

乳腺癌患者血清长链非编码 RNA mir4435-2HG 表达水平与临床病理特征的相关性研究

吕美玲¹, 马婕群², 陈海艳³

(1. 长安大学医院内科, 西安 710064; 2. 陕西省肿瘤医院肿瘤内科, 西安 710061;
3. 西安国际医学中心医院肿瘤科, 西安 710100)

摘要:目的 探究乳腺癌 (breast cancer, BC) 患者血清长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lnc RNA) mir4435-2HG 表达水平与临床病理特征的相关性。方法 选择 2016 年 8 月~2017 年 7 月长安大学医院收治的 52 例 BC 患者为 BC 组, 选择同期 49 例乳腺良性疾病患者为乳腺良性疾病组, 另随机纳入同期 45 例体检健康的志愿者为健康对照组。采用实时荧光定量 PCR (Quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 检测血清 lnc RNA mir4435-2HG, 通过比较各组血清中 lnc RNA mir4435-2HG 相对表达量的差异, 分析 lnc RNA mir4435-2HG 与患者各临床病理特征的关系。lnc RNA mir4435-2HG 的诊断价值分析采用 ROC 曲线。结果 血清 lnc RNA mir4435-2HG 在 BC 组 [2.04(1.41, 3.96)], 乳腺良性疾病组 [1.21(1.00, 1.39)] 和健康对照组 [0.99(0.84, 1.15)] 的相对表达量比较差异具有统计学意义 ($H=28.73$, $P=0.00$), BC 组血清 lnc RNA mir4435-2HG 的相对表达量高于乳腺良性疾病组 ($U=89.23$, $P=0.01$) 和健康对照组 ($U=91.46$, $P=0.02$)。BC 患者血清 lnc RNA mir4435-2HG 与年龄和肿瘤大小无显著相关性 ($U=115.41$, 155.02 , 均 $P>0.05$), 而与淋巴结转移、TNM 分期、ER, PR 和 Her2 有显著相关性 ($U=87.32$, 90.51 , 102.74 , 98.73 , 91.50 , 均 $P<0.05$)。lnc RNA mir4435-2HG 诊断 BC 的最佳截断值为 0.69, 该截断值对应的灵敏度和特异度分别为 80.25% 和 70.91%。结论 lnc RNA mir4435-2HG 在 BC 血清中高表达, 可作为 BC 的潜在生物学标志物。

关键词: 乳腺癌; 长链非编码 RNA; 病理特征; 生物学标志物

中图分类号: R737.9; R730.43 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2021) 03-023-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2021.03.006

Correlation between Expression Level of Serum Long Non-coding RNA mir4435-2HG and Clinicopathological Characteristics in Breast Cancer Patients

LÜ Mei-ling¹, MA Jie-qun², CHEN Hai-yan³

(1. Department of Internal Medicine, Hospital of Chang'an University, Xi'an 710064, China; 2. Medical Oncology, Shaanxi Provincial Cancer Hospital, Xi'an 710061, China; 3. Department of Oncology, Xi'an International Medical Center Hospital, Xi'an 710100, China)

Abstract: Objective To explore the correlation between the expression level of long non-coding RNA (lnc RNA) miR4435-2HG in serum and clinicopathological characteristics in breast cancer (BC) patients. **Methods** Fifty-two BC patients admitted to Chang'an University Hospital from August 2016 to July 2017 were selected as the BC group, 49 benign breast disease patients were selected as the benign breast disease group, and 45 healthy volunteers during the same period were randomly included as the healthy control group. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to detect serum lnc RNA mir4435-2HG, and the relationship between lnc RNA mir4435-2HG and the clinicopathological characteristics of patients was analyzed by comparing the relative expression levels of lnc RNA mir4435-2HG in serum of each group. The diagnostic value of lnc RNA mir4435-2HG was analyzed using ROC curve. **Results** The relative expression level of serum lnc RNA mir4435-2HG in BC group [2.04(1.41, 3.96)], benign breast disease group [1.21(1.00, 1.39)] and healthy control group [0.99(0.84, 1.15)] was statistically significant ($H=28.73$, $P=0.00$). The relative expression level of serum lnc RNA mir4435-2HG in BC group was higher than that in benign breast disease group ($U=89.23$, $P=0.01$) and healthy control group ($U=91.46$, $P=0.02$). Serum lnc RNA mir4435-2HG in BC patients was not significantly correlated with age and tumor size ($U=115.41$, 155.02 , all $P>0.05$), but was significantly correlated with lymph node metastasis, TNM stage, ER, PR and HER2 ($U=87.32$, 90.51 , 102.74 , 98.73 , 91.50 , all $P<0.05$). The optimal

作者简介: 吕美玲 (1988-), 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 肿瘤的临床诊疗, E-mail: 742242849@qq.com。

通讯作者: 陈海艳 (1987-), 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 肿瘤的临床诊疗, E-mail: 404704950@qq.com。

truncation value of lnc RNA mir4435-2HG in the diagnosis of BC was 0.69, and the corresponding sensitivity and specificity were 80.25% and 70.91%, respectively. **Conclusion** lnc RNA mir4435-2HG was highly expressed in BC serum and could be used as a potential biomarker of BC.

Keywords: breast cancer; long non-coding RNA; pathological features; biological marker

乳腺癌 (breast cancer, BC) 是严重威胁全球女性生命健康最常见的恶性肿瘤, 目前高居女性癌症之首, 平均每年以 4% 的速度持续上升且呈年轻化趋势^[1-3], 其发病隐匿、致死率高、诊断相对延迟仍是临床存在的重大问题。因此, 寻找一种新型且有效的肿瘤标志物为 BC 的诊断提供更为准确和及时的信息尤为重要。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lnc RNA) 可通过参与转录激活、基因沉默和染色体修饰等影响恶性肿瘤的生物学行为^[4], 近年来研究发现 lnc RNA mir4435-2HG 具有促进胃癌增殖、迁移和侵袭的作用^[5], 其还可用作口腔鳞状细胞癌的预后标志物。目前关于 lnc RNA mir4435-2HG 与 BC 的关联研究尚未见, 因此本研究通过比较 BC 组和乳腺良性疾病组血清中 lnc RNA mir4435-2HG 相对表达量的差异, 分析 lnc RNA mir4435-2HG 与 BC 患者各临床病理特征的关系, 旨在为 BC 的诊断和预后判断提供新的参考。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选择 2016 年 8 月~2017 年 7 月长安大学医院收治的 52 例 BC 患者为 BC 组, 选择同期 49 例乳腺良性疾病患者为乳腺良性疾病组, 其中乳腺纤维腺瘤 18 例、乳腺囊性增生 14 例和浆细胞性乳腺炎 17 例, 另随机纳入同期 45 例体检健康的志愿者为健康对照组。根据 TNM 分期 BC 组患者包含 I 期 8 例、II 期 21 例、III 期 18 例、IV 期 5 例。淋巴结转移 17 例, 淋巴结未转移 35 例; 孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 阳性 31 例, 阴性 21 例; 雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 阳性 38 例, 阴性 14 例; 人表皮生长因子受体 2 (Her2) 阳性 40 例, 阴性 12 例, 本研究经由我院伦理委员会批准, 三组的一般资料比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

纳入标准: ① BC 组纳入患者术后均经病理学检查确诊; ②临床资料完整者; ③自愿参加且均签署知情同意书。

排除标准: ①其他肿瘤史者; ②伴有严重器质性疾病和慢性疾病者; ③远处器官转移者。

1.2 仪器与试剂 Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司, SYBR Green Realtime PCR Master Mix 扩增试剂盒购自日本 ToYoBo 公司, TakaRa Prime-Script RT reagent kit 购自大连宝生物工程有限公司, 血清 RNA 提取试剂盒购自北京天根公司, ABI 7500 Fast 荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司), lnc RNA mir4435-2HG 及内参引物由上海生工生物工程有限

公司合成。

1.3 方法 术前空腹抽取受试者静脉血 2 ml, 于 4℃ 条件下 12 000 r/min 离心 10 min 分离血清, 采用血清 RNA 提取试剂盒提取血清总 RNA, 采用 TakaRa Prime-Script RT reagent kit 将血清总 RNA 逆转录为 cDNA, 采用实时荧光定量 PCR (quantitative Real-time PCR, qRT-PCR) 检测血清 lnc RNA mir4435-2HG 和内参基因 GAPDH 的水平, lnc RNA mir4435-2HG 引物序列为: F: 5'-AGACAAGCCGT GCCTGAG-3', R: 5'-ATCTTTCAGCTGCATTCC GG-3'; GAPDH 引物序列为: F: 5'-CGGAGTCAAC GGATTTGGTCGTAT-3', R: 5'-AGCCTTCTCCATG GTGGTGAAGAC-3'。反应条件依次为: 95℃ 预变性 2 min, 95℃ 5s, 60℃ 25s 共 40 个循环, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示 lnc RNA mir4435-2HG 的相对表达量。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计学软件处理数据, 满足正态性分布及方差齐性的计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 采用 t 检验, 呈非正态分布, 用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示, 多组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验, 两组间比较采用非参 Mann-Whitney U 检验, lnc RNA mir4435-2HG 的诊断价值分析采用 ROC 曲线。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 三组 lnc RNA mir4435-2HG 相对表达量的比较 血清 lnc RNA mir4435-2HG 在 BC 组 [2.04(1.41, 3.96)], 乳腺良性疾病组 [1.21(1.00, 1.39)] 和健康对照组 [0.99(0.84, 1.15)] 的相对表达量比较, 差异具有统计学意义 ($H=28.73, P=0.00$), BC 组血清 lnc RNA mir4435-2HG 的相对表达量高于乳腺良性疾病组 ($U=89.23, P=0.01$) 和健康对照组 ($U=91.46, P=0.02$)。

2.2 血清 lnc RNA mir4435-2HG 与患者临床病理特征的关系 见表 1。BC 患者血清 lnc RNA mir4435-2HG 与年龄和肿瘤大小无显著的相关性 ($P > 0.05$), 而与淋巴结转移、TNM 分期、ER、PR 和 Her2 有显著的相关性 ($P < 0.05$), 差异均有统计学意义。

2.3 lnc RNA mir4435-2HG 诊断 BC 的 ROC 曲线 见图 1。绘制 lnc RNA mir4435-2HG 诊断 BC 的 ROC 曲线, 曲线下面积 (area under the curve, AUC) 为 0.84(95%CI: 0.72~0.91, $P < 0.01$), 参考约登指数的最大值确定 lnc RNA mir4435-2HG 诊断 BC 的最佳截断值为 0.69, 该截断值对应的灵敏度和特异度分别为 80.25% 和 70.91%。

表1 血清 lnc RNA mir4435-2HG 与患者临床病理特征的关系 [M(P₂₅,P₇₅)]

临床病理特征	n	lnc RNA mir4435-2HG 相对表达量	U 值	P 值
年龄 (岁)				
≤ 50	28	2.84(1.82, 4.64)	115.41	0.21
> 50	24	1.86(1.63, 3.87)		
肿瘤大小 (cm)				
≤ 2	33	1.95(1.14, 3.59)	155.02	0.91
> 2	19	1.30(1.15, 4.12)		
淋巴结转移				
是	17	1.27(0.96, 2.28)	87.32	0.00
否	35	2.35(1.28, 5.65)		
TNM 分期				
I-II 期	29	2.47(1.28, 4.89)	90.51	0.01
III-IV 期	23	1.21(0.91, 2.23)		
ER				
阳性	38	2.24(1.19, 4.84)	102.74	0.04
阴性	14	1.18(1.05, 1.77)		
PR				
阳性	31	2.31(1.26, 5.66)	98.73	0.03
阴性	21	1.34(1.13, 2.32)		
Her2				
阳性	40	3.21(1.34, 8.41)	91.50	0.02
阴性	12	1.36(1.15, 2.67)		

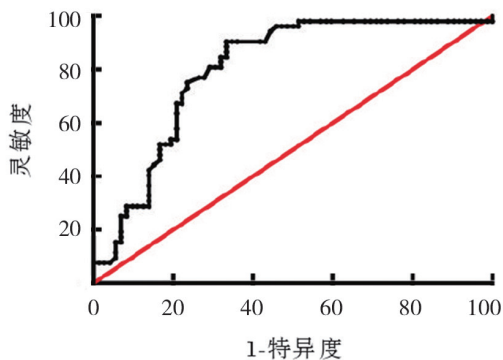


图1 lnc RNA mir4435-2HG 诊断 BC 的 ROC 曲线

3 讨论

BC 位居女性恶性肿瘤的首位, 约占全身恶性肿瘤的 10%, 每年约以 4% 的速度持续上升^[6-7]。其致死率高且起病较隐匿, 严重危害女性的身体健康。目前, 临床上使用的 CA153 被指灵敏度和特异度均不高^[8-10]。基于此, 寻找一种新型且有效的肿瘤标志物为 BC 的诊断提供更为准确、及时的信息意义重大。lnc RNA 可通过表观遗传和转录及转录后的调控等在肿瘤中发挥多种生物学功能。早期 lnc RNA mir4435-2HG 研究主要是在色素性视网膜炎作用方面, MIAO 等^[11] 近期指出 lnc RNA mir4435-2HG 促进胃癌的增殖、转移和迁移, 早期有文献报道指出血清 lnc RNA mir4435-2HG 在口腔鳞状细胞癌中呈异常低表达且其具有较好的预测预后的价值。倪

文昌等^[12] 指出 lnc RNA mir4435-2HG 可通过靶向 miR-873-5p 调控神经母细胞瘤细胞的增殖、凋亡、迁移和侵袭。QIAN 等^[13] 指出 lnc RNA mir4435-2HG 在肺癌组织中呈高表达, 高表达的 mir4435-2HG 可促进肺癌细胞的增殖与侵袭作用。

目前在临床诊疗中 BC 通用的肿瘤标志物为 ER, PR 和 Her2。ER 和 PR 是女性重要的激素受体, 同时也是激素依赖性 BC 患者较直观的肿瘤标记物。ER 和 PR 与激素反应生成的复合物对癌组织分化、增殖发挥重要作用。Her2 是内源性的跨膜受体糖蛋白, 其具有较强的酪氨酸激酶 (tyrosine kinase, TK) 活性, 可显著提升癌组织的增殖活性, 因此 Her2 常与癌组织分化程度相关联。本研究结果提示 lnc RNA mir4435-2HG 与 ER, PR 和 Her2 呈显著相关关系, 提示高表达的 lnc RNA mir4435-2HG 可能成为 ER, PR 和 Her2 BC 的靶点。

本研究结果显示, 血清 lnc RNA mir4435-2HG 在 BC 中呈高表达, 这可能是由于 lnc RNA mir4435-2HG 扮演癌基因的角色, 表达于 BC 患者循环外周血液中, 其可为 BC 的诊断提供参考和依据。血清 lnc RNA mir4435-2HG 与 BC 患者的某些病理特征有关, 比如淋巴结转移, 提示 lnc RNA mir4435-2HG 可能参与了 BC 的侵袭迁移过程; TNM 分期, 提示 lnc RNA mir4435-2HG 可能参与了 BC 的恶性转化。ROC 曲线结果显示, lnc RNA mir4435-2HG 诊断 BC 的最佳截断值为 0.69, 灵敏度和特异度分别为 80.25% 和 70.91%。

综上所述, lnc RNA mir4435-2HG 在 BC 血清中高表达, 可作为 BC 的潜在生物学标志物。但由于本研究选取的样本数量有限, 且缺少预后和疗效观察的相关研究。在后续工作中, 将加大样本研究数量、进行随访和功能研究, 以进一步验证 lnc RNA mir4435-2HG 在 BC 中的诊断和应用价值。

参考文献:

- [1] 洪宏, 袁建芬, 喻海忠. 乳腺癌患者血清长链非编码 RNA ATB 表达水平检测及临床诊断价值 [J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(2):22-23,31.
HONG Hong, YUAN Jianfen, YU Haizhong. Detection and clinical diagnosis value of serum long non-coding RNA ATB in patients with breast cancer [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(2):22-23,31.
- [2] 李丽仙, 何永鹏, 陈霞, 等. 环状 RNAs 在乳腺癌中的研究进展 [J]. 中华乳腺病杂志 (电子版), 2020, 14(3):173-179.
LI Lixian, HE Yongpeng, CHEN Xia, et al. Research progress and prospect of circular RNA in breast cancer [J]. Chinese Journal of Breast Disease (Electronic Edition), 2020, 14(3):173-179.
- [3] 张毅, 罗政莲, 张开炯, 等. 血浆长链非编码 RNA H19 对乳腺癌的潜在诊断价值 [J]. 临床检验杂志,

- 2016,34(4):264-267.
- ZHANG Yi, LUO Zhenglian, ZHANG Kaijiong, et al. Potential value of plasma long non-coding RNA H19 in the diagnosis of breast cancer [J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2016,34(4):264-267.
- [4] SUBASH C G, YASHODA N T. Potential of long non - coding RNAs in cancer patients: From biomarkers to therapeutic targets [J]. International Journal of Cancer, 2017, 140(9): 1955-1967.
- [5] 邱杨, 骆萍, 吴书贵, 等. LncRNA MIR4435-2HG 在 HCT-116 细胞株的顺铂耐药中的作用机制 [J]. 实用癌症杂志, 2020,35(9):1400-1403.
- QIU Yang, LUO Ping, WU Shugui, et al. Mechanism of LncRNA MIR4435-2HG in Cisplatin resistance of HCT-116 cell line [J]. The Practical Journal of Cancer, 2020,35(9):1400-1403.
- [6] 万军. 血清肿瘤标志物 CA153, CA125, CEA 和 HER-2 联合检测在乳腺癌诊断中的价值 [J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(6):119-121.
- WAN Jun. Value of combined detection of tumor markers CA153, CA125, CEA and HER-2 in the diagnosis of breast cancer [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018,33(6):119-121.
- [7] 尹志辉, 周志伟, 刘继勇, 等. 乳腺癌患者组织多项组化标记物与血清 CA153, CA125, CEA, 25-OH-D3 水平关联性分析模型建立及在预后判断的临床价值 [J]. 现代检验医学杂志, 2019,34(3):47-50,54.
- YIN Zhihui, ZHOU Zhiwei, LIU Jiyong, et al. Establishment of a correlation analysis model between multi-group markers and serum CA153, CA125, CEA, 25-OH-D3 in breast cancer patients and clinical value in prognosis [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019,34(3):47-50,54.
- [8] 马少君, 樊民义, 康晓丽, 等. 乳腺癌组织雄激素受体表达与临床相关病理特征分析 [J]. 现代检验医学杂志, 2019,34(6):36-40.
- MA Shaojun, FAN Minyi, KANG Xiaoli, et al. Analysis of androgen receptor expression and clinical pathological features in breast cancer patients [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019,34(6):36-40.
- [9] 刘延梅, 马少君, 张月浪, 等. 人类表皮生长因子受体 2 在乳腺癌表达与临床的相关病理特征分析 [J]. 现代检验医学杂志, 2016,31(5):91-93,96.
- LIU Yanmei, MA Shaojun, ZHANG Yuelang, et al. Expression of human epidermal growth factor receptor 2 and correlation with clinical pathological features in breast cancer [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016,31(5):91-93,96.
- [10] 王碧, 吉茂礼. 乳腺癌组织长链非编码 RNA UCA1 和 BCAR4 表达与辅助化疗效果的相关性研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(5):77-80.
- WANG Bi, JI Maoli. Correlational research on the expression of long-chain non-coding RNA UCA1 and BCAR4 in breast cancer tissues for the effect of adjuvant chemotherapy [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(5):77-80.
- [11] MIAO Yan, SUI Jing, XU Siyi, et al. Comprehensive analysis of a novel four-lncRNA signature as a prognostic biomarker for human gastric cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8(43): 75007-75024.
- [12] 倪文昌, 金泉, 王丽艳, 等. LncRNA MIR4435-2HG 通过靶向 miR-873-5p 调控小儿神经母细胞瘤细胞生物学功能 [J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(24): 2986-2992.
- NI Wenchang, JIN Quan, WANG Liyan, et al. LncRNA MIR4435-2HG regulates biological function of pediatric neuroblastoma cells by targeting miR-873-5p [J]. Chinese Journal of Immunology, 2020, 36(24): 2986-2992.
- [13] QIAN Haiyun, CHEN Li, HUANG Jiangping, et al. The lnc RNA miR4435-2Hg promotes lung cancer progression by activating β -catenin signalling [J]. Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany), 2018, 96(8): 753-764.

收稿日期: 2021-01-07

修回日期: 2021-01-29

(上接第9页)

- [8] 林秀娟, 阮建锋, 林红燕, 等. 神经外科患者术后颅内感染易感因素分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2015,2(5):1133-1135.
- LIN Xiujuan, RUAN Jianfeng, LIN Hongyan, et al. Risk factors for postoperative intracranial infections in patients of neurosurgery department [J]. Chin J Nosocomiol, 2015,25(5):1133-1135.
- [9] STOTZ M, GERGER A, EISNER F, et al. Increased neutrophil-lymphocyte ratio is a poor prognostic factor in patients with primary operable and inoperable pancreatic cancer [J]. Br J Cancer, 2013,109(2): 416-421.
- [10] LAYIOS N, LAMBERMONT B, CANIVET J L, et al. Procalcitonin usefulness for the initiation of antibiotic treatment in intensive care unit patients [J]. Crit Care Med, 2012,40(8):2304-2309.
- [11] GU Liangyou, MA Xin, LI Hongzhao, et al. Prognostic value of preoperative inflammatory response biomarkers in patients with sarcomatoid renal cell carcinoma and the establishment of a nomogram [J]. Sci Rep, 2016,6:23846.
- [12] 王玉荣, 郑庆斌, 韦广发, 等. 中性粒细胞淋巴细胞比值对术后并发颅内感染患者的预测价值 [J/CD]. 中华神经创伤外科电子杂志, 2019,5(5):265-268.
- WANG Yurong, ZHENG Qinbin, WEI Guangfa, et al. Predictive value of neutrophil lymphocyte ratio in patients with postoperative intracranial infection [J]. Chin J Neurotrauma Surg (Electronic Edition), 2019,5(5):265-268.
- [13] LATTANZI S, BRIGO F, TRINKA E, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio in acute cerebral hemorrhage: a system review [J]. Transl Stroke Res, 2019,10(2):137-145.

收稿日期: 2020-05-28

修回日期: 2021-02-22