

乳癌组织中 C - erbB - 2 基因扩增与临床关系的研究

陈森清 赵祥生 马国建 吴建中 薛开先

江苏省肿瘤防治研究所 南京 210009

摘要 本文应用差别聚合酶链式反应检测了 63 例乳癌患者新鲜手术标本的 C - erbB - 2 基因。结果表明, 共在 13 例 (20.6%) 乳癌患者中检测出 C - erbB - 2 基因扩增。在有淋巴结转移的乳癌患者中, C - erbB - 2 扩增的阳性率为 21.6% (8/37); 尚无淋巴结转移的患者中, 阳性率为 19.2% (5/26); 两者无统计学差异 ($P > 0.75$)。在 50 例临床分期明确的病例中, 期的 C - erbB - 2 扩增阳性检出率为 5/17; 期为 1/4; 高于 期 4/27 及 期 0/2, 但无统计学差异 ($P > 0.50$)。

关键词 差别聚合酶链式反应; C - erbB - 2; 乳癌

STUDY ON THE AMPLIFICATION OF C-erbB-2 ONCOGENE IN BREAST CANCER

Chen Senqing, Zhao Xiangsheng, Ma Guojian, et al

Jiangsu Institute of Cancer Research, Nanjing 210009

Abstract Differential PCR was used to detect the variance of C - erbB - 2 gene copies in 63 fresh breast cancer tissues. Amplification of C - erbB - 2 oncogene was found in 13 of 63 breast cancer (20.6%). The rate of amplification of C - erbB - 2 gene in patients with positive lymph node metastasis was approximately equal to that in negative node patients. It was identified that amplification of C - erbB - 2 gene existed in 5 of 17 on stage , 1 of 4 on stage , higher than that of stage (4/27) and stage (0/2), but the difference was not significant ($P > 0.50$).

Key words Differential PCR; C - erbB - 2; Breast cancer

在肿瘤的发生和演进中, 癌基因、抑癌基因的扩增和缺失起着重要的作用^(1,2)。在乳癌组织中, 癌基因 C - erbB - 2 的扩增或过度表达与乳癌病情的发展或肿瘤的转移相关⁽³⁾, 因此临床上可作为乳癌的预后指标之一。为满足临床简便、快速和多项检测的需要, 我们首先应用了小块新鲜癌组织直接做差别聚合酶链反应 (Differential PCR), 即在检测乳癌组织中 C - erbB - 2 癌基因的同时设立一个单拷贝基因 - 干扰素 (IFN γ), 确定 C -

erbB - 2 基因拷贝数的变化, 来探讨乳癌组织中 C - erbB - 2 基因扩增与临床的关系。

材料和方法

1 新鲜乳癌组织的 DNA 释放 63 例新鲜乳癌组织均为我院外科手术切除的病变组织, 生理盐水洗去血污, 若不立即实验, 可加入无水乙醇, 保存与 4 待用。取 20 例正常人外周血作为阴性对照。检测前取出癌组织, 生理盐水洗涤两次, 剪去脂肪、结缔组织及坏死组织,

取 2mm³ 左右的癌组织块,充分剪碎,置 150 目金属网上,加入 5ml 生理盐水,用 2ml 注射器内芯轻轻揉磨,使癌细胞及碎片通过网眼进入生理盐水成混悬液,取样作细胞颗粒计数,离心去上清,制成约 0.5ml 的混悬液待用。

2 D-PCR 引物、反应条件及检测 根据靶基因 C-erbB-2 及参照基因 IFNG 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'-CCTCTGACGTC-CATCATCTC-3';5'-ATCTTCTGCTGC-CGTCGCTT-3'); IFNG (5'-TCTTTTCTTTCCCGATAGGT-3';5'-CTGGGATGCTCTTCGACCTC-3') 分别特异性扩增 C-erbB-2 基因序列的 2122-2219 位的 98 个碱基及 IFNG 基因序列的第 4582-4731 位的 150 个碱基。

经基因释放剂处理过的癌组织悬液及外周血悬液,按本实验室常规⁽⁴⁾加入各反应成

份,反应总体积 50μl。循环 93 60sec,55 60sec,72 120sec,共 35 个反应周期,最后延长 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,负片用波长为 520nm 可见光的 Beckman CDS-200 型光密度仪对电泳道作纵向扫描,求出 C-erbB-2 带与 IFNG 带光密度比值⁽⁵⁾。

结 果

1 阴性对照 20 例正常人外周血的 C-erbB-2 带与 IFNG 带的光密度比值为 0.88 ± 0.22,其双侧 95% 可信区间为 0.41 - 1.31;99% 置信区间为 0.31 - 1.44。因正常对照样本量较小,确定 99% 为可信限,即 C-erbB-2/IFNG 值 > 1.44 为具有 C-erbB-2 基因扩增的阳性病例(见图 1)。

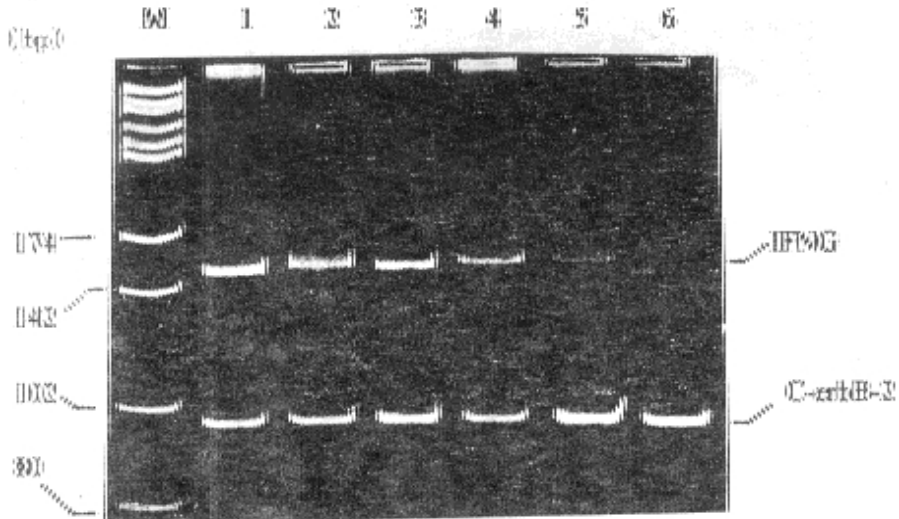


图 1 差别 PCR 检测乳腺癌组织中 C-erbB-2 基因扩增

1,2 为正常人外周血阴性对照;3,4 为未见 C-erbB-2 基因扩增的乳腺癌病例;5,6 为 C-erbB-2 基因扩增的乳腺癌病例。M: Marker

2 乳腺癌组织 63 例乳腺癌患者 D-PCR 检测结果与临床情况见表 1。

由表 1 可知:(1)在总计 63 例乳腺癌患者中,共有 13 例有 C-erbB-2 基因扩增,C-erbB-2/IFNG 为 2.64 ± 1.12,阳性率为

20.6%;(2)在淋巴结转移及尚未转移的乳腺癌患者中,C-erbB-2 基因扩增的检出率分别为 21.6% (8/37) 及 19.2% (5/26),经²检验,两者无统计学差异(P > 0.75);(3)髓样癌的 C-erbB-2 扩增阳性率 50% (2/4) 高于浸

浸润性导管癌 18 % (9/50), 但无显著性差异 ($P > 0.10$); (4) 临床分期明确的 50 例病例中, C-erbB-2 基因扩增阳性率, 早期最高 29.4 % (5/17), 中期次之 25.0 % (1/4), 高于晚期 14.8 % (4/27) 及 0 % (0/2), 但经 χ^2 检验, 无显著性差异 ($P > 0.50$)。

表 1 乳癌患者临床多种因素的差别 PCR 检测 C-erbB-2 基因扩增的结果比较

比较因素	总例数	C-erbB-2 基因扩增阳性率 (%)	P 值
淋巴结状况: 转移	26	19.2	>0.75
未转移	37	21.6	
病理分型: 髓样癌	4	50.0	>0.10
浸润性导管癌	50	18.0	
其它	9	11.1	
临床分期: 早期	2	0	>0.50
中期	27	14.8	
晚期	17	29.4	
晚期	4	25.0	

讨论

基因的扩增与缺失常引起癌基因的活化 和抑癌基因的失活, 从而在肿瘤的发生与演进中起着中心的生物学作用。检测癌基因扩增的传统方法为 Southern 印迹杂交法, 此法需用核素标记的探针, 所需样品的 DNA 要求高, 临床检测有一定的困难。我们首先在国内建立了差别 PCR 技术⁽⁴⁾。鉴于目前肿瘤增多, 常规检查项目增加, 难以获得实验研究所需的体积较大的肿瘤组织, 我们首先应用了小块新鲜组织直接作 D-PCR, 满足了快速及多项检测的要求。

C-erbB-2 基因产物类似于上皮生长因子受体, 癌基因扩增使细胞膜上类皮生长因子受体过度表达, 刺激细胞旺盛分裂和增殖, 一般预示肿瘤的预后较差^(6,7)。

在检测的 63 例新鲜乳癌组织中, 有 C-erbB-2 基因扩增的为 13 例, 阳性率为 20.6 %, 与国外报道的大样本检测结果相似⁽⁷⁾, 提示乳癌是经常出现 C-erbB-2 扩增的肿瘤之一。电泳结果显示, 在正常组织或未见 C-erbB-2 扩增的病例中, 代表 C-erbB-2 基因的产物带 (98bp) 的荧光强度稍弱于 IFN γ 基因产物带 (150bp), 这可能是由于参照基因 IFN γ 扩增的 DNA 片段, 约比靶基因 C-erbB-2 扩增片段大 1/3, 故产物 DNA 量

较大, 发出了较强的荧光; 而在 C-erbB-2 基因扩增的病例中, IFN γ 带荧光强度显著减弱, 这可能是在有限的酶和 dNTP 的反应体系中, 拷贝数少的基因的复制合成处于竞争劣势的原因。

研究结果还表明: 在有、无淋巴结转移的乳癌患者中, 两者的 C-erbB-2 扩增率非常接近, 分别为 21.6 % 及 19.2 %, 提示淋巴结转移与癌基因 C-erbB-2 扩增之间无联系, Waston H⁽⁶⁾ 等也有类似报道。另外, 我们比较了不同临床分期与 C-erbB-2 扩增的关系, 发现临床分期晚, 则阳性率有增高趋势, 但未获统计学支持。所以, 癌基因 C-erbB-2 扩增与乳癌预后的关系, 有待于进一步的随访观察和研究积累。

参考文献

- 1 An HX, Niederach D, Beckman MW, et al. ERB-2 gene amplification detected by differential polymerase chain reaction in paraffin embedded breast carcinoma tissues. *Int J Cancer*, 1995, 64:291
- 2 Noguchi M, Koyasaki N, Ohta N, et al. C-erbB-2 oncoprotein expression versus internal mammary lymph node metastases as additional prognostic factors in patients with axillary lymph node - positive breast cancer. *Cancer*, 1992, 69:2953
- 3 Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of

17 - 雌二醇和低密度脂蛋白对内皮细胞表达白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子的影响

马丽萍¹ 张国元² 吴宗贵²

¹第二军医大学长海医院心内科 上海 200433 ²第二军医大学长征医院心内科 上海 200003

摘要 本文研究低密度脂蛋白(LDL)对内皮细胞表达促炎性细胞因子白细胞介素 6(IL - 6)和肿瘤坏死因子(TNF)的影响及 17 - 雌二醇的保护作用。以体外培养的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)为模型。将 LDL 与 HUVEC 孵育及 HUVEC 经它莫西芬(Tamoxifen)和/或 17 - 雌二醇预处理后,再与 LDL 孵育,检测培养液中 IL - 6 和 TNF 活性。发现 LDL 可明显增加内皮细胞表达 IL - 6 和 TNF。LDL 100 μ g/ml 时,TNF 为 0.74 ± 0.09 (ng/ml),IL - 6 为 91.64 ± 7.39 (u/ml),与对照组相比 $P < 0.01$;经 17 - 雌二醇预处理后,细胞在 LDL 作用下,IL - 6 和 TNF 活性与对照组相比无显著差异($P > 0.05$);它莫西芬和 17 - 雌二醇处理后,再加 LDL,IL - 6 和 TNF 活性增高,与对照组相比有显著差异。实验结果表明:LDL 可促进血管内皮细胞高表达促炎性细胞因子 IL - 6 和 TNF。雌激素可明显抑制 LDL 引起的内皮细胞高表达 IL - 6 和 TNF,从而产生对内皮细胞的保护作用。此作用可被它莫西芬拮抗。因此雌激素保护内皮细胞的作用,可能部分通过内皮细胞上雌激素受体。

关键词 内皮细胞;雌激素;LDL;IL - 6;TNF

EFFECTS OF 17 - ESTRADIOL AND LOW DENSITY LIPOPROTEIN ON CULTURED ENDOTHELIAL CELLS TO EXPRESSION OF INTERLEUKIN - 6 AND TUMOR NECROSIS FACTOR

Ma Liping, Zhang Guoyuan, Wu Zonggui

Chang Zheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003

Abstract A study on the effects of 17 - estradiol against the expression of interleukin - 6 (IL - 6) and tumor necrosis factor (TNF) induced by low - density lipoproteins(LDL) on vascular endothelial cells (VECs) was carried out. The level of IL - 6 and TNF were measured in cultured human umbilical vein endothelial cells. LDL significantly raise the level of IL - 6 and TNF in cultured endothelial cells. In LDL 100 μ g/ml, TNF activity was 0.74 ± 0.09 (ng/ml) and IL - 6 ac-

- the GER - 2/neu oncogene. *Science*, 1987, 235:177
- 4 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. *遗传*, 1994, 4(2):39
- 5 薛开先,王亚平,陈森清,等. 差别 PCR 技术及检测卵巢癌 C - erbB - 2 癌基因扩增的研究. *癌变·畸变·突变*, 1995, 7:31
- 6 Waston H, Safreck JR, Le K, et al. Relationship of C - myc amplification to progression of breast cancer from in situ to invasive tumor lymph node metastasis. *J Nat Cancer Inst*, 1993, 85:902
- 7 Haraday, Katagiri T, Ito L, et al. Genetic Studies of 457 breast cancer. *Cancer*, 1994, 78:2281