

microRNA 表达与乳腺癌患者临床特征的关系

赵芳¹, 王静², 余建军³, 施露露¹, 刘兰¹

(1.宁夏医科大学公共卫生与管理学院, 宁夏 银川 750001; 2.天津医科大学临床医学院, 天津 300070; 3.宁夏人民医院, 宁夏 银川 750001)

摘要: [目的] 探讨 Let-7a、miRNA-125b、miRNA-145、miRNA-21 和 miRNA-155 在乳腺癌组织和乳腺良性组织中的差异表达, 分析其表达水平与患者临床特征的相关性。[方法] 采用 ViiA™7 实时荧光定量 PCR 系统对 miRNAs 的表达水平进行检测。[结果] Let-7a 和 miRNA-145 在乳腺癌组织中的表达低于良性组织, 差异有统计学意义 ($P=0.000$)。Let-7a、miRNA-125、miRNA-155、miRNA-21、miRNA-145 的相对表达量在不同临床分期乳腺癌组织中表达差异无统计学意义。乳腺癌组织中 let-7a、miRNA-125、miRNA-145 的相对表达量在不同的 ER、PR、HER-2 组中差异均无统计学意义。乳腺癌组织中 miRNA-155 的相对表达量在不同的 PR 组 ($P=0.009$) 中差异有统计学意义; 乳腺癌组织中 miRNA-21 的相对表达量在不同的 PR 组 ($P=0.037$) 中差异有统计学意义。[结论] miRNA-145 和 let-7a 在乳腺癌组织中表达下调可能与乳腺癌的发生有关。miRNA-155、miRNA-21 表达可能与 PR 有关。

关键词: 乳腺癌; microRNA; 临床病理

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2016)12-1013-05

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2016.12.A014

MicroRNA Expression and Its Relationship with Clinicopathological Characteristics of Patients with Breast Cancer

ZHAO Fang¹, WANG Jing³, YU Jian-jun², et al.

(1.Ningxia Medical University, Yinchuan 750001, China; 2.Tianjin Medical University Clinical Medical School, Tianjin 300070, China; 3.Ningxia Hui Autonomous Region People's Hospital, Yinchuan 750001, China)

Abstract: [Purpose] To discuss the expression of Let-7a, miRNA-125b, miRNA-145, miRNA-21 and miRNA-155 in breast cancer tissue and benign breast tissue and clinicopathological characteristics of patients with breast cancer. [Methods] ViiA™7 real-time fluorescence quantitative PCR system was used to detect the expression levels of miRNA. [Results] Agent let-7a and miRNA-145 was lower in breast cancer tissue than that in the benign group, the difference was statistically significant ($P=0.000$). There was no significant difference of Let-7a, miRNA-125, miRNA-155, miRNA-21, and miRNA-145 in different clinical stages in breast cancer tissue. Relative expression of miRNA-155 in breast cancer tissue in PR group was statistically significant ($P=0.009$). Relative expression of miRNA-21 in PR group was statistically significant ($P=0.037$). [Conclusion] Deregulation of miRNA-145 and let-7a in breast cancer tissue may be associated with the occurrence of breast cancer. The expression of miRNA-155 and miRNA-21 may be associated with PR.

Key words: breast cancer; microRNA; clinical pathology

乳腺癌的发生发展是一个复杂的过程, 受环境因素和遗传因素的共同作用。对乳腺癌病因的探究一直是肿瘤流行病学关注的热点。由于不同人群在遗传、环境和生活方式等方面有显著差异, 乳腺癌的发生、发展及作用机制可能会有不同的表现形式。对

于其研究更多的关注于微观流行病学研究, 比如基因多态性、非编码 RNA 研究等。研究证实 miRNA 参与癌基因激活和抑癌基因失活的调节, 逐渐成为诸多癌症发生发展过程中的潜在分子标志物, 并有望用于癌症的防治^[1]。本文通过 miRNA (TIANGEN) 荧光定量检测方法 (AB7500) 检测 49 例乳腺疾病组织中 Let-7a、miRNA-125b、miRNA-145、miRNA-21 和 miR-

收稿日期: 2016-03-22; 修回日期: 2016-04-19

基金项目: 宁夏自然科学基金 (NZ14071)

通讯作者: 刘兰, E-mail: liulan-162@163.com

NA-155 表达与乳腺癌患者临床病理特征的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2014 年 9 月至 2015 年 10 月在宁夏人民医院就诊入院的女性乳腺癌患者乳腺微创外科手术切除的新鲜乳腺组织标本,术后经病理检查确诊的癌组织和良性组织。所有组织在离体 30min 以内置于事先装有 RNAlater 的进口 1.5ml 洁净冻存管,每份组织大小约 0.5cm×0.5cm×0.5cm,并且用油性记号笔在冻存管外表处写明样本编号,立即放入液氮冻存后转入-80℃冰箱中保存。所有患者均是在宁夏地区居住 10 年及以上,新发的良、恶性乳腺病例,且排除精神疾病患者和临终患者、近 3 个月内有激素使用史、近 1 年内有口服避孕药史、患有其他恶性肿瘤病史。所有乳腺癌组织 TNM 分期以美国癌症联合委员会(AJCC)/国际抗癌联盟(UICC)乳腺癌 TNM 分期系统(第 6 版)为标准。

1.2 主要试剂与仪器

RNAstore 样本保存液(100ml),Storage:RT(15℃~25℃)(天根)。Trizol 裂解液、三氯甲烷、异丙醇、75%酒精;miRcute miRNA cDNA 第一链合成试剂盒,货号 KR201-02(天根);miRcute miRNA 荧光定量检测试剂盒,货号 FP401-02(天根)。4℃离心机、AB 普通 PCR 仪,实时荧光定量 ViiA™7。

1.3 组织总 RNA 提取

剪下适量组织块放于离心管中,取 1ml 生理盐清洗组织,转移至匀浆套管中加入 1ml Trizol 试剂匀浆套管中,电动匀浆至无组织块可见(2~3 min)。将套管中的匀浆液移入 1.5ml 离心管,室温静置 10min,使其充分裂解。4℃,12 000rpm(13 800g)离心 10min,将上清移至新 1.5 ml 离心管,弃沉淀。在上清中按 200μl 氯仿/ml Trizol 加入氯仿,用手振荡混匀后室温放置 15min。然后按照总 RNA 抽提试剂盒说明书提取总 RNA。加入约 40μl RNase-free 水(约 1μg RNA/μl RNase-free 水),用手轻弹管壁,溶解 RNA 样品,RNA 样品中加入 RNA 保护剂,-80℃保存。测 OD 值定量 RNA 浓度,保存

于-20℃冰箱用于后续实验。根据 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值判断 RNA 纯度,均处在 1.8~2.1 之间,表示 RNA 纯度高。

1.4 荧光定量检测

根据 cDNA 逆转录试剂盒说明书逆转录成 cDNA:反应体系(总体积 20μl)包括 TotalRNA13.6μl、10× Poly(A) Polymerase Buffer 2μl、5×rATP Solution 4μl、E.coliPoly(A) Polymerase(5U/μl) 0.4μl,短暂离心后在 37℃反应 60 min。Poly(A)修饰的 miRNA 进行逆转录反应:短暂离心后在 37℃反应 60min,合成的 cDNA 直接进行下游荧光定量检测。

利用荧光定量检测试剂盒(FP401)在实时荧光定量 ViiA™ 7PCR 系统进行荧光定量,内参照采用 U6,引物由天根公司提供,引物序列见 Table 1。适时荧光定量反应体系(20μl)反应条件:94℃ 20s,60℃ 34s,重复 40 个循环。

1.5 结果判读

本实验采用 2^{-ΔΔCt} 法分析表达量的大小,用 2^{-ΔΔCt} 值来表示目的基因在癌组织中的表达量是良性组织的多少倍,是相对定量的方法,2^{-(Average ΔCt)} 是以 2 为底数,Average ΔCt 为指数的变化结果,其中 Ct 是 PCR 仪检测到反应体系中荧光信号达到阈值的循环数,计算得到 ΔΔCt 后再计算 2^{-ΔΔCt} 值。

1.6 统计学处理

采用 RT² Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5 和 SPSS 17.0 软件进行 microRNAs 差异表达分析和。分类变量采用 χ² 检验,数值变量采用 t 检验。P 值的计算依据病例组与对照组中每个 microRNA 的 replicate 2^{-ΔCt} 值的 t 检验,P<0.05 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象的临床资料

本次共收集标本 49 例,其中病例组(乳腺癌组)24 例,对照组(乳腺良性组)25 例,患者均为宁夏居

Table 1 The experimental sequence primers

Cat.NO.	miRNA full name	miRBase number	miRNA mature sequence
CD201-0386	Has-let-7a-5p	MIMAT0000062	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
CD201-0047	Has-miR-125b-5p	MIMAT0000423	UCCCUAGAGACCCUAACUUGUGA
CD201-0074	Has-miR-155-5p	MIMAT0000646	UUAAGUCUAAUCCGUAUAGGGGU
CD201-0092	Has-miR-21-5p	MIMAT0000076	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
CD201-0012	Has-miR-145-5p	MIMAT0000437	GUCCAGUUUCCCCAGGAUCCCU

住 10 年及以上新发良恶性女性乳腺癌患者,且排除精神疾病和临终患者、近 3 个月内有激素使用史、近 1 年内有口服避孕药史、患有其他恶性肿瘤病史。乳腺良性组 X 线摄影检查阳性者,进一步进行超声检查,超声检查阳性和可疑者再进行病理诊断,经病理诊断排除恶性肿瘤者纳入良性组。平均年龄为 44.24 ± 14.82 岁。所有标本的临床资料通过查阅电子病历获得,浸润性导管癌 23 例,原位癌 1 例,其中有淋巴转移 8 例,无淋巴转移 16 例;左侧 6 例,右侧 16 例,双侧 2 例;肿瘤 TNM 分期 I 期 4 例,II 期 12 例和 III 期 8 例。乳腺癌患者免疫组化监测 ER、PR 及 HER-2 表达情况:ER 阴性 3 例,阳性按照染色程度分为弱阳性(+)8 例、阳性(++)10 例、强阳性(+++)4 例。PR 阴性 8 例,阳性按染色程度分为弱阳性(+)4 例、阳性(++)6 例、强阳性(+++)6 例。HER-2 阴性 9 例,阳性按染色程度分为弱阳性(+)7 例、阳性(++)4 例、强阳性(+++)4 例。

2.2 miRNAs 在病例组与对照组中的表达差异

miRNAs 在乳腺癌组织和乳腺良性组织的表达情况比较采用两独立样本的 t 检验,以 U6 为内参基因为对照,比较其 $-\Delta Ct$ 值,所有的 $-\Delta Ct$ 值符合正态分布。结果显示:let-7a 和 miR-145 在乳腺癌组织中的表达低于良性组织,差异有统计学意义 ($P=0.000$);miR-125、miR-155、miR-21 在乳腺癌组织与乳腺良性组织中的表达差异无统计学意义 ($P>0.05$) (Table 2)。

研究乳腺组织中 miRNA 相对表达量与患者年龄的关系,结果显示:let-7a、miR-145 的表达与患者年龄相关 ($P<0.05$) (Table 3)。

2.3 miRNAs 在乳腺癌组织中相对表达量与乳腺癌患者临床病理特征的关系

Let-7a、miR-125、miR-155、miR-21、miR-145 的相对表达量在不同临床分期

乳腺癌组织中表达差异无统计学意义 (Table 4)。

乳腺癌组织中 let-7a 的相对表达量在不同的 ER ($P=0.408$)、PR ($P=0.726$)、HER-2 ($P=0.519$) 组中差异均无统计学意义;乳腺癌组织中 miR-125 相对表达量在不同的 ER ($P=0.102$)、PR ($P=0.052$)、HER-2 ($P=0.227$) 组中差异均无统计学意义。乳腺癌组织中 miR-155 相对表达量在不同的 ER ($P=0.092$)、HER-2 ($P=0.511$) 组中差异均无统计学意义,而在不同的 PR ($P=0.009$) 组中差异有统计学意义。乳腺癌组织中 miR-21 的相对表达量在不同的 ER ($P=0.967$)、HER-2 ($P=0.126$) 组中差异均无统计学意义,但是在不同的 PR 组 ($P=0.037$) 组中差异有统计学意义。乳腺癌组织中 miR-145 的相对表达量在不同的 ER ($P=0.218$)、PR ($P=0.319$)、HER-2 ($P=0.371$) 组中差异均无统计学意义 (Table 5)。

3 讨论

微小 RNA 作为近年研究热点,已被发现可作为

Table 2 Expression of miRNAs in two groups

Group	2 ⁻ (-Average ΔCt)				
	let-7a	miR-125b	miR-155	miR-21	miR-145
Breast cancer tissue	1.76 ± 1.66	2.28 ± 1.10	3.64 ± 2.16	-0.89 ± 1.56	-1.62 ± 1.39
Breast benign group	-1.87 ± 1.79	1.89 ± 1.72	3.01 ± 1.99	-1.05 ± 2.15	-4.16 ± 1.50
t	7.420	0.886	0.780	0.262	6.127
P value	0.000	0.136	0.889	0.182	0.000

Table 3 Relationship of miRNA expression in breast cancer tissue with different ages of patient

Age	N	2 ⁻ (-Average ΔCt)				
		let-7a	miR-125b	miR-155	miR-21	miR-145
<53	36	-0.74 ± 2.38	2.17 ± 1.54	3.37 ± 2.02	-1.09 ± 1.72	-3.37 ± 1.86
≥ 53	13	1.78 ± 2.02	2.02 ± 1.19	3.33 ± 2.20	-0.71 ± 2.20	-1.65 ± 1.53
t		-3.382	0.356	0.046	-0.636	-2.992
P value		0.001	0.721	0.963	0.528	0.004

Table 4 Relative expression of miRNAs in breast cancer tissue between the clinical staging

Clinical staging	N	2 ⁻ (-Average ΔCt)				
		Let-7a	miR-125	miR-155	miR-21	miR-145
I	4	4.01 ± 1.14	0.19 ± 1.12	0.18 ± 0.74	0.07 ± 1.73	2.50 ± 2.54
II	12	4.01 ± 2.52	0.22 ± 2.26	-0.06 ± 3.30	0.18 ± 2.71	3.13 ± 2.07
III	8	3.57 ± 1.78	0.59 ± 1.94	0.84 ± 2.90	1.46 ± 2.11	2.46 ± 2.36
F		0.114	0.095	0.231	1.168	0.261
P value		0.893	0.910	0.796	0.330	0.773

Table 5 Relative expression of miRNAs in breast cancer tissue in patients with hormone receptor expression

Receptor type			2 ⁻ (-Average Δ Ct)				
			Let-7a	miR-125	miR-155	miR-21	miR-145
ER	-	3	3.55±1.32	-1.55±1.14	-0.25±1.80	0.99±0.37	1.19±1.61
	+	7	4.99±2.21	1.61±1.69	2.44±2.13	0.12±2.76	4.09±2.08
	++	10	3.40±2.17	0.13±2.03	-0.98±3.11	0.36±2.80	2.62±2.38
	+++	4	3.28±1.78	0.04±1.60	0.04±2.14	0.58±2.30	2.21±1.25
<i>P</i>			0.408	0.102	0.092	0.967	0.218
PR	-	8	3.54±2.45	-0.87±1.96	-0.98±2.44	-0.84±2.39	1.96±2.75
	+	4	4.77±2.53	0.02±2.18	1.02±2.60	-1.82±2.21	2.18±1.18
	++	6	4.17±1.11	1.92±1.03	3.11±1.70	2.39±0.49	4.05±2.09
	+++	6	3.38±2.17	0.59±1.63	-1.38±2.37	0.56±2.57	3.08±1.54
<i>P</i>			0.726	0.052	0.009	0.037	0.319
HER-2	-	9	4.29±2.08	0.59±1.70	-0.33±2.72	0.49±2.24	3.53±2.37
	+	7	3.83±1.43	1.28±1.57	1.68±1.92	1.18±1.75	3.11±1.74
	++	4	2.49±1.65	-0.84±1.63	-0.22±3.06	0.99±0.37	1.68±2.32
	+++	4	4.36±3.26	-0.70±2.87	-0.30±4.29	0.12±2.76	1.71±2.12
<i>P</i>			0.519	0.227	0.511	0.126	0.371

多种肿瘤的检测或潜在的诊断标志物,广泛存在于动植物及病毒中,通过与位于靶基因的 mRNA 3' UTR 区域的结合位点完全或不完全互补配对结合,促进 mRNA 降解和/或抑制翻译过程,被证实广泛参与癌细胞的增殖、侵袭、转移、耐药等病理进程,并与乳腺癌组织学分级、临床分期和淋巴结转移等密切相关^[2,3]。

研究显示,肿瘤组织普遍具有特征性的 miRNA 表达谱,能够作为癌症的生物学标志。Iorio 等^[4]应用微阵列芯片从乳腺癌组织和细胞株中筛选出在乳腺癌中异常表达的 miRNA 谱,发现有 12 种 miRNA 表达下调,改变最明显的是 miR-125b、miR-145、miR-21 和 miR-155。Huang 等^[5]应用组织微阵列平台,采用原位分子杂交技术检测乳腺癌组织和癌旁组织的 42 种 miRNA,再通过芯片扫描和数据分析,获得了人乳腺癌 miRNA 表达谱。结果发现,与癌旁组织相比,14 种 miRNA 表达在乳腺癌组织中发生显著变化 ($P<0.05$),其中 9 种(miR-15b、miR-20、miR-28、miR-98、miR-29b、miR-152、miR-197、miR-21、miR-030e)表达上调,5 种(miR-145、miR-155、miR-133、let-7d、let-7g)表达下调。本次研究中 miR-145 表达下调与以上 Iorio 和 Huang 的研究相一致。Jiang 等^[6]也发现 miR-145 和 miR-155 的表达在乳腺癌组织中减少。我国学者黄秀芳等^[7]、刘晶晶等^[8]也采用 miRNA 芯片对乳腺癌组织与细胞株 miRNA 差异表达进行研究,研究表明 miRNA 在乳腺癌组织中的表达谱对乳

腺癌的诊断有着重要价值。

本次研究显示,let-7a 和 miR-145 在乳腺癌组织中的表达低于良性组织 ($P=0.000$); Let-7a、miR-125、miR-155、miR-21、miR-145 的相对表达量在不同临床分期乳腺癌组织中表达差异无统计学意义。乳腺癌组织中 let-7a、miR-125、miR-145 的相对表达量在不同的 ER、PR、HER-2 组中差异均无统计学意义。乳腺癌组织中 miR-155 的相对表达量在不同的 PR ($P=0.009$) 组中差异有统计学意义;乳腺癌组织中 miR-21 相对表达量在不同的 PR ($P=0.037$) 组中差异有统计学意义,提示 miR-145 和 let-7a 在乳腺癌组织中表达下调可能与乳腺癌的发生有关。miR-155、miR-21 的表达高低可能与 PR 有关。ER 与 PR 均属于核受体超家族中的甾体激素受体,在临床上,ER 和 PR 作为癌细胞激素依赖因子,从而作为乳腺癌的重要预后因素。

参考文献:

- [1] Liu ZH, Zhang XS. MicroRNAs and breast cancer [J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2014, 42(2): 87-94. [刘芝华, 张绪森. microRNAs 与乳腺癌 [J]. 中国肿瘤临床, 2014, 42(2): 87-94.]
- [2] Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, et al. Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer [J]. Ann Surg, 2010, 251(3): 499-505.
- [3] ÓDay E, Lal A. MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer [J]. Breast Cancer Res, 2010, 12(2): 201.
- [4] Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer [J]. Cancer

- Res, 2005, 65(16): 7065-7070.
- [5] Huang J, Wu ZS, Zhang Q, et al. MicroRNA expression profile in breast cancer[J]. J Clin Exp Pathol, 2010, 26: 173-177.
- [6] Jiang S, Zhang HW, Lu MH, et al. MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene[J]. Cancer Res, 2010, 70(8): 3119-3127.
- [7] Huang XF, Shao JY, Yan LX, et al. Breast cancer screening of differential expression of miRNAs [J]. Journal of Sun Yat-sen University (Medical Sciences), 2009, 30(1): 69-73. [黄秀芳, 邵建永, 颜黎栩, 等. 乳腺癌差异表达的 MicroRNA 的筛选研究[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2009, 30(1): 69-73.]
- [8] Liu JJ, He XC, Liu Y, et al. The preliminary study of miRNAs expression of breast cancer[J]. Tianjin Medical Journal, 2009, 37(11): 913-916. [刘晶晶, 郝晓瓷, 刘艳, 等. 乳腺癌 microRNA 表达谱的初步研究[J]. 天津医药, 2009, 37(11): 913-916.]
- [9] Zhu SF. Research progress of small RNA in breast cancer [J]. Chongqing Medical Journal, 2015, 44(2): 266-267. [朱顺飞. 微小 RNA 在乳腺癌中的研究进展[J]. 重庆医学, 2015, 44(2): 266-267.]
- [10] Chen MT, Zhao HY, Yang WM, et al. The miRNA-373 expression in breast cancer and its clinical significance[J]. Maternal and Child Health Care of China, 2016, 31(1): 159-161. [陈梦婷, 赵洪远, 杨伟明, 等. miRNA-373 在乳腺癌中的表达及其临床意义[J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(1): 159-161.]
- [11] Kong W, Li C, Li Z, et al. Based on the miRNA regulation network study its role in breast cancer pathology classification [J]. Journal of Hebei Normal University (JCR Science Edition), 2015, 35 (5): 435-442. [孔薇, 李晨, 李珍, 等. 基于 miRNA 调控网络研究其在乳腺癌病理学分型中的作用 [J]. 河北师范大学学报 (自然科学版), 2015, 35(5): 435-442.]
- [12] Cui M, Xiao MY, Qiao D, et al. Real-time fluorescent quantitative RT-PCR detection of the miRNA-126 expression in breast tissue [J]. Clinical General Surgery Electronic Magazine, 2015, 3(2): 19-21. [崔明, 肖茗耀, 乔丹, 等. 实时荧光定量 RT-PCR 检测乳腺组织中 miRNA-126 的表达水平[J]. 临床普外科电子杂志, 2015, 3(2): 19-21.]

中国百篇最具影响学术论文发布

2016年10月12日,中国科学技术信息研究所发布2016年度中国科技论文统计结果,中国医学科学院肿瘤医院两篇文章入选2015年中国百篇最具影响国际学术论文。百篇最具影响国际学术论文产生自2015年表现不俗的论文,即在每个学科领域内,论文被引用次数高于年度世界平均水平的论文为“表现不俗”论文,表示论文发表后的影响超过其所在学科的世界平均水平。以此为基础结合论文的创新性、发表论文的期刊水平、是否处于研究前沿、合著论文中我国作者的主导性、论文的文献类型以及论文的参考文献情况选取。此外,中国科学技术信息研究所发布2016年度中国科技论文统计结果显示,有1篇中文论文入选《中国百篇最具影响国内学术论文》。

附1:入选中国百篇最具影响国际学术论文名单

论文题目:Annual report on status of cancer in China, 2011

第一作者:Chen Wanqing(陈万青)

通讯作者:He Jie(赫捷)

来源期刊:Chinese Journal of Cancer Research, 2015, 27(1): 2-12

被引次数:84

论文题目:Cancer survival in China, 2003-2005: a population-based study

第一作者:Zeng Hongmei(曾红梅)

通讯作者:Chen Wanqing(陈万青)

来源期刊:International Journal of Cancer, 2015, 136(8): 1921-1930

被引次数:47

附2:入选中国百篇最具影响国内学术论文

论文题目:2011年中国恶性肿瘤发病和死亡分析

第一作者:陈万青

通讯作者:赫捷

发表期刊:中国肿瘤, 2015, 24(01): 1-10

被引次数:81

(郑荣寿供稿)