

# miR-127-3P 在乳腺癌患者中的表达及意义

Significance and Expression of miR-127-3P in Patients with Breast Cancer

DIAN Hui, KU Wu-fui, HE Ming-chang

典 辉, 库无非, 何明长

(平顶山市第二人民医院, 河南 平顶山 467000)

**摘 要:** [目的] 探讨乳腺癌患者血浆 miR-127-3P 表达及其临床意义。[方法] 采用实时荧光定量 PCR 法检测 60 例乳腺癌患者癌及癌旁组织 miR-127-3P 的表达, 并进一步检测 60 例乳腺癌患者及 20 名正常志愿者血浆 miR-127-3P 的表达。[结果] miR-127-3P 在乳腺癌患者治疗前血浆中的表达 ( $8.15 \pm 1.10$ ) 高于正常人血浆 ( $3.85 \pm 0.54$ ) ( $P < 0.05$ )。miR-127-3P 在乳腺癌组织中的表达高于癌旁组织 ( $P < 0.05$ )。治疗前血浆中 miR-127-3P 表达与癌组织 miR-127-3P 表达呈正相关 ( $r = 0.812$ ,  $P = 0.000$ ); 治疗前血浆中 miR-127-3P 表达与 CA153 表达呈正相关 ( $r = 0.786$ ,  $P = 0.000$ )。[结论] miR-127-3P 在乳腺癌患者血浆中表达水平明显上调, 其表达能够反映癌组织中 miR-127-3P 的表达水平, 乳腺癌患者血浆中 miR-127-3P 能成为乳腺癌筛查的一个潜在指标。

**关键词:** miR-127-3P; 乳腺癌; 血浆

**中图分类号:** R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2017)07-0639-04

**doi:** 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.07.B017

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤。乳腺癌发病率占全身各种恶性肿瘤的 7%~10%<sup>[1]</sup>。现阶段, 临床上主要使用的乳腺癌血清肿瘤标志物为 CA153、CEA 等, 虽然这些肿瘤标志物的检测有助于提高乳腺癌的早期检出率和诊断性能, 但其敏感度较低, 特异性较差<sup>[2,3]</sup>。微小核糖核酸(microRNA, miRNA)可参与细胞增殖、细胞凋亡、细胞代谢、胚胎发育等一系列重要过程<sup>[4,5]</sup>。研究报道, 在恶性肿瘤患者血浆里可以检测到 miRNA, 这种 miRNA 来源于肿瘤组织, 且受内源性 RNA 酶的保护<sup>[6]</sup>。乳腺癌相关研究显示, 乳腺癌患者血液中具有特异的 miRNA, 这种 miRNA 与患者的淋巴结转移、临床分期及预后等相关<sup>[7]</sup>。本研究拟通过 RT-PCR 检测乳腺癌患者血浆、癌组织、癌旁组织及正常人血浆中 miR-127-3P 的表达, 进一步分析血浆中 miR-127-3P 表达在乳腺癌患者中的临床价值。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

选取我院 2015 年 1 月至 2016 年 9 月收治并行

**通讯作者:** 何明长, 副主任医师, 本科; 平顶山市第二人民医院普外一科, 河南省平顶山市曙光街 49 号 (467000); E-mail: 147898968@qq.com

**收稿日期:** 2016-12-11; **修回日期:** 2017-04-10

手术治疗的乳腺癌患者 60 例, 选取同时间来我院体检的正常志愿者 20 名。乳腺癌患者年龄 33~65 岁, 平均年龄  $52.4 \pm 3.5$  岁, 临床分期为 II~III 期, 术前行彩超及 CT 证实无远处转移, 术后行 FEC(环磷酰胺 500mg/m<sup>2</sup>, 氟尿嘧啶 500mg/m<sup>2</sup>, 吡柔比星 45mg/m<sup>2</sup>) 化疗 6 个周期或 AC-T(吡柔比星 45mg/m<sup>2</sup> 加环磷酰胺 600 mg/m<sup>2</sup> 序贯多西他赛 75mg/m<sup>2</sup>) 化疗 8 个周期, 尚未行内分泌治疗或放疗者。对照组年龄 34~66 岁, 平均年龄  $53.5 \pm 5.5$  岁。乳腺癌组织标本取自病灶处肿块, 癌旁组织取自距肿瘤边缘 3~5cm 处; 乳腺癌患者血液标本于患者入院接受治疗前采取 1 次, 院内化疗后采取 1 次, 5ml/次。血液标本采取完毕后立即给予离心处理, 2500~3000r/min, 8~10min; 收集上清液, 并保存于 -80℃ 低温箱, 备用。该研究经医院伦理委员会批准, 研究者均签署知情同意书。

### 1.2 仪器与试剂

紫外分光光度计 (Implen 公司, 德国); 高速冷冻离心机 (Hitachi 公司, 日本); 普通 PCR 仪 (BIO-RAD 公司, 美国); 7500Real Time PCR 仪 (ABI 公司, 美国); 各种型号移液器 (Gilson 公司, 法国); 逆转录试剂 (Fermentas 公司, 立陶宛); miRNeasy Mini kit (QIAGEN 公司, 德国); Fast Stat Universal SYBR Green I Master (Roche 公司, 德国); All-in-One™ miRNA qRT-PCR 试剂盒 (默金斯生物技术有限公

司); Trizol (Invitrogen, 美国)。

### 1.3 RNA 抽提

采用 Trizol 试剂盒 (购自 Invitrogen 公司) 说明书抽提血液总 RNA, 具体步骤如下: (1) 按混合血清样本体积 2:1 的比例加入 TRIzol, 震荡混匀, 室温条件放置 15min, 静置后加入体积为 TRIzol 量的 1/5 氯仿, 震荡混匀, 室温放置。(2) 静置后 2 份样本离心 (4℃, 12 000g×15min), 收集上清液。(3) 收集的上清液置于除酶 EP 管中, 加入与上清体积相同的水饱和酚溶液, 充分震荡混匀, 离心 (4℃, 12 000g×5min)。(4) 收集的上清液中加入上清体积量 1/2 的水饱和酚及 1/2 的氯仿, 充分震荡混匀, 离心 (4℃, 12 000g×5min)。(5) 收集的上清液中加入上清体积量等体积的氯仿, 充分震荡混匀, 离心 (4℃, 12 000g×5min)。(6) 收集的上清液中加入上清体积量等体积的异丙醇, 充分震荡混匀, 离心 (4℃, 12 000g×5min)。去除上清, 沉淀中加入 1ml 75% 乙醇洗涤, 离心 (4℃, 12 000g×15min), 去除上清, 沉淀中加入 1ml TRIzol 洗涤, 离心 (4℃, 12 000g×15min)。(7) 用 TRIzol 再次完全溶解沉淀, 加入 1/5 TRIzol 体积的氯仿, 轻柔混匀室温条件静置 10min, 离心 (4℃, 12 000g×5min)。(8) 收集上清, 加入等体积的异丙醇, 冰上放置 10min, 离心 (4℃, 12 000g×15min)。(9) 去除上清, 沉淀中加入 1ml 75% 乙醇洗涤, 轻柔涡旋颠倒数次, 离心 (4℃, 12 000g×15min)。(10) 去除上清, 使沉淀干燥, 加入 20μl DEPC 水溶解 RNA 并测定记录浓度。NanoDrop 超微量分光光度仪用于检测所提取 RNA 浓度及质量。纯度要求 A260/A280 比值大于 1.90, 且电泳结果显示总 RNA 有清晰的 28s 和 18s 条带, 两者亮度比大于或近 2:1 的样本用于基因芯片检测及 Real-time PCR 检测。

### 1.4 实时荧光定量 PCR 分析 miR-127-3P 的表达

采用 All-in-One™ miRNA qRT-PCR 试剂盒将上述提取的 RNA 进行逆转录和实时荧光定量 PCR 检测。逆转录引物: 5'-ACCCTCAACTGGCAATGTCGTGGACGGCAATTAAGCCCAAGC-3'; miR-127-3P 上游 5'-GAAGATCTGTAGTCCTGTCTGTTGGT-CAG-3', 下游 5'-CCCAAGCTTCCTGAAGAACTGCT-TCCGCC-3'; U6: 上游 5'-TCGCTTCGGCAGCAC-3', 下游 5'-AACGCTTCACGAATTTGCCT-3'。逆转录反应程序为: 16℃ 30min, 42℃ 30min, 75℃ 15min。结

束后立即将 cDNA 产物取出, 快速置于冰上冷却, 后续所有步骤均在冰上进行。将 cDNA 产物稀释 5 倍后进行荧光定量 PCR。PCR 反应程序为: 95℃ 预变性 3min; 95℃ 变性 12s, 62℃ 延伸 1min, 共 40 个循环; 95℃ 终延伸 15s。确认 Real-time PCR 反应的扩增曲线及溶解曲线, 判断扩增效率及特异性; 调节基线至适宜处, 各扩增曲线与基线的交叉点对应的横坐标即为 CT 值; miRNA 计算方法根据  $\Delta CT$  和  $\Delta\Delta CT$  表示,  $\Delta CT$  等于样本 CT 值减去内参 CT 值,  $\Delta\Delta CT$  等癌症组织  $\Delta CT$  减去正常组织  $\Delta CT$ , U6 为内参。CT 值是荧光强度达到设定阈值时所经过的对应扩增循环次数<sup>[8]</sup>。

### 1.5 肿瘤标志物 CA153 检测

取所有研究对象化疗前的外周静脉血 3.0ml, 1000g 离心 8min, 然后取上清液, 使用 i2000SR 化学发光仪 (雅培公司, 美国) 检测 CA153。操作严格参照说明书。

### 1.6 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计学软件进行数据分析。患者血液及组织标本中 miR-127-3P 等指标的表达, 差异检验采用 *t* 检验; miR-127-3P 表达与各临床病理参数之间的关系使用 Pearson 相关分析; 采用 ROC 分析 miR-127-3P、CA153 在乳腺癌诊断中的诊断价值。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结 果

### 2.1 miR-127-3P 在正常人和乳腺癌患者化疗前后的表达

miR-127-3P 在患者治疗前血浆中的表达高于正常人血浆 ( $8.15 \pm 1.10$  vs  $3.85 \pm 0.54$ ,  $P < 0.05$ ); miR-127-3P 在乳腺癌组织中的表达高于癌旁组织 ( $8.56 \pm 1.48$  vs  $4.04 \pm 0.66$ ,  $P < 0.05$ ); 患者化疗后血浆 miR-127-3P 平均表达水平明显低于治疗前 ( $5.22 \pm 0.87$  vs  $8.15 \pm 1.10$ ,  $P < 0.05$ )。

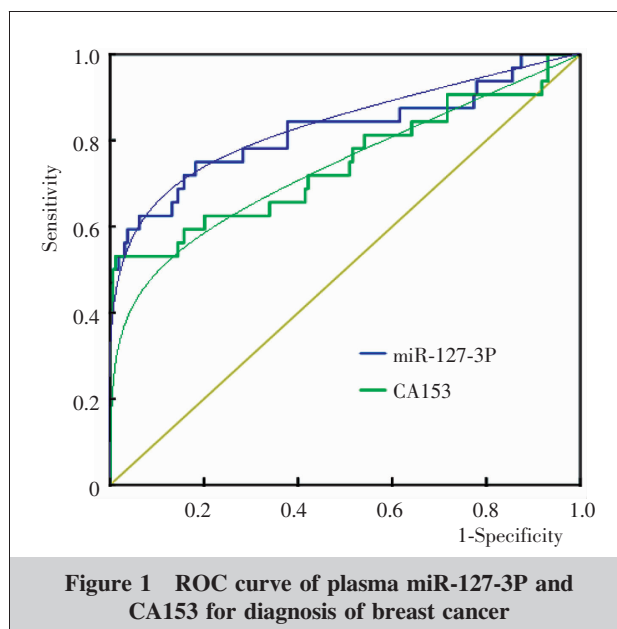
### 2.2 治疗前血浆中 miR-127-3P 与癌组织中 miR-127-3P 及血浆 CA153 相关性

治疗前血浆中 miR-127-3P 表达与癌组织 miR-127-3P 表达呈正相关 ( $r=0.812$ ,  $P=0.000$ ); 治疗前血浆中 miR-127-3P 表达与 CA153 表达呈正相关 ( $r=0.786$ ,  $P=0.000$ )。

### 2.3 血浆 miR-127-3P 和 CA153 诊断乳腺癌效能

患者治疗前血浆 miR-127-3P 表达诊断乳腺癌 ROC 曲线面积为 0.822(95%CI:0.722~0.921),经软件平滑处理后,其阈值点是 4.16,故取 4.2 为诊断截点。此阈值点敏感度为 81.7%,特异性为 6.50%。

治疗前血浆 CA153 诊断乳腺癌 ROC 曲线面积为 0.682(95%CI:0.541~0.810),经软件平滑处理后,其阈值点是 10.36,故取 10.4 为诊断截点。此阈值点的敏感度为 71.7%,特异性为 50.0%。



## 3 讨论

miRNA 可以分为两大类:一类以癌基因发挥作用,以促进肿瘤的发展和转移;另一类则相反,可以通过将癌基因下调,发挥抑癌作用<sup>[9,10]</sup>。近些年来 miRNA 与恶性肿瘤间的关系研究逐渐成为热点。Iorio 等<sup>[11]</sup>用微阵列芯片从乳腺癌组织中筛选出特异表达的 miRNA,并发现了 29 条 miRNA 表达的失调;Wang 等运用荧光定量技术分析 miR-106、miR-119、miR-155、miR-221、miR-335 在乳腺癌患者癌组织中的表达情况,发现 miR-106、miR-155、miR-221 在癌组织中高表达<sup>[12,13]</sup>。

有研究显示,miR-127-3P 在伴有 KRAS 突变的直肠癌以及急性髓细胞性白血病中高表达,在骨肉瘤细胞中则低表达<sup>[14,15]</sup>;此外,miR-127-3P 还可以通过肿瘤靶向抑制基因 SEPT7 促进胶质母细胞瘤细胞的侵袭及远处迁移<sup>[16]</sup>。本研究通过 RT-PCR 检测

20 名正常人血浆和 60 例乳腺癌患者癌组织、相对应的癌旁组织及血浆中 miR-127-3P 的表达。本研究结果显示,miR-127-3P 在癌组织中的相对表达量为  $8.56 \pm 1.48$ ,显著性高于癌旁组织的  $4.04 \pm 0.66$  ( $P < 0.05$ )。说明 miR-127-3P 在乳腺癌组织中高表达。患者治疗前血浆中 miR-127-3P 的表达 ( $8.15 \pm 1.10$ ) 高于正常人血浆 ( $3.85 \pm 0.54$ ) ( $P < 0.05$ ),提示患者治疗前血浆中 miR-127-3P 也是高表达的。

治疗前血浆中 miR-127-3P 的表达与癌组织中 miR-127-3P 的表达呈正相关( $r=0.812, P=0.000$ )。因此推测,乳腺癌患者血浆中 miR-127-3P 的表达水平能够反映癌组织的 miR-127-3P 表达水平。同时又将患者治疗前血浆中 miR-127-3P 的表达量与治疗前血浆中 CA153 表达相关性分析,结果显示两者呈正相关( $r=0.786, P=0.000$ ),进一步提示了 miR-127-3P 可作为乳腺癌血浆中肿瘤标志物的可能。ROC 曲线分析结果显示,治疗前血浆中 miR-127-3P 表达诊断乳腺癌 ROC 曲线下面积高于 CA153 表达,说明血浆中 miR-127-3P 表达水平也可以作为筛查正常人与乳腺癌患者的一个潜在指标。

综上所述,血浆中 miR-127-3P 表达水平可能成为乳腺癌筛查的一个潜在指标。

## 参考文献:

- [1] Checka CM, Chun JE, Schnablel FR, et al. The relationship of mammographic density and age: implications for breast cancer screening [J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2012, 198(3): 292-295.
- [2] Yi L, Liu XM, Ling D, et al. Clinical value of serum CA153, CA125, CEA combined detection in the diagnosis of breast cancer [J]. *Journal of Chongqing Medical University*, 2012, 37(9): 802-805. [易琳, 刘兴明, 林丁, 等. 血清 CA153、CA125、CEA 联合检测在乳腺癌诊断中的价值 [J]. *重庆医科大学学报*, 2012, 37(9): 802-805.]
- [3] Molina R, Barak V, Dalen A, et al. Tumor markers in breast cancer-European Group on Tumor Markers recommendations [J]. *Tumor Biol*, 2005, 26(6): 281-293.
- [4] Plasterk RH. MicroRNAs in animal development [J]. *Cell*, 2006, 124(5): 877-881.
- [5] Poy MN, Spranger M, Stoffel M. MicroRNAs and the regulation of glucose and lipid metabolism [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2007, 9(Suppl 2): 67-73.
- [6] Mitchell P, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood based markers for cancer detection [J].

- Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(30):10513–10518.
- [7] Guo LJ, Zhang QY. Decreased serum miR-181 is a potential new tool for breast cancer screening [J]. Int J Mol Med, 2012, 30(3):680–686.
- [8] Wang W, Sun K, Wu CT, et al. Effect of miR-221-specific inhibitor on the proliferation and apoptosis of human colorectal carcinoma cells [J]. Journal of Southern Medical University, 2011, 31(4):674–677. [王伟, 孙凯, 吴承堂, 等. 特异性 miR-221 抑制剂对结直肠癌细胞增殖及凋亡的影响[J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(4):674–677.]
- [9] Tang F, Hajkova P, Barton SC, et al. MicroRNA expression profiling of single whole embryonic stem cells [J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(2):e9.
- [10] Selcuklu SD, Donoghue MT, Spillane C. miR-21 as a key regulator of oncogenic processes [J]. Biochem Soc Trans, 2009, 37(4):918–925.
- [11] Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA genes expression deregulation in human breast cancer [J]. Cancer Res, 2005, 65(16):7065–7070.
- [12] Zhu W, Qin W, Atasoy U, et al. Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects [J]. BMC Res Notes, 2009, 2:89.
- [13] Wang F, Zheng Z, Guo J, et al. Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor [J]. Gynecol Oncol, 2010, 119(3):586–593.
- [14] Konishi, H, Ichikawa, D, Komatsu, et al. Detection of gastric cancer-associated microRNAs on microRNA microarray comparing pre- and post-operative plasma [J]. Br J Cancer, 2013, 106(4):740–747.
- [15] Le HB, Zhu WY, Chen DD, et al. Evaluation of dynamic change of serum miR-21 and miR-24 in pre- and post-operative lung carcinoma patients [J]. Med Oncol, 2012, 29(5):3190–3197.
- [16] Hiang H, Hua D, Zhang J, et al. miR-127-3P promotes loblastoma cell migration and invasion by targeting the tumor suppressor gene SEPT7[J]. Oncol Rep, 2014, 31(5):2261–2269.

## 凡临床试验都应在中国临床试验注册中心注册

全球临床试验注册制度由世界各国政府共同决定由 WHO 领导建立。临床试验注册具有伦理和科学的双重意义,目的是为了尊重和珍惜所有试验参与者的贡献,他们的贡献用于改善全社会的医疗保健,因此,任何临床试验都与公众利益相关。公开临床试验的信息,并将其置于公众监督之下是试验研究者的义务和道德责任。临床试验注册不仅能确保追溯每个临床试验的结果,公开在研试验或试验结果信息还有助于减少不必要的重复研究。

中国临床试验注册中心(Chinese Clinical Trial Register, ChiCTR)为国家卫生计生委(原卫生部)下属的国家临床试验注册中心,是世界卫生组织国际临床试验注册协作网一级注册机构(World Health Organization International Clinical Trial Registration Platform Primary Register, WHO ICTRP Primary Register),由中国循证医学中心和四川大学华西医院等于 2005 年 7 月 25 日正式成立并运行。

ChiCTR 的宗旨是联合中国和全球的临床医师、临床流行病学家、统计学家、流行病学家和医疗卫生管理者,严格科学地管理中国临床试验信息,提高其质量,为广大医务工作者、医疗卫生服务消费者和政府卫生政策制定者提供可靠的临床试验证据,让医疗卫生资源更好地服务于中国人民和全人类的健康事业。

所有在人体实施的试验均属于临床试验,都应该先注册后实施。凡已注册临床试验都会被授予 WHO ICTRP 全球统一的唯一注册号。

我国众多医学期刊已和中国临床试验注册中心共同建立了临床试验报告发表机制,正在分步实施优先发表、直到只发表具有全球性唯一的注册号的临床试验报告。

ChiCTR 接受中国地区及全球的临床试验注册申请,还接受获得 WHO ICTRP 认证的二级注册机构输送的注册资料,并向 WHO ICTRP 中央数据库输送注册信息供全球检索。除注册临床试验外,ChiCTR 以中国循证医学中心、循证医学教育部网上合作研究中心、中国 Cochrane 中心、英国 Cochrane 中心、四川大学华西医院国际临床流行病学网华西资源与培训中心为人才和技术支持平台,负责指导临床试验设计、中心随机、论文写作、教育培训,推动提高我国临床试验的质量。

通过 ChiCTR 检索入口网址 [www.chictr.org](http://www.chictr.org),公众可方便地查询已注册临床试验信息,并与 WHO 全球检索入口链接,可方便地查询全球已注册临床试验。