

• 临床检验研究论著 •

血清 miR-155 水平检测在乳腺肿瘤患者早期诊断中的研究*

赵苏琪¹, 吴倩², 高峰¹, 张春兵¹, 杨学文¹

(1. 江苏省中医院, 南京 210029; 2. 南京医科大学公共卫生学院, 南京 210029)

摘要:目的 探讨血清 miR-155 检测在乳腺肿瘤早期诊断中的作用。方法 提取 20 例早、中期乳腺肿瘤患者以及 10 例健康人血清中的总 RNA, 利用荧光定量技术系统分析与乳腺肿瘤极其相关的 miR-155 在血清中的表达情况。结果 miR-155 在乳腺肿瘤患者血清中的表达与健康人相比均呈现出显著的高表达, 两者表达水平经 Mann-Whitney 检验, $P < 0.05$, 说明 miR-155 的表达水平在乳腺肿瘤患者与健康人之间存在明显差异。结论 疾病特异性 miRNA 或可作为肿瘤早期检测的血清学分子标志物。

关键词: 微 RNA; 乳腺肿瘤; 血清; 分子标记物

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.13.013

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)13-1569-03

Study on the detection of miR-155 in serum from patients with breast tumor*

Zhao Suying¹, Wu Qian², Gao Feng¹, Zhang Chunbing¹, Yang Xuewen¹

(1. Jiangsu Provincial Hospital of TCM, Nanjing, Jiangsu 210029, China;

2. School of Public Health Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China)

Abstract: Objective To study the significance of the detection of miR-155 in serum for the early diagnosis of breast tumor.

Methods Total RNA in serum were extracted in 20 patients with newly diagnosed breast tumor and 10 healthy subjects. Real-time polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the expression of miR-155 in serum samples. **Results** Expression level of miR-155 in patients with breast tumor was significantly higher than in healthy controls ($P < 0.05$). **Conclusion** miRNA specific for diseases could be used as serological biomarkers for early diagnosis of cancer.

Key words: microRNA; breast neoplasms; serum; biomarkers

乳腺肿瘤是女性最常见的恶性肿瘤之一, 发病率占全身各种恶性肿瘤的 7%~10%^[1], 在妇女仅次于子宫肿瘤。乳腺肿瘤早期时, 临床上无症状, 也无肿块, 是很难发现的, 等到有明显症状时大都已是晚期, 只能选择手术切除或是放射治疗。对于患者来说, 痛苦大并且可能影响到生活质量, 因此, 如何早期发现一直是研究的热点问题。随着研究的深入, miRNA 一类长度约为 22 个核苷酸的参与基因转录后水平调控的非编码小分子单链 RNA 进入了科学家的视线^[2], Iorio 等^[3]比较了 10 例健康乳腺组织和 76 例新生乳腺肿瘤组织中 miRNA 的表达谱, 发现 miR-125b、miR-145、miR-21 和 miR-155 的表达在乳腺肿瘤组织中显著降低, 其中 miR-155 降低的程度尤为明显且 miRNA 的表达与乳腺肿瘤的病理生理学特征, 如分期、增殖指数、雌激素和孕甾酮受体的表达以及血管受侵有关。2008 年 Tewari 的研究小组发现, 在血浆和血清中存在有 miRNA 分子并且这种分子独立于细胞之外, 也不能被血液而降解其他 RNA 分子的酶降解^[4]。这个发现为作者在血清中检测 miR-155 水平以期对乳腺肿瘤患者作出早期诊断提供了可靠依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 患者血清样本来自 2009 年 1~12 月在江苏省中医院接受治疗的 20 例乳腺肿瘤患者。入组患者要求有明确的细胞学诊断, 手术前未经任何放疗、化疗及内分泌治疗, 手术后有完整的临床及病理资料。20 例乳腺肿瘤患者根据病理切片分期, 其中 I 期 1 例, II 期 19 例。10 例健康血清对照样本来自女性健康志愿者, 入组志愿者经严格体检无乳腺肿瘤及其相关妇科肿瘤遗传病史且无近期患病史及慢性疾病, 健康个

体的平均年龄与乳腺肿瘤高发平均年龄相仿, 本实验中选择范围 35~60 岁。所有样本采集前告知采样目的并获得患者同意。

1.2 仪器与试剂 总 RNA 的提取与逆转录以及 cDNA 的扩增均采用 Qiagen 试剂盒, 分别为 miRNeasy Mini Kit、miScript Reverse Transcription Kit 与 miScript SYBR Green PCR Kit, 引物为 miScript Prime Assay miR-155, 实时荧光 PCR 仪购自美国的 ABI 7500。

1.3 方法

1.3.1 血样采集与血清分离 无菌采集实验个体外周血, 每管 5 mL, 血样采集选择在上午, 采集的血样常温下保存不超过 1 h, 之后 $3\ 500 \times g$ 离心 10 min, 将血清与血细胞分离, 装入 Eppendorf 管置 $-80\ ^\circ\text{C}$ 保存。

1.3.2 RNA 提取 从样本血清中提取富含 miRNA 的总 RNA, 提取采用 miRNeasy Mini Kit (Qiagen) 试剂盒, 具体操作参见试剂盒说明书。提取出的 RNA 使用前均 $-80\ ^\circ\text{C}$ 保存。

1.3.3 RT-PCR 及 Real-Time PCR 提取出的总 RNA 模板选用 (Qiagen) 逆转录生成所需的 cDNA, RT 反应体系为 RT Buffer 4 μL 、RTase Mix 1 μL 、RNA 模板 4 μL 、ddH₂O 11 μL 共 20 μL , 反应条件为 $37\ ^\circ\text{C}$ 60 min, $95\ ^\circ\text{C}$ 5 min, $4\ ^\circ\text{C}$ 保存。之后用 miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen) 和 miScript Prime Assay miR-155 (Qiagen) 对样本中的 miR-155 进行实时定量荧光扩增, 引物序列为 5'-CUC CUA CAU AUU AGC AUU AAC A, Real-Time PCR 反应体系为 SYBR Master Mix 10 μL 、UP 2 μL 、Primer 2 μL 、ddH₂O 4 μL 、cDNA 2 μL 共 20 μL 。

* 基金项目: 江苏省中医院院级资助项目 (09Y022)。

反应条件为 95 °C 15 min, 94 °C 15 s, 55 °C 30 s, 70 °C 34 s, 共 40 个循环。因到目前为止没有已知的 miRNA 作为内参以消除样品间 RNA 含量的差异,故扩增时选用人 RNU6B 作为内参^[5],将目的基因扩增的值得用内参修正后再行统计分析。荧光定量 PCR 定量检测 miRNA 的相对表达变化量时,以 RNU6B 为内参基因,来对目标基因进行归一化处理,以确保相等数量的样品中比较目标基因的量。表达量的变化用公式 $RQ = 2^{-\Delta Ct}$ 计算,其中 $\Delta Ct = (Ct_{miR-155} - Ct_{RNU6B})$ 。RQ 代表相对表达量, $Ct_{miR-155}$ 和 Ct_{RNU6B} 分别代表荧光定量检测到的目标 miR-

NA 和内参基因 RNU6B 的 Ct 值^[6]。

2 结 果

所提取的样本中除患者组与健康对照组有 1 例扩增失败外,均获得了扩增信号,部分样本扩增曲线见图 1,各样本扩增的具体数据见表 1、2。实验数据的统计分析采用 Mann-Whitney 检验^[6], $P < 0.05$, miR-155 在乳腺肿瘤患者与健康人的血清中存在显著差异的表达,乳腺肿瘤患者血清中的 miR-155 水平相较健康人有了显著的升高。

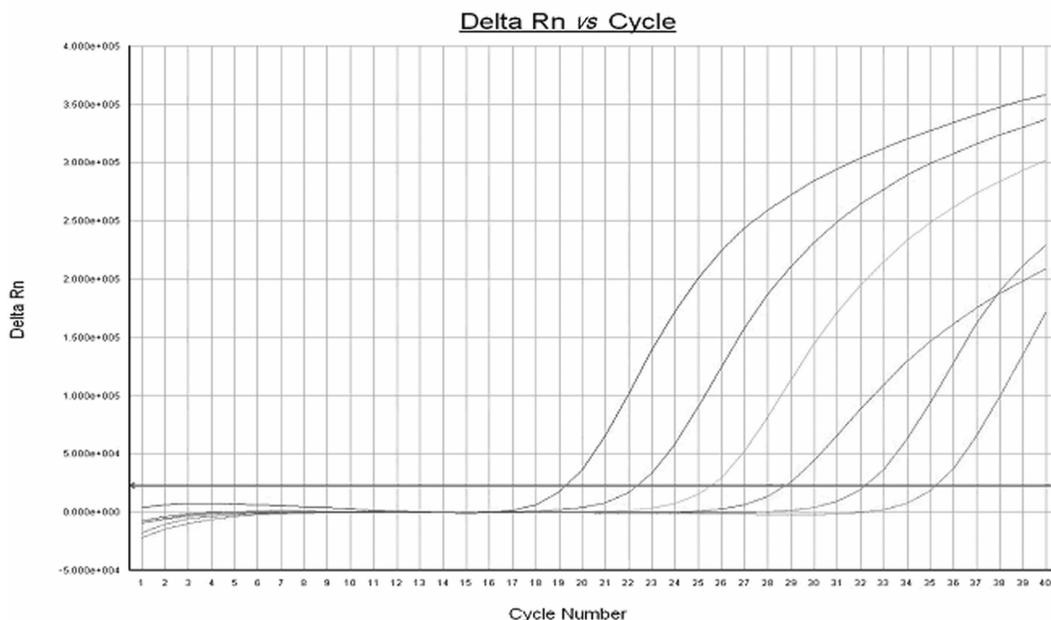


图 1 部分样本中 miR-155 的扩增曲线

表 1 健康对照组扩增数据

| Ct_{RNU6B} | $Ct_{miR-155}$ | $-\Delta Ct$ | $2^{-\Delta Ct}$ |
|--------------|----------------|--------------|------------------|
| 33.095 7 | 35.742 2 | -2.646 5 | 0.159 707 |
| 18.574 5 | 23.807 7 | -5.233 2 | 0.026 586 |
| 16.516 9 | 19.235 6 | -2.718 7 | 0.151 911 |
| 29.750 3 | 30.377 7 | -0.627 4 | 0.647 342 |
| 19.061 7 | 20.132 5 | -1.070 8 | 0.476 055 |
| 9.279 5 | 10.963 2 | -1.683 7 | 0.311 283 |
| 21.269 7 | 23.552 3 | -2.282 6 | 0.205 527 |
| 15.443 3 | 13.298 7 | 2.144 6 | 4.421 696 |
| 28.212 6 | 36.265 6 | -8.053 0 | 0.003 765 |

表 2 患者组扩增数据

| Ct_{RNU6B} | $Ct_{miR-155}$ | $-\Delta Ct$ | $2^{-\Delta Ct}$ |
|--------------|----------------|--------------|------------------|
| 28.856 9 | 25.178 6 | 3.678 3 | 12.802 024 0 |
| 30.657 0 | 26.087 9 | 4.569 1 | 23.737 564 0 |
| 33.908 7 | 30.313 9 | 3.594 8 | 12.082 106 0 |
| 32.271 8 | 30.355 6 | 1.916 2 | 3.774 276 2 |
| 26.837 4 | 24.557 5 | 2.279 9 | 4.856 442 9 |
| 12.499 9 | 11.882 6 | 0.617 3 | 1.534 001 6 |

续表 2 患者组扩增数据

| Ct_{RNU6B} | $Ct_{miR-155}$ | $-\Delta Ct$ | $2^{-\Delta Ct}$ |
|--------------|----------------|--------------|------------------|
| 14.336 1 | 10.243 6 | 4.092 5 | 17.059 459 0 |
| 19.898 0 | 18.637 7 | 1.260 3 | 2.395 455 5 |
| 14.942 5 | 12.325 7 | 2.616 8 | 6.133 880 2 |
| 16.862 1 | 16.671 7 | 0.190 4 | 1.141 080 0 |
| 33.302 1 | 30.842 5 | 2.459 6 | 5.500 642 0 |
| 28.415 1 | 24.462 6 | 3.952 5 | 15.481 786 0 |
| 21.732 4 | 21.263 1 | 0.469 3 | 1.384 437 6 |
| 19.161 6 | 16.527 8 | 2.633 8 | 6.206 586 4 |
| 20.994 4 | 20.590 1 | 0.404 3 | 1.323 446 6 |
| 22.109 2 | 18.056 2 | 4.053 0 | 16.598 719 0 |
| 25.141 1 | 21.373 6 | 3.767 5 | 13.618 539 0 |
| 21.297 6 | 16.698 0 | 4.599 6 | 24.244 742 0 |
| 36.093 0 | 27.622 5 | 8.470 5 | 354.710 940 0 |

3 讨 论

miRNA 是真核生物中一类长度约为 22 个核苷酸的参与基因转录后水平调控的非编码小分子单链 RNA,能通过与其靶 mRNA 特异性的碱基配对引起靶 mRNA 的降解或抑制其翻译,从而对基因进行转录后的表达调控^[2]。miRNA 的主要功

能是调节生物体生长、发育和疾病发生过程中有关基因的表达。大量研究表明,miRNA 在肿瘤细胞中表达水平的异常,是肿瘤发生、发展的重要影响因素。其功能的发挥类似于行使肿瘤基因与抑肿瘤基因的功能,除了表达的数量和丰度有所差异外,在某些肿瘤中表达上调而在另一些肿瘤中可能表达下调^[7-8]。

在 2008 年之前,miRNA 被认为在血清和血浆中不能稳定存在,因此 miRNA 的研究仅限于在组织当中,miRNA 被称作基于组织的肿瘤标志物,直到 2008 年美国弗雷德哈钦森肿瘤症研究中心发表了一篇名为“Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection”的文章,提出 microRNA 分子能在细胞外循环并且能明显保持稳定^[9]。血清作为生物检测样本,具有取材方便,创伤小,可连续体外检测的优点,且血清 miRNA 的高度稳定性也使得患者的实际值与实验的测试值相当吻合,并且选择明显上调的 miRNA 可提高诊断的灵敏度^[9]。本实验通过众多文献筛选出与乳腺肿瘤密切相关的 miR-155 作为研究靶点^[3],经 Real-Time PCR 证明 miR-155 在血清中稳定存在并表达,表明从血清中寻找 miRNA 作为乳腺肿瘤分子标志物的可行性。

本实验中,乳腺肿瘤患者血清中的 miR-155 水平较健康人有了显著的升高,并且升高的程度差异有统计学意义。这与 2005 年 Iorio 等^[3]采用乳腺肿瘤组织进行研究所得到的 miR-155 在肿瘤组织中的表达明显下调是相反的结果^[10],但是与 Zhu 等^[6]采用乳腺肿瘤患者血清所得到的结论一致。在病例的选择上,乳腺肿瘤患者均为早、中期,提示 miR-155 或可作为一种血清分子标志物用于乳腺肿瘤的早期诊断。鉴于肿瘤的发生是一个复杂的过程,仅仅采用一种血清 microRNA 作为肿瘤标志物往往特异性不足,若将多种 microRNA 组合使用并与其他类型肿瘤标志物检测相结合,可望显著提高诊断的准确性^[11-12]。个体间血清 microRNA 变异较大,探寻肿瘤发生、发展的不同时期个体血清 microRNA 表达谱的变化规律并阐明作用机制,是将 miRNA 检测应用于恶性肿瘤个体化诊断的一个关键问题。本实验中选用的临床病例偏少,并且对患者的年龄特征、激素受体情况没有做更多的分组,有待更进一步的研究。

现在临床使用的肿瘤标志物促进了诊断的发展,但是目前的诊断技术大都具有较大的创伤性,其临床应用受到限制。而血清 microRNA 作为肿瘤诊断和预后分子标志物不仅具有创

伤小,方法准确、便捷的优势,而且还可改进疾病诊断、肿瘤分类、预后估计、疗效及复发预测的精度。血清 microRNA 作为新兴的肿瘤分子标志物在未来的肿瘤临床诊断和治疗中必将会有更好的应用前景。

参考文献

- [1] 刘新杰,麦沛成,周冬仙. 早期乳腺癌的诊断[J]. 现代诊断与治疗, 2001,12(6):378-379.
- [2] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in caenorhabditis elegans [J]. Nature, 2000,403(6772):901-906.
- [3] Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer[J]. Cancer Res, 2005,65(2):7065-7070.
- [4] Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum; a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases[J]. Cell Research, 2008,10(5):1038-1039.
- [5] Ng EK, Chong WW, Jin H, et al. Differential expression of microRNAs in plasma of colorectal cancer patients: a potential marker for colorectal cancer screening [J]. Gut, 2009, 58(2):1375-1381.
- [6] Zhu Weizhu, Qin Wenyi, Ulus A, et al. Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects [J]. BMC Research Notes, 2009,2:89-91.
- [7] Zhang B, Pan X, Cobb GP, et al. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors[J]. Dev Biol, 2007,302(4):1-12.
- [8] Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans[J]. Science, 2001,294:862-864.
- [9] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008,105:10513-10518.
- [10] Israel A, Sharan R, Ruppin E, et al. Increased microRNA activity in human cancers[J]. PLoS One, 2009,4:6045.
- [11] 许建, 武治印. 血清 microRNA 在肿瘤诊断和预后评估中的应用 [J]. 科学通报, 2010,55(2):449.
- [12] Schaeffer P, Mulcahy HE, Meyer P, et al. Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients[J]. Clin Cancer Res, 2000,6(10):3823-3826.

(收稿日期:2012-01-10)

(上接第 1568 页)

compromises the DNA damage-induced G2/M checkpoint and causes deregulated expression of the ECT2 oncogene[J]. Oncogene, 2007,26(4):509-520.

- [7] Ryu JM, Lee MY, Yun SP, et al. High glucose regulates cyclin D1/E of human mesenchymal stem cells through TGF-beta1 expression via Ca²⁺/PKC/MAPKs and PI3K/Akt/mTOR signal pathways[J]. J Cell Physiol, 2010,224(1):59-70.
- [8] Izzo JG, Wu TT, Wu X, et al. Cyclin D1 guanine/adenine 870 polymorphism with altered protein expression is associated with genomic instability and aggressive clinical biology of esophageal adenocarcinoma[J]. J Clin Oncol, 2007,25(6):698-707.
- [9] Pakakasama S, Chen TT, Frawley W, et al. CCND1 polymorphism

and age of onset of hepatoblastoma[J]. Oncogene, 2004,23(27):4789-4792.

- [10] Gautschi O, Ratschiller D, Gugger M, et al. Cyclin D1 in non-small cell lung cancer: a key driver of malignant transformation [J]. Lung Cancer, 2007,55(1):1-14.
- [11] Papadimitrakopoulou V, Izzo JG, Liu DD, et al. Cyclin D1 and cancer development in laryngeal premalignancy patients [J]. Cancer Prev Res(Phila), 2009,2(1):14-21.
- [12] Hong X, Wang S, Zhou Y, et al. Cyclin D1 gene polymorphism and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia in a Chinese population[J]. Int J Hematol, 2005,82(3):206-209.

(收稿日期:2011-12-09)