

## 乳腺癌患者血浆 miR221 表达及其对临床分期和耐药性的监测作用

卫淑芳, 李歌妹\*

(平顶山市妇幼保健院妇产科, 河南 平顶山 467002)

**[摘要]** 目的:探讨乳腺癌患者血浆 miR221 表达及其临床意义。方法:采用实时荧光定量 PCR 法检测 56 例乳腺癌患者癌及癌旁组织 miR-221 的表达,并进一步检测 56 例乳腺癌患者和 20 例正常人血浆 miR-221 的表达;结合临床资料用 *t* 检验、多因素 Logistic 回归等方法分析血浆 miR-221 表达及其临床意义。结果:miR-221 在乳腺癌患者治疗前血浆中的表达 ( $8.19 \pm 2.97$ ) 高于正常人血浆 ( $3.75 \pm 0.67$ ), 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 乳腺癌患者癌组织 miR-221 表达与治疗前血浆中 miR-221 表达呈正相关 ( $r=0.832, P < 0.001$ ); 患者治疗前血浆 miR-221 表达与淋巴结转移和临床分期呈正相关; 患者化疗后血浆 miR-221 表达与耐药性呈正相关。结论:miR-221 在乳腺癌患者血浆中表达水平明显上调, 能够反映乳腺癌组织 miR-221 的表达水平, 其或可成为监测乳腺癌患者临床分期及耐药性的一个潜在指标。

**[关键词]** miR-221; 乳腺癌; 血浆; 分期; 耐药

**[中图分类号]** R737.9

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)04-479-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20160421

## Analysis of plasma miR-221 expression in patients with breast cancer and its monitoring role for clinical stages and drug resistance

Wei Shufang, Li Gemei\*

(Department of Obstetrics and Gynecology, Pingdingshan Maternal and Child Hospital, Pingdingshan 467002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression and clinical significance of plasma miR-221 in patients with breast cancer. **Methods:** The expressions of plasma miR-221 in 20 cases of healthy volunteers and 56 patients with breast cancer were detected by real-time RT-PCR as well as miR-221 expression in 56 breast cancer and their matched non-tumor adjacent tissues; The relationship between plasma miR-221 expression and clinicopathological characteristics and drug resistance were further analyzed using statistical methods, including independent-samples *t* test, multiple logistic regression analysis. **Results:** The expression of plasma miR-221 in patients with breast cancer was significantly higher than that of the healthy volunteers ( $P < 0.05$ ); The expression of plasma miR-221 in patients with breast cancer was positively correlated with miR-221 expression in breast cancer tissues ( $r=0.832, P < 0.001$ ); Before the therapy, the expression of plasma miR-221 in breast cancer patients was positively correlated with lymph nodes metastasis and clinical stages, while it was positively correlated with drug resistance only after chemotherapy. **Conclusion:** MiR-221 highly expressed in plasma of patients with breast cancer reflecting the expression level of miR-221 in breast cancer tissues. The expression of miR-221 in plasma could be used as one of the indicators for clinical stages and the drug resistance.

**[Key words]** miR-221; breast cancer; plasma; clinical stages; drug resistance

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(04):479-482, 507]

微小核糖核酸(microRNA, miRNA)是一类由内源基因编码的长度约为 22 个核苷酸, 定位在 RNA 前体 3' 端或 5' 端的非编码单链 RNA 分子。miRNA 可参

与细胞增殖、细胞凋亡、细胞代谢、胚胎发育等一系列重要过程<sup>[1-2]</sup>。近年来也发现, miRNA 可作为肿瘤抑制或促进因子参与肿瘤的发生<sup>[3]</sup>。血浆里同样可以检测到 miRNA, 其来源于肿瘤组织, 受内源性 RNA 酶的保护<sup>[4]</sup>。目前在淋巴瘤、前列腺癌、胃癌、结直肠癌患者血浆中检测到肿瘤相关的 miRNA, 而且

**[基金项目]** 河南省科技攻关计划项目(132102310385)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: 695726898@qq.com

miRNA 具有较强的稳定性和特异性。miR221 是成簇分布的 miRNA, 它参与了甲状腺癌<sup>[5]</sup>、肝癌<sup>[6]</sup>、前列腺癌<sup>[7]</sup>等肿瘤的发生。抑癌基因 p27, 凋亡因子 Bim、Bmf<sup>[8]</sup> 等均是 miR221 的靶基因。目前关于 miR221 在乳腺癌中的研究表明 miR221 在乳腺癌组织中呈高表达, 但关于乳腺癌患者血液中 miR-221 的表达鲜有报道, 本实验通过 RT-PCR 检测 20 例正常人血浆和 56 例乳腺癌患者癌组织、相对应的癌旁组织及血浆中 miR-221 的表达, 进一步分析血浆中 miR-221 的表达与患者临床病理参数和新辅助化疗耐药性的关系, 探讨监测血浆中 miR-221 表达的临床意义。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

选择本院 2014 年 6 月—2015 年 3 月肿瘤外科住院手术治疗的乳腺癌患者 56 例。年龄 30~68 岁, 平均年龄(55.4 ± 1.5)岁。乳腺癌组织标本取自病灶中央无坏死部分, 另取距肿瘤边缘约 5 cm 的癌旁非肿瘤乳腺组织, 离体后切成米粒大小, 20 min 内液氮保存。乳腺癌血液标本在患者入院接受治疗前取 1 次, 化疗后取 1 次, 每次 5 mL。血液标本取完后迅速离心 3 000 r/min, 10 min。收集上清液保存于 -80℃ 低温保存箱, 以备后续检测。乳腺癌的诊断及常规病理资料由病理科医生盲法阅片后提供。20 例正常人志愿者血浆标本选自本院 2014 年 10 月—2015 年 3 月体检者。本研究经医院伦理委员会批准, 所有被纳入本研究者均签署知情同意书。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 组织 RNA 抽提

按 TRIzol 试剂(Invitrogen 公司, 美国)说明书抽提样品总 RNA, 为增加小 RNA 得率, 异丙醇沉淀步骤改为 -20℃ 沉淀 1 h 以上。DEPC 处理水溶解 RNA, 分光光度计测定 260 nm 及 280 nm 吸光值, 确定 RNA 溶液浓度和纯度。取 2~5 μg 总 RNA 以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

#### 1.2.2 血浆 RNA 抽提

将低温保存的血浆标本, 置于冰上融化, 且充分混匀后取 500 μL 血浆标本加入 500 μL TRIzol, 后续步骤参照 TRIzol 试剂说明书抽提样品总 RNA。

#### 1.2.3 实时荧光定量 PCR 分析 miR-221 的表达

将上述血浆及组织中提取的 RNA 进行逆转录和实时荧光定量 PCR 检测。逆转录反应程序为 16℃ 30 min, 42℃ 30 min, 75℃ 15 min。结束后立即将

cDNA 产物取出, 快速置于冰上冷却, 后续所有步骤均在冰上进行。将 cDNA 产物稀释 5 倍后进行荧光定量 PCR。反应体系参照实时荧光定量 PCR 试剂盒(Invitrogen 公司, 美国)说明书。PCR 反应程序: 95℃ 预变性 3 min; 95℃ 变性 12 s, 62℃ 延伸 1 min, 共 40 个循环; 95℃ 终延伸 15 s。反应结束后确认 real-time PCR 的扩增曲线和熔解曲线, 进行 PCR 定量时制作标准曲线等。3 次独立实验后, miR-221 的表达量用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示<sup>[9]</sup>:  $\Delta\Delta Ct = (\text{待测样品目的基因 Ct 的平均值} - \text{待测样本管家基因 Ct 的平均值}) / (\text{空白对照样品的目的基因的 Ct 的平均值} - \text{空白对照样本管家基因 Ct 的平均值})$ 。以 let-7a 作为管家基因, 实验所用引物参考文献<sup>[10]</sup>: 上游 5'-CGAGCTACATTGCTCTGCTGGGT-3'; 下游 5'-GTGCAGGCTCCGAGGT-3'。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS16.0 统计学软件进行数据分析。患者血液及组织标本中 miR-221 的差异表达采用 *t* 检验分析, 以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示; miR-221 的表达与各临床病理参数之间的关系使用 *t* 检验和多元 Logistic 回归分析; 以  $\alpha = 0.05$  为检验水准。

## 2 结果

### 2.1 乳腺癌患者治疗前血浆和癌组织中 miR-221 的表达及相关性

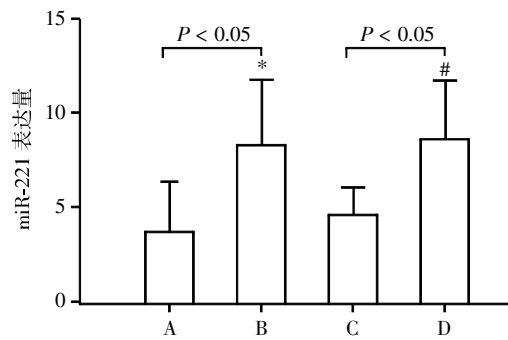
乳腺癌组织 miR-221 的表达(8.57 ± 2.45)高于癌旁组织(4.64 ± 0.36); 血浆 miR-221 在患者治疗前的表达(8.19 ± 2.97)高于正常人(3.75 ± 0.67), 差异有统计学意义(均  $P < 0.05$ , 图 1)。患者治疗前血浆 miR-221 表达 ROC 曲线面积为 0.826(95% CI: 0.722~0.930, 图 2)。经相关性分析发现, 治疗前癌组织 miR-221 表达与血浆 miR-221 表达呈正相关( $r = 0.832, P < 0.001$ )。

### 2.2 乳腺癌患者治疗前与化疗后血浆 miR-221 表达比较

乳腺癌患者化疗后血浆 miR-221 平均表达水平为(5.36 ± 2.01), 低于治疗前(8.19 ± 2.97), 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 2.3 乳腺癌患者血浆 miR-221 表达与临床病理参数的关系

用 *t* 检验分析血浆 miR-221 表达与患者的年龄、肿瘤大小、分级、淋巴结转移及分期的关系, 结果显示: 患者治疗前 miR-221 表达与患者的年龄、肿瘤大小、分级和耐药性无关( $P$  均  $> 0.05$ , 表 1), 与淋巴结转移、分期有关; 患者化疗后 miR-221 表



A: 正常人血浆; B: 乳腺癌治疗前血浆; C: 癌旁组织; D: 乳腺癌组织。

图 1 miR-221 在正常人血浆和乳腺癌患者治疗前血浆、癌组织及癌旁组织中的表达

Figure 1 Expressions of miR-221 in plasma of healthy control, plasma of tumors before treatment, tumor tissues and their matched non-tumor adjacent tissues

达只与患者的耐药性有关( $P < 0.05$ , 表 1)。进一步经多因素回归分析, 患者治疗前血浆 miR-221 表达与淋巴结转移、分期呈正相关; 患者化疗后血浆 miR-221 表达只与耐药性呈正相关(表 2)。

### 3 讨论

miRNA 在人类恶性肿瘤的发生、发展过程中起着重要作用, 根据其在肿瘤表达水平的不同可将其

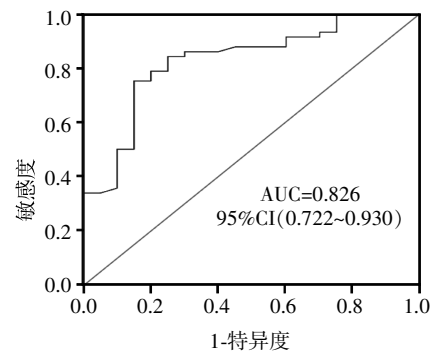


图 2 乳腺癌患者治疗前血浆中 miR-221 表达 ROC 曲线面积  
Figure 2 ROC curves of plasma miR-221 in patients with breast cancer before treatment

分为两型。一型 miRNA 可下调癌基因发挥抑癌作用, 另一型 miRNA 作为癌基因促进肿瘤的进展和转移<sup>[11-12]</sup>。近年来 miRNA 与乳腺癌之间的关系逐渐成为研究热点。2005 年, Iorio 等<sup>[13]</sup>用微阵列芯片从乳腺癌组织中筛选出特异表达的 miRNA, 发现其中 29 条 miRNA 表达失调; 2007 年 Sempere 等<sup>[14]</sup>用原位杂交技术也发现 miRNA 在乳腺癌中表达的异常; Zhu 等<sup>[15]</sup>报道了乳腺癌患者血清中 miR-155 的表达与孕激素受体(progesterone receptor, PR)有关, 同时 Wang 等<sup>[16]</sup>利用荧光定量技术也发现 miR-21、miR-106、miR-155 在乳腺组织和血清中显著高表达。

近些年有关 miR-221 的研究不断增多。有报

表 1 乳腺癌患者血浆 miR-221 表达与临床病理参数的关系

Table 1 Correlation between plasma miR-221 and clinical pathological parameters in patients with breast cancer

临床病理参数	例数	治疗前			化疗后		
		血浆 miR-221 表达	t/F 值	P 值	血浆 miR-221 表达	t/F 值	P 值
年龄(岁)			0.65	0.51		1.15	0.11
<55	29	7.78 ± 1.23			4.77 ± 0.72		
≥55	27	8.89 ± 3.14			6.04 ± 1.32		
肿块大小(cm)			0.87	0.08		0.98	0.38
<2	26	6.03 ± 2.44			3.44 ± 0.82		
2~5	19	7.97 ± 1.52			5.33 ± 1.02		
>5	10	8.79 ± 3.02			7.09 ± 1.22		
淋巴结转移			2.76	0.02		1.22	0.26
无转移	35	4.85 ± 1.02			3.53 ± 1.12		
有转移	21	9.83 ± 2.12			6.23 ± 0.52		
组织学分级			1.14	0.08		0.74	0.42
I	23	6.88 ± 3.97			3.36 ± 1.01		
II	25	7.36 ± 2.16			4.66 ± 0.98		
III	8	8.69 ± 4.21			6.26 ± 1.28		
临床分期			2.59	0.03		1.39	0.31
I + II	14	5.17 ± 2.36			5.41 ± 2.31		
III + IV	42	9.24 ± 3.91			4.01 ± 1.06		
耐药性			1.21	0.44		2.41	0.02
耐药	21	8.53 ± 2.38			7.96 ± 1.51		
敏感	35	8.02 ± 1.88			3.81 ± 1.37		

表 2 乳腺癌患者血浆 miR-221 表达与临床病理参数的多元 Logistic 回归分析

Table 2 Logistic regression analysis of plasma miR-221 and clinical pathological parameters in breast cancer patients

变量	治疗前血浆				化疗后血浆			
	β	SE	P 值	OR	β	SE	P 值	OR
淋巴结转移	0.879	0.397	0.045	1.253	-	-	-	-
分期	1.765	0.224	0.015	4.842	-	-	-	-
耐药性	-	-	-	-	1.533	0.312	0.027	1.931

道,miR-221 可影响多种肿瘤的信号通路<sup>[17]</sup>;在前列腺癌、甲状腺癌等肿瘤组织中 miR-221 高表达的患者预后较差<sup>[5,7]</sup>。但是,关于 miR-221 在乳腺癌患者血液中的表达及其与肿瘤耐药关系鲜有报道。本研究通过 RT-PCR 检测 20 例正常人血浆,56 例乳腺癌患者癌组织和相对应的癌旁组织及血浆中 miR-221 的表达,进一步分析血浆 miR-221 表达与患者临床病理参数和新辅助化疗耐药性的关系,探讨血浆 miR-221 表达对乳腺癌患者治疗及耐药的监测作用。

研究结果显示,miR-221 在乳腺癌患者肿瘤组织中的相对表达量高于癌旁组织( $P < 0.05$ ),此结果与许践刚等<sup>[18]</sup>研究结果相符。提示 miR-221 在乳腺癌组织中高表达。患者治疗前血浆 miR-221 的表达高于正常人( $P < 0.05$ ),同时治疗前血浆 miR-221 的表达与乳腺癌组织中 miR-221 的表达呈正相关( $r = 0.832, P < 0.001$ )。由此推测,血浆 miR-221 表达水平可能会间接反映出乳腺癌组织中 miR-221 的表达水平。进一步统计学分析显示,治疗前血浆中 miR-221 表达的 ROC 曲线下面积为 0.826 (95% CI: 0.722~0.930),提示血浆中 miR-221 表达或可成为区分乳腺癌患者和正常人的一个潜在指标。在对 56 例患者治疗前和化疗后血浆 miR-221 表达检测分析后发现,乳腺癌患者化疗后血浆 miR-221 表达水平明显比治疗前降低( $P < 0.05$ ),此结果提示,患者化疗后血浆 miR-221 表达水平降低。

本研究同时分析了乳腺癌患者血浆 miR-221 表达与临床病理参数的关系,结果显示患者治疗前血浆 miR-221 表达与患者的年龄、肿瘤大小、分级和耐药无关(均  $P > 0.05$ ),而与淋巴结转移和分期有关(均  $P < 0.05$ );化疗后 miR-221 表达只与患者的耐药有关( $P < 0.05$ )。这一结果提示,患者在治疗前后血浆 miR-221 表达水平可能会随着乳腺癌的分期及耐药性的不同而有差别。进一步经多因素回归分析发现:患者治疗前血浆 miR-221 表达与淋巴结转移、分期、耐药呈正相关;患者化疗后血浆 miR-

221 表达与分期和耐药呈正相关。由于耐药是导致肿瘤患者化疗失败的主要原因,而本研究结果显示血浆 miR-221 表达与分期和耐药呈正相关,因此血浆 miR-221 表达或可成为监测患者分期及耐药性的一个潜在指标,不过还需在更大样本量上进一步验证。

综合以上讨论分析,miR-221 在乳腺癌患者血浆中表达水平明显上调,能够反映乳腺癌组织 miR-221 的表达水平,其或可成为监测乳腺癌患者临床分期及耐药的一个潜在指标。

[参考文献]

- [1] Plasterk RH. Micro RNAs in animal development[J]. Cell, 2006, 124(5):877-881
- [2] Poy MN, Spranger M, Stoffel M. microRNAs and the regulation of glucose and lipid metabolism[J]. Diabetes Obes Metab, 2007, 9(Suppl 2):67-73
- [3] Zhang BH, Pan XP, Cobb GP, et al. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors[J]. Dev Biol, 2007, 302(1): 1-12
- [4] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(30): 10513-10518
- [5] Visone R, Russo L, Pallante P, et al. MicroRNAs (miR)-221 and miR-222, both overexpressed in human thyroid papillary carcinomas, regulate p27Kip1 protein levels and cell cycle[J]. Endocr Relat Cancer, 2007, 14(3):791-798
- [6] Fornari F, Gramantieri L, Ferracin M, et al. MiR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma[J]. Oncogene, 2008, 27(43): 5651-5661
- [7] Galardi S, Mercatelli N, Giorda E, et al. miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27kip1[J]. J Biol Chem, 2007, 282(32):23716-23724
- [8] Gramantieri L, Fornari F, Ferracin M, et al. MicroRNA-221 targets Bmf in hepatocellular carcinoma and correlates with tumor multifocality [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(16):5073-5081
- [9] 王伟, 孙凯, 吴承堂, 等. 特异性 miR-221 抑制剂对结肠癌细胞增殖及凋亡的影响[J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(4):674-677
- [10] Pu XX, Huang GL, Guo HQ, et al. Circulating miR-221 directly amplified from plasma is a potential diagnostic and prognostic marker of colorectal cancer and is correlated with p53 expression[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2010, 25