

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.34.007

文章编号: 1005-8982 (2018) 34-0032-05

新进展研究·论著

MicroRNA-9 和 microRNA-210 检测联合 彩色多普勒超声诊断乳腺癌的价值*

徐静¹, 努尔兰·吐尔逊², 王士光¹, 王萍³, 谢芳¹

[1. 四川省人民医院东院 超声科, 成都 610101; 2. 新疆医科大学第三临床医院
(附属肿瘤医院) 影像中心, 新疆 乌鲁木齐 830011; 3. 川北医学院附属医院
超声科, 四川 南充 637000]

摘要: 目的 探讨 microRNA-9 (miR-9) 和 microRNA-210 (miR-210) 检测联合彩色多普勒超声诊断乳腺癌的价值。**方法** 选取 2015 年 3 月至 2018 年 3 月四川省人民医院东院乳腺外科收治的乳腺癌患者 175 例 (乳腺癌组) 和乳腺良性病变患者 162 例 (良性病变组)。以是否患有乳腺癌为因变量, 采用 Logistic 回归分析影响乳腺癌患病的影响因素; 以术后病理检查结果作为金标准比较彩色多普勒超声, miR-9、miR-210 检测及联合诊断乳腺癌的准确性。**结果** 乳腺癌发病的危险因素包括乳腺癌家族史、月经规律与否、人表皮生长因子受体 2 (HER2) 表达、miR-9 表达和 miR-210 表达 ($P < 0.05$); 彩色多普勒超声诊断乳腺癌的敏感性为 83.43%, 特异性为 69.14%。miR-9 检测诊断乳腺癌的曲线下面积 (AUC) 为 0.753, miR-210 的 AUC 为 0.747。彩色多普勒超声联合 miR-9、miR-210 检测诊断为乳腺癌 AUC 为 0.934, 敏感性为 89.78%, 特异性为 85.12%。**结论** 彩色多普勒超声联合血清 miR-9、miR-210 检测可以较好地诊断乳腺癌, 为临床早期诊断、筛查乳腺癌提供参考。

关键词: 乳腺肿瘤; 超声检查, 多普勒, 彩色; microRNAs; 诊断

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

Value of miRNA-9 and miRNA-210 combined with color Doppler ultrasonography in diagnosis of breast cancer*

Jing Xu¹, Nuerlan·Tuerxun², Shi-guang Wang¹, Ping Wang³, Fang Xie¹

[1. Department of Ultrasonography, Eastern Hospital of Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610101, China; 2. Imaging Center, Third Hospital of Xinjiang Medical University (Affiliated Tumor Hospital), Urumqi, Xinjiang 830011, China; 3. Department of Ultrasonography, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China]

Abstract: Objective To explore the value of miRNA-9 and miRNA-210 combined with Doppler ultrasonography in the diagnosis of breast cancer. **Methods** A total of 175 patients with breast cancer (breast cancer group) and 162 patients with benign breast diseases (benign disease group) were enrolled in Eastern Hospital of Sichuan Provincial People's Hospital from March 2015 to March 2018. Using breast cancer as the dependent variable, logistic regression analysis was used to analyze the influencing factors of breast cancer prevalence. Postoperative pathological examination was used as the gold standard to explore the value of color Doppler ultrasonography, miRNA-9 and miRNA-210 in the diagnosis of breast cancer. **Results** The risk factors of breast cancer included family history of breast cancer, regular menstruation, and the expression levels of human epidermal growth factor receptor 2, miRNA-9 and miRNA-210 ($P < 0.05$). Color Doppler ultrasonographic diagnosis had a sensitivity of

收稿日期: 2018-05-23

* 基金项目: 四川省卫生计生委课题 (No: 16PJ462)

83.43% and a specificity of 69.14% in the diagnosis of breast cancer. The AUC of miRNA-9 in the diagnosis of breast cancer was 0.753, and the AUC of miRNA-210 was 0.747. The AUC of color Doppler ultrasonogram combined with miRNA-9 and miRNA-210 in the diagnosis of breast cancer was 0.934, the sensitivity was 89.78%, and the specificity was 85.12%. **Conclusions** Color Doppler ultrasonography combined with serum miRNA-9 and miRNA-210 can be used to diagnose breast cancer and provide a new direction for early non-invasive diagnosis of breast cancer.

Keywords: breast neoplasms; ultrasonography, Doppler, color; microRNA; diagnosis

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一。超声是最常用的影像学诊断方法之一,目前多应用美国放射学会超声乳腺影像报告和数据系统(BI-RADS)给乳腺肿块进行评分,但该系统分级所涉及的项目仍主要依赖医生的主观经验^[1-2]。肿瘤标志物的检测客观性较好,其中人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 的蛋白表达与基因扩增状态已成为乳腺癌选择临床治疗方案与判断预后的重要标准^[3-4],但其单项检测的敏感性有限,漏诊率大。因此探索更具特异性和敏感性的早期诊断方法具有重要的临床应用价值。近年来,微 RNA (microRNA, miRNA) 在癌症的发生、转移和增殖中的作用得到了进一步地探索,SUN 等^[5] 研究显示 miR-9 在肝细胞癌、乳腺癌等中表达显著升高。TOYAMA 等^[6] 研究表明,miR-210 的高表达是日本三重阴性乳腺癌患者预后不良的独立因素。杨浚沅等^[7] 研究显示,miRNA 联合诊断乳腺癌比 HER2 等单一指标诊断具有更大的优势。但尚未有研究表明 miRNA 检测与影像学手段联合是否具有更高的诊断价值。因此,本研究利用 miR-9、miR-210 和彩色多普勒超声对乳腺癌进行联合诊断,旨在为临床早期诊断、筛查乳腺癌提供参考。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2015 年 3 月至 2018 年 3 月四川省人民医院东院乳腺外科收治的患者。均经该院病理科术后病理确诊。确诊为乳腺恶性肿瘤的患者 175 例(乳腺癌组),其中,浸润性癌 168 例(浸润性导管癌 165 例、浸润性小叶癌 3 例)、导管内癌 7 例;平均年龄(51.01 ± 7.18)岁;均为女性。确诊为乳腺良性病变的患者 162 例(良性病变组),其中,乳腺上皮增生 94 例(腺病 86 例、乳腺小叶增生 4 例、乳腺上皮不典型增生 4 例)、上皮良性肿瘤 62 例(单纯纤维腺瘤 45 例、导管内乳头状瘤 17 例)、脂肪瘤 5 例、感染性肉芽肿 1 例;平均年龄(50.80 ± 6.91)岁;均为女性。纳入标准:①患

者术后病理诊断明确;②所有患者术前均未接受化疗;③精神状态良好,生命体征平稳,能配合研究者。排除标准:合并其他恶性肿瘤、严重心脑血管疾病、肾功能不全及内分泌失调疾病等。本研究获该院伦理委员会批准,所有患者均已签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂

德国 GE LOGIQ E9 彩色多普勒超声诊断仪,离心机购自美国 Sigma 公司,PCR 仪购自美国 BIO-RAD 公司。miRNeasy Mini Kit 试剂盒(德国 QIAGEN 公司),All-in-One miRNA qRT-PCR Detection Kit 试剂盒(美国 GeneCopoeia 公司),ELISA 定量试剂盒(美国 Bender 公司)。

1.3 研究方法

1.3.1 超声检查 使用 GE LOGIQ E9 彩色多普勒超声诊断仪,ML6-15 探头,频率为 6~15 MHz。患者取仰卧位,充分暴露双侧乳腺、腋窝及锁骨上窝,常规超声扫描,探头分别做纵向、斜向、横向及多方位扫查,观察各乳腺病灶的形状、走行、边缘、回声、周围组织、钙化、病变内血管血流的阻力指数(resistance index, RI)等征像并记录。根据上述情况,参照 BI-RADS 分级诊断标准进行分级评价^[8-9]:0 级,资料不完善,需结合其他检查进行诊断;1 级,未见明显异常;2 级,良性改变,建议定期随访;3 级,良性病变可能,建议短期随访;4 级,可疑恶性病变(恶性概率 3%~94%),建议活检以确诊;5 级,高度可疑恶性病变(恶性概率 >95%);6 级,病理已确诊为恶性。因此,在本研究中,认为 1~3 级为良性改变,4~5 级为恶性病变。**1.3.2 miR-9、miR-210 检测** 采集患者手术前空腹静脉血液标本 5 ml,加入促凝管,4℃条件下 4 000 r/min 离心 10 min,再置于 4℃条件下 12 000 r/min 离心 15 min,分离血清。分离后的血清暂时放至 -80℃冰箱冷冻保存。取 100~200 μl 血清,按照 miRNeasy Mini Kit 试剂盒说明书提取血清总 RNA。然后按照 All-in-One miRNA qRT-PCR Detection Kit 试剂盒说明

书进行 RNA 逆转录, 并 qRT-PCR 检测血清 miR-9、miR-210 浓度, 表达水平的对比以 U6B 浓度作为内参对照。

1.3.3 HER2 检测 采集患者手术前空腹静脉血样, 3 500 r/min 离心 5 min, 取上清。按照 ELISA 定量试剂盒说明书操作, 1 : 20 稀释待检血清, 配置标准曲线, 室温摇育 2 h。酶标仪读取光密度 (OD) 值, 绘制标准曲线, 得出每个样品浓度, 血清 HER2 > 15 ng/ml 为阳性, ≤ 15 ng/ml 为阴性。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 和 Medcalc 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 *t* 检验, 计数资料使用例数表示, 采用 χ^2 检验。比较采用 Logistic 回归进行乳腺癌的影响因素分析, 建立受试者工作特征曲线 (ROC) 分析潜在指标诊断乳腺癌的准确性, 利用 Logistic 回归建立彩色多普勒超声与 miR-9、miR-210 检测联合诊断模型。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者一般资料比较

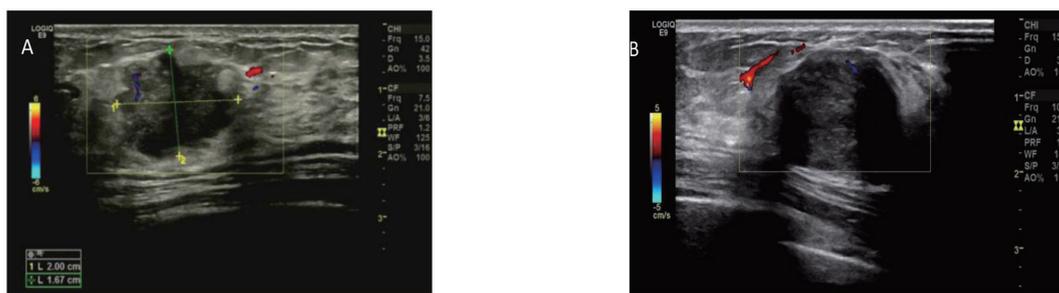
两组均可触及无痛性肿块 (共 310 例, 占 91.98%), 多位于外上象限 (共 154 例, 占 45.69%), 肿块质地多较硬, 也可为囊性或有柔韧感; 肿块较为固定, 活动度小。乳腺癌组患者可有乳头湿疹样改变,

回缩固定 (乳腺癌组 32 例, 占 19.75%); 乳房皮肤橘皮样改变 (乳腺癌组 21 例, 占 12.96%) 等。超声结果示: 乳腺癌组肿块边界不清, 呈锯齿状或虫蚀样向周围组织浸润, 肿块边缘有厚薄不均的强回声晕环; 肿块内部为弱回声或低回声, 有小钙化或液化, 内部和周边可探及丰富血流信号 (见图 1A)。良性病变组肿块边界相对清晰, 肿块内回声较为均匀, 内部和周边多无丰富血流信号 (见图 1B)。

乳腺癌家族史、月经周期不规律、BI-RADS 分级恶性、HER2 阳性在乳腺癌组中所占比例大于在良性病变组中的比例, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。RI 值、miR-9、miR-210 表达水平在乳腺癌组中均高于良性病变组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。年龄在两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 乳腺癌的危险因素

以患者是否患乳腺癌为因变量, 进一步分析患者乳腺癌家族史、月经周期不规律、BI-RADS 分级恶性、RI 值、HER2 及 miR-9、miR-210 表达水平对乳腺癌准确诊断的影响程度, 多因素 Logistic 分析结果显示: 乳腺癌家族史、月经周期不规律、BI-RADS 分级恶性、HER2 及 miR-9、miR-210 表达水平对乳腺癌发生有影响, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 分析各因素对乳腺癌准确诊断的影响程度, BI-RADS 分级的影响程度最高 ($OR=5.702$), 其次为 HER2 阳性 ($OR=4.371$)。见表 2。



A 乳腺恶性肿瘤

B 乳腺良性肿瘤

图 1 乳腺良恶性肿瘤的多普勒超声声像图

表 1 两组患者一般资料比较

组别	<i>n</i>	年龄 / (岁, $\bar{x} \pm s$)	乳腺癌家族史 (无 / 有) / 例	月经周期规律 (是 / 否) / 例	BI-RADS 分级 (良性 / 恶性) / 例	RI / ($\bar{x} \pm s$)	HER2 (阴性 / 阳性) / 例	miR-9 ($\bar{x} \pm s$)	miR-210 ($\bar{x} \pm s$)
乳腺癌组	175	51.01 \pm 7.18	86/89	84/91	29/146	0.54 \pm 0.13	71/104	1.509 \pm 0.908	1.490 \pm 0.822
良性病变组	162	50.80 \pm 6.91	99/63	100/62	112/50	0.69 \pm 0.16	45/117	1.320 \pm 0.533	1.339 \pm 0.483
<i>t</i> / χ^2 值		0.273	4.867	6.396	95.519	9.476	6.099	2.307	2.035
<i>P</i> 值		0.785	0.027	0.011	0.000	0.000	0.014	0.022	0.043

表 2 乳腺癌危险因素的多因素分析

因素	b	S _b	Wald χ^2	P 值	OR	95%CI	
						下限	上限
乳腺癌家族史 (无 =0, 有 =1)	1.319	0.268	4.278	0.031	3.741	2.212	6.326
月经周期规律 (是 =0, 否 =1)	1.296	0.087	4.911	0.027	3.655	3.082	4.335
BI-RADS 分级 (良性 =0, 恶性 =1)	1.744	0.233	9.915	0.002	5.702	3.695	8.856
RI 值	-0.323	0.236	1.207	0.305	0.724	0.456	1.150
HER2 (阴性 =0, 阳性 =1)	1.475	0.135	4.438	0.038	4.371	3.355	5.695
miR-9	0.208	0.054	8.736	0.004	1.231	1.107	1.368
miR-210	0.355	0.078	6.035	0.018	1.426	1.224	1.662

2.3 HER2、彩色多普勒超声、miR-9 和 miR-210 诊断乳腺癌的敏感性、特异性比较

以病理结果为金标准, HER2 诊断乳腺癌的敏感性为 59.43% (104/175), 特异性为 27.78% (45/162)。彩色多普勒超声诊断乳腺癌的敏感性为 83.43% (146/175), 特异性为 69.14% (112/162)。血清 miR-9 诊断乳腺癌的 AUC 为 0.753, 敏感性为 50.99%, 特异

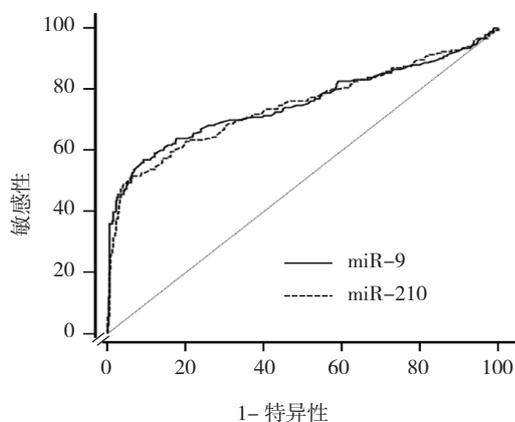


图 2 血清 miR-9、miR-210 检测诊断乳腺癌 ROC 曲线

性为 90.63%。血清 miR-210 诊断乳腺癌的 AUC 为 0.747, 敏感性为 51.08%, 特异性 94.21% (见图 2)。

2.4 彩色多普勒超声联合 miR-9、miR-210 检测诊断乳腺癌

利用 Logistic 回归模型将彩色多普勒超声与血清 miR-9、miR-210 检测进行联合诊断, 其 AUC 提高到 0.934, 敏感性为 89.78%, 特异性为 85.12%。见图 3。

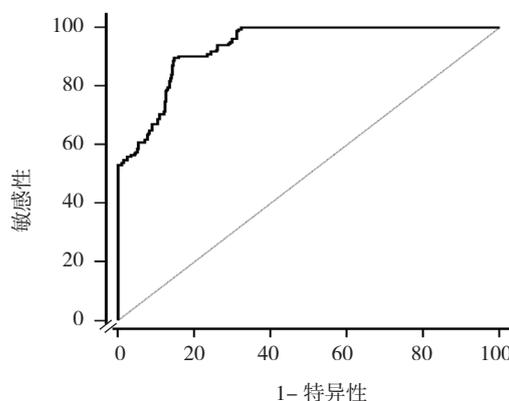


图 3 彩色多普勒超声联合血清 miR-9、miR-210 检测诊断乳腺癌 ROC 曲线

3 讨论

目前临床上常用钼靶 X 射线摄影作为乳腺癌筛查的主要手段, 但是钼靶 X 射线不能检出较小的乳腺癌肿块, 且对致密腺体显影较差, 不利于乳腺恶性肿瘤的早期诊断。虽然彩色多普勒超声可以弥补这一不足, 但其对病变性质的区别能力较低, 并且应用于临床的 BI-RADS 标准多依赖于医生的主观判断。近年来, 基因检测成为乳腺恶性肿瘤研究的新兴热点, miRNA 的出现为乳腺癌的筛查与早期诊断提供了新的方向。然而 miRNA 进行乳腺癌的早期诊断时, 其敏感性较影

像学手段低, 且缺乏多中心大样本量的研究支持。因此, 本研究选取与乳腺癌发生密切相关的 miR-9 和 miR-210 作为标志物, 联合彩色多普勒超声, 旨在为乳腺癌提供准确、高效的筛查和早期诊断方式。

通过对两组一般资料的比较发现, 乳腺癌组和良性病变组都有较高比例的乳腺癌家族史, 且乳腺癌组有家族史人群比例更高, 这与乳腺癌的遗传易感性相符^[10]; 月经周期不规律常与雌孕激素的失调有关, 在乳腺癌组中更高比例的月经不规律发生例数也印证该点^[11]。在本研究中, 彩色多普勒超声可以显示大部分

肿瘤内有典型的丰富血流、肿块边缘有厚薄不均的强回声晕环等特点,但部分良性病变患者亦可见局部血流丰富,因此需要有经验的医生进行辨别,而其敏感性和特异性受限。乳腺癌组中 RI 值较良性病变组低,表明肿瘤内有丰富血流,而 RI 值并不受医生经验的影响,具有更客观的特点。

新近有研究表明^[12-13],miR-9 或 miR-210 与胃、肺、乳腺等多种肿瘤的临床分期、淋巴结转移和预后存在密切的关系。本研究显示,相较于良性病变组,乳腺癌组的血清 miR-9、miR-210 表达量显著升高,与既往研究一致^[14]。

在多因素分析中,乳腺癌家族史、月经周期不规律、BI-RADS 分级恶性、HER2 表达水平、miR-9 和 miR-210 的表达水平均为乳腺癌发生的影响因素。然而根据临床经验,问诊得到的乳腺癌家族史、月经规律与否等信息存在一定的偏差,而 HER2 表达水平的敏感性低^[15],故无法作为筛查乳腺癌的主要手段。因此本研究探讨 miR-9、miR-210 检测联合彩色多普勒超声诊断乳腺癌的诊断效能。

根据 ROC 曲线,分别分析彩色多普勒超声、血清 miR-9、miR-210 水平诊断乳腺癌的诊断效能,发现彩色多普勒超声检查敏感性较好,但依赖于医生的主观判断。血清 miR-9、miR-210 的 AUC 均在 0.75 左右,但其敏感性和特异性无法兼顾。两者联合检测可以有效提高诊断的准确性,AUC 提高至 0.934,敏感性为 89.78%,特异性为 85.12%,综合效能较独立诊断较好。因此,miR-9、miR-210 检测联合彩色多普勒超声诊断乳腺癌具有较好的诊断效能。

综上所述,miR-9 和 miR-210 检测联合彩色多普勒超声诊断乳腺癌准确性较高,是一种无创而高效的筛查和早期诊断方法,具有较高的临床价值,值得参考与借鉴。

参 考 文 献:

[1] 吴猛,王雪梅,周如海. 探讨 BI-RADS 分级在超声诊断乳腺癌

中的应用价值[J]. 中国临床医学影像杂志, 2013, 24(7): 465-468.

- [2] RAZA S, GOLDKAMP A L, CHIKARMANE S A, et al. US of breast masses categorized as BI-RADS 3, 4, and 5: pictorial review of factors influencing clinical management[J]. Radiographics, 2010, 30(5): 1199-1212.
- [3] ASIF H M, SULTANA S, AHMED S, et al. HER-2 positive breast cancer - a mini-review[J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention Apjcp, 2016, 17(4): 1609-1615.
- [4] 《乳腺癌 HER 检测指南》编写组. 乳腺癌 HER2 检测指南(2014 版)[J]. 中华病理学杂志, 2014, 43(4): 262-267.
- [5] SUN H, SHAO Y, HUANG J, et al. Prognostic value of microRNA-9 in cancers: a systematic review and meta-analysis[J]. Oncotarget, 2016, 7(41): 67020-67032.
- [6] TOYAMA T, KONDO N, ENDO Y, et al. High expression of microRNA-210 is an independent factor indicating a poor prognosis in Japanese triple-negative breast cancer patients[J]. Japanese Journal of Clinical Oncology, 2012, 42(4): 256-263.
- [7] 杨浚浚,王龙强,李海,等. 乳腺癌循环 miRNA 生物标志物的筛选及验证[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(5): 696-700.
- [8] RADIOLOGY A C O. Breast Imaging Reporting and Data System (BI-RADS)[M]. American College of Radiology, 2003.
- [9] 周建桥,詹维伟. 超声乳腺影像报告数据系统及其解读[J]. 中华医学超声杂志(电子版), 2011, 8(6): 84-88.
- [10] 李挺. 乳腺癌异质性的分子遗传学基础及临床应用[J]. 中华外科杂志, 2017, 55(2): 104-108.
- [11] ARTHUR R, WANG Y, YE K, et al. Association between lifestyle, menstrual/reproductive history, and histological factors and risk of breast cancer in women biopsied for benign breast disease[J]. Breast Cancer Research & Treatment, 2017, 165(3): 623-631.
- [12] ZHANG Y, ZHOU J, SUN M, et al. Prognostic value of microRNA-9 in various cancers: a meta-analysis[J]. Pathology Oncology Research Por, 2017, 23(3): 573-582.
- [13] LI Y, DAI Y, ZHANG X, et al. Three-layered polyplex as a microRNA targeted delivery system for breast cancer gene therapy[J]. Nanotechnology, 2017, 28(28): 285101.
- [14] 曹志刚,邵志敏. microRNA 在乳腺癌诊断及预后判断中的作用[J]. 中国癌症杂志, 2012, 22(7): 542-546.
- [15] 张毅敏,王明丽,潘志文,等. 血清 HER-2neu ECD 水平与乳腺癌临床特征及组织中 HER-2neu 表达的相关性[J]. 中国现代医学杂志, 2017, 27(12): 84-87.

(张蕾 编辑)