

microRNA 在乳腺肿瘤患者组织和血清中表达的变化和相关性¹

王凤军^a, 郑智国^b, 丁先锋^{a,**}, 郭江峰^{a,**}

^a 浙江理工大学生命科学院生物工程研究所, 杭州 (310018)

^b 浙江省肿瘤医院肿瘤研究所, 杭州 (310022)

E-mail: wfj0808@126.com

摘要: MicroRNAs (miRNAs) 在肿瘤发生与发展过程中呈现出不同的表达水平, 具有筛查和诊断乳腺肿瘤并对治疗方案的选择和预后分析具有潜在的指示作用。目前普遍共识的癌症特异性的 miRNA 表达谱的研究仍只局限于肿瘤组织样本中, 而血清作为生物检测样本, 具有取材方便, 无创伤性, 可连续体外检测的优点, 且血清 miRNA 的高度稳定性也使得病人的实际值与实验的测试值相当吻合。本文首先提取 48 例乳腺肿瘤患者的组织和血清样本以及 20 例健康志愿者血清中的总 RNA, 利用荧光定量技术系统分析与乳腺肿瘤极其相关的目标 miRNA (miRNA-21, 106a, 126, 155, 199a and 335) 在乳腺组织和血清中的差异性表达情况。发现目标 miRNA 在乳腺肿瘤组织和血清中的表达均呈现出显著的差异性, 并在乳腺肿瘤组织和血清中的表达水平具有显著的相关性 ($R^2=0.853$)。其中 miR-21, miR-106a 和 miR-155 在乳腺癌组织和癌血清样本中呈现出显著的高表达, 而 miR-126, miR-199a 和 miR-335 则显著低表达 ($P<0.05$)。此外, 目标 miRNA 还分别与不同的乳腺肿瘤的临床病理特征密切相关, 在组织学和血清学水平上均具有一定的指示作用。这为疾病特异性 miRNA 表达谱可作为肿瘤检测, 诊断及治疗的血清学分子标记物提供一种新的理论和实验基础。

关键词: microRNA; 乳腺肿瘤; 血清; 分子标记物

1. 引言

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤, 具有高度异质性, 组织学形态多样性, 与遗传和环境因素均密切相关。虽然在过去的 10 年内, 早期诊断及辅助化疗和激素治疗使得乳腺癌的死亡率每年以 2.3% 递减, 但仍属于发病率和死亡率最高的女性恶性肿瘤^[1, 2]。2008 年美国约有 67770 新增乳腺癌病例, 全世界每年约有 130 万妇女发现乳腺癌, 有 50 万妇女死于乳腺癌^[3, 4]。我国女性乳腺癌发病率为 50 个/10 万人, 每年还正在以 3% 的速度递增, 居各类癌症之首, 并导致 48164 人死亡。过去 25 年, 在西方国家此病发病率增加了 25%, 而在我国的增长已高达 96%^[5]。

最新数据显示肿瘤组织普遍具有特征性的 miRNA 表达谱, 能够作为癌症的生物学标志。Calin 等通过分析 miRNA 在染色体上的定位与肿瘤发生的关系, 发现 186 例 miRNA 基因中 15 个 miRNA 定位于 10 个与人类乳腺癌相关的缺失区^[6]。Iorio 等运用 miRNA 基因芯片及 Northern 杂交等方法对 76 例乳腺癌样本和 10 例乳腺正常标本进行 miRNA 表达谱分析, 发现 29 种 miRNA 的表达有显著变化, 且有 15 种 miRNA 可以明确区分肿瘤或正常乳腺样本, 其中 miR-10b, 125b 和 145 在大多数乳腺癌组织和细胞中显著低表达, 而 miR-21 和 miR-155 表达量则明显下降^[7]。这表明在肿瘤发生与发展过程中, 其癌基因与抑癌基因作用的 miRNA 都发挥着至关重要的调控作用。此外也揭示这些 miRNA 与乳腺肿瘤的分级、分期、血管侵袭性及肿瘤细胞增殖和雌、孕激素的表达等临床病理指数均相关。Lu 等人运用基于微球的更高敏感度的 miRNA 分析方法分析 20 种癌症后, 发现每一种癌症均有一个特征性的 miRNA 表达谱, 大多数低分化肿瘤也可根据其 miRNA 的表达水平确定其起源的组织或器官^[8, 9]。

* 国家“863”计划资助项目(2007AA02Z165)

** 通讯作者, 电子邮箱: jfguo@zstu.edu.cn; bdd114@163.com

应用各种不同的技术, 许多研究小组一直在试图寻找不同癌症的特异性 miRNA 表达谱。

虽然癌症特异性的 miRNA 对于揭示癌症的分子生物学基础非常重要, 而能在血液中检出癌症特异性的 miRNA 并将其作为癌症的生物学标志, 将有助于癌症的早期诊断。近年来研究人员发现在血浆和血清中也存在独立于细胞之外, 有效保护以免接触 RNases, 并且即使在严酷环境下也能明显保持稳定的 miRNA 分子^[10-12]。Lawrie 等人证实血清 miR-21 水平在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤的病人中很高, 与增高的不复发存活率密切相关^[13]。Mitchell 等发现, 在转移性前列腺癌患者的血清中, miR-141 的过表达水平对于确诊前列腺癌患者具有高度的敏感性和良好的特异性^[14]。Taylor 和 Gercel-Taylor 分析来自同一卵巢癌患者的癌细胞和血清中的 miRNA, 发现有 218 种 miRNA 在患者的细胞和血清中均有表达^[10]。Chen 等首先对正常的人血清 miRNA 进行 Solexa 测序分析, 在男性和女性血清中分别发现 100 种和 91 种 miRNA 分子。其次对肺癌、结肠癌和糖尿病患者的血清 miRNA 水平进行分析, 确定这些疾病都有其特异性的血清 miRNA 表型且能够很好地诊断肺癌和结肠癌^[12]。

本文采用荧光定量 PCR 技术检测 miR-21, miR-106a, miR-126, miR-155, miR-199a 和 miR-335 在乳腺肿瘤组织和血清中差异性表达的情况, 并分析 miRNA 表达变化与乳腺肿瘤患者的临床病理指标间的关系, 进而验证 miRNA 在乳腺肿瘤患者的乳腺组织和血清中的表达水平具有显著的相关性, 希望能够为筛选乳腺肿瘤分子预测指标提供依据。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 乳腺组织与血清样本

肿瘤组织和血清样本来自 2007 年 11 月~2008 年 12 月间在浙江省肿瘤医院接受治疗的 48 例乳腺肿瘤患者的组织和血清。入组患者要求有明确的细胞学诊断, 手术前未经任何放疗、化疗及内分泌治疗, 手术后有完整的临床及病理资料(表 2.1)。正常组织对照样本来自乳腺肿瘤患者的癌旁正常组织, 正常血清对照样本来自健康志愿者。入组志愿者均经问卷调查和严格体检无乳腺肿瘤及其相关妇科肿瘤遗传病史且无乳腺肿瘤患病风险。

2.1.2 目标 miRNA

本实验的目标 miRNA 主要通过查阅近八年发表的乳腺癌及其相关 miRNA 的文献(近 100 篇)以及肿瘤血清 miRNA 的研究报道(近 20 篇)筛选出来的。对文献中采用的 miRNA 基因芯片、荧光定量 PCR、Northern 杂交及 Solex 高通量测序的实验结果客观分析并比对, 且考虑到乳腺癌极为相关的 miRNA 的特异性引物设计的难易情况以及这些 miRNA 在血清中的稳定存在, 本实验筛选出 miR-16 作为相对定量的内参基因, miR-21, miR-106a, miR-126, miR-155, miR-199a 和 miR-335 作为研究对象^[7, 11, 12, 15-23]。

表 2.1 乳腺肿瘤患者的临床病理信息

Table 2.1. Clinicopathologic characteristics and follow-up data of patients with breast tumor.

Variable	Clinicopathologic parameter	Number of RNA samples
Case		48
Age	<48	25
	≥48	23
Histological type ^a	invasive ductal carcinoma	38
	galactophore fibroma	10
Histological	I	0

grade ^a	II	22
	III	16
AJCC clinical stage ^b	I	6
	II A	17
	IIIA	5
	unknown	10
Lymph node metastasis	no	16
	<3	14
	≥3	7
	unknown	1
Tumor size	T1 (Size< 2)	5
	T2 (2≤ Size≤ 5)	28
	T3 (Size> 5)	2
	unknown	3
ER	-	18
	+	3
	++	8
	+++	9
PR	-	20
	+	1
	++	8
	+++	9

^a 根据 WHO 确立的乳腺癌分类标准 (Tavassoli 和 Devilee, 2003)

^b 根据美国癌症联合委员会建立的癌症临床分期系统 (Singletary 等, 003)

^a According to the WHO classification of breast cancer (Tavassoli and Devilee, 2003).

^b According to the AJCC (American Joint Committee on Cancer) staging system (Singletary et al, 2003).

2.1.3 主要试剂

免疫组化过程使用的 ER 试剂购自 DOKA 公司, PR 试剂购自 Abcam 公司, 二抗系统购自 SantaCruz 公司。组织和血清总 RNA 的提取分别采用 Norgen 公司的动物组织 RNA 提取试剂盒 (animal tissue RNA purification kit) 和总 RNA 提取试剂盒 (total RNA purification kit)。反转录试剂购自 TaKaRa 公司。荧光定量 PCR 检测试剂盒为 TOYOBO 产品。

表 2.2 反转录茎环引物及 PCR 引物
Table 2.3 The primer information of miRNA

miRNA	引物 (Primer)	序列 (Sequence (5'-3'))	长度/nt (Length/nt)	扩增产物/bp (Amplicon size/bp)
	URP ^a	TGGTGTCTGGAGTTCG	16	
	sequence	uauugcacuuguccggccugu	22	
miR-16	SL-P ^b	CTCAACTGGTGTCTGGAGTTCGCAATTCAGT TGAGCGCCAATA	44	
	F-P ^c	ACACTCCAGCTGGGTAGCAGCACGTAAATA	30	66
	sequence	uagcuuauacagacugauguuga	22	
miR-21	SL-P	CTCAACTGGTGTCTGGAGTTCGCAATTCAGT TGAGTCAACATC	44	
	F-P	ACACTCCAGCTGGGTAGCTTATCAGACTGA	30	66
	sequence	aaaagugcuuacagucagguag	23	
miR-106a	SL-P	CTCAACTGGTGTCTGGAGTTCGCAATTCAGT TGAGCTACCTGC	44	
	F-P	ACACTCCAGCTGGGAAAAGTGCTTACAGTG	30	67
	sequence	ucguaccgaguuauaauugcg	22	66

	SL-P	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGT TGAGCGCATTAT	44	
	F-P	ACACTCCAGCTGGGTCGTACCGTGAGTAAT	30	
	sequence	uuaaugcuaaucgugauaggggu	23	
miR-155	SL-P	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGT TGAGACCCCTAT	44	
	F-P	ACACTCCAGCTGGGTTAATGCTAATCGTGAT	31	67
	sequence	ucaagagcaauaacgaaaaugu	23	
miR-335	SL-P	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGT TGAGACATTTTT	44	
	F-P	ACACTCCAGCTGGGTCAAGAGCAATAACGAA	31	67
	sequence	cccaguguucagacuaccuguuc	23	
miR-199a	SL-P	GTCGTATCCAGTCGAGGGTCCGAGGTATTCCG ACTGGATACGACGAACAG	50	
	F-P	CGAGGGTCCGAGGTATTCCG	20	
	R-P ^d	CGCCGCCCAAGTGTTCAGA	18	60

^a通用正向引物; ^b茎环引物; ^c正向引物; ^d反向引物

^auniversal forward primer; ^bstem-loop primer; ^cforward primer; ^dreverse primer.

2.2 方法

2.2.1 乳腺癌组织样本的免疫组化

免疫组织化学在病理技术上作为辅助诊断技术已广泛应用,特别是肿瘤病理的鉴别和诊断。本文采用免疫组化实验确定各乳腺肿瘤组织样本中的雌、孕激素受体的蛋白表达水平。操作流程严格按照各试剂说明书要求。

2.2.2 乳腺组织和血清总 RNA 样本制备

为保证提取质量,使用 Norgen 公司的总 RNA 提取试剂盒,乳腺组织的起始用量为 30 mg,血清的起始用量为 100 μ l,提取过程严格按照试剂盒说明书操作。纯化后的总 RNA 样本均经 NanoDrop ND-100 定量检测,计算出 miRNA 反转录时所需的 RNA 溶液的体积。乳腺组织总 RNA 样本还需 1%甲醛变性 MOPS 琼脂糖凝胶电泳和 Agilent 2100 BioAnalyzer 进行完整性检测。

2.2.3 miRNA 茎环引物及 PCR 引物设计

引物设计应用 Primer Express 2.0, Primer 5.0, Iesegene 7.0 等软件,设计的原则为:1) stem-loop 引物:茎上约 16 bp,环上约 16-20 bp,整个 stem-loop 长约 36-44 bp,与 miRNA 特异性互补的部分为 6-8 bp;2) PCR 引物:长度 20 bp 左右,退火温度 60 $^{\circ}$ C 左右,GC 含量约 50%,上下游引物之间的退火温度 $\leq 2^{\circ}$ C,扩增产物长约 60-80 bp。以上方法设计的引物(表 2.2)通过 DNASTAR 评价,再在 NCBI 上比对扩增产物来验证引物的特异性。所有引物委托上海生物工程有限公司合成。

2.2.4 RT-PCR 检测

RT 反应是以纯化后的总 RNA 为模板,加入目标 miRNA 各自的特异性茎环引物,在反转录酶等试剂的作用下反转录生成 cDNA 的过程。主要操作流程为:1)在无 RNase 的 0.2 ml PCR 管中依次加入定量的组织总 RNA 100 ng 或血清总 RNA 40.00 ng 和 DEPC-H₂O;2)将

上述 RNA 溶液 70 °C 变性 5 min, 冰上放置 3 min, 再依次加入反转录试剂: RNase 抑制剂 (40 U/μl) 0.25 μl、dNTP 混合物 (10mM each) 0.75 μl、5×M-MuLV 缓冲液 3.00 μl、M-MuLV 反转录酶 (200 U/μl) 0.25 μl; 3) 加入反应浓度已优化的茎环引物 (2 μM) 0.5 μl, 补加 DEPC-H₂O 至终体积 10 μl, 混匀后稍离心在 PCR 仪中进行反应; 4) 反应参数设置为: 16 °C 反应 15 min, 促使模板与茎环引物的特异性结合, 42 °C 反转录 60 min, 85 °C 处理 5 min 灭活反转录酶。反应设置无模板对照体系及无反转录酶对照体系。反转录产物经常规 PCR 扩增, 反应条件为: 94 °C 3 min; 94 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min, 8% DNA 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测扩增产物。

2.2.5 miRNA 表达的检测与分析

为验证血清中 miRNA 的稳定存在和表达, 需对 RT-PCR 产物进行克隆测序, 验证扩增的准确性和特异性。由于成熟体 miRNA 序列较短, 仅为 19~24 bp, 由茎环引物和 PCR 引物扩增得到的 RT-PCR 产物也仅为 60-67 bp, 不能满足 DNA 测序要求, 因此本文通过连接反应对 RT-PCR 产物加接头, 接头产物回收、富集及纯化, 将扩增后的连接产物克隆到 T-easy 载体, 转化于感受态的大肠杆菌 DH5α, 蓝白斑筛选后, 经质粒抽提、菌液 PCR 和 DNA 测序来鉴定重组克隆, 测序工作由上海生工生物工程技术有限公司完成。测序结果采用 DNASTAR Lasergene 7.1 和 BioEdit 7.0 两软件的相关功能进行比对分析。

2.2.6 miRNA 表达的定量分析

通过基于 DNA 染料法的荧光定量 PCR 对 miRNA 在乳腺组织和血清中表达的水平进行检测和分析。主要操作流程为: 1) 在 0.2 mL 光学 PCR 反应管中依次加入: ddH₂O 2.9 μl, SYBR[®] real-time PCR Master Mix 5 μl, 50 × ROX reference 0.2 μl, PCR 正向引物 0.2 μl, PCR 反向引物 0.2 μl 和模板 cDNA 1 μl, 反应混合液在 ABI 7300 实时定量 PCR 仪中进行扩增。2) 反应条件设置为 95 °C 预处理 15 s, 再以 95 °C 15 s, 60 °C 1 min 进行 45 个循环。定量中设立重复实验和阴性对照实验, 定量实验的每个样本重复 3 次, 阴性对照中不加模板 cDNA, 而以水代替, 用于检验是否存在 PCR 污染和较高的引物二聚体污染。

2.2.7 数据处理及统计分析

荧光定量 PCR 定量检测 miRNA 的相对表达变化量时, 以 miR-16 为内参基因, 来对目标基因进行归一化处理, 已确保相等数量的样品中比较目标基因的量。表达量倍数的变化用公式 $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$, 其中 $\Delta\Delta CT = (C_{T \text{ miRNA}} - C_{T \text{ miR-16}})_{BC} - (C_{T \text{ miRNA}} - C_{T \text{ miR-16}})_{\text{Mean BN}}$ 。RQ 代表相对表达量 (relative quantitation), $C_{T \text{ miRNA}}$ 和 $C_{T \text{ miR-16}}$ 分别代表荧光定量检测到的目标 miRNA 和内参基因 miR-16 的 Ct 值, BC 代表乳腺肿瘤组织或肿瘤血清, BN 代表与肿瘤组织或血清对应的正常对照组, Mean_{BN} 代表所有正常对照组中的平均值。

荧光定量数据的统计学分析采用 SPSS 16.0 统计分析软件。miRNA 在两样本中的相对表达量分析采用 *levene's* 卡方检验和 *independent-samples t* 检验, 当 P 值 < 0.05 时, 认为结果在统计学上具有显著性差异, 当 P 值 < 0.01 时, 认为结果在统计学上具有极显著性差异。miRNA 在不同病理的乳腺肿瘤患者的血清中表达的差异性分析的直观表现通过绘制含误差线的柱状图实现, 采用 *OrginPro 7.5* 绘图软件。误差主要来自于不同的病人样本, 不同的 RNA 提取步骤和不同的实验操作环境中。

相关分析采用皮尔逊相关系数 (*Pearson's correlation coefficient*) 来描述呈线性关系的两变量之间相关关系的密切程度和相关方向。其值在 -1 至 +1 之间, 用 R 表示, R 越接近于

1 或-1, 相关性越好, 分别表示正相关和负相关; 越接近于 0, 相关性越差。miRNA 在乳腺肿瘤组织和血清中表达的相关性分析的直观表现通过绘制以血清样本为横坐标轴, 以组织样本为纵坐标轴的散点图实现, 采用 SPSS 16.0 软件。

3 结果和分析

3.1 乳腺癌组织样本的免疫组化分析

免疫组化染色的结果判定: ER 和 PR 阳性染色定位于细胞核, 以胞核中出现棕黄色颗粒为阳性表达。所有切片均在不了解患者的临床资料的情况下阅片。随机计数 5 个高倍视野, 计算每视野中阳性细胞所占比例, 阳性率=阳性细胞数/癌细胞总数 \times 100%。其平均值为该张切片的表达水平。阳性细胞在 10%以上的 ER 或 PR 计为阳性, \leq 10%计为阴性(图 3.1)。

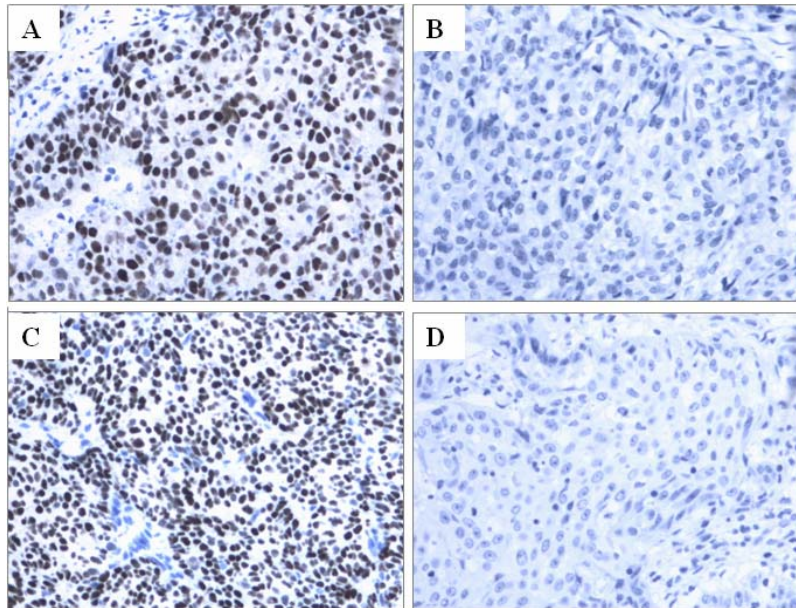


图 3.1 乳腺癌组织中 ER、PR 的免疫组化染色结果

(A) 经免疫组化染色后肿瘤细胞核内呈现 ER 阳性 “+++” (\times 100); (B) 经免疫组化染色后肿瘤细胞核内呈现 ER 阴性 “——” (\times 100); (C) 经免疫组化染色后肿瘤细胞核内呈现 PR 阳性 “+++” (\times 100); (D) 经免疫组化染色后肿瘤细胞核内呈现 PR 阴性 “——” (\times 100)。

Fig 3.1 Immunohistochemical staining of ER、PR of breast cancer.

(A) Tumor cells present “+++” nuclear positive staining of ER (\times 100); (B) Tumor cells present “——” nuclear negative staining of ER (\times 100); (C) Tumor cells present “+++” nuclear positive staining of PR (\times 100); (D) Tumor cells present “——” nuclear negative staining of PR (\times 100).

3.2 miRNA 基因的扩增 (RT-PCR)

在健康对照血清(图 3.2-D), 良性病变血清(图 3.2-E)和癌变血清(图 3.2-F)中均检测到目标 miRNA 的特异性表达, 并与其在对应的乳腺正常组织(图 3.2-A), 良性病变组织(图 3.2-B)和癌变组织(图 3.2-C)中的表达情况一致, 充分说明目标 miRNA 在乳腺组织和血清中均有特异性表达。

3.3 miRNA 基因的测序验证结果

序列比对分析结果表明目标序列区域信号良好, 测序结果可靠。测序结果显示与预期 100%相同, 证实引物设计以及 PCR 反应的可靠性(图 3.3)。

3.4 乳腺肿瘤组织中 miRNA 的差异性表达分析

3.4.1 miRNA 在乳腺癌组织及其癌旁正常组织中表达的差异性

本文对 38 例乳腺癌患者的癌组织及其癌旁正常组织中目标 miRNA 表达量的差异性分析 (图 3.4-A), 表明 miR-21 (RQ=2.922, $P<0.001$), miR-106a (RQ=2.353, $P<0.001$) 和 miR-155 (RQ=3.373, $P<0.001$) 在乳腺癌组织中显著高表达, 而 miR-126 (RQ=0.454, $P=0.002$), miR-199a (RQ=0.654, $P=0.031$) 和 miR-335 (RQ=0.299, $P<0.001$) 则呈现显著低表达。除 miR-199a 外, 相对表达变化倍数均大于 2, 且已达到极显著水平, 因此根据这 5 种 miRNA 在乳腺组织中的表达情况可明显区分癌组织和正常组织, miR-199a 也具有一定的参考价值。

3.4.2 miRNA 的差异性表达与临床病理分级的相关性

目标 miRNA 在乳腺正常组织 (38 例)、良性病变组织 (10 例) 和乳腺癌病理分期 II 级 (22 例) 及 III 级 (16 例) 组织中表达具有差异性 (图 3.4-B), 其中在肿瘤组织中表达上调的 miR-21, miR-106a 和 miR-155 从正常乳腺组织到高增殖指数的癌肿渐近地升高, 而在肿瘤组织中表达下调的 miR-126, miR-335 和 miR-199a 从正常乳腺组织到高增殖指数的癌肿渐近地下降。更为重要的是, 在正常乳腺样本和良性病变样本之间, miR-106a ($P=0.001$) 和 miR-335 ($P=0.050$) 的表达水平具有显著性差异, 且 miR-106a 已达到极显著水平; 在良性病变肿瘤与乳腺癌病理分级 II 之间, miR-21 ($P=0.001$), miR-155 ($P=0.001$) 和 miR-335 ($P=0.002$) 有显著性的差异表达, 且均达到极显著水平; 在乳腺癌病理分级 II 和 III 之间, miR-21 ($P<0.001$), miR-155 ($P=0.001$), miR-199a ($P=0.006$), miR-126 ($P=0.028$) 和 miR-335 ($P=0.032$) 均表现出明显的差异性, 且前三者已达至极显著水平。结果表明, miR-106a 在乳腺样本中的表达变化量可用来区分良性病变组织; miR-21, miR-155 和 miR-335 的表达变化量可用来区分良、恶性肿瘤; miR-21, miR-155 和 miR-199a 的表达变化量可区分高增殖指数的癌肿。

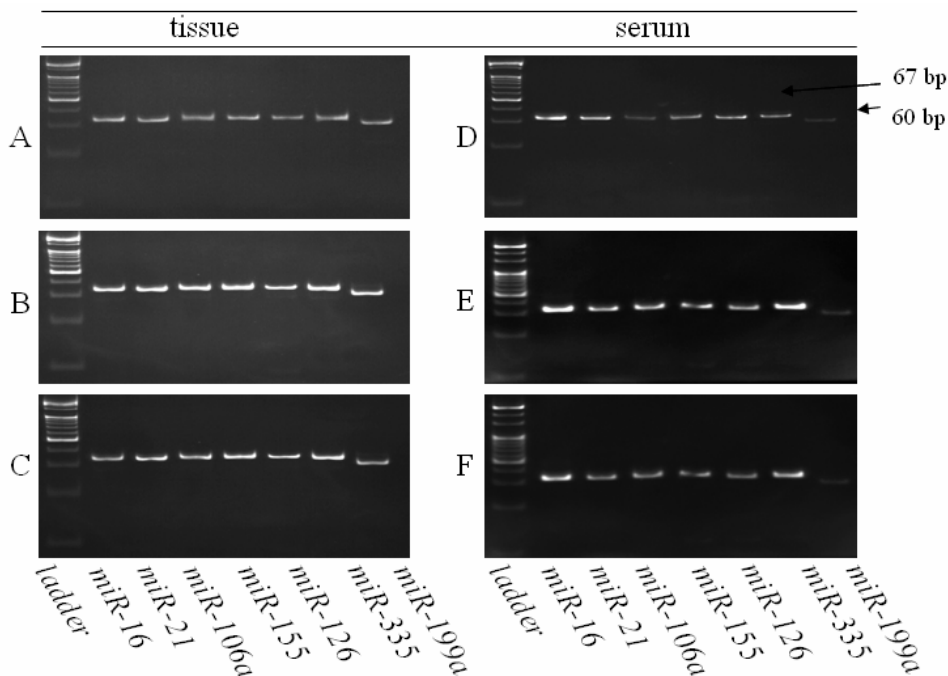


图 3.2 miRNAs (miRNA-16, 21, 155, 106a, 126, 335, 199a) 反转录产物的 PCR 检测结果

(A-C) 目标 miRNA 在乳腺正常组织 (图 3.2-A)、良性病变组织 (图 3.2-B) 和癌组织 (图 3.2-C) 中的表达情况。(D-F) 目标 miRNA 在健康对照血清 (图 3.2-A)、良性病变血清 (图 3.2-B) 和癌血清 (图 3.2-C) 中的表达情况。20 bp 分子量标准, 8% DNA PAGE 凝胶检测。

Fig 3.2 RT-PCR analysis of specific miRNA expression of miRNA-16, 21, 155, 106a, 126, 335, 199a in total RNA isolated from matched excised breast tissue and serum.

(A-C) The selected miRNA expression in tissues with normal (Fig 3.2-A), benign (Fig 3.2-B) and malignant breast cancer (Fig 3.2-C). (D-F) The selected miRNA expression in sera from women with normal (Fig 3.2-D), benign (Fig 3.2-E) and malignant breast cancer (Fig 3.2-F). This is 20 bp DNA ladders. PCR products were visualized on ethidium bromide-stained 8% DNA polyacrylamide gel.

```

miR-16      ...CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGACAGGC
            CGGGACAAGTGCAATACCCAGCTGGAGTGT...

miR-21      ...CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTCAACA
            TCAGTCTGATAAGCTACCCAGCTGGAGTGT...

miR-106a    ...CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCTACCT
            GCACCTGTAAGCACTTTTCCAGCTGGAGTGT...

miR-126     ...CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCGCATT
            ATTACTCACGGTACGACCCAGCTGGAGTGT...

miR-155     ...CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGACCCCT
            ATCACGATTAGCATTAAACCCAGCTGGAGTGT...

miR-335     ...CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGACATT
            TTCGTTATTGCTCTTGACCCAGCTGGAGTGT...

miR-199a    ...GTCGTATCCAGTCGAGGGTCCGAGGTATTCCGACTGGATACG
            ACGAACAGGTAGTCTGAACACTGGGCGGCG...
    
```

图 3.3 miRNA (miRNA-16, 21, 155, 106a, 126, 335, 199a) 的克隆测序
 荧光定量 PCR 扩增片断以灰色区域显示，上下游引物用下划线标记，miRNA 序列字体加粗。

Fig 3.3 Sequence data from the clones of miRNAs (miRNA-16, 21, 155, 106a, 126, 335, 199a)
 The amplified fragments are shown as a gray box for each miRNA, the forward and reverse primers are underlined,
 and the miRNA sequence is indicated in bold text.

3.4.3 miRNA 的差异性表达与雌、孕激素受体表达量的相关性

本实验首先依据免疫组化染色的结果，将收集到的乳腺癌组织样本分为 ER 阳性 (ER+, 共 20 例) 或阴性 (ER-, 共 18 例) 和 PR 阳性 (PR+, 共 18 例) 或阴性 (PR-, 共 20 例)，然后分析目标 miRNA 在这些病理状态下的表达水平 (图 3.4-C,D)。发现 miR-21, miR-106a, miR-126, miR-155, miR-335 和 miR-199a 在乳腺癌组织中的差异性表达与 ER、PR 的表达量有密切的关联性。其中，miR-155 ($P=0.001$)，miR-126 ($P=0.019$)，miR-21 ($P=0.021$)，miR-106a ($P=0.029$) 和 miR-335 ($P=0.050$) 的表达差异水平可区分 ER 阴性或阳性，且 miR-155 的表达变化量已达至极显著水平；miR-155 ($P<0.001$)，miR-21 ($P=0.012$)，miR-106a ($P=0.034$) 和 miR-335 ($P=0.039$) 表达差异水平可区分 PR 阴性或阳性，且 miR-155 的表达变化量已达至极显著水平。结果表明在乳腺癌病理状态鉴定过程中可利用 miRNA 的差异性表达水平，尤其是 miR-155，来反映 ER、PR 在乳腺肿瘤中的表达情况，从而能更快捷、有效地对病人进行诊断和治疗，具有广泛的临床应用前景。

3.4.4 miRNA 的差异性表达与患病年龄的相关性

将乳腺癌样本按病理信息中的患病年龄，以 48 岁为界，分为两个年龄组，对低年龄组的 25 例样本和高年龄组的 23 例样本进行分析，发现 miR-106a ($P=0.061$)，miR-126 ($P=0.079$)，miR-155 ($P=0.133$)，miR-199a ($P=0.250$) 和 miR-335 ($P=0.064$) 在乳腺癌组织相对于其

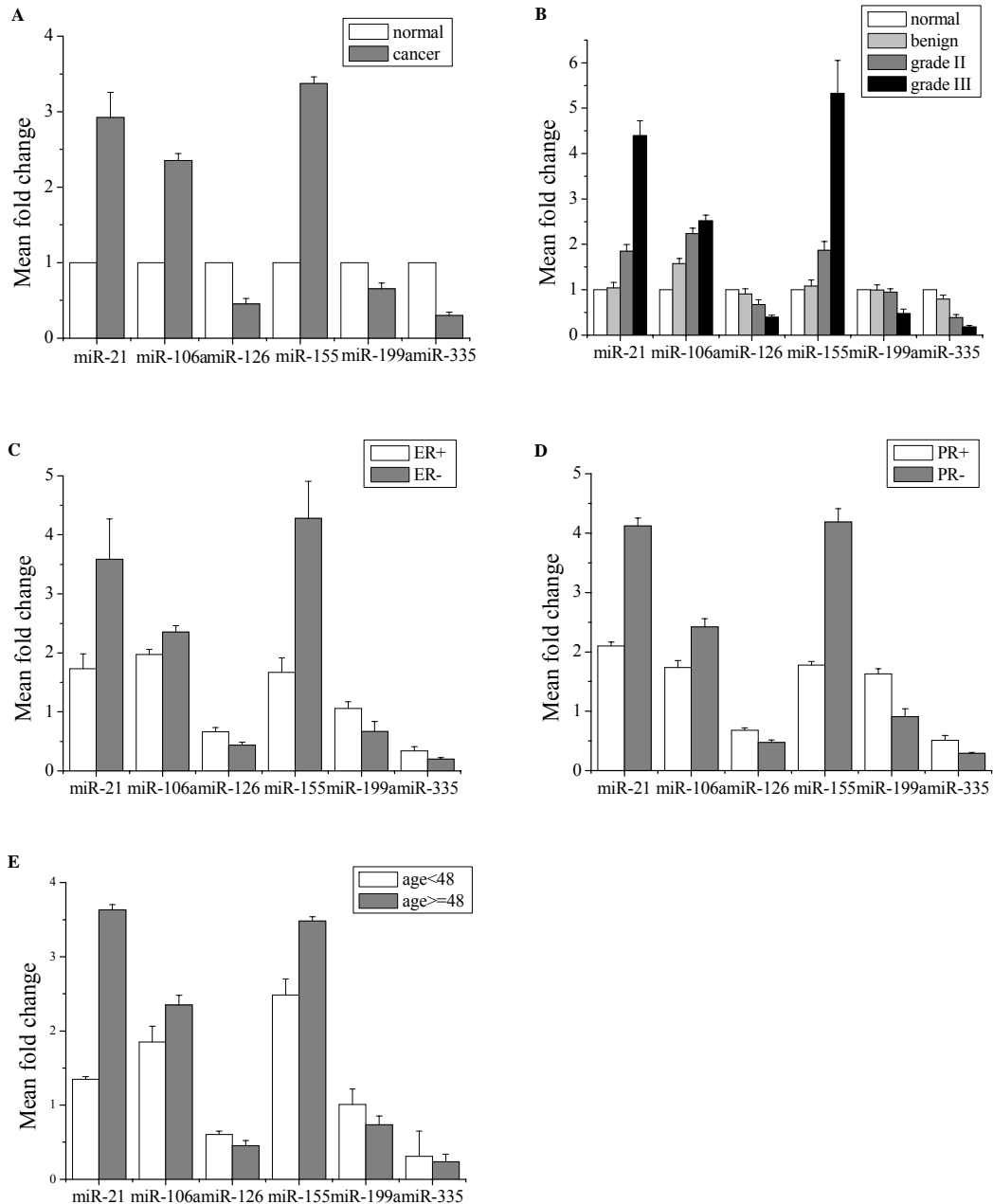


图 3.4 目标 miRNA 在血清中的表达在乳腺肿瘤临床病理指标上的差异性分析

(A) miRNA 在乳腺癌组织与正常组织中的差异性表达；(B) miRNA 在乳腺组织中的表达与乳腺肿瘤组织学病理分级的差异性分析；(C) miRNA 在乳腺肿瘤组织中的表达与雌激素受体 (ER) 表达量的差异性分析；(D) miRNA 在乳腺肿瘤组织中的表达与孕激素受体 (PR) 表达量的差异性分析；(E) miRNA 在乳腺癌肿瘤组织中的表达与患病年龄的差异性分析。

Fig. 3.6. Correlation of clinicopathologic features of invasive breast cancer with the relative expression level of 6 selected miRNA in tissues.

(A) miRNA aberrant expression in breast cancer tissues versus normal controls; (B) miRNA aberrant expression in breast tissues with histological tumor grades among normal, benign, grade II and grade III; (C) miRNA aberrant expression in breast cancer tissues with differential estrogen receptor level; (D) miRNA aberrant expression in breast cancer tissues with differential progesterone receptor level; (E) miRNA aberrant expression in breast cancer tissues with patient's age between less than 48 years and greater than or equal to 48 years.

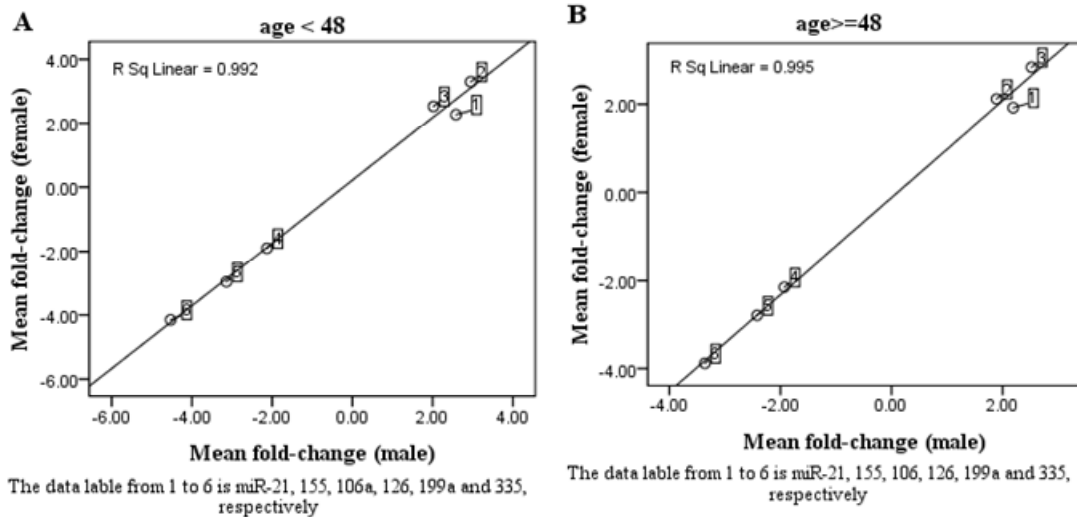


图 3.5 miRNA 在乳腺血清中的表达与性别的相关散点图

(A) 年龄均小于 48 岁的健康男性和女性($R^2=0.992$); (B) 年龄均大于等于 48 岁的健康男性和女性($R^2=0.995$)。

Fig 3.5 Pearson correlation scatter plot of the fold-change of serum miRNAs relative expression from donors' with age-matched female and male.

(A) The age of donors of female and male was less than 48 years ($R^2=0.992$); (B) The age of donors of female and male was greater than or equal to 48 years ($R^2=0.995$).

癌旁正常组织中的差异性表达在两患病年龄 (<48 和 ≥ 48) 组上无显著性差异, 呈现出相似的相对表达水平 (图 3.4-E), 说明这 5 种 miRNA 的表达变化与年龄没有相关性, 即随着患病年龄的增大, miRNA 的表达量并无显著变化, 仅有 miR-21 在高年龄组中比低年龄组中显著高表达 ($P=0.008$)。

3.5 血清中 miRNA 的表达与性别的相关性

本实验随机抽取健康男性和女性志愿者各 10 名以及乳腺癌病人 10 名的血清样本, 检测这 6 种 miRNA 在癌血清与健康对照血清中的相对表达变化量, 并用 SPSS 16.0 中的 Pearson 相关系数对 miRNA 在癌血清与健康对照女性血清中的相对表达量和 miRNA 在癌血清与健康对照男性血清中的相对表达量进行相关性分析。由于考虑到 miRNA 在不同年龄的乳腺癌病人的血清中恒定表达未得到考证, 因此本实验将两个年龄组上分别抽样, 检测并分析。结果显示, 在小于 48 岁 (图 3.5-A) 和大于等于 48 岁 (图 3.5-B) 两个年龄组中, 这 6 种 miRNA 在男性与女性中的差异性表达具有极为显著的相关性, R^2 分别为 0.992 和 0.995。这表明 miRNA 在血清中的表达无性别差异, 实验样本收集过程中获得的健康男性志愿者的血清样本也可作为后续定量实验的正常对照。

3.6 乳腺肿瘤血清中 miRNA 的差异性表达

3.6.1 miRNA 在乳腺癌血清与正常血清中表达的差异性

目标 miRNA 在 38 例乳腺癌患者的血清及其 38 例健康对照血清样本中表达的差异性分析 (图 3.6-A), 表明 miR-21 (RQ=2.527, $P=0.001$), miR-106a (RQ=1.902, $P=0.020$) 和 miR-155 (RQ=3.427, $P<0.001$) 在乳腺癌血清中显著高表达, 而 miR-126 (RQ=0.437, $P<0.001$), miR-199a (RQ=0.267, $P=0.001$) 和 miR-335 (RQ=0.272, $P=0.001$) 则呈现显著低表达。除 miR-106a 外, 相对表达变化倍数均大于 2, 且已达到极显著水平。因此根据这 5 种 miRNA 在血清中的表达情况可明显区分癌血清和健康血清, miR-106a 也具有较好的参考

价值。

3.6.2 miRNA 的差异性表达与病理分级的相关性

目标 miRNA 在健康对照血清（38 例）、乳腺良性病变血清（10 例）和乳腺癌病理分期 II 级（22 例）及 III 级（16 例）血清中表达具有差异性（图 3.6-B），其中在肿瘤血清中表达上调的 miR-21, miR-106a 和 miR-155 从健康血清到高增殖指数的癌肿渐近地升高，而在肿瘤血清中表达下调的 miR-126, miR-335 和 miR-199a 从健康血清到高增殖指数的癌肿渐近地下降。值得注意的是，在健康血清和良性病变血清样本之间，miR-199a ($P=0.005$)，miR-335 ($P=0.001$) 和 miR-155 ($P=0.021$) 的表达水平具有显著性差异，且前二者均已达至极显著水平；在良性病变肿瘤与乳腺癌病理分级 II 之间，miR-21 ($P=0.001$)，miR-155 ($P=0.001$) 和 miR-335 ($P=0.001$) 有显著性的差异表达，且均达到极显著水平；在乳腺癌病理分期 II 和 III 之间，miR-155 ($P=0.001$) 和 miR-199a ($P=0.005$) 均表现出明显的差异性，且均已达到极显著水平。结果表明，miR-199a 和 miR-335 在血清水平上来区分乳腺良性病变肿瘤；miR-21, miR-155 和 miR-335 可在血清水平上区分良、恶性肿瘤；miR-21, miR-155 和 miR-199a 可在血清水平上区分高增殖指数的癌肿。

3.6.3 miRNA 的差异性表达与雌、孕激素受体表达量的相关性

本实验分析取自同一乳腺肿瘤病人的血清样本中的目标 miRNA 的表达水平与雌、孕激素受体表达量上的关系，结果发现目标 miRNA 在癌血清中的差异性表达与 ER、PR 的表达量有密切的关联性（图 3.6-C,D）。其中，miR-106a ($P=0.001$)，miR-155 ($P<0.000$)，miR-126 ($P=0.002$)，miR-199a ($P=0.009$)，miR-21 ($P=0.020$) 和 miR-335 ($P=0.014$) 的表达差异水平可区分 ER 阴性或阳性，且前四者的表达变化量已达至极显著水平；miR-21 ($P=0.009$)，miR-106a ($P=0.007$)，miR-155 ($P<0.001$)，miR-199a ($P=0.001$)，miR-126 ($P=0.012$) 和 miR-335 ($P=0.026$) 表达差异水平可区分 PR 阴性或阳性，且前四者的表达变化量已达至极显著水平。结果表明在乳腺癌病理状态鉴定过程中可利用 miRNA 在血清中的差异性表达水平，尤其是 miR-155, miR-106a 和 miR-199a 能从血清学水平上反映 ER、PR 在乳腺肿瘤中的表达情况，而避免组织切片鉴定 ER/PR 的滞后性和创伤性，从而能更快捷对病人进行筛查和诊断并采取有效的治疗方案，具有广泛的临床应用前景。

3.6.4 miRNA 的差异性表达与患病年龄的相关性

本实验对取自同一乳腺癌病人的血清样本中 miRNA 在两年龄组上的表达水平进行分析，发现 miR-21 ($P=0.248$)，miR-106a ($P=0.461$)，miR-126 ($P=0.979$)，miR-199a ($P=0.250$) 和 miR-335 ($P=0.164$) 在乳腺癌血清相对于其健康对照血清中的差异性表达在两患病年龄 (<48 和 ≥48) 组上无显著性差异，呈现出相似的相对表达水平（图 3.6-E），说明这 5 种 miRNA 在乳腺血清中的表达变化与年龄没有相关性，即随着患病年龄的增大，miRNA 的表达量并无显著变化，仅有 miR-155 ($P=0.005$) 在高年龄组血清中比低年龄组中显著高表达。

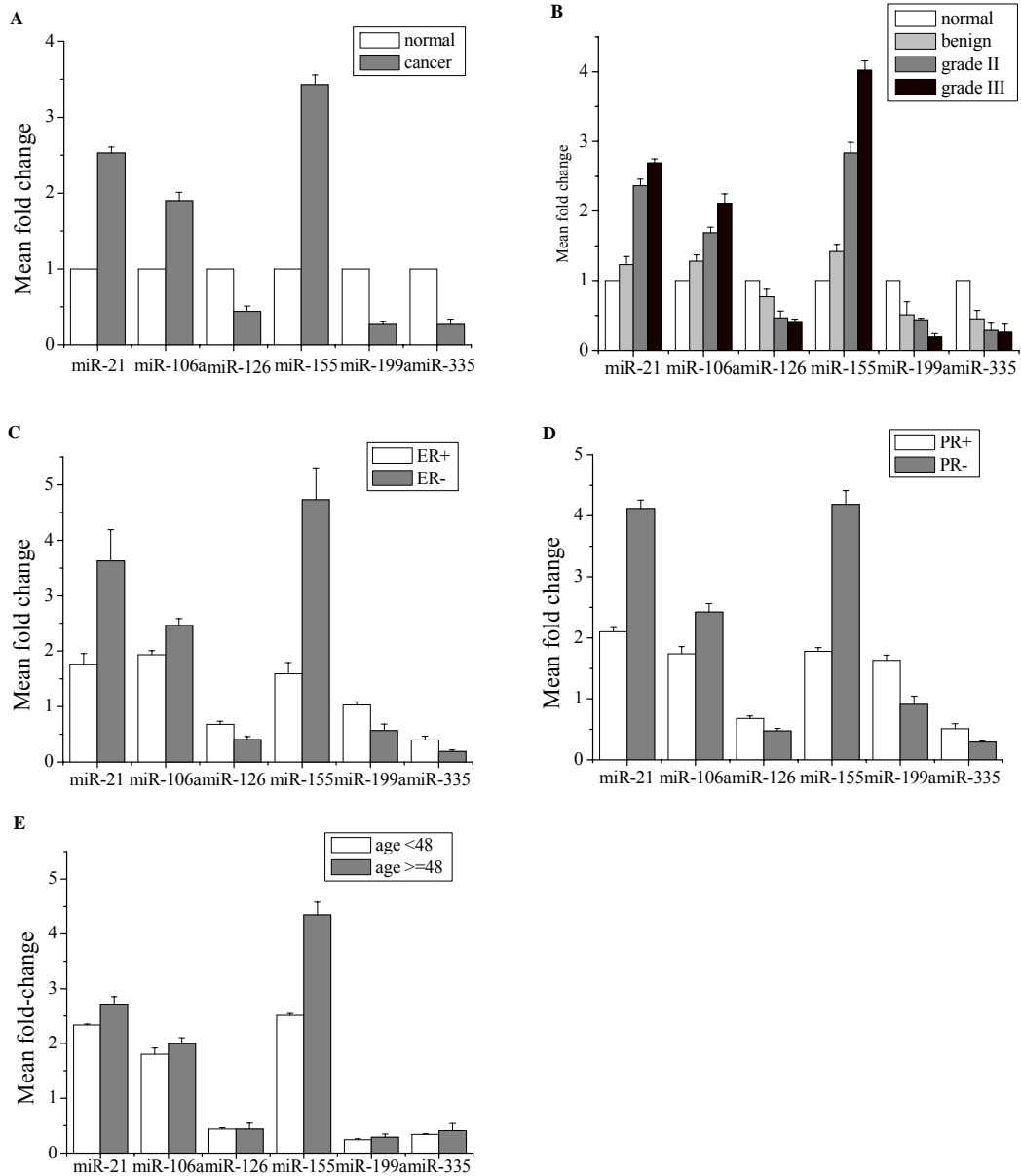


图 3.6 目标miRNA在血清中的表达在乳腺肿瘤临床病理指标上的差异性分析

(A) miRNA 在乳腺癌患者与健康志愿者血清中的差异性表达；(B) miRNA 在血清中的表达与乳腺肿瘤组织学病理分级的差异性分析；(C) miRNA 在乳腺肿瘤患者血清中的表达与雌激素受体 (ER) 表达量的差异性分析；(D) miRNA 在乳腺肿瘤患者血清中的表达与孕激素受体 (PR) 表达量的差异性分析；(E) miRNA 在乳腺肿瘤患者血清中的表达与患病年龄的差异性分析。

Fig. 3.6. Correlation of clinicopathologic features of invasive breast cancer with the relative expression level of 6 selected miRNA in sera.

(A) miRNA aberrant expression in breast cancer sera versus normal control; (B) miRNA aberrant expression in sera from women with histological tumor grades of breast tumor among normal, benign, grade II and grade III; (C) miRNA aberrant expression in breast cancer sera with differential estrogen receptor level; (D) miRNA aberrant expression in breast cancer sera with differential progesterone receptor level; (E) miRNA aberrant expression in breast cancer sera with patient's age between less than 48 years and greater than or equal to 48 years.

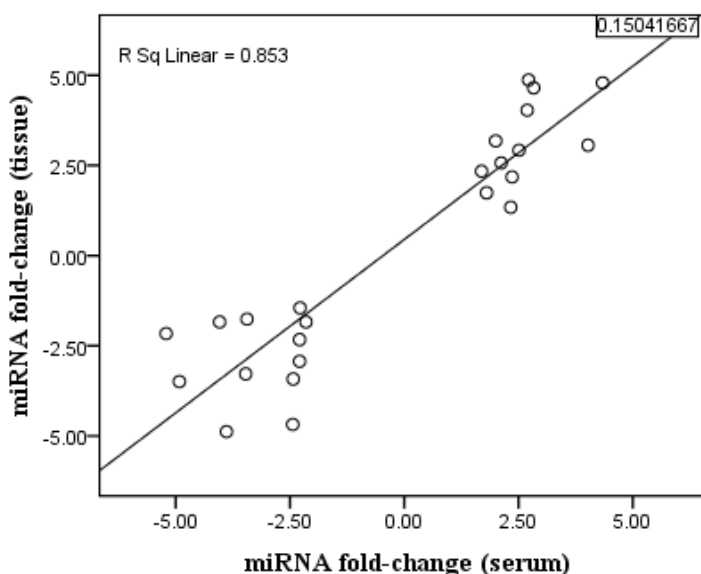


图 3.7 miRNA 在血清和乳腺组织样本中差异性表达的相关散点图
(相关性分析在 $P=0.01$ 水平上, SPSS 16.0 软件, *Pearson* 相关系数分析)

Fig. 3.7 Pearson correlation scatter plot of miRNA level in matched tissue and serum samples.
(Correlation is significant at 0.01 level and data was analyzed by *Pearson's correlation coefficient* using SPSS v16.0)

3.7 miRNA 在血清和组织中表达的相关性分析

进一步系统分析 miRNA 在乳腺癌患者的两种病理标本中表达的情况, 本实验运用 SPSS 16.0 软件中的 *Pearson* 相关系数分析目标 miRNA 在 24 例乳腺肿瘤患者的组织和其对应的血清样本中表达的相关性。发现目标 miRNA 在乳腺肿瘤血清和组织中的表达水平具有显著的相关性, 相关系数为 $R^2=0.853$ ($P=0.01$)。表明 miRNA 在血清中的表达水平可反映乳腺组织样本的病理特点, 进而确定血清 miRNA 可作为乳腺肿瘤的生物标记物来指示肿瘤的临床病理情况。

3.8 miRNA 的差异性表达指示各病理特征

通过定量分析目标 miRNA 在各病理指数上的差异性表达, 我们发现显著性差异表达的 miRNA 在组织学和血清学上对乳腺肿瘤病理特征都具有一定的指示作用。总体上这 6 种 miRNA 的差异性表达均能从组织学和血清学上区分乳腺肿瘤患者和健康人群, 而不同的 miRNA 还能指示不同的乳腺肿瘤病理特征 (图 3.8)。

4 总结与讨论

4.1 实验结论

1) 通过众多文献筛选出与乳腺肿瘤密切相关的 6 个 miRNA 作为研究靶点, 然后根据这 6 个 miRNA 的成熟体设计特异性的茎环引物和 PCR 引物, 通过 RT-PCR 以及克隆和测序, 证明目标 miRNA 在血清中稳定存在并表达。表明从血清中寻找 miRNA 作为乳腺肿瘤分子标记物的可行性。

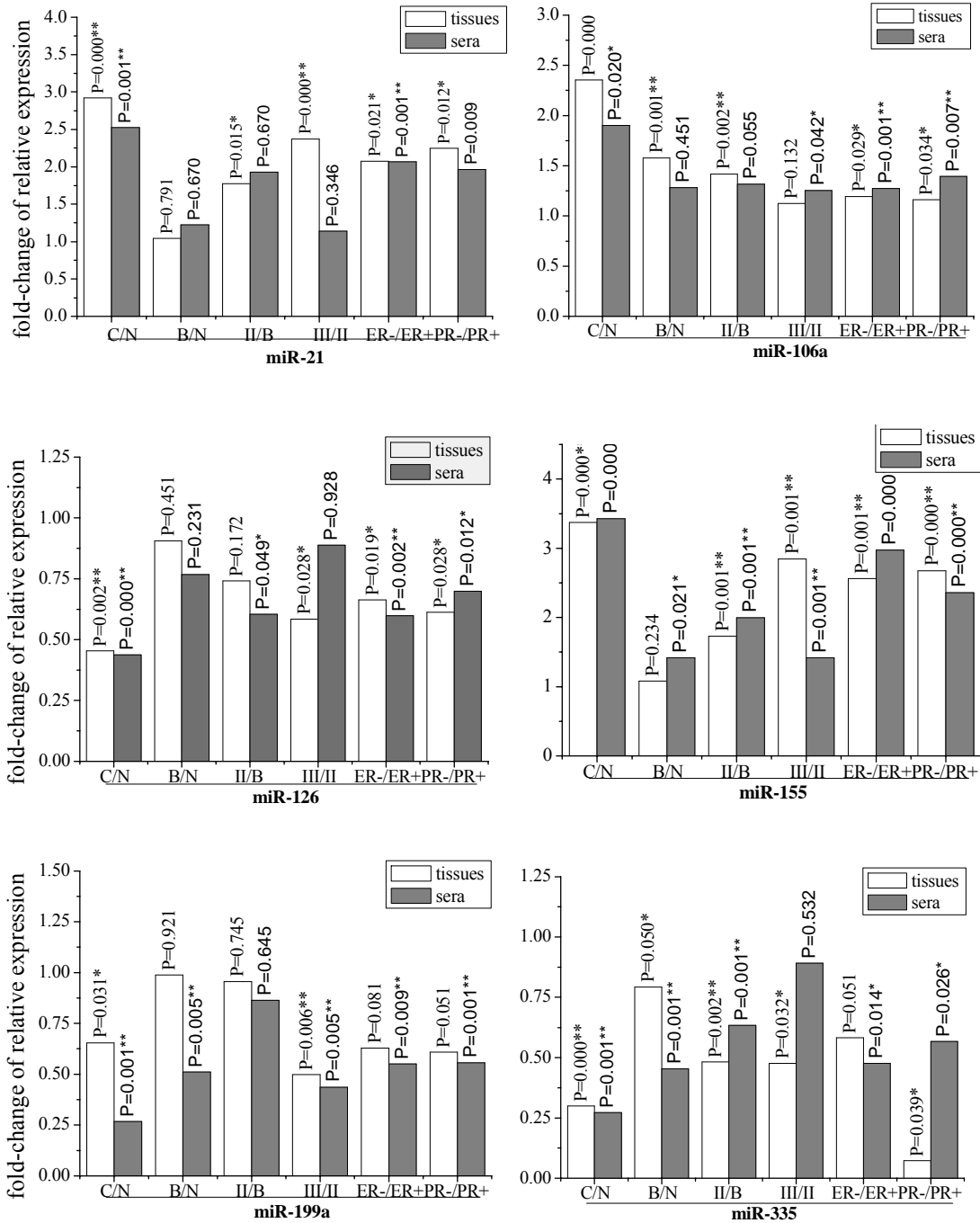


图 3.8 目标 miRNA 的差异性表达指示各乳腺肿瘤病理特征

采用 SPSS 16.0 (Sep 13, 2007) 统计分析 RT-q-PCR 所得的 miRNA 相对表达量数据, 其中通过 *Levene's* 检验两样本标准差是否相等, 通过两独立样本 t 检验计算 P 值。P 值以一个星号 (*) 标记表明其小于显著性标准 0.05。P 值以两个星号 (**) 标记表明其小于极显著性标准 0.01。

Fig 3.8 The differential expression of selected miRNAs discriminate the clinicopathologic features of both breast cancer tissues and sera.

Statistical analysis of RT-q-PCR data of miRNA relative expression was performed in SPSS 16.0 for Windows (Sep 13, 2007) and P-values was calculated using a *Levene's* test for equality of variances and independent-samples t test. Asterisks (*) indicate P value < 0.05. Double Asterisks (**) indicate P value < 0.01.

2) 利用荧光定量 PCR 技术和皮尔逊相关系数分析目标 miRNA 在正常人血清中表达无性别差异, 表明本实验收集到的男性健康志愿者血清也可作为乳腺肿瘤血清的对照样本, 并且血清 miRNA 对乳腺肿瘤的筛查无性别限制。

3) 对乳腺良性病变组织样本和乳腺癌变组织样本及其癌旁正常组织样本中 miRNA 表

达水平的分析以及乳腺肿瘤不同病理分级和不同雌、孕激素受体表达量上 miRNA 表达水平的差异性分析,表明 miRNA 在组织学水平上可筛查乳腺肿瘤并指示乳腺肿瘤的临床病理特征。

4) 对乳腺癌患者的血清样本中 miRNA 表达水平的分析以及乳腺肿瘤不同病理分级和不同雌、孕激素受体表达量上 miRNA 表达水平的差异性分析,表明 miRNA 在血清学水平上也可筛查乳腺肿瘤并指示乳腺肿瘤的临床病理特征。

5) 验证 miRNA 在乳腺肿瘤患者的乳腺组织和血清中的表达水平具有显著的相关性。从血清水平上得到的 miRNA 的表达情况可反映其在普遍共识的组织中的表达状况,证明 miRNA 可作为乳腺肿瘤潜在的血清学分子标记物。

4.2 讨论分析

1) miRNA 作为乳腺肿瘤血清学分子标记物

通过体外检测血清中 miRNA 的表达情况能否代表具有组织特异性的 miRNA 在人体组织内部表达的情况,这一问题还未通过研究加以证明。尽管血清中 miRNA 丰度较组织中低得多,但却具有组织无法比拟的异常的稳定性,其次血清 miRNA 主要来自于细胞, miRNA 在血清和组织中的表达必将具有较高的相似性。从该理论基础出发,本实验分析了目标 miRNA 在乳腺组织和血清中表达的相关性,其结果表明目标 miRNA 在乳腺肿瘤组织和血清中的表达水平具有显著的相关性。进一步说明 miRNA 在血清中的表达水平可反映乳腺组织样本的病理特点,进而确定血清 miRNA 可作为乳腺肿瘤的生物标记物来指示肿瘤的临床病理情况,为乳腺癌早期筛查和无创诊断开拓了广阔的应用前景。

2) 基于荧光定量 PCR 技术检测血清 miRNA 表达

本实验对血清 miRNA 的检测采用基于茎-环的 RT-PCR 方法,通过设计反转录茎环引物和特异性的 PCR 引物,经反转录和 cDNA 扩增反应以及克隆测序和溶解曲线分析实现 miRNA 的特异性表达。此外,本文还选用较少使用的保守性 miRNA (miR-16) 作为内参照基因,对表达量进行标准化,来克服常规使用的核糖体 RNA (5S, 18S), U6 以及大分子 mRNA (GAPDH, ACTIN) 在血清中表达不稳定或表达量过高,而不能作为内参照的难题。实验结果表明, miR-16 在众多组织和血清样本中均具有较高的稳定性和重现性,可作为内参照基因对目标基因进行标准化。此外,为保证血清 miRNA 在临床病理指示上的高敏感度和高精度,今后需要建立和形成一套标准化的血液样本采集、运输保存、血清分离、RNA 提取制备和实时定量 PCR 检测技术体系,以及数据处理系统,确保 miRNA 检测结果标准化,使得基于荧光定量 PCR 技术利用 miRNA 作为分子标记的方法比传统的蛋白分子标记方法将更加有效,这也克服分子标记在抗体制备和定量分析上发展所遇到的瓶颈。

3) 目标 miRNA 指示乳腺肿瘤病理特征

随着癌症特异性的 miRNA 表达谱的研究, miRNA 的表达水平与低分化癌肿的病理分级的相关性也逐渐被提及。本文通过荧光定量技术检测正常人群,乳腺良性病变患者和乳腺癌患者的组织和血清中目标 miRNA 表达水平,经数据处理和统计分析,发现目标 miRNA 对乳腺肿瘤病理特征具有较明确的指示作用。这种指示作用主要表现在:

在组织水平上, miR-106a 在乳腺样本中的表达变化量可用来区分良性病变组织; miR-21, miR-155 和 miR-335 的表达变化量可用来区分良、恶性肿瘤,进而采取不同的诊疗措施; miR-21, miR-155 和 miR-199a 的表达变化量可区分高增值指数的癌肿,进而考虑更

为激进的治疗方案。这些 miRNA 的表达失调可能是影响肿瘤增殖的关键分子事件，有望作为区分乳腺肿瘤病理状态的生物标记物。

在血清水平上，miR-199a 和 miR-335 识别乳腺良性病变肿瘤血清，进而从正常人群中无创伤性地筛查良性肿瘤患者以得到积极的早期诊断；miR-21，miR-155 和 miR-335 可区分乳腺良、恶性肿瘤，进而积极采取适合的诊疗措施；miR-21，miR-155 和 miR-199a 可区分高增值指数的癌肿，进而考虑更为激进的治疗方案，以降低死亡风险。因此在血清中检测这些 miRNA 的表达变化量对乳腺肿瘤快速筛查，临床诊断和治疗具有重要作用，有望作为乳腺诊断和治疗的血清学生物标记物。

在乳腺癌病理状态鉴定过程中可利用 miRNA 的差异性表达水平来反映 ER、PR 在乳腺肿瘤中的表达情况。主要表现在：miR-155 在乳腺癌组织中的高表达可区分 ER 阴性可 PR 阴性，从而从组织学水平上反映 ER、PR 的表达情况；miR-155，miR-106a 和 miR-199a 的差异性表达可从血清学水平上反映 ER、PR 在乳腺肿瘤中的表达情况，而避免组织切片鉴定 ER/PR 的滞后性和创伤性，从而能更快捷对病人进行筛查和诊断并采取有效的治疗方案，具有广泛的临床应用前景。

4.3 进一步研究

1) 由于本文未使用 miRNA 基因芯片平台，没有在整个 miRNA 基因组范围内筛选与乳腺肿瘤相关的 miRNA，因此在确定乳腺肿瘤分子标记物时，还存在更多的候选的 miRNA。

2) 本文所使用的实验样本都来源于有限人群中的 48 名乳腺肿瘤患者和 20 名正常志愿者，因此，在任何其他标志物被证实可用于临床之前，进一步的大样本实验是十分必须的。

3) 本实验由于样本量较少，所关注的乳腺癌临床病理特征仅仅局限于临床病理分级和雌、孕激素受体表达水平，而对于乳腺肿瘤来说 TNM 病理分期、淋巴转移情况以及预后都将成为研究重点，寻找与其相关的 miRNA 作为指示临床病理特征的潜在的分子标记物。

参考文献

- [1] A. Jemal, L.X. Clegg, E. Ward, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival [J]. *Cancer*, 2004, 101(1): p. 3-27.
- [2] H.K. Weir, M.J. Thun, B.F. Hankey, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2000, featuring the uses of surveillance data for cancer prevention and control [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2003, 95(17): p. 1276-1299.
- [3] A. Jemal, R. Siegel, E. Ward, et al. Cancer statistics, 2008 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2008, 58(2): p. 71-96.
- [4] M. Baum. Patients' perception of risk and breast cancer awareness [J]. *Br J Radiol*, 1997, 70(836): p. 777-781.
- [5] R. Peto, J. Boreham, M. Clarke, et al. UK and USA breast cancer deaths down 25% in year 2000 at ages 20-69 years [J]. *Lancet*, 2000, 355(9217): p. 1822.
- [6] G.A. Calin, C. Sevignani, C.D. Dumitru, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(9): p. 2999-3004.
- [7] M.V. Iorio, M. Ferracin, C.G. Liu, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(16): p. 7065-7070.
- [8] H.A. Visser-Wisselaar, C.J. Van Uffelen, P.M. Van Koetsveld, et al. 17-beta-estradiol-dependent regulation of somatostatin receptor subtype expression in the 7315b prolactin secreting rat pituitary tumor in vitro and in vivo [J]. *Endocrinology*, 1997, 138(3): p. 1180-1189.
- [9] J. Lu, G. Getz, E.A. Miska, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers [J]. *Nature*, 2005, 435(7043): p. 834-838.
- [10] D.D. Taylor and C. Gercel-Taylor. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2008, 110(1): p. 13-21.
- [11] K.E. Resnick, H. Alder, J.P. Hagan, et al. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform [J]. *Gynecol Oncol*, 2008.
- [12] X. Chen, Y. Ba, L. Ma, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for

- diagnosis of cancer and other diseases [J]. *Cell Res*, 2008, 18(10): p. 997-1006.
- [13] C.H. Lawrie, S. Gal, H.M. Dunlop, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Br J Haematol*, 2008, 141(5): p. 672-675.
- [14] P.S. Mitchell, R.K. Parkin, E.M. Kroh, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(30): p. 10513-10518.
- [15] S. Zhu, H. Wu, F. Wu, et al. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis [J]. *Cell Res*, 2008, 18(3): p. 350-359.
- [16] L.X. Yan, X.F. Huang, Q. Shao, et al. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis [J]. *RNA*, 2008, 14(11): p. 2348-2360.
- [17] S. Volinia, G.A. Calin, C.G. Liu, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(7): p. 2257-2261.
- [18] K.A. Cissell, Y. Rahimi, S. Shrestha, et al. Bioluminescence-based detection of microRNA, miR21 in breast cancer cells [J]. *Anal Chem*, 2008, 80(7): p. 2319-2325.
- [19] T.E. Miller, K. Ghoshal, B. Ramaswamy, et al. MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27Kip1 [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(44): p. 29897-29903.
- [20] O. Kovalchuk, J. Filkowski, J. Meservy, et al. Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin [J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(7): p. 2152-2159.
- [21] I. Faraoni, F.R. Antonetti, J. Cardone, et al. miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1792(6): p. 497-505.
- [22] S.F. Tavazoie, C. Alarcon, T. Oskarsson, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis [J]. *Nature*, 2008, 451(7175): p. 147-152.
- [23] C. Blenkinson, L.D. Goldstein, N.P. Thorne, et al. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype [J]. *Genome Biol*, 2007, 8(10): p. R214.

Correlation analysis and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from the patients with breast tumor

Wang Fengjun^a, Zheng Zhiguo^b, Guo Jiangfeng^{a,*}, Ding Xianfeng^{a,*}

^a Institute of Bioengineering, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou, Zhejiang, P.R. China (310018)

^b Zhejiang Cancer Research Institute, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou, Zhejiang, P.R. China (310022)

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are involved in the initiation and progression of human malignancy and hold much potential for new developments in cancer detection, current diagnostic and therapeutic strategies in the management of patients with breast cancer. However, the studies on cancer specific miRNA expression profiling are still limited to tissue specimens by recent works. Clinical specimens of sera are more plentiful existence and conveniently obtained than tissues. Serum-derived miRNAs are validated to be stable present in human organization. In this study, forty-eight pairs of tumor tissues and adjacent non-tumor tissues and matched serum samples were collected from patients with newly diagnosed breast tumor. Twenty unmatched, healthy serum controls were collected to serve as comparison. Six miRNAs (miRNA-21, 106a, 126, 155, 199a and 335) previously demonstrated as diagnostic, were selected and quantified their aberrant expression level both in tissue and matched serum samples of breast tumor using real-time PCR platform. The selected miRNAs were identified to be significantly differentially expressed both in tissue and matched serum tumors compared with their normal controls. A high correlation of miRNA expression level was found between breast tumor tissues and sera ($R^2=0.853$). MiR-21, miR-106a and miR-155 were significantly over-expressed in the tumor specimens compared with normal controls, whereas, miR-126, miR-199 and miR-335 were significantly under-expressed ($P<0.05$). Additionally, the selected miRNAs are closely associated with clinicopathologic features of breast tumor, such as tumor histological grade and hormone receptor status. It is advantageous and rational for miRNAs as blood-based biomarkers for cancer detection, diagnosis and prognosis.

Keywords: MicroRNA; breast tumor; serum; biomarkers