

文章编号:1005-6947(2006)04-0257-04

· 乳腺外科专题研究 ·

乳腺癌组织中 PSA mRNA 的表达及其与 ER 亚型表达的关系

吴唯^{1,2}, 吕新生¹, 唐中华³, 李小荣², 陈道瑾²

(1. 中南大学湘雅医院 普通外科, 湖南 长沙 410008; 2. 湘雅三医院 普外二科, 湖南 长沙 410013; 3. 湘雅二医院 普通外科, 湖南 长沙)

摘要:目的 探讨前列腺特异抗原(PSA)mRNA和雌激素受体(ER) β 亚型在乳腺癌组织中的表达及其与不同雌激素受体亚型表达之间的关系。方法 检测35例乳腺癌和12例癌旁乳腺组织及10例乳腺纤维腺瘤组织中的PSAmRNA和ER β mRNA表达;35例乳腺癌组织ER α 和PR蛋白的表达,并分析乳腺癌组织PSAmRNA表达与雌激素受体亚型和PR表达之间的关系。结果 PSAmRNA在乳腺癌组织中的表达水平明显低于癌旁乳腺组织和乳腺纤维腺瘤组织(P 均=0.00)。ER β mRNA在乳腺癌中的表达水平明显低于癌旁乳腺组织和乳腺纤维腺瘤组织(P 均=0.00)。PSAmRNA表达阳性者ER β mRNA表达水平明显低于PSAmRNA表达阴性者,差异有显著性($P=0.038$)。ER α 和PR阳性表达的乳腺癌组织中PSAmRNA表达高于ER和PR阴性者,差异有显著性($P=0.001, 0.004$)。结论 PSA和ER β 基因在乳腺癌中的表达下调。PSA可能是反映乳腺癌组织中功能性甾体类激素受体的一个重要指标。

关键词: 乳腺肿瘤; 前列腺特异抗原; 受体, 雌激素

中图分类号: R737.9; Q51 文献标识码: A

The relationship between expression of prostate-specific antigen mRNA and expression of subtype estrogen receptor in breast cancer

WU Wei^{1,2}, LU Xin-sheng¹, TANG Zhong-hua³, LI Xiao-rong², CHEN Dao-jin²

(1. Department of General Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 2. Department of General Surgery, the Third Xiangya Hospital, Changsha 410013, China; 3. Department of General Surgery, the Second Xiangya Hospital, Changsha 410011, China)

Abstract: **Objective** To study the significance of expression of prostate-specific antigen mRNA (PSA mRNA) and estrogen receptor beta mRNA (ER β mRNA) in breast cancer (BC), and the relationship of PSA mRNA expression with subtype estrogen receptor expression. **Methods** Reverse transcriptase polymerase chain reaction was conducted to detect the expression of PSA mRNA and ER β mRNA in 35 breast cancer samples, 12 juxta-carcinoma breast tissues and 10 breast fibroadenoma samples. Immunohistochemical method was conducted to analyze the expression of ER α and PR protein in 35 BC samples. **Results** The level of PSA mRNA in BC tissues was significantly lower than that in juxta-carcinoma breast tissues and breast fibroadenoma tissues (all $P=0.00$). The expression of ER β mRNA in BC tissues was significantly lower than that in juxta-carcinoma breast tissues and breast fibroadenoma tissues (all $P=0.00$). The expression of ER mRNA in PSA mRNA positive expression BC tissues was significantly lower than that in negative expression BC tissues ($P=0.038$). The expression of PSA mRNA in ER α and PR positive BC tissues was higher than that in ER β and PR negative BC tissues ($P=0.001, 0.004$ respectively). **Conclusions** PSA mRNA and ER β mRNA in BC tissues is downregulated, and PSA gene can be an important marker that reflects the hormonal status of the BC.

收稿日期:2006-01-08; 修订日期:2006-03-01。

作者简介:吴唯,男,湖南耒阳人,中南大学湘雅医院主治医师,主要从事乳腺、甲状腺和胃肠疾病的临床和基础方面的研究。

通讯作者:吴唯 E-mail:wuwei8912006@sina.com。

Key words: Breast Neoplasms; Prostate-Specific Antigen; Receptor, Estrogen

CLC number: R737.9; Q51

Document code: A

前列腺特异抗原(PSA)是当前诊断前列腺癌极有价值的肿瘤标志物,但研究认为其不是前列腺组织所特有,在乳腺癌组织中,癌细胞内含有高水平的PSA,是乳腺癌病人内分泌治疗有效和预后良好的重要标志,而且其表达可能受甾体类激素受体调节^[1],雌激素受体亚型 β (ER β)是近年发现的一种新型雌激素受体亚型,目前对其在乳腺癌发生发展中的作用仍不明确。笔者通过检测乳腺癌组织中PSA mRNA和雌激素受体亚型的表达,探讨两者之间的关系。

1 材料和方法

1.1 临床资料及分组

1.1.1 乳腺癌组 35例乳腺癌组织为湘雅二医院2003年5月—2003年7月间手术治疗的原发性乳腺癌患者,均为女性;年龄28~75岁,中位年龄48.14岁。已绝经者13例,绝经前期者22例。术前均未行放、化疗。34例行乳腺癌改良根治术,1例行乳腺癌根治术。按乳腺癌国际TNM临床分期:I期4例,II期27例,III期4例。病理类型:浸润性导管癌15例,单纯癌18例,乳头状瘤癌变1例,硬癌1例。淋巴结转移情况:腋窝淋巴结阴性15例,腋窝淋巴结阳性20例。

1.1.2 癌旁乳腺组织组 为研究后期手术的12例乳腺癌患者组织,均取自距肿瘤边缘2cm以上的外观无异常的乳腺组织,年龄29~68岁,中位年龄为49.25岁。

1.1.3 乳腺纤维瘤组 10例为同期手术治疗的乳腺纤维瘤患者,均为女性,年龄19~41岁,中位年龄为30.5岁。

所有病例术后均经病理检查证实诊断。每例标本取材后的标本迅速投入液氮中速冻,然后转存于-70℃的冰箱。

1.2 检测方法

1.2.1 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR) 按Trizol操作说明书步骤提取每例标本的总RNA后,在Gene Amp 2400P扩增仪上进行RT-PCR。根据紫外可见分光光度计测的各管总RNA浓度,各取4 μ g总RNA的体积做逆转录成cDNA。逆转录条件:10 \times

逆转录反应缓冲液2 μ L,25mM MgCl₂ 4 μ L,10mM dNTP 2 μ L,OligDT1 μ L,RNA酶抑制剂(RNasin)0.5 μ L,AMV逆转录酶(20U/ μ L)1 μ L,加无核酸酶水至终反应体系20 μ L,70℃变性10min,42℃1h,99℃5min,反应完毕后取出,冰上放置5min,将生成的cDNA置于-20℃保存。分别取一定量的cDNA进行PCR扩增。

PSA和ER β 引物序列参照文献由上海生物工程有限公司合成^[2-3],PSA正向:5'-CACAGACACCCCATCCTATC-3',反向:5'-GATGACTGGAGC-CACGACCT-3';ER β 正向:5'-GGCCGACAAGGAGTTG-GTGTA-3',反向:5'-AAACCTGAAGTAGTTGCCAG-GAGC-3';内参照 β -actin正向:5'-CACTGTGTTGGCG-TACAGGT-3';反向:5'-TCATCACCATTGGCAATGAG-3'。

PSA的扩增条件如下:10 \times PCR反应缓冲液2.5 μ L,10mM dNTP 0.5 μ L,25mM MgCl₂ 1.8 μ L,正向引物1 μ L,反向引物1 μ L,Taq酶2U(1 μ L),cDNA2 μ L,加去离子双蒸水至终反应体系25 μ L,94℃预变性5min,94℃变性1min、55℃退火1min、72℃延伸90s为1个循环,共35个循环。

ER β 的扩增条件如下:10 \times PCR反应缓冲液2.5 μ L,10mM dNTP 0.5 μ L,25mM MgCl₂ 1.5 μ L,正向引物1 μ L,反向引物1 μ L,Taq酶2U(1 μ L),cDNA2 μ L,加去离子双蒸水至终反应体系25 μ L,94℃预变性5min,94℃变性45s、58℃退火30s、72℃延伸90s为1个循环,共35个循环。

内参照 β -actin的扩增条件如下:10 \times PCR反应缓冲液2.5 μ L,10mM dNTP 0.5 μ L,25mM MgCl₂ 1.5 μ L,正向引物1 μ L,反向引物1 μ L,Taq酶2U(1 μ L),cDNA1 μ L,加去离子双蒸水至终反应体系25 μ L,94℃预变性5min,94℃变性30s、57℃退火30s、72℃延伸1min为1个循环,共30个循环。

用微量移液器取目的基因PCR产物和 β -actin基因PCR产物各5 μ L与载样液混匀后(按5:1),分别加入各孔。1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测并照像保存。用条带的大小和深浅判断PCR产物量,以 β -actin作为内部参照,经凝胶影像分析仪处理,用平均光密度乘以条带面积的值表示总的吸光度值

来代表各基因 mRNA 量。

1.2.2 免疫组化检测 鼠抗人 ER α 和 PR 单克隆抗体购自北京中山生物技术发展有限公司。35 例乳腺癌标本经 10% 福尔马林固定液,石蜡包埋,4~5 μ m 厚度连续切片,进行 HE 染色观察及免疫组织化学染色。免疫组织化学染色采用过氧化物标记的链霉卵白素染色法(SP 法),操作按说明书进行,以已知阳性的乳腺癌切片作为阳性对照,以 PBS 替代一抗作为阴性对照。细胞的胞浆或胞核内出现棕黄色或黄色颗粒为阳性细胞,以阳性细胞数为基础,阳性细胞数在 10% 以上为阳性表达,少于 10% 为阴性。

1.3 统计学分析

本组资料采用 SPSS10.0 统计软件进行统计学分析。采用精确概率法和 t 检验。

2 结果

2.1 PSA mRNA 的表达

PSA mRNA 的特异性条带为 710 bp (图 1)。乳腺癌组织中 PSA mRNA 阳性表达率 54.3% (19/

35), 癌旁阳性表达率 83.3% (10/12), 乳腺纤维瘤阳性表达率 90.0% (9/10)。以 β -actin 为内部参照半定量分析测得的 PSA mRNA 光密度值,19 例 PSA mRNA 阳性表达的乳腺癌组织中其表达水平为 0.11~0.51, 平均值为 0.31 ± 0.10 ; 10 例癌旁乳腺组织 PSA mRNA 表达水平为 0.26~0.72, 平均值为 0.52 ± 0.14 ; 9 例乳腺纤维瘤组织中 PSA mRNA 表达水平为 0.31~0.75, 平均值为 0.55 ± 0.13 。PSA mRNA 在乳腺癌组织中的表达水平明显低于癌旁乳腺组织和乳腺纤维瘤组织, 差异均有显著性 ($t = 5.39, 4.63, P$ 均 = 0.00)。但其在癌旁乳腺组织和乳腺纤维瘤组织表达水平无差异 ($P > 0.05$)。

2.2 ER β mRNA 的表达

ER β mRNA 的特异性条带为 257 bp (图 2)。半定量分析测得 ER β mRNA 吸光度值,在乳腺癌组织均值 0.27 ± 0.12 ; 癌旁乳腺组织均值 0.54 ± 0.12 ; 乳腺纤维瘤组织均值 0.4 ± 0.13 。ER β mRNA 在乳腺癌中的表达明显低于癌旁和乳腺纤维瘤组织, 差异均有显著性 ($t = 6.37, 4.09, P$ 均 = 0.00)。

图 1 PSA mRNA 扩增产物(710bp)

图 2 ER β mRNA 扩增产物(257bp)

2.3 PSA mRNA 表达与 ER β mRNA 表达关系

19 例乳腺癌组织中 PSA mRNA 表达阳性者 ER β mRNA 表达水平为 0.08~0.37, 平均值为 0.24 ± 0.09 ; 16 例 PSA mRNA 表达阴性者 ER β mRNA 表达水平为 0.08~0.54, 平均值为 0.32 ± 0.14 。PSA mRNA 表达阳性者 ER β mRNA 表达水平明显低于 PSA mRNA 表达阴性者, 差异有显著性 ($t = 2.17, P = 0.038$)。

2.4 PSA mRNA 的表达与 ER, PR 的关系

21 例 ER 阳性表达的乳腺癌组织中 PSA mRNA 呈阳性表达者 16 例, 阳性表达率为 76.19%; 14 例 ER 阴性者 PSA mRNA 阳性表达 3 例, 阳性表达率为

21.43%。ER 阳性表达的乳腺癌组织中 PSA mRNA 表达明显高于 ER 阴性者 ($P = 0.001$)。22 例 PR 阳性表达的乳腺癌组织中 PSA mRNA 阳性表达 16 例, 阳性表达率为 72.72%; 13 例 PR 阴性者 PSA mRNA 阳性表达 3 例, 阳性表达率为 23.08%。PR 阳性表达的乳腺癌组织中 PSA mRNA 表达明显高于 PR 阴性者 ($P = 0.004$)。

3 讨论

本研究结果显示 PSA mRNA 在乳腺癌的表达水平下调明显低于癌旁乳腺组织和乳腺纤维瘤中的表达。与 Yu 等^[1]的结果一致。值得提出的是 PSA

mRNA 表达水平在前列腺癌组织中亦下调^[4]。可能是由于 PSA 基因在乳腺癌和前列腺癌的癌发生过程中出现变异或缺失,从而导致表达水平下调^[5],说明 PSA 可能对乳腺具有保护作用。本研究结果显示 ER β mRNA 在乳腺癌组织中的表达水平明显低于癌旁乳腺组织和乳腺纤维瘤,提示 ER β mRNA 表达水平在乳腺癌中下调,与文献^[3]报道的基本一致。表明其表达下调在乳腺癌的发生发展过程中有着重要的作用。

研究认为,PSA 基因是受甾体类激素受体调控,其中主要是受雄激素和孕激素的调节,ER α 通过对孕激素受体的作用而间接调节 PSA 基因^[6]。本研究资料显示,PSA mRNA 表达阳性组的 ER β mRNA 表达水平低。提示 PSA 基因可能并不受新型的雌激素受体 β 亚型的调控。对于 PSA 与 ER β 的关系,可能还需从蛋白表达水平以及细胞系等多方面研究证实。

本研究发现,PSA mRNA 的表达与 ER α 和 PR 的状况相关,ER α 和 PR 阳性的乳腺癌组织中的 PSA mRNA 表达率显著高于阴性者。说明 PSA 的表达受 ER α 和 PR 的影响,进一步证实 PSA 基因受甾体类激素受体调控。Zarghami 等^[7]采用低浓度的雄激素、盐皮质激素、糖皮质激素、孕激素对甾体类激素受体阳性的乳腺癌细胞株 T-47D 诱导培养,发现只有雄激素和孕激素能使 PSA mRNA 的表达上调。Diamandis^[4]研究发现,PSA 能抑制乳腺癌细胞系 MCF-7 的生长,而且能使细胞系内雌三醇转变为雌酮,但在 ER α 缺乏的恶性程度较高的 MDA-MB-231 细胞系中则无此作用。说明 PSA 可能对乳腺具有保护作用,而这种保护作用依赖于 ER α 的存在。这

些均提示 PSA 基因具有甾体类激素的依赖性,对 PSA 的研究可以帮助了解肿瘤组织中甾体类激素受体的状况,特别是 ER α 和 PR 的状况,从而有利于判断乳腺癌病人内分泌治疗的效果^[8]。因此,PSA 可能是判断功能性甾体类激素受体的一个重要指标。

参考文献:

- [1] Yu H, Levesque M, Clark GM, *et al.* Prognostic value of prostate-specific-antigen for woman with breast cancer, a large United States cohort study [J]. *Clin Cancer Res*, 1998, 4(6):1489-1497.
- [2] 吴唯,吕新生,唐中华. PSA mRNA 在乳腺癌中表达及临床意义 [J]. *中国实验诊断学*, 2004, 8(3):238-240.
- [3] Speirs V, Malone C, Walton DS, *et al.* Increased expression of estrogen receptor beta mRNA in tamoxifen-resistant breast cancer patients [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(25):5421-5424.
- [4] Diamandis EP. Prostate-specific antigen: a cancer fighter and a valuable messenger? [J]. *Clin Chem*, 2000, 46(7):896-900.
- [5] Majumdar S, Diamandis EP. The promoter and the enhancer region of the KLK3 (prostate-specific-antigen) gene is frequently mutated in breast tumours and in breast carcinoma cell lines [J]. *Br J Cancer*, 1999, 79(9/10):1594-1602.
- [6] Wang W, John EM, Ingles SA. Androgen receptor and prostate-specific antigen genepolymorphisms and breast cancer in African-American women [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005, 14(12):2990-2994.
- [7] Zarghami N, Grass L, Diamandis EP. Steroid hormone regulation of prostate-specific antigen gene expression in breast cancer [J]. *Br J Cancer*. 1997, 75(3):579-588.
- [8] 吴唯,唐中华,吕新生. PSA 在乳腺癌中研究进展 [J]. *中国普通外科杂志*, 2003, 12(5):374-376.

本刊 2006 年下半年各期重点内容安排

本刊 2006 年下半年各期重点内容安排如下,欢迎赐稿。

第 7 期 肝脏外科
第 8 期 腔镜外科
第 9 期 胃肠外科

第 10 期 乳腺、甲状腺外科
第 11 期 胰腺外科
第 12 期 血管外科及其他