

上皮性卵巢癌中 c-myc 基因扩增和 Rb1 基因缺失及临床意义*

黄宇婷^① 胡林萍^② 田菁^① 鞠宝辉^① 葛菁^② 李惠智^② 袁卫平^②
程涛^② 郝权^①

摘要 目的:肿瘤的发生与发展是基因组不稳定性逐渐积累的结果,表现为染色体数值异常、结构重排(基因缺失、扩增和染色体异位)、点突变和表观遗传学改变等。本研究使用双色荧光原位杂交技术(Duo-Colour Fluorescent *in situ* Hybridization, D-FISH)对上皮性卵巢癌患者腹水肿瘤细胞 c-myc 和 Rb1 基因的拷贝数的变化情况进行了研究。**方法:**收集经病理检查证实为卵巢癌患者的腹水标本 61 例,使用染色体核型分析选取二倍体的病例 58 例。同时检测细胞核中 c-myc 和 Rb1 基因的拷贝数变化。**结果:**在 58 例二倍体上皮性卵巢癌中,41 例出现 c-myc 基因扩增(70.69%),24 例出现 Rb1 基因缺失(41.38%)。20 例同时出现 c-myc 基因扩增和 Rb1 基因缺失(34.48%)。与卵巢良性肿瘤及正常卵巢组织相比差异具有统计学意义。且 Rb1 基因缺失与 FIGO 分期和病理分级($P < 0.01$)均相关。**结论:**上皮性卵巢癌中同时存在着癌基因 c-myc 的扩增和抑癌基因 Rb1 的缺失,多基因发生拷贝数变化可能在上皮性卵巢癌的发生和发展过程中起重要作用。

关键词 卵巢癌 C-myc Rb1 基因拷贝数变化

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.20.023

C-myc Amplification and Rb1 Deletion in Epithelial Ovarian Cancer

Yuting HUANG¹, Linping HU², Jing TIAN¹, Baohui JU¹, Jing GE², Huizhi LI², Weiping YUAN², Tao CHENG², Quan HAO¹

Correspondence to: Quan HAO; Email: haoquandoctor@126.com

¹Department of Gynecological Oncology, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Key Laboratory of Cancer Prevention and Treatment of Tianjin City, Tianjin 300060 China

²Institute of Hematology and Blood Disease Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, State Key Laboratory of Experimental Hematology, Tianjin 300020 China

This work was supported by the Program of International Science and Technology Cooperation of the Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China (2010DFB30270), the Tianjin Technology Support Program of International Science and Technology Cooperation (09ZCZDSF03800), and the Science and Technology Fund of Tianjin Bureau of Public Health (2011KZ80), and Key Program of Tianjin Nature Science Roundation

Abstract Objective: To identify copy number variations in the oncogene c-myc and antioncogene Rb1 in epithelial ovarian cancer. **Methods:** Tumor cells from ascites were collected from epithelial ovarian cancer patients. Karyotype analysis was performed to distinguish and exclude aneuploid samples. Probe DNA prepared from bacterial artificial chromosomes (BACs) selected according to c-myc and Rb1 was labeled with Spectrum Green and PromoFluor-590 by nick translation. Duo-color fluorescent *in situ* hybridization (D-FISH) analysis was then performed. The hybridization was performed strictly according to a previously published method. **Results:** Three aneuploid samples were excluded from the samples. In 41 of the 58 diploid samples, c-myc amplification was identified (70.69%), whereas Rb1 deletion appeared in 24 of the 58 samples (41.38%). C-myc amplification and Rb1 deletion were found simultaneously in 20 samples (34.48%). Only one sample showed c-myc amplification in a benign ovarian tumor. Neither amplification nor deletion was seen in normal ovarian tissues. The deletion of Rb1 is related to the International Federation of Gynecology and Obstetrics staging and pathological grading. **Conclusion:** Genome abnormalities were abundantly observed in epithelial ovarian cancer, among which, the amplification of c-myc and Rb1 deletion are the most common. Copy number variations in both oncogenes and antioncogenes may play an important role in the development and progress of advanced epithelial ovarian cancer.

Keywords Ovarian cancer; c-myc; Rb1; Copy number variation

作者单位:①天津医科大学附属肿瘤医院妇科肿瘤科、天津市肿瘤防治重点实验室(天津市300060);②中国医学科学院血液学研究所 实验血液学国家重点实验室

*本文课题受国家科技部国际合作项目(编号:2010DFB30270)和天津市重大科技支撑计划(编号:09ZCZDSF03800)、天津市卫生局基金(编号:2011KZ80)和天津市应用基础及前沿技术研究计划重点项目(编号:11JCZDJC27900)资助

通信作者:郝权 haoquandoctor@126.com

随着细胞遗传学与肿瘤病因学研究的不断深入,各种研究显示染色体不稳定性即数值异常(非整倍体)和结构重排(缺失、基因扩增和易位)与肿瘤的形成和发展密切相关^[1]。1989年Slamon在Science上报道了HER2/Neu基因在30%乳腺癌患者中扩增,时至今日仅仅20年的时间,Her-2基因检查已经成为判断乳腺癌的预后和化疗是否有效的必要检查,在临床工作中制定治疗方案时Her-2基因阳性者使用赫赛汀(herceptin)治疗^[2]。由此我们可以看到基因诊断技术在当今肿瘤临床医学上的作用不断发展、日益明显。

卵巢癌在妇科恶性肿瘤中发生率位居第三,但其死亡率高居榜首,5年生存率仍徘徊在20%~30%。目前各类型肿瘤的诊断都有着从细胞学诊断的水平向分子诊断水平发展的趋势,仅仅依靠细胞学诊断已经远远不能够满足临床工作的需要,分子诊断特别是基因诊断因其在判断肿瘤生物学行为、判断肿瘤预后、指导治疗和预测化疗敏感性等多方面具有重要的作用,已成为肿瘤诊断学的发展趋势。目前对于卵巢癌分子诊断的研究尚处于初步阶段。

荧光原位杂交(Fluorescence *in situ* Hybridization, FISH)技术是利用碱基的互补性,将标记上荧光素的探针与待测样本的DNA进行杂交,通过荧光显微镜收集荧光信号从而对待测核酸进行定性、定量及定位的方法。各种FISH探针及方法在研究肿瘤细胞的基因组的不稳定性,以及对恶性肿瘤的诊断、治疗反应监测、预后估计中起重要作用。本研究应用双色荧光原位杂交技术(Duo-Colour Fluorescent *in situ* Hybridization, D-FISH)探索上皮性卵巢癌患者腹水肿瘤细胞中c-myc和Rb1基因的拷贝数的变化。

1 材料与方法

1.1 研究对象

患者组样本来源于2011年3月至12月间在我院就诊的腹水阳性的经病理检查证实为上皮性卵巢癌的患者61例。经染色体核型分析,其中肿瘤细胞为二倍体的患者58例,其余3例为非整倍体不入组。入组的58例患者年龄44~78岁,平均年龄60岁,其中,按WHO组织学分类方法分:浆液性囊腺癌36例,黏液性囊腺癌22例;按国际妇产科联盟(Federation International of Gynecology and Obstetrics, FIGO)2000年制定的分期标准分期:I~II期12例,III~IV期46例;病理分级高分化-中分化36例,低分化-未分化22例。

对照组样本包括同时期手术的经病理检查证实为卵巢良性肿瘤的患者10例及因非卵巢疾病而行手术治疗患者的正常卵巢标本10例。3组患者间的年

龄差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究获得所有患者的知情同意。

1.2 主要试剂和仪器

质粒纯化试剂盒为美国QIAGEN公司产品。EcoR I、ssDNA、tRNA购自美国Sigma公司。质粒DNA(BAC克隆)、DNA Polymerase I、人cot-DNA、SSPE购自美国Invitrogen公司。Green dUTP为Abbott Molecular公司产品。PromoFluor-590-aadUTP为PromoKine公司产品。多色荧光显微镜为Zeiss公司AxioImagerZ2型显微镜连接高分辨率电荷耦合原件(Charge Coupled Device, CCD)相机;DAPI和Spectrum Green™滤光片购自Chroma公司,Texas Red™滤光片为Zeiss公司产品。ThermoBrite™原位杂交仪购自美国自然基因有限公司。离心甩片机为美国Wescor公司产品。

1.3 方法

1.3.1 染色体核型分析 收集卵巢癌患者腹水标本,分离腹水肿瘤细胞在1640培养基中培养68~72 h,收获细胞前2~3 h加入0.1 mL、5 μg/mL秋水仙素(终浓度0.1 μg/mL)混匀后继续培养2~3 h,离心5 min,加入37°C预热低渗液(0.075 mol/L KCl)水浴低渗30 min,加入固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)室温固定20 min 3次,使用固定液重悬并调整浓度,滴片,气干,Giemsa染液染色8 min,显微镜观察。

1.3.2 卵巢癌腹水肿瘤细胞FISH标本制备 收集卵巢癌患者腹水标本,使用PBS稀释清洗腹水标本,离心弃上清,必要时裂红细胞。加入37°C预热低渗液(0.075 mol/L KCl)水浴低渗30 min,加入固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)室温固定20 min 3次,固定液重悬后-20°C过夜。调整样品浓度使具有乳状外观,火焰法滴片,室温干燥并老化过夜。2×SSC洗片10 min 2次,梯度脱水。室温晾干。

1.3.3 正常卵巢组织及卵巢良性肿瘤组织FISH标本制备 将正常卵巢组织及卵巢良性肿瘤组织标本置平皿中,用含双抗的PBS洗涤2次。用眼科剪将组织迅速剪碎,加入RPMI 1640培养基(含10%血清)至5 mL,再加胶原酶至其终浓度为0.2%,混合均匀后置于37°C孵箱中过夜消化组织。次日将细胞悬液1 000 r/min离心10 min,弃上清液。加入预热低渗液(0.075 mol/L KCl),混匀后37°C水浴低渗30 min,1 000 r/min离心10 min。加固定液(甲醇:冰醋酸=3:1),室温固定20 min重复3次后滴片。2×SSC洗片10 min 2次,梯度脱水。室温晾干。

1.3.4 荧光探针制备 使用UCSC Genome Bioinformatics(<http://genome.ucsc.edu/>)数据库定位检索BAC(bacterial artificial chromosomes)克隆,各基因使用克

隆编码见表1。用Qiagen质粒纯化试剂盒分离提取 c-myc 和 Rb1 基因的DNA,先用EcoR I 酶切DNA,将酶切后的DNA进行沉淀,晾干后溶解于10 mmol/L TrisHCl 中。采用缺口平移的方法将荧光染料 Spectrum Green 和 PromoFluor-590 分别连接到酶切后的 c-myc 和 Rb1 基因的DNA上,将连接好的DNA进行沉淀,用70%乙醇洗涤1遍,最后溶解到杂交混合液中^[3-4]。

表1 探针制备及使用BAC克隆RP编码

Table 1 RP code of the BACs used in preparing probes

基因	荧光染料	染色体	RP克隆编码		
c-myc	Spectrum Green	8q24.21	RP11-944J14	RP11-367L7	RP11-440N18
Rb1	PromoFluor-590	13q14	RP11-951P4	RP11-305D15	RP11-102I4

1.3.5 双色荧光原位杂交实验 将制备好的FISH标本片用PBS洗片2次,0.4%甲醛室温固定20 min, PBS、0.1×PBS各洗片5 min,梯度脱水室温干燥。加入探针溶液,加盖盖玻片,用封片胶封片后85℃变性5 min,47℃杂交24 h。47℃核酸杂交缓冲液(saline sodiumphosphate EDTA, SSPE)洗涤5 min,55℃SSPE洗涤10 min,梯度乙醇中脱水之后放入己烷/异丙醇(60:40)中10 min,再放入异丙醇中5 min,100%乙醇中5 min,在空气中干燥后加入10 μL的4,6-二脒基-2-苯基吲哚(4,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)复染细胞核,加上Zeiss盖玻片,于荧光显微镜下观察、拍照^[1]。

1.3.6 D-FISH数据采集系统 使用Zeiss公司Axio-ImagerZ2型多色荧光显微镜,分别于DAPI、Spectrum Green™和TexasRed™(PromoFluor-590)滤光片下观察荧光信号,在DAPI图像下选择视野,定位,记录图像采集位置,然后在63倍油镜下同时在DAPI、Spectrum Green™和Texas Red™3个通路中采集细胞核和2种荧光素的原始图像,软件分析合成最后的分类图像照相记录。用AxioVisionRe 1.4.8软件进行图像分析测量。每张玻片选择10个区域进行拍照,每个样本计数200个以上细胞。以在大多数细胞中观察到的信号复合变化作为结果。结果判定标准:在二倍体细胞中,某基因拷贝数≥6为基因扩增,某基因拷贝数≤1为基因缺失。

1.4 统计学方法

本研究应用SPSS 16.0软件进行统计分析,定性资料的统计学分析应用卡方检验,采用配对资料卡方检验进行相关性分析,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 染色体核型分析

本研究采用二倍体肿瘤细胞为入组条件,共计

检测患者组标本61例,其中58例染色体核型分析结果为46,XX,为正常女性染色体组。其余3例为多倍体或非整倍体。染色体数量变化会影响基因拷贝数变化的分析,即基因拷贝数的增多不能排除由该染色体数量增多所导致;基因拷贝数减少亦不能排除由于该染色体缺失所引起,故此3例不入组。卵巢癌腹水肿瘤细胞染色体核型分析结果(二倍体)如图1。

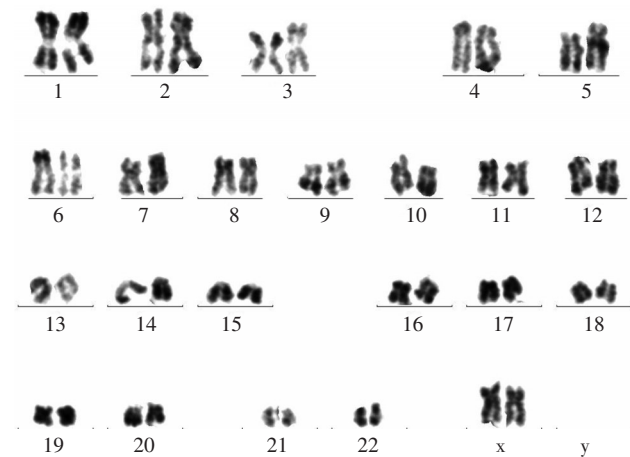


图1 卵巢癌腹水肿瘤细胞染色体核型分析结果(二倍体)

Figure 1 Karyotype analysis report for tumor cells in ascites from ovarian cancer patients (diploid)

2.2 双色荧光原位杂交

分析各组卵巢组织的基因拷贝数可发现:对3例未入组病例进行D-FISH检测,可见c-myc 基因和 Rb1 基因拷贝数均出现增加(如图2A),异常考虑是由于肿瘤细胞为多倍体细胞所导致,不能够明确判断各基因是否出现扩增或缺失。而经染色体核型分析筛选二倍体肿瘤细胞后,排除了多倍体、非整倍体等因素的影响即c-myc 基因和 Rb1 基因的拷贝数变化与染色体数量变异无关。

在58例二倍体上皮性卵巢癌中,41例出现c-myc 基因扩增(70.69%),24例出现 Rb1 基因缺失(41.38%)。20例同时出现c-myc 基因扩增和 Rb1 基因缺失(34.48%)。c-myc 基因扩增的频率显著高于卵巢上皮性良性肿瘤组织及正常卵巢组织,差异均具有统计学意义($\chi^2=10.86, P<0.01$; $\chi^2=14.97, P<0.01$)。Rb1 基因缺失的频率高于卵巢上皮性良性肿瘤组织及正常卵巢组织,差异均具有统计学意义($\chi^2=4.71, 0.01<P<0.05$; $\chi^2=4.71, 0.01<P<0.05$)。见表2,图2。图2B所示为正常卵巢组织中无基因拷贝数变化的细胞。图2C所示为上皮性卵巢癌中同时存在c-myc 基因扩增和 Rb1 基因缺失的肿瘤细胞。

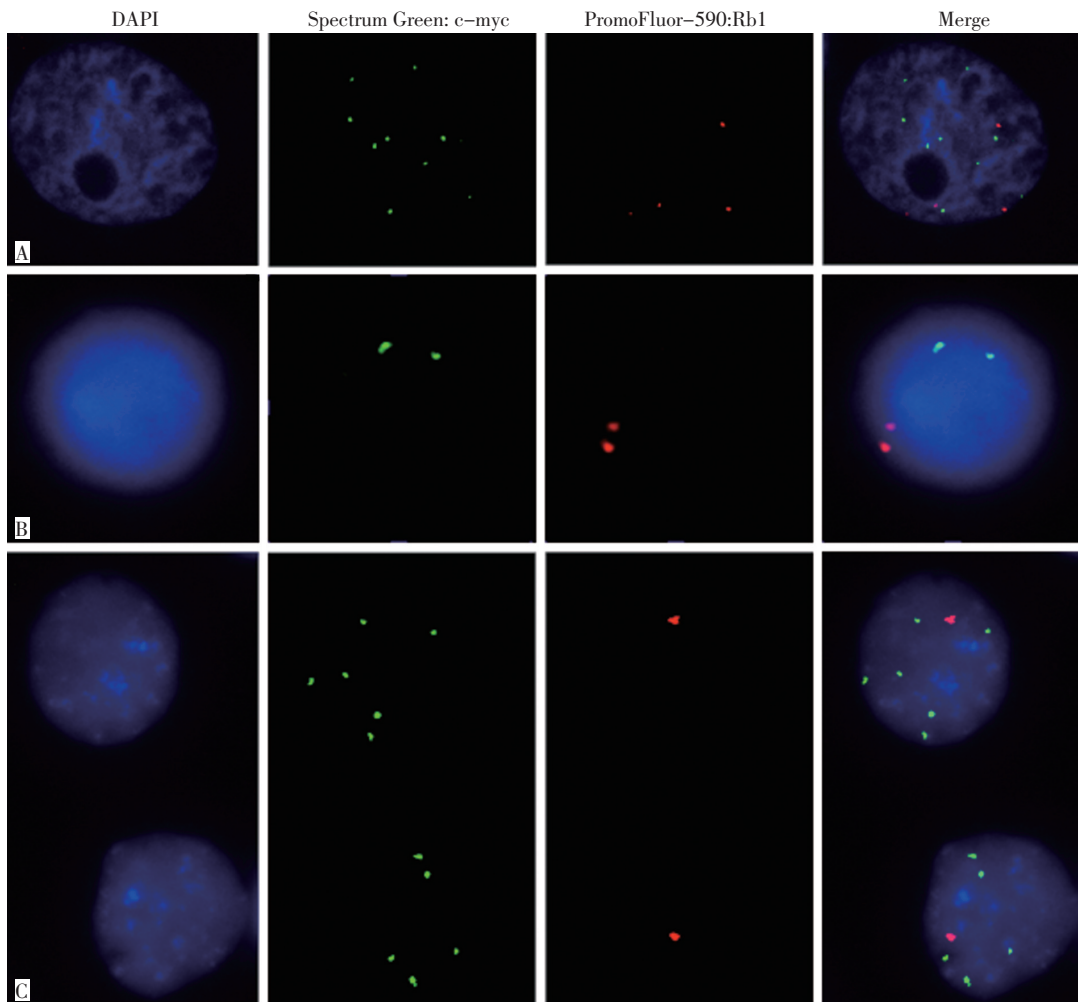
2.3 上皮性卵巢癌组织中c-myc 基因扩增和 Rb1 基因缺失与临床特性间的关系

上皮性卵巢癌组织中 c-myc 基因扩增与肿瘤的组织学类型、FIGO 分期和病理分级均无关 ($P>0.05$), 考虑 c-myc 基因扩增并未在肿瘤进展的过程中发挥明显的作用。Rb1 基因缺失与其组织学类型无关 ($P>0.05$), 但与 FIGO 分期和病理分级 ($P<0.01$) 相关。在进展期上皮性卵巢癌 (FIGO III ~ IV 期) 中 Rb1 基因缺失明显增加, 低分化-未分化组的 Rb1 基因缺失率较高分化-中分化组明显增加。Rb1 基因可能在疾病进展的过程中发挥作用, 与疾病的恶性程度相关。见表 3。

表 2 各组卵巢组织中 c-myc 和 Rb1 基因拷贝数情况 例 (%)
Table 2 Copy number variations in c-myc and Rb1 in different ovarian tissues

组织	n	拷贝数异常			拷贝数异常率
		c-myc 扩增*	Rb1 缺失	共存	
正常卵巢组织	10	0(0)	0(0)	0(0)	0
卵巢良性肿瘤	10	1(10)	0(0)	0(0)	10
上皮性卵巢癌腹水肿瘤细胞	58	41(70.69)	24(41.38)	20(34.48)	77.59

*结果判定标准: 在二倍体细胞中, 某基因拷贝数 ≥ 6 为基因扩增, 某基因拷贝数 ≤ 1 为基因缺失



A: 染色体核型分析为多倍体非整倍体者 c-myc 基因和 Rb1 基因拷贝数均出现增加; B: 正常卵巢组织中无基因拷贝数变化的细胞, c-myc 基因和 Rb1 基因拷贝数均为 2; C: 上皮性卵巢癌中同时存在 c-myc 基因扩增和 Rb1 基因缺失

图 2 上皮性卵巢癌腹水细胞中同时存在 c-myc 扩增 Rb1 缺失 ($\times 630$)

Figure 2 c-myc amplification and Rb1 deletion co-exist in tumor cells of ascites from ovarian cancer patients ($\times 630$)

表 3 上皮性卵巢癌组织中 c-myc 基因扩增和 Rb1 基因缺失与临床特征间的关系

Table 3 Relationship between c-myc amplification and Rb1 deletion in patients with ovarian epithelial cancer and their clinical characteristics

临床特征	n	c-myc 扩增			Rb1 缺失		
		阳性	χ^2	P	阳性	χ^2	P
组织类型			2.12	>0.05		2.53	>0.05
浆液性囊腺癌	36	23			12		
黏液性囊腺癌	22	18			12		
FIGO 分期			0.52	>0.05		8.64	<0.01
I ~ II	12	10			0		

(续表3)

临床特征	n	c-myc 扩增			Rb1 缺失		
		阳性	χ^2	P	阳性	χ^2	P
III ~ IV	46	31			24		
病理分级			0.74	>0.05		29.57	<0.01
高分化-中分化	36	24			5		
低分化-未分化	22	17			19		

3 讨论

卵巢癌在妇科恶性肿瘤中发生率位居第三,但其死亡率高居榜首。国内外现有的对于卵巢癌中发现癌基因的扩增和抑癌基因缺失的报道结果差异很大,如 c-myc 基因报道其在卵巢癌中的扩增率为 27.8% ~ 78%^[5-6],而抑癌基因 p53 的缺失率为 29.4% ~ 70.4%^[7-8]。本研究使用 D-FISH 技术研究了上皮性卵巢癌中 c-myc 和 Rb1 基因的拷贝数变化情况,为排除由于肿瘤细胞中异倍体现象及染色体数量变化导致的基因拷贝数误读,本研究选取了经染色体核型分析证实为二倍体的肿瘤细胞作为研究对象,从而明确基因拷贝数的变化的确由扩增或缺失导致。本研究发现 c-myc 基因的部分实验结果与现有文献报道结果相符,并在国内首次报道了 Rb1 基因缺失与卵巢癌 FIGO 分期和病理分级相关。对卵巢癌基因拷贝数变化进行测定有助于该疾病的诊断、治疗和预后判断,为卵巢癌基因诊断和基因治疗靶向选择提供了一定的实验基础。

本研究发现在正常卵巢组织中未观察到基因拷贝数变化,在卵巢良性肿瘤中该现象发生率极低。而在上皮性卵巢癌患者腹水肿瘤细胞中,普遍存在着基因拷贝数变化(77.59%)。不但存在着癌基因 c-myc 的扩增(70.69%)和抑癌基因 Rb1 的缺失(41.38%),且在高达 34.48% 的患者中同时存在着这两种基因拷贝数变化。可见在肿瘤的发生发展过程中,基因组不稳定性逐渐积累。这个现象可能在进展期上皮性卵巢癌的发生和发展过程中起重要作用。

C-myc 基因是 myc 基因家族的重要成员之一,myc 基因定位于染色体 8q24,myc 基因主要通过扩增和染色体易位重排的方式激活,与某些组织肿瘤的发生、发展和演变转归有重要关系。在不同的人体肿瘤细胞系中,包括粒细胞性白血病细胞系,视网膜母细胞瘤细胞系,某些神经母细胞病细胞系,乳腺癌细胞系及某些肺癌细胞系,已发现 c-myc 或 c-myc 相关序列的扩增。C-myc 癌基因已在成骨肉瘤、软骨肉瘤、脊索瘤、脂肪肉瘤、横纹肌肉瘤中发现扩增,而且 c-myc 过量表达与肿瘤的早期复发有关,在致瘤中,已发现 ras 与 myc、sis 与 myc、myc 与 fos 偶联激活,协

同致瘤等。相关研究已发现,c-myc 的 mRNA 和蛋白在卵巢上皮性癌组织中过度表达^[9]。本研究发现,c-myc 基因扩增的频率显著高于卵巢上皮性良性肿瘤组织及正常卵巢组织,但 c-myc 基因扩增与肿瘤的组织学类型、FIGO 分期和病理分级均无关,提示 c-myc 基因扩增可能在卵巢组织癌变过程中发挥一定的作用,但与上皮性卵巢癌的进展无关,可以有望用于上皮性卵巢癌的早期诊断,从而早期阻断疾病的进程。

在研究中 Rb1 基因缺失的频率显著高于卵巢上皮性良性肿瘤组织及正常卵巢组织,Rb1 基因缺失与其组织学类型无关,但与 FIGO 分期和病理分级相关,Rb1 基因的缺失多见于疾病进展期。由此可推断 Rb1 基因缺失与肿瘤的发生无关,但与疾病的进展相关,可用于疾病预后的判断并指导治疗等方面。视网膜母细胞瘤基因 1 (Retinoblastoma 1, Rb1) 是人类第一个分离克隆的抑癌基因。Rb1 基因是细胞周期的负调控因子,通过与转录因子结合调节细胞增殖和分化所需基因的表达,从而维持细胞生长发育的平衡。该基因的功能与细胞周期、细胞衰老、细胞凋亡、细胞分化和生长抑制等有关。Rb1 基因所编码的蛋白 pRb 是一个位于细胞核的磷蛋白,相对分子质量约为 104 ~ 110 kDa。pRb 是细胞生长发育各个阶段的关键调节因子,pRb 的适量表达是生物体正常生长发育所必须的。pRb 主要通过调节细胞周期和各种组织、器官的相关转录因子和蛋白的调控来维持生物体生长发育的平衡,一旦 pRb 失活或过表达就会导致细胞的异常增殖、衰老或凋亡,使正常的器官组织发生病理性改变,导致各种疾病的发生,并最终影响生物体的生长发育^[10]。已有研究证实 Rb1 通路异常可见于卵巢浆液性乳头状瘤^[11];使小鼠卵巢表面上皮 p53 和 Rb1 基因共失活可以诱发癌症发生^[12]。

综上所述,在上皮性卵巢癌中存在着癌基因 c-myc 的扩增和抑癌基因 Rb1 的缺失,推测二者可能共同参与了上皮性卵巢癌的发生和发展过程。其中 c-myc 基因扩增可能是卵巢癌发生的重要环节;而 Rb1 基因缺失与肿瘤的 FIGO 分期和病理分级相关,可能在肿瘤的进展中起重要作用。对二者进行联合

(下转第 1555 页)