DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.05.018

论著

文章编号:1000-5404(2003)05-0416-04

大鼠乳癌发生过程中核DNA含量变化与cyclin D1、P53蛋白表达

张 毅,姜 军,封传悦,韩晓蓉 (第三军医大学附属西南医院普通外科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨乳腺癌发生过程中细胞核DNA含量变化、cyclin D1、P53蛋白表达情况及其相互关系。方法 雌性Wistar大鼠120只,利用DMBA 20 mg·(100 g)$^{-1}$灌胃,复制大鼠乳腺癌动物模型,观察正常乳腺、不典型增生乳腺和乳腺癌中细胞核DNA含量变化。应用SP免疫组化技术检测cyclin D1、P53蛋白在正常乳腺、不典型增生乳腺及乳腺癌中的表达。结果 在乳腺癌发生过程中,正常乳腺、不典型增生乳腺及乳腺癌中细胞核DNA含量增加($P<0.05$);在不典型增生Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ级乳腺组织中分别有3/20、6/20、11/20有cyclin D1表达,7/9的乳腺癌Ⅰ级有cyclin D1的表达,1/4的乳腺癌Ⅱ级中cyclin D1有表达。P53蛋白在乳癌Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ级中分别有1/9、1/4、6/7有过度表达。结论 在大鼠乳腺癌发生过程中,细胞核DNA含量变化反映细胞增殖状态,cyclin D1过度表达参与肿瘤的发生过程,是肿瘤发生中的早期事件,而P53表达与肿瘤进展有关,是肿瘤发生的晚期事件,cyclin D1表达与P53蛋白表达呈负相关。

关键词:cyclin D1;P53蛋白;细胞核DAN含量;乳腺癌;肿瘤发生

中图法分类号:R394.2;R737.902 文献标识码:A

The relationship between nuclear DNA content and the expressions of cyclin D1 and P53 proteins in carcinogenesis of breast carcinoma induced by DMBA in rats

ZHANG Yi, JIANG Jun, FENG Chuan-yue, HAN Xiao-rong (Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the interrelation between nuclear DNA content and the expressions of cyclin D1 and P53 in carcinogenesis of breast carcinoma induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracence(DMBA) in rats. Methods Animal model of breast carcinoma was replicated by gastric perfusion of DMBA at 20 mg/100 g. Nuclear DNA content was detected with image analysis instrument and the expressions of cyclin D1 and P53 at every stage of carcinogenesis of breast carcinoma induced by DMBA in rats observed by Sp immunohistochemical staining. Results In mammary gland tissue at grade Ⅰ, grade Ⅱ and grade Ⅲ atypical hyperplasia of breast carcinoma, there was overepression of cyclin D1 (3/20, 6/20 and 11/20, respectively). The overexpression of cyclin D1 was detected to be present in grade Ⅰ, grade Ⅱ and grade Ⅲ breast carcinoma (7/9, 1/4 and 0/7, respectively). The overexpression of P53 was detected to be present in grade Ⅰ, grade Ⅱ and grade Ⅲ breast carcinoma (1/9, 1/4 and 6/7, respectively). Conclusion Nuclear DNA content reflects the state of cell proliferation. Cyclin D1 overexpression participates in the carcinogenesis of breast carcinoma, which may be the early event in breast carcinoma. P53 expression is associated with the development of breast carcinoma, which may be the late event in breast carcinoma. The expression of cyclin D1 is negatively correlated with P53 overexpression.

Key words: cyclin D1; P53; nuclear DNA content; breast carcinoma; carcinogenesis

我们用二甲基苯蒽(DMBA)诱导大鼠乳腺癌发生,研究在乳腺癌发生过程中细胞核DNA含量变化与cyclin D1、P53蛋白表达的关系及其意义,为乳腺良性疾病癌变机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

健康雌性Wistar大鼠120只,50~60 d龄,体重90~110 g,采用完全随机方法分为实验组(A、B、C)及正常对照组,每组40只。均购自第三军医大学实验动物中心。cyclin D1、P53蛋白单克隆抗体及二甲基苯蒽(DMBA)均购自美国Sigma公司。

1.2 模型制作

实验组以二甲基苯蒽200 mg/kg灌胃,复制大鼠乳腺癌动

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、甲状腺外科方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68753810

收稿日期:2002-03-11;修回日期:2002-09-05

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

物模型[1]。给药后第 7 周(A 组)、10 周(B 组)及 24 周(C 组)后分批活杀大鼠取乳腺组织及肿瘤标本。

1.3　大鼠乳腺癌组织学分级

乳腺癌组织学分级标准参照文献[2]的标准。

1.4　免疫组化染色

采用 SP 免疫组织化学染色, SP 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 2 抗体, 底物用 DAB。最后以苏木素染色, 中性树胶封片, 光镜下观察染色情况。免疫组化染色结果评定标准: 光镜观察, 阳性为棕黄色至深棕色染色, P53 及 cyclin D1 阳性为胞核染色。阳性细胞数>20%为强阳性(++), 阳性细胞数 5%~20%之间为阳性(+); 无阳性细胞或阳性细胞数小于 5%为阴性[3]。

1.5　细胞 DNA 染色及图像分析

1.5.1　DNA 染色方法(Feulgen 法)　取各组石蜡标本, 切片厚 5 μm, 脱蜡后用 1 mol/L 盐酸溶液在 60 ℃下水解 15 min, 室温下蒸馏水水解 2 min。浸入 Schiff 试剂中染色 90 min, 亚硫酸水洗 3 次, 每次 2 min。水洗、室温干燥、透明、封片。细胞核 DNA 的脱氧核糖核酸醛基部分与 Schiff 试剂反应后生成紫红色产物。

1.5.2　图像分析仪检测方法　采用德国 Leitz 公司 MD 型真彩色图像分析仪, 对每例切片在典型区测定 50~100 个细胞核。经计算机将所测细胞核 DNA 吸光度值计算, 得出 DNA 相对含量。

1.6　统计学方法

采用 t 检验、方差分析和相关分析。

2　结果

2.1　大体及病理组织学观察结果

活杀 A 组大鼠乳腺中未见肿瘤发生, 与对照组相比, 镜下可观察到大鼠乳腺有较多的表现为不典型增生Ⅰ、Ⅱ级的区域, 见图 1。活杀 B 组大鼠乳腺中镜下观察到有较多的不典型增生Ⅲ级, 见图 2。及少数导管内癌或原位癌发生, 肉眼观察肿瘤发生活跃时间为给药后 11~17 周。活杀 C 组所有存活大鼠(共存活 37 只, 3 只不明原因死亡), 组织学观察乳腺肿瘤个别为纤维腺瘤, 大多数为乳腺癌(19 只大鼠有乳癌生长, 共检出 27 个肿瘤, 见图 3), 肿瘤组织学分级不同。

2.2　cyclin D1、P53 蛋白表达及细胞核 DNA 含量检测结果

分别将大鼠正常乳腺、不典型增生Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ及乳癌标本中各取 20 例, 进行 cyclin D1、P53 蛋白表达, 见图 4、5。及细胞核 DNA 含量检测, 检测结果见表 1。

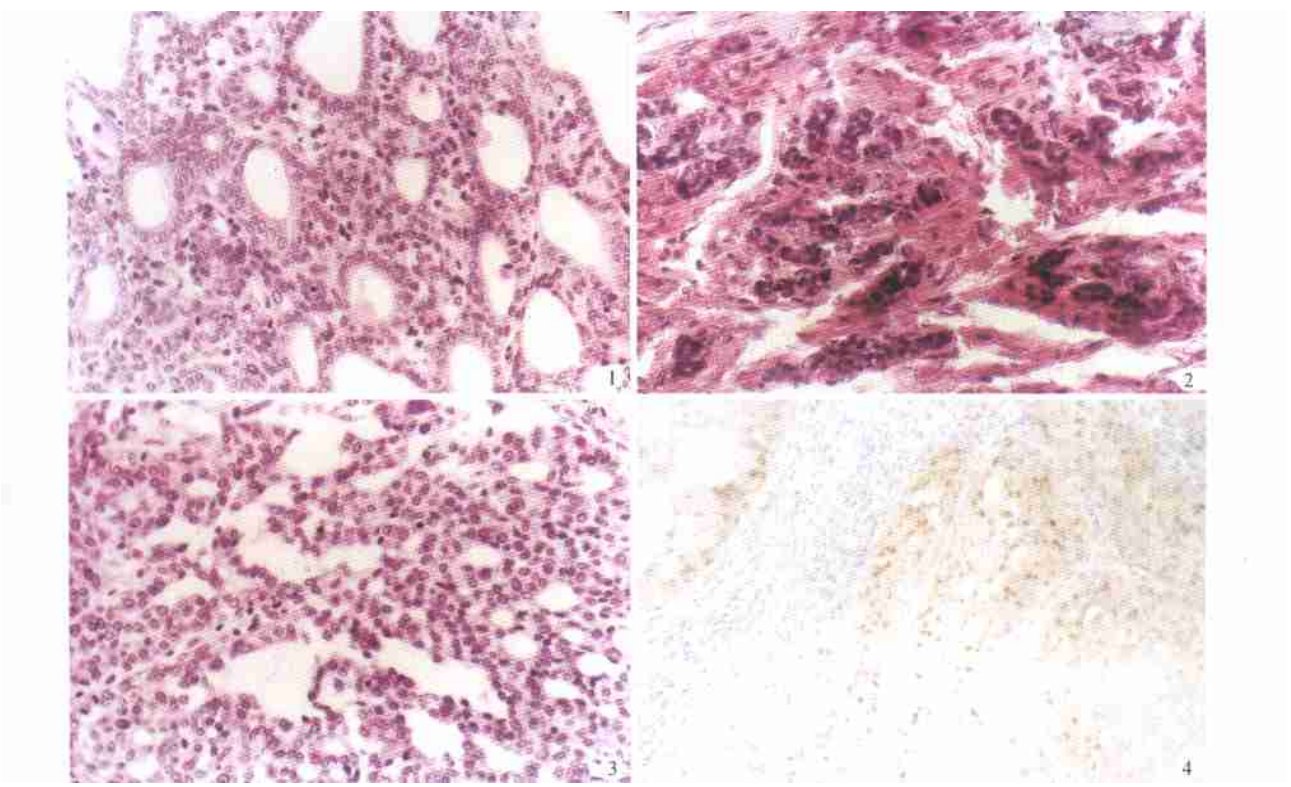


图 1　A 组乳腺不典型增生Ⅱ级　(HE×100)
Fig 1　Group A: grade 2 of atypical hyperplasia　(HE×100)
图 2　B 组乳腺不典型增生Ⅲ级(HE×100)
Fig 2　Group B: grade 3 of atypical hyperplasia　(HE×100)
图 3　C 组浸润性导管癌　(HE×100)
Fig 3　Group C: infiltrating duct carcinoma　(HE×100)
图 4　大鼠乳腺癌中 **cyclin D1** 表达阳性　(S-P×400)
Fig 4　Expression of cyclin D1 in breast carcinoma　(S-P×400)

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

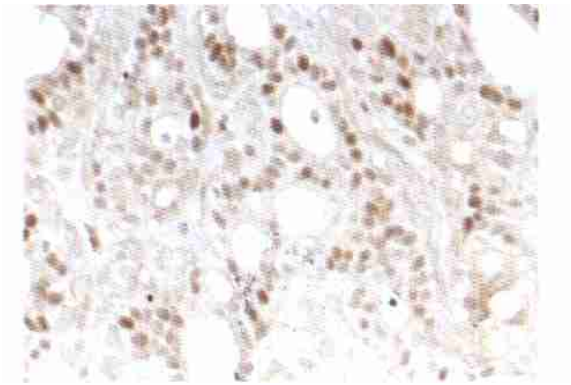


图 5 大鼠乳腺癌中 P53 表达阳性 (S-P× 100)

Fig 5 Expression of P53 in breast carcinoma (S-P× 100)

2.3 细胞核 DNA 含量与 cyclin D1 表达的关系

从不典型增生Ⅰ级到不典型增生Ⅲ级,各组中 cyclin D1 阳性组织 DNA 含量分别明显高于 cyclin D1 阴性组织($P<0.05$)。乳腺癌 1 级中 cyclin D1 阳性与阴性相差不显著。乳腺癌Ⅱ级中 cyclin D1 阴性组织较阳性组织高($P<0.05$)。乳腺癌Ⅲ级无对照。见表 2。

表 1 大鼠乳腺标本 cyclin D1、P53 表达及细胞 DNA 含量

Tab 1 Expressions of cyclin D1, P53 protein and nuclear DNA content

Group	n	cyclin D1$^+$	(%)	P53$^+$	(%)	DNA content($\bar{x}\pm s$)
Normal breast tissue	20	0	0	0	0	101±4.54
Grade 1 of atypical hyperplasia	20	3	15	0	0	104±10.58 *
Grade 2 of atypical hyperplasia	20	6	30	0	0	119±12.24
Grade 3 of atypical hyperplasia	20	11	55	0	0	131±11.46
Grade 1 of breast carcinoma	9	7	77.7	1	11.1	136±5.23 #
Grade 2 of breast carcinoma	4	1	25	1	25	149±9.65
Grade 3 of breast carcinoma	7	0	0	6	85.7	163±10.97

*: $P>0.05$ *vs* normal breast tissue, #: $P<0.05$ *vs* grade 1 of atypical hyperplasia; between the others

表 2 DNA 含量与 cyclin D1 表达的关系($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Relationship between DNA content and expression of cyclin D1($\bar{x}\pm s$)

Group	Atypical hyperplisa Ⅰ		Atypical hyperplisa Ⅱ		Atypical hyperplisa Ⅲ		Grade Ⅰ of Cancer		Grade Ⅱ of Cancer		Grade Ⅲ of Cancer	
	Case	Content	Case	Content	Case	Content	Case	Content	Case	Content	Case	Content
cydin D1$^+$	3	109±4.31 *	6	129±4.23 *	11	134±8.25 *	7	137±12.08	1	141 *	0	–
cydin D1$^-$	17	102±9.01	14	117±9.54	9	127±8.21	2	135±3.56	3	153±5.21	7	163±9.02

*: $P<0.05$ *vs* cyclin D1$^-$

2.4 细胞核 DNA 含量与 P53 蛋白表达的关系

在正常乳腺及不典型增生乳腺中无 P53 蛋白表达,在乳腺癌中 P53 蛋白表达阳性的组织中细胞核 DNA 含量相对较高,见表 3。

表 3 DNA 含量与 P53 蛋白表达的关系

Tab 3 Relationship between DNA content and the expression of P53 protein

Group	Grade Ⅰ of Cancer		Grade Ⅱ of Cancer		Grade Ⅲ of Cancer	
	Case	Content	Case	Content	Case	Content
P53$^+$	1	138	1	157 *	6	165±10.38
P53$^-$	8	135±5.21	3	145±9.23	1	157

*: $P<0.05$ *vs* P53$^-$

2.5 cyclin D1 表达与 P53 蛋白表达的关系

不典型增生乳腺中可见 cyclin D1 表达,P53 表达均阴性,乳腺癌中 cyclin D1 表达也与 P53 表达呈负相关($r=-0.975$, $P<0.05$),P53 蛋白表达阳性乳癌 8 例中 cyclin D1 表达阳性 1 例,P53 表达阴性 12 例中 cyclin D1 表达阳性 7 例。

3 讨论

细胞核 DNA 是细胞遗传物质染色质的基础成分,DNA 含量增加提示细胞处于 S 期,生长活跃。增殖活跃的恶性肿瘤细胞 DNA 含量异常增加。cyclin D1 在细胞周期 $G_1\rightarrow S$ 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中有过度表达,并与预后有关,cyclin D1 在大鼠乳腺癌中的表达尚少见报道。p53 基因为抑癌基因,其产物在细胞周期 G_1 及 S 限制点调控中也起重要作用,WTp53 可通过诱导 $p21^{waf-1/cip-1/edi-1ey}$ 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[4]。体外实验表明 cyclin D1 参与 p53 调控的生长抑制[5]。本研究探讨乳腺癌发生过程中细胞核 DNA 含量变化、P53 蛋白及 cyclin D1 表达三者的关系。

研究显示,大鼠从正常乳腺到乳腺癌发生过程中,以及随着肿瘤组织学分级的增高,细胞核 DNA 含量增加,表明在增生活跃的细胞中 DNA 含量增加,细胞核 DNA 含量反映细胞的增殖状态;在不典型增生乳腺组织中,cyclin D1 表达阳性组织中细胞核 DNA 含量较阴性组织中明显较高($P<0.05$)。而在乳腺癌组织中,cyclin D1 表达阳性组织中 DNA 含量较阴性组织明显较低($P<0.05$),P53 蛋白表达阳性组织中 DNA 含量却较阴性组织高($P<0.05$)。结果显示,在乳腺癌发生过程中,在不典型增生组织中细胞核 DNA 含量与 cyclin D1 表达呈正相关性,而在乳腺癌中则呈负相关性,其机制尚不清楚,可能随着肿瘤组织进展,肿瘤调控机制变化有关,如 P53 蛋白高表达可能影响肿瘤恶性进展及 cyclin D1 表达。

cyclin D1 在大鼠正常乳腺中无过度表达,在不典

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

型增生乳腺(乳腺癌的癌前病变)中的表达呈逐渐增高趋势,77.7%乳腺癌Ⅰ级有表达、25%乳腺癌Ⅱ级过度表达,在组织学Ⅱ级乳癌中无表达,呈现下降趋势,在乳腺癌发生过程中,乳腺癌组织学Ⅰ级中 cyclin D1 表达为高峰阶段。结合 cyclin D1 表达与细胞核 DNA 含量变化的关系,表明 cyclin D1 可能是大鼠乳癌发生中较早期事件,cyclin D1 表达在 DMBA 诱导的大鼠乳腺癌发生过程中有重要作用,但与肿瘤发展无关,至于 cyclin D1 为何在乳腺癌高组织学分级中表达减少,可能在肿瘤发生过程中有 cyclin D1 高表达,而随着肿瘤进展,在某种调控因子作用下 cyclin D1 表达减少。有研究报道某些人体肿瘤 cyclin D1 阳性提示肿瘤的高侵袭性或预后差[6],与本实验结果不一致,其原因尚不明确,是否由于人与大鼠乳癌发生过程基因变化不同,尚有待于进一步的大样本观察及更深入的实验研究。

P53 蛋白在大鼠正常乳腺及不典型增生乳腺中无表达,在乳腺癌中有阳性表达,并随着组织学分级的增高表达的阳性率增高,结合与细胞核 DNA 含量变化的关系,表明可能随着肿瘤发展,p53 基因突变率增高,P53 蛋白过度表达,P53 蛋白过度表达是大鼠乳腺癌发生的晚期事件,与肿瘤的高恶性增殖状态有关。

cyclin D1 表达与 P53 蛋白表达呈显著的负相关性($r=-0.975$, $P<0.05$),cyclin D1 表达主要在不典型增生乳腺及低组织学分级乳腺癌中,而 P53 蛋白表达主要在高组织学分级的乳腺癌组织中,这种显著的负相关性可能表明大鼠乳腺癌中 cyclin D1 表达受 p53 基因功能的影响,有文献[5]报道 WTP53 蛋白可促进 p21WAF1 及 cyclin D1 过度表达,随着肿瘤恶性进展,p53 基因突变增加,突变型 P53 蛋白表达增多,cyclin D1 表达减少。大鼠乳癌 cyclin D1 与 P53 蛋白表达的负相关性,反映了 cyclin D1 表达对野生型 P53 蛋白的依赖性,同时 P53 蛋白高表达也可以影响肿瘤的增殖状态,导致细胞核 DNA 含量增加。

参考文献:

[1] Larie F, Li S M, Labrie C, *et al*. Inhibitory effect of a steroidal antiestrogen on estrone-stimulated growth of 7, 12-dimetheylabenz(a)anthracene (DMBA)-induced mammary carcinoma in the rat[J]. Breast Cancer Res, 1995, 33(2): 237—244.

[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 deratosis and cutanious squamous cell carcinoma in relation to P53 expression[J]. Cutan Pathol, 1998, 22(5): 427—434.

[4] Mansukhani M M, Osborne B M, Zhong J Z, *et al*. The pattern of p53 and p21waf1/cip1immunoreactivity in non-Hodgkin's lymphomas predicts p53 gene status[J]. Diag Mol Patho, 1997, 6(4): 222—229.

[5] Giannino D S, Murphy M, Ruaro E M, Lazarevic D, *et al*. Cyclin D1 and p21/war1 are both involved in P53 growth suppression[J]. Oncogene, 1998, 12(1): 177—183.

[6] Worsley S D, Jenmngs B A, Khalil K H, *et al*. Cyclin D1 amplification and expression in human breast carcinoma: correlation with histological prognostic markers and oestrogen receptor expression[J]. Clin Pathol, 1996, 49(1): 46—50.

(编辑 薛国文)

文章编号: 1000-5404(2003)05-0419-01

个案与短篇

NMP22 在膀胱移行细胞癌诊断中的价值

An evaluation of NMP22 urinary level for the diagnosis of bladder transitional cell carcinoma

万江华, 靳凤烁, 江 军, 李黔生, 姜 庆, 王洛夫, 叶 锦, 孙中义 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所泌尿外科, 重庆 400042)

我们对 85 例有血尿或膀胱刺激症状需要行膀胱镜检查的病人,同时行尿核基质蛋白(Nuclear metrix protein22, NMP22)和细胞学检查,比较其在膀胱癌诊断中的敏感性和特异性。85 例中男 65 例,女 20 例。年龄 17~84 岁,平均 51 岁。病人既往均无膀胱肿瘤史,近期由于血尿、膀胱刺激症状、B 超发现膀胱占位等需行膀胱镜检查。均于镜检前收集病人新鲜自排尿约 80 ml,分别行 NMP22 和脱落细胞学检查。以膀胱镜和活检病理结果作为金标准。NMP22 检测: ELISA 法(美国 Matritech 公司)。尿脱落细胞学检查以发现肿瘤细胞为阳性。统计学分析: NMP22 各组值的比较用非参数检验,计数资料比较采用 χ^2 检验。

本组病理证实膀胱移行细胞癌 28 例。其他疾病 57 例,包括良性前列腺增生 25 例、膀胱炎 11 例、尿石症 10 例、膀胱乳头状瘤和内翻性乳头状瘤各 3 例,肾癌 3 例,其他 2 例。根据 ROC

(下转 422 页)

作者简介: 万江华(1967—),男,湖北省钟祥市人,主治医师,讲师,主要从事膀胱肿瘤方面的研究,发表论文 12 篇。电话: (023)68757639

收稿日期: 2002-02-26; 修回日期: 2002-06-25

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