

# 微 RNA-223 与微 RNA-29c 在乳腺癌中的表达及意义

何永鹏<sup>1</sup> 张海伟<sup>1</sup> 唐万燕<sup>1</sup> 易琳<sup>1</sup> 李丽仙<sup>1</sup> 曾建挺<sup>2</sup> 房慧颖<sup>3</sup> 犖伟奇<sup>1</sup>

**【摘要】 目的** 研究微 RNA (miRNA)-223 与 miRNA-29c 在乳腺癌组织、癌旁组织(距离肿瘤边缘 2 cm 的非癌组织)以及乳腺癌细胞株中的表达情况,探讨 miRNA-223、miRNA-29c 的表达水平与乳腺癌患者临床病理特征之间的相关性。**方法** 采用回顾性横断面研究方法,收集 2013 年 7 月至 2014 年 1 月经重庆市肿瘤研究所初次确诊为乳腺癌的新鲜穿刺的癌组织标本 125 例(有 81 例具有完整的临床病理资料),其中 12 例同时取了癌旁组织,并选择不同分子亚型的乳腺癌细胞株 MCF-7(ER 阳性)、MDA-MB-231(三阴性)和 SKBR3(HER-2 阳性),利用实时荧光定量 PCR 检测乳腺癌组织和癌旁组织及各乳腺癌细胞株中 miRNA-223 与 miRNA-29c 的表达水平。采用配对样本 *t* 检验分析 12 例乳腺癌组织和癌旁组织中 miRNA-223 与 miRNA-29c 表达水平的差异,采用 Pearson 相关分析乳腺癌组织中 miRNA-223 和 miRNA-29c 表达水平的相关性,并采用独立样本 *t* 检验分析其中 81 例临床病理资料完整者乳腺癌组织中 miRNA-223 与 miRNA-29c 表达水平与临床病理特征之间的关系,采用单因素方差分析比较 3 种乳腺癌细胞株之间 miRNA-223 和 miRNA-29c 表达水平的差异,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。**结果** 乳腺癌组织中 miRNA-223 与 miRNA-29c 的表达水平均明显低于癌旁组织(miRNA-223:  $2.27 \pm 0.75$  比  $9.34 \pm 3.24$ , miRNA-29c:  $0.69 \pm 0.40$  比  $2.58 \pm 0.75$ ,  $t = 6.763, 11.354$ , 均  $P < 0.001$ );miRNA-223 与 miRNA-29c 在乳腺癌组织中呈正相关关系( $r = 0.737, P < 0.001$ );乳腺癌组织中 miRNA-223 表达与肿瘤部位有关,左侧乳腺癌患者 miRNA-223 表达水平高于右侧乳腺癌患者( $t = 2.032, P = 0.046$ ),但 miRNA-29c 表达与乳腺癌患者肿瘤部位无关( $t = -0.587, P = 0.559$ );并且,乳腺癌组织中 miRNA-223 和 miRNA-29c 表达与患者年龄、肿瘤直径、淋巴结转移、TNM 分期以及 ER、PR、HER-2、Ki67、p53 表达均无关系( $t = -0.079, 0.220, -0.227, 0.899, -1.355, -0.544, -1.482, -0.338, -0.487, 0.429, 0.395, 1.432, -1.432, -1.318, -0.049, -0.307, -0.330, 1.234, P$  均  $> 0.050$ )。miRNA-223 在乳腺癌细胞株 MDA-MB-231、MCF-7 和 SKBR3 中的表达水平分别为  $2.16 \pm 0.28, 0.93 \pm 0.24$  和  $0.57 \pm 0.15$ , 3 组间差异有统计学意义( $F = 39.224, P < 0.001$ ),其中,miRNA-223 在高侵袭性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 中的表达水平显著高于 MCF-7 和 SKBR3( $P$  均  $< 0.050$ );并且,miRNA-29c 在乳腺癌细胞株 MCF-7、MDA-MB-231 和 SKBR3 中的表达水平分别为  $0.54 \pm 0.04, 0.44 \pm 0.06$  和  $0.41 \pm 0.04$ , 3 组间差异也有统计学意义( $F = 6.652, P = 0.030$ ),其中,miRNA-29c 在弱侵袭性乳腺癌细胞株 MCF-7 中的表达水平高于 MDA-MB-231 和 SKBR3( $P = 0.034, 0.013$ )。**结论** miRNA-223 和 miRNA-29c 可作为乳腺癌辅助诊断潜在的生物标志物,并且,两者与乳腺癌的分子分型相关。

**【关键词】** 微 RNAs; 乳腺肿瘤

**【中图法分类号】** R737.9 **【文献标志码】** A

**Expressions of miRNA-223 and miRNA-29c in breast cancer and clinical significance** He Yongpeng<sup>1</sup>, Zhang Haiwei<sup>1</sup>, Tang Wanyan<sup>1</sup>, Yi Lin<sup>1</sup>, Li Lixian<sup>1</sup>, Zeng Jianting<sup>2</sup>, Fang Huiying<sup>3</sup>, Nian Weiqi<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Chongqing Key Laboratory of Translational Research for Cancer Metastasis and Individualized Treatment,

<sup>2</sup>Department of Hepatobiliary Surgery, <sup>3</sup>Breast Center, Chongqing Cancer Institute, Chongqing 400030, China

Corresponding author: Nian Weiqi, Email: nwqone@ 126. com

**【Abstract】 Objective** To investigate the expressions of microRNA (miRNA)-223 and miRNA-29c in

breast cancer tissue, peritumoral tissues (2 cm from tumor margin) and breast cancer cell lines, and analyze the correlation between their expressions and clinicopathological characteristics of breast cancer. **Methods** For a retrospective cross-sectional study, the expressions of miRNA-223 and miRNA-29c were detected by real-time quantitative PCR in breast cancer tissues from 125 cases (including 81 cases with complete clinicopathological data), among which 12 cases provided peritumoral tissues (12 paired breast cancer tissues and peritumoral tissues), in Chongqing Cancer Institute from July 2013 to January 2014. The breast cancer cell lines included MCF-7 (ER positive), MDA-MB-231 (triple-negative) and SKBR3 (HER-2 positive). The expressions of miRNA-223 and miRNA-29c in breast cancer tissues, adjacent peritumoral tissues and breast cancer cell lines were detected by real-time quantitative PCR. The expression difference of miRNA-223 and miRNA-29c in 12 cases of breast cancer tissues and corresponding peritumoral tissues was analyzed by paired *t* test. The correlation between their expressions and clinicopathological parameters was detected by Pearson analysis. Independent *t* test was performed to analyze the correlation between their expressions and clinicopathological characteristics in 81 cases with complete clinicopathological data. The expression levels of miRNA-223 and miRNA-29c in 3 different breast cancer cell lines were compared by one-way analysis of variance and pairwise comparison was performed by LSD-*t* test. **Results** The expressions of miRNA-223 and miRNA-29c in breast cancer tissues were lower than those in peritumoral tissues (miRNA-223:  $2.27 \pm 0.75$  vs  $9.34 \pm 3.24$ , miRNA-29c:  $0.69 \pm 0.40$  vs  $2.58 \pm 0.75$ ,  $t = 6.763$ ,  $11.354$ , both  $P < 0.001$ ). miRNA-223 expression was positively correlated with miRNA-29c expression in breast cancer tissues ( $r = 0.737$ ,  $P < 0.001$ ). The expression level of miRNA-223 was related with tumor location and miRNA-223 expression in left breast cancer was significantly higher than that in right breast cancer ( $t = 2.032$ ,  $P = 0.046$ ), while miRNA-29c expression was not related to tumor location ( $t = -0.587$ ,  $P = 0.559$ ). Meanwhile, the expression levels of miRNA-223 and miRNA-29c in breast cancer were not correlated with patients' age, tumor diameter, lymph node metastasis, TNM staging, ER, PR, HER-2, Ki67 and p53 expression ( $t = -0.079$ ,  $0.202$ ;  $-0.227$ ,  $0.899$ ;  $-1.355$ ,  $-0.544$ ;  $-1.482$ ,  $-0.338$ ;  $-0.487$ ,  $0.429$ ;  $0.395$ ,  $1.432$ ;  $-1.432$ ,  $-1.318$ ;  $-0.049$ ,  $-0.307$ ;  $-0.330$ ,  $1.234$ ; all  $P > 0.050$ ). The expression levels of miRNA-223 in breast cancer cell lines MDA-MB-231, MCF-7 and SKBR3 were  $2.16 \pm 0.28$ ,  $0.93 \pm 0.24$  and  $0.57 \pm 0.15$  respectively, indicating a significant difference ( $F = 39.224$ ,  $P < 0.001$ ). The expression level of miRNA-223 in breast cancer MDA-MB-231 cells was significantly higher than that in MCF-7 and SKBR3 (both  $P < 0.050$ ). The expression levels of miRNA-29c in breast cancer cell lines MDA-MB-231, MCF-7 and SKBR3 were  $0.54 \pm 0.04$ ,  $0.44 \pm 0.06$  and  $0.41 \pm 0.04$ , respectively, indicating a significant difference ( $F = 6.652$ ,  $P = 0.030$ ). The expression level of miRNA-29c in MDA-MB-231 and SKBR3 cells was significantly lower than that in MCF-7 cells ( $P = 0.034$ ,  $0.013$ ). **Conclusion** miRNA-223 and miRNA-29c, served as potential biomarkers for breast cancer diagnosis, may be associated with molecular typing of breast cancer.

**【Key words】** MicroRNAs; Breast neoplasms

乳腺癌是中国女性发病率最高的恶性肿瘤,占中国所有女性新发肿瘤的 15%<sup>[1]</sup>。研究乳腺癌的分子生物学特点对其临床诊断、预后评估、治疗等都有非常重要的意义。大量研究表明,微 RNA (microRNA, miRNA) 参与了乳腺癌的发生、发展,在乳腺癌中起致癌或者抑癌作用,同时对乳腺癌的临床诊断、预后甚至治疗都有一定帮助<sup>[2-3]</sup>。研究表明,miRNA-223 和 miRNA-29c 参与多种肿瘤的发生、发展<sup>[4-7]</sup>,但目前在乳腺癌中的作用机制及其与各临床病理特征间的关系还缺乏系统性研究。本研究通过分析 miRNA-223 与 miRNA-29c 在乳腺癌组织和癌旁组织(离肿瘤边缘 2 cm 的非癌组织)以及

不同分子亚型乳腺癌细胞株 [MCF-7 (ER 阳性)、MDA-MB-231 (三阴性) 和 SKBR3 (HER-2 阳性)] 中的表达情况,以探讨其在乳腺癌中的作用和价值,为乳腺癌的临床诊断和抗肿瘤治疗寻找新的标志物和靶点。

## 资料与方法

### 一、一般资料

回顾性分析 2013 年 7 月至 2014 年 1 月经重庆市肿瘤研究所初次确诊为乳腺癌患者的 125 例新鲜穿刺癌组织标本(有 81 例临床病理资料完整,研究 miRNA-223 和 miRNA-29c 表达水平与乳腺癌患者

临床病理特征间的关系时,只对这 81 例数据进行统计分析),其中 12 例同时取了乳腺癌旁组织。组织标本均经病理证实且取样前患者未经放射治疗或化疗处理。穿刺组织标本放置冰上迅速转移至实验室并存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱中。125 例乳腺癌患者均为女性,年龄为 31~81 岁,中位年龄为 48 岁,其中浸润性导管癌 120 例,黏液性腺癌 3 例,浸润性小叶癌 2 例。根据美国癌症联合委员会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)编写的第 7 版《AJCC 癌症分期手册》<sup>[8]</sup>对患者进行 TNM 分期,其中 I 期 17 例、II 期 64 例、III 期 39 例、IV 期 5 例。所有研究材料均通过本研究所医学伦理委员会审核,并得到了患者许可,签署了知情同意书。

## 二、主要试剂、仪器及细胞株

TRIZOL 试剂购自美国生命技术(Life Technologies)公司,SYBR<sup>®</sup> green real-time qPCR master mix 试剂购自美国 Arraystar 公司, Gene amp PCR system 9700 购自美国应用生物系统公司(ABI),ViiA 7 实时荧光定量 PCR 系统购自美国应用生物系统公司, NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 微量紫外分光光度计购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司,扩增引物购自上海百力格生物技术有限公司,引物设计软件为 Primer 5.0。

不同分子亚型的乳腺癌细胞株 MCF-7(ER 阳性)、MDA-MB-231(三阴性)和 SKBR3(HER-2 阳性)由美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection, ATCC)提供。

## 三、总 RNA 的提取

利用 TRIZOL 提取组织及乳腺癌细胞株总 RNA,氯仿两相分离,异丙醇沉淀浓缩 RNA,75%乙醇清洗 RNA,并用无 RNA 酶的水溶解 RNA 沉淀。采用 NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 微量紫外分光光度计测

定 RNA 浓度和纯度, RNA 溶液的吸光度  $D_{260}/D_{280}$  比值范围要求为 1.8~2.1。使用变性琼脂糖凝胶电泳对 RNA 纯度和完整性进行鉴定。结果显示所提取的 RNA 纯度和完整性均较好,符合下一步实验要求。

## 四、cDNA 的合成

取 300 ng 总 RNA,加入 2.5 mmol/L dNTP 2  $\mu\text{l}$ , 10 $\times$ RT 缓冲液 2  $\mu\text{l}$ , 1 mmol/L RT 特异引物 0.3  $\mu\text{l}$ , 莫洛尼鼠白血病病毒反转录酶 40 U, RNA 酶抑制剂 12 U,再加无 RNA 酶水至 20  $\mu\text{l}$  制备 RT 混合体系。RT-PCR 所用引物见表 1,反应转录条件:16  $^{\circ}\text{C}$  30 min, 42  $^{\circ}\text{C}$  40 min, 85  $^{\circ}\text{C}$  5 min。整个实验操作均在冰上完成,反应结束后,产物于 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

## 五、实时荧光定量 PCR

采用 SYBR<sup>®</sup> green real-time qPCR master mix 试剂,使用 ViiA 7 实时荧光定量 PCR 系统进行实时荧光定量 PCR 检测。将所有 cDNA 样品分别配置实时荧光定量 PCR 反应体系,体系配置如下:cDNA 2  $\mu\text{l}$ , 2 $\times$  master mix 5  $\mu\text{l}$ , 10 mmol/L 的 PCR 特异引物正向和反向分别 0.5  $\mu\text{l}$ ,加水至 10  $\mu\text{l}$ 。实时荧光定量 PCR 使用引物见表 1,反应条件按以下程序进行:95  $^{\circ}\text{C}$ , 10 min;40 个 PCR 循环(95  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  60 s)。在扩增反应结束后,立即进行溶解曲线分析。采用 U6 作为内参基因,每个样品均设置 3 个复孔,用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法进行相对表达量数据分析<sup>[9]</sup>[取某个病例标本(1 号标本)为参照标本,所有目标标本的 miRNA 表达水平均为该标本的相对表达量,具体计算公式为: $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_{\text{miRNA 目标}} - \text{Ct}_{\text{U6 目标}}) - (\text{Ct}_{\text{miRNA 参照}} - \text{Ct}_{\text{U6 参照}})$ ,  $\text{Ct}_{\text{miRNA 目标}}$  和  $\text{Ct}_{\text{U6 目标}}$  分别代表荧光定量检测到的目标标本 miRNA 和 U6 的 Ct 值,  $\text{Ct}_{\text{miRNA 参照}}$  和  $\text{Ct}_{\text{U6 参照}}$  分别代表荧光定量检测到的参照样标本 miRNA 和 U6 的 Ct 值]。

表 1 U6(内参)、miRNA-223 及 miRNA-29c 的 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 引物序列

基因名称	引物	序列
U6	反转录	5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGCAT-3'
	正向	5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3'
	反向	5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGCAT-3'
miRNA-223	反转录	5'-GTCGTATCCAGTGCCTGCTGCGAGTCGGCAATTGCACTGGATACGACAACCTCA-3'
	正向	5'-GGCGTGTATTGACAAGC-3'
	反向	5'-CAGTCCGTGCTCGTGGAGT-3'
miRNA-29c	反转录	5'-GTCGTATCCAGTGCCTGCTGCGAGTCGGCAATTGCACTGGATACGACTAACCG-3'
	正向	5'-GGGTAGCACCATTGAAA-3'
	反向	5'-TGCCTGCTCGTGGAGTC-3'

注:反转录引物为 RT-PCR 所用引物;正向引物和反向引物均为实时荧光定量 PCR 所用引物



## 六、统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计处理。miRNA-223 和 miRNA-29c 在乳腺癌中的表达水平服从正态分布,因此数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用配对样本  $t$  检验分析 12 例乳腺癌组织和癌旁组织中 miRNA-223 与 miRNA-29c 表达水平的差异,采用 Pearson 相关分析乳腺癌组织中 miRNA-223 和 miRNA-29c 表达水平的相关性,并采用独立样本  $t$  检验分析 81 例临床病理资料完整者乳腺癌组织中 miRNA-223 与 miRNA-29c 表达水平与临床病理特征之间的关系,采用单因素方差分析比较 3 种乳腺癌细胞株间 miRNA-223 和 miRNA-29c 表达水平的差异,组间两两比较采用 LSD- $t$  检验。以  $P < 0.050$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、miRNA-223 和 miRNA-29c 在 12 例乳腺癌组织及癌旁组织中的表达

在乳腺癌组织中,miRNA-223 表达水平明显低于癌旁组织( $2.27 \pm 0.75$  比  $9.34 \pm 3.24$ ,  $t = 6.763$ ,  $P < 0.001$ ,图 1a),miRNA-29c 表达水平也明显低于癌旁组织( $0.69 \pm 0.40$  比  $2.58 \pm 0.75$ ,  $t = 11.354$ ,  $P < 0.001$ ,图 1b)。

### 二、乳腺癌组织中 miRNA-223 与 miRNA-29c 表达的相关性

Pearson 相关性分析显示,miRNA-223 与 miRNA-29c 在乳腺癌组织中的表达呈正相关关系( $r = 0.737$ ,  $P < 0.001$ )。

### 三、乳腺癌组织中 miRNA-223、miRNA-29c 表达与临床病理特征的关系

乳腺癌组织中 miRNA-223 表达水平与肿瘤部位有关,左侧乳腺癌患者 miRNA-223 表达水平高于

右侧乳腺癌患者,但 miRNA-29c 表达与乳腺癌患者肿瘤部位无关;miRNA-223 和 miRNA-29c 表达与乳腺癌患者年龄、肿瘤直径、淋巴结转移、TNM 分期以及 ER、PR、HER-2、Ki67、p53 表达均无关系(表 2)。

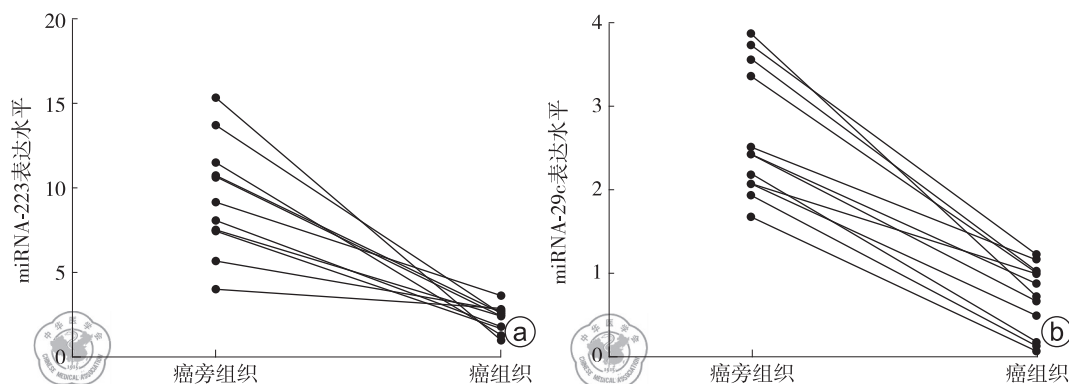
### 四、miRNA-223 和 miRNA-29c 在乳腺癌细胞株中的表达

miRNA-223 在乳腺癌细胞株 MDA-MB-231、MCF-7 和 SKBR3 中的表达水平分别为  $2.16 \pm 0.28$ 、 $0.93 \pm 0.24$  和  $0.57 \pm 0.15$ ,3 组间差异有统计学意义( $F = 39.224$ ,  $P < 0.001$ )。多重比较显示,miRNA-223 在乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 中的表达水平明显高于 MCF-7 和 SKBR3( $P$  均  $< 0.050$ ),而其在乳腺癌细胞株 MCF-7 与 SKBR3 中的表达水平接近( $P = 0.109$ )(图 2a)。

miRNA-29c 在乳腺癌细胞株 MCF-7、MDA-MB-231 和 SKBR3 中的表达水平分别为  $0.54 \pm 0.04$ 、 $0.44 \pm 0.06$  和  $0.41 \pm 0.04$ ,3 组间差异也有统计学意义( $F = 6.652$ ,  $P = 0.030$ )。多重比较显示,miRNA-29c 在乳腺癌细胞株 MCF-7 中的表达水平高于 MDA-MB-231 和 SKBR3( $P = 0.034$ 、 $0.013$ ),而其在乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 与 SKBR3 中表达水平相似( $P = 0.494$ )(图 2b)。

## 讨 论

miRNA 在肿瘤的发生、发展过程中发挥着非常重要的作用。异常表达的 miRNA 影响细胞增殖、凋亡、分化、血管生成及上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)等一系列生物学行为,在肿瘤的演变中发挥着致癌基因或者抑癌基因的作用<sup>[10-13]</sup>。miRNA 的发现及其深入研究为肿瘤发病机制及肿瘤诊治提供了新的思路和途径,具有广



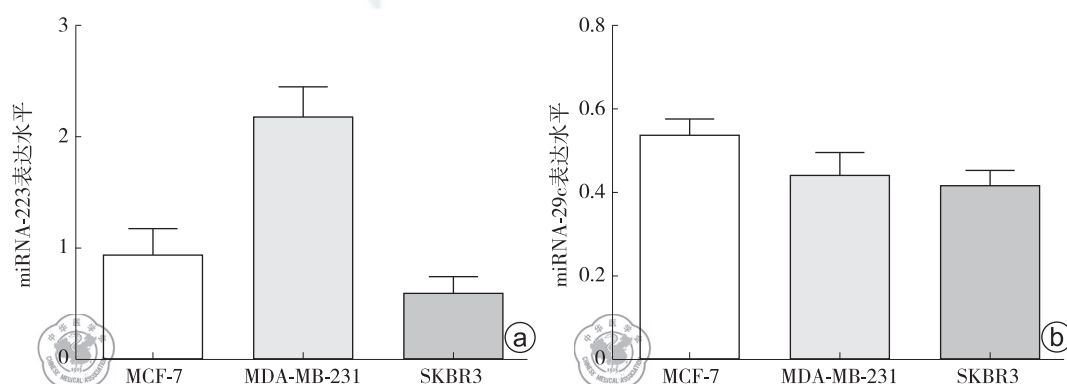
注:a 图所示,miRNA-223 在乳腺癌组织中的表达水平明显低于癌旁组织( $t = 6.763$ ,  $P < 0.001$ );b 图所示,miRNA-29c 在乳腺癌组织中的表达水平明显低于癌旁组织( $t = 11.354$ ,  $P < 0.001$ );每组  $n = 12$

图 1 miRNA-223 和 miRNA-29c 在乳腺癌组织及癌旁组织中的表达

表 2 乳腺癌患者临床病理特征与 miRNA-223、miRNA-29c 表达的关系

临床病理特征	例数 <sup>a</sup>	miRNA-223( $\bar{x} \pm s$ )	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	miRNA-29c( $\bar{x} \pm s$ )	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
年龄							
<50 岁	46	2.32±0.95	-0.079	0.937	0.77±0.43	0.220	0.826
≥50 岁	35	2.34±0.98			0.74±0.41		
肿瘤部位							
左乳	50	2.50±0.99	2.032	0.046	0.73±0.39	-0.587	0.559
右乳	31	2.06±0.84			0.79±0.46		
肿瘤直径							
≤5 cm	63	2.32±0.96	-0.227	0.821	0.78±0.44	0.899	0.371
>5 cm	18	2.38±0.96			0.68±0.31		
淋巴结转移							
阴性	36	2.17±0.88	-1.355	0.179	0.73±0.46	-0.544	0.588
阳性	45	2.46±1.00			0.78±0.38		
TNM 分期							
I、II 期	55	2.22±0.94	-1.482	0.142	0.75±0.44	-0.338	0.736
III、IV 期	26	2.56±0.97			0.78±0.38		
ER							
阴性	41	2.38±0.98	-0.487	0.627	0.78±0.42	0.429	0.669
阳性	40	2.28±0.94			0.74±0.41		
PR							
阴性	50	2.36±0.94	0.395	0.694	0.81±0.42	1.432	0.156
阳性	31	2.28±0.99			0.67±0.41		
HER-2							
阴性	57	2.23±0.92	-1.432	0.156	0.72±0.40	-1.318	0.191
阳性	24	2.56±1.02			0.85±0.44		
Ki67							
阴性	12	2.32±1.28	-0.049	0.961	0.72±0.38	-0.307	0.760
阳性	69	2.33±0.90			0.76±0.42		
p53							
阴性	29	2.28±0.94	-0.330	0.742	0.83±0.40	1.234	0.221
阳性	52	2.36±0.97			0.71±0.42		

注：<sup>a</sup> 本研究只对 81 例临床病理资料完整的患者进行了统计分析



注：a 图所示，miRNA-223 在乳腺癌细胞株 MCF-7、MDA-MB-231 和 SKBR3 中的表达水平差异有统计学意义 ( $F=39.224$ ,  $P<0.001$ )，其中，miRNA-223 在乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 中的表达水平明显高于 MCF-7 和 SKBR3,  $P$  均  $<0.050$ ; b 图所示，miRNA-29c 在乳腺癌细胞株 MCF-7、MDA-MB-231 和 SKBR3 中的表达水平差异也有统计学意义 ( $F=6.652$ ,  $P=0.030$ )，其中，miRNA-29c 在乳腺癌细胞株 MCF-7 中的表达水平平均高于 MDA-MB-231 和 SKBR3,  $P=0.034$ ,  $0.013$ ; 实验重复 3 次

图 2 miRNA-223 和 miRNA-29c 在不同分子亚型乳腺癌细胞株中的表达

阔的临床应用前景。

一种 miRNA 可通过多条信号通路调节多种靶基因,同时,不同 miRNA 可以共同调节一个靶基因参与肿瘤演变过程。乳腺癌的发病机制非常复杂,已有证据表明乳腺癌的发生、发展受多种 miRNA 调控,如:miRNA-200s 家族能够调节乳腺癌细胞 EMT 进程,过表达的 miRNA-200s 能够减少乳腺癌细胞侵袭转移,上调 miRNA-200s 表达可能成为高侵袭性乳腺癌新的治疗策略<sup>[14]</sup>;miRNA-182 通过直接作用于转移消失(missing in metastasis, MIM)基因而促进乳腺癌侵袭转移<sup>[15]</sup>;miRNA-205 在乳腺癌组织中比在正常乳腺组织中低,且越低的 miRNA-205 表达预示着更差的无远处转移生存(distant metastasis-free survival, DMFS)和 OS<sup>[16]</sup>。本研究发现,乳腺癌组织中 miRNA-223 和 miRNA-29c 表达水平均明显低于癌旁组织,说明其可以用于乳腺癌的辅助诊断。已有研究表明,上调 miRNA-223 在乳腺癌细胞株 MCF-7 中的表达水平,能够减少活细胞数量,有望成为抗肿瘤治疗的新途径<sup>[17]</sup>。通过某种方法改变乳腺癌患者 miRNA-223 和 miRNA-29c 的表达水平,能否使乳腺癌患者获益是个值得研究的课题。由于受标本取材限制,本研究收集到同时有乳腺癌组织和癌旁组织的乳腺癌患者样本只有 12 例,可能造成选择性偏倚。本研究采用配对设计方案,并采取了一系列质控措施,以保证研究结果的可靠性。

miRNA-223 在不同组织来源的肿瘤组织或肿瘤细胞系中的作用机制存在差异。miRNA-223 通过作用于靶基因 MAFB 而抑制鼻咽癌细胞扩增和迁移<sup>[18]</sup>。在前列腺癌中 miRNA-223 通过作用于整合素 A3 和整合素 B1 基因而抑制细胞侵袭、转移<sup>[19]</sup>。笔者前期的研究显示,miRNA-223 在 Lewis 肺癌细胞中起着抑癌作用<sup>[20]</sup>。但是,在胃癌组织中,过表达的 miRNA-223 不仅能刺激胃癌细胞增殖,而且能加速其迁移<sup>[21]</sup>。本研究结果显示,miRNA-223 表达水平在乳腺癌组织中明显低于癌旁组织,推测其可能在乳腺癌演变过程中作用于某靶基因,从而发挥某种生物学作用,但具体作用机制有待进一步研究。Pinatel 等<sup>[22]</sup>的研究表明,miRNA-223 能减少乳腺癌细胞侵袭、转移,在失巢凋亡情况下能增加细胞死亡,同时还能增加化疗敏感性。由此可见,miRNA-223 不仅参与乳腺癌侵袭转移,还有望成为新的治疗靶点。

miRNA-29c 在乳腺癌发生、发展中起着抑癌基因作用。Nygren 等<sup>[23]</sup>研究发现,miRNA-29c 可通过

下调 B7 家族免疫调节蛋白 B7-H3 的表达水平,发挥抑癌基因作用,进而降低乳腺癌患者的死亡风险;并且,前瞻性队列研究结果提示 miRNA-29c 表达水平与乳腺癌患者的生存时间密切相关。本研究结果显示,miRNA-29c 表达水平在乳腺癌组织中明显低于癌旁组织,可用于乳腺癌辅助诊断。由此可见,miRNA-29c 有望成为乳腺癌诊断、预后评估新的生物标志物。

本研究还发现 miRNA-223 与 miRNA-29c 在乳腺癌组织中呈正相关关系( $r=0.737, P<0.001$ ),推测这 2 种 miRNA 在乳腺癌中可能调节相同的靶基因,在乳腺癌发生、发展过程中通过某种生物学行为起着协同作用。miRNA-223 与 miRNA-29c 在乳腺癌中的相互作用机制有待深入研究。

高双全等<sup>[24]</sup>研究发现,miRNA-223 与乳腺浸润性导管癌患者 TNM 分期、淋巴结转移及 HER-2 表达呈正相关关系。但本研究中只发现 miRNA-223 与乳腺癌患者肿瘤部位有关( $t=2.032, P=0.046$ ),而与乳腺癌患者年龄、肿瘤直径、淋巴结转移、TNM 分期及 ER、PR、HER-2、Ki67、p53 表达均无关系,同时发现 miRNA-29c 与乳腺癌临床病理特征也无关系,这可能与本研究采用的样本量过少和样本来源差异有关。若要进一步证实 miRNA-223 和 miRNA-29c 与乳腺癌临床病理特征间的关系,还需要大量临床样本的验证。

基于 ER、PR、HER-2 表达情况将乳腺癌分为多个分子亚型(luminal A 型、luminal B 型、HER-2 阳性型、三阴性乳腺癌等),对于乳腺癌预后及治疗方案的选择有重要意义<sup>[25]</sup>。为研究 miRNA-223 与 miRNA-29c 在不同分子亚型乳腺癌中的表达情况,笔者选取了不同分子亚型的乳腺癌细胞株 MDA-MB-231(三阴性)、MCF-7(ER 阳性)、SKBR3(HER-2 阳性),并对其进行 miRNA-223 与 miRNA-29c 检测。本研究发现,miRNA-223 在高侵袭性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 中的表达水平显著高于 MCF-7 和 SKBR3;而 miRNA-29c 在弱侵袭性乳腺癌细胞株 MCF-7 中的表达水平高于 MDA-MB-231 和 SKBR3。miRNA-223 与 miRNA-29c 在不同分子亚型乳腺癌细胞株中的表达情况存在差异,表明其与乳腺癌分子亚型分型密切相关。并且,两者在不同侵袭性乳腺癌细胞株中表达水平存在差异,说明它们在乳腺癌侵袭、转移过程中可能发挥着某种生物学特性,且作用机制有所不同,这为下一步研究 miRNA-223 与 miRNA-29c 在乳腺癌侵袭、转移调控机制中的作用



奠定了基础。

总之,miRNA-223 与 miRNA-29c 有望作为一种新的肿瘤标志物用于乳腺癌的辅助诊断,并且,其与乳腺癌分子亚型相关,但其对乳腺癌侵袭、转移的调控机制及其能否成为临床治疗新的靶点,尚需进一步研究阐明。

### 参 考 文 献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132.
- [2] Wang W, Luo YP. MicroRNAs in breast cancer: oncogene and tumor suppressors with clinical potential [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2015, 16(1): 18-31.
- [3] Tang J, Ahmad A, Sarkar FH. The role of microRNAs in breast cancer migration, invasion and metastasis [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(10): 13 414-13 437.
- [4] Zeng X, Xiang J, Wu M, et al. Circulating miR-17, miR-20a, miR-29c, and miR-223 combined as non-invasive biomarkers in nasopharyngeal carcinoma [J]. PLoS One, 2012, 7(10): e46367.
- [5] Cristóbal I, Madoz-Gúrpide J, Manso R, et al. MiR-29c downregulation contributes to metastatic progression in colorectal cancer [J]. Ann Oncol, 2015, 26(10): 2199-2200.
- [6] Zhou X, Ji G, Chen H, et al. Clinical role of circulating miR-223 as a novel biomarker in early diagnosis of cancer patients [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(9): 16 890-16 898.
- [7] Li S, Li Z, Guo F, et al. miR-223 regulates migration and invasion by targeting Artemin in human esophageal carcinoma [J]. J Biomed Sci, 2011, 18:24.
- [8] Edge S, Byrd DR, Compton CC. AJCC cancer staging manual [M]. 7th ed. New York: Springer, 2009: 345-376.
- [9] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [10] Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, et al. Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila [J]. Cell, 2003, 113(1): 25-36.
- [11] Zhang B, Pan X, Cobb GP, et al. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors [J]. Dev Biol, 2007, 302(1): 1-12.
- [12] Nohata N, Hanazawa T, Kinoshita T, et al. MicroRNAs function as tumor suppressors or oncogenes: aberrant expression of microRNAs in head and neck squamous cell carcinoma [J]. Auris Nasus Larynx, 2013, 40(2): 143-149.
- [13] Voorhoeve PM. MicroRNAs: Oncogenes, tumor suppressors or master regulators of cancer heterogeneity? [J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1805(1): 72-86.
- [14] Ahmad A, Aboukameel A, Kong D, et al. Phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor mediates epithelial-mesenchymal transition regulated by miR-200 in breast cancer cells [J]. Cancer Res, 2011, 71(9): 3400-3409.
- [15] Lei R, Tang J, Zhuang X, et al. Suppression of MIM by microRNA-182 activates RhoA and promotes breast cancer metastasis [J]. Oncogene, 2014, 33(10): 1287-1296.
- [16] Huo L, Wang Y, Gong Y, et al. MicroRNA expression profiling identifies decreased expression of miR-205 in inflammatory breast cancer [J]. Mod Pathol, 2016, 29(4):330-346.
- [17] Cao L, Zhang X, Cao F, et al. Inhibiting inducible miR-223 further reduces viable cells in human cancer cell lines MCF-7 and PC3 treated by celastrol [J]. BMC Cancer, 2015, 15:873.
- [18] Yang W, Lan X, Li D, et al. MiR-223 targeting MAFB suppresses proliferation and migration of nasopharyngeal carcinoma cells [J]. BMC Cancer, 2015, 15:461.
- [19] Kurozumi A, Goto Y, Matsushita R, et al. Tumor-suppressive microRNA-223 inhibits cancer cell migration and invasion by targeting ITGA3/ITGB1 signaling in prostate cancer [J]. Cancer Sci, 2015, 107(1):84-94.
- [20] Nian W, Ao X, Wu Y, et al. miR-223 functions as a potent tumor suppressor of the Lewis lung carcinoma cell line by targeting insulin-like growth factor-1 receptor and cyclin-dependent kinase 2 [J]. Oncol Lett, 2013, 6(2): 359-366.
- [21] Ma L, Chen Y, Zhang B, et al. Increased microRNA-223 in Helicobacter pylori-associated gastric cancer contributed to cancer cell proliferation and migration [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2014, 78(4): 602-608.
- [22] Pinatel EM, Orso F, Penna E, et al. miR-223 is a coordinator of breast cancer progression as revealed by bioinformatics predictions [J]. PLoS One, 2014, 9(1): e84859.
- [23] Nygren MK, Tekle C, Ingebrigtsen VA, et al. Identifying microRNAs regulating B7-H3 in breast cancer: the clinical impact of microRNA-29c [J]. Br J Cancer, 2014, 110(8): 2072-2080.
- [24] 高双全, 丁宇, 高双荣, 等. miR-223 在乳腺浸润性导管癌中的表达及临床意义 [J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(36): 5976-5978.
- [25] Prat A, Parker JS, Karginova O, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer [J]. Breast Cancer Res, 2010, 12(5): R68.

(收稿日期:2016-04-10)

(本文编辑:罗承丽)

何永鹏,张海伟,唐万燕,等. 微 RNA-223 与微 RNA-29c 在乳腺癌中的表达及意义[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2016,10(6):340-346.