

• 实验研究 •

BP1 和 C-erbB-2 在乳腺癌中的表达

李孟圉 李靖若 李江涛

【摘要】 目的 研究 BP1 与 C-erbB-2 基因在乳腺癌组织中的表达及其相互关系。**方法** 采用 RT-PCR 方法及免疫组织化学方法检测 62 例乳腺癌及配对癌旁组织中 BP1、C-erbB-2 基因的表达及雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)的表达。运用 χ^2 检验对各组间差别及相互关系进行分析。**结果** BP1 在乳腺癌和癌旁组织中的阳性表达率分别为 64.5%(40/62)和 0.05%(3/62),前者明显高于后者,差异具有统计学意义($P < 0.050$);BP1 阳性表达率在 ER 阳性乳腺癌组织中为 47.3%(18/38),在 ER 阴性乳腺癌组织中为 91.7%(22/24),两者之间差异有统计学意义($P < 0.050$);BP1 阳性表达率在 I 期乳腺癌中为 36.3%(4/11),在 II 期乳腺癌中为 64.3%(27/42),在 III 期乳腺癌中为 100%(9/9),三者间差异有统计学意义($P < 0.050$)。在乳腺癌组织中 C-erbB-2 阳性表达率为 46.8%(29/62),C-erbB-2 与 BP1 共阳性者 23 例,共阴性者 16 例。**结论** BP1 基因在乳腺癌组织中表达高于癌旁组织,BP1 表达与乳腺癌雌激素受体状态及组织学分级有关,与 C-erbB-2 共表达。

【关键词】 BP1;C-erbB-2 基因;乳腺肿瘤

【中图分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

Expressions of BP1 and C-erbB-2 gene in breast cancer LI Meng-quan, LI Jing-ruo, LING Jiang-tao. Breast Surgery Department, First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

【Abstract】 Objective To study the expressions of beta protein 1 (BP1) and C-erbB-2 in breast cancer and their relationships. **Methods** RT-PCR was used to detect the expressions of BP1 and C-erbB-2, and immunohistochemistry was used to detect the expressions of ER and PR in breast cancer and pericancer tissues of 62 breast cancer patients. The difference and relationship between groups were analyzed with Chi square test. **Results** The positive rate of BP1 expression was 64.5% (40/62 cases) in breast cancer and 0.05% (3/62 cases) in pericancer tissues, with statistically significant difference between breast cancer and pericancer tissues ($P < 0.050$). The positive rate of BP1 expression was 47.3% (18/38 cases) in ER positive breast cancer and 91.7% (22/24 cases) in ER negative breast cancer, there was a statistical difference between them ($P < 0.050$). The positive rate of BP1 expression was 36.3% (4/11 cases) in stage I breast cancer, 64.3% (27/42 cases) in stage II, and 100% (9/9 cases) in stage III, with statistical difference between the three groups ($P < 0.050$). The positive rate of C-erbB-2 expression was 46.8% (29/62 cases) in breast cancer tissue. Twenty-three cases had positive coexpression of BP1 and C-erbB-2 and 16 cases had negative coexpression of BP1 and C-erbB-2 in breast cancer tissue. **Conclusion** The BP1 expression is higher in breast cancer than in pericancer tissues, and correlated with histological grade and estrogen receptor status. There is coexpression of BP1 and C-erbB-2 in breast cancer.

【Key words】 BP1; C-erbB-2 gene; Breast neoplasms

基金项目:河南省医学高科技发展扶持项目(20060038)

作者单位:450052 郑州,郑州大学第一附属医院乳腺外科

通信作者:李靖若, E-mail: ljz@zzu.edu.cn

乳腺癌是严重威胁女性健康最常见的恶性肿瘤之一。BP1(beta protein 1) 基因是最近发现的转录因子,属于异型盒基因(homeobox gene, HB) DLX 家族^[1],研究发现 BP1 基因在乳腺癌特别是雌激素受体(ER)阴性的病例中表达率相当高,提示 BP1 与乳腺癌的关系密切^[2]。本实验检测 BP1 在乳腺癌中的表达并分析其与病理因素的关系。

1 资料和方法

1.1 病例资料

收集 2006 年 7 月至 2007 年 7 月郑州大学第一附属医院乳腺外科手术切除的乳腺癌原发灶及其配对癌旁组织标本(距肿瘤边缘 3 cm)62 例作为有效标本。患者均为女性,年龄 28~70 岁,中位年龄 49 岁,术前均未进行过任何治疗;所有标本离体 5 分钟内立即剪取 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 乳腺癌癌灶中心非坏死部分及配对癌旁组织两块(冰上操作),分别装入 5 ml EP 管,置于-179℃液氮中速冻,-80℃冰箱保存备用。另切取相应的组织块 0.3 cm×1.0 cm×1.0 cm 置入福尔马林液中固定备做常规蜡块及免疫组织化学检测。所有病例均经病理确诊,根据全国乳腺病理专题学术研讨会(2003)推荐的乳腺癌组织学分类:导管原位癌 6 例,小叶原位癌 3 例,浸润性导管癌 35 例,浸润性小叶癌 18 例。根据 2003 年 AJCC 乳腺癌临床分期:I 期 11 例,II_A 期 25 例,II_B 期 17 例,III 期 9 例。

1.2 BP1 基因与 C-erbB-2 基因 mRNA 表达的测定

1.2.1 乳腺癌及癌旁组织总 RNA 的提取:采用 Trizol(凯基生物科技发展有限公司)一步法,快速提取癌组织总 RNA,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳显示 18 S、28 S、5 S 三条电泳带,紫外分光光度计检测 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 值 > 1.8。

1.2.2 cDNA 的合成:采用 KeyGen RT-PCR Kit(南京凯基生物科技发展有限公司)反转录,实验操作参照试剂盒说明进行。

RT-PCR 分析:建立 RT-PCR 反应体系,按照 KeyGen RT-PCR 试剂盒说明进行操作, β 肌动蛋白(β -actin)为内对照,BP1 基因的 PCR 反应条件为:94℃ 变性 30 s,59℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1 min,35 个循环后 72℃ 延伸 7 min,4℃ 保存。C-erbB-2 基因的 PCR 反应条件为:94℃ 变性 1 min,57℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min,35 个循环后 72℃ 延伸 5 min,4℃ 保存。BP1 基因引物、C-erbB-2 基因引物和 β -actin 基因引物见表 1。电泳检测:取待测因子及 β -actin 的 RT-PCR 扩增产物 5 μ l,分别进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳、全自动凝胶图像分析系统进行扫描分析。

表 1 BP1、C-erbB-2 和 β -actin 基因的引物

基因	序列	长度(bp)
BP1	sense, 5'-GTATGGCCACCTCCTGTCTT-3';	225
	antisense, 5'-GAGTAGATGGTCCTCGGCTT-3'	
C-erbB-2	sense, 5'-GAAGGTGAAGGTGCTTGGATC-3';	342
	antisense, 5'-TAGCTCATCCCCTTGCAATCTG-3'	
β -actin	sense, 5'-ACCCCACTGAAAAAGATGA-3';	114
	antisense, 5'-ATCTTCAAACCTCCATGATG-3'	

1.3 免疫组织化学

1.3.1 免疫组织化学染色步骤:包埋组织块 4 μ m 连续切片, 60 $^{\circ}$ C 烤箱烘烤 30 min。浸入二甲苯脱蜡。梯度酒精脱水, PBS 液浸泡, 抗原修复, 冷却至室温。PBS 液浸泡。3% H_2O_2 室温孵育。PBS 液浸泡, 血清封闭液, 加一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 冲洗。滴加生物素标记的二抗, 室温孵育, PBS 液冲洗。滴加链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶溶液, 室温孵育 30 min。PBS 液冲洗切片。显微镜下显色, 复染, 1% 盐酸酒精分化, 自来水冲洗。梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。

1.3.2 免疫组织化学染色结果判断:ER、PR 蛋白阳性表达在细胞核, 呈棕黄色颗粒状, 以高倍镜(400 \times)观察 5 个视野, 每个视野观察 100 个细胞。染色强度分级^[3]为: 阴性(-): 细胞不显色或背景深, 染色不清晰; 弱阳性(+): 25%~50% 细胞显色; 中度阳性(++): 50%~75% 细胞显色, 着色较深; 强阳性(+++): >75% 细胞显色, 着色深。

1.3.3 免疫组织化学质量控制:所有标本均按中国抗癌协会乳腺癌专业委员会的规范取材, 所有结果均在同样实验条件下监测; 所有标本的检测结果均经复查, 至少重复两次。设阳性对照和阴性对照, 用预实验中已知阳性标本做阳性对照, PBS 代替一抗做阴性对照。

1.4 统计学处理

采用 SPSS12.0 软件进行统计处理, 运用 χ^2 检验对各组间差别及相关进行统计学分析, $\alpha=0.050$ 。

2 结果

2.1 BP1 基因 mRNA 的表达情况

62 例乳腺癌组织中, 40 例呈阳性表达(64.5%), 22 例呈阴性表达(35.5%); 在 62 例配对的癌旁组织中, 阳性表达仅 3 例。两组间 BP1 表达差异有统计学意义(表 2)。

2.2 BP1 的表达与 ER 及病理组织学分级的关系

38 例 ER(+) 乳腺癌组织中, 18 例(47.3%)呈 BP1 阳性表达; 24 例 ER(-)

表 2 BP1 基因在乳腺癌及配对癌旁组织中的表达

组别	例数	BP1 基因		χ^2 值	P 值
		阳性(例)	阳性率(%)		
乳腺癌	62	40	64.5	48.738	0.000
配对癌旁	62	3	4.8		

乳腺癌组织中,22 例 BP1 呈阳性表达(91.7%),两者差异具有统计学意义($P < 0.050$);11 例 I 期乳腺癌标本中,4 例呈阳性表达(36.4%);42 例 II 期乳腺癌标本中,27 例呈阳性表达(64.3%),9 例 III 期乳腺癌标本中,全部阳性表达,三者之间差异有统计学意义($P < 0.050$);9 例原位癌中 2 例 BP1 呈阳性表达(22.2%),53 例浸润性癌中 38 例呈 BP1 阳性表达(71.7%),两组之间差异有统计学意义($P < 0.050$,表 3)。

表 3 62 例乳腺癌中 BP1 的表达与 ER 及病理组织学分级的关系

因素	例数	BP1		χ^2 值	P 值
		阳性(例)	阳性率(%)		
ER					
+	38	18	47.4	12.609	0.000
-	24	22	91.7		
临床分期					
I	11	4	36.4	8.759	0.013
II	42	27	64.3		
III	9	9	100.0		
病理学分级					
原位癌	9	2	22.2	6.207	0.013
浸润性癌	35	38	71.7		

BP1:beta 蛋白 1

2.3 在乳腺癌组织中 C-erbB-2 基因与 BP1 基因的表达

62 例乳腺癌组织中,29 例呈 C-erbB-2 阳性表达(46.8%),33 例阴性表达(53.2%);C-erbB-2 与 BP1 共阳性表达者 23 例,共阴性表达者 16 例,两者阳性表达率间的差异有统计学意义($P = 0.035$,表 4)。

表 4 BP1 与 C-erbB-2 在乳腺癌组织中的表达情况

BP1	C-erbB-2		P 值
	阳性(例)	阴性(例)	
阳性	23	17	0.035
阴性	6	16	

3 讨论

BP1 定位于染色体 17q 21~22,已克隆的 cDNA 全长为 1251bp,开放阅读框(ORF)长约 720bp,编码 240 个氨基酸,为人类 β 珠蛋白基因的抑制蛋白,对 BP1 基因序列的比较发现 BP1 属于在早期发育过程中起重要作用的 DLX

家族,与 DLX-4 和 DLX-7 互为异构重整体^[3]。在白血病的研究中,国内外学者发现 BP1 基因与急性髓系白血病相关^[5-6]。近年来研究表明 BP1 高表达和许多恶性肿瘤的发生发展相关^[2]。

C-erbB-2 基因又称 Neu 或 HER-2,定位于 17q21,编码相对分子质量为 185 000 的跨膜蛋白,该蛋白与表皮生长因子受体(EGFR)具有高度的同源性,故又称为人类表皮生长因子相关基因^[7]。C-erbB-2 过度表达通过启动多种转移相关机制而增加转移能力,包括细胞迁移率、体外侵袭力、实验性肺转移等^[8-13]。C-erbB-2 过度表达也影响某些黏附分子如上皮型钙黏附分子(E-cadherin)等的合成从而促进转移^[14]。目前C-erbB-2已被公认为是与乳腺癌发生发展密切相关的原癌基因,参与调控细胞的生长、增殖及分化,其产物过度表达常提示恶性程度高、预后差。

为探讨 BP1 基因与 C-erbB-2 基因在乳腺癌发生发展中的作用机制,本研究对 62 例乳腺癌组织中的 BP1 基因与 C-erbB-2 基因进行检测,并采用免疫组织化学的方法对 ER、PR 的表达进行检测。结果表明:BP1 基因在乳腺癌组织中的表达阳性率为 64.5%,明显高于与配对的癌旁组织 4.84%,与 Fu 等^[4]的结果一致。研究同时发现 BP1 mRNA 与组织学分级、病理类型及雌激素受体 ER 的表达相关,尤其是在预后较差的 ER(-)的乳腺癌中 BP1 基因的表达尤其高,与 Fu 等^[4]及于满等^[15]的研究一致;提示该基因可能在从正常乳腺组织癌变的早期至晚期的整个过程中均发挥作用,且与乳腺癌的恶性表型有关。对该基因的联合检测有助于临床判断预后。对本研究数据的统计学处理发现 BP1 与 C-erbB-2 有共表达,提示其在乳腺癌的侵袭转移过程中可能发挥作用,但具体作用机制尚不十分清楚,分析原因认为:(1)在染色体中 BP1 基因定位接近 erbB2 基因^[1],预测它们可能共同扩增,在乳腺癌的发生和发展中共同发挥作用。(2)BP1 基因和 C-erbB-2 基因均可与 Cyclin D1 相互发挥作用。Cyclin D1 基因是细胞周期素家族中最重要的成员,是目前公认的癌基因,被证实参与多种实体瘤的分子病理机制,其中最具有临床意义的是乳腺癌,50%乳腺癌过表达 cyclin D1^[16]。文献报道乳腺癌 C-erbB2 基因的过表达与 Cyclin D1 基因的高表达之间有密切联系^[17]。而乳腺癌组织中 BP1 和 Cyclin D1 存在明显的共表达性^[18]。二者结合提示 BP1 基因可能通过 Cyclin D1 基因与 C-erbB-2 基因在乳腺癌的发生发展中发挥作用。(3)BP1 基因和 C-erbB-2 基因通过雌激素受体发挥相互作用。本实验显示 BP1 基因的表达与雌激素受体具有相关性,与文献报道一致^[4]。虽然本实验结果显示 C-erbB-2 基因的表达与雌激素受体无关,但有实验^[18-19]证实 C-erbB-2 基因与雌激素受体之间存在关联性,分析原因可能与标本数量以及标本的选择有关。因此

BP1 与 C-erbB-2 基因在乳腺癌发生发展中的相关性研究尚需进一步深入。

参考文献

- [1] Haga S B, Fu S, Karp J E, *et al.* BP1, a new homeobox gene, is frequently expressed in acute leukemia. *Leukemia*, 2000, 14: 1867—1875.
- [2] 线胤生, 党诚学, 阎春霞, 等. 同源异盒基因 BP1 在肺癌组织中的表达及临床意义. *南方医科大学学报*, 2006, 26: 1173—1175.
- [3] Hagan S, AlMulla F, Mallon E, *et al.* Reduction of Raf-1 Kinase Inhibitor Protein Expression Correlates with Breast Cancer Metastasis. *Clin Cancer Res*, 2005, 11: 7392—7397.
- [4] Fu S, Schwartz A, Stevenson H, *et al.* Correlation of expression of BP1, a homeobox gene, with estrogen receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2003, 5: 82—87.
- [5] Chase M B, Fu S, Haga S B, *et al.* BP1, a homeodomain-containing isform of DLX4, represses the beta-globin gene. *Mol Cell Biol*, 2002, 22: 2505—2514.
- [6] 李慧, 徐开林, 潘秀英, 等. BP1 基因在成人急性白血病中的表达. *中华血液学*, 2004, 25: 38—40.
- [7] Michael P D. Clinical significance of HER-2/neu overexpression: Part I. *Princ Pract Oncol*, 1999, 13: 1—5.
- [8] Dabiri S, Huntsman D, Makretsov N, *et al.* The presence of stromal mast cells identifies a subset of invasive breast cancers with a favorable prognosis. *Mod Pathol*, 2004, 17: 690—695.
- [9] Ueda Y, Wang S, Dumoni N, *et al.* Overexpression of HER2(ErbB2) in human breast epithelial cells unmasks TGF-induced cell motility. *Biol Chem*, 2004, 24: 24 505—24 513.
- [10] Galiegue S, Casellas P, Kramar A, *et al.* Immuno-histochemical assessment of the peripheral benzodiazepine receptor in breast cancer and its relationship with survival. *Clin Cancer Res*, 2004, 10: 2058—2064.
- [11] Tiseo M, Loprevite M, Ardizzoni A. Epidermal growth factor receptor inhibitors: a new prospective in the treatment of lung cancer. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents*, 2004, 4: 139—148.
- [12] Makino K, Day C P, Wang S C, *et al.* Upregulation of IKKalpha/IKKbeta by integrin-linked kinase is required for HER2/neu-induced NF-kappa-B antiapoptotic pathway. *Oneogene*, 2004, 23: 3883—3887.
- [13] Kunitomo K, Inoue S, Ichihara F, *et al.* A case of metastatic breast cancer with outgrowth of HER2-negative cells after eradication of HER2-positive cells by human anti-HER2 monoclonal antibody(trastuzumab) combined with docetaxel. *Hum Pathol*, 2004, 35: 379—381.
- [14] Kleer C G, van Golen K L, Braun T, *et al.* Persistent E-cadherin expression in inflammatory breast cancer. *Med Pathol*, 2001, 14: 458—464.
- [15] 于满, 杨毅, 牛瑞芳, 等. 同源异型盒基因 BP1 在乳腺癌组织中的表达及临床意义. *癌症*, 2004, 3: 855—859.
- [16] McIntosh G G, Anderson J J, Milton I, *et al.* Determination of the prognostic value of cyclin D1 overexpression in breast cancer. *Oncogene*, 1995, 11: 885—891.
- [17] Lee A, Park W C, Yim H W, *et al.* Expression of C-erbB-2, cyclin D1 and estrogen receptor and clinical implications in the invasive ductal carcinoma of the breast. *Jpn J Clin Oncol*, 2007, 37: 708—714.
- [18] 宋永春, 傅四东, 温小鹏, 等. BP1 基因和 Cyclin D1 基因在乳腺癌组织中的表达及意义. *癌症*,

2007,26:709—714.

- [19] Ko S S, Na Y S, Yoon C S, *et al.* The significance of C-erbB-2 overexpression and p53 expression in patients with axillary lymph node negative breast cancer: a tissue micro-array study. Int J Surg Pathol, 2007, 15:98—109.

(收稿日期:2009-03-11)

(本文编辑:赵彬)

李孟圈,李靖若,李江涛. BP1 和 C-erbB-2 在乳腺癌中的表达[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2009,3(5):542—548.