

• 论 著 •

cHNSCC 患者 PD-L1、MMP1 表达分析及与术后复发的关系*

靳书滨, 刘晓燕, 耿文华, 焦建军
邯郸市中心医院口腔颌面外科, 河北邯郸 056001

摘要:目的 分析程序性细胞死亡蛋白配体-1(PD-L1)、基质金属蛋白酶 1(MMP1)在头颈部皮肤鳞状细胞癌(cHNSCC)患者中的表达情况,探讨其与术后复发的关系。方法 将 2020 年 5 月至 2021 年 8 月该院收治的 cHNSCC 患者 173 例纳入研究,检测 cHNSCC 患者术中切除的肿瘤组织与癌旁组织中 PD-L1、MMP1 的表达情况。比较不同临床分期 cHNSCC 患者 PD-L1、MMP1 表达情况及不同术后复发情况的 cHNSCC 患者的临床病理资料。分析 cHNSCC 患者术后复发的影响因素。分析 PD-L1、MMP1 表达情况用于评估 cHNSCC 患者术后复发风险的效能。结果 cHNSCC 患者术后肿瘤组织 PD-L1、MMP1 阳性表达率高于癌旁组织($P < 0.05$)。不同临床分期 cHNSCC 患者术后 PD-L1、MMP1 阳性表达率差异有统计学意义($P < 0.05$)。复发组临床分期、术后放疗化疗情况、分化程度,PD-L1、MMP1 表达情况与未复发组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。PD-L1、MMP1 阳性表达是 cHNSCC 患者术后复发的危险因素($P < 0.05$)。PD-L1、MMP1 联合预测 cHNSCC 患者术后复发的灵敏度、特异度分别为 87.90%、79.59%。结论 PD-L1、MMP1 在 cHNSCC 患者肿瘤组织中呈高表达,是患者术后复发的独立危险因素,可作为评估术后复发风险的客观指标,具有较高临床应用价值。

关键词:头颈部皮肤鳞状细胞癌; 程序性细胞死亡蛋白配体-1; 基质金属蛋白酶 1; 术后复发

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.04.016 **中图法分类号:**R446.8

文章编号:1673-4130(2023)04-0461-05 **文献标志码:**A

Significance of PD-L1 and MMP1 expression in patients with cHNSCC and their correlation with postoperative recurrence*

JIN Shubin, LIU Xiaoyan, GENG Wenhua, JIAO Jianjun

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Handan Central Hospital,
Handan, Hebei 056001, China

Abstract: Objective To analyze the expression of programmed cell death protein ligand-1 (PD-L1) and matrix metalloproteinase 1 (MMP1) in patients with head and neck cutaneous squamous cell carcinoma (cHNSCC), and to analyze their correlation with postoperative Recurrence correlation. **Methods** A total of 173 patients with cHNSCC admitted to the hospital from May 2020 to August 2021 were enrolled in the study. The expression of PD-L1 and MMP1 in tumor tissues and adjacent tissues of cHNSCC patients resected during operation was detected. The expressions of PD-L1 and MMP1 in cHNSCC patients with different clinical stages and the clinicopathological data of cHNSCC patients with different postoperative recurrence were compared. The influencing factors of postoperative recurrence in cHNSCC patients were analyzed. The efficacy of PD-L1 and MMP1 expression in predicting the risk of postoperative recurrence in cHNSCC patients was analyzed. **Results** The positive expression rates of PD-L1 and MMP1 in postoperative tumor tissues of cHNSCC patients were higher than those in adjacent tissues ($P < 0.05$). There were significant differences in the positive expression rates of PD-L1 and MMP1 among cHNSCC patients with different clinical stages ($P < 0.05$). There were significant differences in clinical stage, postoperative radiotherapy and chemotherapy, degree of differentiation, and expression of PD-L1 and MMP1 between the recurrence group and the non-recurrence group ($P < 0.05$). The positive expressions of PD-L1 and MMP1 were risk factors for postoperative recurrence in cHNSCC patients ($P < 0.05$). The sensitivity and specificity of PD-L1 and MMP1 combined to predict postoperative recurrence in cHNSCC patients were 87.90% and 79.59%, respectively. **Conclusion** PD-L1 and MMP1 are highly expressed in tumor tissues of cHNSCC patients, which are independent risk factors for postoperative recurrence. They can be used as objective indicators to evaluate the risk of postoperative recurrence

* 基金项目:邯郸市科学技术研究与发展计划项目(1823208058ZC)。

作者简介:靳书滨,女,副主任医师,主要从事口腔颌面外科肿瘤的相关研究。

and have high clinical application value.

Key words: cutaneous squamous cell carcinoma of head and neck; programmed cell death protein ligand-1; matrix metalloproteinase-1; postoperative recurrence

头颈部皮肤鳞状细胞癌(cHNSCC)发病率居恶性肿瘤第 6 位,有报道指出,2000 年至 2016 年 cHNSCC 各个部位发病率均有所增加^[1]。手术是治疗 cHNSCC 患者的主要方案,但部分患者由于术后复发而导致治疗失败,生存率降低。目前临床主要通过手术切缘病理检查评估 cHNSCC 患者术后复发风险,具有一定价值,但 cHNSCC 病理机制复杂,仍有部分患者手术切缘病理检查阴性却术后复发,寻找新的客观指标评估患者术后复发风险具有重要价值。程序性细胞死亡蛋白配体-1(PD-L1)是近年来靶向免疫治疗研究热点,其免疫抑制作用与肿瘤转移密切相关^[2],其阳性表达可能为术后复发的影响因素,但目前相关报道较少。基质金属蛋白酶 1(MMP1)具有降解细胞外基质作用^[3],可直接影响肿瘤细胞转移、浸润、增殖,对肿瘤恶性进展有促进作用,但关于其对术后复发的影响报道较少。基于此,本研究将本院 cHNSCC 患者纳入研究,分析 PD-L1、MMP1 表达情况及对术后复发的影响,以期临床提供借鉴,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将 2020 年 5 月至 2021 年 8 月该院收治的 cHNSCC 患者 173 例纳入研究,男 94 例、女 79 例;年龄 53~68 岁、平均(60.43±3.52)岁。纳入标准:符合 cHNSCC 的诊断标准^[4];首次发病;为原发性肿瘤且经病理组织活检确诊;预估生存期>6 个月;年龄>18 岁;行手术治疗;术后随访资料完整。排除标准:合并严重心肺疾病;有放化疗史;骨髓造血功能异常;合并全身系统性疾病。

1.2 方法

1.2.1 PD-L1、MMP1 检测 均以免疫组织化学染色法进行检测,活检组织标本经乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡处理,所有操作在组织处理机中进行。然后进行石蜡包埋、切片。对制备好的石蜡切片按常规免疫组织化学染色的步骤进行操作,最后用中性树脂封片,显微镜下进行观察。判定标准:随机选取 5 个背景清晰、染色明确的视野,计算阳性细胞占全部细胞的百分比,若阳性细胞比例超过 10%,则表明结果为阳性表达。

1.2.2 术后复发观察 患者均行 cHNSCC 根治术,术后根据患者实际情况决定是否进行靶向治疗或放化疗,随访 6 个月,以出现术后复发或远处转移为终点事件。

1.3 观察指标 (1)比较 cHNSCC 患者肿瘤组织与癌旁组织 PD-L1、MMP1 阳性表达情况。(2)比较不同临床分期 cHNSCC 患者 PD-L1、MMP1 表达情况。

(3)比较不同术后复发情况 cHNSCC 患者的一般资料,包括性别、年龄、临床分期、合并症、肿瘤部位、术后是否放化疗、肿瘤浸润深度及分化程度、淋巴结受累数目、PD-L1、MMP1 阳性表达情况。(4)对 cHNSCC 患者复发的影响因素进行分析。(5)PD-L1、MMP1 表达用于评估 cHNSCC 患者术后复发的价值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行数据处理。计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;采用 Logistic 回归分析 cHNSCC 患者术后复发的影响因素。计算 PD-L1、MMP1 阳性表达情况用于预测 cHNSCC 患者术后复发的灵敏度、特异度。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 cHNSCC 患者 PD-L1、MMP1 阳性表达情况 cHNSCC 患者肿瘤组织 PD-L1、MMP1 阳性表达率高于癌旁组织($P<0.05$),见表 1。

表 1 cHNSCC 患者不同组织 PD-L1、MMP1 阳性表达情况比较[n(%)]

组织类型	n	PD-L1	MMP1
肿瘤组织	173	33(19.08)	29(16.76)
癌旁组织	173	12(6.94)	9(5.20)
χ^2		11.265	11.825
P		<0.001	<0.001

2.2 不同临床分期 cHNSCC 患者 PD-L1、MMP1 阳性表达情况比较 不同临床分期 cHNSCC 患者肿瘤组织 PD-L1、MMP1 阳性表达率差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 不同临床分期 cHNSCC 患者肿瘤组织 PD-L1、MMP1 阳性表达情况比较[n(%)]

临床分期	n	PD-L1	MMP1
I 期	35	4(11.43)	2(5.71)
II 期	53	6(11.32)	4(7.55)
III 期	45	9(20.00)	10(22.22)
IV 期	40	14(35.00)	13(32.50)
Z		9.987	14.349
P		0.019	0.003

2.3 不同术后复发情况的 cHNSCC 患者临床病理资料比较 随访 6 个月,173 例 cHNSCC 患者中,术后复发 49 例作为复发组,未复发 124 例作为未复发组。复发组临床分期、术后放化疗、分化程度及 PD-L1 和 MMP1 的阳性表达情况与未复发组比较差异有

统计学意义($P<0.05$),见表 3。

表 3 不同术后复发情况 cHNSCC 患者临床病理资料比较[n(%)]

临床病理资料	复发组 (n=49)	未复发组 (n=124)	χ^2	P
性别			0.217	0.641
男	28(57.14)	66(53.23)		
女	21(42.86)	58(46.77)		
年龄			0.227	0.634
<60 岁	30(61.22)	71(57.26)		
≥60 岁	19(38.78)	53(42.74)		
临床分期			3.326	<0.001
I 期	6(12.24)	29(23.39)		
II 期	9(18.37)	44(35.48)		
III 期	15(30.61)	30(24.19)		
IV 期	19(38.78)	21(16.94)		
合并症				
高血压	7(14.29)	18(14.52)	0.002	0.969
糖尿病	4(8.16)	11(8.87)	0.023	0.880
肿瘤部位				
口咽	18(36.73)	41(33.06)	5.950	0.114
口腔	15(30.61)	28(22.58)		
鼻咽	12(24.49)	25(20.16)		
其他	4(8.16)	30(24.19)		
术后放疗			5.258	0.022
是	32(65.31)	57(45.97)		
否	17(34.69)	67(54.03)		
浸润深度			7.506	0.057
黏膜层	8(16.33)	30(24.19)		
黏膜下层	11(22.45)	34(27.42)		
肌肉层	14(28.57)	42(33.87)		
骨及软骨层	16(32.65)	18(14.52)		
分化程度			2.330	0.020
低分化	18(36.73)	20(16.13)		
中分化	20(40.82)	63(50.81)		
高分化	11(22.45)	41(33.06)		
PD-L1			45.194	<0.001
阴性	24(48.98)	116(93.55)		
阳性	25(51.02)	8(6.45)		
MMP1			38.783	<0.001
阴性	27(55.10)	117(94.35)		
阳性	22(44.90)	7(5.65)		
淋巴结受累数目			5.383	0.146
0	8(16.33)	41(33.06)		
1	23(46.94)	49(39.52)		
2	16(32.65)	28(22.58)		
3	2(4.08)	6(4.84)		

2.4 cHNSCC 患者术后复发的影响因素分析 将临床分期、术后放疗、分化程度、PD-L1、MMP1 阳性表达情况进行多重共线性检验,发现临床分期、术后放疗存在多重共线性($VIF>10$),手动移除术后放疗。以 cHNSCC 患者术后是否复发为因变量,以临床分期、分化程度、PD-L1、MMP1 阳性表达情况作为自变量,根据表 4 进行赋值,以 Logistic 回归进行多因素分析,结果显示,PD-L1、MMP1 阳性表达情况是 cHNSCC 患者术后复发的危险因素($P<0.05$),见表 5。

表 4 cHNSCC 患者术后复发影响因素分析赋值方案

序号	项目	变量类型	赋值方案
1	术后复发	因变量	否=0、是=1
2	临床分期	自变量	I 期=1、II 期=2、III 期=3、IV 期=4
3	分化程度	自变量	高分化=1、中分化=2、低分化=3
4	PD-L1	自变量	阴性=0、阳性=1
5	NMMP1	自变量	阴性=0、阳性=1

表 5 cHNSCC 患者术后复发影响因素分析

项目	β	SE	Wald χ^2	OR	P	95%CI
临床分期	0.479	0.415	1.334	1.615	0.248	0.843~3.094
分化程度	0.266	0.358	0.553	1.305	0.494	0.662~2.573
PD-L1	1.202	0.502	5.735	3.327	0.002	1.967~5.628
MMP1	1.166	0.445	6.866	3.209	<0.001	1.487~6.926

2.5 PD-L1、MMP1 表达情况用于评估 cHNSCC 患者术后复发的价值 PD-L1 阳性表达用于预测 cHNSCC 患者术后复发的灵敏度、特异度分别为 93.55%、51.02%,MMP1 阳性表达用于预测 cHNSCC 患者术后复发的灵敏度、特异度分别为 94.35%、44.90%,二者联合预测 cHNSCC 患者术后复发的灵敏度、特异度分别为 87.90%、79.59%。

3 讨论

cHNSCC 是常见恶性肿瘤,世界范围内每年新增患者约 50 万人,严重威胁患者健康。目前临床治疗 cHNSCC 的方案仍以手术切除为主。虽然手术技术发展迅速,但患者远期生存率却未得到明显提高,其原因主要在于术后的局部复发。有研究显示,cHNSCC 患者术后复发率可达 17.61%^[5]。因此,预防术后复发对改善患者远期生存结局有重要价值,而寻找评估术后复发风险的客观指标对临床尽早干预有积极作用。

近年来,程序性细胞死亡蛋白-1(PD-1)抑制剂是肿瘤免疫疗法研究的热点,作为免疫哨点单抗药物,在应答广度、深度、持久性方面均具有明显优势,其主要通过抑制 PD-1、PD-L1 进行靶向治疗,具有较强抗肿瘤效果^[6-7]。肿瘤进展时,肿瘤微环境诱导 T 细胞高表达并提高 PD-1 分子活性,肿瘤细胞则可通过传

递负性调控信号激活 PD-1/PD-L1 信号通路,抑制 T 细胞对肿瘤细胞的杀灭作用,从而促进肿瘤进展^[8-9]。因此,以 PD-1/PD-L1 为靶点的免疫疗法治疗 cHNSCC 具有良好效果,而且已在部分临床研究中得到证实^[10-11]。另有研究证实,cHNSCC 患者 PD-L1 2 级染色更有可能发生肿瘤转移,而且与局部复发显著相关^[12-13]。本研究发现,cHNSCC 患者肿瘤组织 PD-L1 表达阳性率明显高于癌旁组织且晚期患者 PD-L1 阳性表达率更高,提示 PD-L1 与 cHNSCC 患者预后有关。这与相关研究结果基本一致^[14]。本研究结果显示,术后复发患者的 PD-L1 阳性表达率明显高于未复发患者,PD-L1 阳性表达是 cHNSCC 患者术后复发的独立危险因素,提示其可作为反映 cHNSCC 患者术后复发风险的指标。

MMP1 是基质金属蛋白酶家族第一个被定性的成员,在多种器官、细胞培养液、组织提取物中均可发现,有报道指出,MMP1 可作为良性肿瘤向恶性进展的标志物^[15]。MMP1 在 cHNSCC、肺癌、卵巢癌、乳腺癌、直肠癌等多种肿瘤细胞中均有表达,具有降解明胶及胶原的作用。相关研究指出,间质细胞对促进肿瘤增殖、侵袭、迁移有重要作用,而细胞外基质中大量存在的胶原蛋白是角质形成细胞迁移的必要条件^[16]。细胞外基质是细胞与细胞间自分泌调节、旁分泌调节的缓冲,对细胞生存有直接影响,其水平变化受 MMP1 影响。MMP1 可通过诱导基质重塑、血管形成、细胞黏附等作用降解细胞外基质,降低细胞外基质对恶性肿瘤浸润、转移的阻碍,从而促进肿瘤转移、恶化^[17]。陈艳丹等^[18]研究指出,通过 miR-134 靶向 MMP1 蛋白表达可直接影响喉癌细胞的侵袭、增殖,证实 MMP1 在喉癌中具有促进肿瘤侵袭、转移的作用。本研究结果显示,cHNSCC 患者肿瘤组织细胞 MMP1 阳性表达率高,其高表达提示患者术后存在较高复发风险。

既往临床评估肿瘤患者术后复发风险主要依据为手术切缘组织病理学检查,但其效果并不理想,有研究指出存在部分手术切缘阴性的患者术后出现局部复发或淋巴结转移^[19-20]。这说明传统组织病理学检查具有一定局限性,而在病理学检查基础上联合免疫组织化学检测,可一定程度上提高诊断准确率。本研究中 PD-L1、MMP1 阳性表达对预测 cHNSCC 患者术后复发均有较高价值,二者联合预测 cHNSCC 患者术后复发的灵敏度、特异度分别为 87.90%、79.59%,提示 PD-L1、MMP1 阳性表达情况可作为评估 cHNSCC 患者术后复发风险的参考指标。

综上所述,cHNSCC 患者术后肿瘤组织 PD-L1、MMP1 阳性表达率较高,而且与患者术后复发存在密切关系,通过检测 PD-L1、MMP1 阳性表达情况有助于评估术后复发风险,有助于临床尽早干预以降低复发率。本研究不足之处在于仅探究了 PD-L1、MMP1

与术后复发的关系,受限于现有条件未分析其表达情况是否对远期生存有影响,这可作为下一步研究的方向。

参考文献

- [1] TAYLOR M A, SWITCHENKO J, STOKES W, et al. Incidence trends of squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) in the aging population: a SEER-based analysis from 2000 to 2016[J]. *Cancer Med*, 2021, 10(17): 6070-6077.
- [2] JIAO S, XIA W, YAMAGUCHI H, et al. PARP inhibitor upregulates PD-L1 expression and enhances cancer-associated immunosuppression[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(14): 3711-3720.
- [3] PADALA C, TUPURANI M A, PURANAM K, et al. Synergistic effect of collagenase-1 (MMP1), stromelysin-1 (MMP3) and gelatinase-B (MMP9) gene polymorphisms in breast cancer[J]. *PLoS One*, 2017, 12(9): e0184448.
- [4] STRATIGOS A, GARBE C, LEBBE C, et al. Diagnosis and treatment of invasive squamous cell carcinoma of the skin: European consensus-based interdisciplinary guideline[J]. *Eur J Cancer*, 2015, 51(14): 1989-2007.
- [5] LOPEZ F, FERNANDEZ-VANES L, GARCIA-CABO P, et al. Selective neck dissection in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma patients with a clinically positive neck[J]. *Oral Oncol*, 2020, 102(1): 104565.
- [6] 鄢敏, 余思佳, 邓世山, 等. 外泌体 PD-L1 在肿瘤免疫治疗中的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2022, 30(1): 178-181.
- [7] WANG X, NI S, CHEN Q, et al. Bladder cancer cells induce immunosuppression of T cells by supporting PD-L1 expression in tumour macrophages partially through interleukin 10[J]. *Cell Biol Int*, 2017, 41(2): 177-186.
- [8] ZHANG S A, NIYAZI H E, HONG W, et al. Effect of EBI3 on radiation-induced immunosuppression of cervical cancer HeLa cells by regulating Treg cells through PD-1/PD-L1 pathway [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(3): 1010428317692237.
- [9] 田季平, 张剑, 周金培, 等. 免疫检查点 PD-1/PD-L1 小分子抑制剂的研究进展[J]. *中国药科大学学报*, 2019, 50(1): 1-10.
- [10] LEE Y G, CHANG H, KEAM B, et al. Outcomes and biomarkers of immune checkpoint inhibitor therapy in patients with refractory head and neck squamous cell carcinoma: KCSG HN18-12 [J]. *Cancer Res Treat*, 2021, 53(3): 671-677.
- [11] 宋攀, 颜晓晴, 姜燕慧, 等. PD-1/L1 抑制剂在头颈部鳞状细胞癌治疗中的应用进展[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2022, 36(4): 315-320.
- [12] AMOILS M, KIM J, LEE C, et al. PD-L1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes in high-risk and metastatic cutaneous squamous cell carcinoma [J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2019, 160(1): 93-99. (下转第 471 页)

• 论 著 •

lncRNA CASC11 在三阴性乳腺癌中的临床意义及其与 miR-676-3p 调控的关系

徐 阳, 潘胜男[△]

南京医科大学附属淮安第一医院医学检验中心, 江苏淮安 223300

摘要:目的 探讨长链非编码 RNA(lncRNA)癌易感候选基因 11(CASC11)对三阴性乳腺癌(TNBC)细胞株 MDA-MB-231 迁移和侵袭能力的影响及其调控机制。方法 采用实时荧光定量 PCR(qPCR)检测 TNBC 组织芯片中 lncRNA CASC11 和 miR-676-3p 的表达;分析 TNBC 组织中 lncRNA CASC11 的相对表达水平与患者临床病理参数及预后的相关性;通过 Transwell 实验验证 lncRNA CASC11 与 miR-676-3p 对 TNBC 细胞株 MDA-MB-231 迁移和侵袭能力的影响;采用双荧光素酶报告实验对 lncRNA CASC11 与 miR-676-3p 之间的调控关系进行验证。结果 lncRNA CASC11 在 TNBC 组织中的表达水平异常升高($P < 0.05$),而 miR-676-3p 在 TNBC 组织中的表达水平下调($P < 0.05$);肿瘤组织中 lncRNA CASC11 的表达水平与脉管浸润、阳性淋巴结数目、淋巴结转移、远处转移、TNM 分期以及复发情况有关($P < 0.05$),并且在 TNM I 期、TNM II 期以及 TNM I ~ IV 期 TNBC 患者中,lncRNA CASC11 高表达的 TNBC 患者总体生存时间和无复发生存时间较 lncRNA CASC11 低表达的 TNBC 患者明显缩短($P < 0.05$),lncRNA CASC11 的相对表达水平是 TNBC 患者预后较差的独立危险因素;Transwell 实验表明下调 miR-676-3p 能够逆转 lncRNA CASC11 沉默介导的对 TNBC 细胞迁移和侵袭的抑制作用,双荧光素酶报告实验表明 lncRNA CASC11 能够调控 miR-676-3p。结论 lncRNA CASC11 的异常高表达与 TNBC 的发生、发展以及不良预后密切相关,其能够通过调控 miR-676-3p 诱导 TNBC 细胞的迁移和侵袭。

关键词:三阴性乳腺癌; 长链非编码 RNA; 癌易感候选基因 11; 迁移; 侵袭

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.04.017 **中图法分类号:**R446.8

文章编号:1673-4130(2023)04-0465-07

文献标志码:A

The clinical significance of lncRNA CASC11 in triple negative breast carcinoma and its relationship with miR-676-3p

XU Yang, PAN Shengnan[△]

Department of Medical Laboratory Center, Huai'an First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Huai'an, Jiangsu 223300, China

Abstract: Objective To investigate the effect of long non-coding RNA (lncRNA) cancer susceptibility candidate gene 11 (CASC11) on the migration and invasion ability of triple negative breast cancer (MDA-MB-231 cell line) and its regulatory mechanism. **Methods** Quantitative real-time PCR (qPCR) was used to detect the expression of lncRNA CASC11 and miR-676-3p in TNBC tissue chips; the correlation between the relative expression of lncRNA CASC11 in TNBC tissues and the clinicopathological parameters and prognosis of patients was analyzed. Transwell experiments were used to verify the effect of lncRNA CASC11 and miR-676-3p on the migration and invasion of MDA-MB-231 cell line, the regulatory relationship between lncRNA CASC11 and miR-676-3p was verified by qPCR and dual luciferase reporter experiments. **Results** The expression level of lncRNA CASC11 was abnormally increased in TNBC tissue ($P < 0.05$), while the expression level of miR-676-3p was down-regulated in TNBC tissue ($P < 0.05$); the expression of lncRNA CASC11 in tumor tissue was associated with vascular invasion, number of positive positive metastatic lymph nodes, lymph node metastasis, distant metastasis, TNM stage and recurrence are closely related ($P < 0.05$). Among TNBC patients with TNM I, TNM II, and TNM I - IV stages, the overall survival time and recurrence-free survival time of TNBC patients with high expression of lncRNA CASC11 were significantly shortened ($P < 0.05$). The lncRNA CASC11 expression was an independent risk factor for poor prognosis in TNBC patients. Transwell assays showed that down-regulation miR-676-3p could reverse the inhibitory effect of lncRNA CASC11 silencing-mediated migration and invasion of TNBC cells, dual luciferase reporter assays showed that lncRNA CASC11 could regulate miR-676-3p. **Conclusion** The high expression of lncRNA CASC11 is closely related to the oc-

currence, development and poor prognosis of TNBC, and it can regulate the migration and invasion of TNBC cells through miR-676-3p.

Key words: hepatocellular carcinoma; long non-coding RNA; cancer susceptibility candidate gene 11; migration; invasion

三阴性乳腺癌(TNBC)指的是免疫组织化学染色报告中,雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)及人表皮生长因子受体 2(EGFR-2)均为阴性的乳腺癌亚型^[1],约占新诊断乳腺癌数量的 24%^[2],是目前乳腺癌治疗中最棘手的一类,病死率高且最容易转移和复发^[3],虽然诊断和治疗的手段有了长足的发展,但是 TNBC 患者的生存率仍然不容乐观^[4],肿瘤转移极大地降低了治疗的成功率,是肿瘤相关性死亡首要的因素^[5-6],因此,全面了解 TNBC 发生、发展的机制对于改善患者的预后意义重大。长链非编码 RNA(lncRNAs)是长度超过 200 个核苷酸且缺乏蛋白质编码功能的转录本,参与多种生理和病理过程,尤其是肿瘤领域^[7]。此外,越来越多的证据表明 lncRNA 能够通过竞争性内源 RNA(ceRNA)机制吸附微小 RNA(miRNAs)调控下游基因表达和生物学功能,例如 lncRNA BCRT1 通过 miR-1303/PTBP3 促进乳腺癌的进展^[8],lncRNA H19 通过吸附 miR-19b-3p 促进肺癌细胞铁死亡^[9]。本研究拟探讨 lncRNA 癌易感候选基因 11(CASC11)对 TNBC 细胞株 MDA-MB-231 迁移和侵袭能力的影响及其调控机制,以期对 TNBC 的转移机制研究提供新的见解。lncRNA CASC11 也有望成为 TNBC 新的治疗靶点和预后标志物。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 实验中所使用的 132 例 TNBC 组织和配对癌旁组织的 cDNA 芯片购自上海芯超生物科技有限公司,公司与合作医院签订了合作协议,标本收集获得合作医院的伦理委员会批准并经过被研究对象及其家属同意,产品编码 HBreD132Su07,患者临床及病理资料包括年龄、性别、脉管浸润、阳性淋巴结数目、淋巴结转移、远处转移、TNM 分期以及随访资料等信息,所有患者术前均未接受任何治疗,包括放射治疗、化学治疗及靶向治疗等治疗。手术时间从 2009 年 1 月至 2016 年 9 月,随访截至 2020 年 8 月,死亡 29 例,完整资料可以在网站(<https://www.superchip.com.cn/>)上查询。胎牛血清(FBS)和 DMEM 培养基购自美国 Thermo 公司,Trizol 试剂和 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司,实时荧光定量 PCR(qPCR)检测试剂盒购自日本 Takara 公司,Transwell 小室购自美国康宁公司,lncRNA CASC11 小 RNA 干扰片段(si-CASC11)、miR-676-3p 类似物(mimics)/抑制剂(inhibitor)、lncRNA CASC11 野生型和突变型双荧光素酶报告载体均由上海吉泰生物有限公司构建合成,双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自美国 Promega 公司,所有引物购自上海生物工程有限公司。使用 Starbase2.0(<http://starbase.sysu.edu.cn/>)以及 TCGA (<https://portal.gdc.cancer.gov>)生物

信息学数据库验证 lncRNA CASC11 与 miR-676-3p 是否存在物理学上的结合位点。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人正常乳腺上皮细胞株(MCF-10A)以及 4 个 TNBC 细胞系(MDA-MB-231、4T1、BT549 和 HCC1937)购自中国科学院上海细胞库,将细胞培养使用含 10% FBS 的 DMEM 培养基中,放置于 5% CO₂、37 °C 的孵育箱中培养,待细胞生长至 70%~80%密度后进行传代,选择对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 细胞转染和双荧光素酶报告实验 取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞制备成单细胞悬液,均匀的接种在六孔板中,于 5% CO₂、37 °C 的孵育箱中孵育 24 h,当细胞密度达到约 70%~80%,根据试剂盒说明书进行转染。配制 A 液:将 5 μL 干扰片段或 5 μL 阴性对照加入到 250 μL 的低血清培养基中,轻柔混匀静置 5 min;B 液:将 5 μL lipofectamine 2000 加入到 250 μL 的低血清培养基中,轻柔混匀静置 5 min,将 A 液和 B 液混匀并静置 20 min,缓慢加入到相应六孔板中,继续置于 5% CO₂、37 °C 的培养箱中培养。构建含有 miR-676-3p 结合位点的野生型和突变型 lncRNA CASC11 双荧光素酶报告载体。lncRNA CASC11 突变型质粒突变的部分是与 miR-676-3p 结合的位点(Starbase 2.0 数据库预测)。使用 lipofectamine 2000 将双荧光素酶报告载体或阴性对照与 miR-676-3p mimics 共转染至 TNBC 细胞中,48 h 后测定各组荧光素酶活性。

1.2.3 qPCR 检测 lncRNA CASC11 和 miR-676-3p 的表达水平 使用 Trizol 试剂提取 TNBC 细胞系和人正常乳腺上皮细胞株中总 RNA,根据反转录试剂盒提供说明书进行反转录,分别以 GAPDH 和 U6 为内参,参照荧光定量 PCR 试剂盒说明书使用荧光定量 PCR 仪对 lncRNA CASC11 和 miR-676-3p 的表达水平进行 qPCR 检测,采用公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算 lncRNA CASC11 和 miR-676-3p 的相对表达水平,本研究所使用的引物序列见表 1。qPCR 检测 lncRNA CASC11/miR-676-3p 的反应条件:95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 15 s,65 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 34 s,共 35 个循环。

1.2.4 Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭能力 用胰蛋白酶消化并收集对数生长期细胞,用无血清培养基将每组细胞调整为 5×10^7 /mL 的悬液,取 250 μL 细胞悬液加入到上层小室中(侵袭实验在此基础上小室底部加入配套的基质胶),在下层小室中加入 500 μL 含 10% FBS 的 DMEM 培养基,于 37 °C、5%

TNBC 细胞迁移和侵袭的抑制作用, lncRNA CASC11 可能通过调控 miR-676-3p 进而促进 TNBC 细胞的侵袭和迁移能力, 双荧光素酶报告实验初步预测 lncRNA CASC11 和 miR-676-3p 可能存在物理学结合位点, 但是需要进一步的验证实验验证。

综上所述, 本研究表明 lncRNA CASC11 与 TNBC 患者脉管浸润、淋巴结转移、远处转移、TNM 分期、复发以及不良预后有关, 可能发挥癌基因的功能。此外, 体外细胞实验进一步表明 lncRNA CASC11 可能通过调控 miR-676-3p 进而促进 TNBC 细胞的侵袭和转移, 因此, lncRNA CASC11 可能会成为 TNBC 患者潜在的分子治疗靶点以及预后标志物。

参考文献

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(1): 7-30.
- [2] BORRI F, GRANAGLIA A. Pathology of triple negative breast cancer[J]. Semin Cancer Biol, 2021, 72(2): 136-145.
- [3] CAO Y, CHEN C, TAO Y, et al. Immunotherapy for triple-negative breast cancer[J]. Pharmaceutics, 2021, 13(12): 2003.
- [4] LUO S P, WU Q S, CHEN H, et al. Validation of the prognostic significance of the prognostic stage group according to the eighth edition of american cancer joint committee on cancer staging system in triple-negative breast cancer; an analysis from surveillance, epidemiology, and end results 18 database[J]. J Surg Res, 2020, 247(2): 211-219.
- [5] HE L, WICK N, GERMAN S K, et al. The role of breast cancer stem cells in chemoresistance and metastasis in triple-negative breast cancer[J]. Cancers, 2021, 13(24): 6209.
- [6] DEEPAK K G K, VEMPATI R, NAGARAJU G P, et al. Tumor microenvironment: challenges and opportunities in targeting metastasis of triple negative breast cancer[J]. Pharmacol res, 2020, 153(2): 104683.
- [7] MIRZAEI S, GHOLAMI M H, HUSHMANDI K, et al. The long and short non-coding RNAs modulating EZH2 signaling in cancer[J]. J Hematol Oncol, 2022, 15(1): 18.
- [8] LIANG Y, SONG X, LI Y, et al. LncRNA BCRT1 promotes breast cancer progression by targeting miR-1303/PTBP3 axis[J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 85.
- [9] ZHANG R, PAN T, XIANG Y, et al. Curcumenol triggered ferroptosis in lung cancer cells via lncRNA H19/miR-19b-3p/FTH1 axis[J]. Bioactive materials, 2022, 13(1): 23-36.
- [10] MEHRAJ U, MUSHTAQ U, MIR M A, et al. Chemokines in triple-negative breast cancer heterogeneity: New challenges for clinical implications[J]. Semin Cancer Biol, 2022, 86(2): 122-125.
- [11] CAPIK O, SANLI F, KURT A, et al. CASC11 promotes aggressiveness of prostate cancer cells through miR-145/IGF1R axis[J]. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2021, 24(3): 891-902.
- [12] LUO H, XU C, LE W, et al. lncRNA CASC11 promotes cancer cell proliferation in bladder cancer through miRNA-150[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(8): 13487-13493.
- [13] TONG W, HAN T C, WANG W, et al. LncRNA CASC11 promotes the development of lung cancer through targeting microRNA-302/CDK1 axis[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(15): 6539-6547.
- [14] JIN J, ZHANG S, HU Y, et al. SP1 induced lncRNA CASC11 accelerates the glioma tumorigenesis through targeting FOXK1 via sponging miR-498[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 116(1): 108968.
- [15] CHENG N, WU J, YIN M, et al. LncRNA CASC11 promotes cancer cell proliferation in hepatocellular carcinoma by inhibiting miRNA-188-5p[J]. Biosci Rep, 2019, 39(4): 20190251.
- [16] YU Z, ZHANG J, HAN J. Silencing CASC11 curbs neonatal neuroblastoma progression through modulating microRNA-676-3p/nucleolar protein 4 like (NOL4L) axis[J]. Pediatr Res, 2020, 87(4): 662-668.
- (收稿日期: 2022-06-23 修回日期: 2022-11-28)
- (上接第 464 页)
- [13] SCHNEIDER S, KADLETZ L, WIEBRINGHAUS R, et al. PD-1 and PD-L1 expression in HNSCC primary cancer and related lymph node metastasis: impact on clinical outcome[J]. Histopathology, 2018, 73(4): 573-584.
- [14] YANG F, ZENG Z, LI J, et al. PD-1/PD-L1 axis, rather than high-mobility group alarmins or CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes, is associated with survival in head and neck squamous cell carcinoma patients who received surgical resection[J]. Front Oncol, 2018, 8(1): 604.
- [15] TANG M L, BAI X J, LI Y, et al. MMP-1 over-expression promotes malignancy and stem-like properties of human osteosarcoma MG-63 cells in vitro[J]. Curr Med Sci, 2018, 38(5): 809-817.
- [16] 陈雨蒙, 徐晓薇, 刘欣辰, 等. 肿瘤间质细胞对口腔癌作用的研究进展[J]. 海南医学院学报, 2019, 25(7): 552-556.
- [17] 姜文佳, 汤晓庆, 汤国军, 等. 白细胞介素-37 在结直肠癌患者中的表达及其与基质金属蛋白酶-8、基质金属蛋白酶-9、血管内皮生长因子及可溶性细胞间黏附分子间的关系[J]. 中国卫生检验杂志, 2019, 29(14): 1728-1731.
- [18] 陈艳丹, 岑瑞祥, 曹伟, 等. miR-134 靶向基质金属蛋白酶 1 对喉癌细胞的增殖、凋亡、侵袭和迁移的影响[J]. 重庆医学, 2021, 50(22): 3793-3796.
- [19] 谭兆邦, 刘凤军. 肛管直肠恶性黑色素瘤 26 例临床特征及预后分析[J]. 实用癌症杂志, 2020, 35(6): 1005-1009.
- [20] 杨扬, 殷新明, 袁霞. 切缘阴性宫颈锥切术后影响宫颈上皮内肿瘤残留/复发的因素[J]. 中国性科学, 2019, 28(8): 36-40.
- (收稿日期: 2022-08-11 修回日期: 2022-12-21)