

· 临床研究 ·

长链非编码 RNA MCM3AP-AS1 在老年晚期乳腺癌患者肿瘤组织中的表达及临床病理意义

姜 艺¹, 吴 昊^{2*}

¹南京医科大学第一临床医学院, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学第一附属医院肿瘤科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:探讨长链非编码 RNA(long noncoding RNA, LncRNA)MCM3AP-AS1 在乳腺癌患者中的表达及其临床病理意义。方法:收集老年女性(年龄 ≥ 60 岁)晚期乳腺癌患者肿瘤组织穿刺标本 64 例,应用 qRT-PCR 技术检测肿瘤组织中的 LncRNA MCM3AP-AS1 表达情况,免疫组化检测乳腺癌组织样本中的雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)、人表皮生长因子受体-2(human epidermal growth factor receptor-2, Her-2)、Ki-67 抗原、Dickkopf 相关蛋白 1(Dickkopf-related protein 1, Dkk1)蛋白表达情况。Her-2 免疫组化结果 2+ 的患者进一步行荧光原位杂交试验(FISH)检测。分析 LncRNA MCM3AP-AS1 表达情况与乳腺癌患者临床病理之间的关系及对预后的影响。结果:组织分化差及 ER、PR 阴性的乳腺癌患者肿瘤组织中 LncRNA MCM3AP-AS1 的表达明显升高($P < 0.01$)。LncRNA MCM3AP-AS1 的表达与是否存在肺、肝、脑转移均无相关性,但与骨转移关系密切($P < 0.01$)。激素受体阴性、Her-2 阳性、Dkk1 阳性的患者更容易发生骨转移($P < 0.01$)。LncRNA MCM3AP-AS1 高表达的乳腺癌患者无进展生存期明显低于低表达组($P < 0.01$)。结论:LncRNA MCM3AP-AS1 与女性乳腺癌的恶性生物学行为关系密切。检测 LncRNA MCM3AP-AS1 表达对明确乳腺癌发病、转移机制及判断乳腺癌患者预后具有潜在的价值。

[关键词] 乳腺癌; LncRNA MCM3AP-AS1; Dkk1; 骨转移; 预后

[中图分类号] R737.9; Q786

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)11-1589-05

doi: 10.7655/NYDXBNS201911108

Expression and clinicopathological significance of long noncoding RNA MCM3AP-AS1 in tumor tissues of elderly patients with advanced breast cancer

Jiang Yi¹, Wu Hao^{2*}

¹The First Clinical Medical School of Nanjing Medical University, Nanjing 210029; ²Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression and clinical pathological significance of long noncoding RNA (LncRNA) MCM3AP-AS1 in breast cancer patients. **Methods:** A total of 64 cases of tumor tissue puncture specimens were collected from elderly women (age ≥ 60) with advanced breast cancer. The expression of LncRNA MCM3AP-AS1 in tumor tissues of these patients was detected by qRT-PCR. The expressions of ER, PR, Her-2, Ki-67 and Dkk1 protein in breast cancer tissue samples were detected by immunohistochemistry. Samples with immunohistochemical Her-2 2+ were further tested by FISH. Furthermore, we analyzed the relationship between LncRNA MCM3AP-AS1 expression and clinical pathology of breast cancer patients and its impact on prognosis. **Results:** The expression of LncRNA MCM3AP-AS1 was significantly increased in breast cancer patients with poor tissue differentiation and ER(-), PR(-) ($P < 0.01$). The expression of LncRNA MCM3AP-AS1 was not associated with the presence of liver, lung or brain metastasis, but was closely related to bone metastasis ($P < 0.01$). Patients with ER(-), PR(-), Her-2(+) or Dkk1(+) were more likely to have bone metastases ($P < 0.01$). The progression-free survival of breast cancer patients with high expression of LncRNA MCM3AP-AS1 was significantly shorter than that of low expression group ($P < 0.01$). **Conclusion:** LncRNA MCM3AP-AS1 is closely related to the malignant biological behavior of female breast cancer. The detection of LncRNA MCM3AP-AS1 expression has potential value in helping us to better understand the mechanism of breast cancer and judging the prognosis of breast cancer patients.

[Key words] breast cancer; LncRNA MCM3AP-AS1; Dkk1; bone metastasis; prognosis

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(11):1589-1593]

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(81301898)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: whdactor@163.com

乳腺癌是中国女性最常见的恶性肿瘤^[1]。乳腺癌的发病率有明显的年龄分布特点^[2-3]。我国妇女乳腺癌发病高峰在45~50岁,50岁以后逐渐减少。但由于我国人口基数大,人口老龄化严重,60岁以上的乳腺癌患者仍非常常见。对这部分老年患者的诊治一直是我们的重点。在过去的几十年里,随着乳腺癌的分子分型越来越详细,其治疗策略也发生了根本性的改变,已由传统的乳腺癌手术及放化疗,转变为手术、放化疗、内分泌治疗及靶向治疗等多模式的综合治疗。治疗手段的丰富对改善老年乳腺癌患者的预后有很大的帮助。但由于患者高龄、脏器功能差、合并症多又决定了老年乳腺癌患者不能完全按照指南规范进行^[4-5]。故进一步阐明老年乳腺癌的发病机制、寻求新的治疗靶点,对改善老年乳腺癌患者的预后至关重要^[6]。

近年来越来越多的研究表明,长链非编码RNA(long noncoding RNA, LncRNA)在乳腺癌的发生发展中起着重要的作用,对其机制的研究将为乳腺癌的诊断、治疗提供新的理论依据^[7-8]。在前期工作中,我们利用基因芯片与生物信息学技术,对乳腺癌与癌旁组织的LncRNA表达谱进行筛选,分析发现MCM3AP-AS1在乳腺癌组织标本中高表达,提示其可能是调控乳腺癌恶性表型的重要LncRNA之一。LncRNA MCM3AP-AS1是近年来新发现在肿瘤中异常表达的基因^[9],其在乳腺癌中表达情况少见报道。本研究通过检测LncRNA MCM3AP-AS1在不同乳腺癌组织中的表达,分析其与各临床病理特征的相关性,探讨其在老年乳腺癌发生、发展及转移中的作用。

1 对象和方法

1.1 对象

2014年1月—2016年6月南京医科大学第一附属医院收治的老年女性(年龄 ≥ 60 岁)晚期乳腺癌患者64例,所有患者均因存在远处转移不能行手术治疗,穿刺标本均由2位有经验的高年资病理医师阅片评分。留取部分新鲜标本放入液氮中冻存,以备后用。治疗前所有患者行影像学检查评估转移部位。明确诊断后定期对患者进行随访,统计患者无进展生存时间(progress-free survival, PFS)。本研究经医院伦理委员会批准,并得到所有患者的知情同意。

1.2 方法

1.2.1 总RNA的提取及逆转录

按照试剂盒说明书操作提取乳腺癌组织标本中的总RNA,用紫外分光光度计检测吸光度值,取

比值(260 nm/280 nm)在1.8~2.0的RNA样本用于后续试验。采用Revertra Ace qRT-PCR Master Mix逆转录试剂盒(ToYoBo公司,日本)将RNA样本逆转录为cDNA,置于-80℃保存。

1.2.2 PCR检测LncRNA MCM3AP-AS1的表达

荧光定量PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司,引物分别为MCM3AP-AS1-F:5'-GCTGCTAATG-GCAACACTGA-3',MCM3AP-AS1-R:5'-AGGTGCTGTCTGGTGGAGAT-3';GAPDH-F:5'-GGACCTGACCTGCCGTCTAG-3',GAPDH-R:5'-GTAGCCCAGGATGCCCTTGA-3'。按照试剂盒操作规程进行PCR检测。包括SYBR Green Realtime PCR Master Mix 10 μ L,10 μ mol/L上、下游引物各1 μ L,cDNA模板2.5 μ L,ddH₂O 5.5 μ L。循环参数:95℃ 60 s;95℃ 15 s,60℃ 34 s,72℃ 45 s,共40个循环。在60℃时收集荧光信号,应用熔解曲线分析产物纯度,最终结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法表示。实验重复3次。

1.2.3 免疫组织化学检测

应用穿刺标本制作石蜡切片,以常规SP法检测人表皮生长因子受体-2(human epidermal growth factor receptor-2, Her-2)、雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR),试剂盒购自上海美轩生物科技有限公司。具体操作流程参照2015年乳腺癌雌、孕激素受体免疫组织化学检测指南^[10]。Ki-67抗体购自美国Invitrogen公司,工作浓度为1:200。Dickkopf相关蛋白1(Dickkopf-related protein 1, Dkk1)抗体购自美国Santa Cruz公司,工作浓度为1:400。细胞核是PR、ER阳性表达部位,阳性率 $> 1\%$ 判为阳性。细胞膜是HER-2表达部位,免疫组化检测结果3+判为Her-2阳性,0和1+为Her-2阴性,2+为Her-2不确定病例,需进一步应用荧光原位杂交试验(FISH)的方法进行Her-2基因扩增状态检测。

1.2.4 FISH

进行Her-2基因状态检测的探针为同时含有Her-2基因和该基因所在的第17号染色体着丝粒(CEP17)序列的双探针(Abbott分子公司,美国)。参考我国《乳腺癌Her-2检测指南(2014版)》进行判读^[11]。

1.3 统计学方法

应用SPSS17.0统计软件进行统计。LncRNA MCM3AP-AS1基因的相对表达量均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验。率的比较采用卡方检验。生存曲线采用Kaplan-Meier分析,组间比较

采用Log-rank 检验。P ≤ 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌组织中 LncRNA MCM3AP-AS1 的表达与临床病理特征的关系

比较不同临床病理特征乳腺癌患者肿瘤组织中 LncRNA MCM3AP-AS1 的表达差异。结果表明, 肿瘤组织分化差及ER阴性、PR阴性的乳腺癌患者, 其肿瘤组织中 LncRNA MCM3AP-AS1 的表达明显升高, 差异有统计学意义(P < 0.01, 表1)。LncRNA MCM3AP-AS1 的表达量与Her-2、Ki-67的表达水平无关。

2.2 乳腺癌组织中 LncRNA MCM3AP-AS1 的表达与肿瘤转移部位的关系

本次研究入组的人群均为晚期乳腺癌患者, 转移部位各不相同, 按照不同的转移部位进行亚组分析。LncRNA MCM3AP-AS1 的表达与是否存在肺、肝、脑转移均无相关性。但在骨转移的患者其 LncRNA MCM3AP-AS1 的表达明显高于无骨转移的患者, 差异具有统计学意义(图1)。

2.3 乳腺癌骨转移与肿瘤组织病理的关系

按照是否存在骨转移进行分组, 检测不同患者肿瘤组织中ER、PR、Her-2、Ki-67和Dkk1的表达情况, 并将免疫组化结果与骨转移情况进行统计学分析。结果显示, 骨转移与否与ER、PR、Her-2、Dkk1的表达有关。激素受体阴性、Her-2阳性、Dkk1阳性的患者似乎更容易发生骨转移(P < 0.05, 表2)。

2.4 LncRNA MCM3AP-AS1 的表达与乳腺癌患者预后的关系

Kaplan-Meier 分析显示, LncRNA MCM3AP-AS1 低表达组和高表达组的晚期乳腺癌患者首次治疗后的中位PFS分别为10.7个月和8.1个月, LncRNA MCM3AP-AS1 高表达的乳腺癌患者PFS明显低于低表达组, 差异有统计学意义(P < 0.01, 图2)。

3 讨论

近年来越来越多的研究表明表观遗传学的改

表1 LncRNA MCM3AP-AS1 的表达量与临床病理特征的关系

Table 1 The relationship between expression of LncRNA MCM3AP-AS1 and clinicopathologic features

特征	例数	LncRNA MCM3AP-AS1 相对表达量	P值
病理分级			
I ~ II 级	35	1.93 ± 0.25	< 0.001
III 级	29	3.78 ± 0.28	
ER			
(+)	39	2.25 ± 0.24	0.003
(-)	25	3.58 ± 0.37	
PR			
(+)	27	2.11 ± 0.25	0.009
(-)	37	3.25 ± 0.31	
Her-2			
(+)	24	3.14 ± 0.37	0.187
(-)	40	2.54 ± 0.27	
Ki-67			
<14%	19	2.36 ± 0.34	0.232
≥14%	45	2.94 ± 0.28	
Dkk1			
(+)	29	4.13 ± 0.30	< 0.001
(-)	35	1.64 ± 0.13	

变在乳腺癌的发生发展中起着重要的作用, 对其机制的研究将为乳腺癌的诊断、治疗提供新的理论依据。LncRNA 作为近年来备受关注的一类非编码RNA, 在肿瘤形成、增殖和转移的过程中起着广泛而重要的作用^[12-13], 其功能及作用机制较为复杂, 是目前RNA基因组学研究的热点。LncRNA在人类中预计数量是mRNA的3~100倍, 它们并不编码蛋白, 而是以RNA的形式在多种层面上(表观遗传学调控、转录调控以及转录后调控等)调控基因的表达水平, 在多种疾病包括肿瘤发生过程中扮演重要的角色^[14-15]。

前期利用基因芯片与生物信息学技术筛选出 LncRNA MCM3AP-AS1 在乳腺癌组织高表达。进一

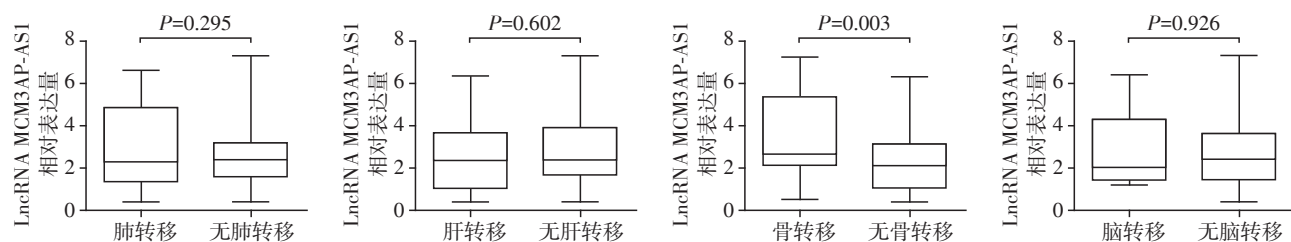


图1 LncRNA MCM3AP-AS1 的表达量与远处转移病灶的关系

Figure 1 The relationship between expression of LncRNA MCM3AP-AS1 and distant metastatic lesions

表2 乳腺癌骨转移与肿瘤组织病理的关系

Table 2 The relationship between bone metastasis and histopathology of breast cancer [n(%)]

病理特征	骨转移		P值
	(+)	(-)	
ER			
(+)	9(23.1)	30(76.9)	0.001
(-)	16(64.0)	9(36.0)	
PR			
(+)	6(22.2)	21(77.8)	0.018
(-)	19(51.4)	18(48.6)	
Her-2			
(+)	15(62.5)	9(37.5)	0.032
(-)	14(35.0)	26(65.0)	
Ki-67			
<14%	6(31.6)	13(68.4)	0.202
≥14%	22(48.9)	23(51.1)	
Dkk1			
(+)	19(65.5)	10(34.5)	<0.001
(-)	8(22.9)	27(77.1)	

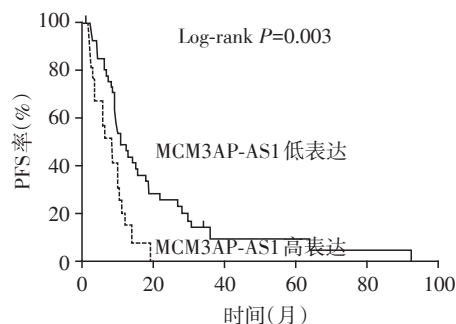


图2 LncRNA MCM3AP-AS1 表达与乳腺癌患者PFS之间的关系 (Kaplan-Meier 法)

Figure 2 The relationship between LncRNA MCM3AP-AS1 expression and PFS in breast cancer patients (Kaplan-Meier method)

步研究发现,LncRNA MCM3AP-AS1 在组织分化差的乳腺癌中高表达,LncRNA MCM3AP-AS1 高表达的乳腺癌患者PFS明显低于低表达者。这和Wang等^[16]在肝细胞癌中的研究类似,他们在肝癌组织中发现LncRNA MCM3AP-AS1 与肝癌的组织学分级、肿瘤大小、临床分期及预后密切相关,说明其在肝癌细胞的恶性生物学行为中扮演重要角色。因此,本研究表明,检测LncRNA MCM3AP-AS1 表达可作为判断乳腺癌患者预后的指标,具有一定的临床意义。

本研究还发现ER、PR阴性的患者LncRNA MCM3AP-AS1 表达水平高,这在其他研究中尚无报道。一般来说,ER、PR阴性的患者其预后较激素受

体阳性的患者更差一些。这一点和LncRNA MCM3AP-AS1 表达水平高的患者预后差也是吻合的。Peng等^[17]应用芯片技术发现,有13种LncRNA在乳腺癌中与ER的表达密切相关,但是未能进一步阐述他们与ER高表达或低表达之间的因果关系。这方面的研究仍然值得我们关注。

另一个有趣的问题是,按照不同的转移部位进行亚组分析,发现LncRNA MCM3AP-AS1 高表达与乳腺癌骨转移有关,而与肝、肺、脑等部位的转移无关。骨转移是乳腺癌的常见转移途径。本研究发现,骨转移也与Dkk1的阳性表达有关。研究者在多种恶性肿瘤的临床样本中得出结论:Dkk1 表达升高与骨转移密切相关^[18-19],常见的解释认为Dkk1 通过Wnt/ β -catenin 信号通路抑制下游基因RUNX2的表达,抑制成骨细胞的分化及活性^[20-21]。Dkk1 阳性患者LncRNA MCM3AP-AS1 表达水平较高,两者之间的因果关系如何需进一步研究。笔者猜测,LncRNA MCM3AP-AS1 可能通过吸附某种特定的miRNA,减少其对Dkk1 翻译水平的抑制作用,从而促进Dkk1 在肿瘤组织及血清中的高表达,这种假设是否成立需要进一步研究。

人类基因编码非常多的LncRNA,它们在常规生理学过程以及疾病中发挥的功能还有待考证。LncRNA MCM3AP-AS1 作为在乳腺癌中差异表达的长链非编码RNA,对其生物学功能的研究可能为乳腺癌的诊断治疗提供新的帮助。

[参考文献]

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. 2019 [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1):7-34
- [2] DeSantis CE, Ma J, Goding Sauer A, et al. Breast cancer statistics, 2017, racial disparity in mortality by state [J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(6):439-448
- [3] Richardson LC, Henley SJ, Miller JW, et al. Patterns and trends in age-specific black-white differences in breast cancer incidence and mortality - united states, 1999-2014 [J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2016, 65(40):1093-1098
- [4] Okonji DO, Sinha R, Phillips I, et al. Comprehensive geriatric assessment in 326 older women with early breast cancer [J]. Br J Cancer, 2017, 117(7):925-931
- [5] Freedman RA, Partridge AH. Emerging data and current challenges for young, old, obese, or male patients with breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(11):2647-2654
- [6] Brouwers B, Hatse S, Dal Lago L, et al. The impact of ad-

- juvant chemotherapy in older breast cancer patients on clinical and biological aging parameters [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(21):29977-29988
- [7] Chen F, Chen J, Yang L, et al. Extracellular vesicle-packaged HIF-1 α -stabilizing lncRNA from tumour-associated macrophages regulates aerobic glycolysis of breast cancer cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(4):498-510
- [8] Lin A, Li C, Xing Z, et al. The LINK-A lncRNA activates normoxic HIF1 α signalling in triple-negative breast cancer [J]. *Nat Cell Biol*, 2016, 18(2):213-224
- [9] Yang C, Zheng J, Xue Y, et al. The effect of MCM3AP-AS1/miR-211/KLF5/AGGF1 axis regulating glioblastoma angiogenesis [J]. *Front Mol Neurosci*, 2018, 10:437
- [10] 《乳腺癌雌、孕激素受体免疫组织化学检测指南》编写组. 乳腺癌雌、孕激素受体免疫组织化学检测指南 [J]. *中华病理学杂志*, 2015, 44(4):237-239
- [11] 《乳腺癌 HER2 检测指南(2014 版)》编写组. 乳腺癌 HER2 检测指南 2014 版 [J]. *中华病理学杂志*, 2014, 43(4):262-266
- [12] 崔 鹤, 居晓斌, 叶 琴, 等. 长链非编码 RNA BANCR 在胃癌中表达及其对胃癌细胞迁移、侵袭的影响 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(12):1674-1678
- [13] Gu J, Wang Y, Wang X, et al. Effect of the LncRNA GAS5-miR-23a-ATG3 axis in regulating autophagy in patients with breast cancer [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 48(1):194-207
- [14] Wu W, Chen F, Cui X, et al. LncRNA NKILA suppresses TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition by blocking NF- κ B signaling in breast cancer [J]. *Int J Cancer*, 2018, 143(9):2213-2224
- [15] Li J, Wang W, Xia P, et al. Identification of a five-lncRNA signature for predicting the risk of tumor recurrence in patients with breast cancer [J]. *Int J Cancer*, 2018, 143(9):2150-2160
- [16] Wang Y, Yang L, Chen T, et al. A novel lncRNA MCM3AP-AS1 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by targeting miR-194-5p/FOXA1 axis [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1):28
- [17] Peng J, Zhang L, Yuan C, et al. Expression profile analysis of long noncoding RNA in ER-positive subtype breast cancer using microarray technique and bioinformatics [J]. *Cancer Manag Res*, 2017, 9:891-901
- [18] Kasoha M, Bohle RM, Seibold A, et al. Dickkopf-1 (Dkk1) protein expression in breast cancer with special reference to bone metastases [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2018, 35(8):763-775
- [19] Clines KL, Clines GA. DKK1 and kremen expression predicts the osteoblastic response to bone metastasis [J]. *Transl Oncol*, 2018, 11(4):873-882
- [20] Zhuang X, Zhang H, Li X, et al. Differential effects on lung and bone metastasis of breast cancer by Wnt signaling inhibitor DKK1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2017, 19(10):1274-1285
- [21] Jin H, Wang B, Li J, et al. Anti-DKK1 antibody promotes bone fracture healing through activation of β -catenin signaling [J]. *Bone*, 2015, 71:63-75

[收稿日期] 2019-04-26

欢迎投稿 欢迎订閱