

乳腺癌组织中 miR-502 和 HDAC3 表达的相关性及其临床意义

赵云飞¹, 何姣¹, 杨玲¹, 刘智¹, 罗启翹¹, 陈茂山²

(遂宁市中心医院 1. 病理科, 2. 乳腺甲状腺外科, 四川省遂宁市 629000)

[关键词] miR-502; HDAC3; 乳腺癌; 表达关系; 生存分析; 诊断效能

[摘要] **目的** 探讨 miR-502 和 HDAC3 在乳腺癌中的表达关系及其临床病理意义。**方法** 采集 76 例乳腺癌患者癌旁组织及癌组织标本, 实时荧光定量 PCR 检测组织中 miR-502、HDAC3 mRNA 的表达, 并绘制溶解曲线。免疫组化及免疫印迹法检测各组织标本中 HDAC3 阳性表达率及蛋白表达, 并对乳腺癌组织中 miR-502 与 HDAC3 的相关性及靶向关系进行分析验证。分析 miR-502、HDAC3 表达水平与乳腺癌患者临床病理特征、诊断效能及生存情况之间的关系。**结果** 乳腺癌组织中 miR-502 呈低表达水平, 而 HDAC3 呈高表达水平 ($P < 0.05$), 且二者水平在乳腺癌组织中呈负相关 ($P < 0.05$), HDAC3 是 miR-502 的靶基因。miR-502、HDAC3 相对表达水平与 TNM 分期、肿瘤直径、淋巴结转移及雌激素受体/孕激素受体表达情况有关 ($P < 0.05$)。乳腺癌组织中 miR-502、HDAC3 二者联合诊断效能高于 miR-502、HDAC3 单一诊断效能。miR-502 高表达组患者 3 年总生存率高于低表达组 ($P < 0.05$); HDAC3 高表达组患者 3 年总生存率低于低表达组 ($P < 0.05$)。**结论** miR-502、HDAC3 在乳腺癌中的表达与患者病情发展及预后相关, 可作为早期诊断乳腺癌的生物学指标。

[中图分类号] R737.9

[文献标识码] A

Correlation of miR-502 and HDAC3 expression in breast cancer tissue and its clinic significance

ZHAO Yunfei¹, HE Jiao¹, YANG Ling¹, LIU Zhi¹, LUO Qichi¹, CHEN Maoshan²

(1. Department of Pathology, 2. Department of Breast and Thyroid Surgery, Suining Central Hospital, Suining, Sichuan 629000, China)

[KEY WORDS] miR-502; HDAC3; breast cancer; expression relationship; survival analysis; diagnostic performance

[ABSTRACT] **Aim** To explore the relationship between miR-502 and HDAC3 expression in breast cancer and its clinicopathological significance. **Methods** The paracancerous tissues and cancer tissue samples of 76 breast cancer patients were collected, Real-time quantitative fluorescence PCR was used to detect and plot the mRNA expressions of miR-502 and HDAC3 in the tissues, and the dissolution curves were drawn. The positive expression rate and protein expression of HDAC3 were detected by immunohistochemistry and western blot, the correlation and targeting relationship between miR-502 and HDAC3 in breast cancer tissues were analyzed and verified, and to investigate the relationship between miR-502 and HDAC3 expression levels and clinicopathological characteristics, diagnostic efficacy and survival of breast cancer patients. **Results** miR-502 level was low in breast cancer tissues, while HDAC3 level was high ($P < 0.05$), and the two levels were negatively correlated in breast cancer tissues ($P < 0.05$), and HDAC3 was the target gene of miR-502. The relative expression levels of miR-502 and HDAC3 were correlated with TNM stage, tumor diameter, lymph node metastasis and estrogen receptor/progesterone receptor expression ($P < 0.05$). The combined diagnostic efficacy of miR-502 and HDAC3 was higher than that of miR-502 and HDAC3 alone in breast cancer tissue. The 3-year overall survival rate in the group with high miR-502 expression was higher than that in the group with low expression ($P < 0.05$), the 3-year overall survival rate in the group with high HDAC3 expression was significantly lower than that in the group with low expression ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of miR-502 and HDAC3 in breast cancer is correlated with the disease progression and prognosis of patients, and can be used as a biological indicator for early diagnosis of breast cancer.

[收稿日期] 2021-01-17

[修回日期] 2021-04-21

[基金项目] 四川省卫生和计划生育委员会科研课题(17PJ599);遂宁市中心医院科研项目(2015y03)

[作者简介] 赵云飞, 硕士, 副主任医师, 研究方向为乳腺癌的诊断和治疗, E-mail 为 zyf3270@163.com。

乳腺癌是临床上较为常见的女性恶性肿瘤,发病率及致死率呈逐年增加趋势,严重危及患者的生命安全^[1-2]。随着基因组学、生物信息学及分子生物学的不断发展,乳腺癌标志物筛选及其靶点治疗已成为关注的焦点^[3]。微小 RNA (microRNA, miRNA) 属于非编码小分子 RNA,已有多项研究表明多种 miRNA 参与了癌症、免疫、代谢等疾病的发生发展^[4]。研究发现 miR-502 在乳腺癌^[5]、宫颈癌^[6]等妇科肿瘤的发生发展中起到不同程度的调节作用,可作为妇科肿瘤的抑癌基因。组蛋白修饰是导致表观遗传学变化的重要机制,组蛋白去乙酰化酶 3 (histone deacetylase3, HDAC3) 在肿瘤的发生发展中起到重要的作用^[7]。有研究表明 HDAC3 在浸润性乳腺癌中异常高表达,起到一定的促癌基因作用^[8]。本文探讨 miR-502 和 HDAC3 在乳腺癌组织中表达的相关性,及对乳腺癌诊断效能和预后的影响。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选择本院 2015 年 5 月—2017 年 12 月 76 例经手术病理证实的乳腺癌患者,收集其癌旁组织及癌组织标本。患者年龄 36 ~ 73 岁,平均 (55.12 ± 7.20) 岁。全部患者均签署知情协议书,并获本院伦理委员会批准。纳入标准:手术病理学诊断为乳腺癌,并符合相关诊断标准^[9];首次确诊;临床资料齐全。排除标准:术前接受放化疗及免疫治疗;依从性低或精神障碍者;合并其他恶性肿瘤;严重内科疾病;患严重感染、造血功能障碍及免疫缺陷疾病。

1.2 仪器与材料

RNA 提取试剂盒购自 Invitrogen 公司;PrimeScript RT 试剂盒及 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 试剂盒均购自默沙克生物公司;反转录试剂盒购自大连宝生物工程有限公司;miR-502、HDAC3、U6、磷酸甘油醛脱氢酶 (reduced glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 引物购自 Takara 公司;紫外分光光度计及蛋白提取试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司;BSA 试剂盒购自北京中生利康科技有限公司;HDAC3、GAPDH 相关抗体、BCA 试剂盒、荧光素酶试剂盒均购自 Abcam 公司;苏木精购自上海博谷生物科技有限公司;图像扫描系统购自上海涵飞医疗器械有限公司。

1.3 荧光定量 PCR 检测

提取各组织中总 RNA。其中 miR-502 以 U6 为

内参,HDAC3 以 GAPDH 为内参。定量 RNA,将 RNA 反转录成 cDNA,反转录体系 10 μL,反应条件:37 °C、15 min×3 次、85 °C 5 s。实施荧光定量 PCR 操作,反应体系 50 μL:SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (2×) 25 μL,PCR 上游和下游引物均 2 μL,ROX Reference Dye(50×) 1 μL,ddH₂O 16 μL,DNA 模板 4 μL。miR-502 反应条件:94 °C 10 min;95 °C 15 s;60 °C 60 s;72 °C 1 min,40 个循环;HDAC3 反应条件:95 °C 15 s;95 °C 30 s;60 °C 30 s;72 °C 10 s,40 个循环。通过 2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因 (miR-502、HDAC3) 的相对转录水平。引物序列:miR-502 正向引物:5'-ATCCTTGCTATCTGGGTGCTA-3',反向引物:5'-CGAGCTCGGATCCACTAGTCC-3';HDAC3 正向引物:5'-CCTGGCATTGACTCATAG-3',反向引物:5'-ATTAAGGCTCTTGGTGAAA-3';U6 正向引物:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',反向引物:5'-AACGCTTACGAATTTGCGT-3';GAPDH 正向引物:5'-ACGGCAAGTTCAACGGCACAG-3',反向引物:5'-GACGCCACTAGACTCCACGACA-3'。

1.4 免疫组化

组织标本固定于 10% 的甲醛中,常规石蜡包埋切片 (厚 4 μm),置于 60 °C 温箱 1 h,常规脱蜡脱水,3% 双氧水中 37 °C 孵育 0.5 h,磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 冲洗,放于 0.01 mol/L 柠檬酸综合缓冲液中,95 °C 20 min,冷却至室温,PBS 冲洗。羊血清工作液封闭,37 °C 10 min。放入一抗:HDAC3 (1 : 250),4 °C 过夜,PBS 冲洗。滴加相应的二抗室温孵育 0.5 h,显色,苏木精复染,封片。每张切片随机选 5 个高倍视野 (400×),计算阳性细胞所占百分比,阳性细胞判定标准^[9]:细胞核/细胞质内棕黄色颗粒。

1.5 免疫印迹检测

提取组织标本中蛋白,按照 BCA 试剂盒说明书定量,10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE),将 PAGE 胶中蛋白转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶,室温密封 1 h,加一抗:HDAC3 (1 : 1 000)、GAPDH (1 : 1 000) 4 °C 孵育过夜,冲洗后,将相应二抗与 PVDF 膜至室温孵育 1 h。漂洗、化学发光、暗室曝光,显影并定影,通过图像扫描系统对蛋白条带进行分析。

1.6 荧光素酶报告实验

通过生物信息学 http://www.targetscan.org/vert_72/、<https://cm.jefferson.edu/> 网站预测 miR-

502 和 HDAC3 的靶向关系,了解 miR-502 与 HDAC3 3'UTR 的结合位点。PCR 反应扩增 HDAC3 结合位点片段,循环后 72 °C 继续延伸 3 min,4 °C 保存。经琼脂糖电泳分析,PCR 产物纯化,经酶切、连接、转化、扩大菌落培养并提取质粒,构建 HDAC3 3'UTR 野生型(WT)质粒(HDAC3-WT)。并以质粒为基础,构建 HDAC3 3'UTR 突变型(MUT)质粒(HDAC3-MUT)。将对数生长的 293T 细胞于 96 孔板中接种,待对数生长期时,将 HDAC3-MUT 和 HDAC3-WT 的载体分别和 mimic-NC 或 miR-502 mimic 共转至 293T 细胞中。转染 48 h 后收集并裂解细胞,离心取上清,荧光素酶试剂盒检测荧光素酶活性。

1.7 临床病理特征分析

分析患者年龄、绝经状态、TNM 分期、肿瘤直径、淋巴结转移、雌激素受体/孕激素受体(ER/PR)表达情况。根据癌组织 miR-502、HDAC3 相对表达中位数将乳腺癌患者分为高、低表达组,分析 miR-502、HDAC3 不同表达水平与乳腺癌患者临床病理资料之间的关系及对乳腺癌患者的诊断效能和预后生存的影响。患者随访时间至 2020 年 12 月。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,行 t 检验。相关性检验经 Pearson 法分析,计数资料采用卡方检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-502、HDAC3 的溶解曲线结果

miR-502、HDAC3 的产物溶解峰,扩增产物分别在 84.85、84.23 °C 出现单一峰,即 qRT-PCR 法可以检测组织中 miR-502、HDAC3 的表达且具有较高的特异度(图 1)。

2.2 组织标本中 miR-502 及 HDAC3 的表达情况

qRT-PCR 及 West blot 实验结果显示,乳腺癌组织中 miR-502 表达水平显著低于癌旁组织,而 HDAC3 基因、阳性表达率及其蛋白表达水平均显著高于癌旁组织($P < 0.05$;图 2A ~ C)。相关性分析结果显示,miR-502 与 HDAC3 在乳腺癌组织中呈负相关($P < 0.05$;图 2D)。网站预测 HDAC3 是 miR-502 的靶基因(图 2E、F);荧光素酶报告实验显示,mimic-NC 和 miR-502 mimics 共转染 293T 细胞后的 HDAC3-WT 荧光素酶活性差异有显著性($P < 0.05$;图 2F)。

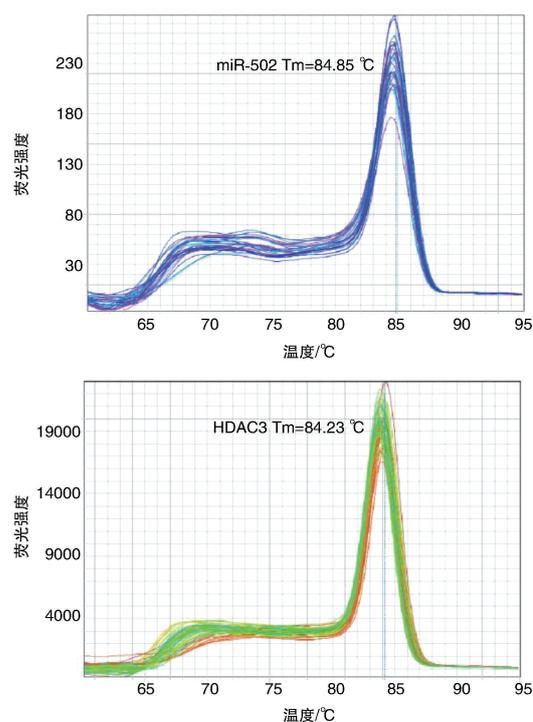


图 1 miR-502 与 HDAC3 的溶解曲线

2.3 miR-502、HDAC3 表达与乳腺癌临床病理资料之间的关系

根据 miR-502、HDAC3 相对表达水平的中位数将乳腺癌患者分为低表达组与高表达组,结果显示,miR-502、HDAC3 相对表达水平与 TNM 分期、肿瘤直径、淋巴结转移及 ER/PR 表达情况有关($P < 0.05$;表 1)。

2.4 miR-502、HDAC3 基因表达对乳腺癌患者的诊断效能

乳腺癌组织中 miR-502、HDAC3 及二者联合表达诊断乳腺癌患者均具有一定的诊断价值,其中二者联合诊断价值最高(表 2)。

2.5 miR-502、HDAC3 基因表达对乳腺癌患者预后生存率的影响

miR-502 高表达组患者的 3 年总生存率高于低表达组($P < 0.05$);HDAC3 高表达组患者的 3 年总生存率显著低于低表达组($P < 0.05$;表 3)。

3 讨论

现阶段多数乳腺癌患者在确诊时已处于癌症中晚期,经手术治疗后预后并不理想,因此探寻诊断价值高、可较好反应预后的生物靶点,对乳腺癌筛查、诊治及预后改善具有重要影响,也是现阶段临床妇科分子生物研究关注的重点^[10]。microRNA

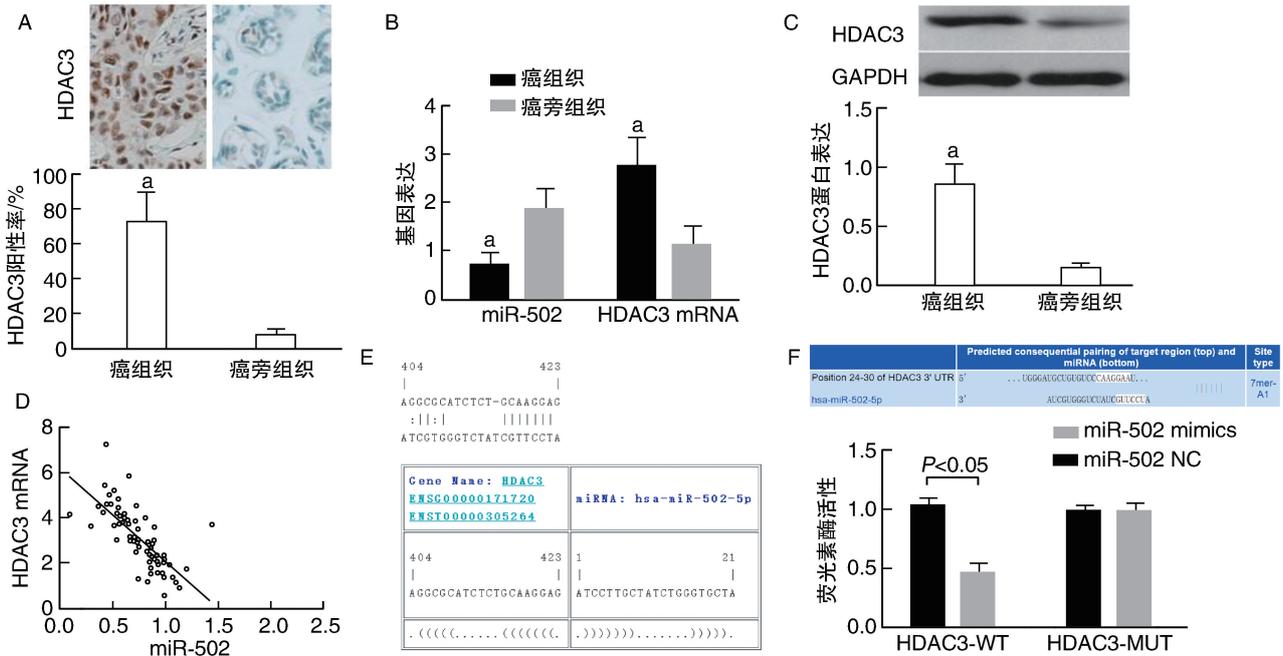


图2 miR-502与HDAC3之间表达关系

A为HDAC3免疫组化图(400×)及HDAC3阳性表达率;B为miR-502及HDAC3 mRNA表达情况;C为HDAC3蛋白条带图及蛋白表达情况;D为miR-502与HDAC3相关性分析;E为miR-502、HDAC3之间的靶向关系;F为荧光素酶报告实验验证。

a为P<0.05,与癌旁组织比较。

表1 miR-502、HDAC3基因表达与乳腺癌临床的关系

单位:例(%)

项目	miR-502 (n=38)		HDAC3 (n=38)		
	低表达组	高表达组	低表达组	高表达组	
年龄	≥55岁	20(52.63)	21(55.26)	19(50.00)	22(57.89)
	<55岁	18(47.37)	17(44.74)	19(50.00)	16(42.11)
绝经状态	绝经	22(57.89)	21(55.26)	20(52.63)	23(60.53)
	未绝经	16(42.11)	17(44.74)	18(47.37)	15(39.47)
TNM分期	I~II	12(31.58)	25(65.79) ^a	23(60.53)	14(36.84) ^a
	III~IV	26(68.42)	13(34.21) ^a	15(39.47)	24(63.16) ^a
肿瘤直径	<3cm	14(36.48)	26(68.42) ^a	25(65.79)	15(39.47) ^a
	≥3cm	24(63.16)	12(31.58) ^a	13(34.21)	23(60.53) ^a
淋巴结转移	是	20(52.63)	9(23.68) ^a	7(18.42)	22(57.89) ^a
	否	18(47.37)	29(76.32) ^a	31(81.58)	16(42.11) ^a
ER/PR表达情况	阳性	8(21.05)	19(50.00) ^a	21(55.26)	6(15.79) ^a
	阴性	30(78.95)	19(50.00) ^a	17(44.74)	32(84.21) ^a

a为P<0.05,与低表达组比较。

表2 miR-502、HDAC3基因表达对乳腺癌患者诊断效能的影响

基因	AUC(95% CI)	灵敏度	特异度	约登指数
miR-502	0.887(0.826~0.949)	0.882	0.868	0.750
HDAC3	0.883(0.826~0.941)	0.816	0.908	0.724
miR-502+HDAC3	0.929(0.886~0.973)	0.895	0.895	0.790

表3 miR-502、HDAC3基因表达对乳腺癌患者预后的影响

分组	预后的影响		
	1年	3年	
miR-502	低表达组	34(89.47)	23(60.53)
	高表达组	36(94.74)	32(84.21) ^a
HDAC3	低表达组	36(94.74)	29(76.32)
	高表达组	33(86.84)	20(52.63) ^a

a为P<0.05,与相同基因低表达组比较。

异常表达参与了恶性肿瘤的发生发展,起到抑癌或促癌的作用^[11]。

Liu 等^[12]发现 miR-502 处理或下调 Set8 可抑制乳腺癌细胞增殖和细胞周期,减少细胞迁移、侵袭和上皮间质转化,临床分析显示,miR-502 在乳腺癌肿瘤组织中的表达低于癌旁组织。HDAC3 属于 I 类组蛋白去乙酰化酶,而类组蛋白去乙酰化酶可催化生理过程中的关键蛋白。已有研究证实 HDAC3 在乳腺癌组织中表达水平高于正常组织,并与乳腺癌患者淋巴结转移及预后密切相关^[8]。本研究通过网站预测了 miR-502、HDAC3 之间存在一定的靶向关系,但需实验验证。

本研究结果显示,乳腺癌组织中 miR-502 表达水平显著低于癌旁组织,而 HDAC3 表达趋势与之相反。这与 Liu 等^[12]及林俊杰等^[8]报道一致。说明乳腺癌组织中 miR-502 表达水平下调,HDAC3 表达上调,分析原因:①在多种恶性肿瘤组织中,miR-502 起到抑癌基因的作用,而 HDAC3 起到促癌基因的作用,因此在乳腺癌组织中,促癌基因发挥主要调控作用,抑癌基因表达受到抑制;②HDAC3 表达上调可能受到乳腺癌组织中 miR-502 的靶向负调控的影响。结果显示,二者呈负相关,且 HDAC3 是 miR-502 的直接靶基因,由此推测 miR-502 通过靶向负调控 HDAC3 参与乳腺癌病情的发生发展。

本文结果显示 miR-502、HDAC3 表达水平与 TNM 分期、肿瘤直径、淋巴结转移及 ER/PR 表达情况有关。TNM 分期是乳腺肿瘤大小及其是否出现转移的重要体现,而 TNM 分期 III ~ IV 期肿瘤组织中 miR-502 低表达及 HDAC3 高表达比较多,说明 miR-502 可能通过靶向负调控 HDAC3 抑制乳腺癌细胞的增殖、侵袭及迁移。当 ER 或 PR 呈阴性表达时,说明激素已经不能起到治疗乳腺癌的作用,反应乳腺癌的恶化程度较显著^[13-14]。这说明随着乳腺癌病理分级及病情的恶化,miR-502 呈下调趋势,HDAC3 呈上调趋势,其中 HDAC3 病理分析结果与 Zhao 等^[15]研究类似。

本文结果显示,miR-502、HDAC3 及二者联合针对乳腺癌患者具有较好的诊断价值,miR-502 高表达组患者的 3 年总生存率高于 miR-502 低表达组;HDAC3 表达趋势与之相反。结果说明患者癌组织中若 miR-502 呈低表达及 HDAC3 呈高表达,可一定程度反应患者预后不良,进一步提示 miR-502 及 HDAC3 可能成为乳腺癌治疗的靶标因子。

综上,miR-502 在乳腺癌组织中呈低表达水平,

HDAC3 呈高表达水平,HDAC3 是 miR-502 的直接靶基因,二者之间呈负相关,且与患者病情发展及预后相关,可作为早期诊断乳腺癌的生物学指标。

[参考文献]

- [1] 何明艳,朱碧琪,钟媛,等. 2005—2013 年中国女性乳腺癌发病及死亡趋势分析[J]. 中华疾病控制杂志, 2019, 23(1): 10-14.
- [2] 钱俊华,王莹莹,杨艳蕾,等. 江苏省海门市 1999—2016 年成年女性乳腺癌发病及死亡趋势分析[J]. 中华疾病控制杂志, 2020, 24(2): 189-193.
- [3] 梅林,许扬,徐少华,等. 卡培他滨治疗对 HER-2 阳性乳腺癌患者肿瘤标志物、抑癌基因表达及心肌损伤的影响[J]. 川北医学院学报, 2020, 35(2): 317-320.
- [4] 王明阳,王光磊,陈新亮,等. MicroRNA 的生物学功能及其与肿瘤诊断和治疗的研究进展[J]. 动物医学进展, 2018, 39(1): 95-98.
- [5] SUN L L, WANG J, ZHAO Z J, et al. Suppressive role of miR-502-5p in breast cancer via downregulation of TRAF2[J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(5): 2085-2092.
- [6] 王志景,马丽丽,程珂,等. miR-502 对宫颈癌 Hela 细胞增殖和转移的影响[J]. 中国癌症防治杂志, 2018, 10(4): 33-35.
- [7] 毕国斌,屈晓蝶,韩晓婷,等. HDAC3 和 PTEN 在非小细胞肺癌中的表达及其与预后的相关性[J]. 广东医学, 2018, 39(18): 2775-2778+2782.
- [8] 林俊杰,杨昭婷,玄延花,等. HDAC3 和 HDAC5 在乳腺癌中的表达与临床病理特征意义[J]. 中国实验诊断学, 2016, 20(6): 1001-1003.
- [9] 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. 中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2015 版)[J]. 中国癌症杂志, 2015, 25(9): 692-754.
- [10] 冯燕枝,张景臣,刘薇. 三阴性乳腺癌中 miR-135b, LZTS1 表达水平对评估新辅助化疗疗效的价值[J]. 热带医学杂志, 2020, 20(4): 525-529.
- [11] 伊丽娜,魏欢,赵方新,等. 过表达 miR-455 促进肝癌细胞诱导的管型形成[J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(7): 1248-1252, 1258.
- [12] LIU B, ZHANG X, SONG F, et al. MiR-502/SET8 regulatory circuit in pathobiology of breast cancer[J]. *Cancer Lett*, 2016, 376(2): 259-267.
- [13] 吴雨洁,刘敏,高静东. 三阴性乳腺癌分子靶向治疗研究进展[J]. 中南医学科学杂志, 2019, 47(2): 217-220.
- [14] PARISE C A, CAGGIANO V. Risk of mortality of node-negative, ER/PR/HER2 breast cancer subtypes in T1, T2, and T3 tumors[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2017, 165(3): 743-750.
- [15] ZHAO Y F, HE J, YANG L, et al. Histone deacetylase-3 modification of MicroRNA-31 promotes cell proliferation and aerobic glycolysis in breast cancer and is predictive of poor prognosis[J]. *J Breast Cancer*, 2018, 21(2): 112-123.

(此文编辑 蒋湘莲)