

• 实验研究 •

Pokemon mRNA 与 c-myc 蛋白在乳腺癌组织中的表达及其相关性

崔明 付朝江 杨彦 冯雁康 刘嘉

【摘要】 目的 探讨人乳腺癌中原癌基因 c-myc 和 Pokemon mRNA 在乳腺癌组织中的表达及其与乳腺癌发生、转移的关系。**方法** 收集本院 2008 年 1 月至 10 月 45 例浸润性导管癌组织标本、20 例癌旁乳腺组织标本和 20 例正常乳腺组织标本,均为女性,年龄 23~69 岁。所有标本均经临床病理确诊。采用原位杂交法检测 Pokemon mRNA 表达,采用免疫组织化学法检测 c-myc 表达。采用卡方检验和等级相关法进行统计分析。**结果** (1) Pokemon mRNA 的阳性表达率在乳腺癌组织、癌旁乳腺组织和正常乳腺组织中分别是 71.11% (32/45), 30.00% (6/20) 和 20.00% (4/20), 3 者间差异有统计学意义 ($P=0.000$)。c-myc 阳性表达率在乳腺癌组织、癌旁乳腺组织和正常乳腺组织中分别是 86.67% (39/45), 60.00% (12/20) 和 50.00% (10/20), 3 者间差异有统计学意义 ($P=0.004$)。(2) 乳腺癌细胞质 Pokemon mRNA 表达和乳腺癌细胞质 c-myc 表达都与乳腺癌腋窝淋巴结转移有关 ($P=0.012, P=0.027$)。(3) 乳腺癌细胞质 Pokemon mRNA 表达与 c-myc 表达有关联性 ($r=0.585, P<0.000$)。**结论** Pokemon mRNA 和 c-myc 蛋白可能参与乳腺导管癌的发生和转移。Pokemon mRNA 表达和 c-myc 表达两者间有相关性。

【关键词】 乳腺癌; Pokemon mRNA; c-myc 蛋白; 原位杂交; 免疫组织化学

【中图分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

Expressions of Pokemon mRNA and c-myc in breast carcinoma and their correlation

CUI Ming, FU Chao-jiang, YANG Yan, FENG Yan-kang, LIU Jia. Department of General Surgery, Kunming General Hospital of Chengdu Military Region, Kunming 650032, China

【Abstract】 Objective To explore the expressions of Pokemon mRNA and proto-oncogene c-myc in breast cancer and their relation with carcinogenesis and metastasis. **Methods** From January to October 2008, 45 samples of invasive ductal carcinoma, 20 samples of pericancer tissue and 20 samples of normal breast tissue were collected for the study. All study subjects were female, aged 23 to 69 years. All samples were confirmed pathologically. The expression of Pokemon mRNA was examined using *in situ* hybridization and the expression of c-myc was tested using immunohistochemistry. Chi-square test and Spearman's rank correlation coefficient were used for statistical analysis. **Results** (1) The rate of positive expression of plasma Pokemon mRNA in breast cancer tissue, pericancer tissue and normal breast tissue was 71.11% (32/45), 30.00% (6/20) and 20.00% (4/20) respectively, with statistical difference between the three groups ($P=0.000$). The rate of positive

expression of c-myc in breast cancer tissue, pericancer tissue and normal breast tissue was 86.67% (39/45), 60.00% (12/20) and 50.00% (10/20) respectively, with statistical difference between the three groups ($P = 0.004$). (2) The positive expressions of Pokemon mRNA and c-myc in breast cancer were correlated with breast cancer axillary lymph node metastasis ($P = 0.012, P = 0.027$). (3) There was a positive correlation between Pokemon mRNA and c-myc ($r = 0.585, P < 0.000$).

Conclusions Pokemon mRNA and c-myc participate in the pathogenesis and metastasis of breast cancer, and there is a correlation between Pokemon mRNA and c-myc.

【Key words】 Breast neoplasms; Pokemon mRNA; c-myc protein; in-situ hybridization; Immunohistochemistry

近年来,肿瘤分子生物学和分子遗传学的研究表明,原癌基因的激活、抑癌基因的失活和细胞凋亡调控基因的失调是许多肿瘤的发生机制。myc 基因家族属于核蛋白类调控基因,研究证明 c-myc 原癌基因激活的主要方式是该基因的扩增和过表达^[1],证明其在细胞周期变化、细胞的生长代谢、基因的不稳定性、刺激血管生成、细胞恶性转化、分化及凋亡中起重要的调节作用^[2]。研究发现红系髓性致癌因子(Pokemon)与肿瘤发生密切相关^[3],Pokemon 能增加细胞质内 c-myc 并维持其稳定性,有可能与肿瘤转移密切相关。为进一步证实两者在乳腺癌发生、转移中的作用,笔者采用原位杂交和免疫组织化学方法观察乳腺癌组织中 Pokemon mRNA 和 c-myc 的表达情况,探讨它们之间的关系。

1 资料和方法

1.1 临床资料

全部病例来自本院普外科 2008 年 1 月~10 月间收治的 45 例乳腺癌改良根治术后患者。45 例标本均经临床病理确诊,患者均为女性,年龄 27~69 岁,平均年龄 47 岁,术前均未行化疗、放疗、内分泌治疗。采用随机数字表法从 45 例乳腺癌标本中选取 20 例,取距乳腺癌肿块边缘大于 5 cm 处的乳腺组织为癌旁乳腺组织。选取同期乳腺纤维腺瘤旁经病理确诊为正常乳腺组织标本 20 例为正常乳腺组织标本,患者均为女性,年龄 23~51 岁,平均年龄 36 岁。按 WHO 肿瘤国际组织学分类标准复查全部病理切片。45 例乳腺癌临床病理资料:年龄 ≤ 50 岁 26 例, > 50 岁 19 例;全部为浸润性导管癌,肿块直径 > 2 cm 者 29 例, ≤ 2 cm 者 16 例,肿块平均直径 3.5 cm;乳腺癌组织学分级采用 Bloom-Richardson 分级法,即综合组织分化程度、核分裂和核多形性 3 个指标,将其分为 I 级(高分化)、II 级(中分化)、III 级(低分化),I 级 15 例,II 级 21 例,III 级 9 例;TNM 分期按国际抗癌联盟 UICC 1998 年修订 TNM 分期

法, I 期 10 例, II 期 28 例, III 期和 IV 期共 7 例;伴有腋窝淋巴结转移者 20 例、无腋窝淋巴结转移者 25 例。

1.2 主要试剂

(1) Pokenon mRNA 原位杂交检测试剂盒(ZBTB7 原位杂交检测试剂盒,产品编号:MK2810-h),DAB 显色试剂盒,由武汉博士德生物工程有限公司合成,经测序无误;(2) c-myc 鼠抗人单克隆抗体 c-myc Ab-2 (clone 9E 10.3)(产品编号:ms-139-P0,产地:labvision,工作浓度 1:500,购自晶美生物工程有限公司);(3) 即用型 S-P 试剂盒(LHK611-060)、DAB 试剂盒(购自晶美生物工程有限公司)。

1.3 实验方法

原位杂交方法检测 Pokenon mRNA 表达(所有溶液均用 DEPC 水配制,实验器材经高温处理灭活 RNA,实验操作过程严防 RNA 污染),c-myc 的检测采用免疫组织化学链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶(Streptavidin-Peroxidase,S-P)法,操作按说明书步骤进行。针对人 ZBTB7A 靶基因的 mRNA 序列为:(1)5'-GACCAGCAGAAC GTGTACGAGATCGACTTCGTCAG-3';(2)5'-CGACACATCCGCACCCACACGGGCGAGAA GCCCTA-3';(3)5'-GACGCCCGGCGCAACGG CCAGGAGAAGCACTTTAA-3';Pokenon mRNA 原位杂交阳性片为阳性对照;以正常乳腺组织原位杂交时不加探针作为阴性对照;c-myc 以晶美生物工程有限公司提供的阳性片为阳性对照;以 PBS 替代第一抗体的乳腺癌组织免疫组织化学染色结果为阴性对照。

1.4 结果判断

Pokenon mRNA 阳性表达的判断标准^[3]为:阳性信号表现为核周及细胞质内出现棕黄色颗粒;半定量分级标准为^[4]:(-)未见细胞染色,(+)阳性细胞<25%,(++)阳性细胞达 25%~50%,(+++)阳性细胞>50%。c-myc 表达的判断标准^[5]:c-myc 蛋白阳性信号表现为核周及细胞质内出现棕色颗粒;半定量分级标准为^[4]:(-)未见细胞染色,(+):阳性细胞<25%,(++)阳性细胞达 25%~50%,(+++)阳性细胞>50%。

1.5 统计学方法

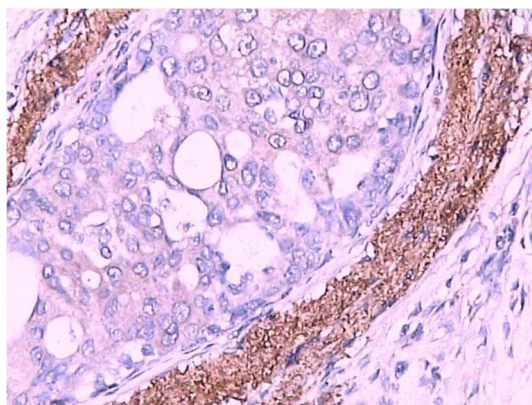
所得数据采用 SPSS11.0 软件进行统计学处理,计数资料以率表示,进行 χ^2 检验,Pokenon mRNA 和 c-myc 关系采用等级相关性分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 3 组中 Pokenon mRNA 和 c-myc 的表达

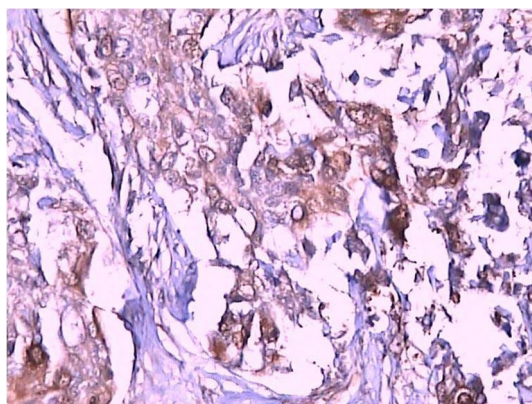
乳腺癌组织中 Pokenon mRNA 和 c-myc 在细胞质中都有不同程度的表达

(图 1、2)。Pokemon mRNA 阳性表达率在乳腺癌组织、癌旁乳腺组织及正常乳腺组织分别为 71.1% (32/45)、30.0% (6/20) 和 20.0% (4/20), 3 组间差异有统计学意义($P=0.000$); 乳腺癌组织 Pokemon mRNA 的阳性表达分别与癌旁乳腺组织和正常乳腺组织相比, 差异有统计学意义($P<0.050$), 癌旁乳腺组织与正常乳腺组织比差异无统计学意义($P=0.465$)。乳腺癌组织、癌旁乳腺组织及正常乳腺组织细胞质 c-myc 阳性表达率分别为 86.7% (39/45)、60.0% (12/20)、50.0% (10/20), 3 组间差异有统计学意义($P=0.004$); 乳腺癌组织分别与癌旁乳腺组织和正常乳腺组织比, 差异有统计学意义($P<0.050$), 癌旁乳腺组织与正常乳腺组织比, 差异无统计学意义($P=0.525$, 表 1)。



Pokemon mRNA 阳性表达定位于癌细胞胞质

图 1 乳腺浸润导管癌 Pokemon mRNA 的阳性表达 (原位杂交 SP 染色 $\times 200$)



c-myc 阳性表达定位于癌细胞胞质

图 2 乳腺浸润导管癌 c-myc 阳性表达 (免疫组化 SP 染色 $\times 200$)

2.2 Pokemon mRNA 和 c-myc 表达与乳腺癌临床病理特征的关系

乳腺癌细胞质 Pokemon mRNA 表达与乳腺癌腋窝淋巴结转移有关($P=0.012$), 与年龄、肿块大小、组织学分级、TNM 分期无关($P>0.050$)。乳腺癌细胞质 c-myc 表达与乳腺癌淋巴结转移有关($P=0.027$), 与年龄、肿块大小、组织学分级、TNM 分期无关($P>0.050$, 表 2)。

表 1 Pokemon mRNA 和 c-myc 蛋白在乳腺癌、癌旁组织及正常乳腺组织中的表达

组别	例数	Pokemon mRNA[例(%)]		χ^2 值	P 值	c-myc 蛋白[例(%)]		χ^2 值	P 值
		+	-			+	-		
乳腺癌 ^a	45	32(71.11)	13(28.89)	18.413	0.000	39(86.67)	6(13.33)	10.973	0.004
癌旁乳腺组织 ^b	20	6(30.00)	14(70.00)			12(60.00)	8(40.00)		
正常乳腺组织	20	4(20.00)	16(80.00)			10(50.00)	10(50.00)		

a: 分别与癌旁乳腺组织和正常乳腺组织比较(Pokemon mRNA: $P=0.002$; c-myc 蛋白: $P=0.037$); b: 与正常乳腺组织比较(Pokemon mRNA: $P=0.465$; c-myc 蛋白: $P=0.525$)

表 2 Pokemon mRNA 和 c-myc 蛋白的表达与乳腺癌临床病理特征的关系

临床病理指标	例数	Pokemon mRNA(例)		χ^2 值	P 值	c-myc (例)		χ^2 值	P 值
		+	-			+	-		
年龄									
≤50 岁	26	16	10	2.747	0.097	22	4	—	1.000 ^b
>50 岁	19	16	3			17	2		
肿瘤大小									
≤2 cm	16	10	6	0.364	0.546 ^a	12	4	1.568	0.211 ^a
>2 cm	29	22	7			27	2		
组织学分级									
I	15	8	7	-2.285	0.131 ^a	11	4	1.947	0.163 ^a
II~III	30	24	6			28	2		
TNM 分期									
I~II	38	27	11	—	1.000 ^b	33	5	—	1.000 ^b
III~IV	7	5	2			6	1		
腋窝淋巴结转移									
有	20	18	2	6.245	0.012	20	0	—	0.027 ^b
无	25	14	11			19	6		

a: 连续性校正; b: Fisher 确切概率法

2.3 乳腺癌细胞质中 Pokemon mRNA 和 c-myc 表达的关系

Pokemon mRNA 与 c-myc 同时阴性表达有 5 例, 共阴性率为 11.1% (5/45), 同时强阳性(+++)表达有 6 例, 共强阳性率为 13.3% (6/45)。随着 Pokemon mRNA 表达强度增加, c-Myc 的阳性率也逐渐提高, Pokemon mRNA 与 c-myc 在乳腺癌组织中表达有相关性($r=0.585$, $P=0.000$, 表 3)。

表 3 Pokenon mRNA 和 c-myc 蛋白在乳腺癌中表达的关系

Pokemon	c-myc				合计
	-	+	++	+++	
-	5	4	3	1	13
+	1	5	2	2	10
++	0	3	5	3	11
+++	0	2	3	6	11
合计	6	14	13	12	45

$r=0.585$, $P=0.000$

3 讨论

Pokemon 是 ZBTB7A 基因所编码的蛋白质。它是 POK 家族成员之一, 并作为转录因子参与一些细胞基因转录的调节^[4,6-7]。近来发现, Pokemon 在致癌

转化过程中发挥着至关重要的功能,并与肿瘤的发生密切相关。研究发现 pokemon 在某些类型的人类乳腺癌、肺癌、结肠癌、前列腺癌和膀胱癌中过表达,表明 pokemon 与这些肿瘤的发生相关^[3]。本实验结果与此相近,显示乳腺癌细胞质 Pokemon mRNA 高表达率为 71.11%,显著高于癌旁乳腺组织 30.0%及乳腺正常组织 20.0%, ($P < 0.050$),提示 Pokemon 可能在乳腺癌的发生过程中发挥着重要作用;研究还显示有腋窝淋巴结转移的乳腺癌细胞质 Pokemon mRNA 表达率为 90.0%,无腋窝淋巴结转移的乳腺癌为 56.0%,两者差异有统计学意义 ($P = 0.012$),说明 Pokemon 也可能在乳腺癌侵袭转移过程中起着一定作用。

原癌基因 c-myc 为序列特异性转录因子,该基因定位于染色体 8q34,编码磷酸化蛋白, c-myc 编码蛋白具有 DNA 结合活性,其亮氨酸拉链区介导各种转录因子的二聚作用,产生活化转录及细胞增殖的作用^[4]。c-myc 原癌基因主要激活方式是基因扩增、重排或过度表达。c-myc 与细胞生长调控、肿瘤发生及细胞凋亡密切相关^[8,9]。c-myc 基因过度表达可能参与了肿瘤的恶变、进展等过程^[10]。在乳腺癌中 c-myc 癌基因的扩增率约 30%,对复发及生存期有一定预测作用^[11]。另外 Shanmugham 等^[12]在乳腺癌研究中发现 c-myc 与肿块微血管密度有相关性,考虑其有促进微血管形成作用。本研究结果显示乳腺癌细胞质 c-myc 蛋白过度表达,其表达高于癌旁乳腺组织及正常乳腺组织 ($P < 0.050$),有腋窝淋巴结转移的浸润性导管癌细胞质 c-myc 蛋白表达明显高于无腋窝淋巴结转移 ($P = 0.027$),提示 c-myc 蛋白与乳腺癌的转移有关。

本研究对 45 例乳腺导管癌的 Pokemon mRNA 表达进行了检测,同时对 c-myc 蛋白进行检测,发现 Pokemon mRNA 与 c-myc 蛋白表达的共阴性率为 11.11% (5/45),共强阳性率为 13.33% (6/45),随着 Pokemon mRNA 表达强度增加, c-myc 的阳性率也逐渐提高,两者表达有相关性(等级相关: $r = 0.585$, $P < 0.001$)。

综上所述, Pokemon mRNA 高表达可能与乳腺导管癌发生有关。

参考文献

- [1] Hatakeyama S, Watanabe M, Fujii Y, et al. Targeted destruction of c-myc by an engineered ubiquitin ligase suppresses cell transformation and tumor formation. *Cancer Res*, 2005, 65:7874-7879.
- [2] Hemann MT, Bric A, Teruya-Feldstein J, et al. Evasion of the p53 tumour surveillance network by tumour-derived MYC mutants. *Nature*, 2005, 436:787-789.
- [3] Maeda T, Hobbs RM, Merghoub T, et al. Role of the proto-oncogene Pokemon mRNA in cellular transformation and ARF repression. *Nature*, 2005, 433: 278-285.
- [4] Morrison DJ, Pendergrast PS, Stavropoulos P, et al. FBI, a factor that binds to the HIV-1 inducer of short transcripts (IST), is a POZ domain protein. *Nucleic Acid Res*, 1999, 5: 1251-1253.
- [5] Xiao Q, Claassen G, Shi J, et al. Transactivation-defective c-Myc retains the ability to regulate proliferation and apoptosis. *Genes Dev*, 1998, 12:3803-3808.

- [6] Pessler F, Pendergrast PS, Hernandez N. Purification and characterization of FBI-1: a cellular factor that binds to the human immunodeficiency virus type 1 inducer of short transcripts. *Mol Cell Bio*, 1997, 17: 3786-3789.
- [7] Lee DK, Suh D, Edenberg HJ, et al. POZ domain transcription factor, FBI-1, represses transcription of ADH5/FDH by interacting with the zinc finger and interfering with DNA binding activity of Sp1. *J Biol Chem*, 2002, 277: 26761-26766.
- [8] Cole MD, McMahon SB. The Myc oncoprotein: a critical evaluation of transactivation and target gene regulation, *Oncogene*, 1999, 18:2916-2919
- [9] Hemann MT, Bric A, Teruya-Feldstein J, et al. Evasion of the p53 tumour surveillance network by tumour derived MYC mutants. *Nature*, 2005, 436:787-789.
- [10] Corzo C, Corominas JM, Tusquets I, et al. The MYC oncogene in breast cancer progression: from benign epithelium to invasive carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 2006, 165:151-156.
- [11] White RA, Adkison LR, Dowler LL, et al. Chromosomal localization of the human gene encoding c-myc promoter binding protein (MPB1) to chromosome 1p35-pter. *Genomics*, 1997, 39:406-408.
- [12] Shanmugham R, Gopalan R, Shanthi P, et al. Tumor angiogenesis and C-myc expression in breast carcinomas. *Indian J Pathol Microbiol*, 2004, 47:340-342.

(收稿日期:2009-08-12)

(本文编辑:赵彬)

崔明,付朝江,杨彦,等. Pokemon mRNA 与 c-myc 蛋白在乳腺癌组织中的表达及其相关性[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版,2010,4(6):734-740.