

文章编号:1005-6947(2007)01-0055-03

· 基础研究 ·

乳腺癌中 β -catenin 基因突变和表达的研究

刘臻¹, 王贵友², 崔东旭¹, 刘宝林¹, 张小薄¹, 马文锋³, 张强³

(1. 中国医科大学附属第二医院 普外一科, 辽宁 沈阳 110004; 2. 辽宁省朝阳县医院 普外科, 辽宁 朝阳 122000; 3. 中国医科大学附属第一医院 普外三科, 辽宁 沈阳 110001)

摘要:目的 探讨 β -catenin (β -cat) 基因在乳腺癌发生中的作用。方法 应用 PCR-SSCP 和免疫组织化学法检测 42 例乳腺癌组织中的 β -cat 基因突变及表达。结果 乳腺癌组织中 β -cat 异常表达率为 59.5% (25/42); 但在其中未发现 β -cat 基因突变。结论 β -cat 异常表达在人乳腺癌发生过程中可能起重要作用, 但该蛋白异常表达的原因并非是 β -cat 基因突变。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(1): 55-57]

关键词: 乳腺肿瘤/病理学; β -连环素; 基因表达

中图分类号: R737.9; R73-3 **文献标识码:** A

Mutation and expression of β -catenin gene in breast cancer

LIU Zhen¹, WANG Gui-you², CUI Dong-xu¹, LIU Bao-lin¹, ZHANG Xiao-bo¹,
MA Wen-feng³, ZHANG Qiang³

(1. The First Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China; 2. Department of General Surgery, Chaoyang County Hospital, Chaoyang, Liaoning 122000; 3. the Third Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the role of β -catenin gene in breast tumorigenesis. **Methods** Mutation and expression of β -catenin gene in 42 breast cancer tissues were detected by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism and immunohistochemistry. **Results** The rate of abnormal expression of β -catenin in breast cancer tissue was 59.5% (25/42). Mutation of β -catenin gene was not detected in breast cancer tissue. **Conclusions** Abnormal expression of β -catenin plays an important role in human breast tumorigenesis, but the cause of abnormal expression of β -catenin is not mutation of β -catenin gene.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(1): 55-57]

Key words: Breast Neoplasms/Pathol; β -catenin; Gene Expression

CLC number: R737.9; R73-3 **Document code:** A

研究^[1]发现, 乳腺癌中存在 β -连环素 (β -catenin, β -cat) 异常表达, 这种异常表达与乳腺癌的发生、发展有关。在某些肿瘤中发现, β -cat 基因外显子 3 突变可能是其异常表达的原因^[2]。本研究检测了乳腺癌中 β -cat 基因的表达及其外显子 3 的突变状况, 试图了解 β -cat 的表达和突变与乳腺癌发生的关系。

1 资料和方法

1.1 标本及其一般资料

标本取自本校附属第一医院 2003 年 1 月—2004 年 4 月手术切除的 42 例女性乳腺癌组织及距肿瘤 5 cm 的癌旁正常乳腺组织。年龄 32 ~ 75 (平均 50.3 ± 10.5) 岁; 其中浸润性导管癌 19 例, 浸润性小叶癌 13 例, 导管内癌 5 例, 黏液腺癌 3 例, 髓样癌 2 例; TNM 分期: I 期 11 例, II 期 19 例, III 期 12 例。所有病变均经病理证实。

收稿日期: 2006-05-31; 修订日期: 2006-10-20。

作者简介: 刘臻, 男, 辽宁沈阳人, 中国医科大学附属第二医院普外一科主治医师, 主要从事乳腺癌临床与基础方面的研究。

通讯作者: 刘臻 E-mail: liuzhen7099@vip.sina.com

1.2 试剂与检测方法

1.2.1 主要试剂 鼠抗人 β -cat 单克隆抗体购自北京中山生物技术有限公司。蛋白酶 K, Taq DNA 聚合酶, dNTP 混合液和 β -cat 基因引物均购自大连宝生物有限公司。

1.2.2 免疫组织化学(免疫组化)染色及结果判定^[3] 采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶(SP)染色法检测乳腺癌和癌旁正常乳腺组织标本中 β -cat 的表达。4 μ m 组织切片脱蜡、水化, 3% 过氧化氢室温孵育 10 min 以封闭内源性过氧化物酶活性; 高压抗原热修复; 10% 非免疫血清室温孵育 10 min。滴加一抗, 4℃ 过夜, 加生物素标记的二抗, 室温孵育 20 min; 加 SP 试剂, 室温孵育 10 min。DAB 染色, 苏木精复染。用磷酸盐缓冲液(PBS)液代替一抗作阴性对照。以正常乳腺的腺泡及导管上皮细胞 β -cat 的表达模式为阳性对照。如 >90% 肿瘤细胞的染色强度和方式与正常乳腺导管和腺泡上皮细胞染色相同, 则为表达正常; 如阳性染色的肿瘤细胞 \leq 90%, 或存在细胞核染色以及细胞质内阳性颗粒聚集的肿瘤细胞, 则为表达异常。

1.2.3 β -cat 基因外显子 3 突变的检测

1.2.3.1 基因组 DNA 的制备 采用酚-氯仿法抽提石蜡包埋组织中 DNA。

1.2.3.2 β -cat 基因外显子 3 引物 引物 1: 5'-GCTGATTTGATGGAGTTGGA-3'; 引物 2: 5'-GC-TACTTGTCTTGAGTGAA-3'; 扩增片段长度为 227 bp。

1.2.3.3 多聚酶链(PCR)反应 反应体系为 20 μ L, 包括 10 \times 缓冲液 2 μ L, 终浓度为 0.25 mmol/L (dNTP), Taq 酶 2 U, 终浓度为 2 mmol/L (MgCl₂), 引物各 12 pmol, 模板 300 ng。反应条件: 94℃, 10 min 预变性; 94℃, 变性 1 min, 55℃, 退火 2 min, 72℃, 延伸 3 min; 35 次循环。

1.2.3.4 单链构象多态性分析(SSCP) 取扩增产物 10 μ L, 加入变性上样液 10 μ L (95% 去离子甲酰胺, 20 mmol/L (EDTA), 0.05% 溴酚蓝, 0.05% 二甲苯青)混合, 95℃ 10 min 变性, 冰浴 10 min, 上样于 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶。电泳温度 16℃, 电压 300 V, 电泳时间 4.5 h。硝酸银染色。若出现与正常对照组织不同的单链泳动变位或额外带、电泳带缺失即为突变。

1.3 统计学处理

采用 SPSS10.0 软件进行统计学处理。计数

资料采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。

2 结果

β -cat 免疫染色阳性物质呈棕黄色。癌旁正常组织中, β -cat 定位于腺泡或导管上皮细胞膜上, 尤其是细胞-细胞间交界处, 显示了细胞轮廓(图 1)。42 例乳腺癌组织中, 25 例 β -cat 异常表达, 异常率为 59.5%, 表现为胞膜和胞质杂合性染色、胞膜染色减少或缺失、胞质内颗粒状染色(图 2)。

以癌旁正常组织作为对照, 扩增产物均为密度一致的 3 条带。与癌旁正常组织相比, 乳腺癌组织中未见异常电泳带(图 3)。

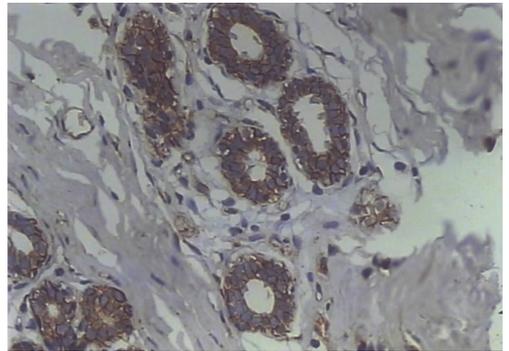


图 1 癌旁正常乳腺组织 β -cat 的表达 胞膜 β -cat 表达阳性, 显示出细胞轮廓(SP \times 200)

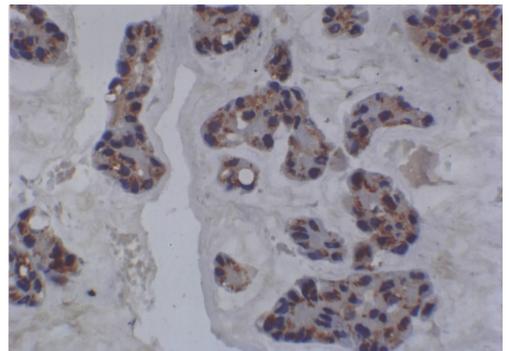


图 2 乳腺癌组织 β -cat 的异常表达 胞膜 β -cat 表达缺失, 表现为胞质 β -cat 表达阳性(SP \times 200)



N:癌旁正常组织 T:肿瘤组织

图 3 SSCP 电泳结果 癌旁正常组织显示 3 条电泳带, 与癌旁正常组织相比, 肿瘤组织未见异常电泳带。

3 讨论

β -cat 基因位于人染色体 3p21, 长度 23.2kb, 包含 16 个外显子, 编码分子质量为 92kD 的蛋白质。它具有两种明确的功能: (1) 维持组织结构的完整性和极性, 介导细胞同质黏附。(2) 作为 Wnt 信号通路中下游信号分子, 参与转录调节, 并与胚胎发育及肿瘤的发生有关。Bankfalvi 等^[4]检测了包括乳腺正常组织、良性病变、原位癌、浸润癌共 142 例乳腺组织中 β -cat 的表达, 发现从乳腺正常组织到浸润癌的发展过程中 β -cat 膜表达下调, 认为 β -cat 的改变是乳腺癌发生过程中的早期事件。本实验发现, 在正常乳腺组织中 β -cat 分布在乳腺导管和腺泡上皮细胞膜上; 而在乳腺癌中出现 β -cat 蛋白表达异常, 在胞质内异常积聚, 从而可能激活 Wnt 通路下游的靶基因, 导致乳腺癌的发生。有报道^[5-6], 在鼠乳腺肿瘤病毒 - 长末端重复序列 (MMTV-LTR) 控制下编码氨基端截断的 β -cat 基因 (MMTV- Δ N89 β -cat 和 MMTV- Δ N90 β -cat), 能表达缺失氨基端的 β -cat 蛋白, 该蛋白在鼠乳腺上皮细胞中稳定表达并活化, 导致鼠乳腺癌生成。上述研究表明, β -cat 异常表达在乳腺癌发生中可能起重要作用。现已在某些恶性肿瘤如: 结肠癌、肝癌、子宫内膜癌、卵巢癌、前列腺癌中发现 β -cat 基因外显子 3 致癌性突变。Zhuang 等^[7]在 13 例 1,3-丁二烯诱导的 B6C3F1 鼠乳腺癌中发现 3 例存在 β -cat 基因突变, 分别在密码子 33, 34, 41; 这些突变导致 β -cat 蛋白 GSK-3 β 磷酸化及随后泛素化降解障碍。但本研究采用 PCR-SSCP 检测了乳腺癌组织中 β -cat 基因外显子 3 突变, 但未发现突变。本结果与 Jonsson 等研究^[8]结果相符。这表明在人乳腺癌中 β -cat 基因突变并非是该蛋白异常表达的原因。可能存在其他途径调节 β -cat 蛋白的表达, 如: (1) β -cat 破坏复合物异常。该复合物中 APC, GSK-3 β , Axin 中任何一种改变将导致 β -cat 降解障碍而出现异常表达。(2) β -cat 基因扩增。已有研究^[9]发现, 恶性肿瘤中存在 β -cat 基因扩增从而导致胞质内

β -cat 蛋白积聚并易位入细胞核内。(3) Wnt 通路上游组分 (包括 Wnt 基因、Frizzles 受体、dishevelled 蛋白等) 的调节。研究^[10]发现, MMTV-LTR 控制下 Wnt (MMTV-Wnt) 基因能诱导鼠乳腺癌, Wnt 基因诱导的肿瘤生成系由 β -cat 介导。

参考文献

- [1] 刘臻, 张强, 马文锋, 等. 乳腺癌中上皮钙黏蛋白和 β -连环素的表达及其意义 [J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13 (11): 817 - 821.
- [2] Chang HJ, Jee CD, Kim WH. Mutation and altered expression of beta-catenin during gallbladder carcinogenesis [J]. Am J Surg Pathol, 2002, 26 (6): 758 - 766.
- [3] Hugh TJ, Dillon SA, Taylor BA, et al. Cadherin-catenin expression in primary colorectal cancer: a survival analysis [J]. Br J Cancer, 1999, 80 (7): 1046 - 1051.
- [4] Bankfalvi A, Terpe HJ, Breukelmann D, et al. Immunophenotypic and prognostic analysis of E-cadherin and beta-catenin expression during breast carcinogenesis and tumor progression: a comparative study with CD44 [J]. Histopathology, 1999, 34 (1): 25 - 34.
- [5] Michaelson JS, Leder P. Beta-catenin is a downstream effector of Wnt-mediated tumorigenesis in the mammary gland [J]. Oncogene, 2001, 20 (37): 5093 - 5099.
- [6] Imbert A, Eelkema R, Jordan S, et al. Delta N89 beta-catenin induces precocious development, differentiation, and neoplasia in mammary gland [J]. J Cell Biol, 2001, 153 (3): 555 - 568.
- [7] Zhuang SM, Wiseman RW, Soderkvist P. Frequent mutations of the Trp53, Hras1 and β -catenin (Catnb) genes in 1,3-butadiene-induced mammary adenocarcinomas in B6C3F1 mice [J]. Oncogene, 2002, 21 (36): 5643 - 5648.
- [8] Jonsson M, Borg A, Nibert M, et al. Involvement of adenomatous polyposis coli (APC) / β -catenin signaling in human breast cancer [J]. Eur J Cancer, 2000, 36 (2): 242 - 248.
- [9] Suriano G, Vrcelj N, Senz J, et al. beta-Catenin (CTNNB1) gene amplification: a new mechanism of protein overexpression in cancer [J]. Genes Chromosomes Cancer, 2005, 42 (3): 238 - 246.
- [10] Milyoshi K, Hennighausen L. β -catenin: a transforming actor on many stages [J]. Breast Cancer Research, 2002, 5 (2): 63 - 68.