乳腺癌患者血清 miR-765,miR-200b 水平检测及与临床病理学相关研究*

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 探讨乳腺癌患者血清 miR-765 与 miR-200b 的表达及其临床应用价值。**方法** 选取乳腺癌患者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PCR技术检测血清 miR-765 和 miR-200b 的表达水平,评价指标的诊断价值,并分析与乳腺癌临床病理特征的相关性。**结果** 乳腺癌患者血清 miR-765 和 miR-200b 相对表达量均显著性低于乳腺良性疾病患者(t=3.955,2.657,P<0.05)和健康对照者(t=4.465,3.518,P<0.05)。ROC曲线分析结果显示,miR-765 在乳腺癌诊断中的 AUC 为 0.843(95%CI:0.767~0.919),miR-200b 在乳腺癌诊断中的 AUC 为 0.897(95%CI:0837~0.957)。miR-765 联合 miR-200b 在乳腺癌诊断中的 AUC 为 0.952(95%CI:0.941~0.990),两者联合优于单一检测 miR-765 或 miR-200b。在乳腺癌患者中血清 miR-765 相对表达量与临床分期相关(t=3.222,P<0.05);miR-200b 相对表达量与临床分期、淋巴结转移相关(t=1.855,3.987,P 均<0.05)。**结论** 乳腺癌患者血清 miR-765 与 miR-200b 表达水平显著降低,并与乳腺癌临床病理特征明显相关,血清 miR-765 与 miR-200b 联合检测具有较高的临床应用价值。

关键词:微小 RNA-765;微小 RNA-200b;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)06-055-04
doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2018.06.014

Detection of Serum miR-765 and miR-200b Levels in Breast Cancer Patients and Its Correlation with Clinicopathology

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 explore the relative expression of serum miR-765 and miR-200b in breast carcinoma patients and its clinical value. **Methods** 58 cases of patients with breast cancer,28 cases of patients with benign breast disease and 30 cases of healthy individuals were selected. The expression levels of serum miR-765 and miR-200b were determined by fluorescence quantitative PCR. The diagnostic value were evaluated,and the correlation between miRNAs expression and clinicopathological features of breast cancer were analyzed. **Result** The relative expression levels of miR-765 and miR-200b in breast carcinoma patients were significantly lower than those in benign breast disease (t=3.955,2.657,P<0.05) and healthy controls (t=4.465,3.518,P<0.05). ROC curve analysis showed that,in the diagnosis of breast cancer,AUC value of miR-765 was 0.843 (95%CI:0.767~0.919),AUC value of miR-200b was 0.897 (95%CI:0837~0.957),AUC value of miR-765 combined with miR-200b in the diagnosis of breast was 0.952 (95%CI:0.941~0.990),which was better than a single detector miR-765 or miR-200b. In the cancer patients,low miR-765 relative expression was significantly correlated to advanced clinical stage (t=3.222,P<0.05),and low miR-200b relative expression was significantly correlated to advanced clinical stage (t=1.855,P<0.05) and lymph node metastasis (t=3.987,P<0.05). **Conclusion** Levels of miR-765 and miR-200b in serum of breast carcinoma patients were reduced significantly,and had a significant correlation with the clinicopathological features of breast cancer. There is a high clinical value of combed detection of miR-765 with miR-200b to breast cancer.

Keywords:microRNA-765;microRNA-200b;real-time fluorescence quantitation polymerase chain reaction;breast cancer

乳腺癌是我国女性最常见的恶性肿瘤。高发病率、致死率,严重威胁女性身体健康[1]。早期确诊是提高患者生存率的关键。近年来,有大量研究表明,多种血清微小 RNA(miRNA,miR)的异常表达与乳腺癌的发生、发展密切相关,对乳腺癌的早期诊断、预后评估、治疗等都有非常重要的意义[2,3]。miR-765 和 miR-200b 参与乳腺癌的发生、发展[4,5],但联合检测在乳腺癌诊断的临床价值及其与各临床病理特征间的关系还缺乏相关性研究。本研究应用实时荧光定量PCR的方法检测乳腺癌患者血循环 miR-765 和 miR-200b 的表达情况,并进行价值和相关性探讨,报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取本院2014年4月~2018年

* 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月收治的初诊乳腺癌患者58例(乳腺癌组),平均年龄48.2±7.1岁;乳腺良性疾病患者28例(乳腺良性疾病组),包括乳腺纤维腺瘤、囊性增生及乳头状瘤,平均年龄47.4±6.2岁。上述诊断均通过术前穿刺病理检查或术后病理切片确诊,临床病理资料完整,且均为女性。另选取30例健康体检妇女为对照组,并排除肝肾、心血管及乳腺等疾病,平均年龄48.7±7.2岁。各组在年龄、性别上差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 试剂和仪器 Cobas z 480荧光PCR仪采用瑞士Roche公司的产品,RNA提取使用美国Invitroge公司的产品,PCR试剂分别使用TaqMan MicroRNA RT kit试剂盒,TaqMan MicroRNA assay和QuantiTect SYBR® Green PCR Kits。

1.3 方法 分别采集患者术前及健康体检者空腹静脉血3 ml,静置30 min,1 500 g离心15 min分离血清,上清液于EP管中−70℃保存备用。RNA提取使用Trizol法,按试剂盒操作说明进行。用紫外分光光度计测定260 nm和280 nm波长下的光密度值,若$A_{260nm/280nm}$在1.8~2.2间认为合格,RNA溶液无杂质,可进行RNA逆转录。根据TaqMan MicroRNA RT kit操作说明书进行RT-PCR,生成的cDNA置于−70℃保存。以实时荧光定量PCR仪进行如下扩增反应,U6为内参,miR-765反应体系TaqMan MicroRNA assay如下:cDNA 1 μl,2×Master mix 10 μl,PCR primer 0.5 μl,20×SYBRI 1 μl,H_2O 7.5 μl,共20 μl;U6体系中除去PCR primer,H_2O增至8 μl。反应条件:95℃ 10 min→95℃ 15 s→60℃ 30 s,70℃ 90 s(40个循环),溶解曲线1个循环。miR-200b反应体系QuantiTect SYBR® Green PCR Kits如下:cDNA 2 μl,2×QuantiTect SYBR Green PCR Master mix 10 μl,10×miScript Universal primer 2 μl,10×miScript primer assay 2 μl,H_2O 4 μl,共20 μl;U6体系同上。反应条件:95℃ 15 min→94℃ 15 s→55℃ 30 s,70℃ 30 s(40个循环),溶解曲线1个循环。由$2^{-\triangle Ct}$计算得出miR-765,miR-200b的相对表达量。

1.4 统计学分析 以SPSS13.0统计软件分析资料,用Kolmogorov-Smirnov Z检验进行正态性检验,并用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间的比较用方差分析,两两比较用q检验(SNK法),两独立样本的t检验,进行Logistic回归并绘制ROC曲线,GraphPad prism 7.0软件绘图。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组间血清miRNA相对表达水平比较 见表1。乳腺癌组血清miR-765和miR-200b的相对表达量显著低于乳腺良性疾病组($t=3.955$,2.657,$P<0.05$),亦低于健康对照组($t=4.465$,3.518,$P<0.05$);乳腺良性疾病组miR-765和miR-200b的相对表达量均略低于健康对照组,两组miR-765表达差异有统计学意义($t=0.872$,$P<0.05$),miR-200b表达差异无统计学意义($t=3.253$,$P>0.05$)。

表1 不同组间血清miRNA相对表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

项目	乳腺癌组(n=58)	乳腺良性疾病组(n=28)	健康对照组(n=30)
miR-765	0.199±0.080	0.281±0.067	0.331±0.051
miR-200b	0.461±0.173	0.752±0.196	0.787±0.105

2.2 血清miR-765和miR-200b的Logistic回归分析 见表2。设自变量X_1=miR-765,X_2=miR-200b,得联合检测的因变量Y(miR-765&miR-200b)$=9.923X_1+19.901X_2$。通过模型中的概率值来拟合得ROC曲线的AUC为0.952,灵敏度和特异度均较好。

表2 miR-765与miR-200b相对表达量单独与联合检测对乳腺癌的诊断价值

变量	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)	<0.05	87.9	81.0
miR-200b	0.568	0.897(0.837~0.957)	<0.05	94.8	74.1
miR-765&miR-200b		0.952(0.941~0.990)	<0.05	89.7	93.1

2.3 miR-765,miR-200b的相对表达量与乳腺癌临床病理特征的关系 见表3。miR-765在乳腺癌患者血清中的表达与患者的年龄、肿瘤大小、淋巴结转移、雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)和Cerb-B-2均无明显相关($t=0.548$,0.475,2.653,0.302,0.418,2.014,均$P>0.05$),只与TNM分

期相关(t=3.222,P<0.05);而miR-200b在乳腺癌患者血清中的表达亦与患者的年龄、肿瘤大小、雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)和Cerb-B-2均无明显相关(t=2.367,1.939,0.7773,0.519,2.301,均P<0.05),与TNM分期、淋巴结转移明显相关(t=1.855,3.987,均P<0.05)。

表3　miR-765,miR-200b的相对表达量与乳腺癌临床病理特征的关系(n=58)

临床病理特征		n	miR-765相对表达量	t值	P值	miR-200b相对表达量	t值	P值
年龄(岁)	≤48	21	0.207±0.088	0.548	0.261	0.529±0.183	2.367	0.328
	>48	37	0.195±0.077			0.422±0.157		
肿瘤大小(cm)	≤2	13	0.208±0.092	0.475	0.191	0.541±0.163	1.939	0.939
	>2	45	0.196±0.078			0.437±0.170		
淋巴结转移	是	20	0.162±0.069	2.653	0.159	0.349±0.118	3.987	0.015
	否	38	0.218±0.080			0.519±0.169		
TNM分期	Ⅰ,Ⅱ期	42	0.218±0.083	3.222	0.029	0.486±0.184	1.855	0.026
	Ⅲ期	16	0.148±0.046			0.393±0.121		
ER	阳性	40	0.197±0.087	0.302	0.088	0.472±0.181	0.773	0.238
	阴性	18	0.204±0.065			0.434±0.156		
PR	阳性	39	0.202±0.086	0.418	0.277	0.452±0.173	0.519	0.975
	阴性	19	0.193±0.070			0.478±0.176		
Cerb-B-2	阳性	24	0.174±0.091	2.014	0.122	0.521±0.178	2.301	0.321
	阴性	34	0.216±0.068			0.418±0.158		

3　讨论　miRNA是一类约为18～26个核苷酸长度的小分子非编码RNA,通过与目标mRNA完全或不完全互补结合的方式,降解目标mRNA,或抑制其翻译,参与基因转录和表达,对细胞的发育、增殖、分化和凋亡等起调控作用[6～8]。miRNA作为调节子在乳腺癌发生、发展中发挥着重要作用。最近有研究发现,miRNA可以通过表达异常、作用靶基因不同,来作为促癌或抑癌基因进而调控乳腺癌进程,已成为目前研究的热点之一。临床研究中,我们期望找到更多的关于miRNA用于乳腺癌诊断、预后等方面的新思路和新方法,对提高乳腺癌的诊疗具有重要意义。血清miR-765检测对乳腺癌的诊断已显现出一定的价值,联合检测可以优势互补,提高效率,是肿瘤早期诊断的趋势[9]。

本研究发现,乳腺癌患者血清中miR-765与miR-200b表达水平显著降低,提示其血清水平低表达可能作为乳腺癌诊断的潜在生物标志物。进一步评估miRNA-765和miRNA-200b表达对乳腺癌诊断的价值,分析了单独miR-765与miR-200b和两者联合检测的ROC曲线,发现血清miR-765与miR-200b的表达对乳腺癌的诊断具有较高的AUC值,分别为0.843,0.897;联合检测的AUC值为0.952,优于单一使用miR-765或miR-200b来诊断乳腺癌。单独检测时,miR-765与miR-200对乳腺癌的诊断敏感度较好,分别为87.9%,94.8%,但特异度均不足,分别为81.0%,74.1%,两者联合检测大大提高了对乳腺癌诊断的特异度(93.1%)。两者与目前研究比较多的miR-21在乳腺癌患者血清中的表达(ROC曲线下面积为0.828,敏感度和特异度分别为80%和70%)相比较优[10]。进一步分析,乳腺癌患者血清中miR-765和miR-200b表达水平与临床病理特性相关性发现,TNM分期越高则miR-765和miR-200b表达水平越低,提示两者可能作为抑癌基因参与乳腺癌的进展;远处淋巴结转移者miR-200b表达低于无淋巴结转移者,提示miR-200b低表达可能促进乳腺癌侵袭及迁移。而两者表达与患者的年龄、肿瘤大小、ER表达、PR表达及Cerb-B-2表达无相关性,提示miR-765和miR-200b表达不易受个体因素等影响,是乳腺癌早期诊断和预后评估的潜在标志物。但值得注意的是,多种恶性肿瘤均具有低表达,特异度较差。因此,联合其他血清学检测可能对提高特异度有所帮助。

综上所述,乳腺癌患者血清miR-765与miR-200b的表达均下调,联合检测对乳腺癌的诊断具有潜在的临床应用价值,可作为临床上一种辅助诊断的方法,与临床病理特征具有一定的相关性,可用于预后评估。

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] Asiaf A,Ahmad ST,Arjumand W,et al. MicroRNAs in breast cancer:diagnostic and therapeutic potential [J]. Methods Mol Biol,2018,1699:23-43.
[4] 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.
[5] Hong H,Yu HZ,Yuan JF,et al. MicroRNA-200b impacts breast cancer cell migration and invasion by regulating Ezrin-Radixin-Moesin[J]. Med Sci Monit, 2016,22:1946-1952.
[6] Yang X,Hu Q,Hu LX,et al. miR-200b regulates epithelial-mesenchymal transition of chemo-resistant breast cancer cells by targeting FN1[J]. Discov Med, 2017,24(131):75-85.
[7] 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.
[8] 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.
[9] 洪 宏,袁建芬,喻海忠. 血清 miR-765 和 CA153 联合检测对乳腺癌的诊断价值[J]. 现代检验医学杂志, 2018,33(3):92-94.
Hong H,Yuan JF,Yu HZ. Diagnostic value of combined detection of serum miR-765 and CA153 in breast cancer[J]. J Mod Lab Med,2018,33(3):92-94.
[10] 钟 婧,周伟民,马志红,等. 微小 RNA-21 在乳腺癌患者血清中的表达及其与临床病理特征的关系[J]. 中华实验外科杂志,2015,32(1):157-159.
Zhong J,Zhou WM,Ma ZH,et al. Expression of serum microRNA-21 in breast cancer patients abd its association with clinicopathological features[J]. Clin J Exp Surg,2015,32(1):157-159.

收稿日期:2018-08-14
修回日期:2018-09-05