

miRNA-214 在乳腺癌组织中的表达及其意义

李 芳,翟从飏,田延锋,刘 肇,赵增仁,韩晓东
(河北医科大学第一医院,河北 石家庄 050031)

摘 要: [目的] 探讨 miRNA-214 在乳腺癌组织中的表达及其与临床病理特征及预后的关系。[方法] 应用实时定量 qPCR 检测 45 例乳腺癌及癌旁正常组织中 miRNA-214 的含量,分析其与临床病理特征、预后的关系。[结果] 乳腺癌组织中 miRNA-214 的含量明显低于癌旁正常组织,差异具有统计学意义 ($P<0.01$); miRNA-214 在 Ki-67 阴性组的表达量明显高于 Ki-67 阳性组,差异具有统计学意义 ($P=0.01$); miRNA-214 水平与患者的年龄、月经状况、临床分期、肿瘤大小、淋巴结转移、ER、PR、Her-2 及 p53 的表达均无关 ($P>0.05$)。[结论] miRNA-214 在乳腺癌组织中呈低表达,并与 Ki-67 表达相关,提示其可能与乳腺癌的发生、发展及预后有关。

关键词: miRNA-214; 乳腺癌; qPCR

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2016)10-0816-04

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2016.10.A014

Expression of miRNA-214 in Breast Cancer and Its Significance

LI Fang, ZHAI Cong-jie, TIAN Yan-feng, et al.

(First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, China)

Abstract: [Purpose] To explore the expression of miRNA-214 and the correlation between miRNA-214 and clinical pathologic features and prognosis in breast cancer. [Methods] The expression of miRNA-214 was examined by qPCR in 45 cases of breast cancer and normal tissue adjacent to carcinoma. Its relationship with clinical pathologic features and prognosis was analyzed. [Results] Compared with normal tissue, the expression of miRNA-214 decreased in breast cancer tissue, the difference was statistically significant ($P<0.01$). The expression of miRNA-214 in Ki-67 negative group was obviously higher than Ki-67 positive group, with statistically significant difference ($P=0.01$). The miRNA-214 level was irrelevant with the patient's age, menstrual status, clinical stage, tumor size, lymph node metastasis, ER, PR, Her-2 and p53 ($P>0.05$). [Conclusion] The miRNA-214 shows low expression in breast cancer, and relates to the expression of Ki-67, which suggests that miRNA-214 may be associated with the occurrence, development and prognosis of breast cancer.

Key words: miRNA-214; breast cancer; qPCR

乳腺癌目前已成为女性常见恶性肿瘤, 针对乳腺癌的治疗也进入了分子分型的时代, 这大大推动了乳腺癌的基础研究和对疾病控制。microRNA (也称为 miRNA) 是近年来发现的一种非编码 RNA, 作为重要的调控因子, miRNA 对细胞的生长、增殖、分化、凋亡等生命过程有重要的影响^[1]。miRNA 在乳腺癌发生发展过程中, 部分可作为原癌基因, 也有部分可作为抑癌基因起作用。研究表明 miRNA-214 在

多种恶性肿瘤中均有异常表达^[2-4]。本研究旨在探索 miRNA-214 在乳腺癌组织中的表达及与乳腺癌临床病理因素之间的关系。

1 资料与方法

1.1 材 料

1.1.1 临床标本

收集 2013 年 1 月至 2014 年 1 月 45 例来自河北医科大学第一医院、河北医科大学第四医院乳腺

收稿日期: 2015-11-14; 修回日期: 2015-12-27
基金项目: 河北省科技支撑计划项目 (14277755D)
通讯作者: 田延锋, E-mail: tianyanfeng1212@163.com

癌手术标本及其对应的癌旁正常组织,新鲜标本离体后迅速置于液氮中,于-80℃保存。年龄26~79岁(中位年龄52岁),术前未接受任何化疗、免疫治疗和放疗。按WHO(2003年)乳腺肿瘤分类标准对所有病例进行病理学分型,所有病理诊断均经两位高年资病理医师证实。

1.1.2 主要试剂和设备

Trizol试剂购自美国Invitrogen公司;反转录试剂盒、Real-time PCR试剂盒及引物均购自美国ABI公司。7500荧光定量PCR仪购自美国ABI公司。

1.2 方法

1.2.1 RNA提取

组织标本加入1ml Trizol于DEPC处理过的匀浆器中匀浆,室温下静置5min;加入200μl氯仿,振荡混匀后于冰上静置5min;4℃ 12 000r/min离心15min,吸取上层无色液相至另一管中,加入500μl异丙醇,室温下静置15min,4℃ 13 000r/min离心15min,可见RNA沉淀在管底部或侧壁。弃上清液,加75%乙醇1ml振荡器混匀,4℃ 7500r/min离心5min,弃上清液,室温干燥15min后用无RNA酶水溶解混匀。检测RNA溶液260nm及280nm处的吸光度值,计算RNA浓度和纯度,吸光度比值>1.8方可用于检测。

1.2.2 miRNA-214检测

采用实时定量qPCR检测患者组织中miRNA-214的表达,按照检测试剂盒说明书进行操作。根据TaqMan MicroRNA ReverseTranscription试剂盒说明书反转录成cDNA,反转录选用15μl反应体系:RNA sample 5μl,5X RT primer 3μl,100mM dNTPs 0.15μl,50U/μl MultiScribe™ Reverse Transcriptase 1μl,10X Reverse Transcription Buffer 1.5μl,20U/μl RNase inhibitor 0.19μl,Nuclease-free water 4.16μl。反应条件:16℃ 30 min,42℃ 30min,85℃ 5min。取反转录产物,按照TaqMan Universal PCR Master Mix, NoAmpErase UNG试剂盒说明书提供的方法在Real-time PCR AB7500仪上进行实时荧光定量PCR反应,以U6作为内参照。采用20μl反应体系:TaqMan Universal Master Mix 10μl,20X TaqMan Assay1μl,cDNA template 2μl,RNase-free water 7μl。反应条件为50℃ 2min,95℃ 10min,然后95℃ 15s,60℃ 1min,40个循环。根据待测标本的Ct值,以U6

作为内参照,采用定量PCR中的相对定量法,以 $N=2^{-\Delta CT}$ 表示标本中miRNA-214的相对表达量,其中 $\Delta CT=CT_{miRNA-214}-CT_{U6}$ 。

1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0统计软件进行统计分析。miRNA-214表达数据以P50(P25,P75)表示。配对样本间比较采用Wilcoxon符号秩检验,两组独立样本间比较采用Mann-Whitney U检验,多组独立样本间比较采用Kruskal-Wallis H检验, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miRNA-214在乳腺癌组织中的表达

乳腺癌组织中miRNA-214表达水平123.7636(27.4925,401.6886)明显低于乳腺癌旁组织412.6400(117.9420,1296.5002),差异有统计学意义($P<0.01$)(Figure 1)。

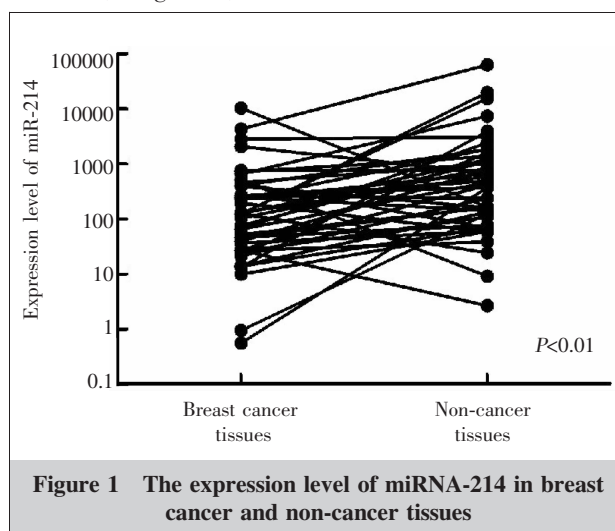


Figure 1 The expression level of miRNA-214 in breast cancer and non-cancer tissues

2.2 miRNA-214与乳腺癌临床病理特征的关系

miRNA-214在乳腺癌组织中的表达与Ki-67表达有关($P=0.01$),与患者的年龄、月经状况、临床分期、肿瘤大小、淋巴结转移、ER、PR、Her-2及p53的表达均无关($P>0.05$)(Table 1)。

3 讨论

越来越多的研究表明,miRNA在肿瘤发生发展中发挥着重要作用。它作为一类内源性非蛋白质编

Table 1 Association between the expression of miRNA-214 and clinicopathological features in patients with breast cancer

Clinicopathologic characteristics	N	miRNA-214[P50(P25, P75)]	P
Age(years)			0.204
≤52	23	233.7382(27.2220, 721.9696)	
>52	22	123.3116(27.2767, 235.7898)	
Menstrual status			0.522
Premenopause	16	114.7258(40.4491, 437.3247)	
Post-menopause	29	123.7636(26.2548, 333.4042)	
Grade			0.802
I	10	197.4050(21.2527, 516.1361)	
II	29	104.0229(32.0792, 247.3754)	
III	6	187.4672(35.1970, 2986.2360)	
Diameter			0.924
≤2cm	16	123.7572(24.3864, 437.3247)	
>2cm	29	123.7636(38.0486, 255.8997)	
Lymph node status			0.873
Positive	24	123.3116(29.9211, 362.6472)	
Negative	21	124.6549(25.1549, 427.1244)	
Her-2			0.886
Negative	18	94.3342(23.0610, 1090.1994)	
Positive	26	125.0418(38.8752, 263.0103)	
Missing data	1		
ER			0.412
Negative	12	123.3116(32.4759, 178.0301)	
Positive	32	181.9622(29.5153, 458.2856)	
Missing data	1		
PR			0.242
Negative	17	104.0229(27.4925, 164.4127)	
Positive	27	233.7382(39.7019, 461.8725)	
Missing data	1		
p53			0.420
Negative	30	113.4413(26.4733, 399.1710)	
Positive	14	125.0418(51.2634, 451.1118)	
Missing data	1		
Ki-67			0.010
Negative	14	358.8400(102.7481, 1090.1994)	
Positive	30	71.1631(26.4733, 233.8341)	
Missing data	1		

码的 RNA 分子,广泛分布于病毒、植物和高等哺乳动物中。miRNA 具有序列保守性、严格的时空性和组织特异性。大量的研究证实 miRNA 在卵巢癌^[5]、肺癌^[6]、胰腺癌^[7]、结直肠癌^[8]、宫颈癌^[9]、Burkitt 淋巴瘤和慢性淋巴细胞白血病^[10,11]等多种恶性肿瘤中表达失调。在肿瘤的发生、发展过程中,它们可能起到原癌基因和抑癌基因的作用。乳腺癌是一种多基因遗传性疾病,其发病机制复杂,同样也接受 miRNA

的调控作用。

miRNA-214 基因在染色体上的位置为 1q24.3,它与肿瘤密切相关^[12,13]。Huang 等^[2]在对食管鳞癌的研究中发现 miRNA-214 在高分化组、T₁/T₂ 组及无淋巴结转移组的表达高于低分化组、T₃/T₄ 组和伴有淋巴结转移组。Shih 等^[3]的研究表明,肝细胞肝癌中 miRNA-214 表达下调与复发和预后差密切相关。另有研究表明,miRNA-214 在宫颈癌组织中的表达水平明显低于正常组织^[4]。而在胰腺癌和卵巢癌中,miRNA-214 的高表达促进了癌细胞的存活并增强癌细胞的化疗耐药性^[11,14],还有研究发现 miRNA-214 对黑色素瘤细胞的转移和侵袭具有促进作用^[15]。

本研究采用实时定量 qPCR 法检测了乳腺癌组织及癌旁正常组织中 miRNA-214 的表达情况,发现 miRNA-214 在乳腺癌组织的表达明显低于配对的癌旁组织,差异有统计学意义,表明 miRNA-214 的下调可能与乳腺癌的发生有关,其在乳腺癌的发生中可能发挥抑癌基因的作用。本研究还显示,miRNA-214 在乳腺癌组织中的表达与患者的年龄、月经状况、临床分期、肿瘤大小、淋巴结转移及大部分免疫组化指标如 ER、PR、Her-2 及 p53 的表达均无关 ($P>0.05$),但与 Ki-67 表达有关。Ki-67 作为一种与细胞分裂增殖有关的核蛋白,已广泛应用于各种肿瘤的诊断及预后的判断,与乳腺癌的恶性程度呈正相关,与肿瘤的生长、侵袭及转移能力密切相关,是一个不良的预后因素,同时还可以作为乳腺癌化疗敏感性指标,对乳腺癌的诊断及预后评价有重要的参考价值^[16,17]。而 miRNA-214 与 Ki-67 相关提示 miRNA-214 的高表达可能与乳腺癌较好的预后有关。

综上所述,miRNA-214 可能在乳腺癌的发生、发展过程中具有重要的作用,有潜力作为一个新的预测乳腺癌的诊断及预后的分子生物学指标。若能通过进一步研究其在乳腺癌中的作用机制,寻找抗肿瘤药物可为抗肿瘤治疗提供一个新思路和治疗

靶点,从而达到阻止肿瘤发展及转移的目的。

参考文献:

- [1] Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, et al. Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila[J]. Cell, 2003, 113(1): 25–36.
- [2] Huang SD, Yuan Y, Zhuang L, et al. MicroRNA-98 and microRNA-214 post-transcriptionally regulate enhancer of zeste homolog 2 and inhibit migration and invasion in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. Mol Cancer, 2012, 11: 51.
- [3] Shil TC, Tien YJ, Wen CJ, et al. MicroRNA-214 downregulation contributes to tumor angiogenesis by inducing secretion of the hepatoma-derived growth factor in human hepatoma[J]. J Hepatol, 2012, 57(3): 584–591.
- [4] Yang Z, Chen S, Luan X, et al. MicroRNA-214 is aberrantly expressed in cervical cancers and inhibits the growth of HeLa cells[J]. IUBMB Life, 2009, 61(11): 1075–1082.
- [5] Miles GD, Seiler M, Rodriguez L, et al. Identifying microRNA/Mrna dysregulations in ovarian cancer [J]. BMC Res Notes, 2012, 5(1): 164.
- [6] Zhou Z, Niu XM, Li CJ, et al. Inhibition of the growth of non-small cell lung cancer by miRNA-1271 [J]. Am J Transl Res, 2015, 7(10): 1917–1924.
- [7] Laurila EM, Sandström S, Rantanen LM, et al. Both inhibition and enhanced expression of miR-31 lead to reduced migration and invasion of pancreatic cancer cells[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2012, 51(6): 557–568.
- [8] Ren A, Dong YJ, Tsoi H, et al. Detection of miRNA as non-invasive biomarkers of colorectal cancer [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(2): 2810–2823.
- [9] Han Y, Xu GX, Lu H, et al. Dysregulation of miRNA-21 and their potential as biomarkers for the diagnosis of cervical cancer [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(6): 7131–7139.
- [10] Kluiver J, Haralambieva E, de Jong D, et al. Lack of BIC and microRNA miR-155 expression in primary cases of Burkitt lymphoma [J]. Genes Chromosomes Cancer, 2006, 45(2): 147–153.
- [11] Eis PS, Tam W, Sun L, et al. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(10): 3627–3632.
- [12] Yang H, Kong W, He L, et al. MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN [J]. Cancer Res, 2008, 68(2): 425–433.
- [13] Ueda T, Volinia S, Okumura H, et al. Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis [J]. Lancet Oncol, 2010, 11(2): 136–146.
- [14] Zhang XJ, Ye H, Zeng CW, et al. Dysregulation of miR-15a and miR-214 in human pancreatic cancer [J]. J Hematol Oncol, 2010, 3: 46.
- [15] Penna E, Orso F, Cimino D, et al. microRNA-214 contributes to melanoma tumour progression through suppression of TFAP2C [J]. EMBO J, 2011, 30(10): 1990–2007.
- [16] Keam B, Im SA, Lee KH, et al. Ki-67 can be used for further classification of triple negative breast cancer into two subtypes with different response and prognosis [J]. Breast Cancer Res, 2011, 13(2): R22.
- [17] Kim KI, Lee KH, Kim TR, et al. Ki-67 as a predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients [J]. J Breast Cancer, 2014, 17(1): 40–46.

关于开具版面费发票提供税号的通知

由于营改增的实施,从2016年5月起,本刊的版面费发票改为国税发票,如您的版面费发票台头为贵单位名称,需提供贵单位的税号或组织机构代码证号,请您在百忙中,向贵单位财务部门咨询一下!并在本刊投稿网站作者版面费登记栏中,完善税号登记信息,以便本刊开具发票;如果您的版面费发票台头是个人,则不需税号。谢谢合作!

《中国肿瘤》编辑部
2016–5–16