DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.23.003
第25卷第23期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 23
2066 2003年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)23-2066-03

二甲基苯蒽诱导大鼠乳腺癌微卫星不稳定性与 cyclin D1、P53 表达的意义

张 毅[1],姜 军[1],封传悦[1],刘丽梅[2] (第三军医大学附属西南医院:[1]乳腺疾病中心;[2]病理学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨大鼠乳腺癌发生中微卫星不稳定性发生情况及其 cyclin D1、P53 蛋白表达。方法 雌性 Wistar 大鼠 30 只,利用二甲基苯蒽 200 mg/kg 灌胃,复制大鼠乳腺癌动物模型,应用 PCR 技术检测大鼠 8 个微卫星位点 D1Mit14、D1Mgh2、D1Mgh6、D3Mit3、D3Mgh9、D5Mit11、D5Mgh5 及 D7Mgh1 微卫星不稳定性(MSI)发生情况;用 SP 免疫组织化学技术检测 cyclin D1、P53 在乳腺癌中的表达。结果 27 例乳腺癌中有 2 例发生 MSI,9/27 例 P53 表达阳性,12/27 例 cyclin D1 表达阳性,且与组织学分级及肿瘤大小有关。结论 MSI 不是大鼠乳腺癌发生中常见现象,cyclin D1 过表达是乳腺癌发生的早期事件,而 P53 过表达则是肿瘤发生的晚期事件。

关键词:乳腺癌;微卫星不稳定性;cyclin D1;P53;大鼠
中图法分类号:R394.2;R737.9 文献标识码:A

Significance of microsatellite instability and expressions of cyclin D1 and P53 proteins in breast carcinoma induced by DMBA in rats

ZHANG Yi, JIANG Jun, FENG Chuan-yue, LIU Li-mei (Breast Disease Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the significance of microsatellite instability (MSI) and expressions of cyclin D1 and P53 in 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) induced breast carcinoma in rats. Methods Animal model of rat breast carcinoma was duplicated in 30 female Wistar rats by gastric irrigation of DMBA at the dose of 200 mg/kg. Eight microsatellite loci (D1Mit14, D1Mgh2, D1Mgh6, D3Mit3, D3Mgh9, D5Mit11, D5Mgh5 and D7Mgh1) were selected for the examination of MSI of breast carcinoma by PCR analysis. S-P immunohistochemical staining was used to study the expressions of cyclin D1 and P53 in DMBA-induced breast carcinoma in rats. Results Of the 27 cases of breast carcinoma, there were 2 cases of MSI at 8 loci, 9 cases with P53 overexpression and 12 cases with cyclin D1 overexpression. All these were associated with histological grading. Conclusion MSI is infrequent in breast carcinogenesis in rats. Cyclin D1 overexpression may be the early event but P53 protein overexpression may be the late event in breast carcinoma.

Key words: breast carcinoma; microsatellite instability; cyclin D1; P53; rat

近年来,许多研究显示,微卫星不稳定性(Microsatellite instability, MSI)在肿瘤发生、发展中起重要作用。我们通过应用化学致癌剂,诱发大鼠发生乳腺癌,研究实验性大鼠乳腺癌微卫星不稳定性发生情况及与 cyclin D1、P53 表达的情况。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用健康雌性 Wistar 大鼠 30 只,50~60 d 龄,体质量 90~110 g,分笼编号喂养,均购自第三军医大学实验动物中心。PCR 引物、cyclin D1、P53 蛋白单克隆抗体及致癌剂二甲基苯蒽(7, 12-dimethylbenz(a) anthracene, DMBA)均购自美国 Sigma 公司。

1.2 模型制作

以 DMBA 200 mg/kg 灌胃,复制大鼠乳腺癌动物模型[1]。给药 24 周后处死大鼠取乳腺组织及肿瘤标本。

1.3 乳腺标本检测

观察并记录大鼠乳腺肿瘤发生时间,24 周处死存活大鼠,观察肿瘤发生情况,测量肿瘤直径,并对乳腺癌进行组织学分级。乳腺癌分期及组织学分级标准参照文献[2]的标准。

1.4 微卫星分析

1.4.1 基因组 DNA 提取 小心将肿瘤组织中坏死组织及结缔组织去除,取 1 cm×0.25 cm×0.2 cm 肿瘤组织用匀浆器研碎,PBS 洗 2 次,常规蛋白酶 K 消化,苯酚-氯仿-异戊醇抽取

作者简介:张 毅(1969—),男,河南省新乡市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事乳腺、甲状腺外科临床及基础方面的研究,发表论文 10 余篇。电话:(023)65387389
通信作者:姜 军,电话:(023)68754160
收稿日期:2003-08-26;修回日期:2003-09-30

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

DNA, 紫外线分光光度法定量, －20 ℃冰箱保存备用。另取大鼠正常乳腺组织对照。

1.4.2　PCR扩增　　对大鼠 8 个微卫星位点 D1Mit14, D1Mgh2, D1Mgh6, D3Mit3, D3Mgh9, D5Mit11, D5Mgh5, D7Mgh1 进行扩增。反应总体积为 25 μl, 内含 10× buffer2.5 μl, 1.5 mmol $MgCl_2$, 4× dNTP 100 μmol/L, Taq DNA 聚合酶 1 U, 70 ng 基因组 DNA, 引物各 50 pmol/L。反应条件: 94 ℃变性 5 min 后进入循环, 共 35 个循环, 循环参数为 94 ℃ 2 min, 58 ℃ 1 min, 72 ℃ 2 min, 最后一个循环结束后继续置 72 ℃反应 10 min, 然后将扩增产物与等体积的上样缓冲液混匀, 在 95 ℃变性 5 min, 冰水中快速冷却后, 在 8%聚丙酰胺变性凝胶上电泳 2～3 h 后放射自显影, 8～24 h 后洗片观察结果。

1.5　免疫组化染色

采用 S-P 免疫组织化学染色, S-P 药盒购自 Sigma 公司。标本用 10%甲醛固定, 石蜡包埋后切片, 常规脱蜡, 洗涤, 过氧化氢阻断 30 min, 加第一抗体 4 ℃过夜, 然后加第二抗体, 底物用 DAB。最后以苏木素复染, 中性树胶封片, 光镜下观察。阳性结果评定标准: 阳性为棕黄色至深棕色染色, P53 及 cyclinD1 阳性为胞核染色。阳性细胞数大于 5%为阳性[3]。

1.6　统计学方法

采用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　大体及病理组织学观察结果

大鼠自给药后第 11 周开始出现乳腺肿瘤, 17～19 周为高峰时间。第 24 周存活大鼠 28 只, 有 2 只不明原因死亡, 处死所有存活大鼠, 有 20 只大鼠有肿瘤发生。组织学观察发现 1 只大鼠肿瘤为纤维腺瘤; 有 19 只大鼠有乳腺癌生长, 共检出 27 个癌瘤, 乳腺癌直径 1.0～4.0 cm, 均数为(2.08±0.655) cm。其中肿瘤诱发出现时间早、生长时间较长者肿瘤直径较大, 而肿瘤生长时间短者直径较小。肿瘤组织学分级 1 级 11 例, 2 级 9 例, 3 级 7 例。

2.2　微卫星不稳定性检测情况

对所有诱发的 27 个乳腺癌组织中 8 个微卫星位点进行检测, 有 2 个肿瘤在 D1Mit14、D5Mgh6 及 D3Mgh9 3 个位点检测出微卫星不稳定性, 其中 MSI 检出率为 2/27(7.4%)。MSI 阳性 2 个肿瘤直径较小, 分别为 1.0 cm 和 1.5 cm, 组织学分级均为 1 级。

2.3　P53 及 cyclin D1 蛋白表达情况

将大鼠 27 例乳癌标本进行 P53 及 cyclin D1 表达检测, 见表 1, 图 1、2。

表 1　大鼠不同组织学分级乳腺癌 **P53** 及 **cyclin D1** 表达情况

Tab 1　Expressions of P53 and cyclin D1 in different histological gradings of breast carcinoma

Grade	*n*	P53$^+$(%)	Cyclin D1$^+$(%)
1	11	1(9.09)	8(72.7)
2	9	3(33.3)	4(44.4)
3	7	5(71.4) *	0(0) *

*: $P<0.05$ *vs* grade 1

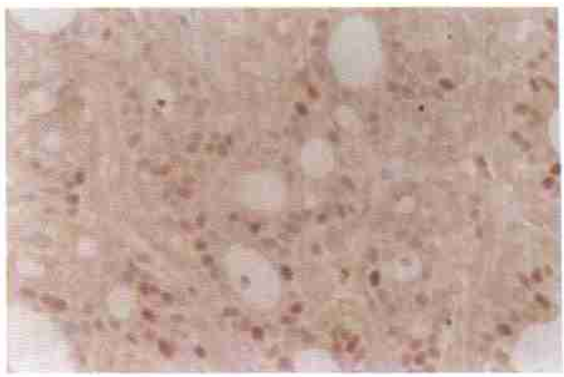


图 1　大鼠乳腺癌中 **P53** 表达阳性　(S-P× 400)

Fig 1　Positive expression of p53 in breast carcinoma　(S-P× 400)



图 2　大鼠乳腺癌中 **cyclin D1** 表达阳性　(S-P× 200)

Fig 2　Positive expression of cyclin D1 in breast carcinoma　(S-P× 200)

2.4　MSI 与 P53 及 cyclin D1 表达的关系

MSI 阳性两个肿瘤 P53 表达均为阴性, 其中 1 例 cyclin D1 表达阳性, 1 例 cyclin D1 阴性。P53 表达阳性乳癌 9 例中 cyclin D1 表达阳性 1 例, P53 表达阴性 18 例中 cyclin D1 表达阳性 10 例。

3　讨论

微卫星是由 1～6 个核苷酸组成, 具有高度多态性的简单串联排列的 DNA 重复序列, 广泛存在于原核及真核细胞基因组中, 位于很多基因的内含子、编码区及启动子中, 微卫星不稳定性是指由于复制错误引起的简单重复序列的改变[4]。MSI 首先在遗传性非多发性息肉性结肠癌中观察到, 以后相继在肺癌、胃癌、食道癌、乳腺癌、前列腺癌等肿瘤中发现[5]。在大鼠乳腺癌动物模型中则少见报道。

本研究显示, MSI 在大鼠乳腺癌中发生率仅为 2/27(7.4%), 可能表明 MSI 为大鼠乳腺癌发生中不常见的现象, 与 Lee 等[4] 对人乳腺癌中 MSI 发生不常见的报道结果较相似。而且 MSI 发生在肿瘤直径较小、生长时间较短及组织学分级较低的肿瘤中, 因 MSI 阳性

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

样本仅2例，因此是否与肿瘤发生早期有关，需进一步大样本实验证实。

Cyclin D1是目前研究较多的周期蛋白之一，在细胞周期G_1→S转变中有重要意义，在人体多种肿瘤中可检测出cyclin D1的过度表达，有报道cyclin D1在人类乳腺癌、食道癌、肝癌及非小细胞肺癌[6]中有过度表达，并与预后有关。p53基因为抑癌基因，其产物在细胞周期G_1/S限制点调控中也起重要作用，WTp53可通过诱导$p21^{waf-1/cip-1/cdi-1ey}$及gadd基因转录引起$G_1$停滞，抑制细胞生长，对细胞周期进行调控[7]。本研究中发现，P53蛋白在组织学分级较高及诱发时间较长直径较大的肿瘤中阳性高，与大多数报道一致，而cyclin D1则在直径较小，组织学分级较低的肿瘤表达阳性率高，二者呈较显著的负相关性，表明cyclin D1高表达可能是大鼠乳腺肿瘤诱发早期现象，P53表达则是乳腺癌诱发中、晚期现象。同时，MSI阳性两个肿瘤P53表达均阴性，而其中1个肿瘤cyclin D1表达阳性，因样本数较少，无法说明其相关性，但从其趋势来看，微卫星不稳定性可能发生在肿瘤发生早期，是否与cyclin D1因基因突变有关尚需进一步大样本实验及更深入的研究。

参考文献：

[1] 张 毅，姜 军，封传悦，等. 大鼠乳癌发生过程中核DNA含量变化与cyclin D1、P53蛋白表达[J]. 第三军医大学学报，2003，25(5)：416－419.

[2] 高 进. 肿瘤学基础与实验[M]. 北京：人民卫生出版社，1999. 410－411.

[3] Bito T, Ueda M, Ahmed N U, *et al*. Cyclin D and retinoblastoma gene product expression in actinic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma in relation to p53 expression[J]. J Cutan Pathol, 1995, 22(5): 427－434.

[4] Lee S C, Berg K D, Sherman M E, *et al*. Microsatellite instability is infrequent in medullary breast cancer[J]. Am J Clin Pathol, 2001; 115(6): 823－827.

[5] Orlandi F, Barucca A, Biagini G, *et al*. Molecular stability of DNA typing short tandem repeats in the mammary tree of patients with breast cancer[J]. Diagn Mol Pathol, 2002, 11(1): 41－46.

[6] Naitoh H, Shibata J, Kawaguchi A, *et al*. Overexpression and localization of cyclin D1 mRNA and antigen in esophageal cancer[J]. Am J Pathol, 1995, 146(5): 1161－1169.

[7] Del-Sal G, Murphy M, Ruaro E, *et al*. Cyclin D1 and $p21^{waf1}$ are both involved in p53 growth suppression[J]. Oncogene, 1996, 12(1): 177－185.

（编辑 刘洪娥）

（上接2065页）

缩，为治疗失败。

2 结果

2.1 治疗效果

治疗后随访1～3个月，13眼中12眼眼压正常，治疗成功率为92.3%，其中8眼未用药物，4眼加用噻吗心安眼液；1眼(7.7%)失败，但未见眼球萎缩。

2.1.1 眼压 12眼平均眼压为(16.91±6) mmHg，较治疗前(42.1±11) mmHg下降59.85%(降幅10～57 mmHg)；1眼眼压曾有一过性正常，后虽有回升，但较治疗前有好转。

2.1.2 视力 3眼视力分别由光感、数指/30 cm和手动/眼前提高至0.1、0.05和0.02；10眼视力无变化。

2.1.3 眼痛症状 12眼疼痛消失，1眼曾有一过性疼痛消失。

2.2 治疗次数与疗效关系

成功12眼中，11眼(91.6%)1次成功，1眼(8.4%)2次成功，累积成功率92.30%。

2.3 并发症

术后前房出血1眼、前房渗出5眼，对症治疗后出血吸收、炎症消失。

3 讨论

波长810 nm的半导体激光具有良好的穿透性，可被睫状体色素选择性吸收，造成光凝固从而破坏睫状体功能，减少房水的分泌，对难治性青光眼有较好疗效[1]。本临床研究初步证实该技术的有效性：TSCPC治疗难治性青光眼的成功率为92.30%，疼痛解除率为92.30%，治疗后眼压平均下降59.85%，与国外报道基本一致[2]。本组病例并发症为不同程度的前房出血和前节炎症反应，经常规对症处理后均消失。因本研究样本量小、观察时间较短，其远期疗效、并发症还有待扩大样本量后进一步观察和研究。

半导体激光治疗难治性青光眼疗效确切，降压速度快，术后反应轻，易被患者接受。因此，我们认为在难治性青光眼治疗时可首选TSCPC，是否适用于青光眼常规治疗还需深入研究[3]。同时因其价格低，体积小，便于携带，易于基层单位眼科推广使用。

关键词：半导体激光；青光眼；睫状体光凝

中图法分类号：R779.63 文献标识码：B

参考文献：

[1] McKelvie P A, Walland M J. Pathology of cyclodiode laser: a series of nine enucleated eyes[J]. Br J Ophthalmol, 2002, 86(4): 381－386.

[2] Ho C L, Wong E Y, Chew P T. Effect of diode laser contact transscleral pars plana photocoagulation on intraocular pressure in glaucoma[J]. Clin Exp Ophthalmol, 2002, 30(5): 343－347.

[3] Egbert P R, Fiadoyor S, Budenz D L, *et al*. Diode laser transscleral cyclophotocoagulation as a primary surgical treatment for primary open-angle glaucoma[J]. Arch Ophthalmol, 2001, 119(3): 345－350

（编辑 王 红）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net