

论著·临床研究

血清 microRNA-155 水平在乳腺癌早期诊断和预后评价中的作用^{*}张超¹,童富云^{1△},胡滢²

(1. 重庆市涪陵中心医院乳腺甲状腺血管外科,重庆 408000; 2. 陆军军医大学第一附属医院乳腺甲状腺外科,重庆 400038)

摘要:目的 研究微小 RNA-155(microRNA-155)在乳腺癌患者及健康女性血清中的表达水平,从而评价其在乳腺癌早期诊断和预后评价中的作用。方法 2012 年 9 月至 2013 年 12 月收集 81 例乳腺癌患者和 80 例健康女性(对照组)的血液样本,提取血清中的 microRNA,采用实时定量聚合酶链反应检测 microRNA-155 表达水平,分析其在血清中表达差异与乳腺癌患者临床病理特征的关系。通过绘制受试者工作特征曲线和生存分析评价 microRNA-155 在乳腺癌诊断和预后评价中的价值。结果 乳腺癌患者血清 microRNA-155 表达水平明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。microRNA-155 在血清中表达水平的增加与淋巴结转移具有显著的相关性,有淋巴结转移患者 microRNA-155 表达水平明显高于无淋巴结转移者,差异有统计学意义($P < 0.05$),与患者年龄、月经情况、肿瘤分期、雌激素受体、孕激素受体均无关,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。检测 microRNA-155 在乳腺癌的诊断中具有一定的灵敏度。microRNA-155 高表达乳腺癌患者生存率较低,预后较差。结论 microRNA-155 在乳腺癌的早期诊断和预后评价中具有重要意义。

关键词:乳腺肿瘤/诊断; 微 RNAs; 血清; 预后**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2019.10.011 **中图法分类号:**R737.9;R446.61**文章编号:**1673-4130(2019)10-1197-04**文献标识码:**AEffect of serum microRNA-155 in early diagnosis and prognosis of breast cancer^{*}ZHANG Chao¹, TONG Fuyun^{1△}, HU Ying²

(1. Department of Breast, Thyroid and Vascular Surgery, Fuling Central Hospital, Chongqing 408000, China; 2. Department of Thyroid Breast Surgery, the First Affiliated Hospital to Army Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the expression level of serum microRNA-155 in breast cancer patients and normal women, in order to evaluate its value in the diagnosis and prognosis of breast cancer. **Methods** The blood samples from 81 breast cancer patients and 80 normal women (control group) were collected from September 2012 to December 2013 to extract serum microRNA. Quantitative real-time PCR (RT-PCR) was used to determine the expression level of microRNA-155 in serum, and the relationship of expression difference in serum and clinicopathologic feature of breast cancer patients was analyzed. The value of microRNA-155 in the diagnosis and prognosis of breast cancer was evaluated by receiver operating characteristic (ROC) curve and Kaplan-Meier survival analysis. **Results** The expression of microRNA-155 in breast cancer patients was significantly higher than that in the control group, and the difference had statistical significance ($P < 0.05$). The growth of expression level in serum of microRNA-155 was obviously correlated with lymphatic metastasis, and the expression level of microRNA-155 in patients with lymphatic metastasis was higher than that in patients without lymphatic metastasis with statistically significant difference ($P < 0.05$), but the expression level of microRNA-155 had not connection with age, menstrual conditions, tumor stages, estrogen receptor or progesterone receptor, without statistically significant difference ($P > 0.05$). The detection of serum microRNA-155 had satisfactory sensitivity in diagnosis of breast cancer, and the high expression level of microRNA-155 in

^{*} 基金项目:陆军军医大学第一附属医院肿瘤免疫病理学教育部重点实验室开放项目(015jszl11)。

作者简介:张超,男,主治医师,主要从事乳腺癌诊治相关研究。△ 通信作者, E-mail:50761361@qq.com。

本文引用格式:张超,童富云,胡滢. 血清 microRNA-155 水平在乳腺癌早期诊断和预后评价中的作用[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(10):1197-1200.

breast cancer patients was with low survival rate and poor prognosis. **Conclusion** microRNA-155 has important significant in the diagnosis and prognosis of breast cancer.

Key words: breast neoplasms/diagnosis; microRNAs; serum; prognosis

乳腺癌是严重威胁女性健康的恶性肿瘤,其发病率在我国呈逐年上升趋势^[1]。随着手术、放、化疗技术的飞速发展及多模态成像设备的应用,治疗乳腺癌的疗效得到了极大的改善。然而,乳腺癌的转移与复发仍不能得到有效的控制,是乳腺癌患者致死的主要原因^[2]。早期诊断乳腺癌并根据预后预测指导全程最佳治疗达到减少复发、转移的目的具有重要的研究意义。在乳腺癌早期诊断的标志物中微小 RNA(microRNA)正受到越来越多的关注^[3-6]。近期有研究表明, microRNA-155 的过度表达与肿瘤的侵袭与转移密切相关,其机制主要包括促进肿瘤细胞上皮-间质转化、抑制细胞凋亡等^[7-9]。患者血清 microRNA-155 水平与临床病理的关系及其对诊断与预后预测的作用已成为目前的研究热点。本研究通过回顾性分析乳腺癌患者与健康女性血清 microRNA-155 水平,研究其在乳腺癌早期诊断与预后评价中的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 9 月至 2013 年 12 月重庆市涪陵中心医院经病理检查诊断为乳腺癌的 81 例女性患者的外周血样本及相对应的病理切片作为研究组。乳腺癌病理诊断标准采用 WHO 乳腺肿瘤的病理分型,入组患者均为美国国立综合癌症网络(NCCN)乳腺癌临床实践指南临床分期为 I ~ III 期的患者,且尚未开始接受手术等其他治疗。收集同期在重庆市涪陵中心医院健康体检的 80 例健康女性的外周血样本作为对照组。对照组均为成年、非妊娠、无严重心肺疾病的健康女性。乳腺癌组患者年龄 35~75 岁,平均(51.26±6.99)岁;对照组健康女性年龄 29~76 岁,平均(50.87±7.52)岁。两组研究对象年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究已获得该院伦理委员会批准,同时,经患者或亲属授权并签署本研究知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 提取总 RNA 采集两组研究对象血液标本 5 mL 于乙二胺四乙酸二钾抗凝管中,静置 30 min,然后 4 000 r/min(离心半径 20 cm)离心 25 min,将上清液转移至无 RNA 酶的 Eppendorf 离心管中,每管 200 μL,根据 RNA 提取试剂盒(上海生工生物工程有限公司)说明书的要求,采用 Trizol 法提取 RNA。

1.2.2 microRNA 的逆转录 采用 microRNA q 聚合酶链反应(PCR)试剂盒(南京凯基生物有限公司)进行逆转录。具体反应体系为包括 50 ng/μL 的模板

RNA,25 U/μL 的 Poly A 聚合酶 1 μL,RTase Mix 1 μL,PAP/RT 缓冲液 10 μL,使用焦碳酸二乙酯(DEPC)水将体系调整至 30 μL。PCR 反应程序设置为 37 °C 60 min、70 °C 15 min。克隆用 PCR 引物(苏州金维智科技有限公司):上游引物 3'-GGATCCG-GTGGCACAAACCAGGAA-5';下游引物 5'-GAATTCTCTAAGTTATCCAGCAGGGTG-3'。

1.2.3 实时定量 PCR 检测 microRNA 采用实时定量荧光 PCR 的方法检测样本中 microRNA-155 的表达水平。具体反应体系包括 10 μL 的 2×Mix、2 μL 通用引物、2 μL 特异引物、2 μL cDNA 等,然后使用无 RNA 酶的双蒸水将体系调整为 25 μL。PCR 反应条件为 95 °C 10 min、95 °C 15 s、60 °C 1 min,循环数(Ct)为 50。

1.2.4 计算 microRNA 相对表达量 使用 U6 内参基因对目标基因进行均一化。通过 Ct 值计算 microRNA-155 相对表达水平,即荧光 PCR 信号达到预定阈值所需要的 Ct。ΔΔCt 可计算目标基因的相对表达。 $\Delta C_{\text{样本}} = C_{\text{样本}} - C_{\text{内参}}$; $\Delta C_{\text{对照}} = C_{\text{对照}} - C_{\text{内参}}$; $\Delta \Delta C = \Delta C_{\text{样本}} - \Delta C_{\text{对照}}$ 。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件对数据进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验和方差分析;计数资料以率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验;采用受试者工作特征(ROC)曲线评价检测指标的诊断价值。使用 Kaplan-Meier 曲线进行生存分析,并采用 log-rank 比较生存的差异。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组研究对象血清 microRNA-155 表达水平比较 乳腺癌组患者血清 microRNA-155 表达水平明显高于对照组,是对照组的 3.5 倍,差异有统计学意义($t=8.71, P=0.001$)。见表 1。

表 1 两组研究对象血清 microRNA-155 相对表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	microRNA-155 相对表达水平
正常对照组	80	0.88±0.23
乳腺癌组	81	2.57±0.52
<i>t</i>		8.71
<i>P</i>		0.001

2.2 microRNA-155 表达水平与乳腺癌患者临床病理特征的关系 microRNA-155 表达水平与淋巴结转

移具有显著的相关性,有淋巴结转移患者 microRNA-155 表达水平明显高于无淋巴结转移者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。然而, microRNA-155 表达水平与患者年龄、肿瘤分期、肿瘤直径、雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)等无关,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 microRNA-155 表达水平与乳腺癌患者临床病理特征的关系($n=81$)

临床病理特征	n	microRNA-155 表达水平	t	P
年龄(岁)				
≥50	53	2.52±0.71	4.176	0.814
<50	28	2.36±0.53		
月经情况				
绝经前	38	2.39±0.61	-5.332	0.321
绝经后	43	2.60±0.70		
肿瘤分期				
I ~ II	49	2.20±0.83	-5.751	0.142
III	32	2.59±0.55		
肿瘤直径(cm)				
<2	41	2.41±0.68	-3.918	0.413
≥2	40	2.56±0.75		
淋巴结转移				
有	25	2.96±0.46	-12.524	0.033
无	56	2.15±0.38		
ER				
阳性	39	2.46±0.81	-3.637	0.091
阴性	42	2.52±0.59		
PR				
阳性	43	2.69±0.45	5.262	0.374
阴性	38	2.36±0.82		

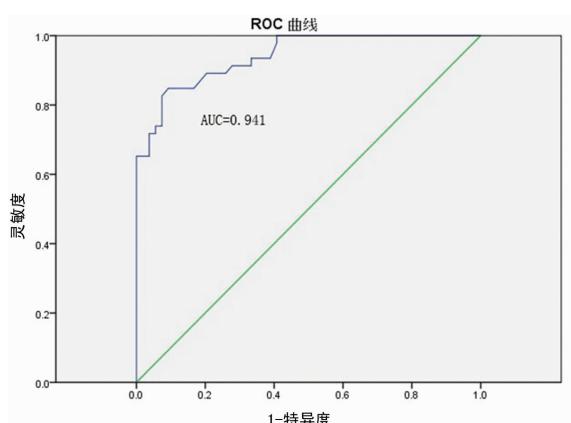


图 1 microRNA-155 表达的 ROC 曲线

2.3 microRNA-155 表达水平在乳腺癌中的诊断价值 血清 microRNA-155 水平诊断乳腺癌的 ROC 曲线下面积为 0.941(95% 可信区间: 0.899~0.982), 临

界值为 1.165, 灵敏度、特异度分别为 84.2% 和 91.3%。microRNA-155 表达水平对乳腺癌具有较高的诊断价值。见图 1。

2.4 microRNA-155 表达水平在乳腺癌预后评价中的价值 以 microRNA-155 表达的中位数 2.49 将研究组或者分为小于 2.49 组(40 例)和大于或等于 2.49 组(41 例)。两组患者生存率比较, 差异有统计学意义($\chi^2=4.811, P=0.027$)。见图 2。

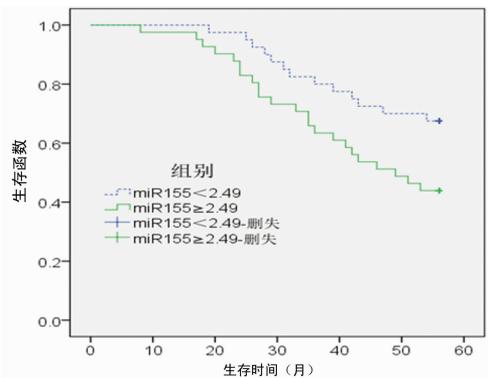


图 2 两组患者生存率比较

3 讨 论

乳腺癌治疗的关键在于早期诊断与干预, 因此, 发现新的易于检测且具有一定灵敏度和预后预测作用的早期诊断分子标志物具有极大的临床意义, 从健康人群中筛查、鉴别出早期乳腺癌患者, 进而提高乳腺癌早期诊断的效率, 并尽早开始综合治疗, 达到提高疗效的目的。

microRNA 是参与基因转录后水平调控的一类非编码 RNA, 国内外研究均表明, 其在肿瘤发生、发展中具有重要作用^[10-12]。microRNA-155 是一种多功能 microRNA, 血循环中主要来自于细胞, 因血循环中其多与蛋白相结合, 稳定性好, 故是作为肿瘤标志物研究的基础。

本研究比较了乳腺癌患者和健康者血清 microRNA-155 的表达水平, 结果显示, 乳腺癌患者血清 microRNA-155 表达水平明显高于健康女性, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 与相关研究结果一致^[13], 即 microRNA-155 在乳腺癌患者血清中的表达显著升高。本研究通过制作 ROC 曲线发现, 检测血清 microRNA-155 表达水平对乳腺癌具有较高的诊断价值, ROC 曲线下面积为 0.941, 灵敏度、特异度分别为 84.2% 和 91.3%, 与国外相关研究结果相符^[14-15]。

尽管钼靶检查等常规筛查手段在目前乳腺癌诊断中具有重要地位, 但已有研究表明, microRNA-155 诊断乳腺癌的诊断价值比钼靶更高^[16]。钼靶还因辐射、乳腺组织本身等因素的影响导致应用受限。而检测 microRNA-155 表达更易获取检测标本, 对受试者

基本无创伤和痛苦,操作方法成熟,是潜在的良好的诊断乳腺癌的标志物。

本研究结果显示,血清 microRNA-155 的表达水平与淋巴结转移显著相关,淋巴结转移组患者血清 microRNA-155 表达水平明显高于无淋巴结转移组,而与患者年龄、是否绝经、激素受体等临床病理特点无关,与相关研究结果基本一致^[17]。表明 microRNA-155 的高表达可能导致淋巴结转移,而转移正是乳腺癌患者致死的主要原因。本研究 Kaplan-Meier 生存分析结果显示,不同 microRNA-155 表达水平组患者生存率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),microRNA-155 高表达提示预后较差,原因可能是 microRNA-155 通过调控促进上皮-间质转化从而加快肿瘤转移的进程^[18]。

4 结 论

microRNA-155 的表达在乳腺癌的诊断与预后预测中具有重要意义,可能成为诊断乳腺癌并根据预后预测指导临床治疗的重要标志物。

参考文献

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] YATES L R, KNAPPSKOG S, WEDGE D, et al. Genomic evolution of breast cancer metastasis and relapse [J]. Cancer Cell, 2017, 32(2): 169-184.
- [3] NASSAR F J, NASR R, TALHOUK R. MicroRNAs as biomarkers for early breast cancer diagnosis, prognosis and therapy prediction[J]. Pharmacol Ther, 2017, 172: 34-49.
- [4] TEOH S L, DAS S. The role of MicroRNAs in diagnosis, prognosis, metastasis and resistant cases in breast cancer [J]. Curr Pharm Des, 2017, 23(12): 1845-1859.
- [5] 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.
- [6] HAMAM R, HAMAM D, ALSALEH K A, et al. Circulating microRNAs in breast cancer: novel diagnostic and prognostic biomarkers[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(9): e3045.
- [7] KONG W, HE L, COPPOLA M, et al. MicroRNA-155 regulates cell survival, growth, and chemosensitivity by targeting FOXO3a in breast cancer[J]. J Biol Chem, 2010, 285(23): 17869-17879.
- [8] MA Z, MA Y, XIA Q, et al. MicroRNA-155 expression inversely correlates with pathologic stage of gastric cancer and it inhibits gastric cancer cell growth by targeting cyclin D1[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2016, 142(6): 1201-1212.
- [9] ZHANG L, WANG W, LI X, et al. MicroRNA-155 promotes tumor growth of human hepatocellular carcinoma by targeting ARID2[J]. Int J Oncol, 2016, 48(6): 2425-2434.
- [10] Hagan J P, Croce C M. MicroRNAs in carcinogenesis[J]. Cytogenet Genome Res, 2007, 118(2/3/4): 252-259.
- [11] 张琴, 卢忠心. microRNA 与肿瘤侵袭转移的研究进展 [J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(22): 3151-3153.
- [12] SOCHOR M, BASOVA P, PESTA M, et al. Oncogenic microRNAs: miR-155, miR-19a, miR-181b, and miR-24 enable monitoring of early breast cancer in serum[J]. BMC Cancer, 2014, 14: 448.
- [13] IORIO M V, FERRACIN M, LIU C G, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer[J]. Cancer Res, 2005, 65(16): 7065-7070.
- [14] MARTIN E C, KREBS A E, BURKS H E, et al. miR-155 induced transcriptome changes in the MCF-7 breast cancer cell line leads to enhanced mitogen activated protein kinase signaling[J]. Genes Cancer, 2014, 5(9/10): 353-364.
- [15] Mar-Aguilar F, Mendoza-Ramirez J A, Malagón-Santiago I, et al. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential breast cancer biomarkers[J]. Dis Markers, 2013, 34(3): 163-169.
- [16] WANG F, HOU J, JIN W, et al. Increased circulating microRNA-155 as a potential biomarker for breast cancer screening: a meta-analysis[J]. Molecules, 2014, 19(5): 6282-6293.
- [17] CHEN J, WANG B C, TANG J H. Clinical significance of microRNA-155 expression in human breast cancer[J]. J Surg Oncol, 2012, 106(3): 260-266, 8.
- [18] JIANG S, ZHANG H W, LU M H, 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.

(收稿日期:2018-09-28 修回日期:2018-12-25)