

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.10.006

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20181228.0846.002.html(2018-12-28)

MALAT-1 和 HIF-1 α 在三阴性乳腺癌中表达及临床意义*

唐静,贾昱娴,农丽,覃芳卉,钟武宁,谭爱花,刘燕,王洪学,王涵,谢伟敏,陆永奎,周文献

(广西医科大学附属肿瘤医院乳腺及骨软组织肿瘤内科,南宁 530021)

[摘要] **目的** 探讨肺腺癌转移相关转录本-1(MALAT-1)、低氧诱导因子-1(HIF-1) α mRNA 在三阴性乳腺癌(TNBC)中的表达及临床意义。**方法** 采用免疫组织化学 SP 法检测 HIF-1 α 的蛋白表达水平;实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测 MALAT-1、HIF-1 α mRNA 的表达情况,分析其与 TNBC 临床特征的关系。**结果** MALAT-1、HIF-1 α mRNA 在乳腺癌组织中的表达明显高于癌旁组织(2.62 ± 0.23 vs. 2.02 ± 0.08 ; 129.79 ± 15.34 vs. 43.46 ± 5.14 ; $P < 0.05$), HIF-1 α 蛋白在 TNBC 组织中的阳性表达率显著高于癌旁组织(69.7% vs. 45.4% , $P < 0.05$)。癌组织中的 MALAT-1、HIF-1 α mRNA 的表达水平与 TNBC 组织的组织学分化程度、浸润深度、淋巴结转移、临床分期相关($P < 0.01$)。**结论** 检测 MALAT-1、HIF-1 α mRNA 的表达水平可能对 TNBC 浸润转移及增殖有一定的预测意义。

[关键词] 乳腺肿瘤;逆转录聚合酶链反应;肺腺癌转移相关转录本-1;低氧诱导因子-1 α

[中图分类号] R733.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)10-1642-04

Expression and clinical significance of MALAT-1 and HIF-1 α in triple negative breast cancer*

TANG Jing, JIA Yuxian, NONG Li, QIN Fanghui, ZHONG Wuning, TAN Aihua,

LIU Yan, WANG Hongxue, WANG Han, XIE Weimin, LU Yongkui, ZHOU Wenxian

(Department of Medical Oncology of Breast and Bone Soft Tissue Tumor,

Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression and clinical significance of metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT-1) and hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) in triple negative breast cancer (TNBC). **Methods** Immunohistochemical SP method was used to detect the expression of HIF-1 α in 33 cases of TNBC tumor tissues and their corresponding paracancer tissues. HIF- α , MALAT-1 mRNA levels were measured by quantitative real-time PCR (RT-PCR). The correlation between HIF-1 α , MALAT-1 levels and the clinical features of TNBC were analyzed. **Results** The expression of HIF-1 α , MALAT-1 mRNA in breast tumor tissues was significantly higher than that in paracancer tissues in TNBC (2.62 ± 0.23 vs. 2.02 ± 0.08 ; 129.79 ± 15.34 vs. 43.46 ± 5.14 ; $P < 0.05$). The positive expression rate of HIF-1 α in TNBC increased significantly compared with those in paracancer tissues (69.7% vs. 45.4% , $P < 0.05$). The positive expression rate of HIF-1 α , MALAT-1 mRNA in TNBC patients correlated with histological grading, infiltration depth, lymph node metastasis, and clinical staging ($P < 0.01$). **Conclusion** Detection of the expression level of MALAT-1 and HIF-1 α mRNA may have some predictive significance for the invasion, metastasis and proliferation of TNBC.

[Key words] breast neoplasms; reverse transcriptase polymerase chain reaction; metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript-1; hypoxia inducible factor-1 α

乳腺癌是分子水平表达高度特异的一类疾病,其中一种分子亚型为三阴性乳腺癌(TNBC)。该类型乳腺癌雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、人表皮生长因子受体-2(HER-2)均为阴性,是疗效和预后较差的乳腺癌亚型之一^[1]。探寻其发病机制和潜在的生物

治疗靶点成为近年来的热点。低氧诱导因子-1(HIF-1)是目前所发现的唯一特异在低氧条件下介导细胞反应的核转录因子。HIF-1是由HIF-1 α 和HIF-1 β 两个亚基组成的异二聚体,其中 β 亚基不受氧的调节和影响,而 α 亚基是缺氧诱导的,是调节活性的功能

亚基。研究证实, HIF-1 α 在肿瘤组织中大量表达, 不仅与肿瘤组织的血管生成、能量代谢、侵袭转移、放疗抵抗性相关, 还与药物耐药性相关^[2]。在缺氧条件下肿瘤组织中的 HIF-1 α 上调使肺腺癌转移相关转录本-1 (Metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT-1) 基因启动子甲基化, 使其在增殖的肿瘤细胞中异常表达^[3]。MALAT-1 属 lncRNA 家族重要成员之一, 长度约 8.7 kb, 基因位于人染色体 11q13.1, 具有高度保守的核苷酸序列。以往文献报道, MALAT-1 在乳腺癌中异常表达, 参与乳腺癌细胞的迁移、侵袭及克隆增殖^[4-5]。但目前有关两者在 TNBC 的表达与临床病理特点相关性的研究报道较少。本研究检测 TNBC 患者癌组织标本及其对应癌旁组织标本中 MALAT-1、HIF-1 α mRNA 的表达情况, 且分析其与 TNBC 的临床特征关系。本研究了解 MALAT-1、HIF-1 α 在 TNBC 的发生、发展中的作用, 希望为 TNBC 患者的个体化治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 标本收集 收集广西医科大学附属肿瘤医院 2013 年 1 月至 2014 年 6 月 33 例患者手术切除的 TNBC 及癌旁组织标本, 患者均为女性, 年龄 31~69 岁, 随访至 2016 年 6 月。肿瘤临床分期 I 期 4 例, II 期 17 例, III 期 12 例。标本保存于 -80 °C 冰箱中。

1.2 方法

1.2.1 染色方法 采用免疫组织化学 SP 法。对 33 例 TNBC 癌组织及癌旁组织依次进行低聚甲醛固定, 石蜡包埋, 连续切片, 脱蜡, 水化, 抗原修复, 血清封闭, 然后进行兔抗人 HIF-1 α 多克隆抗体一抗 4 °C 孵育过夜。取出标本后按说明书加入二抗。二氨基联苯胺(DAB)显色, 苏木精复染, 冲洗反蓝。用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照。

1.2.2 结果判定 采用染色强度与阳性细胞百分数相结合的判读标准。采用双盲法判定染色结果。HIF-1 α 阳性定位在细胞核或细胞质中。细胞核或细胞质无染色或轻微染色判为阴性。细胞核或细胞质有较强染色, 且阳性细胞数比例大于或等于 50%, 或者细胞核或细胞质强染色, 且阳性细胞数比例大于或等于 10% 判读为阳性。

1.2.3 引物设计与合成 使用美国国立生物技术信息中心网络查询到相应基因的 mRNA 序列, 用引物设计软件 Premier5.0 设计相应基因引物, 并用 OLIGO 7.0 对引物的可行性进行评估。内参选用甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)。所有引物选择聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)纯化级别, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。具体引物序列如下: MALAT-1 上游引物 5'-TGC CCA TTC ACT GCC TCC T-

3', 下游引物 5'-TGC CGA CCT CAC GGA TTT T-3', 扩增产物片段长度为 93 bp。HIF-1 α 上游引物 5'-TCC AAG CCC TCC AAG TAT-3'; 下游引物 5'-ATG CTA AAT CGG AGG GTA-3', 扩增产物片段长度为 568 bp。

1.2.4 实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测 Trizol法提取总 RNA, 操作按说明书进行, 采用 ND-2000C 微量紫外分光光度计测定总 RNA 浓度。反转录反应(TaKaRa 公司产品): 2.0 μ L 5 \times gDNA Eraser Buffer、1.0 μ L gDNA Eraser、500 ng 总 RNA、加入 10 μ L RNase Free ddH₂O。然后在 PCR 仪 42 °C 水浴 2 min。按顺序加入 1.0 μ L PrimeScript RT Enzyme Mix I、1.0 μ L RT Primer Mix、4.0 μ L 5 \times PrimeScript Buffer 2、4.0 μ L RNase Free ddH₂O、总体积 20 μ L。37 °C 15 min, 85 °C 5 s, 4 °C 5 min。水浴 1~2 min。反转录合成的 cDNA 在 -80 °C 中保存用于 PCR。PCR 总反应体积为 20 μ L, 包括 SYBR Green PCR Master Mix 10 μ L, QN-Rox Reference Dye 0.2 μ L, 上下游引物各 2 μ L, CDNA 模板 2 μ L, RNase-Free 水 6.8 μ L。循环参数: 95 °C 2 min, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 共循环 40 次。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳分离, 并采用自动电泳凝胶成像分析仪及分子分析软件进行图像扫描和分析。将目的基因的 mRNA 实际表达水平与 GAPDH mRNA 实际表达水平比较, 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法得到 MALAT-1、HIF-1 α mRNA 相对表达水平。

1.3 统计学处理 SPSS17.0 软件对全组数据进行统计分析。对于正态分布的数据使用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用配对 t 检验。计数资料采用率表示, 组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HIF-1 α 蛋白在癌组织及癌旁组织阳性表达情况 在 33 例 TNBC 组织中, 有 23 例阳性表达 HIF-1 α 蛋白, 10 例阴性表达 HIF-1 α 蛋白; 33 例癌旁组织中, 有 15 例阳性表达 HIF-1 α 蛋白, 18 例阴性表达 HIF-1 α 蛋白, TNBC 组织的 HIF-1 α 蛋白阳性表达率 (69.7%) 明显高于癌旁组织 (45.4%), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 3.97, P < 0.05$)。

2.2 MALAT-1、HIF-1 α 在癌组织及癌旁组织的表达情况 TNBC 组织的 MALAT-1 的 RNA 表达水平为 2.62 ± 0.23 , 癌旁组织的表达水平为 2.02 ± 0.08 , 两组间比较差异有统计学意义 ($t = 12.73, P < 0.05$)。TNBC 组织的 HIF-1 α 的 RNA 表达水平为 129.79 ± 15.34 , 癌旁组织的表达水平为 43.46 ± 5.14 , 两组间比较差异有统计学意义 ($t = 32.48, P < 0.05$)。

2.3 TNBC 组织中的 MALAT-1、HIF-1 α 的 RNA

表 1 乳腺癌组织中的 MALAT-1、HIF-1 α 的 RNA 表达量与临床病理参数的相关

病理特征	n	HIF-1 α			MALAT-1		
		mRNA 表达水平($\bar{x}\pm s$)	t	P	mRNA 表达水平($\bar{x}\pm s$)	t	P
分化程度							
I 级	5	129.80 \pm 11.32	21.42	<0.00	2.79 \pm 0.03	17.58	<0.01
II 级	16	124.43 \pm 9.70			2.61 \pm 0.17		
III 级	12	112.50 \pm 8.01			2.27 \pm 0.23		
淋巴结转移							
无	15	118.72 \pm 10.62	25.19	<0.00	2.45 \pm 0.23	24.80	<0.01
有	18	139.03 \pm 12.30			2.76 \pm 0.10		
浸润深度							
Tis~T1	10	118.41 \pm 11.79	9.82	<0.00	2.47 \pm 0.27	6.79	<0.01
T2	14	129.15 \pm 14.25			2.61 \pm 0.19		
T3~T4	9	143.45 \pm 9.09			2.80 \pm 0.10		
分期							
I 期	4	109.34 \pm 3.06	27.26	<0.00	2.28 \pm 0.19	15.33	<0.00
II 期	17	124.15 \pm 9.31			2.57 \pm 0.20		
III 期	12	144.63 \pm 10.70			2.80 \pm 0.03		

表达水平与临床病理参数的相关性 33 例 TNBC 患者有 5 例分化程度 I 级,16 例 II 级,12 例 III 级;15 例没有淋巴结转移,18 例淋巴结转移阳性;浸润深度 Tis~T1 有 10 例,T2 有 14 例,T3~T4 有 9 例;临床分期 I 期 4 例,II 期 17 例,III 期 12 例。随访期间出现复发 14 例,没有出现复发 19 例。癌组织中的 MALAT-1、HIF-1 α mRNA 的表达水平与 TNBC 的分化程度、浸润深度、淋巴结转移、临床分期相关,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 1。

3 讨论

由于 TNBC 作为乳腺癌的一种分子亚型,其复发率高,耐药性及易转移的特点是该疾病预后差的主要因素,目前临床上尚无对于 TNBC 有效的治疗措施。TNBC 肿瘤生长微环境的机制尚不清楚。如何选择靶点进行靶向治疗成为 TNBC 治疗的关键和难点。缺氧微环境常见于快速生长的肿瘤组织中。在肿瘤微环境中,肿瘤新生血管无法满足无限增殖的肿瘤细胞,导致细胞氧浓度下降,脯氨酸羟化酶、天冬酰胺羟化酶失活,进而激活下游靶基因 HIF-1 α 转录。HIF-1 α 通过与低氧反应元件结合,激活下游靶基因转录表达^[6]。现已发现 HIF-1 α 可以激活多种靶基因产物,并且大多数靶基因在肿瘤组织的血管生成、能量代谢、侵袭转移中扮演重要角色^[7]。

MALAT-1 是第一个被证实与肿瘤转移和预后有关的 lncRNA,其高表达与早期非小细胞肺癌术后转移密切相关^[8]。研究表明 MALAT-1 lncRNA 在 MCF-7 乳腺癌细胞缺氧条件下高度表达^[9]。研究证实 MALAT-1 在多种肿瘤组织出现异常表达,可能参

与肿瘤细胞的分化、增殖、凋亡、迁移及侵袭等过程^[10-12]。

本研究结果表明,HIF-1 α 蛋白、MALAT-1、HIF-1 α RNA 在 TNBC 癌组织的表达水平明显高于癌旁组织,差异有统计学意义($P<0.05$),提示 MALAT-1、HIF-1 α RNA 的异常表达可能参与了 TNBC 的发生、发展过程,与近年来相关文献报道一致^[13-18]。提示乳腺癌组织中 HIF-1 α 蛋白、MALAT-1、HIF-1 α RNA 的表达可作为其向恶性转化的一个标准。

本研究显示 MALAT-1、HIF-1 α RNA 在 TNBC 的表达与浸润深度、分化程度、淋巴结转移、临床分期相关,提示 MALAT-1、HIF-1 α 可能在 TNBC 发生、发展和浸润转移过程中发挥了一定的作用,并有可能提示预后,与近年来相关文献报道一致^[19-22]。文献报道,已有基于 HIF-1 的靶向治疗处于试验阶段,利用 HIF-1 为靶点的基因治疗主要有反义核酸技术和 RNA 干扰。其中代表药物有 miR-20b、EZN-2968,均可以抑制肿瘤 HIF-1 α 的表达,将在未来进入临床阶段^[23],有望为 TNBC 找到新的有效的靶向治疗途径。本研究显示,MALAT-1、HIF-1 α RNA 在 TNBC 中的表达与浸润深度、分化程度、淋巴结转移、临床分期具有相关性。

本研究尚有许多不足之处,比如样本量较小,有一定的局限性,MALAT-1 和 HIF-1 α 的作用机制缺乏分子水平实验支持,有待在后续实验中进一步补充。

参考文献

[1] DOGAN B E,TURNBULL L W. Imaging of triple-nega-

- tive breast cancer[J]. *Ann Oncol*, 2012, 23(Suppl 6): S23-29.
- [2] CHEN S Y, SANG N L. Hypoxia-inducible factor-1: a critical player in the survival strategy of stressed cells [J]. *Cell Biochem*, 2016, 117(2): 267-278.
- [3] ESPOSTI D D, HERNANDEZ-VARGAS H, VOEGELE C, et al. Identification of novel long non-coding RNAs deregulated in hepatocellular carcinoma using RNA-sequencing[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(22): 31862-31877.
- [4] FENG T, SHAO F, WU Q, et al. miR-124 downregulation leads to breast cancer progression via LncRNA-MALAT1 regulation and CDK4/E2F1 signal activation[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(13): 16205-16216.
- [5] HUANG N S, CHI Y Y, XUE J Y, et al. Long non-coding RNA metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1) interacts with estrogen receptor and predicted poor survival in breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(25): 37957-37965.
- [6] 徐益文, 徐庆祥, 丁义涛. 缺氧诱导因子 1 与肿瘤的研究进展[J]. *医学综述*, 2012, 6(18): 1656-1660.
- [7] SEMENZA G L. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics[J]. *Oncogene*, 2010, 29(5): 625-634.
- [8] JI P, DIEDERICH S, WANG W, et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer [J]. *Oncogene*, 2003, 22(39): 8031-8041.
- [9] CHOUDHRY H, SCHODEL J, OIKONOMOPOULOS S, et al. Extensive regulation of the non-coding transcriptome by hypoxia: role of HIF in releasing paused RNAPol2[J]. *EMBO Rep*, 2014, 15(1): 70-76.
- [10] SHEN L, CHEN L, WANG Y, et al. Long noncoding RNA MALAT1 promotes brain metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition in lung cancer [J]. *Neurooncol*, 2015, 121(1): 101-108.
- [11] KONISHI H, ICHIKAWA D, YAMAMOTO Y, et al. Plasma level of metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 is associated with liver damage and predicts development of hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2016, 107(2): 149-154.
- [12] LAI M C, YANG Z, ZHOU L, et al. Long non-coding RNA MALAT-1 overexpression predicts tumor recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation[J]. *Med Oncol*, 2012, 29(3): 1810-1816.
- [13] 周俭珊, 叶红. HIF-1 α , VEGF 及 HIF-1 α /VEGF 轴在子宫内膜癌中的表达研究进展[J]. *海南医学*, 2015, 26(16): 2413-2416.
- [14] 刘彦琦, 于红刚. 缺氧诱导因子-1 α 和血管内皮生长因子在胃癌组织中的表达及其与肿瘤细胞增殖的关系[J]. *中华实验外科杂志*, 2015, 32(9): 2246-2248.
- [15] 孙慧霞, 孙会, 李国正. HIF-1 α 和 Glut-1 蛋白在中老年宫颈癌组织中的表达及其意义[J]. *中国妇产科临床杂志*, 2018, 19(1): 16-19.
- [16] GUO F, GUO L, LI Y, et al. MALAT1 is an oncogenic long non-coding RNA associated with tumor invasion in non-small cell lung cancer regulated by DNA methylation [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(12): 15903-15910.
- [17] SHEN L, CHEN L, WANG Y, et al. Long noncoding RNA MALAT1 promotes brain metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition in lung cancer[J]. *J Neur Oncol*, 2015, 1121(1): 101-108.
- [18] LI S, WANG Q, QIANG Q, et al. Sp1-mediated transcriptional regulation of MALAT1 plays a critical role in tumor[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2015, 141(11): 1909-1920.
- [19] 赵文明, 周炳娟, 李金梅, 等. HIF-1 α 、Glut-1 表达与乳腺癌分化程度及分子亚型的关系[J]. *河北医学*, 2018, 3(24): 353-357.
- [20] 张峻, 武月, 赵岩, 等. 生物信息学分析沉默 HIF-1 α 后胃癌细胞系基因表达变化同胃癌发生发展的相关性研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2018, 4(26): 1155-1162.
- [21] 罗清, 曾梓涵, 赵玖, 等. 三阴性乳腺癌患者血清 HOTAIR、GAS5、MALAT-1 表达变化及其意义[J]. *山东医药*, 2018, 3(58): 75-77.
- [22] 李子博, 周江, 周琳, 等. 乳腺癌组织中 lncRNA、MALAT1 的表达及临床意义[J]. *医学研究杂志*, 2018, 3(47): 79-81.
- [23] 徐益文, 徐庆祥, 丁义涛. 缺氧诱导因子 1 与肿瘤的研究进展[J]. *医学综述*, 2012, 6(18): 1656-1660.

(收稿日期: 2018-08-12 修回日期: 2018-11-24)

(上接第 1641 页)

- by nordihydroguaiaretic Acid as a protease-activated receptor 2 antagonist[J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2012, 20(5): 463-469.
- [12] MCALEER M A, IRVINE A D. The multifunctional role of filaggrin in allergic skin disease[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 131(2): 280-291.

- [13] RIETHMULLER C, MCALEER M A, KOPPES S A, et al. Filaggrin breakdown products determine corneocyte conformation in patients with atopic dermatitis[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 136(6): 1573-1580.

(收稿日期: 2018-08-18 修回日期: 2018-11-27)