

乳腺癌肿瘤组织和血浆中 miR-21、miR-210 的含量及临床意义

陆芸瑶 王 卉 喻 珪 李光新 吴立翔 郭变琴

摘 要 **目的** 探讨 miR-21、miR-210 在乳腺癌患者肿瘤组织及血浆中的含量,并进一步分析其在乳腺癌中的诊断及预后评价中的价值。**方法** 收集 31 例乳腺癌患者肿瘤组织及 36 例癌旁组织,25 例乳腺癌患者及 21 例健康者血浆。采用实时荧光定量 PCR 技术(real time fluorescence quantitative PCR, RTFQ PCR)检测 miR-21、miR-210 在乳腺癌患者肿瘤组织及血浆中的含量,应用受试者工作特征(receive operating characteristic, ROC)曲线分析其在乳腺癌中的诊断价值,通过 Kaplan-Meier Plotter 网站分析其与患者预后的关系。**结果** 与癌旁正常组织比较,miR-21 在乳腺癌肿瘤组织中的含量差异有统计学意义($P < 0.05$),miR-210 含量差异无统计学意义($P > 0.05$);与健康者血浆比较,miR-21、miR-210 在乳腺癌患者血浆中的含量差异无统计学意义($P > 0.05$);miR-21 在组织中 ROC 下面积为 0.695;miR-21 高含量组患者生存时间明显低于 miR-21 低含量组($P < 0.05$)。**结论** miR-21 在乳腺癌肿瘤组织中上调,可作为乳腺癌诊断与预后评价指标。

关键词 乳腺癌 miR-21 miR-210

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.03.026

Expression and Clinical Significance of MiR-21/MiR-210 in Tissues and Plasma with Breast Cancer. Lu Yunyao, Wang Hui, Yu Yao, et al. Chongqing University Cancer Hospital & Chongqing Cancer Institute & Chongqing Cancer Hospital, Chongqing 400032, China

Abstract Objective To investigate the expression of miR-21 and miR-210 in tissues and plasma with breast cancer, further to analyze their value in the diagnosis and prognosis of breast cancer. **Methods** The expression of miR-21 and miR-210 in 31 tumor tissues and 36 normal tissues, 25 tumor plasma samples and 21 healthy controls were detected by RTFQ PCR. We analyzed the diagnostic value of miRNA by receive operating characteristic (ROC) curve and the prognosis of patients by Kaplan-Meier Plotter website. **Results** The levels of miR-21 in tumor tissues were higher than that in normal tissues ($P < 0.05$), whereas the levels of miR-210 were not ($P > 0.05$). There were no significant differences between the tumor plasma samples and healthy controls ($P > 0.05$). The area of miR-21 in tissues under the ROC curve was 0.695. Kaplan-Meier Plotter revealed that higher miR-21 level was correlated with a shorter survival time ($P < 0.05$). **Conclusion** miR-21 in breast cancer tissues is up-regulated, and it may be served as a novel marker of diagnosis and prognosis in the breast cancer.

Key words Breast cancer; miR-21; miR-210

乳腺癌是起源于乳腺组织的一种复杂的异质性疾病,病死率居全球癌症病死率的第 5 位^[1]。现临床上常用乳腺钼靶 X 线摄影筛查乳腺癌,但频繁的筛查显著提高了疾病假阳性率($> 20\%$),增加了受检女性的心理负担并且其对健康女性的长期影响还未明确^[2]。临床上根据癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)的含量等辅助诊断乳腺癌,但其敏感度低、特异性差,不能有效筛查早期癌症及原位癌,而且

部分检测结果相同的乳腺癌患者其临床表现差异较大^[3]。所以有必要研究更加敏感的诊疗因子,用以乳腺癌的早期诊断及高患病风险人群的识别。

microRNA(miRNA)是一类 18~22 个核苷酸组成的非编码 RNA,其表达存在组织特异性、稳定性高、检测可重复性强。多个研究发现肿瘤患者组织及血浆中存在特异表达的 miRNA,提示 miRNA 可以作为一种新的肿瘤诊疗标志物^[4]。

miR-21 和 miR-210 在胰腺癌、前列腺癌、胃癌、肝癌、肠癌和卵巢癌等多种癌症中高表达,参与肿瘤的发生、发展等多个过程^[5]。miR-21 和 miR-210 在乳腺癌中的研究相对较少,对乳腺癌的诊断价值还未有明确定论。本研究通过实时荧光定量 PCR

基金项目:重庆市卫生和计划生育委员会基金资助项目(2016MSXM089)

作者单位:400032 重庆大学附属肿瘤医院、重庆市肿瘤研究所、重庆市肿瘤医院

通讯作者:郭变琴,电子信箱:178098941@qq.com

方法检测 miR-21 和 miR-210 在乳腺癌组织和血浆中的含量,同时应用 ROC 曲线评价其在乳腺癌中的诊断价值以及通过 Kaplan-Meier Plotter 网站分析其与患者预后的关系,旨在探寻一种用于乳腺癌早期诊断及预后评价指标。

材料与方法

1. 材料:收集 2016~2017 年在重庆大学附属肿瘤医院病理学确诊的乳腺癌患者肿瘤组织及血浆标本。其中,乳腺癌患者肿瘤组织标本 31 例,患者平均年龄 52.84 ± 8.57 岁;另取癌旁组织 36 例作为正常对照组,平均年龄 40.89 ± 12.27 岁。乳腺癌血浆样本 25 例,平均年龄 47.36 ± 11.72 岁;另随机选取笔者医院体检健康女性血浆样本 21 例作为正常对照,平均年龄 41.57 ± 9.80 岁。患者基本情况详见表 1。本研究获得重庆大学附属肿瘤医院医学伦理学委员会批准,且所有患者均签署知情同意书。

表 1 患者基本情况

项目	组织 (n=31)	血浆 (n=25)
年龄(岁)		
>50	15	7
≤50	16	18
肿瘤直径(cm)		
>5	5	13
≤5	26	12
TNM 分期		
I	5	3
II	15	1
III	8	8
IV	3	13
淋巴结转移		
否	12	4
是	19	21
远端转移		
否	28	11
是	3	14

2. 主要试剂与仪器设备:(1)主要试剂:miRcute miRNA 提取分离试剂盒、血清/血浆 miRNA 提取分离试剂盒、石蜡包埋组织切片 miRNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司,miRNA 反转录试剂盒、miR-21、miR-210 及内参 U6 的特异性茎环引物购自美国 Genecopoeia 公司,SYBR[®] Premix Ex Taq 试剂盒购自宝生物工程公司。(2)仪器设备:CFX-Connect 荧光定量 PCR 仪、T100 Thermal Cycler 梯度 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),NANODROP 1000 核酸浓度测定仪、FRESCO17 高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司)。

3. 研究方法:(1)miRNA 提取:取新鲜冷冻的乳腺组织 20~25mg,液氮中进行研磨;转移石蜡切片 1~8 片至离心管中;取收集的抗凝血,离心后获得上层血浆。分别参照相应 miRNA 提取试剂盒说明书提取 miRNA,检测 miRNA 的 A_{260}/A_{280} 比值及浓度。(2)实时荧光定量 PCR:取 100ng RNA,参照 miRNA 反转录试剂盒进行反转录。使用 SYBR[®] Premix Ex Taq 试剂盒检测 miR-21、miR-210 的含量:SYBR[®] Premix Ex Taq 12.5μl (2×),qPCR Forward Primer 0.5μl,qPCR Forward Primer 0.5μl,cDNA(稀释 5 倍)2μl,Nuclease-free water 9.5μl。反应条件:95℃ 10min,95℃ 10s,60℃ 20s,72℃ 10s,45 个循环。

4. 统计学方法:采用 SPSS 24.0 统计学软件分析实验数据,计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,miRNA 的相对定量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行统计分析,ROC 评价 miRNA 对乳腺癌的诊断价值,Kaplan-Meier plotter 评价乳腺癌患者的预后,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 乳腺癌患者肿瘤组织中 miR-21、miR-210 含量:采用荧光定量 PCR 检测 miR-21、miR-210 在 31 例乳腺癌肿瘤组织和 36 例癌旁正常组织(对照组)中的含量,结果显示,与癌旁正常组织比较,miR-21 在乳腺癌肿瘤组织中含量显著升高 ($P = 0.011$,图 1A);而 miR-210 的含量比较差异无统计学意义 ($P = 0.193$,图 1B)。

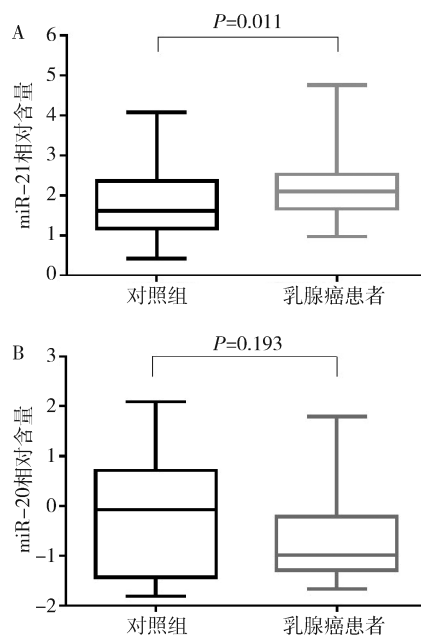


图 1 乳腺癌患者肿瘤组织中 miRNA 的含量

A. miR-21; B. miR-210

2. 乳腺癌患者血浆中 miR - 21、miR - 210 含量: 采用荧光定量 PCR 检测 miR - 21、miR - 210 在 25 例乳腺癌患者血浆和 21 例健康者血浆(对照组)的含量。结果显示,与对照组比较,miR - 21、miR - 210 在乳腺癌患者血浆中的含量差异无统计学意义($P = 0.874, P = 0.457$,图 2)。

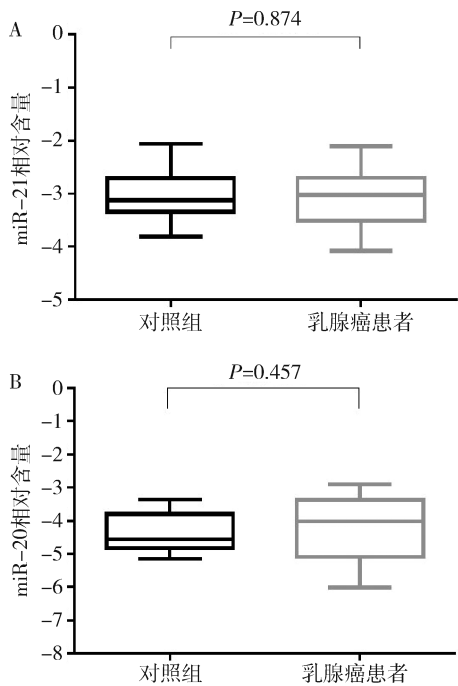


图 2 乳腺癌患者血浆中 miRNA 的含量
A. miR - 21; B. miR - 210

3. miR - 21 诊断乳腺癌的 ROC 曲线: 绘制 ROC 曲线, 评价 miR - 21 在乳腺癌中的诊断价值, ROC 曲线下面积趋近于 1, 该指标对疾病的预测价值越高。miR - 21 的 AUC = 0.695(图 3), miR - 21 在乳腺癌的诊断中具有一定的作用。

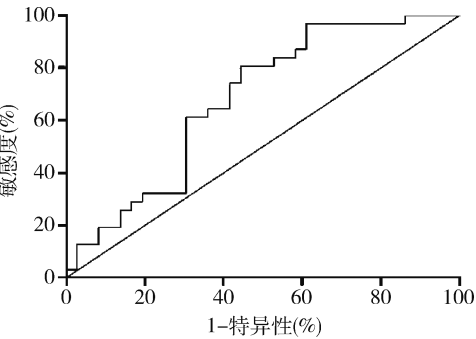


图 3 组织 miRNA - 21 辅助诊断乳腺癌的 ROC 曲线

4. miR - 21 的含量与乳腺癌患者生存曲线分析: 通过 Kaplan - Meier Plotter 网站分析 miR - 21 与乳

腺癌患者预后的关系。结果显示,miR - 21 高含量组生存时间明显低于 miR - 21 低含量组,经 $\log - \text{rank}$ 检验,两组间比较,差异有统计学意义($P = 0.019$)。

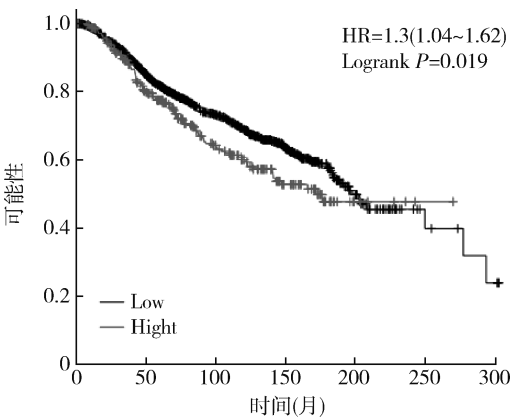


图 4 乳腺癌患者 miR - 21 含量 - 生存曲线

讨 论

乳腺癌是全球女性癌症患者中最常见的癌症,每年全球的新增病例超过 100 万例。乳腺癌导致的女性病死率居癌症相关病死率的第 2 位^[6,7]。所以研究更加敏感的乳腺癌早期诊断肿瘤标志物显得尤为重要。miRNA 可以作为诊断标志物的基础是 miRNA 在患病组织及血液中存在特异的稳定的表达。

miRNA - 21 在多个实体瘤(前列腺癌、直肠癌、肺癌等)中的表达均上调,参与多个肿瘤抑制基因(PTEN、PDCD4、p53 等)的调控,与肿瘤细胞的生长、入侵和转移等有关^[2]。在乳腺癌中,miR - 21 参与癌细胞的增殖与转移^[8]。有研究报道 miR - 21 在乳腺癌患者组织中表达上调,miR - 21 的含量和激素水平及疾病分期、淋巴结转移、远端转移、ROC 曲线等相关^[2]。另有研究报道血浆中 miR - 21 的含量和激素水平及疾病分期无关^[9]。笔者研究发现,乳腺癌患者肿瘤组织中 miR - 21 的含量显著高于对照组,而血浆中 miR - 21 的含量与对照组比较差异无统计学意义。笔者实验结果表明组织中 miR - 21 可作为乳腺癌诊断肿瘤标志物,后续仍需大量的标本进行验证。为了进一步研究 miR - 21 对乳腺癌的诊断价值,笔者进行了 ROC 曲线分析,AUC 作为评价指标,AUC 越大说明诊断效果更好。ROC 曲线下面积为 0.695,表明组织中 miR - 21 的含量可作为乳腺癌诊断有效指标。另外,笔者还使用 Kaplan - Meier Plotter 网站分析了 miR - 21 的生存曲线,发现 miR - 21 高含量组生存时间明显少于 miR - 21 低含量组,说明 miR - 21 含量的高低和乳腺癌预后相关。

有研究表明,miR-210在乳腺癌患者血浆中含
量升高,笔者实验结果表明乳腺癌肿瘤组织、血浆中
miR-210的含量与对照组比较差异无统计学意义,
miR-210在肿瘤组织与血浆结果相一致,均未升
高^[5]。与文献报道不一致的原因可能为各实验室标
本采集及实验技术流程的不同造成结果的差异,因
为不同的标本会影响miRNA的表达,如标本的种族
差异、标本量、对照组的选择等,对于血浆标本而言,
抗凝剂的不同、新鲜血液标本还是冻存血液标本、标
本是否存在肉眼不可见的溶血、脂血等也会影响
miRNA的表达。不同的实验技术同样会影响miRNA
的表达,如miRNA提取方式、内参的选择、检测方法
的不同,离心的转速、RNA浓度的检测这些都会影响
miRNA的表达^[10,11]。

此外,由于肿瘤患者血浆中的miRNA主要来源
于肿瘤细胞的凋亡,应激、炎症及迁移等导致的肿瘤
细胞损伤后miRNA的释放,不同病理状态下,miR-
NA被选择性地释放到血浆中,因此标本采集的时间
点对于结果的影响非常大^[12,13]。另有研究报道,
miRNA不仅可作为癌症的血浆肿瘤标志物,也可以
作为其他疾病的标志物(如miR-21、miR-210在
肠炎、溃疡、心血管系统疾病、肝脏疾病、糖尿病等疾
病中存在差异表达),收集单纯患有乳腺癌的标本难
度极大^[14]。以往的研究包括笔者的研究中收集的患
者大多患有一些心血管系统、糖尿病等疾病,这些不
同的疾病状态可能会影响miR-21、miR-210在血
浆中的表达。miRNA的表达也极易受到患者饮食习
惯、生活方式等的影响,即使一个小小的静脉穿刺也
有可能影响其表达^[11,15]。

总之,由于血浆中miRNA的含量受多因素影
响,因此选取血浆miRNA作为肿瘤标志物还需要
制定统一的标准实验流程,如:样本收集、处理、检
测方法的选择、参考区间的确定等。多个miRNA联
合检测比单个miRNA检测更敏感,选择哪些miR-
NA作为生物学标志物需要开展大量实验研究进行
验证。

参考文献

- Harbeck N, Gnant M. Breast cancer [J]. Lancet, 2017, 389 (10074): 1134-1150
- Li S, Yang X, Yang J, et al. Serum microRNA-21 as a potential diagnostic biomarker for breast cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. Clin Exp Med, 2016, 16(1): 29-35
- Wang W, Xu X, Tian B, et al. The diagnostic value of serum tumor markers CEA, CA19-9, CA125, CA15-3, and TPS in metastatic breast cancer [J]. Clin Chim Acta, 2017, 470(3): 51-55
- Madhavan D, Cuk K, Burwinkel B, et al. Cancer diagnosis and prognosis decoded by blood-based circulating microRNA signatures [J]. Front Genet, 2013, 4(10): 116
- Tang Y, Zhou X, Ji J, et al. High expression levels of miR-21 and miR-210 predict unfavorable survival in breast cancer: a systemic review and meta-analysis [J]. Int J Biol Markers, 2015, 30(9): e347-358
- Campos-Parra AD, Mitznauatl GC, Pedroza-Torres A, et al. Micro-RNAs as potential predictors of response to breast cancer systemic therapy: future clinical implications [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(6): 1182
- Nazari SS, Mukherjee P. An overview of mammographic density and its association with breast cancer [J]. Breast Cancer, 2018, 25(8): e347-358
- Petrovic N. miR-21 might be involved in breast cancer promotion and invasion rather than in initial events of breast cancer development [J]. Mol Diagn Ther, 2016, 20: 97-110
- Rask L, Balslev E, Skilde R, et al. Differential expression of miR-139, miR-486 and miR-21 in breast cancer patients sub-classified according to lymph node status [J]. Cell Oncol (Dordr), 2014, 37: 215-227
- Han J, Jiang Y, Zhang C, et al. A novel panel of serum miR-21/miR-155/miR-365 as a potential diagnostic biomarker for breast cancer [J]. Ann Surg Treat Res, 2017, 92: 55-66
- Tiberio P, Callari M, Angeloni V, et al. Challenges in using circulating miRNAs as cancer biomarkers [J]. Biomed Res Int, 2015, 73(9): 1479
- Ulivi P, Zoli W. miRNAs as non-invasive biomarkers for lung cancer diagnosis [J]. Molecules, 2014, 19: 8220-8237
- Zhu J, Zheng Z, Wang J, et al. Different miRNA expression profiles between human breast cancer tumors and serum [J]. Front Genet, 2014, 5(8): e347-358; 149
- Witwer KW. Circulating microRNA biomarker studies: pitfalls and potential solutions [J]. Clin Chem, 2015, 61(1): 56-63
- Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S, et al. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy [J]. Trends Mol Med, 2014, 20(8): 460-469 (收稿日期:2018-05-25) (修回日期:2018-06-05)
- Gong JP, Yang L, Huang XE, et al. Outcomes based on risk assessment of anastomotic leakage after rectal cancer surgery [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(2): 707-712
- 李耀武. 生长抑素加双套管负压吸引防治中低位直肠癌术后吻合口瘘 [J]. 吉林医学, 2014, 35(30): 6713-6714 (收稿日期:2018-06-05) (修回日期:2018-06-13)

(上接第99页)

- 王成龙, 汤文浩. 直肠癌 Dixon 术后吻合口漏影响因素的分析 [J]. 东南大学学报, 医学版, 2017, 36(6): 958-961
- Park JS, Choi GS, Kim SH, et al. Multicenter analysis of risk factors for anastomotic leakage after laparoscopic rectal cancer excision: the Korean laparoscopic colorectal surgery study group [J]. Ann Surg, 2013, 257(4): 665-671