

miR-342-3p 在乳腺癌组织中的表达及意义

马 涛¹, 陆肖玮¹, 王嘉园², 丁 云¹

(¹南京医科大学附属无锡市妇幼保健院乳腺科, ²病理科, 江苏 无锡 214002)

[摘要] 目的:研究 miR-342-3p 在乳腺癌中的表达及与临床病理联系。方法:收集 2008 年 1 月~2012 年 8 月乳腺癌手术患者组织标本共 85 例,使用实时荧光定量 PCR 检测 miR-342-3p 在乳腺癌组织中的表达情况,应用免疫组化的方法检测乳腺癌组织中雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、Her-2 及 P53 的表达。结果:miRNA-342-3p 在 Lumina 型乳腺癌组织中高表达,在 Her-2 高表达型乳腺癌次之,在三阴性乳腺癌组织中表达最低,差异有统计学意义($P < 0.05$);miRNA-342-3p 的表达与不同 ER、Her-2 及 P53 的表达相关,差异有统计学意义($P < 0.05$),在不同 PR 状态、不同年龄组、有无淋巴结转移及与肿瘤大小、组织分级和病理分期间,差异无统计学意义($P > 0.05$),癌与癌旁组织间无显著性差异($P > 0.05$)。结论:miR-342-3p 在不同乳腺癌分子亚型中表达存在差异,可能成为乳腺癌尤其是三阴性乳腺癌治疗的新靶点。

[关键词] 乳腺癌;miR-342-3p;分子亚型

[中图分类号] Q786

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2013)07-907-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20130710

乳腺癌是严重威胁女性健康的疾病,占女性恶性肿瘤发病率的第 1 位。目前乳腺癌的诊断和治疗方面取得了很大的进展,如乳腺癌基因分型和靶向治疗方面的进展,大大推动了乳腺癌基础研究和对疾病的控制。根据不同分子亚型乳腺癌的个体化治疗也正成为研究热点。微小 RNA(miRNA)是一类广泛存在于真核细胞中的长约 22 个核苷酸的单链、非蛋白编码 RNA,能对基因表达进行负调控,进而调节细胞的代谢、增殖、分化和凋亡等基本生理过程及多种生物学行为。一些 miRNA 被认为与特异性乳腺癌的临床病理因素,诸如激素受体水平、Her-2 状态、肿瘤分期、脉管浸润或细胞增殖指数有关,并与乳腺癌的分子亚型相关。本研究旨在探索 miR-342-3p 在乳腺癌组织中的表达情况及与乳腺癌临床病理之间的联系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本

组织标本来自无锡市妇幼保健院乳腺科 2008 年 1 月~2012 年 8 月乳腺科乳腺癌手术患者 85 例,术前均未行放化疗。取部分肿瘤组织保存于液氮罐冷冻或低温冰箱保存,其中 25 例同时取癌旁组织(距离癌组织边缘 ≥ 1 cm),其余手术标本送病理科常规病理学检查。全部病例均为女性,单侧,均为浸

润性乳腺癌,年龄 30~82 岁;平均年龄 52.46 岁,中位年龄 48 岁。病理组织学类型均为浸润性导管癌。根据本院常规免疫组化方法检测,雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、P53 及 Her-2 的阳性表达。阳性是指免疫组化染色阳性细胞在 10%以上者。

1.1.2 主要试剂和设备

TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司。实时荧光定量 PCR 试剂购自上海闪晶分子生物科技有限公司;7300 荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取

按 TRIzol 试剂说明书提取冷冻标本中总 RNA,DEPC 处理水溶解 RNA。为增加小 RNA 得率,将异丙醇沉淀步骤改为 -20°C 沉淀 2 h 以上。检测 RNA 溶液 260 nm 及 280 nm 处的吸光度值,计算 RNA 浓度和纯度,吸光度比值 >1.8 方可用于检测。

1.2.2 应用含茎环引物的 real-time quantitative PCR (RQ-PCR)行 miR-342-3p 表达水平的检测

根据 miRNAs 序列设计引物,用 U6 RNA 作为对照。引物由上海生工公司合成。miR-342-3p 引物序列为:stem-loop 引物 5'-GCCCGTGAGCAGGCTG-GAGAAATTAACCACGCGCACGGGT-3',正义 5'-TC-TCACACAGAAATCGC-3',反义 5'-GAGCAGGCTGG-AGAA-3'; U6 引物序列为:stem-loop 引物 5'-GTC-GTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTGCACTGGATAC-

GACAAAATATGGAAC-3', 正义5'-GCTTCGGCAGC-ACATATACTAAAT-3', 反义5'-CGCTTCACGAATTT-GCGTGTTCAT-3'。取1 μg 总 RNA 以 miR-342-3p 茎环反转录引物进行反转录。为准备定量 PCR 内参模板 cDNA, 用相同的总 RNA 标本以 U6、RT 引物为反转录引物进行反转录。反转录反应体系为 1 μg 总 RNA、50 nmol/L miRNA 茎环 RT 引物 (或 U6 RT 引物)、2 U RNase inhibitor、5 U M-MLV 反转录酶、0.5 μmol/L dNTP。反应条件为:16°C, 30 min, 42°C, 30 min, 75°C, 15 min, 反应结束后-20°C保存。以 15 μl 反应体系进行 RQ-PCR。miRNA 检测反应体系包括: 1 μl RT 产物, 1xSYBR Green I Mastermix, 0.5 μmol/L miRNA 特异前向引物、0.5 μmol/L 反向引物。RQ-PCR 条件为:95°C, 10 min 后, 95°C, 15 s, 60°C, 1 min, 40 个循环。RQ-PCR 使用 7300 荧光定量 PCR 仪进行。记录每个反应管中的荧光信号到达所设定的阈值时所经历的循环数即 Ct 值。通过设置复孔取平均值, 即得到各样本中目的基因扩增的 Ct 值作为 miR-342-3p 定量判定。采用 $2^{-\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析, 目的基因 ΔCt 值=目的基因 Ct 值-同一样本参照基因 Ct 值, 重复 4 次, 取平均值。计算结果经对数转换后, miR-342-3p 的表达量符合正态分布。

1.3 统计学方法

数据采用 SPSS18.0 统计软件分析, 数据经对数转换后均采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组样本均数比较用独立样本 *t* 检验, 多组均数间比较采用单因素方差分析, 两两比较用 SNK-*q* 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

本实验显示, 所有样本中 miR-342-3p PCR 产物 cDNA 显示指数增长, 并达到平台期, 其扩增曲线为一组典型的倒 S 型曲线, 扩增效率较高。

乳腺癌组织中 miR-342-3p 的表达, 在不同年龄组、肿瘤大小、组织分级和病理分期方面, 差异无统计学意义, 但在 ER、Her-2 阳性表达和 P53 阴性表达的乳腺癌组织中高表达, 与 ER、Her-2 阴性表达和 P53 阳性表达的乳腺癌组织差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。不同 PR 状态的乳腺癌差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。乳腺癌组织与癌旁组织中 miR-342-3p 的相对表达量分别为 1.198 ± 0.375 和 1.217 ± 0.406 , 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 1)。

根据免疫组化指标, 乳腺癌可分为 3 类近似分子亚型: Lumina 型、Her-2 高表达型和三阴性型。

表 1 乳腺癌组织中 miR-342-3p 的表达与临床病理因素的关系 ($\bar{x} \pm s$)

临床病理特征	<i>n</i>	miR-342-3p 相对表达量	<i>P</i> 值
年龄(岁)			
≥48	34	1.233 ± 0.451	> 0.05
< 48	51	1.246 ± 0.428	
肿瘤大小(cm)			
> 2	40	1.251 ± 0.463	> 0.05
≤2	45	1.209 ± 0.433	
组织分级			
I ~ II	47	1.226 ± 0.503	> 0.05
III	38	1.194 ± 0.397	
淋巴结转移情况			
有	18	1.218 ± 0.385	> 0.05
无	67	1.187 ± 0.410	
病理分期			
I	30	1.246 ± 0.425	> 0.05
II	44	1.227 ± 0.416	
III	11	1.208 ± 0.374	
ER			
阳性	59	1.482 ± 0.485	< 0.05
阴性	26	1.046 ± 0.371	
PR			
阳性	57	1.325 ± 0.418	> 0.05
阴性	28	1.296 ± 0.387	
Her-2			
阳性	23	1.368 ± 0.366	< 0.05
阴性	62	1.107 ± 0.342	
P53			
阳性	58	1.095 ± 0.319	< 0.05
阴性	27	1.425 ± 0.453	
组织			
癌组织	25	1.198 ± 0.375	> 0.05
癌旁组织	25	1.217 ± 0.406	

Lumina 型包括 Lumina A 型[ER 阳性和(或)PR 阳性和 Her-2 阴性]和 Lumina B 型[ER 阳性和(或)PR 阳性和 Her-2 阳性]; Her-2 高表达型为 Her-2 阳性, ER、PR 阴性; 三阴性型为 Her-2、ER、PR 均阴性^[1]。miR-342-3p 的表达水平在 ER 阳性的 Lumina 型乳腺癌组织中高表达, 与 ER 阴性的乳腺癌 (Her-2 高表达型和三阴性) 相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Her-2 高表达型乳腺癌组织中 miR-342-3p 的表达高于三阴性乳腺癌, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 2)。

3 讨论

乳腺癌是激素相关的肿瘤, 激素受体在肿瘤的发生、发展及预后方面紧密联系。根据乳腺癌基因表

表 2 乳腺癌组织中 miR-342-3p 的表达与不同分子亚型的关系 ($\bar{x} \pm s$)

子亚型	n	miR-342-3p 相对表达量
Lumina 型	59	1.584 ± 0.534**
Her-2 高表达型	14	1.165 ± 0.407*
三阴性型	12	0.837 ± 0.351

与三阴性型比较,* $P < 0.05$;与 Her-2 高表达型比较,** $P < 0.05$ 。

达谱和分子生物学行为,可将乳腺癌分为管腔型、正常乳腺样型、Her-2 高表达型及基底细胞样型,这种分型同样适用于中国人。临床上多根据病理免疫组化情况,使用近似的病理分型,可以分为 Lumina 型乳腺癌 (Lumina A/B)、Her-2 过表达型乳腺癌和三阴性型乳腺癌。这种病理近似分型在临床的治疗中有非常重要的意义^[1]。

miRNA 能对基因表达进行负调控,进而调节细胞的代谢、增殖、分化和凋亡等基本的生理过程及多种生物学行为。miRNA 在乳腺癌的研究中越来越受到重视,乳腺癌的发生、浸润、转移和耐药与一些 miRNA 关系密切^[2]。miR-342-3p 是 23 个碱基的单链小分子 RNA, 曾被称为 miR-342, 位于染色体 14q32, 在人类多个组织中均可以检测出, 宿主基因是 EVL 基因, miR-342-3p 位于 EVL 基因的内含子中, 有多项试验证明 miR-342-3p 与宿主基因 EVL 的 mRNA 表达一致^[3-5]。miR-342-3p 在多种肿瘤中表达异常, 如多骨髓瘤^[6]、结肠癌^[3]、炎性乳腺癌^[7]等, 有研究表明 miR-342-3p 的低表达与乳腺癌的化疗耐药有关^[8-9], 并且也与内分泌治疗耐药性相关, 通过上调 miR-342-3p 的表达可以使内分泌治疗抵抗的肿瘤细胞, 转变为对内分泌治疗敏感的细胞^[4]。

本实验显示, miR-342-3p 在乳腺癌细胞中的表达具有明显的规律性, 在 ER 阳性的乳腺癌的表达高于 ER 阴性的乳腺癌, Her-2 受体过表达型乳腺癌高于三阴性型的乳腺癌。三阴性型乳腺癌中表达最低, 这与文献中报道相一致^[10]。本研究还显示, miR-342-3p 与患者年龄、肿瘤组织分级、有无淋巴结转移及病理分期无相关性, 在免疫组化指标方面, 与 ER、Her-2 正相关, 与 P53 负相关, 与 PR 无相关性。从本实验可以看出, miR-342-3p 与乳腺癌不同分子亚型相关。不同的分子亚型预后是不同的, ER 阳性的乳腺癌预后相对较好, 三阴性型的乳腺癌预后最差^[11-12]。研究显示 miR-342-3p 与 P53 负相关, 而 P53 阳性表达多预示着预后不良^[13-14]。这提示 miR-342-3p 的高表达可能与乳腺癌较好的预后相关。miR-342-3p 也与 Her-2 正相关, 因此可以推断在 Lumina

B 型乳腺癌中表达最高。由于本实验激素受体阳性的乳腺癌病例数有限, 并未将激素受体阳性的乳腺癌分成 Lumina A 型和 Lumina B 型, 有待以后进一步研究证实。癌与癌旁组织中 miR-342-3p 的表达无显著性差异, 但不同分子亚型 miR-342-3p 的表达不同, 这也提示不同乳腺癌其癌旁组织中 miR-342-3p 的表达亦不同。

三阴性型乳腺癌发病年龄轻, 既不能接受 ER、PR 阳性的内分泌治疗, 也不能接受针对 Her-2 阳性靶向治疗, 放化疗成为术后治疗的主要手段, 分子靶向治疗也成为研究的热点, 但目前尚无标准的治疗方案^[15-17]。通过改变三阴性型乳腺癌细胞中 miR-342-3p 的表达量, 可能会改变肿瘤细胞的恶性程度或化疗的敏感性。这也将是本课题组下一步要进行的课题研究。对 miR-342-3p 的深入研究, 将来可能会为乳腺癌尤其是在三阴性型乳腺癌的治疗提供新的靶点。

[参考文献]

- [1] Nguyen PL, Taghian AG, Katz MS, et al. Breast cancer subtypes approximated by estrogen receptor, progesterone and HER-2 is associated with local and distant recurrence after breast-conserving therapy [J]. Clin Oncol, 2008, 26(14):2373-2379
- [2] Rodriguez Gonzalez F, Sieuwerts AM, Smid M, et al. MicroRNA 30c expression level is an independent predictor of clinical benefit of endocrine therapy in advanced estrogen receptor positive breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2011, 127(1):43-51
- [3] Grady WM, Parkin RK, Mitchell PS, et al. Epigenetic silencing of the intronic microRNA has-miR-342 and its host gene EVL in colorectal cancer [J]. Oncogene, 2008, 27(27):3880-3888
- [4] Cittelly DM, Das PM, Spoelstra NS, et al. Downregulation of miR-342 is associated with tamoxifen resistant breast tumors [J]. Mol Cancer, 2010, 9:317
- [5] Radfar MH, Wong W, Morris Q. Computational prediction of intronic microRNA targets using host gene expression reveals novel regulatory mechanisms [J]. PLoS One, 2011, 6(6):e19312
- [6] Ronehetti D, Lionetti M, Mosca L, et al. An integrative genomic approach reveals coordinated expression of intronic miR-335, miR-342, and miR-561 with deregulated host genes in multiple myeloma [J]. BMC Med Genomics, 2008, 1:37
- [7] Van der Auwera I, Limame R, van Dam P, et al. Integrated miRNA and mRNA expression profiling of the inflam-

matory breast cancer subtype[J]. Br J Cancer,2010,103(4):532-541

[8] Chen JQ,Russo J. ER α -negative and triple negative breast cancer:molecular features and potential therapeutic approaches[J]. Biochim Biophys Acta,2009,1796(2):162-175

[9] Pogribny IP,Filkowski JN,Tryndyak VP,et al. Alterations of microRNAs and their targets are associated with acquired resistance of MCF-7 breast cancer cells to cisplatin[J]. Int J Cancer,2010,127(8):1785-1794

[10] Lowery AJ,Miller N,Devaney A,et al. MicroRNA signatures predict oestrogen receptor,progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer [J]. Breast Cancer Res,2009,11(3):R27

[11] Rakha EA,EI-Sayed ME,Green AR,et al.Prognostic markers in triple-negative breast cancer[J]. Cancer,2007,109(1):25-32

[12] Ma KK,Chau WW,Wong CH,et al. Triple negative status is a poor prognostic indicator in Chinese women with breast cancer;a ten year review[J]. Asian Pac J Cancer Prev,2012,13(5):2019-2114

[13] Kobayashi T,Iwaya K,Moriya T,et al. A simple immunohistochemical panel comprising 2 conventional markers, Ki67 and p53,is a powerful tool for predicting patient outcome in luminal-type breast cancer[J]. BMC Clin Pathol,2013,13:5

[14] Végran F,Rebucci M,Chevrier S,et al. Only mis sense mutations affecting the DNA binding domain of p53 influence outcomes in patients with breast carcinoma[J]. PLoS One,2013,8(1):e55103

[15] 袁中玉,王树森,高岩,等. 305例三阴乳腺癌患者的临床特征及预后因素分析[J]. 癌症,2008,27(6):561-565

[16] Bartsch R,Ziebermayr R,Zielinski CC,et al. Triple-negative breast cancer[J]. Wien Med Wochenschr,2010,160(7-8):174-181

[17] Freres P,Collignon J,Gennigens C,et al. "Triple negative" breast cancer [J]. Rev Med Liege,2010,65(3):120-126

[收稿日期] 2013-02-25

科技出版物中阿拉伯数字的书写规则

1. 为使多位数字便于阅读,可将数字分成组,从小数点起,向左或向右每3位分成1组,组间留空隙(约为一个汉字的1/4),不得用逗号、圆点或其他方式。
2. 纯小数必须写出小数点前用以定位的“0”。
3. 阿拉伯数字不得与除万、亿及法定计量单位词头外的汉字数字连用。如453 000 000可写成45 300万或4.53亿或4亿5 300万,但不能写成4亿5千3百万;三千元写成3 000元或0.3万元,但不能写成3千元。
4. 一个用阿拉伯数字书写的数值,包括小数与百分数,不能拆开转行。
5. 表示用阿拉伯数字书写的数值范围,使用波浪号“~”。如10%~20%, $(2\sim6)\times 10^3$ 或 $2\times 10^3\sim 6\times 10^3$,30~40 km。

(本刊编辑:接雅俐)