

血清 miR-765 和 CA153 联合检测对乳腺癌的诊断价值*

洪 宏,袁建芬,喻海忠 (南通市中医院检验科,江苏南通 226001)

摘要:目的 探讨血清 miR-765 与 CA153 联合检测对乳腺癌的诊断价值。方法 收集乳腺癌患者 58 例,乳腺良性疾病患者 28 例及体检健康者 30 例,应用实时荧光定量聚合酶链反应检测血清 miR-765 的表达水平,受试者工作特征曲线分析单一和联合检测对早期乳腺癌的诊断价值。结果 乳腺癌患者血清 miR-765 相对表达量均显著低于乳腺良性疾病患者和健康对照者($F=35.97$,均 $P<0.01$);单独检测 miR-765 的 ROC 曲线下 AUC 为 0.843(95%CI:0.767~0.919),灵敏度为 87.9%,特异度为 81.0%;miR-765 与 CA153 联合检测的 ROC 曲线下 AUC 为 0.903(95%CI:0.844~0.962),灵敏度为 89.7%,特异度为 86.2%;CA153<25U/ml 的乳腺癌患者血清 miR-765 的 ROC 曲线下 AUC 为 0.840(95%CI:0.746~0.934),灵敏度为 87.5%,特异度为 82.4%。结论 miR-765 对乳腺癌的诊断具有一定价值,与 CA153 联合检测可为临床提供一种潜在的辅助方法。

关键词:微小 RNA-765;实时荧光定量聚合酶链反应;乳腺癌

中图分类号:R737.9;R730.43 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2018)03-023-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2018.03.023

Diagnostic Value of Combined Detection of Serum miR-765 and CA153 in Breast Cancer

HONG Hong, YUAN Jian-fen, YU Hai-zhong (Department of Clinical Laboratory, Nantong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Nantong 226001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the diagnostic value of serum miR-765 and CA153 in patients with breast cancer. **Methods** 58 cases of patients with breast cancer, 28 cases of patients with benign breast disease and 30 cases of healthy individuals were collected. The level of serum miR-765 was determined by real-time fluorescence quantitation polymerase chain reaction (PCR). Receiveroperating characteristic (ROC) curve was used to analyze the diagnosis value of single and combined detection in breast cancer. **Results** The relative expression levels of miR-765 in breast carcinoma patients were significantly lower than those in benign breast disease and healthy controls ($F=35.97$, all $P<0.01$). The receiver operating characteristic(ROC) curve analysis of serum miR-765 for the diagnosis of breast cancer yielded AUC of 0.843 (95%CI:0.767~0.919) with 87.9% sensitivity and 81.0% specificity. The ROC curve analysis of combined miR-765 and CA153 for breast cancer detection yielded AUC of 0.903 (95%CI:0.844~0.962) with 89.7% sensitivity and 86.2% specificity. The ROC curve analysis of serum miR-765 as biomarkers for the group (CA153<25 U/ml) of breast cancer yielded AUC of 0.840 (95%CI:0.746~0.934) with 87.5% sensitivity and 82.4% specificity. **Conclusion** miR-765 showed that it would has certain diagnostic value for breast cancer, and combined with CA153, miR-765 may provide a potential assistant diagnostic method.

Keywords: microRNA-765; real-time fluorescence quantitation polymerase chain reaction; breast cancer

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤,发病率、致死率均较高,且有年轻化趋势,严重威胁女性健康^[1]。近年来研究表明^[2,3],微小 RNA(microRNA, miRNA)的检测可用于恶性肿瘤的早期诊断和预后判断,多种 microRNA 的异常表达影响着乳腺癌的行为和进展,其中 miR-765 的异常表达亦参与乳腺癌的发生发展^[4]。本研究旨在通过联合检测乳腺癌患者血清 miR-765 表达和 CA153 的水平,探讨联合检测模式在乳腺癌诊断中的价值,以期寻求新方法诊断乳腺癌。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2014 年 4 月~2018 年 1 月南通市中医院 58 例行乳腺癌根治术患者、28 例乳腺良性疾病患者及 30 例健康者静脉血。其中乳腺癌患者术后均经病理学检查确诊,术前均未行任何放、化疗,年龄 32~71 岁,平均年龄 48.2 岁;乳腺良性疾病患者为同期我院收治的乳腺纤维腺瘤、囊性增生及乳头状瘤,年龄 35~68 岁,平均年龄 47.4 岁;另健康者为女性体检者,均无肝肾、心血管及乳腺等疾病,年龄 33~69 岁,平均年龄 48.7 岁。各组在年龄、性别上差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

* 基金项目:南通市社会发展计划资助项目(MS2017017-4)。

作者简介:洪 宏(1977-),女,硕士研究生,副主任技师,研究方向:分子生物学,E-mail:2669831140@qq.com。

通讯作者:喻海忠(1967-),男,主任技师,硕士生导师,E-mail:yuhaizhong911@163.com。

1.2 试剂和仪器 Trizol(Invitrogen 美国), TaqMan MicroRNA RT kit(Ambion 美国), TaqMan MicroRNA assay(Life 美国), Cobas z 480 实时荧光定量 PCR 仪(Roche 瑞士); Cobas e 411 电化学发光仪(Roche 瑞士), CA153 试剂及质控品均为原装配套试剂。

1.3 方法 术前空腹抽取静脉血 3 ml, 分离血清, 用 Trizol 法提取血液样本中的总 mRNA。分光光度计 $A_{260nm/280nm}$ 检测吸光度, 1.8~2.2 合格, 进行下一步逆转录。TaqMan MicroRNA RT kit 试剂盒逆转录反应: 16℃ 30 min, 42℃ 30 min, 85℃ 5 min, 生成的 cDNA 置于 -70℃ 保存。实时荧光定量 PCR 仪使用 TaqMan MicroRNA assay 试剂盒进行扩增反应, U6 为内参, miR-765 反应体系如下: cDNA 1 μ l, 2×Master mix 10 μ l, PCR primer 0.5 μ l, 20×SYBRI 1 μ l, H₂O 7.5 μ l, 共 20 μ l; U6 体系中除去 PCR primer, H₂O 增至 8 μ l。反应条件: 95℃ 10 min, 95℃ 15 s, 60℃ 30 s(40 个循环), 溶解曲线 1 个循环。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示 miR-765 的相对表达含量。用罗氏 Cobas e 411 型电化学发光仪检

测 CA153。

1.4 统计学分析 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析, 首先用 Kolmogorov-Smirnov Z 检验进行正态性检验, miR-765 相对表达量呈正态分布, 用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 三组间的比较用方差分析, 组间两两比较用 q 检验(SNK 法); CA153 呈非正态分布, 用 M(P25, P75)表示。三组间比较采用非参数 Kruskal-Wallis H 检验; 联合诊断采用二元 Logistic 回归分析, 受试者工作特征曲线(ROC 曲线)下面积(AUC), 灵敏度和特异度评价指标的诊断价值。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血清 CA153 含量与 miR-765 相对表达水平比较 见表 1。乳腺癌患者血清 CA153 的水平与乳腺良性疾病患者及健康对照者比较, 差异均有统计学意义($H=26.24, P<0.01$); 乳腺癌患者血清中 miR-765 的相对表达量低于乳腺良性疾病患者, 同时低于健康体检者, 差异均有统计学意义($F=35.97$, 均 $P<0.01$)。

表 1 各组血清 CA153 含量与 miR-765 相对表达水平比较[M(P₂₅, P₇₅), $\bar{x}\pm s$]

项 目	乳腺癌组($n=58$)	乳腺良性疾病($n=28$)	健康对照($n=30$)	H/F	P
CA153(U/ml)	20.00(11.06, 72.72)	10.20(7.33, 13.56)	9.95(7.83, 12.84)	26.24	<0.01
miR-765($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	0.199±0.080	0.281±0.067	0.331±0.051	35.97	<0.01

2.2 CA153 含量和 miR-765 相对表达水平单独检测与联合检测对乳腺癌的诊断价值 见表 2。以 miR-765, CA153 为自变量, 建立 Logistic 回归

模型, 通过模型中的概率值来拟合联合检测的 ROC 曲线, CA153 和 miR-765 联合检测的 AUC 为 0.903, 有较好的灵敏度和特异度。

表 2 血清 CA153 含量和 miR-765 相对表达水平对乳腺癌的诊断价值

项 目	最佳截值	AUC(95%CI)	P 值	灵敏度(%)	特异度(%)
miR-765	0.253	0.843(0.767~0.919)	<0.01	87.9	81.0
CA153	16.33	0.775(0.689~0.861)	<0.01	60.3	91.4
两者联合检测		0.903(0.844~0.962)	<0.01	89.7	86.2

2.3 CA153 阴性患者血清 miR-765 相对表达水平对乳腺癌的诊断价值 见图 1。CA153<25U/ml 的乳腺癌患者也可通过检测血清 miR-765 相对表达量诊断乳腺癌, 其灵敏度为 87.5%, 特异度为 82.4%, AUC 为 0.840(95%CI: 0.746~0.934, $P<0.01$)。

3 讨论 microRNA 是一类非编码的小分子 RNA 片段, 具有高度保守性, 可结合靶基因 mRNA, 在转录后水平调控靶基因的表达, 以调节细胞生命活动中众多信号转导途径, 在细胞发育、增殖及凋亡等一系列过程中发挥着重要作用^[5~7]。在

肿瘤的发生和发展过程中, 起到癌基因或抑癌基因的作用^[8,9]。研究发现, 肿瘤细胞中 microRNA 可进入血液循环, 能稳定的存在于血清当中, 表达水平可反映组织中的表达情况, 且具有耐 RNA 酶降解, 可反复冻融, 能长期保存等优点, 具备作为肿瘤标志物的特性应用于临床^[10,11]。有研究表明抑制乳腺癌 SK-BR-3 细胞株中的 miR-765 表达有助于细胞凋亡, 并发现其潜在的靶基因 EMP3 可能是肿瘤增殖、侵袭和转移的癌基因, 在乳腺癌发生发展中可能起到抑癌基因的作用^[12]。

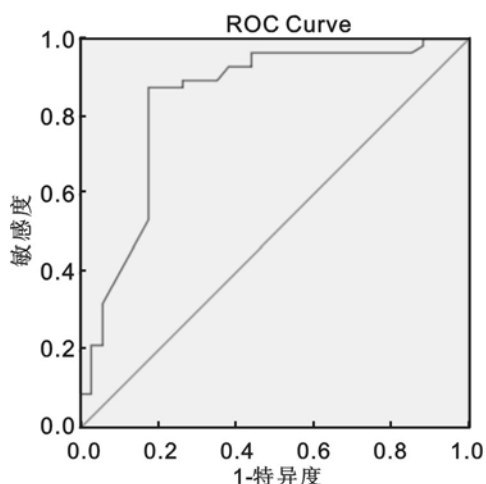


图1 CA153<25U/ml的乳腺癌患者
miR-765检测诊断乳腺癌的ROC曲线

目前临床上诊断乳腺癌首选的血清学标志物为CA153,但其敏感度和特异度均不能满足临床需求。本研究通过血清学检测提示 miR-765 在乳腺癌患者血清中表达下调,单独检测 miR-765 灵敏度为 87.9%,特异度为 81.0%,AUC=0.843($P<0.01$),表明临床诊断准确性较高,通过 ROC 曲线确定血清 miR-765 表达的临床诊断临界值(cut-off value ≤ 0.253),即当 miR-765 相对表达水平 $2^{-\Delta\Delta C_t} \leq 0.253$ 可考虑患有乳腺癌的可能。单独检测 CA153 灵敏度仅为 60.3%,特异度为 91.4%,AUC 为 0.775 ($P<0.01$),通过 miR-765 与 CA153 联合检测,诊断乳腺癌的灵敏度可提高至 89.7%,与单独检测 CA153 特异度相比稍低(86.2%),AUC 为 0.903($P<0.01$),表明联合诊断能提高诊断乳腺癌的准确性,但要注意假阳性问题。CA153<25U/ml 的乳腺癌患者中血清 miR-765 诊断乳腺癌的灵敏度为 87.5%,特异度为 82.4%,AUC 为 0.840($P<0.01$),提示通过对血清 miR-765 的检测可以降低血清 CA153<25U/ml 的乳腺癌患者通过血清学筛查的漏检率。

综上所述,乳腺癌患者血清 miR-765 的表达下调,miR-765 对乳腺癌诊断的灵敏度和特异度均较好,特别是 miR-765 联合检测 CA153 后,能显著减少临床的漏诊率。然而,由于成本问题,纳入本研究的病例数有限,指标的诊断价值仍需加大样本量来进一步验证;未对乳腺癌进行分期,用于乳腺癌的早期诊断尚未明确;以及未进行随访观察乳腺癌患者的预后情况等。因此,我们的结果为血液肿瘤标志物 miR-765 用于乳腺癌筛选提供了可能性,研究基于血清中 miR-765 和 CA153 两个指标对乳腺癌的诊断价值进行了评价,仅作为临床上一种辅助诊断的方法。

参考文献:

- [1] 刘水逸,吴唐维,李晓怡,等. MicroRNA-145 在乳腺癌中的表达及其对乳腺癌侵袭转移的影响[J]. 中华检验医学杂志,2015,38(9):613-616.
Liu SY, Wu TW, Li XY, et al. Expression of miR-145 in breast cancer and its role in invasion and migration of breast cancer cells[J]. Chin J Lab Med, 2015, 38(9):613-616.
- [2] Sempere LF, Keto J, Fabbri M. Exosomal microRNAs in breast cancer towards diagnostic and therapeutic applications[J]. Cancers (Basel), 2017, 9(7):E71.
- [3] He Y, Deng F, Yang S, et al. Exosomal microRNA: a novel biomarker for breast cancer[J]. Biomark Med, 2018, 12(2):177-188.
- [4] 胡道军,秦兵,郁森,等. 循环 miRNAs 检测对乳腺癌诊断价值的 meta 分析[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(5):93-96.
Hu DJ, Qin B, Yu M, et al. Circulating miRNAs in the diagnosis of breast cancer: A meta analysis[J]. J Mod Lab Med, 2014, 29(5):93-96.
- [5] Chu C, Liu X, Bai X, et al. MiR-519d suppresses breast cancer tumorigenesis and metastasis via targeting MMP3[J]. Int J Biol Sci, 2018, 14(2):228-236.
- [6] Xie W, Sun F, Chen L, et al. miR-96 promotes breast cancer metastasis by suppressing MTSS1[J]. Oncol Lett, 2018, 15(3):3464-3471.
- [7] Cheng X, Chen J, Huang Z. MiR-372 promotes breast cancer cell proliferation by directly targeting LATS2[J]. Exp Ther Med, 2018, 15(3):2812-2817.
- [8] Jurkovicova D, Smolkova B, Magyerkova M, et al. Down-regulation of traditional oncomiRs in plasma of breast cancer patients[J]. Oncotarget, 2017, 8(44):77369-77384.
- [9] Yang Y, Jiang Z, Ma N, et al. MicroRNA-223 targeting STIM1 inhibits the biological behavior of breast cancer[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 45(2):856-866.
- [10] 苏谦,陈文举,王攀,等. 血清 miR-598-3p 与 CA153 联合检测在乳腺癌诊断中的意义[J]. 检验医学, 2017, 32(6):457-460.
Su Q, Chen WJ, Wang P, et al. Combined determination of serum miR-598-3p and CA153 in the diagnosis of breast carcinoma[J]. Laboratory Medicine, 2017, 32(6):457-460.
- [11] Asiaf A, Ahmad ST, Arjumand W, et al. MicroRNAs in breast cancer: diagnostic and therapeutic potential[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1699:23-43.
- [12] Xiao CH, Yuan JF, Guo CY, et al. Epithelial membrane protein 3 functions as an oncogene and is regulated by microRNA-765 in primary breast carcinoma[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(5):6445-6450.

收稿日期:2018-03-22

修回日期:2018-04-10