

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.04.009

ADAMTS9-AS2 在乳腺癌患者血浆中的表达及其意义

宋宏伟, 丛 辉[△]

(南通大学附属医院医学检验科, 江苏南通 226001)

摘要:目的 探讨长链非编码 RNA(lncRNA)ADAMTS9-AS2 在乳腺癌患者血浆中的表达情况及其临床意义。**方法** 收集 44 例乳腺癌初诊患者、48 例乳腺良性病变患者的血浆标本,以同期 50 例年龄相仿的门诊健康体检女性血浆标本作为对照。采用实时荧光定量聚合酶链反应检测血浆 ADAMTS9-AS2 的相对表达量;对 44 例乳腺癌患者标本进行统计学分析,研究血浆 ADAMTS9-AS2 表达水平与患者年龄、病理类型、淋巴结转移、雌激素受体、孕激素受体、增殖细胞核抗原(Ki67)、人表皮生长因子-2 等临床病理特征的关系。**结果** 血浆 ADAMTS9-AS2 的相对表达量在 48 例乳腺良性病变患者中,除 2 例降低外,其余均升高,在 44 例乳腺癌初诊患者中均升高,且血浆 ADAMTS9-AS2 在乳腺癌中的表达水平明显高于乳腺良性病变,差异有统计学意义($P<0.05$)。乳腺癌患者血浆高表达的 ADAMTS9-AS2 与 Ki67 有关($P=0.0338$)。**结论** ADAMTS9-AS2 在乳腺癌患者血浆中高表达,可作为乳腺癌早期诊断的潜在新型生物标志物。

关键词:乳腺癌; 长链非编码 RNA; ADAMTS9-AS2; 生物标志物

中图分类号:R737.9

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)04-0464-04

Expression and significance of plasma ADAMTS9-AS2 in patients with breast cancer

SONG Hongwei, CONG Hui[△]

(Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of plasma long chain non-coding RNA (lncRNA) ADAMTS9 antisense RNA 2 (ADAMTS9-AS2) in the patients with breast cancer (BC) and to study its clinical significance. **Methods** The plasma samples were collected from 44 patients with initially diagnosed BC and 48 patients with benign breast lesions, while the plasma samples collected from contemporaneous 50 age-matched females undergoing the healthy physical examination in the outpatient department served as the control group. The relative expression level of ADAMTS9-AS2 was detected by adopting the fluorescence quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The statistical analysis was performed on 44 cases of BC sample. Then the relationship between the expression level of ADAMTS9-AS2 the clinicopathological characteristics of with the age, pathological type, lymph node metastasis, estrogen receptor, progesterone receptor, C-erbB-2, Ki67, etc. was analyzed. **Results** The relative expression level of plasma ADAMTS9-AS2 in 48 patients with benign breast lesions was increased except for decrease in two cases. The level of ADAMTS9-AS2 was increased in 44 cases of initially diagnosed BC, moreover the expression level of ADAMTS9-AS2 in BC was significantly higher than that in benign breast lesions, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The high expression level of plasma ADAMTS9-AS2 was related with Ki67 ($P=0.0338$). **Conclusion** ADAMTS9-AS2 is highly expressed in plasma of the patients with BC, which can be used for a potential novel biomarker for early diagnosis of BC.

Key words: breast cancer; long non-coding RNA; ADAMTS9-AS2; biomarker

乳腺癌是全球女性最常见的恶性肿瘤之一,位居女性恶性肿瘤死因的首位。中国乳腺癌的发病率正以 2% 左右的速度逐年上升^[1],且患者呈现年轻化趋势。乳腺癌起病隐匿,部分乳腺癌患者确诊时已属中晚期,术后不可避免的复发、转移仍是亟待解决的问

题。因此,提高乳腺癌的治愈率和生存率,降低复发率和病死率的关键在于早期发现和早期诊断。目前,较少有用于乳腺癌早期诊断的检查方法或手段。穿刺活检不适宜于大规模筛查且为有创检查,患者一般难以接受。临床常用的癌胚抗原、糖类抗原 153 等肿

瘤标志物特异度和灵敏度不尽如人意。因此,临床迫切需要一种高效、灵敏的新型生物标志物筛查乳腺癌患者。

游离核酸是一类存在于血液(血清或血浆)、尿液和脑脊液等体液中的胞外核酸。游离 DNA 和微小 RNA 是游离核酸的典型代表,文献[2-3]显示其与癌症的形成和进展息息相关。最近发现的长链非编码 RNA(lncRNA)因其高度的组织特异性,以及二级结构的稳定性,有望成为新型生物标志物。本文建立了实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测血浆 lncRNA ADAMTS9-AS2 的方法,检测 ADAMTS9-AS2 在乳腺癌中的表达情况,探讨其临床研究意义,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2016 年 11 月至 2017 年 8 月经本院病理科确诊的乳腺癌初诊患者 44 例(年龄 32~76 岁,中位年龄 54 岁),乳腺良性病变患者 48 例(年龄 16~67 岁,中位年龄 43 岁)和同期门诊健康体检女性 50 例(年龄 37~64 岁,中位年龄 51 岁)。所有患者临床资料均收集于原始病历,术后病理诊断明确,术前均未经放射或化学药物治疗,手术后顺利出院,未在住院期间死亡。本研究经本院伦理委员会批准,所有标本均在抽血前得到受试者的知情同意。

1.2 仪器与试剂 美国 BIO-RAD 公司反转录扩增仪和美国 ABI 公司 7500 Real Time PCR 仪。血液(液体标本)总 RNA 快速提取试剂盒(离心柱型)购自北京百泰克生物技术有限公司;Reverse Transcription Kit 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;FastStart Universal SYBR Green I Master 购自德国 Roche 公司;ADAMTS9-AS2、GAPDH 荧光定量 PCR 引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 标本采集与处理 采用乙二胺四乙酸抗凝的 EP 管收集全血标本 2 mL,3 000 r/min 离心 10 min 后,留取血浆 600 μ L 立即放于 1.5 mL 的无酶 EP 管内,-80 $^{\circ}$ C 冻存备用。50 例健康体检女性血浆充分混匀,制备对照血浆,每 250 μ L 分装于 1.5 mL 的无酶 EP 管内,-80 $^{\circ}$ C 冻存备用。

1.3.2 总 RNA 提取及反转录 严格按照试剂说明书要求提取总 RNA 并进行反转录反应,将得到的 cDNA 保存于-80 $^{\circ}$ C 备用。

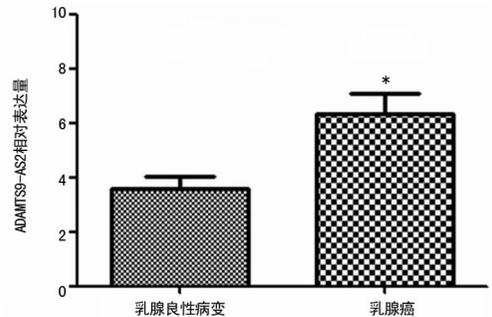
1.3.3 实时荧光定量 PCR 选择 GAPDH 作为内参,每次 PCR 反应时取对照血浆作为每次反应的参比。采用相对定量 PCR 的方法 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (RQ 值)计算相对表达量, $\Delta\Delta Ct = \text{受检组}(C_t^{\text{ADAMTS9-AS2}} - C_t^{\text{GAPDH}}) - \text{对照组}(C_t^{\text{ADAMTS9-AS2}} - C_t^{\text{GAPDH}})$ 均值。AD-

AMTS9-AS2 的上游引物为 5'-TCT GTT GCC CAT TTC CTA CC-3', ADAMTS9-AS2 下游引物为 5'-CCC TTC CAT CCT GTC TAC TCT A-3';GAPDH 上游引物为 5'-GGA CCA ATA CGA CCA AAT CCG-3', GAPDH 下游引物为 5'-AGC CAC ATC GCT CAG ACA C-3'。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 45 个循环;60~95 $^{\circ}$ C 收集荧光,通过熔解曲线及 2% 琼脂糖凝胶电泳评估 PCR 的特异性。反应体系如下:SYBR Green I mix (Rox) 10 μ L, Forward primer 1 μ L, Reverse primer 1 μ L, ddH₂O 5 μ L, cDNA 3 μ L。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件进行统计分析,Graphpad Prism5.0 软件进行图像绘制。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两独立样本比较采用双侧 t 检验;血浆 ADAMTS9-AS2 表达水平与患者年龄、病理类型、淋巴结转移、雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、增殖细胞核抗原(Ki67)、人表皮生长因子-2(C-erbB-2)等临床病理参数进行成组 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血浆 ADAMTS9-AS2 在不同疾病状态下的差异表达 用上述建立的方法,对 44 例乳腺癌初诊患者和 48 例乳腺良性病变患者血浆标本 ADAMTS9-AS2 的相对表达量进行检测。由于本试验以 50 例健康体检女性混合血浆为对照,作为每次实时荧光定量 PCR 的参比,对照血浆的 RQ 值设定为 1。结果显示,血浆 ADAMTS9-AS2 的 RQ 值在 48 例乳腺良性病变患者中,除 2 例小于 1 外,其余均大于 1;血浆 ADAMTS9-AS2 的 RQ 值在 44 例乳腺癌初诊患者中均大于 1,且血浆 ADAMTS9-AS2 在乳腺癌中的表达水平(6.036 \pm 0.789)明显高于乳腺良性病变的(3.606 \pm 0.417),差异有统计学意义($t = 2.787, P < 0.05$)。见图 1。



注:与乳腺良性病变相比,* $P < 0.05$

图 1 ADAMTS9-AS2 在乳腺癌和乳腺良性病变患者的相对表达量

2.2 乳腺癌患者血浆 ADAMTS9-AS2 与临床病理参数之间的关系 参照患者临床病理基本参数,将乳

腺癌患者按照年龄、病理类型、淋巴结转移、ER、PR、C-erbB-2、Ki67 检测结果等病理特征进行分组。结果表明,乳腺癌患者血浆高表达的 ADAMTS9-AS2 与 Ki67 有关($P=0.0338$),而与患者年龄、病理类型、淋巴结转移、ER、PR 及 C-erbB-2 无关($P>0.05$)。见表 1。

表 1 乳腺癌患者血浆 ADAMTS9-AS2 表达水平与临床病理特征的关系($\bar{x}\pm s$)

病理变量	n	ADAMTS9-AS2	P
年龄(岁)			0.4563
<50	14	6.238±1.572	
≥50	30	5.941±0.915	
病理类型			0.2421
浸润性导管癌	37	5.824±0.820	
非浸润性导管癌	7	7.155±2.549	
淋巴结转移			0.3206
有	16	5.741±1.115	
无	28	6.204±1.078	
ER			0.5285
阳性	35	5.954±0.868	
阴性	9	6.352±1.972	
PR			0.5957
阳性	34	6.082±0.885	
阴性	10	5.878±1.826	
C-erbB-2			0.2566
阳性	33	6.205±0.694	
阴性	11	5.527±1.209	
Ki67			0.0338
≤10%	2	2.928±0.694	
>10%	42	6.184±0.820	

3 讨 论

ADAMTS9 是一种抑癌基因,ADAMTS9-AS2 是 ADAMTS9 的一种反义转录,应该也是一种抑癌基因。YAO 等^[4]报道 ADAMTS9-AS2 的表达在神经胶质瘤组织中显著下调,起到抑癌基因的作用;LI 等^[5]发现 ADAMTS9-AS2 的表达在结直肠癌组织中也显著下调,且其低表达可预测结直肠癌患者预后不良;XUE 等^[6]报道 ADAMTS9-AS2 的表达在非小细胞肺癌组织中也显著下调,同样起到抑癌基因的作用。本研究采用实时荧光定量 PCR 检测 44 例乳腺癌初诊患者,48 例乳腺良性病变患者和 50 例同期门诊健康体检女性血浆标本 lncRNA ADAMTS9-AS2 的相对表达量,结果显示,血浆 ADAMTS9-AS2 的相对表达量在 48 例乳腺良性病变患者中,除 2 例降低外,其余均升高,在 44 例乳腺癌初诊患者中均升高,

且血浆 ADAMTS9-AS2 在乳腺癌中的表达水平明显高于乳腺良性病变,差异有统计学意义($P<0.05$)。笔者前期研究用乳腺癌芯片筛查差异表达的 lncRNAs 时,ADAMTS9-AS2 是低表达的,为什么在乳腺癌血浆中却是高表达的呢?这一问题同样出现在其他癌症相关非编码 RNA 的研究中,如 QI 等^[7]同样发现微小 RNA(miR-122)表达水平在肝癌组织中降低,但在肝癌患者血清中的表达水平要显著高于健康者。又如许楠^[8]硕士论文中 lncRNA RP11-445H22.4 在乳腺癌组织中的表达呈显著下调,而在外周循环血中却呈上调表现。可能的原因是肿瘤细胞中的非编码 RNA 大量释放入血。lncRNA ADAMTS9-AS2 在组织及外周血中的表达水平不一致是否也可能由肿瘤特异性分泌导致,需要进一步深入研究。

Ki67 是一种与细胞增殖密切相关的核抗原,是反映肿瘤增殖活性的一项指标。乳腺肿瘤中 Ki67 阳性表达的肿瘤细胞恶性程度高,细胞增殖活跃,肿瘤生长速度快,侵袭性高,转移概率高,预后差^[9]。因此, Ki67 表达的高低与乳腺癌的发生、发展密切相关。本文通过对 44 例乳腺癌患者进行统计分析发现,血浆中高表达的 ADAMTS9-AS2 与 Ki67 有关($P=0.0338$),而与患者年龄、病理类型、淋巴结转移、ER、PR 及 C-erbB-2 无关,表明 ADAMTS9-AS2 表达的高低与乳腺癌的发生、发展也密切相关。

综上所述,lncRNA ADAMTS9-AS2 在乳腺癌早期辅助诊断方面是有价值的,且该法属于非侵入性检查,易被患者接受,有望成为乳腺癌早期诊断的潜在新型生物标志物。本研究由于标本量较少,未对乳腺癌术前术后标本进行研究,在后续工作中将进行大样本收集、长期随访和进一步功能研究,以进一步验证乳腺癌患者血浆 lncRNA ADAMTS9-AS2 的临床应用价值。

参考文献

- [1] 汤鸿超,孟旭莉. 乳腺癌相关长链非编码 RNA 的研究进展[J]. 基础医学与临床,2016,36(12):1738-1742.
- [2] WU J,LI G,WANG Z,et al. Circulating microRNA-21 is a potential diagnostic biomarker in gastric cancer[J]. Dis Markers,2015,2015(1):435656.
- [3] HAO TB,SHI W,SHEN X J,et al. Circulating cell-free DNA in serum as a biomarker for diagnosis and prognostic prediction of colorectal cancer[J]. Br J Cancer,2014,111(8):1482-1489.
- [4] YAO J,ZHOU B,ZHANG J,et al. A new tumor suppressor lncRNA ADAMTS9-AS2 is regulated by DNMT1 and inhibits migration of glioma cells[J]. Tumour Biol,2014,35(8):7935-7944.

临床信息^[6]。在开展解释性注释时,若能结合反馈性检测和反射性检测,则能大大提高临床实验室服务的价值,帮助临床医生作出快速、准确的临床决策^[7-8]。然而,虽然临床医生更支持实验室采用反馈性检测提供有价值的实验室信息,但它存在临床效用、伦理、患者知情同意及成本效益等各方面的问題;相比之下,尽管实验室更愿意采用反射性检测,但目前尚不存在统一的标准建立检验规则系统^[9-10]。

临床实验室目前出具的报告类型主要包括检测性报告和诊断性报告^[11]。《医疗机构临床实验室管理办法》第十九条指出,诊断性临床检验报告应当由执业医师出具^[12]。然而从调查的情况看来,检验医师的人数偏少。随着教育体制的改革,能考取执业医师资格证的检验医学本科毕业生越来越少;且检验医师的管理模式仍在摸索阶段。现代医学多学科相互融合,检验医师应积极参与到临床诊疗活动中,为临床医生提供分析前检验项目的咨询以及分析后检验结果的解释服务,以增强临床医生对检验工作的支持和信任^[13-14]。

综上所述,我国临床检验解释性注释的开展尚处于起步阶段,就现况调查的结果而言,存在诸多问題。但本次现况调查也存在不足之处,如回报率低、实验室对部分概念(如反馈性检测和反射性检测等)不熟悉。实验室可参考国外的管理模式并结合实际情况^[15],定期评价人员能力,明确检验医师的岗位职责,并加强与临床的沟通,提高检验后质量。

参考文献

[1] VASIKARAN S D. Anatomy and history of an external quality assessment program for interpretative comments in clinical biochemistry[J]. Clin Biochem, 2015, 48(7/8): 467-471.

[2] 鲁辛辛,顾海彤. 探索检验医师素质培养新模式[J]. 中华医学杂志, 2014, 94(32): 2481-2484.

[3] 罗素新. 实施卓越医师教育培养计划的思考[J]. 中华医

学教育探索杂志, 2012, 11(6): 617-620.

[4] 胡婷婷,刘维薇. 医学实验室质量和能力认可准则(ISO 15189:2012)专用要求概述[J]. 临床检验杂志, 2013, 31(11): 867-871.

[5] PATERSON J R, PATERSON R. Reflective testing: how useful is the practice of adding on tests by laboratory clinicians[J]. J Clin Pathol, 2004, 57(3): 73-75

[6] YOUNG I S. A few thoughts on reflective testing [J]. Ann Clin Biochem, 2006, 43(5): 333-334.

[7] BARLOW I M. Are biochemistry interpretative comments helpful? Results of a general practitioner and nurse practitioner survey[J]. Ann Clin Biochem, 2008, 45(Pt 1): 88-90.

[8] ÉVA A. Adding Value in the Post-analytical Phase[J]. EJIFCC, 2016, 27(2): 166-173.

[9] ELNENAEI M, MINNEY D, CLARKE D B, et al. Reflex and reflective testing strategies for early detection of pituitary dysfunction[J]. Clin Biochem, 2018, 54(1): 78-84.

[10] MURPHY M J, MCMAHON M J, PATERSON J R. Reflective testing: the practice of adding on tests by laboratory staff[J]. Ann Clin Biochem, 2005, 42(Pt 1): 1-2.

[11] 王斐,齐志宏,崔巍. 从检验到临床:中国检验医师职责架起的桥梁[J/CD]. 中华临床实验室管理电子杂志, 2016, 4(2): 73-77.

[12] 中华人民共和国卫生部. 医疗机构临床实验室管理办法[S]. 北京:中华人民共和国卫生部, 2006.

[13] 黄克斌,张亚萍,陈如,等. 检验医学分析后质量控制的探讨[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(4): 565-566.

[14] 赵霞,李勤广. 检验与临床联系的必要性[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(6): 758-760.

[15] JASSAM N, LAKE J, DABROWSKA M, et al. The European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine syllabus for postgraduate education and training for specialists in laboratory medicine: version 5 - 2018 [J]. Clin Chem Lab Med, 2018, 56(11): 1846-1863.

(收稿日期:2018-05-18 修回日期:2018-09-02)

(上接第 466 页)

[5] LI Q, DAI Y, WANG F, et al. Differentially expressed long non-coding RNAs and the prognostic potential in colorectal cancer [J]. Neoplasma, 2016, 63(6): 977-983.

[6] XUE F, ZHU L, LIU S, et al. Long noncoding RNA ADAMTS9-AS2 is regulated by DNA methyltransferase 1 and inhibits the malignant behaviors of non-small cell lung cancer cells[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2017, 10(3): 2599-2608.

[7] QI P, CHENG S Q, WANG H, et al. Serum microRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma in Chinese pa-

tients with chronic hepatitis B virus infection[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28486.

[8] 许楠. 术前乳腺癌肝郁证与相关 lncRNA 的初步研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2015.

[9] DE AZAMBUJA E, CARDOSO F, DE CASTRO G, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer; a meta-analysis of published studies involving 12, 155 patients [J]. Br J Cancer, 2007, 96(10): 1504-1513.

(收稿日期:2018-05-26 修回日期:2018-09-10)