·论著·

miR-10b 在 Her-2 阳性乳腺癌患者血浆中表达及其预后关系研究

周怡锦　林碧云　谢玉柳　黄文楠　张英

【摘要】 **目的**　探讨 miR-10b 在 Her-2 阳性乳腺癌患者血浆中的表达及其与乳腺癌临床病理特征之间的相互关系及作为预后、预测的可行性。**方法**　采用 RT-qPCR 法检测 40 例乳腺癌患者及 20 名健康者血浆中 miR-10b 的表达情况,分析 miR-10b 在 Her-2 阳性乳腺癌患者血浆中的表达情况与乳腺癌临床病理特征之间的相关性。**结果**　miR-10b 在 Her-2 阳性乳腺癌患者血浆中表达是健康者的 5.12 倍($P<0.0001$),N1~3 组是 N0 组的 5.79 倍($2^{-\triangle\triangle Ct}=5.79$)($P=0.001$),T3~4 是 T1~2 的 3.49 倍($2^{-\triangle\triangle Ct}=3.49$)($P=0.009$),临床分期Ⅲ~Ⅳ期组是Ⅰ~Ⅱ期组的 1.39 倍($2^{-\triangle\triangle Ct}=1.39$)($P=0.042$),而与年龄、ER、PR、KI67、P53、组织学分级无相关性($P>0.05$)。**结论**　miR-10b 在乳腺癌患者血浆中表达较健康者显著增加,并且与乳腺癌的侵袭性生物学行为密切相关,提示 miR-10b 有可能成为乳腺癌患者诊断或随诊的指标。

【关键词】 乳腺癌;　miR-10b;　RT-qPCR;　血循环

[中图分类号]R737　[文献标识码]A　DOI:10.3969/j.issn.1002-1256.2018.19.001

The expression of miR-10b in plasma of patients with Her-2 positive breast cancer and its relationship with prognosis

ZHOU Yi-jin.　Cancer center of affiliated hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang, Guangdong, 524000, *China.*

【**Abstract**】 **Objective**　To detect the expression of miR-10b in plasma of patients with Her-2 positive breast cancer, and its correlation with clinical pathological characteristics, and its feasibility in evaluating the prognosis and predicting the disease.**Methods**　The RT-qPCR method was used to measure the expression of miR-10b in the plasma of 40 breast cancer patients and 20 healthy subjects. Analyze the correlation between the expression of miR-10b in the plasma of patients with her-2 positive breast cancer and the clinical pathological features of breast cancer.**Results**　MiR-10b expression in her-2 positive breast cancer patients plasma was 5.12 times of the healthy persons ($P<0.0001$). The expression of miR-10b in N1-3 group was 5.79 ($2^{-\triangle\triangle Ct}=5.79$) times of that in N0 group ($P=0.001$). It was found the expression of miR-10b in bigger tumor (T3~4) was 3.49 times that of the smaller tumor (T1~2) ($P=0.009$),and clinical TNM stage (Ⅲ~Ⅳ) was 1.39 times of clinical TNM stage (Ⅰ~Ⅱ) ($P=0.042$). Has no significant association with the age, ER, PR, KI67, P53, and histological grade ($P>0.05$). **Conclusions**　Mir-10b expression increased significantly in breast cancer patients than healthy persons, and was closely related to invasive biological behaviors of breast cancer, suggesting that mir-10b may be a diagnostic and follow-up indicator for breast cancer patients.

【**Key words**】 Breast cancer;　miR-10b;　RT-qPCR;　Blood circulation

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,由于诊断技术改进及新药研发,明显提高了乳腺癌患者诊断率及提高治愈率,但仍有部分患者由于出现远处转移及原发对化疗、内分泌治疗耐药增加了治愈的难度,因此,早期发现早期治疗是关键,攻破耐药机制是重点。目前,国内外多项研究发现 miRNAs 分子在乳腺癌细胞中异常表达[1],且与乳腺癌复发、转移有着密切的关系[2-4]。本团队前期实验研究已证实在乳腺癌实体标本中,miR-10b 在乳腺癌组织中的表达水平比癌旁组织明显上调,并且与淋巴结转移、肿瘤大小、临床分期、组织学分级、Her-2 扩增情况、ER 表达状态及 Ki-67 数值呈正相关。本研究采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 Her-2 阳性乳腺癌患者血浆中 miR-10b 的表达情况,初步分析其与临床分期、肿瘤大小、淋巴结转移、组织学分级、雌激素受体(ER、PR)表达情况、Ki-67 水平等临床病理参数的关系;探讨 miR-10b 对乳腺癌预后、预测的价值。

一、材料与方法

1.收集资料:(1)血浆标本收集:收集 2016 年 10 月—2018 年 3 月广东医科大学附属医院乳腺外科手术病理明确诊断为 Her-2 阳性乳腺浸润性导管癌,术前术后均未行放化疗、内分泌治疗、靶向等抗肿瘤患者 40 例,采集外周血 3~4 ml;同期采集健康志愿者血浆标本 20 例,常规-80 ℃冰箱保存,备用提取

作者单位:524000 广东湛江,广东医科大学附属医院肿瘤中心(周怡锦、谢玉柳、黄文楠、张英);广东医科大学附属医院病理科(林碧云)

通信作者:张英,Email:hualiaoke@163.com

RNA。所有标本均来自女性。(2)临床病理资料:40 例 Her-2 阳性乳腺浸润性导管癌(Her-2 检测参考 2013 版国际公认的 ASCO/CAP 指南推荐的评分系统),病理分期(根据 AJCC2003 年乳腺癌 TNM 分期):Ⅰ~Ⅱ期 18 例,Ⅲ~Ⅳ期 22 例;有淋巴结转移 22 例,无淋巴结转移 18 例;ER 阳性 19 例,ER 阴性 21 例,PR 阳性 12 例,PR 阴性 28 例(ER、PR 检测参考参考《2014 版中国乳腺癌雌、孕激素受体免疫组化学检测指南》),26 例 Ki-67<50%,14 例 Ki-67≥50%,P53 阳性 12 例,P53 阴性 28 例。

2.主要试剂及实验材料:RNA 提取:全血总 RNA 快速抽提试剂盒(上海生工生物工程有限公司,产品编号:B518623)。RNA 逆转:miRNA 第一链 cDNA 合成(加尾法)(上海生工生物工程有限公司,产品编号:B532451)。仪器:Bio-Rad T100,QPCR:SYBR® Premix Ex Taq™ II(TliRNaseH Plus)(宝日医生物技术(北京)有限公司,产品编号:RR820A)。仪器:LocheLightCycler480,QPCR 引物(上海生工生物工程有限公司)。

has-mir-10b

Forward　5'-TGTAGAACCGAATTTGTG-3'

Reverse　5'-TAGAATCGAATCTGTGAC-3'

U6　Forward　5'-GCAAGGATGACACGCAAAT-3'

Reverse　5'ATGGAACGCTTCACGAAT-3'

3.实验方法:实时荧光定量 PCR 法:40 例乳腺癌患者血浆及 20 例健康者血浆提取 RNA,逆转录后获取反转录产物,应用 SYBR SYBR® Premix Ex Taq™ II (TliRNaseH Plus) RT-PCR 检测 miR-10b,样本用 3 次独立样本经过 3 次独立实验,本实验以 U6 为内参基因,采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 相对定量方法进行数据分析:△Ct(实验组)= Ct(实验组目标基因)-Ct(实验组内参基因);△Ct(对照组)= Ct(对照组目标基因)-Ct(对照组内参);△△Ct = △Ct(实验组)-△Ct(对照组)。$2^{-\triangle\triangle Ct}$ 具有线性关系,可用于最后数据的统计,表示实验组与对照组成相对倍数关系,若 $2^{-\triangle\triangle Ct}>1$,则说明目的基因上调,反之则下调。

4.统计方法:数据均采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。两组间均数比较采用两独立样本的 t 检验,χ^2 检验分析 miR-10b 表达与临床病理因素的关系,理论频数<1 时,使用 Fish 确切概率法。数据大小使用均数+标准差($\bar{x}\pm s$)表示,$P<0.05$ 为统计学上有差异。

二、结果

1.miR-10b 在乳腺癌患者中的表达:miR-10b 在乳腺癌患者及健康者中的表达量△Ct 分别为(5.32±1.23)、(8.67±0.87),应用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 数据分析,miR-10b 在乳腺癌患者血浆中的表达量是健康者的 5.12 倍,明显增多($P<0.0001$)。见图 1。

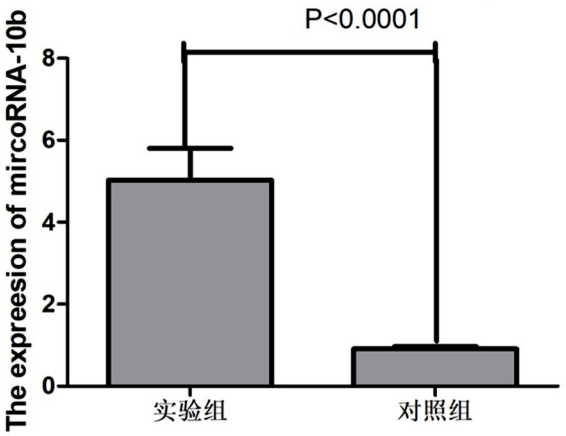

图 1　两组血浆 miRNA-10b 表达的比较

2.miR-10b 表达与乳腺癌临床病理参数的关系:应用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 数据分析 miR-10b 表达水平与乳腺癌临床病理参数的关系,发现肿瘤越大,miR-10b 表达水平越高,T3-4 是 T2-1 组的 3.49 倍($2^{-\triangle\triangle Ct}=3.49$)($P=0.009$);有淋巴结转移组是无淋巴结转移组的 5.79 倍($2^{-\triangle\triangle Ct}=5.79$)($P=0.001$);Ⅲ-Ⅳ期组是Ⅰ~Ⅱ期组 1.89 倍($2^{-\triangle\triangle Ct}=1.39$)($P=0.042$),显示肿瘤分期越晚,miR-10b 表达越多。上述结果提示 miR-10b 表达量与乳腺癌组织的肿瘤大小、TNM 分期、淋巴结转移情况具有相关性($P<0.05$),而与患者年龄、ER、PR、P53、组织学分级、Ki67%的表达无相关性($P>0.05$)。见表 1。

讨论　MiRNA 是一类内源性、非编码的小分子 RNA,自从 Lawrie C[10] 首次报道了在人类外周血标本(血清)中检测到了 miRNA 的存在。越来越多的科研人员投入到循环 miRNA 与肿瘤的关系的研究之中,并且取得了非常多的成果[7-8]。表明循环 miRNA 与肿瘤病变的发生、发展存在密切的联系。miRNA 在循环中有较强的稳定性,经反复冻融或在强酸、强碱环境中其表达水平基本不变[5-6],可长期保存,样本容易获取,miRNA 检测方法已经逐渐成熟,为循环中 miRNA-10b 研究奠定了基础。

目前 miRNA 在乳腺癌中有大量研究,多种 miRNAs 与乳腺癌的组织病理、临床特征有特殊的关系[9],提示 miRNAs 在乳腺癌形成、发展过程中起到重要的作用。我们研究发现,与健康对照组对比,miRNA-10b 在乳腺癌患者血浆中的表达水平明显上调,在我们继续评估 40 例 HER-2 阳性乳腺癌患者血浆标本中 miR-10b 的表达与临床病理因素之间的

关系时发现,miR-10b 的表达水平与淋巴结转移、肿瘤大小、肿瘤分期呈正相关($P<0.05$);淋巴结转移数越多、肿瘤越大、分期越晚,miRNA-10b 表达水平越高;另外本研究发现 miR-10b 的表达在淋巴结转移的标本中上调更明显;而与年龄、ER、PR、KI67、P53、组织学分级、Ki67 未体现出相关性($P>0.05$)。miRNA-10b 在乳腺癌发生、发展过程中起重要作用,其与乳腺癌侵袭、转移密切相关。因此,推测 miR-10b 在乳腺癌中是促进性 miRNAs,或许是通过调节某些癌基因而发挥肿瘤促进性基因的作用[11],但其具体作用机制有待进一步研究。

综上所述,本研究发现 miR-10b 在乳腺癌患者血浆中高表达,miR-10b 表达与淋巴结转移、肿瘤大小、临床分期正相关($P<0.05$)。但本研究也存在一定的缺陷,样本量有限,且本研究样本为 Her-2 阳性术后患者,不能兼顾所有类型乳腺癌,缺乏对疾病复发、无病生存期等预后效果的长期随访,缺乏对这期间循环 miRNA 表达变化的研究,因此,仍需进一步研究大样本量及不同分子分型的样本来提高准确性及研究的可靠性。

循环 miRNA 具有较强的稳定性,及采用外周循环血液标本进行检测时取材方便、对受检者损伤小,容易被大众所接受。有望循环 miRNA 可能成为下一种用于乳腺癌诊断的标志物及术后复查检测的指标,miR-10b 有望成为治疗的新靶点,攻破耐药机制。

参　考　文　献

[1] Frères P,Wenric S,Boukerroucha M,et al. Circulating microRNA-based screening tool for breast cancer[J].Oncotarget,2015,7(5):5416-5428.

[2] Lu M,Ju S,Shen X,et al.Combined detection of plasma miR-127-3p and HE4 improves the diagnostic efficacy of breast cancer[J]. Cancer Biomark,2017,18(2):143-148.

[3] 石岩,秦岩,宋磊,等.miRNA-21 和 miRNA-134 在乳腺癌患者血清中表达情况及其临床意义[J]. 中山大学学报(医学科学版),2016,37(6):875-880.

[4] Shaker O,Maher M,Nassar Y,et al.Role of microRNAs -29b-2, -155, -197and -205 as diagnostic biomarkers in serum of breast cancer females[J].Gene,2015, 560(1):77-82.

[5] 韩璐璐,高小晶,管晓媛,等.冻存血浆中 microRNAS 稳定性研究[J].中华实用诊断与治疗杂志,2012,26(7):639-641.

[6] 聂宇,张洋,韩变梅,等.常规 TRIZOL 法提取血清 microRNA 的改良[J].中华实用诊断与治疗杂志,2011,25(5):427-428.

[7] Chen TH,Lee C,Chiu CT,et al.Circulating microRNA-196a is an early gastric cancer biomarker[J]. Oncotarget, 2018, 9(12):10317-10323.

[8] Li P,Ou Q,Braciak TA,et al.MicroRNA-192-5p is a predictive biomarker of survival for stage IIIB colon cancer patients[J]. Jpn J Clin Oncol,2018,48(7):619-624.

[9] Leicui Z,Lin D,Song W,et al. Diagnostic value of circulating microRNAsas biomarkers for breast cancer: a meta-analysis study[J]. Tumor Biology,2015,36(2):829-839.

[10] Lawrie C,Gal S,Dunlop H,et al.Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma[J]. Br J Haematol,2008,141(5):672-675.

[11] 顾忆,李小曼,郑禄枫,等.MicoRNA-10b 调控乳腺癌细胞生长增殖与凋亡的研究[J].中国药科大学学报,2015,46(2):242-249.

表 1　miR-10b 表达和乳腺癌临床病理参数的关系

临床特征	例数 n	miR-10b 基因表达量(△Ct)	T	P 值
年龄				
<50 岁	23	6.78±0.71		
≥50 岁	17	6.58±0.47	0.59	0.06
肿瘤大小				
T1~T2	22	6.62±1.23	9.98	0.009
T3~T4	18	6.18±0.47		
淋巴结转移				
N0	22	8.99±0.52		
N1~N3	18	5.30±0.22	24.89	0.001
TNM 分期				
Ⅰ~Ⅱ	12	7.81±0.36		
Ⅲ~Ⅳ	18	6.21±0.40	1.66	0.042
组织学分级				
Ⅰ~Ⅱ	10	6.68±0.38		
Ⅲ	30	6.56 ±0.92	0.06	0.41
ER				
阳性	19	6.50±0.45		
阴性	21	6.84±0.74	0.64	0.53
PR				
阳性	12	6.38±1.73		
阴性	28	6.96±1.60	0.87	0.39
P53				
阳性	22	6.57±1.24		
阴性	18	6.54±1.24	0.56	0.61
Ki-67				
<50%	26	6.64±1.38		
≥50%	14	6.64±1.54	0.98	0.35

(收稿日期:2018-07-25)
(本文编辑:卜明)