

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.23.054

他莫昔芬辅助治疗的 ER 阳性乳腺癌患者 miR-122、miR-449a 检测的临床价值研究*

范丽莉^{1,2} 许文林^{1,3Δ} 彭金娟² 李丽² 陶凯²

(1 江苏大学医学院 江苏 镇江 212013; 2 江苏大学第四附属医院乳腺科 江苏 镇江 212050;

3 江苏大学第四附属医院中心实验室 江苏 镇江 212050)

摘要 目的: 分析他莫昔芬辅助治疗的雌激素受体(ER)阳性乳腺癌患者微小 RNA(miR)-122、miR-449a 检测的临床价值。**方法:** 选择 258 例 ER 阳性乳腺癌患者,均接受他莫昔芬辅助治疗。分析血清外泌体 miR-122、miR-449a 表达与患者临床病理特征的关系。随访 5 年,绘制 Kaplan-Meier 曲线分析生存率,采用多因素 Cox 回归分析影响因素。**结果:** 组织学分级 3 级、TNM 分期 III 期、腋窝淋巴结转移、Ki-67 高表达的 ER 阳性乳腺癌患者治疗前血清外泌体 miR-122 高于组织学分级 1-2 级、TNM 分期 I/II 期、无腋窝淋巴结转移、Ki-67 低表达,miR-449a 则更低($P<0.05$)。miR-122 高表达组中位总生存期(OS)低于 miR-122 低表达组($P<0.05$); miR-449a 低表达组中位 OS 低于 miR-449a 高表达组($P<0.05$);Cox 回归分析显示 TNM 分期为 III 期、Ki-67 高表达($\geq 14\%$)、miR-122 高表达、miR-449a 低表达是 ER 阳性乳腺癌患者他莫昔芬辅助治疗预后不良的独立危险因素($P<0.05$)。**结论:** ER 阳性乳腺癌患者血清外泌体 miR-122、miR-449a 表达水平与患者组织学分级、TNM 分期、腋窝淋巴结转移情况、Ki-67 表达等临床病理特征相关,miR-122 高表达、miR-449a 低表达是影响患者 5 年生存期的独立危险因素,有望成为预测他莫昔芬辅助治疗预后的重要标志物。

关键词: ER 阳性乳腺癌;他莫昔芬;miR-122;miR-449a;预后

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2024)23-4592-03

Study on the Clinical Value of miR-122 and miR-449a Detection in ER-Positive Breast Cancer Patients Treated with Tamoxifen*

FAN Li-li^{1,2}, XU Wen-lin^{1,3Δ}, PENG Jin-juan², LI Li², TAO Kai²

(1 School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu, 212013, China;

2 Department of Breast, The Fourth Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu, 212050, China;

3 Central Laboratory, The Fourth Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu, 212050, China)

ABSTRACT Objective: To analyze the clinical value of minimal RNA (miR) -122 and miR-449a detection in estrogen receptor (ER) -positive breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen. **Methods:** 258 ER-positive breast cancer patients were selected, and all patients treated with tamoxifen. The relationship between the expression of serum exosomal miR-122 and miR-449a and the clinicopathological characteristics of patients were analyzed. 5 years after follow-up, the survival rate was analyzed by Kaplan-Meier curve, and the influencing factors was analyzed by multivariate Cox regression. **Results:** The serum exosomal miR-122 of ER positive breast cancer patients with histological grade 3, TNM stage III, axillary lymph node metastasis and high expression of Ki-67 before treatment was higher than that of histological grade 1-2, TNM stage I/II, no axillary lymph node metastasis and low expression of Ki-67, and miR-449a was lower ($P<0.05$). The median overall survival (OS) of miR-122 high expression group was lower than that of miR-122 low expression group ($P<0.05$). The median OS of miR-449a low expression group was lower than that of miR-449a high expression group ($P<0.05$). Cox regression analysis showed that TNM stage III, high expression of Ki-67 ($\geq 14\%$), high expression of miR-122 and low expression of miR-449a were independent risk factors for poor prognosis of tamoxifen adjuvant therapy in ER-positive breast cancer patients ($P<0.05$). **Conclusion:** The expression levels of serum exosomal miR-122 and miR-449a in ER-positive breast cancer patients are correlated with TNM stage III and high expression of Ki-67, the high expression of miR-122 and the low expression of miR-449a are independent risk factors affecting the 5-year survival of patients, It is expected to be an important marker for predicting the prognosis of tamoxifen adjuvant therapy.

Key words: ER- positive breast cancer; Tamoxifen; miR-122; miR-449a; Prognosis

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

Article ID: 1673-6273(2024)23-4592-03

* 基金项目:镇江市妇产疾病临床医学研究中心开放课题项目(SS2022003-KFD01);江苏省自然科学基金资助项目(BK20141288)

作者简介:范丽莉(1988-),女,在读硕士研究生,研究方向:肿瘤学,E-mail: fanlili1108@126.com

Δ 通讯作者:许文林(1963-),男,博士,主任医师,研究方向:肿瘤学,E-mail: xwl0806@163.com

(收稿日期:2024-07-24 接受日期:2024-08-29)

前言

乳腺癌属于一种激素依赖性肿瘤,其中雌激素受体(ER)阳性乳腺癌占比70%以上^[1]。他莫昔芬是雌激素拮抗药,常用于ER阳性乳腺癌术后辅助治疗^[2]。相关数据发现,仍有30%-50%比例的ER阳性乳腺癌患者在接受他莫昔芬辅助治疗后未能获得明显效果^[3]。

外泌体是一种重要的细胞间信号传导载体,具有微小RNA(miRNA)、DNA、脂质、蛋白等诸多检测靶点^[4]。Munagala^[5]等于2013年利用生物信息学技术筛选发现,Luminal型乳腺癌患者血清miR-122呈高表达,但关于miR-122的促癌机制未作深入研究。miR-449a在乳腺癌组织中的表达具有明显异质性,且可通过影响磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)/蛋白激酶(Akt)、跨膜受体蛋白1(NOTCH1)等信号通路参与乳腺癌发展过程^[6]。鉴于此,本研究分析他莫昔芬辅助治疗的ER阳性乳腺癌患者miR-122、miR-449a的临床意义,旨在为临床改善患者的预后提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择2015年2月至2019年3月江苏大学第四附属医院收治的258例ER阳性乳腺癌患者,纳入标准:①符合乳腺癌诊断标准^[7];②免疫组织化学判定为ER阳性;③绝经前女性患者;④原发单侧乳腺癌;⑤TNM分期为I-III期;⑥预计生存期3个月以上;⑦ECOG评分0-2分。排除标准:①无法耐受治疗中途退出或非规范治疗;②既往有子宫、卵巢与附件手术史;③正在参与其他临床研究;④合并乳腺结核、复发乳腺癌或血液系统疾病;⑤合并其他部位(胃部、头颈部等)恶性肿瘤;⑥合并严重甲亢、糖尿病等需长期服药的慢性疾病。

1.2 方法

1.2.1 治疗方案 所有患者均接受改良根治术或保乳术,术后实施表柔比星+环磷酰胺序贯多西他赛方案,以21d为1个治疗周期,用药共8个周期。在此化疗方案后给予患者他莫昔芬辅助治疗,口服枸橼酸他莫昔芬片[国药准字H32021472,四川海汇药业有限公司],10mg/次,2次/d,持续治疗5年。

1.2.2 血清外泌体 miR-122、miR-449a 表达 采集患者治疗前3mL清晨空腹静脉血,利用实时荧光定量PCR仪器(美国Biorad公司,型号:BIO-RAD CFX Connect)测定血清外泌体miR-122、miR-449a表达量。

1.2.3 随访 通过门诊复诊、电话等方式随访5年,本次随访截止日期为2024年3月,总生存期(OS)为治疗后第1d开始至任何原因死亡的时长。

1.3 统计学方法

采用SPSS26.0软件进行数据处理,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,用t检验;计数资料用百分比表示,采用 χ^2 检验;生存分析采用Kaplan-Meier方法,组间比较应用Log-Rank检验;影响ER阳性乳腺癌患者预后的因素采用单因素和多因素Cox回归分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 血清外泌体 miR-122、miR-449a 表达水平与临床病理特征的相关性

组织学分级3级、TNM分期III期、腋窝淋巴结转移、Ki-67高表达的ER阳性乳腺癌患者血清外泌体miR-122高于组织学分级1-2级、TNM分期I/II期、无腋窝淋巴结转移、Ki-67低表达,miR-449a则更低($P < 0.05$)。其他一般资料下的血清外泌体miR-122、miR-449a表达水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。

表1 血清外泌体 miR-122、miR-449a 表达水平与临床病理特征的相关性

Table 1 Correlation between serum exosomal miR-122, miR-449a expression levels and clinicopathological features

Clinicopathological features		n	miR-122	t	P	miR-449a	t	P
Age (year)	<35 year	103	4.35±0.28	-0.506	0.613	0.53±0.18	1.071	0.285
	≥ 35 year	155	4.37±0.33			0.51±0.12		
Tumor diameter	<2 cm	115	4.37±0.58	0.318	0.751	0.51±0.15	-0.461	0.645
	≥ 2 cm	143	4.35±0.43			0.52±0.19		
Histological grade	1-2grade	173	4.31±0.15	-2.680	0.008	0.56±0.25	4.266	0.000
	3grade	85	4.36±0.12			0.44±0.11		
TNM staging	I / II staging	153	4.28±0.77	-2.453	0.015	0.57±0.17	5.308	0.000
	IIIstaging	105	4.48±0.39			0.45±0.19		
ECOGscore	0-1score	168	4.35±0.21	-0.905	0.366	0.53±0.16	1.588	0.113
	2score	90	4.38±0.32			0.50±0.11		
lymphaticmetastasis	No	58	4.27±0.26	-3.875	0.000	0.59±0.15	3.473	0.001
	Yes	200	4.39±0.19			0.50±0.18		
Ki-67 expression situation	Low(<14%)	126	4.18±1.23	-2.638	0.009	0.61±0.24	6.976	0.000
	High(≥ 14%)	132	4.53±0.88			0.43±0.17		

2.2 血清外泌体 miR-122、miR-449a 表达与 5 年 OS 的关系

258 例 ER 阳性乳腺癌患者随访结束时共 5 例患者失访, 最终纳入 253 例, 5 年生存率为 81.82% (207/253)。按照患者治疗前血清外泌体 miR-122、miR-449a 表达将 253 例 ER 阳性乳腺癌患者分为 miR-122 高表达组 (\geq 均值 2.80, 133 例) 及 miR-122 低表达组 ($<$ 均值 2.80, 120 例)、miR-449a 高表达组 (\geq 均值 0.66, 115 例) 及 miR-449a 低表达组 ($<$ 均值 0.66, 138 例)。绘制 Kaplan-Meier 曲线发现, miR-122 高表达组中位 OS 为 50.56 个月 (95%CI:47.51-53.62), 低于 miR-122 低表达组的 57.39 个月 (95%CI:55.77-59.01) ($\chi^2=14.186, P=0.000$)。miR-449a 低表达组中位 OS 为 51.79 个月 (95%CI:49.02-54.56), 低于 miR-449a 高表达组的 55.58 个月 (95%CI:53.45-57.71) ($\chi^2=4.876, P=0.027$)。

2.3 ER 阳性乳腺癌患者他莫昔芬辅助治疗预后不良的因素分析

单因素与多因素 Cox 回归分析发现, TNM 分期为 III 期 [HR (95%CI): 2.15 (1.29-4.38)], miR-122 高表达 [HR (95%CI): 2.98 (1.47-5.35)], miR-449a 低表达 [HR (95%CI): 2.41 (1.41-4.72)] 及 Ki-67 高表达 ($\geq 14\%$) [HR (95%CI): 2.32 (1.55-4.32)] 是 ER 阳性乳腺癌患者他莫昔芬辅助治疗预后的独立危险因素 ($P < 0.05$)。

3 讨论

他莫昔芬是内分泌治疗药物之一, 通过与 ER 竞争结合并形成受体复合物, 从而抑制乳腺癌肿瘤生长、发育, 但仍有部分患者存在原发或继发耐药^[2]。研究发现, 内分泌耐药的分子机制涉及细胞存活、受体酪氨酸激酶信号通路、细胞周期调控分子、ER 等信号分子改变^[8]。Huber-Keener^[9]等发现, 多达 513 个 microRNA、1215 个 mRNA 与诸多分子事件相关 (包括线粒体功能紊乱、转录/翻译等), 证实 miRNA 与他莫昔芬耐药机制相关。

国内有研究表明 miR-122 等多种非编码 RNA 在他莫昔芬耐药过程中起着至关重要的作用^[6]。本研究发现, ER 阳性乳腺癌患者血清外泌体 miR-122 表达水平与患者组织学分级、TNM 分期、腋窝淋巴结转移情况、Ki-67 表达等临床病理特征有关, miR-122 高表达组中位 OS 低于 miR-122 低表达组, 且经 Cox 回归分析发现, miR-122 高表达是 ER 阳性乳腺癌患者他莫昔芬辅助治疗预后不良的独立危险因素, 推测原因可能与 miR-122 促癌机制相关: (1) 快速发育生长因子同源蛋白 2 抗体 (SPRY2) 可调控乳腺癌肿瘤细胞迁移、侵袭、增殖等恶性生物学行为, 其作用机制可能与调节肉瘤基因 (Ras)/MAPK 信号通路相关, 而 miR-122 可通过抑制 SPRY2 表达而异常激活 Ras/MAPK 信号通路, 从而促进癌细胞增殖; (2) 叉头框蛋白 O3 (FOXO3) 可通过增加细胞死亡调解因子 (Bim) 表达或诱导 p53 依赖性细胞凋亡来抑制乳腺癌肿瘤生长, 而 miR-122 通过负调控 FOXO3 从而促使肿瘤细胞迁移、侵袭能力^[10]。

国内一项研究报道^[11], miR-449a 低表达会增加癌细胞对多种化疗药物产生耐受, 提升细胞对化疗的抵抗性, 从而影响新辅助化疗效果。另一项研究报道^[12], 调节 miR-449a/ 丝氨酸羟甲基转移酶 2 (SHMT2) 轴表达可促进胃癌细胞的顺铂耐药性。本研究发现, ER 阳性乳腺癌患者血清外泌体 miR-449a 表达水平与患者组织学分级、TNM 分期、腋窝淋巴结转移情况、Ki-67 表达等临床病理特征情况有关, miR-449a 低表达组中位 OS 低于

miR-449a 高表达组, 且 miR-449a 低表达是 ER 阳性乳腺癌患者他莫昔芬辅助治疗预后不良的独立危险因素, 究其原因可能是组蛋白去乙酰化酶 1 (HDAC1) 过度表达可促使癌细胞增殖、侵袭、迁移; 同时, HDAC1 可通过调控 Wnt/ β 联蛋白 (β -catenin) 信号通路而诱导乳腺癌细胞凋亡^[13], 从而提升内分泌治疗效果。此外, 本研究还发现, TNM 分期为 III 期和 Ki-67 指数 $\geq 14\%$ 是 ER 阳性乳腺癌患者他莫昔芬辅助治疗预后的独立危险因素, 推测原因是 III 期患者癌细胞多发生侵犯至附近淋巴结, 病情复杂且治疗难度大, 进而影响预后结局^[14]。

综上所述, ER 阳性乳腺癌患者血清外泌体 miR-122、miR-449a 表达水平与患者组织学分级、TNM 分期、腋窝淋巴结转移情况、Ki-67 表达等临床病理特征相关, miR-122 高表达、miR-449a 低表达是影响患者 5 年生存期的独立危险因素, 有望成为预测他莫昔芬辅助治疗预后的重要标志物。

参考文献 (References)

- [1] Kubo M. Adjuvant endocrine treatment for estrogen receptor (ER)-positive/HER2-negative breast cancer [J]. *Chin Clin Oncol*, 2020, 9 (3): 33.
- [2] Ryu KJ, Kim MS, Lee JY, et al. Risk of Endometrial Polyps, Hyperplasia, Carcinoma, and Uterine Cancer After Tamoxifen Treatment in Premenopausal Women With Breast Cancer [J]. *JAMA Netw Open*, 2022, 5(11): e2243951.
- [3] 廖瑜倩, 李勇, 张战民, 等. HuR 胞浆表达水平与接受他莫昔芬辅助治疗的雌激素受体阳性乳腺癌预后的相关性 [J]. *实用癌症杂志*, 2022, 37(9): 1424-1428.
- [4] 孙大鹏, 李晨光, 张凤香. miR-206 通过钙网蛋白调控乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡 [J]. *锦州医科大学学报*, 2021, 42(3): 1-4, 10.
- [5] Munagala R, Aqil F, Vadhanam MV, et al. MicroRNA'signature' during estrogen-mediated mammary carcinogenesis and its reversal by ellagic acid intervention [J]. *Cancer Lett*, 2013, 339(2): 175-184.
- [6] 王鹏, 李凯敏, 冯瑞刚. 微小 RNA-122 在人乳腺癌组织中的表达及对体外培养人乳腺癌细胞他莫昔芬耐药的影响 [J]. *中国医药*, 2020, 15(1): 62-66.
- [7] 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. 中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范 (2015 版) [J]. *中国癌症杂志*, 2015, 25(9): 692-754.
- [8] 徐杨安泰, 王美宸, 缪晶茜, 等. 乳腺癌内分泌治疗耐药的机制及应对策略 [J]. *中国新药杂志*, 2023, 32(12): 1228-1232.
- [9] Huber-Keener KJ, Liu X, Wang Z, et al. Differential gene expression in tamoxifen-resistant breast cancer cells revealed by a new analytical model of RNA-Seq data [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41333.
- [10] Nie W, Ni D, Ma X, et al. miR-122 promotes proliferation and invasion of clear cell renal cell carcinoma by suppressing Forkhead box O3 [J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(2): 559-571.
- [11] 楚利涛, 李兴华, 朱梁豫, 等. 骨肉瘤患者血清中 miR-34a, miR-449a 表达及与新辅助化疗耐药的关系 [J]. *实用癌症杂志*, 2022, 37(3): 388-391.
- [12] Yang G, Tan J, Guo J, et al. Exosome-mediated transfer of circ_0063526 enhances cisplatin resistance in gastric cancer cells via regulating miR-449a/SHMT2 axis [J]. *Anticancer Drugs*, 2022, 33 (10): 1047-1057.
- [13] 牟成金, 潘武, 李娟, 等. HDAC1 调控 Wnt/ β -catenin 信号通路对乳腺癌细胞凋亡的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(1): 41-47.
- [14] 陈慧, 莫淋, 徐晓帆, 等. 雌激素受体阳性乳腺癌预后的相关因素分析 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2015, 20(04): 333-337.