

引用本文:郭檬檬,姚昶.血清外泌体 miR-155、miR-222 表达对乳腺癌术后复发转移的预测价值[J].安徽医药, 2022, 26(10):1997-2000.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.10.021.



◇临床医学◇

血清外泌体 miR-155、miR-222 表达对乳腺癌术后复发转移的预测价值

郭檬檬¹,姚昶²

作者单位:¹南通市中医院普外科,江苏 南通 226000;²江苏省中医院乳腺科,江苏 南京 210000

通信作者:姚昶,男,主任医师,研究方向为肿瘤基因治疗的基础与临床,Email:yaochang@126.com

摘要: **目的** 探究血清外泌体 miR-155、miR-222 表达对乳腺癌术后复发转移的预测价值。**方法** 选取 2016 年 1 月至 2017 年 6 月于南通市中医院收治的乳腺癌病人 72 例作为乳腺癌组,同期选取确诊为乳腺纤维瘤病人 40 例为对照组。根据乳腺癌病人术后是否发生复发转移分为复发转移组 27 例和未复发转移组 45 例。利用外泌体试剂盒提取血清中外泌体,采用荧光定量 PCR 技术检测外泌体 miR-155、miR-222 水平。采用受试者工作特征(ROC)曲线评价血清外泌体 miR-155、miR-222 水平对乳腺癌病人术后复发转移的诊断价值。**结果** 研究组血清外泌体 miR-155(1.46±0.62)、miR-222(1.87±0.79)水平均明显高于对照组[(0.98±0.03)、(1.02±0.02)](均 $P < 0.05$);复发转移组病人血清外泌体 miR-155(1.68±0.47)、miR-222(2.13±0.53)水平均明显高于未复发转移组[(1.33±0.24)、(1.71±0.26)](均 $P < 0.05$);临床病理分析结果显示,乳腺癌病人血清外泌体 miR-155、miR-222 表达与 TNM 分期、淋巴结转移有关(均 $P < 0.05$);ROC 结果显示,血清外泌体 miR-155、miR-222 预测乳腺癌病人术后复发转移的曲线下面积(AUC)分别为 0.82[95%CI:(0.71,0.87)]、0.79[95%CI:(0.68,0.88)],对应的灵敏度分别为 69.37%、59.26%,特异度分别为 80.22%、86.33%;二者联合预测乳腺癌病人术后复发转移的 AUC 为 0.89[95%CI:(0.79,0.95)],灵敏度为 84.37%,特异度为 93.16%。**结论** 乳腺癌病人血清外泌体 miR-155、miR-222 水平呈高表达,二者对乳腺癌术后复发转移均有一定的预测价值,且联合预测效能更高,通过监测乳腺癌病人术后血清外泌体水平可能有利于尽早发现复发转移。

关键词: 乳腺肿瘤; 外泌体; 微小 RNA-155; 微小 RNA-222; 复发转移; 预测价值

The value of serum exosomes miR-155 and miR-222 expression in predicting postoperative recurrence and metastasis of breast cancer

GUO Mengmeng¹, YAO Chang²

*Author Affiliations:*¹General Surgery Department, Nantong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nantong, Jiangsu 226000, China;²Galactophore Department, Jiangsu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210000, China

Abstract: **Objective** To explore the predictive value of serum exosomes miR-155 and miR-222 expression on postoperative recurrence and metastasis of breast cancer. **Methods** A total of 72 patients with breast cancer admitted to Nantong Hospital of Traditional Chinese Medicine from January 2016 to June 2017 were selected as the breast cancer group, and 40 patients with breast fibroma were selected as the control group. According to the recurrence and metastasis of breast cancer patients, they were divided into recurrence and metastasis group (27 cases) and non-recurrence and metastasis group (45 cases). Serum exosomes were extracted by exosome kit, and the levels of miR-155 and miR-222 were detected by fluorescence quantitative PCR. Receiver operating characteristic (ROC) curve was used to evaluate the diagnostic value of serum miR-155 and miR-222 levels in patients with breast cancer recurrence and metastasis. **Results** The levels of serum miR-155 (1.46±0.62) and miR-222 (1.87±0.79) in the study group were significantly higher than those in the control group [(0.98±0.03), (1.02±0.02)] ($P < 0.05$); the levels of serum miR-155 (1.68±0.47) and miR-222 (2.13±0.53) in recurrence and metastasis group were significantly higher than those in non-recurrence and metastasis group [(1.33±0.24), (1.71±0.26)] (all $P < 0.05$); the results of clinicopathological analysis showed that the expression of miR-155 and miR-222 in serum was related to TNM stage and lymph node metastasis (all $P < 0.05$); ROC results showed that the area under the curve (AUC) of serum exosomes miR-155 and miR-222 in predicting postoperative recurrence and metastasis of breast cancer patients was 0.82[95%CI:(0.71,0.87)] and 0.79[95%CI:(0.68,0.88)], the corresponding sensitivity was 69.37%, 59.26%, and the specificity was 80.22% and 86.33%, respectively; the AUC of the combined prediction was 0.89[95%CI:(0.79,0.95)], the sensitivity was 84.37%, and the specificity was 93.16%. **Conclusions** The levels of serum exosomes miR-155 and miR-222 are highly expressed in breast cancer patients. Both of them have certain predictive value for the recurrence and metastasis of breast cancer, and the joint prediction efficiency is higher. Monitoring the serum exosomes level

of breast cancer patients after operation may be conducive to early detection of recurrence and metastasis.

Key words: Breast neoplasms; Exosomes; microRNA-155; microRNA-222; Recurrence and metastasis; Predictive value

乳腺癌是严重威胁女性身心健康的恶性肿瘤之一,近年来乳腺癌的发病率呈上升趋势,并且病人趋于年轻化。早期诊断、及早治疗是提高乳腺癌病人疗效、改善预后的关键^[1]。已有研究证实,微小RNA(microRNA, miRNA)在乳腺癌的发生发展中起重要调节作用,但循环miRNA含量比组织内少,并且易被RNA酶降解^[2-3]。随着研究的不断深入,有学者认为血清中的miRNAs可能通过外泌体的形式进行运输,实现细胞间的信息传递作用^[4-5]。由外泌体包裹运输的miRNA含量较为稳定,可较为真实地反映母细胞的miRNA水平。研究发现,miR-155可直接靶向FOXO-3a的3'-端非翻译区下调其转录及翻译,从而调节乳腺癌细胞的药物反应^[6]。另有研究称,miR-222在乳腺癌病人外泌体中过表达,与乳腺癌病人阿霉素耐药有关^[7]。然而,关于外泌体miR-155、miR-222与乳腺癌病人复发转移的相关研究鲜见报道,因此本研究通过检测血清外泌体miR-155、miR-222表达水平,并初步分析其与乳腺癌病人术后复发转移的关系,以期为临床治疗提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2016年1月至2017年6月南通市中医院收治的乳腺癌病人72例作为乳腺癌组,病人均为女性,年龄范围27~71岁,年龄(50.46±7.24)岁,其中左侧37例,右侧45例;TNM分期I期31例,II~III期41例;无淋巴结转移40例,有淋巴结转移32例;低、中分化34例,高分化38例。纳入标准:①经病理组织切片证实为原发性病灶浸润性乳腺癌;②均行乳腺癌改良根治术进行治疗;③术前行乳腺彩色超声检查;④临床资料完整。排除标准:①非原发性乳腺癌;②合并恶性肿瘤;③合并血液系统疾病或传染性疾病;④孕妇、哺乳期女性。同期选取在本院确诊的乳腺纤维瘤病人40例为对照组,均为女性,年龄范围25~67岁,年龄(48.62±8.17)岁。所有病人及其近亲属均知情同意并签署知情同意书。本研究方案经南通市中医医院伦理委员会批准实施(批号20160211)。

1.2 方法

1.2.1 血样采集及外泌体提取 所有病人于入院次日清晨取空腹静脉血5 mL,对照组于检查当日取空腹静脉血5 mL,3 000 r/min离心10 min后,取上层清液转移至干净EP管,做好编号后置于-80℃条件下保存。利用外泌体试剂盒提取血清中外泌体,置于透射电镜下观察形态进行鉴定。外泌体试剂盒

购自德国QIAGEN公司,提取步骤按照说明书严格执行。

1.2.2 荧光定量PCR技术检测外泌体miR-155、miR-222水平 利用Trizol试剂盒提取血清外泌体总RNA,富集miRNAs后按照microRNA Reverse Transcription Kit(美国Thermo Fisher Scientific)说明书方法进行血清外泌体miRNAs逆转录反应,将得到的cDNA按照SYBR Green Supermix(美国Bio-Rad)说明书进行实时荧光定量PCR分析,反应条件如下:95℃变性30 s;95℃、15 s;60℃延伸15 s,40个循环。miR-155、miR-222均以U6为内参,引物序列为:miR-155正向引物5'-ACGCTCAGTTAATGCTAATCGTGATA-3',miR-155反向引物5'-ATTCATGTTGTCCAACGTCTCTCTG-3';miR-222正向引物5'-GCTGGCGACATTACGACATTTCGCGC-3',miR-222反向引物5'-ACGCGCTAAGCCAAGTCTTAC-3';U6正向引物5'-CTCGCTTCGGCAGCACAC-3',U6反向引物5'-AACGCTTCCAGAATTTGCGT-3'。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各血清外泌体中miR-155、miR-222相对表达水平。每个样品重复3次,取平均值。

1.2.3 观察指标 乳腺癌病人术后第一年每3个月随访一次,之后每6个月随访一次至术后3年。随访时病人行全身CT或MRI扫描,如发现影像学转移,则进一步行组织病理学检查确诊,根据病人是否发生复发转移分为复发转移组27例和未复发转移组45例,比较两组病人血清外泌体miR-155、miR-222水平。

1.3 统计学方法 用SPSS 22.0统计学软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验;计数资料用例(%)表示,行 χ^2 检验。采用受试者工作特征(ROC)曲线评价血清外泌体miR-155、miR-222水平对乳腺癌病人术后复发转移的预测价值。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究组和对照组血清外泌体miR-155、miR-222水平比较 研究组血清外泌体miR-155、miR-222水平均明显高于对照组(均 $P < 0.05$),见表1。

2.2 复发转移组和未复发转移组血清外泌体miR-155、miR-222水平比较 复发转移组病人血清外泌体miR-155、miR-222水平均明显高于未复发转移组(均 $P < 0.05$),见表2。

2.3 乳腺癌病人血清外泌体miR-155、miR-222水平与临床病理参数之间的关系 以血清外泌体

表1 乳腺纤维瘤病人40例与乳腺癌病人72例血清外泌体 miR-155、miR-222水平比较 $\bar{x} \pm s$

组别	例数	miR-155	miR-222
对照组	40	0.98±0.03	1.02±0.02
研究组	72	1.46±0.62	1.87±0.79
<i>t</i> 值		4.88	6.79
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

表2 乳腺癌病人72例复发转移组和未复发转移组血清外泌体 miR-155、miR-222水平比较 $\bar{x} \pm s$

组别	例数	miR-155	miR-222
复发转移组	27	1.68±0.47	2.13±0.53
未复发转移组	45	1.33±0.24	1.71±0.26
<i>t</i> 值		4.18	4.50
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

miR-155、miR-222相对表达量的平均数将病人分为高表达组和低表达组,经病理分析结果显示,乳腺癌病人血清外泌体 miR-155、miR-222表达水平与年龄、肿瘤大小、分化程度无关(均 $P>0.05$),与TNM分期、淋巴结转移有关(均 $P<0.05$),见表3。

表3 乳腺癌病人72例血清外泌体 miR-155、miR-222水平与临床病理参数之间的关系/例(%)

临床参数	miR-155			χ^2, P 值	miR-222			χ^2, P 值
	例数	高表达 达($n=37$)	低表达 达($n=35$)		高表达 达($n=38$)	低表达 达($n=34$)		
年龄				3.36, 0.067			1.37, 0.243	
<50	24	16	8		15	9		
≥50	48	21	27		23	25		
TNM分期				7.98, 0.005			4.32, 0.038	
I	31	10	21		12	19		
II~III	41	27	14		26	15		
肿瘤大小				1.60, 0.207			1.16, 0.282	
<3.5 cm	44	20	24		22	22		
≥3.5 cm	28	17	11		16	12		
淋巴结转移				9.68, 0.002			14.85, <0.001	
无	40	14	26		13	27		
有	32	23	9		25	7		
分化程度				2.78, 0.096			0.95, 0.331	
低+中	34	21	13		20	14		
高	38	16	22		18	20		

2.4 血清外泌体 miR-155、miR-222水平对乳腺癌病人术后复发转移的诊断价值 ROC结果显示,血清外泌体 miR-155、miR-222预测乳腺癌病人术后复发转移的曲线下面积(AUC)分别为0.82[95%CI:(0.71, 0.87)]、0.79[95%CI:(0.68, 0.88)],对应的灵敏度分别为69.37%、59.26%,特异度分别为80.22%、86.33%;二者联合预测乳腺癌病人术后复

发转移的AUC为0.89[95%CI:(0.79, 0.95)],灵敏度为84.37%,特异度为93.16%。进一步Z检验结果显示,血清外泌体 miR-155、miR-222单独预测乳腺癌病人术后复发转移的AUC与联合预测的AUC相比,均差异无统计学意义($Z=1.04, P=0.298; Z=1.29, P=0.196$)。

3 讨论

乳腺癌是一种高度异质性肿瘤,临床研究发现,约有30%~40%的早期乳腺癌病人即使接受了手术根治术,仍有复发转移的风险,可能与其基因异质性导致的生物学行为和临床病理改变有关^[8-9]。本研究纳入的72例乳腺癌病人,有27例发生复发转移,复发转移率为37.50%,与其他学者^[10]报道的39.53%较为接近。目前临床上诊断乳腺癌常用方法有影像学检查、病理学诊断及血清肿瘤标志物检查等,但由于存在放射性损伤、有创性、灵敏度较差等缺陷,且对病人术后复发转移预测价值有限,寻找新的有效标志物以监测乳腺癌术后复发转移成为目前研究的热点。

外泌体是内分泌体衍生的纳米大小的小泡(50~150 nm),由多种类型细胞分泌,外泌体中含有细胞蛋白、脂质和miRNAs,可通过转运mRNA或miRNA调控受体细胞基因表达,癌细胞分泌的外泌体从原发肿瘤转移到循环系统已在多种模型中得到证实^[11-13]。已有学者报道称从乳腺癌病人和健康志愿者血清中分离出的外泌体中含有miR-155^[14],Kia等^[15]研究发现,miR-155在转移性乳腺癌外泌体中富集,且通过靶向PTEN和DUSP14参与乳腺癌细胞的侵袭、转移作用。本研究结果显示,与对照组相比,乳腺癌病人血清外泌体 miR-155呈高表达,且复发转移病人血清外泌体 miR-155水平亦明显高于未复发转移病人。经病理分析发现,血清外泌体 miR-155的表达水平与乳腺癌病人TNM分期、淋巴结转移有关,表明外泌体 miR-155可能通过独特的信息传递作用参与乳腺癌细胞的增殖、迁移,影响疾病进展。外泌体由于具有较高稳定性,在细胞外环境中可防止RNA酶、蛋白酶的降解作用,同时发挥独特的细胞间信息传递功能^[16],但关于外泌体 miR-155在乳腺癌中的具体作用机制有待进一步研究。

研究发现,miR-222是最早发现的一类外泌体miRNAs,可通过在肿瘤基质、耐药细胞及非耐药细胞之间相互传递信息,从而改变肿瘤微环境,进而使肿瘤细胞产生耐药性^[17-18]。也有人认为,外泌体可能通过囊泡将抗肿瘤药物隔离,再通过胞吐作用将其排出细胞,以消除药物对细胞的毒害作用,促进肿瘤细胞增殖、分化、转移^[19]。Yu等^[7]体外细胞

实验研究发现,转染 miR-222 模拟物的乳腺癌细胞 MCF-7/S 获得阿霉素耐药,而转染 miR-222 抑制剂的 MCF-7/S 细胞失去耐药性,证实 miR-222 可能是引起乳腺癌病人耐药的机制之一。另有研究发现,外泌体 miR-222 在伴有淋巴结转移的乳腺癌细胞中高表达,进一步研究证实外泌体 miR-222 通过下调肿瘤抑制基因 PDLIM2,从而激活 NF-KB 信号通路,促进肿瘤细胞迁移、侵袭作用^[20]。本研究结果显示,miR-222 在乳腺癌病人血清外泌体中表达水平明显高于对照组,与病人 TNM 分期、淋巴结转移有关,与上述结果一致,提示乳腺癌病人血清外泌体 miR-222 可能通过在肿瘤局部微环境中传递信息,激活一条或多条信号通路,从而参与肿瘤的发生发展过程。本研究还发现,术后复发转移病人血清外泌体 miR-222 水平明显高于未复发转移,提示血清外泌体 miR-222 可能作为乳腺癌病人复发转移的生物标志物。

ROC 曲线可用于评价临床诊断价值,AUC 为 ROC 曲线与横轴之间的面积,其大小可反映诊断价值大小,一般 AUC 值大于 0.5,认为具有诊断价值,AUC 值越大则诊断价值越高。本研究结果显示,外泌体 miR-155、miR-222 水平预测乳腺癌病人术后复发转移的 AUC 分别为 0.82、0.79,预测敏感性较低,分别为 69.37%、59.26%。为提高预测效果,进一步探究二者联合预测价值,结果显示二者联合预测乳腺癌病人术后复发转移的 AUC 为 0.885,均高于单独预测 AUC,但差异无统计学意义,联合诊断的灵敏度为 84.37%,特异度为 93.16%,提示二者联合诊断对乳腺癌术后复发转移的预测效能更优,后续应纳入更大样本量对本研究结果进行验证。

综上所述,乳腺癌病人血清外泌体 miR-155、miR-222 水平呈高表达,与 TNM 分期、淋巴结转移有关,二者对病人术后复发转移均有一定的预测价值,且二者联合预测价值更高,提示血清外泌体 miR-155、miR-222 可能成为预测乳腺癌术后复发转移的潜在生物标记物,但具体作用机制有待更深入研究。

参考文献

- [1] 师弘,王伟,贺新,等.多原发乳腺癌的临床流行病学特征--82 例患者的回顾性研究[J].现代肿瘤医学,2018,26(20):3307-3310.
- [2] NIU XY, ZHANG ZQ, MA PL. MiRNA-221-5p promotes breast cancer progression by regulating E-cadherin expression [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(16):6983-6990.
- [3] SWELLAM M, MAHMOUD MS, HASHIM M, et al. Clinical aspects of circulating miRNA-335 in breast cancer patients: a prospective study [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(6):8975-8982.
- [4] 刘亭亭,贾冬萍,王秀梅.外泌体源性 miRNAs 作为诊断标志物在肿瘤中的研究进展[J].国际遗传学杂志,2019,41(2):143-148.
- [5] 姜鹏玲,张思浩,徐织,等. Exosomal miRNAs 在肿瘤治疗中的研究进展[J/OL].临床普外科电子杂志,2019,7(2):35-39. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5308.2019.02.006.
- [6] SANTOS JC, LIMA NDS, SARIAN LO, et al. Exosome-mediated breast cancer chemoresistance via miR-155 transfer [J]. Sci Rep, 2018, 8(1):829.
- [7] YU DD, WU Y, ZHANG XH, et al. Exosomes from adriamycin-resistant breast cancer cells transmit drug resistance partly by delivering miR-222 [J]. Tumour Biol, 2016, 37(3):3227-3235.
- [8] 陈小松,沈坤炜.乳腺癌局部区域复发的外科和综合诊治策略[J].中华外科杂志,2019,57(2):92-96.
- [9] 董久兴,赵佳,邹庆华,等. T1~2N0M0 期乳腺癌改良根治术后胸壁复发的危险因素分析[J].肿瘤学杂志,2017,23(7):643-645.
- [10] 常庆龙,杨红星,贾国丛,等.血清 HER2 ECD+VEGF+HE4 对乳腺癌术后复发转移的诊断价值[J].癌症进展,2019,17(3):328-330.
- [11] 臧明泉,任建琳,靖琳,等.外泌体在肿瘤发生发展中的作用机制研究进展[J].山东医药,2018,57(7):102-105.
- [12] JIA Y, CHEN Y, WANG Q, et al. Exosome: emerging biomarker in breast cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8(25):41717-41733.
- [13] ZHANG L, YU D. Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2019, 1871(2):455-468.
- [14] GONZALEZ-VILLASANA V, RASHED MH, GONZALEZ-CANTÚ Y, et al. Presence of circulating miR-145, miR-155, and miR-382 in exosomes isolated from serum of breast cancer patients and healthy donors [J]. Dis Markers, 2019, 2019(1):6852917. DOI:10.1155/2019/6852917.
- [15] KIA V, PARYAN M, MORTAZAVI Y, et al. Evaluation of exosomal miR-9 and miR-155 targeting PTEN and DUSP14 in highly metastatic breast cancer and their effect on low metastatic cells [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(4):5666-5676.
- [16] 陈乐天,周冬仙,颜晨.外泌体 miRNA 在乳腺癌早期诊断和早期筛查中的应用[J].国际外科学杂志,2020,47(1):48-54.
- [17] BLISS SA, SINHA G, SANDIFORD OA, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulate cycling quiescence and early breast cancer dormancy in bone marrow [J]. Cancer Res, 2016, 76(19):5832-5844.
- [18] PAN ZX, ZHANG XY, CHEN SR, et al. Upregulated exosomal miR-221/222 promotes cervical cancer via repressing methyl-CpG-binding domain protein 2 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(9):3645-3653.
- [19] DOYLE LM, WANG MZ. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis [J]. Cells, 2019, 8(7):727.
- [20] DING J, XU Z, ZHANG Y, et al. Exosome-mediated miR-222 transferring: an insight into NF-κB-mediated breast cancer metastasis [J]. Exp Cell Res, 2018, 369(1):129-138.

(收稿日期:2020-12-30,修回日期:2021-02-03)