doi:10.11659/jjssx.12E022002

·临床研究·

乳腺癌miR-4500、NGF表达与术前磁共振征象的相关性研究

杨 帆,陈 静,张 斌,李娇娇,张 丽,边桂风,边雅静,郎晓燕 (河北北方学院附属第一医院医学影像部,河北 张家口 075000)

[摘 要] **目的** 分析乳腺癌患者中miR-4500、神经生长因子(NGF)表达与术前磁共振(MR)征象的相关性。**方法** 选取我院收治的乳腺癌患者105例,通过qRT-PCR法检测患者乳腺癌组织及癌旁组织中miR-4500、NGF mRNA表达水平,免疫组化法测定乳腺癌组织及癌旁组织中NGF的阳性表达率。分析乳腺癌组织中miR-4500、NGF表达与患者临床病理特征及MR征象的相关性。生物信息网站预测miR-4500与NGF的靶向关系,并分析二者表达的相关性。**结果** 与癌旁组织相比,乳腺癌组织中miR-4500表达水平降低($P<0.05$),NGF mRNA水平、NGF阳性表达率升高($P<0.05$)。年龄、病理类型、肿瘤分型、实质背景、表观弥散系数、强化曲线在不同miR-4500表达及NGF表达间差异无统计学意义($P>0.05$),组织学分级、淋巴结转移、肿瘤直径、肿瘤形态、环形强化、瘤周水肿与miR-4500表达及NGF表达有关($P<0.05$)。生物信息网站预测显示,miR-4500与NGF存在结合位点,乳腺癌组织中miR-4500表达与NGF mRNA表达呈负相关($r=-0.576$,$P<0.05$)。**结论** 乳腺癌组织miR-4500低表达,NGF高表达,二者与患者术前MR征象具有相关性,为MR征象提供了分子学依据。

[关键词] 乳腺癌;miR-4500;神经生长因子;MR征象
[中图分类号] R445.2;R737.9 [文献标志码] A [收稿日期] 2022-12-01

Correlation analysis of miR-4500, NGF expressions with preoperative magnetic resonance signs in breast cancer

YANG Fan, CHEN Jing, ZHENG Bin, LI Jiao-jiao, ZHANG Li, BIAN Gui-feng, BIAN Ya-jing, LANG Xiao-yan (Department of Medical Imaging, First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou Hebei 075000, China)

Abstract: Objective To analyze the correlations of the expressions of miR-4500 and nerve growth factor (NGF) in breast cancer patients with preoperative magnetic resonance (MR) signs. **Methods** A total of 105 patients with breast cancer admitted to our hospital were selected, the mRNA expression levels of miR-4500 and NGF in breast cancer tissues and adjacent tissues of patients were detected by qRT-PCR, and the positive expression rates of NGF in breast cancer tissues and adjacent tissues were determined by immunohistochemistry method. The correlations of the expressions of miR-4500 and NGF in breast cancer tissues with clinicopathological features and MR signs of patients were analyzed. The targeting relationship between miR-4500 and NGF was predicted by the bioinformatics website, and the correlation between the expressions of the two was analyzed. **Results** Compared with the adjacent tissues, the expression level of miR-4500 in breast cancer tissue decreased ($P<0.05$), while the level of NGF mRNA and the positive expression rate of NGF increased ($P<0.05$). There was no significant difference in age, pathological type, tumor classification, parenchymal background, apparent diffusion coefficient or enhancement curve among different expressions of miR-4500 and NGF ($P>0.05$). The histological grade, lymph node metastasis, tumor diameter, tumor morphology, ring-like enhancement, and peritu-moral brain edema were related to the expressions of miR-4500 and NGF ($P<0.05$). The bioinformatics website prediction showed that miR-4500 and NGF had binding sites, and the expressions of miR-4500 and NGF mRNA in breast cancer tissues were negatively correlated ($r=-0.576$, $P<0.05$). **Conclusion** The expression of miR-4500 in breast cancer tissue is low, and the expression of NGF is high, which are correlated with the preoperative MR signs in patients, providing a molecular basis for MR signs.

Keywords: breast cancer; miR-4500; nerve growth factor; MR signs

乳腺癌是女性人群多发恶性肿瘤,由乳腺上皮细胞在各种刺激下异常增殖引发,发病率居女性恶性肿瘤之首,且有升高趋势,严重威胁患者生命[1-2]。乳腺癌治疗以手术为主,放化疗、分子靶向药物治疗为辅[3]。miR-4500可抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移[4]及血管生成[5],属于抑癌因子。TargetScanHuman数据库分析显示,miR-4500与神经生长因子(nerve growth factor, NGF)存在结合位点,NGF属于多功能生长因子,其可通过促进细胞膜上络氨酸激酶活化促进癌细胞的增殖[6]。Bruno等[7]研究显示,NGF由乳腺癌细胞合成及释放,促NGF信号传导与乳腺癌细胞侵袭和转移有关。医学影像学技术发展迅速,磁共振(magnetic reso-

[基金项目] 河北省2021年度医学科学研究课题计划(20210136)
[通信作者] 杨 帆,E-mail:yangfan1993yangfan@163.com

nance,MR)征象可为临床提供无创、清晰的信息,反映乳腺病理变化,在乳腺疾病中有较好的应用[8]。生物学分子水平变化与MR征象的相关性对临床乳腺癌诊治有一定作用,但miR-4500、NGF表达与MR征象是否具有相关性尚不清楚。基于此,本研究通过分析乳腺癌患者术前MR征象与miR-4500、NGF的相关性,探讨MR征象与乳腺癌分子生物学特性的关系,以期为该病的诊治提供参考。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取本院2020年1月至2022年1月收治的乳腺癌患者105例,分析其术前MR及临床资料。纳入标准:①术前MR检查资料完整;②行手术治疗,术后留存癌组织及癌旁组织样本;③MR检查与手术间隔期在2周及以上。排除标准:①合并其他恶性肿瘤;②MR检查前接受过手术治疗或放化疗。

1.2 术前MR扫描

患者取仰卧位足先进,通过3.0T MR仪行双侧乳腺扫描。层厚/层间距为4 mm/0.5 mm;T1WI参数:TE为500 ms,TR为20 ms;T2WI参数:TE为5 300 ms,TR为80 ms;DWI参数:TE为8 400 ms,TR为90 ms,扩散敏感梯度场参数b为0、800 s/mm^2。

增强扫描:视野280 cm×340 cm,矩阵280×340,层厚/层间距为1 mm/0 mm,以2.5 mL/s的流速注入钆喷酸葡甲胺盐显影剂(0.15 mL/kg)。采集MR征象,包括乳腺实质背景强化、腺体类型、表观弥散系数、强化曲线、环形强化、瘤周水肿等。

1.3 qRT-PCR法检测miR-4500、NGF mRNA表达

收集乳腺癌组织及其癌旁组织标本,通过RNA试剂盒提取组织RNA,将部分RNA逆转录为cDNA,qRT-PCR仪进行扩增:94 ℃预变性10 min,94 ℃ 15 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,循环35次。miR-4500以U6为内参,NGF以GAPDH为内参,$2^{-\Delta\Delta Ct}$法测定组织中miR-4500、NGF mRNA表达水平。引物序列见表1。

1.4 免疫组化法检测NGF阳性表达

将石蜡保存的乳腺癌与癌旁组织标本脱蜡、切片、修复抗原,然后室温封闭;加入兔抗人NGF(稀释比1∶500),4 ℃过夜孵育;添加羊抗兔二抗IgG(稀释比1∶1 000)37 ℃孵育30 min,DAB染色试剂盒进行染色。染色强度评分:无染色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分;阳性细胞率评分:<25%为0分,25%~50%为1分,51%~75%为2分,>75%为3分。由2名专业人员进行评分,两项评分相乘,≤3分为阴性表达,>3分为阳性表达。

表1 引物序列

基因	正向(5′-3′)	反向(5′-3′)
miR-4500	GGGGTGAGGTAGTAG	CAGTGCGTGTCGTGGAGT
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT
NGF	CGGCGTCTTTGTGCCTTAT	CGAGGAAAAGCAGGTACGAG
GAPDH	AACATCATCCCTGCATCCAC	AGTGGGAGTTGCTGTTGAG

1.5 观察指标

收集患者年龄、病理类型、组织学分级、淋巴结转移、肿瘤分型、肿瘤直径、肿瘤形态等临床资料及MR征象。生物信息网站预测miR-4500与NGF的靶向关系,并分析二者表达的相关性。

1.6 统计学分析

使用SPSS 22.0软件进行统计学分析,计数资料以率(%)表示,行χ^2检验;计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,行t检验。相关性分析采用*Pearson*法。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌组织与癌旁组织中miR-4500、NGF mRNA水平

与癌旁组织相比,乳腺癌组织中miR-4500水平降低(P<0.05),NGF mRNA水平升高(P<0.05),见表2。乳腺癌组织中NGF阳性表达率为76.3%,高于癌旁组织的23.8%,差异有统计学意义(χ^2=57.619,P<0.001)。

表2 乳腺癌组织与癌旁组织中miR-4500、NGF mRNA水平比较($\bar{x}\pm s$,n=105)

组织	miR-4500	NGF mRNA
癌旁组织	1.01±0.11	1.02±0.11
乳腺癌组织	0.35±0.04	1.96±0.18
t	57.780	45.661
P	<0.001	<0.001

2.2 乳腺癌组织中miR-4500、NGF表达与临床特征及MR征象的关系

NGF阳性表达80例,阴性表达25例。以乳腺癌患者组织中miR-4500表达的均值(0.35)为界,将其分为miR-4500低表达组(<0.35,52例)与miR-4500高表达组(≥0.35,53例)。年龄、病理类型、肿瘤分型、实质背景、表观弥散系数、强化曲线在不同miR-4500表达及NGF表达间差异无统计学意义(P>0.05),组织学分级、淋巴结转移、肿瘤直径、肿瘤形态、环形强化、瘤周水肿与miR-4500表达及NGF表达有关(P<0.05),见表3~4。

表3 患者miR-4500、NGF表达与临床特征的相关性[例(%)]

临床特征		n	miR-4500低表达(n=52)	miR-4500高表达(n=53)	χ^2	P	NGF阴性表达(n=25)	NGF阳性表达(n=80)	χ^2	P
年龄	<45岁	36	20(55.6)	16(44.4)	0.797	0.372	6(16.7)	30(83.3)	1.541	0.215
	≥45岁	69	32(46.4)	37(53.6)			19(27.5)	50(72.5)		
病理类型	浸润性导管癌	31	16(51.6)	15(48.4)	0.857	0.414	5(16.1)	26(83.9)	4.936	0.177
	小叶原位癌	25	15(60.0)	10(40.0)			10(40.0)	15(60.0)		
	导管内原位癌	29	14(48.3)	15(51.7)			6(20.7)	23(79.3)		
	其他	20	7(35.0)	13(65.0)			4(20.0)	16(80.0)		
组织学分级	Ⅰ~Ⅱ级	47	34(72.3)	13(27.7)	17.720	<0.001	18(38.3)	29(61.7)	9.846	0.002
	Ⅲ级	58	18(31.0)	40(69.0)			7(12.1)	51(87.9)		
淋巴结转移	有	55	35(63.6)	20(36.4)	9.202	0.002	19(34.5)	36(65.5)	7.339	0.007
	无	50	17(34.0)	33(66.0)			6(12.0)	44(88.0)		
肿瘤分型	Luminal型	54	25(46.3)	29(53.7)	2.794	0.247	8(14.8)	46(85.2)	5.014	0.082
	HER-2阳性	16	11(68.7)	5(31.3)			5(31.3)	11(68.7)		
	三阴性	35	16(45.7)	19(54.3)			12(34.3)	23(65.7)		
肿瘤直径	<2 cm	31	8(25.8)	23(74.2)	9.898	0.002	20(64.5)	11(34.5)	40.179	<0.001
	≥2 cm	74	44(59.5)	30(40.5)			5(6.8)	69(93.2)		
肿瘤形态	肿块	75	44(58.7)	31(41.3)	8.778	0.003	22(29.3)	53(70.7)	4.415	0.036
	非肿块	30	8(25.8)	22(74.2)			3(10.0)	27(90.0)		

表4 患者miR-4500、NGF表达与MR征象的相关性

MR征象		n	miR-4500低表达(n=52)	miR-4500高表达(n=53)	χ^2	P	NGF阴性表达(n=25)	NGF阳性表达(n=80)	χ^2	P
实质背景[例(%)]	轻度至少量	62	32(51.6)	30(48.4)	0.264	0.607	13(21.0)	49(79.0)	0.674	0.412
	中度至显著	43	20(46.5)	23(53.5)			12(27.9)	31(72.1)		
环形强化[例(%)]	有	49	31(63.3)	18(36.7)	6.940	0.008	17(34.7)	32(65.3)	6.000	0.014
	无	56	21(37.5)	35(62.5)			8(14.3)	48(85.7)		
瘤周水肿[例(%)]	有	41	27(65.8)	14(34.2)	7.176	0.007	15(36.6)	26(63.4)	6.052	0.014
	无	64	25(39.1)	39(60.9)			10(15.6)	54(84.4)		
表观弥散系数		105	0.98±0.10	1.02±0.13	1.765	0.081	0.99±0.11	1.01±0.12	0.741	0.460
强化曲线[例(%)]	Ⅰ级	42	22(52.4)	20(47.6)	0.778	0.678	6(14.3)	36(85.7)	3.521	0.172

2.3 乳腺癌组织中miR-4500与NGF mRNA的相关性

生物信息网站预测显示,miR-4500与NGF存在结合位点(图1)。乳腺癌组织中miR-4500与NGF mRNA表达呈负相关($r=-0.576$,$P<0.05$),见图2。

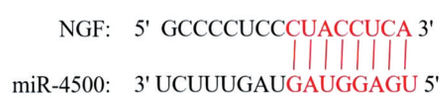


图1 生物信息网站预测miR-4500、NGF结合位点

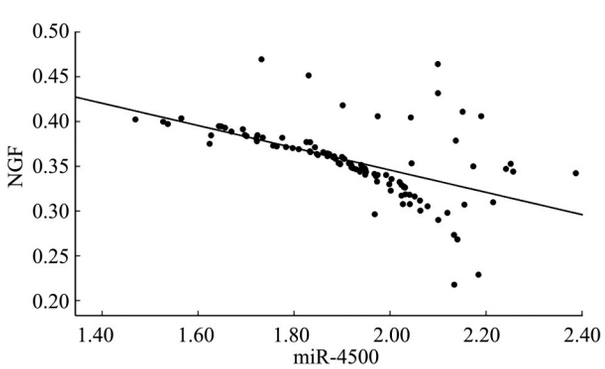


图2 miR-4500与NGF mRNA表达的相关性

3 讨论

乳腺癌是最常见的恶性肿瘤之一,2020年有226万例乳腺癌病例,该疾病是全球女性癌症死亡的主要原因[9]。MR等影像学技术为乳腺癌提供了直观图像,为临床患者的诊治提供参考。影像学成像机制建立在临床病变基础上,而分子变化会导致临床病变的发生,因此影像学检查的研究具有重要的意义[10]。了解特异性分子异常表达与影像学变化的相关性,可为影像学特征的指向性提供参考,有助于临床治疗方案的制定。

NGF是神经营养素因子家族成员,其受体包括p75 NTR,而p75 NTR属于肿瘤坏死因子受体家族,在机体正常组织、病变组织中均可存在,NGF可与p75 NTR受体结合调节肿瘤的生长[11]。Vera等[12]研究显示,NGF/原肌球蛋白激酶通过上调血管内皮生长因子与cMYC表达,促进卵巢癌细胞增殖、血管生成。Mazaki等[13]研究显示,乳腺癌细胞中NGF可促进脊髓

转移模型大鼠轴索生长和降钙素基因相关肽的表达。本研究生物信息学分析显示,miR-4500与NGF存在结合位点。miR-4500在非小细胞肺癌[14]、结直肠癌[15]、膀胱癌[16]中均发挥抑癌作用。吴月等[4]的研究显示,miR-4500可通过转录后下调LIN28B基因表达抑制乳腺癌的进展与转移。本研究乳腺癌组织中NGF mRNA与蛋白阳性表达率均高于癌旁组织,而miR-4500水平低于癌旁组织,且NGF、miR-4500表达与患者淋巴结转移、组织学分级相关,提示NGF在乳腺癌中发挥促癌作用,而miR-4500发挥抑癌作用;miR-4500与NGF mRNA表达呈负相关,且二者存在靶向结合位点,推测miR-4500可能通过调控NGF发挥作用。miR-4500、NGF可能通过激活患者体内相关信号通路,促进癌细胞的快速增殖与扩散,肿瘤浸润能力增强,从而导致癌症进展。瘤周水肿是乳腺癌恶性程度的重要MR参数,癌细胞增殖迅猛时通常伴新生血管生成,而新生血管较薄,通透性高,容易在肿瘤周围形成水肿[17]。研究发现,瘤周水肿也是乳腺癌预后不良的重要参数[18]。本研究中miR-4500、NGF表达与瘤周水肿相关,提示NGF可作为反映乳腺癌进展的重要指标,患者出现瘤周水肿征象时,可能病理表现为NGF高表达,miR-4500低表达。MR环形强化是乳腺癌侵袭过程中新生血管在对比剂填充下呈环状带,可反映疾病的进展,是乳腺癌患者复发及预后不良的危险因素[19]。本研究还发现,NGF、miR-4500表达与MR环形强化亦具有相关性,进一步提示了NGF、miR-4500参与乳腺癌的进展,也为MR环形强化的形成提供了分子依据。

综上所述,乳腺癌组织中miR-4500低表达、NGF高表达与患者术前MR征象具有一定相关性,为MR征象提供了分子学依据。但本研究参数单一,且病例数相对较少,后续将展开多参数及大样本的研究进一步验证结论。

[参考文献]

[1] da Silva BAO, Dias IS, Sarto LE, et al. Cytotoxicity induced by newly synthesized palladium (Ⅱ) complexes lead to the death of MCF-7 and MDA-MB-435 cancer cell lines[J]. Adv Pharm Bull, 2023, 13(1): 160-169. doi:10.34172/apb.2023.017.

[2] Min J, Kim JY, Yeon S, et al. Change in shoulder function in the early recovery phase after breast cancer surgery: a prospective observational study[J]. J Clin Med, 2021, 10(15): 3416. doi: 10.3390/jcm10153416.

[3] Khalki LE, Maire V, Dubois T, et al. Berberine impairs the survival of triple negative breast cancer cells: cellular and molecular analyses[J]. Molecules, 2020, 25(3): 506. doi:10.3390/molecules25030506.

[4] 吴 月, 刘诗月, 黄玉琴, 等. miR-4500通过转录后下调LIN28B表达抑制乳腺癌细胞的迁移和增殖[J]. 山西医科大学学报, 2020, 51(2): 119-123. doi:10.13753/j.issn.1007-6611.2020.02.003.

[5] Li S, Mai H, Zhu Y, et al. MicroRNA-4500 inhibits migration, invasion and angiogenesis of breast cancer cells via RRM2-dependent MAPK signaling pathway[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2020, 21: 278-289. doi:10.1016/j.omtn.2020.04.018.

[6] Jafari M, Delaviz H, Torabi S, et al. The effect of muscle graft with nerve growth factor and laminin on sciatic nerve repair in rats[J]. Basic Clin Neurosci, 2019, 10(4): 333-344. doi: 10.32598/bcn.9.10.145.

[7] Bruno F, Arcuri D, Vozzo F, et al. Expression and signaling pathways of nerve growth factor (NGF) and pro-NGF in breast cancer: a systematic review[J]. Curr Oncol, 2022, 29(11): 8103-8120. doi: 10.3390/curroncol29110640.

[8] 朱景航, 高小玲. MR征象与乳腺癌VEGF表达的相关性分析[J]. 影像诊断与介入放射学, 2021, 30(4): 261-265. doi: 10.3969/j.issn.1005-8001.2021.04.004.

[9] Wilkinson L, Gathani T. Understanding breast cancer as a global health concern[J]. Br J Radiol, 2022, 95(1130): 20211033. doi: 10.1259/bjr.20211033.

[10] Ding W, Fan Z, Xu Y, et al. Magnetic resonance imaging in screening women at high risk of breast cancer: a meta-analysis[J]. Medicine (Baltimore), 2023, 102(10): e33146. doi:10.1097/MD.0000000000033146.

[11] Bruno F, Abondio P, Montesanto A, et al. The nerve growth factor receptor (NGFR/p75NTR): a major player in Alzheimer's disease[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(4): 3200. doi:10.3390/ijms24043200.

[12] Vera DB, Fredes AN, Garrido MP, et al. Role of mitochondria in interplay between NGF/TRKA, miR-145 and possible therapeutic strategies for epithelial ovarian cancer[J]. Life, 2021, 12(1): 8. doi:10.3390/life12010008.

[13] Mazaki A, Yamauchi K, Orita S, et al. Nerve growth factor in breast cancer cells promotes axonal growth and expression of calcitonin gene-related peptide in a rat model of spinal metastasis[J]. Anticancer Res, 2022, 42(1): 581-587. doi:10.21873/anticanres.15515.

[14] Li ZY, Zhang ZZ, Bi H, et al. MicroRNA4500 suppresses tumor progression in nonsmall cell lung cancer by regulating STAT3[J]. Mol Med Rep, 2019, 20(6): 4973-4983. doi: 10.3892/mmr.2019.10737.

[15] Fu D, Ren Y, Wang C, et al. LINC01287 facilitates proliferation, migration, invasion and EMT of colon cancer cells via miR-4500/MAP3K13 pathway[J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 782. doi:10.1186/s12885-021-08528-7.

[16] Peng W, Dong N, Wu S, et al. miR-4500 suppresses cell proliferation and migration in bladder cancer via inhibition of STAT3/CCR7 pathway[J]. J Cell Biochem, 2019, 121(8/9): 3913-3922. doi:10.1002/jcb.29558.

[17] 岳叶洼团, 熊春来. 磁共振T2WI序列瘤周水肿征象用于润性乳腺癌早期复发诊断的价值分析[J]. 影像研究与医学应用, 2021, 5(21): 44-46. doi:10.3969/j.issn.2096-3807.2021.21.021.

[18] Lee HJ, Lee JE, Jeong WG, et al. HER2-positive breast cancer: association of MRI and clinic opathologic features with tumor-infiltrating lymphocytes[J]. AJR Am J Roentgenol, 2022, 218(2): 258-269. doi:10.2214/AJR.21.26400.

[19] 黎冠峰. MR动态增强对不同组织类型乳腺癌的诊断及预后评价[J]. 现代医用影像学, 2019, 28(2): 240-243.

(编辑:龙小芬)