

• 论 著 •

人 BRIT1 基因在宫颈癌组织中的表达及其临床意义分析*

麦 力, 王 玎, 胡 琴, 聂 红, 赵 清, 陈维贤, 邓淋曼[△]

(重庆医科大学附属第二医院检验科 400010)

摘 要:目的 检测宫颈癌组织和配对的宫颈非癌组织中的 BRIT1 表达情况,比较两者之间的表达差异。方法 分别应用实时荧光 PCR(RT-PCR)、免疫组化技术检测宫颈癌组织及其配对的宫颈非癌组织中 BRIT1 mRNA 和蛋白的表达水平,分析 BRIT1 蛋白表达水平与患者年龄、肿瘤大小、肿瘤类型、肿瘤的病理分级和临床分期之间的关系。结果 RT-PCR 结果揭示宫颈癌组织中 BRIT1 mRNA 的表达水平低于配对的宫颈非癌组织,差异有统计学意义($P < 0.05$);免疫组化技术结果揭示 63 例标本中的 44 例(69.8%)宫颈癌组织 BRIT1 蛋白表达水平低于配对的宫颈非癌组织,差异有统计学意义($P < 0.05$);在高级的病理分级和临床分期中,BRIT1 蛋白的表达减少更为明显。结论 BRIT1 在宫颈癌癌组织和非癌组织中的表达差异提示 BRIT1 可能在宫颈癌的发生、发展中具有一定的作用。

关键词:BRIT1; 宫颈癌; 免疫组化; 实时荧光定量 PCR

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.14.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)14-1904-03

Analysis of human BRIT1 expression and its clinical significance in cervical cancer*

MAI Li, WANG Ding, HU Qin, NIE Hong, ZHAO Qing, CHEN Weixian, DENG Linman[△]

(Department of Clinical Laboratory, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To detect the expression of BRIT1 in cervical cancer tissues and cervical noncancer tissues, and to analyze the differences between the two tissues. Methods The expression of BRIT1 mRNA and protein in cervical cancer tissues and the paired cervical noncancer tissues was evaluated by RT-PCR and immunohistochemistry. Its correlation with the clinicopathological parameters including age, tumor types, size, tumor pathological grade and clinical stage was analyzed. Results RT-PCR results showed that the BRIT1 mRNA level in cervical cancer tissues was significantly lower than that in the paired cervical noncancer tissues, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The immunohistochemistry results showed that the BRIT1 protein expression level in 44 cases of 63 (69.8%) samples was slower than that in the paired cervical noncancer tissues, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); In high pathological grades and high clinical stages, the decrease of BRIT1 protein expression was more significant. Conclusion The difference of the BRIT1 expression between the cervical cancer tissues and cervical noncancer tissues suggests that BRIT1 may play a certain role in the occurrence and development of cervical cancer.

Key words: BRIT1; cervical cancer; immunohistochemistry; real time-PCR

宫颈癌是癌细胞起源于子宫颈的恶性肿瘤,又称子宫颈癌。宫颈癌是全球第三位高发的女性恶性肿瘤,是引起全球女性死亡的第四大“肿瘤杀手”^[1]。据世界卫生组织统计,仅 2010 年全球新发宫颈癌病例 52.9 万,死亡病例 27.5 万,病死率高达 52%,其中 88% 的死亡病例发生在发展中国家^[1]。宫颈癌是导致女性死亡的一个主要疾病。因此,进一步研究宫颈癌发生、发展的分子机制,研究开发新的宫颈癌诊断和治疗方法,具有重要的理论和现实意义。BRIT1(BRCT-repeat inhibitor of hTERT expression)又称 MCPH1(microcephalin),是以大脑体积减小及智力迟钝为特征的原发性小头畸形的主要致病基因之一,因此该基因也称作小脑症基因^[2]。目前研究证实 BRIT1 基因是 DNA 损伤应答通路中一个重要分子^[3]。DNA 损伤应答是机体早期抵御肿瘤发生的重要防线,因此推测 BRIT1 在肿瘤的发生、发展中扮演着重要作用。然而目前,BRIT1 在宫颈癌组织中的表达和其潜在功能尚未得到证实。因此研究 BRIT1 在宫颈癌组织中的表达及临床意义,对认识宫颈癌的发生和发展机制有着重要的理论意义,同时可能为宫颈癌的诊断和靶向治疗提供重要的理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 63 对宫颈标本包括宫颈癌组织和同一病例的宫颈非癌组织,采集于重庆医科大学附属第一医院。所有标本的病理资料包括患者年龄、肿瘤分型、肿瘤大小、肿瘤的病理分级和临床分期等。每份组织标本分成 2 份:一份由 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片用于免疫组织化学分析;另一份液氮冻存,用于提取总 RNA,用于实时荧光 PCR(RT-PCR)分析。

1.2 试剂 RNA 提取试剂盒 Trizol 购自美国 Invitrogen 公司,cDNA 逆转录试剂盒、RT-PCR 试剂盒购自大连宝生物公司,BRIT1 一抗购自 Abcam 公司;HRP 标记的 IgG 二抗购自北京鼎国生物技术公司;免疫组化试剂盒购自碧云天生物技术公司。

1.3 方法

1.3.1 PCR 检测宫颈癌组织中 BRIT1 mRNA 的表达 提取宫颈组织中的 RNA,在逆转录酶作用下合成 cDNA,将 cDNA 稀释 10 倍后进行 RT-PCR 反应。反应体系:SYBR Premix Ex TaqTM II 5 μ L,上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.1 μ L, cDNA 模板 1 μ L, ddH₂O 3.8 μ L。引物序列如下:BRIT1 引物正义链

* 基金项目:重庆市卫生和计划生育委员会项目(2013-2-046)。

作者简介:麦力,男,主管检验技师,主要从事肿瘤分子生物学研究。 [△] 通讯作者,E-mail:denglinmancqmu@126.com。

5'- AGT GGG AGA GGC AAA AAG CC-3',反义链 5'-GTT CGA ACG GCT CCT CAG AA-3';GAPDH 引物正义链 5'-CGC TCT CTG CTC CTC CTG TT-3',反义链 5'-CCA TGG TGT CTG AGC GAT GT-3'。反应条件:94 ℃ 变性 5 min;94 ℃ 10 s,60 ℃ 30 s,共 40 个循环,相同试验重复 3 次。

1.3.2 免疫组化宫颈癌组织中 BRIT1 蛋白水平的表达 宫颈癌组织石蜡包埋、切片,制作免疫组化组织片。免疫组化过程为:脱蜡,切片经二甲苯洗 3 次,每次 5 min,再水化;抗原修复,柠檬酸抗原修复液(pH6.0)100 ℃,20 min;5%的山羊血清封闭;BRIT1 一抗 4 ℃ 孵育过夜;HRP 标记的 IgG 二抗 25 ℃ 孵育 30 min;链霉亲和素-过氧化物酶孵育 30 min;DAB 显色;显微镜观察,结果判读。由 2 位病理医生在不知晓临床病理参数的条件下,对免疫组化的结果进行量化打分。量化分值根据染色阳性细胞比率和染色强度进行综合量化。其中染色强度的打分标准如下:阴性(-,0 分),弱阳性(+,1 分),中等阳性(++ ,2 分),强阳性(+++ ,3 分)。染色阳性细胞比率的打分标准如下:阳性细胞比率≤10%(0 分),10%<阳性细胞比率≤30%(1 分),30%<阳性细胞比率≤50%(2 分),50%<阳性细胞比率≤70%(3 分),70%<阳性细胞比率≤100%(4 分)。总分值(0~7 分)= 染色强度的分值+染色阳性细胞比率的分值。

1.4 统计学处理 所有统计均由 SPSS21.0 软件包执行,计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验分析;计数资料以百分比表示,采用 χ^2 检验分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 宫颈癌标本 BRIT1 mRNA 的表达 采用 RT-PCR 检测 31 对宫颈组织中 BRIT1 mRNA 的表达情况,在 31 例标本中有 19 例(61.3%)宫颈癌组织标本的 BRIT1 mRNA 的表达水平低于其配对的宫颈非癌组织的表达,统计分析证实宫颈癌组织中 BRIT1 mRNA 的表达量比宫颈非癌组织中的表达量低($P=0.000\ 2$),见图 1。

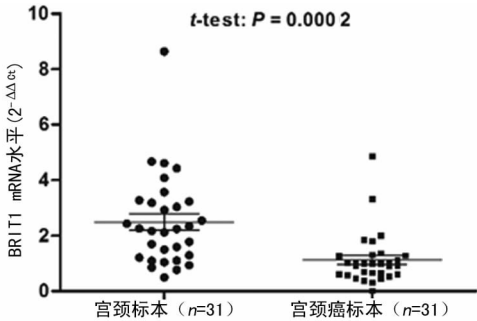


图 1 宫颈标本 BRIT1 mRNA 表达水平的比较

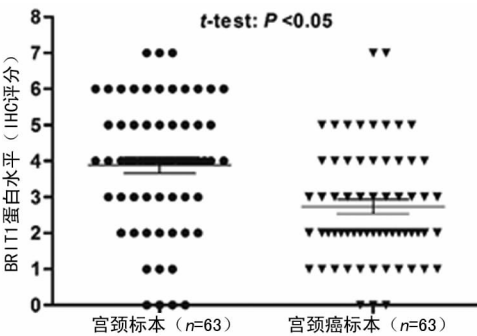


图 2 宫颈标本 BRIT1 蛋白表达水平的比较(400×)

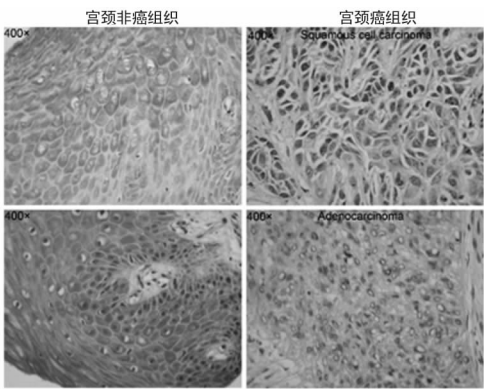


图 3 宫颈组织中 BRIT1 蛋白的表达水平

2.2 免疫组化检测宫颈癌标本 BRIT1 蛋白的表达 采用免疫组化技术检测 63 对宫颈癌标本中 BRIT1 蛋白的表达水平,各组织标本的 BRIT1 蛋白的表达量化评分和经统计分析后,结果显示:63 例标本中的 44 例(69.8%)宫颈癌组织 BRIT1 蛋白的表达水平低于配对的宫颈非癌组织,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 2;宫颈鳞癌组织和宫颈腺癌组织中 BRIT1 蛋白的表达均低于各自配对的宫颈非癌组织中 BRIT1 蛋白的表达,见图 3。宫颈癌中 BRIT1 的表达量与肿瘤分级、肿瘤分期有相关性,差异有统计学意义($P<0.05$),与患者年龄、肿瘤大小、肿瘤分型等没有相关性,见表 1。

表 1 BRIT1 蛋白表达水平与临床病理资料的相关性分析*

病理资料	<i>n</i>	BRIT1 蛋白 表达水平(分)	低表达 [<i>n</i> (%)]	高表达 [<i>n</i> (%)]
年龄				
<50 岁	36	2.78±1.51	26(59.1)	10(52.6)
≥50 岁	27	2.67±1.73	18(40.9)	9(47.3)
肿瘤分型				
鳞癌	53	2.68±1.63	38(86.4)	15(78.9)
腺癌	10	3.00±1.50	6(13.6)	4(21.1)
瘤体大小				
<20 mm	39	2.69±1.51	29(65.9)	10(52.6)
≥20 mm	24	2.79±1.77	15(34.1)	9(47.4)
肿瘤分级				
1	31	3.16±1.71 ^a	19(43.2)	12(63.2)
2	22	2.63±1.26 ^a	17(38.6)	5(26.3)
3	10	1.60±1.43	8(18.2)	2(10.5)
肿瘤分期				
0	17	3.35±1.73 ^b	9(20.5)	8(42.1)
I	20	2.85±1.57 ^b	14(31.8)	6(31.6)
II	19	2.42±1.35	15(34.1)	4(21.1)
III	7	1.71±1.60	6(13.6)	1(5.2)

注: * BRIT1 蛋白表达水平为免疫组化法检测量化打分结果,≤3 分为低表达,>3 分为高表达; ^a $P<0.05$,与肿瘤分级 3 级比较; ^b $P<0.05$,与肿瘤分期Ⅲ期比较。

3 讨 论

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤,是威胁女性健康最常见的“肿瘤杀手”。因此,进一步研究宫颈癌发生发展的分子机制将有助于宫颈癌诊断和治疗。而 BRIT1 在宫颈癌组织的表达和功能目前尚未证实。

BRIT1 基因是一个新的关键的 DNA 损伤应答基因,可调

控 ATM/ATR 信号通路,修饰染色体结构,直接参与 DNA 修复等过程。DNA 损伤应答信号的正常激活是早期阻止肿瘤发生的重要机制,是抵御细胞内外损伤因子损伤基因组 DNA 的重要防线^[4]。而 BRIT1 正是 DNA 损伤应答信号通路中的关键一环,且处于 DNA 损伤应答的早期阶段。多个研究小组已证实:在乳腺癌^[5]、卵巢癌^[6]、前列腺癌^[7]及慢性粒细胞白血病^[8]等肿瘤组织中,BRIT1 表达减少。此外,在 BRIT1 基因敲除的小鼠中,其基因组的不稳定性增加,肿瘤的易感性增加^[9]。这些研究提示 BRIT1 可能是一个新的肿瘤抑制基因。因此,研究 BRIT1 在宫颈癌组织的表达及其功能有助于宫颈癌对肿瘤发生、发展的分子机制的认识;有利于提高宫颈癌的早期诊断和治疗。

本研究采用 RT-PCR 和免疫组化技术从 mRNA 和蛋白水平两个方面证实了 BRIT1 在宫颈癌组织中的表达低于宫颈非癌组织中的表达,差异有统计学意义($P < 0.05$)。RT-PCR 结果显示:在 31 例标本中有 19 例(61.3%)宫颈癌组织中 BRIT1 mRNA 的表达低于配对的宫颈非癌组织的表达,差异有统计学意义($P < 0.05$)。免疫组织化学结果根据染色强度和阳性细胞比率进行量化评分后统计分析,结果显示:63 例标本中的 44 例(69.8%)宫颈癌组织 BRIT1 蛋白表达水平低于配对的宫颈非癌组织,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在 mRNA 水平和蛋白水平,宫颈癌组织较配对的宫颈非癌组织 BRIT1 的低表达率基本一致,均在 60%以上。这一结果提示 BRIT1 在宫颈癌组织的低表达可能与 BRIT1 基因在转录水平和转录后水平的表达调控失衡有关,如启动子区域的 DNA 甲基化、miRNA 的调控失衡等。统计分析揭示,宫颈癌中 BRIT1 的表达量与肿瘤的病理分级和临床分期有一定的相关性,与患者年龄、肿瘤大小、肿瘤分型等没有相关性。这一结果提示 BRIT1 可能是宫颈癌细胞恶性程度的一个重要标志。此外,有多个报道显示 BRIT1 在其他肿瘤组织中也呈低表达,如 Richardson 等^[5]研究表明在 319 例乳腺癌标本中,有 93 例乳腺癌标本中 BRIT1 的表达低于其配对的正常乳腺的表达,其低表达率为 29%,且 BRIT1 的表达量与肿瘤分级呈负相关;而也有研究证实 BRIT1 的表达与乳腺癌的转移^[10]和无复发生存时间呈负相关^[11]。另有报道 BRIT1 在 30 例卵巢癌标本中有 19 例的癌组织较配对正常组织呈低表达^[12]。在人体中,BRIT1 基因定位于染色体 8p23.1,在肿瘤细胞中这一区带易于杂合性缺失,这个可能是 BRIT1 在多个肿瘤组织中的表达缺失的重要原因。此外,BRIT1 的表达缺失也可能与其转录水平和转录后水平的表达调控失衡有关,需进一步研究。这些研究结果进一步证实了 BRIT1 可能是一个新的抑癌基因,参与抑制肿瘤的发生、发展。BRIT1 在宫颈癌组织和宫颈非癌组织中的差异表达,提示 BRIT1 可能在宫颈癌发生、发展具有重要的作用,为进一步研究其作用奠定了基础。

参考文献

- [1] Siegel R, Ma JM, Zou ZH, et al. Cancer statistics, 2014 [J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1):9-29.
- [2] Jackson AP, Eastwood H, Bell SM, et al. Identification of microcephalin, a protein implicated in determining the size of the human brain [J]. Am J Hum Genet, 2002, 71(1):136-142.
- [3] Zhou ZW, Tapias A, Bruhn C, et al. DNA damage response in microcephaly development of MCPH1 mouse model [J]. DNA Repair (Amst), 2013, 12(8):645-655.
- [4] Tian H, Gao Z, Li H, et al. DNA damage response—a double-edged sword in cancer prevention and cancer therapy [J]. Cancer Lett, 2015, 358(1):8-16.
- [5] Richardson J, Shaaban AM, Kamal M, et al. Microcephalin is a new novel prognostic indicator in breast cancer associated with BRCA1 inactivation [J]. Breast Cancer Res Treat, 2011, 127(3):639-648.
- [6] Brüning-Richardson A, Bond J, Alsiary R, et al. ASPM and microcephalin expression in epithelial ovarian cancer correlates with tumour grade and survival [J]. Br J Cancer, 2011, 104(10):1602-1610.
- [7] Rai R, Dai H, Multani AS, et al. Brit1 regulates early DNA damage response, chromosomal integrity, and cancer [J]. Cancer Cell, 2006, 10(2):145-157.
- [8] Giallongo C, Tibullo D, La Cava P, et al. Brit1/MCPH1 expression in chronic myeloid leukemia and its regulation of the G2/M checkpoint [J]. Acta Haematol, 2011, 126(4):205-210.
- [9] Liang Y, Gao H, Lin SY, et al. Mcph1/Brit1 deficiency promotes genomic instability and tumor formation in a mouse model [J]. Oncogene, 2015, 34(33):4368-4378.
- [10] Van't Veer LJ, Dai HY, Van De Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer [J]. Nature, 2002, 415(6871):530-536.
- [11] Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer [J]. Lancet, 2005, 365(9460):671-679.
- [12] Lin SY, Liang Y, Li K. Multiple roles of Brit1/MCPH1 in DNA damage response, DNA repair, and cancer suppression [J]. Yonsei Med J, 2010, 51(3):295-301.

(收稿日期:2016-01-08 修回日期:2016-03-21)

(上接第 1903 页)

- [9] 张凯华,刘双全,任林,等.鲍曼不动杆菌感染的临床调查与耐药情况分析[J].当代医学,2012,18(33):20-22.
- [10] 张长春,贾晓君,张淑敏.中心静脉导管相关性血流感染的病原菌分布与耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2015,28(12):2709-2711.
- [11] Gahlot R, Nigam C, Kumar V, et al. Catheter related

blood stream infections in ICU: A study from North India [J]. Int J Infect Control, 2014, 4(2):162-167.

- [12] 张玉琴,章华萍,屈嬉嬉,等. ICU 中心静脉导管相关性感染病原菌分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(5):1146-1148.

(收稿日期:2016-01-18 修回日期:2016-03-20)