

Cyclin D1 在乳腺肿瘤组织中的表达及其与基因扩增的相关性

丁峰¹, 魏光¹, 田兴松²

(1 济南医院, 山东济南 250013; 2 山东大学附属省立医院)

[摘要] 目的 研究细胞周期蛋白(Cyclin D1)表达在乳腺肿瘤发生中的作用及影响因素。方法 采用免疫组化染色法检测 122 例乳腺恶性肿瘤和良性乳腺增生标本 Cyclin D1 表达; Southern 杂交方法检测 Cyclin D1 基因变异。结果 40 例良性乳腺增生组织均未观察到 Cyclin D1 表达, 40 例浸润性导管癌组织、早期乳腺癌和淋巴结转移病变组织阳性率分别为 55.0% (22/40)、52.0% (22/42) 和 53.3% (8/15); 25 例浸润性导管癌组织 Cyclin D1 基因扩增率为 16.0%, 明显低于其蛋白表达率。结论 Cyclin D1 表达在乳腺癌发病早期即发挥作用, 其在肿瘤发生、发展过程中的作用尚受基因扩增以外因素的影响。

[关键词] Cyclin D1 蛋白; 免疫组化; 基因扩增; 乳腺癌; 良性乳腺增生

[中图分类号] R736 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1002-266X(2008)35-0010-02

Expression of Cyclin D1 in breast tumors and its relationship with gene amplification

DING Feng¹, WEI Guang, TIAN Xing-song

(1 Jinan Hospital, Jinan 250013, P. R. China)

Abstract: Objective To explore the expression of Cyclin D1 protein in breast tumors and its relationship with gene amplification. **Methods** 122 cases of breast tissues were collected and expression of Cyclin D1 were examined by using immunohistochemistry (by the labeled streptavidin biotin method). While the genetic alteration of Cyclin D1 were detected by Southern blots. **Results** There were no positive expression of Cyclin D1 in all 40 cases of mastosis. The positive rate of early stage breast carcinoma and lymph node metastatic lesion were 52% (22/42) and 53.3% (8/15) respectively. The ratio of Cyclin D1 gene amplification (16%) was significantly lower than that of Cyclin D1 protein expression (55%). **Conclusions** The overexpression of Cyclin D1 protein in breast carcinoma may be an early event in breast carcinoma pathogenesis, and it tends to retain stable expression throughout breast carcinoma progression. The expression of Cyclin D1 protein is also controlled by other factors besides gene amplification.

Key words: Cyclin D1 protein; immunohistochemistry; gene amplification; breast carcinoma; mastosis

增生是恶性肿瘤的基本特征,与细胞增生有关的转录因子和细胞周期调控因子在肿瘤形成过程中所起的作用已引起临床关注,其中 G₁~S 期(DNA 合成期)的进展对启动细胞周期是必不可少的。细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)是近年来发现的原癌基因,其在细胞周期进展中起正调节作用^[1]。2008 年 6 月,我们对 Cyclin D1 在乳腺肿瘤组织中的表达及其与基因扩增的关系进行了观察。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集 122 份济南医院和山东省立医院手术切除的乳腺组织,其中浸润性导管癌 40 例(15 例有淋巴结转移)、早期癌 42 例(包括 16 例导管内癌和 26 例早期浸润的导管内癌,早期浸润癌中的浸润成分 < 10%)和良性乳腺增生 40 例;患者均为女性,年龄 40~65 岁。所有标本均用 10% 福尔

马林浸泡并封入石蜡,用来进行组织学分析和免疫组织化学技术检测。新鲜组织取自 40 例浸润性导管癌患者中的 25 例,并在液氮中储存用作 DNA 分析。

1.2 Cyclin D1 表达测定 采用免疫组织化学技术。以载体 Vectastain Elite kit(Burlingame 公司,美国加州)标记链生物素(LSAB)。常规石蜡连续 4 μm 切片,微波抗原修复(放置在盛有 10 mmol/L 柠檬酸缓冲液的标本瓶内,并在 675 W 功率下于微波炉内加热 10 min)后,采用 SP 法,按试剂盒说明书操作,DAB 显色,苏木精复染。Cyclin D1 为兔单抗,阳性对照片购自福州迈新公司,以 0.01 mol/L PBS 液作空白对照。结果判断参照 Barnes 半定量法,每计数 500 个肿瘤细胞,染色细胞数目 > 10% 为表达阳性。

1.3 Cyclin D1 基因变异检测 采用 Southern 杂交

方法。从 25 例新鲜癌组织中提取 DNA。用异硫氰酸胍法制备核酸,具体方法见文献^[2]。样品 DNA (5 μg) 用限制性内切酶分解,并在 1% 的琼脂糖凝胶上通过电泳方法进行分馏提取。凝胶变性后, DNA 转移到硝化纤维素过滤器中。过滤器用文献^[3]所述方法进行预杂交和杂交。将过滤器干燥,并暴露于 -70 °C 中,观察每个时间段结果并记录在 XAR5 型柯达底片上。用于检测 Cyclin D1 的探针检测 Cyclin D1 mRNA 第 1 ~ 17 号碱基。探针用 32p-dcTP (3000Li mmd-1) 标记。β-肌动蛋白作为 DNA 载量对照,位于早期癌组织附近的正常乳腺组织作为正常对照。

1.4 统计学方法 应用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理。两组间结果比较采用 χ^2 检验分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 Cyclin D1 表达情况及其与临床病理特征的关系 Cyclin D1 表达主要位于细胞核。良性乳腺增生病例均未观察到 Cyclin D1 表达; 40 例浸润性导管癌病例中 Cyclin D1 表达阳性 22 例 (55.0%); 早期乳腺癌和淋巴结转移病变的阳性表达率分别为 52.0% (22 / 42) 和 53.3% (8 / 15)。在 15 例淋巴结转移病变患者中, 12 例转移病变显示与原始病变相同的 Cyclin D1 免疫染色; 在 22 例早期浸润导管内癌患者中, 原位和浸润组织成分间有很好的关联性。在浸润性导管癌患者中, Cyclin D1 表达与患者年龄、淋巴结转移及组织学分级无明显相关性。

2.2 Cyclin D1 基因扩增情况 25 例新鲜组织中, 4 例 (16.0%) 出现 Cyclin D1 基因扩增现象 (扩增倍数为 2 ~ 4 倍), 未观察到基因重排, 其 Cyclin D1 表达均呈阳性。Cyclin D1 的基因扩增率明显低于 Cyclin D1 表达率。

3 讨论

Cyclin D1 基因位于染色体 11q13 区域。乳腺癌、卵巢癌和鳞状细胞癌患者中 20% ~ 40% 存在 Cyclin D1 基因扩增^[4]及表达增加。Cyclin D1 蛋白由 295 个氨基酸构成, 正常情况下可在细胞周期 G₁ 期通过促进 pRb 磷酸化调节细胞增生进程。Cyclin D1 与 cdk4 结合可促进转录因子 E2f 自 pRb 中释放, 进而终止调节基因中的 E2f (包括 DNA 聚合酶和胸苷激酶)^[5] 表达。Cyclin D1 在正常乳腺组织和增生乳腺组织的小叶组织呈非常微弱表达^[6]。本研究中 40 例良性乳腺增生组织均无 Cyclin D1 阳性表达, 乳腺癌 (包括 40 例浸润性导管癌和 42 例早期

癌) 组织阳性表达率为 54.0% (44 / 82)。本研究还显示, Cyclin D1 表达与患者年龄、淋巴结转移和组织学分级无明显相关性。Bartkora 等^[6] 研究发现, Cyclin D1 表达与乳腺癌浸润程度存在一定关系。但本研究表明, 早期浸润性导管癌和伴有淋巴结转移的乳腺癌患者 Cyclin D1 表达阳性率相似, 且原位癌与其浸润成分、原位肿瘤与淋巴结转移肿瘤间均有较高一致性 (95.0%、80.0%)。提示 Cyclin D1 过表达在乳腺癌发病早期即可出现, 且在整个乳腺癌进程中趋于保持稳定。

研究表明^[7], 类固醇 (包括雌激素和孕激素) 的促细胞增生功能可被 Cyclin D1 终止。Worsley 等研究显示, Cyclin D1 表达与雌激素受体有关。本研究显示, 在 25 例经 EcoRI 消化的乳腺癌组织 DNA 中, 4 例出现 Cyclin D1 基因扩增现象 (蛋白表达均阳性), 而未发现其他遗传变异, 其扩增率明显低于其蛋白表达率。提示基因扩增是 Cyclin D1 基因变异的主要形式; Cyclin D1 表达除受 Cyclin D1 基因扩增影响外, 可能存在其他影响因素 (如 Cyclin D1 催化剂变异或转录因子异常表达), 与文献报道一致。

综上所述, Cyclin D1 表达在乳腺癌发病早期即发挥作用, 其在肿瘤发生、发展过程中的作用尚受基因扩增以外因素的影响。

[参考文献]

- [1] Tamamori-Adachi M, Ito H, Sumrejkanchanakij P, et al. Critical role of cyclin D1 nuclear import in cardiomyocyte proliferation [J]. *Circ Res*, 2003, 92(1): 12-19.
- [2] Wan QH, Qian KX, Fang SG. A simple DNA extraction and rapid specific identification technique for single cells and early embryos of two breeds of *Bos Taurus* [J]. *Anim Reprod Sci*, 2003, 77(1-2): 1-9.
- [3] Yuan BZ, Zhou X, Zimonjic DB, et al. Amplification and Overexpression of the EMS1 Oncogene, a Prognostic Marker, in Human Hepatocellular Carcinoma [J]. *J Mol Diagn*, 2003, 5(1): 48-53.
- [4] Arnold A. The cyclin D1/PRAD1 oncogene in human neoplasia [J]. *J Investig Med*, 1995, 43(6): 543-549.
- [5] Xiao B, Spencer J, Clements A, et al. Crystal structure of the retinoblastoma tumor suppressor protein bound to E2F and the molecular basis of its regulation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(5): 2363-2368.
- [6] Bartkova J, Lukas J, Muller H, et al. Cyclin D protein expression and function in human cancer [J]. *Int J Cancer*, 1994, 57(8): 353-361.
- [7] Naidu R, Wahab NA, Yadav MM, et al. Expression and amplification of cyclin D1 in primary breast carcinomas; relationship with histopathological types and clinico-pathological parameters [J]. *Oncol Rep*, 2002, 9(2): 409-416.

(收稿日期: 2008-08-02)