

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.08.018

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190326.0956.007.html(2019-03-26)

miR-135a-5p 在乳腺癌患者血清中的表达及意义*

黄俊婷,潘利咸,朱俊琳

(南阳医学高等专科学校第一附属医院肿瘤内科,河南南阳 473000)

[摘要] **目的** 探讨 miR-135a-5p 在乳腺癌患者血清中的表达及意义。**方法** 选取 2017 年 1 月至 2018 年 1 月该院收治的 80 例乳腺癌患者,50 例乳腺增生患者及 50 例体检健康者为研究对象,均为女性,收集 3 组血清样本并分别检测其血清 miR-135a-5p、糖类抗原 125(CA125)表达水平,采用 ROC 曲线评价血清 miR-135a-5p 在乳腺癌中的诊断效能。**结果** 乳腺癌患者血清 miR-135a-5p 的相对表达水平及 CA125 水平显著高于乳腺增生患者和体检健康者,差异有统计学意义($P < 0.01$);miR-135a-5p 诊断乳腺癌的灵敏度、阳性预测值及阴性预测值均高于 CA125,其诊断特异度与 CA125 相同;miR-135a-5p 联合 CA125 诊断乳腺癌的灵敏度和阴性预测值均有所提升;乳腺癌患者血清 miR-135a-5p 相对表达水平与肿瘤的 TNM 分期及分化程度密切相关($P < 0.05$),而与患者的年龄、是否绝经、肿瘤大小、病理类型无明显相关性($P > 0.05$);采用 ROC 曲线评价血清 miR-135a-5p 在乳腺癌中的诊断效能,其曲线下面积为 0.847(95%CI:0.609~0.973),诊断灵敏度为 91.82%,特异度为 77.35%。**结论** miR-135a-5p 在乳腺癌患者血清中表达明显上调,血清 miR-135a-5p 对乳腺癌诊断的敏感度和特异度均较高,或将成为乳腺癌临床诊断的生物学标志物之一。

[关键词] miR-135a-5p;乳腺肿瘤;血清;基因表达;诊断,鉴别

[中图分类号] R737.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)08-1330-04

Expression and significance of miR-135a-5p in serum of patients with breast cancer*

HUANG Junting, PAN Lixian, ZHU Junlin

(Department of Oncology, First Affiliated Hospital of Nanyang Medical College, Nanyang, Henan 473000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression and significance of miR-135a-5p in serum of breast cancer patients. **Methods** Eighty patients with breast cancer, 50 patients with breast hyperplasia and 50 people with physical examination were enrolled in the study from January 2017 to January 2018 in this hospital, all of them were women. Three groups of serum samples were collected and their serum miR-135a-5p and carbohydrate antigen 125(CA125) expression levels were detected. The ROC curve was used to evaluate the diagnostic efficacy of serum miR-135a-5p in the breast cancer. **Results** The relative expression of serum miR-135a-5p and CA125 in the breast cancer patients were significantly higher than that in the breast with hyperplasia patients and the physical examination people, and the difference were statistically significant ($P < 0.01$). The sensitivity, positive predictive value and negative predictive value of miR-135a-5p for diagnosis of breast cancer were higher than CA125, and its diagnostic specificity was the same as CA125. The sensitivity and negative predictive value of miR-135a-5p combined with CA125 in the diagnosis of breast cancer had improved. The relative expression of serum miR-135a-5p in breast cancer patients was closely related to the tumor TNM stage and differentiation ($P < 0.05$), but it was not significantly related to the patient's age, menopause, tumor size, pathological type ($P > 0.05$); The ROC curve was used to evaluate the diagnostic efficacy of serum miR-135a-5p in breast cancer. The area under the curve was 0.847 (95%CI:0.609-0.973). The diagnostic sensitivity was 91.82% and the specificity was 77.35%. **Conclusion** The expression of miR-135a-5p in the serum of breast cancer patients was significantly up-regulated. The sensitivity and specificity of serum miR-135a-5p in the diagnosis of breast cancer were high. It may be one of the biological markers for clinical diagnosis of breast cancer.

[Key words] miR-135a-5p; breast neoplasms; serum; gene expression; diagnosis, differential

* 基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(201303203)。 作者简介:黄俊婷(1982-),主治医师,本科,主要从事乳腺癌,肝癌,肺癌,食管癌等实体瘤放疗及靶向治疗,姑息治疗,肿瘤晚期止痛治疗等研究。

乳腺癌为女性最常见的恶性肿瘤之一,其发病率约占全身各种恶性肿瘤的 10%,并呈逐年升高趋势^[1]。有资料显示,早期乳腺癌患者经手术治疗联合放疗的治愈率可达 90%左右^[2],但临床对于晚期乳腺癌的治疗尚缺乏有效手段,因此,探寻乳腺癌的早期诊断标记物具有重要的价值。糖类抗原 125(carbohydrate antigen 125,CA125)是临床常用的乳腺癌诊断指标,其虽具有一定诊断价值,但存在假阳性率高、敏感度低等缺点^[3]。微 RNA(microRNA, miRNA)是近年来发现的一类长度为 18~24 个核苷酸的内源性小 RNA,既往研究表明,miRNA 在乳腺癌组织和正常乳腺组织中的表达存在差异^[4],最近有报道,miRNA 可长期稳定地存在于血浆或血清中,其中,血清 miR-135a-5p 已被证实与子宫内膜癌^[5]、结直肠癌^[6]等恶性肿瘤密切相关,但其在乳腺癌中的表达及诊断效能尚未明确。因此,本研究通过对比分析 80 例乳腺癌患者,50 例乳腺增生患者及 50 例体检健康者血清 miR-135a-5p 表达水平,旨在为乳腺癌的临床诊断提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017 年 1 月至 2018 年 1 月本院收治的 80 例乳腺癌患者,50 例乳腺增生患者及 50 例体检健康者为研究对象,均为女性。乳腺癌组年龄 32~67 岁,平均(48.26±5.35)岁;病理类型:浸润型导管癌 42 例,浸润型小叶癌 38 例;临床分期:I~II 期 49 例,III 期 31 例,患者均经组织病理学检查确诊为原发性乳腺癌且为初发病例,术前未接受放化疗治疗。乳腺增生组年龄 30~65 岁,平均(47.49±4.28)岁,均经临床检查确诊且为初发病例。体检健康组年龄 29~71 岁,平均(49.03±6.13)岁。本研究经医院伦理委员会批准,且研究对象均知情同意并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 血清总 RNA 提取 收集 3 组血浆样本,于采集 48 h 内离心处理(1 000 r/min 离心 10 min),取上层血清置于-80℃的冰箱中保存待检,整个过程避免溶血。分别取血清 400 μL,采用血清 RNA 提取试剂盒(美国 Invitrogen 公司)提取血清总 RNA,应用紫外分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)检测 RNA 的纯度及浓度。

1.2.2 反转录反应 按照反转录试剂盒(美国 Invitrogen 公司)操作说明书进行操作,将提取的血清总 RNA 反转录为 cDNA,反应体系为 20 μL,配制混合物:总 RNA 300 ng,5×RT buffer 4 μL,反转录特异性引物 1 μL,脱氧核糖核苷酸 2 μL,RNA 酶抑制剂 1 μL,反转录酶 1 μL,加焦碳酸乙二酯(DEPC)水补足至 20 μL。反应条件:42℃ 60 min,70℃ 5 min;产物置于-20℃保存。miR-135a-5p 及内参 U6 的反转录引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计并合成。

1.2.3 miR-135a-5p 定量 PCR 检测 采用 7500 型实时荧光定量 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司)进行定量 PCR 检测。反应体系:SYBR Green I 混合液 10.00 μL,U6 上游引物 0.25 μL(5'-CTC GCG CAG CCT TGA CA-3'),U6 下游引物 0.25 μL(5'-AAC TTC GGA ATT GCA CTC GT-3'),miR-135a-5p 上游引物 0.25 μL(5'-ACA GCC TCC ATG GGA ATG GAA GCA GGT TGA-3'),miR-135a-5p 下游引物 0.25 μL(5'-TGG AGT GTG GCG TTC G-3'),cDNA 酶 6 μL,无 RNA 酶水 3.00 μL。反应条件:95℃ 10 min;95℃ 15 s,60℃ 1 min,30℃ 30 s,共 40 个循环。采用相对定量法,以 U6 为内参,各样本中 miR-135a-5p 的水平为它与同样本中的 U6 的比值为相对表达水平,由公式 $Folds = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算获得,ΔΔCt 为 miR-135a-5p 的相对表达水平。

1.2.4 CA125 水平检测 应用电化学发光免疫分析法测定卵巢癌肿瘤标记物 CA125 水平,试剂盒由中国联科生物公司提供,严格按照试剂盒说明进行操作。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据分析,数据以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,采用 Mann-Whitney U 检验,采用 ROC 曲线评价血清 miR-135a-5p 在乳腺癌中的诊断效能,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。阳性预测值及阴性预测值根据诊断实验评价四格表计算。

2 结果

2.1 3 组血清 miR-135a-5p 的相对表达水平及 CA125 比较 由 RT-PCR 检测结果可知,乳腺癌组、乳腺增生组、体检健康组血清 miR-135a-5p 的相对表达水平分别为 2.397(1.041, 4.362)、0.935(0.398, 1.917)、0.918(0.189, 1.403),血清 CA125 表达水平分别为 $(179.42 \pm 23.69) \times 10^3$ 、 $(43.48 \pm 9.47) \times 10^3$ 、 $(9.11 \pm 1.62) \times 10^3$ U/L。乳腺癌组血清 miR-135a-5p 的相对表达水平及 CA125 表达水平显著高于乳腺增生组和体检健康组,且差异均有统计学意义($U = 349.0, 308.0$, 均 $P < 0.01$),而乳腺增生组血清 miR-135a-5p 的相对表达水平及 CA125 表达水平与体检健康组比较差异无统计学意义($U = 328.0, P = 0.167$)。

2.2 血清 miR-135a-5p 及 CA125 对乳腺癌的诊断价值 miR-135a-5p 诊断乳腺癌的灵敏度、阳性预测值及阴性预测值均高于 CA125,其诊断特异度与 CA125 相同。miR-135a-5p 联合 CA125 诊断乳腺癌的灵敏度和阴性预测值均有所提升,见表 1。

表 1 血清 miR-135a-5p 及 CA125 对乳腺癌的诊断价值(%)

评价指标	灵敏度	特异度	阳性预测值	阴性预测值
miR-135a-5p	54	92	88	63
CA125	26	92	80	52
miR-135a-5p+CA125	66	92	84	69

2.3 乳腺癌患者血清 miR-135a-5p 相对表达水平与其临床病理特征的相关性分析 乳腺癌患者血清 miR-135a-5p 相对表达水平与肿瘤的 TNM 分期及分化程度密切相关($P < 0.05$),而与患者的年龄、是否绝经、肿瘤大小、病理类型无明显相关性($P > 0.05$),见表 2。

表 2 乳腺癌患者血清 miR-135a-5p 相对表达水平与其临床病理特征的相关性

项目	n	miR-135a-5p 相对表达水平 [M(P ₂₅ , P ₇₅)]	U	P
年龄			229.0	0.663
≥60 岁	37	1.987(1.016, 3.495)		
<60 岁	43	2.653(0.904, 4.279)		
绝经			238.0	0.216
是	31	3.107(1.194, 5.598)		
否	49	2.246(0.937, 4.352)		
肿瘤直径			263.0	0.399
≥2.5 cm	41	2.491(1.183, 4.106)		
<2.5 cm	39	2.107(0.902, 4.003)		
病理类型			245.0	0.265
浸润型导管癌	42	1.745(0.983, 3.329)		
浸润型小叶癌	38	2.354(1.182, 4.013)		
TNM 分期			203.0	0.012
I~II 期	49	1.607(0.831, 2.874)		
III 期	31	3.548(1.485, 6.112)		
分化程度			214.0	0.027
低分化	34	3.625(1.207, 5.836)		
中、高分化	46	1.749(0.916, 2.788)		

2.4 ROC 曲线分析 采用 ROC 曲线评价血清 miR-135a-5p 在乳腺癌中的诊断效能,其曲线下面积为 0.847(95% CI: 0.609 ~ 0.973),诊断敏感度为 91.82%,特异度为 77.35%,见图 1。

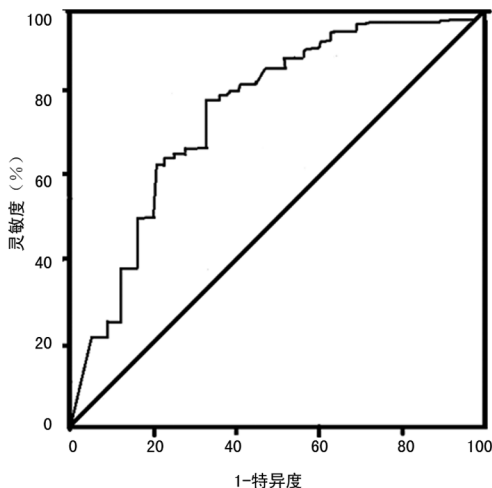


图 1 血清 miR-135a-5p 诊断乳腺癌的 ROC 曲线

3 讨论

乳腺癌为临床常见的恶性肿瘤之一,其发病率呈逐年升高且呈年轻化发展趋势,这对乳腺癌的临床防治带来极大挑战^[7]。有资料显示,每年全世界约有 50 万患者死于乳腺癌,尽管手术联合同步放疗提高了早期乳腺癌的临床治愈率,但对于晚期乳腺癌的治疗尚缺乏有效手段^[8]。因此,探寻乳腺癌的发病机制,明确其早期诊断的生物学标志物成为临床研究的重点。近年来,随着临床对乳腺癌标志物的不断探究,miRNA 越来越受学者的关注,成为肿瘤生物标志物研究的新领域^[9]。miRNA 是近年来发现的一类长度为 18~24 个核苷酸的内源性小 RNA,已有研究证实,miR-29^[10]、miRNA-241^[11]、miRNA-320^[12]等与乳腺癌的发生发展存在相关性。虽然 miRNA 对乳腺癌的早期诊断具有一定价值,但多数研究基于癌组织或细胞 miRNA 的表达差异,在获得检测 miRNA 的肿瘤组织时需行穿刺或有创手术等,因此,此种检测方式不便于临床乳腺癌的广泛筛查。

有资料显示,miRNA 在血液、唾液及尿液中也能被检测到,且外周血中 miRNA 作为肿瘤标志物已取得一定成效^[13]。王攀等^[14]研究报道,血清 miRNA-1246 与乳腺癌的进展密切相关。另有研究报道,miR-21、miR-195、miR-222 在早期乳腺癌患者血清中的表达上调,其对乳腺癌诊断的敏感度分别 63.3%、70.0% 和 70.0%,特异度分别 86.7%、93.3% 和 90.0%^[15]。以上研究结果说明,血清 miRNA 有望成为乳腺癌的诊断标记物,miR-135a-5p 为 RNA-135 家族的重要成员,位于第 3 号染色体,已被证实与多种恶性肿瘤密切相关^[16-17],而其与乳腺癌的关系尚未明确。

本研究显示,乳腺癌患者、乳腺增生患者、体检健康者血清 miR-135a-5p 的相对表达水平分别为 2.397(1.041, 4.362)、0.935(0.398, 1.917)、0.918(0.189, 1.403),由此可知,乳腺癌患者血清 miR-135a-5p 的相对表达水平显著高于乳腺增生患者和体检健康者。结果提示,血清 miR-135a-5p 的高表达可能与乳腺癌的发生存在一定相关性。TAIPALEENMAKI 等^[18]研究报道,miR-135 在转移性乳腺癌患者血清中呈高表达,这与本研究结果一致。CA125 为乳腺癌公认的血清诊断标记物,本研究中,CA125 在乳腺癌患者血清中呈高表达。一般较理想的肿瘤标记物应具有灵敏度及特异性高,阳性预测值及阴性预测值较理想的特点。本研究显示,miR-135a-5p 诊断乳腺癌的灵敏度、阳性预测值及阴性预测值均高于 CA125,其诊断特异度与 CA125 相同;与单指标诊断结果比较,二者联合诊断乳腺癌的灵敏度及阴性预测值均有所提升,结果提示,联合诊断利于提高对乳腺癌的诊断效能。

本研究表明,乳腺癌患者血清 miR-135a-5p 相对表达水平与肿瘤的 TNM 分期及分化程度密切相关,

而与患者的年龄、是否绝经、肿瘤大小、病理类型无明显相关性。结果提示,分期越高、分化程度越低的乳腺癌患者血清 miR-135a-5p 水平呈升高趋势,临床监测乳腺癌患者血清 miR-135a-5p 水平可能对患者病情发展及预后评价有一定意义。进一步采用 ROC 曲线评价血清 miR-135a-5p 在乳腺癌中的诊断效能,其曲线下面积为 0.847(95%CI:0.609~0.973),诊断敏感度为 91.82%,特异度为 77.35%。结果提示,血清 miR-135a-5p 对乳腺癌具有较高的诊断价值。赵宇明等^[19]研究发现,miR-135 在前列腺癌患者血清中呈高表达,可作为前列腺癌诊断和预后的标志物。邓道庭^[20]研究报道,miR-135b-5p 在胃癌外周血中呈高表达。VAN REMVE 等^[21]研究报道,miR-135b-5p 与丙型肝炎病毒(HCV)相关肝癌发生存在相关性。有学者研究发现,miR-135b-5p 诊断头颈部鳞癌的敏感度和特异度均较高。以上研究结果表明,miR-135b-5p 与多种恶性肿瘤的发生发展密切相关,其或将成为早期恶性肿瘤的一个非侵入性诊断标志物。

综上所述,miR-135a-5p 在乳腺癌患者血清中表达明显上调,血清 miR-135a-5p 对乳腺癌诊断的敏感性和特异性均较高,其或将成为乳腺癌临床诊断的生物学标志物之一。今后,本院会加大对样本量的收集,深入探讨血清 miRNA 对恶性肿瘤的诊断价值,以期临床诊疗提供更有价值的参考。

参考文献

- [1] 徐兵河,邵志敏,胡夕春,等.中国早期乳腺癌卵巢功能抑制临床应用专家共识(2016年版)[J].中国癌症杂志,2016,26(8):712-720.
- [2] 魏雪菲,许守林,冯雪凤.血清肿瘤标记物在乳腺癌临床分期中的诊断价值[J].实用临床医药杂志,2017,21(9):227-228.
- [3] 蒲瑞雪,赵芹.癌胚抗原(CEA)与糖类抗原(CA125、CA153)对乳腺癌的诊断价值[J].医学检验与临床,2016,27(1):60-61.
- [4] 刘夏,浦春,黄丽珠.乳腺癌相关 miRNA 的研究进展[J].临床输血与检验,2017,19(4):413-416.
- [5] 冷洪锐,孔繁菲,马晓欣.miR-135a-5p 在子宫内膜癌中的表达及意义[J].中国医科大学学报,2017,46(6):485-488.
- [6] 王钦君,张红春,申娟娟,等.miR135a-5p 在结直肠癌患者血清中的表达及意义[J].中华肿瘤杂志,2016,38(12):909-914.
- [7] 刘洋,董毅龙.miRNA 在乳腺癌中作用的研究进展[J].实用肿瘤杂志,2017,32(4):300-303.
- [8] 冯雪松,鲁明骞.miRNA 与乳腺癌治疗抵抗的关系及机制研究进展[J].实用医学杂志,2017,33(14):2412-2414.
- [9] 王野,畅智慧,赵相轩,等.血清中 microRNA 在预测肝细胞癌患者预后作用的研究探讨[J].实用肿瘤学杂志,2016,30(2):142-145.
- [10] 王燕,于洋,李擎,等.miRNA-29 在正常乳腺、原发性乳腺癌及转移性乳腺癌组织中的表达意义[J].实用癌症杂志,2016,31(11):1763-1766.
- [11] 李芳,翟从劼,田延锋,等.miRNA-214 在乳腺癌组织中的表达及其意义[J].中国肿瘤,2016,25(10):816-819.
- [12] 程学远,黄忠.miR-320 在乳腺癌组织中的表达及临床意义[J].中国现代医学杂志,2017,27(15):58-61.
- [13] 刘洪璐,王熙才.外周血 miRNA 应用于肿瘤早期诊断的研究进展[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2018,7(2):109-117.
- [14] 王攀,朱杰,顾婉红,等.微 RNA-1246 在乳腺癌患者中的临床意义[J].检验医学,2017,32(7):586-589.
- [15] 张文昭,李莹,陶才华.血清 miR-21、miR-195、miR-222 联合检测对早期乳腺癌的诊断价值[J].海南医学院学报,2016,22(14):1591-1593.
- [16] 殷保兵,王一飞,杨光华,等.miR-135a-5p 抑制胆囊癌细胞增殖的研究[J].外科理论与实践,2014,11(2):140-144.
- [17] WANG Q J, ZHANG H C, SHEN X J, et al. Serum miRNA-135a-5p as an auxiliary diagnostic biomarker for colorectal cancer[J]. Ann Clin Biochem, 2017, 54(1):76-85.
- [18] TAIPALEENMAKI H, BROWNE G, ZUSTIN J, et al. Targeting Runx2 By Mir-135 and Mir-203 impairs breast cancer metastasis and progression of osteolytic bone disease [J/OL]. [2018-04-30]. <http://abstracts.ect-sibms2015.org/ectsibms/0001/ectsibms0001P128.htm>.
- [19] 赵宇明,张悦,王华,等.miR-135 在前列腺癌中的诊断价值研究[J].中国实验诊断学,2018,11(3):1072-1073.
- [20] 邓道庭.miR-191-5p 和 miR-135b-5p 在胃癌外周血中的表达及临床意义[D].武汉:武汉科技大学,2016.
- [21] VAN RENNE N, SUAREZ A A, DUONG F H, et al. miR-135a-5p-mediated downregulation of protein tyrosine phosphatase receptor delta is a candidate driver of HCV-associated hepatocarcinogenesis[J]. Gut, 2018, 67(5):953-962.

(收稿日期:2018-12-12 修回日期:2019-01-27)