

NF- κ B 与 MTA2 在乳腺浸润性导管癌中的表达及相关性研究何丽梅¹, 俞菁¹, 李亚男¹, 徐锦屏², 王小捷², 龚波^{1△}

(上海市长宁区妇幼保健院; 1. 检验科; 2. 病理科, 上海 200051)

摘要:目的 探讨核转录因子 κ B(NF- κ B)与肿瘤转移相关基因 2(MTA2)在乳腺浸润性导管癌组织中的表达及其相关性,并分析其与乳腺浸润性导管癌临床病理参数之间的关系。方法 采用实时定量聚合酶链反应检测 68 例乳腺浸润性导管癌患者的癌组织及配对癌旁正常乳腺组织中 NF- κ B 与 MTA2 基因的表达情况,并分析其与各临床参数的关系。结果 NF- κ B 和 MTA2 在乳腺浸润性导管癌组织中的表达都与年龄、肿瘤大小及组织学分期等指标无关($P>0.05$);与淋巴结转移及 TNM 分期等指标有关($P<0.05$)。此外,MTA2 在乳腺浸润性导管癌 ER 阳性患者组织中呈高表达($P<0.05$)。乳腺浸润性导管癌组织中 NF- κ B 与 MTA2 的表达呈正相关($r=0.808, P=0.012$)。结论 检测 NF- κ B 与 MTA2 在乳腺浸润性导管癌组织中的表达水平,可为乳腺浸润性导管癌的诊断,侵袭转移程度和预后提供理论依据。

关键词:乳腺浸润性导管癌; 真核转录因子- κ B; 实时定量聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.05.014

中图法分类号:R737.9

文章编号:1673-4130(2018)05-0566-04

文献标识码:A

Study of the expressions of NF- κ B and MTA2 in infiltrating ductal carcinoma of breast and their correlationHE Limei¹, YU Jing¹, LI Yanan¹, XU Jinping², WANG Xiaojie², GONG Bo^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Pathology, Shanghai Changning Maternity and Infant Health Hospital, Shanghai 200051, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of NF- κ B and MTA2 in infiltrating ductal carcinoma of breast and their correlations to clinicopathologic character. **Methods** The expressions of and MTA2 in breast cancer and paired adjacent normal breast tissues of 68 breast invasive ductal cancer patients were detected by real-time quantitative PCR method, and their correlations to the clinicopathologic characteristics of breast invasive ductal cancer were analyzed. **Results** The expressions of NF- κ B and MTA2 in breast invasive ductal carcinoma were not related to age, tumor size and histological stage ($P>0.05$), and were positively correlated with lymph node metastasis and TNM stage ($P<0.05$). In addition, MTA2 was highly expressed in the tissues of ER positive breast invasive ductal cancer patients ($P<0.05$). There was a positive correlation between the expression of NF- κ B and the expression of MTA2 in breast cancer tissue of the infiltrating ductal carcinoma of breast patients ($r=0.808, P=0.012$). **Conclusion** Measurement of NF- κ B and MTA2 from breast invasive ductal carcinoma tissue may provide a theoretical basis for the diagnosis, progression and prognosis of infiltrating ductal carcinoma of breast.

Key words: infiltrating ductal carcinoma of breast; nuclear factor- κ B; real-time quantitative PCR

乳腺癌是全球女性最常见的恶性肿瘤之一^[1], 严重威胁广大女性的身心健康。资料显示, 我国乳腺癌的发病率逐年升高, 并呈现年轻化趋势。同其他恶性肿瘤一样, 早期转移和术后复发是治愈乳腺癌的主要难题。核转录因子 κ B(NF- κ B)是一种广泛存在于多种细胞中的重要核转录因子, 它可使多种靶基因表达上调, 促使分泌多种炎症因子, 参与免疫、炎症、应激

反应。大量研究证实, 激活的 NF- κ B 信号通路, 可以通过调节增殖、转移、存活相关的一些基因导致肿瘤的发生或者促进肿瘤的恶化^[2-3]。肿瘤转移相关基因 2(MTA2)作为转移相关基因家族(MTA)成员之一, 存在于人体大多数组织和器官中, 尤其在脑组织及肝脏中含量丰富。MTA2 在蛋白结构上与 MTA1 具有很高的同源性, 参与核小体重构及组蛋白去乙酰化,

作者简介:何丽梅, 女, 主管技师, 主要从事肿瘤表观遗传学机制方面的研究。△ **通信作者,** E-mail: 13661908202@126.com。

本文引用格式:何丽梅, 俞菁, 李亚男, 等. NF- κ B 与 MTA2 在乳腺浸润性导管癌中的表达及相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(5):

并可与多种转录因子相互作用,参与基因的转录调控。而 MTA1 在多种肿瘤中高表达,如乳腺癌、肝细胞癌等,并且参与了肿瘤的转移和浸润。因此,MTA2 也可能参与肿瘤的生长和转移。本研究拟采用实时定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测 NF- κ B 与 MTA2 基因在组织中的表达情况,分析其与乳腺浸润性导管癌临床病理指标之间的关系,为乳腺浸润性导管癌的诊断,评估侵袭转移程度和预后提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院 2014 年 6 月至 2016 年 2 月行手术治疗且术后经病理诊断确诊为乳腺浸润性导管癌患者的癌组织及配对癌旁正常乳腺组织标本 68 例,以配对癌旁正常乳腺组织为参照。患者均为女性,术前均未接受放、化疗及内分泌治疗,年龄 31~73 岁,中位年龄 52 岁,平均为 51.7 岁; ≤ 50 岁 23 例, > 50 岁 45 例。肿瘤直径 1.0~7.0 cm,中位直径 3.5 cm,平均为 3.2 cm。参照 2003 年版世界卫生组织(WHO)乳腺癌分类标准,Ⅰ~Ⅱ期 44 例,Ⅲ期~Ⅳ期 24 例。淋巴结转移 19 例,无淋巴结转移 49 例。

1.2 方法 逆转录试剂盒及 RT-PCR 试剂盒均购自 TAKARA 有限公司。RT-PCR 引物由上海生物工程有限公司合成,PCR 引物序列、产物长度及退火温度见表 1。组织解冻称重后,放至预冷的匀浆器中,然后加入一定量的 TRIZOL 试剂匀浆。采用氯仿-异丙醇法抽提总 RNA,紫外分光光度计检测其浓度和纯度。Prime Script™ 逆转录 PCR(RT-PCR)试剂盒 20 μ L 体系逆转录 2 000 ng 总 RNA,获得各标本 cDNA。以获得的 2 μ L cDNA 为模板,加入 23 μ L PCR 反应液[基因引物 1 μ L,2 \times 高灵敏 DNA 荧光染料(SYBR)Premix Ex Taq 12.5 μ L,双蒸水(ddH₂O)9.5 μ L]。在 CFX96™ RT-PCR 仪上,95.0 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,95.0 $^{\circ}$ C 5 s,65.0 $^{\circ}$ C 30 s,共 40 个循环,每升高 0.5 $^{\circ}$ C 检测 1 次荧光信号值,反应结束仪器自动生成循环阈值(Ct 值)及熔解曲线图。

1.3 统计学处理 全部数据均采用 SPSS19.0 统计学软件处理,组间均数比较采用 *t* 检验,采用 Pearson 相关系数分析 NF- κ B 与 MTA2 的关系, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

表 1 PCR 引物序列、产物长度及退火温度

基因	GenID	引物序列(5'~3')	产物长度(bp)	退火温度($^{\circ}$ C)
β -actin	NM_001101	F:TCA TCA CCA TTG GCA ATG AG	149	56.0
		R:CAG TGT GTT GGC GTA CAG GT		
NF- κ B	NM_021975	F:CCT TCC TCA TCC CAT CTT TGA C	132	53.0
		R:ACC TCA ATG TCC TCT TTC TGC		
MTA2	NM_004739	F:TAT GAG ACT ATG GCA GGG	116	52.0
		R:TCA GCT GGG TTT AGT TTC		

注:F 表示上游引物;R 表示下游引物

2 结果

2.1 RNAc 纯度及抽提质量 通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳判断 RNA 的完整性。细胞总 RNA 以 rRNA 含量最高。随机选择 13 例组织中抽提的总 RNA 样本,电泳结果显示标本均有 28S、18S 和 5S 三条带(图 1),且 28S 的亮度约为 18S 的 2 倍,表明 RNA 没有发生降解。泳道前缘还可观察到 1 条较为模糊且亮度较弱的条带,为 5S。采用 Gene Quant 核酸定量仪检测 RNA 的纯度和浓度。 A_{260}/A_{280} 为 1.8~2.0 为合格标本。核酸定量仪根据公式 $A_{260} \times \text{稀释倍数} \times 40 \mu\text{g/mL}$ 自动算出 RNA 浓度,根据各标本 RNA 定量结果用无 RNase 的水将所有 RNA 稀释至 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

2.2 熔解曲线图 RT-PCR 检测各目的基因 mRNA 水平,根据熔解曲线是否有双峰判断检测引物有无杂带、Ct 值可信度,证明 RT-PCR 产物并非引物二聚体

或其他杂带,特异性较好。见图 2~4。

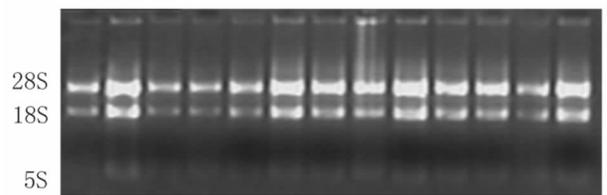


图 1 琼脂糖凝胶电泳鉴定总 RNA 的完整性

2.3 RT-PCR 经 RT-PCR 扩增得到各目的基因的 Ct 值,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算各基因与 β -actin 拷贝数的比值,比较癌组织和癌旁组织之间的差异,见表 2。与癌旁正常组织相比,NF- κ B 及 MTA2 在癌组织中表达上调,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。通过 Pearson 相关系数分析,表明癌组织中 NF- κ B 与 MTA2 呈高度正相关($r = 0.808, P = 0.012$)。

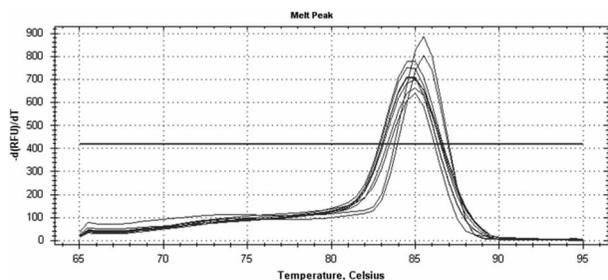


图 2 β -actin 的熔解曲线

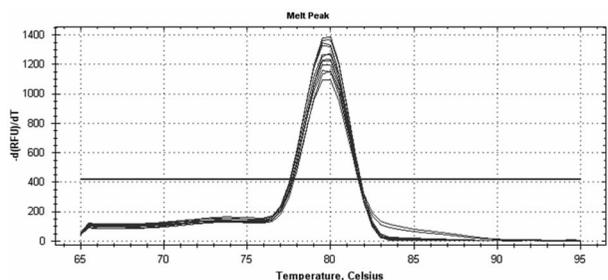


图 3 NF- κ B 的熔解曲线

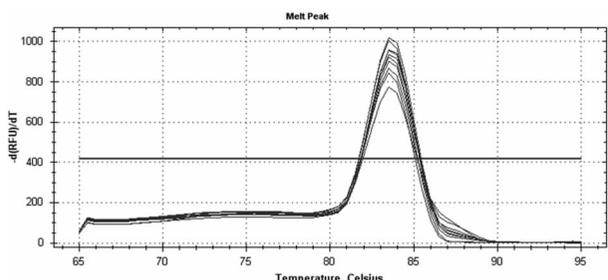


图 4 MTA2 的熔解曲线

表 2 RT-PCR 扩增基因 [$2^{-\Delta\Delta Ct}$ (以 β -actin 为内参)]

基因	癌组织	癌旁组织	P
β -actin	1.28 ± 0.01	1.03 ± 0.21	0.068
NF- κ B	1.93 ± 0.15	1.02 ± 0.18	0.002
MTA2	1.97 ± 0.21	1.00 ± 0.03	0.001

2.4 乳腺浸润性导管癌患者 NF- κ B、MTA2 的表达与各临床参数的关系 各年龄段、各肿瘤大小及组织学分期的乳腺浸润性导管癌患者 NF- κ B、MTA2 表达水平比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$);而 NF- κ B、MTA2 表达与淋巴结转移及 TNM 分期等指标有关 ($P < 0.05$)。此外,MTA2 在乳腺浸润性导管癌雌激素阳性患者组织中呈高表达,见表 3。

表 3 乳腺癌组织中 NF- κ B、MTA2 表达与其临床参数的关系

临床参数	n	NF- κ B			MTA2		
		$2^{-\Delta\Delta Ct}$ *	t	P	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ *	t	P
年龄(岁)							
≤ 50	23	8.259	0.272	0.792	9.852	1.197	0.267

续表 3 乳腺癌组织中 NF- κ B、MTA2 表达与其临床参数的关系

临床参数	n	NF- κ B			MTA2		
		$2^{-\Delta\Delta Ct}$ *	t	P	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ *	t	P
> 50	45	9.841			13.152		
肿瘤大小(cm)							
≤ 2	20	5.488	1.702	0.127	8.431	0.983	0.349
> 2	48	13.997			13.863		
淋巴结转移							
有	19	22.046	5.482	0.001	23.269	3.297	0.008
无	49	3.617			6.443		
TNM 分期							
I~II 期	44	8.590	2.68	0.023	27.051	4.047	0.002
III~IV 期	14	28.312			7.525		
组织学分期							
I~II 级	46	5.132	1.745	0.119	9.443	1.427	0.184
III~IV 级	12	13.971			19.881		
ER							
阳性	43	11.867	1.039	0.326	16.159	2.819	0.024
阴性	25	6.326			3.837		
PR							
阳性	23	10.707	0.394	0.702	12.179	0.420	0.968
阴性	45	7.960			11.796		

注: * 表示平均值;ER 表示雌激素受体;PR 表示孕激素受体

3 讨论

乳腺癌是发生在乳腺上皮组织的恶性肿瘤,其发生、发展是受到多个癌基因和抑癌基因参与及调控的复杂过程,目前在临床上主要依靠手术根治性治疗,辅以放、化疗,但无法从根本上解决乳腺癌复发、转移及耐药等问题。NF- κ B 是一种具有多向调节功能的转录因子,其信号通路在维持正常免疫功能、细胞增殖、凋亡及突触可塑性中发挥重要作用。目前研究发现,NF- κ B 的异常活化可刺激细胞的异常增殖,抑制细胞凋亡,参与肿瘤的发生、发展,并与肿瘤的侵袭恶化有关^[4-5],如 kindlin-2(一种整合素结合粘着蛋白)通过 NF- κ B 相关信号通道上调基质金属蛋白酶促进前列腺癌细胞的侵袭^[4]。NF- κ B 是乳腺癌细胞生存和发展重要而复杂的细胞因子,其通过经典或非经典通路,参与乳腺癌增殖、存活及血管生成等过程。近年来,对乳腺癌发病机制的研究,将 NF- κ B 推向研究的前沿。而肿瘤复发转移是目前肿瘤治疗的关键障碍,其过程包含很多步骤,涉及很多分子表达的改变^[6-8]。MTA2 作为转移相关基因家族成员之一,主要通过参与 NuRD 复合物构成而发挥生物功能。研究显示,MTA2 在调节肿瘤细胞骨架和细胞迁移过程

中发挥重要作用,对多种肿瘤侵袭转移过程中的 Rho/ROCK 信号通道起调控作用,并且与多种肿瘤转录相关因子存在交叉作用,共同参与肿瘤侵袭转移过程^[9-12]。但 MTA2 在乳腺癌中的作用却少有报道,因此,研究 MTA2 在乳腺浸润性导管癌中的表达及作用,可为乳腺癌的复发转移治疗提供新的思路。

乳腺浸润性导管癌患者组织中的 NF- κ B 水平明显高于癌旁正常组织,但各年龄段、各肿瘤大小及组织学分期的乳腺浸润性导管癌患者 NF- κ B 表达水平比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$);而与淋巴结转移及 TNM 分期等指标有关($P < 0.05$)。本研究结果与 HOU 等^[13]的研究结果相一致。NF- κ B 的活化能够促进乳腺癌细胞的转化、迁移和转移。HUBER 等^[14]的研究也表明 NF- κ B 的活化参与肿瘤转移、转化过程。这提示 NF- κ B 有助于对乳腺癌临床病情的判断,对乳腺癌的预后评估具有参考作用。此外,本研究结果表明,NF- κ B 和 MTA2 在乳腺浸润性导管癌组织中的表达呈正相关关系($r = 0.808$, $P = 0.012$)。而 MTA2 作为转移相关基因家族中的一员,不仅与淋巴结转移及 TNM 分期等指标有关($P < 0.05$),且在 ER 阳性的乳腺肿瘤患者中表达更明显。在 MTA2 与雌激素通路的相关研究中发现,MTA2 与雌激素受体 α (ER α) 的表达有着明显的相关性,MTA2 在乳腺癌中通过脱乙酰作用等方式抑制了该受体的表达,而乳腺癌的内分泌治疗药物靶点之一就是 ER α ^[15]。MTA2 对于 ER α 的脱乙酰化作用可能是通过 HDAC1 产生的,最终导致 ER α 的转录受到抑制,并且 N-Co R 等也参与了 HDAC1 的组成,ER α 在多因素共同作用下功能被进一步的抑制。

综上所述,NF- κ B 和 MTA2 联合检测可为乳腺浸润性导管癌的诊断,评估侵袭转移程度和预后提供理论依据,然而 NF- κ B 和 MTA2 在乳腺浸润性导管癌中的相互作用机制仍需进一步研究。此外,本研究样本量较小,后续需加大样本量研究。

参考文献

- [1] GATZA M L, LUCAS J E, BARRY W T, et al. A pathway-based classification of human breast cancer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(15): 6994-6999.
- [2] INOUE J I, GOHDA J, AKIYAMA T, et al. NF-kappa B activation in development and progression of cancer[J]. Cancer Sci, 2007, 98(3): 268-274.
- [3] KARIN M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression[J]. Nature, 2006, 441(792): 431-436.
- [4] YANG J R, PAN T J, YANG H, et al. Kindlin-2 promotes invasiveness of prostate cancer cells via NF- κ B-dependent upregulation of matrix metalloproteinases [J]. Gene, 2016, 576(1 Pt 3): 571-576.
- [5] PHOON Y P, CHEUNG A K, CHEUNG F M, et al. IK-BB tumor suppressive role in nasopharyngeal carcinoma via NF- κ B-mediated signalling[J]. Int J Cancer, 2016, 138(1): 160-170.
- [6] PALMER T D, ASHBY W J, LEWIS J D, et al. Targeting tumor cell motility to prevent metastasis[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2011, 63(8): 568-581.
- [7] VALASTYAN S, WEINBERG R A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms[J]. Cell, 2011, 147(2): 275-292.
- [8] HOLEN I, WHITWORTH J, NUTTER F, et al. Loss of plakoglobin promotes decreased cell-cell contact, increased invasion, and breast cancer cell dissemination in vivo[J]. Breast Cancer Res, 2012, 14(3): 86-99.
- [9] ZHOU J, ZHAN S, TAN W, et al. P300 binds to and acetylates MTA2 to promote colorectal cancer cells growth[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 444(3): 387-390.
- [10] FU J, QIN L, HE T, et al. The TWIST/Mi2/NuRD protein complex and its essential role in cancer metastasis [J]. Cell Res, 2011, 21(2): 275-289.
- [11] CHEN H, XIE G H, WANG W W, et al. Epigenetically downregulated Semaphorin 3E contributes to gastric cancer[J]. Oncotarget, 2015, 6(24): 20449-20465.
- [12] COVINGTON K R, FUGUA S A. Role of MTA2 in human cancer[J]. Cancer Metastasis Rev, 2014, 33(4): 921-928.
- [13] HOU M F, LIN S B, YUAN S S, et al. The clinical significance between activation of nuclear factor kappa B transcription factor and overexpression of HER-2/neu oncoprotein in Taiwanese patients with breast cancer[J]. Clin Chim Acta, 2003, 334(1/2): 137-144.
- [14] HUBER M A, AZOITEI N, BAUMANN B, et al. NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression [J]. J Clin Invest, 2004, 114(4): 569-581.
- [15] O'NEILL D J, WILLIAMSON S C, ALKHARAIF D, et al. SETD6 controls the expression of estrogen-responsive genes and proliferation of breast carcinoma cells[J]. Epigenetics, 2014, 9(7): 942-950.

(收稿日期:2017-09-24 修回日期:2017-11-14)