

miR-146a 在乳腺浸润性导管癌中的表达及临床意义

田南南, 杨建新

(广东药学院, 广东 广州 510080)

【摘要】 目的 观察 microRNA-146a (miR-146a) 在乳腺浸润性导管癌及癌旁正常对照组织中的表达, 探讨 miR-146a 的表达与乳腺癌临床病理特征的关系及其对乳腺癌发生发展的影响。方法 采用组织芯片平台, 应用原位杂交方法检测 65 例乳腺浸润性导管癌及癌旁正常对照组织中 miR-146a 的表达。结果 乳腺浸润性导管癌 miR-146a 阳性率低于癌旁正常对照组织 (44.6% vs 66.2%, $P < 0.05$); 乳腺浸润性导管癌中 miR-146a 的表达与淋巴结转移有关联 ($P < 0.01$), 与患者年龄、肿瘤大小、组织学分级、TNM 分期、ER、PR、c-erbB-2、ki67、p53、E-cadherin 过表达均无相关性 ($P > 0.05$)。结论 miR-146a 在乳腺浸润性导管癌中表达下调, 提示其可能作为重要的抑癌因子参与乳腺癌的发生发展过程, 并可能成为乳腺癌新的肿瘤标记物或预后因子。

【关键词】 乳腺浸润性导管癌; miR-146a; 临床病理特征; 原位杂交

【中图分类号】 R737.9 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2013)24-3599-03

Expression of miR-146a in breast infiltrative ductal carcinoma and its clinical significance. TIAN Nan-nan, YANG Jian-xin. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510080, Guangdong CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the expression of microRNA-146a (miR-146a) in breast infiltrative ductal carcinoma and its clinicopathologic significance. **Methods** miR-146a expression was detected in 65 cases of breast infiltrative ductal carcinoma and corresponding paracarcinoma normal tissues on tissue microarray sections by in situ hybridization. **Results** The expression rate of miR-146a in breast infiltrative ductal carcinoma was significantly lower than that of the paracarcinoma normal tissues (44.6% vs 66.2%, $P < 0.05$). There were positive correlations between miR-146a expression and lymph node metastasis ($P < 0.01$). There were no correlations between the expression of miR-146a and age, size, histological grading, TNM stage, ER and PR status, c-erbB-2 over expression, ki-67 positive expression, P53 positive expression, E-cadherin positive expression. **Conclusion** The down-expression of miR-146a in the breast infiltrative ductal carcinoma suggests that it may be involved in tumorigenesis of breast carcinoma. miR-146a may become a novel tumormarker or prognostic factor for breast carcinoma.

【Key words】 Breast infiltrative ductal carcinoma; microRNA-146a (miR-146a); Clinicopathologic characteristics; In situ hybridization

乳腺癌是女性发病第一位的恶性肿瘤, 而浸润性导管癌是临床上最为常见的病理类型。近年相关研究表明, miRNA 在恶性肿瘤中呈过表达^[1]或表达明显下调^[2], 具有癌基因或抑癌基因的作用。miRNA 通过与靶 mRNA 特异性的碱基配对结合, 引起靶 mRNA 的降解或抑制其翻译, 导致靶基因的转录后沉默而发挥其功能调控作用。microRNA-146a (miR-146a) 作为 miRNA 中的一员, 除了在免疫反应中发挥重要作用外, 多项研究提示其同样参与和肿瘤的发生发展相关的许多重要生物学过程, 包括增殖、凋亡、转移^[3]。我们在组织芯片平台上, 采用原位分子杂交方法检测乳腺浸润性导管癌与癌旁正常对照组织中 miR-146a 的表达, 从分子水平探讨 miR-146a 在乳腺癌中的表达及意义。

1 材料与方法

1.1 标本来源 人乳腺癌组织芯片(产品编号: OD-CT-RpBre01)共 328 片, 直径约 1.0 mm, 厚度 4 μm , 购自上海芯超生物科技有限公司, 包括 82 例浸润性导管癌患者, 均为女性, 癌和癌旁组织各两点。取其中病理资料(ER、PR、c-erbB-2、ki67、P53、E-cadherin)完善的 65 例作为原位杂交的标本, 年龄 33~88 岁, 平均 (56.5 \pm 8.2) 岁。按美国癌症联合委员会(AJCC)第六版制定的 TNM 分期: I 期 18 例, II 期 31 例, III 期 16 例; 有淋巴结转移 36 例, 无淋巴结转移 29 例。

1.2 主要试剂 原位杂交检测试剂盒 MK1303 和寡核苷酸探针稀释液购自武汉博士德生物工程有限公司。miR-146a 地高辛标记探针购自丹麦 Exiqon

公司, 探针序列为 AACCCATGGAATTCAGTTCT-CA。DEPC 由美国 Sigma 公司生产, NBT/BCIP 碱性磷酸酶显色试剂盒购自美国 Roche 公司。

1.3 实验方法 简要步骤如下: 切片脱蜡、水化后用蛋白酶 K 37℃ 孵育 20 min, 加入杂交液后在恒温箱 54℃ 预杂交 2 h, 再加入 miR-146a 探针 54℃ 杂交过夜。冲洗后用 2% 山羊血清室温封闭 1 h, 加入抗地高辛抗体(1:500) 4℃ 孵育过夜。BCIP/NBT 染色液缓冲液洗两次, 每次 10 min, BCIP/NBT 暗处染色 4~48 h, TE (pH8.0) buffer 终止反应, 核固红复染, 蒸馏水冲洗, 封片, 镜检。用已知的阳性切片作阳性对照, 用 PBS 替代探针作阴性对照。

1.4 结果判断 由两位有经验的病理医师采用双盲法对原位杂交结果进行评定。Olympus 显微镜下观察(×200), miR-146a 以乳腺腺上皮或癌细胞胞质中出蓝紫色颗粒状为阳性染色, 采用定性法判断结果: 阳性细胞数 < 10% 为阴性(-), 阳性细胞数 ≥ 10% 为阳性(+)

1.5 统计学方法 采用 SPSS17.0 软件进行统计学处理。采用 χ^2 检验或四格表确切概率法。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-146a 在乳腺浸润性导管癌和癌旁正常对照组织中的表达 miR-146a 阳性信号主要定位于乳腺腺上皮或癌细胞胞质中, miR-146a 不同程度表达于乳腺浸润性导管癌和癌旁正常对照组织, miR-146a 在乳腺浸润性导管癌中的阳性表达率为 44.6%, 显著低于癌旁正常对照组织的 66.2%, 两者之间差异有统计学意义(P < 0.05), 见图 1、表 1。

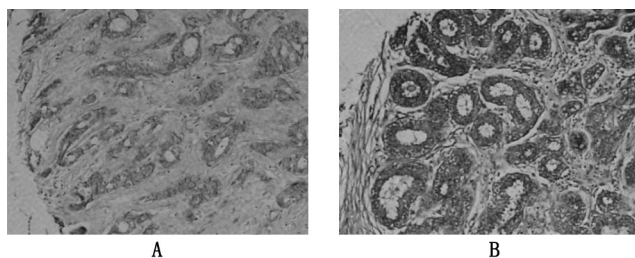


图 1 各组织 miR-146a 的表达(×200)

注: A, 乳腺浸润性导管癌; B, 癌旁正常对照组织。

表 1 乳腺浸润性导管癌、癌旁正常对照组织中 miR-146a 的表达(%)

组别	例数	miR-146a		χ^2 值	P 值
		阳性率	阴性率		
乳腺浸润性导管癌	65	44.6	55.4	6.102	0.014
癌旁正常对照组织	65	66.2	33.8		

2.2 乳腺浸润性导管癌 miR-146a 表达与患者临床病理特征的关系 乳腺浸润性导管癌 miR-146a

的表达与淋巴结转移有关联, 在淋巴结转移组的表达明显低于无淋巴结转移组, 差异有统计学意义(P < 0.05), 而与患者年龄、肿瘤大小、组织学分级、TNM 分期、ER、PR、c-erbB-2、ki67、p53、E-cadherin 过表达均无相关性(P > 0.05), 见表 2。

表 2 乳腺浸润性导管癌 miR-146a 表达与患者临床病理特征的关系

临床病理特征	分类	例数	阳性数[例(%)]	χ^2 值	P 值
年龄(岁)	≤ 50	13	8(61.5)	1.883	0.170
	> 50	52	21(40.4)		
肿瘤大小(cm)	≤ 2	11	6(54.5)	0.155	0.693
	> 2	54	24(44.4)		
组织学分级	低分化	17	6(35.3)	1.506	0.471
	中分化	28	12(42.9)		
	高分化	20	11(55.0)		
淋巴结转移	有	36	10(29.3)	9.258	0.002
	无	29	19(65.5)		
TNM 分期	I	18	10(55.6)	2.032	0.362
	II	31	14(45.2)		
	III	16	5(31.3)		
ER	+	35	17(48.6)	0.480	0.488
	-	30	12(40.0)		
PR	+	38	16(42.1)	0.233	0.629
	-	27	13(48.1)		
Cerb-2	+	49	21(42.9)	0.249	0.618
	-	16	8(50.0)		
Ki-67	+	60	26(43.3)	0.064	0.801
	-	5	3(60.0)		
P53	+	38	19(50.0)	1.073	0.300
	-	27	10(37.0)		
E-cadherin	+	53	26(49.1)	2.292	0.130
	-	12	3(25.0)		

3 讨论

miR-146a 的编码基因位于 5 号染色体 q33.3 区 LOC285628 基因上, 其成熟序列位于第二外显子上^[4], 且在不同的物种间具有高度保守性。miR-146a 是一种典型的多功能基因, 参与调控免疫细胞的分化及功能、炎症因子的信号转导、自身免疫性疾病、病毒感染及肿瘤的发生发展。自 Taganov 等^[5]的研究发现 miR-146a 在固有免疫应答中发挥重要负反馈调节作用后, 引发了 miR-146a 在免疫系统疾病中研究的热潮, 但其在肿瘤发生发展中的作用仍不容忽视。有研究表明, miR-146a 可能借助于 NF- κ B 在炎症与肿瘤之间发挥桥梁作用^[6]。

miRNA 在肿瘤组织与周围正常组织的 miRNA 表达谱之间存在很大变化, 这些差异表达的 miRNA 可能作为癌基因和或抑癌基因对肿瘤的发生发展起着决定性的作用。miR-146a 作为一种典型代表, 在

不同的肿瘤中起着不同的生物学功能。鲁琼等^[7]发现 miR-146a 在胶质瘤中的表达明显低于癌旁对照组织, 且进一步表明 miR-146a 可能通过抑制其靶基因 Notch1 的表达调控胶质瘤细胞的增殖。Hou 等^[8]发现 miR-146a 在胃癌组织和胃癌细胞系中表达降低, 并且其低表达和胃癌的低分化、肿瘤大小和预后相关。Pacifico 等^[9]发现在间变性甲状腺癌中 miR-146a 的表达是上调的, 这种上调具有 NF- κ B 依赖性, 并且抑制 miR-146a 的表达可以降低肿瘤细胞致瘤性和侵袭力。金丽艳等^[10]发现 miR-146a 在食管鳞癌组织中的表达显著高于癌旁正常组织, 其高表达与食管癌的分化程度、淋巴结转移、TNM 分期显著相关。敬敏等^[11]发现鼻咽癌组织中 miR-146a 表达水平明显高于鼻咽黏膜慢性炎症组织, 其在鼻咽癌淋巴结转移组中的表达水平高于无淋巴结转移组。而 miR-146a 在胰腺癌中的表达一直备受争议, 崔鹏等^[12]发现胰腺癌组织中 miR-146a 的表达显著高于胰腺良性病变组织。而 Li 等^[13]在胰腺癌细胞系 (Colo357 和 Panc-1) 中发现 miR-146a 的表达明显低于人胰腺导管上皮细胞, 以上结果表明 miR-146a 在肿瘤中的双重作用。

miR-146a 在乳腺癌中的表达变化及意义在国内外研究中很少有明确的相关报道, 国外有学者研究表明 BRMS1 (Breast cancer metastasis suppressor-1) 是 miR-146a 下游调控基因。外源性表达 BRMS1 可以使 miR-146a 在 MDA-MB-231 细胞株中表达下调。且进一步外源性升高 miR-146a 能使 MDA-MB-231 细胞 EGFR (Epidermal growth factor receptor) 表达降低, 细胞侵袭和转移能力降低^[14]。此外, 在高度转移的乳腺癌细胞株中转染 miR-146a 可以通过抑制其靶基因 IRAK1 (IL-1 receptor-associated kinase) 和 TRAF6 (Tumour-necrosis factor receptor-associated factor 6) 继而抑制 NF- κ B 信号通路, 促进细胞凋亡, 降低细胞侵袭和转移能力^[15]。以上的研究都是基于在乳腺癌细胞系中, 并没有在乳腺癌组织中进一步验证。本实验采用组织芯片平台, 用原位杂交的方法检测 65 例乳腺浸润性导管癌及癌旁正常对照组织中 miR-146a 表达水平, 并分析其与乳腺浸润性导管癌临床病理特征的关系, 结果显示 miR-146a 在乳腺浸润性导管癌中低表达, 在淋巴结转移组的表达明显低于无淋巴结转移组 ($P < 0.05$), 与患者年龄、肿瘤大小、组织学分级、TNM 分期、ER、PR、c-erbB-2、ki67、p53、E-cadherin 过表达均无相关性 ($P > 0.05$)。

综上所述, miR-146a 在乳腺浸润性导管癌组织表达下调可能参与了与乳腺癌的发生发展, 这为寻找新的乳腺癌治疗的靶点提供了新的思路。但本研究

获取的样本量较少, 与乳腺癌临床病理特征的关系不是很确切, 未来的研究应该加大样本量, 进一步探讨 miR-146a 与乳腺癌临床病理特征的关系, 为临床治疗提供更多的检测手段。同时构建 miR-146a 模拟物或抑制剂转入乳腺癌动物模型体内, 使其发挥促进或者抑制肿瘤细胞的作用, 从而更进一步探讨 miR-146a 在乳腺癌体内发生及发展过程中的作用及意义。

参考文献

- [1] Cameron JE, Yin Q, Fewell C, et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces cellular MicroRNA miR-146a, a modulator of lymphocyte signaling pathway [J]. *Virology*, 2008, 82(4): 1946-1958.
- [2] Paik JH, Jang JY, Jeon YK, et al. MicroRNA-146a downregulates NF- κ B activity via targeting TRAF6 and functions as a tumor suppressor having strong prognostic implications in NK/T cell lymphoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(14): 4761-4771.
- [3] 王晓龙, 马 军, 秦建军. miRNA-146a 在炎症与肿瘤之间的调节作用[J]. *河南大学学报*, 2013, 32(1): 61-65.
- [4] Nakasa T, Miyaki S, Okubuo A, et al. Expression of mi-croRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue [J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(5): 1284-1292.
- [5] Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, et al. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(33): 12481-12486.
- [6] Williams A, EPerry M, MMoschos SA, et al. Role of miRNA-146 in the regulation of the innate immune response and cancer [J]. *Biochem Soc Trans*, 2008, 36(6): 1211-1215.
- [7] 鲁 琼, 戴冬伟, 韩国胜, 等. MicroRNA-146a 抑制胶质瘤细胞增殖的研究[J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(24): 4821-4823.
- [8] Hou Z, Xie L, Yu L, et al. MicroRNA-146a is down regulated in gastric cancer and regulates cell proliferation and apoptosis [J]. *Med Oncol*, 2012, 29(2): 886-892.
- [9] Pacifico F, Crescenzi E, Mellone S, et al. Nuclear factor-kappa B contributes to anaplastic thyroid carcinomas through up-regulation of miR-146a [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(3): 1421-1430.
- [10] 金丽艳, 陈德玉, 毛朝明. miR-146a 在食管鳞癌中的表达及意义 [J]. *江苏大学学报(医版)*, 2012, 22(5): 422-425.
- [11] 敬 敏, 赵颖海, 陈小毅, 等. miRNA-146 在鼻咽炎症和癌症病变组织中的表达及意义[J]. *山东医药*, 2012, 52(37): 1-3.
- [12] 崔 鹏, 区金锐, 简志祥, 等. miR-146a 在胰腺癌组织中的表达及临床意义[J]. *岭南现代临床外科*, 2013, 13(1): 18-21.
- [13] Li Y, Vandenboom TN, Wang Z, et al. miR-146a suppresses invasion of pancreatic cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(4): 1486-1495.
- [14] Hurst DR, Edmonds MD, Scott GK, et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 up-regulates miR-146, which suppresses breast cancer metastasis [J]. *Cancer Res*, 2009, 69:1279-1283.
- [15] Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, et al. Expression of microRNA-146 suppresses NF-kappaB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells [J]. *Oncogene*, 2008, 27: 5643-5647.

(收稿日期: 2013-05-28)