

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.13.010

文章编号: 1005-8982(2017)13-0050-08

临床研究·论著

MicroRNA-196a 对食管癌预后的评估价值及其生物学行为的调控机制

吴晓鹏, 陈强, 刘勤, 乔滨, 张卫国

(河南科技大学第一附属医院 肿瘤外科二病区, 河南 洛阳 471003)

摘要:目的 探讨 microRNA-196a(miR-196a)对食管癌预后的评估价值及其生物学行为的调控机制。**方法** 收集 120 例行食管癌根治性手术切除的食管癌组织及癌旁组织,逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测组织 miR-196a 表达水平,分析 miR-196a 表达与食管癌患者临床资料的关系。对食管癌患者进行随访,记录患者总生存期(OS)和无病生存期(DFS);以 OS 和 DFS 作为评价指标,采用单变量和多变量 Cox 比例风险模型评价患者预后的影响因素。分别采用 miR-196a mimic、NC-mimic、miR-196a inhibitor、NC-inhibitor 转染食管癌 TE1 细胞,MTT 实验检测细胞增殖能力,Transwell 实验检测细胞侵袭能力,细胞划痕实验检测细胞迁移能力,Western blot 检测细胞 ANXA1、NTN4、HMGA2、HOXB8 蛋白表达。**结果** miR-196a 在食管癌组织中表达水平高于癌旁组织($P<0.05$);在 TE1 细胞中,miR-196a mimic 组 miR-196a 表达水平高于 NC-mimic 组,miR-196a inhibitor 组 miR-196a 表达水平低于 NC-inhibitor 组($P<0.05$),证实细胞转染实验成功。将食管癌患者按照 miR-196a 表达分为 miR-196a 高表达组 51 例和低表达组 69 例,miR-196a 表达与年龄、性别、分化程度、N 分期、肿瘤位置等无关($P>0.05$),随着 T 分期、TNM 分期和肿瘤直径增加,miR-196a 高表达率升高($P<0.05$)。生存分析显示,miR-196a 高表达患者总生存期($P=0.015$)和无病生存期($P=0.017$)低于 miR-196a 低表达者;单因素和多因素分析显示,T 分期、miR-196a 表达是影响患者总生存期和无病生存期的独立危险因素(均 $P<0.05$)。MTT 实验结果显示,第 48~120 h,miR-196a mimic 组吸光度值高于 NC-mimic 组,miR-196a inhibitor 组吸光度值低于 NC-inhibitor 组($P<0.05$);Transwell 小室实验显示,miR-196a mimic 组穿膜细胞数量高于 NC-mimic 组,miR-196a inhibitor 组穿膜细胞数量低于 NC-inhibitor 组($P<0.05$);细胞划痕实验显示,miR-196a mimic 组细胞迁移距离高于 NC-mimic 组,miR-196a inhibitor 组细胞迁移距离低于 NC-inhibitor 组($P<0.05$)。Western blot 实验结果显示,miR-196a mimic 组、NC-mimic 组、miR-196a inhibitor 组、NC-inhibitor 组 HMGA2、HOXB8 蛋白表达比较差异均无统计学意义($P>0.05$),miR-196a mimic 组 ANXA1、NTN4 蛋白表达低于 NC-mimic 组,miR-196a inhibitor 组 ANXA1、NTN4 蛋白表达高于 NC-inhibitor 组($P<0.05$)。**结论** miR-196a 能够作为食管癌预后的预测指标之一;miR-196a 可能通过抑制 ANXA1、NTN4 基因的表达参与调控食管癌细胞的增殖、侵袭和迁移等生物学行为。

关键词: 微小 RNA;食管癌;预后;增殖;侵袭;迁移

中图分类号: R735.1

文献标识码: A

Prognostic value of miR-196a in esophageal carcinoma and its regulatory mechanism of biological behavior

Xiao-peng Wu, Qiang Chen, Qin Liu, Bin Qiao, Wei-guo Zhang

(Department of Cancer Surgery, the First Affiliated Hospital, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China)

Abstract: Objective To explore the prognostic value of miR-196a in esophageal carcinoma and its regulatory mechanism of biological behavior. **Methods** Esophageal carcinoma tissues and paracancerous tissues were collected from 120 patients. miR-196a expression level was detected by RT-PCR. The relationships between miR-196a expression and clinical data were analyzed. The esophageal carcinoma patients were followed up. The overall

survival (OS) and disease-free survival (DFS) were recorded. Taking OS and DFS as evaluation indexes, the prognostic factors were evaluated by univariate and multivariate Cox proportional hazards models. The TE1 cells were transfected with miR-196a mimic, NC-mimic, miR-196a inhibitor and NC-inhibitor. Cell proliferative ability was detected by MTT assay, invasive ability was detected by Transwell assay, migratory ability was detected by cell scratch assay. ANXA1, NTN4, HMGA2 and HOXB8 protein expressions in the cells were detected by Western blot.

Results The expression of miR-196a in the esophageal carcinoma tissues was significantly higher than that in the paracancerous tissues ($P < 0.05$). In the TE1 cells, the expression of miR-196a in the miR-196a mimic group was significantly higher than that in the NC-mimic group, the expression of miR-196a in the miR-196a inhibitor group was significantly lower than that in the NC-inhibitor group ($P < 0.05$), which confirmed the cell transfection experiment was successful. The esophageal carcinoma patients were divided into miR-196a high-expression group (51 cases) and miR-196a low-expression group (69 cases) according to the miR-196a expression. miR-196a expression was not related to age, sex, differentiation, N stage or tumor location ($P > 0.05$). With the increase of T staging, TNM stage and tumor diameter, the high-expression rate of miR-196a was significantly increased ($P < 0.05$). Survival analysis showed that OS and DFS in the miR-196a high-expression group were significantly lower than those in the miR-196a low-expression group ($P < 0.05$). Univariate and multivariate analyses showed that T stage and miR-196a expression were the independent risk factors for OS and DFS ($P < 0.05$). MTT experimental showed that in the 48th-120th h, the absorbance value of the miR-196a mimic group was significantly higher than that of the NC-mimic group, while the absorbance value of the miR-196a inhibitor group was significantly lower than that of the NC-inhibitor group ($P < 0.05$). Transwell chamber experiment showed that the number of transmembrane cells in the miR-196a mimic group was significantly larger than that in the NC-mimic group, and the number of transmembrane cells in the miR-196a inhibitor group was significantly smaller than that in the NC-inhibitor group ($P < 0.05$). Cell scratch test showed that the cell migration distance in the miR-196a mimic group was significantly longer than that in the NC-mimic group, and the cell migration distance in the miR-196a inhibitor group was significantly shorter than the NC-inhibitor group ($P < 0.05$). Western blot showed that there was no significant difference in HMGA2 or HOXB8 protein expression among the 4 TE1 cell groups ($P > 0.05$); the expressions of ANXA1 and NTN4 proteins in the miR-196a mimic group were significantly lower than those in the NC-mimic group, but the expressions of ANXA1 and NTN4 proteins in the miR-196a inhibitor group were significantly higher than those in the NC-inhibitor group ($P < 0.05$).

Conclusions miR-196a can be used as one of the indexes predicting the prognosis of esophageal carcinoma. It may inhibit the proliferation, invasion and migration of esophageal cancer cells by inhibiting the expressions of ANXA1 and NTN4 genes.

Keywords: microRNA; esophageal carcinoma; prognosis; proliferation; invasion; migration

早期食管癌临床症状不明显^[1],其5年生存率仅为15%~25%^[2]。MicroRNAs(miRNAs)是一种非编码的小分子RNA,含有20~22核苷酸,主要参与调控基因的表达和转录。在恶性肿瘤中,miRNAs能够抑制某些特殊的基因表达而发挥癌基因或抑癌基因的作用^[3-4]。MicroRNA-196a(miR-196a)在不同类型肿瘤中表达差异较大,其所介导的生物学行为也不同^[5-7]。本研究采用逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction,RT-PCR)检测食管癌癌组织和癌旁组织miR-196a表达水平,并进一步通过体外培养食管癌细胞株,观察miR-196a对食管癌迁移、侵袭、增殖等生物学行为的影响及可能作用机制,旨在探讨miR-196a对食管癌的潜在临床价值,现将研究成果总结报道如下。

1 资料与方法

1.1 标本采集

收集河南科技大学第一附属医院2009年4月

至2011年4月行食管癌根治性手术切除的标本组织120例,所有患者均经病理学证实,患者术前未接受放疗、化疗等抗肿瘤治疗。每例患者术中采集癌组织及癌旁组织(距癌组织边缘 ≥ 5 cm),手术剪将样本组织剪成0.5cm \times 0.5cm \times 0.5cm的块状,并立即置于液氮中保存。同时收集患者临床资料,包括姓名、性别、年龄、肿瘤大小、浸润深度(T分期)、淋巴结转移(N分期)、远处转移(M分期)、分化程度,临床病理分期参考美国癌症国际联盟抗癌分期手册^[8](American joint committee on cancer-international union against cancer staging manual)TNM分类系统。本研究经本院医院伦理委员会批准,患者签署知情同意书。对患者术后进行随访,术后第1年每3个月随访1次,之后6个月随访1次。

1.2 细胞来源及处理

食管癌细胞株TE1细胞购自美国菌种保藏中心(American type culture collection,ATCC),TE1细

胞接种于 DMEM 培养基(含 10%胎牛血清、100 u/ml 青霉素和 100 mg/ml 链霉素), 恒温培养箱中以 37℃、5%二氧化碳 CO₂ 培养。取对数生长期细胞, 转染前 24 h 用 0.25%胰蛋白酶消化, 以 1 × 10⁵ 个 / 孔接种于 6 孔板中, 待细胞融合度 ≥ 80% 时开始转染。TE1 细胞分为 4 组: miR-196a mimic 组、NC-mimic 组、miR-196a inhibitor 组和 NC-inhibitor 组。取 37.5 ng miR-196a mimic、NC-mimic、miR-196a inhibitor 或 NC-inhibitor, 溶于 100 μl 无胎牛血清的 DMEM 培养基(A 液)静置 10 min, 再取 4 μl Lipofectamine 2000™, 溶于 100 μl 无胎牛血清的 DMEM 培养基(B 液)静置 5 min; A 液和 B 液混匀后室温静置 10 min。将混合液加入至培养板, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 6 ~ 8 h。弃去转染液, 加入 2 ml DMEM 培养基继续培养, 待细胞生长完全融合时收集上清液, 按 1 : 3 比例传代培养。

1.3 实验试剂

DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司, RIPA 裂解液、胰蛋白酶、二甲亚砜(DMSO)、胎牛血清、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自广州碧云天生物技术研究, Trizol 试剂、RT-PCR 反应试剂盒、脂质体 Lipofectamine 2000™ 购自美国 Invitrogen 公司, miR-196a mimic/inhibitor 特异性寡核苷酸序列委托上海生工生物工程股份有限公司合成设计, miR-196a mimic 序列: 5'-UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGGG-3', 阴性对照(NC-mimic)序列: 5'-UUUGUACUACACAAAAGUACUG-3'; miR-196a inhibitor 序列: 5'-UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGGG-3', 阴性对照(NC-inhibitor): 5'-CAGUACUUUUGUGUAGUACAAA-3', RNA 提取试剂、SYBR Premix ExTaq II 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司, Transwell 小室、Matrigel 人工基底膜购自美国 BD 公司, 兔抗人 ANXA1 多克隆抗体、兔抗人 NTN4 多克隆抗体、兔抗人 HMGA2 多克隆抗体、兔抗人 HOXB8 多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗购自 Santa Cruz 公司, 聚烯酰胺、PVDF 膜、十二烷基硫酸钠购自美国 Sigma 公司。

1.4 实验方法

1.4.1 MTT 增殖实验检测细胞增殖能力 取对数生长期细胞, 用不含胎牛血清的培养基调整浓度为 1 × 10⁵/ml, 接种于 96 孔板, 每组设置 6 个复孔, 37℃、5%CO₂ 条件下培养, 分别于细胞接种 0、24、48、72、96 和 120 h 时加入 MTT 试剂(20 μl / 孔), 孵育 4 h 后再向每孔中加入 150 μl DMSO, 室温下振

荡 15 min, 置于酶标仪上检测 570 nm 处吸光度值(A 值), 以评价细胞生长能力。

1.4.2 Transwell 小室实验检测细胞侵袭能力 用不含血清的培养基将转染后细胞浓度调整为 1.0 × 10⁵ 个 / ml, Transwell 上室每孔接种 150 μl 细胞, 下室加入 600 μl 含有 20%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基作为趋化剂, 37℃培养 48 h, 轻轻拭去表面非侵袭性细胞, 4%多聚甲醛固定, 苏木精染色 10 min, 200 倍荧光显微镜下统计穿透滤膜的细胞数。

1.4.3 细胞划痕实验检测细胞迁移能力 将细胞接种于 6 孔板, 待细胞融合度 ≥ 70% 时进行划痕实验。用记号笔在培养板后均匀划间距为 0.5 cm 的横线(确保每孔至少有 4 条线穿过), 每孔中铺 1 × 10⁵ 个细胞, 细胞融合度 ≥ 80% 时用无菌用移液枪枪头在单层细胞沿底部划出“一”字划痕, PBS 冲洗 3 次后, 分别于培养 12、24 和 48 h 在显微镜下测量划痕的宽度, 并计算细胞迁移率。细胞迁移率 = (初始划痕宽度 - 不同时间点划痕宽度) / 初始划痕宽度 × 100%。实验重复 3 次, 取平均值。

1.4.4 miR-196a 靶基因预测 采用 TargetScan 软件预测 miR-196a 靶基因, 通过查询基因数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), 对靶基因进行筛选, 靶基因满足以下 2 个标准: ①被基因数据库收录; ②在既往的研究中显示与食管癌进展密切相关。按照上述标准, 共有 4 个靶基因: ANXA1、NTN4、HMGA2、HOXB8 纳入研究。

1.4.5 RT-PCR 检测组织和细胞 miR-196a 表达水平 组织总 RNA 提取: 从液氮中取出 50 mg 组织样本, 充分研磨, 加入 1 ml Trizol 裂解液, 冰浴上静置 10 min。细胞总 RNA 提取: PBS 冲洗生长状态良好的 TE1 细胞, 加入 1 ml Trizol 裂解液, 冰浴上静置 10 min。紫外分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 处吸光度值, 当 A₂₆₀/A₂₈₀ > 2.0, 说明 RNA 纯度合格。取 2 μl 总 RNA 进行逆转录: 2 μl 总 RNA 中加入 8 μl 无核酸酶水和 2 μl RT Primer, 85℃反应 5 min 后置于冰浴 3 min。再向上述 12 μl 混合物中加入 RT buffer 3 μl、dNTP 0.5 μl、RNase 1 μl、ddH₂O 8 μl, 反应条件: 37℃ 60 min, 85℃ 5 min。取 5 μl 逆转录产物作为模板, 利用 SYBR Premix ExTaq II 试剂盒进行 RT-PCR, U6 作为内参, 反应条件: 95℃预变性 30 s, 95℃变性 10 s, 60℃延伸 40 s, 35 个循环后 74℃延伸 5 min; 设置熔解曲线: Melt curve: 65~95℃, increment 0.5℃ 0.05min+plate read。miR-196a 引

物委托上海博尚生物技术有限公司设计合成, miR-196a 引物,正向:5'-GAGAAGCAGCATGAGTA TTGGA-3',反向:5'-GGATGTAGTTGAGGCACGTCT G-3';U6 引物,正向:5'-CCAGCAAGAGCACAAGAG GAAGAG-3',反向:5'-GGTCTACATGGCAACTGTGA GGAG-3'。miR-196a 表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示,每个样本均检测 3 次。

1.4.6 Western blot 检测 ANXA1、NTN4、HMGA2、HOXB8 蛋白表达 取对数生长期细胞,弃去培养液,PBS 冲洗,加入离心管中,再加入 1 ml RIPA 裂解液置于冰浴上裂解 30 min,4℃条件下离心 15 min,BCA 蛋白浓度试剂盒检测蛋白纯度。采用 Western blot 检测 E-cadherin、N-cadherin 蛋白水平,将 20 μ g 蛋白提取液置于 10%SDS-PAGE 电泳分离,常规湿法转膜,加入 5%脱脂牛奶孵育封闭 2 h。加入 1:500 ANXA1 抗体、1:500 NTN4 抗体、1:500 HMGA2 抗体、1:200 HOXB8 抗体,4℃孵育 24 h。再滴加二抗 37℃孵育 2 h。PBS 冲洗 3 次,按照 ECL 化学发光显影试剂盒显影,以 GAPDH 作为内参照,分析目的条带相对表达量。

1.5 统计学方法

采用 GraphPad Prism5.0 软件进行数据处理,计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用 one-way ANOVA 分析,两组间比较采用配对 t 检验;计数资料用百分率表示,率的比较采用 χ^2 检验或 Fishers 确切概率法;生存分析采用 Kaplan Meier 法及 Log-rank 法检验;采用单变量和多变量 Cox 比例风险模型评价患者预后的影响因素, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 食管癌组织及细胞 miR-196a 表达

miR-196a 在食管癌组织中表达水平高于癌旁组织 ($t = 34.025, P = 0.000$, 图 1A); 在 TE1 细胞中,miR-196a mimic 组 miR-196a 表达水平高于 NC-mimic 组 ($t = 13.019, P = 0.000$),miR-196a inhibitor 组 miR-196a 表达水平低于 NC-inhibitor 组 ($t = 11.024, P = 0.000$, 图 1B),证实转染实验成功。

2.2 miR-196a 表达与食管癌患者临床病理资料的关系

以食管癌 miR-196a 表达中位值 (10.47 ± 1.5) 作为分界点,将食管癌分为两组:miR-196a 高表达组 51 例和低表达组 69 例,结果显示 miR-196a 表

达与年龄、性别、分化程度、N 分期、肿瘤位置等无关 ($P > 0.05$),随着 T 分期、TNM 分期和肿瘤直径增加,miR-196a 高表达率升高 ($P < 0.05$),见表 1。

2.3 miR-196a 表达与食管癌患者生存预后的关系

生存分析显示,miR-196a 高表达患者总生存期 ($P = 0.015$, 图 2A)和无病生存期 ($P = 0.017$, 图 2B)低于 miR-196a 低表达者;单因素和多因素分析显示,T 分期、miR-196a 表达是影响患者总生存期和无病生存期的独立危险因素(均 $P < 0.05$),见表 2。

2.4 食管癌细胞增殖、迁移和侵袭能力

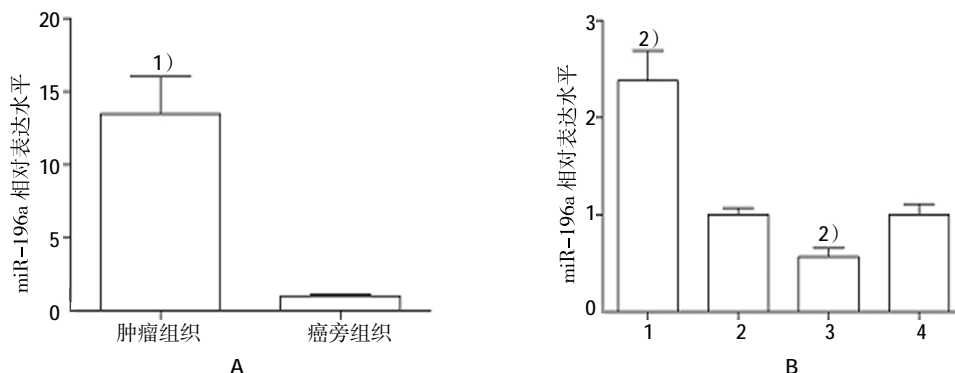
MTT 实验结果显示,第 48 ~ 120 h,miR-196a

表 1 miR-196a 表达与食管癌患者临床病理资料的关系

临床资料	miR-196a 表达		χ^2 值	P 值
	高表达($n=69$)	低表达($n=51$)		
年龄				
<65 岁	34	25	0.001	0.978
≥ 65 岁	35	26		
性别				
男	29	24	0.301	0.583
女	40	27		
分化				
好	19	17	0.532	0.766
中	31	22		
差	19	12		
T 分期				
T ₁	10	22	21.384	0.000
T ₂	16	12		
T ₃	17	14		
T ₄	26	3		
N 分期				
N ₀	7	10	6.312	0.097
N ₁	17	19		
N ₂	22	9		
N ₃	23	13		
TNM 分期				
I	5	24	29.491	0.000
II	22	16		
III	42	11		
肿瘤直径				
<4 cm	28	36	10.610	0.001
≥ 4 cm	41	15		
肿瘤位置				
胸上段	14	9	0.203	0.903
胸中段	29	21		
胸后段	26	21		

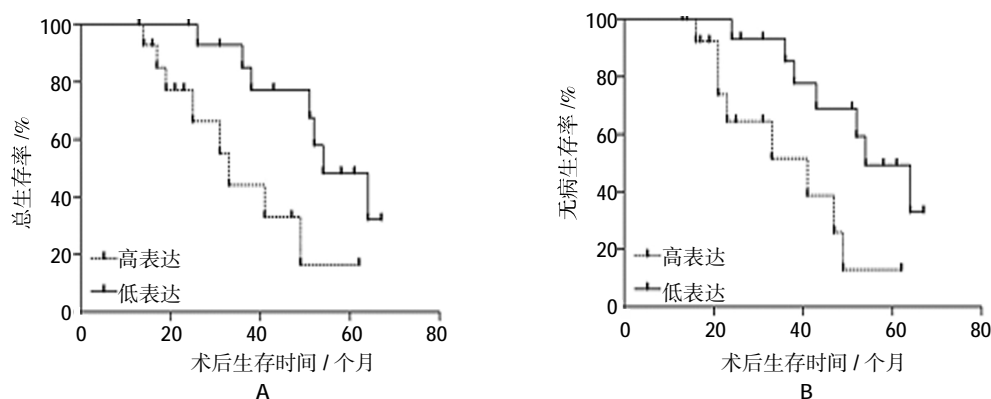
mimic 组吸光度值高于 NC-mimic 组 ($P=0.021$, 图 3A), miR-196a inhibitor 组吸光度值低于 NC-inhibitor 组 ($t=2.913, P=0.013$, 图 3B); Transwell 小室

实验显示, miR-196a mimic 组穿膜细胞数高于 NC-mimic 组 ($t=1.793, P=0.033$, 图 3C), miR-196a inhibitor 组穿膜细胞数低于 NC-inhibitor 组 ($t=$



A: miR-196a 在组织中的表达, B: miR-196a 在 TE1 细胞中的表达; 1: miR-196a mimic; 2: NC-mimic; 3: miR-196a inhibitor; 4: NC-inhibitor; 1) 与癌旁组织比较, $P<0.05$; 2) 与相应的 NC 组比较, $P<0.05$

图 1 食管癌组织及细胞 miR-196a 表达



A: 食管癌患者 miR-196a 表达高低与总生存期的关系; B: 食管癌患者 miR-196a 表达高低与无病生存期的关系

图 2 miR-196a 高表达和低表达食管癌患者总生存期和无病生存期的 Kaplan-Meier 曲线

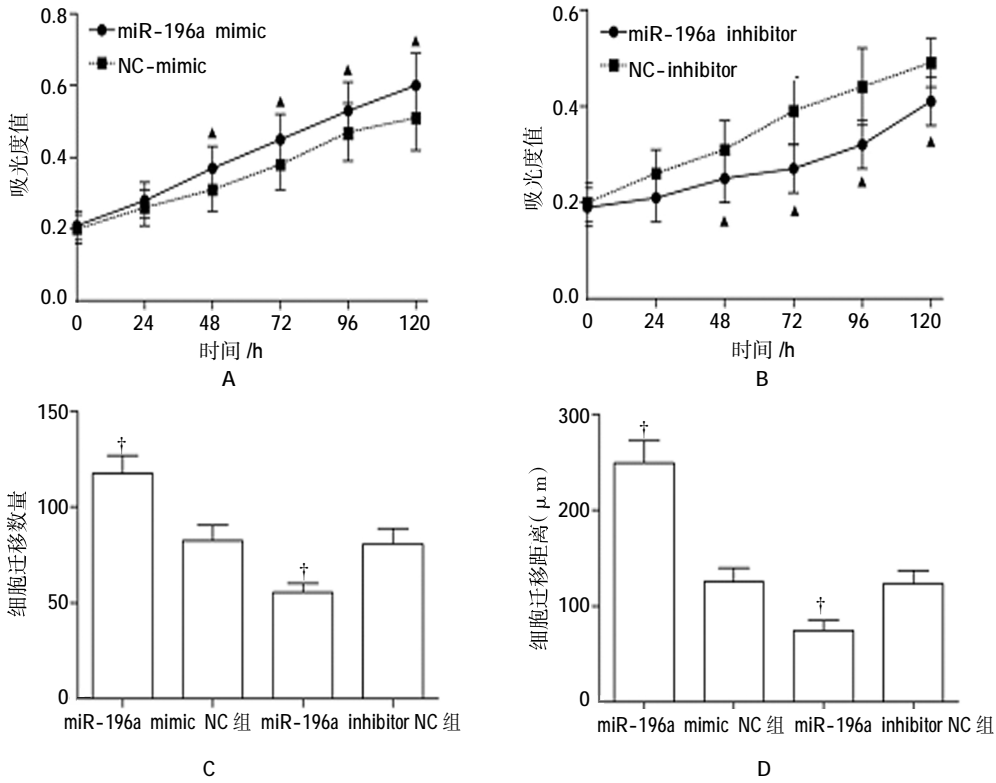
表 2 单因素和多因素分析影响食管癌 OS 和 DFS 的临床病理因素

变量	无病生存期				总生存期			
	风险比	95%CI		P值	风险比	95%CI		P值
		下限	上限			下限	上限	
单因素分析								
年龄(≥ 65 岁 vs <65 岁)	0.863	0.524	1.316	0.652	0.925	0.483	1.231	0.764
性别(男 vs 女)	1.346	1.164	2.220	0.570	1.259	0.938	2.464	0.575
分化(差 vs 好 + 中)	0.946	0.683	1.525	0.455	0.825	0.537	1.391	0.438
T 分期(T_4+T_3 vs T_1+T_2)	1.957	1.055	2.462	0.027	1.874	1.145	2.187	0.016
N 分期(N_3+N_2 vs N_1+N_0)	1.142	0.990	2.356	0.351	0.917	1.102	1.854	0.617
TNM 分期(III vs I + II)	1.205	0.635	1.875	0.570	1.103	0.773	1.631	0.458
肿瘤直径(≥ 4 cm vs <4 cm)	1.118	0.726	1.982	0.651	1.032	0.858	1.239	0.384
肿瘤位置(上段 vs 中下段)	1.136	0.815	1.737	0.775	1.027	0.875	1.515	0.545
miR-196a 表达(高 vs 低)	2.012	1.371	2.816	0.018	2.145	1.350	3.240	0.023
多因素分析								
T 分期(T_4+T_3 vs T_1+T_2)	2.275	1.198	2.767	0.005	2.291	1.369	3.527	0.002
miR-196a 表达(高 vs 低)	1.927	1.343	2.671	0.016	1.985	1.256	2.961	0.019

2.002, $P=0.031$,图3C);细胞划痕实验显示,miR-196a mimic 组细胞迁移距离高于 NC-mimic 组($t=7.045$, $P=0.000$,图 3D),miR-196a inhibitor 组细胞迁移距

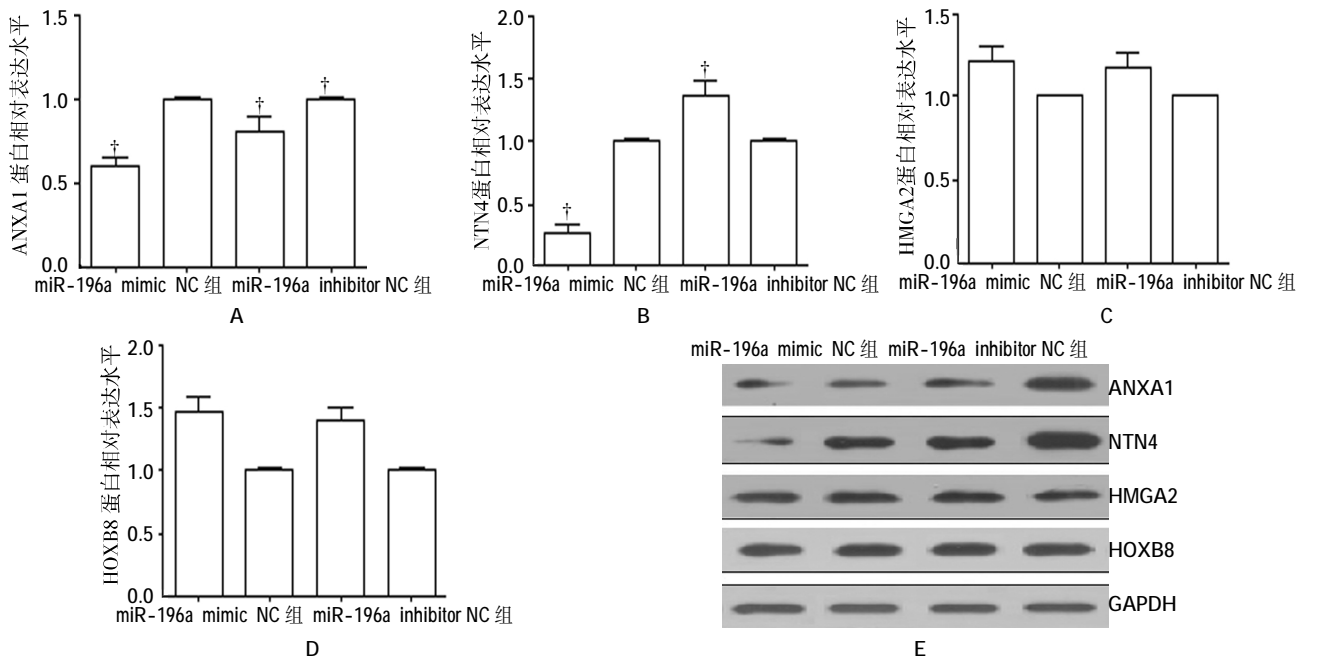
离低于 NC-inhibitor 组($t=2.547$, $P=0.019$,图 3D)。

2.5 食管癌细胞 ANXA1、NTN4、HMGA2、HOXB8 蛋白表达



A:miR-196a mimic 组和 NC-mimic 组的吸光度值比较,B:miR-196a inhibitor 组和 NC-inhibitor 组的吸光度值比较,C:各组的细胞迁移数目,D:各组细胞迁移距离;† 与相应的 NC 组比较, $P<0.05$

图 3 食管癌细胞增殖、迁移和侵袭能力



A: ANXA1 蛋白表达水平,B:NTN4 蛋白表达水平,C:HMGA2 蛋白表达水平,D:HOXB8 蛋白表达水平,E:ANXA1、NTN4、HMGA2、HOXB8 蛋白电泳图;† 与相应的 NC 组比较, $P<0.05$

图 4 食管癌细胞 ANXA1、NTN4、HMGA2、HOXB8 蛋白表达

Western blot 实验结果显示,miR-196a mimic 组、NC-mimic 组、miR-196a inhibitor 组、NC-inhibitor 组 HMGA2、HOXB8 蛋白表达比较差异均无统计学意义($P>0.05$),miR-196a mimic 组 ANXA1、NTN4 蛋白表达低于 NC-mimic 组 ($t=13.009$ 和 15.094 , 均 $P=0.000$),miR-196a inhibitor 组 ANXA1、NTN4 蛋白表达高于 NC-inhibitor 组 ($t=22.174$ 和 19.382 , 均 $P=0.000$),见图 4。

3 讨论

MicroRNAs 是广泛存在于真核生物和人类的源性非编码小分子 RNA,在肿瘤方面,miRNAs 可以作为抑癌基因和癌基因参与肿瘤的发生、发展。miR-196a 是近年来发现的与恶性肿瘤密切相关的 miRNA,其包括 miR-196a-1 和 miR-196a-2 两个编码基因^[9-11]。有报道称^[12]miR-196a-2 基因 T/C 多态性能够影响 miR-196a 对靶点的识别,携带 GG 基因型的 miR-196a 胃癌患者预后较差,提示 miR-196a 与肿瘤的发生、进展有关。不同起源的恶性肿瘤 miR-196a 表达存在一定差异,并且由 miR-196a 介导的生物学行为也不同。TSAI 等^[13]报道称食管癌、结肠癌、胶质瘤等癌组织中 miR-196a 表达升高,而在乳腺癌、黑色素瘤等组织中表达下调。

本研究显示食管癌组织 miR-196a 表达水平高于癌旁组织,提示 miR-196a 可能作为癌基因参与食管癌的进展。分析 miR-196a 与食管癌患者临床病理资料的关系,结果显示 miR-196a 表达与 T 分期、TNM 分期和肿瘤直径有关,即随着 T 分期、TNM 分期和肿瘤直径增加,miR-196a 高表达率升高。本研究提示 miR-196a 或许可以作为食管癌预后评估的指标。为了证实上述猜测,本研究统计了食管癌患者术后随访资料,结果发现 miR-196a 高表达患者总生存期和无病生存期低于 miR-196a 低表达者,说明 miR-196a 高表达与食管癌不良预后有关。单因素和多因素分析也证实,T 分期、miR-196a 表达是影响患者总生存期和无病生存期的独立危险因素。GOCZE 等^[14]报道称 miR-196a rs11614913 多态性是预测胃癌预后的敏感指标,并能够为预测胃癌化疗敏感型提供参考。但是在不同来源肿瘤中 miR-196a 的预测价值不完全一样,比如 GUO 等^[15]报道称 miR-196a 高表达的宫颈癌患者 5 年生存率高于低表达者,miR-196a 过表达与宫颈癌细胞增殖抑制有关。

miRNAs 参与调控肿瘤的机制较为复杂,包括受到转录因子调控、与靶基因之间的调控以及受到竞争性内源 RNA 的调控等。RICHARDS 等^[16]报道称 miR-196a 能够与靶基因 3'-UTR 的区域 microRNA 反应元件竞争性结合 miRNA,阻断 miRNA 对靶基因的抑制作用而参与肿瘤的调控。本研究分别采用 miR-196a mimic 和 miR-196a inhibitor 转染食管癌 TE1 细胞,结果显示 miR-196a mimic 组吸光度值、穿膜细胞数量、胞迁移距离高于 NC-mimic 组,miR-196a inhibitor 组吸光度值、穿膜细胞数量、胞迁移距离低于 NC-inhibitor 组,说明过表达 miR-196a 能够促进 TE1 细胞增殖、侵袭和迁移能力,而抑制 miR-196a 则能阻断上述生物学行为。

进一步分析 miR-196a 潜在的调控靶基因,结果显示 miR-196a mimic 组、NC-mimic 组、miR-196a inhibitor 组、NC-inhibitor 组 HMGA2、HOXB8 蛋白表达比较差异均无统计学意义,miR-196a mimic 组 ANXA1、NTN4 蛋白表达低于 NC-mimic 组,miR-196a inhibitor 组 ANXA1、NTN4 蛋白表达高于 NC-inhibitor 组,说明 miR-196a 过表达能够抑制 ANXA1、NTN4 基因,ANXA1、NTN4 可能是 miR-196a 调控的靶基因之一。ANXA1 以抑癌基因参与肿瘤的调控,既往研究^[17]证实 ANXA1 能抑制肿瘤细胞的增殖和促进细胞的凋亡;ZHANG 等^[18]证实在食管癌中,ANXA1 能够激活 MAPKs 和 JNK 信号转导通路,诱导细胞由增殖转向凋亡。NTN4 是神经生长因子(netrin)家族成员之一,具有促进轴突生长、分支形成的作用。结合本研究结果,说明 miR-196a 可能通过抑制 ANXA1、NTN4 基因的表达发挥细胞增殖、侵袭、迁移的诱导作用。但是限于本研究的局限性在于,未对 miR-196a 调控 ANXA1、NTN4 的信号通路进行分析,这也是接下来研究工作的重点。

综上所述,miR-196a 能够作为食管癌预后的预测指标之一;miR-196a 可能通过抑制 ANXA1、NTN4 基因的表达参与调控食管癌细胞的增殖、侵袭和迁移等生物学行为。

参 考 文 献:

- [1] MOGHATAEI M, HASHEMI GOLPAYEGANI M R, ALMASGANJ F, et al. Predicting the risk of squamous dysplasia and esophageal squamous cell carcinoma using minimum classification error method [J]. Computers in Biology & Medicine, 2014, 45(1):

- 51-57.
- [2] MAO A. Interventional therapy of esophageal cancer[J]. *Gastrointestinal Tumors*, 2016, 3(2): 59-68.
- [3] BERILLO O, RÉGNIER M, IVASHCHENKO A. Binding of intronic miRNAs to the mRNAs of host genes encoding intronic miRNAs and proteins that participate in tumorigenesis[J]. *Computers in Biology & Medicine*, 2013, 43(10): 1374-1381.
- [4] CAMPUZANO S, PEDRERO M, PINGARRÓN J M. Electrochemical genosensors for the detection of cancer-related miRNAs[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014, 406(1): 27-33.
- [5] DING X, PARK S I, MCCAULEY L K, et al. Signaling between transforming growth factor β (TGF- β) and transcription factor SNAI2 represses expression of microRNA miR-203 to promote epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(15): 10241-10253.
- [6] TSAI K W, LIAO Y L, WU C W, et al. Aberrant expression of miR-196a in gastric cancers and correlation, with recurrence[J]. *Genes Chromosomes & Cancer*, 2012, 51(4): 394-401.
- [7] ZHANG J, ZHENG F, YU G, et al. miR-196a targets netrin 4 and regulates cell proliferation and migration of cervical cancer cells [J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2013, 440(4): 582-588.
- [8] SOBIN L H, FLEMING I D. TNM Classification of Malignant Tumors, fifth edition (1997). Union Internationale Contrele Cancer and the American Joint Committee on Cancer [J]. *Cancer*, 1997, 80(9): 1803-1804.
- [9] 赫捷, 邵康. 中国食管癌流行病学现状、诊疗现状及担任中华未来对策[J]. *中国癌症杂志*, 2011, (7): 501-504.
- [10] CHEN Z Y, CHEN X, WANG Z X. The role of microRNA-196a in tumorigenesis, tumor progression and prognosis[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(12): 15457-15466.
- [11] CAI X, LIU X, LU N, et al. Prognostic value of microRNA-196a in Asian cancer patients: a meta-analysis [J]. *Clin Lab*, 2016, 62(11): 2257-2265.
- [12] XU Q, LIU J W, YUAN Y. Comprehensive assessment of the association between miRNA polymorphisms and gastric cancer risk[J]. *Mutat Res Rev Mutat Res* 2015, 763: 148-160.
- [13] TSAI M M, WANG C S, TSAI C Y, et al. MiR-196a Circulating microRNA-196a/b are novel biomarkers associated with metastatic gastric cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2016, 64: 137-148.
- [14] GOCZE K, GOMBOS K, JUHASZ K, et al. Unique microRNA expression profiles in cervical cancer [J]. *Anticancer Res*, 2013, 33(6): 2561-2567.
- [15] GUO X, DONG Z, YAMADA S, et al. Association of Casp3 microRNA target site (1049216) snp with the risk and progress of cervical squamous cell carcinoma [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2017, 27(2): 206-213.
- [16] RICHARDS S L, LAOHAVISIT A, MORTIMER J C, et al. Annexin 1 regulates the H₂O₂-induced calcium signature in *Arabidopsis thaliana* roots [J]. *Plant J*, 2014, 77(1): 136-145.
- [17] FANG Y, GUAN X, CAI T, et al. Knockdown of ANXA1 suppresses the biological behavior of human NSCLC cells in vitro[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(5): 3858-3866.
- [18] ZHANG X, LI X, LI X, et al. ANXA1 silencing increases the sensitivity of cancer cells to low-concentration arsenic trioxide treatment by inhibiting ERK MAPK activation[J]. *Tumori*, 2015, 101(4): 360-367.

(张蕾 编辑)