

乳腺癌组织中 ING4、HIF-1 α 和 HIF-2 α 表达及与肿瘤微血管新生的关系

张金山¹, 朱宗恒¹, 王钢胜¹, 曲少华²

(1. 鄂东医疗集团黄石市中心医院肿瘤外科, 湖北 黄石 435000;

2. 中山大学附属第一医院乳腺外科, 广东 广州 510000)

摘要:目的 探讨乳腺癌组织中生长抑制因子 4(ING4)、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)和缺氧诱导因子-2 α (HIF-2 α)表达及与肿瘤微血管新生的关系。方法 选取择期行手术治疗的乳腺癌病人 107 例,利用实时荧光定量 PCR 技术检测乳腺癌和癌旁组织中 HIF-1 α 、HIF-2 α 、ING4 和血管内皮生长因子(VEGF)基因表达,免疫组化染色检测乳腺癌和癌旁组织中微血管密度(MVD)。结果 乳腺癌组织中 HIF-1 α mRNA、HIF-2 α mRNA 相对表达量均高于癌旁组织,而 ING4 mRNA 相对表达量低于癌旁组织,差异有统计学意义($P < 0.05$);HIF-1 α mRNA 相对表达量与淋巴结转移有关($P < 0.05$),HIF-2 α mRNA 相对表达量与肿瘤大小、淋巴结转移有关($P < 0.05$),ING4 mRNA 相对表达量与临床分期、淋巴结转移有关($P < 0.05$);乳腺癌组织中 VEGF mRNA 相对表达量和 MVD 计数均高于癌旁组织,均差异有统计学意义($P < 0.05$);Pearson 相关分析显示,乳腺癌组织中 HIF-1 α mRNA、HIF-2 α mRNA 相对表达量均与 VEGF mRNA 相对表达量和 MVD 计数呈正相关($r = 0.382, 0.417$ 和 $0.408, 0.491$, $P < 0.05$),ING4 mRNA 相对表达量均与 VEGF mRNA 相对表达量和 MVD 计数呈负相关($r = -0.395, -0.502$, $P < 0.05$)。结论 乳腺癌组织中 HIF-1 α 、HIF-2 α 基因表达升高,而 ING4 基因则被抑制,可能共同参与了乳腺癌组织中血管新生。

关键词:乳腺癌;生长抑制因子 4;缺氧诱导因子-1 α ;缺氧诱导因子-2 α ;血管新生

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.05.018

Expressions of ING4, HIF-1 α and HIF-2 α in breast cancer tissues and their relationship with tumor angiogenesis

ZHANG Jinshan¹, ZHU Zongheng¹, WANG Gangsheng¹, QU Shaohua²

(1. Department of Oncology Surgery, Central Hospital of Huangshi, Eudong Medical Group, Huangshi,

Hubei 435000, China; 2. Department of Breast Surgery, The First Affiliated Hospital of

Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510000, China)

Abstract: Objective To investigate the expressions of ING4, HIF-1 α and HIF-2 α in breast cancer tissues and their relationship with tumor angiogenesis. **Methods** 107 cases of patients with breast cancer undergoing elective surgery were selected. Expressions of HIF-1 α , HIF-2 α , ING4 and VEGF genes in breast cancer and adjacent tissues were tested by real-time quantitative PCR. The microvessel density (MVD) in breast cancer and adjacent tissues were detected by using immunohistochemical staining. **Results** The relative expression levels of HIF-1 α mRNA and HIF-2 α mRNA in breast cancer tissues were higher than the adjacent tissues, while the relative expression levels of ING4 mRNA was lower than the adjacent tissues. The differences were statistically significant ($P < 0.05$). The relative expression levels of HIF-1 α mRNA were correlated with lymph node metastasis ($P < 0.05$). The relative expression levels of HIF-2 α mRNA were correlated with tumor size and lymph node metastasis ($P < 0.05$), and the relative expression levels of ING4 mRNA were correlated with clinical stage and lymph node metastasis ($P < 0.05$). The relative expression levels of VEGF mRNA and MVD counts in breast cancer tissues were significantly higher than those in adjacent tissues. The differences were statistically significant ($P < 0.05$). Pearson correlation analysis showed that the relative expression levels of HIF-1 α mRNA and HIF-2 α mRNA were positively correlated with the relative levels of VEGF mRNA and MVD counts ($r = 0.382, 0.417$ and $0.408, 0.491$, $P < 0.05$), and the expression levels of ING4 mRNA in breast cancer tissues were negatively correlated with the relative expression levels of VEGF mRNA and MVD counts ($r = -0.395, -0.502$, $P < 0.05$). **Conclusion** The expressions of HIF-1 α and HIF-2 α genes in breast cancer tissues were up-regulated and ING4 gene was inhibited, which might be involved in the angiogenesis of breast cancer.

Key words: Breast cancer; ING4; HIF-1 α ; HIF-2 α ; Angiogenesis

乳腺癌作为女性常见恶性肿瘤,近年来发病率逐年上升且呈年轻化趋势^[1],严重威胁女性健康。目前,乳腺癌发病机制尚未完全清楚,研究发现^[2],实体肿瘤由于肿瘤细胞过快增殖及血管新生,会导致局部组织呈缺氧状态,而缺氧环境又会加速细胞恶化,与肿瘤细胞浸润、转移及化疗耐药密切相关。缺氧诱导因子(HIF)是调控肿瘤细胞适应缺氧环境的关键性因子,在肿瘤生长、血管新生及侵袭转移中发挥重要作用,HIF-1 α 和HIF-2 α 是较为重要的两个亚基^[3]。生长抑制因子4(ING4)作为生长抑制家族重要成员,发挥抑癌基因功能,与促进肿瘤细胞凋亡及抑制肿瘤血管新生密切相关^[4]。有研究指出^[5],HIF和ING4在肿瘤组织中表达异常与肿瘤恶性生物学特性密切相关。本研究对乳腺癌组织中HIF-1 α 、HIF-2 α 和ING4表达进行分析,探讨他们与临床病理特征之间的关系,以及在肿瘤微血管新生中的意义,以期对乳腺癌相关机制研究提供基础资料。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 临床资料 选取2014年5月—2016年6月在鄂东医疗集团黄石市中心医院择期行手术治疗的乳腺癌病人107例,均为女性,年龄26~73岁,平均年龄(56.2 $\pm$ 11.8)岁,所有病人均经术后病理确诊,术前均未接受任何放化疗治疗。肿瘤直径0.9~10.2 cm,中位数3.8 cm;肿瘤部位:左侧52例,右侧55例;组织学分级:I级58例,II级30例,III级19例;临床分期:I期22例,II期57例,III期28例;病理学类型:浸润性导管癌91例,其他类型16例;发生淋巴结转移61例,雌激素受体(ER)阳性72例,孕激素受体(PR)阳性69例。手术方式均采取改良根治术,术中均留取乳腺癌组织及癌旁组织,快速置于液氮中,保存于-80℃液氮中以备检。本研究获鄂东医疗集团黄石市中心医院伦理委员会批准,病人或近亲属对研究方案签署知情同意书。

1.1.2 试剂与设备 总RNA抽提试剂盒(Trizol法)购自美国Invitrogen公司,逆转录试剂盒和PCR扩增试剂盒均购自日本TaKa-Ra公司,HIF-1 α 、HIF-2 α 、ING4、血管内皮生长因子(VEGF)和内参引物均由上海生工生物公司设计合成,鼠抗人CD31单克隆抗体购自上海酶联生物研究所,免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物公司,紫外分光光度计购自上海光谱仪器有限公司,实时荧光定量PCR仪购自美国ABI公司。

1.2 方法

1.2.1 利用实时荧光定量PCR技术检测乳腺癌和癌旁组织中HIF-1 α 、HIF-2 α 、ING4和VEGF基因表达 取乳腺癌和癌旁组织,4℃下研磨,加入细胞裂解液进行裂解,用总RNA抽提试剂盒对组织中总RNA进行提取,用紫外分光光度计检测总RNA纯度,取A260/A280 $\geq$ 1.80样品完成后续操作。将总RNA逆转录为模板单链cDNA,以cDNA为模板,用PCR试剂盒完成PCR。引物序列见表1。PCR反应条件:95℃1 min,92℃30 s,58℃30 s,73℃30 s,连续进行40次循环,没有样品均设置3个平行反应复孔。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法获得乳腺癌和癌旁组织中HIF-1 α 、HIF-2 α 、ING4和VEGF基因相对表达量。

表1 引物序列

基因	序列(5' - 3')
HIF-1 α	上游:ACTTCTGGATGCTGCTGATTTG
	下游:GCTTCGCTGTGTGTTTTGTCT
HIF-2 α	上游:TCATCGGACTGGCAATCAGC
	下游:GTCACCACGGCAATGAAACC
ING4	上游:GAGGCTGATCTCAAGGAGAA
	下游:TCC ACAGGCATATCCAACAC
VEGF	上游:ATCGAGACCCTGGTGGACA
	下游:CCGCCTCGGCTTGTCACA
β -actin	上游:AAAGACCTGTACGCCAACAC
	下游:GTCATA CTCCTGCTTGCTGAT

1.2.2 免疫组化染色检测乳腺癌和癌旁组织中微血管密度(MVD) 取乳腺癌和癌旁组织,用10%甲醛溶液固定后,经脱水、石蜡包埋,连续切片,厚度4 μ m,脱蜡至水,加入3%过氧化氢去离子水,室温下避光孵育25 min,将切片置于枸缘酸盐缓冲液中,微波炉加热,PBS冲洗3次,加入鼠抗人CD31单克隆抗体(1:300稀释),4℃过夜孵育,PBS洗涤3次,将二抗加入,室温下孵育120 min,DAB显色15 min,PBS冲洗3次,苏木素复染。结果判定:以出现单个棕黄色血管内皮细胞或细胞群,且管壁未见肌层作为1个MVD,排除出现平滑肌肌层或官腔直径超过20 μ m的血管。利用Image Pro Plus 6.0图像分析软件,分别从切片顶部、中部、底部各取一个区域,并从每个区域随机取5个不相邻的高倍视野进行计数,取均数作为MVD。

1.3 统计学方法 利用SPSS 17.0统计分析软件进行数据整理分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用成组 t 检验,配对资料比较采用配对 t 检验。此外,利用Pearson相关分析对变量间相关性进行分析, $P < 0.05$ 示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌和癌旁组织中 HIF-1α、HIF-2α、ING4 基因表达比较 乳腺癌组织中 HIF-1α mRNA、HIF-2α mRNA 相对表达量均高于癌旁组织,而 ING4 mRNA 相对表达量低于癌旁组织,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 乳腺癌和癌旁组织中 HIF-1α、HIF-2α、ING4 基因表达比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	例数	HIF-1α mRNA	HIF-2α mRNA	ING4 mRNA
乳腺癌	107	1.79 ± 0.14	1.92 ± 0.09	1.31 ± 0.13
癌旁组织	107	1.14 ± 0.11	1.21 ± 0.12	2.05 ± 0.15
<i>t</i> 值		38.858	51.065	39.776
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

注:配对 *t* 检验,两类组织的差值数据未在表中列示。

2.2 乳腺癌组织中 HIF-1α、HIF-2α、ING4 基因表达与临床病理特征之间的关系 乳腺癌组织中 HIF-1α mRNA、HIF-2α mRNA、ING4 mRNA 相对表

达量均与年龄、肿瘤部位、组织学分级、病理学类型、ER、PR 无关($P > 0.05$),HIF-1α mRNA 相对表达量与淋巴结转移有关($P < 0.05$),HIF-2α mRNA 相对表达量与肿瘤大小、淋巴结转移有关($P < 0.05$),ING4 mRNA 相对表达量与临床分期、淋巴结转移有关($P < 0.05$),见表 3。

2.3 乳腺癌和癌旁组织中 VEGF 基因表达和 MVD 计数比较 乳腺癌组织中 VEGF mRNA 相对表达量和 MVD 计数均高于癌旁组织,均差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 4。

2.4 乳腺癌组织中 HIF-1α、HIF-2α、ING4 基因表达与 VEGF 基因表达和 MVD 计数相关性 Pearson 相关分析显示,乳腺癌组织中 HIF-1α mRNA 相对表达量均与 VEGF mRNA 相对表达量和 MVD 计数呈正相关($r = 0.382、0.417, P < 0.05$),HIF-2α mRNA 相对表达量均与 VEGF mRNA 相对表达量和 MVD 计数呈正相关($r = 0.408、0.491, P < 0.05$),ING4 mRNA 相对表达量均与 VEGF mRNA 相对表

表 3 乳腺癌组织中 HIF-1α、HIF-2α、ING4 基因表达与临床病理特征的关系/ $\bar{x} \pm s$

指标	例数	HIF-1α mRNA	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	HIF-2α mRNA	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	ING4 mRNA	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
年龄/岁			1.448	0.151		1.800	0.075		1.141	0.256
≤55	53	1.76 ± 0.11			1.90 ± 0.07			1.30 ± 0.12		
>55	54	1.80 ± 0.17			1.93 ± 0.10			1.33 ± 0.15		
肿瘤大小/cm			1.485	0.140		10.390	0.000		1.635	0.105
≥5	38	1.77 ± 0.12			2.07 ± 0.13			1.32 ± 0.11		
<5	69	1.81 ± 0.14			1.85 ± 0.10			1.29 ± 0.09		
肿瘤部位			0.707	0.481		2.017	0.047		2.562	0.012
左侧	52	1.78 ± 0.13			1.94 ± 0.12			1.28 ± 0.10		
右侧	55	1.80 ± 0.16			1.90 ± 0.08			1.34 ± 0.14		
组织学分级			1.448	0.151		0.760	0.456		1.650	1.650
I + II 级	88	1.82 ± 0.17			1.91 ± 0.07			1.29 ± 0.09		
Ⅲ级	19	1.76 ± 0.13			1.93 ± 0.11			1.33 ± 0.12		
临床分期			1.615	0.109		2.576	0.011		5.733	0.000
I + II 期	79	1.83 ± 0.15			1.94 ± 0.14			1.24 ± 0.08		
Ⅲ期	28	1.78 ± 0.11			1.89 ± 0.06			1.39 ± 0.13		
病理学类型			0.967	0.347		2.819	0.007		0.643	0.522
浸润性导管癌	91	1.77 ± 0.10			1.95 ± 0.12			1.30 ± 0.11		
其他类型	16	1.81 ± 0.16			1.90 ± 0.05			1.32 ± 0.14		
淋巴结转移			11.559	0.000		8.709	0.000		16.107	0.000
是	61	1.96 ± 0.15			2.01 ± 0.11			1.52 ± 0.15		
否	46	1.64 ± 0.13			1.85 ± 0.08			1.13 ± 0.10		
ER			1.578	0.118		1.674	0.097		1.782	0.078
阳性	72	1.82 ± 0.16			1.91 ± 0.08			1.33 ± 0.14		
阴性	35	1.77 ± 0.14			1.94 ± 0.10			1.29 ± 0.09		
PR			1.083	0.283		2.194	0.031		1.789	0.077
阳性	69	1.78 ± 0.11			1.93 ± 0.10			1.32 ± 0.16		
阴性	38	1.81 ± 0.15			1.90 ± 0.04			1.28 ± 0.07		

注:成组 *t* 检验。

表4 乳腺癌和癌旁组织中 VEGF 基因表达和

MVD 计数比较 $\bar{x} \pm s$			
组别	例数	VEGF mRNA	MVD 计数/个
乳腺癌	107	1.85 ± 0.10	109.32 ± 25.17
癌旁组织	107	1.26 ± 0.13	63.84 ± 22.91
t 值		38.785	14.346
P 值		0.000	0.000

注:配对 t 检验,两类组织的差值数据未在表中列示。

定量和 MVD 计数呈负相关($r = -0.395$ 、 -0.502 , $P < 0.05$)。

3 讨论

乳腺癌作为女性发病率第一位的恶性肿瘤,发生、进展、侵袭、转移机制较为复杂,涉及多基因、多阶段,随着诊疗技术的进步,病人多数预后已得到很大改善,但依然是影响女性尤其是年轻女性健康的重要因素^[6]。有研究指出^[7],肿瘤细胞快速增殖,易导致局部组织处于缺氧状态,而缺氧又会进一步加速肿瘤细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭。研究表明^[8],局部组织缺氧微环境是影响肿瘤转移、复发、预后的重要因素。HIF-1 α 、HIF-2 α 作为 HIF 重要成员,在机体内广泛存在,在常氧条件下不能稳定存在而易被降解,但在缺氧条件下,可稳定存在,且在维持细胞适应缺氧环境,以及在调控细胞增殖、凋亡、血管新生、抗药性等多种生物学功能中发挥重要作用^[9]。有研究指出^[10],HIF 在肿瘤进展、转移中发挥重要作用。本研究对乳腺癌组织中 HIF-1 α 、HIF-2 α 基因表达进行分析,结果显示,乳腺癌组织中 HIF-1 α mRNA、HIF-2 α mRNA 相对表达量均升高,且 HIF-1 α mRNA、HIF-2 α mRNA 相对表达量均与淋巴结转移有关,说明 HIF-1 α 、HIF-2 α 可能参与了乳腺癌发生及转移过程,有研究指出^[11],HIF-1 α 、HIF-2 α 在肿瘤缺氧环境中作用存在差异,HIF-1 α 主要在缺氧急性期发挥作用,而 HIF-2 α 则是随着缺氧环境进展而逐渐发挥作用。本研究发现,HIF-2 α mRNA 相对表达量与肿瘤大小有关,说明可能随着肿瘤生长,逐渐形成慢性缺氧反应,而促使 HIF-2 α 大量表达。ING4 作为一种发挥抑癌作用的转录调节蛋白,广泛存在于机体锌指结构域内,在调控细胞增殖、存活、生长中发挥重要作用^[12],并可通过阻滞细胞周期而加速细胞凋亡。有研究指出^[13],ING4 可通过抑制 HIF 表达而抑制肿瘤血管新生。ING4 基因表达缺失与多种恶性肿瘤发生、进展密切相关^[14]。本研究显示,乳腺癌组织中 ING4 mRNA 相对表达量降低,且 ING4 mRNA 相对表达量与临床分期、淋巴结转移有关,说明 ING4

表达缺失参与了乳腺癌进展、转移过程。

研究表明^[15-16],HIF 作为缺氧微环境下重要的调节分子,可通过调节多种基因,如 VEGF 等而促使肿瘤组织中血管新生,以加速肿瘤细胞能量供应。本研究显示,乳腺癌组织中 VEGF mRNA 相对表达量和 MVD 计数均升高,说明缺氧环境可能加速了肿瘤组织中微血管生成,Pearson 相关分析显示,乳腺癌组织中 HIF-1 α mRNA、HIF-2 α mRNA 相对表达量均与 VEGF mRNA 相对表达量和 MVD 计数呈正相关,而 ING4 mRNA 相对表达量则均与 VEGF mRNA 相对表达量和 MVD 计数呈负相关,说明 HIF-1 α 、HIF-2 α 、ING4 可能共同参与了乳腺癌组织血管新生,HIF 在缺氧环境下表达增加,而 ING4 在乳腺癌组织中表达缺失,两方面的因素可能共同参与了乳腺癌组织中血管新生,从而有利于乳腺癌细胞增殖、转移及侵袭。

综上所述,乳腺癌组织中 HIF-1 α 、HIF-2 α 基因表达升高,而 ING4 基因则被抑制,可能共同参与了乳腺癌组织中血管新生,有望为乳腺癌基因治疗提供新的靶点。

参考文献

- [1] POURMASOUMI M, KARIMBEIKI R, VOSOUGHI N, et al. Healthy Eating Index/Alternative Healthy Eating Index and Breast Cancer Mortality and Survival: A Systematic Review and Meta-analysis[J]. Asia Pac J Oncol Nurs, 2016, 3(3): 297-305.
- [2] LEE GY, CHUN YS, SHIN HW, et al. Potential role of the N-MYC downstream-regulated gene family in reprogramming cancer metabolism under hypoxia[J]. Oncotarget, 2016, 7(35): 57442-57451.
- [3] HALLIGAN DN, MURPHY SJ, TAYLOR CT. The hypoxia-inducible factor (HIF) couples immunity with metabolism[J]. Semin Immunol, 2016, 28(5): 469-477.
- [4] YUAN S, JIN J, SHI J, et al. Inhibitor of growth-4 is a potential target for cancer therapy[J]. Tumour Biol, 2016, 37(4): 4275-4279.
- [5] 赵树鹏, 靳彩玲, 赵新利, 等. 星形细胞瘤组织中生长抑制因子 4 和缺氧诱导因子-1 α 的表达及其临床意义[J]. 中华医学杂志, 2015, 95(43): 3533-3536.
- [6] 胡保全, 胡春艳, 姜军, 等. 转录因子 Twist 在乳腺癌中的作用及研究进展[J/CD]. 中华乳腺病杂志(电子版), 2016, 10(4): 239-242.
- [7] LIN D, WU J. Hypoxia inducible factor in hepatocellular carcinoma: A therapeutic target[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(42): 12171-12178.
- [8] MCINTYRE A, HARRIS AL. Metabolic and hypoxic adaptation to anti-angiogenic therapy: a target for induced essentiality[J]. EMBO Mol Med, 2015, 7(4): 368-379.
- [9] ZHANG FJ, LUO W, LEI GH. Role of HIF-1 α and HIF-2 α in osteoarthritis[J]. Joint Bone Spine, 2015, 82(3): 144-147.