

## 讨 论

现有的研究表明 miRNAs 的表达差异与人体的多个系统的肿瘤(呼吸系统、循环系统、生殖系统等)关系密切,另外有学者发现 microRNA - 21 可靶向作用于多种基因,包括 TPM1 (tropomyosin1)、PDCD4 (programmed cell death 4) 和 TGF - B1 (human transforming growth factor B1) 发挥生物学作用<sup>[11,12]</sup>。MicroRNA - 21 通过与其靶基因的 3' 端非编码区结合,并遏制其表达导致肿瘤产生。这为进一步研究 microRNA - 21 提供了方向,通过对靶基因的预测,研究其发生机制,从而为分子靶向治疗、生物治疗等提供依据。相关研究发现,微小 RNA (microRNAs, miRNAs) 分子调控着人体基因组内约 1/3 的基因表达,其表达与乳腺癌的进展相关<sup>[13-16]</sup>。研究表明,miRNAs 通过转录后水平参与了其凋亡、增殖、转移治疗抵抗和乳腺癌干细胞的肿瘤形成。同时研究所用外周血比较容易获取,血清检测操作方便,有利于大范围临床推广应用。研究表明,miRNAs 在血清中较稳定,长期存在,耐 RNA 酶的降解,耐煮沸、反复冻融、酸碱环境等,这样长期保存不会造成血清 miRNAs 的损失。

本研究应用运用荧光定量 PCR 的技术检测 microRNA - 21 在乳腺癌和正常人血清中的表达情况,并收集相应病例的临床病理资料进行统计分析,所得结果发现 microRNA - 21 在乳腺癌患者中血清中的相对表达量明显高于正常对照组 ( $P < 0.05$ ), microRNA - 21 的过高表达与临床分期、腋窝淋巴结转移情况具有相关性 ( $P < 0.05$ ), 而与患者年龄、月经状况、ER、PR、C - erbB - 2 受体的表达以及肿瘤大小没有明显相关性 ( $P > 0.05$ )。本实验统计分析 TNM 分期的时候发现 I 期与 II 期之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 这与其他相关研究肿瘤组织的结果不尽相同,可能是由于本次研究所纳入的乳腺癌的病例数量不足所致。本研究只是一个初步的探索,在以后的研究过程中会吸取经验教训,组织进行大规模大样本的多中心研究论证。

## 参考文献

- 1 Krichevsky AM, Gabriely G. MiR - 21: a small multi - faceted RNA [J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(1): 39 - 53
- 2 Sota A, Christine K, Tung N, *et al.* Direct serum assay for microRNA

- 21 concentrations in early and advanced breast cancer [J]. *Clinical Chemistry*, 2011, 57(1): 84 - 91
- 3 Yan LX, Wu QN, Zhang Y, *et al.* Knockdown of miR - 21 in human breast cancer cell lines inhibits proliferation, in vitro migration and in vivo tumor growth [J]. *Breast Cancer Res*, 2011, 13(1): 22 - 30
- 4 Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, *et al.* MicroRNA - 21 (miR - 21) post - transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer [J]. *Oncogene*, 2008, 27(15): 2128 - 2136
- 5 Li T, Li D, Sha J, *et al.* MicroRNA - 21 directly targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 383(3): 280 - 285
- 6 Zhu S, Wu H, Wu F, *et al.* MicroRNA - 21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis [J]. *Cell Res*, 2008, 18(3): 350 - 359
- 7 Zheng J, Xue H, Wang T, *et al.* MiR - 21 downregulates the tumor suppressor P12 CDK2AP1 and stimulates cell proliferation and invasion [J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(3): 872 - 880
- 8 Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, *et al.* Circulating microRNAs as stable blood - based markers for cancer detection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(30): 10513 - 10518
- 9 Ahmed IS, Chamberlain C, Craven RJ. S2R (Pgrmc1): the cytochrome - related sigma - 2 receptor that regulates lipid and drug metabolism and hormone signaling [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2012, 8(3): 361 - 370
- 10 Xu J, Zeng C, Chu W, *et al.* Identification of the PGRMC1 protein complex as the putative sigma - 2 receptor binding site [J]. *Nat Commun*, 2011, 2: 380
- 11 Zhu S, Si ML, Wu H, *et al.* MicroRNA - 21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1) [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(19): 14328 - 14336
- 12 Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, *et al.* Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR - 21 in breast cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(2): 1026 - 1033
- 13 Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets [J]. *Cell*, 2005, 120(1): 15 - 20
- 14 Esquela - Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(4): 259 - 269
- 15 Le Quesne J, Caldas C. Micro RNAs and breast cancer [J]. *Mol Oncol*, 2010, 4(3): 230 - 241
- 16 Yu Z, Baserga R, Chen L, *et al.* MicroRNA, cell cycle, and human breast cancer [J]. *Am J Pathol*, 2010, 176(3): 1058 - 1064

(收稿日期: 2013 - 11 - 30)

(修回日期: 2013 - 12 - 30)

者中的安全性仍需大样本、高质量 RCT 进一步验证。

参考文献

- 1 Calabro P, Bianchi R, Crisci M, *et al.* Use and efficacy of saline hydration and N - acetyl cysteine to prevent contrast - induced nephropathy in low - risk populations undergoing coronary artery angiography [J]. *Intern Emerg Med*,2011,6(6):503 - 507
- 2 Chang CF, Lin CC. Current concepts of contrast - induced nephropathy: A brief review[J]. *J Chin Med Assoc*,2013,76(12):673 - 681
- 3 Neyra JA, Shah S, Mooney R, *et al.* Contrast - induced acute kidney injury following coronary angiography: a cohort study of hospitalized patients with or without chronic kidney disease [J]. *Nephrol Dial Transplant*,2013,28(6):1463 - 1471
- 4 Naziroglu M, Yoldas N, Uzgur EN, *et al.* Role of contrast media on oxidative stress, Ca(2+) signaling and apoptosis in kidney[J]. *J Membr Biol*,2013,246(2):91 - 100
- 5 Solomon RJ, Natarajan MK, Doucet S, *et al.* Cardiac Angiography in Renally Impaired Patients (CARE) study: a randomized double - blind trial of contrast - induced nephropathy in patients with chronic kidney disease[J]. *Circulation*,2007,115(25):3189 - 3196
- 6 Wessely R, Koppara T, Bradaric C, *et al.* Choice of contrast medium in patients with impaired renal function undergoing percutaneous coronary intervention[J]. *Circ Cardiovasc Interv*,2009,2(5):430 - 437
- 7 Shin DH, Choi DJ, Youn TJ, *et al.* Comparison of contrast - induced nephrotoxicity of iodixanol and iopromide in patients with renal insufficiency undergoing coronary angiography[J]. *Am J Cardiol*,2011,108(2):189 - 194
- 8 Chalmers N, Jackson RW. Comparison of iodixanol and iohexol in renal impairment[J]. *Br J Radiol*,1999,72(859):701 - 703
- 9 Hernandez F, Mora L, Garcia - Tejada J, *et al.* Comparison of iodixanol and ioversol for the prevention of contrast - induced nephropathy in diabetic patients after coronary angiography or angioplasty[J]. *Rev Esp Cardiol*,2009,62(12):1373 - 1380
- 10 Barrett BJ, Katzberg RW, Thomsen HS, *et al.* Contrast - induced nephropathy in patients with chronic kidney disease undergoing computed tomography: a double - blind comparison of iodixanol and iopam-

- idol[J]. *Invest Radiol*,2006,41(11):815 - 821
- 11 Nguyen SA, Suranyi P, Ravenel JG, *et al.* Iso - osmolality versus low - osmolality iodinated contrast medium at intravenous contrast - enhanced CT: effect on kidney function[J]. *Radiology*,2008,248(1):97 - 105
- 12 Aspelin P, Aubry P, Fransson SG, *et al.* Nephrotoxic effects in high - risk patients undergoing angiography[J]. *N Engl J Med*,2003,348(6):491 - 499
- 13 Rudnick MR, Davidson C, Laskey W, *et al.* Nephrotoxicity of iodixanol versus ioversol in patients with chronic kidney disease: the Visipaque Angiography/Interventions with Laboratory Outcomes in Renal Insufficiency (VALOR) Trial[J]. *Am Heart J*,2008,156(4):776 - 782
- 14 Jo SH, Youn TJ, Koo BK, *et al.* Renal toxicity evaluation and comparison between visipaque (iodixanol) and hexabrix (ioxaglate) in patients with renal insufficiency undergoing coronary angiography: the RECOVER study: a randomized controlled trial[J]. *J Am Coll Cardiol*,2006,48(5):924 - 930
- 15 Thomsen HS, Morcos SK, Erley CM, *et al.* The ACTIVE Trial: comparison of the effects on renal function of iomeprol - 400 and iodixanol - 320 in patients with chronic kidney disease undergoing abdominal computed tomography[J]. *Invest Radiol*,2008,43(3):170 - 178
- 16 Kuhn MJ, Chen N, Sahani DV, *et al.* The PREDICT study: a randomized double - blind comparison of contrast - induced nephropathy after low - or isoosmolar contrast agent exposure[J]. *AJR Am J Roentgenol*,2008,191(1):151 - 157
- 17 Nie B, Cheng WJ, Li YF, *et al.* A prospective, double - blind, randomized, controlled trial on the efficacy and cardiorenal safety of iodixanol vs. iopromide in patients with chronic kidney disease undergoing coronary angiography with or without percutaneous coronary intervention[J]. *Catheter Cardiovasc Interv*,2008,72(7):958 - 965
- 18 韦福起. 等渗透剂碘克沙醇对老年冠状动脉性心脏病并慢性肾衰竭介入治疗肾功能的影响[J]. *上海医学*,2009,32(3):246 - 248  
(收稿日期:2013 - 12 - 18)  
(修回日期:2013 - 12 - 31)

## microRNA - 21 在乳腺浸润性导管癌患者血清中的表达及临床意义

何佩娜 窦拉加 盛捡云

**摘要 目的** 通过测定 microRNA - 21 在试验组(乳腺浸润性导管癌女性患者组)及对照组(正常女性组)血清中的表达

作者单位:810000 西宁,青海大学医学院(何佩娜);810000 西宁,青海大学附属医院乳腺甲状腺外科(窦拉加);467000 河南省平顶山市第一人民医院(盛捡云)

通讯作者:窦拉加,硕士生导师,电子信箱:doulj2011@126.com

情况;分析这两组血清中 microRNA - 21 表达的差别,并分析乳腺癌组与其临床病理特征之间的关联。**方法** 通过 PCR 检测 45 例乳腺癌和 45 例正常女性血清中 microRNA - 21 的表达,分析其表达的差异及其与临床病理资料(肿瘤的 TNM 分期、肿瘤的大小、淋巴结的转移、激素受体状况等)的关系。**结果** 血清中 microRNA - 21 在乳腺癌女性患者组的相对表达量高于正常对照组血清中的相对表达量,microRNA - 21 在乳腺癌女性患者组的表达明显上调,microRNA - 21 在乳腺癌女性患者组的相对表达与患者的年龄、女性的月经状态等均无关,与肿瘤的分期、腋窝有无淋巴结转移情况等明显相关。**结论** microRNA - 21 在乳腺癌女性患者组的相对表达量高于正常对照组血清中的表达,microRNA - 21 在乳腺癌的表达明显上调,检测其在血清中表达情况可能成为乳腺癌诊治、判断预后的一种新指标。

**关键词** 乳腺癌 MicroRNA - 21 PCR

[中图分类号] R737.9 [文献标识码] A

**Expression and Its Clinical Significance of Serum MicroRNA - 21 in Infiltrating Ductal Carcinoma of Breast Patients.** He Peina, Dou Lajia, Sheng Jianyun. Medical College of Qinghai University, Qinghai 810001, China

**Abstract Objective** To study the serum microRNA - 21 expression levels and its relationship with clinicopathological features of the breast invasive ductal carcinoma between the two groups by measuring serum microRNA - 21 expression in the experimental group (invasive ductal carcinoma in female patients) and the control group (normal female group). **Methods** Serum microRNA - 21 expression levels in 45 breast cancer patients and 45 normal female was analyzed using real - time quantitative PCR (RT - PCR). The differences and the relationship of the clinicopathological features between the expression of tumor size, TNM stage, the patient's age, axillary's lymph node metastasis, hormone receptor status and menstrual status were analyzed. **Results** Serum microRNA - 21 expression of female breast cancer patients exceeded normal control group. In breast cancer patients, it was obviously raised. It has no relationship with age and menopausal status. It has great relevance with tumor stage and axillary's lymph node metastasis. **Conclusion** In female breast cancer patients, the expression of serum microRNA - 21 was higher than normal women group. It was obviously up - regulated in breast cancer. It may become a new index of breast cancer for the diagnosis, treatment and judging prognosis.

**Key words** Breast cancer; MicroRNA - 21; PCR

近来研究发现,microRNA - 21 作为一种癌基因,对多种肿瘤的临床诊断具有重要的参考价值<sup>[1]</sup>。microRNA - 21 在乳腺癌的细胞系、组织以及血清中的表达上调,且与肿瘤的临床分期及预后相关<sup>[2]</sup>。Yan 等<sup>[3]</sup>通过对乳腺癌细胞系的进一步研究,证明 microRNA - 21 可增强肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭及存活能力。随着研究的不断深入,研究者采用多种实验方法,对 miRNAs 在人体肿瘤细胞中的表达进行研究,研究表明 microRNA - 21 是目前检测到的一种在多种实体肿瘤中高表达的 miRNA<sup>[4-7]</sup>。由于肿瘤存在高度的异质性,组织取材检测尚不能完全代表整个肿瘤组织,而外周血中肿瘤核酸可起源于肿瘤内部任何一个亚克隆群体,更能全面反映肿瘤组织丰富的异常分子改变<sup>[8]</sup>。miRNAs 能比较稳定存在于血清中,使得 microRNA - 21 作为一种肿瘤标志物,从患者的血清提取检测,用来判断肿瘤分期、治疗及预后情况成为可能。

### 对象与方法

1. 研究对象:随机收集 2012 年 10 月 ~ 2013 年 9 月间青海大学附属医院乳甲外科诊治的乳腺癌患者血清 45 例,及相应的术后蜡片组织,同时收取笔者医院健康体检中心同时期、

年龄比较匹配的正常女性血清 45 例。其中试验组患者年龄为 22 ~ 67 岁之间,中位年龄 45 岁;正常对照组,年龄为 18 ~ 73 岁,中位年龄 47 岁。入组的女性乳腺癌患者均为笔者医院首治,具有完整的临床病理诊疗资料,所有患者的病理均有两名有经验的病理医师按 WHO 的分类标准进行诊断,入组患者的术后组织病理示:均为乳腺浸润性导管癌;临床分期按照美国癌症联合会 TNM 分期。本试验全部乳腺癌患者均为女性,且在采集全血样本前均未经过任何手术、放疗、化疗等综合治疗。

2. 研究方法:(1)标本的采集:使用真空采血管(带有血清分离胶)收集全血样本 2ml,3000r/min 离心 10min,弃去不溶物,分离血清即为实验所用。该步骤所得血清转入洁净干燥的 EP 管中,保存于 - 80℃ 的冰箱内以备下一步操作使用。(2)总 RNA 的提取:取出保存于 - 80℃ 的血清在室温下充分溶解,然后抽吸混匀。按照试剂说明书用 Trizol 一步法提取血清总 RNA,操作中加入氯仿、异丙醇,提高总 RNA 的提取率,然后加入 100μl DEPC 水溶解 RNA。用此种法分别提取正常对照组和乳腺癌患者组血清中的总 RNA。(3)cDNA 的合成:反转录反应体系(15μl):DEPC 水 2μl,茎环反转录引物 2μl, M - MLV 1μl,反转录缓冲液 2μl,4μl DTT,2μl DNTP,2μl 总 RNA。该体系反应条件:16℃ 退火 30min,42℃ 反转录 50min,85℃ 灭活反转录酶。将上述 RNA 反转录为 cDNA。(4)实时荧光定量 PCR:PCR 反应体系:universal PCR Master 10μl,

DEPC水 5 $\mu$ l, PCR 上下游引物均为 1 $\mu$ l, 3 $\mu$ l cDNA; 用荧光定量 PCR 对反转录所得产物进行扩增。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10min, 95 $^{\circ}$ C 15s 和 60 $^{\circ}$ C 1min 退火延伸, 进行 50 个循环。(5) 数据处理: 通过 PCR 检测其相对表达量, 以 U6 为内参基因, 加入血清中, 实现对目标基因的均一化处理, 确保在相等数量的样本中比较目标基因的量。试验组血清中 microRNA - 21 的相对表达量公式是:  $RQ = 2^{-\Delta CT}$ , RQ 代表其相对表达量,  $\Delta CT = CT_{target} - CT_{reference}$ ,  $CT_{target}$ 、 $CT_{reference}$  分别表示某一标本中目标基因以及内参基因的 CT 值; 乳腺癌组与正常组间 miRNA - 21 的表达水平变化用  $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$ 。其中  $\Delta\Delta CT = (CT_{target} - CT_{reference})_{癌组} - (CT_{target} - CT_{reference})_{正常组}$ 。(6) 免疫组化: 所有入组患者的术后病理结果均为浸润性导管癌, 组织标本均有 2 位经验丰富的病理科医师经行检查并作出诊断, 意见不统一时由第 3 位病理医师加入评判。免疫组化的实验主要是为确定乳腺癌组织样本中的 ER 受体、PR 受体、C - erbB - 2 受体的蛋白表达水平; 该实验的具体操作步骤和结果评定均严格按照试剂盒说明书要求来操作。ER、PR 阳性结果定位于细胞核, 根据染色强度不同分为两个级别: 阴性(-), 无阳性细胞或阳性细胞数 < 10%; 阳性(+), 阳性细胞数 > 10%<sup>[9]</sup>。C - erbB - 2 阳性表达定位于细胞膜, 根据阳性细胞的比例分为 4 个级别: 阴性(-), 无阳性结果表达; 弱阳性(+), < 10% 的区域有阳性表达, 胞膜显色不连续; 中度阳性(++), > 10% 的区域有阳性表达, 胞膜显色不连续; 强阳性(+++), > 10% 的区域有阳性表达, 胞膜显色连续<sup>[10]</sup>。本试验入组的 45 例乳腺癌病人术后的石蜡切片均行此种免疫组化。

3. 统计学方法: 在进行统计数据分析前, 对计算所得 microRNA - 21 的相对表达水平, 即  $2^{-\Delta CT}$  进行对数转换, 转换后的数据符合正态分布。数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用两个独立样本的 *t* 检验、卡方检验及秩和检验等, 运用 SPSS 16.0 分析处理,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

1. 血清中 microRNA - 21 在正常女性对照组、女性乳腺浸润性导管癌组的表达情况: microRNA - 21 在女性乳腺浸润性导管癌患者组血清中的表达水平远远高于正常对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 1)。

2. 乳腺癌患者血清中 microRNA - 21 相对于正常对照组血清的表达量公式为  $2^{-\Delta\Delta CT}$ ,  $\Delta\Delta CT = (CT_{microRNA-21} - CT_{U6})_{癌} - (CT_{microRNA-21} - CT_{U6})_{正常}$  人均值。得出的相对表达结果经  $\log_2$  转换之后符合正态分布, 平均值为  $10.16 \pm 0.28$ 。以 10.16 这个平均值为界, 把乳腺癌患者分成两组, 分别是低表达组和高表达组, 结果表明: microRNA - 21 的表达与患者的年龄 ( $P = 0.841$ )、月经状况 ( $P = 0.384$ )、肿瘤组织大小 ( $P = 0.121$ )、ER ( $P = 0.919$ )、PR ( $P =$

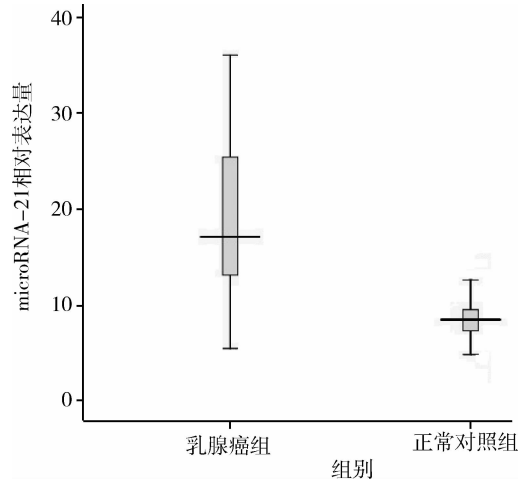


图 1 两组血清中 microRNA - 21 的表达量

0.549) 及 C - erb - 2 ( $P = 0.373$ ) 的表达无明显相关性; 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。而与腋窝淋巴结有无转移 ( $P = 0.031$ )、TNM 临床分期 ( $P = 0.019$ ) 存在明显相关 ( $P < 0.05$ )。经过  $\chi^2$  检验及秩和检验, 表明血清中 microRNA - 21 的表达在乳腺癌的临床分期中: I 期与 II 期之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 而 I 期与 III 期、II 期与 III 期之间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。microRNA - 21 的相对表达量与乳腺浸润性导管癌临床病理特征间的关系见表 1。

表 1 microRNA - 21 的相对表达量与乳腺浸润性导管癌临床病理特征间的关系

临床病理特征	n	miRNA - 21 高表达组 [n(%)]	miRNA - 21 低表达组 [n(%)]	P
年龄 (岁)				0.841
≥45	25	13 (54.2)	12 (57.1)	
<45	20	11 (45.8)	9 (42.9)	
月经状况				0.384
绝经前	28	20 (66.7)	8 (53.3)	
绝经后	17	10 (33.3)	7 (46.7)	
肿瘤大小 (cm)				0.121
≤2	20	9 (34.6)	11 (57.9)	
>2	25	17 (65.4)	8 (42.1)	
腋窝淋巴结转移				0.031
转移	25	18 (69.2)	7 (36.8)	
无转移	20	8 (30.8)	12 (63.2)	
临床分期 (TNM)				0.019
I + II	24	10 (38.5)	14 (73.7)	
III	21	16 (61.5)	5 (26.3)	
ER				0.919
阳性	34	15 (78.9)	19 (73.1)	
阴性	11	4 (21.1)	7 (26.9)	
PR				0.549
阳性	37	21 (87.5)	16 (76.2)	
阴性	8	3 (12.5)	5 (23.8)	
C - erbB - 2				0.373
阳性	29	13 (72.2)	16 (59.3)	
阴性	16	5 (27.8)	11 (40.7)	