

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.06.015

乳腺导管原位癌与浸润性导管癌染色体微卫星杂合性缺失的比较

乔峰^{1,2}, 姜晓玲², 李曦洲¹, 施俊义¹, 郑唯强^{1*} (1. 第二军医大学长海医院甲乳外科, 上海 200433; 2. 解放军 88 医院病理科, 山东泰安 271000)

[摘要] 目的: 研究乳腺导管原位癌与浸润性导管癌染色体 3p 区域微卫星杂合性缺失 (loss of heterozygosity, LOH) 的发生情况。方法: 选取本院 2005 年 9 月至 2009 年 2 月手术切除石蜡包埋的乳腺癌组织切块 43 例, 应用激光显微切割技术留取组织中乳腺浸润性导管癌 (invasive ductal type carcinoma, IDC)、导管原位癌 (ductal carcinoma in situ, DCIS) 及正常乳腺组织区域, 采用毛细管电泳测序技术进行了 4 个微卫星位点的 LOH 检测。结果: 40 例乳腺癌患者中, 染色体 3p 区域 D3S1038、D3S1295、D3S1581、D3S3118 等 4 个位点的 LOH 率分别为 25.0% (8/40)、37.5% (15/40)、17.5% (7/40) 和 5.0% (2/40)。IDC 的 LOH 率比 DCIS 稍高 (47.5% vs 37.5%), 但差异无统计学意义。结论: 乳腺导管癌染色体 3P 微卫星 LOH 是肿瘤发生的早期事件, DCIS 的总 LOH 频率已经接近于 IDC。在乳腺癌发展过程中, 新的微卫星位点发生了 LOH。

[关键词] 乳腺癌; 导管原位癌; 浸润性导管癌; 染色体; 微卫星; 杂合性缺失

[中图分类号] R737.9; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)06-0668-04

Comparison of loss of heterozygosity at chromosomal microsatellites in invasive ductal carcinoma and ductal carcinoma *in situ* of breast

QIAO Feng^{1,2}, JIANG Xiao-ling², LI Xi-zhou¹, SHI Jun-yi¹, ZHENG Wei-qiang^{1*} (1. Department of Thyroid and Mammary Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pathology, the 88th Hospital of PLA, Taian 271000, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the loss of heterozygosity (LOH) of microsatellite sites at chromosome 3p in ductal carcinoma in situ (DCIS) and invasive ductal carcinoma (IDC) lesions. **Methods:** Forty-three paraffin blocks were obtained from patients with invasive ductal carcinoma who received surgery (Sep. 2005 to Feb. 2009, Changhai Hospital). The IDC, DCIS and normal tissues were microdissected from paraffin sections. The LOH of 4 microsatellite sites was examined with the application of capillary electrophoresis sequencing techniques. **Results:** In 40 breast cancer cases, the frequencies of LOH at D3S1038, D3S1295, D3S1581 and D3S3118 were 25% (8/40), 37.5% (15/40), 17.5% (7/40) and 5% (2/40), respectively. The frequency of LOH in IDC group was higher than that in DCIS group with no significant difference (47.5% vs 37.5%). **Conclusion:** LOH at chromosome 3P site is an early event in the development of breast ductal carcinoma. The frequency of LOH in DCIS is close to that in IDC. In the development of breast carcinoma, new MS sites have LOH.

[Key words] breast carcinoma; ductal carcinoma *in situ*; invasive ductal type carcinoma; chromosome; microsatellite; loss of heterozygosity

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(6): 668-671]

乳腺癌的发生与发展是多基因参与、多步骤和多阶段的复杂过程。根据多步癌变学说, 正常乳腺上皮经历单纯性增生阶段和不典型增生阶段, 最终发展为原位癌和浸润癌^[1], 其过程是一组而非单一基因的改变^[2]。基因损伤的累积表现为特定肿瘤基因型, 而基因组微卫星 (microsatellite, MS) 位点多态性提供了大量高频的信息。在各种上皮性肿瘤

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30870975)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30870975)

[作者简介] 乔峰 (1974 -), 男, 山东省泰安市人, 硕士, 主要从事乳腺肿瘤方面的研究。E-mail: qfxlk@sina.com

[通信作者] 施俊义 (SHI Jun-yi, corresponding author), E-mail: shijunyi666@126.com。郑唯强 (ZHENG Wei-qiang, corresponding author), E-mail: zhengdoctor@hotmail.com。* 并列通信作者

中,染色体 3p 区域易受到影响,近来在此区域发现了多个抑癌基因,其中最易受影响的是 3p21 区,在 30 多种恶性肿瘤中此区重排率达 50% ~ 100%^[34]。因此本研究选择染色体 3q 区域 D3S1295、D3S1038、D3S1581 及 D3S3118 共 4 个 MS,联合应用激光捕获显微切割与毛细管电泳技术等各种分子生物学方法,比较乳腺癌导管原位癌(ductal carcinoma in situ, DCIS)与浸润性导管癌(invasive ductal type carcinoma, IDC)染色体 3p 区域微卫星杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH)发生情况。

1 材料与方法

1.1 材料

ER、PR、Her-2 及 UltraSensitive TMS-P 超敏免疫组化用试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司,SDS、蛋白酶 K、Taq DNA 聚合酶等购自宝生物工程(大连)有限公司。ABI PRISM 310 Genetic Analyzer 测序仪、Gene Amp PCR System 9700 型 PCR 仪均为美国 ABI 公司产品,Ultrospec 2000 紫外分光光度仪为英国 Oharmacia Biotech 公司产品。Cell Cut Plus 激光显微切割系统产自瑞士 MMI 公司。

43 例乳腺癌组织标本均来自本院 2005 年 9 月至 2009 年 2 月手术切除石蜡包埋切块。行毛细管电泳后信息缺失 3 例,获有效信息者 40 例。40 例患者年龄 32 ~ 71 岁,平均(49.0 ± 10.1)岁。根据 Blom-Richarcisonde 分级标准对所有病例进行评分,其中 I 级 6 例(15%),II 级 24 例(60%),III 级 10 例(25%)。患者一般情况及临床病理学参数、TNM 分期等来源于病历记录。病理分级来源于病理报告。参照 2003 年 WHO 乳腺癌分类标准,经两位病

理医师复习切片,证实每一例标本在组织形态学上同时存在有浸润性导管癌区域、导管原位癌区域以及正常乳腺导管小叶细胞;每例标本均取其中浸润性区域、原位癌区域及正常区域进行研究。

1.2 激光显微切割浸润性导管癌、导管原位癌以及正常乳腺导管细胞

石蜡包埋组织切片(厚度在 6 μm)经脱蜡常规 H-E 染色,在 Cell Cut Plus 激光显微切割系统上切割分离浸润性导管癌、导管原位癌以及正常乳腺导管 3 种目的细胞,每个病例标本的每种细胞不少于 1 mg,收集于相关试管中备用。40 个病例各取 3 种细胞共获得 120 个样本。

1.3 PCR 扩增基因组 DNA

(1) DNA 样品抽提:样品加消化缓冲液、PK 溶液、Tris 饱和酚,水浴离心;70% 乙醇洗涤沉淀,室温晾干 30 min;双蒸水重新溶解沉淀;取 1 μl 测定浓度,核酸定量仪测定 DNA 浓度 > 20 ng/μl 为纳入标准;经 Ultrospec 2000 紫外分光光度仪测量 D 值, D_{260}/D_{280} 比值为 1.8 ~ 2.0 者纳入。余 -20℃ 保存备用。(2) MS 及其引物序列:MS 信息及其引物序列来自文献及 PubMed Home, 荧光引物由上海基康生物技术有限公司提供(表 1)。(3) PCR 扩增的反应体系:在 PCR 仪中进行。反应总体积为 10 μl,其中基因组 DNA 50 ~ 100 ng,上、下游引物各 10 μmol/L (1 μl), TaKaRa ExTaq DNA 聚合酶 2 U, dNTPs 1 μl (25 mmol/L), 10 × ExTag Buffer (Mg^{2+}) 1 μl,加双蒸水补到 10 μl。反应条件为:95℃ 预变性 5 min 后,94℃ 变性 30 s,55℃ ~ 57℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,38 个循环后,72℃ 延伸 10 min。

表 1 MS 引物序列信息
Tab. 1 Information of MS primer sequences

Primer	Information		
	Sequence	Size (bp)	Primers modified category
D3S1295F	ATGGTTTCATGGATACACACA	21	6-FAM
D3S1295R	ATAAGTTTTGATACCCACCCA	21	
D3S1038F	TCCAGTAAGAGGCTTCCTAG	20	6-FAM
D3S1038R	AAAGGGGTTTCAGGAAACCTG	20	
D3S1581F	CTCTTCCCAGTCCCTGTATC	20	6-FAM
D3S1581R	GATTGCACTATGTCTCCAGG	20	
D3S3118F	GCAGGATCTACAAATCATTTTATTG	25	6-FAM
D3S3118R	TGTGAAGGTTTGTAAATAGTCCATG	25	

1.4 毛细管电泳检测 LOH

纯化 PCR 产物后加入模板抑制试剂, 让其充分溶解 DNA 沉淀。在 PCR 仪上 95 °C 变性 5 min 后, 迅速放置在冰中 5 min 以上。然后在 ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer 上用 POP-4 胶、15 kV 于 60 °C 下电泳 28 min。电泳数据经 Genescan 软件(3.1 版)、Genetyper (3.7 版) 处理检测片段大小。

1.5 LOH 判断标准

患者正常组织 DNA 标本为多态标记杂合子, 即出现两个等位基因片段, 才能作为信息个体用于 LOH 分析。与同一个体的正常癌旁组织比较, LOH 是以肿瘤组织中微卫星 DNA 两种等位基因的相对强度比与正常组织等位基因相对强度比之间的比值(allele ratio)作为判定依据。等位基因比值(T1: T2/N1: N2) < 0.6 或 > 1.67 时该位点判为 LOH (T 为肿瘤组织, N 为正常组织)^[5-6]。

1.6 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件, 数据以百分构成比表示, 两种率间差异采用 Pearson 卡方检验, 多个率间单向有序资料采取等级资料的秩和检验, Kruskal-Wallis 法进行多组间两两比较。P < 0.05 或 P < 0.01 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 DCIS 与 IDC 染色体 3p 区微卫星 LOH 情况

微卫星位点基因组经过 PCR 扩增后, 将毛细管电泳获得片段进行基因组扫描(图 1)。电泳图横坐标代表 PCR 产物及内标的碱基数, 纵坐标代表相对荧光信号强度。等位基因比值(T1: T2/N1: N2) < 0.6 或 > 1.67 时该位点判为 LOH。

43 例乳腺癌病例中 40 例具有有效信息。在 DCIS 中有 37.5% (15/40) 病例染色体 3P 微卫星位点发生 LOH, 而在 IDC 中共有 47.5% (19/40) 病例发生 LOH, 虽然发生率数值比 DCIS 组大, 但两组间比较 LOH 差异无统计学意义($\chi^2 = 0.8184, P = 0.3656$)。

2.2 4 个 3p 微卫星位点 LOH 在 DCIS 和 IDC 中发生率的差别

4 个位点中, D3S1038 LOH 率为 25% (8/40), 其中 3 例 IDC 发生 LOH, 1 例 DCIS 发生 LOH, 4 例 IDC 及 DCIS 同时发生 LOH; D3S1295 杂合性缺失率为 37.5% (15/40), 其中 6 例 IDC 发生 LOH, 1 例 DCIS 发生 LOH, 8 例 IDC 及 DCIS 同时发生 LOH; D3S1581 LOH 率为 17.5% (7/40), 其中 2 例 IDC 发生 LOH, 2 例 DCIS 发生 LOH, 3 例 IDC 及 DCIS 同时

发生 LOH; D3S3118 LOH 率为 5% (2/40), 2 例均为 IDC 发生 LOH。4 个位点 LOH 发生率不同(P = 0.0039), 其中两两对比发现, D3S1295 与 D3S3118 间的 LOH 发生率差异有统计学意义(P < 0.01), 而 D3S1295 与 D3S1038 及 D3S1581 三者之间两两对比差异无统计学意义(P > 0.05)。

具体分析每个位点与组织学类型的关系, D3S1581 的 LOH 率在 IDC、DCIS 两组中相同, 均为 12.5% (5/40); 而另 3 个位点的 LOH, IDC 组均比 DCIS 组发生率略高, 但无统计学意义(P > 0.05, 表 2)。

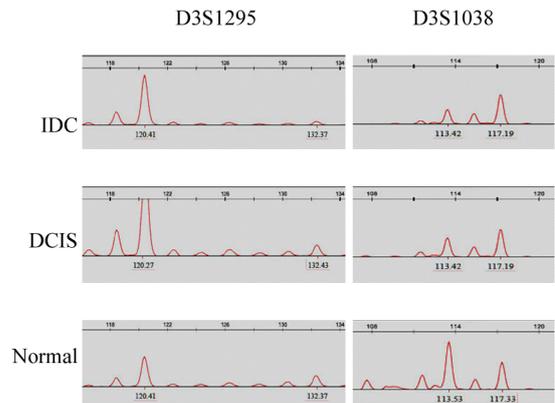


图 1 DCIS 与 IDC 染色体 D3S1295 和 D3S3118 位点的 LOH
Fig. 1 LOH at D3S1295 and D3S3118 on chromosomes of DCIS and IDC

表 2 4 个 3P 微卫星位点 LOH 在 IDC 和 DCIS 中发生率的差别[n(%)]

Tab. 2 Differences in the incidence of LOH at 4 MS on 3P in IDC and DCIS [n(%)]

Type	D3S1038	D3S1295	D3S1581	D3S3118P
IDC	7(17.5)	14(35.0)	5(12.5)	2(5.0)
DCIS	5(12.5)	9(22.5)	5(12.5)	0(0.0)

3 讨 论

乳腺癌基因组发生等位基因丢失的有 1p、3p、6q、8p21 ~ 22、9p、11q、11p、13q12 ~ 13、16q、17p、17q 等^[7]染色体区域, 而 3 号染色体短臂等位基因缺失在许多肿瘤均有发现。据有关报道, 3p14(缺失频率为 11% ~ 44%)^[8-9]、3p21 ~ 22(69%)、3p24 ~ 26(30% ~ 48%)^[10-11]为缺失率最高的 3 个区域。本研究选择的 D3S1295、D3S1038、D3S1581 及 D3S3118 共 4 四个 MS 位点分别位于 3p14. 3、3p25. 3、3p14. 3 及 3p21. 3 染色体区域, 其对应基因分别为 FHIT、VHL、FLNB 及 TVSC2。

4个位点中D3S1295的LOH在40例乳腺癌患者中检出率最高(37.5%),其中DCIS检出率为22.5%,IDC检出率为35%。D3S1295的LOH是FHIT蛋白表达下调可能的分子机制之一,研究^[12-13]已证实,FHIT的低表达在乳腺癌的发生、发展过程中起着重要的作用,说明该MS的LOH是乳腺癌发病的重要启动子之一。D3S1038的LOH检出率为25%,其中DCIS检出率为12.5%,IDC检出率为17.5%。其所定位的VHL基因是已知重要肿瘤抑制基因(tumor suppressor gene, TSG)之一,文献^[14]报道,VHL低表达与乳腺癌浸润及淋巴结转移有关。经文献检索,未见D3S1581、D3S3118及其对应基因的相关报道,在本研究发现,D3S1581的LOH总检出率为17.5%,其中DCIS检出率为12.5%,IDC检出率为12.5%。D3S1581的LOH率与D3S1038及D3S1295之间差异无统计学意义。因此可以认为,D3S1581的LOH与乳腺癌的发生密切相关,其所对应基因FLNB很可能是乳腺癌的重要TSG之一。D3S3118的LOH在40例患者中仅仅检测出2例,但检出的两例均位于IDC,而DCIS中未有发现。

40例乳腺癌患者中,15例(37.5%)于DCIS发生LOH,而19例(47.5%)于IDC发生LOH。其中有13例(32.5%)患者于DCIS和IDC同时发生LOH;共有21例(52.5%)患者发生MS的LOH,其中3例(7.5%)有3个MS发生LOH,5例(12.5%)有2个MS发生LOH,13例(32.5%)有1个MS发生LOH。可看出,随着乳腺由DCIS向IDC的进展,发生LOH的MS位点明显增多,提示在乳腺癌发展的过程中,新的MS位点发生了LOH,证实了乳腺癌的发生发展是多个遗传物质改变积累的结果^[15]。本研究中显示,DCIS组的LOH频率已接近IDC组。Zikan等^[16]也发现有相当一部分DCIS的分子模式类似于IDC,认为这些分子变化可以作为DCIS发展为IDC的标记。

本研究中乳腺癌LOH的检出率低于既往的报道^[17],其主要原因可能是由于应用激光捕获显微切割,使精确分离目标细胞成为可能,联合毛细管电泳技术所产生的数据更加准确可信,Taylor等^[18]对此原因已做了证实。

[参考文献]

- [1] Maitra A, WISTUBA II, Washington C, et al. High-resolution chromosome 3p allelotyping of breast carcinomas and precursor lesions demonstrates frequent loss of heterozygosity and a discontinuous pattern of allele loss [J]. *Am J Pathol*, 2001, 159(1): 119-130.
- [2] Kumar M, Zhao X, Wang XW. Molecular carcinogenesis of hepato-

cellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma: One step closer to personalized medicine? [J]. *Cell Biosci*, 2011, 1(1): 5-17.

- [3] Braga E, Loginov W, Khodyrev D, et al. A novel MECA3 region in human 3p21.3 harboring putative tumor suppressor genes and oncogenes [J]. *Exp Oncol*, 2011, 33(1): 33-41.
- [4] Schwarzenbach H, Müller V, Milde-Langosch K, et al. Evaluation of cell-free tumour DNA and RNA in patients with breast cancer and benign breast disease [J]. *Mol Biosyst*, 2011, 7(10): 2848-2854.
- [5] Canzian F, Salovaara R, Hemminki A, et al. Semiautomated assessment of loss of heterozygosity and replication error in tumors [J]. *Cancer Res*, 1996, 56(14): 3331-3337.
- [6] Zhou C Z, Peng Z H, Zhang F, et al. Loss of heterozygosity on long arm of chromosome 22 in sporadic colorectal carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(4): 668-673.
- [7] Ruppert J M, Wright M, Rosenfeld M et al. Gene therapy strategies for carcinoma of the breast [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1997, 44(2): 93-114.
- [8] Kollias J, Man S, Marafie M, et al. Loss of heterozygosity in bilateral breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2000, 64(4): 241-251.
- [9] Matsumoto S, Minobe K, Utada Y, et al. Loss of heterozygosity at 3p24-p25 as a prognostic factor in breast cancer [J]. *Cancer Lett*, 2000, 152(1): 63-69.
- [10] Maitra A, WISTUBA II, Washington C, et al. High-resolution chromosome 3p allelotyping of breast carcinomas and precursor lesions demonstrates frequent loss of heterozygosity and a discontinuous pattern of allele loss [J]. *Am J Pathol*, 2001, 159(1): 119-130.
- [11] Sourvinos C, Miyakis S, Liloglou TL, et al. Von Hippel-Lindau tumour suppressor gene is not involved in sporadic human breast cancer [J]. *Tumour Biol*, 2001, 22(3): 131-136.
- [12] 陈周, 吴君辉. Fhit在乳腺癌进展过程中的表达和意义 [J]. *中国当代医药*, 2010, 17(8): 13-14.
- [13] Ismail HM, Medhat AM, Karim AM, et al. FHIT gene and flanking region on chromosome 3p are subjected to extensive allelic loss in Egyptian breast cancer patients [J]. *Mol Carcinog*, 2011, 50(8): 625-634.
- [14] 蒋莉, 路名芝, 刘勇, 等. 乳腺癌组织中PTEN、VHL的表达及其对HIF-1 α 的影响 [J]. *浙江医学*, 2007, 29(11): 1152-1154, 1175.
- [15] Amari M, Moriya T, Ishida T, et al. Loss of heterozygosity analyses of asynchronous lesions of ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the human breast [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2003, 33(11): 556-562.
- [16] Zikan M, Pavlista D, Velenska Z, et al. Analyses of LOH and expression in healthy gland, DCIS and invasive breast cancer gland [J]. *Ceska Gynecol*, 2009, 74(2): 102-105.
- [17] 付琼, 姚根有, 汤绚丽, 等. 乳腺癌与癌前病变的微卫星不稳定性与3p杂合性缺失 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2007, 29(1): 34-40.
- [18] Taylor TB, Nambiar PR, Raja R, et al. Microgenomics: Identification of new expression profiles via small and single-cell sample analyses [J]. *Cytometry*, 2004, 59A(2): 254-261.

[收稿日期] 2011-08-15 [修回日期] 2011-10-09

[本文编辑] 韩丹