



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.05.016  
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.05.016  
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(5):696-700.

· 基础研究 ·

## 乳腺癌循环 miRNA 生物标志物的筛选及验证

杨浚沅, 王龙强, 李海, 钟源, 江学庆

(湖北省武汉市中心医院 甲状腺乳腺外科, 湖北 武汉 430014)

### 摘要

**目的:** 寻找可作为乳腺癌敏感生物标志物的循环 miRNA。

**方法:** 首先用 qRT-PCR 方法测定 80 例乳腺癌患者与 80 例健康对照者循环中 6 个候选 miRNA (miR-9、miR-335、miR-205、miR-10b、miR-125b、miR-34a) 中表达水平, 筛选出改变显著的 miRNA; 然后再次收集 80 例乳腺癌患者和 80 例健康对照者, 进一步验证筛选出的 miRNA, 并通过受试者工作特征 (ROC) 曲线的曲线下面积 (AUC) 分析这些 miRNA 诊断乳腺癌的准确度, 并与 CA15-3 比较。

**结果:** 筛选与验证均显示, 与健康对照者比较, 乳腺癌患者循环 miR-9 水平明显升高, 而 miR-335 与 miR-205 明显降低 (均  $P < 0.05$ ); miR-9、miR-335、miR-205 的诊断乳腺癌的 AUC 分别为 0.859 (95% CI=0.814~0.911), 0.920 (95% CI=0.885~0.959)、0.899 (95% CI=0.861~0.939), 且 miR-9、miR-335 和 miR-205 联合检测的 AUC 值 (0.924, 95% CI=0.895~0.953) 明显高于 CA15-3 的 AUC 值 (0.874, 95% CI=0.834~0.914) ( $P < 0.05$ )。

**结论:** 循环 miR-9、miR-335、miR-205 是乳腺癌的敏感生物标志物, 且联合检测更有利于提高乳腺癌诊断的准确率。

### 关键词

乳腺肿瘤; 微 RNAs; 肿瘤标记, 生物学  
中图分类号: R737.9

## Screening and verification of circulating miRNA biomarkers of breast cancer

YANG Junfeng, WANG Longqiang, LI Hai, ZHONG Yuan, JIANG Xueqing

(Department of Thyroid and Breast Surgery, Wuhan Central Hospital, Wuhan 430014, China)

### Abstract

**Objective:** To seek the circulating miRNAs that can be used as sensitive biomarkers of breast cancer.

**Methods:** Firstly, the expression levels of six candidate miRNAs (miR-9, miR-335, miR-205, miR-10b, miR-125b, and miR-34a) in blood circulation of 80 breast cancer patients and 80 healthy control subjects were measured by qRT-PCR, to screen out the miRNAs that changed significantly. Then, in another population of 80 breast cancer patients and 80 healthy control subjects, the miRNAs that were screened out were verified, and their diagnostic accuracy for breast cancer were analyzed through the area under the curve (AUC) of receiver operating characteristics (ROC) curve, which were also compared with that of A15-3.

**Results:** Both screening and verification showed that the circulating level of miR-9 was increased while the circulating levels of miR-335 and miR-205 were decreased significantly in breast cancer patients compared with

收稿日期: 2015-03-20; 修订日期: 2015-04-24。

作者简介: 杨浚沅, 湖北省武汉市中心医院住院医师, 主要从事乳腺及甲状腺外科方面的研究。

通信作者: 江学庆, Email: xueqingj@hotmail.com

healthy controls (all  $P < 0.05$ ). The AUC of miR-9, miR-335 and miR-205 for diagnosis of breast cancer was 0.859 (95% CI=0.814–0.911), 0.920 (95% CI=0.885–0.959) and 0.899 (95% CI=0.861–0.939) respectively, and the AUC value of the combined detection of the three miRNAs (0.924, 95% CI=0.895–0.953) was significantly higher than that of CA15-3 (0.874, 95% CI=0.834–0.914) ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** Circulating miR-9, miR-335 and miR-205 are sensitive biomarkers for breast cancer, and their combined detection may help improve the diagnostic accuracy of breast cancer.

**Key words** Breast Neoplasms; MicroRNAs; Tumor Markers, Biological

**CLC number:** R737.9

乳腺癌是最常见的女性恶性肿瘤,占女性所有癌症的22.9%<sup>[1]</sup>。因此,发现更为敏感的生物标志物以用于乳腺癌的诊断具有重要的临床意义。大量的研究表明,微小RNA(microRNA, miRNA)在乳腺癌的发生、转移和增殖过程中具有关键性的调节作用,可能用于乳腺癌的诊断<sup>[2]</sup>。miR-10b在乳腺癌中高表达并且与乳腺癌细胞系的转移相关<sup>[3]</sup>。miR-9的表达可激活JAK-STAT途径,导致乳腺癌的肿瘤血管生成<sup>[4]</sup>。Tavazoie等<sup>[5]</sup>报道,miR-335对乳腺癌的侵蚀性具有抑制性作用,抑制miR-335会导致乳腺癌细胞系的侵袭和迁移增加。此外,miR-205在乳腺癌细胞中的表达比正常乳腺细胞中的表达下调<sup>[6]</sup>。miRNA的表达也影响着乳腺癌细胞对化疗药物的反应。比如,降低循环miR-125b的表达水平会增加乳腺癌细胞对化疗药物的敏感性<sup>[7]</sup>;Kastl等<sup>[8]</sup>也发现当miR-34a的循环表达水平增高时,乳腺癌细胞对多西他赛的耐药性增加。

本研究的目的是,通过两个段的病例对照研究及与乳腺癌最重要的生物标记物糖类抗原15-3(CA15-3)的比较<sup>[9]</sup>。探索6个候选循环miRNA作为乳腺癌敏感生物标志物的潜力。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究人群

2012年3月—2013年6月间,从华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院住院患者中挑选80名乳腺癌患者,并从门诊经全面检查确定为未罹患相关恶性肿瘤的人群中挑选80名健康对照者;进行第一阶段(筛选阶段)循环血miR-9、miR-335、miR-205、miR-10b、miR-125b和miR-34a测定。2013年8月—2014年12月间,再次从住

院患者中挑选80名乳腺癌患者,从门诊经全面检查确定为未罹患相关恶性肿瘤的人群中挑选80名健康对照者,进行第二阶段(验证阶段)循环血miR-9、miR-335、miR-205和CA15-3测定。本研究中所选择患者均为浸润性导管癌。所有参与者均为汉族女性,以排除基因差异性干扰。所有患者与对照者按照年龄和是否绝经进行匹配。手术和/或化疗前采集患者空腹血样。所有提取血浆样品在-80℃冰箱中保存。为了最大限度地减少冻-融过程对循环miRNA浓度的影响,将之前未被解冻过的血浆样品用于本研究。

### 1.2 RNA提取

根据mirVana PARIS miRNA提取试剂盒(Ambion 1556, Austin, TX)提供的实验操作流程从200 μL人血浆中提取总RNA。为了使样本间变异标准化,将合成的秀丽隐杆线虫miRNA CELlet-7(miRNA寡核苷酸由Qiagen公司合成)加入(按10 μL总体积加入50 fmol混合物)每个变性样品中。

### 1.3 qRT-PCR

用TaqMan miRNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems, Foster City, CA)对输入RNAs进行逆转录,miRNA特异性引物由试剂盒厂商提供,小规模RT反应条件:16℃ 30 min, 42℃ 30 min, 85℃ 5 min。按1:10比例稀释逆转录产物,并用TaqMan miRNA的检测试剂盒(Applied Biosystems, Foster City, CA)按复孔进行定量PCR检测。将反应体系:TaqMan 2× Universal PCR Master Mix, 2 μL, 不含AmpErase UNG; TaqMan miRNA Assay, 0.2 μL; 稀释后RT产物, 2.5 μL; 其它成分在总体积的master mix中按比例加入。反应进行条件:95℃ 10 min; 95℃ 20 s, 62℃ 2 min, 40个周期。miRNA根据cel-

let-7进行标准化,并按 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方程进行计算,其中 $\Delta\Delta CT = CT(miRNA) - CT(ce1-let-7)$ 。

#### 1.4 CA15-3测定

化学发光免疫分析法测定第二阶段160名研究对象循环血CA15-3水平。

#### 1.5 统计学处理

连续变量结果表示为均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )。病例组和对照组之间的差异特征用 $\chi^2$ 检验或单向AVNOA检验检测数据正态性分布,用Mann-Whitney U检验检测偏度系数。循环miRNA为高偏数据,因此采用Mann-Whitney U检验检查组间差异。输入循环miRNA及CA15-3的表达水平并进行受试者工作特征(ROC)曲线分析,计算曲线

下面积(AUC)。用SPSS 11.0软件进行统计学分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 研究人群特征

两阶段研究人群的临床特征总结在表1中。两阶段研究人群乳腺癌组与对照组间的年龄、初潮年龄、质量指数(BMI)、停经状态等均无统计学差异(均 $P>0.05$ ),但乳腺癌组癌症家族史均明显高于对照组(均 $P<0.05$ )。两组研究人群的乳腺癌初始转移率分别为36%和30%,差异有统计学意义( $P<0.05$ )(表1)。

表1 研究人群的基本特征( $n=80$ )

Table 1 Summary characteristics of the population ( $n=80$ )

变量	筛选阶段		P	验证阶段		P
	对照组	乳腺癌组		对照组	乳腺癌组	
年龄(岁)	49.14 $\pm$ 2.39	49.55 $\pm$ 1.98	0.752	48.25 $\pm$ 2.25	49.43 $\pm$ 2.50	0.671
月经初潮年龄(岁)	16.23 $\pm$ 0.59	15.65 $\pm$ 0.43	0.052	15.95 $\pm$ 0.28	15.43 $\pm$ 0.53	0.055
停经[n(%)]						
停经前	49(61.3)	46(57.5)	0.629	47(58.8)	50(62.5)	0.627
停经后	31(38.7)	34(42.5)		33(41.2)	30(37.5)	
癌症家族史[n(%)]						
是	2(2.5)	10(12.5)	0.016	3(3.8)	11(13.8)	0.025
否	78(97.5)	70(87.5)		77(96.2)	69(86.2)	
BMI	23.02 $\pm$ 2.15	23.73 $\pm$ 3.05	0.178	22.62 $\pm$ 2.52	23.39 $\pm$ 2.78	0.167
CA15-3(U/mL)	—	—	—	12.68 $\pm$ 8.25	63.27 $\pm$ 48.56	0.036
转移率(%)	—	36	—	—	30	—

### 2.2 乳腺癌患者循环差异 miRNA 筛选

用qRT-PCR检测第一阶段人群循环血miR-9、miR-335、miR-205、miR-10b、miR-125b和miR-34a的表达水平。结果显示,乳腺癌组的miR-9循环水平明显升高( $P=0.03$ ),而miR-335和miR-205明显降低( $P=0.02$ , $P=0.02$ );两组间的miR-10b,miR-125b和miR-34a的循环水平无明显差异( $P=0.43$ , $P=0.20$ , $P=0.33$ )(图1)。

### 2.3 乳腺癌患者循环差异 miRNA 验证及其对乳腺癌诊断准确性

用qRT-PCR检测第二阶段人群循环血上述3个miRNA水平,结果显示,乳腺癌患者组的循环

miR-9水平明显升高( $P=0.03$ ),miR-335和miR-205水平均明显下降( $P=0.02$ , $P=0.01$ )(图2)。

用ROC曲线分析来评估循环miRNA在总体人群中将乳腺癌患者与健康对照者区别开来的准确度,结果显示,miR-9、miR-335和miR-205的AUC分别为0.859(95%CI=0.814~0.911),0.920(95%CI=0.885~0.959)和0.899(95%CI=0.861~0.939)。miR-9、miR-335和miR-205联合检测的AUC值(0.924,95%CI=0.895~0.953)明显高于CA15-3的AUC值(0.874,95%CI=0.834~0.914)( $P<0.05$ )(图3)。

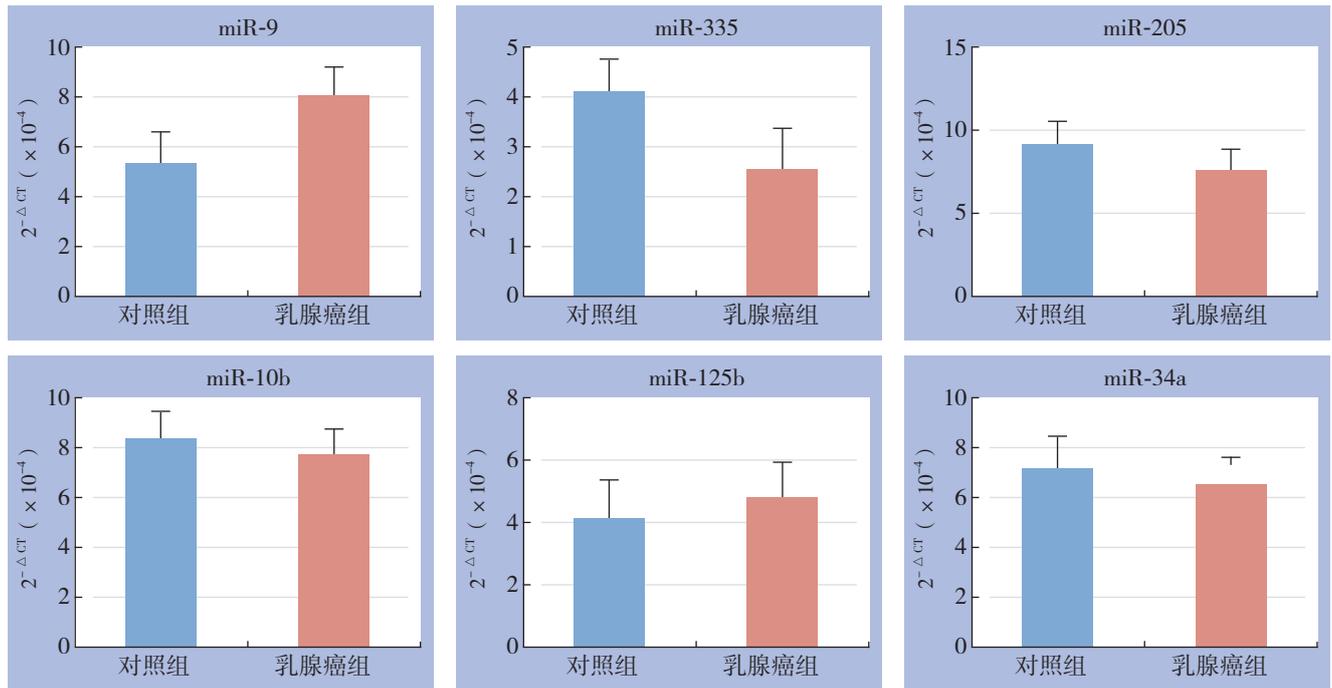


图 1 第一阶段两组循环 miRNA 表达情况

Figure 1 The circulating miRNAs in the two groups in the first experimental stage

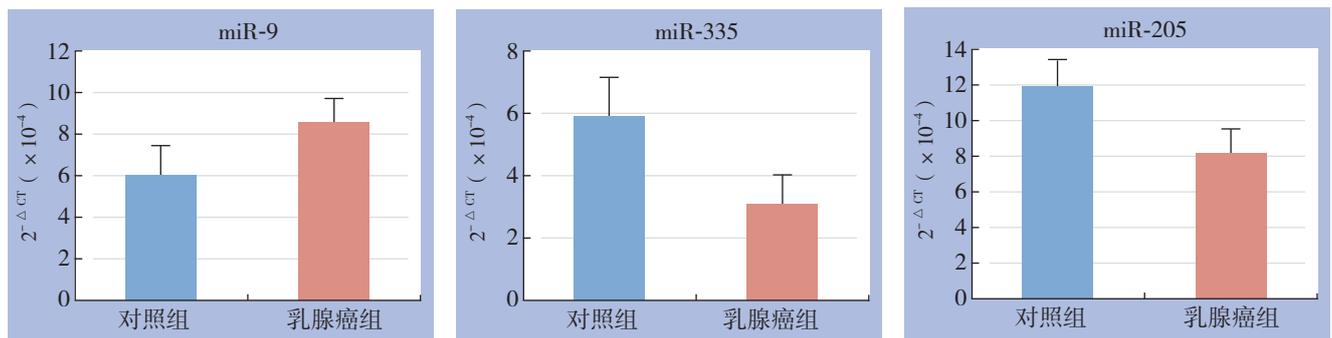


图 2 第二阶段两组循环 miRNA 验证情况

Figure 2 Verification of the circulating miRNAs in the two groups in the second experimental stage

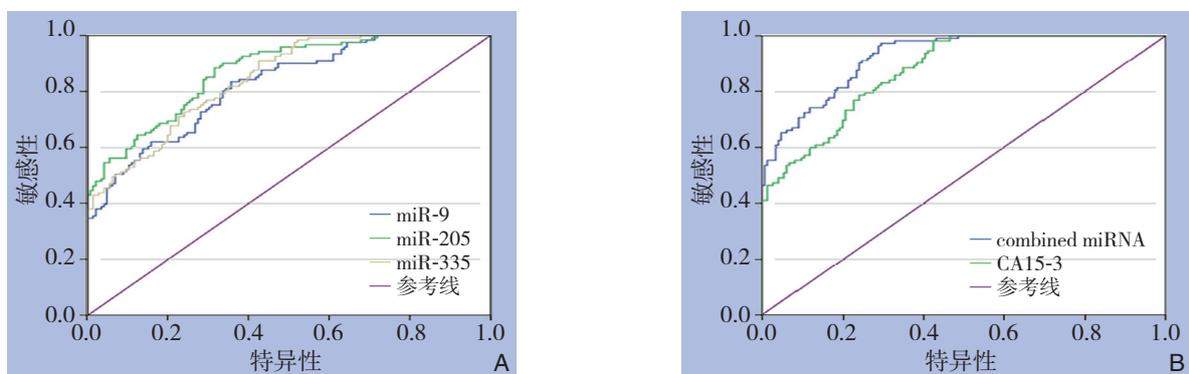


图 3 ROC 曲线分析 A: 3 个 miRNA 各自的 ROC 曲线; B: CA15-3 及 3 个 miRNA 联合的 ROC 曲线

Figure 3 ROC curve analysis A: ROC curves of the three miRNAs; B: ROC curves of CA15-3 and combination of the three miRNAs

### 3 讨论

本研究<sup>[10]</sup>表明, 乳腺癌患者血液循环中的

miR-9 显著升高, miR-335 和 miR-205 显著下降。这 3 个 miRNA 的作用也在其它癌症研究中得到了证实。miR9 在肝细胞癌、结肠直肠癌中表达上

调<sup>[11-12]</sup>。miR-335表达也在几种癌症中降低<sup>[13-14]</sup>，恢复miR-335水平可以诱导肿瘤抑制<sup>[15]</sup>。口腔癌、前列腺癌、膀胱癌和恶性黑色素瘤中都发现miR-205表达下降，且研究<sup>[16-19]</sup>认为miR-205是一种肿瘤抑制性miRNA。

循环中的miRNA高度相互关联，因而miRNA联合测定比单个miRNA测定更为可信。本研究发现3个循环miRNA联合起来比单个miRNA或CA15-3有更大的AUC值，能够将癌症患者与健康对照者更敏感的区别开。带有大范围网络分析的芯片研究也表明，联合miRNA检测在提供敏感和特异的诊断检测过程中具有潜在优势<sup>[20-21]</sup>。

总之，本研究首次证明了miR-9、miR-335和miR-205是乳腺癌的敏感生物标志物。但未能根据患者的免疫组化分型来细化患者群体，并进一步探究特殊分型的乳腺癌及对化疗药物的敏感性是否与特异的miRNA循环表达水平相关；以及未能提供循环miRNA水平异常的分子生物机制。这些都亟待进一步继续研究，以发掘miRNA在乳腺癌诊疗中更为重要的临床意义。

#### 参考文献

- [1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12):2893-2917.
- [2] Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(16):7065-7070.
- [3] Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer[J]. *Nature*, 2007, 449(7163):682-688.
- [4] Selcuklu SD, Donoghue MT, Mehmet K, et al. MicroRNA-9 inhibition of cell proliferation and identification of novel miR-9 targets by transcriptome profiling in breast cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 287(35):29516-29528.
- [5] Tavazoie SF, Alarcón C, Oskarsson T, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis[J]. *Nature*, 2008, 451(7175):147-152.
- [6] Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1[J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(5):593-601.
- [7] Wang H, Tan G, Dong L, et al. Circulating MiR-125b as a marker predicting chemoresistance in breast cancer[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4):e34210. doi: 10.1371/journal.pone.0034210.
- [8] Kastl L, Brown I, Schofield AC. miRNA-34a is associated with docetaxel resistance in human breast cancer cells[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 131(2): 445-454.
- [9] Ludwig JA, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection[J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(11): 845-856.
- [10] Cekaite L, Rantala JK, Bruun J, et al. MiR-9, -31, and -182 deregulation promote proliferation and tumor cell survival in colon cancer[J]. *Neoplasia*, 2012, 14(9):868-879.
- [11] Zhu L, Chen H, Zhou D, et al., MicroRNA-9 up-regulation is involved in colorectal cancer metastasis via promoting cell motility[J]. *Med Oncol*, 2012, 29(2):1037-1043.
- [12] Tan HX, Wang Q, Chen LZ, et al., MicroRNA-9 reduces cell invasion and E-cadherin secretion in SK-Hep-1 cell[J]. *Med Oncol*, 2010, 27(3):654-660.
- [13] Yan Z, Xiong Y, Xu W, et al. Identification of hsa-miR-335 as a prognostic signature in gastric cancer[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7):e40037. doi: 10.1371/journal.pone.0040037.
- [14] Xu Y, Zhao F, Wang Z, et al. MicroRNA-335 acts as a metastasis suppressor in gastric cancer by targeting Bcl-w and specificity protein 1[J]. *Oncogene*, 2012, 31(11):1398-1407.
- [15] Lynch J, Fay J, Meehan M, et al. MiRNA-335 suppresses neuroblastoma cell invasiveness by direct targeting of multiple genes from the non-canonical TGF-beta signalling pathway[J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(5):976-985.
- [16] Kim JS, Yu SK, Lee MH, et al. MicroRNA-205 directly regulates the tumor suppressor, interleukin-24, in human KB oral cancer cells[J]. *Mol Cells*, 2013, 35(1):17-24.
- [17] Tucci P, Agostini M, Grespi F, et al. Loss of p63 and its microRNA-205 target results in enhanced cell migration and metastasis in prostate cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(38):15312-15317.
- [18] Hanna JA, Hahn L, Agarwal S, et al. In situ measurement of miR-205 in malignant melanoma tissue supports its role as a tumor suppressor microRNA[J]. *Lab Invest*, 2012, 92(10):1390-1397.
- [19] Wang G, Chan ES, Kwan BC, et al. Expression of microRNAs in the urine of patients with bladder cancer[J]. *Clin Genitourin Cancer*, 2012, 10(2):106-113.
- [20] Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, et al. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes[J]. *Circ Res*, 2010, 107(6):810-817.
- [21] Liu R, Zhang C, Hu Z, et al. A five-microRNA signature identified from genome-wide serum microRNA expression profiling serves as a fingerprint for gastric cancer diagnosis[J]. *Eur J Cancer*, 2011, 47(5):784-791.

( 本文编辑 宋涛 )

本文引用格式：杨浚泓，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. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.05.016

Cite this article as: YANG JF, WANG LQ, LI H, et al. Screening and verification of circulating miRNA biomarkers of breast cancer[J]. *Chin J Gen Surg*, 2015, 24(5):696-700. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.05.016