

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.15.012

文章编号: 1005-8982(2017)15-0058-04

miR-320 在乳腺癌组织中的表达及临床意义

程学远, 黄忠

(广西北海市人民医院 普通外科, 广西 北海 536000)

摘要:目的 探讨 miR-320 在乳腺癌组织中的表达及其临床意义。**方法** 采用逆转录聚合酶链反应法(RT-PCR)检测 108 例乳腺癌组织和对应癌旁正常组织中 miR-320 表达,分析 miR-320 表达与乳腺癌病理特征的相关性。**结果** 乳腺癌组织中 miR-320 表达水平低于正常乳腺组织[(0.58±0.17)vs(1.05±0.21)]($P<0.05$)。乳腺癌组织 miR-320 表达水平与乳腺癌 TNM 分期及淋巴转移有关($P<0.05$);而 miR-320 表达水平与年龄、绝经、病理类型、肿瘤大小、C-erbB-2 表达、增殖细胞核抗原(PCNA)表达、孕激素受体(PR)表达及雌激素受体(ER)表达无关($P>0.05$)。**结论** miR-320 在乳腺癌组织中呈低表达,且其表达水平与乳腺癌发生发展密切相关,miR-320 可能是乳腺癌特异性诊断潜在标志物和治疗新靶点。

关键词: miR-320;乳腺癌;临床病理特征

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

Expression and clinical significance of miR-320 in breast cancer

Xue-yuan Cheng, Zhong Huang

(Department of General Surgery, the People's Hospital of Beihai City,
Beihai, Guangxi 536000, China)

Abstract: Objective To evaluate the expression and clinical significance of miR-320 in breast cancer. **Methods** The expression of miR-320 in 108 cases of breast cancer tissues and normal breast tissue were detected by RT-PCR, and analyzed the correlation between expression of miR-320 in breast cancer, pathological feature and clinical prognosis. **Results** The miR-320 expression levels of breast cancer tissue were significantly lower than normal breast tissue [(0.58±0.17) vs (1.05±0.21)] ($P<0.05$). The miR-320 expression level was closely correlated with TNM staging and lymph node metastasis ($P<0.05$), but the miR-320 expression level was no correlated with age, menopause, pathological type, tumor size, C-erbB-2 expression, PCNA expression, PR expression and ER expression ($P>0.05$). **Conclusions** miR-320 is lowly expression in the breast cancer, and its expression level is closely related with occurrence and development of breast cancer.

Keywords: miR-320; breast cancer; clinicopathological features

乳腺癌是临床常见的恶性肿瘤,全世界每年约有 130 万乳腺癌新增病例,约有 50 多万患者死于乳腺癌^[1]。尽管手术联合同步放化疗治疗早期乳腺癌的长期治愈率可达 $\geq 90\%$,但对于局部晚期及复发转移乳腺癌仍缺乏令人满意的治疗手段^[2]。缺乏具有早期诊断及预后判定意义的特异性指标是导致乳腺癌

临床诊疗效果欠佳的重要因素。因此,探寻乳腺癌的发病机制,明确其早期诊断及治疗靶点,对于乳腺癌的临床诊疗具有十分重要的意义。微小核糖核酸(micro ribonucleic acid, miRNA)属于内源性非编码小分子核糖核酸(ribonucleic acid, RNA),其可通过与靶基因信使核糖核酸 3' (messenger ribonucleic

收稿日期:2016-11-17

* 基金项目:北海市本级科学研究与技术开发项目研发类资助(No:201602028)

acid 3', mRNA 3') 端非翻译区相结合调控靶基因 mRNA 翻译,从而在转录后水平调控基因表达,并以此参与细胞增殖、分化及凋亡等过程^[3]。miRNAs 异常表达与恶性肿瘤的发生、发展密切相关。因此,miRNAs 被认为是肿瘤特异性诊断标志物和治疗新靶点。miR-320 是一种公认的抑癌 miRNA,既往研究显示,miR-320 在宫颈癌^[4]和结直肠癌等^[5]多种恶性肿瘤组织中低表达。但 miR-320 在乳腺癌组织中的表达及其临床意义尚未明确。本研究旨在探讨 miR-320 表达水平乳腺癌临床病理特征的关系,以期为乳腺癌的临床诊疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织样本 选取 2014 年 7 月 -2016 年 9 月北海市人民医院收治的 108 例乳腺癌患者。患者均为女性;年龄 27 ~ 69 岁,平均(52.35 ± 9.44)岁;所有乳腺癌组织样本均经病理证实为原发性乳腺癌;术前均未接受放疗、化疗等辅助治疗,且有完整临床病理资料。同时取对应癌旁组织(距癌组织边缘 ≥ 5 cm)为对照组,所有癌旁组织样本均经病理证实为正常乳腺组织。

1.1.2 试剂与设备 逆转录试剂盒、逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒(购于美国 ABI 公司),Trizol 试剂(购于美国 Invitrogen 公司),miR-320、U6 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 取 2 mm³ 样本组织超声匀浆,随后加入 1 ml Trizol 试剂,吹打均匀后室温静置 10 min 后加入 340 μl 氯仿,震荡均匀,4℃、12 000 r/min 离心 10 min,吸取上层水相并加入等体积的异丙醇,震荡均匀,室温反应 10 min,4℃、12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,室温放置 15 min 以彻底晾干,焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)水溶解,取 1 μl RNA 经 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,采用 Bio-Rad 检测 RNA 纯度及浓度。

1.2.2 逆转录反应 取组织总 RNA 置于 1 支洁净 PCR 反应管中,1 μl Oligo (dT),RNase Free dH₂O 将溶液总体积补足至 6 μl,混匀,70℃水浴 10 min,冰浴 3 min,向上述聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)反应管中依次加入下列试剂,总反应体系为 20 μl: 1 μmol/L 逆转录特异性引物 3 μl、

10 × RT buffer 1.5 μl、100 mmol/L dNTPs 0.15 μl、50 u/μl Multi Scribe™ Reverse Transcriptase(美国 Applied Biosystems 公司) 1.0 μl、20 u/μl RNA 酶抑制剂 0.19 μl、总 RNA 1 μl,加 DEPC 水补至 20 μl。反应条件:16℃反应 30 min,42℃反应 30 min,85℃反应 5 s,置入 -20℃冰箱冷冻保存备用。miR-320 逆转录引物序列,正向引物:5'-TATTCGACTGGAT ACGACTCCAGC-3';反向引物:5'-GTCGTATCCAG TGCAGGGTCCGAGG-3'。U6 逆转录引物序列,正向引物:5'-CGCTTACGAATTTGCGTGTTCAT-3',反向引物:5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3'。

1.2.3 PCR 扩增 取一支洁净 PCR 反应管,反应体系为 20 μl,冰上依次加入以下试剂:逆转录产物互补脱氧核糖核酸(complementary deoxyribonucleic acid, cDNA)1 μl、引物 1 μl、TaqMan GEx MASTER Mix(美国 Applied Biosystems 公司)10 μl,加双蒸水补至 20 μl。反应条件:95℃反应 10 min,92℃反应 15 s,60℃反应 1 min,共 40 个循环。以 U6 为内参,ΔCt 值 = miR-320Ct 值 - U6Ct 值。miR-320 引物序列,正向引物:5'-ACACTCCAGCTGGGAAAAGCTGGGTTG AGA-3';反向引物:5'-TGGTGTCGTGGAGTCG-3'。U6 引物序列,正向引物:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3';反向引物:5'-AACGCTTACGAATTTGCGT-3'。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用 *t* 检验,计数资料用百分数(%)表示,组间比较用 χ^2 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌组织与正常乳腺组织 miR-320 表达水平比较

乳腺癌组织中 miR-320 表达水平低于正常乳腺组织[(0.58 ± 0.17)vs(1.05 ± 0.21)](*P* < 0.05)。

2.2 乳腺癌组织 miR-320 表达水平与临床病理特征的关系

miR-320 表达水平与 TNM 分期及淋巴转移有关(*P* < 0.05),miR-320 表达水平年龄、绝经、病理类型、肿瘤大小、C-erbB-2 表达、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)表达、孕激素受体(progesterone receptor, PR)表达及雌激素受体(estrogen receptor, ER)表达无关(*P* > 0.05)。见附表。

附表 乳腺癌组织临床病理特征与 miR-320 表达水平的相关性 ($\bar{x} \pm s$)

| 病理特征 | 例数 | miR-320 相对表达量 | t 值 | P 值 |
|-------------|----|---------------|-------|-------|
| 绝经 | | | | |
| 是 | 48 | 0.60 ± 0.24 | 0.197 | 0.843 |
| 否 | 60 | 0.56 ± 0.15 | | |
| 年龄 | | | | |
| ≥40 岁 | 66 | 0.59 ± 0.28 | 0.049 | 0.978 |
| <40 岁 | 42 | 0.57 ± 0.14 | | |
| 病理类型 | | | | |
| 浸润型导管癌 | 57 | 0.55 ± 0.20 | 0.113 | 0.924 |
| 浸润型小叶癌 | 51 | 0.60 ± 0.16 | | |
| TNM 分期 | | | | |
| I、II | 72 | 0.68 ± 0.25 | 3.199 | 0.035 |
| III | 36 | 0.52 ± 0.13 | | |
| 肿瘤大小 | | | | |
| <2.5 cm | 55 | 0.59 ± 0.20 | 0.062 | 0.963 |
| ≥2.5 cm | 53 | 0.57 ± 0.16 | | |
| 淋巴结转移 | | | | |
| 是 | 40 | 0.51 ± 0.15 | 3.128 | 0.038 |
| 否 | 68 | 0.66 ± 0.23 | | |
| C-erbB-2 表达 | | | | |
| + | 38 | 0.56 ± 0.25 | 0.127 | 0.919 |
| - | 70 | 0.59 ± 0.16 | | |
| PCNA 表达 | | | | |
| + | 76 | 0.57 ± 0.21 | 0.058 | 0.964 |
| - | 32 | 0.59 ± 0.19 | | |
| PR 表达 | | | | |
| + | 71 | 0.57 ± 0.20 | 0.225 | 0.821 |
| - | 37 | 0.60 ± 0.24 | | |
| ER 表达 | | | | |
| + | 73 | 0.59 ± 0.16 | 0.186 | 0.859 |
| - | 35 | 0.57 ± 0.22 | | |

3 讨论

miRNA 属于高度保守的非编码小分子单链 RNA, 并广泛存在于真核生物中。正常生理状态下, 机体内 miRNA 表达遵守严格的组织、时序特异性; 但在肿瘤环境下, miRNA 往往出现异常表达, 并起到类似癌基因或抑癌基因的作用^[6]。大量研究证实, 乳腺癌中存在多种 miRNA 的异常表达, 提示 miRNA 参与乳腺癌的发生、发展^[7-9]。因此, 深入研究 miRNA 与乳腺癌的相关性, 对乳腺癌的临床诊疗具有积极的促进作用。

miR-320 定位于人类第 8 号染色体, 是新发现的

一类 miRNA。近年来研究发现, miR-320 失衡表达可促进恶性肿瘤的发生、发展。WU 等^[10]研究显示, 口腔鳞状细胞癌组织中 miR-320 表达低于正常组织 ($P < 0.05$), 且 miR-320 表达水平与肿瘤血管密度呈负相关 ($P < 0.05$), 而慢病毒载体转染 miR-320 可抑制腔鳞状细胞癌新生血管生成。WAN 等^[11]研究表明, 结直肠癌组织中 miR-320 表达低于正常组织 ($P < 0.05$), 过表达 miR-320 可抑制结直肠癌细胞 HT-29 增殖及侵袭, 并降低后者对 5-Fu 和奥沙利铂的敏感性, 其机制与 miR-320 靶向调控叉头框蛋白 M1 (fork head box M1, FOXM1) 蛋白表达有关。宋成等^[12]通过对比宫颈癌组织和正常宫颈上皮组织 miR-320 表达发现, 宫颈癌组织中 miR-320 表达低于正常宫颈上皮组织 ($P < 0.05$), 且 miR-320 表达水平与宫颈癌临床分期及淋巴结转移有关 ($P < 0.05$)。上述研究提示, miR-320 在多种恶性肿瘤进展过程中发挥着类似抑癌基因作用, 但 miR-320 在乳腺癌中的作用尚未明确。

本研究结果显示, 乳腺癌组织中 miR-320 表达水平低于正常乳腺组织 ($P < 0.05$), 该结果与其他肿瘤的表达情况相似^[12-13], 提示 miR-320 低表达可能在某种程度上促进乳腺癌的发生、发展。进一步分析, 乳腺癌组织中 miR-320 表达与乳腺癌临床病理特性相关性发现, TNM 分期越高则 miR-320 表达越低 ($P < 0.05$), 提示 miR-320 可能作为抑癌基因参与乳腺癌的进展过程; 远处淋巴转移者 miR-320 表达低于无淋巴转移者 ($P < 0.05$), 提示 miR-320 低表达可能促进乳腺癌侵袭及迁移^[14]。而 miR-320 表达与年龄、绝经、病理类型、肿瘤大小、C-erbB-2 表达、PCNA 表达、PR 表达及 ER 表达 ($P > 0.05$), 提示 miR-320 表达不易受个体因素或其他因素影响, 其可能是乳腺癌早期诊断、疗效判定和预后评估的潜在指标。但值得注意的是, 由于 miR-320 在多种恶性肿瘤组织中具有高表达, 故其诊断乳腺癌的特异性较差。因此, 联合其他血清学指标检测可能对于提高 miR-320 针对乳腺癌的特异性有所帮助。

综上所述, miR-320 在乳腺癌组织中呈低表达, 且其表达水平与乳腺癌 TNM 分期及淋巴转移密切相关。miR-320 可能是乳腺癌特异性诊断潜在标志物和治疗新靶点。

参 考 文 献:

[1] 王深明, 马浙夫. 乳腺癌临床和实验研究的新进展[J]. 中华实验外

- 科杂志, 2012, 29(5): 786-789.
- [2] 苟凌云, 刘健. 早期乳腺癌的影像学诊断进展[J]. 中华临床医师杂志, 2013, 7(14): 6575-6578.
- [3] SAITO Y, SAITO H, LIANG G, et al. Epigenetic alterations and microRNA misexpression in cancer and autoimmune diseases: a critical review [J]. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 2014, 47(2): 128-135.
- [4] ZHANG T, PING Z, WANG T, et al. Down-regulation of miR-320 associated with cancer progression and cell apoptosis via targeting Mcl-1 in cervical cancer[J]. *Tumor Biology*, 2016, 68(7): 1-10.
- [5] ZHAO H, DONG T, ZHOU H, et al. miR-320a suppresses colorectal cancer progression by targeting Rac1[J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(4): 886-895.
- [6] TORMO E, PINEDA B, SERNA E, et al. MicroRNA profile in response to doxorubicin treatment in breast cancer[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2015, 116(9): 2061-2073.
- [7] KRUTILINA R, SUN W, SETHURAMAN A, et al. MicroRNA-18a inhibits hypoxia-inducible factor 1- α activity and lung metastasis in basal breast cancers[J]. *Breast Cancer Research*, 2014, 16(4): 1-16.
- [8] CHACONCORTES D, SMITH R A, LEA R A, et al. Association of microRNA 17-92 cluster host gene (MIR17HG) polymorphisms with breast cancer[J]. *Tumor Biology*, 2015, 36(7): 5369-5376.
- [9] ZHAO F L, DOU Y C, WANG X F, et al. Serum microRNA-195 is down-regulated in breast cancer: a potential marker for the diagnosis of breast cancer[J]. *Molecular Biology Reports*, 2014, 41(9): 5913-5922.
- [10] WU Y Y, CHEN Y L, JAO Y C, et al. miR-320 regulates tumor angiogenesis driven by vascular endothelial cells in oral cancer by silencing neuropilin 1[J]. *Angiogenesis*, 2014, 17(1): 247-260.
- [11] WAN L Y, DENG J, XIANG X J, et al. miR-320 enhances the sensitivity of human colon cancer cells to chemoradiotherapy in vitro by targeting FOXM1[J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2015, 457(2): 125-132.
- [12] 宋成, 张婷, 许耀辉, 等. 新型分子标志物 miR-320 在宫颈癌组织中的表达及其临床意义[J]. *中国妇幼保健*, 2016, 31(2): 238-240.
- [13] 张丹华, 董明, 周建平. miR-320 在结直肠癌中的表达及意义[J]. *世界华人消化杂志*, 2013, 21(32): 3592-3597.
- [14] LEI T, ZHU Y, JIANG C, et al. MicroRNA-320 was downregulated in non-small cell lung cancer and inhibited cell proliferation, migration and invasion by targeting fatty acid synthase[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2016, 14(2): 1255-1262.