

## BRCA2 在卵巢肿瘤组织中的表达及临床意义

刘琼琼<sup>1</sup>,张慧林<sup>2</sup>,李 琥<sup>1</sup>,张万东<sup>2</sup>,王小英<sup>1</sup>,李凤山<sup>2\*</sup>,冯振卿<sup>1</sup>,朱 进<sup>1,3\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学卫生部抗体技术重点实验室,江苏 南京 210029;<sup>2</sup>南京医科大学附属南京市妇幼保健院,江苏 南京 210004;<sup>3</sup>南京军区军事医学研究所,江苏 南京 210002)

**[摘要]** 目的:乳腺癌易感基因 2(breast cancer susceptibility gene 2, BRCA2)是近几年发现的新的抑癌基因,本研究旨在分析 BRCA2 在卵巢癌组织中的表达及其临床意义。方法:采用 1 对引物扩增 BRCA2 基因第 14 外显子,应用聚合酶链反应和基因测序技术检测 BRCA2 基因,并且应用免疫组化和 Western blot 检测肿瘤组织 BRCA2 蛋白的表达。结果:卵巢黏液性囊腺瘤和正常组织 BRCA2 基因未发生突变,浆液性肿瘤和黏液性囊腺瘤的 BRCA2 第 14 外显子的 128 位碱基 T 突变为 C。Western blot 检测结果显示 BRCA2 在卵巢囊腺瘤上的表达低于正常卵巢组织和卵巢囊腺瘤,免疫组化检测结果发现 BRCA2 在卵巢黏液性囊腺瘤和黏液性囊腺瘤中的阳性率分别为 87.50%和 53.33%,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );而 BRCA2 在卵巢浆液性囊腺瘤和浆液性囊腺瘤中阳性率分别为 53.85%和 73.17%,差异没有统计学意义( $P > 0.05$ )。BRCA2 蛋白在不同年龄、组织学分型、分化程度和临床分期各组间差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论:BRCA2 在卵巢癌组织中的表达不仅可以用于诊断,也可能为治疗提供一个途径。

**[关键词]** 卵巢癌; BRCA2 基因; DNA 测序; 免疫组化

**[中图分类号]** R737.31

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)07-995-05

### Expression of BRCA2 in ovarian tumor tissues and its clinical significance

LIU Qiong-qiong<sup>1</sup>,ZHANG Hui-lin<sup>2</sup>,LI Hu<sup>1</sup>,ZHANG Wan-dong<sup>2</sup>,WANG Xiao-ying<sup>1</sup>,LI Feng-shan<sup>2\*</sup>,FENG Zhen-qing<sup>1</sup>,ZHU Jin<sup>1,3\*</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Antibody Technique of Ministry of Health, NJMU, Nanjing 210029;<sup>2</sup>Nanjing Maternal and Child Health Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210004;<sup>3</sup>Medical Research Institute of Nanjing Military Region, Nanjing 210002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To analyze expression of breast cancer susceptibility gene 2(BRCA2) in ovarian cancer tissues and its clinical significance. **Methods:** BRCA2 was detected using a pair of primer on 14 exon of BRCA2 by polymerase chain reaction amplification, and the mutations of BRCA2 were analyzed by DNA sequencing. The expression of BRCA2 protein in ovarian tumor tissues were detected by immunohistochemistry and Western blot. **Results:** No mutation was found in any mucinous cystadenoma and normal tissues, but the base T of 128 mutated C in 14 exon of BRCA2 in serous tumors and mucinous carcinoma. Western blot showed that BRCA2 protein expression of the malignant tumor in ovarian was lower than that of normal tissues and benign tumors. The results of immunohistochemistry showed that the BRCA2 expression rates in mucinous cystadenoma and mucinous carcinoma were 87.50% and 53.33% respectively, and there were significant differences between the mucinous cystadenoma and mucinous carcinoma ( $P < 0.05$ ); whereas the BRCA2 expression rates in serous cystadenoma and serous carcinoma were 53.85% and 73.17% respectively, and there was no significant difference between the serous cystadenoma and serous carcinoma ( $P > 0.05$ ). The BRCA2 expression was not significantly associated with patient's age, clinical stage, differentiation and histological types of ovarian cancer ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** BRCA2 expression in ovarian tumor tissues can be used as a diagnosis marker, it also may provide a target for the ovarian cancer treatment.

**[Key words]** ovarian cancer; BRCA2 gene; DNA sequencing; immunohistochemistry

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(7): 995-999]

**[基金项目]** 南京市卫生局重点项目(YKK08118);南京市科技发展项目(200901083)

\*通讯作者, E-mail: zjsimmons@yahoo.com.cn; lifengshan55@yahoo.com.cn

卵巢癌是妇科常见的恶性肿瘤,由于卵巢癌起病隐匿、早期没有症状,一旦发现多为晚期,其临床治疗效果较差。目前已有的卵巢癌生物学标志物的敏感性和特异性较低,不能作为临床诊断的依据。乳腺癌易感基因 2(breast cancer susceptibility gene 2, BRCA2)作为一个新发现的抑癌基因,在乳腺癌的早期诊断中引起了极大的关注。多数学者认为, BRCA2 基因主要与乳腺癌有关, BRCA1 基因突变在家族性乳腺癌中可达 35%,在男性乳腺癌及散发乳腺癌中则更为多见<sup>[1-3]</sup>。BRCA2 与卵巢癌的关系,国内外均少有报道。因此,本研究拟应用 PCR、Western blot 及免疫组化技术探讨 BRCA2 在卵巢癌肿瘤组织中的表达及其临床意义。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

所检测的标本均由南京医科大学附属南京市妇幼保健院提供。收集 2008 年 1 月~2009 年 12 月的卵巢良性浆液性、良性黏液性囊腺瘤及卵巢恶性浆液性、恶性黏液性囊腺瘤标本共 100 例。其中卵巢良性肿瘤 29 例(黏液性囊腺瘤 16 例,浆液性囊腺瘤 13 例),卵巢恶性肿瘤 71 例(黏液性囊腺瘤 30 例,浆液性囊腺瘤 41 例),另取 10 例正常卵巢组织作为对照。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 基因组 DNA 的提取

采用常规的酚氯仿法提取基因组 DNA,溶于 50  $\mu$ l 的 TE 中,紫外分光光度计测定 DNA 含量后, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

#### 1.2.2 PCR 扩增

GenBank 中查找 BRCA2 的 DNA 序列,应用 primer 5.0 引物设计软件,设计了扩增第 14 外显子的 1 对引物序列,引物由上海 Invitrogen 公司合成,引物序列为:上游:5'-ATCTTCAAGCAATTTAGCAG-3',下游:5'-TACTATCATCAGAGCCATGT-3'。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 50 s,56 $^{\circ}$ C 退火 50 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 末端延伸 10 min,扩增产物经 1% 琼脂糖电泳鉴定。

#### 1.2.3 DNA 序列测定

将扩增鉴定后的产物用胶回收试剂盒进行纯化,然后送至上海华大公司进行基因测序。

#### 1.2.4 Western blot 检测 BRCA2 蛋白表达

组织置于冰上研磨碾碎,每 100 mg 加入 0.2 ml 细胞裂解液,冰上充分裂解 30 min,12 000 r/min 离心收集上清。将蛋白于 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。

分离后将蛋白转移至硝酸纤维素膜,37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h。兔抗人 BRCA2 一抗(稀释度 1:1 000), $\beta$ -actin 一抗(稀释度 1:500),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜漂洗,加二抗 1:2 000,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,滴加发光试剂暗室曝光显示条带。

#### 1.2.5 免疫组织化学染色

石蜡切片经脱蜡、高压抗原修复后,3%的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温孵育 5~10 min,以消除内源性过氧化物酶的活性。血清封闭后,滴加抗 BRCA2 的一抗(1:100 稀释),37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,PBS 冲洗,滴加二抗,继续孵育 30 min,PBS 冲洗后滴加 SABC(链霉亲和素-生物素-过氧化物酶),孵育 30 min,DAB 显色。自来水冲洗后,苏木精复染,脱水透明,中性树胶封片。

#### 1.2.6 免疫组织化学检测结果判定

于 5 个高倍视野下计数,随机计数 200 个细胞中阳性细胞所占的比例,根据阳性细胞数和染色强度进行分级。阳性细胞 0~4% 计 0 分,5%~19% 计 1 分,20%~49% 计 2 分, $\geq$ 50% 计 3 分;依染色强度计分:无着色 0 分,浅棕色 1 分,棕黄色 2 分,棕褐色 3 分。每张切片 2 项分数相乘:0 分为阴性,1~2 分为弱阳性(+),3~4 分为中度阳性(++), $>$ 4 分为强阳性(+++)。

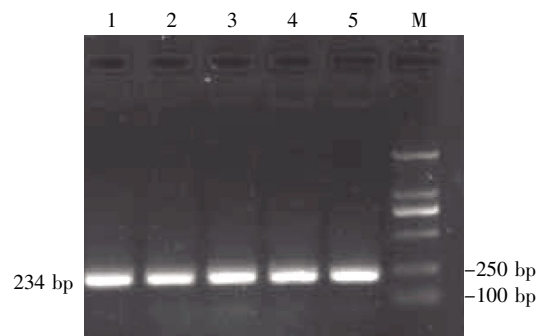
### 1.3 统计学方法

SPSS12.0 统计软件对所获数据进行统计学处理,Western blot 检测结果采用方差分析;免疫组织化学检测结果用  $\chi^2$  检验进行数据分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 部分 PCR 扩增结果

所有 PCR 扩增产物在 1% 的琼脂糖电泳检测中均显示单一条带,产物均为 234 bp,说明患者的 BRCA2 基因在所检测的片段上没有明显的插入或缺失(图 1)。



M: DNA Marker; 1~5: BRCA2 DNA 检测结果。

图 1 PCR 琼脂糖电泳图

Figure 1 PCR agarose electrophoresis result

## 2.2 DNA 测序分析

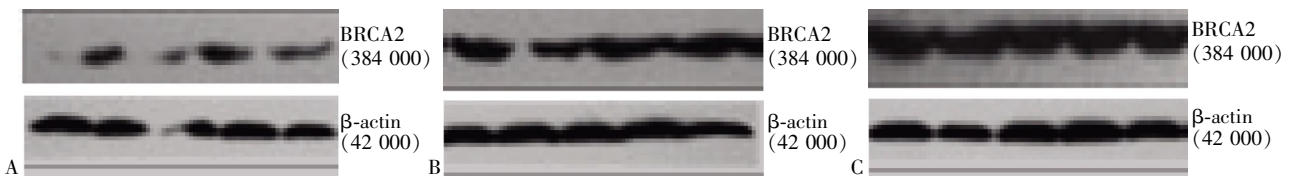
将纯化后的 DNA 产物直接测序后,发现卵巢的浆液性肿瘤和黏液性囊腺癌 BRCA2 基因第 14 外显子的第 128 位碱基 T 突变为 C(图 2)。

```
AGTTCGTTAAATCGTCAAAGTCCTGTAGGTAAATAGTTC  
AAAGACGATGTTCTTTACTTTTTTACTCTGTGAACTAATGATGT  
CCGTCTGCTTGGTTTCAGAAAACAAGGTGGAAAATTTTGATT TA  
CGTAAAAGTGCTCAACTTGTGACA CAATCCTTATAATTGAAC  
CTCCTTTTGTCTGTTTTTCGTTTTGTAACCTACCTGTACCGAGACT  
ACTATCATT
```

方框内碱基即为突变位点。

图 2 BRCA2 第 14 外显子的 DNA 序列分析结果

Figure 2 DNA sequence analysis result of 14 exon of BRCA2



A:卵巢黏液腺癌;B:卵巢浆液腺癌;C:正常卵巢组织。

图 3 Western blot 检测 BRCA2 在不同卵巢组织上的表达

Figure 3 Western blot detection of BRCA2 expression in different ovarian tissues

BRCA2 蛋白主要在胞浆中表达,部分核内也有表达,16 例卵巢黏液瘤中 14 例表达阳性,阳性率为 87.50%;30 例卵巢黏液癌中 14 例表达阳性,阳性率为 53.33%,两者阳性率相比,差异具有统计学意义 ( $P = 0.02$ );13 例卵巢浆液瘤中 7 例表达阳性,阳性率为 53.85%;41 例卵巢浆液癌中 30 例表达阳性,阳性率为 73.17%,两者阳性率相比,差异没有统计学意义 ( $P = 0.191$ ,图 4,表 1)。

## 2.5 BRCA2 蛋白表达与卵巢癌临床病例因素的关系

BRCA2 蛋白表达在不同年龄,组织类型、肿瘤分化程度和临床分期间,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ,表 2)。

## 3 讨论

卵巢癌在女性恶性肿瘤中的发病率居第 4 位,病死率居第 1 位,大部分卵巢癌起病隐匿,早期并没有症状,直到晚期发生盆腔包块、腹水、大网膜转移才发现,一旦确诊已有三分之二患者为浸润晚期癌, I ~ II 期卵巢癌 5 年生存率可达 90%,而 III ~ IV 期卵巢癌 5 年生存率小于 30%。Moss 等<sup>[4]</sup>对 799 例接受过血清 CA125 测定的患者进行回顾性研究,结果发现,在血清 CA125 水平异常者中,20%为卵

## 2.3 Western blot 检测结果

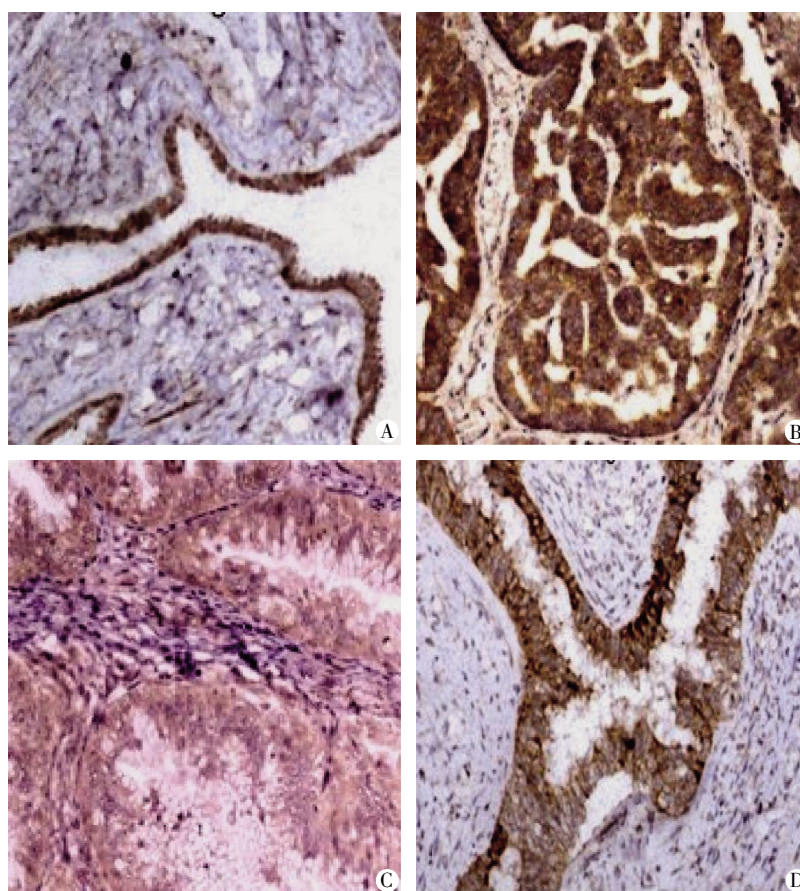
在分子量 384 000 处,可见 BRCA2 特异性蛋白条带,图像分析发现卵巢囊腺癌仅有少量 BRCA2 蛋白表达。在正常卵巢组织中,BRCA2 表达明显增强,是卵巢囊腺癌表达量的 2.07 倍,是卵巢囊腺癌的 1.27 倍。灰度分析显示 BRCA2 在正常卵巢组织中为  $1.12 \pm 0.11$ ,在卵巢囊腺癌中为  $0.88 \pm 0.01$ ,在卵巢囊腺癌中为  $0.54 \pm 0.21$ 。BRCA2 在卵巢囊腺癌中的表达与正常卵巢组织、卵巢囊腺癌比较差异均有统计学意义(图 3)。这一结果说明 BRCA2 在卵巢囊腺癌中表达降低。

## 2.4 免疫组织化学检测结果

巢癌,26%为非妇科恶性肿瘤,14%为卵巢良性疾 病,其余均为其他妇科良性疾 病。因此,血清 CA125 测定用于卵巢癌诊断的敏感度、特异度并不佳,假阳性率较高。许多新的肿瘤标志物还处于研究中,尤其是诊断早期卵巢癌。其中 40%~50%的 I ~ II 期卵巢癌患者的 CA125 是不升高的。因此进一步探索卵巢癌的早期诊断成为研究的焦点。

自 1994 年 Miki 等<sup>[5]</sup>发现了家族性乳腺性乳腺癌/卵巢癌易感基因 BRCA1 以来,有关 BRCA2 基因的研究一直方兴未艾。BRCA2 是继 BRCA1 之后发现的另一个遗传性乳腺癌/卵巢癌的易感基因。Wooster 等<sup>[6]</sup>将其定位于人类染色 13q12~13,基因组 DNA 长约 70 kb,编码区 10 987 bp,共有 27 个外显子,mRNA 长约 10 kb,编码肿瘤抑制因子 BRCA2 蛋白,其由 3 418 个氨基酸残基组成<sup>[7]</sup>。目前,BRCA2 的确切功能尚不清楚<sup>[8]</sup>,仅知道 BRCA2 对细胞生长的调节有着重要作用<sup>[9]</sup>,在 G<sub>0</sub> 期和 G<sub>1</sub> 期早期 BRCA2 转录水平较低,G<sub>1</sub>/S 期达高峰,表现出细胞周期依赖性。BRCA2 的活性异常增加了基因组的不稳定性,有可能是导致多种肿瘤发生的原因之一<sup>[9]</sup>。BRCA2 蛋白的羧基末端有一个被称为 BRCA2 DBD (DNA/DSS1-binding domain)的结构,在 DNA 的损伤修复中起着非常重要的作用。这种保护性蛋白通





A: 卵巢浆液性囊腺癌; B: 卵巢浆液性囊腺癌; C: 卵巢黏液性囊腺癌; D: 卵巢黏液性囊腺癌。

图 4 BRCA2 蛋白在卵巢肿瘤组织中表达(免疫组织化学 SABC 法,  $\times 100$ )Figure 4 BRCA2 expression in different ovarian tumor tissues (IHC SABC,  $\times 100$ )

表 1 免疫组化检测 BRCA2 在不同卵巢肿瘤中的表达情况

Table 1 Immunohistochemistry result of the BRCA2 expression in ovarian tumors

分 组	n	BRCA2 表达情况(n)				阳性率(%)
		阴性	弱阳性	阳性	强阳性	
卵巢黏液囊腺瘤	16	2	3	10	1	87.50
卵巢黏液囊腺癌	30	14	13	3	0	53.33
卵巢浆液囊腺瘤	13	6	1	2	4	53.85
卵巢浆液囊腺癌	41	11	26	4	0	73.17

过同源重组及部分调节 RAD51 蛋白因子的活性参与双链 DNA 损伤的修复,从而阻止癌细胞的生长和发育<sup>[10]</sup>, Cotroneo 等<sup>[11]</sup>建立了 BRCA2 基因敲除的小鼠模型,发现 BRCA2 基因敲除的小鼠生长速度变慢且 BRCA2 在人的大多数正常组织中都有不同程度的表达,比如睾丸、胸腺组织表达量高,乳腺和卵巢表达中等,因此有可能成为卵巢癌的一个早期诊断基因。

目前研究发现 BRCA2 基因的突变类型有 100 多种,有缺失突变、插入突变、错义突变、拼接处突变等。Yasmine 等<sup>[12]</sup>对非洲 74 个独立家族进行了分析,

找到了 8 个突变位点 (8643delAT 等)。Makoto 等<sup>[13]</sup>对日本人进行分析时也发现了第 372 个密码子 (Asn/His) 及第 784 个密码子 (Met/Val) 的错义突变,且密码子的突变在家族性乳腺癌中更具有临床意义,这使得它们编码出无作用或反作用的蛋白,从而导致细胞恶变。该基因在国内的突变情况虽然有类似研究,但样本量较少<sup>[14]</sup>,不足以说明国内的情况,因此有必要进一步研究 BRCA2 基因在中国人中的突变情况。

本研究选择 BRCA2 的第 14 外显子进行基因突变研究<sup>[15]</sup>,检测到 128 位碱基 T 突变为 C,使肽链

表2 BRCA2与卵巢癌临床病例因素的关系

Table 2 The relationships between BRCA2 with clinical characteristics of ovarian cancer (n)

影响因素	n	BRCA2		χ <sup>2</sup> 值	P值
		阳性	阴性		
年龄(岁)				0.289	0.591
≤50	20	12	8		
>50	51	27	24		
组织类型				0.665	0.415
黏液性囊腺癌	30	19	11		
浆液性囊腺癌	41	22	19		
分化程度				0.244	0.621
高分化	39	23	16		
低分化	32	17	15		
分期				0.306	0.580
I~II	40	22	18		
III~IV	31	15	16		

的电荷性质发生改变,可引起蛋白构象变化,最终影响BRCA2蛋白的正常生物学功能,导致癌症的发生。Western blot 检测结果显示卵巢囊腺癌中BRCA2表达量最低,说明其BRCA2突变,丧失了抑癌作用,组织细胞无限制无序性增生,导致了癌症发生。免疫组化显示BRCA2蛋白在浆液性囊腺癌和浆液性囊腺癌上都呈阳性表达,并且都发生了突变,然而BRCA2蛋白在黏液性囊腺癌上呈弱阳性表达,在黏液性囊腺癌上呈阳性表达且未发生突变,差异有统计学意义,说明BRCA2在卵巢黏液性囊腺癌和浆液性囊腺癌之间表达有明显差异。因此,BRCA2作为一个新发现的抑癌基因,了解该基因在肿瘤组织中的表达不仅仅可以用于诊断,也可能为治疗提供一个途径。

[参考文献]

[1] Rodriguez RC, Esperon AA, Roper R, et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer patients from Cuba [J]. *Familial Cancer*, 2008, 20 (2): 275-279

[2] Lee E, McKean-Cowdin R, Ma H, et al. Evaluation of unclassified variants in the breast cancer susceptibility genes BRCA1 and BRCA2 using five methods; results from a population-based study of young breast cancer patients [J]. *Breast Cancer Res*, 2008, 10(1): 1-20

[3] Antoniou AC, Sinilnikova OM, Simard J, et al. Genetic

modifiers of cancer risk in brca1/2 mutation carriers study [J]. *Hum Genet*, 2007, 81(6): 1186-1200

[4] Moss EL, Hollingworth J, Reynolds TM. The role of CA125 in clinical practice [J]. *Clin Pathol*, 2005, 35 (58): 308-312

[5] Miki Y, Swensen J, Shattuck ED, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1 [J]. *Science*, 1997, 2(66): 66-71

[6] Wooster R, Bignel G, Lancaster J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 [J]. *Nature*, 1995, 378(6559): 789-792

[7] Milne RL, Antoniou AC. Genetic modifiers of cancer risk for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers [J]. *Ann Oncol*, 2011, 22(11): 11-17

[8] Yang Q, Sakurai T, Mori I, et al. Prognostic significance of BRCA2 expression in Japanese sporadic breast carcinomas [J]. *Cancer*, 2001, 92(1): 54-60

[9] De Brakeleer S, Bogdani M, de Greve J, et al. Loss of nuclear BRCA1 protein staining in normal tissue cells derived from BRCA1 and BRCA2 mutation carriers [J]. *Mutat Res*, 2007, 619(122): 104-122

[10] Rajan JV, Marquis ST, Gardner HP, et al. Developmental expression of BRCA2 colocalizes with BRCA1 and is associated with proliferation and differentiation in multiple tissues [J]. *Dev Biol*, 1997, 184(2): 385-401

[11] Cotroneo MS, Haag JD, Zan Y, et al. Characterizing a rat BRCA2 knockout model [J]. *Oncogene*, 2007, 5 (26): 1626-1635

[12] Yasmine K, Elikem K, Kim U, et al. Inherited BRCA2 mutations in African Americans with breast and/or ovarian cancer: a study of familial and early onset cases [J]. *Hum Genet*, 2003, 113(29): 452-460

[13] Makoto I, Yasuo M, Akiko A, et al. Association of BRCA2 polymorphism at codon 784 (Met/Val) with breast cancer risk and prognosis [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 4(9): 1376-1380

[14] Takano EA, Mitchell G, Fox SB, et al. Rapid detection of carriers with BRCA1 and BRCA2 mutations using high resolution melting analysis [J]. *BMC Cancer*, 2008, 225 (7): 45-59

[15] 张海添, 陆云飞, 曾健, 等. 散发性乳腺癌中BRCA1和BRCA2基因突变的研究 [J]. *中华外科杂志*, 2007, 45(7): 480-482

[收稿时间] 2011-12-06