

· 论著 ·

miR-934在乳腺癌组织中的表达及临床意义*

林 慧* 陈佳菁 张冲冲 邱建龙

中国人民解放军联勤保障部队第九一〇医院病理科 (福建 泉州 362000)

【摘要】目的 探讨miR-934在乳腺癌组织中的表达及其与临床病理特征、预后的关系。方法 选择68例行手术切除的乳腺癌患者作为研究对象,通过实时荧光定量PCR检测miR-934在乳腺癌和癌旁组织中的表达量,分析其与患者临床病理特征的关系。使用Kaplan-Meier Plotter数据库分析miR-934表达对患者生存率的影响。通过ENCORI数据库预测miR-934的靶基因,通过string数据库分析蛋白互作关系,数据导入Cytoscape软件筛选关键靶基因。结果 miR-934的表达在乳腺癌中显著上调,表达水平与肿瘤组织学级别、大小、雌激素受体状态 and Ki67增殖指数有关($P<0.05$),与年龄、淋巴结转移、孕激素受体状态、人表皮生长因子受体2状态无关($P>0.05$)。miR-934在三阴性乳腺癌中的表达水平显著高于管腔型($P<0.05$)。生存分析结果显示,miR-934高表达组总生存率显著低于低表达组($P<0.05$)。通过生物信息学分析筛选出ESR1、PUM2、XIAP、XBP1等关键靶点。结论 miR-934在乳腺癌组织中高表达,与肿瘤进展密切相关。在三阴性和管腔型乳腺癌中miR-934的表达水平存在显著差异,调控ESR1及相关基因的表达可能是重要的作用机制。

【关键词】miR-934; 乳腺癌; 生物信息学; 分子亚型; 预后

【中图分类号】R737.9

【文献标识码】A

【基金项目】泉州市科技计划项目(2018N132S)

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2023.04.015

Expression and Clinical Significance of miR-934 in Breast Cancer*

LIN Hui*, CHEN Jia-jing, ZHANG Chong-chong, QIU Jian-long.

Department of pathology, The 910th Hospital of Chinese People's Liberation Army Joint Logistic Support Force, Quanzhou 362000, Fujian Province, China

Abstract: *Objective* To investigate the expression of miR-934 in breast cancer and its relationship with clinicopathological features and prognosis. *Methods* A total of 68 patients with breast cancer who underwent surgical resection were selected as research objects. The relative expression of miR-934 in breast cancer and adjacent tissues was detected by real-time fluorescent quantitative PCR, and the relationship between its expression level and the clinicopathological characteristics of patients was analyzed. The Kaplan-Meier Plotter database was used to analyze the impact of miR-934 expression on patient survival. Target genes were predicted through ENCORI database, the encoded protein interaction network was analyzed using string database, and the data were imported into Cytoscape software to screen the key target genes. *Results* The expression of miR-934 was significantly up-regulated in breast cancer. The expression level was related to tumor histological grade, size, estrogen receptor status and Ki67 proliferation index ($P < 0.05$), but not related to patient age, lymph node metastasis, status of progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 ($P > 0.05$). The expression of miR-934 in triple negative breast cancer was significantly higher than luminal type ($P < 0.05$). Survival analysis revealed that the overall survival rate in high expression group of miR-934 was significantly lower than that in low expression group ($P < 0.05$). Key targets such as ESR1, PUM2, XIAP and XBP1 were selected through bioinformatics analysis. *Conclusion* Expression of miR-934 is upregulated in breast cancer, closely related to tumor progression. It is significantly different in the expression of miR-934 between triple negative and luminal breast cancer. Regulating the expression of ESR1 and related genes may be an important mechanism.

Keywords: MiR-934; Breast Cancer; Bioinformatics; Molecular Subtype; Prognosis

乳腺癌近年来成为世界范围内新发病例数最多的癌症,统计资料显示2020年全球新增近230万例,与其相关的死亡约68.5万例^[1]。随着对乳腺癌生物学行为和分子特征的深入认识,靶向治疗、免疫治疗等新疗法在临床上广泛应用,有效改善患者的预后,但复发转移、药物耐药仍是导致死亡的重要原因。作为肿瘤异质性的体现,不同分子特征的乳腺癌往往具有不同的临床进展和药物治疗反应,雌激素受体(estrogen receptor, ER)和/或孕激素受体(progesterone receptor, PR)的表达状态与内分泌治疗敏感性有关,而人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)基因的扩增和过表达既能提示预后,同时也是抗HER2疗效的预测指标^[2]。了解不同分子亚型乳腺癌内在机制的差异,有助于制定更精准的分类方法和治疗方案。微小RNA是一类约22nt、在转录后水平调控基因表达的非编码RNA,广泛参与正常生理过程和恶性肿瘤发生发展过程,其在癌症分子分型、预后提示、治疗靶点等方面的应用价值也备受瞩目^[3]。少量研究显示miR-934在结直肠癌、胰腺癌、卵巢癌中过表达,可促进肿瘤细胞的恶性进展,与预后不良显著相关^[4-6]。miR-934在乳腺癌中也可发挥致瘤作用,但相关的研究报道数量有限,调控机制尚未完全阐明^[7]。本研究通过分析miR-934的表

达与乳腺癌患者临床病理特征的关系,并采用多种生物信息学工具预测其调控网络,初步探索miR-934在乳腺癌进展过程中可能的作用机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2018年1月至2021年12月本院收治的68例乳腺癌患者作为研究对象。研究经医院医学伦理委员会批准,患者或监护人知情同意。

纳入标准:手术切除后经病理诊断为非特殊类型浸润性癌;有完整的临床病理资料;经免疫组化检测ER、PR、HER2和Ki67蛋白的表达。排除标准:复发病例;行新辅助治疗;双侧或多灶性乳腺癌。患者均为女性,发病年龄27~79岁,肿瘤直径1.2~6.0cm,分子亚型:管腔型乳腺癌37例、HER2过表达型乳腺癌15例、三阴性乳腺癌16例。

1.2 方法

1.2.1 提取RNA 将乳腺癌和癌旁组织的石蜡包埋样本以10μm厚度切片,按miRNA提取试剂盒(购自天根生物公司,DP502)的操作指南提取RNA,浓度和纯度经检测合格后进行下步实验。

1.2.2 实时荧光定量PCR检测 逆转录采用茎环法,miR-934

【第一作者】林 慧,男,主治医师,主要研究方向:肿瘤病理诊断与研究。E-mail: 3197308518@qq.com

【通讯作者】林 慧

逆转录引物序列: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTA
TTCGCACTGGATACGACCCAGTGTG。逆转录后配制PCR扩
增体系: 模板cDNA 5 μ l、引物各0.5 μ l、qPCR SYBR Green
Master Mix 10 μ l、H₂O 4 μ l, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5min;
95 $^{\circ}$ C 10s、60 $^{\circ}$ C 20s、72 $^{\circ}$ C 20s, 循环40次。miR-934上
游引物: TGTCTACTACTGGAGACACTGGGT, 下游引物:
CAGTGCAGGGTCCGAGGTAT。以U6作为内参照, 使用2- $\Delta\Delta$ Ct法
进行相对定量。

1.2.3 生存分析 通过Kaplan-Meier Plotter数据库(<https://kmplot.com/analysis/>)进行在线生存分析, 选择METABRIC预后数据, 比较miR-934表达与不同ER状态乳腺癌患者总生存率的关系。

1.2.4 靶基因预测和编码蛋白互作网络分析 通过ENCORI网站(<https://starbase.sysu.edu.cn/index.php>)进行miR-934靶基因预测, 选择与miRmap和microT数据库共同的预测结果作为靶基因集合。使用string数据库(<https://cn.string-db.org/>)对编码蛋白进行相互作用网络分析, 并将结果导入Cytoscape软件进行可视化, 使用Network Analyzer工具筛选关键靶基因。

1.3 统计学方法 使用SPSS 26.0软件行统计分析, 计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较使用配对t检验, 计数资料以例(%)表示, 进行 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌和癌旁正常组织miR-934表达水平比较 乳腺癌组织中miR-934表达量为 1.21 ± 0.45 , 明显高于癌旁组织, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 见表1。

2.2 miR-934表达水平与患者临床病理特征的关系 以miR-934表达量的平均值为标准, 将68例样本分为高、低表达两组。结果显示miR-934高表达组的肿瘤组织学级别、肿瘤大小、ER表达状态、Ki67增殖指数与低表达组比较, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); miR-934表达水平在患者年龄、淋巴结是否转移、PR和HER2状态间的比较, 均无统计学意义($P > 0.05$)。miR-934表达水平在乳腺癌不同分子亚型之间具有显著差异($P < 0.05$), 两两比较结果显示三阴性乳腺癌的表达水平显著高于管腔型($P < 0.05$), 与HER2过表达型比较则无显著差异($P > 0.05$)。见表2。

2.3 miR-934表达水平与乳腺癌患者预后的关系 生存分析结果显示, 在全部乳腺癌患者和ER阳性病例中, miR-934高表达组的总生存率均显著低于低表达组($P < 0.05$), 但在ER阴性病例中的差异不具有统计学意义($P > 0.05$), 见图1。

2.4 靶基因预测和编码蛋白互作网络分析 通过数据库筛选出115个靶基因, 上传至string数据库构建蛋白互作网络, 数据导入Cytoscape软件后, 以接近中心性参数为标准, 筛选出雌激素受体1(estrogen receptor 1, ESR1)、pumilio RNA结合家族成员2(pumilio RNA binding family member 2, PUM2)、X连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)、X盒结合蛋白1(X-box binding protein 1, XBP1)等关键靶点, 见图2。

表1 乳腺癌组织与癌旁正常组织miR-934表达水平比较

组别	n	miR-934表达水平	t值	P值
乳腺癌组织	68	1.21 ± 0.45	4.290	0.000
癌旁正常组织	68	1.02 ± 0.23		

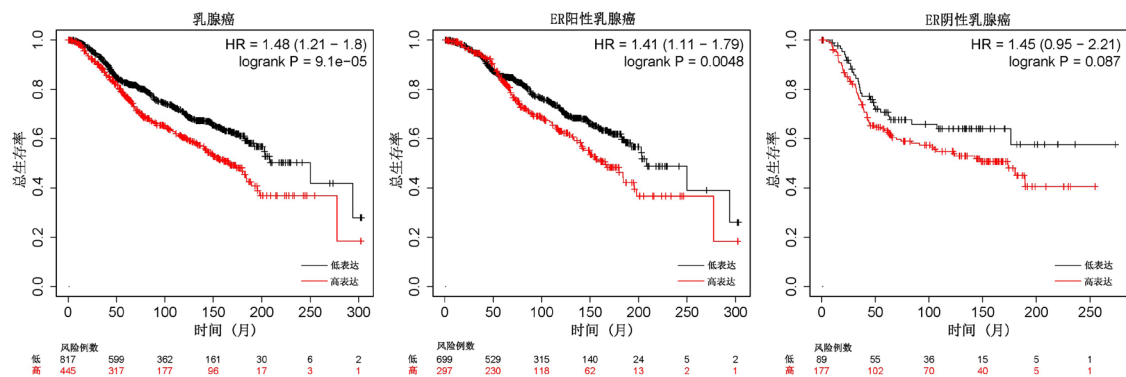


图1 miR-934表达水平与乳腺癌患者预后的关系

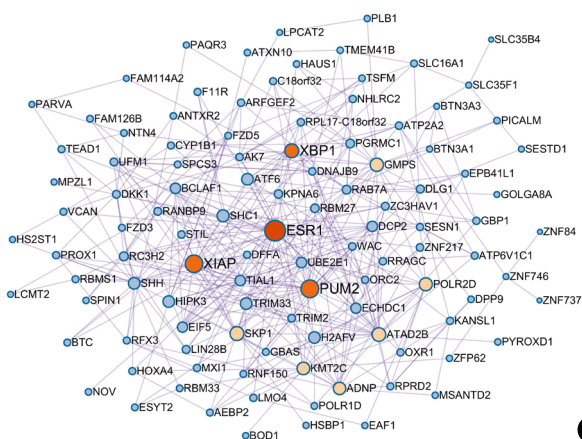


图2 编码蛋白互作网络分析结果

3 讨论

miR-934定位于X染色体VGLL1(vestigial like family member 1)基因的第4内含子区, 在多种恶性肿瘤中发挥致癌作用, 其表达与病理状态密切相关^[8]。miR-934在卵巢癌细胞中的表达水平升高, 下调后明显抑制癌细胞增殖, 并诱导细胞凋亡^[6]。在结直肠癌中, miR-934可通过多个靶点促进癌细胞的增殖、迁移、侵袭和血管生成^[4, 9]。在胰腺导管腺癌中, miR-934可作为预后标志物, 过表达提示预后不良^[10]。本研究结果显示, miR-934在乳腺癌组织中的表达显著高于癌旁组织, 并与肿瘤组织学级别、大小和Ki67增殖指数有关, 在高级别、体积大、增殖指数高的乳腺癌中表达显著上调, 说明miR-934的功能与乳腺癌细胞增殖有关, 并在肿瘤进展中可发挥促癌作用。生存分析结果显示miR-934高表达的乳腺癌患者总体预后较差。Lu等^[7]研究发现下调miR-934的表达可显著抑制乳腺癌细胞的迁移能力和侵袭性, 并证实PTEN是其直接靶点, 通过激活下游PI3K/AKT/mTOR信号通路从而诱导上皮-间充质转化可能是重要的作用机制。

进一步比较miR-934的表达在不同分子亚型乳腺癌之间的差异, 结果发现三阴性乳腺癌的表达水平显著高于管腔型。管腔型

表2 miR-934表达水平与乳腺癌患者临床病理特征的关系 [n(%)]

组别		n	miR-934表达		χ ² 值	P值
			低	高		
年龄(岁)	≤50	40	18(45.00)	22(55.00)	0.971	0.324
	>50	28	16(57.14)	12(42.86)		
组织学级别	1级、2级	28	18(64.29)	10(35.71)	3.886	0.049
	3级	40	16(40.00)	24(60.00)		
肿瘤大小(cm)	≤2	24	17(70.83)	7(29.17)	6.439	0.011
	>2	44	17(38.64)	27(61.36)		
淋巴结转移	阴性	29	16(55.17)	13(44.83)	0.541	0.462
	阳性	39	18(46.15)	21(53.85)		
分子亚型	管腔型	37	23(62.16)	14(37.84)	8.506	0.014
	HER2过表达型	15	8(53.33)	7(46.67)		
	三阴性	16	3(18.75)	13(81.25)		
ER表达	阴性	37	23(62.16)	14(37.84)	4.802	0.028
	阳性	31	11(35.48)	20(64.52)		
PR表达	阴性	46	20(43.48)	26(56.52)	2.419	0.120
	阳性	22	14(63.64)	8(36.36)		
HER2表达	阴性	42	20(47.62)	22(52.38)	0.249	0.618
	阳性	26	14(53.85)	12(46.15)		
Ki67指数(%)	≤20	23	16(69.57)	7(30.43)	5.322	0.021
	>20	45	18(40.00)	27(60.00)		

乳腺癌以表达ER/PR为主要特征,三阴性乳腺癌不表达ER、PR和HER2蛋白,统计结果显示miR-934在ER阳性乳腺癌患者中的表达水平显著低于ER阴性患者,而与PR、HER2表达状态无关。Castilla等^[11]证实miR-934与VGLL1基因的表达显著相关,均在三阴性乳腺癌中上调,可能协同参与乳腺癌管腔前体细胞表型的维持。

靶基因预测结果显示miR-934可能直接调控ESR1、XBP1、PUM2、XIAP等基因的表达。ESR1编码雌激素受体 α 亚型,作为一种重要的转录因子,是管腔型乳腺癌发生发展的关键驱动基因^[12]。XBP1的表达水平与ER显著相关,在管腔亚型中表达水平高于正常组织和三阴性乳腺癌,高表达提示预后较好^[13]。既往研究表明XBP1是未折叠蛋白反应和ER信号通路的关键组成部分,在受到雌激素刺激时,ER可结合至XBP1基因增强子区,加强启动子活性导致XBP1表达增加,XBP1蛋白与ER形成复合体,在乳腺癌细胞中可增强ER不依赖于雌激素的转录活性,从而促进癌细胞的生长^[14]。在三阴性乳腺癌细胞中XBP1也可被激活,通过HIF1 α 信号通路参与驱动缺氧条件下肿瘤的血管生成和进展^[15]。本研究生存分析结果显示miR-934的表达水平可显著影响ER阳性乳腺癌患者的预后,说明除了ER信号通路,miR-934还通过其他信号通路参与肿瘤的发展过程。

PUM2是一种翻译调节因子,与正常乳腺组织和细胞相比,其在管腔A型和三阴性乳腺癌中表达均显著下调,在乳腺癌MCF-7和MDA-MB-231细胞中上调表达后,可以观察到细胞的恶性生物学行为受到了明显的抑制,PUM2在乳腺癌中所起的抑癌作用可能与PI3K/AKT信号通路有关^[16]。凋亡抑制蛋白XIAP通过结合和抑制天冬氨酸蛋白酶调控细胞死亡信号通路,是细胞凋亡、自噬和坏死的主要调控因子^[17]。Devi等^[18]对2341例乳腺癌进行回顾性分析,发现XIAP mRNA的表达存在明显异质性,在年轻患者、组织学低级别、激素受体阳性、管腔B型、淋巴结转移的乳腺癌中表达水平更高,XIAP高表达的管腔型乳腺癌患者无病生存期显著缩短,临床病理特征与预后存在的矛盾可能与其复杂的调控机制有关。

综上所述,miR-934与乳腺癌的进展密切相关,其表达水平在三阴性和管腔型乳腺癌中存在显著差异,调控ESR1及相关基因的表达可能是重要的作用机制。本研究对数个关键靶点在乳腺癌中的作用进行了初步探讨,但具体的机制仍需实验进一步阐明。

参考文献

- [1] Karami Fath M, Azargoonjahromi A, Kiani A, et al. The role of epigenetic modifications in drug resistance and treatment of breast cancer[J]. Cell Mol Biol Lett, 2022, 27(1): 52-76.
- [2] 练斌, 洪朝寅, 余锦婕, 等. 广西地区不同分子分型乳腺癌的临床病理特征及预后研究[J]. 实用医学杂志, 2021, 37(22): 2928-2933.

- [3] Zhao S, Mi Y, Guan B, et al. Tumor-derived exosomal miR-934 induces macrophage M2 polarization to promote liver metastasis of colorectal cancer[J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 156-174.
- [4] Li B, Liu X, Wu G, et al. MicroRNA-934 facilitates cell proliferation, migration, invasion and angiogenesis in colorectal cancer by targeting B-cell translocation gene 2[J]. Bioengineered, 2021, 12(2): 9507-9519.
- [5] Gong X, Liu Y, Zheng C, et al. Establishment of a 4-miRNA Prognostic Model for Risk Stratification of Patients With Pancreatic Adenocarcinoma[J]. Front Oncol, 2022, 12(2): 1-16.
- [6] Hu Y, Zhang Q, Cui J, et al. Oncogene miR-934 promotes ovarian cancer cell proliferation and inhibits cell apoptosis through targeting BRMS1L[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(13): 5595-5602.
- [7] Lu Y, Hu X, Yang X. miR-934 promotes breast cancer metastasis by regulation of PTEN and epithelial-mesenchymal transition[J]. Tissue Cell, 2021, 71: 1581-1591.
- [8] Ju L, Han M, Li X, et al. MicroRNA Signature of Lung Adenocarcinoma with EGFR Exon 19 Deletion[J]. J Cancer, 2017, 8(7): 1311-1318.
- [9] Liu W, Ma L, Zhang J. MicroRNA-934 promotes colorectal cancer cell proliferation by directly targeting Dickkopf-related protein 2[J]. Exp Ther Med, 2021, 22(3): 1041-1048.
- [10] Jin Y, Weng Y, Wang Y, et al. miR-934 as a Prognostic Marker Facilitates Cell Proliferation and Migration of Pancreatic Tumor by Targeting PROX1[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 3389-3399.
- [11] Castilla MA, Lopez-Garcia MA, Atienza MR, et al. VGLL1 expression is associated with a triple-negative basal-like phenotype in breast cancer[J]. Endocr Relat Cancer, 2014, 21(4): 587-599.
- [12] Porras L, Ismail H, Mader S. Positive Regulation of Estrogen Receptor Alpha in Breast Tumorigenesis[J]. Cells, 2021, 10(11): 2966-2990.
- [13] Zhu Z, Zhan H, Sun A, et al. X-box binding protein 1 (XBP1): a potential role in chemotherapy response, clinical pathologic features, non-inflamed tumour microenvironment for breast cancer[J]. Biosci Rep, 2022, 42(6): 1-18.
- [14] Barua D, Gupta A, Gupta S. Targeting the IRE1-XBP1 axis to overcome endocrine resistance in breast cancer: Opportunities and challenges[J]. Cancer Lett, 2020, 486: 29-37.
- [15] Harnoss JM, Le Thomas A, Reichelt M, et al. IRE1 α Disruption in Triple-Negative Breast Cancer Cooperates with Antiangiogenic Therapy by Reversing ER Stress Adaptation and Remodeling the Tumor Microenvironment[J]. Cancer Res, 2020, 80(11): 2368-2379.
- [16] Tao W, Ma J, Zheng J, et al. Silencing SCAMP1-TV2 Inhibited the Malignant Biological Behaviors of Breast Cancer Cells by Interaction With PUM2 to Facilitate INSM1 mRNA Degradation[J]. Front Oncol, 2020, 10: 613-628.
- [17] Tu H, Costa M. XIAP's Profile in Human Cancer[J]. Biomolecules, 2020, 10(11): 1493-1507.
- [18] Devi GR, Finetti P, Morse MA, et al. Expression of X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) in Breast Cancer Is Associated with Shorter Survival and Resistance to Chemotherapy[J]. Cancers (Basel), 2021, 13(11): 2807-2819.

(收稿日期: 2022-07-15)
(校对编辑: 孙晓晴)