

循环 miR-145 和 miR-484 在乳腺癌诊断中的研究^{*}

黄远帅¹, 周炜鑫², 罗彬瑞², 郭天虹² (1. 四川医科大学附属第一医院输血科, 四川泸州 646000;
2. 四川医科大学研究生院, 四川泸州 646000)

【摘要】 目的 探索乳腺癌血浆中差异表达的微小 RNA(miRNA), 为检测乳腺癌寻找全新的生物标志物, 并确定其诊断价值。**方法** 采用定量反转录聚合酶反应检测训练组 30 例乳腺癌患者和 20 例健康对照者血浆中的候选标志物, 再盲法验证 20 例乳腺癌患者和 20 例健康对照者候选标志物的诊断效能。**结果** 训练组共发现 6 个差异表达的 miRNA, 其中 miR-145 和 miR-484 差异最显著, 与其他 4 个差异有统计学意义($P<0.05$)。经盲法验证, 二者联合诊断可有效区分乳腺癌患者与健康对照患者, 受试者工作曲线下面积为 0.965, 灵敏度和特异度分别为 91.3% (95%CI: 85.2%~95.4%) 和 90.8% (95%CI: 83.7%~93.6%), 阳性预测值为 91.0%, 阴性预测值为 91.0%。**结论** 血浆中 miR-145 和 miR-484 是乳腺癌潜在的诊断标志物。

【关键词】 乳腺癌; 微小 RNA-145; 微小 RNA-484; 受试者工作曲线下面积; 灵敏度

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.24.005 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)24-3623-03

Research of circulating miR-145 and miR-484 in the diagnosis of breast cancer^{*} HUANG Yuan-shuai¹, ZHOU Wei-xin², LUO Bin-rui², GUO Tian-hong² (1. Department of Transfusion, the First Affiliated Hospital of Sichuan Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Graduate School of Sichuan Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

【Abstract】 Objective To explore the expression changes of miRNAs in the plasma of patients with breast cancer and to evaluate their significance, so as to find new biomarkers for the detection of breast cancer. **Methods** Plasma miRNA levels of 30 cases of patients with breast cancer and 20 cases of healthy controls in training group were measured by qRT-PCR. The diagnosis values of the candidate miRNAs were validated by blind method in test group (including 20 cases of patients with breast cancer and 20 cases of healthy controls). **Results** In training group, there were 6 differentially expressed miRNAs ($P<0.05$), in which miR-145 and miR-451 expressed significantly different from the other 4 miRNAs ($P<0.05$). The result of blind validation showed that a combination of miR-145 and miR-484 could be effective in the differential diagnosis between patients with breast cancer and healthy controls. And the AUC, sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of combination detection were 0.965, 91.3% (95%CI 85.2% - 95.4%), 90.8% (95%CI 83.7% - 93.6%), 91.0% and 91.0%, respectively. **Conclusion** Plasma miR-145 and miR-484 could be potential specific biomarkers for breast cancer screening.

【Key words】 breast cancer; miR-145; miR-484; ROC curve; sensitivity

乳腺癌是由乳腺导管上皮发生的恶性肿瘤, 是妇女的常见恶性肿瘤, 占 99%, 男性仅占 1%^[1]。全球每年约有 120 万妇女患乳腺癌, 50 万人死于乳腺癌, 我国虽属乳腺癌低发地区, 但随着生活水平的提高和家庭人口的简单化, 近几年有明显上升的趋势^[2]。目前乳腺癌的诊断包括: 病理学检查、影像学检查及血清标志物辅助检查。病理活检是乳腺癌诊断的“金标准”, 但因为取材和创伤性等限制了它的应用。影像学检查包括乳腺 X 线摄影(乳腺钼靶照相)、CT、彩超、MRI 等, 是乳腺癌检测的重要手段, 但由于其放射性损伤和假阳性率高, 检测费用也偏高, 因此不适合常规体检。实验室检测项目有癌胚抗原、糖类抗原 153 等, 但是无论是单项检测还是联合应用, 其灵敏度和特异度都不够理想, 只能作为一种辅助检查手段^[3-4]。因此寻找一种新的, 诊断效能高的乳腺癌诊断标志物显得十分重要。微小 RNA(miRNA) 在人类肿瘤的发生、发展中起十分重要的作用, 它们参与细胞的分化、增殖、凋亡、黏附及死亡等生物学过程, 这些与癌

症的形成及演变都密切相关^[5]。近年来, 有关 miRNA 在诊断疾病价值方面的研究越来越受到重视, 血清/血浆 miRNA 表达稳定, 检测方便, 损伤小, 是理想的癌症诊断标志物。已有相关文献报道 miRNA 在乳腺癌的发生、发展及诊断中的应用^[6-9]。本研究旨在寻找乳腺癌的特异生物标志物——miRNA, 并评价其在乳腺癌诊断中的价值。

1 资料与方法

1.1 标本收集 收集四川医科大学附属第一医院 2011 年 7 月至 2014 年 7 月收治的乳腺癌患者 50 例作为肿瘤组, 年龄 34~70 岁, 平均 59 岁; TNM 分期: I 期 7 例, II 期 20 例, III 期 18 例, IV 期 5 例。入选条件: (1) 女性; (2) 病理检查确诊为乳腺浸润性导管癌; (3) 未行手术或放、化疗等任何治疗; (4) 临床病理资料完整。同时收集门诊体检者 40 例作为健康对照组, 男 5 例, 女 35 例; 年龄 35~68 岁, 平均 60 岁。将这两组标本分为训练组(乳腺癌患者 30 例和健康对照者 20 例, 用于筛选具有诊断价值的

^{*} 基金项目: 四川省卫生计生厅课题资助项目(120336)。

作者简介: 黄远帅, 男, 博士, 副研究员, 主要从事 microRNA 与疾病关系的研究。

miRNA)和验证组(乳腺癌患者 20 例,健康对照组 20 例,用于鉴别筛选出的 miRNA 的诊断价值)。肿瘤组血浆标本采集于患者乳腺癌确诊后和治疗前;两组受试者均签署知情同意书。

1.2 定量反转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测训练组候选标志物 先用 Trizol 试剂提取肿瘤组和健康对照组血浆标本的总 RNA,反转录和实时定量 PCR 技术联合检测训练组 50 例血浆标本中的 miRNA,选择 RNU6B (U6)作为内标物质进行标准化($\Delta Ct = \Delta Ct_{miR} - \Delta Ct_{U6}$),相对表达量以 $2^{-\Delta Ct}$ 表示^[10]。所用试剂为 Taqman human miRNA assay kit,按试剂盒说明书步骤操作。

1.3 统计学处理 组间数据比较采用 Mann-Whitney U 检验,数据之间两两比较采用 Kruskal-Wallis 检验,所有数据均采用 SPSS18.0 统计软件进行统计分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。利用 Graph PadPrism V4.03 软件进行数据分析和作图,然后将差异 miRNA 带入验证组验证其诊断效能^[11]。用受试者工作曲线(ROC)及曲线下面积(AUC)比较不同 miRNA 区分乳腺癌患者和健康者的能力,计算其灵敏度、特异度。

2 结 果

2.1 乳腺癌特异 miRNA 筛选 乳腺癌组(30 例)和健康对照组(20 例)共 50 例标本经 qRT-PCR 检测,初步筛选出 6 个显著表达的 miRNA(miR-16、miR-21、miR-145、miR-191、miR-210、miR-484),见表 1。除了 miR-145 在乳腺癌组中表达降低以外,其余都呈高表达,差异有统计学意义($P < 0.05$),其中 miR-145 和 miR-484 在乳腺癌组和健康对照组的表达差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。图中方框内横线代表中位数,方框所表示的区域指 25%~75%百分位数区间,方框外的小横线代表 10%~90%的百分位数区间,小圆点指在 10%~90%的百分位数区间以外的值。

表 1 乳腺癌组显著表达的 miRNA

miRNA	Foldchange	P
miR-16	4.5	0.0001
miR-21	5.0	<0.01
miR-145	2.2	<0.01
miR-191	5.2	0.0001
miR-210	4.3	<0.01
miR-484	5.5	<0.01

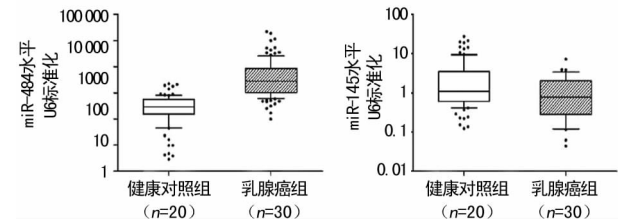


图 1 miR-484 和 miR-145 在乳腺癌组和健康对照组中相对表达情况

2.2 miR-484 和 miR-145 鉴别乳腺癌的诊断价值 检测验证组 miR-484 和 miR-145 的相对表达量,单独使用 miR-484 和 miR-145 作为乳腺癌的标志物作 ROC 曲线,得到 AUC 分别为 0.928 (95%CI: 0.901~0.959) 和 0.623 (95%CI: 0.513~0.725),见图 2。为了提高肿瘤的诊断价值,联合使用 miR-484 和 miR-145

一起作为区分乳腺癌患者与健康对照者的生物标志物作 ROC 曲线,得到 AUC 为 0.965 (95%CI: 0.939~0.984),见图 3。此时灵敏度和特异度分别为 91.3% (95%CI: 85.2%~95.4%) 和 90.8% (95%CI: 83.7%~93.6%),阳性预测值为 91.0%,阴性预测值为 91.0%。

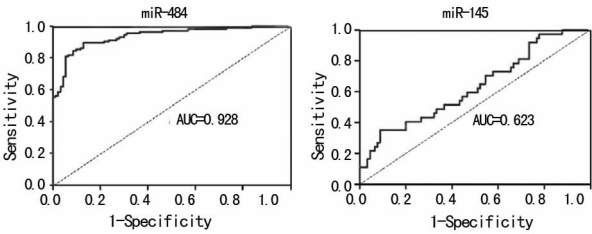


图 2 单独使用 miR-484 和 miR-145 作为乳腺癌标志物的 ROC 曲线及 AUC

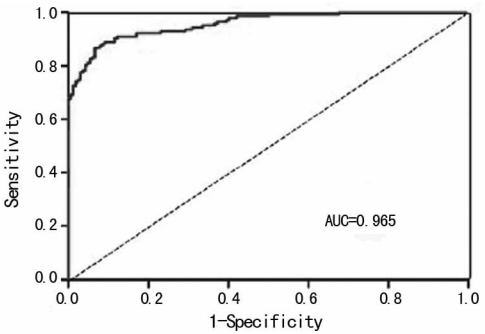


图 3 联合使用 miR-484 和 miR-145 作为乳腺癌标志物的 ROC 曲线及 AUC

3 讨 论

本研究通过对 30 例乳腺癌患者和 20 例健康对照者血浆使用 qRT-PCR 检测,共筛选出 6 个候选标志物,再通过统计分析找到差异最显著的 2 个标志物——miR-484 和 miR-145,然后进行诊断价值评价。单独使用 miR-484 和 miR-145 作为乳腺癌的诊断标志物时,其 ROC 的 AUC 分别为 0.928 (95%CI: 0.901~0.959) 和 0.623 (95%CI: 0.513~0.725),诊断效能不甚理想。为了提高乳腺癌的诊断价值,联合使用 miR-484 和 miR-145 作为区分乳腺癌患者与健康对照者的生物标志物,ROC 的 AUC 为 0.965 (95%CI: 0.939~0.984),此时灵敏度和特异度分别为 91.3% (95%CI: 85.2%~95.4%) 和 90.8% (95%CI: 83.7%~93.6%),阳性预测值为 86%,阴性预测值为 91%。说明 miR-484 和 miR-145 对乳腺癌的诊断有十分重要的价值,虽然本研究数据展示了较好的诊断效能,但若要应用于临床,仍需扩大标本量和细化分组,或对乳腺癌分期分型再进行标志物的筛选,以提高诊断的特异性。

Li 等^[12]比较了 19 例胰腺癌患者和 10 例健康对照者血清 miRNA,发现 miR-484 在胰腺癌中表达显著增高;Vecchione 等^[13]发现在对化疗不敏感的卵巢癌中 miR-484 表达减低;另外关于 miR-484 与恶性肿瘤的关系,有研究指出其在表皮恶性黑色素瘤中(相对于良性黑色素痣而言)是 10 个重要的上调 miRNA 之一^[14]。Volinia 和 Croce^[15]通过分析 466 例乳腺癌患者的生存情况认为,miR-484 水平的高低与 I、II 期乳腺癌的预后有重要相关性。miR-145 是公认的抑癌基因,在多种肿瘤的发生中,通过抑制细胞生长从而达到抑癌作用^[16-17]。可见各种 miRNA 在肿瘤中的表达并非特异的,因此,单独将某一种 miRNA 作为

癌症的诊断标志物是不理想的,所以在单独使用 miR-484 作为乳腺癌的诊断标志物时,在 ROC 的 AUC 达 0.928 的情况下,为了增加其特异性和提高诊断效能,本研究依然考虑将 miR-484 和 miR-145 作为联合诊断标志物来计算其诊断效能,结果显示,联合诊断 ROC 的 AUC 达 0.965,诊断效能有了明显提高。结果中显示 miR-484 在乳腺癌中高表达,而 miR-145 在乳腺癌中低表达,这也为后期研究提供了很好的思路,即研究标志物的作用机制。这样,标志物不仅可以作为疾病诊断和预后判断的标准,同时也可以阐明疾病发生、发展的机制,纵向加深了研究的深度。

综上所述,尽管本研究尚有一些局限,但血浆 miR-484 和 miR-145 仍不失作为乳腺癌有效的诊断标志物,下一步研究可加大标本量验证和进行 miRNA 对乳腺癌发病机制的研究。

参考文献

[1] Liu LY, Wang M, Ma ZB, et al. The role of adiponectin in breast cancer; a meta-analysis[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e73183.

[2] Jia Y, Lu Y, Wu K, et al. Does night work increase the risk of breast cancer? A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies[J]. Cancer Epidemiol, 2013, 37(3): 197-206.

[3] Zob D, Vasilescu M, Gruia M, et al. Breast cancer. Screening criteria[J]. Chirurgia (Bucur), 2013, 108(4): 557-562.

[4] Gopal S, Krysiak R, Liomba NG, et al. Early experience after developing a pathology laboratory in Malawi, with emphasis on cancer diagnoses[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e70361.

[5] Kothandan R, Biswas S. Search for signatures in miRNAs associated with cancer[J]. Bioinformation, 2013, 9(10): 524-527.

[6] Godfrey AC, Xu Z, Weinberg CR, et al. Serum microRNA expression as an early marker for breast cancer risk in prospectively collected samples from the Sister Study cohort[J]. Breast Cancer Res, 2013, 15(3): R42.

[7] Schrauder MG, Strick R, Schulz-Wendtland R, et al. Circulating micro-RNAs as potential blood-based markers for early stage breast cancer detection[J]. PLoS One, 2012, 7(1): e29770.

[8] Mar-Aguilar F, Mendoza-Ramírez JA, Malagón-Santiago I, et

al. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential breast cancer biomarkers[J]. Dis Markers, 2013, 34(3): 163-169.

[9] Si H, Sun X, Chen Y, et al. Circulating microRNA-92a and microRNA-21 as novel minimally invasive biomarkers for primary breast cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2013, 139(2): 223-229.

[10] Zhao Y, Li C, Wang M, et al. Decrease of miR-202-3p Expression, a Novel Tumor Suppressor, in Gastric Cancer[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e69756.

[11] Hajian-Tilaki K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation[J]. Caspian J Intern Med, 2013, 4(2): 627-635.

[12] Li A, Yu J, Kim H, et al. MicroRNA array analysis finds elevated serum miR-1290 accurately distinguishes patients with Low-stage pancreatic cancer from healthy and disease controls[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(13): 3600-3610.

[13] Vecchione A, Belletti B, Lovat F, et al. A microRNA signature defines chemoresistance in ovarian cancer through modulation of angiogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci, 2013, 110(24): 9845-9850.

[14] Sand M, Skrygan M, Sand D, et al. Comparative microarray analysis of microRNA expression profiles in primary cutaneous malignant melanoma, cutaneous malignant melanoma metastases, and benign melanocytic nevi[J]. Cell Tissue Res, 2013, 351(1): 85-98.

[15] Volinia S, Croce CM. Prognostic microRNA/mRNA signature from the integrated analysis of patients with invasive breast cancer[J]. Proc Natl Acad Sci, 2013, 110(18): 7413-7417.

[16] Sachdeva M, Zhu S, Wu F, et al. p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(9): 3207-3212.

[17] Shao Y, Qu Y, Dang S, et al. MiR-145 inhibits oral squamous cell carcinoma (OSCC) cell growth by targeting c-Myc and Cdk6[J]. Cancer Cell Int, 2013, 13(1): 51-56.

(收稿日期:2015-07-20 修回日期:2015-09-15)

(上接第 3622 页)

[8] 陈薇. 23 价肺炎球菌疫苗联合流感疫苗对 COPD 急性发作的临床干预[J]. 国际医药卫生导报, 2014, 20(12): 1767-1770.

[9] 乔萍. 高原地区慢性阻塞性肺病患者接种 23 价肺炎球菌多糖疫苗和流感疫苗的疗效观察[J]. 中国实用医药, 2014, 9(23): 191-192.

[10] 韩性运, 韩丽丽. 联合疫苗接种对慢性阻塞性肺病患者防治的追踪观察[J]. 中国实用医药, 2011, 6(5): 159-160.

[11] 章琴莹. 流感疫苗和肺炎球菌疫苗预防 COPD 急性发

疗效观察[J]. 浙江中西医结合杂志, 2014, 24(7): 597-599.

[12] 王学英. 西宁地区慢性阻塞性肺病患者稳定期接种两种疫苗的效果观察[J]. 青海医药杂志, 2010, 40(7): 75-76.

[13] Higgins JP, Thompson SG, Deeks JJ, et al. Measuring inconsistency in meta-analyses[J]. BMJ, 2003, 327(7414): 557-560.

(收稿日期:2015-07-10 修回日期:2015-09-06)