

HMGA1 在乳腺癌中的表达及临床意义

周锐,董慧明,丁淑琴,李楠,姚廷敬,彭德峰,朱正志,卢燕红

摘要 目的 探讨高迁移率族蛋白 A1 (HMGA1) 在乳腺癌组织中的表达及临床意义。方法 应用实时定量荧光聚合酶链反应检测 65 例乳腺癌组织及配对的癌旁正常乳腺组织和 40 例乳腺纤维腺瘤组织中 HMGA1 mRNA 的表达情况;应用免疫组织化学法检测石蜡包埋的 120 例乳腺癌组织、46 例乳腺纤维腺瘤组织和 43 例乳腺腺病组织中 HMGA1 的蛋白表达水平。结果 乳腺癌组织中 HMGA1 mRNA 的表达显著高于癌旁正常乳腺组织及乳腺纤维腺瘤组织 ($P < 0.01$);乳腺癌组织中 HMGA1 蛋白的阳性表达率显著高于乳腺纤维腺瘤组织 ($P < 0.01$) 和乳腺腺病组织 ($P < 0.05$),乳腺癌组织中 HMGA1 蛋白的表达与患者的年龄、淋巴结是否转移及 TNM 分期有关 ($P < 0.01$, $P < 0.05$),三阴性乳腺癌 HMGA1 蛋白的阳性表达率明显更高 ($P < 0.05$)。结论 HMGA1 在乳腺癌组织中表达较癌旁正常组织和良性疾病组织明显升高,并与临床分期有关,有望成为乳腺癌诊治中的一个新的靶点。

关键词 高迁移率族蛋白 A1; 乳腺癌; 转录调控

中图分类号 R 737.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)11-1690-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.024

近年来,乳腺癌的发病率呈逐年上升趋势,已成为威胁当今女性健康的主要疾病之一。虽然治疗方法众多,大部分患者预后较好,但仍有一些患者治疗效果差,短期内出现复发或转移。现今个体化医疗和靶向治疗可能给这个群体带来新希望,深入的了解乳腺癌发生的分子生物学机制,寻找诊治乳腺癌的新靶点显得尤为迫切。目前欧美大量的研究^[1]证明,高迁移率族蛋白 A1 (high mobility group A1, HMGA1) 在众多的人类恶性肿瘤中过度表达,并且在某些肿瘤中与转移和预后不良有关,但 HMGA1 在乳腺癌中的研究在国内罕见有报道。该研究采用实时定量荧光 PCR 反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, QRT-PCR) 和免疫组织化学方

法从 mRNA 和蛋白水平检测 HMGA1 在乳腺癌组织中的表达情况,探讨 HMGA1 与乳腺癌的发生、发展是否有关系,也验证与欧美的研究是否一致,明确种族差别对乳腺癌中 HMGA1 的表达是否有影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本 收集 2015 年 3 月~12 月蚌埠医学院第一附属医院肿瘤外科手术切除的乳腺癌组织及配对的癌旁正常乳腺组织 (距肿瘤边缘 > 3 cm) 65 例、乳腺纤维腺瘤组织 40 例。其中乳腺癌组织中男 1 例,女 64 例,年龄 28~80 岁,中位年龄 53 岁,均为浸润性导管癌,乳腺纤维腺瘤患者皆为女性。所有标本在离体后置入经去酶处理的冻存管中,迅速置于液氮中保存,30 min 内转存于 -80°C 冰箱中备用。同时从蚌埠医学院第一附属医院病理科收集 2014 年 3 月~2015 年 5 月 120 例石蜡包埋的乳腺癌组织、46 例乳腺纤维腺瘤组织和 43 例乳腺腺病组织,均为女性患者。其中乳腺癌患者年龄 18~73 岁,中位年龄 55 岁,肿瘤大小在 1.2~3.5 cm,均为浸润性导管癌,伴有患侧腋窝淋巴结转移的有 82 例,按 AJCC 的 2003 年 TNM 分期, I 期 25 例, II A 期 32 例, II B 期 48 例, III A 期 15 例, IV 期 0 例。所有石蜡切片经 HE 染色,光镜下证实无坏死组织。上述所有病例的诊断术后均经病理证实,临床及病理资料完整,所有乳腺癌病例术前未进行放、化疗及靶向治疗等其它治疗。

1.1.2 主要试剂及仪器 TRIzol 试剂 (美国 Invitrogen 公司); 逆转录试剂盒和 SYBR Green 荧光定量试剂盒 (立陶宛 MBI Fermentas 公司); 兔抗人 HMGA1 单抗 (美国 SANTA CRUZ 生物技术公司); DU800 型核酸分析系统 (美国 Beckman 公司); 荧光定量 PCR 仪为 Applied Biosystems 7500 (美国 ABI 公司); SP-免疫组化试剂盒 (福州迈新生物技术开发有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 QRT-PCR 按 TRIzol 试剂说明书提取组织总 RNA,紫外分光光度仪测定 $D_{260\text{nm}}/D_{280\text{nm}}$ 的比值介

2017-07-20 接收

基金项目: 安徽高校省级自然科学基金 (编号: KJ2015B097by)

作者单位: 蚌埠医学院第一附属医院肿瘤外科,蚌埠 233000

作者简介: 周锐,男,硕士,主治医师,讲师,责任作者, E-mail:

zhourei19810120@126.com

于 1.8 ~ 2.0, 确定提取的总 RNA 纯度符合要求。取 1 μg 总 RNA 用逆转录试剂盒逆转录成 cDNA。用美国 ABI 公司的 Applied Biosystems 7500 进行 QRT-PCR 反应, 扩增目的基因 HMGA1, 以 GAPDH 作为内参照。PCR 反应总体积为 20 μl , 包括: 2 \times SYBR Green master mix 10 μl , cDNA 模板 2 μl , 上、下游引物各 0.8 μl , ddH₂O 6 μl 。PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, HMGA1 (60 $^{\circ}\text{C}$) 退火 31 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 40 个循环结束后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。用 7500 Software v2.0.6 软件统计分析实验结果, 目的基因相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 。

引物设计及合成: 用 Primer Premier 5.0 引物设计软件设计 HMGA1 与 GAPDH 基因引物, 引物序列见表 1, 引物均由美国 Invitrogen 公司合成。

表 1 PCR 引物序列、反应条件及扩增产物

| 引物 | 引物序列(5'-3') | 退火温度($^{\circ}\text{C}$) |
|-------|-------------------------|----------------------------|
| HMGA1 | F: GGCACCTGAGAAGCGGGCCG | 60.0 |
| | R: CCCTTGTTTTTTGCTTCCTT | |
| GAPDH | F: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC | 56.4 |
| | R: GAAGATGCTGATGGGATTC | |

1.2.2 免疫组化 采用免疫组织化学 SP 法进行测定, DAB 显色, 苏木精复染, 具体步骤严格参照 SP 试剂盒说明书进行。光镜检测组织切片中 HMGA1 蛋白的表达情况。

结果的判定: 每张切片由 2 名病理科副主任医师以双盲法进行评估。高倍镜下随机选取 5 个视野 (每个视野观察细胞数 ≥ 200 个) 进行观察, 然后根据阳性细胞的染色强度和其所占的比例来综合判断结果: ① 着色程度: 无着色为 0 分, 浅黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分; ② 阳性细胞百分比: 0 ~ 10% 为 0 分, 11% ~ 25% 为 1 分, 26% ~ 50% 为 2 分, > 50% 为 3 分; ③ 两者乘积所得分数进行染色分级: < 3 分为阴性, ≥ 3 分为阳性。

1.3 统计学处理 实验数据采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间数据比较利用单因素方差分析进行, 组间方差齐时利用 LSD- t 检验进行两两比较; HMGA1 蛋白在各组间表达率的比较采用 χ^2 检验, 检验结果以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HMGA1 mRNA 的表达 QRT-PCR 检测乳腺癌组织、癌旁正常乳腺组织和乳腺纤维腺瘤组织中

HMGA1 mRNA 的表达, 结果显示各组数据分布呈正态分布, 方差齐性检验 (F 检验) 提示各组间方差齐。其中乳腺癌组织中 HMGA1 mRNA 的表达显著高于配对的癌旁正常乳腺组织 ($t = 15.73, P < 0.01$) 和乳腺纤维腺瘤组织 ($t = 7.79, P < 0.01$)。见图 1。

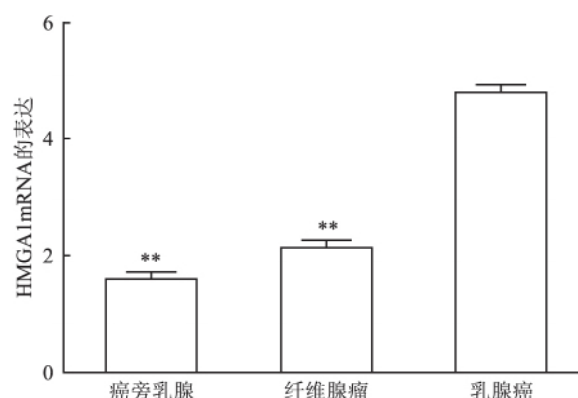


图 1 不同乳腺组织 HMGA1 mRNA 的表达
与乳腺癌比较: ** $P < 0.01$

2.2 HMGA1 蛋白的表达 HMGA1 抗体免疫组化染色后, 其阳性信号为棕黄色或棕褐色颗粒, 主要表达在细胞核、核膜, 胞质弱表达或不表达。可以看出在乳腺癌组织 HMGA1 高表达, 以细胞核为主 (图 2), 乳腺纤维腺瘤和乳腺腺病组织 HMGA1 不表达或弱表达。

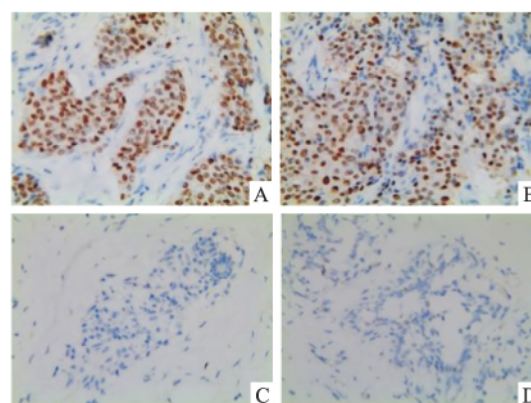


图 2 不同乳腺组织中 HMGA1 蛋白的表达 HE $\times 400$
A、B: 乳腺癌组织; C: 乳腺纤维腺瘤组织; D: 乳腺腺病组织

2.3 HMGA1 蛋白在三种乳腺病患组织中的表达

120 例乳腺癌组织中有 71 例 HMGA1 蛋白表达阳性, 阳性表达率为 59.2%; 46 例乳腺纤维腺瘤组织中仅有 10 例表达阳性, 阳性表达率为 21.7%; 43 例乳腺腺病组织中有 14 例表达阳性, 阳性表达率为 32.6%。三者之间比较, HMGA1 蛋白在乳腺癌组织

中的阳性表达率显著高于乳腺纤维腺瘤及乳腺腺病等良性病变组织($\chi^2 = 22.42, P < 0.01$)。

2.4 HMGA1 蛋白表达与乳腺癌临床病理特征的关系 在乳腺癌组织中, HMGA1 蛋白在 ≤ 45 岁的患者中阳性表达率高于 > 45 岁的患者($\chi^2 = 4.85, P < 0.05$); 在有淋巴结转移组的阳性表达率高于无淋巴结转移组($\chi^2 = 14.34, P < 0.01$); 在临床分期高的患者中阳性表达率高于临床分期低的患者($\chi^2 = 8.10, P < 0.05$); HMGA1 蛋白的阳性表达率与肿瘤大小无关。见表 2。

2.5 三阴性乳腺癌和非三阴性乳腺癌组织中 HMGA1 蛋白表达的情况 在总共 23 例三阴性乳腺癌组织高达 18 例 HMGA1 蛋白表达呈阳性, 占 78.3%, 与非三阴性乳腺癌组织中 HMGA1 蛋白的表达有显著的差异性($\chi^2 = 0.04, P < 0.05$)。

表 2 HMGA1 蛋白在不同临床病理特征的乳腺癌中的表达情况

| 临床病理参数 | n | HMGA1 蛋白的表达 | | χ^2 值 | P 值 |
|-----------|----|-------------|----|------------|----------|
| | | 阳性 | 阴性 | | |
| 年龄(岁) | | | | | |
| ≤ 45 | 38 | 28 | 10 | 4.85 | < 0.05 |
| > 45 | 82 | 43 | 39 | | |
| 肿瘤大小(cm) | | | | | |
| ≤ 2 | 46 | 26 | 20 | 0.22 | > 0.05 |
| > 2 | 74 | 45 | 29 | | |
| 淋巴结转移 | | | | | |
| 有 | 82 | 58 | 24 | 14.34 | < 0.01 |
| 无 | 38 | 13 | 25 | | |
| TNM 分期 | | | | | |
| I 期 | 25 | 10 | 15 | 8.10 | < 0.05 |
| II A 期 | 32 | 17 | 15 | | |
| II B 期 | 48 | 32 | 16 | | |
| III A 期 | 15 | 12 | 3 | | |

3 讨论

乳腺癌是妇女最常见的非上皮性恶性肿瘤, 在世界上每年影响大约 120 万妇女^[2]。自上世纪 80 年代初以来, 由于辅助治疗的广泛使用, 乳腺癌的死亡率已大大下降。然而, 过去 30 余年的经验已证明为每一个患者进行个体化并且充分的治疗是迫切需要的^[3-4]。人们普遍认为乳腺癌的发生发展, 与其他癌症一样, 涉及多个步骤, 包括遗传和表观遗传学改变的积累。然而, 乳腺癌发生的确切机制尚不清楚, 因此, 寻找乳腺癌治疗的新靶点已成为研究的热点。

HMGA1 是 HMGA 家族中的一员, HMGA1 亚家族包括 HMGA1a 和 HMGA1b 这两个蛋白异构体, 其

共享一个类似的结构, 在进化中保存完好。它们都包含 3 个 AT-hook 基本域和 1 个羧基末端区, 前者赋予它们在富含 A 和 T 的核苷酸序列中结合 DNA 小沟的能力, 并在染色质上装配转录或增强子复合体。羧基末端区的功能到现在仍然不清楚。有研究^[1]显示在快速的分裂细胞、肿瘤细胞及胚胎发育期间 HMGA1 高表达, 但在分化好的成熟组织中没有 HMGA1 表达。其在进化上的保守和在发育中的广泛发生表明了具有重要的生物学功能。在休眠的成纤维细胞中 HMGA1 能被血清或生长因子诱导出来, 展示出早期延迟反应动力学特性。目前大量的研究显示 HMGA1 的异常表达与众多恶性肿瘤的发生发展密切相关, Hristov et al^[5] 研究发现 HMGA1 蛋白的表达在胰腺癌组织较正常胰腺组织和前兆性病变(PanIN 1 ~ 3) 组织中明显增强, 且 HMGA1 免疫反应性与生存率的下降、肿瘤进展和 PanIN 级别呈正相关。在结肠癌中, Belton et al^[6] 发现 HMGA1 通过下调 E-cadherin 和上调 TWIST1 的表达, 增强了上皮-间质转变和转移。Pang et al^[7] 研究发现, HMGA1 表达的上调与人脑胶质瘤细胞的恶性程度、血管生成和侵袭性呈正相关性。在肺癌中, HMGA1 也被过度表达, 并且增加的核表达与肺腺癌^[8] 差的生存率相关, 其通过上调磷脂酰肌醇-3-激酶和基质金属蛋白酶-2, 促进细胞迁移和侵袭^[8-9]; 还通过激活 miR-222 oncomiR, 在非小细胞肺癌中其诱导 PPP2R2A 介导的 AKT 信号^[10]。Akaboshi et al^[11] 认为 HMGA1 可能是一种致癌基因, 其受 Wnt/ β -catenin 通路调控, 在胃癌中正调节细胞增殖。

本研究显示, HMGA1 mRNA 在乳腺癌组织中的表达显著高于癌旁正常乳腺组织和乳腺纤维腺瘤组织, 免疫组化的结果与之类似, HMGA1 蛋白在乳腺癌组织的表达明显高于非癌组织。这与 Chiappetta et al^[12-13] 在乳腺肿瘤中的研究结果相一致, 未发现种族差别影响乳腺癌组织 HMGA1 的表达, 欧美关于乳腺癌中 HMGA1 的研究结果同样适合于中国患者。本研究还显示, 在年龄 ≤ 45 岁组、有淋巴结转移组及临床分期较高组, HMGA1 蛋白阳性表达率均增加, 差异均有统计学意义, 这与 Huang et al^[14] 研究结果相一致。但本研究也显示 HMGA1 蛋白的阳性表达率与肿瘤大小无关, 这与 Huang et al^[14] 研究结果不一致, 这可能与本研究中选择的乳腺癌病例肿瘤直径偏小, ≤ 5 cm 和(或)标本量较小有关。也说明, 乳腺癌的发生发展中可能有多种因素参与。三阴性乳腺癌是乳腺癌的一个亚型, 占有乳腺癌

病例的 15% ~ 20% ,具有特殊的生物学特性和临床病理特征 ,与其他类型的乳腺癌相比 ,其恶性程度高 ,易早期出现复发和转移 ,总生存率低 ,无病生存期短 ,预后差。本组 120 例乳腺癌中有 23 例三阴性乳腺癌 ,占 19.2% ,其中高达 78.3% 的病例 HMGA1 蛋白表达阳性 ,与非三阴性乳腺癌病例比较 ,差异有统计学意义 ,说明 HMGA1 蛋白表达与乳腺癌的高侵袭性和转移可能有关 ,但是本研究病例偏少 ,其之间的关系有待进一步验证 ,其发生的机制有待进一步探讨。

综上所述 ,本研究显示 HMGA1 可能参与乳腺癌的发生发展 ,并与不良预后可能有关 ,有望成为乳腺癌诊断和预后的一个潜在的靶点。但 HMGA1 在乳腺癌发病中的具体机制及作用大小仍不明确 ,需要进一步研究。

参考文献

- [1] Pallante P ,Sepe R ,Puca F ,et al. High mobility group A proteins as tumor markers [J]. Front Med(Lausanne) 2015 2: 15.
- [2] Zhao X X ,Yuan Q Z ,Mu D P ,et al. MicroRNA-26a inhibits proliferation by targeting high mobility group AT-hook 1 in breast cancer [J]. Int J Clin Exp Pathol 2015 8(1) : 368 - 73.
- [3] Paplomata E ,O' Regan R. The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: targets , trials and biomarkers [J]. Ther Adv Med Oncol 2014 6(4) : 154 - 66.
- [4] Zhang W ,Liu J ,Wang G. The role of microRNAs in human breast cancer progression [J]. Tumour Biol 2014 35(7) : 6235 - 44.
- [5] Hristov A C ,Cope L ,Di Cello F ,et al. HMGA1 correlates with advanced tumor grade and decreased survival in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Mod Pathol 2010 23(1) : 98 - 104.
- [6] Belton A ,Gabrovsky A ,Bae Y K ,et al. HMGA1 induces intestinal polyposis in transgenic mice and drives tumor progression and stem cell properties in colon cancer cells [J]. PLoS One 2012 7(1) : e30034.
- [7] Pang B ,Fan H ,Zhang I Y ,et al. HMGA1 expression in human gliomas and its correlation with tumor proliferation , invasion and angiogenesis [J]. J Neurooncol 2012 106(3) : 543 - 9.
- [8] Hillion J ,Wood L J ,Mukherjee M ,et al. Upregulation of MMP-2 by HMGA1 promotes transformation in undifferentiated , large-cell lung cancer [J]. Mol Cancer Res 2009 7(11) : 1803 - 12.
- [9] Serima M ,De Marco C ,Fabiani F ,et al. Signaling networks associated with AKT activation in non-small cell lung cancer(NSCLC) : new insights on the role of phosphatidylinositol-3 kinase [J]. PLoS One 2012 7(2) : e30427.
- [10] Zhang Y ,Ma T ,Yang S ,et al. High-mobility group A1 proteins enhance the expression of the oncogenic miR-222 in lung cancer cells [J]. Mol Cell Biochem 2011 357(1 - 2) : 363 - 71.
- [11] Akaboshi S ,Watanabe S ,Hino Y ,et al. HMGA1 is induced by Wnt/betacatenin pathway and maintains cell proliferation in gastric cancer [J]. Am J Pathol 2009 175(4) : 1675 - 85.
- [12] Chiappetta G ,Botti G ,Monaco M ,et al. HMGA1 protein overexpression in human breast carcinomas: correlation with ErbB2 expression [J]. Clin Cancer Res 2004 10(22) : 7637 - 44.
- [13] Peluso S ,Chiappetta G. High-mobility group a(HMGA) proteins and breast cancer [J]. Breast Care (Basel) 2010 5(2) : 81 - 5.
- [14] Huang R ,Huang D ,Dai W ,et al. Overexpression of HMGA1 correlates with the malignant status and prognosis of breast cancer [J]. Mol Cell Biochem 2015 404(1 - 2) : 251 - 7.

Expression of HMGA1 in breast cancer and its clinical significance

Zhou Rui ,Dong Huiming ,Ding Shuqin ,et al

(Dept of Oncology Surgery ,The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College Bengbu 233000)

Abstract Objective To investigate the expression and clinical significance of high mobility group A1(HMGA1) in breast cancer. **Methods** The expression of HMGA1 mRNA was detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction in 65 cases of breast cancer and the matched normal tissues 40 cases of fibroadenoma of breast tissues; immunohistochemical method was used to detect the expression of HMGA1 protein in 120 cases of breast cancer tissues ,46 cases of breast fibroadenoma and 43 cases of adenosis of breast tissues. **Results** The expression of HMGA1 mRNA in breast cancer was significantly higher than the matched normal tissues and fibroadenoma of breast tissues($P < 0.01$). The positive expression rate of HMGA1 protein in breast cancer was significantly higher than in fibroadenoma of breast($P < 0.01$) and adenosis of breast tissues($P < 0.05$). The expression of HMGA1 protein was associated with age , lymph node metastasis and TNM stage($P < 0.01$, $P < 0.05$). The positive expression rate of HMGA1 protein in triple negative breast cancer was significantly higher($P < 0.05$). **Conclusion**

Compared with the normal tissues and benign disease group ,HMGA1 expression in breast cancer tissue increased significantly. It is expected to become a new marker for diagnosis and treatment of breast cancer.

Key words high mobility group A1; breast cancer; transcriptional regulation