

文章编号:1005-6947(2007)08-0793-04

· 临床研究 ·

# BCSG1 基因在乳腺癌新辅助化疗疗效评估中的价值

何劲松<sup>1</sup>, 袁建辉<sup>2</sup>, 王先明<sup>1</sup>, 郭良峰<sup>1</sup>, 朱国献<sup>1</sup>, 伍健春<sup>1</sup>, 李戎<sup>1</sup>, 王敏<sup>1</sup>, 陈伟财<sup>1</sup>, 吴恢升<sup>1</sup>

(1. 广东省深圳市第二人民医院 乳腺疾病诊疗中心, 广东 深圳 518035; 2. 广东省深圳市疾病预防控制中心, 广东 深圳 518020)

**摘要:**目的 探讨乳腺癌特异基因(BCSG1)在乳腺癌新辅助化疗疗效评估中的价值。方法 采用免疫组化 S-P 法和荧光定量 PCR 方法检测 36 例乳腺癌患者新辅助化疗(CEF 方案)前后乳腺癌组织 BCSG1 的表达,比较化疗前后肿瘤体积的变化情况,分析新辅助化疗前后 BCSG1 蛋白表达与肿瘤形态学变化的关系。结果 36 例乳腺癌患者新辅助化疗后肿瘤体积均有明显缩小( $P < 0.01$ ),病灶缓解率(CR + PR)为 85.6%;新辅助化疗后 BCSG1 mRNA 表达水平亦明显低于化疗前( $P < 0.05$ ),BCSG1 蛋白高表达率低于新辅助化疗前( $P < 0.01$ )。结论 乳腺癌新辅助化疗后 BCSG1 在分子和蛋白水平表达均明显降低,与新辅助化疗后疗效呈负相关( $r = -0.539, P < 0.01$ ),提示 BCSG1 可作为乳腺癌新辅助化疗疗效的预测因子。 [中国普通外科杂志, 2007, 16(8): 793-796]

**关键词:** 乳腺肿瘤; 乳腺癌特异基因(BCSG1); 新辅助化疗

中图分类号: R 737.9

文献标识码: A

## The value of BCSG1 on evaluating the curative effect of neoadjuvant chemotherapy for breast cancer

HE Jin-song<sup>1</sup>, YUAN Jian-hui<sup>2</sup>, WANG Xian-ming<sup>1</sup>, GUO Liang-feng<sup>1</sup>, ZHU Guo-xian<sup>1</sup>, WU Jian-chun<sup>1</sup>, LI Rong<sup>1</sup>, WANG Min<sup>1</sup>, CHEN Wei-cai<sup>1</sup>, WU Hui-sheng<sup>1</sup>

(1. Center of Diagnosis and Treatment of Breast Disease, the Second Hospital of Shenzhen City, Shenzhen, Guangdong 518035, China; 2. Shenzhen Municipal Center for Disease Prevention and Control, Shenzhen, Guangdong 518020, China)

**Abstract:** **Objective** To study the value of BCSG1 on evaluating the curative effect of neoadjuvant chemotherapy (NC) for breast cancer. **Methods** The expression of BCSG1 in cancer tissue was assayed by immunohistochemistry and RT-PCR in 36 cases of breast cancer patients before and after receiving NC of CEF (cyclophosphamide, epirubicin and fluorouracil) regimen. The therapeutic response of NC was evaluated by morphological and pathological observation. The relationship between expression of BCSG1 and morphological response to NC was analyzed. **Results** Among the studied cases, the diameter of tumor significantly decreased ( $P < 0.01$ ) and the improvement rate of the treatment effect (CR + PR) was 85.6%. The expression of BCSG1 mRNA ( $P < 0.05$ ) and the high expression rate of BCSG1 ( $P < 0.01$ ) were decreased significantly after receiving NC than that before NC. **Conclusions** After NC, the expression of BCSG1 mRNA and protein was decreased significantly, which had negative relation to the therapeutic effect of NC. BCSG1 can be a prognosticate gene to evaluate the effect of NC in breast cancer patients.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(8): 793-796]

**Key words:** Breast Neoplasms; BCSG1; Neoadjuvant Chemotherapy

**CLC number:** R 737.9

**Document code:** A

基金项目:广东省深圳市科技计划资助项目(200404082)。

收稿日期:2007-07-01; 修订日期:2007-07-31。

作者简介:何劲松,男,湖南永州人,广东省深圳市第二人民医院副主任医师,主要从事乳腺肿瘤治疗方面的研究。

通讯作者:王先明 E-mail:hjssums@sohu.com

新辅助化疗 (neoadjuvant chemotherapy, NAC) 在乳腺癌综合治疗中的作用已获得肯定, 临床 II、III 期乳腺癌患者, 均可行新辅助治疗<sup>[1]</sup>。以往对乳腺癌新辅助化疗疗效的评定仅限于以治疗前后原发肿瘤和转移淋巴结的临床和病理变化来评定, 未能从乳腺癌分子机制上反映其转归。本研究在对肿瘤形态学和病理学观察的同时, 应用免疫组化和荧光定量 RT-PCR 方法检测新辅助化疗前后癌组织中乳腺癌特异基因 (breast cancer special gene1, BCSG1) 表达水平的变化, 探讨两者的内在关系, 旨在为评估乳腺癌新辅助化疗疗效提供一个特异性较强的肿瘤标志物。

## 1 材料与方法

### 1.1 一般资料

本组患者为 2004 年 10 月—2006 年 12 月深圳市第二人民医院乳腺疾病诊疗中心收治的 36 例乳腺癌病例, 均为女性, 年龄 26~51 岁, 中位年龄 41 岁。均经粗针穿刺组织活检确诊, 均为浸润性非特殊型癌, 按 1997 年 UICC TNM 分期, II A 期 12 例, II B 期 15 例, III A 期 5 例, III B 期 4 例。其中伴同侧腋下淋巴结转移的 20 例。全部患者确诊前未接受过任何治疗, Karnofsky 评分均为 100 分, 无心、肝、肾功能严重损害。

### 1.2 新辅助化疗 (NAC)

36 例患者术前新辅助化疗方案均采用 CEF 方案: 环磷酰胺 (CTX)  $600\text{mg}/\text{m}^2$ , 表阿霉素 (EPI)  $80\text{mg}/\text{m}^2$ , 氟尿嘧啶 (5-FU)  $500\text{mg}/\text{m}^2$ , 第 1 天静脉滴注; 21 天为 1 个周期。化疗 2 个周期后行乳腺癌改良根治术或保乳手术。术后常规病理检查。

### 1.3 检测项目及方法

1.3.1 标本采集 分别取术前经巴德公司生产的自动弹簧装载活检针穿刺或 Mammotome 微创活检组织及化疗术后中切取的新鲜标本作为新辅助化疗前后的检测标, 按常规行石蜡包埋, 切片, 备免疫组化检测。

1.3.2 主要试剂 羊抗人 BCSG1 单克隆抗体 (sc-10699) 购自美国 SANTA 公司; S-P 超敏试剂盒购自北京中山生物技术有限公司; 羊抗人 maspin 单克隆抗体 (C-20) 及 S-P 超敏试剂盒均购自福州迈新生物技术开发有限公司; Trizol 购自美国 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒购自美国 promega 公司; 荧光定量 PCR 试剂盒及引物合成均购自大连宝生物公司。

1.3.3 免疫组化检测 具体操作严格按试剂盒说明的要求进行, 石蜡切片用微波修复抗原。一抗稀释度 1:100, 染色过程中用人的脑组织作阳性对照, 用 PBS 替代一抗作阴性对照, DAB 显色, 苏木精复染, 每例均取 1 张切片作 HE 染色供病理形态学观察用。

### 1.3.4 荧光定量 RT-PCR

(1) RNA 提取 用 Trizol 试剂盒提取乳腺癌组织总 RNA, 按说明书进行操作。取乳腺癌组织块 50~100mg, 用液氮在研钵中研磨成粉末, 移入 1.5mL 新离心管, 加入 1mL Trizol 匀浆, 冰上孵育 5min, 加入 0.2 mL 氯仿, 震荡, 冰上孵育 5min,  $4^{\circ}\text{C}$  12 000r/min 离心 10min, 取上层液相移入 1.5mL 新离心管, 加 0.5 mL 异丙醇, 震荡, 冰上孵育 5min,  $4^{\circ}\text{C}$  12 000r/min 离心 5min, 弃上清液, 加入 1mL 75% 乙醇, 震荡,  $4^{\circ}\text{C}$  7 500r/min 离心 5min, 弃上清液, 室温下干燥后加入 20 $\mu\text{L}$  无 RNase 水溶解并用核酸测定仪定量后  $-80^{\circ}\text{C}$  保存备用。

(2) 反转录及荧光 PCR 反应 采用逆转录试剂盒方法, 每份取 1 $\mu\text{g}$  总 RNA 进行 cDNA 合成, 取随机引物 1 $\mu\text{L}$  5 倍缓冲液 4 $\mu\text{L}$ , Rnasin 20U, 10mmol/L dNTP 2 $\mu\text{L}$ , Revertaid M-MuLV Reverse Transcriptase (20U/ $\mu\text{L}$ ) 1 $\mu\text{L}$ , 加入 DEPC 处理水至 20 $\mu\text{L}$   $25^{\circ}\text{C}$  10min,  $42^{\circ}\text{C}$  60min,  $70^{\circ}\text{C}$  10min 进行逆转录合成的 cDNA。25 $\mu\text{L}$  荧光定量 PCR 反应体系中含 SYBR Green Mix 12.5 $\mu\text{L}$ , BCSG1 上游引物为 5'-AGGAGGGG-TCATGTATGTG-3', 下游引物为 5'-TTCTCTTTGGATGCCTCACC-3'; 内参 GAPDH 上游引物为 5'-GGAAGGTGAAGGTCGGAGT-3', 下游引物为 5'-CCTGGAAGATGGTGAGG-3', 上下引物各 0.8 $\mu\text{L}$  (5 $\mu\text{M}$ ), RO  $\times$  0.37 $\mu\text{L}$ , cDNA 1 $\mu\text{L}$  及适量灭菌 ddH<sub>2</sub>O。制定定量反应的标准曲线和溶解曲线, 以 GAPDH 为内参对 BCSG1 的 mRNA 进行定量检测。反应条件:  $94^{\circ}\text{C}$  变性 5min, 然后按  $94^{\circ}\text{C}$  30S,  $57^{\circ}\text{C}$  45S,  $72^{\circ}\text{C}$  30S, 进行 35 个循环, 最后 1 个循环  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10min, 产物以达到阈值时的循环圈数即 Ct 值作为定量结果, 以分析每例标本的 BCSG1 mRNA 表达水平。

### 1.4 结果判定

1.4.1 NAC 后的病灶变化 按世界卫生组织 (WHO) 抗肿瘤药物客观疗效评定标准<sup>[2]</sup> 进行。分别在 NAC 前及 NAC 后 1 周期和 2 周期时, 由高年资临床医师和超声医师根据病灶临床反应及 B 超测量肿瘤大小来评定疗效, 完全缓解 (CR) + 部分缓解 (PR) 为临床病灶总缓解率。

1.4.2 免疫组化 参考 Mohsin 等<sup>[3]</sup>报道的标准,细胞质出现棕黄色细颗粒为 BCSG1 阳性细胞,少数病例可见胞核着色。采用阳性细胞比例和着色强度 2 项指标综合评定结果,计分方法:阳性细胞数 < 25% 为 0 分,26% ~ 50% 为 1 分,51% ~ 75% 为 2 分,≥ 75% 为 3 分;弱着色计 1 分,中度着色计 2 分,强着色计 3 分。每张切片的 2 项得分之和为该肿瘤阳性结果。< 3 分为低表达,≥ 3 分为高表达。

### 1.5 统计学分析

采用 SPSS 11.0 统计软件包进行分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验,参数间比较用  $\chi^2$  检验,BCSG1 蛋白表达与疗效的相关性分析采用 Spearman 等级相关分析。

## 2 结果

### 2.1 病灶体积变化

新辅助化疗后 10d 72.2% (25/36) 病例可见肿块质地变软,1 周期后 77.8% (28/36) 病例肿块明显缩小,2 周期后 83.3% (30/36) 病例肿块明显缩小,最大直径缩小近 2/3。化疗 2 周期后本组病例病灶体积较化疗前缩小 45% ~ 65%,平均缩小 50% ( $P < 0.01$ )。化疗 1 周期后 5 例 (25.0%) 腋下淋巴结缩小或逐渐消失,化疗 2 周期后 8 例 (40.0%) 腋下淋巴结缩小或消失。CR 3 例,PR 27 例,,6 例无进展 (疾病稳定,SD),总缓解率 (CR + PR) 为 83.3% (30/36)。

### 2.2 组织学改变

31 例术后标本肉眼见癌组织与周围乳腺组织

分界清楚,切面呈灰白色,间有点片状坏死;光镜下见肿瘤细胞出现不同程度的细胞变性坏死,特别是肿瘤周边的细胞出现明显的细胞核收缩、破裂、胞浆凝固坏死,炎性细胞浸润。肿瘤区血管内皮增生,管腔变窄甚至闭塞。其余 5 例肿瘤细胞亦出现不同程度的细胞变性,但坏死不明显。8 例腋窝转移淋巴结内癌细胞出现不同程度坏死、钙化和纤维化,其余病例腋窝淋巴结癌细胞亦出现不同程度核固缩和碎裂。

### 2.3 BCSG1 mRNA 表达

36 例患者新辅助化疗前后乳腺癌组织中的 BCSG1 mRNA 表达水平分别为  $0.26 \pm 0.07$  和  $0.15 \pm 0.05$ ,化疗后 BCSG1 mRNA 的表达水平明显低于化疗前 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。

表 1 荧光定量 RT-PCR 分析比较乳腺癌 NAC 前后 BCSG1 的表达

样本数	化疗前 Ct 值	化疗后 Ct 值	P 值
36	$0.26 \pm 0.07$	$0.15 \pm 0.05$	0.031

注:乳腺癌中 BCSG1 的表达以  $\beta$  球蛋白的表达为内参,以 Ct 值 ( $\bar{x} \pm s$ ) 来表示,新辅助化疗后 BCSG1 mRNA 表达水平明显低于化疗前 ( $P < 0.05$ )

### 2.4 BCSG1 蛋白表达及与 NAC 疗效的相关性

36 例患者新辅助化疗后 BCSG1 蛋白高表达率为 30.6% (11/36),明显低于化疗前 66.7% (24/36),两组比较差异有显著性 ( $P < 0.01$ ) (图 1-2)。乳腺癌 BCSG1 蛋白高表达与 NAC 疗效呈负相关 ( $r = -0.539, P < 0.01$ ) (表 2)。

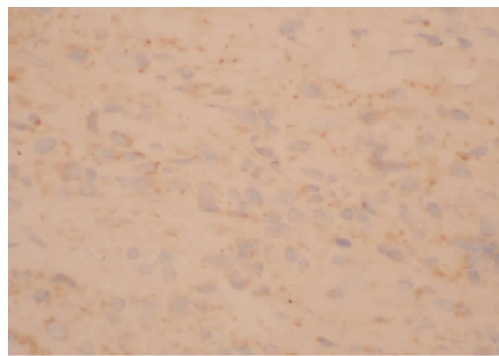


图 1 新辅助化疗前乳腺癌组织 BCSG1 蛋白表达(S-P × 100)

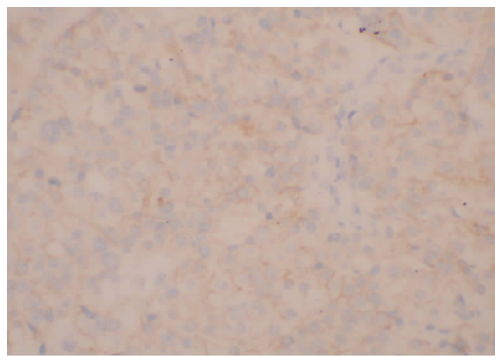


图 2 新辅助化疗后乳腺癌组织 BCSG1 蛋白表达(S-P × 100)

表 2 乳腺癌 BCSG1 表达与 NAC 疗效的相关性 ( $n = 36$ )

NAC 疗效	BCSG1 表达			<i>r</i>
	高表达	低表达	<i>P</i> 值	
CR + PR	6	24	$P < 0.01$	$r = -0.539$
SD	5	1		

## 3 讨论

目前,判断乳腺癌新辅助化疗的疗效仍主要以原发肿瘤和转移淋巴结的变化来评定,有临床和病理学两种判定标准。临床主要依靠触诊测

得的肿块大小计算。但触诊方法有较高评估疗效之弊,采用联合影像学(CT和超声)检查的结果进行评估,较能准确反映客观疗效,因为影像学检查结果与病理学检查的符合率较高<sup>[4]</sup>。但上述评价标准并不能从乳腺癌分子机制上反映其转归。因此,寻找一种能真正反映乳腺癌新辅助化疗疗效的生物学预测因子,以提高对新辅助化疗在乳腺癌治疗疗效判断的预测是当前研究的热点。

BCSG1又名SNCG( $\gamma$ -synuclein gene),是1997年用cDNA直接测序法发现的乳腺癌相关基因。Ji等<sup>[5]</sup>首先报道BCSG1在正常乳腺组织中不表达,在乳腺良性增生或纤维腺瘤中低表达(11.1%),在乳腺癌组织中高表达(85.0%)。BCSG1阳性乳腺癌细胞其转移及成瘤能力明显高于BCSG1阴性乳腺癌细胞。BCSG1在纤维腺瘤、增生症和非典型增生阳性表达率分别为20%,76%,92.3%,提示BCSG1的表达与乳腺组织的增生程度相关。Bruening<sup>[6]</sup>及Wu等<sup>[7]</sup>报道,III/IV期乳腺癌细胞BCSG1表达明显高于I/II期乳腺癌,BCSG1可能是乳腺癌分级的特异基因,是乳腺癌侵袭和转移的预测指标,潜在的基因治疗靶点。对BCSG1进行检测,有助于对乳腺癌侵袭转移能力的评估,为更准确地确定增生程度分级及预测其进展提供重要信息,同时,通过比较治疗前后乳腺癌细胞中BCSG1的水平,可评估治疗效果。

本文研究发现,BCSG1蛋白主要为胞质表达,少数病例可见胞核着色。无论在蛋白水平还是mRNA水平,患者新辅助化疗后的乳腺癌组织

BCSG1表达水平明显低于化疗前,与新辅助化疗后患者病灶明显缩小,取得较高临床缓解率相一致。提示,新辅助化疗能明显缓解乳腺癌患者病情,延缓临床进展,其可能与抑制乳腺癌组织BCSG1表达相关。本组结果BCSG1表达水平与乳腺癌NAC疗效呈负相关,表明NAC后BCSG1表达水平降低越明显疗效越好,提示,可将BCSG1基因作为乳腺癌新辅助化疗疗效的预测因子。但本组病例较少,今后还有待积累更多病例资料深入研究证实。

#### 参考文献:

- [1] 吕新生. 乳腺癌的新辅助化疗[J]. 中国普通外科杂志, 2006, 15(10): 721-724.
- [2] World Health Organization. WHO handbook for reporting results of cancer treatment [M]. Geneva: Offset Publication, 1979.
- [3] Mohsin SK, Zhang M, Clark GM, *et al.* Maspin expression in invasive breast cancer: association with other prognostic factors [J]. J Pat hol, 2003, 199(4): 432-435.
- [4] Akashi Tanaka S, Fukutomi T, Watanabe T, *et al.* Accuracy of contrast enhanced computed tomography in the prediction of residual breast cancer after neoadjuvant chemotherapy [J]. Int J Cancer, 2001, 96(1): 66-73.
- [5] Ji H, Liu YE, Jia T, *et al.* Identification of a breast cancer-specific gene, BCSG1, by direct differential cDNA sequencing [J]. Cancer Res, 1997, 57(4): 759-764.
- [6] Bruening W, Giasson BI, Klein-Szanto AJ, *et al.* Synucleins are expressed in the majority of breast and ovarian carcinomas and in preneoplastic lesions of the ovary [J]. Cancer, 2000, 88(9): 2154-2163.
- [7] Wu K, Weng Z, Tao Q, *et al.* Stage-specific expression of breast cancer-specific gene gamma-synuclein [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2003, 12(9): 920-959.

## 本刊2008年各期重点内容安排

本刊2008年各期重点内容安排如下,欢迎赐稿。

第1期	肝脏外科及肝肿瘤	第7期	肝脏外科及肝移植
第2期	胆道外科及胆石症	第8期	胆道外科及胆道肿瘤
第3期	胰腺外科及胰腺炎	第9期	胰腺外科及胰腺肿瘤
第4期	胃肠道外科及消化道肿瘤	第10期	胃肠道外科及大肠肿瘤
第5期	乳腺、甲状腺外科	第11期	甲状腺、乳腺外科
第6期	血管外科及门静脉高压症外科	第12期	微创外科及其他