นเนื้อด้วยฟอร์มาลีน 10% ฝังชิ้นเนื้อในบล็อกพาราฟิน ตัดชิ้นเนื้อให้มีความหนา 5 ไมโครเมตร และย้อมสีพิเศษด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสำหรับโปรตีน SFRP 2

ผลการศึกษา พบโปรตีน SFRP 2 ในเนื้องอกเต้านมชนิด Mammary adenoma Mammary adenocarcinoma และ Mixed mammary gland tumor อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อเต้านมปกติ และ Mammary fibrosarcoma

ข้อสรุป เนื้องอกเต้านมสุนัขชนิด Mammary adenoma Mammary adenocarcinoma และ Mixed mammary gland tumor มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของโปรตีน SFRP 2 แต่ไม่พบ SFRP 2 ใน Mammary fibrosarcoma และ SFRP 2 ไม่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นวิธีวินิจฉัยเนื้องอกเต้านมสุนัขได้

คำสำคัญ: อิมมูโนฮิสโตเคมี เนื้องอกเต้านมสุนัข

¹ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

*ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ อีเมลล์: tanakarn@kku.ac.th

บทนำ

เนื้องอกเต้านมเป็นเนื้องอกที่มีความสำคัญในสุนัขเพศเมีย มีรายงานพบมากเป็นอันดับสองรองจากเนื้องอกของผิวหนังในสุนัข [1] เนื้องอกเต้านมจะพบได้น้อยในสุนัขที่มีอายุน้อยกว่า 4 ปี และมีโอกาสพบมากขึ้นในสุนัขที่มีอายุปานกลางถึงอายุมาก โดยเฉพาะสุนัขที่มีอายุระหว่าง 10-11 ปี [2] มีรายงานอัตราการเกิดเนื้องอกเต้านมลดลงในสุนัขเพศเมียที่ทำหมันก่อนถึงวัยเจริญพันธุ์ ในขณะที่สุนัขเพศเมียที่คุมกำเนิดโดยการฉีดฮอร์โมน มีโอกาสการเกิดเนื้องอกเต้านมสูงขึ้น [3] เนื้องอกเต้านมสุนัขประมาณครึ่งหนึ่งจะเป็นเนื้องอกเต้านมชนิดรุนแรง [2,3] ชนิดเซลล์เนื้องอกอาจจะเป็นเซลล์เยื่อของต่อมสร้างน้ำนมหรือเซลล์ค้ำจุนเต้านมก็ได้ ส่วนอาการสุนัขที่เกิดเนื้องอกเต้านม อาจะพบก้อนเนื้อที่เต้านมก้อนเดียว หรือหลายก้อน โดยเฉพาะเต้านมคู่ที่ 4 และ 5 ซึ่งเป็นเต้านมที่มีขนาดใหญ่และมีเนื้อเยื่อเต้านมมากที่สุด เนื้องอกเต้านมชนิดไม่รุนแรง จะมีลักษณะก้อนเนื้อขนาดเล็ก มีขอบเขตชัดเจน มีลักษณะแน่นแข็ง เมื่อคลำ ส่วนเนื้องอกเต้านมชนิดรุนแรงจะพบก้อนเนื้อเกิดการขยายใหญ่อย่างรวดเร็ว ขอบเขตไม่ชัดเจน ก้อนเนื้อเกาะยึดกับที่ อาจะพบผิวหนังด้านบนเป็นแผลหรือเกิดการอักเสบ [2] ส่วนการวินิจฉัยชนิดเนื้องอกเต้านมจะทำการตัดชิ้นเนื้อ เพื่อส่งตรวจทางจุลพยาธิวิทยา โดยการย้อมสีฮีมาทอกซาลินและอีโอซิน (Hematoxylin and Eosin, H&E) แต่วิธีดังกล่าวอาจจะทำให้พยาธิสัตวแพทย์ที่ยังไม่มีประสบการณ์มากนักวินิจฉัยผิดพลาดได้ จึงมีความพยายามค้นหาเทคนิคการย้อมสไลด์ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี เพื่อมาเป็นเครื่องมือสนับสนุนยืนยันผลการวินิจฉัยเนื้องอกให้ได้แม่นยำมากขึ้น และในระยะ 10 ปีที่ผ่านมา มีการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีน SFRP 2 โดยพบว่าในทางการแพทย์มีการนำ SFRP 2 มาช่วยวินิจฉัยโรคต่างๆ และการเกิดมะเร็ง เช่น มะเร็งหลอดอาหาร มะเร็งกระเพาะอาหาร มะเร็งลำไส้ มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งที่ไต มะเร็งกระเพาะปัสสาวะและมะเร็งเต้านม เป็นต้น [4,6] ส่วนในทางสัตวแพทย์มีการใช้ยังไม่มาก และมีรายงานการใช้ในการวินิจฉัยโรคมะเร็งเต้านมในสุนัข โดยพบว่า SFRP 2 มีแนวโน้มที่จะไวต่อมะเร็งเต้านมมากกว่าเนื้องอกเต้านม [4] ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงจะประเมินการแสดงออกของโปรตีน SFRP 2 ในเนื้องอกเต้านม ที่อาจจะใช้เป็นตัวบ่งชี้ของการเกิดเนื้องอกเต้านมชนิดต่างๆ ในสุนัข

สำหรับโปรตีน Secreted Frizzled-Related Proteins (SFRPs) คือกลุ่มของโปรตีนที่ควบคุมการทำงานของ Wnt-Frizzled signal transduction pathway แบ่งออกเป็น 5 ชนิด ได้แก่ SFRP 1 SFRP 2 SFRP 3 SFRP 4 และ SFRP 5 ที่มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการแบ่งตัวของเซลล์ การต่อต้านการตายของเซลล์ตามธรรมชาติ (anti-apoptosis) และควบคุมการเกิดเนื้องอก [4,5] การแสดงออกของ SFRPs สามารถพบได้ในคนและสัตว์ตั้งแต่ระยะตัวอ่อนจนถึงระยะโตเต็มวัย โดยเฉพาะเมื่อเกิดพยาธิสภาพ เช่น ความผิดปกติของระบบกระดูก การเสื่อมของเรติน่า ความผิดปกติของกล้ามเนื้อหัวใจ และเนื้องอกชนิดต่างๆ ซึ่งความแตกต่างของพยาธิสภาพเหล่านี้เป็นผลที่เกิดจากการแสดงออกของ SFRPs ในระดับที่แตกต่างกันออกไป [5] SFRP 2 เป็นหนึ่งในกลุ่ม SFRPs มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการต่อต้านการตายของ

เซลล์ตามธรรมชาติ เป็นผลให้เนื้องอกเกิดการขยายใหญ่ สามารถพบ SFRP 2 ได้ในนิวเคลียส ไซโตพลาสมและส่วนภายนอกของเซลล์ [4]

ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของโปรตีน SFRP 2 ที่จะใช้เป็นตัวบ่งชี้ของการเกิดเนื้องอกเต้านมชนิดต่างๆ ในสุนัข

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การคัดเลือกและเตรียมเนื้อเยื่อ

คัดเลือกตัวอย่างเนื้อเยื่อเต้านมสุนัขที่ส่งมาชันสูตร ที่หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ช่วงระหว่างปี พ.ศ. 2551-2556 ซึ่งผ่านขบวนการฝังชิ้นเนื้อในพาราฟิน ตัดให้มีความหนา 5 ไมโครเมตร และย้อมด้วยสีฮีมาทอกซาลินและอีโอซิน (H&E) แล้วผ่านการวินิจฉัยของผู้วิจัยนักพยาธิสัตวแพทย์จำนวน 3 ท่านยืนยันว่าเป็นเนื้อเยื่อเต้านมปกติ เนื้องอกเต้านมชนิด Mammary adenoma, Mammary adenocarcinoma, Mixed mammary gland tumor และ Mammary fibrosarcoma จำนวน 5 ชนิด ชนิดละ 16 ตัวอย่าง รวม 80 ตัวอย่าง

การย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

นำชิ้นเนื้อทุกชนิดที่ฝังในพาราฟิน มาตัดให้ได้ความหนา 5 ไมโครเมตร แล้ววางบนกระจกสไลด์ที่เคลือบด้วย Poly-L-lysine และนำมาย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี โดยนำเนื้อเยื่อมาเผยแพร่แอนติเจน (antigen retrieval) ด้วยสารละลาย 0.3% trypsinase จากนั้นทำการระงับปฏิกิริยา endogenous peroxidase ด้วย 0.5% H₂O₂ ใน PBS ต่อมาย้อมด้วย primary antibody คือ rabbit polyclonal anti-SFRP 2 และ secondary antibody คือ biotinylated immunoglobulin ตามด้วยเอมไซม์ avidin-biotin peroxidase complex สุดท้ายจึงทำให้เกิดสีที่เนื้อเยื่อโดยใช้ peroxidase substrate counterstaining ย้อมทับด้วย Mayer's hematoxylin เมื่อสิ้นสุดกระบวนการทั้งหมด จึงนำสไลด์มาผ่านกระบวนการดึ่งน้ำ ออกและตรึงสไลด์ด้วย mounting medium พร้อมกับปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์

Scoring criteria

การประเมินผลการทดลองจะใช้วิธี semi-quantitative method สำหรับประเมินเซลล์ที่ย้อมติดสี ทำการนับเซลล์ที่ย้อมติดสีน้ำตาลตัวอย่างสไลด์ละ 2 fields ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา กำลังขยาย 400 เท่า โดยผู้วิจัยจำนวน 3 ท่าน และคำนวณเซลล์ติดสีออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับเซลล์ที่ย้อมไม่ติดสี นำเปอร์เซ็นต์เซลล์ย้อมติดสีคูณค่าความเข้มที่ติดสี (staining intensity) ซึ่งจะเรียกว่าค่า Immunohistochemistry (IHC) score โดยค่าความเข้ม staining intensity 0: ไม่ติดสี, 1: ติดสีเพียงเล็กน้อย, 2: ติดสีปานกลาง และ 3: ติดสีเข้มมาก

การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำมาหาความสัมพันธ์เปรียบเทียบการติดสีและไม่ติดสีของตัวอย่างเนื้อเยื่อเต้านมด้วยการแปลผลทางสถิติจาก Pearson's chi-squared test และนำค่า IHC score มาหาค่าเฉลี่ยแล้วทดสอบทางสถิติโดยใช้ ANOVA กำหนดค่านัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติคือ SPSS for windows version 17.0, KKU license

ผลการศึกษา และวิจารณ์

ผลจากการย้อมสไลด์ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี พบว่า เนื้อเยื่อเต้านมชนิด Mammary adenocarcinoma, Mixed mammary gland tumor และ Mammary adenoma มีเปอร์เซ็นต์การติดสี 100, 62.5 และ 50 ตามลำดับ ส่วนเนื้อเยื่อเต้านมปกติ และเนื้องอกเต้านมชนิด Mammary fibrosarcoma ไม่พบการติดสี (Table 1, Figure 1) ส่วนค่า IHC score พบว่า เนื้องอกชนิด Mammary adenocarcinoma, Mammary adenoma และ Mixed mammary gland tumor มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 42.13, 40.06 และ 6.81 ตามลำดับ (Table 2) เมื่อนำผลการทดลองมาหาความสัมพันธ์เปรียบเทียบการติดสีและไม่ติดสีของตัวอย่างเนื้อเยื่อเต้านมด้วยการแปลผลทางสถิติ และนำ IHC score ไปคำนวณทางสถิติ พบว่าการแสดงออกของโปรตีน SFRP 2 ไม่มีความสัมพันธ์กับเนื้อเยื่อเต้านมปกติและเนื้องอกเต้านมชนิด Mammary fibrosarcoma อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่พบการแสดงออกของโปรตีน SFRP 2 มีความสัมพันธ์กับเนื้องอกเต้านมชนิด Mammary adenoma, Mammary adenocarcinoma และ Mixed mammary gland tumor อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

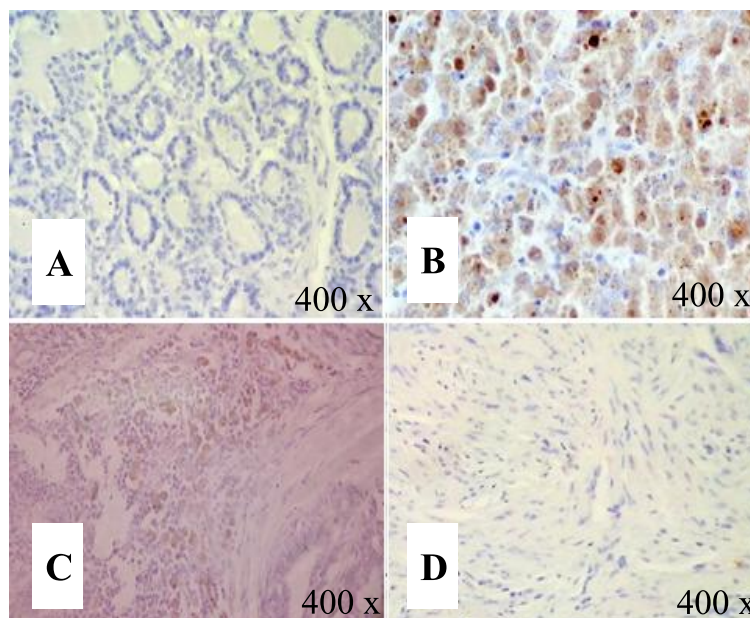


Figure 1. Immunohistochemical staining for SFRP 2, A: Negative staining in normal canine mammary tissue. B and C: Positive staining in mammary adenocarcinoma and mixed mammary gland tumor. D: Negative staining in mammary fibrosarcoma.

ส่วนผลจากการย้อม SFRP 2 ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีเนื้อเยื่อที่มีการติดสี คือ Mammary adenocarcinoma, Mixed mammary gland tumor และ Mammary adenoma นั้น พบว่า การติดสีสามารถพบทั้งในส่วนของนิวเคลียส ไฮโดพลาสซึม และส่วนภายนอกเซลล์ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Lee [4] ซึ่งเป็นการทำงานของ SFRP 2 ที่จะทำให้การส่งสัญญาณทั้งภายในและนอกเซลล์ เมื่อเข้าจับกับ Wnt และ Fz protein [8] SFRP เป็นโปรตีนที่สร้างและขับออกนอกเซลล์ เป็น antagonist ต่อ Wnt-Frizzlesignaling pathway ซึ่งมีผลเกี่ยวข้องกับขบวนการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) การตายของเซลล์ด้วยวิธี apoptosis และการเกิดมะเร็ง [9] นอกจากนี้จากการศึกษา ยังพบการแสดงออกของ SFRP 2 เฉพาะบนเนื้อเยื่อที่เป็นเนื้องอกโดยเฉพาะเนื้องอกเต้านมที่มีเซลล์เยื่อบุของต่อมสร้างน้ำนม (epithelial of mammary gland) เป็นต้นกำเนิด อาทิเช่น Mammary adenoma, Mammary adenocarcinoma และ Mixed mammary gland tumor ส่วนเนื้อเยื่อเต้านมปกติและเนื้องอกเต้านมที่มีเซลล์ค้ำจุน เป็นต้นกำเนิด เช่น Mammary fibrosarcoma จะไม่มีการแสดงออกของ SFRP 2 เช่นเดียวกับการศึกษาของ Lee [4,7] อีกทั้งเมื่อศึกษาดูการแสดงออกของ SFRP 2 ทั้งในเนื้องอกเต้านมชนิดไม่รุนแรง (benign) และเนื้องอกเต้านมชนิดรุนแรง (malignant) พบว่า เนื้องอกเต้านมชนิดรุนแรงมีแนวโน้มพบการแสดงออกของ SFRP 2 มากกว่าบนเนื้องอกเต้านมชนิดไม่รุนแรงสอดคล้องกับรายงานของ Lee [4]

Table 1. Immunohistochemically stained results of SFRP 2 expressed in canine mammary gland.

Type of tissue	Number (sample)	Results	
		Positive staining : sample (%)	Negative staining : sample (%)
Normal mammary gland	16	0 (0%)	16 (100%)
Mammary adenoma	16	8 (50%)	8 (50%)
Mammary adenocarcinoma	16	16 (100%)	0 (0%)
Mixed mammary gland tumor	16	10 (62.5%)	6 (37.5%)
Mammary fibrosarcoma	16	0 (0%)	16 (100%)

Table 2. Immunohistochemical score (IHC score) of SFRP 2 expressed in canine mammary gland.

Type of tissue	results		
	Positive cell/100 mean (range)	Staining intensity ¹ mean (range)	IHC score ² mean (range)
Mammary adenoma	24.44 (0-75)	0.75 (0-2)	40.06 (0-150)
Mammary adenocarcinoma	20.50 (15-105)	1.75 (1-3)	42.13 (15-105)
Mixed mammary gland tumor	5.69 (0-16.5)	0.75 (0-2)	6.81 (0-18)

¹Staining intensity: 0: No stain, 1: lightly stained, 2: moderate stained, 3: markedly stained

²IHC score: percent of positive stained cells x Staining intensity.

สรุป

เนื้องอกเต้านมสุนัขชนิด Mammary adenoma, Mammary adenocarcinoma และ Mixed mammary gland tumors มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของโปรตีน SFRP 2 แต่ไม่พบ SFRP 2 ใน Mammary fibrosarcoma และ SFRP 2 ไม่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นวิธีวินิจฉัยเนื้องอกเต้านมสุนัขได้ เนื่องจากการแสดงออกของ SFRP 2 ไม่สามารถตรวจพบในเนื้องอกเต้านมได้ทุกชนิด โดยเฉพาะเนื้องอกเต้านมที่มีเซลล์ค้ำจุนเป็นต้นกำเนิด แต่จะสามารถพบได้เฉพาะบนเนื้อเยื่อที่เป็นเนื้องอกเต้านมที่มีเซลล์เยื่อของต่อมสร้างน้ำนมเป็นต้นกำเนิด

เอกสารอ้างอิง

1. Dobson, J. M., Samuel, S., Milstein, H., Rogers, K., and Wood, J. L. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J Small Anim Pract.* 2002 ; 43, 240-246.
2. Stephen, J. W., and David, M. V. *Withrow and Macewen's small animal clinical oncology.* Saunders elsevier, St. Louis. 2007.
3. Gilbertson, S. R., Kurzman, I. D., Zachrau, R. E., Hurvitz, A. I., and Black, M. M. Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Vet Patho.* 1983; 20, 127-142.
4. Lee, J. L., Chang, C. J., Wu, S. Y., Sargan, D. R., and Lin, C. T. Secreted frizzled-related protein 2 (SFRP2) is highly expressed in canine mammary gland tumors but not in normal mammary glands. *Breast Cancer Res Treat J. Article.* 2004 ; 84, 139-149.

5. Marschall ZV and Fisher LW. (2010) Secreted frizzled-related protein 2 (SFRP2) augments canonical Wnt3a-induced signaling. *Bioche. and Biophys. Res. Comm.* 299-304.
6. Hurley GO, Perry AS, Grady AO, Loftus B. Smyth P, Leary JJ, Sheils O, Fitzpatrick JM, Hewitt SM, Lawler M and Kay EW. The role of Secreted frizzled-related protein 2 expression in prostate cancer. *Histopathology.* 59, 1240-1248. 2011.
7. Lee, J. L., Chang, C. J., Chueh, L. L., and Lin, C. T. Expression of secreted frizzled-related protein 2 in a primary canine mammary tumor cell line: a candidate tumor marker for mammary tumor cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim J. Article* 2003; 9, 221-227.
8. Shi, Y., He, B., You, L., and Jablons, D. M. Roles of secreted frizzled-related proteins in cancer. *Acta Pharmacol Sin J. Article.* 2007 ;28, 1499-1504.
9. Kypta, Y. K. a. R. Secreted antagonist of the Wnt signaling pathway. *J Cell Sci Journal Article.* 2003; 116, 2627-2634.