

• 论著 •

# P73 基因表达与乳腺癌细胞凋亡、激素受体的关系

杨开颜

(温州医学院附属第一医院病理科, 浙江 温州 325000)

**【摘要】**背景与目的: 研究 P73 基因与乳腺癌发病的关系。材料与方法: 应用 TUNEL、RT-PCR 等技术检测乳腺癌组织 P73 基因的表达及其与肿瘤细胞凋亡、激素受体的关系。结果: 45 例乳腺癌组织 P73 基因表达阳性者 32 例, 高于良性乳腺肿瘤; 淋巴结转移阳性者 P73 基因表达高于阴性者; 肿瘤细胞的凋亡率与 P73 基因表达无相关性; P73 基因表达与雌、孕激素受体亦无相关性。结论: P73 基因表达增多可能与乳腺癌发病有关。

**【关键词】** P73; 乳腺癌; 凋亡; TUNEL; RT-PCR

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2004)05-0296-02

## Expression of P73 Gene and the Relationship Among P73 Gene, Apoptosis and Receptors of Hormone in Breast Cancer

YANG Kai-yan

(The Department of Pathology Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)

**【ABSTRACT】**BACKGROUND & AIM: To investigate the expression of P73 gene in breast cancer, also to study the relationship among P73 gene, apoptosis and receptors of hormone. MATERIAL AND METHODS: The expression of P73 gene in breast cancer tissues was detected by RT-PCR and apoptosis by TUNEL. RESULTS: The expression of P73 gene was significantly higher in breast cancer(32/45) than in breast benign tumors( $P < 0.05$ ) and significantly higher in positive metastasis of lymph nodes than in negative ones( $P < 0.05$ ); the expression of P73 gene was not associated with ER, PR, the apoptosis rate of P73 gene positive cells was not significantly different from the negative ones. CONCLUSION: The increased expression of P73 gene may be related with breast cancer.

**【KEY WORDS】** P73; breast cancer; apoptosis; TUNEL; RT-PCR

女性常见的恶性肿瘤之一乳腺癌, 近年来发病率有不断升高的趋势。以往的研究资料提示基因的改变与乳腺癌的发生有关, 在原发性乳腺癌, 肿瘤抑制基因 P53 突变可导致生长抑制性的丢失和不良的结局。最近, 与 P53 相关的命名为 P73 的基因已经被发现, 它位于染色体 1p36.3 部位<sup>[1]</sup>。这个区域在乳腺癌、神经母细胞瘤时经常缺失。P73 与 P53 同源, 其编码一核蛋白。至少存在两种 P73 异构体。这些异构体都具有生长抑制和诱导凋亡的活性, 主要通过诱导 P21 表达来激活。这些观察显示 P73 具有类似于 P53 的生物学功能<sup>[2]</sup>。那么, 在乳腺癌的发病过程中, P73 是否也起作用, 与肿瘤细胞的凋亡有何关系呢?

因此, 本文做了下列研究工作。

### 1 材料与方法

#### 1.1 标本

乳癌肿瘤组织 45 例, 乳腺纤维腺瘤组织 35 例。液氮保存的组织用于做 RT-PCR 研究, 石蜡包埋组织用于 TUNEL 检测。标本均来自从 1995~2000 年在院治疗的病人。乳癌患者年龄从 28~79 岁, 平均 53 岁。有淋巴结转移者 21 例。雌激素受体阳性 27 例而孕激素阳性 23 例。乳癌按世界卫生组织肿瘤诊断标准进行诊断分型: 16 例单纯癌, 8 例硬癌, 11 例髓样癌, 10 例导管内癌。

## 1.2 方法

**1.2.1 TUNEL 检测** 蜡块按常规切片, TUNEL 检测操作按细胞凋亡原位检测试剂盒 (Boehringer Mannheim 公司产品) 说明书进行。设阳性和阴性对照。TUNEL 染色阳性细胞棕黄色颗粒位于细胞核。切片选择多个高倍视野, 观察 500 个肿瘤细胞, 计算平均阳性细胞比例, 以百分率代表肿瘤细胞凋亡率。

**1.2.2 DNA 及 RNA 的制备** RNA 的提取采用 Tripure 分离试剂 (B.M 公司), 按试剂盒说明书规范操作提取 RNA。然后进行定量、检测纯度等。应用 AMV-RTase 和 Oligo(dT) 15 引物 (均为 Promega 公司产品), 先将 RNA 反转录成 cDNA, 用于 PCR 扩增。

**1.2.3 RT-PCR 分析** 用 cDNA 产物进行 PCR 基础扩增。上游引物: 5'-AACCATGGCCACGCAGTG-3' 和下游引物: 5'-GTTGCTAGAGCGGAGCAGCT-3' 来分析 P73 的表达。PCR 扩增后取 10  $\mu$ l PCR 产物经 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳、溴化乙锭染色后, 紫外灯下观察。在 231 bp 位置出现条带为 P73 表达阳性。

## 1.3 统计学处理

计数资料采用  $\chi^2$  检验, 采用二项公布估计总体率可信区别。

## 2 结果

P73 基因表达阳性的肿瘤细胞凋亡率  $10.00 \pm 1.31$ , 阴性的为  $10.19 \pm 1.07$ , 两者差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。

浸润性癌阳性率 82.9% (66% ~ 93%) 高于导管内癌阳性率 30% (7% ~ 65%) ( $\chi^2 = 8.67$ ,  $P < 0.01$ ); 乳腺癌阳性率 71.1% (56% ~ 84%) 高于纤维腺瘤阳性率 14.29% (6% ~ 35%) ( $\chi^2 = 25.57$ ,  $P < 0.001$ )。见表 1。

表 1 乳腺癌与纤维腺瘤的 RT-PCR P73 表达结果

		Positive	Negative	Total
Invasive carcinoma	Carcinoma simplest	13	3	16
	Medullary carcinoma	9	2	11
	Scirrhous carcinoma	7	1	8
Ductal carcinoma in situ		3	7	10
Fibroadenoman		5	30	35

淋巴结转移者 21 例 P73 基因表达阳性者 21 例 (84% ~ 100%), 无转移者 24 例中 P73 基因有 11 例表达阳性 (45.8%), 两者差异有显著性意义 ( $\chi^2 = 15.996$ ,  $P < 0.05$ )。

27 例雌激素受体阳性者有 19 例 P73 基因表达阳性 (70.4%), 18 例雌激素受体阴性者有 13 例 P73 基因表达阳性 (72.2%), 两者差异没有显著性 ( $\chi^2 = 0.018$ ,  $P > 0.05$ ); 23 例孕激素受体阳性者 P73 基因

表达为 16 例 (69.6%), 22 例阴性者表达 P73 基因为 16 例 (72.7%), 两者差异也没有显著性 ( $\chi^2 = 0.055$ ,  $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

抑癌基因失活是常见的导致实体肿瘤发生的最重要的分子生物学基础, 其中 P53 基因是迄今为止发现的与人类肿瘤相关性最高的基因。P53 通常被称为基因组的“监护人”, 由于近 50% 的肿瘤 P53 突变或丢失, 它在人类癌症中是最常见的突变基因<sup>[3]</sup>。P53 肿瘤抑制基因的重要性在于它能够针对大范围的基因毒性的和细胞的刺激阻止细胞循环和凋亡。作为转录因子, P53 通过转录基因如 P21, Bax 阻止损伤 DNA 复制及基因改变的细胞分裂。1997 年, Kaghad 等在探索免疫系统常规有关的基因时偶然发现了 P73<sup>[4]</sup>。由于它与 P53 的同源性, 刚开始认为其功能亦类似于 P53。另外, P73 作为另一种肿瘤抑制物重要的一点是它在染色体 1p36 的位置, 这个区域在神经母细胞瘤和其他一些肿瘤经常缺失。

结构上 P73 与 P53 一样, 具有四个主要功能区: 包括转录激活区、DNA 结合区、寡聚物区和羧基端。而且 P73 的前三个功能区的氨基酸结构组成与 P53 的相应区域有很高的同源性, 分别为 29%、63%、38%<sup>[4]</sup>。在正常人体内 P73 基因低水平广泛表达, 当人体组织发生肿瘤时, P73 基因表达是否有所改变? 国外的一些研究报道了 P73 在神经母细胞瘤、膀胱癌、前列腺癌、结肠癌和乳腺癌等肿瘤中的转录表达, 结果不太一致。有 P73 表达过量的, 也有不升高的。Senod 等<sup>[5]</sup>认为 P73 mRNA 在不同肿瘤中明显的表达差异提示 P73 的作用或许具有组织特异性。我们的研究结果显示乳癌组织中 P73 的 mRNA 表达水平较良性病变 (纤维腺瘤) 组织有明显升高, 提示乳癌组织中确实存在 P73 的过度转录表达, P73 基因可能参与调控乳癌的发生; 并且, 浸润性乳癌 P73 的表达高于非浸润性乳癌; 乳癌中淋巴结转移阳性的 P73 表达高于淋巴结转移阴性的, 提示 P73 基因在乳癌发展的中晚期所起的作用可能更明显, 与 Ichimiya<sup>[6]</sup>对神经母细胞瘤的研究结果较一致; 黄东胜等<sup>[7]</sup>对 P73 在胃癌中的改变和意义的研究结果显示 P73 过表达与胃癌的进程密切相关, 也与本研究结果相符。李红智等<sup>[8]</sup>研究结果显示 P53 基因的过度表达提示乳腺癌预后较差, 本研究结果显示在中晚期乳腺癌 (预后差) 中 P73 基因表达率较高, 提示 P53 和 P73 基因在肿瘤发生发展中的作用可能有相

表 3 重组葡激酶对小鼠骨髓细胞微核发生率的影响

Table 3 Effect of the recombinant Staphylokinase on MNCF of bone marrow cells in mice

Groups	Dosage mg/kg <sup>-1</sup>	Number of mice	Number of PCE	MNCF(×10 <sup>-3</sup> ) ( $\bar{x} \pm s$ )
Vehicle control	500	6	6 000	2.8±1.2
Positive control(CP)	50	6	6 000	62.3±15.6*
Staphy lokinase	500	6	6 000	3.0±0.6
	250	6	6 000	1.8±1.2
	125	6	6 000	1.5±0.8

\* P < 0.01, compared with vehicle control

于一般的化学药物，因此其剂量设计难以按照指导原则的方法进行。根据国际该类药物同类研究的报道<sup>[5]</sup>，采用以临床拟用剂量作为最高剂量的设定依据，对重组葡激酶遗传毒性进行了较系统的研究。

研究结果发现，重组葡激酶对组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌株没有回复突变作用；对体外培养 CHL 细胞染色体也无致畸效应；同时，昆明小鼠用药后也未检测到骨髓嗜多染红细胞出现异常的微核增多现象。说明，在本实验条件下，重组葡激酶没有遗传毒性。

尽管本实验重组葡激酶的剂量设计有相关文献

参考，但其依据仍缺乏大量的实验积累。就是说，基因工程药物遗传毒性的剂量设计仍然是一个尚待解决的问题，该问题的解决离不开相关基础理论的突破和更多实验室数据的积累。

参考文献：

[1] 中华人民共和国卫生部药政局. 新药(西药)临床前研究指导原则汇编(药学·药理学·毒理学)[Z]. 北京: 中华人民共和国卫生部药政局, 1993. 211-212.  
 [2] Maron DM, Ames MN. Revised methods for Salmonella mutagenicity test [J]. *Mutat Res*, 1983, 113: 173-215.  
 [3] 高沛永, 齐淑华, 孟大宇, 等. 丝裂霉素 C 诱发 CHL 细胞染色体畸变的量效关系 [J]. 军事医学科学院院刊, 1991, 15: 81-83.  
 [4] 王治乔, 袁伯俊. 新药临床前安全性评价与实践 [M]. 第 1 版. 北京: 军事医学科学出版社, 1997. 97-102.  
 [5] Yajima N, Kurata Y, Sawai T, et al. Induction of micronucleated erythrocytes by recombinant human erythropoietin [J]. *Mutagenesis*, 1993, 8: 221-229.

(上接 297 页)

似之处,当然还需进一步的研究来证实。至于 P73 在乳腺癌发病过程中的具体作用是否与 P53 相似,通过抑制细胞凋亡而起作用的呢? 本研究结果显示肿瘤细胞的凋亡率与 P73 基因表达无相关性,提示 P73 在乳腺癌发病中对肿瘤细胞凋亡作用可能不同于 P53。乳腺癌细胞的雌、孕激素受体是否阳性直接关系到患者的治疗方案的选择和预后,结果显示 P73 基因表达在雌、孕激素受体阳性者和阴性者之间没有差别,提示 P73 基因与雌、孕激素受体表达无关。

P73 基因在肿瘤中是否存在基因的突变也是研究的一个热点,国外在肺癌、乳腺癌、大肠癌等肿瘤中都没有发现 P73 基因的突变<sup>[9]</sup>,也许是由于 P73 虽然属于 P53 家族,但与 P53 还是不同。Mai 等认为 P73 并非作为一个抑癌基因,可能是通过沉默等位基因的激活或 wt-p73 的过表达发挥 P53 显性负性蛋白功能,从而在肺癌肿瘤发生机制中发挥重要作用<sup>[10]</sup>。P73 或许在肿瘤发生机制中并不像 P53 一样是一个抑癌基因。因此,尚需进一步做研究工作来明确 P73 基因在肿瘤发生发展中的具体作用。

参考文献：

[1] Thompson FH, Taetle R, Trent JM, et al. Band 1p36 abnormalities and t(1;17) in ovarian carcinoma [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 1997, 96(2): 106-110.

[2] Jost CA, Marin MC, Kaelin WG. P73 is a human P53-related protein that can induce apoptosis [J]. *Nature*, 1997, 389(1): 191-194.  
 [3] Levine AJ. P53, the cellular gatekeeper for growth and division [J]. *Cell*, 1997, 88(3): 323-331.  
 [4] Kaghad M, Bonnet H, Yang A, et al. Monoallelically expressed gene related to P53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancer [J]. *Cell*, 1997, 90(4): 809-819.  
 [5] Senod M, Seki N, Ohira M, et al. A second P53-related protein, P73L, with high homology to P73 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 248(3): 603-607.  
 [6] Ichimiya S, Nimura Y, Kageyama H, et al. P73 at chromosome 1 p36.3 is lost in advanced stage neuroblastoma but its mutation is infrequent [J]. *Oncogene*, 1999, 18(4): 1 061-1 066.  
 [7] 黄东胜, 谢海洋, 郑树森. P73 和 P51 在胃癌中的改变及意义 [J]. 浙江大学学报, 2002, 31(4): 233-237.  
 [8] 李红智, 谢丽微, 杨开颜, 等. 细胞凋亡相关基因表达与乳腺癌预后的关系 [J]. 温州医学院学报, 2002, 32(5): 284-286.  
 [9] Han S, Semba S, Abe T, et al. Infrequent somatic mutation of the P73 gene in various human cancers [J]. *Eur J Surg Oncol*, 1999, 25(2): 194-198.  
 [10] Mai M, Yokomizo A, Qian C, et al. Activation of P73 silent allele in lung cancer [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(11): 2 347-2 349.