

## • 实验研究 •

# 乳腺癌组织中驱动蛋白家族成员 1B mRNA 水平预测患者预后的临床价值

李林 李晓青 潘秀华 冯玉梅

**【摘要】 目的** 探讨乳腺原发癌组织中驱动蛋白家族成员 1B(KIF1B)基因 mRNA 表达与乳腺癌临床病理因素的关系,评估其对预测患者预后的临床价值。**方法** 采用实时定量 RT-PCR 方法检测 180 例乳腺浸润性导管癌原发癌组织中 KIF1B mRNA 水平;采用受试者工作特征(ROC)曲线确定 KIF1B mRNA 水平分组的阈值; $\chi^2$  检验比较组间差异;Kaplan-Meier 法绘制生存曲线;Log-rank 时序检验比较组间生存期的差异;多因素 Cox 回归模型评估 KIF1B mRNA 水平对患者预后的预测价值。**结果** KIF1B mRNA 水平在各临床病理因素亚组间的差异无统计学意义;KIF1B mRNA 低水平组患者 5 年无病生存率和 5 年无转移生存率显著低于高水平组( $\chi^2=4.714$   $P=0.030$ ,  $\chi^2=4.393$   $P=0.036$ ),而 3 年无病生存率和 3 年无转移生存率差异无统计学意义;KIF1B 基因表达状态、临床分期、组织学分级和 PR 状态是患者独立预后因素,KIF1B mRNA 低水平组与高水平组患者发生远处转移的风险比为 3.53 (95% CI 为 1.54~8.08,  $P=0.003$ )。**结论** KIF1B mRNA 在乳腺原发癌组织中下调与患者的预后差相关,且是独立预后预测分子标志物。

**【关键词】** 乳腺肿瘤;驱动蛋白家族成员 1B; 定量逆转录聚合酶链反应

**【中图法分类号】** R737.9

**【文献标识码】** A

**Prognostic prediction by detection of KIF1B mRNA level in breast cancer and its clinical significance** LI Lin, LI Xiao-qing, PAN Xiu-hua, FENG Yu-mei.  
Department of Biochemistry and Molecular Biology, Breast Cancer Prevention and Treatment Key Laboratory of Ministry of Education, Tianjin Medical U-

niversity, Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060, China

**【Abstract】 Objective** To clarify the correlation between the mRNA level of 1B (KIF1B), one member of the kinesin family, and clinicopathologic factors in breast cancer, and to evaluate its clinical value in predicting the prognosis of breast cancer patients. **Methods** Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the mRNA expression level of KIF1B in primary invasive ductal carcinoma in 180 cases. Receiver Operating Characteristic (ROC) curve was used to identify the cut-off value of KIF1B mRNA level to group the patients. Chi-square test was used to compare the differences between/among groups. Survival analysis was carried out according to Kaplan-Meier analysis. Log-rank test was used to compare the differences of survival between groups. Multivariate Cox proportional hazards regression model was used to evaluate KIF1B mRNA level for predicting the prognosis of breast cancer patients. **Results** No significant differences in KIF1B mRNA levels were found between/among groups with different clinicopathologic status. Five-year disease-free survival and metastasis-free survival of patients with low KIF1B were significantly lower than those with high KIF1B ( $\chi^2 = 4.714, P = 0.030$ ;  $\chi^2 = 4.393, P = 0.036$ ), while three-year disease-free survival and metastasis-free survival between these two groups were not found significantly different. The KIF1B status, clinical stage, histological grade, PR status were independent prognostic factors of breast cancer by analysis of Multivariate Cox proportional hazards regression model. Patients with low KIF1B had higher risk of distant metastasis than patients with high KIF1B (hazard ratio = 3.53, 95% CI = 1.54 – 8.08,  $P = 0.003$ ). **Conclusion** The under-expressed KIF1B mRNA is correlated with poor prognosis in breast cancer patients, and is an independent molecular marker for predicting prognosis of breast cancer patients.

**【Key words】** Breast neoplasmas; KIF1B; Quantitative RT-PCR

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤,远处转移是导致患者死亡的主要原因。乳腺癌的转移是多基因参与、多步骤、多阶段的复杂生物学过程。相同临床病理和激素受体状态的肿瘤由于生物学特性不同可能具有不同的转移表型,而目前依据常规的临床病理因素和生物学标志不能准确评估肿瘤的转移潜能。乳腺癌转移相关基因的研究将为转移的早期发现提供分子标志,为患者预后的准确评估提供客观依据,为抗转移治疗提供基因靶点。本课题组前期研究发现驱动蛋白家族成员 1B (kinesin family member 1B, KIF1B) 基因在转移性乳腺癌的原发癌组织中 mRNA 水平低于非转移性乳腺癌,是潜在的乳腺癌转移相关基因。本研究采用实时定量 RT-PCR 方法,进一步对乳腺癌组织中 KIF1B 基因表达水平与临床病理因素及转移和预后的关系进行大样本量 5 年以上随访的临床病例验证,并评估其预测患者预后的临床价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 病例资料和标本收集

180例乳腺原发癌组织取自1995年5月至2004年5月天津医科大学附属肿瘤医院乳腺科收治的乳腺癌患者手术切除标本,标本取材均取得患者知情同意。所有患者均无术前化疗,病理类型均为浸润性导管癌(WHO分类)。随访时间36~100个月,180例患者随访时间均超过3年,其中132例患者随访时间多于5年,中位随访时间62个月;4例复发,39例发生远处转移。所有标本均经病理组织学证实。组织标本取材时所用器械均经无RNase处理,标本经液氮速冻后保存于-80℃冰箱。

### 1.2 实时定量 RT-PCR 检测 KIF1B mRNA 表达

**1.2.1 细胞总 RNA 的提取:**采用 Trizol(Invitrogen 公司)提取组织细胞总 RNA,紫外分光光度法测定 RNA 的浓度和纯度,1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

**1.2.2 cDNA 的合成:**使用 20  $\mu$ l 反应体系。在适量的焦碳酸二乙酯(DEPC)中加入 5  $\mu$ g 总 RNA 和 0.5  $\mu$ g Oligo(dT),65℃变性 5 min,冰浴后加入 10 nmol dNTP mix、First-Strand 缓冲液、0.2  $\mu$ mol 二硫苏糖醇(DTT)和 40 U Rnase 抑制剂,37℃温育 2 min 后加入 200 U SuperScript<sup>TM</sup>II,37℃反应 50 min。反应完成后 70℃ 15 min 终止反应。

**1.2.3 引物和探针的设计与合成:**采用 Oligo6.0 软件设计引物和 TaqMan 探针,KIF1B 的上游引物 5'-CTTCGTAAAACAGAGGCCATCAG-3',下游引物 5'-CAAGATGTGGGGTCTTTTGTAGGT-3',TaqMan 探针 5'(FAM)-CATCTCAGCCAACAAAGCCTCTCTC-TC(TAMRA)-3';管家基因 GAPDH 的上游引物 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3',下游引物 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3',TaqMan 探针 5'(FAM)-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC(TAMRA)-3'。引物和探针均由上海生工生物工程公司合成。

**1.2.4 实时定量 RT-PCR:**采用 Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG 试剂盒(Invitrogen 公司)。20  $\mu$ l 反应体系包括由 40 ng 总 RNA 反转录所得的 cDNA,10  $\mu$ l Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG,10  $\mu$ mol/L 的上游引物、下游引物和 TaqMan 探针各 0.4  $\mu$ l。PCR 反应条件为 50℃温育 2 min,95℃预变性 3 min;95℃变性 30 s,62℃退火延伸 1 min,40 个循环。 $C_T$  值为荧光信号达到设定阈值时所经过的循环数, $\Delta C_T$  值为各样本 KIF1B 的  $C_T$  值与管家基因 GAPDH 的  $C_T$  值的差, $2^{-\Delta C_T}$  则为该样本中 KIF1B mRNA 相对于 GAPDH mRNA 的表达量。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS13.0 软件。如果所有样本的 KIF1B mRNA 表达水平不符合正态分布,则各病例的 KIF1B 表达水平按定性分析,采用受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线确定分组的阈值。 $\chi^2$  检验比较组间差异;Kaplan-Meier 法绘制生存曲线;Log-rank 时序检验比较组间生存期的差异;多因素 Cox 回归模型评估 KIF1B mRNA 水平对患者预后的预测价值。 $P < 0.050$  判定差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 乳腺原发癌组织中 KIF1B mRNA 水平与临床病理因素的关系

由于所有样本的 KIF1B mRNA 相对表达量不符合正态分布,以  $3.4 \times 10^{-3}$  为阈值将其划分为 KIF1B 高水平组和低水平组,则 KIF1B 高水平组 109 例、低水平组 71 例。乳腺原发癌组织中 KIF1B mRNA 水平在患者年龄、肿瘤大小、临床分期、组织学分级、淋巴结状态、ER、PR 状态及 HER-2 状态等各组间差异无统计学意义( $P > 0.050$ , 表 1)。

表 1 乳腺原发癌组织中 KIF1B mRNA 水平与临床病理因素的关系

临床病理因素	例数	KIF1B mRNA 水平		$\chi^2$ 值	P 值
		高表达例数	高表达率%		
年龄				0.488	0.485
≤50 岁	92	58	63.0		
>50 岁	88	51	58.0		
肿瘤大小				3.691	0.158
≤2 cm	24	17	70.8		
2~5 cm	136	77	56.6		
>5 cm	20	15	75.0		
临床分期				1.414	0.234
I~II	147	86	58.5		
III	33	23	69.7		
组织学分级				1.522	0.467
I	3	1	33.3		
II	111	71	64.0		
III	23	13	56.5		
缺失	43				
淋巴结状态				0.845	0.358
—	76	49	64.5		
+	104	60	57.7		
阳性淋巴结数				1.046	0.593
0 枚	76	49	64.5		
1~3 枚	71	42	59.2		
≥4 枚	33	18	54.5		
ER				1.841	0.175
+	109	62	56.9		
—	67	45	67.2		
缺失	4				
PR				3.076	0.079
+	85	46	54.1		
—	91	61	67.0		
缺失	4				
HER-2				1.501	0.221
—	70	38	54.3		
+	36	24	66.7		
缺失	74				

2.2 乳腺原发癌组织中 KIF1B mRNA 水平与患者预后的关系

KIF1B mRNA 低水平组患者 5 年无病生存率和 5 年无转移生存率低于 KIF1B mRNA 高水平组, 差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 4.714$   $P = 0.030$ ,  $\chi^2 = 4.393$   $P = 0.036$ , 图 1, 2), 但 3 年无病生存率和 3 年无转移生存率差异无统计学意义 ( $P > 0.050$ , 表 2)。

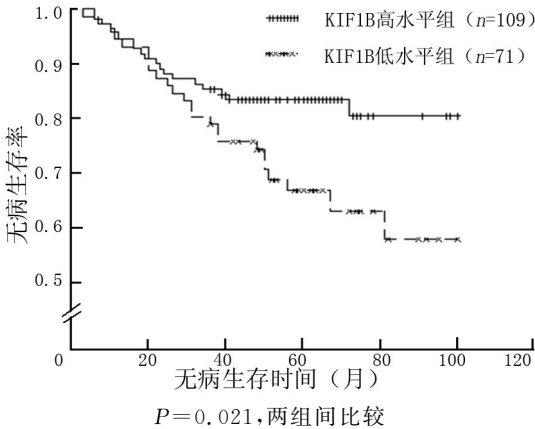


图 1 KIF1B mRNA 高水平组与低水平组患者的无病生存曲线

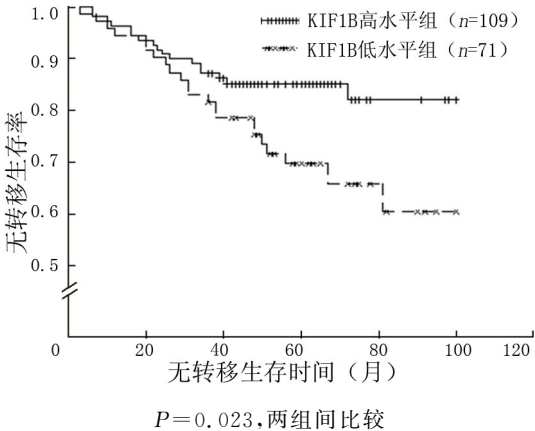


图 2 KIF1B mRNA 高水平组与低水平组患者的无转移生存曲线

表 2 乳腺原发癌组织中 KIF1B mRNA 水平与患者预后的关系

组别	例数	无病生存		$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值	无转移生存		$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值
		例数	生存率(%)			例数	生存率(%)		
随访时间 3 年				1.254	0.263			1.007	0.316
KIF1B 高水平组	109	93	85.3			95	87.2		
KIF1B 低水平组	71	56	78.9			58	81.7		
随访时间 5 年				4.714	0.030			4.393	0.036
KIF1B 高水平组	78	60	76.9			62	79.5		
KIF1B 低水平组	54	32	59.3			34	63.0		

2.3 乳腺原发癌组织中 KIF1B mRNA 水平对预测患者预后的价值评估

将与乳腺癌患者预后相关的临床病理因素和 KIF1B mRNA 状态引入 Cox 比



例风险模型,得出 KIF1B mRNA 表达状态、临床分期、组织学分级和 PR 状态是患者独立预后因素,KIF1B 表达低水平组与高水平组患者发生远处转移的风险比为 3.53(95% CI 为 1.54~8.08, $P=0.003$ ,表 3)。

表 3 乳腺癌患者的独立预后因素

独立预后因素	回归系数( $\beta$ )	标准误( $S_x$ )	Wald	$P$ 值	相对危险度	95%可信区间	
						下限	上限
KIF1B	1.262	0.422	8.925	0.003	3.532	1.543	8.082
临床分期	1.555	0.421	13.639	0.000	4.735	2.074	10.806
组织学分级	0.925	0.404	5.245	0.022	2.521	1.143	5.564
PR	1.145	0.476	5.779	0.016	3.142	1.235	7.989

### 3 讨论

KIF1B 基因定位于人染色体 1p36.2, DNA 全长约 170 kb。KIF1B 基因编码的驱动蛋白样蛋白(kinesin-like protein KIF1B, KLP)属于驱动蛋白(kinesin)家族<sup>[1-2]</sup>,其转录通过选择性剪接产生两个主要的亚型:由 7.8 kb mRNA 编码的分子质量为  $130 \times 10^3$  的 KIF1B $\alpha$  和 10 kb mRNA 编码的分子质量为  $204 \times 10^3$  的 KIF1B $\beta$ 。两者 N 端结构相同,都为微管驱动区,具有微管驱动功能和 ATP 酶活性;C 端结构不同,KIF1B $\beta$  的 C 端有血小板-白细胞 C 激酶底物同源性功能域(pleckstrin homology domain, PH),参与蛋白质-蛋白质作用,可能与细胞内结构相互联系,而 KIF1B $\alpha$  的 C 端没有 PH 功能域<sup>[3]</sup>。这种分子结构的差异决定了两者功能的差异<sup>[4]</sup>,KIF1B $\alpha$  沿微管顺向转运线粒体<sup>[5]</sup>,KIF1B $\beta$  主要运输突触小泡前体参与神经-神经突触传递、神经-肌肉突触传递过程。KIF1B 蛋白亚细胞定位于细胞质,主要聚集在胞质囊泡状和小管状结构,包括线粒体、微管、微管相关复合体、细胞质囊泡及细胞质囊泡膜等。该蛋白广泛分布于成人和胎儿的脑、骨髓、脾脏、骨骼肌等正常组织,尤其聚集在分化的神经细胞中,提示其在多种组织特别是神经组织中发挥功能,还可能在胚胎发育过程中有重要作用<sup>[3,6]</sup>。KIF1B 结合到葡萄糖载体结合蛋白(glucose transporter binding protein, GLUT1CBP),使葡萄糖载体和细胞骨架相连,提示其为细胞骨架驱动蛋白<sup>[7]</sup>。Zhao 等<sup>[8]</sup>指出 KIF1B 基因的 ATP 结合部位突变(Q98L)可引起进行性神经性肌萎缩(Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A, CMT2A)<sup>[9]</sup>,是 CMT2A 的致病基因,因此 KIF1B 基因也称 CMT2A。敲除 KIF1B 基因的小鼠由于神经系统缺陷出生时即死亡,恢复表达 KIF1B 基因可使这些受损的神经元修复存活,提示 KIF1B 具有 ATP 酶活性,可为轴突运输提供能量,在神经传导过程中起重要作用。

研究发现包括神经系统肿瘤在内的多种肿瘤中都存在 KIF1B 表达缺失<sup>[10]</sup>,特别是在同时伴有其他相邻的染色体 1p 基因表达缺失的条件下(如 CHD5),KIF1B 表达下调引起肿瘤发生<sup>[11]</sup>。Schlisio 等<sup>[12]</sup>研究发现 KIF1B 受上游转录调控因子脯氨酰羟化酶 3(EGL nine homolog 3, EglN3)的作用,调节神经细胞凋亡,提示

KIF1B 有介导凋亡诱导作用。进一步研究还发现 KIF1B 基因突变, mRNA 表达下调, 产生凋亡抑制, 使神经祖细胞永生化, 最终导致神经源性肿瘤包括嗜咯细胞瘤、神经母细胞瘤等的发生。但是当 KIF1B 表达下调 50% 时产生凋亡抑制效应, 而 KIF1B 完全失表达反而会促进凋亡。Ohira 等<sup>[13]</sup>发现 KIF1B 在早期神经母细胞瘤中表达量高于晚期神经母细胞瘤 3.6 倍; 但是 Yang 等<sup>[6]</sup>发现 KIF1B 在早期神经母细胞瘤和晚期神经母细胞瘤中表达水平无差异。至今关于 KIF1B 在神经母细胞瘤中的表达尚无大样本量的病例验证。

目前, 有关 KIF1B 在乳腺癌组织的表达及其与肿瘤进展和患者预后关系的研究少见报道。本研究证实乳腺原发癌中 KIF1B 低表达患者的 5 年无病生存率和无转移生存率显著下降, 而 3 年无病生存率和无转移生存率差异无统计学意义, 且 KIF1B 表达状态是患者独立预后因素, 提示 KIF1B 表达水平对长期随访的患者具有独立的预后预测价值, 但对短期随访患者无预测预后价值。本研究结果表明, KIF1B 是新的乳腺癌转移抑制基因, KIF1B mRNA 水平可作为乳腺癌预后预测的生物学标志物。KIF1B 在乳腺癌发生、发展过程中所起的作用及其分子机制均有待进一步深入研究。

### 参考文献

- [1] Gong T L, Burmeister M, Lomax M I. The novel gene D4 Mille maps to mouse chromosome 4 and human chromosome 1p36. *Mamm Genome*, 1996, 7:790—791.
- [2] Nagai M, Ichimiya S, Ozaki T, *et al.* Identification of the full-length KIAA0591 gene encoding a novel kinesin-related protein which is mapped to the neuroblastoma suppressor gene locus at 1p36. 2. *Int J Oncol*, 2000, 16:907—916.
- [3] Gong T W, Winnicki R S, Kohrman D C, *et al.* A novel mouse kinesin of the UNC-104/KIF1 subfamily encoded by the Kif1b gene. *Gene*, 1999, 239:117—127.
- [4] Nakagawa T, Tanaka Y, Matsuoka E, *et al.* Identification and classification of 16 new kinesin superfamily (KIF) proteins in mouse genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94:9654—9659.
- [5] Nangaku M, Sato Yoshitake R, Okada Y, *et al.* KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria. *Cell*, 1994, 79:1209—1220.
- [6] Yang H W, Chen Y Z, Takita J, *et al.* Genomic structure and mutational analysis of the human KIF1B gene which is homozygously deleted in neuroblastoma at chromosome 1p36. 2. *Oncogene*, 2001, 20:5075—5083.
- [7] Bunn R C, Jensen M A, Reed B C. Protein interactions with the glucose transporter binding protein GLUT1CBP that provide a link between GLUT1 and the cytoskeleton. *Mol Biol Cell*, 1999, 10:819—832.
- [8] Zhao C, Takita J, Tanaka Y, *et al.* Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1B beta. *Cell*, 2001, 105:587—597.
- [9] Saito M, Hayashi Y, Suzuki T, *et al.* Linkage mapping of the gene for Charcot-Marie-Tooth disease type 2 to chromosome 1p (CMT2A) and the clinical features of CMT2A. *Neurology*, 1997, 49:1630—1635.
- [10] Schwab M, Praml C, Amler L C. Genomic instability in 1p and human malignancies. *Genes Chromosomes Cancer*. 1996, 16:211—229.
- [11] Bagchi A, Papazoglu C, Wu Y, *et al.* CHD5 is a tumor suppressor at human 1p36. *Cell*, 2007, 128:459—

475.

- [12] Schlisio S, Kenchappa R S, Vredeveld LC, *et al.* The kinesin KIF1Bbeta acts downstream from EglN3 to induce apoptosis and is a potential 1p36 tumor suppressor. *Genes Dev*, 2008, 22:884—893.
- [13] Ohira M, Kageyama H, Mihara M, *et al.* Identification and characterization of a 500-kb homozygously deleted region at 1p36.2-p36.3 in a neuroblastoma cell line. *Oncogene*, 2000, 19:4302—4307.

(收稿日期:2008-12-22)

(本文编辑:周艳)

李林,李晓青,潘秀华,等. 乳腺癌组织中驱动蛋白家族成员 1B mRNA 水平预测患者预后的临床价值[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2009, 3(2):173—180.