

乳腺癌组织 miR-23a、miR-1247-5p 表达与临床病理特征及预后的关系

郭斌 于桑桑 顾蓓

【摘要】 目的 检测微小 RNA(miR)-23a、miR-1247-5p 在乳腺癌组织中的表达情况,并分析 miR-23a、miR-1247-5p 表达与乳腺癌患者临床病理特征及预后的关系。方法 收集 2012 年 1 月至 2013 年 12 月在昆山市第二人民医院行手术切除的 150 例乳腺癌患者术后的乳腺癌组织及癌旁正常组织样本,采用 RT-PCR 法检测组织样本中 miR-23a、miR-1247-5p 表达水平。单因素分析 miR-23a、miR-1247-5p 表达水平与患者临床病理特征的关系;Kaplan-Meier 生存曲线分析不同 miR-23a、miR-1247-5p 表达水平患者的术后生存情况;ROC 曲线分析 miR-23a、miR-1247-5p 对患者预后的预测价值。结果 与癌旁正常组织相比,乳腺癌组织 miR-23a 表达水平较高、miR-1247-5p 表达水平较低(均 $P < 0.05$)。乳腺癌组织 miR-23a 表达水平与肿瘤直径、分子分型、淋巴结转移、TNM 分期有关(均 $P < 0.05$),miR-1247-5p 表达水平与组织病理分级、分子分型、淋巴结转移、TNM 分期有关(均 $P < 0.05$)。miR-23a 高表达、miR-1247-5p 低表达患者的术后 5 年总生存率及中位生存时间均分别低于 miR-23a 低表达、miR-1247-5p 高表达患者(均 $P < 0.05$)。检测乳腺癌组织 miR-23a、miR-1247-5p 表达水平对患者预后预测的 AUC 分别为 0.709(95%CI: 0.625~0.793)、0.690(95%CI: 0.606~0.775),灵敏度分别为 0.812、0.749,特异度分别为 0.637、0.622。结论 乳腺癌组织 miR-23a 表达上调,miR-1247-5p 表达下调,且与患者预后有关。检测乳腺癌患者术后癌组织 miR-23a、miR-1247-5p 表达水平对患者预后预测有一定的临床价值。

【关键词】 乳腺癌 miR-23a miR-1247-5p 分子分型 淋巴结转移 生存 预后

Expression of miR-23a and miR-1247-5p in breast cancer tissue and its relation with the clinicopathological characteristics and prognosis of patients GUO Bin, YU Sangsang, GU Bei. Department of Thyroid and Breast Surgery, Kunshan Second People's Hospital, Kunshan 215300, China

Corresponding author: GUO Bin, E-mail: guobinbingb@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression of microRNA(miR)-23a, miR-1247-5p in breast cancer tissues, and its relation with the clinicopathological characteristics and prognosis of patients. Methods Breast cancer and adjacent tissue samples were collected from 150 patients who underwent surgical resection in Kunshan Second People's Hospital from January 2012 to December 2013. The relative expression of miR-23a and miR-1247-5p in tissue samples were detected by the real-time RT-PCR (qRT-PCR) assay. Univariate analysis was performed to examine the relationship between the expression of miR-23a, miR-1247-5p and the clinicopathological characteristics of patients. Kaplan Meier survival curve was used to analyze the postoperative survival of patients. ROC curve was applied to determine the prognostic value of miR-23a and miR-1247-5p for breast cancer patients. Results Compared to the adjacent normal tissues, the relative expression of miR-23a was increased, miR-1247-5p was decreased in the breast cancer tissues(all $P < 0.05$). The miR-23a expression in the breast cancer tissues was correlated with tumor diameter, molecular subtype, lymph node metastasis and TNM stage. The miR-1247-5p expression was correlated with histopathological classification, molecular subtype, lymph node metastasis and TNM stage of breast cancer(all $P < 0.05$). The overall 5-year survival rate and median survival time of patients with high expression of miR-23a and low expression of miR-1247-5p were lower than those of patients with low expression of miR-23a and high expression of miR-1247-5p(all $P < 0.05$).

DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2020.42.23.2020-2793

基金项目:江苏省自然科学基金青年科技人才专项(BK20162360)

作者单位:215300 江苏,昆山市第二人民医院甲乳外科

通信作者:郭斌,E-mail:guobinbingb@163.com

$P < 0.05$). The area under the curve (AUC) of miR-23a and miR-1247-5p for prognosis of breast cancer were 0.709 (95%CI: 0.625–0.793), 0.690(95%CI:0.606–0.775), with the sensitivity of 0.812, 0.749, and specificity of 0.637, 0.622, respectively. **Conclusion** In the breast cancer tissues the expression of miR-23a is increased, the expression of miR-1247-5p is decreased, which are closely correlated with patients prognosis. The detection of mir-23a and mir-1247-5p expression in postoperative breast cancer tissue may have certain clinical value for prognosis prediction.

【Key words】 Breast cancer miR-23a miR-1247-5p Molecular subtype Lymph node metastasis Survival Prognosis

恶性肿瘤是威胁人类健康的第一杀手,已成为全球性的公共卫生问题,每年约有 700 万人死于恶性肿瘤;据统计,2018 年全球约有 210 万女性乳腺癌新发病例,约占女性恶性肿瘤新发病例的 25%^[1]。目前,手术切除是乳腺癌治疗的最有效治疗手段之一,寻找有效的评估患者术后预后的生物靶标是乳腺癌研究领域的热点之一。微小 RNA(microRNA, miR)在调节肿瘤细胞增殖、分化、血管生成、侵袭、化疗耐药等过程中具有重要作用。目前已发现,乳腺癌细胞中存在多种异常表达的 miR 发挥调节功能,如 miR-424 抑制乳腺癌细胞增殖^[2], miR-1297 促进乳腺癌细胞侵袭^[3]。朱丽华等^[4]研究发现 miR-23a 检测有助于胃癌诊断、预后判断, Eissa 等^[5]证实 miR-23a 在乳腺癌中发挥促癌基因作用,并可通过直接激活癌基因叉头蛋白 M1(forkhead box M1, FOXM1)和富组氨酸糖蛋白(histidine rich glyco, HRG)基因表达,诱导乳腺癌恶性进展。miR-1247-5p 是近年来新发现的 miR,其在肝细胞癌中发挥抑癌基因功能^[6],而 miR-1247-5p 在乳腺癌的相关研究甚少。鉴于此,本研究通过检测乳腺癌组织中 miR-23a、miR-1247-5p 的表达水平,探讨其表达与患者临床病理特征、术后预后的关系,现报道如下。

1 对象和方法

1.1 对象 选取 2012 年 1 月至 2013 年 12 月在昆山市第二人民医院行乳腺切除手术的 150 例乳腺癌患者为研究对象,均为女性,年龄 26~73(54.36±9.78)岁。纳入标准:(1)具有完整的病历资料和随访资料;(2)术前未经抗肿瘤治疗。排除标准:(1)合并其他恶性肿瘤;(2)合并糖尿病等慢性疾病;(3)合并血液系统疾病或免疫系统疾病。收集患者手术切除的乳腺癌组织及配对的癌旁正常组织样本用于 miR-23a、miR-1247-5p 表达水平检测。

1.2 方法 采用实时荧光定量 PCR(real-time PCR, RT-PCR)法检测乳腺癌组织与癌旁正常组织 miR-23a、miR-1247-5p 表达水平。取 50~100 mg 组织样本、1 ml Trizol 试剂,加入至电动匀浆器,匀浆约 2 min,转移匀

浆液至 EP 管中,依次加入氯仿、异丙醇、乙醇,抽提组织样本总 RNA, RNase-free ddH₂O 溶解后,测定 RNA 纯度及浓度后,逆转录为 cDNA, -20 ℃冰箱中保存备用。参照 SYBR Premix EX Taq™ 试剂盒(大连生物工程有 限 公 司) 说 明 书, 配 制 RT-PCR 反 应 体 系, miR-23a、miR-1247-5p 和 U6 引物(上海生工生物工程有限公司)序列如下:miR-23a 正向引物为 5'-GGG GAT CAC ATT GCC AGG-3',反向引物为 5'-AGT GCG TGT CGT GGA GTC-3';miR-1247-5p 正向引物为 5'-ACA CTC CAG CTG GGA CCC GTC CCG TTC GTC C-3',反向引物为 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC G-3';U6 正向引物为 5'-CTT CGG CAG CAC ATA TAC TAA AAT-3',反向引物为 5'-CGC TTC ACG AAT TTG CGT GTC AT-3'。RT-PCR 反应条件如下,预变性:95 ℃, 10 min;40 个循环:95 ℃, 15 s;57 ℃, 30 s;72 ℃, 30 s。实验结果以循环数(cycle threshold, Ct)值表示,U6 为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 公式计算 miR-23a、miR-1247-5p 相对表达水平。

1.3 观察指标 (1)比较乳腺癌组织与癌旁正常组织 miR-23a、miR-1247-5p 表达水平;(2)分析乳腺癌组织 miR-23a、miR-1247-5p 表达水平与患者临床病理特征、预后的关系,及对患者预后的预测价值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析,两组比较采用两独立样本 t 检验。采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,两组患者生存曲线的比较采用 log-rank 检验。采用 ROC 曲线分析 miR-23a、miR-1247-5p 对乳腺癌患者预后的预测价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计意义。

2 结果

2.1 乳腺癌组织与癌旁正常组织 miR-23a、miR-1247-5p 表达水平比较 乳腺癌组织 miR-23a 表达水平高于癌旁正常组织,miR-1247-5p 表达水平低于癌旁正常组织,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),见表 1。

2.2 乳腺癌组织 miR-23a、miR-1247-5p 表达水平与患者临床病理特征的关系分析 乳腺癌组织 miR-23a

表 1 乳腺癌组织与癌旁正常组织 miR-23a、miR-1247-5p 表达水平比较

组别	n	miR-23a	miR-1247-5p
乳腺癌组织	150	1.67 ± 0.41	0.42 ± 0.13
癌旁正常组织	150	1.16 ± 0.20	1.45 ± 0.520
t 值		13.423	-23.554
P 值		0.000	0.000

表达水平与患者年龄、绝经状态、肿瘤部位、组织病理分级无关(均 $P > 0.05$),与肿瘤直径、分子分型、淋巴结转移、TNM 分期有关(均 $P < 0.05$)。乳腺癌组织 miR-1247-5p 表达水平与患者年龄、绝经状态、肿瘤部位、肿瘤直径无关(均 $P > 0.05$),与组织病理分级、分子分型、淋巴结转移、TNM 分期有关(均 $P < 0.05$),见表 2。

2.3 乳腺癌组织 miR-23a、miR-1247-5p 表达水平与患者预后的关系分析 以乳腺癌组织 miR-23a 表达水平的中位数(1.58)为界,将乳腺癌患者分为 miR-23a 高表达组(74 例)和 miR-23a 低表达组(76 例)。生存曲线分析显示,miR-23a 低表达组患者的术后 5 年生存率为 72.97%(54/74)、中位生存时间 53.85 个月,均分别高于

miR-23a 高表达组患者的 46.05%(35/76)、42.58 个月,差异有统计学意义(log-rank $\chi^2=13.302, P < 0.05$)。以乳腺癌组织中 miR-1247-5p 表达水平的中位数(0.42)为界,将乳腺癌患者分为 miR-1247-5p 低表达组(76 例)和 miR-1247-5p 高表达组(74 例)。生存曲线分析显示,miR-1247-5p 高表达组患者术后 5 年生存率 73.68%(56/76)、中位生存时间 52.54 个月,均分别高于 miR-1247-5p 低表达组患者的 44.59%(33/74)、43.62 个月,差异有统计学意义(log-rank $\chi^2=12.650, P < 0.05$)。乳腺癌组织 miR-23a、miR-1247-5p 表达水平与患者预后的生存曲线见图 1。

2.4 乳腺癌组织 miR-23a、miR-1247-5p 表达水平对患者预后的预测价值分析 以术后 5 年存活的患者为阳性样本(89 例),以术后 5 年死亡的患者为阴性样本(61 例),建立 ROC 诊断分析模型。结果显示:检测 miR-23a、miR-1247-5p 对乳腺癌患者预后预测的 AUC 分别为 0.709(95%CI:0.625~0.793)、0.690(95%CI:0.606~0.775),灵敏度分别为 0.812、0.749,特异度分别为 0.637、0.622,见图 2、表 3。

表 2 乳腺癌组织 miR-23a、miR-1247-5p 表达水平与患者临床病理特征的关系分析

临床病理特征	n	miR-23a 表达水平	t/F 值	P 值	miR-1247-5p 表达水平	t/F 值	P 值
年龄							
<50 岁	57	1.66 ± 0.42	-0.113	0.455	0.43 ± 0.13	0.283	0.389
≥50 岁	93	1.67 ± 0.42			0.42 ± 0.12		
绝经状态							
是	84	1.66 ± 0.41	-0.265	0.395	0.44 ± 0.13	1.285	0.100
否	66	1.68 ± 0.42			0.41 ± 0.12		
肿瘤部位							
外上	52	1.67 ± 0.42	0.111	0.456	0.42 ± 0.12	-0.409	0.342
其他	98	1.66 ± 0.42			0.43 ± 0.13		
肿瘤直径							
<3 cm	69	1.56 ± 0.40	-2.790	0.003	0.43 ± 0.13	0.650	0.283
≥3 cm	81	1.76 ± 0.43			0.42 ± 0.11		
组织病理分级							
G3	52	1.67 ± 0.42	0.042	0.483	0.39 ± 0.11	-1.888	0.030
G1/G2	98	1.67 ± 0.41			0.44 ± 0.14		
分子分型							
Lumina A/B 型	97	1.73 ± 0.43	10.161	0.000	0.44 ± 0.13	4.266	0.016
人类表皮生长因子 2 过表达型	41	1.67 ± 0.41			0.41 ± 0.13		
基底细胞型	12	1.14 ± 0.39			0.33 ± 0.12		
淋巴结转移							
有	71	1.84 ± 0.44	4.911	0.000	0.405 ± 0.113	-1.776	0.039
无	79	1.51 ± 0.39			0.441 ± 0.133		
TNM 分期							
I ~ II	95	1.74 ± 0.43	2.920	0.002	0.45 ± 0.13	2.911	0.002
III	55	1.54 ± 0.40			0.38 ± 0.11		

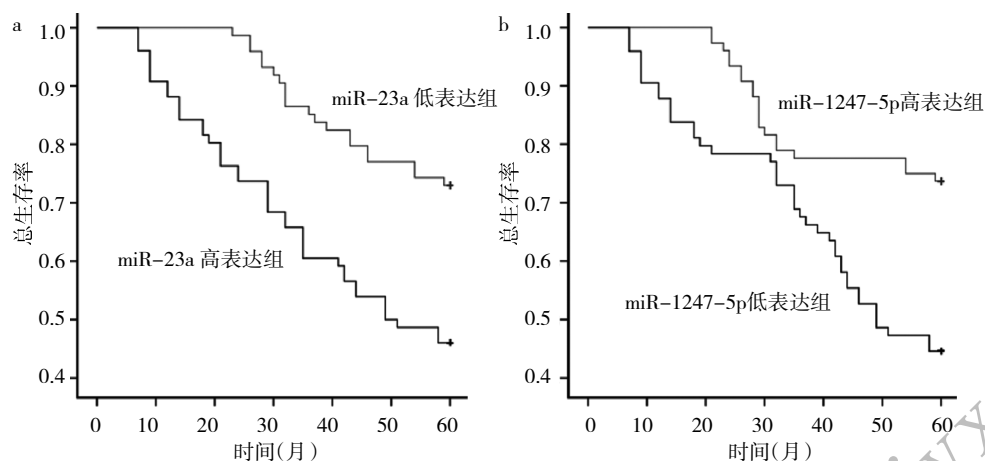


图 1 不同乳腺癌组织 miR-23a、miR-1247-5p 表达水平患者生存曲线比较

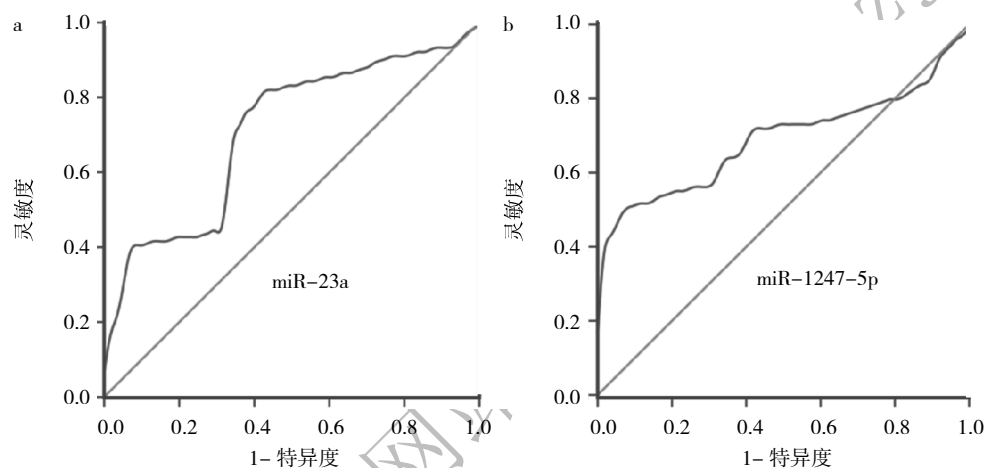


图 2 乳腺癌组织 miR-23a、miR-1247-5p 对患者预后预测价值的 ROC 曲线

表 3 乳腺癌组织 miR-23a、miR-1247-5p 对患者预后预测价值的 ROC 分析结果

检测指标	AUC	95%CI	理论阈值	灵敏度	特异度	约登指数
miR-23a	0.709	0.625~0.793	0.316	0.812	0.637	0.449
miR-1247-5p	0.690	0.606~0.775	0.460	0.749	0.622	0.371

3 讨论

乳腺癌是源于乳腺上皮组织的恶性肿瘤,原位乳腺癌患者经手术后的预后良好,但突破乳腺基底膜并伴有淋巴结转移或远处转移的乳腺癌患者,经手术后的预后情况难以预估。寻找有效的评估乳腺癌患者术后预后的生物学靶标成为乳腺癌研究领域的热点之一。大量研究证实,淋巴结转移、远处转移、TNM 分期、病理分级及分子分型等均与乳腺癌患者术后预后有关^[7-8],但上述指标对患者无法进行个体化地预测、评估预后。近年来分子生物学发展迅猛,大量 miR 分子被证实预测、评估恶性肿瘤患者预后中具有靶分子的潜能。研

究表明,miR-23a 在不同的恶性肿瘤中的表达情况不一致,如在骨肉瘤^[9]、恶性胶质瘤^[10]中表达降低,而在非小细胞肺癌^[11]、结直肠癌^[12]中表达增加,表明 miR-23a 同时具有抑癌和促癌基因功能。

本研究 RT-PCR 结果显示,与癌旁正常组织相比,乳腺癌组织中 miR-23a 表达水平增加,提示 miR-23a 可能在乳腺癌变过程中发挥促癌基因作用;Chen 等^[13]发现 Lumina 乳腺癌细胞中,miR-23a 调节 X 连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein,XIAP)介导的细胞自噬过程,促进细胞存活和侵袭。Ma 等^[14]证实 miR-23a 通过直接靶向调节 CDH1 基因表达和激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,促进乳腺癌细胞中转化生长因子 β 1(transforming growth factor β 1,TGF- β 1)诱导的上皮-间质转化(epithelial mesenchymal transitions,EMT)和肿瘤侵袭过程,本研究发现 miR-23a 表达与乳腺癌的肿瘤直径、分子分型、淋巴结转移、TNM 分期有关,表明 miR-23a 可能在乳腺癌细胞增殖、雌激素受体/孕激素受体/人类表皮生长因子受体 2 分子表达、EMT 等病理过程发

挥作用。

有研究表明,miR-1247-5p 在皮肤鳞状细胞癌增殖、侵袭过程中发挥抑癌基因作用^[15],而 miR-1247-5p 在去势耐药前列腺癌中表达增加,发挥促癌基因功能^[16]。本研究发现 miR-1247-5p 表达降低,且其表达与组织病理分级、分子分型、淋巴结转移、TNM 分期有关,初步表明 miR-1247-5p 在乳腺癌中发挥抑癌基因作用,且可能参与乳腺癌细胞分化、增殖及转移等过程。Zhang 等^[17]研究结果表明,乳腺癌中 miR-1247-5p 低表达与较高 TNM 分期、淋巴结转移、不良病理分化和分子分型有关,且被证实可能是通过 DVL1/Wnt/ β -catenin 信号通路调节肿瘤细胞增殖^[18],与本研究结论一致。

本研究生存曲线分析显示,与 miR-23a 低表达、miR-1247-5p 高表达患者相比,miR-23a 高表达、miR-1247-5p 低表达患者的术后预后较差。Zeng 等^[18]发现 miR-1247-5p 低表达与乳腺癌患者不良预后有关,Ahmad 等^[19]发现 miR-23a~27a~24-2 基因簇与乳腺癌患者预后有关。此外,ROC 曲线分析显示,乳腺癌组织 miR-23a、miR-1247-5p 表达水平对患者预后预测的灵敏度、特异度均较高,提示 miR-23a、miR-1247-5p 表达水平检测在乳腺癌预后判断中具有较好的临床应用价值。

综上所述,乳腺癌组织 miR-23a 表达上调,miR-1247-5p 表达下调,且均可能在乳腺癌细胞的增殖、分化、侵袭等过程中发挥调节功能,检测该两指标有助于预测患者术后预后。

4 参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1):7-30. DOI: 10.3322/caac.21442.
- [2] 李自涛, 马志军, 刘震, 等. miR-424 在乳腺癌中的表达及与临床病理特征之间的关系[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(21):5213-5216. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2019.21.022.
- [3] 赵雪云, 李远平, 张英毅, 等. miR-1297 通过下调 TET3 促进乳腺癌 MCF-7 细胞的恶性生物学行为[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(10):1142-1147. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2019.10.014.
- [4] 朱丽华, 李盖, 刘爱华, 等. 胃癌癌细胞中 miR-23a 靶基因 PPP2R5E 的鉴定[J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(5):1-7. DOI:10.3969/j.issn.1005-8982.2015.05.001.
- [5] Eissa S, Matboli M, Shehata HH. Breast tissue-based microRNA panel highlights microRNA-23a and selected target genes as putative biomarkers for breast cancer[J]. Transl Res, 2015, 165(3): 417-427. DOI:10.1016/j.trsl.2014.10.001.
- [6] Chu Y, Fan W, Guo W, et al. miR-1247-5p functions as a tumor suppressor in human hepatocellular carcinoma by targeting Wnt3 [J]. Oncol Rep, 2017, 38(1):343-351. DOI:10.3892/or.2017.5702.
- [7] Hong J, Kim Y, Cho J, et al. Clinical features and prognosis of breast cancer with gastric metastasis[J]. Oncol Lett, 2019, 17(2): 1833-1841. DOI:10.3892/ol.2018.9754.
- [8] 张思明, 李洪胜, 柳玉梅, 等. E-钙粘蛋白和 S100 钙结合蛋白 A4 在乳腺癌组织中的表达及其与病理特征的关系[J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(22):4308-4311. DOI:10.13241/j.cnki.pmb.2018.22.024.
- [9] Wang G, Li B, Fu Y, et al. miR-23a suppresses proliferation of osteosarcoma cells by targeting SATB1[J]. Tumour Biol, 2015, 36(6): 4715-4721. DOI:10.1007/s13277-015-3120-0.
- [10] 张凤江, 周金桥, 赵新炜, 等. 微小 RNA-23a 在恶性胶质瘤患者血清和肿瘤组织表达及其调控 ATP5A1 基因表达的作用[J]. 中华实验外科杂志, 2017, 34(5):793-796. DOI:10.3760/cmaj.issn.1001-9030.2017.05.023.
- [11] 郝艳萍, 王光. 非小细胞肺癌患者血浆 miR-499 与 miR-23a 表达及其检测意义[J]. 临床肺科杂志, 2018, 23(2):199-202. DOI:10.3969/j.issn.1009-6663.2018.02.002.
- [12] Tang X, Yang M, Wang Z, et al. MicroRNA-23a promotes colorectal cancer cell migration and proliferation by targeting at MARK1[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2019, 51(7):661-668. DOI: 10.1093/abbs/gmz047.
- [13] Chen P, He YH, Huang X, et al. MiR-23a modulates X-linked inhibitor of apoptosis-mediated autophagy in human luminal breast cancer cell lines[J]. Oncotarget, 2017, 8(46):80709-80721. DOI:10.18632/oncotarget.21080.
- [14] Ma F, Li W, Liu C, et al. MiR-23a promotes TGF- β 1-induced EMT and tumor metastasis in breast cancer cells by directly targeting CDH1 and activating Wnt/ β -catenin signaling[J]. Oncotarget, 2017, 8(41):69538-69550. DOI:10.18632/oncotarget.18422.
- [15] An X, Liu X, Ma G, et al. Upregulated circular RNA circ_0070934 facilitates cutaneous squamous cell carcinoma cell growth and invasion by sponging miR-1238 and miR-1247-5p[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 513(2):380-385. DOI:10.1016/j.bbrc.2019.04.017.
- [16] Scaravilli M, Porkka KP, Brofeldt A, et al. MiR-1247-5p is overexpressed in castration resistant prostate cancer and targets MYCBP2[J]. Prostate, 2015, 75(8):798-805. DOI:10.1002/pros.22961.
- [17] Zhang P, Fan C, Du J, et al. Association of miR-1247-5p expression with clinicopathological parameters and prognosis in breast cancer[J]. Int J Exp Pathol, 2018, 99(4):199-205. DOI: 10.1111/iep.12287.
- [18] Zeng B, Li Y, Feng Y, et al. Downregulated miR-1247-5p associates with poor prognosis and facilitates tumor cell growth via DVL1/Wnt/ β -catenin signaling in breast cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 505(1):302-308. DOI:10.1016/j.bbrc.2018.09.103.
- [19] Ahmad M, Shah AA. Functional polymorphism within miR-23a 27a 24-2 cluster confers clinical outcome of breast cancer in Pakistani cohort[J]. Per Med, 2019, 16(2):107-114. DOI:10.2217/pme-2018-0059.

(收稿日期:2020-07-09)

(本文编辑:李媚)