

文章编号:1004 - 616X(2000)01 - 0047 - 02

## 应用冰冻切片标本检测乳腺癌 c - erbB - 2 基因扩增的研究

吴建中,沈宗丽,陈森清,薛开先

(江苏省肿瘤防治研究所,江苏南京 210009)

**摘要:**目的与方法:c - erbB - 2 基因的扩增与乳腺癌的治疗和预后有一定的关系。为了能够快速、简便、准确的检测乳癌中 c - erbB - 2 基因的扩增,我们将靶基因与参照基因设在同一条染色体上,同时选用快速冰冻切片的剩余组织作 d - PCR 实验。结果:研究表明,71 例乳腺癌中共有 19 例 c - erbB - 2 基因的扩增,扩增率为 26.7%。与我们过去的研究相比,c - erbB - 2 基因扩增检出率有所提高。结论:本文认为,引物设计合理、选材得当,能够提高 c - erbB - 2 基因扩增的准确检出率。

**关键词:**聚合酶链式反应;乳腺癌;c - erbB - 2 基因

中图分类号:R737.904.5

文献标识码:A

## STUDY ON C - ERBB - 2 GENE AMPLIFICATION IN FROZEN SECTIONS OF BREAST CANCER

WU Jian-zhong, SHEN Zong-li, CHEN Sen-qing, XUE Kai-xian

(Jiangsu Institute of Cancer Research, Nanjing 210009, China)

现象。羟基蒽醌的诱变作用只与所带的羟基数目有关而与羟基在蒽醌环上的位置无关<sup>4</sup>。最近不同作者之间通过改变光照、培养细胞的血清浓度以及不同实验材料来源 AQs 的遗传毒性所得的结果不同<sup>9,10</sup>,这些不同类型的同分异构体以何种方式产生诱变性有待进一步研究。

## 参考文献:

- 1 Brown JP. A review of the genetic of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds J. *Mutat Res*, 1980, 75: 243 - 277.
- 2 Adans N, blaket C, Michael J, et al. Synthesis and antitumor activity of novel 4 - demethoxyamthracyclines J. *J Med Chem*, 1990, 33: 2375 - 2379.
- 3 Sendelbach SE. A review of the toxicity and carcinogenicity of anthraquinone derivatives J. *Toxicity*, 1989, 57: 227 - 240.
- 4 Westendorf J, Marquardt H, Poginsky B, et al. Genotoxicity of naturally occurring hydroxyanthraquinones J. *Mutat Res*, 1990, 240: 1 - 12.
- 5 薛开先,孙玉洁,周平.小鼠尾血淋巴细胞微核制片法J.细胞生物学杂志,1985,7:145.
- 6 Brown JP, Brown RJ. Mutagenesis by 9,10 - anthraquinone and benzantrone derivatives and related compounds in Salmonella typhimurium J. *Mutat Res J*. 1976, 40: 203 - 224.
- 7 Vanparys P, Vermeiren F, Sysmans M, et al. The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity J. *Mutat Res*, 1990, 244: 95 - 103.
- 8 Ashby J, Tennant RW. Chemical structure, Salmonella mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodent by the U. S. NCI/NTPJ. *Mutat Res*, 1988, 204: 17 - 115.
- 9 Fernandez M, L 'Haridon J. Influence of lighting condition on toxicity and genotoxicity of various PAH in the newt in vivo J. *Mutat Res*, 1992, 298: 31 - 41.
- 10 Mueller SO, Lutz WK, Stopper H. Factors affecting the genotoxic potency ranking of natural anthraquinones in mammalian cell culture systems J. *Mutat Res*, 1998, 414: 125 - 129.

收稿日期:1999 - 07 - 03;修订日期:1999 - 09 - 01

作者简介:吴建中(1965 - ),男,江苏南通人,技师,大专,目前主要从事分子流行病学研究工作。

**Abstract : Purpose :** The amplification of HER - 2/ neu may have prognostic value in breast cancer. **Methods :** In this study , we chose the reference gene on the same chromosome as the target gene , and used the differential polymerase chain reaction (d - PCR) to assess the presence of c - erbB - 2 gene amplification in frozen sections of breast cancer. **Results :** The results showed that there were 19 of 71 cases of breast cancer were detected amplification of c - erbB - 2 gene , the detectable rate was 26.7 % , which was higher than our previous reports. **Conclusion :** the author regards that the chose of primer and the specimens contribute to the improvement of the detectable rate.

**Key words :** differential polymerase chain reaction (d - PCR) ; breast cancer ; c - erbB - 2 gene

癌基因、抑癌基因的扩增和缺失,在肿瘤的发生和演进过程中起着重要作用<sup>1,2</sup>。在乳腺癌中,癌基因 c - erbB - 2(HER - 2/ neu)的扩增与过度表达与乳腺癌的发生、发展和预后有一定的关系<sup>3</sup>。因此,临床上常选用 c - erbB - 2 基因作为判断预后的指标之一。为了能够快速、简便的检测 c - erbB - 2 基因,我们选用乳癌冰冻切片剩余组织作差别聚合酶链反应(Differential PCR)。同时,我们将与靶基因 c - erbB - 2 位于同一条染色体上的 TK 基因作为参照基因,以提高 c - erbB - 2 基因扩增的检出率。

## 材料与方法

### 1 组织来源与 DNA 制备

71 例乳腺癌组织均为我院外科手术时快速冰冻切片的剩余组织。将乳癌组织置于无水乙醇中 4 保存,备用。应用改良的 Triton - 100 法<sup>4</sup> 提取 DNA。

### 2 d - PCR 引物、反应条件及检测

根据靶基因 c - erbB - 2 与参照基因 TK 序列分别合成一对引物(中国科学院上海细胞生物研究所合成):

c - erbB - 2 (5' - ATCTTCTGCTGC - CGTCGCTT - 3'; 5' - TTGGCATTCTGCTG - GTCGTG - 3');

TK (5' - CAGAGTTGATGACGCGTC - 3'; 5' - GTAGCGAGTGCTTTGGCAT - 3')

分别特异性扩增 c - erbB - 2 基因序列的第 2510 - 2219 位的 70 个碱基及 TK 基因序列的第 1907 - 1990 位的 84 个碱基。

取 1μl 由乳癌组织提取的 DNA,按本室常规<sup>5</sup> 加入各反应组份,总体积为 50μl。循环 94 60 sec, 55 60sec, 72 120sec, 共 35 个反应周期,最后 72 延长 5min。

取 10μl 反应产物作 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,

溴乙锭染色,紫外灯照射,摄片。负片用波长 520nm 可见光的 Beckman CDS - 200 型光密度仪对电泳道作纵向扫描<sup>6</sup>。根据每一泳道内各区带的电光密度值(I. O. D)用下述公式计算出靶基因拷贝数:c - erbB - 2 基因拷贝数 = I. O. D<sub>c - erbB - 2</sub> / I. O. D<sub>TK</sub>。其中 I. O. D 的计算公式为半宽 × 高。

## 结果与讨论

在 71 例乳腺癌患者中,共有 19 例扩增,I. O. D<sub>c - erbB - 2</sub> / I. O. D<sub>TK</sub> 为 4.03 ± 1.73,阳性率为 26.7%。其中扩增 2 倍的 7 例,3 - 5 倍的 6 例,5 倍以上的 6 例。

以往研究所用的组织一般为新鲜肿瘤组织或石蜡包埋标本,但由于目前所发现的乳腺癌早期肿瘤较多,癌组织较小,而临床首先必须满足病理诊断的需要,因此,手术时留取作 d - PCR 研究的组织就难以保证。石蜡包埋标本多用于回顾性研究,但由于所用的固定剂福尔马林对 DNA 有降解作用,且固定剂的浓度对 DNA 的提取也有很大的影响,从石蜡包埋组织中提取的 DNA 常有碎裂化现象<sup>7</sup>。为此,我们选取手术过程中快速冰冻切片的剩余乳癌组织作 d - PCR。临床为了确诊所选取的作快速冰冻切片的组织一般都是癌组织,因此,用此材料作 d - PCR 检测乳腺癌 c - erbB - 2 基因的扩增克服了以上不足,具有简便、快速、结果可靠的优点,值得临床试用和推广。

癌细胞呈现基因组的不稳定性,因此,在肿瘤的发生和演进过程中,常发生染色体的缺失、易位和重排。c - erbB - 2 基因定位于 17 号染色体,而在乳腺癌细胞中,染色体的非整倍体现象,包括 17 号染色体的缺失和增加现象非常普遍<sup>8</sup>。c - erbB - 2 基因的扩增是乳腺癌中最常见的遗传学损伤。如果靶基因 c - erbB - 2 与参照基因 TK 设在不同的染色体上,在肿瘤细胞的增殖过程中,就很可能因靶、参照基因所

文章编号:1004 - 616X(2000)01 - 0049 - 03

## 昆明山海棠胶囊致突变作用

唐 瑛,郑有顺,梁翠微

(第一军医大学中医系,广东广州 510515)

**摘要:**目的与方法:本文采用 Ames 法、活体小鼠骨髓嗜多染红细胞微核(PCEs - MN)和骨髓细胞姊妹染色单体交换(SCE)试验,对昆明山海棠胶囊进行了诱变性研究。结果:昆明山海棠胶囊无移码突变和碱基置换效应;剂量低于 200mg/kg. bw 时 SCE 频率正常,高于此剂量,则可增加 SCE 频率,且使嗜多染红细胞微核率增加,并呈剂量依赖性。结论:实验结果表明,昆明山海棠胶囊具有低中度的遗传毒性。

**关键词:**昆明山海棠胶囊;Ames;微核;姊妹染色单体;致突变

中图分类号:R285.53;R965.3 文献标识码:A

昆明山海棠胶囊是由昆明山海棠、淫羊藿等药的提取物组成,对类风湿性关节炎有明显疗效。为了临床安全用药,本文报道微生物回复突变试验(Ames 试验)、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核(PCE - MN)试验、小鼠骨髓细胞姊妹染色单体交换(SCE)试验。结果显示如下:

### 材料与方法

#### 1 材料

1.1 昆明山海棠胶囊由四川省中医药研究院中药研究所提供。用蒸馏水按所需浓度配制,冰箱保存备用。

在的染色体非同步增减而影响参照基因的单拷贝性,从而影响检测结果。为了弥补以上不足,我们将靶、参照基因都设记在同一条染色体 - 17 号染色体上,使我们对乳腺癌中 c - erbB - 2 基因扩增的检出率由原来的 20%左右<sup>7,9</sup>提高到 26.7%。

差别 PCR 是一种检测基因拷贝数改变的、快速并较敏感的非同位素技术。该方法简单、易行、实用。只要引物设计合理、选材得当,就能获得准确的基因扩增信息,为临床治疗和预后的判断提供可靠的依据。

### 参考文献:

- 1 An HX, Niederuches D, Beckman MW, et al. ERB - 2 gene amplification detected by fluorescent differential polymerase chain reaction in paraffin embedded breast carcinoma tissues J. *Int J Cancer*, 1995, 64 (5): 291 - 297.
- 2 Noguchi M, KoyAki N, Otha N, et al. c - erbB - 2 oncoprotein expression versus internal mammary lymph node metastases as addi-

tional prognostic factors in patients with axillary lymph node - positive breast cancer J. *Cancer*, 1992, 62: 2953 - 2960.

- 3 Edison Liu, Ann Thor, Mei He, et al. The HER - 2 (c - erbB - 2) oncogene in frequently amplification in situ carcinomas of the breast J. *Oncogene*, 1992, 7: 1027 - 1032.
- 4 沈宗丽,薛开先,吴建中,等. 无水乙醇保存少量肿瘤组织用于聚合酶链反应研究 J. *中华检验杂志*, 1999, 22(1): 56.
- 5 薛开先,王亚平,陈森清,等. 应用差别 PCR 技术检测癌基因扩增的研究 J. *遗传*, 1994, 4(2): 39.
- 6 薛开先,王亚平,马国建,等. 差别 PCR 技术及检测卵巢癌 C - erbB - 2 癌基因扩增的研究 J. *癌变·畸变·突变*, 1995, 7: 31 - 34.
- 7 薛开先,陈森清,马国建,等. 检测肿瘤 c - erbB - 2 癌基因扩增的差别 PCR 研究 J. *中华遗传学杂志*, 1997, 14(6): 381 - 383.
- 8 Jennings BA, Hadierd JE, Worsley SD, et al. A differential PCR assay for the detection of c - erbB - 2 amplification used in a prospective study of breast cancer J. *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 1997, 50: 251 - 256.
- 9 陈森清,赵祥生,马国建,等. 乳癌组织中 C - erbB - 2 基因扩增与临床关系的研究 J. *癌变·畸变·突变*, 1998, 10(6): 349 - 352.

收稿日期:1999 - 04 - 06;修订日期:1999 - 06 - 24

作者简介:唐瑛(1964 - )女,江苏扬州人,主治医师,硕士,研究方向:中药药理。