

本文引文格式:翟云芝,张浩然,石默哈. miR-146a在三阴乳腺癌中的表达及意义[J].
右江民族医学院学报,2021,43(3):383-386,398.

【论著与临床报道】

miR-146a 在三阴乳腺癌中的表达及意义

翟云芝,张浩然,石默哈

(蚌埠医学院第一附属医院肿瘤内科,安徽 蚌埠 233004)

摘要:目的 观察 miR-146a 在三阴乳腺癌中的表达情况,探讨该指标和细胞增殖与 VEGF 的关系,分析其临床意义。

方法 选取 2015 年 1 月—2015 年 11 月我院收治的 60 例三阴乳腺癌患者作为研究对象,留取肿瘤组织作为观察组,留取癌旁正常组织作为对照组,应用实时荧光定量 PCR 法检测二组组织中 miR-146a 的表达,应用免疫组化方法检测观察组中 Ki67 和 VEGF 的表达。**结果** 观察组中 miR-146a 的表达明显低于对照组 ($P < 0.001$)。观察组中 miR-146a 的表达在肿瘤有没有产生淋巴结转移、不同 TNM 分期的情况中比较差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。miR-146a 的表达与增殖指数和 VEGF 均呈负相关 ($P < 0.05$)。**结论** 三阴乳腺癌中 miR-146a 低表达为导致肿瘤形成的重要分子事件,会介入肿瘤的进展,而且其产生的作用和细胞增殖、VEGF 调节存在关系。

关键词:三阴乳腺癌;miR-146a;增殖;血管内皮生长因子

中图分类号:R737.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-5817(2021)03-0383-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2021.03.019

Expression and significance of miR-146a in triple-negative breast cancer

Zhai Yunzhi, Zhang Haoran, Shi Mohan

(Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, Anhui, China)

Abstract: **Objective** To observe the expression of miR-146a in triple-negative breast cancer and to explore the relationship between miR-146a and cell proliferation as well as vascular endothelial growth factor (VEGF), so as to analyze the clinical significance of miR-146a. **Methods** A total of 60 patients with triple-negative breast cancer admitted to our hospital from January 2015 to November 2015 were selected as the research subjects. Their tumor tissues were collected as the observation group, and adjacent normal tissues were collected as the control group. The expression of miR-146a in the tissues of these two groups was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The expressions of Ki67 and VEGF in the observation group were detected by means of immunohistochemistry. **Results** The expression of miR-146a in the observation group was significantly lower than that of the control group ($P < 0.001$). The differences in the expression of miR-146a were statistically significant between patients with lymph node metastasis and patients without lymph node metastasis, and so were the differences among patients with different TNM stages in the observation group ($P < 0.001$). The expression of miR-146a was negatively correlated with the proliferation index and VEGF ($P < 0.05$). **Conclusion** Low expression of miR-146a in triple-negative breast cancer is an important molecular event leading to tumor formation. It is involved in tumor progress, and its effects are related to cell proliferation and VEGF regulation.

Key words: triple-negative breast cancer; miR-146a; proliferation; vascular endothelial growth factor

目前,乳腺癌作为对女性危害最大的恶性肿瘤问题,严重影响了女性健康^[1]。三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)是较为特殊的乳腺癌亚型,代表相应的雌激素(estrogen receptor, ER)、孕激素(progesterone receptor, PR)与人表皮生长因子(human epidermal growth factor receptor, HER-2)三类受体都表现为阴性,这一特殊亚型由于缺乏治疗靶点,治疗手段单一,又非常容易出现复发及内脏转移,目前 5 年生存率不足 30%^[2]。TNBC 目前在治疗上以化疗为主,缺少更多其他有效的治疗措施。因此, TNBC 在治疗方面迫切需要寻求新的治疗靶点,以提高 TNBC 的治疗效果^[3]。而微小 RNA(miRNA)是近年肿瘤研究的热点,其在真核细胞的基因表达、细胞分化等方面发挥着重要的调控作用。miRNA 作为转录长度为 18~22 个核苷酸的非编码 RNA,依靠和靶基因 3'UTR 的结合,进一步实现控制 mRNA 的效果,在很多肿瘤的进展过程中都有重大的影响^[4]。miR-146a 是 miRNAs 家族非常重要的成员,对于恶性肿瘤的产生、进展有非常关键的调控作用,该部分的实际表达和恶性肿瘤的进展与侵袭等存在紧密联系,相关报道得出 miR-146a 在胃癌、肺癌等肿瘤的实际表达有明显下调,miR-146a 下调有助于调节癌变部分的增殖^[5]。但是通过分析追踪学术领域的最新研究课题,对 TNBC 的 miR-146a 表达和临床病理间的联系,少见有报道。通过对 miRNA 基因库开展筛查,即可发现 miR-146a 或许和乳腺癌存在联系,或许有调控增殖与加速血管生成的效果。所以,对此我们运用实时荧光定量 PCR 法,进一步测定 miR-146a 的具体指标,判断该指标和细胞增殖的联系,对更为深入的研究 TNBC 机制与进展问题,提供更加可靠的数据与理论支持。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选定 2015 年 1 月—2015 年 11 月蚌埠医学院第一附属医院 60 例 TNBC 患者作为研究对象。所有患者均为初治患者,且符合 TNBC 的诊断标准,并经有经验的病理医生复核切片免疫组化及 FISH 确诊;年龄 35~67 岁,中位年龄 51 岁,癌旁正常的乳腺组织作为此次分析的对照组,留取术后新鲜组织(-80℃环境存储)与石蜡包埋组织。

1.2 方法

1.2.1 miR-146a 的测定方案 使用新鲜冻存标本开展 miR-146a 测定,测定方法是荧光 PCR,首要步骤为获取相应的总 RNA。使用 TRIzol 试剂盒提取总 RNA,总 RNA 浓度通过测量来评估。使用 NanoDrop 分光光度计在 260 nm 和 280 nm 处的吸光度。将提取的总 RNA 按 RNA 反转录试剂盒(Reverse-aid-

first-strang-cDNA 合成试剂盒购自 Synthesis Thermo Fisher Scientific 公司)说明反转录 RNA 为 cDNA,合成的 cDNA 使用 TB Green™ Primix Ex Taq™ 试剂盒(Takara Bio 公司)通过 PCR 仪进行扩增检测,以 U6 为内参检测各组 miR-146a 表达。此次设计采用的 miR-146a 引物^[6]:上游:5'-CTATCGGGAACGACCG-3';下游:5'-ACACATTGAAGGTCCTT-3';同时运用 U6 为内参。PCR 反应设置:95℃ 5 min,对此进行 1 次循环的操作;95℃ 25 s,64℃ 20 s,72℃ 20 s,15 个循环;93℃ 25 s,60℃ 35 s,72℃ 20 s,35 个循环。60℃的时间点获取荧光讯号,记载相应的 Ct 值。应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析详细表达状态。 $\Delta\Delta Ct = [Ct \text{ 目的基因(未知)} - Ct \text{ GAPDH(未知)}] - [Ct \text{ 目的基因(校正样品)} - Ct \text{ GAPDH(校正样品)}]$ 。

1.2.2 免疫组化方法 使用石蜡包埋组织进行免疫组化检测。在此次方案设计中,实际运用的 Ki67 与 VEGF 试剂,都源自于北京金桥,方案中运用了二步法、DAB 显色的处理方案。对 Ki67 的表达位置在细胞核,表达相对明显的 3 个高倍(400 倍)位置分析具体的阳性率数据,采用 Ki67 阳性率为此次分析所运用的增值指数。VEGF 评估方案:阳性位置位于细胞质,对此选择 3 个高倍(400 倍)观察视角,依次开展阳性率和着色强度的计算工作。阳性率:<25%在此次分析中判定为 1 分,26%~50%在此次分析中判定为 2 分,51%~75%在此次分析中判定为 3 分,>75%在此次分析中判定为 4 分。着色强度:没有色彩归入 0 分,淡黄归入到 1 分,棕黄归入到 2 分,棕褐则是归入到 3 分。两个数据进行乘法计算,为此次分析的最后评分,实际区间是 0~12 分。安排有丰富经验的医师,运用盲法的方式进行诊断。

1.3 统计学方法 在统计过程中选择 SAS 6.12 开展计算,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,miR-146a 基因在三阴乳腺癌组织及癌旁组织中的表达差异分析主要用配对 *t* 检验,采用 Pearson 法分析 miR-146a 与增值指数及 VEGF 的关系, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TNBC 癌组织及癌旁组织中 miR-146a 的表达 两组组织的 miR-146a 表达量区别显著,存在统计学价值($P < 0.001$),观察组内 miR-146a 的具体表达数据显著小于对照组(见表 1、图 1)。

2.2 观察组不同临床病理特征中 miR-146a 的表达 观察组中 miR-146a 的表达指标分析,可发现是否存在淋巴结转移、不同 TNM 分期都有显著的区别,该区别存在统计学意义($P < 0.001$)。在年龄、肿瘤大

小与分化不同方面并不存在统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2。

表 1 TNBC 癌组织及癌旁组织中 miR-146a 的表达

组别	<i>n</i>	miR-146a
观察组	60	1.20 ± 0.33
对照组	60	1.84 ± 0.29

注: ①表内计量资料数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示; ② $t = 11.300, P < 0.001$ 。

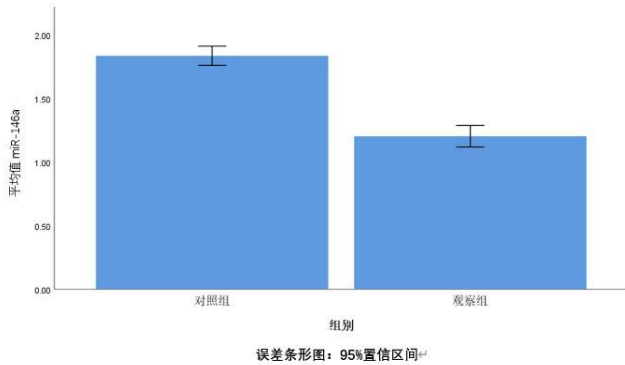


图 1 两组中 miR-146a 表达的柱状图

表 2 不同临床病理特征中 miR-146a 表达比较

组别	<i>n</i>	miR-146a	<i>t</i>	<i>P</i>
年龄/岁			0.899	0.372
<60	39	1.33 ± 0.25		
≥60	21	1.27 ± 0.24		
分化			-1.756	0.084
低	23	1.25 ± 0.19		
高~中	37	1.36 ± 0.26		
肿瘤大小/cm			-1.339	0.186
≥2	31	1.28 ± 0.37		
<2	29	1.39 ± 0.26		
淋巴结转移			5.079	<0.001
无	28	1.41 ± 0.32		
有	32	1.01 ± 0.29		
TNM 分期			5.204	<0.001
I~II 期	35	1.45 ± 0.28		
III 期	25	1.09 ± 0.24		

注: 表内计量资料数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。

2.3 观察组中 miR-146a 与增殖指数的关系 使用 Pearson 相关分析, 发现观察组中 miR-146a 的指标和增殖指数之间表现为负相关的关系 ($r = -0.909, P < 0.05$)。见图 2。

2.4 观察组中 miR-146a 与 VEGF 的关系 使用 Pearson 相关分析, 发现观察组中 miR-146a 的指标和 VEGF 之间表现为负相关的联系 ($r = -0.960, P < 0.05$)。见图 3。

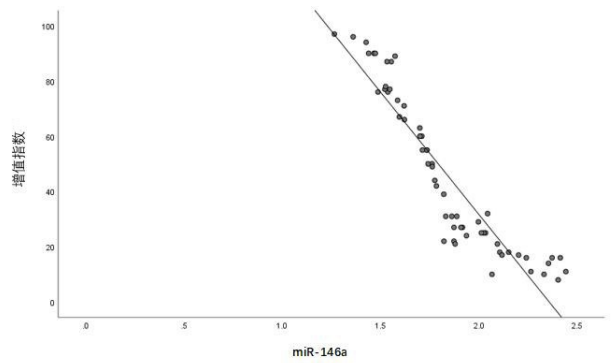


图 2 miR-146a 与增殖指数的关系散点图

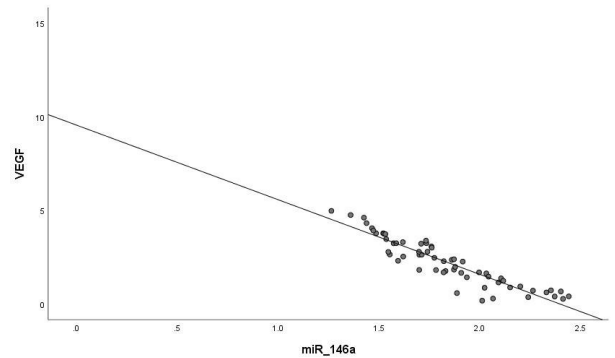


图 3 miR-146a 与 VEGF 的关系散点图

3 讨论

TNBC 是一类具有高度异质性的恶性肿瘤, 严重危害了女性健康。大约 15%~20% 的乳腺癌患者为 TNBC^[7]。在过去的几十年中, 随着治疗手段的增加和治疗水平的提高, 乳腺癌的治疗效果得到了显著提升, 5 年生存率明显提高, 总体死亡率明显下降。然而, 由于 TNBC 肿瘤侵袭性强, 更容易发生内脏转移。且治疗手段单一, 目前 TNBC 的治疗仍以化疗为主, 缺乏内分泌治疗及抗 HER-2 治疗靶点。3 年的治疗复发率高达 40%~50%^[8], 预后仍然很差。TNBC 目前在治疗方面迫切需要寻找新的治疗靶点, 以提高治疗效果, 改善患者的生存率。近年来微小 RNA 成为恶性肿瘤的研究热点, 其主要功能是在转录过程中发挥重要作用。miRNA 作为非编码单链小分子 RNA, 在各类细胞中都有较多的存在。miRNA 为转录后重要的调控因子, 对此可依靠目标 RNA 的分解, 进一步产生的控制表达的效果, 也可对 miRNA 翻译进行控制, 有效调控转录后的表达信息, 其在实际的生长和发育等程序中, 都发挥着非常重要的调节作用^[9]。miR-146a 位于 5 号染色体的 LOC285628, 成熟序列位置是第 2 外显子。miR-146a 水平在胃癌、膀胱癌等多种癌症组织中存在异常表达^[10-12], 但目前在 TNBC 的表达还未见报道。为寻找新的治疗靶点, 提高治疗效果, 本研究探讨 miR-146a 在 TNBC 中的表达及其临床意

义,结果显示 TNBC 中 miR-146a 的表达明显低于对照组,提示 miR-146a 或许为 TNBC 肿瘤产生的关键分子因素,或许会介入肿瘤的进展,miR-146a 为重要的抑癌基因,也有相对较强的调节功能,miR-146a 在异常增殖的场景中会有显著影响,对调控失控性增殖也有显著的促进效果。当前,部分和临床特征、预后存在密切联系的标志物,都获得了业界的普遍关注。miR-146a 为抑制基因的重要指标,在多个肿瘤表达中都有所下调^[13-15]。miR-146a 是 miRNA 家族的重要成员,在多个实体肿瘤的表达都出现了下调,认定其或许和肿瘤的出现与进展存在密切联系。Shomali N 等^[16]分析得出,胃癌肿瘤的 miR-146a 表现为低表达的状态,该指标可能会影响癌症迁移与侵袭,发现 miR-146a 可作为治疗的抑制物,运用到相关诊疗活动中。但是当前对 TNBC 组织的 miR-146a 表达和病理特征的联系少有研究。本文的结果显示观察组不同临床病理特征中 miR-146a 的表达在有无淋巴结转移与 TNM 多个分期的不同情况中,其表达都有显著的区别,该区别存在统计学意义。在年龄、肿瘤大小与分化不同的表达区别较小,并不存在统计学意义。TNBC 中 miR-146a 的表达与淋巴结转移存在联系,代表 miR-146a 低表达或许和实际产生的侵袭、生长以及转移等密切相关,miR-146a 低表达可使 TNBC 的肿瘤组织进入到生长状态。此外,miR-146a 表达也和 TNBC 不同 TNM 分期存在联系,因为 TNM 分期可以判断预后与生物学变化,所以 miR-146a 低表达或许也和 TNBC 肿瘤预后等变化存在联系,即 TNBC 中 miR-146a 低表达或许代表预后也不理想。低表达 miR-146a 也代表实际疾病分期相对较高。此次分析还可发现,TNBC 肿瘤内 miR-146a 的表达指标,和增殖指数间表现为显著的负相关关系,代表 miR-146a 维持低表达的状况,或许会造成肿瘤出现异常增殖,进一步促使肿瘤的发生与进展。miR-146a 异常表达或许介入 TNBC 肿瘤的失控增殖,促进了恶性肿瘤细胞的快速生长,从而造成肿瘤体积的快速增大,使肿瘤的侵袭性变得增强。本组研究结果还显示了 TNBC 肿瘤组织中 miR-146a 的表达与 VEGF 的表达表现为负相关联系,miR-146a 低表达可能加快 VEGF 的高表达,帮助肿瘤间质的血管发育,提高肿瘤组织的营养供给,进一步加快肿瘤的生长。

整体而言,miR-146a 低表达或许为肿瘤发生发展的关键标志,会影响肿瘤的进展与恶化,miR-146a 低表达和细胞增殖与 VEGF 调控存在关系。目前由于 TNBC 在治疗方面手段单一,迫切需要寻找新的治疗靶点,肿瘤进展可能与肿瘤新生血管、信号通路等因素有关。另外,细胞周期和免疫缺陷可能也是影响乳腺

癌发生发展的重要因素^[17]。

参考文献:

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] Doepker MP, Holt SD, Durkin MW, et al. Triple-negative breast cancer: a comparison of race and survival[J]. Am Surg, 2018, 84(6): 881-888.
- [3] Park JH, Ahn JH, Kim SB. How shall we treat early triple-negative breast cancer (TNBC): from the current standard to upcoming immune-molecular strategies [J]. ESMO Open, 2018, 3(Suppl 1): e000357.
- [4] Wei L, Sun J, Zhang N, et al. Noncoding RNAs in gastric cancer: implications for drug resistance [J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 62.
- [5] Yao Q, Tu C, Lu D, et al. Clinicopathological significance of the microRNA-146a/WASP-family verprolin-homologous protein-2 axis in gastric cancer [J]. Cancer Sci, 2017, 108(7): 1285-1292.
- [6] Hu HQ, Sun LG, Guo WJ. Decreased miRNA-146a in glioblastoma multiforme and regulation of cell proliferation and apoptosis by target Notch1 [J]. Int J Biol Markers, 2016, 31(3): 270-275.
- [7] Bareche Y, Venet D, Ignatiadis M, et al. Unravelling triple-negative breast cancer molecular heterogeneity using an integrative multiomic analysis [J]. Ann Oncol, 2018, 29(4): 895-902.
- [8] Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, et al. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2016, 13(11): 674-690.
- [9] Matamala N, Vargas MT, Gonzalez-Cdmpora R, et al. Tumor microRNA expression profiling identifies circulating microRNAs for early breast cancer detection [J]. Clin Chem, 2015, 61(8): 1098-1106.
- [10] Xue Y, Tong L, Liu A, et al. Tumor-infiltrating M2 macrophages driven by specific genomic alterations are associated with prognosis in bladder cancer [J]. Oncol Rep, 2019, 42(2): 581-594.
- [11] Li M, Zou X, Xia T, et al. A five-miRNA panel in plasma was identified for breast cancer diagnosis [J]. Cancer Med, 2019, 8(16): 7006-7017.
- [12] Tang S, Cheng J, Yao Y, et al. Combination of four serum exosomal miRNAs as novel diagnostic biomarkers for early stage gastric cancer [J]. Front Genet, 2020, 11(1): 237.

(下转第 398 页)

糊、上臂或者咽喉部疼痛、失语等症状必须马上停止运动。若开始运动前血压监测 $>23.94/15.96$ kPa,或者血糖 >14 mmol/L,请不要开始运动,并且建议到医院进一步检查评估后按照高血压和糖尿病的运动处方进行运动。

参考文献:

- [1] 葛均波,徐永健,王辰.内科学[M].9版.北京:人民卫生出版社,2019:762-764.
- [2] Ng M,Fleming T,Robinson M,et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980—2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 [J]. Lancet, 2014,384(9945):766-781.
- [3] Afshin A,Forouzanfar MH,Reitsma MB,et al. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Counties over 25 Year[J],N Engl J Med,2017,377(1):13-27.
- [4] Finer N. Medical consequences of obesity[J]. Medicine, 2015,43:88-93.
- [5] 步斌,侯乐荣,周学兰,等.运动处方研究进展[J].中国循证医学杂志,2010,10(12):1359-1366.
- [6] Cai M,Zou Z. Effect of aerobic exercise on blood lipid and glucose in obese or overweight adults: A meta-analysis of randomised controlled trials [J]. Obes Res Clin Pract, 2016,10(5):589-602.
- [7] Xiao T,Fu YF. Resistance training vs. aerobic training and role of other factors on the exercise effects on visceral fat [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19(10):1779-1784.
- [8] 吴明方,陆阿明.有氧运动及其联合饮食干预影响非酒精性脂肪肝患者血浆 SREBP-1c、RBP4 水平的研究[J].中国康复医学杂志,2015,30(2):132-137.
- [9] 王永胜.张弛有致的有氧训练对单纯性肥胖症患者的疗效观察[J].中华物理医学与康复杂志,2011,33(8):620-

621.

- [10] 叶骏,张晓莉,胡福松,等.个性化健康管理中的运动强度监测[J].中华健康管理学杂志,2017,11(3):265-268.
- [11] Robergs RA, Landwehr R. The surprising history of the “HRmax=220-age” equation[J]. J Exerc Physiol, 2002, 5(2):1-10.
- [12] 王军利,张冰.基于年龄预测我国大学生最大心率的有效性研究[J].中国运动医学杂志,2017,36(8):693-699.
- [13] 张云梅,张宏.心脏康复五大处方[M].昆明:云南科技技术出版社,2018:20-22.
- [14] 美国运动医学会著,王正珍,等译. ACSM 运动测试与运动处方指南(第九版)[M].北京:北京体育大学出版社,2014:75-78.
- [15] 张达成.现代体育运动科学训练理论与方法探索[M].北京:中国纺织出版社,2017:32-35.
- [16] 代毅,张培峰.健身理论与方法[M].成都:四川大学出版社,2010:38-40.
- [17] Ryan E. R. Reid, David Thivel, Marie-Eve Mathieu, Understanding the Potential Contribution of a Third “T” to FITT Exercise Prescription: The Case of Timing in Exercise for Obesity and Cardiometabolic Management in Children [J]. Appl Physiol Nutr Metab, 2019, 44(8):911-914.
- [18] Swift DL, McGee JE, Earnest CP, et al. The Effects of Exercise and Physical Activity on Weight Loss and Maintenance [J]. Prog Cardiovasc Dis, 2018, 61(2):206-213.
- [19] American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, Obesity Expert Panel, 2013. Expert Panel Report: Guidelines (2013) for the management of overweight and obesity in adults [J]. Obesity (Silver Spring), 2014, 22(Suppl 2):S41-410.

收稿日期:2020-11-29;修回日期:2021-02-10

(上接第 386 页)

- [13] Li Y, Xu Y, Yu C, et al. Associations of miR-146a and miR-146b expression and breast cancer in very young women [J]. Cancer Biomark, 2015, 15(6):881-887.
- [14] Liu X, Xu B, Li S, et al. Association of SNPs in miR-146a, miR-196a2, and miR-499 with the risk of endometrial/ovarian cancer [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2015, 47(7):564-566.
- [15] Hou JP, Meng F, Chan LW, et al. Circulating plasma mi-

croRNAs as diagnostic markers for NSCLC [J]. Front Genet, 2016, 7(11):193.

- [16] Shomali N, Mansoon B, Mohammadi A, et al. MiR-146a functions as a small silent player in gastric cancer [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 96(5):238-245.
- [17] 覃燕,杨迪,覃花香,等. TACC3 mRNA 在乳腺癌中的表达及其基因富集分析 [J]. 右江民族医学院学报, 2020, 42(4):423-426, 431.

收稿日期:2020-12-23;修回日期:2021-03-03