

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.03.008
文章编号: 1005-8982 (2019) 03-0043-04

MicroRNA-146a 表达与乳腺癌临床分子亚型的相关性研究 *

付明刚, 郭丽英

(新疆医科大学第一附属医院 乳腺外科, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要: **目的** 检测 microRNA-146a (miR-146a) 在不同临床分子亚型的乳腺癌组织中的表达, 分析 miR-146a 与分子亚型之间的相关性。**方法** 选取新疆医科大学第一附属医院乳腺浸润性导管癌患者手术标本 185 例, 应用原位杂交技术检测乳腺癌石蜡组织中 miR-146a 的表达情况, 应用 χ^2 检验和秩和检验分析 miR-146a 表达水平在不同临床分子亚型的乳腺癌之间的关系。**结果** 4 组不同临床分子亚型的浸润性乳腺癌组织中, miR-146a 在 Lumina A 型中的阳性表达率最高, 而 miR-146a 在 Basal-like 型的阴性表达率最高, 临床分子亚型中 miR-146a 表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 进一步分组检验, Lumina A 型较 Basal-like 型阳性表达率与 Basal-like 型比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** miR-146a 在浸润性乳腺癌组织中的表达与其临床分子亚型相关, 浸润性乳腺癌组织中 miR-146a 阳性表达程度高提示预后更佳, 其有望成为乳腺癌新的预后分子判断标志。

关键词: 乳腺肿瘤; MicroRNAs; 原位杂交; 分子亚型

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

Expression of MicroRNA-146a in subtypes of breast cancer*

Ming-gang Fu, Li-ying Guo

(Department of the Breast Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of miR-146a in molecular subtypes. **Methods** Totally 185 cases of patients with breast invasive ductal cancer who were admitted into our hospital during Jan. 2013 to Aug 2016 were involved in this study. Breast cancer tissue were collected during surgery. Expression levels of miR-146a was quantified by hybridization in situ method. Association of miR-146a with molecular subtypes of breast cancer was identified by Pearson chi-square test and Nemenyi Rank sum test. **Results** Among four subtypes in breast cancer, miR-146a had the highest expression rate in Lumina A type while lowest expression rate in basal-like type ($P < 0.05$). **Conclusions** Expression of miR-146a is closely associated with molecular subtypes of breast cancer, which may be a new prognostic biomarker of breast cancer.

Keywords: breast neoplasms; MicroRNAs; in situ hybridization; molecular subtypes

MicroRNAs 作为一类非编码因子参与人类许多基因的生理过程^[1], 近年来其在肿瘤细胞中的表达影响肿瘤的侵袭性成为目前医学研究的热点之一, 很多研究

发现 microRNAs 在实体肿瘤的侵袭性上扮演着关键角色^[2-3]。众所周知, 乳腺癌严重危害当今社会妇女的身心健康, 且发病率呈逐年增高的趋势, 研究显示许多

收稿日期: 2018-06-26

* 基金项目: 省部共建国家重点实验室培育基地 - 新疆重大疾病医学重点实验室专项 (No: SKLI-XJMDR-ZX-2014-1)

[通信作者] 郭丽英, E-mail: 2315365607@qq.com

microRNAs 与乳腺癌发生、进展有着紧密联系^[4-5]。本研究在 microRNAs 固定组织稳定并可定量提取的基础上^[6]，通过原位杂交技术检测 185 例浸润性导管癌石蜡组织中 microRNA-146a (miR-146a) 的表达，分析 miR-146a 在乳腺癌组织中的表达与不同临床分子亚型组间的差异及预后的关联，探讨其是否能成为预后判断的分子标志物。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2013 年 1 月—2016 年 8 月新疆医科大学第一附属医院 185 例女性乳腺癌患者石蜡组织标本，均经病理明确诊断为乳腺浸润性导管癌。入组患者均经过本院医学伦理委员会审批，纳入标准：①未接受术前新辅助化疗及新辅助内分泌治疗，具有完整的临床资料。②入组患者年龄 28 ~ 72 岁，中位年龄 46 岁。③所有患者均行乳腺癌改良根治术，术后接受表阿霉素 + 多西他赛 (TA) 3 周方案 6 周期常规化疗 (表阿霉素成人常用量为每疗程按体表面积 60 mg/m²，多西他赛为 75 mg/m²)。④所有石蜡标本组织切片厚约 4 μm。

1.2 材料与试剂

miR-146a 探针购自丹麦 Exiqon 公司，敏感型原位杂交试剂盒 (MK1030) 购自武汉博士德生物有限公司，DAB 显色试剂盒及其他常规试剂购自新疆乌鲁木齐齐宝信生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 原位杂交技术检测乳腺癌石蜡组织中 miR-146a 的表达 切片用脱蜡液梯度脱蜡，3% 双氧水室温下处理切片 10 min，蒸馏水洗 2 遍；室温下胃蛋白酶覆盖消化 15 min，聚丁二酸丁二醇酯浸泡冲洗 15 min；预杂交液 37℃ 预杂交 3 h；添加稀释浓度为 40 μg/ml 的 miR-146a 探针，原位杂交盖玻片覆盖后恒温箱 37℃ 杂交过夜 (约 16 h)；2× 柠檬酸钠缓冲液梯度充分洗涤；封闭液 37℃ 封闭 60 min；室温下滴加鼠抗地

高辛玻片覆盖后孵育 2 h，聚丁二酸丁二醇酯浸泡冲洗 15 min；滴加链霉亲和素-生物素酶复合物 37℃ 孵育 20 min，聚丁二酸丁二醇酯洗 3 次，5 min/次；滴加生物素化过氧化物酶 37℃ 孵育 20 min，聚丁二酸丁二醇酯洗 4 次，5 min/次；二氨基联苯胺显色，苏木精复染，充分水洗，聚丁二酸丁二醇酯返蓝，常规酒精梯度给予脱水，经二甲苯透明后树脂封片。以上各项检测均严格按照试剂盒说明书操作。

1.3.2 原位杂交及免疫组织化学结果判断 原位杂交实验结果为本院病理科高年资的病理医师进行结果评定。通过 Olympus 显微镜下观察评分并记录，miR-146a 阳性的判定标准为：每张切片在镜下观察 5 个不同的高倍视野 (×200)，通过观察阳性染色的细胞强度及范围，记录并分析阳性标志物的强度和阳性细胞数后综合计量^[7]。免疫染色强度分级计分为 3 个等级，1 分：无染色或弱染色 (淡黄色颗粒)；2 分：一般强度染色 (颗粒状棕黄色)；3 分：强染色 (颗粒状或团块状的棕褐色)；阳性细胞密度分级计分：阳性细胞数 <10% 评为 1 分；阳性细胞数 10% ~ 50% 评为 2 分；阳性细胞数 >50% 者评为 3 分。每例标本最后得分综合染色强度和分布范围进行半定量分析，染色强度与积分之积为实际评分，0 分为阴性 (-)，1 分为弱阳性 (+)，2 ~ 3 分为阳性 (++)，>3 分为强阳性 (+++)。^[8]

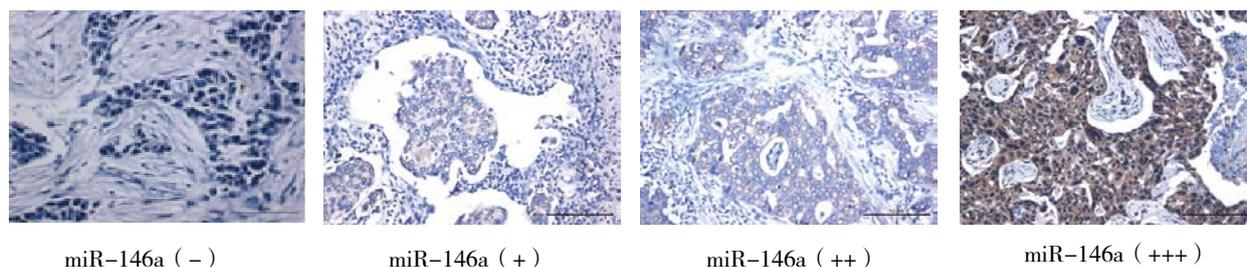
1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件，计数资料以率 (%) 表示，比较采用 Pearson χ^2 检验，乳腺癌分子亚型的分组两两比较采用 Nemenyi 秩和检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-146a 在乳腺癌组织中的表达

经原位杂交技术检测，结果显示 miR-146a 在细胞胞浆中表达，阳性表达产物呈颗粒状或团块状在镜下分布，依据表达强弱呈黄色分布、棕黄色或棕褐色分布。见附图。



附图 miR-146a 在乳腺癌组织中的表达 (×200)

2.2 miR-146a 在乳腺癌 4 种不同临床分子亚型中的表达

miR-146a 在 185 例乳腺癌组织中 51 例表达(-), 134 例表达(+). 在 Lumina A 型中, miR-146a 的阳性表达率最高, 为 84.0%, 而在 Basal-like 型中 miR-

146a 阴性表达率最高, 为 59.1%. 经 Pearson χ^2 检验分析, 4 种分子亚型组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明不同分子亚型中 miR-146a 表达率不全相同(见表 1)。经 Nemenyi 秩和检验, Luminal A 型相对 Basal-like 型阳性表达高 ($P < 0.05$)(见表 2)。

表 1 miR-146a 表达与乳腺癌分子亚型的关系 例 (%)

分子亚型	miR-146a (-)	miR-146a (+~++)	miR-146a (+++)	χ^2 值	P 值
Luminal A 型	12 (16.0)	30 (40.0)	33 (44.0)	16.153	0.001
Luminal B 型	9 (29.0)	13 (41.9)	9 (29.0)		
HER-2 过表达型	17 (29.8)	25 (43.9)	15 (26.3)		
Basal-like 型	13 (59.1)	4 (18.1)	5 (22.7)		

表 2 miR-146a 表达与乳腺癌分子亚型的分组比较

组别	样本量		两组平均秩次差值 TA-TB	检验水准 α 界值		P 值
	n1	n2		$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$	
A 与 B						
Luminal A 型与 Luminal B 型	75	31	18.69	30.01	36.17	>0.05
Luminal A 型与 HER-2 过表达型	75	57	21.04	24.71	29.77	>0.05
Luminal A 型与 Basal-like 型	75	22	42.91	34.09	41.07	<0.05
Luminal B 型与 HER-2 过表达型	31	57	2.35	31.37	37.81	>0.05
Luminal B 型与 Basal-like 型	31	22	24.22	39.11	47.22	>0.05
Basal-like 型与 HER-2 过表达型	22	22	21.87	35.29	42.51	>0.05

3 讨论

乳腺癌的发病率在我国呈逐渐增高的趋势, 随着对乳腺癌研究的不断深入, 通过研究乳腺癌基因来分析乳腺癌生物学行为及预后成为一个重要的研究方向^[9]。研究显示, microRNAs 作为一种重要的转录后调控基因不仅在人类的多种实体肿瘤中起着关键作用, 并且 microRNAs 的上调或者下调直接影响肿瘤的侵袭性, 目前科学研究推测多种 microRNAs 为癌基因或抑癌基因参与人类肿瘤的发生、发展^[10], 其通过影响靶基因从而在转录后水平调控对应的基因, 作为重要的调节因子参与并调控相应的信号通路^[11-12]。目前证实人类的 miR-146a 位于第 5 号染色体 LOC285628 基因上^[13], 其不仅参与正常组织的各种生理活动, 而且在多种实体肿瘤发生、进展阶段 miR-146a 的表达会发生上调或者下调^[14-15]。因此, 随着研究的深入, miR-146a 在乳腺癌的预后判断上已成为一个重要的研究方向。

2000 年, PEROU 等^[16]定义乳腺癌 4 种临床分子亚

型, 其分别为: Luminal A 型、Luminal B 型、HER-2 过表达型及 Basal-like 型。近年来, 根据临床分子亚型的不同, 选择不同的治疗方案在乳腺肿瘤学的治疗上成为一个里程碑式的革新。现代医学证实, 即使相同的组织学分级和同等的病理分期, 不同的临床分子亚型的患者的肿瘤侵袭性及预后也有明显的差异。因不同的临床分子亚型的乳腺癌患者有着差异性的预后结果, 国内的乳腺癌诊疗指南已明确建议根据不同分子亚型的乳腺癌患者可采取相应的个体化治疗方案。

原位杂交技术通过带有标志物的核酸探针来检测对应的组织中待测核酸的表达, 是对 miRNAs 表达的半定量分析方法之一。本研究通过原位杂交技术发现, 在 185 例乳腺浸润性导管癌患者中, 分子分型为 Lumina A 型中 miR-146a 的阳性表达率最高, 而 Basal-like 型中 miR-146a 的阴性表达率最高, miR-146a 在 4 种分子亚型组表达组间差异有统计学意义, 经 Nemenyi 秩和进一步检验, Luminal A 型相对于 Basal-like 型阳性表达高。众所周知, Lumina A 型乳腺癌患者的预后在 4 种分子亚型中的预后通常最好,

在本研究中发现 Lumina A 型乳腺癌组织中 miR-146a 阳性表达率最高, 据此推测 miR-146a 的阳性表达预示预后更好; 而在 Basal-like 型中, miR-146a 的阴性表达率最高, 而 Basal-like 型为乳腺癌分子亚型中最具侵袭性的亚型, 以往研究表明乳腺癌肿瘤组织中生物标志物具有预后指导意义, 而 miR-146a 在乳腺浸润性导管癌组织中表达与患者分子分型相关, miR-146a 阳性表达预示患者有着较好的预后。

综上所述, 通过 185 例浸润性乳腺导管癌患者的原位杂交实验提示不同分子亚型的乳腺浸润性导管癌中 miR-146a 表达率不全相同, 其中 miR-146a 表达在 Basal-like 型与 Lumina A 型中的表达有差异, 提示 miR-146a 的低表达与乳腺浸润性导管癌的侵袭性相关, 本研究提示 miR-146a 有望成为乳腺癌预后判断的分子标志物。由于原位杂交技术为一种半定量检测, 其预测价值有限, 仍有待一种定量的实验进一步证实。

参 考 文 献:

- [1] PETROVIC N, DAVIDOVIC R, BAJIC V, et al. MicroRNA in breast cancer: the association with BRCA1/2[J]. *Cancer Biomark*, 2017, 19(2): 119-128.
- [2] AHIR B K, ELIAS N M, LAKKA S S. SPARC overexpression alters microRNA expression profiles involved in tumor progression[J]. 2017, 8(1/2): 453-471.
- [3] YAO Q, TU C, LU D, et al. Clinicopathological significance of the microRNA-146a/WASP-family verprolin-homologous protein-2 axis in gastric cancer[J]. *Cancer Sci*, 2017, 108(7): 1285-1292.
- [4] MA W, ZHAOX, LIANG L, et al. miR-146a and miR-146b promote proliferation, migration and invasion of follicular thyroid carcinoma via inhibition of ST8SIA4[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(17): 28028-28041.
- [5] LU D, YAO Q, ZHAN C, et al. MicroRNA-146a promote cell migration and invasion in human colorectal cancer via carboxypeptidase M/src-FAK pathway[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(14): 22674-22684.
- [6] LI J, SMYTH P, FLAVIN R, et al. Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells[J]. *BMC Biotechnol*, 2007, 7(2): 35-36.
- [7] GUJ, TAMURAM, YAMADA K M. Tumor suppressor PTEN factor-mediated protein (MAP) kinase signaling pathways[J]. *Cell Biol*, 1998, 143(5): 1375-1384.
- [8] ANTONIO C, WOLFF M, ELIZABETH H, et al. American society of clinical oncology/college of American pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2007(131): 18-43.
- [9] MU K, WU Z Z, YU J P, et al. Meta-analysis of the association between three microRNA polymorphisms and breast cancer susceptibility[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(40): 68809-68824.
- [10] FKIHMHAMED I, PRIVAT M, TRIMECHE M, et al. MiR-10b, miR-26a, miR-146a and miR-153 expression in triple negative vs non triple negative breast cancer: potential biomarkers[J]. *Pathol Oncol Res*, 2017, 1(18): 12253-12267.
- [11] SIDIROPOULOS K G, DING Q, PAMPALAKIS G, et al. KLK6-regulated miRNA networks activate oncogenic pathways in breast cancer subtypes[J]. *Mol Oncol*, 2017, 10(7): 993-1007.
- [12] MA W, ZHAO X, LIANG L, et al. Claudin 1 expression levels affect miRNA dynamics in human basal-like breast cancer cells[J]. *DNA Cell Biol*, 2017, 35(7): 328-339.
- [13] SANDHU R, REIN J, D'ARCY M, et al. Overexpression of miR-146a in basal-like breast cancer cells confers enhanced tumorigenic potential in association with altered p53 status[J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(11): 2567-2575.
- [14] KUMARASWAMY E, WENDT K L, AUGUSTINE L A, et al. BRCA1 regulation of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in human breast cancer cells involves microRNA-146a and is critical for its tumor suppressor function[J]. *Oncogene*, 2017, 34(33): 4333-4346.
- [15] MA W, ZHAO X, LIANG L, et al. Associations of miR-146a and miR-146b expression and breast cancer in very young women[J]. *Cancer Biomark*, 2015, 15(6): 881-887.
- [16] PEROU C M, SORLIE T, EISEN M B, et al. Molecular portraits of human breast tumours[J]. *Nature*, 2000, 406(6797): 747-752.

(张西倩 编辑)