

此 Stieber^[1]认为血清 Pro - GRP 设为 200pg/ml 可作为无症状健康人群的筛查的界值,可有效避免假阳性结果。

参考文献

- 1 Stieber P. Pro - gastrin - releasing peptide (ProGRP) - a diagnostic biomarker for small - cell lung cancer[J]. *China J Lung Cancer*, 2009, 12 (3) : 183 - 186
- 2 Molina R, Holdenrieder S, Auge JM, *et al.* Diagnostic relevance of circulating biomarkers in patients with lung cancer[J]. *Cancer Biomark*, 2010, 6(3 - 4) : 163 - 178
- 3 康淑霞, 朱安友. 胃泌素释放肽前体实验室检测及临床应用进展[J]. *中华全科医学*, 2012, 10(1) : 88 - 90
- 4 Komatsu T, Oizumi Y, Kunieda E, *et al.* Definitive chemoradiotherapy of limited - disease small cell lung cancer: retrospective analysis of new predictive factors affecting treatment results[J]. *Oncol Lett*, 2011, 2 (5) : 855 - 860

- 5 胡志坚. 血清 NSE、pro - GRP、MMP - 9、CEA 联合检测在肺癌诊断中的应用[J]. *山东医药*, 2011, 34: 86 - 87
- 6 赵先文, 荆洁线, 韩存之, 等. 小细胞肺癌血清 ProGRP 与神经性烯醇化酶同步检测的临床价值及其相关性[J]. *肿瘤研究与临床*, 2011, 23(8) : 518 - 521
- 7 王慧杰, 李学祥, 高佳, 等. 血清 ProGRP、TPS 和 NSE 在小细胞肺癌患者治疗监测中的应用[J]. *中华检验医学杂志*, 2011, 34(2) : 152 - 157
- 8 Wójcik E, Kulpa JK, Sas - Korczyńska B, *et al.* ProGRP and NSE in therapy monitoring in patients with small cell lung cancer[J]. *Anticancer Res*, 2008, 28(5B) : 3027 - 3033
- 9 Nordlund MS, Bjerner J, Warren DJ, *et al.* Progastrin - releasing peptide: stability in plasma / serum and upper reference limit[J]. *Tumour Biol*, 2008, 29(3) : 204 - 210

(收稿日期: 2013 - 06 - 15)

(修回日期: 2013 - 07 - 04)

乳腺浸润性导管癌 Mus81 表达的检测及其意义

钱 颖 孙 荷 吕 娟 吴云路 董学君

摘 要 **目的** 研究乳腺浸润性导管癌组织中 Mus81 的表达及意义。**方法** 采用反转录 - 聚合酶链反应 (RT - PCR) 和 Western blot 检测 39 例乳腺浸润性导管癌病灶组织及其对应的癌旁组织、15 例乳腺纤维腺瘤组织中 Mus81 mRNA 和蛋白的表达情况。**结果** 乳腺浸润性导管癌病灶组织中 Mus81 阳性率为 66.67% (26/39), 低于癌旁组织 (100%), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。乳腺纤维腺瘤组织中 Mus81 阳性率 (100%) 与癌旁组织无差别。乳腺浸润性导管癌病灶组织 Mus81 mRNA 和蛋白平均表达水平低于癌旁组织, 差异有统计学意义 ($t = -6.546, P < 0.01$; $t = -4.264, P < 0.01$); 乳腺浸润性导管癌病灶组织 Mus81 mRNA 和蛋白平均表达水平低于乳腺纤维腺瘤组织, 差异有统计学意义 ($t = -6.117, P < 0.01$; $t = -3.566, P < 0.01$); 癌旁组织 Mus81 mRNA 和蛋白平均表达水平低于乳腺纤维腺瘤组织, 差异无统计学意义 ($t = -0.519, P > 0.05$; $t = -2.128, P > 0.05$)。Mus81 表达水平与乳腺癌 TNM 分期有关, 处于 TNM 分期 0、I 期的乳腺浸润性导管癌组织 Mus81 mRNA 和蛋白平均表达水平高于 II、III、IV 期, 差异有统计学意义 ($t = 2.297, P < 0.05$; $t = 2.763, P < 0.05$); Mus81 表达水平与患者年龄、肿瘤大小、腋窝淋巴结转移无关 ($P > 0.05$)。**结论** Mus81 在乳腺浸润性导管癌中表达下调且与肿瘤 TNM 分期相关, 检测 Mus81 的表达情况有助对乳腺浸润性导管癌的病期评估。

关键词 乳腺浸润性导管癌 Mus81 RT - PCR Western blot

Detection and Significance of Mus81 in Breast Invasive Ductal Carcinoma. Qian Ying, Sun He, Lu Juan, Wu Yunlu, Dong Xuejun. School of Laboratory Medicine and Life Science of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325035, China

Abstract Objective To explore the expression and significance of Mus81 in breast invasive ductal carcinoma tissues. **Methods** The expression of Mus81 mRNA and protein was detected in 39 human breast invasive ductal carcinoma tissues and 39 paired paracancerous tissues as well as 15 breast fibroadenoma tissues by RT - PCR and Western blot. **Results** Mus81 was positive in 26 of 39 breast invasive ductal carcinoma tissues. The expression of Mus81 in breast invasive ductal carcinoma tissues was significantly lower than in that of paracancerous tissues ($t = -6.546, P < 0.01$; $t = -4.264, P < 0.01$). Mus81 expression in breast invasive ductal carcinoma tis-

基金项目: 浙江省医药卫生平台重点资助项目 (2013ZDA024); 浙江省重点科技创新团队 (2012R10048 - 09); 浙江省市共建重点学科 (GJSX - 010 - 003)

作者单位: 325035 温州医科大学检验医学院、生命科学学院 (钱颖、吴云路、董学君); 312000 浙江省绍兴市人民医院、浙江大学绍兴医院临床检验中心 (孙荷、吕娟、董学君)

通讯作者: 董学君, 电子信箱: dxj9666@163.com

sues was markedly lower than in that of breast fibroadenoma tissues ($t = -6.117, P < 0.01; t = -3.566, P < 0.01$). Compared with the breast fibroadenoma tissues, the expression of Mus81 mRNA and protein in paracancerous tissues was decreased ($t = -0.519, P > 0.05; t = -2.128, P > 0.05$). The expression of Mus81 mRNA and protein was correlated with TNM stages ($t = 2.297, P < 0.05; t = 2.763, P < 0.05$). No significant association of abnormal Mus81 expression with factors such as age of patients, size of tumor, lymph node metastasis, was observed ($P > 0.05$). **Conclusion** The Mus81 expression levels were decreased significantly in breast invasive ductal carcinoma tissues, which was correlated with high TNM stages, indicating that detection of Mus81 helps the assessment of breast invasive ductal carcinoma.

Key words Breast invasive ductal carcinoma; Mus81; RT-PCR; Western blot

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤,其发病率已占全球妇科肿瘤的 31%^[1]。近年来,乳腺癌发病率在我国也进入了高速增长阶段,目前上海的乳腺癌患病率已达到 70/10 万^[2]。有研究表明 Mus81 基因突变与乳腺癌患病关系密切^[3]。本研究采用 RT-PCR、Western blot 两种方法检测乳腺癌常见病理类型—乳腺浸润性导管癌病灶组织中 Mus81 的表达情况,并以癌旁组织和乳腺纤维腺瘤组织为对照,探讨 Mus81 在乳腺浸润性导管癌中的表达及意义。

材料与方法

1. 材料:收集笔者医院乳腺浸润性导管癌手术切除标本 39 例(包括对应的癌旁组织)、乳腺纤维腺瘤手术切除标本 15 例。组织标本于切下 20min 内分装并置于液氮中速冻,后转存于 -70°C 低温冰箱用于 PCR 和 Western blot 检测。所有标本均来源于女性,乳腺浸润性导管癌患者年龄 34~90 岁,平均年龄 55 岁。乳腺纤维腺瘤患者年龄 20~60 岁,平均年龄 41 岁。所有患者术前未经放疗,术后经两位病理医师确诊。同时收集患者的临床病理资料,包括年龄、肿瘤大小、TNM 分期、腋窝淋巴结转移。

2. PCR 检测:(1)组织总 RNA 及蛋白提取:取 30mg 新鲜组织加入液氮研磨后,按 E. Z. N. A.® Total DNA/RNA/Protein Kit(美国 OMEGA)说明书提取组织总 RNA 和蛋白。所提取的总 RNA 用 Thermo NANO DROP2000 分光光度计(美国 Thermo)测定浓度及纯度,OD260/OD280 比值在 1.7~2.0 为最佳。1.5% 琼脂糖凝胶分析 RNA 的完整性。(2)RT-PCR:按照 BioRT cDNA 试剂盒(杭州博日科技)说明书,将 1 μg 总 RNA 反转录成 cDNA 后,进行 PCR 反应。Mus81 上游引物:5'-TGTGGACATTGGCGAGAC-3',下游引物:5'-GCTGAGGT-TGTGGACGGA-3'(产物长度 319bp); β -actin 上游引物:5'-ACCCACACTGTGCCCATCTAC-3',下游引物:5'-TCGGT-GAGGATCTTCATGAGGTA-3'(产物长度 108bp)。引物均由上海生工生物公司合成。PCR 反应体系:25 μl ,包括 Taq MasterMix 12.5 μl 、上下游引物各 1 μl 、cDNA 2 μl 、去离子水 8.5 μl 。PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2min,然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 30s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30s,35 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 5min。取 5 μl PCR 终产物进行琼脂糖凝胶电泳。使用 ChemiDocTM XRS 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad)进行灰度扫描、Quantity One-4.6.2 分析结

果。以同一标本 Mus81 基因条带与内参基因 β -actin 条带的光密度比值作为 Mus81 的相对表达量。

3. Western blot 检测:所用一抗、二抗均购自 Abcam 公司。使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(江苏碧云天)测定蛋白浓度,取等量蛋白进行 100V 恒压 SDS-PAGE 电泳,300mA 恒流转膜。丽春红(北京索莱宝)染色 5min,确定转膜效果,蒸馏水洗膜去除染液。5% BSA 室温封闭 2h 后,分别加入 Mus81 鼠抗人抗体(1:1000)、 β -actin 鼠抗人抗体(1:3000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。弃一抗,TBST 洗膜 3 次,每次 15min。加入辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠抗体(1:10000)室温孵育 1h。弃二抗,TBST 洗膜 3 次,每次 15min。最后滴加 ECL 化学发光 A、B 液(江苏碧云天),曝光、显影、定影。使用 ChemiDocTM XRS 凝胶成像系统进行灰度扫描、Quantity One-4.6.2 分析结果,以同一标本 Mus81 蛋白条带与 β -actin 蛋白条带的光密度比值作为 Mus81 蛋白的相对表达量。 β -actin 和 Mus81 蛋白分别为 42kDa 和 66kDa。

4. 统计学方法:采用统计软件 SPSS 17.0 分析数据。计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。比较癌组织、癌旁组织与良性病变组织 Mus81 表达量的差异用 t 检验,阳性率的差异用卡方检验。所有检验均为双侧检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. 乳腺组织总 RNA 浓度及完整性分析:分别提取乳腺浸润性导管癌病灶组织、癌旁组织、乳腺纤维腺瘤组织的总 RNA,用紫外分光光度计测定浓度和纯度。经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳可见 28S、18S、5S 3 条明亮条带(图 1),表明 RNA 无降解,符合实验要求。

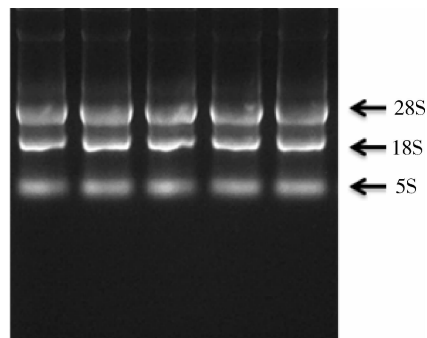


图 1 总 RNA 凝胶电泳

2. 乳腺浸润性导管癌病灶组织中 Mus81 表达情况:66.67% (26/39) 乳腺浸润性导管癌病灶组织可通过 RT-PCR 检测到 Mus81 mRNA, 阳性率低于癌旁的 100% ($P < 0.05$)。乳腺纤维腺瘤 Mus81 mRNA 阳性率为 100%, 与癌旁组织无差别 (图 2A)。乳腺浸润性导管癌病灶组织 Mus81 mRNA 平均表达水平 (0.301 ± 0.068) 低于癌旁组织 (0.556 ± 0.076), 差异有统计学意义 ($t = -6.546, P < 0.01$); 乳腺浸润性导管癌病灶组织 Mus81 mRNA 平均表达水平 (0.301 ± 0.068) 低于乳腺纤维腺瘤组织 (0.583 ± 0.082), 差异有统计学意义 ($t = -6.117, P < 0.01$)。癌旁组织 Mus81 mRNA 平均表达水平 (0.556 ± 0.076) 低于乳腺纤维腺瘤组织 (0.583 ± 0.082), 差异无统计学意义 ($t = -0.519, P > 0.05$) (图 2C)。另采用 West-

ern blot 方法检测相同标本中 Mus81 蛋白的表达水平, 乳腺浸润性导管癌病灶组织 Mus81 蛋白阳性率为 66.67% (26/39) 低于癌旁的 100% ($P < 0.05$)。全部乳腺纤维腺瘤可检测到 Mus81 蛋白, 与癌旁组织无差别 (图 2B)。乳腺浸润性导管癌组织 Mus81 蛋白平均表达水平 (0.398 ± 0.068) 低于癌旁组织 (0.613 ± 0.069), 差异有统计学意义 ($t = -4.264, P < 0.01$); 乳腺浸润性导管癌组织 Mus81 蛋白平均表达水平 (0.398 ± 0.068) 低于乳腺纤维腺瘤组织 (0.700 ± 0.093), 差异有统计学意义 ($t = -3.566, P < 0.01$)。癌旁组织 Mus81 蛋白平均表达水平 (0.613 ± 0.069) 低于乳腺纤维腺瘤组织 (0.700 ± 0.093), 差异无统计学意义 ($t = -2.128, P > 0.05$) (图 2C)。

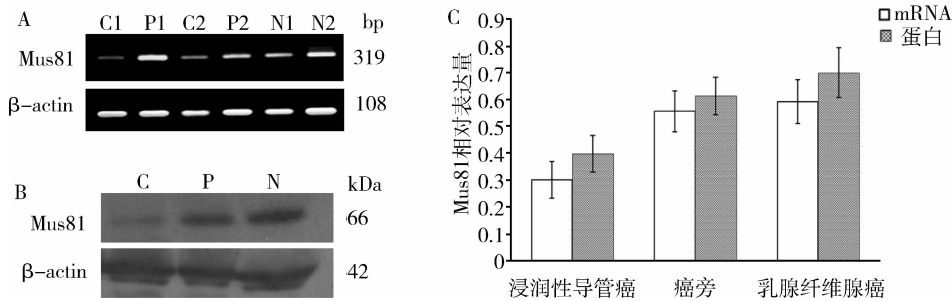


图 2 乳腺浸润性导管癌组织中 Mus81 mRNA 和蛋白表达情况

A. RT-PCR 检测 Mus81 mRNA 的表达, C 为乳腺浸润性导管癌组织, P 为癌旁组织, N 为乳腺纤维腺瘤组织; B. Western blot 检测 Mus81 蛋白的表达; C. Mus81 平均表达水平, 乳腺浸润性导管癌组织低于癌旁组织 ($P < 0.01$), 癌旁组织低于乳腺纤维腺瘤组织 ($P > 0.05$)

3. Mus81 表达水平与乳腺浸润性导管癌临床病理特征的关系: 0 期、I 期乳腺浸润性导管癌病灶组织 Mus81 mRNA 和蛋白平均表达水平 ($0.429 \pm 0.101, 0.553 \pm 0.042$) 高于 II、III、IV 期 ($0.293 \pm$

$0.064, 0.321 \pm 0.047$), 差异具有统计学意义 ($t = 2.297, P < 0.05; t = 2.763, P < 0.05$, 表 1)。Mus81 表达水平与患者年龄、肿瘤大小、腋窝淋巴结转移无关 (表 1)。

表 1 Mus81 表达水平与乳腺浸润性导管癌临床病理特征的关系

临床病理指标	n	Mus81 mRNA		Mus81 蛋白	
		相对表达量	P	相对表达量	P
年龄 (岁)					
≤50	16	0.356 ± 0.087	0.323	0.408 ± 0.082	0.846
>50	23	0.350 ± 0.072		0.385 ± 0.109	
肿瘤大小 (cm)					
≤2	13	0.333 ± 0.063	0.702	0.417 ± 0.055	0.726
>2	26	0.312 ± 0.061		0.375 ± 0.089	
TNM 分期					
0、I	9	0.429 ± 0.101	0.027	0.553 ± 0.042	0.028
II、III、IV	30	0.293 ± 0.064		0.321 ± 0.047	
腋窝淋巴结转移					
阴性	20	0.328 ± 0.059	0.501	0.442 ± 0.046	0.395
阳性	19	0.292 ± 0.070		0.343 ± 0.082	

讨 论

Mus81 是在近年发现的 DNA 修复基因^[4]。Mus81 基因编码的同名蛋白属于 XPF 核酸内切酶家族,具有一个解旋酶结构域、一个核酸内切酶结构域、两个螺旋-发卡-螺旋结构^[5]。Mus81 具有处理复制叉停滞、复制失败、游离 3'端和 X 形霍迪利连接(Holliday junctions)等功能,对于 DNA 损伤修复以及维护染色体稳定性至关重要^[6~8]。染色体不稳定以及 DNA 损伤是癌症细胞的主要特征^[9]。有研究表明 Mus81 mRNA 在人结肠癌等恶性肿瘤病灶组织中表达下调,敲除 Mus81 基因会使小鼠极易患乳腺癌等各种肿瘤,Mus81 基因 rs545500 位点碱基由鸟嘌呤突变为胞嘧啶者乳腺癌患病风险增加^[3,10,11]。目前未见文献报道 Mus81 在人乳腺癌组织中表达情况及意义。

乳腺浸润性导管癌是乳腺癌非常常见的病理类型。笔者采用 RT-PCR 和 Western blot 检测乳腺浸润性导管癌病灶组织 Mus81 mRNA 及蛋白的表达情况,探讨 Mus81 与乳腺浸润性导管癌发生发展的关系。研究结果显示,乳腺浸润性导管癌病灶组织 Mus81 mRNA 阳性率低于癌旁、乳腺纤维腺瘤;且乳腺浸润性导管癌病灶组织 Mus81 mRNA 平均表达水平低于癌旁组织和乳腺纤维腺瘤组织。笔者同时用 Western blot 检测了相同标本中 Mus81 蛋白的表达水平,Mus81 蛋白与 Mus81 mRNA 表达情况一致,说明 Western blot 以及 RT-PCR 两种方法都稳定可靠,Mus81 翻译和转录相互协调一致。Mus81 在乳腺浸润性导管癌组织中表达降低,提示 Mus81 缺失或者表达降低可能参与了乳腺肿瘤恶变。笔者推测,Mus81 mRNA 降低导致 Mus81 蛋白降低,当 Mus81 蛋白缺失或表达降低时,Mus81 不能及时有效地断裂 DNA 双链、处理受损复制叉,导致基因组不稳定性 and 癌变,但具体的分子机制有待深入研究。

分析 Mus81 表达水平与乳腺浸润性导管癌临床病理特征的关系得出,Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ期乳腺浸润性导管癌病灶组织 Mus81 mRNA 和蛋白平均表达水平低于 0、Ⅰ期,提示 Mus81 表达高低与乳腺浸润性导管癌 TNM 分期有关,可用于病程进展评估。由于 TNM 分期越高肿瘤患者预后越差,Wu 等^[10]也证实 Mus81

对结肠癌患者预后评估具有重要意义^[10]。笔者推测 Mus81 可作为乳腺癌预后评估的分子指标,但需要做随访进一步证明。

综上所述,Mus81 在乳腺浸润性导管癌病灶组织中表达下调,且该基因表达量与乳腺癌 TNM 分期有关,表明 Mus81 参与了乳腺浸润性导管癌的发生发展。进一步研究 Mus81 在乳腺癌中如何表达调控,将有助于阐明乳腺癌发生发展的分子机制。

参考文献

- 1 Liu SH, Liu YF, Liou SH, *et al.* Mortality and cancer incidence among physicians of traditional Chinese medicine: a 20-year national follow-up study[J]. *Occup Environ Med*, 2010, 67(3): 166-169
- 2 杨坤, 任建强. 乳腺癌肿瘤标志物的研究现状及展望[J]. *临床和实验医学杂志*, 2011, 10(21): 1711-1713
- 3 Loizidou MA, Cariolou MA, Neuhausen SL, *et al.* Genetic variation in genes interacting with BRCA1/2 and risk of breast cancer in the Cypriot population[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, 121(1): 147-156
- 4 Boddy MN, Gaillard PH, McDonald WH, *et al.* Mus81 - Emel are essential components of a Holliday junction resolvase[J]. *Cell*, 2001, 107(4): 537-548
- 5 Enzlin JH, Scharer OD. The active site of the DNA repair endonuclease XPF - ERCC1 forms a highly conserved nuclease motif[J]. *EMBO J*, 2002, 21(8): 2045-2053
- 6 Osman F, Whitby MC. Exploring the roles of Mus81 - Emel/Mms4 at perturbed replication forks[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2007, 6(7): 1004-1017
- 7 Hanada K, Budzowska M, Davies SL, *et al.* The structure-specific endonuclease Mus81 contributes to replication restart by generating double-strand DNA breaks[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, 14(11): 1096-1104
- 8 Murfuni I, Nicolai S, Baldari S, *et al.* The WRN and MUS81 proteins limit cell death and genome instability following oncogene activation[J]. *Oncogene*, 2013, 32(5): 610-620
- 9 Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability - an evolving hallmark of cancer[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(3): 220-228
- 10 Wu F, Shirahata A, Sakuraba K, *et al.* Downregulation of Mus81 as a novel prognostic biomarker for patients with colorectal carcinoma[J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(2): 472-477
- 11 McPherson JP, Lemmers B, Chahwan R, *et al.* Involvement of mammalian Mus81 in genome integrity and tumor suppression[J]. *Science*, 2004, 304(5678): 1822-1826

(收稿日期:2013-06-11)

(修回日期:2013-06-24)