

乳腺癌患者血清中 tRF-32-Q99P9P9NH57SJ 的表达及临床意义

王承霞, 朱玉蓉

(江苏省肿瘤医院 & 江苏省肿瘤防治研究所 & 南京医科大学附属肿瘤医院检验科, 南京 210009)

摘要: 目的 检测 tRNA 及其来源片段 (tRNA-derived fragments) – tRF-32-Q99P9P9NH57SJ (tRF-32) 在乳腺癌患者血清中的表达及意义。方法 选取 2017 年 11 月 ~ 2019 年 2 月在江苏省肿瘤医院乳腺外科确诊的 51 例乳腺癌患者及同期 25 例健康对照者的血清, 记录患者临床资料。运用 RT-PCR 检测血清 tRF-32 的表达水平, 分析其表达水平与临床病理资料的关系。结果 51 例乳腺癌患者血清中 tRF-32 的表达量 (13.84 ± 2.62) 与 25 例健康对照组血清中的 tRF-32 表达量 (39.47 ± 7.21) 比较, 差异有统计学意义 ($t=4.091, P<0.0001$)。临床 TNM 分期 I-II 期的 tRF-32 表达量 (16.97 ± 3.315) 明显高于 III-IV 期 tRF-32 表达量 (7.07 ± 2.83), 差异有统计学意义 ($t=2.241, P=0.029$)。无淋巴结转移患者血清中的 tRF-32 表达量 (18.75 ± 3.91) 明显高于有淋巴结转移患者血清中 tRF-32 表达量 (7.80 ± 2.51), 差异有统计学意义 ($t=2.47, P=0.017$)。乳腺癌患者 tRF-32 表达量与年龄无关 ($\chi^2=0.621, P>0.05$), 与 TNM 临床分期 ($\chi^2=8.463, P=0.004$) 以及淋巴结是否转移相关 ($\chi^2=5.856, P=0.016$)。受试者工作曲线 (receiver operating characteristic curve, ROC) 显示血清 tRF-32 诊断乳腺癌的曲线下面积 (area under curve, AUC) 是 0.776 (95% CI: 0.673 ~ 0.880), 敏感度和特异度分别为 84.0% 和 68.8%。结论 tRF-32 在乳腺癌患者血清中低表达, tRF-32 的表达水平与乳腺癌的临床分期和淋巴结转移有关。

关键词: 乳腺癌; tRF-32-Q99P9P9NH57SJ; 荧光定量 PCR; 临床诊断

中图分类号: R737.9; R730.43 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414 (2019) 06-016-04

doi:10.3969 / j.issn.1671-7414.2019.06.004

Expression and Clinical Significance of tRF-32-Q99P9P9NH57SJ in Serum of Patients with Breast Cancer

WANG Cheng-xia, ZHU Yu-rong

(Department of Clinical Laboratory, Jiangsu Cancer Hospital & Jiangsu Institute of Cancer Research & the Affiliated Cancer Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and significance of tRF-32 in breast cancer serum. **Methods** The serum samples were collected from 51 patients with breast cancer in Jiangsu Cancer Hospital from November 2017 and February 2019, at the same time serum from 25 healthy controls were collected. The clinical data of patients were recorded. The expression level of tRF-32 was detected by RT-PCR, and analyzed its relationship with clinicopathologic factor of patients with breast cancer. **Results** The serum level of tRF-32 in 51 patients with breast cancer (13.84 ± 2.62) was different from that in 25 healthy control group (39.47 ± 7.21) and they had statistical difference ($t=4.091, P<0.0001$). Serum tRF-32 in patients with breast cancer was significantly difference between TNM stage I-II and stage III-IV ($t=2.241, P=0.029$). Meanwhile, the expression of tRF-32 in patients without lymph node metastasis was higher than those with lymph node metastasis ($t=2.47, P=0.017$). The level of serum tRF-32 was no correlated with ages ($\chi^2=0.621, P>0.05$). While there were significant association with TNM stage ($\chi^2=8.463, P=0.004$) and lymph node metastasis ($\chi^2=5.856, P=0.016$). Finally, the ROC-AUC for tRF-32 was 0.776 (95% CI: 0.673 ~ 0.880) for differentiating breast cancer patients from healthy controls, with a sensitivity of 84.0% and specificity of 68.8%. **Conclusion** tRF-32 was lower expression in patient's serum with breast cancer. The expression level of tRF-32 was related to the clinical stage and lymph node metastasis of breast cancer.

Keywords: breast cancer; tRF-32-Q99P9P9NH57SJ; RT-PCR; clinical diagnosis

乳腺癌是世界范围内女性最常见的恶性肿瘤, 有女性癌症患者的 15%, 并以每年 2.7% 的比例快速增长, 每年新增病例约 278 800 人, 死亡人数约在我国乳腺癌的发病率和死亡率逐年攀升, 占到所

64 600人,严重危害人们的健康和生活^[1-3]。因此,积极筛选乳腺癌诊断和预后的分子靶标,对提高乳腺癌检出率和治愈率具有重要意义^[4-5]。

RNA组学如今成为研究热点,恶性肿瘤的研究从功能基因层面(编码蛋白质)逐渐拓展到非编码RNA领域,极大丰富人们对遗传信息调控网络的理解。研究表明,除编码蛋白基因外,超过基因组产物90%的非编码RNA,同样广泛参与细胞生长、发育等生命环节,在多个层面调控基因而发挥生物学功能^[6]。研究发现一种由转运RNA(tRNAs)加工而成,来源于tRNA前体或成熟序列的小非编码RNA,即tRNA及其来源片段(tRNA-derived fragments)参与多种肿瘤的发生发展过程,成为与肿瘤相关的研究新热点^[7-9]。然而这些来源于tRNA前体或成熟序列的小非编码RNA在乳腺癌中的研究鲜有报道。本文采用RT-PCR方法首次检测乳腺癌患者血清中tRF-32-Q99P9P9NH57SJ(tRF-32)的表达水平,并分析其表达水平与乳腺癌患者的临床病理资料的关系,初步探讨tRF-32的表达水平对乳腺癌的诊断价值。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集2017年11月~2019年2月在江苏省肿瘤医院乳腺外科住院治疗的患者,其中乳腺癌患者51例(乳腺癌组),年龄29~76岁,平均年龄 52.08 ± 1.34 岁,病例均经本院病理科确诊。临床分期:I期9例,II期18例,III期11例,IV期13例;30例有淋巴结转移,21例无淋巴结转移。所有患者均未行放、化疗等抗肿瘤治疗;体检后未见明显器质性疾病的女性25例为健康对照组,年龄28~69岁,平均年龄 49.48 ± 1.63 岁,所有研究对象均抽取清晨空腹静脉血5ml,静置30min后,以3 000 r/min离心10min,分离血清放置 -80°C 冻存待检。

1.2 试剂和仪器 ViiA 7 实时荧光定量PCR仪(Applied Biosystems), TRIzol LS 试剂(life technologies, 美国), rtStarTM tRF&tiRNA Pretreatment Kit (Cat#: AS-FS-005, Arraystar, MD, 美国), rtStarTM First-Strand cDNA Synthesis Kit (3' and 5' adaptors) (Cat#: AS-FS-003, Arraystar, MD, 美国), 2X PCR master mix (Arraystar, MD, 美国)。

1.3 方法

1.3.1 总RNA的提取和纯度检测:从冰箱中取出血清样品,解冻后于 4°C $12\ 000 \times g$ 离心10min,去除可能存在的杂质,取250 μl 血清,转至1.5ml的离心管中,加入750 μl 的TRIzol LS Reagent试剂(invitrogen life technologies)和20 μl 冰醋酸采用Trizol法提取总RNA。纯度检测:紫外分光光度

计检测总RNA纯度, $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 的比值0.82,说明制备的RNA较纯,无蛋白质污染。

1.3.2 RNA前处理与cDNA合成:使用rtStarTM tRF&tiRNA Pretreatment Kit试剂盒进行预处理,去除3'氨酰基末端与3'环磷酸末端,磷酸化5'羟基末端,并移去m1A, m3C等多种甲基化修饰。使用rtStarTM First-Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒进行接头连接和反转,合成cDNA第一链。

1.3.3 RT-PCR检测血清中tRF-32表达水平:以U6为内参,使用Primer Premier 5.0引物设计软件设计U6和tRF-32的引物序列:

U6:	FW:5' -GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3', RV:5' -CGCTTCACGAATTTGCGTGTCTAT-3';
tRF-32:	FW:5' -TTCTACAGTCCGACGATCGCT-3', RV:5' -GGCGAACGTGATAACCACTACA-3'。

反应条件: 95°C 10min; 40个PCR循环 [95°C , 10s; 60°C , 60s(收集荧光)]。所有样本设置3复孔,采用 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 方法计算血清中tRF-32的相对表达量。

1.4 统计学分析 采用SPSS20.0和GraphPad Prism v6.0统计学软件,计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验。血清中tRF-32表达模式与临床病理参数的关系采用 χ^2 检验。血清tRF-32在乳腺癌诊断中的诊断效能采用ROC曲线来评价。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌患者血清中tRF-32的表达分析 运用RT-PCR检测51例乳腺癌患者和25例健康对照者血清标本中tRF-32的表达量。tRF-32的扩增曲线和溶解曲线见图1,溶解曲线呈单峰。51例乳腺癌患者血清中tRF-32的表达量(13.84 ± 2.62)与25例健康对照组(39.47 ± 7.21)比较,差异具有统计学意义($t = 4.091, P < 0.0001$)。结合临床病理特征分析,TNM分期中I-II期($n=27$)的tRF-32表达量(16.97 ± 3.315)高于III-IV期($n=24$) tRF-32表达量(7.07 ± 2.83),差异有统计学意义($t = 2.241, P = 0.029$),同时无淋巴结转移($n=21$)患者血清中的tRF-32表达量(18.75 ± 3.91)明显高于有淋巴结转移($n=30$)患者血清中tRF-32表达量(7.80 ± 2.51),差异有统计学意义($t = 2.47, P = 0.017$)。

2.2 tRF-32与乳腺癌临床病理参数关系 见表1。分析上述51例乳腺癌患者血清中tRF-32的表达量与临床病理参数关系,根据血清中tRF-32表达量的中位数将患者分为高表达和低表达两组,采用卡方检验,发现tRF-32表达量与乳腺癌患者年龄无关($P > 0.05$),而与TNM分期($\chi^2 = 8.463, P$

= 0.004) 以及淋巴结转移 ($\chi^2 = 5.856$, $P = 0.016$) 密切相关。

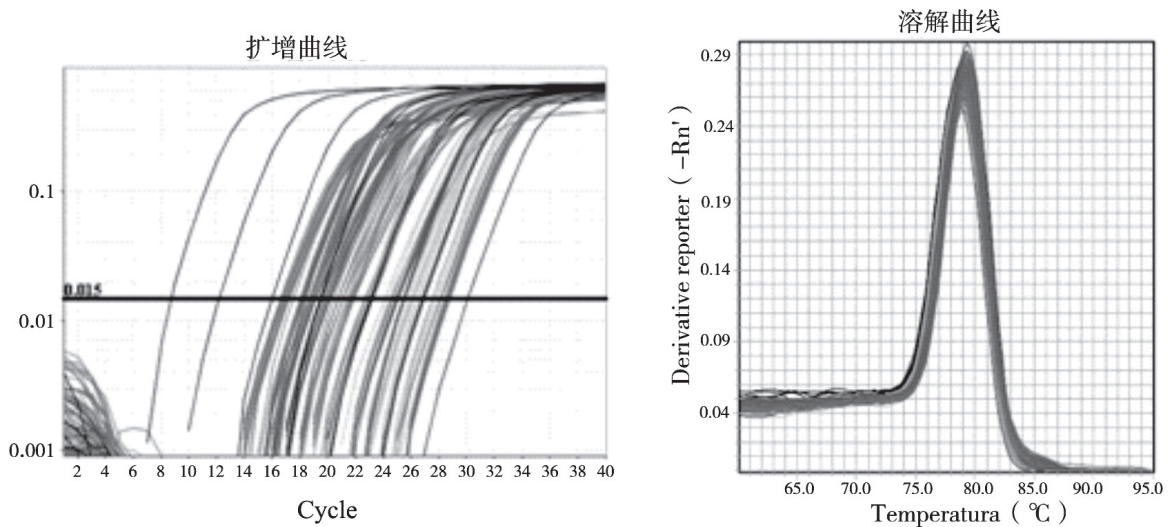


图 1. tRF-32 的扩增曲线和溶解曲线

表 1 乳腺癌血清 tRF-32 的表达水平与临床参数的关系

临床参数	n	tRF-32		χ^2	P
		≤中位数 (n=25)	>中位数 (n=26)		
年龄 (岁)	≤ 55	17	9	0.621	0.553
	>55	34	16		
TNM 分期	I-II	27	8	8.463	0.004
	III-IV	24	17		
淋巴结转移	无	21	6	5.856	0.016
	有	30	19		

2.3 ROC 曲线分析 运用 ROC 曲线分析 tRF-32 对乳腺癌的诊断效能, 见图 2。血清中 tRF-32 诊断乳腺癌的 ROC 曲线 AUC 是 0.776 (95% CI: 0.673~0.880), 敏感度和特异度分别为 84.0% 和 68.8%, 以上提示血清 tRF-32 对评价乳腺癌有诊断意义。

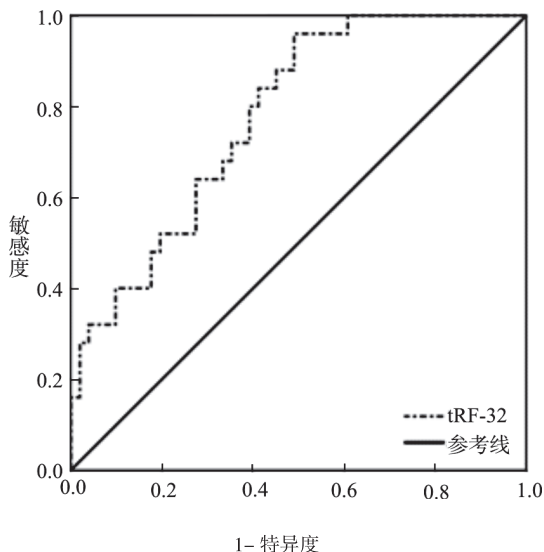


图 2 血清 tRF-32 诊断乳腺癌的 ROC 曲线分析

3 讨论

随着 RNA-seq 技术的广泛应用和分子生物学技术的快速发展, ncRNA 领域的 tRFs&tiRNAs 引起广泛关注。目前认为, 在特定条件下, tRNA 发生切割, 产生功能性小片段 (tRNA-derived Fragments), 主要包括 tRNA 的一半 (tRNA-derived stress-induced RNAs; tiRNA); tRNA 衍生的片段 (tRNA-derived fragments; tRFs) 以及 tRNA 衍生的小 tRNA (tRNA-derived small RNAs; tsRNAs) [10]。近年来, 更多的功能性小片段 (tRNA-derived fragments) 被发现, 但对其功能研究只是庞大的 tRFs&tiRNAs 调控网络中的冰山一角, 大量 tRFs&tiRNAs 的未知功能有待探讨 [11-12]。因此, 从 tRFs&tiRNAs 角度进一步挖掘乳腺癌新型分子靶标, 将有助于揭示乳腺癌发生发展新机制, 为临床诊疗提供新思路。

tRFs&tiRNAs 通过类似于 miRNA 降解 mRNA 的作用机制, 调控 mRNA 的稳定性, 参与细胞增殖和细胞生长 [11-12]。研究显示, tRFs&tiRNAs 与 YBX1 结合, 调控肿瘤基因转录本的稳定性, 抑制肿瘤细胞的恶性进展, 提示这类 tRFs&tiRNAs 是一类新的抑癌因子 [13]。DHAHBI 等 [14] 在小鼠血清中发现 tiRNAs 稳定性表达, 具有转录前抑制功能, 提示其可能是一类新型信号分子。

由于 tRNA 上存在大量的转录后修饰, 而且 tRNA 需与氨基酸形成氨酰基 tRNA 方可参与蛋白翻译。当 tRNAs 被切割为 tRFs&tiRNAs 时, 这些修饰 (包括甲基化修饰、氨酰基末端修饰) 会全部或部分的保留下来。tiRNAs 常由 RNA 内切酶 Angiogenin 切割产生, 这类内切酶会在切割位点产生 5' 羟基 (5' -OH) 末端与 3' 环磷酸 (3' -cP)

末端^[15-16]。然而,5'端与3'端的接头连接步骤,需要底物小RNA 5'端为磷酸,3'端为羟基。此外,某些tRFs&tiRNAs的内部修饰比如m1A, m1G与m3C会严重阻碍反转录过程。因此为了准确检测tRFs&tiRNAs,这些修饰必须被有效的去除^[17]。所以本课题在采用RT-PCR检测乳腺癌患者血清中tRF-32的表达水平之前,采用专门试剂盒对总RNA进行了去甲基化等前处理。

分析RT-PCR结果,我们发现与健康对照组相比,tRF-32在乳腺癌患者血清中低表达,并且其表达水平与乳腺癌临床分期以及淋巴结转移有关。血清中tRF-32表达程度越低,乳腺癌TNM分期越高,同时更容易发生转移。tRF-32用于乳腺癌诊断的敏感度为84.0%,特异度为68.8%,对评价乳腺癌有一定的诊断价值。这些研究结果提示tRF-32在乳腺癌中低表达,可能发挥抑癌基因的作用,同时在乳腺癌中具有早期诊断和治疗的潜在价值。

本课题下一步计划是扩大血清样本量,收集更完整的临床资料,评价血清中tRF-32的临床价值。同时通过靶基因预测软件寻找tRF-32可能的靶基因,并在细胞水平和动物水平加以验证,探讨tRF-32在乳腺癌恶性进展中发挥的作用,为确定tRF-32成为肿瘤诊断和治疗的生物学指标提供实验基础。

参考文献:

- [1] CHEN Wanqing, ZHENG Rongshou, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2016, 66(2):115-132.
- [2] OLTSMANN J, HESELMAYER-HADDAD K, HERNANDEZ L S, et al. Aneuploidy, TP53 mutation, and amplification of MYC correlate with increased intratumor heterogeneity and poor prognosis of breast cancer patients[J]. Genes, Chromosomes & Cancer, 2018, 57(4):165-175.
- [3] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer Statistics, 2017[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians 2017, 67(1):7-30.
- [4] PIVOT X, COX D G: A new era for treatment development in HER2-positive breast cancer[J]. The Lancet Oncology, 2018, 19(2):160-162.
- [5] JANNING M, MULLER V, VETTORAZZI E, et al. Evaluation of soluble carbonic anhydrase IX as predictive marker for efficacy of bevacizumab: a biomarker analysis from the geparquinto phase III neoadjuvant breast cancer trial[J]. International Journal of Cancer, 2019, 45(3):857-868.
- [6] POMPON J, GARCIA-BLANCO M A. RNA: jack of all trades and master of all[J]. Cell, 2015, 160(4):579-580.
- [7] LI Siqu, XU Zhengping, SHENG Jinghao. tRNA-derived small RNA: A novel regulatory small non-coding RNA[J]. Genes, 2018, 9(5):246.
- [8] ROMANO G, VENEZIANO D, ACUNZO M, et al. Small non-coding RNA and cancer[J]. Carcinogenesis, 2017, 38(5):485-491.
- [9] ELKORDY A, MISHIMA E, NIIZUMA K, et al. Stress-induced tRNA cleavage and tiRNA generation in rat neuronal PC12 cells[J]. Journal of Neurochemistry, 2018, 146(5):560-569.
- [10] HUANG Shiqiong, SUN Bao, XIONG Zongping, et al. The dysregulation of tRNAs and tRNA derivatives in cancer[J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2018, 37(1):101.
- [11] SHAO Yang, SUN Qiangling, LIU Xiaomin, et al. tRF-Leu-CAG promotes cell proliferation and cell cycle in non-small cell lung cancer[J]. Chemical Biology & Drug design, 2017, 90(5):730-738.
- [12] ZHOU Kun, DIEBEL K W, HOLY J, et al. A tRNA fragment, tRF5-Glu, regulates BCAR3 expression and proliferation in ovarian cancer cells[J]. Oncotarget, 2017, 8(56):95377-95391.
- [13] GOODARZI H, LIU Xuhang, NGUYEN H C, et al. Endogenous tRNA-derived fragments suppress breast cancer progression via YBX1 displacement[J]. Cell, 2015, 161(4):790-802.
- [14] DHAHBI J M, SPINDLER S R, ATAMNA H, et al. Deep sequencing of serum small RNAs identifies patterns of 5' trna half and YRNA fragment expression associated with breast cancer[J]. Biomarkers in cancer, 2014, 6:37-47.
- [15] COSENTINO C, TOIVONEN S, DIAZ VILLAMIL E, et al. Pancreatic beta-cell tRNA hypomethylation and fragmentation link TRMT10A deficiency with diabetes[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(19):10302-10318.
- [16] SUN Chunxiao, YANG Fan, ZHANG Yanhong, et al. tRNA-derived fragments as novel predictive biomarkers for trastuzumab-resistant breast cancer[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2018, 49(2):419-431.
- [17] GOGAKOS T, BROWN M, GARZIA A, et al. Characterizing expression and processing of precursor and mature human tRNAs by Hydro-tRNAseq and PAR-CLIP[J]. Cell Reports, 2017, 20(6):1463-1475.

收稿日期: 2019-09-05

修回日期: 2019-09-26