

## 乳腺癌组织中 microRNA-145 表达情况及预后价值

刘 晓<sup>1\*</sup>, 秦 安<sup>1</sup>, 储春强<sup>1</sup>, 张广林<sup>1</sup>, 穆会君<sup>2</sup>

<sup>1</sup>南京医科大学附属无锡市人民医院甲乳外科, <sup>2</sup>中心实验室, 江苏 无锡 214023

**[摘要]** 目的:探讨 microRNA-145(miR-145)在乳腺癌组织中表达的预后价值。方法:采用定量逆转录聚合酶链反应(quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测 60 例乳腺癌患者癌组织和邻近正常组织中 miR-145、胰岛素样生长因子 1 受体(insulin-like growth factor-1 receptor, IGF1R)mRNA、胰岛素受体底物 1(insulin receptor substrate 1, IRS-1)mRNA 水平。采用 Spearman 等级相关分析法检验 miR-145 与患者临床病理特征之间相关性,采用 Kaplan-Meier 曲线法分析乳腺癌患者无病生存期(disease-free survival, DFS),并用 Log-rank 法和 Cox 回归分析法进行检验。结果:乳腺癌组织中 miR-145 水平为  $4.15 \pm 1.37$ , 低于邻近正常组织( $5.66 \pm 1.59$ ,  $P < 0.001$ )。乳腺癌组织中 miR-145 水平与患者临床病理特征之间无相关性( $P > 0.05$ )。乳腺癌组织中 miR-145 水平与 IGF1R mRNA( $r = -0.455$ ,  $P = 0.003$ )、IRS-1 mRNA( $r = -0.357$ ,  $P = 0.005$ )水平呈负相关。Kaplan-Meier 曲线显示 miR-145 低表达组患者 DFS 低于高表达组患者( $P = 0.011$ )。单变量、多变量 Cox 回归分析显示肿瘤大小( $P = 0.015$ )、肿瘤分期( $P = 0.001$ )、人表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor 2, HER-2)( $P = 0.050$ )、miR-145( $P = 0.001$ )是独立预后因素。结论:乳腺癌组织中 miR-145 水平下调,且是乳腺癌独立的正性预后因子。

**[关键词]** 乳腺癌;microRNA 145;预后因子

**[中图分类号]** R737.9

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2018)02-239-08

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20180220

乳腺癌在我国是威胁妇女生命排名前 3 位的恶性肿瘤。胰岛素样生长因子 1 受体(insulin-like growth factor 1 receptor, IGF1R)在包括乳腺癌在内的许多癌症中起重要作用<sup>[1]</sup>。IGF1R 信号通路和雌激素受体(estrogen receptor, ER)、人表皮生长因子 2(human epidermal growth factor receptor 2, HER-2)交叉对话,这在乳腺癌内分泌治疗耐药及抗 HER-2 治疗耐药中起作用<sup>[2-3]</sup>。胰岛素受体底物 1(insulin receptor substrate-1, IRS-1)是 IGF1R 的重要下游分子,同样在乳腺癌内分泌治疗耐药及抗 HER-2 治疗耐药中起作用。

MicroRNA(miRNA)是一种含 18~25 个核苷酸的非编码 RNA,其靶点是 mRNA。它与 mRNA 3'-非翻译区靶向结合后,通过诱导降解、抑制翻译从而下调 mRNA 表达。一种 miRNA 可以靶向下调多个 mRNA,miRNA 可以调节人类 1/3 的蛋白编码基因,这提示 miRNA 可以在人类生理及病理过程中起重要作用,其中有些 miRNA 可能起到类似原癌基因或抑癌基因的作用<sup>[4]</sup>。

文献报道,miR-145 在许多癌组织中表达下调,在乳腺癌组织中的表达也比正常组织低<sup>[5]</sup>,它可以通过靶向调节 IGF1R<sup>[6]</sup>、IRS-1<sup>[7]</sup>抑制癌细胞生长,因而被认为是一种肿瘤抑制 miRNA<sup>[5]</sup>。据我们所知,只有少数研究报道乳腺癌组织中 miR-145 表达下调<sup>[5,8]</sup>,但目前尚无 miR-145 在评价乳腺癌预后的研究报道。因此,本研究拟评价 miR-145 在乳腺癌组织中表达的预后价值。

### 1 对象和方法

#### 1.1 对象

2010—2011 年在南京医科大学附属无锡市人民医院甲状腺乳腺外科接受手术的 60 例乳腺癌患者,术后根据病情接受放疗、化疗、内分泌治疗或曲妥珠治疗。收集患者原发灶癌组织和邻近正常癌旁组织新鲜标本,放置 Eppendorf 管中, -80 °C 保存。另外,收集患者临床病理数据。

#### 1.2 方法

用 TRIzol(罗氏公司,美国)提取组织中总 RNA。MiRNA 逆转录反应体系包含 2 μg 总 RNA、0.75 μL dNTP(10 mmol/L)、0.25 μL RNasin(40 U/μL)、1.2 μL miR-145 RT 引物(上海生工公司)、0.2 μL M-MLV 逆

**[基金项目]** 无锡市科技局科研项目(SCZ00N1101)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: liuxiaowuxi@126.com

转录酶(200 U/ $\mu$ L)(Promega公司,美国)、4  $\mu$ L 5 $\times$ RT缓冲液、去除RNA酶水,总体积20  $\mu$ L。反应体系放置在实时PCR仪(LightCycler 480,罗氏公司)上孵育:25  $^{\circ}$ C 30 min,42  $^{\circ}$ C 30 min,85  $^{\circ}$ C 5 min,反应产物1:5稀释。总RNA逆转录到cDNA在20  $\mu$ L反应体系中进行,包括2  $\mu$ g总RNA、1.25  $\mu$ L dNTP(10 mmol/L)、0.75  $\mu$ L RNasin(40 U/ $\mu$ L)、200 ng随机6核苷酸、1  $\mu$ L M-MLV(200 U/ $\mu$ L)(Promega)、5  $\mu$ L 5 $\times$ RT缓冲液和去除RNA酶水,放置PCR仪上37  $^{\circ}$ C 60 min、95  $^{\circ}$ C 5 min。

实时PCR在20  $\mu$ L反应体系中进行,包括2  $\mu$ L 10 $\times$ RT缓冲液、2  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L)、0.4  $\mu$ L dNTP(10 mmol/L)、1  $\mu$ L 20 $\times$ SYBR Green I、上下游引物(10  $\mu$ mol/L)各1  $\mu$ L、0.1  $\mu$ L Taq DNA聚合酶(5 U/ $\mu$ L)(Promega)、2  $\mu$ L cDNA,95  $^{\circ}$ C 2 min、变性94  $^{\circ}$ C 15 s、退火58  $^{\circ}$ C 10 s(miR-145、U6)或20 s(IGF1R、IRS-1)、延伸72  $^{\circ}$ C 10 s(miR-145、U6)或20 s(IGF1R、IRS-1),共40循环。小核RNA U6(RNU6B)做miR-145内参照、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)做IGF1R、IRS-1内参照,定量采用标准 $\Delta\Delta C_T$ 法。引物由上海生工公司合成,RT引物为5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAGGGATTC-3'(miR-145)、5'-GTCTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAAAATATGGAAC-3'(RNU6B);PCR引物为5'-GCGGGTCCAGTTTTCAG-3'(miR-145上游)、5'-CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA(miR-145下游)、5'-CTCGCTTCGGCAGCACATA-3'(RNU6B上游)、5'-GGAACGCTTCACGAATTTGC-3'(RNU6B下游)、5'-ATGCTGACCTCTGTTACCTCT-3'(IGF1R上游)、5'-GGCTTATTTCCC CACAATGTAGTT-3'(IGFR下游)、5'-GTGACACCAGAATAATGAGTCTGC-3'(IRS-1上游)、5'-AACC CATTCTCTCATGACACG-3'(IRS-1下游)。所有反应重复两次。

### 1.3 统计学方法

统计采用SPSS 16.0软件。正态性分布分析采用Kolmogorov-Smirnov检验,乳腺癌组织与邻近非癌组织中miR-145表达水平比较采用配对 $t$ 检验,miR-145表达水平与临床病理特征之间相关性分析及与IGF1R mRNA、IRS-1 mRNA表达水平之间相关性分析采用Spearman等级相关,无病生存期采用Kaplan-Meier法、生存曲线比较采用Log-rank检验,预后因素采用单变量、多变量Cox比例风险回归分

析。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 病理特征

60例乳腺癌患者平均年龄(56.8  $\pm$  10.6)岁,中位随访54.3个月(51.0~63.3个月),在55例早中期(I~III期)浸润性乳腺癌(排除3例导管原位癌及2例IV期乳腺癌)中发生了9例DFS事件(表1)。

### 2.2 乳腺癌组织中miR-145表达水平下调

60例乳腺癌患者癌组织中miR-145表达水平为4.15  $\pm$  1.37,显著低于邻近癌旁组织中的表达水平(5.66  $\pm$  1.59; $P < 0.001$ )。

### 2.3 乳腺癌组织中miR-145表达与患者临床病理特征之间相关性

乳腺癌组织中miR-145表达水平与患者年龄、病理类型、组织学分级、肿瘤大小、淋巴结状况、肿瘤分期、ER、PR状况、HER-2状况、Ki-67指数及分子亚型之间无相关性( $P > 0.05$ ,表1)。

### 2.4 乳腺癌组织中miR-145表达与IGF1R mRNA、IRS-1 mRNA表达之间的相关性

乳腺癌组织中IGF1R mRNA和IRS-1 mRNA表达水平与miR-145表达水平之间呈负相关( $r = -0.455$ , $P = 0.003$ ; $r = -0.357$ , $P = 0.005$ )。

### 2.5 乳腺癌组织中miR-145表达水平下调预示预后差

55例I~III期乳腺癌患者按miR-145表达水平的均值分为miR-145低表达( $n = 22$ )和miR-145高表达( $n = 33$ )2组,miR-145低表达组和高表达组中DFS事件分别发生7例和2例。图1中的Kaplan-Meier曲线显示miR-145低表达组DFS显著低于miR-145高表达组( $P = 0.011$ )。单变量Cox回归分析显示肿瘤大小( $P = 0.045$ )、淋巴结转移( $P = 0.043$ )、肿瘤分期晚( $P = 0.001$ )、ER阴性( $P = 0.013$ )、HER-2阳性( $P = 0.038$ )、分子亚型差( $P = 0.013$ )及miR-145低表达( $P = 0.001$ )患者预后差,而年龄( $P = 0.258$ )、组织学分级( $P = 0.996$ )、PR状况( $P = 0.079$ )、Ki-67指数( $P = 0.447$ )、IGF1R mRNA( $P = 0.778$ )、IRS-1 mRNA( $P = 0.619$ )与预后无相关性。多变量Cox回归分析显示肿瘤大小( $P = 0.015$ )、肿瘤分期( $P = 0.001$ )、HER-2状况( $P = 0.050$ )和miR-145表达( $P = 0.001$ )是独立的预后因素。

## 3 讨论

2003年miR-145被发现在人体结肠癌中表达下

表1 乳腺癌患者临床病理特征、miR-145与临床病理特征之间的相关性 (n=60)

临床病理特征	例数(%)	miR-145 表达水平	P值
年龄(岁)			0.078
< 60	32(53.3)	3.87 ± 1.28	
≥ 60	28(46.7)	4.51 ± 1.42	
病理类型			0.698
DCIS	3(5.0)	3.73 ± 0.06	
浸润性导管癌	54(90.0)	4.12 ± 1.41	
浸润性小叶癌	1(1.7)	4.63 ± 1.58	
黏液腺癌	1(1.7)	2.36 ± 0.81	
髓样癌	1(1.7)	3.40 ± 1.12	
组织学分级			0.488
I	5(8.3)	3.60 ± 0.83	
II	23(38.3)	4.10 ± 1.34	
III	32(53.3)	4.25 ± 1.45	
肿瘤大小			0.903
Tis	3(5.0)	3.73 ± 0.06	
≤2 cm	37(61.7)	4.18 ± 1.38	
> 2 cm且≤5 cm	18(30.0)	4.42 ± 1.30	
> 5 cm	2(3.3)	1.75 ± 0.07	
淋巴结状况			0.965
阴性	37(61.7)	4.29 ± 1.29	
阳性	23(38.3)	3.86 ± 1.51	
肿瘤分期			0.818
0	3(5.0)	3.73 ± 0.06	
I	24(40.0)	4.36 ± 1.09	
II	29(48.3)	4.12 ± 1.55	
III	2(3.3)	2.50 ± 0.99	
IV	2(3.3)	3.50 ± 1.70	
ER状况			0.050
阴性	17(28.3)	3.28 ± 1.44	
阳性	43(71.7)	4.39 ± 1.26	
PR状况			0.102
阴性	24(40.0)	3.78 ± 1.69	
阳性	36(60.0)	4.37 ± 1.10	
HER-2状况(原位癌除外)			0.080
阴性	37(64.9)	4.33 ± 1.30	
阳性	20(35.1)	3.76 ± 1.39	
Ki-67指数			0.914
< 14	19(31.7)	4.20 ± 1.26	
≥14	41(68.3)	4.12 ± 1.44	
分子亚型			0.843
Luminal A	17(28.3)	4.54 ± 1.10	
Luminal B	29(48.3)	4.38 ± 1.42	
HER-2过表达	8(13.3)	3.53 ± 1.64	
三阴性	6(10.0)	3.12 ± 1.12	

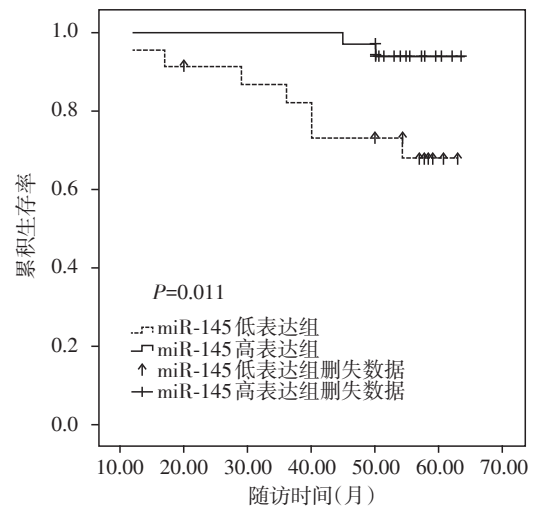


图1 miR-145高表达组、低表达组乳腺癌患者Kaplan-Meier生存曲线(n=55)

调<sup>[9]</sup>,此后,miR-145在许多癌组织中被发现,至今有多种癌基因被证实是miR-145的靶点,包括细胞增殖基因(如IRS-1、IGF-IR<sup>[6-7]</sup>、EGFR、c-Myc)、细胞侵袭基因(如MUC1、N-cadherin)、细胞分化基因(如SOX2)、血管生成基因(如VEGF)等,提示miR-145有抑制肿瘤的作用。

据报道,miR-145在正常乳腺导管和小叶的肌上皮和基底细胞室中表达,在乳腺癌组织<sup>[5,8]</sup>和导管内癌组织中<sup>[10]</sup>明显下调。本研究发现miR-145在乳腺癌组织中表达明显低于邻近癌旁性组织,证实了以前报道中的发现。

Min等<sup>[5]</sup>报道miR-145与患者肿瘤大小、淋巴结转移、ER状况、HER-2状况负相关,而与年龄、月经状况、PR状况无关。但是,Zou等<sup>[8]</sup>报道miR-145表达与ER、PR状况无关。本研究显示miR-145与这些临床病理因素之间无相关性。这些研究结果的不一致可能与患者特征不同或检测方法不同有关。

本研究中,采用Kaplan-Meier分析显示miR-145低表达患者DFS显著低于高表达患者。单变量Cox回归分析显示肿瘤直径大、淋巴结阳性、分子亚型差、miR-145低表达预示预后差,而年龄、组织学分级、PR状况、Ki-67指数、IGF1R mRNA、IRS-1 mRNA表达与预后无关。多变量Cox回归分析显示肿瘤大小(P=0.015)、肿瘤分期(P=0.001)、HER-2状况(P=0.050)、miR-145表达(P=0.001)是乳腺癌独立的预后因子。研究观察到miR-145作为IGF1R mRNA、IRS-1 mRNA的靶向调节物在乳腺癌中具有独立的预后作用。虽然本研究显示乳腺癌组织中miR-145

(下转第246页)

- [J]. *Clin Radiol*, 2015, 23(6):614-621
- [9] Minarik J, Krhovska P, Hrbek J, et al. Prospective comparison of conventional radiography, low-dose computed tomography and magnetic resonance imaging in monoclonal gammopathies [J]. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2016, 160(2):305-309
- [10] Dimopoulos M A, Hillengass J, Usmani S, et al. Role of magnetic resonance imaging in the management of patients with multiple myeloma: A consensus statement [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(6):657-664
- [11] 王攀峰, 李永超, 徐 杨, 等. 全身弥散加权成像(WB-DWI)在初诊多发性骨髓瘤患者中的诊断和监测作用 [J]. *中华血液学杂志*, 2017, 38(2):129-133
- [12] Messiou C, Kaiser M. Whole body diffusion weighted MRI-a new view of myeloma [J]. *Br J Haematol*, 2015, 171(1):29-37
- [13] Pans S, Goosens V. Assessing progressive disease in myeloma patients with whole-body diffusion-weighted imaging at 3.0 T: a prospective imaging study comparing whole body T1 -WI, T2 -STIR -WI and laboratory findings [J]. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, 2015. 15: e108-e116
- [14] Weininger M, Lauterbach B, Knop S, et al. Whole-body MRI of multiple myeloma: comparison of different MRI sequences in assessment of different growth patterns [J]. *Eur J Radiol*, 2009, 69(2):339-345
- [15] Attariwala R, Picker W. Whole body MRI: improved lesion detection and characterization with diffusion weighted techniques [J]. *Magn Reson imaging*, 2013. 38: 253-268
- [收稿日期] 2017-06-03

(上接第241页)

与IGF1R mRNA、IRS-1 mRNA的表达负相关,但它们的预后价值不一致,这提示miR-145的预后价值不依赖它的靶点IGF1R mRNA、IRS-1 mRNA。可能的解释是miR-145有许多靶mRNA组成一个复杂的调节网,它们相互协调从而促成了miR-145在乳腺癌中的预后作用。本研究首次显示,miR-145是乳腺癌独立的正性预后因子。本研究尚存在缺陷和局限性,在于回顾性研究以及样本量较小。

本研究结果提示miR-145在乳腺癌组织中下调。另外,首次显示miR-145是乳腺癌独立的正性预后因子,但它与乳腺癌患者的临床病理特征没有显著相关性。

[参考文献]

- [1] Motalebnezhad M, Aghebati-Maleki L, Jadidi-Niaragh F, et al. The insulin-like growth factor-I receptor(IGF-IR) in breast cancer: biology and treatment strategies [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(9):11711-11721
- [2] Voudouri K, Berdiaki A, Tzardi M, et al. Insulin-like growth factor and epidermal growth factor signaling in breast cancer cell growth: focus on endocrine resistant disease [J]. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2015, 2015:975495
- [3] Luque-Cabal M, García-Tejido P, Fernández-Pérez Y, et al. Mechanisms behind the resistance to trastuzumab in HER2-amplified breast cancer and strategies to overcome it [J]. *Clin Med Insights Oncol*, 2016, 10(S1):21-30

- [4] Kwan JY, Psarianos P, Bruce JP, et al. The complexity of microRNAs in human cancer [J]. *J Radiat Res*, 2016, 57 (Suppl 1):i106-i111
- [5] Min W, Wang B, Li J, et al. The expression and significance of five types of miRNAs in breast cancer [J]. *Med Sci Monit Basic Res*, 2014, 20(1):97-104
- [6] Zhu Z, Xu T, Wang L, et al. MicroRNA-145 directly targets the insulin-like growth factor receptor I in human bladder cancer cells [J]. *FEBS Lett*, 2014, 588 (17):3180-3185
- [7] Li Y, Huang Q, Shi X, et al. MicroRNA 145 may play an important role in uveal melanoma cell growth by potentially targeting insulin receptor substrate-1 [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2014, 127(8):1410-1416
- [8] Zou C, Xu Q, Mao F, et al. MiR-145 inhibits tumor angiogenesis and growth by N-RAS and VEGF [J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(11):2137-2145
- [9] Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, et al. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia [J]. *Mol Cancer Res*, 2003, 1 (12):882-891
- [10] Li S, Meng H, Zhou F, et al. MicroRNA-132 is frequently down-regulated in ductal carcinoma in situ (DCIS) of breast and acts as a tumor suppressor by inhibiting cell proliferation [J]. *Pathol Res Pract*, 2013, 209(3):179-183

[收稿日期] 2017-03-23