

乳腺癌组织突变型 BRCA2 的表达及其临床康复意义探讨

孔萌萌, 陆东东, 陈宇星

[摘要] 目的 研究突变型 BRCA2 在人类乳腺癌组织中的表达及其临床康复意义。方法 采用免疫荧光染色技术检测 66 例手术切除的乳腺癌组织及其癌旁组织中, 突变型 BRCA2 的表达及其与患者临床康复因子间的相关性。结果 66 例乳腺癌患者的标本中, 87.8% (58/66) 突变型 BRCA2 表达上调; 12.2% (8/66) 肿瘤组织突变型 BRCA2 表达无显著改变; 临床分期越晚与肿瘤分化程度越差者突变型 BRCA2 的表达指数 (LI) 值越大; 硬癌与浸润癌类型患者突变型 BRCA2 的 LI 值较大; 有癌转移患者突变型 BRCA2 的 LI 值显著高于无转移患者。结论 突变型 BRCA2 的 LI 与乳腺癌患者的康复因子, 如临床分期、肿瘤分化程度、肿瘤病理类型以及有无转移呈显著相关, 且突变型 BRCA2 过表达可能影响乳腺癌患者的康复治疗。

[关键词] 突变型 BRCA2; 乳腺癌; 免疫荧光染色

Expression of Mutant BRCA2 in Human Breast Cancer Tissue and Its Clinic-healing Significance KONG Meng-meng, LU Dong-dong, CHEN Yu-xing. Tongji University School of Life Science and Technology, Shanghai 200092, China

Abstract: **Objective** To investigate the expression of mutant BRCA2 gene in human breast cancer tissue and its clinic-healing significance. **Methods** The expression of mutant BRCA2 gene in breast cancer tissues and adjacent non-cancerous tissues of 66 patients samples was detected using immunofluorostaining (IFS) and the correlation between the expression of mutant BRCA2 and patients clinic-pathological characteristic was analyzed. **Results** Among 66 patients samples, 87.8% (58/66) were up-regulated expression of mutant BRCA2 protein in breast cancer tissues and 12.2% (8/66) was no significant difference of the mutant BRCA2 expression between the cancer tissue and its corresponding adjacent noncancerous tissues. The label index (LI) of mutant BRCA2 gene was higher in the cases of breast carcinomas later clinical stage, poor tumor differentiation grade, breast scirrhous carcinomas, infiltrative breast carcinomas and metastasis. **Conclusion** The overexpression of mutant BRCA2 gene in human breast cancer tissue is positively related to the breast carcinomas clinical stage, tumor differentiation grade, the tumor pathological type and metastasis, and it may influence the healing therapy of the breast cancer patients.

Key words: mutant BRCA2; human breast cancer; immunofluorostaining

[中图分类号] R737.9 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2008)02-0150-02

[本文著录格式] 孔萌萌, 陆东东, 陈宇星. 乳腺癌组织突变型 BRCA2 的表达及其临床康复意义探讨[J]. 中国康复理论与实践, 2008, 14(2): 150-151.

乳腺癌目前居我国女性肿瘤发病率的首位, 全球每年约有 100 多万妇女患乳腺癌。研究表明, 环境因素对乳腺癌发病的影响超过遗传因素的影响。目前在欧美发达国家, 尽管乳腺癌的发病率仍在上升, 但死亡率已开始下降, 其原因一方面是越来越多的患者能够在病变早期被发现, 另一方面是得益于治疗手段的不断进步。对患有多例早发性乳腺癌而又与 BRCA1 无关的 15 个家族进行的基因组连锁分型分析, 发现一个新的与早发性乳腺癌相关联的定位在 13q12-13 区的基因 BRCA2^[1]。该基因是一个由 26 个外显子构成的大基因, 共有 10254 个核苷酸, 编码 3418 个氨基酸的蛋白质, 而且是一个抑癌基因, 与 BRCA1 有许多相似之处, 在遗传性乳腺癌中有较高频率的基因杂合性丢失, 并且在乳腺癌细胞中也观察到其 mRNA 表达受到协调调控^[2]。目前对乳腺癌组织中突变型 BRCA2 的表达及其与乳腺癌恶性生物学特征间的关系尚缺乏深入研究, 本研究初步探讨人类乳腺癌组织中突变型 BRCA2 基因的表达及其对乳腺癌患者临床康复因子的影响。

1 材料与方法

1.1 标本来源 乳腺癌及相应的癌旁组织来自 66 例女性乳腺癌手术切除患者, 年龄 33~64 岁, 临床分期为 0 期 14 例、I 期 19 例、II 期 18 例、III 期 15 例; 低分化 20 例、中分化 27 例、高分化 19 例; 髓样癌 19 例、硬癌 26 例、单纯癌 21 例; 非浸润性癌 21 例、早期浸润癌 30 例、浸润癌 15 例。外科手术切除乳腺癌及其癌旁组织经 10% 甲醛固定, 常规石蜡包埋, 连续切片 (厚 5

μm)。

1.2 免疫荧光染色 将切片脱蜡、水化后用新鲜配置 3% H₂O₂ 室温处理 10 min, 蒸馏水洗 5 min × 3 次; 经微波修复后, 0.1 M PBS 洗涤 3 次各 5 min; 滴加正常山羊血清室温封闭 30 min; 甩去多余液体后, 滴加兔抗人突变型 BRCA2 (CALBIOCHEM) (PBS 代替 1 抗作为阴性对照), 4℃过夜后 PBS 洗 3 次各 5 min; 滴加羊抗兔 IgG/RB, 37℃孵育 60 min 后 PBS 洗 3 次各 5 min; 封片后荧光显微镜观察与拍照。结果判断根据肿瘤细胞染色程度以及阳性细胞所占百分比进行综合评分。400 倍镜头下在每一视野中连续计数 100 个癌细胞, 记录其中阳性细胞数 (突变型 BRCA2 阳性细胞为细胞核或胞浆被染成红色荧光), 计算阳性细胞百分数。随意选取 10 个视野, 取平均数。

1.3 基因表达剂量比较与统计学分析 基因翻译水平上的相对表达量以标记指数 (label index, LI) 表示, 即每例肿瘤组织中免疫染色阳性细胞百分数占肿瘤及癌旁组织中总阳性细胞百分数的相对百分率, 然后应用 SPSS 12.0 统计软件进行分析。

2 结果

2.1 乳腺癌组织中突变型 BRCA2 蛋白的表达 组织免疫荧光染色结果显示, 突变型 BRCA2 表达位于细胞核和胞浆, 66 例乳腺癌患者的标本中, 87.8% (58/66) 的乳腺癌组织中突变型 BRCA2 阳性表达细胞的比例明显高于癌旁组织 ($P < 0.01$), 即乳腺癌组织中突变型 BRCA2 在翻译水平上呈高表达, 其中 2 例癌旁组织中未见突变型 BRCA2 蛋白表达 (见封三图 3); 12.2% (8/66) 的标本中肿瘤及其癌旁组织中突变型 BRCA2 表达的差异无显著性意义。

2.2 人类乳腺癌组织中突变型 BRCA2 的异常表达与患者临床康复因子间的关系 突变型 BRCA2 的表达与乳腺患者临床

作者单位: 同济大学医学部生命科学与技术学院, 上海市 200092。

作者简介: 孔萌萌 (1980-), 女, 山东枣庄市人, 博士研究生, 主要从事肿瘤相关分子生物学研究。通讯作者: 陆东东。

康复因子间的相关性分析显示,突变型 BRCA2 基因的 LI 与肿瘤的临床分期、分化程度、病理类型以及有无转移呈显著正相关。临床分期为 0、I、II、III 期的患者突变型 BRCA2 的 LI 分别为 (8.91 ± 2.14) 、 (54.64 ± 7.86) 、 (79.89 ± 11.34) 和 (99.97 ± 5.24) , 之间的差异均有非常显著性意义 ($P < 0.01$), 即分期越高, 突变型 BRCA2 的 LI 值越大, 越晚期者其 LI 越高。

高、中、低分化乳腺癌患者的突变型 BRCA2 的 LI 分别为 (9.59 ± 1.36) 、 (64.78 ± 12.31) 和 (98.45 ± 8.98) , 之间的差异均有非常显著性意义 ($P < 0.01$), 即肿瘤分化程度越差, 突变型 BRCA2 的 LI 值越大; 肿瘤细胞分化越好者, 其 LI 越低。

髓样癌、硬癌、单纯癌突变型 BRCA2 的 LI 分别为 (18.36 ± 2.98) 、 (96.75 ± 10.13) 和 (66.25 ± 8.49) , 之间的差异均有非常显著性意义 ($P < 0.01$), 即硬癌患者突变型 BRCA2 的 LI 值最大, 髓样癌患者突变型 BRCA2 的 LI 值较小。

非浸润性癌、早期浸润癌、浸润癌的突变型 BRCA2 的 LI 分别为 (16.19 ± 3.84) 、 (58.29 ± 10.68) 和 (98.45 ± 12.67) , 之间的差异均有非常显著性意义 ($P < 0.01$), 即浸润癌患者突变型 BRCA2 的 LI 值最大, 非浸润性癌患者突变型 BRCA2 的 LI 值较小。

有转移的乳腺癌患者的突变型 BRCA2 的 LI 值 (95.65 ± 13.12) 明显高于无转移患者 (21.48 ± 3.67) ($P < 0.01$)。

3 讨论

乳腺癌是危害妇女健康的主要恶性肿瘤之一, 虽然男性也可患乳腺癌, 但男性患乳腺癌的机会比女性低 100 倍。随着人类基因组计划的完成, 肿瘤研究进入分子时代, 人类可以在分子水平上研究乳癌等恶性肿瘤的发生发展, 还可以在分子水平设计针对不同靶点的新型药物。通过制定带有预见性的个体化规范治疗方案, 可提高乳腺癌治疗的总体水平, 改善患者的生存质量。发生基因突变的妇女得癌的风险超过 60%, 而这部分妇女提前切除乳房可以预防乳腺癌的发生^[3]。20 世纪 90 年代中期, 研究人员识别出两个使女性易患乳腺癌的基因, 即 BRCA1 和 BRCA2。但这两个基因对非遗传性癌症的作用并不显著。EMS1 蛋白能以某种方式影响 BRCA2 基因的功能^[4]。BRCA1 和 BRCA2 基因的变异往往会导致变异的携带者发生乳腺癌与子宫癌^[5]。此外, 其他如 CHEK2、TP53 和 PTEN 等基因的变异也影响患乳腺癌的风险。因此, 通过基因检测分析 BRCA1 和 BRCA2 携带的变异已成为许多国家的临床治疗过程中的一个重要步骤。BRCA2 的活性异常增加了基因组的不稳定性, 有可能是导致多种肿瘤发生的原因之一^[6]。研究发现, BRCA2 mRNA 的表达受到严格调节, 并且这种调节与 BRCA1 相协调。BRCA2 mRNA 在快速增殖细胞中升高, 峰值在 G1/S 交界处, 但与 DNA 的合成无关。乳腺上皮细胞分化时对糖皮质激素的反应使 BRCA2 mRNA 升高, 表明 BRCA2 与细胞的增殖和分化过程有关^[7]。BRCA2 与男性乳腺癌有较高的相关性, 并且其基因型也与 BRCA1 不同^[8]。目前, BRCA2 的基因定位和 mRNA 编码已经清楚, 但其完整的基因结构及其蛋白质功能尚不清楚, 其在乳腺癌相关抑癌基因中所占的比例以及其与其他肿瘤的相关性也需要进一步研究。

研究表明, 许多因子可影响乳腺癌的康复治疗, 如肿瘤临床分期、肿瘤分化程度、有无转移、肿瘤类型等。本研究结果显示, 人类乳腺癌组织中突变型 BRCA2 的表达与临床分期为 0、I、II、III 期的患者的突变型 BRCA2 LI 间的差异均有非常显著性意义, 即分期越高, 突变型 BRCA2 的 LI 值越大, 越晚期者其 LI 越高, 推测突变型 BRCA2 促进了乳腺癌的进展。本研究还显示, 突变型 BRCA2 表达与肿瘤分化程度有关, 高、中、低分化

乳腺癌患者的突变型 BRCA2 的 LI 间的差异均有非常显著性意义, 即肿瘤分化程度越差, 突变型 BRCA2 的 LI 值越大; 反之, 肿瘤细胞分化越好者, 其 LI 越低, 提示突变型 BRCA2 可能促进了乳腺癌细胞的恶性增殖。乳腺癌的病理类型是指通过对肿瘤标本进行病理形态学观察, 进而确定乳腺癌的发展程度、组织来源、变化特点、分化程度等。乳腺癌的病理类型很多, 本研究结果显示, 突变型 BRCA2 基因的表达与乳腺癌细胞的类型有关, 髓样癌、硬癌、单纯癌间, 以及非浸润性癌、早期浸润癌、浸润癌间突变型 BRCA2 的 LI 之间的差异均有非常显著性意义, 即硬癌患者突变型 BRCA2 的 LI 值最大, 髓样癌患者突变型 BRCA2 的 LI 值较小; 浸润癌患者突变型 BRCA2 的 LI 值最大, 非浸润性癌患者突变型 BRCA2 的 LI 值较小, 提示突变型 BRCA2 基因的表达与乳腺癌的病理类型有关。乳腺癌患者中常见肺、淋巴结、肝、骨等器官转移, 而且有许多因素与乳腺癌转移有关。本研究显示, 有转移乳腺癌患者突变型 BRCA2 的 LI 值明显高于无转移患者, 推测突变型 BRCA2 在乳腺癌细胞的转移过程中可能起一定的作用。由此可见, 突变型 BRCA2 基因的过表达与乳腺癌的分期、病理分级、病理类型、肿瘤转移等临床康复指标相关, 突变型 BRCA2 基因可能是一个较为直接的影响乳腺癌康复的相关基因。而突变型 BRCA2 在人乳腺癌组织中的表达明显高于癌旁组织, 表明突变型 BRCA2 可能参与了乳腺癌的恶性转化。突变型 BRCA2 在低分化乳腺癌组织中的表达明显高于中高分化乳腺癌, 在有转移乳腺癌组织中的表达高于无转移乳腺癌, 表明乳腺癌组织中突变型 BRCA2 的表达水平与乳腺癌的恶性生物学特征有密切相关性。突变型 BRCA2 表达增高可能同时参与乳腺癌的恶性转化, 并促进乳腺癌的恶性进展, 从而可能影响乳腺癌的康复治疗。将来可通过分析突变型 BRCA2 表达的改变, 对乳腺癌进行早期诊断和预后评测, 同时可利用突变型 BRCA2 作为靶点在分子水平上对乳腺癌患者进行康复治疗。

[参考文献]

- [1] Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13 [J]. Science, 1994, 265 (5181): 2088.
- [2] Vandenberg J, Johannsson O, Hakansson S, et al. Allelic loss at chromosome 13q12-q13 is associated with poor prognosis in familial and sporadic breast cancer [J]. Br J Cancer, 1996, 74(10): 1615.
- [3] Lancaster JM, Wooster R, Mangion J, et al. BRCA2 mutations in primary breast and ovarian cancers [J]. Nat Genet, 1996, 13(2): 238.
- [4] Spillman MA, Bowcock AM. BRCA1 and BRCA2 mRNA levels are coordinately elevated in human breast cancer cells in response to estrogen [J]. Oncogene, 1996, 13(8): 1639.
- [5] Chenevix-Trench G, Milne RL, Antoniou AC, et al. An international initiative to identify genetic modifiers of cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1 and BRCA2 (CIMBA) [J]. Breast Cancer Res, 2007, 9(2): 104.
- [6] de Brakeleer S, Bogdani M, de Greve J, et al. Loss of nuclear BRCA1 protein staining in normal tissue cells derived from BRCA1 and BRCA2 mutation carriers [J]. Mutat Res, 2007, 619(1-2): 104-112.
- [7] Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance [J]. J Clin Oncol, 2007, 25(11): 1329-1333.
- [8] Awadelkarim KD, Aceto G, Veschi S, et al. BRCA1 and BRCA2 status in a Central Sudanese series of breast cancer patients: interactions with genetic, ethnic and reproductive factors [J]. Breast Cancer Res Treat, 2007, 102(2): 189-199.

(收稿日期: 2007-08-23)

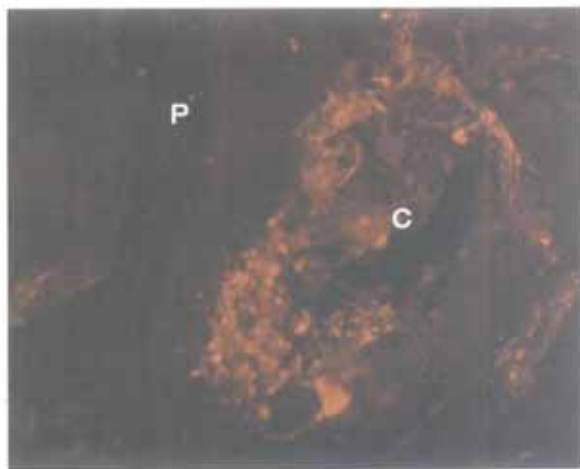


图3 乳腺癌及其癌旁乳腺组织中, 突变型BRCA2蛋白表达的代表性免疫荧光染色检测结果 (HB 荧光染色, 100 \times ; C: 乳腺癌组织, P: 癌旁乳腺组织)

图1 1-1.2 正文见P132-134;

图2 1-2.2 正文见P135-137;

图3 正文见P150-151。