维普资讯 http://www.cqvip.com

236-238,241

文章编号：0253-3626(2000)03-0236-03

5

PCNA和p53、c-erbB-2癌基因蛋白在乳腺癌前病变及癌变过程中的相关性

R737.902

刘胜春，吴凯南，厉红元
（重庆医科大学临床学院普外科 400016）

摘　要：目的　研究乳腺非典型增生及癌变过程中PCNA及癌基因蛋白p53、c-erbB-2的变化规律，并探讨在此过程中细胞增殖活性与p53、c-erbB-2癌基因蛋白表达的关系。**方法**　应用免疫组化法分析了86例良恶性乳腺组织中的PCNA，癌基因蛋白p53、c-erbB-2表达及其相互关系。**结果**　PCNA、p53、c-erbB-2的表达随非典型增生程度的增加而增多；p53、c-erbB-2阳性表达病例PCNA-LI明显高于阴性病例（t =2.9040，P < 0.01；t =3.2333，P < 0.01）。**结论**　PCNA、p53、c-erbB-2可反映乳腺癌前病变的恶变倾向，并对癌前病变的临床处理和随访有指导作用；细胞增殖活性与p53、c-erbB-2基因激活、蛋白产物聚积有密切联系。

关键词：乳腺癌前病变；乳腺癌；癌基因表达；增殖细胞核抗原　癌前病变
中国图书分类法分类号：R737.9　　**文献标识码：**A　　**收稿日期：**1999-09-09

PCNA . p53　c-erbB-2

Relationship between PCNA and p53、c-erbB-2 oncogene protein in malignant and premalignant lesions in breast

LIU Sheng-chun, et al
Department of General Surgery, College of Clinical Medicine

Abstract: Objective　To evaluate cell proliferating activity and expression of P_{53}、c-erbB-2 oncogene protein in breast carcinoma and premalignant lesions in breast and to investigate the relationship of proliferating cell nuclear Aantigen (PCNA) with p53、c-erbB-2 oncogene protein. **Methods**　Immunohistoch emical reaction of PCNA and p53、c-erbB-2 oncogene protein was evaluated in 61 benign lesion and 25 malignant breast paraffinembeded specimens. The relationships of PCNA-Labeling Index (PCNA-LI) and p53、c-erbB-2 oncogene protein with hyperplasia condition and PCNA-LI with p53、c-erbB-2 oncogene protein were analyzed. **Results**　The expression of PCNA and p53、c-erbB-2 oncogene protein significantly increased with the increased breast atypical hyperplasia condition. PCNA-LI of positive expression for p53 or c-erbB-2 was significantly higher than that of negative respectively (t =2.9040, P <0.01; t =3.2333, P <0.01）. **Conclusion**　The expression of PCNA and p53、c-erbB-2 oncogene protein may indicate the risk of breast premalignant for carcinoma and direct clinical treatment and follow-up for premalignant, and in the meantime the cell proliferating activity had close relation to p53、c-erbB-2 oncogene activation and protein accumulation.

Key Words: Breast premalignant lesion; Breast carcinoma; Proliferating cell nuclear antigen; Oncogene protein

乳腺增生病的癌变危险性随非典型增生程度的增加而上升。在乳腺非典型增生到癌变过程中的细胞增殖活性、代谢水平等不断发生变化。我们用免疫组化检测分析了正常乳腺经非典型增生到癌变过程中的增殖细胞核抗原（PCNA）、癌基因蛋白p53、c-erbB-2的表达；并探讨此过程中细胞增殖活性与p53、c-erbB-2癌基因蛋白的关系。

1　材料与方法

1.1　一般资料　86例石蜡包埋乳腺组织标本取自重庆医科大学病理教研室1988年1月～1996年12月的病理档案。其中正常乳腺组织8例，取自纤维腺瘤旁，经病理组织学证实为正常乳腺组织；单纯上皮增生17例；轻度非典型增生18例；中

作者介绍：刘胜春（1968-　），男，讲师，硕士

维普资讯 http://www.cqvip.com

重度非典型增生18例；乳腺癌25例。均为女性，乳腺增生病患者年龄22～65岁，平均35.5岁。

1.2 诊断标准 乳腺癌诊断标准参照《中国常见恶性肿瘤诊治规范·乳腺癌分册》[1]。乳腺增生分类参照Page分类标准并略加修改[2]：单纯上皮增生，指乳腺及导管上皮增生细胞层次为2～4层，细胞形态、大小基本一致，分化良好，无异型性；轻度非典型增生，指上皮细胞增生在4层以上，可向管腔突出呈乳头状或筛状连接成网，细胞极性存在，有轻度异型性；中重度非典型增生，指管腔或腺腔扩大呈实性或簇集成乳头状，细胞排列致密，形态、大小明显异型性。

1.3 免疫组化 5μm连续切片分别用于HE及免疫组化染色。免疫组化染色简要步骤：50℃二甲苯脱腊，梯度酒精逐渐水化；1%甲醇双氧水浸泡10min；在pH6.0柠檬酸缓冲液中加热至92℃并维持10min后自然冷却至室温；分别加抗PCNA、抗p53单克隆抗体、抗c-erbB-2多克隆抗体（DAKO公司产品，前两者1:100，后者1:50），37℃ 60min后4℃过夜；依次加生物素化Ⅱ抗和ABC复合物（LSAB试剂盒，DAKO）；DAB显色，苏木精复染。每步骤间以PBS洗涤3次。实验中分别以已知PCNA和p53、c-erbB-2阳性表达的乳腺癌组织设置阳性对照，阴性对照以PBS代替Ⅰ抗，余步骤相同。

1.4 判断标准及计算方法 PCNA阳性细胞判断标准参照Stevens标准[3]：细胞核内中等强度以上棕黄色或褐色颗粒或核内弥散性着色为阳性表达，采用PCNA标记指数（PCNA-LI）计算阳性细胞数。分别以细胞核和细胞膜棕黄色染色为p53、c-erbB-2蛋白阳性表达标准；着色细胞10%～50%为阳性"+"，50%以上记为过度表达"++"。PCNA-LI计数以

表达，分别进行方差分析、x^2检验、t检验，以$P<0.05$为显著性差异。

2 结 果

2.1 PCNA表达

PCNA组化染色结果见图1，61例良性乳腺组织中44例PCNA阳性表达，阳性率72.13%；25例乳腺癌组织中有23例阳性92.0%。良恶性病变间有显著性差异（x^2=4.0670，P<0.05）。单纯上皮增生（9/17）与非典型增生（30/36）间有显著性差异（x^2=5.4873，P<0.025）；非典型增生与癌变组（23/25）间的PCNA阳性表达无显著性差异（x^2=0.9725，P>0.25）。各组病变PCNA阳性表达标记指数见表1。

2.2 p53和c-erbB-2基因蛋白表达

p53及c-erbB-2基因蛋白组化染色结果见图2及图3。

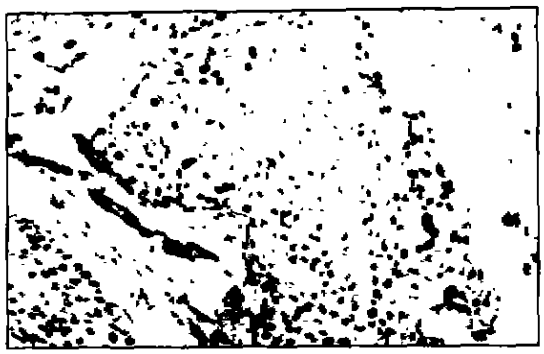


图1 乳腺非典型增生组织PCNA阳性表达 ABC×200



图2 乳腺非典型增生组织c-erbB-2蛋白阳性表达 ABC×200



图3 乳腺非典型增生组织p53蛋白阳性表达 ABC×200

61例良性病变中的10例有基因蛋白p53阳性表达（18.87%），25例乳腺癌组织10例阳性（40%），两者有显著性差异（x^2=5.5368，P<0.05）。癌变组中有6例p53过度表达，其表达率高于良性病变中的1例（x^2=5.6398，P<0.025）见表2。

各组病变c-erbB-2基因表达见表3，良恶性病变间的c-erbB-2表达有显著性差异（x^2=13.2760，P<0.05），良性病变组织中非典型增生阳性表达16/36（44.4%）高于单纯上皮增生3/17（17.65%）（x^2=18.9525，P<0.005）。

2.3 PCNA-LI与p53和c-erbB-2蛋白表达的关系

p53阳性病例PCNA均为阳性表达，p53阳性病例PCNA-LI（20.9741±9.2803）明显高于p53阴性

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 乳腺良恶性病变组织中PCNA阳性表达的标记指数（PCNA-LI）

	PCNA阳性例数	PCNA-LI $\bar{x}\pm s$	范围
正常乳腺	5	3.70±1.30	1.96~6.90
单纯上皮增生	9	6.89±2.44	2.65~11.80
轻度非典型增生	14	8.33±3.90	3.50~14.85
中重度非典型增生*	16	16.53±8.86	4.20~27.60
乳腺癌*	23	25.54±7.69	13.70~40.50

经方差分析：中重度非典型增生及乳腺癌组与任何组比较均有显著差异（$F<0.01$）

表2 乳腺良恶性病变组织P53蛋白表达

	例数	P_{53}蛋白表达			阳性百分率%
		-	+	++	
正常乳腺	8	8	-	-	-
单纯上皮增生	17	16	-	-	5.88
轻度非典型增生	18	15	3	-	16.67
中重度非典型增生	18	12	5	1	33.33
乳腺导管癌	25	15	4	6	40.00

表3 乳腺良恶性病变组织中的c-erbB-2蛋白表达

	例数	c-erbB-2		
		-	+	++
正常乳腺	8	8	0	0
单纯上皮增生	17	14	3	0
轻度非典型增生	18	13	3	2
中重度非典型增生	18	7	5	6
乳腺癌	25	5	10	10

表4 c-erbB-2与PCNA-LI的关系

c-erbB-2	n	PCNA-LI($\bar{x}\pm s$)
-	47	6.5880±5.2713
+	21	14.7500±9.1772
-+	18	15.8680±10.4326

病例（13.3905±8.8330）（$t=2.9047$，$F<0.01$）。c-erbB-2阳性组PCNA-LI高于阴性组（$t=5.515$，$F<0.001$），但阳性与过度表达组间无差异（$t=0.3930$，$F>0.5$），见表4。

3 讨 论

3.1 PCNA作为DNA聚合酶δ的辅助性蛋白，直接参与了细胞增殖过程中的DNA的复制，是评价细胞增殖活性的可靠指标[3]。本组实验结果显示乳腺非典型增生组织PCNA阳性表达率明显高于单纯上皮增生，说明在非典型增生过程中细胞增殖水平和代谢水平均显著升高，表明PCNA活性与乳腺增生病增生程度存在相关性，提示PCNA高表达的乳腺良性病变应作为高危人群进行临床治疗和随访。非典型增生与癌变组PCNA阳性表达率无差异（$F<0.05$），说明非典型增生与癌变组织均有活跃的增殖活性。而PCNA-LI结果显示，恶性组织处于增殖分裂周期中细胞所占比例明显高于非典型增生（$F<0.01$），表明恶变组织中有更多的增殖活跃细胞；但在良恶性病变间的PCNA-LI有交叉重叠，故单纯依靠PCNA-LI难以鉴别良恶性，在形态学鉴别有困难时PCNA检测有一定参考价值。

3.2 本组实验对乳腺非典型增生及癌变组织p53蛋白的免疫组化分析发现，乳腺非典型增生过程中已有p53基因蛋白表达，并随非典型增生程度的增加而增多，表明p53基因突变和蛋白产物聚积在乳腺癌早期阶段已有发生，并能提示良性乳腺疾病的恶变倾向。Midulla和Moriki等已证实了乳腺癌组织中的细胞增殖活性与蛋白表达的相关性p53[4,5]。本研究发现，p53蛋白阳性表达病例的PCNA-LI明显高于蛋白阴性病例（$F<0.01$），说明在非典型增生及癌变过程中p53基因突变，蛋白产物聚积与细胞增殖活性有关。

3.3 本组实验结果显示，c-erbB-2基因蛋白的表达从单纯上皮增生、轻度非典型增生到中重度非典型增生逐步增多，说明c-erbB-2基因蛋白可反映癌前病变的恶变危险性。c-erbB-2蛋白表达与细胞增殖活性的关系各家报道不一。Midulla在乳腺癌的研究中发现c-erbB-2阳性表达的细胞有较高的增殖活性[4]。而Morki的结论相反[5]。本组实验结果显示c-erbB-2阳性表达的病例PCNA-LI明显高于阴性病例，说明乳腺非典型增生及癌变过程中c-erbB-2蛋白表达与细胞增殖活性有关。而c-erbB-2蛋白阳性与过度表达组间的PCNA-LI无差异，表明乳腺非典型增生及癌变过程中c-erbB-2蛋白表达与细胞增殖活性的相关性并不随c-erbB-2蛋白表达的增强而增加。对这一现象有学者认为随着增生活性的增加，c-erbB-2过度表达不能反映较高的增殖活性[6]。但目前尚不能解释c-erbB-2蛋白与细胞增殖活性的关系。

（致谢：感谢病理教研室米粲教授对本研究的支持和帮助。）

（下转第241页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

无ER表达：早期胃癌ER表达阳性率仅为10%，进展期胃癌阳性率达50%，显著增高；伴有淋巴结或其它脏器转移的胃癌ER表达阳性率为60%，高于无转移组的阳性率20%。实验结果表明在胃癌发生过程中ER表达是一晚期事件、具有肿瘤特异性；胃癌ER表达与癌细胞的浸润和转移有关，提示ER在非雌激素靶器官肿瘤中亦具有促进肿瘤细胞增殖，影响胃癌预后的作用。

Ras原癌基因编码的蛋白$P21^{ras}$具有内源性GTP酶活性，传递来自生长因子受体的刺激信号，按序激活一些蛋白激酶，导致c-fos、c-jun、c-myc等原癌基因的表达，影响核内DNA复制，与细胞的增殖和分化有关。我们的研究结果表明$P21^{ras}$在慢性浅表性胃炎与异型增生中均有表达，在胃粘膜癌变后，至进展期胃癌表达阳性率明显增高，且与胃癌浸润程度和转移有关，提示$P21^{ras}$的表达出现在胃癌早期，ras原癌基因的激活或突变可能与癌前病变的发生有关，并促进胃癌的形成与发展。因此，随访、监测$P21^{ras}$，对癌前病变患者，结合其它指标可能有助于胃癌的早期诊断；对胃癌患者则可用于判断病情转归和预后。

我们的前期工作已证实表皮生长因子受体（EGFR）在胃癌和癌前病变中有高表达[4]，可通过生长因子诱发的信息传导途径，经$P21^{ras}$的作用导致部分原癌基因的过度表达。本研究表明胃癌ER的阳性表达具有肿瘤特异性，可能系胃粘膜癌变后通过胚胎基因的去阻抑现象合成的异常蛋白质（有学者[5]发现在3个月胎儿食管、胃、结肠可测到ER，8个月以上的胎儿则测不出是一佐证），因其与雌激素靶器官组织中的ER具有相同的代谢活性[6]，故可与脂溶性信息分子——雌激素结合后发挥反式激活作用，亦导致c-fos、c-jun、c-myc等原癌基因的过度表达[7]。ER还可通过诱导转化生长因子α（TGF-α），胰岛素样生长因子I（IGF-I）等生长因子的产生和自泌性调节，刺激肿瘤细胞的生长[8]。因此，通过抑制$P21^{ras}$传导通路或对于ER、EGFR阳性的胃癌患者给予受体抑制剂，阻断其生物效应，对治疗胃癌应具有一定的临床意义。

参 考 文 献

[1] Sugimoto T, et al. Ki-ras and c-myc expression measured by complification polymerase chain reaction[J].Biochem Biophys Res Commun, 1994, 15(2):574-580.

[2] George J, et al. Increased estrogen receptor and epidermal growth factor receptor gene product co-expression in surgically resected gastric adeno-carcinomas[J]. J Surg Oncol, 1996, 63(1): 166-171.

[3] Yasuo N, et al. Relative effect of steroid hormone receptors on the prognosis of patients with operable breast cancer [J]. Cancer, 1992, 69(1):153-164.

[4] 吴小翎. 表皮生长因子受体在胃癌中的表达及意义[J]. 重庆医科大学学报，1999;24(2):135-137

[5] 王利瑛，等. 食管细胞癌的雌激素和孕激素受体研究[J]. 中华肿瘤杂志，1991，13(1)：23-25.

[6] Mastui M, et al. Characterization of estrogen receptor in human gastric cancer[J]. Cancer, 1991;68(2):305-308.

[7] Weisz A, et al. Identification of an estrogen element upstream of the human c-fos gene that binds the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor[J]. Nucleic Acids Res, 1990;18(17):5097-5105.

[8] Murphy LC, et al. Antiestrogen action and growth factor regulation[J]. Breast Cancer Res Treat, 1994; 31(1):61-71.

（上接第238页）

参 考 文 献

[1] 中华人民共和国医政司. 中国常见恶性肿瘤诊治规范. 乳腺癌分册[M]. 北京：北京医科大学、协和医科大学联合出版社，1989;53-56.

[2] Page L. Cancer Risk Assessment in Benign Breast Biopsises[J]. Human Pathology, 1986;17(9)871-874.

[3] Steven R, Donna S, Neuberg, et al. Prediction of early relapse and shortened survival in patients with breast cancer by proliferating cell nuclear antigen score[J]. Cancer, 1993;71:3552-3559.

[4] Midulla C, Giovagnoli R, Vallic, et al. Correlation Between Ploidy status, ERB-B2 and p53 Immunohistochemical Expression in Primary Breast Carcinoma[J]. Analyt Quant Cyteol Histol, 1995;17:157-162.

[5] Moriki T, Takahashi T, Tanioka F, et al. Proliferative Activity in Breast Carcinoma Evaluated by Brdu and PCNA. Correlation with Expression of p53, c-erbB-2, Estrogen Receptor and P-Glycoprotein[J]. Path, Res. Pract. 1995;191:1122-1132.

[6] Inaji H, Koyama H, Hotomura K, et al. Differential distribution of ErbB-2 and PS2 proteins in ductal carcinoma in situ of the breast[J]. Breast Cancer Research and Treatment, 1996;37:89-92.