

文章编号:1005-6947(2005)09-0687-04

· 实验研究 ·

# FHIT mRNA 和 WWOX mRNA 在乳腺癌中的表达及其临床意义

王甜甜<sup>1</sup>, 马榕<sup>1</sup>, 高海东<sup>1</sup>, 唐鲁兵<sup>1</sup>, 冯进波<sup>2</sup>

(山东大学齐鲁医院 1. 乳腺外科 2. 心血管病中心实验室, 山东 济南 250012)

**摘要:**目的 观察乳腺癌组织中 FHIT mRNA 和 WWOX mRNA 表达情况, 并探讨其与临床病理学指标的关系。方法 以逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 51 例乳腺癌及癌旁组织标本中染色体脆性位点抑癌基因 FHIT mRNA 和 WWOX mRNA 表达, 半定量分析电泳结果。以免疫组化法检测乳腺癌石蜡标本中的雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)和 HER-2 基因状态。结果 51 例配对标本中, WWOX mRNA 表达在乳腺癌组织及癌旁非癌乳腺组织中差异有显著性( $P < 0.01$ ); FHIT 基因的 mRNA 表达在乳腺癌组织及癌旁非癌乳腺组织中差异有显著性( $P < 0.01$ )。FHIT mRNA 和 WWOX mRNA 在乳腺癌组织中的低表达呈正相关( $r_s = 0.354, P < 0.05$ )。FHIT mRNA 和 WWOX mRNA 的表达与临床病理分期有关( $P < 0.05$ ), WWOX mRNA 的表达与腋淋巴结转移有关( $P < 0.05$ )。结论 FHIT 和 WWOX 基因系重要的候选抑癌基因, 与其他预后指标的联合检测可望对患者的治疗预后作出更准确的预测。

**关键词:** 乳腺肿瘤/病理学; 基因, WWOX; FHIT

中图分类号: R737.9 文献标识码: A

## Expression of FHIT mRNA and WWOX mRNA in human breast cancer and their clinical significance

WANG Tian-tian<sup>1</sup>, MA Rong<sup>1</sup>, GAO Hai-dong<sup>1</sup>, TANG Lu-bing<sup>1</sup>, FENG Jin-bo<sup>2</sup>

(1. Department of General Surgery 2. Laboratory of Cardiovascular Diseases, QiLu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the expression of FHIT mRNA and WWOX mRNA in human breast cancer tissues and its relation to clinicopathological and other molecular parameters. **Methods** With reference to the expression of  $\beta$ -actin, the expression of FHIT mRNA and WWOX mRNA was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in 51 breast cancer and adjacent breast tissue, and semi-quantitative analysis of band densities was performed. The protein expression of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), Her-2 gene in the 51 breast cancer lesions was detected by immunohistochemical method. **Results** FHIT mRNA and WWOX mRNA expression was significantly different in 54 breast cancer tissue compared to adjacent breast tissue ( $P < 0.01$ ). The expression of FHIT mRNA and WWOX mRNA in 51 breast cancer tissue was reduced and was related to the clinicopathological stage ( $P > 0.05$ ); of FHIT mRNA and WWOX mRNA was related to axillary lymph node metastasis ( $P < 0.05$ ). There are correlations between the low expression of FHIT mRNA and WWOX mRNA in breast cancer tissue. **Conclusions** FHIT and WWOX are candidate tumor suppressor genes. Detected coordinately with other molecular parameters, they can make the prognosis of therapy more accurate to predict.

**Key words:** Breast Neoplasms/pathol; Gene, WWOX; FHIT

CLC number: 737.9 Document code: A

收稿日期:2005-03-29; 修订日期:2005-07-15。

作者简介:王甜甜(1981-),女,山东济宁人,山东大学齐鲁医院硕士研究生,主要从事乳腺疾病方面的研究。

通讯作者:马榕 电话:13869197382(手机); E-mail:marongw2000@yahoo.com.cn。

近年研究认为, DNA 损伤是恶性肿瘤发生发展的重要机制, 染色体脆性位点抑癌基因对 DNA 损伤高度敏感。脆性三联组氨酸 (FHIT) 基因与 WWOX 基因位于重要的染色体脆性位点 FRA3B 及 FRA16D, 是近期发现的抑癌基因<sup>[1,2]</sup>。本文联合检测乳腺癌及癌旁非癌组织标本中 FHIT 与 WWOX 的转录情况, 与临床病理学指标对比分析, 以探讨染色体脆性位点抑癌基因失活与乳腺癌浸润、转移的关系。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床一般资料

收集我院 2003 年 10 月 ~ 2004 年 10 月 51 例行乳腺癌切除患者的癌组织及距肿瘤 3 cm 以远癌旁非癌乳腺组织。所有病例术后均经病理证实, 术前均未行化疗、放疗和内分泌治疗。患者年龄 28 ~ 76 (平均 51.2) 岁。临床分期: I 期 14 例, II 期 19 例, III 期 18 例。行乳腺癌根治术 16 例, 改良根治术 35 例。病理类型均为浸润性导管癌。

手术时收集标本, 离体后在无菌条件下切取乳腺癌及癌旁新鲜组织各约 1 g, 迅速置 - 84 °C 冰箱保存。

### 1.2 主要试剂与仪器

0.1 mol/L DTT 和 10 U /  $\mu$ L MMLV10U (Invitrogen 公司), 10 mmol/L dNTPs (Fermentas 公司)、OligodT (上海博雅技术公司) 和 1 U /  $\mu$ L Taq 酶 (Fermentas 公司)。Biometra PCR 仪 (Tgradient 96 型号) 及凝胶成像系统 (Fluorchem 9900, Germany)。

### 1.3 方法

1.3.1 引物 WWOX 上游引物为 5' GATAATC-CGACCAAGCCAAC 3'; 下游引物为 5' ACTGCT-TCACTCGCCCTTG 3'; 扩增片断 209 bp。FHIT 上游引物为 5' GCCAACATCTCATCAAGCCCT 3'; 下游引物为 5' TGGGTCGTCTGAAACAAATCG 3'; 扩增片断 172 bp。 $\beta$ -actin 上游引物为 5' ACTATGTTTGAGCCTTCAACA 3'; 下游引物为 5' CATCTCTTGCTCGAAGTCCA 3'; 扩增片断 317 bp。

1.3.2 组织中总 RNA 提取 乳腺癌、癌旁组织均采用异硫氰酸胍 - 酚 - 氯仿 (AGPC) 一步法提取总 RNA。将总 RNA 溶于 0.1% DEPC 处理水, 紫外分光光度计检测 RNA 浓度及 A260 / A280 值, 调 RNA 浓度至 0.5  $\mu$ g /  $\mu$ L。

1.3.3 RT-PCR 反应分两步进行 RT 反应体系: 在 20  $\mu$ l 反应体系中加 5  $\times$  Buffer 4  $\mu$ L, 0.1 mol/L

DTT 2  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTPs 1  $\mu$ L, 15 nmol/L Oligod T 1  $\mu$ L, 10 U /  $\mu$ L MMLV 10 U, 模板 RNA 1  $\mu$ g (2  $\mu$ L), 0.1% DEPC 处理水 8  $\mu$ L, 多聚酶链反应 (PCR) 仪 37 °C 反应 60 min, 95 °C 5 min 灭活 MMLV。PCR 反应体系: 在 50  $\mu$ L 反应体系中加 10  $\times$  Buffer 5  $\mu$ L, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTPs 0.5  $\mu$ L, 1 U /  $\mu$ L Taq 酶 1  $\mu$ L, 上下游引物各 15 pmol, 逆转录 (RT) 产物 cDNA 模板 3  $\mu$ L, 0.1% DEPC 处理水 34.5  $\mu$ L, 入 PCR 仪。反应条件: 95 °C 变性 5 min, 94 °C 45 s, 56 °C 45 s, 72 °C 45 s; 共 33 个循环, 72 °C 延伸 7 min。

### 1.4 PCR 产物相对定量分析

取 10  $\mu$ L PCR 产物在含有溴化已锭的 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 5 V / cm, 在凝胶成像系统下成像分析。将  $\beta$ -actin 条带的光密度值定为 10, 取目的基因条带与  $\beta$ -actin 条带光密度值的比值作为目的基因的相对值。

### 1.5 统计学处理

采用秩和检验、等级相关分析等统计学方法, SPSS 11.5 版软件分析。

## 2 结果

### 2.1 乳腺癌组织与癌旁非癌乳腺组织中 FHIT 与 WWOX 转录情况

FHIT mRNA 和 WWOX mRNA 在乳腺癌组织、癌旁组织中均有表达 (附图); 两者在乳腺癌组织中的表达低于癌旁组织, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。乳腺癌组织中 WWOX 与 FHIT 基因表达强度较癌旁乳腺组织低者分别为 30 例 (58.82%) 和 22 例 (43.14%), 较癌旁乳腺组织高者均为 4 例 (7.84%), 与癌旁乳腺组织相等者为 17 例 (33.33%), 25 例 (49.02%) (表 1)。

m: Marker; a: 癌组织中 WWOX; b: 癌组织中 FHIT; c:  $\beta$ -actin d: 癌旁组织中 WWOX; e: 癌旁组织中 FHIT; f:  $\beta$ -actin

附图 WWOX mRNA 与 FHIT mRNA 在癌与癌旁组织中的表达

表1 WWOX mRNA 与 FHIT mRNA 在癌与癌旁组织中的表达

指标	标本	平均秩次	低表达数	Z 值 <sup>†</sup>	P 值
WWOX	乳腺癌组织	43.95	30		
	癌旁组织	59.05		-2.755	0.006
FHIT	乳腺癌组织	46.24	22		
	癌旁组织	56.76		-2.055	0.040

注: † 数据非正态分布,采用秩和检验

## 2.2 乳腺癌组织中 FHIT 与 WWOX 转录情况的相关性分析

FHIT mRNA 与 WWOX mRNA 在乳腺癌组织及癌旁组织中的表达呈正相关, FHIT 与 WWOX mRNA 在乳腺癌组织中的低表达亦呈正相关(表2)。

表2 WWOX mRNA 与 FHIT mRNA 在乳腺癌组织中表达的相关性分析

表达组织	相关系数( $r_s$ ) <sup>†</sup>	P 值
表达	0.306	0.029
低表达	0.354	0.021

注: † 均采用等级相关分析

## 2.3 乳腺癌组织中 FHIT 与 WWOX 转录与临床病理学指标的关系

腋淋巴结转移与 WWOX mRNA 的表达相关( $P < 0.05$ ); 临床病理学分期与 FHIT mRNA 和 WWOX mRNA 的表达相关( $P < 0.05$ ); 年龄、肿块大小、ER、PR、cerBb2 状态与标本中 FHIT mRNA 和 WWOX mRNA 表达无关( $P > 0.05$ )(表3)。

表3 WWOX 与 FHIT mRNA 在癌组织中的表达与临床病理学指标的关系

临床病理学指标	例数	WWOX mRNA		FHIT mRNA	
		Z 值 <sup>†</sup>	P 值	Z 值 <sup>†</sup>	P 值
年龄(岁)	<50	24			
	>51	27	-0.603	0.547	-0.940
ER	阳性	33			
	阴性	18	-0.773	0.440	-0.958
PR	阳性	33			
	阴性	18	-0.972	0.331	-1.797
cerBb2	阳性	30			
	阴性	21	-0.965	0.335	-0.744
肿块大小(cm)	<2	21			
	>2	30	-1.212	0.226	-3.26
淋巴结转移	阳性	25			
	阴性	33	-2.164	0.030	0.108
临床病理分期	I, II	33			
	III	18	-2.396	0.017	-2.372

注: † 采用秩和检验

## 3 讨论

FHIT 基因定位于染色体 3p14.2 区, 位于染色体脆性位点 FRA3B。FHIT 在所有正常组织中均有低水平的表达, 其蛋白质功能为调控细胞周期、诱导细胞凋亡、降解促使细胞增殖的二腺苷三磷酸(AP3A)<sup>[1,3]</sup>。其失活机制可能有:(1) FHIT 等位基因杂合子缺失;(2) 增强子区域 CpG 段的甲基

化致 FHIT 基因失活<sup>[4]</sup>;(3) 转录缺失或严重降低致表达缺失或降低。WWOX 基因定位于染色体 16q23.3 ~ 24.1 区, 位于染色体脆性位点 FRA16D。WWOX 主要在激素调节组织中表达, 其蛋白质为参与类固醇代谢的酶<sup>[5]</sup>。其失活机制可能有:(1) WWOX 等位基因杂合子缺失及纯合子缺失<sup>[6]</sup>;(2) 甲基化对 WWOX 基因有无影响尚无定论<sup>[5,7]</sup>;(3) 转录缺失或严重降低致表达缺失或降

低。

文献报道<sup>[2,8]</sup>,多种肿瘤组织及肿瘤细胞系中3p14.2区及16q23.3~24.1区存在频繁的杂合子丢失(LOH),且伴发FHIT与WWOX的转录异常及表达缺失。在散发性乳腺癌标本中同样检测到FHIT基因及WWOX基因的缺失。对乳腺癌组织与癌旁非癌乳腺组织中FHIT和WWOX基因的mRNA表达研究结果显示,两者在乳腺癌中的低表达较癌旁非癌组织多见,差异有统计学意义。本文及国内外报道的结果均提示两者为重要的候选肿瘤抑制基因。相关性分析显示,乳腺癌组织中FHIT与WWOX基因的mRNA低表达有相关性,与Guler等<sup>[9]</sup>在蛋白水平的研究结果一致。提示两者在乳腺癌DNA损伤中同时受到影响。

与乳腺癌临床病理学指标的关系分析显示,FHIT mRNA和WWOX mRNA表达与肿块大小无关;FHIT mRNA表达与淋巴结转移无关;而两者与临床病理学分期均相关( $P < 0.05$ )。提示与单因素指标(肿块大小、淋巴结转移)相比,综合性指标(临床病理学分期)可更全面地反映癌症的发生与演变。本文研究显示,FHIT mRNA和WWOX mRNA表达与乳腺癌患者的ER,PR及HER-2表达无关,与临床病理学分期有关( $P < 0.05$ )。WWOX蛋白在晚期乳腺癌标本中表达显著降低<sup>[9]</sup>。Ginestier等<sup>[10]</sup>报道FHIT蛋白失表达的乳腺癌患者预后变差。多项研究结果提示,FHIT和WWOX可作为独立的乳腺癌治疗及预后指标;其与ER,PR,cerBb2,p16,p53等预后相关指标<sup>[11]</sup>联合检测可望提高预后判断的准确性,有助于制订个体化治疗方案。

#### 参考文献:

[1] Ohta M, Inoue H, Coticelli MG, *et al.* The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-as-

sociated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers [J]. *Cell*, 1996, 84(4):587-597.

- [2] Bednarek AK, Laflin KJ, Daniel RL, *et al.* WWOX, a novel WW domain-containing protein mapping to human chromosome 16q23.3-24.1, a region frequently affected in breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(8):2140-2145.
- [3] Paradee W, Mullins C, He Z, *et al.* Precise localization of aphidicolin-induced breakpoints on the short arm of human chromosome 3 [J]. *Genomics*, 1995, 27(2):358-361.
- [4] Zochbauer-Muller S, Fong KM, Maitra A, *et al.* 5' CpG island methylation of the FHIT gene is correlated with loss of gene expression in lung and breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(9):3581-3585.
- [5] Bednarek AK, Keck-Waggoner CL, Daniel RL, *et al.* WWOX, the FRA16D gene, behaves as a suppressor of tumor growth [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(22):8068-8073.
- [6] Paige AJ, Taylor KJ, Taylor C, *et al.* WWOX: a candidate tumor suppressor gene involved in multiple tumor types [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(20):11417-11422.
- [7] Iliopoulos D, Guler G, Han SY, *et al.* Fragile genes as biomarkers: epigenetic control of WWOX and FHIT in lung, breast and bladder cancer [J]. *Oncogene*, 2005, 24(9):1625-1633.
- [8] Maitra A, Wistuba II, Washington C, *et al.* High-resolution chromosome 3p allelotyping of breast carcinomas and precursor lesions demonstrates frequent loss of heterozygosity and a discontinuous pattern of allele loss [J]. *Am J Pathol*, 2001, 159(1):119-130.
- [9] Guler G, Uner A, Guler N, *et al.* The fragile genes FHIT and WWOX are inactivated coordinately in invasive breast carcinoma [J]. *Cancer*, 2004, 100(8):1605-1614.
- [10] Ginestier C, Bardou VJ, Popovici C, *et al.* Loss of FHIT protein expression is a marker of adverse evolution in good prognosis localized breast cancer [J]. *Int J Cancer*, 2003, 107(5):854-862.
- [11] 田兴松,周文红. 乳腺癌细胞中 p16, p53, CDK4/cyclinD1 的表达和预后的关系 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14(4):260-264.