

## • 实验研究 •

## 乳腺癌中 MIF-mRNA 的表达及其意义

王世江 霍志军 王佩国 王 平

**【摘要】 目的** 探讨 MIF-mRNA 在乳腺良、恶性组织中的表达和意义。**方法** 抽取乳腺癌和癌旁组织总 RNA,采用半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 38 例乳腺癌和相应癌旁乳腺组织中 MIF-mRNA 的表达,分析其差异。**结果** 乳腺癌组织 MIF-mRNA(与内参比值)为  $0.82 \pm 0.07$ ,明显高于癌旁乳腺组织的  $0.57 \pm 0.03$  ( $P < 0.05$ )。腋窝淋巴结转移阳性患者乳腺癌组织内 MIF 表达明显高于淋巴结转移阴性患者乳腺癌组织。**结论** MIF 在乳腺癌中表达明显上升,可能参与了乳腺癌的癌变和转移过程。

**【关键词】** 乳腺癌; 巨噬细胞移动抑制因子

**【中图法分类号】** R737.9

**【文献标识码】** A

**Significance of expression of MIF-mRNA in breast cancer** WANG Shi-jiang, HUO Zhi-jun, WANG Pei-guo, WANG Ping. Department of Radiotherapy, Cancer Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the expression of macrophage migration inhibition factor (MIF) gene in breast cancer by evaluating the expression levels of MIF-mRNA in breast cancer and normal breast tissues. **Methods** Total RNA was extracted from breast cancer tissue and beside-cancer tissue. The MIF-mRNA expressions of breast cancer tissue and beside-cancer tissue of 38 patients were tested by RT-PCR, and the relation between them was analyzed. **Results** The MIF-mRNA level in the breast cancer tissue ( $0.82 \pm 0.07$ ) was significantly higher than that of beside-cancer tissue ( $0.57 \pm 0.03$ ), ( $P < 0.05$ ), and significantly higher in patients with positive metastasis of axillary lymph nodes than in patients with negative metastasis of axillary lymph nodes. **Conclusion** MIF, as a cytokine, whose expression increases significantly in breast cancer, might be involved in

作者单位:300060 天津,天津医科大学附属肿瘤医院放射治疗科 天津市肿瘤防治重点实验室(王世江、王佩国、王平); 250117 济南,山东省肿瘤医院放射治疗科(霍志军)

通讯作者:王平, E-mail: wsjhappy115@yahoo.com.cn

pathogenesis and metastasis of breast cancer.

**【Key words】** Breast carcinoma; Macrophage migration inhibition factor gene

巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)起初发现来源于激活的 T 淋巴细胞,后来发现其在许多组织细胞都可以表达。作为一种免疫调节剂, MIF 促进恶性肿瘤细胞侵袭和转移方面的作用已屡有报道<sup>[1]</sup>。本研究检测 MIF 在乳腺癌中的表达并探讨其与临床病理特征之间的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 病例分组及一般资料

乳腺癌组 38 例,为天津医科大学附属肿瘤医院 2006 年 2 月至 2007 年 5 月间手术治疗的原发性乳腺癌女性患者,年龄 26 ~ 75 岁,中位年龄 48 岁。术前均未化疗。已绝经者 18 例,未绝经者 20 例。按乳腺癌国际 TNM 临床分期:I 期 3 例, II 期 26 例, III 期 9 例。腋窝淋巴结转移阴性 18 例,腋窝淋巴结转移阳性 20 例。

乳腺癌旁组织 38 例,为同期手术治疗的乳腺癌患者。所取组织均距离癌组织边缘约 5 cm。所有病例术后均经病理检查证实。每例标本取材后迅速投入液氮中速冻,然后置于 - 70℃ 的冰箱保存备用。

### 1.2 组织总 RNA 提取

Trizol 为 Invitrogen 公司产品,按操作说明书步骤提取每例标本的总 RNA 后,在 Gene Amp 扩增仪上进行 RT-PCR。根据紫外分光光度计测得各管总 RNA 质量浓度( $A_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$  值  $\geq 1.8$  者为理想)。当质量浓度在 800 ~ 1400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  时,各取 4  $\mu\text{l}$  总体积的 RNA 逆转录成 cDNA。逆转录条件:加水至反应体系 20  $\mu\text{l}$ , 42 °C 1 h, 70 °C 变性 10 min,反应完毕后取出,冰上放置 5 min,将生成的 cDNA 置于 - 20 °C 保存。分别取一定量的 cDNA 进行 PCR 扩增(扩增目的基因和内参照基因时所加引物、cDNA 模板量均一致。扩增在 2 个 EP 管内进行,但为同一温度和 10  $\mu\text{l}$  反应体系),加引物(上下游混合后) 1  $\mu\text{l}$ ,模板 1.2  $\mu\text{l}$ ,其余按说明操作。

### 1.3 MIF 基因和内参照 GAPDH 引物

参考国际互联网 cDNA 文库,利用 PRIMER5 设计引物序列,所有引物均

由上海生工生物技术服务有限公司合成。

MIF:上游 5'-GTTCTCTCCGAGCTCACC-3',下游 5'-TGCTGTAGGAGCGGTTCTG-3',该引物扩增产物为 180 bp; GAPDH:上游 5'-ACAGTCCATG CCATCACTGCC-3',下游 5'-GCCTGCTTCACCACC TTCTTG-3',GAPDH 扩增产物片段为 269 bp。PCR 条件:94 °C 3 min,94 °C 45 s,61 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 45 s;扩增 32 个循环。

#### 1.4 组织雌激素受体检测

所取组织在本院病理科作 HE 染色后,继而采用免疫组织化学 SP 三步法测 ER 状况。一抗 ER 免疫组织化学 SP 试剂盒、浓缩型 DAB 试剂盒均购自北京中山生物技术有限公司。ER 的一抗工作浓度均为 1:50。ER 结果判断:以细胞核着色判断为阳性,随机选择 5 个高倍视野,计数 500 个以上细胞。根据阳性细胞数及细胞染色强度进行半定量。无阳性细胞,计 0 分;阳性细胞数 1% ~ 30%,计 1 分,31% ~ 70% 计 2 分,71% ~ 100% 计 3 分。再根据阳性着色强度依次计 1、2、3 分(浅棕色为 1 分,棕黄色为 2 分,深棕色为 3 分)。每张切片进行两项分数累计,0 分为阴性,1 ~ 2 分为 +,3 ~ 4 分为 ++,5 ~ 6 分为 +++。

#### 1.5 统计学处理

数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS12.0.1 软件分析,两组样本间均数比较采用独立样本 *t* 检验,3 组样本间均数比较时,采用方差分析(ANOVA)的 *F* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

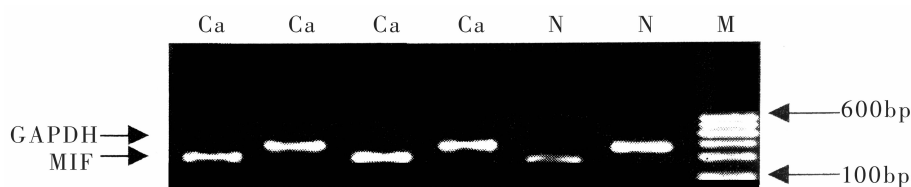
### 2.1 MIF 及 GAPDH-mRNA 在乳腺癌中的表达

MIF 基因在乳腺癌中表达率为 82% (32/39)。不表达的标准是:模板连续 3 次 PCR,内参基因扩增出条带,而 MIF 基因无目的条带。癌旁乳腺组织中,MIF 表达率为 68% (26/38)(表 1,图 1)。

表 1 乳腺良恶性组织中 MIF-mRNA 表达的差异

组织	<i>n</i>	MIF/GAPDH
乳腺癌 <sup>a</sup>	38	0.82 ± 0.07 (32 例阳性)
癌旁组织	38	0.57 ± 0.03 (26 例阳性)

a:  $P < 0.05$ , 与癌旁组织比较



M:标记条带(100~600 bp);N:癌旁乳腺组织;Ca:乳腺癌组织

图 1 组织内 MIF-mRNA 的 RT-PCR 图

## 2.2 MIF 基因与临床病理因素的关系

在乳腺癌组织中,MIF 基因与临床分期、月经情况、雌激素受体状况无明显相关性(表 2)。但是在淋巴结转移阳性患者乳腺癌组织中,MIF-mRNA 的表达明显高于淋巴结转移阴性患者,二者间的差异有统计学意义。

表 2 乳腺癌中 MIF-mRNA 与临床病理因素的关系

临床病理因素	n	MIF/GAPDH		检验值
		阳性例数	MIF 阳性(32 例)	
临床分期				
I	3	3	$0.78 \pm 0.05$	$F = 0.78$ $P = 0.468$
II	26	22	$0.83 \pm 0.07$	
III	9	7	$0.80 \pm 0.06$	
淋巴结转移				
(-)	18	12	$0.78 \pm 0.04$	$P < 0.05$
(+)	20	20	$0.84 \pm 0.08$	
月经				
未绝经	20	19	$0.83 \pm 0.07$	$P = 0.841$
绝经	18	13	$0.81 \pm 0.04$	
ER				
(-)	17	14	$0.81 \pm 0.03$	$P = 0.776$
(+~+++)	21	18	$0.83 \pm 0.07$	

## 3 讨论

MIF 于 20 世纪 60 年代就已被发现,因其能抑制巨噬细胞向血管外游走而得名,是一种来源于 T 淋巴细胞的细胞因子。长期以来,学者们认为 MIF 仅在机体炎症反应中起作用,直到 20 世纪 90 年代中后期,才开始研究 MIF 在肿瘤发展和演进过程中的作用。实验研究表明,MIF 在炎症和肿瘤演进过程中起双重效应,既可通过自分泌途径调节炎症类细胞的活性,又可通过旁分泌途径来刺激肿瘤细胞的增殖、分化,以及抑制肿瘤细胞 P53 依赖的细胞凋亡<sup>[1-2]</sup>。

本研究发现,与癌旁乳腺组织相比,MIF 基因 mRNA 水平在乳腺癌中表达明显上调,差异有统计学意义,提示 MIF 参与了乳腺癌的癌变过程。有研究证实 MIF 作为独特的可溶性细胞因子在多种肿瘤的发生、发展过程中起重要作用,直接或间接影响着肿瘤的生长、侵袭和转移<sup>[3-4]</sup>。

Takahashi 等<sup>[5]</sup>研究了抑制 MIF 在大肠癌细胞系表达后大肠癌细胞的生长情况。他们用反义 MIF 表达质粒消除内源性 MIF,发现大肠癌细胞的生长减少了 40 %,因此认为 MIF 是一种细胞增殖因子。

本研究表明,在预示着肿瘤恶性度高、预后差的淋巴结转移阳性患者乳腺癌组织中 MIF 的表达高于淋巴结转移阴性患者。这与在结肠癌中的研究结果一致<sup>[6]</sup>。

MIF 促进肿瘤发生和转移的作用机制尚不清楚。巨噬细胞通常聚集在肿瘤浸润区域邻近的间质组织中,肿瘤和宿主炎症细胞之间的相互作用对肿瘤的进展和消退有重要影响。肿瘤细胞与巨噬细胞的相互作用导致了细胞外基质降解酶的产生,促进了血管生成反应<sup>[7]</sup>。例如 Fukushima 等<sup>[8]</sup>研究发现 MIF 在早期阶段有潜在的促进肿瘤生长和诱导新生血管形成的作用。Ogawa 等<sup>[9]</sup>报道在大鼠模型中,MIF 诱导血管形成在肿瘤形成过程中起着重要作用,同时还证实抗 MIF 抗体可抑制人脐静脉内皮细胞的增殖。国内的研究结果与此一致。李智等<sup>[10]</sup>在体外实验中发现,MIF 可以诱导肿瘤细胞 MMP-9 和 IL-8 表达上调,提高鼻咽癌细胞体外侵袭能力,可能是肿瘤早期组织侵袭和淋巴结转移的重要因素。

淋巴细胞在人类肿瘤组织中的浸润是较为普遍的现象,因此将肿瘤组织中细胞因子 MIF 的表达作为预测癌细胞侵袭、转移或患者预后的标志物,具有重要的意义。

#### 参考文献

- [1] Mitchell R A, Bucala R. Tumor growth-promoting properties of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Semin Cancer Biol*,2000,10:359-366.
- [2] Hudson J D, Shoaibi M A, Maestro R, *et al.* A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med*,1999,190:1375-1382.
- [3] Ren Y, Tsui H T, Poon R T, *et al.* Macrophage migration inhibitory factor: roles in regulating tumor cell migration and expression of angiogenic factors in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*,2003,107:22-29.
- [4] Eiji H, Takashi O, Dipok K D. Overexpression of macrophage migration inhibitory factor induces angiogenesis and deteriorates prognosis after radical resection for hepatocellular carcinoma. *Cancer*,2005,103:588-596.
- [5] Takahashi N, Nishihira J, Sato Y, *et al.* Involvement of macrophage migration inhibitory factor in the mechanism of tumor

- cell growth. Mol Med, 1998, 4: 707 - 714.
- [6] Legendre H, Decaestecker C, Nagy N, *et al.* Prognostic values of galectin and the macrophage migration inhibitory in human colorectal cancer. Mod Pathol, 2003, 16: 419 - 504.
- [7] Dabbous M K, North S M, Haney L, *et al.* Effects of mast cell-macrophage interactions on the production of collagenolytic enzymes by metastatic tumor cells and tumor-derived and stromal fibroblasts. Clin Exp Metastasis, 1995, 13: 33 - 41.
- [8] Fukushima T, Nishihira J, Yoshiki T, *et al.* Evidence of dual function of macrophage migration inhibitory factor relevant to tumor progression and regression. Int J Mol Med, 2005, 16: 119 - 124.
- [9] Ogawa H, Nishihara J, Sato Y, *et al.* An antibody for macrophage migration inhibitory factor suppresses tumor growth and inhibits tumor associated angiogenesis. Cytokine, 2000, 12: 309 - 314.
- [10] 李智, 林素暇, 梁英杰. 巨噬细胞移动抑制因子提高鼻咽癌细胞体外侵袭能力. 中华病理学杂志, 2004, 33: 57 - 61.

(收稿日期: 2007-08-27)

(本文编辑: 陈莉)

王世江, 霍志军, 王佩国, 等. 乳腺癌中 MIF-mRNA 的表达及其意义[J/CD]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2008, 2(2): 171 - 176.