

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.14.010

FGFR4 mRNA 及蛋白在乳腺癌组织中的表达及临床意义*

任美田^{1,2} 苏占海¹ 张耀刚¹ 唐智伟¹ 沈国双^{2Δ}

(1 青海大学医学院 青海 西宁 810001; 2 青海大学附属医院 青海 西宁 810001)

摘要 目的: 研究乳腺癌组织与乳腺癌旁组织中 FGFR4 mRNA 及蛋白的表达及其临床意义。**方法:** 分别以实时荧光定量 RT-PCR、Western blot 的方法检测 52 例乳腺癌组织和 52 例癌旁正常组织中 FGFR4 mRNA 和蛋白的表达,分析 FGFR4 mRNA 和蛋白的表达与临床病理特征的相关性。**结果:** 在乳腺癌组织中,FGFR4 mRNA 及蛋白的表达均高于在乳腺癌旁正常组织($P < 0.05$),并且 FGFR4 的表达与患者淋巴结转移和 Her-2 相关,而与患者年龄、肿瘤大小、分化程度、ER 和 PR 无明显相关性($P > 0.05$)。**结论:** FGFR4 mRNA 及蛋白在乳腺癌组织中表达升高,与淋巴结转移和 Her-2 有关,有望成为预测乳腺癌的转移和预后的参考指标之一。

关键词: 乳腺癌; FGFR4; 淋巴结转移; 临床病理特征

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2017)14-2646-04

Expression and Clinical Significance of FGFR4 mRNA and Protein in the Breast Cancer*

REN Mei-tian^{1,2}, SU Zhan-hai¹, ZHANG Yao-gang¹, TANG Zhi-wei¹, SHEN Guo-shuang^{2Δ}

(1 Qinghai University Medical College, Xining, Qinghai, 810001, China;

2 Qinghai University Affiliated Hospital, Xining, Qinghai, 810001, China)

ABSTRACT Objective: To study the expression and clinical significance of FGFR4 mRNA and protein in the breast cancer tissues and adjacent tissues. **Methods:** Real-time fluorescence quantitative RT-PCR and Western blot methods were used respectively to detect the expression of FGFR4 mRNA and protein in 52 cases of breast cancer tissues and adjacent tissues. **Results:** The expressions of FGFR4 mRNA and protein in the breast cancer tissues were higher than those of the adjacent tissues ($p < 0.05$), and they were associated with the lymph node metastasis and Her-2 expression ($p < 0.05$), but had no correlation with the age, tumor size, degree of differentiation, ER and PR of breast cancer ($P > 0.05$). **Conclusion:** FGFR4 mRNA and protein expressions in the breast cancer tissue were relate to the lymph node metastasis and Her-2 expression. FGFR4 mRNA and protein were expected to be the indications of breast cancer metastasis and prognosis.

Key words: Breast cancer; FGFR4; Clinical and pathological characteristics; Lymph node metastasis

Chinese Library Classification(CLC): R737.9 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)14-2646-04

前言

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一。流行病学调查表明乳腺癌发病率占女性所有恶性肿瘤的 15% 左右^[1]。成纤维细胞生长因子受体 4 (fibroblast growth factor receptors 4, FGFR4) 参与调节多种细胞过程包括细胞的生长、分化和转移^[2], 在不同的恶性肿瘤如肺癌^[3]、前列腺癌^[4]、结肠癌^[5]、胃癌^[6,7]、软组织肉瘤^[8]和头颈部肿瘤^[9]的中表达增高或者降低, 发挥不同的抑制或者促进作用^[10,11]。但是, 有关于 FGFR4 在乳腺癌组织中表达及作用的文献报道比较少。因此, 本研究采用实时荧光定量聚合酶链反应和 Western blot 技术检测 FGFR4 在乳腺癌组织及乳腺癌旁正常组织中 mRNA 和蛋白的表达, 探讨了 FGFR4 与乳腺癌临床病理特征的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 临床资料 收集 2014 年 10 月 -2016 年 11 月青海大学附属医院甲状腺乳腺外科住院患者手术切除的乳腺癌的肿瘤组织及原理肿瘤 >5 cm 的正常乳腺组织个 52 例; 均有完整的临床病理信息, 包括发病年龄 30~74 岁平均 49.3 ± 11.1 岁, 按国际抗癌联盟(IUCC)TNM 分期标准, I ~ II 期 20 例, III~IV 期 32 例。患者均已签署知情同意书。所有患者术前均未行放疗、化疗和其他相关抗肿瘤治疗, 术后有病理科主任医师诊断并进行分级, 证实为乳腺癌。青海大学附属医院伦理委员会同意并批准该实验, 告知患者签署知情同意书。手术取下来新鲜标本装入冻存盒立即放入液氮, 后转入 -80℃ 冰箱以备用。

* 基金项目: 青海省科技厅应用基础研究项目(2016-ZJ-762)

作者简介: 任美田, 硕士研究生, 研究方向: 肿瘤外科, E-mail: 948268693@qq.com

Δ 通讯作者: 沈国双, 硕士, 副教授, 研究生导师, E-mail: guoshuangshen@126.com

(收稿日期: 2016-12-19 接受日期: 2017-01-12)

1.1.2 相关试剂 总 RNA 提取试剂 Trizol 买于美国 Invitrogen Carlsbad 公司,反转录试剂盒买于美国 Thermo 公司,荧光试剂盒买于德国 QIAGEN 公司,FGFR4 基因引物买于由上海生工公司合成,内参 β -actin 基因引物买于由上海生工公司合成,兔抗人多克隆抗体买于美国 proteintech 公司,FGFR4 羊抗兔二抗买于北京索来宝公司。

1.2 方法

1.2.1 引物和 PCR 程序 FGFR4mRNA 使用 Premier Primer5 软件设计引物,在 NCBI 中查找 FGFR4mRNA 设计出引物:FGFR4mRNA 上游:5'-GGTGACTCCTTCACCTCCA-3',下游:5'-AGCGGAAGTTGACGGTGT3',扩增片段大小为 163 bp。 β -actin 上游:5'-CCTGGCACCCAGCACAAT-3',下游:5'-GGGCACCCAGCACAAT,扩增片段大小为 144 bp。按照试剂盒提供的说明书操作,从 -80 °C 冰箱取出组织,将组织称重放入试管用匀浆器将组织研磨成粉碎末,根据说明书顺序应用 Trizol 提取组织总 RNA,取 1 μ L 提取的总 RNA 在 NAN-ODROP 2000 C 紫外分光光度计,测定 RNA 分别吸收峰 260 mm 和 280 mm 时的值之比为 1.8~2.0,表明 RNA 纯度完好,没有其他杂质污染,在 1.2%琼脂糖凝胶电泳 130 V,30 min,然后使用 Bio-Rad Gel Doc XR+ 凝胶成像分析 RNA 三条带 28 s,28 s,5 s 完整性结果。然后将总 RNA(已测量)逆转录为 cDNA 根据试剂盒说明书加反转录试剂进行反转录,然后进行 PCR 反应。反应条件:65 °C 孵育 5 min,放在冰上,然后按体系加完,42 °C 孵育 60 min,70 °C 加热 5 min 结束。然后进行实时定量荧光 PCR,按 QuantiNoa SYBR Green PCR Kit 体系说明分别加入反转好的 cDNA,FGFR4 合成的引物、内参 β -actin 等相关试剂,反应条件:95 °C 加热 2 min,95 °C 变性 5 s,60 °C 结合、退火、延伸 10 s,进行扩增 40 个循环,对 PCR 产物进行熔点曲线分析。测得 CT 值使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算测得 CT 值。

1.2.2 FGFR4 蛋白检测 乳腺癌组织及癌旁组织,放入研钵加入液氮进行研磨;放入试管中,加入 RIPA 裂解液,放冰上进行自行裂解 30 min,12000 rpm 离心 15 min,用移液枪取上清液;使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒,蛋白浓度测定;配制 12 % SDS- 聚丙烯酰胺凝胶混合凝胶,加入蛋白,进行蛋白电泳 90 min;将蛋白电泳完以后转移到 PVDF 膜上,进行转膜 50 min,将转膜完以后,室温用 5 %脱脂牛奶进行封闭 2 h。封闭结束后剪裁目的条带和内参条带分别加入 1:2000 的 FGFR4 兔抗人的一抗,1:3000 小鼠抗人的 GAPDH,放在 4 °C 冰箱摇床上孵育过夜。次日洗膜 7 次,分别加入 1:5000 羊抗兔二抗和 1:2000 的羊抗小鼠的二抗,室温孵育 2 h。洗膜 7 次,加上 ECL 超敏发光液进行显影。运用 Quantiy one 软件分别计算出目的基因的蛋白条带灰度值和内参条带的灰度值,将测得的数据使用统计学方法进行比较。

1.3 统计学方法

采用 SPSS19.0 软件,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 描述,组间比较采用两个独立样本的 t 检验;计数资料用率描述,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 乳腺癌和乳腺癌癌旁正常组织中 FGFR4 mRNA 的表达比较

乳腺癌和乳腺癌癌旁正常组织各 52 例,乳腺癌组织中 FGFR4 mRNA 相对表达 (1.27 ± 0.33) 显著高于癌旁正常组织 (1.09 ± 0.47),差异有统计学意义($P = 0.033$),见图 1。

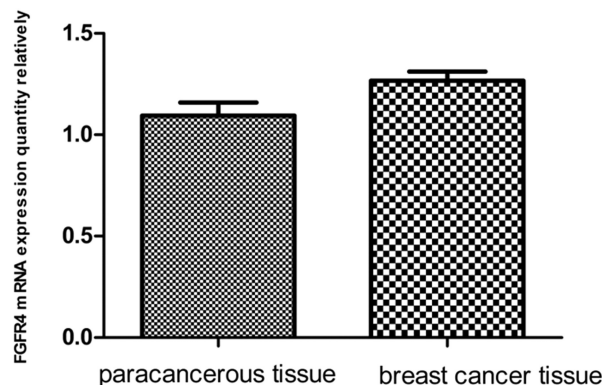


图 1 FGFR4 mRNA 在乳腺癌组织中及癌旁正常组织中的表达比较

Fig.1 Comparison of the FGFR4 mRNA expression between breast cancer tissues and adjacent normal tissues

2.2 乳腺癌和乳腺癌癌旁正常组织 FGFR4 蛋白的表达比较

乳腺癌和乳腺癌癌旁正常组织各 52 例标本,经 Western blot 检测,根据测得目的基因条带与内参条带灰度值之比,乳腺癌组织中 FGFR4 蛋白相对表达量为 (1.40 ± 0.13),癌旁正常组织中 FGFR4 蛋白相对表达量 (1.35 ± 0.05),FGFR4 蛋白在乳腺癌组织中的表达水平显著高于癌旁正常组织中的表达($P = 0.025$)。见图 2。

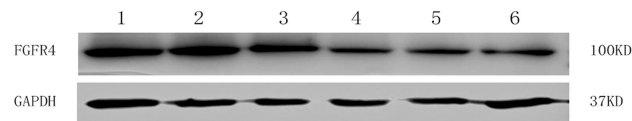


图 2 Western blot FGFR4 蛋白在乳腺癌及乳腺癌癌旁正常组织的表达

Fig.2 Expression of FGFR4 Western protein in the breast cancer and adjacent normal tissues of breast cancer

1, 2, 3 for breast cancer tissue;4,5,6 for adjacent normal tissue

2.3 FGFR4 mRNA 和蛋白在乳腺癌组织中表达与临床病理特征的关系

FGFR4 mRNA 在乳腺癌组织中表达量的中位数 (1.263) 为界限之时,FGFR4 mRNA 在乳腺癌组织中的表达与淋巴结转移 ($P = 0.023$) 和 HER-2 有关 ($P < 0.026$),而与患者的年龄、肿瘤分期、分化程度、雌激素受体 (ER) 表达、孕激素 (PR) 均无关 ($P > 0.05$)。FGFR4 蛋白在乳腺癌组织中表达量的中位数 (1.404) 为界限值时,FGFR4 蛋白的表达量与淋巴结转移有关 ($P = 0.044$),与 Her-2 也有关 ($P = 0.036$);而与患者年龄、肿瘤分期、分化程度、雌激素 (ER)、孕激素 (PR) 的表达均无关 ($P > 0.05$)。见表 1。

3 讨论

乳腺癌已经成为全球女性威胁生命最主要的疾病之一,在欧美发达国家中,乳腺癌占女性所有恶性肿瘤的首位。在我国乳腺癌发病率呈逐年增高趋势,年龄也越来越年轻化^[12]。目前,乳腺癌的主要治疗方法包括:术前化疗、手术、术后化疗、放疗、及靶向药物治疗等相关治疗手段,分子生物靶向药物治疗新靶点是乳腺癌研究的热点。

表 1 52 例乳腺癌组织中 FGFR4mRNA 及蛋白的表达与临床病理特征的关系

Table 1 The relationship between the expression of FGFR4 mRNA and protein in breast cancer tissues and clinicopathological features

Groups	Amount(n)	FGFR4 mRNA			FGFR4 Protein		
		Relaticely high expression	Relaticely high expression rate(%)	P Value	Relaticely high expression	Relaticely high expression rate(%)	P Value
Age				0.224			0.177
≤50	34	19	55.9		16	47.1	
>50	18	7	38.9		12	66.7	
Clinical stages				0.254			0.087
I ~ II	20	8	40.0		13	65	
III~IV	32	18	56.3		13	40.6	
Tumor diameter (cm)				0.773			0.071
≤2	19	9	47.4		6	31.6	
>2	33	17	51.5		19	57.6	
Degree of differentiation				0.080			0.432
Poorly differentiation	18	6	33.3		10	55.6	
Middle and high differentiation	34	20	58.8		15	44.1	
Lymph node metastasis				0.023			0.044
Positive	21	20	64.5		17	54.8	
Negative	31	6	28.6		5	23.8	
ER				0.734			0.120
Positive	41	20	43.2		22	53.7	
Negative	11	6	54.5		3	27.3	
PR				0.126			0.358
Positive	37	16	43.2		20	54.1	
Negative	15	10	54.5		6	40.0	
HER-2				0.026			0.036
Positive	28	18	64.3		15	53.6	
Negative	24	8	33.3		6	25.0	

Note: ER: Estrogen receptor; PR: Progesterone receptor; Her-2Human epidermal growth factor 2.

FGFR4 属于成纤维细胞生长因子受体家族之一, 其特异性配体为 FGF19, 两者相互结合能够抑制细胞凋亡并可以引起细胞增殖相关基因表达上调。FGFR4 还具有酪氨酸的跨膜激酶活性, 通过启动多个信号级联在 FGF 配体结合到细胞外结构域受体, 可以引起肿瘤生长, 尤其是当其表达上调或通过改变基因稳定性和结构, 最终导致肿瘤细胞增殖和生长^[13-16]。FGFR4 在多种恶性肿瘤中表达异常。Han Kiat Ho 等^[17] 采用 PCR 方法检测 62 例肝癌和正常肝组织 FGFR4mRNA 表达, 结果 FGFR4 在肝癌组织比癌旁正常肝组织表达增高。Qian Z R 等^[18]对 137 例不同国家的各种垂体腺瘤组织和 10 例正常垂体组织中, 研究中发现 FGFR4 蛋白在日本 102 例和加拿大 35 例垂体腺瘤表达分别占 57.8%和 62.8%, 而在正常垂体组织中不表达。Gowardhan B 等^[19]采用 Western blot 方法检测对 57 例前列腺癌和 26 例良性前列腺组织 FGFR4 蛋白的表达。结果显示

FGFR4 在前列腺癌组织中表达量显著高于良性前列腺组织。这些实验结果与我们的研究 FGFR4 在乳腺癌组织中表达结果表达情况相同。Roberta Lelis Dutra 等^[20]对 122 例口腔和口咽鳞状细胞癌患者外周血的 DNA, 免疫组化方法检测结果显示 FGFR4 低表达与淋巴结阳性和疾病的早期复发死亡有关。杨胜利等^[21]采用实时荧光 RT-PCR 方法检测对 126 例肺腺癌和癌旁正常组织中 FGFR4, 结果表明 FGFR4 在肺癌组织比癌旁正常组织表达明显下调, 这与我们的研究 FGFR4 在乳腺癌组织中表达的结果相不一样, 可能和样本量多少有关, 也可能与肿瘤组织不同有关, 也提示 FGFR4 在不同组织中可能功能也不完全相同。

本实验使用 RT-PCR 法检测 FGFR4 mRNA 在乳腺癌组织及癌旁正常组织中表达, 结果显示乳腺癌组织中的 FGFR4 mRNA 表达高于癌旁正常组织, 差异具有统计学意义。提示

FGFR4 在乳腺癌发生、发展过程中可能具有一定作用。结合临床病理特征进行相关分析,FGFR4 mRNA 在乳腺癌组织中高表达与淋巴结转移和 Her-2 有一定的关系,提示 FGFR4 可能与淋巴结转移有关。而与年龄肿瘤大小、临床分期、分化程度、ER、PR 等无明显相关性。用 Western blot 方法检测 52 例乳腺癌组织及癌旁正常组织中 FGFR4 蛋白相对表达量,结果显示 FGFR4 蛋白在乳腺癌组织中表达高于癌旁正常组织,进一步的与临床病理特征分析显示,FGFR4 表达与淋巴结转移和 Her-2 呈正相关。Meijer D 等^[22]研究发现在乳腺癌组织中 FGFR4 mRNA 表达水平增高与患者预后有密切的关系。Bange J 等^[23]研究还发现 FGFR4 基因在乳腺癌的高表达表达与 Her-2 呈正相关性。Nadu R 等^[24]在研究中发现乳腺癌患者 FGFR4 基因型过表达与淋巴结转移有明显的相关性。这些实验研究与我们研究结果相同。两项实验均表明 FGFR4 在乳腺癌组织中表达升高,提示可能与乳腺癌有一定的相关性。恶性肿瘤的发生是一个相当复杂的转变过程,包括细胞骨架改变、细胞分裂周期的过程、细胞信号的转导途径等异常改变。FGFR4 是受体酪氨酸激酶家族中的一员,在相关恶性肿瘤研究中逐渐得到重视。FGFR4 可能在乳腺癌形成过程中、淋巴结转移和 Her-2 有一定作用。但 FGFR4 在分子水平肿瘤恶变的具体机制还不清楚,还需要进一步深入研究。

综上所述,FGFR4 在乳腺癌组织中高表达,可能参与乳腺癌的形成过程及淋巴结转移,并有望成为判断乳腺癌淋巴结转移及预后和分析生物学行为的重要参考指标。

参考文献(References)

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in china, 2015[J]. CA: A cancer journal for clinicians, 2016, 66(2): 115-132
- [2] Basilico C, Moscatelli D. The FGFR Family of growth factors and oncogenes[J]. Advances in cancer research, 1992, 59: 115-165
- [3] Spinola M, Leoni V, Pignatiello C, et al. Functional FGFR4 Gly388Arg polymorphism predicts prognosis in lung adenocarcinoma patients[J]. Journal of clinical oncology, 2005, 23(29): 7307-7311
- [4] Wang J, Stockton D W, Ittmann M. The fibroblast growth factor receptor-4Arg388 allele is associated with prostate cancer initiation and progression[J]. Clinical cancer research, 2004, 10(18): 6169-6178
- [5] Spinola M, Leoni V P, Tanuma J, et al. FGFR4 Gly388Arg Polymorphism and prognosis of breast and colorectal cancer [J]. Oncology reports, 2005, 14(2): 415-420
- [6] Ye Y, Shi Y, Zhou Y, et al. The fibroblast growth factor receptor-4Arg388 allele is associated with gastric cancer progression [J]. Annals of surgical oncology, 2010, 17(12): 3354-3361
- [7] Ye Y W, Zhou Y, Yuan L, et al. Fibroblast growth factor receptor 4 regulates proliferation and antiapoptosis during gastric cancer progression[J]. Cancer, 2011, 117(23): 5304-5313
- [8] Morimoto Y, Ozaki T, Ouchida M, et al. Single nucleotide polymorphism in fibroblast growth factor receptor 4 at codon 388 is associated with prognosis in high-grade soft tissue sarcoma [J]. Cancer, 2003, 98(10): 2245-2250
- [9] da Costa Andrade V C, Parise O, Hors C p, et al. The fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) Arg388 allele correlates with survival in head and neck squamous cell carcinoma [J]. Experimental and molecular pathology, 2007, 82(1): 53-57
- [10] Fullanti E, Berking C, Harbeck N, et al. Meta and pooled analyses of FGFR4 Gly388Arg polymorphism as a cancer prognostic factor [J]. European Journal of Cancer Prevention, 2011, 20 (4): 340-347
- [11] Sugiyama N, Varjosalo M, Meller P. et al. Fibroblast growth factor receptor 4 regulates tumor invasion by coupling fibroblast growth factor signaling to extracellular matrix degradation [J]. Cancer research, 2010, 70(20): 7851-7861
- [12] 杜沛玲, 方佳英, 贾潇岳, 等. 1994-2013 年中国女性乳腺癌流行病学特征[J]. 汕头大学医学院学报, 2016(2): 124-126
- [12] Du Pei-Ling, Fang Jia-ying, Jia Xiao-yue, et al. Epidemiological characteristics of breast cancer in Chinese Women from 1994 to 2013 [J]. Journal of Shantou University Medical College, 2016(2): 124-126
- [13] Power C J, Mcleeskey S W, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling[J]. Endocrine-related cancer, 2000, 7(3): 165-197
- [14] Cavallaro U O, Christfori G. Multitasking in tumor progression: signaling functions of cell adhesion molecules [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2004, 1014(1): 58-66
- [15] Johnston C L, Cox H C, Gomm J J, et al. bFGF and aFGF induce membrane ruffling in breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells:FGFR-4 involvement[J]. Biochemical Journal, 1995, 306(2): 609-616
- [16] 方科, 苏子剑, 庄建良. FGF19 和 FGFR4 在肿瘤作用的研究进展 [J]. 中国肿瘤外科杂志, 2013, (1): 64-67
- [16] Fang Ke, Su Zi-jian, Zhuang Jian-liang. FGF19 and FGFR4 in tumor research[J]. Chinese Journal of Surgery, 2013, (1): 64-67
- [17] Ho H K, Pok S, Ruhe J, et al. Exploring the involvement of FGFR4 in hepatocellular carcinoma[J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2007, 6 (11 Supplement): C73-C73
- [18] Qian Z R, Sano T, Asa S L, et al. Cytoplasmic expression of fibroblast growth factor receptor-4 in human pituitary adenomas:relation to tumor type, size, proliferation, and invasiveness [J]. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2004, 89(4): 1904-1911
- [19] Gowardhan B, Douglas D A, Mathers M E, et al. Evaluation of the fibroblast growth factor system as a potential target for therapy in human prostate cancer [J]. British journal of cancer, 2005, 92 (2): 320-327
- [20] Dutra R L, de Carvalho M B, dos Santos M, et al. FGFR4 profile as a prognostic marker in squamous cell carcinoma of the mouth and oropharynx[J]. PloS one, 2012, 7(11): e50747
- [21] 杨胜利, 何建行, 肖大凯, 等. FGFR4 mRNA 在我国南方地区肺癌组织中的表达及其临床意义 [J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2015(12): 1707-1709
- [21] Yang Sheng-li, He Jian-hang, Xiao Da-kai, et al. Expression and clinical significance of FGFR4 mRNA in lung adenocarcinoma of southern China [J]. Journal of Nanjing Medical University: Natural Science Edition, 2015(12): 1707-1709
- [22] Meijer D, Sieuwerts A M, Look M P, et al. Fibroblast growth factor receptor 4 predicts failure on tamoxifen therapy in patients with recurrent breast cancer[J]. Endocr Relat Cancer, 2008, 15(1): 101-111
- [23] Bange J, Prechtel D, Cheburkin Y, et al. cancer progression and tumor cell motility are associated with the FGFR4 Arg388 allele [J]. Cancer research, 2002, 62(3): 840-847
- [24] Naidu R, Har Y C, Taib N A. Polymorphism of FGFR4 Gly388Arg does not confer an increased risk to breast cancer development[J]. Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics, 2009, 18(2-3): 65-71