

文章编号:1005-6947(2006)10-0741-04

· 乳腺癌专题研究 ·

乳腺癌组织中 ER β mRNA 和 VEGF mRNA 的表达及两者的关系

吴唯^{1,2}, 吕新生¹, 唐中华³, 李小荣², 陈道谨²

(中南大学 1. 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 410011)

摘要:目的 探讨雌激素受体亚型 β (ER β) 和血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 在乳腺癌组织中的表达及两者之间的关系。方法 采用半定量逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 检测 35 例乳腺癌组织中 ER β mRNA 和 VEGF mRNA 的表达, 分析两者表达的相关性及其与肿瘤病理参数的关系。结果 ER β mRNA 表达水平与 VEGF121 和 VEGF165 mRNA 的表达水平呈正相关 ($r = 0.785$ 和 0.641 , 均 $P = 0.000$)。VEGF121 和 VEGF 165 mRNA 在有淋巴结转移的乳腺癌组织中表达水平明显高于无淋巴结转移者 ($P = 0.033, 0.004$)。结论 乳腺肿瘤血管生成可能受 ER β 的影响, 而乳腺癌组织中 VEGF mRNA 的表达水平高者可能易于发生淋巴结转移。

关键词: 乳腺肿瘤/病理学; 受体, 雌激素; 血管内皮细胞生长因子

中图分类号: R737.9; Q51

文献标识码: A

The relationship between the expression of estrogen receptor beta mRNA and vascular endothelial growth factor mRNA in human 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 II of General Surgery, the Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China; 3. Department of General Surgery, Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract: **Objective** To study the expression of estrogen receptor beta mRNA (ER β mRNA) and vascular endothelial growth factor mRNA (VEGF mRNA) in breast cancer (BC) and the interrelationship of their expression. **Methods** Semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction was conducted to detect the expression of ER β mRNA and VEGF mRNA in 35 BC samples. The correlation between the expression of ER β mRNA and VEGF mRNA was analyzed, and the relationship between their expression and clinical pathological parameters was also analyzed. **Results** The expression of VEGF121, VEGF 165 mRNA in BC with lymph node metastasis was significantly higher than that in BC without lymph node metastasis ($P = 0.033, 0.004$). The expression of ER β mRNA was well correlated with the expression of VEGF121, 165 mRNA in BC patients (all $p = 0.000$). **Conclusions** ER β might modulate the expression of VEGF mRNA in BC. The expression of VEGF mRNA with high level in BC patient can indicate that lymph node metastasis might occur.

Key words: Breast Neoplasms/pathol; Receptor, Estrogen; Vascular Endothelial Growth

CLC number: R737.9; Q51

Document code: A

收稿日期: 2006-03-05; 修订日期: 2006-09-05。

作者简介: 吴唯, 男, 湖南耒阳人, 中南大学湘雅医院博士研究生 (现在湘雅三医院), 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: 吕新生 电话: 0731-4327400; E-mail: jcgxxych@126.com。

在乳腺癌组织中雌激素对血管生成有重要的调控作用。体内外实验均表明其作用主要可能是通过使血管内皮细胞生长因子(VEGF)mRNA表达水平上调,从而促进VEGF的分泌而实现的^[1-2];并且这种作用依赖雌激素受体(ER)的存在^[3]。本实验采用半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)的方法检测35例乳腺癌组织中ER β mRNA和VEGF mRNA的表达,探讨两者表达的关系及其意义。

1 材料和方法

1.1 一般资料

35例标本来源于湘雅二医院2003年5月—2003年7月手术治疗的乳腺癌患者,均为女性;年龄28~75岁,中位年龄48.1岁。已绝经者13例,未绝经者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。术后病理检查的类型: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:腋窝淋巴结阴性15例,腋窝淋巴结阳性20例。每例标本均取自于乳腺癌组织中央,取材后的标本迅速置入液氮中速冻,然后转存于-70℃的冰箱。

1.2 材料

Trizol购自Invitrogen公司;逆转录试剂盒购自Promega公司;琼脂糖购自上海生物工程有限公司;Taq酶,10×PCR反应缓冲液,10mMdNTP,25mMMgCl₂均购自MBI公司;DNA MARKE SD004购自北京鼎国生物技术发展中心;引物均委托上海生物工程有限公司合成;其它实验器材由中南大学湘雅二医院中心实验室提供。

1.3 检测方法

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定各管总RNA浓度,然后取4 μ g总RNA的体积进行逆转录成cDNA。逆转录条件:10×逆转录反应缓冲液2 μ L,25mmol/L MgCl₂ 4 μ L,10mmol/L dNTP 2 μ L,OligDT 1 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。ER β 和VEGF引物序列参照文献合成^[4-5]。ER β :正向,5'-GGCCGACAAGGAGTTGGTGTA-3';反向,5'-AAACCTTGAAGTAGTTGCCAGGAGC-3'。VEGF:正向,5'-CTGCTGTGTTGGGTGCATTGG-3';反向,5'-CACCGCCTCGGCTTGTACAT-3'。内参照 β -actin:正向,5'-CACTGTGTTGGCGTACAGGT-3';反向,5'-TCATCACCATTGGCAATGAG-3'。ER β 的扩增条件:10×PCR反应缓冲液2.5 μ L,10mmol dNTP 0.5 μ L,25mmol 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。VEGF mRNA的扩增条件:10×PCR反应缓冲液2.5 μ L,10mmol dNTP 0.5 μ L,25mmol 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,60℃退火45s,72℃延伸80s为1个循环;共35个循环。内参照 β -actin的扩增条件:10×PCR反应缓冲液2.5 μ L,10mmol dNTP 0.5 μ L,25mmol 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60s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。各实验以已扩增产物的cDNA为标记重复3次。用条带的大小和深浅判断PCR产物量,以 β -actin作为内参照,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以代表各基因mRNA量。

1.4 统计学方法

数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,显著性采用 t 检验。ER β mRNA和VEGF mRNA表达的关系采用直线相关分析。

2 结果

2.1 ERβ mRNA 和 VEGF mRNA 的表达

ERβ mRNA 的特异性条带为 257 bp (图 1)。VEGF mRNA 见 2 条特异性条带为 434 bp 和 566 bp (图 2), 分别代表 VEGF121 和 VEGF165 的 2 种异构体。

2.2 ERβ mRNA 和 VEGF mRNA 的关系

对 35 例乳腺癌组织中 ERβ mRNA 表达水平与 VEGF121 和 VEGF165 mRNA 的表达水平进行直线相关分析, 结果显示 ERβ mRNA 表达水平与 VEGF121, VEGF165 mRNA 的表达水平呈显著正相

关 ($r = 0.785$ 和 0.641 , P 均 = 0.000) (图 3 - 4)。

2.3 ERβ mRNA 和 VEGF mRNA 的表达与临床病理参数的关系

ERβ mRNA 的表达与 ER 和 PR 状况、临床分期、淋巴结状况和月经状况均无明显关系 (P 均 > 0.05)。VEGF121, VEGF165 mRNA 的表达在有淋巴结转移的乳腺癌明显高于无淋巴结转移者 ($P = 0.033, 0.004$), 而 VEGF121 和 VEGF165 mRNA 的表达与 ER 和 PR 状况、临床分期和月经状况无明显关系 (附表)。

图 1 ERβ mRNA 扩增产物 (257 bp)

图 2 VEGF mRNA 扩增产物 (434 bp, 566 bp)

图 3 VEGF121 与 ERβ 的线性相关图

图 4 VEGF165 与 ERβ 的线性相关图

附表 ERβ mRNA 和 VEGF mRNA 的表达与临床病理参数的关系 ($\bar{x} \pm s$)

病理参数	例数	ERβ	VEGF121	VEGF165
ER				
阳性	21	0.27 ± 0.10	0.51 ± 0.15	0.31 ± 0.10
阴性	14	0.28 ± 0.16	0.58 ± 0.19	0.37 ± 0.13
PR				
阳性	22	0.27 ± 0.10	0.53 ± 0.15	0.32 ± 0.10
阴性	13	0.28 ± 0.16	0.56 ± 0.20	0.36 ± 0.14
TNM 分期				
I-II	31	0.27 ± 0.13	0.53 ± 0.18	0.33 ± 0.11
III	4	0.29 ± 0.08	0.63 ± 0.09	0.42 ± 0.09
淋巴结状况				
阳性	19	0.30 ± 0.12	0.60 ± 0.15 [†]	0.39 ± 0.13 [†]
阴性	16	0.24 ± 0.13	0.48 ± 0.17	0.28 ± 0.06
月经状况				
绝经	13	0.27 ± 0.14	0.49 ± 0.21	0.30 ± 0.19
月经	22	0.28 ± 0.12	0.57 ± 0.14	0.40 ± 0.12

注: † 与阴性组比较, $P < 0.05$

3 讨论

本资料显示, ER β mRNA 的表达与 ER, PR, 淋巴结转移情况、临床分期和月经状况之间未存在明显的相关性, 与文献的报道不完全一致^[6]。说明对 ER β 这种新型 ER 的作用尚需进一步研究。本组 VEGF mRNA 的表达与 ER, PR, 临床分期和月经状况无明显的关系, 与大多数文献报道基本一致。但 Greb 等^[5]认为 VEGF mRNA 的表达水平具有激素依赖性。本组 VEGF mRNA 的表达水平在淋巴结转移组明显高于无淋巴结转移者, 与吴后男等^[7]研究结果一致。因此认为 VEGF 促进乳腺肿瘤新生血管形成的同时, 也促进癌浸润和淋巴道的转移。这可能是由于丰富的血管不仅增加了肿瘤细胞进入血液循环的机会, 也增加了肿瘤细胞侵入邻近与毛细血管伴行的淋巴管或通过静脉-淋巴管吻合处进入淋巴管的几率而促进淋巴道的转移。

本组乳腺癌组织中 ER β mRNA 表达水平与 VEGF121 和 VEGF165 mRNA 的表达水平呈正相关, 提示 ER β 能上调 VEGF mRNA 的表达。这可能是 ER β mRNA 高水平表达的乳腺癌预后较差的原因之一。Buteau-Lozano 等^[1]认为 ER β 能使乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 的 VEGF mRNA 表达水平上调。ER β 上调 VEGF mRNA 表达的机制可能系雌激素通过 ER β 和 ER α 与 AP1 增强元件结合后的作用方式不同^[4,6], 且 ER β mRNA 水平与表皮生长因子受体(EGFR)的表达呈正相关^[8]。EGFR 常与内分泌治疗不敏感、PR 表达的下降有关。ER α 可促进 EGFR 下调, 而 ER β 通过与 ER α 形成二聚体复合物促进 EGFR 的表达^[8], 或直接启动 EGFR 的表达; 或通过 EGFR 信号途径促进 ER β 的表达。后者通过与 AP-1 相互作用调节肿瘤细胞对抗雌激素的反应^[7]。VEGF 基因转录受许多细胞因子的调节, 如血小板

生长因子(PDGF)、表皮生长因子(EGF)、胰岛素样生长因子(IGF)和转化生长因子(TGF)等, 其中 EGF 是其重要的调节因子。故笔者认为 ER β 可能直接调节 VEGF 基因转录和/或通过调节 EGF 等因子而间接调节 VEGF 基因转录。

参考文献:

- [1] Buteau-Lozano H, Ancelin M, Lardeux B. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by estradiol and tamoxifen in breast cancer cells: a complex interplay between estrogen receptors alpha and beta [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(17): 4977-4984.
- [1] 吴唯, 吕新生, 唐中华, 等. 乳腺癌组织中 VEGF mRNA 的表达及其临床意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(11): 813-816.
- [1] John A, Freay AD, Fraser W, *et al.* Disruption of estrogen receptor gene prevents 17 beta estradiol-induced angiogenesis in transgenic mice [J]. *Endocrinology*, 1996, 137(16): 4511-4513.
- [1] 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(18): 5421-5424.
- [1] Greb RR, Maier I, Wallwiener D, *et al.* Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) mRNA expression levels decrease after menopause in normal breast tissue but not in breast cancer lesions [J]. *Br J Cancer*, 1999, 81(2): 225-231.
- [1] Iwao K, Miyoshi Y, Egawa C, *et al.* Quantitative analysis of estrogen receptor-beta mRNA and its variants in human breast cancers [J]. *Int J Cancer*, 2000, 88(6): 733-736.
- [1] 吴后男, 李玉林, 朱桂彬, 等. 血管内皮生长因子及其受体 Flt-1 在乳腺癌中的表达及意义 [J]. *中华医学杂志*, 2002, 82(10): 708-711.
- [1] Speirs V. Oestrogen receptor beta in breast cancer: good, bad or still too early to tell? [J]. *J Pathol*, 2002, 197(2): 143-147.