

• 临床研究 •

整合素 β 样 1 mRNA 在乳腺原发癌中的表达及其临床意义

李东梅 陈晓慧 李林 李晓青 冯玉梅

【摘要】 目的 探讨乳腺原发癌组织中整合素 β 样 1 (integrin β -like 1, ITGBL1) mRNA 水平与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 例行乳腺癌根治术并随访 3 年以上的乳腺浸润性导管癌组织中 ITGBL1 mRNA 的水平。采用受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线确定 ITGBL1 mRNA 水平分组的阈值; 用 χ^2 检验比较组间差异; 用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线; 用 Log-rank 时序检验比较组间生存期的差异。**结果** ER 阴性乳腺癌患者的 ITGBL1 mRNA 高表达率低于 ER 阳性患者 ($\chi^2=7.475, P=0.006$), 组织学 III 级的乳腺癌患者 ITGBL1 mRNA 高表达率低于 I ~ II 级乳腺癌患者 ($\chi^2=4.410, P=0.036$), 而在不同年龄和绝经状态、肿瘤大小、淋巴结转移状态、临床分期以及 PR 和 HER-2 状态各组间比较差异无统计学意义 ($P>0.050$)。ITGBL1 mRNA 低表达组患者 3 年无转移生存率低于高表达组, 差异有统计学意义 ($\chi^2=4.569, P=0.033$); 3 年无病生存率、5 年无病生存率和 5 年无转移生存率组间比较虽差异无统计学意义 ($P>0.050$), 但随 ITGBL1 mRNA 表达降低而有下降趋势。**结论** 乳腺原发癌中 ITGBL1 mRNA 高表达是 ER 阳性乳腺癌的生物学特征之一; ITGBL1 mRNA 低表达的乳腺癌恶性程度高、组织分化差且患者预后不良, 提示 ITGBL1 基因是潜在的乳腺癌预后预测分子标志物。

【关键词】 乳腺癌; 转移; 整合素 β 样 1; 定量 RT-PCR

【中图分类号】 R739.9

【文献标识码】 A

Expression of integrin β -like 1 mRNA in primary breast cancer and its clinical significance LI Dong-mei, CHEN Xiao-hui, LI Lin, LI Xiao-qing, FENG Yu-mei. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Breast Cancer Prevention and Treatment Key Laboratory of Ministry of Education, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060, China

【Abstract】 Objective To clarify the relationships between ITGBL1 (integrin β -like 1) mRNA expression and clinicopathological factors in breast cancer, and to evaluate its clinical value in predicting the prognosis of breast cancer. **Methods** Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression level of ITGBL1 mRNA in 180 cases of primary invasive ductal carcinoma,

基金项目: 国家自然科学基金课题 (30872518); 天津市应用基础研究项目 (06YFJMJC12900); 天津市自然科学基金重点项目 (09JCZDJC19800); 教育部长江学者和创新团队发展计划 (IRT0743)

作者单位: 300060 天津, 天津医科大学附属肿瘤医院肿瘤研究所生物化学及分子生物学室 乳腺癌防治研究教育部重点实验室

通讯作者: 冯玉梅, E-mail: ymfeng@tjmu.edu.cn

who underwent radical mastectomy and were followed up for at least 3 years. Receiver Operating Characteristic (ROC) curve was used to identify the cut-off value of ITGBL1 mRNA level to group the patients. Chi-square test was used to compare differences between groups. Survival analysis was carried out using Kaplan-Meier analysis. Log-rank test was used to compare the differences of survival rates between groups. **Results** The high expression rate of ITGBL1 mRNA in ER-negative breast cancer patients was lower than in ER-positive breast cancer patients ($\chi^2=7.475$, $P=0.006$), lower in histological grade III breast cancer patients than in histological grades I and II breast cancer patients ($\chi^2=4.410$, $P=0.036$); No statistically significant difference was observed between groups in age, menostasis status, tumor size, lymph node status, clinical stage and the status of PR and HER-2 ($\chi^2=4.569$, $P=0.033$). Three-year and 5-year disease-free survival and 5-year metastasis-free survival of cases had no statistical differences between groups. ($P>0.050$), but with decrease of the ITGBL1 mRNA expression, there was a decrease trend in survival. **Conclusions** High expression level of ITGBL1 mRNA is one of the biological characteristics of ER-positive breast cancer. Patients with low expression of ITGBL1 mRNA have higher degree of malignancy, poor differentiation, and poor prognosis, indicating ITGBL1 mRNA is a potential molecular marker for predicting prognosis of breast cancer.

【Key words】 Breast neoplasms; Metastasis; ITGBL1; Quantitative RT-PCR

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,而转移是导致乳腺癌患者死亡的主要原因。转移相关基因的筛选研究,将为转移机制的阐明提供线索,为转移的早期诊断和患者的预后预测提供分子标志,为抗转移治疗提供靶点。本课题组在前期研究发现,整合素 β 样 1(integrin bate-like 1, ITGBL1) mRNA 在乳腺淋巴结转移癌中的表达较其配对的原发癌下调,是潜在的乳腺癌转移相关基因^[1]。本研究采用实时定量 RT-PCR 方法检测 180 例随访 3 年以上的乳腺原发癌组织中 ITGBL1 mRNA 的表达水平,阐明其与患者临床病理因素的关系,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

自 1995 年 5 月至 2004 年 5 月于天津医科大学附属肿瘤医院乳腺科收集到 180 例乳腺原发癌组织标本。所有患者行乳腺癌根治术并且术前未行放、化疗。标本取材均经患者知情同意。病理类型为浸润性导管癌(WHO 分类)。患者年龄 30~75 岁,中位年龄 50 岁;随访时间 36~100 个月,其中 180 例随访满 36 个月,4 例复发,27 例发生远处转移;132 例随访满 60 个月,4 例复发,36 例发生远处转移。每一病例均取原发癌组织,并经病理组织学证实。组织标本取材所用器械均经无 RNase 处理,标本经液氮速冻后保存于-80℃冰箱

备用。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞总 RNA 的提取:采用 Trizol (Invitrogen 公司)一步法提取组织细胞总 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:20 μ l SuperScript™II (Invitrogen 公司)反应体系,其中包括 5 μ g 总 RNA 和 0.5 μ g Oligo(dT)。65 °C 变性 5 min,冰浴后加入 10 nmol dNTP mix、5 \times First-Strand 缓冲液、0.2 μ mol 二巯基苏糖醇(DTT)和 40 U RNase 抑制剂,37 °C 温育 2 min 后加入 SuperScript™II 200 U,37 °C 反应 50 min。反应完成后 70 °C 15 min 终止反应。

1.2.3 引物和探针的设计与合成:采用 Oligo 6.0 软件设计引物和探针。ITGBL1 上游引物:5'-GGCTGGTATGGGAAGAAGTGT-3',下游引物 5'-CGATCTCCTGGAGGATAGCA-3',Taqman 探针:5' (FAM)-CATTTACCCCT-CCCAGAGCAAGGCA (TAMRA)-3';管家基因 GAPDH 上游引物:5'-GAAGGTGAA-GGTTCGGAGTC-3',下游引物:5'-GAAGATGGTGATGGGA-TTTC-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 实时定量 RT-PCR:采用 Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG 试剂盒 (Invitrogen 公司)。20 μ l 反应体系中包括由 40 ng 总 RNA 反转录所获得的 cDNA、10 μ l Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG、10 μ mol/L 的上下游引物和 TaqMan 探针各 0.4 μ l。PCR 反应条件为 50 °C 温育 2 min、95 °C 预变性 2 min、95 °C 变性 30 s、60 °C 退火延伸 1 min、40 个循环。CT 值为荧光信号达到设定阈值时所经过的循环数,用检测到的 Ct 值,以 GAPDH mRNA 为内参照,计算 ITGBL1 mRNA 表达量,计算公式^[2]为:2 Ct(GAPDH)-Ct(ITGBL1)。

1.3 统计学处理

统计学分析采用 SPSS13.0 软件。如果所有样本 ITGBL1 mRNA 表达量不符合正态分布,则各病例的 ITGBL1 表达量按定性分析,采用 ROC 曲线确定分组的阈值。用 χ^2 检验和 Fisher 精确概率法比较组间差异,用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,用 Log-rank 时序检验比较组间生存期的差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺原发癌组织的 ITGBL1 mRNA 表达与临床病理因素的关系

ER 阴性乳腺癌患者的 ITGBL1 mRNA 高表达率低于 ER 阳性患者($P =$

0.006),组织学Ⅲ级乳腺癌患者中 ITGBL1 mRNA 高表达率低于Ⅰ~Ⅱ级乳腺癌患者($P=0.036$),而在不同年龄、绝经状态、肿瘤大小、淋巴结转移状态、临床分期以及 PR 和 HER-2 状态各组间比较差异无统计学意义(表 1)。

表 1 乳腺原发癌组织中 ITGBL1 mRNA 表达与临床病理因素的关系

组别	例数	ITGBL1 mRNA		χ^2 值	P 值
		高表达例数	高表达率(%)		
年龄(岁)				0.006	0.940
≤50	92	58	63.0		
>50	88	55	62.5		
绝经状态				0.007	0.934
—	96	60	62.5		
+	84	53	63.1		
肿瘤大小(cm)				1.615	0.446
≤2	24	15	62.5		
2~5	136	88	64.7		
>5	20	10	50.0		
临床分期				3.533	0.060
I+II	147	97	66.0		
III	33	16	48.5		
组织学分级				4.410	0.036
I+II	127	88	69.3		
III	27	13	48.1		
缺失	26				
淋巴结状态				0.511	0.475
—	76	50	65.8		
+	104	63	60.6		
ER				7.475	0.006
+	101	73	72.3		
—	66	34	51.5		
缺失	13				
PR				1.157	0.282
+	77	53	68.8		
—	84	51	60.7		
缺失	19				
HER-2				0.698	0.404
—	113	72	63.7		
+	51	29	56.9		
缺失	16				

2.2 乳腺原发癌组织中 ITGBL1 mRNA 水平与患者预后的关系

ITGBL1 mRNA 低表达组患者无转移生存率低于高表达组,差异有统计学意义($P=0.033$);ITGBL1 mRNA 低表达组患者 3 年无病生存率、5 年无病生存率和 5 年无转移生存率低于高表达组,差异虽无统计学意义($P<$

0.050),但随 ITGBL1 mRNA 表达降低而有下降趋势(表 2,图 1)。

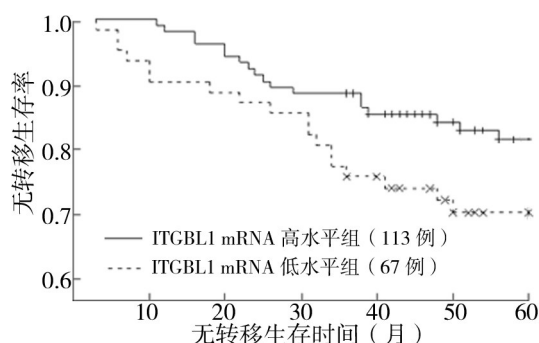


图 1 ITGBL1 mRNA 高水平组与低水平组患者的无转移生存曲线

3 讨论

ITGBL1 基因是 1999 年 Berg 等在筛选与整合素 β 亚基序列同源的表达序列标签(expression sequence tag, EST)的研究中,在骨肉瘤、成骨细胞、胎儿肺和人脐静脉内皮细胞中发现并克隆得到的^[3]。ITGBL1 基因定位于人染色体 13q33, DNA 全长 26 kb, 含有 11 个外显子和 13 个内含子; mRNA 全长 2498 bp, 其中编码序列 1484 bp, 编码 494 个氨基酸的成骨细胞特异性富含半胱氨酸蛋白(osteoblast specific cysteine-rich protein, OSCP), 该蛋白包括一个典型的信号肽和一个由 10 个 EGF-like 串连重复序列组成的共 471 个氨基酸的亲水性功能区, 也被命名为含十个整合素 EGF-like 重复序列蛋白(ten integrin epidermal growth factor (EGF)-like repeat domains protein, TIED)。EGF 样结构域存在于生长因子受体、黏附分子、凝血因子和纤溶因子等蛋白中, 通过钙离子介导的蛋白二聚体的形成, 参与细胞间黏附和受体与配体间相互作用, 因此, TIED 可能具有连接细胞与细胞和细胞与基质的黏附分子功能^[4-8]和(或)受体结合的信号传递功能^[9]; TIED 与整合素 β 亚基富含半胱氨酸重复区域之间序列的同源性高达 68%, 但 TIED 没有跨膜区和精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Glu-Asp, RGD)序列, 因此 TIED 可能具有与整合素不同的生物学功能或作用机制^[5]。通过比较乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的高骨转移潜能的亚克隆细胞系与亲代细胞以及小鼠颅骨成骨细胞的基因表达谱差异的研究发现, ITGBL1 在“成骨样”癌细胞中表达上调, 提示在类骨样“osteomimic”乳腺癌细胞的形成和转移中可能起重要作用^[10-12]。Wagner 等^[13]研究发现 ITGBL1 可能是造血祖细胞与间充质干细胞间的特异性连接蛋白, 其高表达有利于稳定造血祖细胞的干细胞特性, 推测 ITGBL1 可能对维持干细胞特性起重要作用。但是, 关于 ITGBL1 的生物学功能及其在肿瘤发生发展中的作用及机制研究尚无报道。

表 2 乳腺原发癌组织中 ITGBL1 mRNA 水平与患者预后的关系

组别	例数	缺失例数	无病生存		χ^2 值	P 值	无转移生存		χ^2 值	P 值
			例数	生存率(%)			例数	生存率%		
随访时间 3 年					3.319	0.068			4.569	0.033
ITGBL1 高水平组	113	0	98	86.7			101	89.4		
ITGBL1 低水平组	67	0	51	76.1			52	77.6		
随访时间 5 年					2.316	0.128			1.998	0.158
ITGBL1 高水平组	79	34	59	74.7			61	77.2		
ITGBL1 低水平组	53	14	33	62.3			35	66.0		

乳腺癌是高度异质性肿瘤,由于其组织学起源不同和基因表达差异而具有不同的生物学特性和不同的转移潜能,因而,基于肿瘤组织的分子特征将乳腺癌分类为不同的亚型,可以弥补临床常规病理和生物学指标对患者预后评估和疗效评价的不足。Oh 等^[14]发现 ER 阳性乳腺癌的基因表达特征与乳腺导管的腔上皮细胞(luminal epithelial cell)相似,称为 ER(+)/luminal-like 亚型;ER 阴性乳腺癌的基因表达特征与乳腺导管的肌上皮/基底细胞(myoepithelial / basal cell)相似,称为 ER(-)/basal-like 亚型。前者对三苯氧胺(TAM)等内分泌治疗有效,患者预后较好;而后者预后较差。Dontu 等^[15]认为在正常情况下乳腺组织内的乳腺干细胞为 ER(-)的细胞群,它们在激素的作用下可以产生 ER(+)的祖细胞,并继续生长构成正常的乳腺;当乳腺干细胞分化调控异常时,可形成 ER 阳性或 ER 阴性的乳腺癌干细胞,并在不同的微环境中转化为预后完全不同的肿瘤细胞群。本研究发现 ER 阳性乳腺癌组织中 ITGBL1 mRNA 水平显著高于 ER 阴性组织,提示 ITGBL1 mRNA 高表达是 ER 阳性乳腺癌的生物学特征之一。笔者推测 ITGBL1 的编码蛋白 TIED 可能在乳腺干细胞向 ER 阳性的乳腺腔上皮分化和癌变中起重要作用。本研究发现,组织学Ⅲ级乳腺癌患者原发灶的 ITGBL1 mRNA 表达率低于Ⅰ~Ⅱ级乳腺癌患者,且 ITGBL1 mRNA 低表达组患者 3 年无转移生存率低于高表达组,即 ITGBL1 mRNA 低表达的乳腺癌恶性程度高、组织分化差且患者预后不良,提示 ITGBL1 基因是潜在的乳腺癌预后预测分子标志物。关于 ITGBL1 编码蛋白 TIDA 在乳腺癌发生、发展和转移中的作用机制还有待于通过体内外实验研究进一步阐明。

参考文献

- [1] Hao X, Sun B, Hu L, Lähdesmäki H, *et al.* Differential gene and protein expression in primary breast malignancies and their lymph node metastases as revealed by combined cDNA microarray and tissue microarray analysis. *Cancer*, 2004, 100:1110-1122.
- [2] Rasmussen R. Quantification on the LightCycler// Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K, eds. Rapid cycle real-time PCR, methods and applications. Heidelberg: Springer press; 21-34.
- [3] Berg R W, Leung E, Gough S, *et al.* Cloning and characterization of a novel beta integrin-related cDNA coding for the protein TIED ("ten beta integrin EGF-like repeat domains") that maps to chromosome band 13q33: A

- divergent stand-alone integrin stalk structure. *Genomics*, 1999, 56:169—178.
- [4] Tolkachev D, Ng A, Zhu B, *et al.* Identification of a thrombin-binding region in the sixth epidermal growth factor-like repeat of human thrombomodulin. *Biochemistry*, 2000, 39:10 365—10 372.
- [5] Takagi J, Beglova N, Yalamanchili P, *et al.* Definition of EGF-like, closely interacting modules that bear activation epitopes in integrin beta subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98:11 175—11 180.
- [6] Balzar M, Briaire-de Bruijn I H, Rees-Bakker H A, *et al.* Epidermal growth factor-like repeats mediate lateral and reciprocal interactions of Ep-CAM molecules in homophilic adhesions. *Mol Cell Biol*, 2001, 21:2570—2580.
- [7] Smith K M, Gaultier A, Cousin H, *et al.* The cysteine-rich domain regulates ADAM protease function in vivo. *J Cell Biol*, 2002, 159:893—902.
- [8] Park S Y, Kim S Y, Jung M Y, *et al.* Epidermal growth factor-like domain repeat of stabilin-2 recognizes phosphatidylserine during cell corpse clearance. *Mol Cell Biol*, 2008, 28:5288—5298.
- [9] Brusica V, Pillai R S, Silva D G, *et al.* Cytokine-related genes identified from the RIKEN full-length mouse cDNA data set. *Genome Res*, 2003, 13:1307—1317.
- [10] Balic M, Lin H, Young L, *et al.* Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin Cancer Res*, 2006, 12:5615—5621.
- [11] Roman Roman S, Garcia T, Jackson A, *et al.* Identification of genes regulated during osteoblastic differentiation by genomewide expression analysis of mouse calvaria primary osteoblasts in vitro. *Bone*, 2003, 32:474—482.
- [12] Garcia T, Jackson A, Bachelier R, *et al.* A convenient clinically relevant model of human breast cancer bone metastasis. *Clin Exp Metastasis*, 2008, 25:33—42.
- [13] Wagner W, Wein F, Roderburg C, *et al.* Adhesion of hematopoietic progenitor cells to human mesenchymal stem cells as a model for cell-cell interaction. *Exp Hematol*, 2007, 35:314—325.
- [14] Oh D S, Troester M A, Usary J, *et al.* Estrogen-regulated genes predict survival in hormone receptor-positive breast cancers. *J Clin Oncol*, 2006, 24:1656—1664.
- [15] Dontu G, El Ashry D, Wicha M S. Breast cancer, stem/progenitor cells and the estrogen receptor. *Trends Endocrinol Metab*, 2004, 15:193—197.

(收稿日期:2008-09-018)

(本文编辑:赵彬)

李东梅,陈晓慧,李林,等. 整合素 β 样 1 mRNA 在乳腺原发癌中的表达及其临床意义[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版,2009,3(3):273—279.