

C10orf10 基因在乳腺癌中表达及其与临床病理特征的关系

李林海 马冠雅

【摘要】 目的 探讨 C10orf10 基因在乳腺癌中的表达及其与乳腺癌临床病理特征的关系。**方法** 本研究选取从 2007 年 5 月到 2013 年 3 月解放军第 161 医院存档的 200 例乳腺癌组织和 121 例正常乳腺组织标本中(包括 30 例乳腺癌组织和对应的癌旁正常组织)进行回顾性分析,采用 RT-PCR、qRT-PCR 和免疫组织化学方法检测标本中 C10orf10 的 mRNA 及蛋白表达情况。C10orf10 的 mRNA 及蛋白表达的组间比较采用 t 检验,分析乳腺癌组织中 C10orf10 表达与患者临床病理特征的关系采用 χ^2 检验和非参数 Mann-Whitney U 检验。**结果** C10orf10 在乳腺癌组织中的 mRNA 平均表达量为 (2.57 ± 1.24) , 低于正常组织中的平均表达量 (4.82 ± 1.49) ($t = 14.629, P = 0.046$); 并且对于其中的 30 例配对癌和癌旁组织, C10orf10 在癌组织中表达为 (2.71 ± 1.44) , 也显著低于对应癌旁组织中的表达 (4.94 ± 1.86) ($t = 6.120, P < 0.001$)。在乳腺癌组织中 C10orf10 蛋白表达量为 (2.00 ± 1.81) , 也明显低于对应癌旁组织 (4.83 ± 2.27) ($t = 3.782, P = 0.002$)。乳腺癌组织中 C10orf10 表达与患者临床 TNM 分期 ($Z = -2.143, P = 0.032$)、淋巴结转移 ($\chi^2 = 5.337, P = 0.021$) 和 HER-2 表达 ($\chi^2 = 7.466, P = 0.006$) 有关, 但是与患者年龄 ($\chi^2 = 1.449, P = 0.229$)、组织学分级 ($Z = -1.963, P = 0.050$)、肿瘤大小 ($\chi^2 = 0.359, P = 0.549$)、肿瘤位置 ($\chi^2 = 2.912, P = 0.088$)、ER ($\chi^2 = 0.016, P = 0.898$) 和 PR 表达情况 ($\chi^2 = 0.953, P = 0.329$) 无关。**结论** C10orf10 可能参与了乳腺癌的发生、发展进程, 是一个重要的乳腺癌指标。

【关键词】 乳腺肿瘤; C10orf10; 基因表达

【中图分类号】 R737.9 **【文献标志码】** A

C10orf10 expression in breast cancer tissue and its relationship with clinicopathological characteristics

Li Linhai, Ma Guanya. Center of Radiotherapy, No. 161 Hospital of PLA, Wuhan 430010, China

Corresponding author: Ma Guanya, Email: lilinhai2000@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression of C10orf10 in breast cancer tissue and its relationship with clinicopathological characteristics of breast cancer patients. **Methods** The mRNA and protein expressions of C10orf10 in tissue samples from 200 cases of breast cancer and 121 cases of normal breast tissues (including 30 cases of breast cancer and their adjacent normal tissues) in No. 161 Hospital of PLA from May 2007 to March 2013 were detected by RT-PCR, qRT-PCR and immunohistochemistry respectively. C10orf10 mRNA and protein expressions among groups were compared using t test, and the relationship between C10orf10 expression in breast cancer tissue and clinicopathological characteristics using χ^2 test and non-parametric Mann-Whitney U test. **Results** C10orf10 mRNA expression in breast cancer tissue was 2.57 ± 1.24 , significantly lower than 4.82 ± 1.49 in normal breast tissue ($t = 14.629, P = 0.046$). Among them, C10orf10 mRNA expression in breast cancer tissue of 30 cases was 2.71 ± 1.44 , significantly lower than 4.94 ± 1.86 in adjacent normal breast tissues ($t = 6.120, P < 0.001$). C10orf10 protein expression in breast cancer tissues was 2.00 ± 1.81 , significantly lower than 4.83 ± 2.27 in the corresponding adjacent cancer tissues ($t = 3.782, P = 0.002$). C10orf10 expression in breast cancer patients was significantly correlated with TNM stage ($Z = -2.143, P = 0.032$), lymph node metastasis ($\chi^2 = 5.337, P = 0.021$) and HER-2 expression ($\chi^2 = 7.466, P = 0.006$), but not related to patients' age ($\chi^2 = 1.449, P = 0.229$), histological grade ($Z = -1.963, P = 0.050$), tumor size ($\chi^2 = 0.359, P = 0.549$), tumor location ($\chi^2 = 2.912, P = 0.088$), ER ($\chi^2 = 0.016, P = 0.898$) and PR expression ($\chi^2 = 0.953, P = 0.329$). **Conclusion** C10orf10

may be a important indicator, playing a role in oncogenesis and progression of breast cancer.

【Key words】 Breast neoplasms; C10orf10; Gene expression

乳腺癌作为世界范围内女性最常见的恶性肿瘤之一,是引起女性死亡的重要病因^[1-3]。近年来,随着治疗水平的提高,乳腺癌的病死率已经有所降低,但乳腺癌的预防和治疗仍旧是一大难题^[4]。C10orf10(chromosome 10 open reading frame 10)基因定位于人类 10 号染色体的 q11.21 位置,最初是从人类子宫克隆得到。该基因编码 212 个氨基酸,具有一个 t 突触小体相关蛋白受体卷曲的同源性结构域和一个过氧化物酶体定位信号。该基因在肾脏、胎盘、肝脏、卵巢等多种组织中高表达^[5-7]。研究表明,孕激素、雄激素和缺氧条件能够诱导 C10orf10 基因的表达^[5, 8-9]。过表达 C10orf10 能够激活转录因子 Elk-1 的活性和增加磷酸化丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)蛋白表达水平^[5],而且 C10orf10 的表达直接受到 FoxO 和 FoxO3 蛋白的转录调控^[9-10]。C10orf10 在乳腺癌中可能是一个重要的预后因子^[11]。然而, C10orf10 在乳腺癌中的表达与哪些临床特征有关还需要进一步的研究。本研究采用 RT-PCR, 实时定量 RT-PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 和免疫组织化学方法检测了乳腺癌组织中 C10orf10 的表达水平,并探讨了 C10orf10 表达与临床病理特征的关系。

资料与方法

一、组织样本的收集

选取 2007 年 5 月至 2013 年 3 月解放军第 161 医院乳腺外科部分存档的乳腺癌(浸润性导管癌)患者速冻组织标本 200 例及癌旁正常组织标本 121 例作为对照(其中有 30 例癌组织和对应的癌旁正常组织)进行回顾性分析。所有标本通过石蜡切片后,至少由两位病理专家诊断。患者年龄为 29 ~ 83 岁,中位年龄 51 岁。术前未接受放化疗。121 例对照标本取自同期远离肿瘤经病理证实的正常乳腺组织。该研究由解放军第 161 医院伦理委员会批准,所有患者均签署了知情同意书。

二、总 RNA 的提取

速冻样本组织总 RNA 的提取采用 TRIzol 法。加入 TRIzol 试剂(美国 Invitrogen 公司)后迅速进行组织匀浆,后续步骤根据试剂说明书进行。取 2.0 μg 总 RNA 进行 DNase I 处理,以去除基因组 DNA 的污染,最后处理好的 RNA 再逆转录成互补 DNA (complementary DNA, cDNA)。

三、RT-PCR 和实时定量 PCR (qRT-PCR)

采用 RT-PCR 和 qRT-PCR 检测 C10orf10 的表达,且采用 C10orf10 不同区段设计的引物进行扩增(表 1)。对于 RT-PCR,设置一系列的循环圈数以确定 C10orf10 表达的线性增长期。根据线性增长期的结果选择适当的循环数(C10orf10 为 35 个循环,β-actin 为 22 个循环),RT-PCR 共检测了 30 例乳腺癌组织及其对应癌旁正常组织^[12]。对于 qRT-PCR,采用 iQ5 实时监测仪器(Bio-Rad Laboratories, USA)和 SYBR Premix Ex TaqTMII (Takara, 大连宝生物公司)进行定量检测,基因的相对表达量通过公式 $2^{-\Delta\Delta t}$ 进行计算,β-actin 作为内参照^[13]。qRT-PCR 检测 200 例乳腺癌组织和 121 例癌旁正常组织,包括 30 例乳腺癌组织及其对应癌旁组织。为了确定 C10orf10 表达与患者临床病理特征之间的关系,根据乳腺癌组织中 C10orf10 mRNA 相对表达量的平均值(2.57)将乳腺癌患者分成两组,>2.57 为 C10orf10 高表达组,≤2.57 为 C10orf10 低表达组。分析不同的 C10orf10 表达组和患者临床病理特征的关系。

表 1 RT-PCR 和 qRT-PCR 扩增引物序列

基因名称	引物序列	作用
C10orf10	C10F: 5'-ACACTGCCCATGGCTGATAC-3'	用于 RT-PCR
	C10R: 5'-TGCCCAAAAGTCCAGCTTCT-3'	
C10orf10	C10F1: 5'-AAGCTGGACTTTTGGGCAGT-3'	用于 qRT-PCR
	C10R1: 5'-GTTTCATGGATCACCGGAGG-3'	
β-actin	Actin F: 5'-GAGCTACGAGTGCCTGACGG-3'	用作内参
	Actin R: 5'-CCTAGAAGCATTTCGCGTGG-3'	

四、免疫组织化学分析

为进一步确定 C10orf10 蛋白水平在乳腺癌组织中相对于癌旁正常组织是否降低,随机数字表法选择 15 例乳腺癌组织及其对应的癌旁正常组织进行了免疫组织化学 SP 法检测。C10orf10 抗体(Santa Cruz Biotechnology)稀释比例为 1 : 100。以 PBS 缓冲液代替一抗做阴性对照。用 DAB 显色,显微镜下观察。染色定量分析采取细胞染色强度记分和阳性率记分的乘积定义表达水平。肿瘤细胞染色百分比 ≤10% 记为 0 分,11% ~ 25% 记为 1 分; 26% ~ 50% 记为 2 分; 51% ~ 75% 记为 3 分, >76% 记为 4 分。肿瘤细胞的染色强度分为阴性记 0 分,弱阳性记 1 分,中阳性记为 2 分,强阳性记为 3 分^[13]。

五、统计学分析

应用 SPSS16.0 统计软件进行分析,各组数据经正态性检验符合正态分布,用 $\bar{x} \pm s$ 表示。C10orf10 的 mRNA 及蛋白表达量的组间比较采用 t 检验,比较 30 例乳腺癌组织及其对应癌旁正常组织中的 C10orf10 的表达用配对 t 检验,分析乳腺癌组织中 C10orf10 表达与患者临床病理特征的关系采用 χ^2 检验和非参数 Mann-Whitney U 检验。以 $P < 0.050$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、乳腺癌组织及癌旁正常组织中的 C10orf10 mRNA 表达

通过 RT-PCR 检测了 30 例乳腺癌组织和对应正常癌旁组织中的 C10orf10 mRNA 表达,结果显示, C10orf10 mRNA 表达在大多数(26/30)的乳腺癌组织中低于对应的癌旁正常组织(图 1a,表 2, $\chi^2 = 8.570, P = 0.003$)。进一步通过 qRT-PCR 分析 200 例乳腺癌组织和 121 例癌旁正常组织表明, C10orf10 mRNA 表达在乳腺癌组织中的平均表达量低于癌旁正常组织(2.57 ± 1.24 比 $4.82 \pm 1.49, t = 14.629, P = 0.046$)。其中对于 30 例癌组织及其癌旁组织, C10orf10 在癌组织中的表达低于其癌旁正常组织(2.71 ± 1.44 比 $4.94 \pm 1.86, t = 6.120, P < 0.001$, 图 1b)。

二、乳腺癌组织及癌旁正常组织中的蛋白表达

C10orf10 蛋白表达量在乳腺癌组织中为(2.00 ± 1.81),低于癌旁正常组织(4.83 ± 2.27) ($t = 3.782, P = 0.002$, 图 2)。

三、C10orf10 表达与乳腺癌临床病理特征的关系

C10orf10 基因的表达与患者年龄($\chi^2 = 1.449, P = 0.229$)、组织学分级($Z = -1.963, P = 0.050$)、肿瘤大小($\chi^2 = 0.359, P = 0.549$)、肿瘤位置($\chi^2 =$

$2.912, P = 0.088$)、ER 表达($\chi^2 = 0.016, P = 0.898$)和 PR 表达($\chi^2 = 0.953, P = 0.329$)无关,而与患者 TNM 分期($Z = -2.143, P = 0.032$)、淋巴结转移($\chi^2 = 5.337, P = 0.021$)和 HER-2 表达($\chi^2 = 7.466, P = 0.006$)有关(表 3)。其中,与 TNM 分期 I 期患者(65.38%, 17/26)相比, II 期(39.66%, 46/116)和 III 期患者(35.29%, 18/51)中 C10orf10 高表达的比例明显降低($\chi^2 = 59.013, 37.908, P$ 均 < 0.001);与淋巴结阴性的患者相比(49.45%, 45/91),淋巴结阳性患者(33.00%, 33/100)中 C10orf10 高表达的比例降低($\chi^2 = 114.677, P < 0.001$);并且与 HER-2 表达阳性患者相比(54.79%, 40/73), HER-2 表达阴性患者(34.51%, 39/113)中 C10orf10 高表达比例也降低($\chi^2 = 103.183, P < 0.001$)。

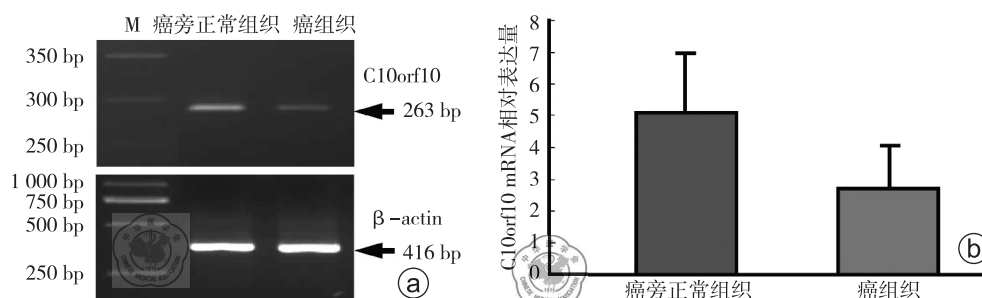
表 2 30 例乳腺癌组织及其癌旁正常组织中 C10orf10 mRNA 的表达

癌旁正常组织	乳腺癌组织		合计
	高表达	低表达	
高表达	3	12	15
低表达	1	14	15
合计	4	26	30

注: $\chi^2 = 8.570, P = 0.003$

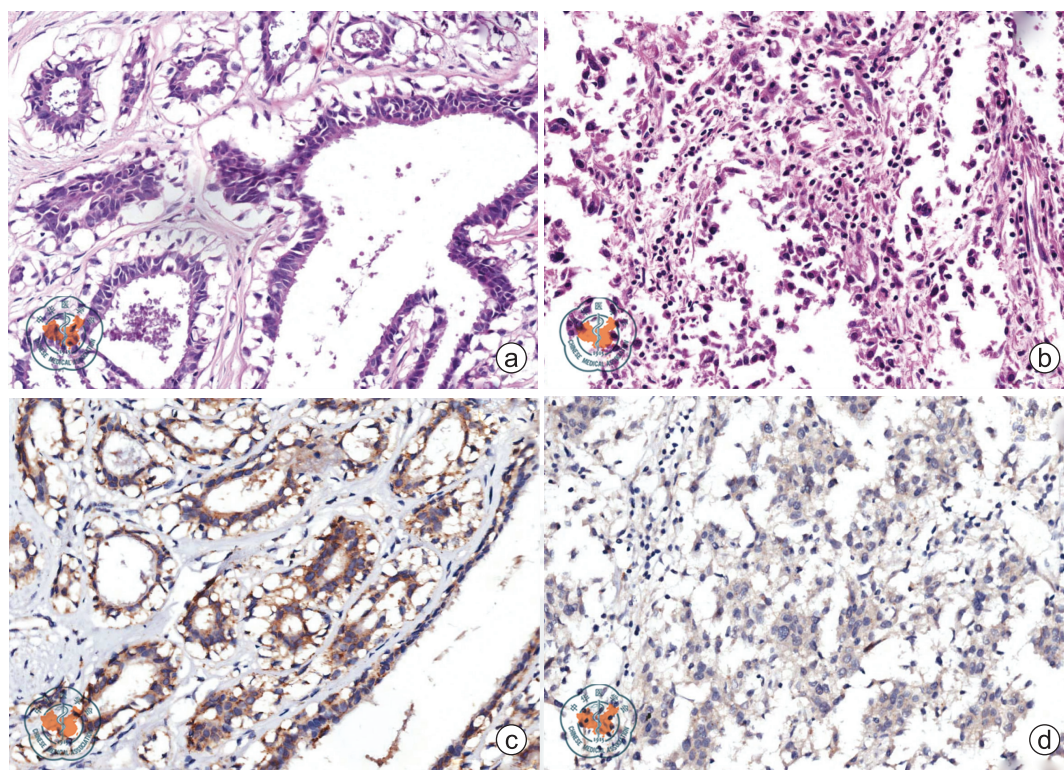
讨 论

本研究中,笔者检测了 200 例乳腺癌和 121 例癌旁正常组织中 C10orf10 的表达。检测结果显示,无论是 mRNA 水平还是蛋白水平, C10orf10 在乳腺癌患者组织中的相对表达量都明显低于癌旁正常组织。进一步分析发现, C10orf10 表达与患者 TNM 分期、淋巴结转移和 HER-2 表达有关。这说明 C10orf10 在乳腺癌的形成过程中具有重要作用,有进一步深入分析和研究的价值。



注: a 图所示 RT-PCR 检测 C10orf10 mRNA 表达, M 为标志物, β -actin 为内参照; b 图所示 qRT-PCR 检测 C10orf10 的 mRNA 表达量($t = 6.120, P < 0.001$)

图 1 C10orf10 在乳腺癌组织和对应癌旁正常组织中的 mRNA 表达



注:a 图表示癌旁正常组织的形态结构(HE ×200);b 图表示乳腺癌组织的形态结构(HE ×200);c 图表示 C10orf10 在癌旁正常组织中的表达(SP ×200);d 图表示 C10orf10 在乳腺癌组织中的表达(SP ×200)

图 2 C10orf10 在乳腺癌组织和对应癌旁正常组织中的蛋白表达

C10orf10 基因在人类多种组织中都有表达,尤其是在胰岛素敏感组织中,而且其表达与缺氧、孕激素、胰岛素、电离辐射和昼夜节律密切相关^[5-9, 14-15]。但是 C10orf10 基因的生物学功能和调控机制缺乏深入研究。最近研究发现,C10orf10 是一个参与激活细胞自噬的重要缺氧诱导基因^[16],过表达 C10orf10 能够激活转录因子 Elk-1 的活性和增加 MAPK 表达水平^[5],而且 C10orf10 的表达直接受到 FoxO 蛋白的转录调控^[9]。本研究发现,C10orf10 在乳腺癌组织中的 mRNA 表达明显低于癌旁正常组织,进一步通过免疫组织化学检测其在乳腺癌组织中的表达发现,C10orf10 在乳腺癌组织中的蛋白表达也明显低于癌旁正常组织,这一结果与 Deng 等^[11]的研究结果相一致。本研究发现,C10orf10 表达于癌旁组织的上皮细胞质中,而 Deng 等^[11]认为其不仅在癌旁组织中上皮细胞质表达,而且在细胞核中也存在轻度表达,这可能与染色判断标准存在差异有关。文献报道,C10orf10 在贝沙罗汀(bexarotene,一种抗肿瘤药物)处理的乳腺细胞中表达明显升高,可以作为该药物暴露的一个生物标志物^[17]。C10orf10 高表达是乳腺癌患者预后的有利因素^[11]。基于本研究结果,笔者猜测 C10orf10 广泛参与了乳腺发育过程,在乳腺癌中可能是一个潜

在的肿瘤抑制基因,不过这需要进一步的体内、外功能实验的验证。目前笔者团队正在构建 C10orf10 的表达质粒,进行初步的功能实验,接下来将重点进行相关分子机制的筛查和解析。

Deng 等^[11]发现 C10orf10 表达与患者年龄、组织学分级和肿瘤大小无关,而与淋巴结转移相关。然而,他们认为 C10orf10 表达与患者临床分期无关,而笔者发现两者有关,可能原因在于:(1)与样本量大小有关;(2)本研究的 200 例患者均为浸润性导管癌,而 Deng 等研究的患者类型是否均为浸润性导管癌并不清楚。此外,本研究显示 C10orf10 表达与患者的 HER-2 表达有关,而与 ER 和 PR 表达无关,这说明 C10orf10 在乳腺癌中能够影响 HER-2 的表达,但其因果关系以及是直接或是间接调控还需要后续研究。C10orf10 表达与其他因子如 CD10、P63、P53、Ki67 等表达是否存在关联,还有待于进一步研究。

综上所述,C10orf10 可能在乳腺癌形成过程中具有重要作用,C10orf10 表达与患者 TNM 分期、淋巴结转移和 HER-2 表达有关。因此,进一步深入研究 C10orf10 基因的功能和临床意义无疑将具有重要的理论意义和潜在的临床诊断应用价值。

本研究的缺陷在于没有患者生存期的数据,因

表 3 C10orf10 基因表达与患者临床病理资料的
关联分析(例)

临床病理特征	总例数	C10orf10 基因表达		检验值	P 值
		高表达	低表达		
年龄					
<51 岁	92	34	58	$\chi^2 = 1.449$	0.229
≥51 岁	108	49	59		
组织学分级					
1	20	7	13	$Z = -1.963$	0.050
2	154	60	94		
3	26	16	10		
TNM 分期					
I	26	17	9	$Z = -2.143$	0.032
II	116	46	70		
III	51	18	33		
肿瘤大小					
≤ 3 cm	117	47	70	$\chi^2 = 0.359$	0.549
> 3 cm	81	36	45		
淋巴结转移					
无	91	45	46	$\chi^2 = 5.337$	0.021
有	100	33	67		
肿瘤位置					
右侧	113	41	72	$\chi^2 = 2.912$	0.088
左侧	87	42	45		
ER 表达					
阴性	72	31	41	$\chi^2 = 0.016$	0.898
阳性	114	48	66		
PR 表达					
阴性	86	40	46	$\chi^2 = 0.953$	0.329
阳性	99	39	60		
HER-2 表达					
阴性	113	39	74	$\chi^2 = 7.466$	0.006
阳性	73	40	33		

注:200 病例中临床分期资料丢失 7 例;肿瘤大小数据丢失 2 例;淋巴结转移数据丢失 9 例;14 例没有 ER 表达数据;15 例没有 PR 表达数据;14 例没有 HER-2 表达数据

此没能进行生存数据的分析。另外,纳入患者类型单一(均为浸润性导管癌),以后还需要收集其他类型患者,进一步分析不同类型患者中 C10orf10 表达与临床病理特征间的关系,为 C10orf10 作为乳腺癌潜在分子标志物提供参考。另外,前期研究发现 C10orf10 表达与缺氧、激素和电离辐射等相关,这意味着 C10orf10 表达与肿瘤放化疗可能存在相关性,也就是说 C10orf10 表达差异的患者对放化疗的敏感性可能不同,这也是笔者重点关注的研究方向。

参 考 文 献

- [1] Forouzanfar MH, Foreman KJ, Delossantos AM, et al. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis [J]. Lancet, 2011, 378 (9801): 1461-1484.
- [2] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63 (1):11-30.
- [3] 余峰,刘晶晶,张晟,等. 白蛋白紫杉醇用于乳腺癌新辅助化疗的二期临床研究 [J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2014, 8(4):9-15.
- [4] Parker JS, Mullins M, Cheang MC, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes [J]. J Clin Oncol, 2009, 27 (8): 1160-1167.
- [5] Watanabe H, Nonoguchi K, Sakurai T, et al. A novel protein Depp, which is induced by progesterone in human endometrial stromal cells activates Elk-1 transcription factor [J]. Mol Hum Reprod, 2005, 11 (7): 471-476.
- [6] Kuroda Y, Kuriyama H, Kihara S, et al. Insulin-mediated regulation of decidual protein induced by progesterone (DEPP) in adipose tissue and liver [J]. Horm Metab Res, 2010, 42(3): 173-177.
- [7] Shin D, Anderson DJ. Isolation of arterial-specific genes by subtractive hybridization reveals molecular heterogeneity among arterial endothelial cells [J]. Dev Dyn, 2005, 233 (4): 1589-1604.
- [8] Ragel BT, Couldwell WT, Gillespie DL, et al. Identification of hypoxia-induced genes in a malignant glioma cell line (U-251) by cDNA microarray analysis [J]. Neurosurg Rev, 2007, 30 (3): 181-187.
- [9] Chen S, Gai J, Wang Y, et al. FoxO regulates expression of decidual protein induced by progesterone (DEPP) in human endothelial cells [J]. FEBS Lett, 2011, 585(12):1796-800.
- [10] Salcher S, Hagenbuchner J, Geiger K, et al. C10ORF10/DEPP, a transcriptional target of FOXO3, regulates ROS-sensitivity in human neuroblastoma [J]. Mol Cancer, 2014, 13: 224.
- [11] Deng J, Dong Y, Li C, et al. Decreased expression of C10orf10 and its prognostic significance in human breast cancer [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e99730.
- [12] 鞠涛,金志强. 过表达转移抑制基因 KAI1 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞上皮间质转化的影响 [J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2015, 9(4):252-256.
- [13] Han F, Dong Y, Liu W, et al. Epigenetic regulation of Sox30 is associated with testis development in mice [J]. PLoS One, 2014, 9(5): e97203.
- [14] Rieger KE, Chu G. Portrait of transcriptional responses to ultraviolet and ionizing radiation in human cells [J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(16):4786-4803.
- [15] Kornmann B, Preitner N, Rifat D, et al. Analysis of circadian liver gene expression by ADDER, a highly sensitive method for the display of differentially expressed mRNAs [J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29(11): E51-1.
- [16] Stepp MW, Folz RJ, Yu J, et al. The c10orf10 gene product is a new link between oxidative stress and autophagy [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1843(6):1076-1088.
- [17] Kim HT, Kong G, Denardo D, et al. Identification of biomarkers modulated by the rexinoid LGD1069 (bexarotene) in human breast cells using oligonucleotide arrays [J]. Cancer Res, 2006, 66 (24): 12 009-12 018.

(收稿日期:2015-06-15)

(本文编辑:刘军兰)

李林海,马冠雅. C10orf10 基因在乳腺癌中表达及其与临床病理特征的关系 [J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2016, 10(4):226-230.