

• 论 著 •

微小 RNA 多态性与中国女性人群乳腺癌发病及病理特征的相关性研究

朱成宾¹, 潘玉琴², 何帮顺²

[摘要] **目的** 探讨 6 个微小 RNA (microRNA) 多态性位点 (rs11614913, microRNA-196a2; rs3746444, hsa-mir-499; rs2910164, microRNA-146a; rs2292832, microRNA-149; rs6505162, microRNA-423; rs895819, microRNA-27a) 与中国女性乳腺癌发病风险及病理特征的相关性。**方法** 采用病例对照研究, 选取 350 例乳腺癌患者为病例组及 350 名正常女性为对照组, 采用 Massarray SNP 技术检测 6 个多态性位点的基因型, 采用免疫组化法检测乳腺癌组织中的雌激素受体及孕激素受体表达, 分析各基因型与乳腺癌发生的关系及与乳腺癌病理参数的关系。**结果** rs3746444GG 基因型在病例组中 (OR = 1.71, 95% CI: 1.16 ~ 2.52) 的频率显著高于对照组。分层分析结果显示, 在绝经后的人群中, rs3746444GG 基因型病例组中的频率 (OR = 2.19, 95% CI: 1.16 ~ 4.15) 显著高于对照组。rs3746444GG 基因型在肿瘤分期 0 ~ II 组 (OR = 1.92, 95% CI: 1.17 ~ 3.13)、淋巴结转移组 (OR = 2.20, 95% CI: 1.28 ~ 3.79)、孕激素受体阴性组中 (OR = 2.19, 95% CI: 1.25 ~ 3.82) 分布频率均显著高于正常对照组。在绝经后人群中, rs2910164GG 基因型在病例组中 (OR = 2.19, 95% CI: 1.16 ~ 4.15) 的分布频率显著高于对照组。而在绝经前的人群中, rs2910164GG 基因型在病例组中 (OR = 0.49, 95% CI: 0.25 ~ 0.98) 的分布频率显著低于对照组。**结论** rs3746444GG 基因型与乳腺癌发病风险相关, 特别是在绝经后人群中风险更高。rs2910164GG 基因型与乳腺癌的发病风险相关性与妇女是否绝经有关。

[关键词] 乳腺癌; 微小核糖核酸; 多态性

[中图分类号] R737.9 **[文献标志码]** A **doi:**10.3969/j.issn.1672-271X.2015.01.007

Study on the association of polymorphisms in microRNAs and risk of breast cancer and its clinic pathological parameters

ZHU Cheng-bin¹, PAN Yu-qin², HE Bang-shun². 1. Department of Clinical Laboratory, 2. Central Laboratory, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210006, China

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between the polymorphisms in microRNAs (rs11614913, miRNA-196a2; rs3746444, hsa-mir-499; rs2910164, miRNA-146a; rs2292832, miRNA-149; rs6505162, miRNA-423; rs895819, miRNA-27a) and risk and pathologic characterize of breast cancer in Chinese female population. **Methods** A total of 350 patients with breast cancer and 350 health controls were enrolled for this case-controls study. Sequenom MassARRAY was applied to detect the polymorphisms, and the immunohistochemistry assay was used to measure the expression of estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR). Logistic regression was applied to assess the association between the polymorphisms and risk and pathologic characterize of breast cancer. **Results** The results showed that the frequency of 3746444GG genotype (OR = 1.71, 95% CI: 1.16 - 2.52) was higher in cases than that in health controls. Sub-group analysis revealed that, in the subgroup of women with postmenopausal status, the frequency of 3746444GG genotype (OR = 2.19, 95% CI: 1.16 - 4.15) was higher in cases than that in health controls. Moreover, the frequency of 3746444GG was higher in subgroup of patients with tumor stage 0 - II (OR = 1.92, 95% CI: 1.17 - 3.13), lymph node involvement (OR = 2.20, 95% CI: 1.28 - 3.79), negative PR expression (OR = 2.19, 95% CI: 1.25 - 3.82) than that in health controls, respectively. In addition, rs2910164GG genotype (OR = 2.19, 95% CI: 1.16 - 4.15) was associated with increased breast cancer risk in the postmenopausal status sub-cohort, while, rs2910164GG genotype (OR = 0.49, 95% CI: 0.25 - 0.98) was associated with decreased breast cancer risk in the premenopausal status sub-cohort. **Conclusion** rs3746444GG genotype was associated with breast cancer risk, especially for women who with postmenopausal status. The risk of rs2910164GG for breast cancer was modified by the postmenopausal status.

[Key words] breast cancer; microRNA; polymorphism

基金项目: 国家自然科学基金 (81200401); 南京市医学科学技术发展项目 (JQX13003, QRX11254, QYK11175)
作者单位: 210006 江苏南京, 南京医科大学附属南京医院 (南京市第一医院), 1. 检验科, 2. 中心实验室
通讯作者: 何帮顺, E-mail: hebangshun@163.com

乳腺癌是女性易患的恶性肿瘤之一, 严重地影响了女性的健康。近年来研究显示环境因素及遗传因素在乳腺癌发病过程中起着重要的作用^[1]。微小 RNA (microRNA) 是一段 19 ~ 25 bp 的核苷酸片

段,其可以结合到靶基因的 3' 非翻译区(3'UTR)或信使 RNA (mRNA),从而影响到 mRNA 的转录效率和稳定性,发挥对靶基因负相调控作用^[2-3]。现有研究已经证实 microRNA 可以调节细胞的分化^[4]、增殖及凋亡^[5-6],从而对个体的生理及病理进程中发挥着重要的作用。此外,研究亦显示 microRNA 具有癌基因或抑癌基因的特点,在肿瘤的发生及进展过程中发挥着重要的作用^[7-8]。

MicroRNA 的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)可以影响 microRNA 前体的成熟及其与靶基因的结合^[9],从而影响到其对靶基因的调控,并与多种肿瘤的发生相关^[10]。目前最为关注的 SNPs 主要有 6 个(rs11614913, miRNA-196a2; rs3746444, hsa-mir-499; rs2910164, miRNA-146a; rs2292832, miRNA-149; rs6505162, miRNA-423; rs895819, miRNA-27a),在多种肿瘤的发生发展中被广泛探讨。我们前期对 4 个 microRNA SNPs (rs11614913, rs3746444, rs2910164, rs2292832)与肿瘤的发生发展进行了荟萃分析^[11],发现 rs11614913 位点与结直肠癌及食道癌发生相关,rs2910164 位点与食道癌、宫颈癌、前列腺癌及肝癌相关。然而对于上述位点与乳腺癌的相关性报道结果并不尽一致^[12-14],特别是在不同种族中差异较大。而在中国人群中,上述 6 个 SNPs 与乳腺癌的相关性鲜有报道,经查阅 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>),显示上述 6 个多态性位点在中国人群中频率均 > 5%。因此,为进一步探讨 microRNA SNPs 与乳腺癌发生的相关性,本研究拟对上述 6 个 microRNAs 的 SNPs 位点与中国人群的女性乳腺癌发生风险及病理特征相关性进行探讨。

1 资料与方法

1.1 研究人群 2008 年 1 月-2013 年 1 月来南京医科大学附属南京医院就诊并经病理诊断为女性乳腺癌 350 例,为病例组。同期以健康体检正常的 350 名女性为对照组。两组均为汉族,为南京及周边地区人群,在年龄、文化程度及地理分布等差异无统计学意义($P > 0.05$),两组人群均无吸烟、饮酒及肿瘤家族史。本研究方案得到南京医科大学附属南京医院伦理委员会批准,受试者均填写知情同意书。

1.2 病理诊断与分类 乳腺癌患者依肿瘤大小(T)、淋巴结(N)和远处部位有无淋巴结转移(M)(TNM)进行临床 I ~ IV 分期。病理组织及同时摘取的周围淋巴结与易被侵犯的远端淋巴结由本院病理科完成病理分析。

1.3 基因组 DNA 提取及基因分型 抽取受试者 EDTA-K₂ 抗凝血 3 mL,全血经离心去血浆后在剩下的血细胞中加入 3 mL 人红细胞裂解液,混匀震荡 3 min 溶解红细胞,10 000 × g 离心 30 s,沉淀白细胞;采用 DNA 提取试剂盒(西安金磁纳米生物技术有限公司),按照试剂盒说明书提取基因组 DNA,采用 NanoDrop2000c 型蛋白核酸检测仪(美国 Thermo 公司)进行提取的基因组 DNA 质量检测,合格后进行下一步分析。基因型检测采用 MassARRAY 分子量阵列技术进行检测(由陕西佰美基因股份有限公司协助完成)。具体过程主要包括:①根据 NCBI 数据库获取 6 个多态性位点的序列(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>);②采用 Genotyping Tools 和 MassarrayAssay Design 软件设计(Sequenom 公司)6 个 SNPs 位点的 PCR 扩增引物和单碱基延伸引物(由上海英骏生物公司合成),最后由检测工作站完成检测。

1.4 免疫组化实验 采用免疫组化法对乳腺癌石蜡组织中的雌激素受体与孕激素受体的表达进行检测。实验主要过程如下:①从石蜡包埋的乳腺癌组织中切出 3 μm 的肿瘤组织切片,置于载玻片 37 ℃ 孵育过夜,烤片后脱蜡;②对切片采用 0.01M 柠檬酸盐(pH 6.0)缓冲液进行高温高压修复,用 3% H₂O₂ 消除内源性过氧化物的活性;③抗雌激素受体及孕激素受体单克隆抗体(Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA)孵育(1:200),阴性对照用 PBS 代替一抗;替代实验分别用 PBS 和生理盐水替代第一抗体。二抗孵育(MaxVision™ 试剂盒,福州迈新生物技术开发有限公司);④DAB 溶液显色,苏木素复染及中性树胶封固;⑤在 400 倍视野下观察 10 个视野计算阳性细胞数,以阳性细胞数大于 10% 为阳性病例。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 11.0 软件包进行统计学分析。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料以例数、百分比(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。多态性位点的基因型与患病风险的关系分析采用二分类因变 logistic 回归分析,以比值比(OR)及 95% 可信区间(CI)表示相对风险度。

2 结果

2.1 两组的基本情况 病例组与对照组在年龄及绝经的差异无统计学意义($P > 0.05$)。对照组的各多态性位点的基因型符合 Hardy-Weinberg 平衡,提示样本来自一个稳定的群体。

2.2 基因型分布 rs3746444 位点在两组中分布的差异显著,其中 GG 基因型在病例组中的频率($OR = 1.71, 95\% CI: 1.16 \sim 2.52$)显著高于对照组($P < 0.05$)。其余位点的各基因型在两组间分布频率的差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 基因型分布与妇女月经状态的关系 rs3746444 位点在绝经后的两组人群中的分布有显著差异,其中 GG 基因型在病例组中的频率($OR = 2.19, 95\% CI: 1.16 \sim 4.15$)显著高于对照组($P < 0.05$)。rs2910164GG 基因型在病例组中的分布频率($OR = 2.19, 95\% CI: 1.16 \sim 4.15$)亦显著高于对照组($P < 0.05$)。而在绝经前的人群中,rs2910164GG 基因型在病例组中的分布频率($OR = 0.49, 95\% CI: 0.25 \sim 0.98$)显著低于对照组($P < 0.05$)。

2.4 rs3746444 位点的 GG 基因型分布与乳腺癌病理特征的关系 rs3746444 位点的 GG 基因型在肿瘤分期 I ~ II 组、有淋巴结转移组、孕激素受体阴性组中分布频率均高于正常对照组($P < 0.05$)。而在雌激素受体阴性组及阳性组中,rs3746444GG 基因型分布频率均显著高于正常对照组($P < 0.05$)。在有淋巴结转移组中,rs3746444AG/GG 的分布频率亦显著高于对照组($P < 0.05$)。

3 讨论

本研究显示,rs3746444GG 基因型与乳腺癌的发生风险相关,且在绝经后人群中发病风险显著相关。rs2910164GG 基因型与乳腺癌的相关性受到月经状态的影响。

近年来 microRNA 的 SNPs 与肿瘤的相关性受到广泛关注,然而研究的结果不尽相同^[11,15-16]。rs11614913 位点位于 microRNA-196a-2 的 mature 成熟片段中,相关研究显示 rs11614913T 等位基因能够影响其由前体向成熟片段的加工,进而影响其抑制靶基因表达的调控^[13]。该位点的多态性与肿瘤的发病风险相关,然而在不同的肿瘤中呈现不同的结果^[15]。另有分析显示,rs11614913 位点的多态性与乳腺癌的发病风险无相关性^[11,15,17-18]。在中国人群中亦有相关的研究报告^[14,19],本研究结果与之相符。

rs3746444 位点定位于 microRNA-499a 成熟的片段的 3p 区域,其多态性同样会影响到其加工成熟。近年来,有研究报道在亚洲人群中 rs3746444 与乳腺癌的发病相关^[12,20-21],与本研究显示 rs3746444GG 基因型与乳腺癌的发病风险相关的结果一致。然而,在欧洲人群中发现该位点与乳腺癌的风

险无相关性^[22],有研究认为 rs3746444 位点与乳腺癌相关性在不同的种族中呈现不同的结果^[11,15,17]。Landgraf 等^[23]报道 microRNA-499a-3p 在侵袭性乳腺癌细胞株中表达,并靶向 FOXO4 及 PDCD4 抑癌基因,提示与乳腺癌的病理进展相关。相关研究亦揭示 microRNA-499 在绝经后的人群中的表达量显著高于绝经前^[20],提示妇女绝经后,rs3746444GG 基因型导致 microRNA-499a-3p 升高,并参与乳腺癌的病理进程,其机制还有待于进一步证实。

rs2910164 定位于 microRNA-146a,研究发现其与多种肿瘤的发病风险相关^[11,15]。从现有研究分析,该位点的基因多态性与肿瘤风险的相关性受肿瘤的类型及不同种族的影响,而与乳腺癌发病风险无相关性^[11,15,17,24],本研究结果与之及 2 篇有关中国人群的报道相一致^[12,19]。然而本研究显示,在绝经后的人群中 rs2910164GG 与乳腺癌的发病风险相关,而在绝经前的人群中显示可以降低乳腺癌的发病风险。相关的研究结果亦显示,rs2910164GG 基因型的人群在乳腺癌发病人群中年龄较大,研究还显示 G 等位基因与 microRNA-146a 的低表达相关,其通过调控癌基因 BRCA1 的表达参与乳腺癌的病理进程^[25]。

综上所述,rs3746444GG 基因型与乳腺癌发病风险相关,特别是在绝经后人群中风险更高。rs3746444GG 基因型与乳腺癌淋巴结转移、肿瘤的早期分期及雌激素受体阴性相关,而 rs2910164GG 基因型与乳腺癌的发病风险与妇女是否绝经有关。

【参考文献】

- [1] Benz CC. Impact of aging on the biology of breast cancer[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2008, 66(1): 65-74.
- [2] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14[J]. Cell, 1993, 75(5): 843-854.
- [3] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [4] Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation[J]. Nat Genet, 2006, 38(2): 228-233.
- [5] Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, et al. The 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.
- [6] Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(39): 13944-13949.
- [7] Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(9): 2999-3004.

- [8] Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(11): 3753-3756.
 - [9] Iwai N, Naraba H. Polymorphisms in human pre-miRNAs[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 331(4): 1439-1444.
 - [10] Ryan BM, Robles AI, Harris CC. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(6): 389-402.
 - [11] He B, Pan Y, Cho WC, et al. The association between four genetic variants in microRNAs (rs11614913, rs2910164, rs3746444, rs2292832) and cancer risk: evidence from published studies[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): 49032.
 - [12] Hu Z, Liang J, Wang Z, et al. Common genetic variants in pre-microRNAs were associated with increased risk of breast cancer in Chinese women[J]. *Hum Mutat*, 2009, 30(1): 79-84.
 - [13] Hoffman AE, Zheng T, Yi C, et al. microRNA miR-196a-2 and breast cancer: a genetic and epigenetic association study and functional analysis[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(14): 5970-5977.
 - [14] Zhang M, Jin M, Yu Y, et al. Associations of miRNA polymorphisms and female physiological characteristics with breast cancer risk in Chinese population[J]. *Eur J Cancer Care (Engl)*, 2012, 21(2): 274-280.
 - [15] Ma XP, Zhang T, Peng B, et al. Association between microRNA polymorphisms and cancer risk based on the findings of 66 case-control studies[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): 79584.
 - [16] Srivastava K, Srivastava A. Comprehensive review of genetic association studies and meta-analyses on miRNA polymorphisms and cancer risk[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): 50966.
 - [17] Chen QH, Wang QB, Zhang B. Ethnicity modifies the association between functional microRNA polymorphisms and breast cancer risk: a HuGE meta-analysis[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(1): 529-543.
 - [18] Xu Y, Gu L, Pan Y, et al. Different effects of three polymorphisms in microRNAs on cancer risk in Asian population: evidence from published literatures[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): 65123.
 - [19] Ma F, Zhang P, Lin D, et al. There is no association between microRNA gene polymorphisms and risk of triple negative breast cancer in a Chinese Han population[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): 60195.
 - [20] Alshatwi AA, Shafi G, Hasan TN, et al. Differential expression profile and genetic variants of microRNAs sequences in breast cancer patients[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): 30049.
 - [21] Omrani M, Hashemi M, Eskandari-Nasab E, et al. Hsa-mir-499 rs3746444 gene polymorphism is associated with susceptibility to breast cancer in an Iranian population[J]. *Biomark Med*, 2014, 8(2): 259-267.
 - [22] Catucci I, Yang R, Verderio P, et al. Evaluation of SNPs in miR-146a, miR196a2 and miR-499 as low-penetrance alleles in German and Italian familial breast cancer cases[J]. *Hum Mutat*, 2010, 31(1): 1052-1057.
 - [23] Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing[J]. *Cell*, 2007, 129(7): 1401-1414.
 - [24] Wang AX, Xu B, Tong N, et al. Meta-analysis confirms that a common G/C variant in the pre-miR-146a gene contributes to cancer susceptibility and that ethnicity, gender and smoking status are risk factors[J]. *Genet Mol Res*, 2012, 11(3): 3051-3062.
 - [25] Shen J, Ambrosone CB, Dicioccio RA, et al. A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis[J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(10): 1963-1966.
- (收稿日期: 2014-10-26; 修回日期: 2014-11-22)
(本文编辑: 张仲书; 英文编辑: 王建东)

(上接第 7 页)

- [3] 李洁, 王坚. 非酒精性脂肪肝疾病的研究进展[J]. *东南国防医药*, 2008, 10(4): 280-282.
 - [4] 于康, 刘燕萍. 肥胖症的医学营养治疗[J]. *中国医学科学院学报*, 2011, 33(3): 239-242.
 - [5] Frigolet ME, Ramos Barragán VE, Tamez González M. Low-carbohydrate diets: a matter of love or hate[J]. *Ann Nutr Metab*, 2011, 58(4): 320-334.
 - [6] 顾景范, 杜寿玢, 查良锭, 等. 现代临床营养学[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 505-528.
 - [7] 王宇, 郑锦锋. 非酒精性脂肪肝营养干预的研究进展[J]. *医学研究生学报*, 2014, 27(1): 99-101.
 - [8] De Luis DA, Aller R, Izola O, et al. Effect of two different hypocaloric diets in transaminases and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease and obese patients[J]. *Nutr Hosp*, 2010, 25(5): 730-735.
 - [9] Browning JD, Baker JA, Rogers T, et al. Short-term weight loss and hepatic triglyceride reduction: evidence of a metabolic advantage with dietary carbohydrate restriction[J]. *Am J Clin Nutr*, 2011, 93(5): 1048-1052.
 - [10] 徐晓峰, 徐英美, 蔡纓, 等. 低血糖指数膳食对代谢综合征患者体重指数、腰臀比值及内脏脂肪的影响[J]. *东南国防医药*, 2008, 10(4): 261-263.
 - [11] Ebbeling CB, Swain JF, Feldman HA, et al. Effects of dietary composition on energy expenditure during weight-loss maintenance[J]. *JAMA*, 2012, 307(24): 2627-2634.
 - [12] 中国肥胖问题工作组数据联合汇总分析协作组. 我国成人体重指数和腰围对相关疾病危险因素异常的预测价值: 适宜体重指数和腰围切点的研究[J]. *中华流行病学杂志*, 2002, 23(1): 5-10.
 - [13] Schroder KE. Effects of fruit consumption on body mass index and weight loss in a sample of overweight and obese dieters enrolled in a weight-loss intervention trial[J]. *Nutrition*, 2010, 26(7-8): 727-734.
 - [14] Lepe M, BacardiGascón M, Jiménez Cruz A. Long-term efficacy of high-protein diets: a systematic review[J]. *Nutr Hosp*, 2011, 26(6): 1256-1259.
 - [15] Santesso N, Akl EA, Bianchi M, et al. Effects of higher-versus lower-protein diets on health outcomes: a systematic review and meta-analysis[J]. *Eur J Clin Nutr*, 2012, 66(7): 780-788.
 - [16] Friedman AN, Ogden LG, Foster GD, et al. Comparative Effects of low-carbohydrate high-protein versus low-fat diets on the kidney[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2012, 7(7): 1103-1111.
- (收稿日期: 2014-09-09; 修回日期: 2014-10-08)
(本文编辑: 张仲书; 英文编辑: 王建东)