

文章编号 1006-8147(2023)03-0272-08

论著

RasGRF1 在乳腺癌中的表达及其临床意义

高漫芝, 马勇杰

(天津医科大学肿瘤医院肿瘤细胞生物学实验室, 国家恶性肿瘤临床医学研究中心, 天津市恶性肿瘤临床医学研究中心, 乳腺癌防治教育部重点实验室, 天津市“肿瘤防治”重点实验室, 天津 300060)

摘要 目的: 通过对大样本乳腺癌临床病例的研究, 探讨鸟苷酸交换因子 1(RasGRF1) 在乳腺癌中的表达及其临床意义。方法: 通过免疫组织化学染色的方法明确 RasGRF1 在乳腺癌组织中的表达方式, 利用 TIMER、DriverDBv3、bc-GenExMiner 和 LinkedOmics 临床数据资源分析 RasGRF1 在乳腺癌组织中的表达趋势及其与乳腺癌患者预后的关系。在此基础上, 探讨 RasGRF1 在不同分型的乳腺癌组织中的表达及其与不同分型的乳腺癌患者预后的关系, 并且在 ER-/PR- 型的乳腺癌患者中深入研究调控 RasGRF1 的 microRNA。结果: 免疫组织化学染色结果显示, RasGRF1 蛋白主要在乳腺癌组织的胞浆和胞膜中表达, 在细胞核中几乎没有表达。与正常乳腺组织相比, RasGRF1 蛋白在乳腺癌组织中高表达并且与患者的预后呈负相关。总生存($HR=2.04, P=0.000\ 67$)、无病生存($HR=1.77, P=0.023\ 5$)、无进展生存($HR=1.85, P=0.001\ 36$)和疾病特异性生存($HR=2.83, P=3.23e-05$)是乳腺癌预后的独立预后因子。与无淋巴结转移的患者相比, RasGRF1 在有淋巴结转移的患者中高表达, 并且其在淋巴结转移的乳腺癌患者中的表达与预后呈负相关($HR=1.86, 95\%CI: 1.34\sim2.57, P=0.000\ 2$)。与其他 3 种乳腺癌类型(ER+/PR+、ER+/PR-、ER-/PR+)相比, RasGRF1 在 ER-/PR- 类型的乳腺癌组织中高表达并且与患者预后呈负相关($HR=2.05, 95\%CI: 1.01\sim4.19, P=0.048\ 4$)。在 ER-/PR- 类型的乳腺癌中 RasGRF1 的表达可能受 hsa-mir-769 的调控。结论: RasGRF1 蛋白能够促进乳腺癌的进展, RasGRF1 可作为乳腺癌预后的生物标志物及治疗靶点。

关键词 乳腺癌; RasGRF1; ER; PR; 细胞黏附; microRNA

中图分类号 R737.9

文献标志码 A

Expression and clinical significance of RasGRF1 in breast cancer

GAO Man-zhi, MA Yong-jie

(Cancer Cell Biology Laboratory, Tianjin Medical University Cancer Institute & Hospital, National Clinical Research Center for Cancer, Tianjin's Clinical Research Center for Cancer, Key Laboratory of Breast Cancer Prevention and Therapy, Tianjin Medical University, Ministry of Education, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin 300060, China)

Abstract **Objective:** To explore the expression and clinical significance of guanosine acid factor 1(RasGRF1) gene in breast cancer by studying a large sample of breast cancer clinical cases. **Methods:** The expression of RasGRF1 in breast cancer tissues was determined by immunohistochemistry, TIMER, DriverDBv3, bc-GenExMiner, and LinkedOmics were used to analyze the expression trend of RasGRF1 in breast cancer tissues and its relationship with the prognosis of breast cancer patients. On this basis, the expression of RasGRF1 in different types of breast cancer tissues and its relationship with the prognosis of patients with different types of breast cancer were also discussed, furthermore, microRNA regulating RasGRF1 was found in ER-/PR- breast cancer patients. **Results:** The results of immunohistochemistry showed that RasGRF1 protein was mainly expressed in the cytoplasm and membrane of breast cancer tissues, but hardly expressed in the nucleus. Compared with normal breast tissues, RasGRF1 protein was highly expressed in breast cancer tissues and negatively correlated with the prognosis of patients. Overall survival($HR=2.04, P=0.000\ 67$), disease-free survival($HR=1.77, P=0.023\ 5$), progression-free survival($HR=1.85, P=0.001\ 36$), and disease-specific survival($HR=2.83, P=3.23e-05$), which were independent prognostic factors for breast cancer prognosis. It was found that RasGRF1 expression was higher in patients with lymph node metastasis than in patients without lymph node metastasis, and its expression in breast cancer patients with lymph node metastasis was negatively correlated with prognosis($HR=1.86, 95\%CI: 1.34\sim2.57, P=0.000\ 2$). Compared with the other three types of breast cancer(ER+/PR+, ER+/PR-, ER-/PR+), RasGRF1 was highly expressed in ER-/PR-type breast cancer tissues and negatively correlated with patient prognosis($HR=2.05, 95\%CI: 1.01\sim4.19, P=0.048\ 4$). The expression of RasGRF1 in ER-/PR-type breast cancer might be regulated by hsa-mir-769. **Conclusion:** RasGRF1 protein can promote the progression of breast cancer, and RasGRF1 can be act as a biomarker and therapeutic target for breast cancer prognosis.

Key words breast cancer; RasGRF1; ER; PR; lymph node; microRNA

基金项目 国家自然科学基金资助项目(82172987);天津市医学重点学科(专科)建设项目(TJYXZDXK-009A)

作者简介 高漫芝(1997-),女,硕士在读,研究方向:生物化学与分子生物学;通信作者:马勇杰, E-mail: mayongjie@tjmuch.com。

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一。虽然在过去的几年里,乳腺癌的诊断和治疗取得了显著进展,但由于高复发和转移发生率,其死亡率仍然很高^[1]。早期诊断、早期治疗对于乳腺癌的预后至关重要,准确的生物标志物可有助于早期诊断和指导治疗。

RasGRF1是Ras的鸟嘌呤核苷酸交换因子(RasGRF)家族的一员,是哺乳动物Ras GTPases的鸟苷酸交换因子,在小鼠中具有父系印迹^[2]。全长RasGRF1蛋白包含多个结构域:pleckstrin同源结构域、1个coil-coil区域、1个钙调素依赖激活结构域、ilimaquinon基序、1个DBL同源结构域和1个CDC25结构域^[3-4]。RasGRF1可以通过促进Ras与GDP解离以及Ras与GTP的结合来激活Ras,Ras蛋白在某些细胞类型的增殖、存活和分化中发挥关键作用^[5]。Ras蛋白可充当分子开关,在GTP结合的活性状态和GDP结合的非活性状态之间循环,Ras蛋白和GTP结合且持续处于活化状态,可与下游的效应蛋白结合产生第二信使,使细胞增殖失去控制,同时细胞凋亡减少,导致细胞恶性转化^[6]。现有研究表明,RasGRF1是一种多结构域蛋白,能够调节肿瘤细胞生物学行为,参与肿瘤进展^[7]。例如在星形细胞瘤中RasGRF1的敲降可以抑制肿瘤细胞的增殖并促进肿瘤细胞的凋亡^[8];在胶质瘤细胞和肺癌细胞中RasGRF1可以通过提高Ras的活性,促进肿瘤细胞的生长^[9-10]。但是RasGRF1在乳腺癌的发生以及发展中的作用鲜有报道,本研究分析RasGRF1表达与乳腺癌患者临床病理特征和生存预后之间的关系,为寻找乳腺癌患者预后的生物标志物奠定科学基础。

1 材料与方法

1.1 免疫组织化学染色 选取天津医科大学肿瘤医院收治的术前未接受放化疗等抗肿瘤治疗的乳腺癌患者石蜡标本,将石蜡标本切为厚度为4 μm左右的切片,固定于防脱片载玻片上,进行组织化学染色:(1)脱蜡复水:在多次二甲苯及不同浓度乙醇中浸泡。(2)将脱蜡复水后的切片置于清水中轻柔洗涤3次,每次5 min。(3)抗原热修复:柠檬酸盐溶液煮沸后,将组织切片置于高压锅中加热加压2.5 min,目的是破坏组织上的抗原因甲醛浸泡而形成醛键。(4)热修复后使用清水洗涤组织切片3次,每次5 min。(5)封闭:使用3% H₂O₂封闭组织切片上的过氧化物酶,室温静置25 min。封闭结束后用清水轻柔洗涤多次,最后1次用PBS工作液洗涤;再使用山羊血清室温封闭25 min。(6)一抗孵

育:弃去血清封闭液后,滴加使用一抗稀释液稀释的RasGRF1抗体(1:50,Abcam,Ab-111830),将切片置于湿盒中,4℃过夜孵育,再复温50 min,弃去抗体,清洗3次。(7)二抗孵育:滴加的二抗,置于湿盒中,室温孵育20 min。弃去二抗,清洗3次。(8)滴加链霉亲和素连接的辣根过氧化物酶溶液,37℃孵育20 min。(9)显色:用现配制的DAB溶液显色,在显微镜下实时控制显色状态,所有切片显色时长均为3.5 min。(10)使用苏木精复染5 min,盐酸酒精分化1 s,于1%氨水中返蓝约3 s,晾干后使用中性树脂封片,莱卡万能正置显微镜观察评分。

1.2 Western印迹检测 弃除细胞培养液后用PBS冲洗细胞,弃除PBS后加裂解液裂解蛋白,测定浓度后进行SDS-PAGE变性电泳,结束后将蛋白转到硝酸纤维素膜上,使用5%的脱脂奶粉室温封闭1 h,加入一抗(β-actin:稀释比例:1:5 000;RasGRF1:稀释比例:1:500)4℃过夜孵育。结束后用TBST洗膜3次,然后避光加入二抗(稀释比例:1:8 000),室温孵育50 min。孵育完成后用TBST洗膜,结束后使用双色红外激光成像系统进行曝光。

1.3 TCGA和GEO的临床资料分析 大标本的浸润性乳腺癌组织与正常组织的临床信息来源于癌症和肿瘤基因图谱网站(TCGA,<http://tcga-data.nci.nih.gov/>)。从网站提取乳腺浸润癌和GTEx中对应的正常组织数据,其中浸润性乳腺癌组织1 099例,乳腺正常组织292例;浸润性乳腺癌组织与配对癌旁组织的临床信息来自于TCGA数据库,包括112对浸润性乳腺癌组织与配对癌旁组织,将TPM(transcripts per million reads)格式的RNAseq数据进行log₂转化后进行样本间的表达比较。其次,在GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中下载GSE25066的表达数据,共508例乳腺癌患者样本,并使用singerBox中GEO ID转换器提取RasGRF1基因表达信息和患者的临床信息,包括年龄(>50, n=231; ≤50, n=277)、TNM分期(T0~T2, n=288; T3、T4, n=220)、淋巴结状态(N0、N1, n=401; N2、N3, n=107)、雌激素受体(ER)状态、病理分期以及预后情况等。单因素多因素Cox回归分析使用IBM SPSS Statistics 25进行分析。

1.4 TIMER的临床资料分析 TIMER(<https://cistrome.shinyapps.io/timer/>)中包括32种肿瘤类型^[11]。选取该数据的差异基因表达(Diff Exp)模块,RasGRF1在32种肿瘤类型中的基因表达水平分布采用箱线图显示,差异表达采用Wilcoxon检验评估差异有统计学意义。

1.5 DriverDBv3 的临床资料分析 选择 DriverDBv3 (<http://driverdb.tms.cmu.edu.tw/>)^[12] “Gene” 和 “survival” 模块, 分析 RasGRF1 在肿瘤中的表达, 及其对患者预后的影响, 包括五年生存率、总生存期(OS)、无病期(DFI)、无进展期(PFI)和疾病特异性生存期(DSS)。以各组数据的平均值为 cut off 值, 其中 OS 和 PFI 中高表达 RasGRF1 有 227 例, 低表达 RasGRF1 有 849 例; 其中 DFI 中高表达 RasGRF1 有 194 例, 低表达 RasGRF1 有 742 例; 其中 DSS 中高表达 RasGRF1 有 222 例, 低表达 RasGRF1 有 835 例。

1.6 bc-GenExMiner 的临床资料分析 选取 bc-GenExMiner(<http://bcgenex.ico.unicancer.fr/BC-GEM/GEM-Accueil.php>)^[13] 的 SCAN-B 数据, 用于分析 RasGRF1 在乳腺癌中表达情况。分析 RasGRF1 在不同类型的乳腺癌患者中的表达情况: 病例样本为 4 421 例, 具有淋巴结转移情况数据的有 3 870 例, 具有阳性和阴性受体免疫组织化学状态包括: ER、孕激素受体(PR)、人体表皮生长因子 2(HER2)和 ER/PR 组合的病例 3 666 例。分析 RasGRF1 对乳腺癌患者的生存情况: 淋巴结转移($n=1\ 167$)、无淋巴结转移($n=2\ 013$)、ER+($n=2\ 832$)、ER-($n=241$)、PR+($n=2\ 554$)、PR-($n=386$)、ER+/PR+($n=2\ 520$)、ER-/PR+($n=29$)、ER+/PR-($n=175$)、ER-/PR-($n=211$)。

1.7 统计学处理 采用 Wilcoxon 检验分析比较 RasGRF1 在正常乳腺组织和乳腺癌组织中的表

达水平; 采用 Log-rank 检验计算高低表达水平, $|\log 2| < -1$ 表示差异具有统计学意义, Kaplan-Meier 生存分析法判断 RasGRF1 表达水平与乳腺癌患者预后的关系; 使用 Pearson 统计学方法分析 ER-/PR-乳腺癌中与 RasGRF1 表达相关的 miRNA。

2 结果

2.1 免疫组织化学染色检测 RasGRF1 在乳腺癌中的表达结果显示, RasGRF1 蛋白在乳腺癌组织中主要为胞浆和胞膜表达, 细胞核中几乎没有表达(图 1)。

2.2 浸润性乳腺癌和正常组织中 RasGRF1 的差异表达 TIMER 数据库分析结果显示 RasGRF1 在多种肿瘤中具有差异表达, 与乳腺正常组织相比, RasGRF1 在乳腺癌组织中高表达($P < 0.05$, 图 2A); 在 TCGA 和 GTEx 数据库联合分析得到同样的结果($P < 0.000\ 1$, 图 2B), 并且生信分析和 Western 印迹验证表明 RasGRF1 在乳腺癌组织中表达水平高于其配对癌旁组织(图 2C、2D)。

2.3 RasGRF1 对乳腺癌患者预后的影响 结果显示, 在乳腺癌中, 与 RasGRF1 低表达组相比, RasGRF1 高表达乳腺癌患者 OS($HR=2.04$, $P=0.000\ 677$) (图 3A)、DFI($HR=1.77$, $P=0.023\ 5$) (图 3B)、PFI($HR=1.85$, $P=0.001\ 36$) (图 3C)和 DSS($HR=2.83$, $P=3.23e-05$) (图 3D)较差。进一步通过单因素和多因素 Cox 回归分析 GSE25066 数据发现, RasGRF1 可作为乳腺癌患者的独立预后因子(表 1)。

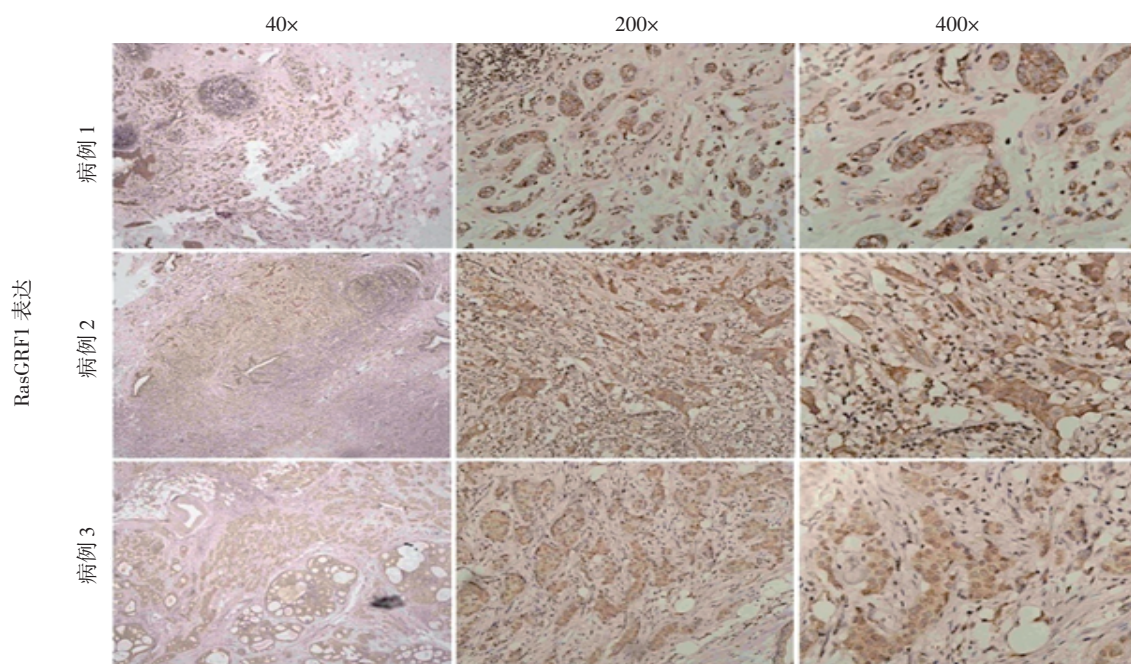
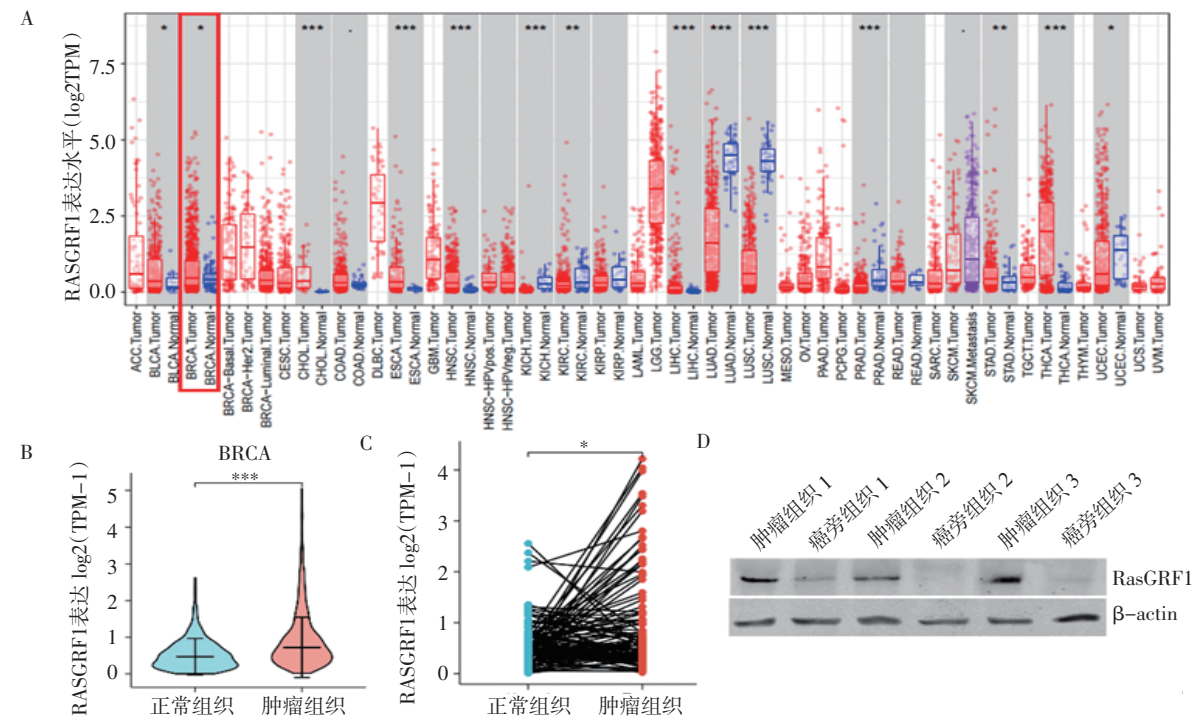


图 1 RasGRF1 在乳腺癌组织中免疫组化染色结果

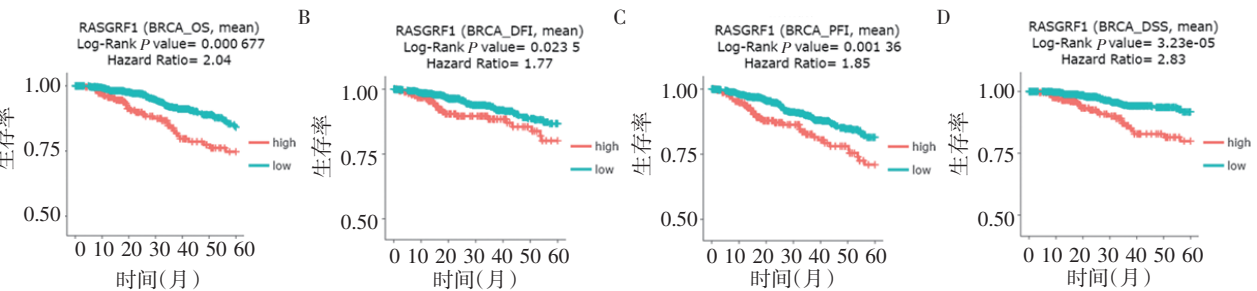
Fig 1 Immunohistochemical staining of RasGRF1 in breast cancer tissues



注:A:乳腺癌样本和正常对照组中的 RasGRF1 表达;B:正常组织和乳腺癌组织中 RasGRF1 的差异表达;C:RasGRF1 在配对乳腺癌组织中差异表达;D:RasGRF1 在乳腺癌组织和正常组织中的蛋白表达检测

图 2 RasGRF1 mRNA 在乳腺癌组织和正常组织中的表达情况

Fig 2 Expression of RasGRF1 mRNA in breast cancer tissues and normal tissues



注:A:RasGRF1 表达和乳腺癌患者总生存期的关系;B:RasGRF1 表达和乳腺癌患者无病期的关系;C:RasGRF1 表达和乳腺癌患者无进展期的关系;D:RasGRF1 表达和乳腺癌患者疾病特异性生存期的关系

图 3 RasGRF1 mRNA 表达水平与乳腺癌患者预后的关系

Fig 3 Relationship between expression of RasGRF1 mRNA and prognosis in breast cancer patients

表 1 508 例患者预后的单因素和多因素分析

Tab 1 Univariate and multivariate analysis of the prognosis of 1 508 patients

变量	HR(95%CI)	P	HR(95%CI)	P
RasGRF1 表达	1.909(1.309~2.785)	0.001	1.859(1.265~2.731)	0.002
年龄	1.050(0.724~1.525)	0.796		
淋巴结状态	2.927(1.744~4.913)	<0.001	1.899(1.059~3.406)	0.031
pTNM 分期	1.788(1.230~2.600)	0.002		
组织学分级	1.574(1.046~2.368)	0.030		
临床分期	2.357(1.603~3.465)	<0.001	1.671(1.080~2.584)	0.021
ER 状态	0.344(0.234~0.507)	<0.001	0.499(0.304~0.819)	0.006
PR 状态	0.380(0.252~0.571)	<0.001	0.638(0.378~1.077)	0.092
Her2 状态	1.758(0.433~7.132)	0.430		

注:pTNM 分期:病理学分期;HR:风险比;RasGRF1:鸟嘌呤核苷酸交换因子;ER:雌激素受体;PR:孕激素受体;HER2:人表皮生长因子 2

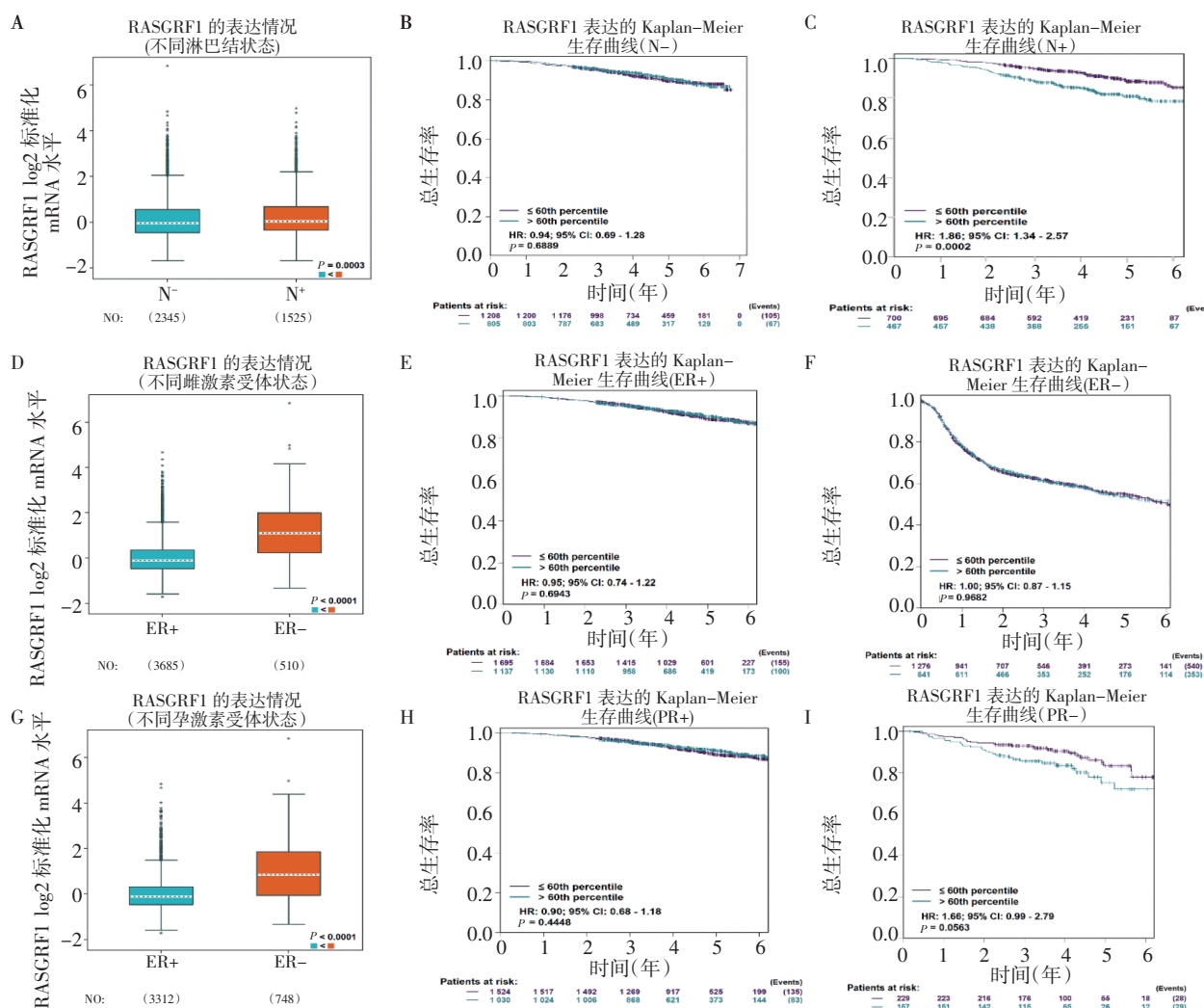
2.4 RasGRF1 在不同 ER/PR 状态的乳腺癌中的表达以及与学生预后的关系 在 bc-GenExMiner 数据中,分析 RasGRF1 表达和乳腺癌患者激素水平以及淋巴结状态的关系发现:与无淋巴结转移的乳腺癌组织相比,RasGRF1 在淋巴结转移的乳腺癌组织中高表达(图 4A, $P<0.0003$),并且在有淋巴结转移的乳腺癌组织中,与 RasGRF1 低表达组相比,RasGRF1 高表达患者具有较差的 OS($HR=1.86,95\%CI:1.34\sim2.57,P=0.0002$)(图 4C),RasGRF1 表达对无淋巴结转移的乳腺癌患者预后无显著影响($HR=0.94,95\%CI:0.69\sim1.28,P=0.6889$)(图 4B);分析乳腺癌患者 ER 状态时发现:与 ER+的乳腺癌组织相比,

RasGRF1 在 ER- 的乳腺癌组织中高表达(图 4D, $P < 0.0001$), 但是 RasGRF1 表达对单独 ER+ 或者 ER- 的乳腺癌患者的预后无显著影响(图 4E、4F); 分析乳腺癌患者 PR 状态时发现: 与 PR+ 的乳腺癌组织相比, RasGRF1 在 PR- 的乳腺癌组织中高表达(4G, $P < 0.0001$), 并且在 PR- 的乳腺癌中, 与 RasGRF1 低表达组相比, RasGRF1 高表达患者具有较差 OS 的趋势($HR = 1.66$, 95% CI: 0.99~2.79, $P = 0.0563$)(图 4I), RasGRF1 表达对 PR+ 乳腺癌患者预后无显著影响($HR = 0.90$, 95% CI: 0.68~1.18, $P = 0.4448$)(图 4H)。

进一步在 bc-GenExMiner 数据中联合分析 RasGRF1 在不同 ER/PR 状态的乳腺癌中的表达以及患者预后的关系, 结果表明, 与 ER+/PR+、ER+/

PR-、ER-/PR+ 类型的乳腺癌组织相比, RasGRF1 在 ER-/PR- 类型乳腺癌组织中表达最高, 在 ER+/PR+ 的乳腺癌中表达最低(图 5A, $P < 0.0001$)。同时分析生存数据结果显示, 在乳腺癌组织中, RasGRF1 高表达的乳腺癌患者具有较差的 OS($HR = 1.29$, 95% CI: 1.04~1.6, $P = 0.019$)(图 5B); RasGRF1 表达对 ER+/PR+ ($HR = 0.85$, 95% CI: 0.64~1.12, $P = 0.2529$)(图 5C)、ER+/PR- ($HR = 1.37$, 95% CI: 0.63~2.96, $P = 0.4276$)(图 5D)、ER-/PR+ ($HR = 0.65$, 95% CI: 0.06~7.18, $P = 0.7252$)(图 5E) 类型的乳腺癌患者预后无显著影响。在 ER-/PR- 类型乳腺癌患者中, RasGRF1 高表达患者具有较差的 OS($HR = 2.05$, 95% CI: 1.01~4.19, $P = 0.0484$)(图 5F)。

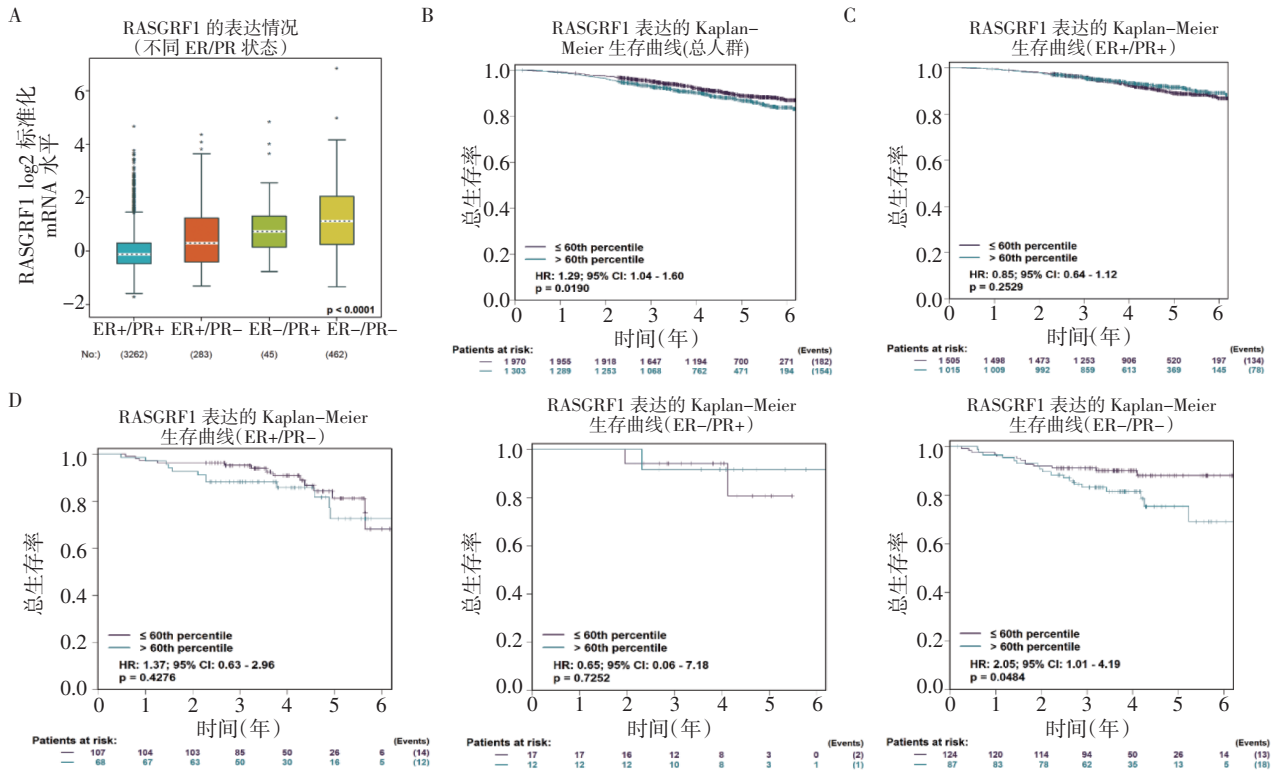
2.5 RasGRF1 影响 PR- 和 ER-/PR- 类型乳腺癌患者



注: A、B、C: RasGRF1 在不同淋巴结状态(N+为淋巴结转移, N-为无淋巴结转移)乳腺癌中的表达及预后情况; D、E、F: RasGRF1 在不同雌激素受体状态乳腺癌组织中的表达及预后情况; G、H、I: RasGRF1 在不同孕激素受体状态的乳腺癌组织中的表达以及预后情况

图4 bc-GenExMiner 数据分析 RasGRF1 在不同分型乳腺癌患者中的表达及其与预后的关系

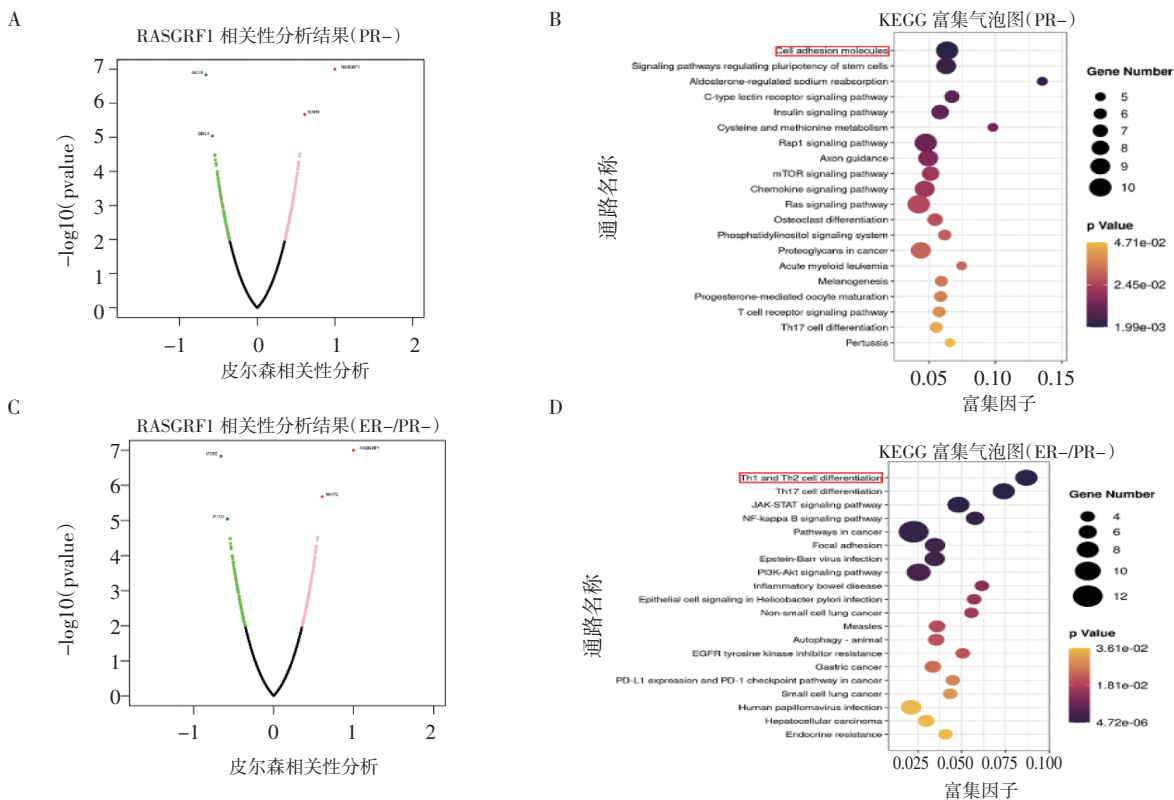
Fig 4 Analysis of RasGRF1 expression in different types of breast cancer patients and its relationship with prognosis by using bc-GenExMiner data



注:A: RasGRF1在不同ER/PR状态乳腺癌中的表达情况;B: RasGRF1表达和总人群(B)、ER+/PR+(C)、ER+/PR-(D)、ER-/PR+(E)、ER-/PR-(F)的乳腺癌患者生存的关系;ER: 雌激素受体;PR: 孕激素受体

图5 bc-GenExMiner 数据分析 RasGRF1 在 ER/PR 状态的乳腺癌患者中的表达及其与预后的关系

Fig 5 Analysis of RasGRF1 expression and its relationship with prognosis in breast cancer patients with ER/PR status by using bc-GenExMiner data



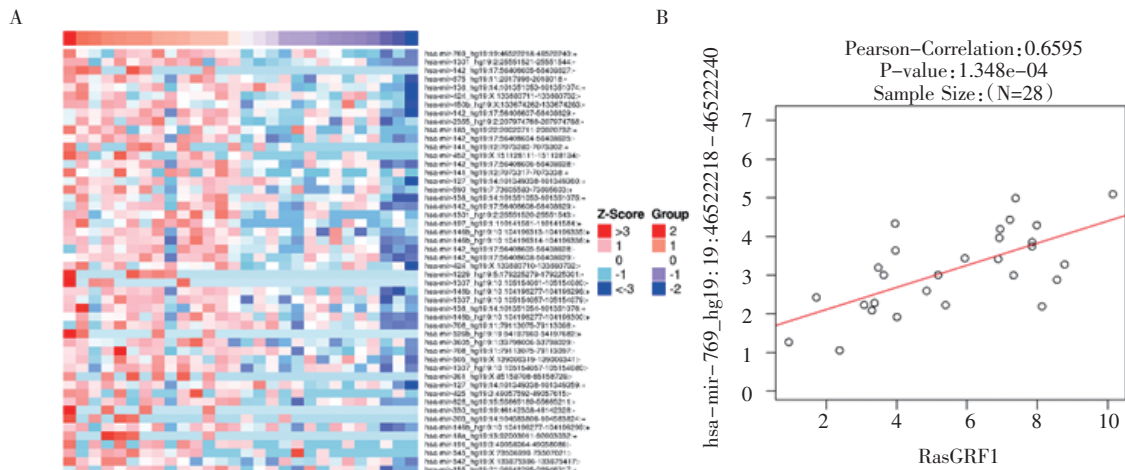
注:A: PR-型乳腺癌中与 RasGRF1 表达相关基因火山图;B: PR-型乳腺癌中与 RasGRF1 表达相关的基因 KEGG 富集分析气泡图;C: ER-/PR-型乳腺癌中与 RasGRF1 表达相关基因火山图;D: ER-/PR-型乳腺癌中与 RasGRF1 表达相关的基因 KEGG 富集分析气泡图;ER: 雌激素受体;PR: 孕激素受体

图6 乳腺癌中与 RasGRF1 表达相关的基因分析

Fig 6 Analysis of genes associated with RasGRF1 expression in breast cancer

预后的分子机制 图 6A 为 ER-乳腺癌中与 Ras-GRF1 表达相关的基因火山图,进一步筛选与 Ras-GRF1 表达高度相关的基因进行 KEGG 富集分析发现:多数基因参与细胞黏附信号通路(图 6B)。同样,在 ER-/PR-型乳腺癌分析发现,多数基因参与辅助性 T 细胞 (Th)1 和 Th2 细胞分化的通路(图 6C、6D)。

2.6 在 ER-/PR-类型的乳腺癌中筛选调控 Ras-GRF1 表达的 miRNA 在 LinkedOmics 数据资料中,选择 PR-和 ER-/PR-类型的乳腺癌,分析该类型的乳腺癌中与 RasGRF1 表达相关的 miRNA,图 7A 是与 RasGRF1 呈正相关的前 50 个基因,其中,hsa-mir-769 和 RasGRF1 相关性最强(图 7B, $P=1.348e-04$, $RS=0.659\ 50$)。



注:A:与 RasGRF1 呈正相关的前 50 个 miRNA 的热图;B:hsa-mir-769 和 RasGRF1 相关性分析;ER:雌激素受体;PR:孕激素受体

图 7 分析 ER-/PR-乳腺癌中与 RasGRF1 表达相关的 miRNA

Fig 7 Analysis of miRNA associated with RasGRF1 expression in ER-/PR- breast cancers

3 讨论

研究显示,RasGRF1 可以通过促进 Ras 与 GDP 释解离以及 Ras 与 GTP 的结合来激活 Ras^[5]。Ras 蛋白在某些细胞的增殖、存活和分化中发挥关键作用^[4-5]。且参与并促进多种肿瘤进展^[8-10,14-15]。

笔者通过免疫组织化学染色首先明确 Ras-GRF1 在乳腺癌组织中主要为胞浆和胞膜表达,然后基于 TIMER 数据库和 TCGA 数据库分析发现:相较于正常乳腺组织,乳腺癌组织中 RasGRF1 表达水平明显升高。并且进一步的预后分析结果显示:与正常乳腺组织相比,RasGRF1 在乳腺癌组织中高表达,且乳腺癌组织中 RasGRF1 高表达的患者预后更差,同时单因素和多因素 Cox 回归分析发现 Ras-GRF1 可作为乳腺癌患者预后的独立预测因子。这一点与既往研究报道的 RasGRF1 在星形细胞瘤、胶质瘤和结直肠癌等恶性肿瘤中的表达与患者的预后呈负相关是一致的^[8-9]。

乳腺癌治疗和预后主要受激素受体和人表皮生长因子 2(HER2)的影响^[16]。不同 ER 和 PR 状态对乳腺癌患者预后影响不同^[17-19]。因此,准确定义不同类型的乳腺癌生物标志物对于精准治疗至关重要。同时笔者还发现:与淋巴结阴性的乳腺癌组织

相比,RasGRF1 在淋巴结阳性的乳腺癌组织中高表达,并且在淋巴结阳性的乳腺癌中,RasGRF1 高表达患者预后较差;与 ER+的乳腺癌组织相比,Ras-GRF1 在 ER-的乳腺癌组织中高表达,但是 Ras-GRF1 表达对 ER+或者 ER-的乳腺癌患者的预后无显著影响;与 PR+的乳腺癌组织相比,RasGRF1 在 PR-的乳腺癌组织中高表达,并且在 PR-的乳腺癌中,RasGRF1 高表达具有较差预后的趋势。联合分析 RasGRF1 在不同 ER/PR 状态乳腺癌中的表达发现:RasGRF1 在 ER-/PR-的乳腺癌中高表达,并且高表达者预后差。综上所述,RasGRF1 表达可能是影响 PR-和 ER-/PR-乳腺癌进展的关键因素。

进一步研究发现,在 ER-和 ER-/PR-型乳腺癌中 RasGRF1 可能分别通过调控细胞黏附和 Th1/Th2 细胞分化来影响乳腺癌患者生存。在 ER-/PR-乳腺癌中 hsa-mir-769 可能是调控 RasGRF1 表达的 microRNA。先前的研究表明,hsa-mir-769-5p 可以促进多个肿瘤的发生和进展,例如在食管癌、肝癌、骨肉瘤和胶质瘤中高表达,且 hsa-mir-769-5p 高表达的患者预后差^[20-23]。在肝癌、骨肉瘤和胶质瘤中 hsa-mir-769-5p 通过促进肿瘤细胞增殖和迁移促进肿瘤进展^[21-23]。同时,hsa-mir-769 在黑色素瘤

中高表达,并且促进黑色素瘤细胞增殖^[24],但 hsa-mir-769 在乳腺癌中作用和机制尚无报道,需进一步研究。

综上所述,本研究通过分析 RasGRF1 表达与乳腺癌患者临床病理特征和生存预后之间的关系,为寻找乳腺癌患者预后的生物标志物奠定了科学基础。

参考文献:

- [1] WANG X, CHEN M, FANG L. hsa_circ_0068631 promotes breast cancer progression through c-Myc by binding to EIF4A3[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 26: 122-134.
- [2] DE LA PUENTE A, HALL J, WU Y Z, et al. Structural characterization of Rasgrf1 and a novel linked imprinted locus[J]. *Gene*, 2002, 291(1/2): 287-297.
- [3] MARTEGANI E, VANONI M, ZIPPEL R, et al. Cloning by functional complementation of a mouse cDNA encoding a homologue of CDC25, a *Saccharomyces cerevisiae* RAS activator[J]. *EMBO J*, 1992, 11(6): 2151-2157.
- [4] BUCHSBAUM R, TELLIEZ J B, GOONESEKERA S, et al. The N-terminal pleckstrin, coiled-coil, and IQ domains of the exchange factor Ras-GRF act cooperatively to facilitate activation by calcium[J]. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(9): 4888-4896.
- [5] CHEN H, XU Z, YANG B, et al. RASGRF1 Hypermethylation, a putative biomarker of colorectal cancer[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2018, 48(1): 3-10.
- [6] SIMANSHU D K, MORRISON D K. A structure is worth a thousand words: new insights for RAS and RAF regulation[J]. *Cancer Discov*, 2022, 12(4): 899-912.
- [7] MEGURO A, YAMANE T, TAKEUCHI M, et al. Genome-wide association study in asians identifies novel loci for high myopia and highlights a nervous system role in its pathogenesis[J]. *Ophthalmology*, 2020, 127(12): 1612-1624.
- [8] DENG D, XUE L, SHAO N, et al. miR-137 acts as a tumor suppressor in astrocytoma by targeting RASGRF1[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(3): 3331-3340.
- [9] PAN Y H, CHEN J, SUN C, et al. Effect of Ras-guanine nucleotide release factor 1-mediated H-Ras/ERK signaling pathway on glioma[J]. *Brain Res*, 2021, 1754: 147247.
- [10] COOPER A J, KOBAYASHI Y, KIM D, et al. Identification of a RAS-activating TMEM87A-RASGRF1 fusion in an exceptional responder to sunitinib with non-small cell lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(15): 4072-4079.
- [11] LI T, FAN J, WANG B, et al. TIMER: a web server for comprehensive analysis of tumor-infiltrating immune cells[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(21): e108-e110.
- [12] LIU S H, SHEN P C, CHEN C Y, et al. DriverDBv3: a multi-omics database for cancer driver gene research[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(D1): D863-D870.
- [13] JEZEQUEL P, GOURAUD W, BEN AZZOUZ F, et al. bc-GenExMiner 4.5: new mining module computes breast cancer differential gene expression analyses[J]. *Database (Oxford)*, 2021, 2021: baab007.
- [14] TAKAMARU H, YAMAMOTO E, SUZUKI H, et al. Aberrant methylation of RASGRF1 is associated with an epigenetic field defect and increased risk of gastric cancer[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2012, 5(10): 1203-1212.
- [15] TARNOWSKI M, SCHNEIDER G, AMANN G, et al. RasGRF1 regulates proliferation and metastatic behavior of human alveolar rhabdomyosarcomas[J]. *Int J Oncol*, 2012, 41(3): 995-1004.
- [16] WAKS A G, WINER E P. Breast cancer treatment: a review[J]. *JAMA*, 2019, 321(3): 288-300.
- [17] KIANI J, KHAN A, KHAWAR H, et al. Estrogen receptor alpha-negative and progesterone receptor-positive breast cancer: lab error or real entity?[J]. *Pathol Oncol Res*, 2006, 12(4): 223-227.
- [18] ITOH M, IWAMOTO T, MATSUOKA J, et al. Estrogen receptor (ER) mRNA expression and molecular subtype distribution in ER-negative/progesterone receptor-positive breast cancers[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 143(2): 403-409.
- [19] WU N, FU F, CHEN L, et al. Single hormone receptor-positive breast cancer patients experienced poor survival outcomes: a systematic review and meta-analysis[J]. *Clin Transl Oncol*, 2020, 22(4): 474-485.
- [20] WU K, ZHANG C, ZHANG C, et al. A Novel Three-miRNA signature identified using bioinformatics predicts survival in esophageal carcinoma[J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 5973082.
- [21] ZHANG X, ZHANG D, BU X, et al. Identification of a novel miRNA-based recurrence and prognosis prediction biomarker for hepatocellular carcinoma[J]. *BMC Bioinformatics*, 2022, 23(1): 479.
- [22] LIU W, WANG B, DUAN A, et al. Exosomal transfer of miR-769-5p promotes osteosarcoma proliferation and metastasis by targeting DUSP16[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 541.
- [23] CHANG M, YAN P, ZHANG B, et al. MicroRNA-769-5p promotes the growth of glioma cells by targeting lysine methyltransferase 2A[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 9177-9187.
- [24] QIU H J, LU X H, YANG S S, et al. MiR-769 promoted cell proliferation in human melanoma by suppressing GSK3B expression[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 82: 117-123.

(2022-11-08 收稿)