

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.20.005
文章编号: 1005-8982(2019)20-0028-06

食管鳞状细胞癌患者 microRNA-127-3p 的表达水平及临床意义

符佳¹, 汪砥², 江金琼¹, 刘劲¹, 段华新¹

(1. 湖南省人民医院 肿瘤科, 湖南 长沙 410005; 2. 长沙市中心医院 肿瘤科, 湖南 长沙 410004)

摘要: 目的 探讨 miR-127-3p 在食管鳞状细胞癌 (ESCC) 中的表达及其临床意义。**方法** 选取 2013 年 2 月—2015 年 2 月于湖南省人民医院和长沙市中心医院行外科手术的 80 例 ESCC 患者癌组织及癌旁组织标本, 采用实时荧光定量聚合酶链反应检测 miR-127-3p mRNA 相对表达量, 利用免疫组织化学法检测 SKI 蛋白在患者癌组织及癌旁组织标本中的表达, 并对所有患者进行 ≥ 3 年的随访。同时检测 ESCC 细胞株 Eca109 和 Kyse150 及正常人食管上皮细胞株 Het-1a 中 miR-127-3p 的表达水平。**结果** 免疫组织化学染色结果表明, 癌组织中 SKI 蛋白表达阳性率较癌旁组织升高 ($P < 0.05$); ESCC 细胞株 Eca109、Kyse150 中 miR-127-3p 相对表达量低于正常人食管上皮细胞株 Het-1a ($P < 0.05$); 临床分期 III 期患者 miR-127-3p 低表达率高于 I 期和 II 期 ($P < 0.05$), 有淋巴结转移和饮酒史患者 miR-127-3p 低表达率高于无淋巴结转移和无饮酒史患者 ($P < 0.05$), miR-127-3p 低表达患者的中位无进展期较高表达患者短 ($P < 0.05$)。**结论** miR-127-3p 通过靶向调控 SKI 蛋白的表达参与 ESCC 的发生, 其低表达可能参与 ESCC 的侵袭及转移过程, 并显著影响患者的预后。

关键词: 食管肿瘤; 癌, 鳞状细胞; miR-127-3p/ 微 RNAs; SKI 蛋白 / 蛋白

中图分类号: R735.1

文献标识码: A

Expression and clinical significance of miR-127-3p in patients with esophageal squamous cell carcinoma

Jia Fu¹, Di Wang², Jin-qiong Jiang¹, Jin Liu¹, Hua-xin Duan¹

(1. Department of Oncology, Hunan Provincial People's Hospital, Changsha, Hunan 410005, China;

2. Department of Oncology, Changsha Central Hospital, Changsha, Hunan 410004, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and clinical significance of miR-127-3p in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **Methods** Cancer and adjacent tissues of eighty patients with ESCC from February 2013 to February 2015 were enrolled in this study. The expression of miR-127-3p was detected by real-time PCR (Polymerase Chain Reaction), the expression of SKI (V-Ski Sarcoma Viral Oncogene Homolog) in cancer tissues and adjacent tissues was detected by immunohistochemistry, and all cases were followed up for at least 3 years. The expression levels of miR-127-3p in ESCC cell lines Eca109 and Kyse150 and normal human esophageal epithelial cell line Het-1a were also detected. **Results** The relative expression of miR-127-3p in ESCC patients was lower than

that in adjacent tissues ($P < 0.05$). The relative expression of miR-127-3p in ESCC cell lines Eca109 and Kyse150 was lower than that in normal human esophageal epithelial cell lines Het-1a, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The low expression rate of microRNA-127-3p in patients with clinical stage III was higher than that in patients with clinical stage I and II ($P < 0.05$); that in patients with lymph node metastasis and drinking history was higher than that in patients without lymph node metastasis and drinking history ($P < 0.05$); the median progression-free period of patients with low expression of microRNA-127-3p was shorter than that in patients without lymph node metastasis and drinking history ($P < 0.05$). **Conclusions** miR-127-3p participates in the development of ESCC by regulating expression of SKI protein, and its low expression may be involved in the invasion and metastasis of ESCC, and significantly affect the prognosis of patients.

Keywords: esophageal neoplasms; carcinoma, squamous cell; miR-127-3p/microRNAs; SKI protein, human

我国食管鳞状细胞癌 (esophageal squamous cell carcinoma, ESCC) 发病率较高, 严重威胁患者生命健康^[1-2]。其发病机制复杂, 与诸多分子机制有关^[3-5]。明确其发生、发展的分子机制, 有利于 ESCC 早期诊断与靶向治疗^[6]。有研究表明, microRNA (miRNA) 与胚胎发育、器官形成及肿瘤形成关系密切, 其中 miR-127-3p 与乳腺癌、宫颈癌等肿瘤形成密切相关^[7]。有研究表明 SKI 基因是 miR-127-3p 潜在的靶基因, 但在 ESCC 中鲜有报道^[8]。因此, 本研究探讨 ESCC 患者癌组织中 miR-127-3p 及 SKI 蛋白表达水平与肿瘤分期、患者预后的关系, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2013 年 2 月—2015 年 2 月于湖南省人民医院和长沙市中心医院行外科手术的 ESCC 患者 80 例。其中, 男性 52 例, 女性 28 例; 平均年龄 (57.1 ± 7.6) 岁。患者均未合并影响生存的重大疾病, 术中取适量切除的癌组织及癌旁组织 (距癌组织 ≥ 5 cm 正常食管上皮组织), 放置于液氮中保存。ESCC 诊断最终经病理证实且分化程度明确。参照 2009 年第 7 版国际抗癌联盟 TNM 分期标准^[9], 其中 I 期患者 22 例, II 期患者 31 例, III 期 27 例; 淋巴结转移 21 例, 无淋巴结转移 59 例。本研究经医院伦理委员会批准, 受试者均自愿签署知情同意书, 并对患者随访至 2018 年 2 月。

1.2 试剂与仪器

DMEM 培养液 (美国 Gibco 公司), 0.25% 胰酶 (美国 Invitrogen 公司), ALP 活性检测试剂盒 (南京建成生物工程有限公司), 二氧化碳 CO₂ 细胞培养

箱 (德国 HeraeusHolding 公司), Olympus 倒置显微系统 (TH4-200, 南京天龙光电仪器厂), 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 仪 (LightCycler480, 德国罗氏诊断有限公司), TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit 试剂盒 (美国应用生物系统公司)。

1.3 细胞复苏及培养

本研究中使用的 ESCC 细胞株 Eca109、Kyse150 及正常食管上皮细胞 Het-1a 均取自中国科学院上海细胞库。由液氮罐中迅速取出冻存的细胞, 37℃ 水浴锅解冻, 接种于一次性细胞培养瓶 (25 cm²) 中, 加入 5 ml DMEM 培养液, 放入 37℃ 培养箱在 5% CO₂ 条件下培养, 换液频率为 2 d/次。当贴壁细胞汇合度达到约 90% 时, 用 0.25% 胰酶消化传代, 计数细胞后按 1×10^5 个/ml 浓度接种继续培养, 将传至第 3 ~ 5 代的细胞进行诱导分化实验。

1.4 RNA 提取

1.4.1 组织中提取 由液氮中取出食管癌患者组织, 加入研钵中, 迅速磨成粉末状; 取出 100 mg 新鲜研磨的粉末加入含 1 ml Trizol 裂解液的 EP 管中, 混合均匀。室温静置 5 min, 加入 200 μ l 氯仿, 充分混匀后室温放置 10 min; 4℃、3 500 r/min 离心 15 min, 取上层水相, 装入含 1.5 ml RNase-free 水的离心管中, 加入等体积异丙醇, 混匀, 置于冰上 30 min; 取出离心管, 4℃、3 500 r/min 离心 15 min, 得到 RNA 沉淀; 75% 酒精 500 μ l 洗涤 RNA, 沉淀 2 次, 风干; 加入 RNase-free 的水 50 μ l, 室温溶解 RNA; NanoDrop 测定 RNA 浓度, 置于 -20℃ 条件下备用。

1.4.2 细胞中提取 对各组细胞予以 0.25% 胰酶消化, 将消化后的细胞悬液置于 15 ml 离心管中; 在

4℃、500 r/min 低速离心 2 min, 弃上清, 放置冰上; 滴入 1 ml Trizol 裂解液重悬, 混匀细胞, 放置冰上; 向 Trizol 裂解液中加入 200 μ l 氯仿, 剧烈震荡细胞悬液, 室温放置 5 ~ 10 min, 在 4℃、3 500 r/min 离心 15 min; 取上层水相, 装入含 1.5 ml RNase-free 水的离心管中, 放入等体积异丙醇, 混匀后, 放置冰上 30 ~ 35 min; 在 4℃、3 500 r/min 离心 15 min, 获取 RNA 沉淀; 75% 酒精 500 μ l 洗涤 RNA 沉淀 2 次, 风干; 放入 50 μ l RNase-free 水, 室温溶解 RNA; NanoDrop 测定 RNA 浓度, 置于 -20℃ 条件下备用。

1.5 qRT-PCR

参考 TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit 试剂盒说明书进行操作, 对抽提的 RNA 进行体外逆转录实验, 得到 cDNA 产物。反应条件: 16℃ 孵育 30 min, 42℃ 孵育 30 min, 85℃ 加热 5 min, 4℃ 保存。以得到的 cDNA 为模版, 予以 qRT-PCR, 采用 TaqMan[®] Universal PCR Master Mix 20 μ l 反应体系, 在 PCR 仪上操作, 以 U6 作为表达检测的内参, Δ CT 表示 miR-127-3p 的相对表达, 其中 Δ CT = CT_{U6} - CT_{miR-127-3p}, 反应条件: 95℃ 预变性 10 min, 95 变性 15 s, 60℃ 退火 30 s, 70℃ 延伸 30 s, 共 40 个循环。见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列	长度 /bp
miR-127-3p	正向: 5' CATAAAGTAGAAAGCAGCAGC-3'	21
	反向: 5' GTCCATGTGTCAGAACTCG-3'	19
U6	正向: 5' CTAGGGTGCTCGCTTCATCG-3'	20
	反向: 5' ACCTGCTCTCGTGGAGTCGTC-3'	21
β -actin	正向: 5' AGCTGTCCCTGTATGCTCG-3'	19
	反向: 5' GACAGTGTATGCACGACTG-3'	20

1.6 免疫组织化学染色检测 SKI 蛋白

对石蜡切片进行 2 次脱蜡过程, 对脱蜡后的组织进行酒精梯度清洗: 二甲苯孵育 5 min, 弃去二甲苯, 加入新的二甲苯继续孵育 5 min, 无水乙醇洗涤 3 min, 无水乙醇 II 洗涤 3 min, 95% 乙醇洗涤 3 min, 80% 乙醇洗涤 3 min, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤 3 次, 3 min/次; 将切片至于含 0.01 mmol/L 的柠檬酸缓冲液中, 对切片进行恢复, 并放入微波炉, 加热 15 min, 冷却至室温; 取出石蜡切片, 置于含 3% 双氧水中 10 ~ 15 min, 以防止内源性过氧化

物酶对切片组织的损伤, 用 1 \times PBS 缓冲液冲洗 3 次, 3 min/次; 按照 1 : 500 加入 SKI 抗体, 对石蜡组织切片进行室温孵育 1 h 或者 4℃ 孵育过夜, 用 1 \times PBS 缓冲液冲洗 3 次, 3 min/次; 按照 1 : 1 000 加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 对石蜡组织切片进行室温孵育 40 min, 用 1 \times PBS 缓冲液冲洗 3 次, 3 min/次; 加入 DAB 试剂盒中的显色剂, 室温孵育 5 ~ 10 min, 然后清水冲洗; 苏木精复染室温孵育 3 ~ 5 min, 清水冲洗; 对染色后的切片进行梯度酒精水化处理, 然后树脂封片观察。采用上述同样的操作方法, 对组织切片中的 SKI 进行免疫组织化学染色。同时以 1 \times PBS 缓冲液为一抗进行孵育, 作为免疫组织化学染色的阴性对照。对每张切片随机选取 5 个高倍镜视野 (400 倍), 计算 SKI 蛋白阳性细胞所占总细胞数目的比例, 阳性表达的细胞数目 >10% 为阳性, <10% 为阴性。

1.7 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 t 检验或方差分析; 计数资料以率 (%) 表示, 比较用 χ^2 检验; Kaplan-Meier 法绘制生存曲线, 比较用 Log-rank χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各细胞系中 miR-127-3p 相对表达量比较

Het-1a 细胞中 miR-127-3p 相对表达量为 (3.04 \pm 0.78), Eca109 为 (2.38 \pm 0.53), Kyse150 为 (1.42 \pm 0.51), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 5.506$, $P = 0.000$); Het-1a 高于 Kyse150 ($P < 0.05$), Eca109 高于 Kyse150 ($P < 0.05$)。见图 1。

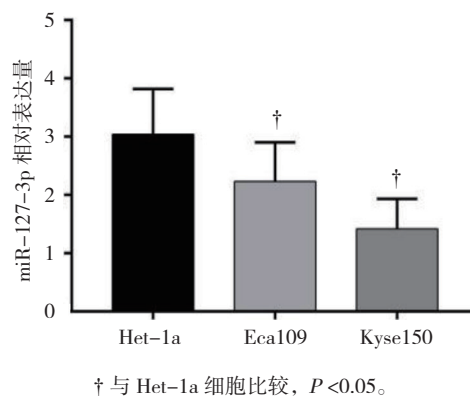
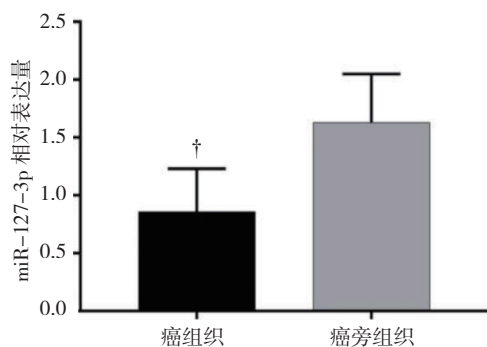


图 1 各细胞系中 miR-127-3p 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

2.2 食管鳞癌与癌旁组织 miR-127-3p 相对表达量比较

食管鳞癌组织中 miR-127-3p 相对表达量为 (0.86 ± 0.23), 癌旁组织为 (1.84 ± 0.35), 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($t = 11.547, P = 0.000$), 癌组织高于癌旁组织。见图 2。



†与癌旁组织比较, $P < 0.05$ 。

图 2 食管鳞癌与癌旁组织 miR-127-3p 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

2.3 食管鳞癌与癌旁组织 SKI 蛋白表达的比较

患者癌组织及癌旁组织中 SKI 蛋白主要表达于细胞质。食管鳞癌中 SKI 蛋白表达阳性率为 78.75%, 阴性率为 21.25%, 癌旁组织中阳性率为 13.75%, 阴性率为 86.25%, 经 χ^2 检验, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 67.982, P = 0.000$), 癌组织高于癌旁组织。见图 3。

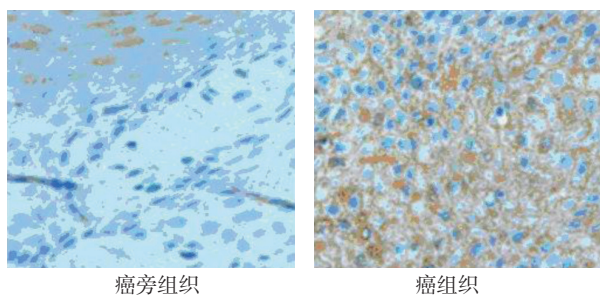


图 3 SKI 蛋白光镜图 (免疫组织化学 × 400)

2.4 不同临床指标患者的 miR-127-3p 低表达率比较

不同临床分期患者 miR-127-3p 低表达率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), III 期高于 II 期和 I 期。是否有淋巴结转移和饮酒史患者 miR-127-3p 低表达率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 有淋巴结转移和饮酒史患者较高。见表 2。

表 2 不同临床指标患者的 miR-127-3p 低表达率比较 %

临床指标	<i>n</i>	miR-127-3p 低表达率	χ^2 值	<i>P</i> 值
年龄				
<55 岁	53	50.94	0.153	0.696
≥ 55 岁	27	55.56		
性别				
男	52	48.08	1.166	0.280
女	28	60.71		
临床分期				
I 期	22	31.82	11.361	0.003
II 期	31	45.16		
III 期	27	77.78		
淋巴结转移				
有	21	80.95	9.244	0.002
无	59	42.37		
饮酒史				
有	56	62.50	8.335	0.004
无	24	29.17		
吸烟史				
有	49	55.10	0.343	0.558
无	31	48.39		

2.5 食管鳞癌患者 miR-127-3p 的表达与预后

42 例食管鳞癌患者癌组织 miR-127-3p 低表达, 38 例患者高表达。20 个月时 miR-127-3p 低表达患者生存率为 47.6%, 高表达患者为 73.7%, 经 Log-rank χ^2 检验, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.946, P = 0.026$)。miR-127-3p 低表达患者中位无进展期 (20 个月) 短于 miR-127-3p 高表达患者 (30 个月)。见图 4。

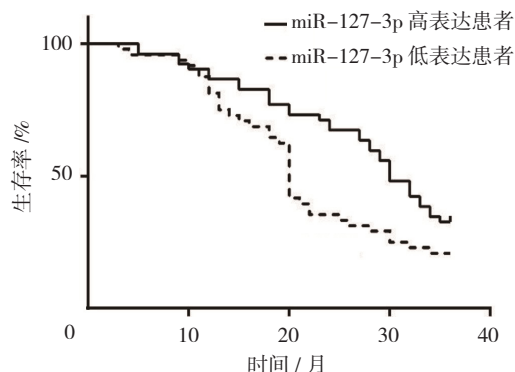


图 4 癌组织中 miR-127-3p 表达水平与食管鳞癌患者预后的关系

3 讨论

我国食管癌发病例数占全球一半以上,为食管癌高发国家,目前 miRNA 与食管癌关系的研究日益深入^[10]。miRNA 在食管癌中的表达存在差异,并且能调节食管癌的增殖、凋亡、侵袭及迁移等生物学特性,这些证据表明 miRNA 参与食管癌发生、发展等病理过程^[11-12]。对 miRNA 与食管癌关系的研究,目前主要集中在 miR-21、miR-203、miR-375、miR-106b-25、miR-143 及 miR-196a 等的异常表达^[13]。王江峰等^[14]研究结果提示在 84 例食管鳞癌组织中,相比于癌旁组织,癌组织中 miR-29b 低表达 48 例,正常表达 28 例,而高表达只有 8 例;进一步分析发现癌组织中 miR-29b 低表达的患者,其肿瘤浸润程度低,TMN 分期早,预后效果较好;罗君等^[15]在食管鳞癌患者组织中检测 miR-31 的表达发现,其相比正常组织中表达上调,推测其表达上调可能会促进鳞癌发生、发展过程。KURASHIGE 等^[16]对患者血浆中的 miR-21 进行检测发现,食管鳞癌患者术后血浆 miR-21 明显表达下调,暗示其可能与食管癌患者预后相关。赵鑫等^[17]通过对在大鼠星形胶质细胞的研究发现,加入脂多糖对大鼠进行诱导,可上调细胞中 SKI 蛋白的表达,表明其可能参与炎症的发生;JIANG 等^[18]通过第二代测序技术对 miRNAs 进行测序,发现 miR-127-3p 在胶质瘤细胞中表达下调,其表达水平的下调是由于 DNA 甲基化与组蛋白乙酰化的作用,从而导致基因的转录表达被抑制;对其进一步研究发现,miR-127-3p 可通过靶向调控 SKI 蛋白,激活 TGF- β 信号的传导过程,抑制胶质瘤细胞的增殖,但对食管鳞癌的研究鲜有报道。

本研究对 80 例 ESCC 患者进行 miR-127-3p 的表达检测,结果癌组织中存在低表达;进一步通过细胞学培养实验发现,miR-127-3p 在食管鳞癌细胞中低表达,且在临床分期 I 期中表达最低;分析患者的临床特征与 miR-127-3p 在癌组织中的表达关系发现,miR-127-3p 的表达水平与患者性别、年龄以及吸烟史无关,而与患者食管鳞癌的分期、有无转移及饮酒史相关。表明食管鳞癌组织中 miR-127-3p 的表达与食管癌的发生有关,其表达上调与食管鳞癌的发展、转移相关,暗示其在食管鳞癌的发生、发展过程

中起重要作用;笔者同时对 80 例患者进行了随访观察,其中 42 例患者食管鳞癌组织中的 miR-127-3p 存在低表达,而 38 例患者食管鳞癌组织中的 miR-127-3p 相比于癌旁组织变化无差异;绘制生存曲线进行分析发现,高表达 miR-127-3p 患者中位无进展期长于 miR-127-3p 低表达患者。

综上所述,在 ESCC 患者中,相比癌旁组织,癌组织中 miR-127-3p 存在低水平表达。进一步体外细胞实验验证,miR-127-3p 在食管鳞癌细胞中存在低表达,并且与食管癌的发生、发展及预后密切相关。

参 考 文 献:

- [1] 李鹏,陈光勇,王拥军,等.中国早期食管鳞状细胞癌及癌前病变筛查与诊治共识(2015年·北京)[J].中国医刊,2016,55(1):20-33.
- [2] RUSTGI A K, EL-SERAG H B. Esophageal carcinoma[J]. *New England Journal of Medicine*, 2014, 371(26): 2499-2509.
- [3] FUNKHOUSER E M, SHARP G B. Aspirin and reduced risk of esophageal carcinoma[J]. *Cancer*, 2015, 76(7): 1116-1119.
- [4] WANG L D, ZHOU F Y, LI X M, et al. Corrigendum: genome-wide association study of esophageal squamous cell carcinoma in Chinese subjects identifies susceptibility loci at PLCE1 and C20orf54[J]. *Nature Genetics*, 2014, 46(9): 759-763.
- [5] SUZUK L, NOFFSINGER A E, HUI Y Z, et al. Detection of human papillomavirus in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer*, 2015, 78(4): 704-710.
- [6] OKUMURA H, UCHIKADO Y, SETOYAMA T, et al. Biomarkers for predicting the response of esophageal squamous cell carcinoma to neoadjuvant chemoradiation therapy[J]. *Surgery Today*, 2014, 44(3): 421-428.
- [7] THRIFT A P, NAGLE C M, FAHEY P P, et al. The influence of pre-diagnostic demographic and lifestyle factors on esophageal squamous cell carcinoma survival[J]. *International Journal of Cancer*, 2012, 131(5): 759-768.
- [8] THOMSON D W, DINGER M E. Endogenous microRNA sponges: evidence and controversy[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2016, 17(5): 272-276.
- [9] 方文涛.第7版国际抗癌联盟食管鳞癌 TNM 分期解读[J].上海交通大学学报(医学版),2011,31(3):265-270.
- [10] 傅剑华,谭子辉.食管癌外科治疗的现状与未来展望[J].中国肿瘤临床,2016,43(12):507-510.
- [11] 刘汉,刘颖,曹秀峰.miRNA 在食管癌中的研究进展[J].中国医药科学,2014,4(7):43-47.
- [12] PENCHEVA N, TAVAZOIE S F. Control of metastatic progression by microRNA regulatory networks[J]. *Nature Cell Biology*, 2013,

- 15(6): 546-554.
- [13] HE B, YIN B, WANG B, et al. MicroRNAs in esophageal cancer[J]. 2012, 6(3): 459-465.
- [14] 王江峰, 凌志强, 毛伟敏. MicroRNA-29b 在食管鳞状细胞癌中的表达及临床意义 [J]. 实用肿瘤杂志, 2013, 28(5): 481-484.
- [15] 罗君, 凌志强, 彭兵锋, 等. MicroRNA-31 在食管鳞状细胞癌中的表达及其与预后的关系 [J]. 中国癌症杂志, 2013, 23(7): 487-492.
- [16] KURASHIGE J, KAMOHARA H, WATANABE M, et al. Serum microRNA-21 is a novel biomarker in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. Journal of Surgical Oncology, 2012, 106(2): 188-192.
- [17] 赵鑫, 郭永强, 王明, 等. 脂多糖对大鼠星形胶质细胞 Ski 蛋白表达的影响 [J]. 中国康复理论与实践, 2017, 23(5): 514-519.
- [18] JIANG H, JIN C, LIU J, et al. Next generation sequencing analysis of miRNAs: miR-127-3p inhibits glioblastoma proliferation and activates TGF- β signaling by targeting SKI[J]. Omics A Journal of Integrative Biology, 2014, 18(3): 196-203.

(李科 编辑)