

c-erbB₂, P53, PCNA, ER, PR及 TopoII在乳腺癌的表达及其临床意义

张琼¹, 朱玉兆²

[摘要]目的: 探讨 c-erbB-2, P53 增殖细胞核抗原 (Proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 和 DNA 拓扑异构酶 II (DNA topoisomerase II, TopoII) 及雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 和孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 在乳腺癌的表达和临床病理关系。方法: 89 例乳腺癌石蜡切片标本免疫组化 EnVision 法染色。结果: c-erbB-2, P53, TopoII 和 PCNA 在乳腺癌的阳性率分别为 64.04%、29.21%、55.06% 和 59.55%, 其中 c-erbB-2, PCNA 在淋巴结有无转移之间表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且 PCNA 的表达与乳腺浸润性癌的关系密切。而 TopoII 在淋巴结转移间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论: c-erbB-2, PCNA 可以作为判断乳腺癌患者预后的有效指标, TopoII 在乳腺癌中的表达可作为指导乳腺癌化疗的重要指标和判断乳腺癌预后的参考指标。

[关键词] 乳腺肿瘤; c-erbB-2; P53 增殖细胞核抗原; DNA 拓扑异构酶 II; 雌激素受体; 孕激素受体

[中国图书资料分类法分类号] R 737.9 [文献标识码] A

Expression of c-erbB₂, P53, PCNA, ER, PR and TopoII in breast cancer and its clinical significances

ZHANG Qiong, ZHU Yuzhao

(1. Department of Pathology Bengbu Medical College, Bengbu 233030

2. Department of Pathology Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] Objective: To evaluate the clinicopathological significance of expressions of c-erbB-2, P53, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), DNA topoisomerase II (TopoII), estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) in breast cancer. Methods: Eighty-nine cases of paraffin embedded specimens of breast carcinoma were studied by immunohistochemical technique. Results: The positive rates of c-erbB-2, P53, TopoII and PCNA were 64.04%, 29.21%, 55.06%, and 59.55%, respectively. The expressions of c-erbB-2, PCNA were positively correlated with lymph node metastases ($P < 0.05$), and there was the closely relationship between PCNA and invasive mammary carcinoma. But there was no relationship between TopoII and lymph node metastases ($P > 0.05$). Conclusions: The results suggested that c-erbB-2 and PCNA can be effective markers for estimating the prognosis of breast cancer. The expressions of TopoII may be useful in predicting prognosis and leading chemotherapy.

[Key words] breast neoplasms; c-erbB-2; P53; Proliferating cell nuclear antigen; DNA topoisomerase II; estrogen receptor; progesterone receptor

乳腺癌居女性恶性肿瘤的首位, 每年全球约有 400 万人死于该病, 其发病率逐年上升。肿瘤的发生、发展与细胞的异常增殖相关。雌激素受体 (ER) 和孕激素受体 (PR) 是调节性器官细胞生长发育的受体, 乳腺是 ER、PR 的靶器官, 在正常乳腺上皮细胞的胞核内均含有雌激素受体和孕激素受体, 在乳腺癌细胞中仍保留对 ER、PR 的表达。增殖细胞核抗原 (Proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 是一种与增殖细胞相关的核抗原, 是近年来认为更能有效评估肿瘤细胞增殖活性的重要标志物, 也是当前研究的热点。癌基因 (oncogene)、肿瘤抑制基因 (抗癌基因) (tumor suppressor gene or antioncogene) 的异常与乳腺癌的发生、发展密切相关。激素受体与多种癌基因、抑癌基因联合表达的报道较少且结果

不尽相同^[1,2]。本研究用免疫组化法检测乳腺癌组织中 c-erbB-2, P53, PCNA, DNA 拓扑异构酶 II (DNA topoisomerase II, TopoII)、ER 及 PR 的表达, 结合临床病理因素 (患者年龄、肿瘤大小、淋巴结转移状况、临床分期等), 分析它们之间的相关性及其临床意义。

1 材料与方法

1.1 材料 89 例标本均来自第二军医大学附属长海医院 2002~2004 年女性原发性乳腺癌根治手术标本, 术前未做放疗和化疗。病理诊断明确, 年龄 29~85 岁, 按 WHO 乳腺癌临床 TNM 分期标准 (2003), I 期 16 例, II 期 35 例, IIb 期 34 例, III 期 4 例, 其中有淋巴结转移 43 例, 未见淋巴结转移 46 例。

1.2 方法

1.2.1 试剂来源 所用抗体均为 DAKO 公司产品, 购自基因公司成都分公司, 采用 EnVision System

[收稿日期] 2006-05-17

[作者单位] 1 蚌埠医学院 病理学教研室, 安徽 蚌埠 233030

2 第二军医大学附属长海医院 病理科, 上海 200433

[作者简介] 张琼 (1979-), 女, 助教。

法。本实验以已知的乳腺癌阳性切片做阳性对照, 又用该组织切片被 PBS 取代一抗做阴性对照。

1.2.2 检测方法 组织标本以 10% 甲醛溶液固定 24 h 常规石蜡包埋, 制备 5 μm 厚连续切片, 贴附于涂有 APES 处理的载玻片上, 60 $^{\circ}\text{C}$ 烤片 2 h 采用 EnVision System 法染色。

1.3 结果判断 对细胞膜及细胞核中棕色颗粒的细胞进行分析, 不同生物学指标在细胞中的着色部位不同。c-erbB-2 阳性部位为细胞膜, P53、PCNA、T α p α II、ER 和 PR 的阳性部位在细胞核。每张切片随机取 3 个高倍视野, 以阳性细胞比例的平均值定义为该肿瘤的阳性细胞百分比。判断标准: 10% ~ 25% 为 “+”; 26% ~ 75% 为 “++”; 76% 以上为 “+++”。

1.4 统计学方法 采用 χ^2 检验和秩和检验。

2 结果

PCNA、c-erbB-2 在乳腺癌有无腋窝淋巴结转移

表 1 乳腺癌患者临床病理参数与 6 项标志物表达的关系 (1)

观察项目	n	c-erbB-2	χ^2	P	P53	χ^2	P	PCNA	χ^2	P	T α p α II	χ^2	P	ER	χ^2	P	PR	χ^2	P
年龄(岁)																			
≤ 50	38	25	0.09	>0.05	12	0.18	>0.05	24	0.36	>0.05	22	0.22	>0.05	21	0.27	>0.05	24	0.93	>0.05
>50	51	32			14			29			27			31			27		
肿瘤长径																			
$\leq 3 \text{ cm}$	61	37	0.97	>0.05	18	0.01	>0.05	39	1.55	>0.05	36	1.23	>0.05	37	0.40	>0.05	36	0.23	>0.05
>3 cm	28	20			8			14			13			15			15		
淋巴结																			
(+)	43	32	3.89	<0.05	13	0.04	>0.05	34	13.16	<0.01	22	0.51	>0.05	25	0.009	>0.05	25	0.02	>0.05
(-)	46	25			13			19			27			27			26		
受体表达																			
均阳性	47	23	10.82	<0.01	9	6.39	<0.05	36	9.66	<0.01	25	0.15	>0.05						
均阴性	33	28			15			14			19								
临床分期																			
I	16	8			3			8			8			10					8
II ^a	35	20	5.60 Δ	>0.05	10	1.48 Δ	>0.05	16	9.02 Δ	<0.05	23	3.54 Δ	>0.05	21	1.96 Δ	>0.05	22	2.50 Δ	>0.05
II ^b	34	25			12			27			17			20			20		
III ^a	4	4			1			2			1			1			1		
病理组织学类型																			
浸润性癌	85	56	0.77	>0.05	26	0.57	>0.05	53	3.85	<0.05	46	0.09	>0.05	50	0.03	>0.05	49	0.05	>0.05
特殊类型癌	4	1			0			0			3			2			2		

Δ 示 H α 值

发展密切相关, 在控制细胞分裂及分化中起到极其重要的作用, 其产物过表达与预后呈负相关。本组检测 89 例乳腺癌 c-erbB-2 阳性率为 64.04%, 且随着临床期别的增加, c-erbB-2 表达强度也相应增加, 从而提示 c-erbB-2 过表达与乳腺癌的发生发展可能有着一定关系。另外, Morik 等^[3]报道 c-erbB-2 与 ER、PR 之间存在负相关关系, 即该基因的激活在

中的表达和在受体表达均阳性与均阴性之间表达均有统计学意义 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$), PCNA 的表达同时在临床分期和疾病的组织学类型之间亦有统计学意义 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.05$)。P53 的表达在受体表达均阳性与均阴性之间差异亦有统计学意义 ($P < 0.05$) (见表 1)。乳腺癌患者 T α p α II 和 c-erbB-2 共表达与受体表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而与其它临床病理参数, 如患者年龄、肿瘤大小、腋窝淋巴结有无转移、临床分期之间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) (见表 2)。

3 讨论

癌基因 c-erbB-2 又称 HER-2 基因, 是表皮生长因子受体家族 (human epidermal growth factor receptor family) 成员之一, 定位于人染色体 17 $\text{q}21$, 其编码产物为 185 kDa 的跨膜蛋白 (P185), 具有酪氨酸蛋白激酶活性, 其扩增和过表达与乳腺癌发生、

ER 阴性肿瘤中较常见。我们也观察到其与该受体的负相关性, 且腋窝淋巴结有转移组 c-erbB-2 基因蛋白表达明显高于无转移组 ($P < 0.05$)。此结果进一步证实了 c-erbB-2 高表达者预后不良。

P53 抑癌基因突变与人类肿瘤关系十分密切, 突变型 P53 不仅失去了正常野生型 P53 的抑癌功能, 反而具有促进恶性转化的活性, 使细胞无限增

表 2 乳腺癌临床病理参数与 TopoII 和 c-erbB-2 共表达的关系⁽¹⁾

临床病理参数	n	共表达	χ^2	P
年龄(岁)	≤ 50	38	1.66	> 0.05
	> 50	51		
肿瘤长径	≤ 3 cm	61	0.03	> 0.05
	> 3 cm	28		
淋巴结	(+)	43	0.22	> 0.05
	(-)	46		
受体表达	均阳性	47	4.71	< 0.05
	均阴性	33		
临床分期	I	16	1.61 [△]	> 0.05
	II ^a	35		
	II ^b	34		
	III ^a	4		

△示 H²值

生。P53基因突变以及 P53基因蛋白异常染色在乳腺癌预后中的价值也早已被研究者所认识, Lwaya 等^[4]提出乳腺癌中 P53基因蛋白表达与浸润性增生和预后不良相关。研究表明^[5], 大约 50%的人类肿瘤都有 P53基因的突变, 在乳腺癌 P53的阳性表达率为 20%~60%, 本组为 29.21%。王洪义等^[6]采用分子生物学方法检测 P53基因突变, 发现突变阳性组和阴性组患者的无病生存期差异有显著性, 因此, 初步认为 P53在乳腺癌中有明显的阳性表达率及过表达率, 特别是随着临床分期而有逐渐增加的趋势, 提示 P53基因在预后的判断中起着重要的作用。本组结果显示 P53表达与淋巴结转移状况无统计学意义, 与一些文献报道结果不同。

PCNA是一种分子量为 36 kD²的酸性核蛋白, 是真核细胞 DNA合成所必需的物质, 是一种仅在增殖细胞中合成或表达的核内多肽, 其表达和合成与细胞周期有关。在细胞增殖过程中, G₁期在细胞核中表达增强, S期达高峰, G₂/M期减少, 在 M期为低浓度^[7]。本组乳腺癌组织 PCNA表达阳性率达 59.55%, 且随临床分期的增高而增高 (P<0.05), 结果支持 PCNA是细胞增生活跃的指标, 表明癌细胞恶性程度愈高, 分化越差, 细胞增生越活跃。有学者从细胞动力学研究发现, 瘤细胞增生活性高者, 易发生淋巴结转移。本组 43例伴腋窝淋巴结转移的乳腺癌原发灶中 PCNA阳性表达率高于 46例无转移者 (P<0.05), 表明 PCNA过表达增加了瘤细胞转移的危险性^[8], 认为 PCNA可作为判断乳腺癌预后的可靠指标, 这在大肠癌中也有发现^[9]。同时, ER阳性是公认的表明预后较好的指标, 本组在研究 PCNA与 ER的相关性也得到了阳性结果。PCNA

在 ER PR均阴性的患者癌组织病变中与 ER PR均阳性的癌组织中的阳性表达率差异有统计学意义 (P<0.01), 提示预后较差。

很多研究显示乳腺癌癌细胞分化程度高, 恶性程度低, 其 ER PR的阳性表达高, 内分泌治疗效果和预后较好。ER阳性是乳腺癌病人的“保护”因素, 本资料显示 ER PR阳性率分别为 58.43%和 57.30%。但影响肿瘤生物学行为、临床特征及预后的因素较多, 应根据具体情况, 结合其它结果一起观察, 才能较为准确判断治疗的效果和预后。目前检测 ER PR的意义主要是用来指导乳腺癌的内分泌治疗, 对判断预后亦有一定作用。

TopoII 是存在于细胞核内催化 DNA拓扑异构体相互转换的一种酶, 许多抗癌药以 TopoII 为靶点, TopoII活性的下降是肿瘤细胞产生多药耐药的机制之一。TopoII不仅是肿瘤多药耐药的重要指标, 而且它们与 c-erbB-2共表达在对评价乳腺癌肿瘤大小及临床分期上有重要意义^[10], 它们有可能成为乳腺癌预后的标志物。同时亦发现 TopoII表达与原发肿瘤大小、病人年龄、腋窝淋巴结转移、远处转移及肿瘤分化程度无关, 与反映细胞增殖程度的 ki67表达显著相关^[11], 提示 TopoII可以作为细胞增殖的指标。Jarvinen等^[12]研究发现, TopoII在乳腺癌中表达水平较正常组织明显升高, TopoII的表达与处于 S期的肿瘤细胞数、DNA非整倍体、c-erbB-2表达呈正相关, 与 ER呈负相关, 与发病年龄、原发肿瘤大小、腋窝淋巴结转移等临床因素无关, 提示 TopoII与肿瘤增殖和远处转移有关。本实验结果表明, TopoII与 c-erbB-2共表达与发病年龄、原发肿瘤大小、腋窝淋巴结转移及临床分期等临床因素无关, 而与 ER PR表达有一定关系 (P<0.05)。

综上所述, 肿瘤的发生发展是一个多因素、多阶段的过程, 是多种因素、多种力量作用的结果。本研究对多种基因与乳腺癌临床、病理因素之间的关系作一些探讨, 对乳腺癌进行上述指标的检测, 有助于评估肿瘤的生物行为及预后, 对指导治疗和提高疗效有重要的意义。

[参 考 文 献]

- [1] 刘静贤, 高 琨, 刘毅强, 等. 乳腺癌 c-erbB-2、P53、ER和 PR表达及意义[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2003, 10(1): 15-16
- [2] 李菊英. c-erbB-2、P53、ER、PR在乳腺癌中的表达和预后[J]. 青海医学院学报, 2004, 25(1): 26-28
- [3] Moriaki T, Takahashi T, Hiroi M, et al. Histological grade in invasive ductal carcinoma of breast correlates with the proliferative activity evaluated by BrdU. An immunohistochemical study including correlations with P53, c-erbB-2 and estrogen receptor status[J]. Pathol Int 1996, 46(6): 417-425.

[文章编号] 1000-2200(2006)05-0450-04

· 基础医学 ·

舒林酸抑制胃癌 BGC-823细胞生长的实验观察

于东红¹, 周 蕾¹, 王 萍¹, 王启之², 承泽农¹

[摘要]目的: 观察舒林酸对胃癌 BGC-823细胞生长的抑制作用, 探讨其作用机制。方法: 将舒林酸设置不同的作用浓度和作用时间于人胃癌 BGC-823细胞共培养。采用 MTT比色法检测胃癌细胞抑制率, 流式细胞术检测胃癌细胞周期分布, TUNEL法检测细胞凋亡率, 免疫组化检测细胞增殖 (ki67)、凋亡抑制基因 (survivin)及还氧合酶 (COX-2)蛋白的表达。结果: 舒林酸使胃癌 BGC-823细胞的生长受抑制, 出现 G₀/G₁期比例增高, S期比例降低, 同时使细胞凋亡率显著上升; 而 ki67、survivin及 COX-2蛋白表达阳性率显著降低, 上述作用均呈时间和剂量依赖性 (P<0.01)。结论: 舒林酸可抑制胃癌 BGC-823细胞生长, 其机制涉及影响细胞周期分布、诱导细胞凋亡及抑制 COX-2、ki67及 survivin蛋白的表达。

[关键词] 胃肿瘤; 舒林酸; 增殖; 凋亡; 还氧合酶-2

[中国图书资料分类法分类号] R 735.2 [文献标识码] A

Inhibitory effect of sulindac on the growth of gastric cancer cells in vitro

YU Donghong, ZHOU Lei, WANG Ping, WANG Qizhi, CHENG Zhenong

(1. Department of Pathology, Bengbu Medical College, Bengbu 233030

2. Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, China)

[Abstract] Objective: To observe the inhibitory effect of sulindac on the growth of gastric cancer cells BGC-823 and its antioplastic mechanisms. Methods: Human gastric cancer cells BGC-823 were cultured with various concentrations of sulindac for different time. The proliferation of BGC-823 cells was measured by MTT coprimetric assay and the cell cycle distribution was examined by flow cytometry. Cell apoptosis was determined by TUNEL. The expressions of ki67, survivin and COX-2 in cells were detected by immunohistochemical staining. Results: Sulindac inhibited proliferation of BGC-823 cells, increased the proportion of cells in the G₀/G₁ phase, decreased the proportion of cells in the S phase, induced apoptosis of the BGC-823 cell line and decreased the expressions of ki67, survivin and COX-2 in cells. All the effects were in a time-dependent and dose-dependent manner (P<0.05). Conclusion: Sulindac inhibits the growth of gastric cancer cells BGC-823 and the anti-tumor mechanism may be related to changing cell cycle distribution, inducing cell apoptosis and inhibiting the expression of COX-2, survivin and ki67.

[Key words] stomach neoplasms; sulindac; proliferation; apoptosis; COX-2

[收稿日期] 2005-11-01

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助 (2003KJ257); 蚌埠市 2003年第一批科技项目 (10)

[作者单位] 1 蚌埠医学院 病理学教研室, 安徽 蚌埠 233030

2 蚌埠医学院附属医院 消化科, 安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 于东红 (1955-), 女, 教授。

近年流行病学研究及体外实验报道, 舒林酸等非甾体类消炎药 (NSAIDs) 对结肠癌、直肠癌有防治作用, 可使结肠癌的发病率降低 40%~50%^[1], 动物实验研究表明 NSAID 对许多动物诱发性肿瘤如结肠癌、膀胱癌有明显的化学预防作用^[2,3]。对于胃癌方面的研究刚刚起步。为此, 我们将舒林酸设置不同浓度和不同时间作用人胃癌细胞株 BGC-823

[4] Iwaya K, Tsuda H, Hiraide H, et al. Nuclear P53 immunoreaction associated with poor prognosis of breast cancer. J. Jpn J Cancer Res 1991, 82(7): 835-840.

[5] Davidoff AM, Hemdon JE, Glover NS, et al. Relation between P53 overexpression and established prognostic factors in breast cancer. J. Surg 1991, 110(2): 259-264.

[6] 王洪义, 吕有勇, 金山, 等. 乳腺癌 P53 基因突变规律及其预后意义 [J]. 实用肿瘤杂志, 2000, 15(5): 307-308.

[7] Aaltonen S, Lipponen P, Syrjänen K. Prognostic value of cell proliferation in breast cancer as determined by proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining [J]. Anticancer Res 1992, 12(4): 1281-1286.

[8] Lipponen PK, Eskelinen MJ. Cell proliferation of transitional bladder tumours determined by PCNA/cyclin immunostaining

and its prognostic value [J]. Br J Cancer 1992, 66(1): 171-176.

[9] 宋向阳, 张苏展, 吾金民. P53 蛋白和增殖细胞核抗原 (PCNA) 在大肠癌中的表达及其与预后的关系 [J]. 实用肿瘤杂志, 1997, 12(1): 24-27.

[10] 陈亦欣, 陈伟, 王秀清, 等. 乳腺癌组织中 MDR1, TopoII 和 c-myc 的表达及其相互关系 [J]. 中国现代医学杂志, 2003, 13(16): 31-34.

[11] 闫伟, 吴波. DNA 拓扑异构酶 II 与细胞增殖 [J]. 医学研究生学报, 2004, 17(3): 2340-2345.

[12] Jarvinen TA, Komonen J, Pelto-Huikko M, et al. Expression of topoisomerase II alpha is associated with rapid cell proliferation, aneuploidy and c-myc-2 overexpression in breast cancer. J. Am J Pathol 1996, 148(6): 2073-2082.