

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.24.008

文章编号: 1005-8982(2017)24-0039-05

食管癌患者 miR-182 表达水平及其对预后的影响

鲁之中¹, 李军民¹, 胡云芝², 李晓辉³, 李卫¹, 姜富国¹, 李帅¹, 申辰¹
(河南省焦作市人民医院 1. 检验科, 2. 儿科, 3. 肿瘤外科, 河南 焦作 454002)

摘要:目的 探讨 miR-182 在食管癌患者组织中的基因表达及其对预后的影响。**方法** 采用实时荧光定量 PCR 检测 59 例食管癌标本和癌旁组织中 miR-182 表达水平; 并分析其表达水平与患者的临床病理特征和随访结局之间的关系。**结果** 相较于癌旁组织, 食管癌组织中 miR-182 表达水平增高 ($P < 0.05$); miR-182 表达水平与肿瘤分化程度、浸润深度、是否发生转移以及临床分期相关 ($P < 0.05$), 与性别、年龄以及肿瘤大小无关系 ($P > 0.05$); 生存分析显示 miR-182 高表达组总体生存期低于低表达组 ($P < 0.05$); Cox 多因素回归分析结果显示 miR-182 表达水平可作为食管癌患者预后不良的标志之一。**结论** miR-182 在食管癌组织中高表达, 其高表达提示预后较差, 可作为食管癌潜在的预测分子标志物。

关键词: miR-182; 食管癌; 预后; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: R735.1

文献标识码: A

Expression of miRNA-182 and its effect on prognosis of esophageal carcinoma

Zhi-zhong Lu¹, Jun-min Li¹, Yun-zhi Hu², Xiao-hui Li³, Wei Li¹,
Fu-guo Jiang¹, Shuai Li¹, Chen Shen¹

(1. Department of Laboratory, 2. Department of Pediatrics, 3. Department of Surgical Oncology,
People's Hospital of Jiaozuo, Jiaozuo Henan 454002, China)

Abstract: Objective To investigate the concentration of miRNA-182 in esophageal carcinoma and its association with disease prognosis. **Methods** MicroRNA-182 in 59 esophageal carcinoma tissues and related adjacent healthy tissues were measured by quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Association of miRNA-182 with clinical characters including pathologic types, and clinical outcome was determined. **Results** The concentration of miRNA-182 in esophageal carcinoma tissues was significantly increased when compared with that in adjacent healthy tissues ($P < 0.05$). Overexpression of miRNA-182 correlated closely with tumor differentiation level, depth of infiltration, metastasis, and clinical stage ($P < 0.05$). Kaplan-Meier survival analysis indicated that patients with high miRNA-182 experienced worse outcome compared with others ($P < 0.05$). Moreover, multivariate analysis showed that increase of miRNA-182 was an independent predictor of overall survival ($P < 0.05$). **Conclusions** MicroRNA-182 is overexpressed in esophageal carcinoma tissue and concentration of miRNA-182 is closely correlated with poor outcome, suggesting that miRNA-182 may serve as a prognostic biomarker for esophageal carcinoma.

Keywords: miRNA-182; esophageal carcinoma; prognosis factor; qRT-PCR

食管癌在我国属于临床常见恶性肿瘤之一, 病死率高, 危害较大, 其病理类型 >90% 为鳞癌。虽然根治性食管癌切除术 + 化疗的治疗方案已经普及, 但其 5 年总体生存率仍较低^[1]。到目前为止, 虽然分

子生物学研究已发现食管癌发生过程中大量异常出现的分子事件, 但是针对食管癌高危人群筛选、早期诊断以及预后判断的有效分子标志物仍很有限。因此, 更深入的研究和筛选食管癌早期诊断和预后判

断分子标志物具有重要临床意义。

MicroRNAs 是一类长度约为 22 个核苷酸的非编码 RNA, 主要通过与其靶 mRNA 结合抑制其蛋白表达从而实现其生物学功能^[2]。研究发现, miRNAs 在多种肿瘤, 包括食管癌的发生、发展过程中发挥重要作用, 因此其异常表达可能作为食管癌潜在的诊断和预后判断的标志物。

近期研究发现, MicroRNA 182(miR-182) 在多种肿瘤中异常表达, 并且其异常表达跟患者预后相关。JIAN 等^[3]发现食管癌细胞系 KYSE410 中 miR-182 上调, 且食管癌患者血清中 miR-182 同样高于正常对照, 但食管癌组织中 miR-182 表达情况以及异常表达的 miR-182 跟食管癌患者预后是否相关尚不明确。本研究主要通过实时荧光定量 PCR 检测 miR-182 在食管癌标本中的表达水平, 并结合临床病理及随访资料, 探讨 miR-182 在食管癌预后判断中的潜在作用。

1 材料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 标本来源 选取 2011 年 2 月 -2013 年 2 月本院手术切除并且常规 HE 染色确定为食管鳞癌患者的食管癌组织和相应癌旁正常组织, 所有标本均液氮冻存并存储于 -80℃ 冰箱中, 后续用于提 RNA。所有患者术前均未接受化疗并且均签署知情同意书。食管癌病理分型及分期标准按照国际抗癌联盟(international union against cancer, UICC)食管癌分期标准执行。本研究经焦作市人民医院医学伦理委员会批准。

1.1.2 患者资料 食管癌患者总共 59 例。其中, 男性 38 例, 女性 21 例; 年龄 44 ~ 79 岁, 中位年龄 61 岁; 临床分期 I、II 期 36 例, III、IV 期 23 例; 中、高分化 29 例, 低、未分化 30 例。

1.1.3 主要试剂及仪器 高速冷冻离心机(购自德国 eppendorf 公司)、nanodrop 紫外分光光度计(购自美国 nano Drop 公司)、PCR 反应仪(美国 Bio Raid 公司)、实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)仪(购自美国 ABI 公司)、miRcute miRNA isolation kit(购自北京天根公司)、miRNA 逆转录及荧光定量试剂盒(购自日本 TaKaRa 公司)、has-miR-182 及内参 RNU6B 引物(购自美国金维智公司)。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取 根据天根 miRcute miRNA

isolation kit 试剂盒操作步骤, 取 0.1 g 组织液氮保护下研磨, 加入 1 ml 裂解液, 加入氯仿抽提, 并用过柱法分别提取肿瘤组织和癌旁组织总 RNA。用紫外分光光度计测量 RNA 浓度及吸光度, 要求 A260/A280 > 1.8。取 1 μl RNA 溶液在 1.5% 的变性琼脂糖凝胶中进行电泳, 测定 RNA 的完整性。

1.2.2 加尾法逆转录 取 1 μg 总 RNA 使用 Prime-Script miRNA cDNA 合成试剂盒进行 cDNA 的合成, 反应体系为 20 μl, 具体操作步骤见使用说明书。

1.2.3 miR-182 表达水平检测 用以上步骤获得的 cDNA 进行适当稀释, 参照 SYBR Premix Ex Taq kit 试剂盒说明书进行操作。反应具体过程为: 50℃ 激活聚合酶 2 min, 95℃ 预变性 1 min; 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火和延伸 34 s, 扩增 40 个循环; 结束后制作溶解曲线。采用管家基因 U6 作为内参对照。

1.2.4 qRT-PCR 结果分析 结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行处理, 首先获取 miR-182 和内参 U6 的 Ct 值, 然后计算 $\Delta Ct = Ct(miR-182) - Ct(U6)$, 再计算 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{肿瘤组织}} - \Delta Ct_{\text{癌旁组织}}$, 进一步计算 miR-182 在食管癌组织和癌旁组织中的表达倍数的差异。

1.3 随访

所有食管癌术后患者均进行电话随访, 了解术后并发症、复发以及生存情况等信息, 随访截止日期为 2016 年 5 月, 中位随访时间为 29 个月(5 ~ 42 个月)。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 各组间 miRNA-182 表达倍数的均值差异采用配对样本 *t* 检验分析; miRNA-182 与临床病理特征的关系用 χ^2 检验; 采用 Kaplan-Meier 法进行生存分析, 并绘制生存曲线; 采用 Cox 回归模型进行多因素分析, 其中 $\alpha_{\text{入}} = 0.05$, $\alpha_{\text{出}} = 0.10$; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-182 在食管癌组织和癌旁组织中的表达

结果显示, 食管癌肿瘤组织中 miR-182 表达水平 (10.89 ± 3.95) 高于癌旁组织 (6.34 ± 2.91 , $P = 0.000$)。见图 1。

2.2 miR-182 的表达水平与食管癌患者临床病理特征之间的关系

根据 miR-182 的表达情况, 将食管癌患者分为 miR-182 高表达 ($n = 30$) 和低表达组 ($n = 29$)。食管癌组织中 miR-182 的表达水平与患者临床病理特

征间的关系见表 1。miR-182 的高表达跟食管癌患者肿瘤分化程度($P=0.042$)、T 分期($P=0.007$)、淋巴结转移情况($P=0.001$)以及临床分期相关($P=0.001$); 而跟患者性别($P=0.336$)、年龄($P=0.436$)以及肿瘤大小无关($P=0.110$)。见表 1。

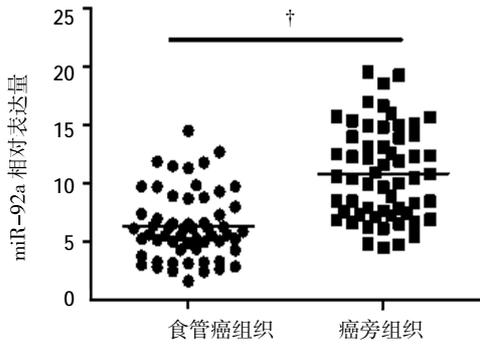


图 1 miR-182 在食管癌组织和癌旁组织中的相对表达量 ($n=59$)

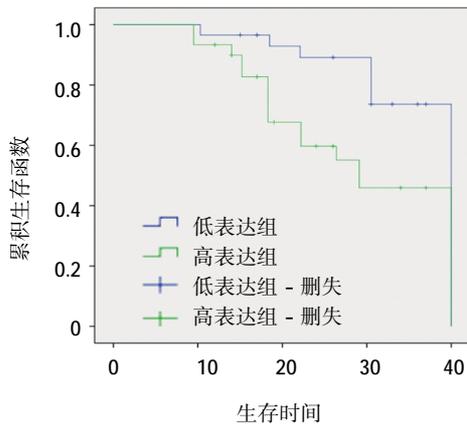


图 2 不同 miR-182 表达水平食管癌患者的生存分析

2.3 miR-182 表达水平与食管癌患者预后的关系

miR-182 高表达组中位生存时间(平均 28.9 个月)低于 miR-182 低表达组(36.1 个月),差异有统计学意义($P=0.015$)(见图 2)。此外,Cox 比例风险

表 1 食管癌组织中 miR-182 表达水平与患者临床病理参数之间的关系

临床参数	miRNA 表达水平		χ^2 值	P 值
	低表达($n=29$)	高表达($n=30$)		
性别				
男	17	21	0.833	0.366
女	12	9		
年龄				
<60 岁	16	19	0.407	0.436
≥ 60 岁	13	11		
肿瘤大小				
<5 cm	23	18	2.594	0.110
≥ 5 cm	6	12		
分化程度				
高、中分化	19	10	6.111	0.042
低、未分化	10	20		
T 分期				
T ₁ -T ₂	19	9	7.460	0.007
T ₃ -T ₄	10	21		
淋巴结转移				
无	20	8	10.581	0.001
有	9	22		
临床分期				
I、II	24	12	11.334	0.001
III、IV	5	18		

模型多因素分析结果显示,T 分期($P=0.060$),临床分期($P=0.687$)以及分化程度($P=0.140$)跟食管癌患者预后无关;淋巴结转移($P=0.027$)以及 miR-182 表达水平($P=0.032$)是食管癌患者预后的独立危险因素。见表 2。

表 2 食管癌患者总生存期 Cox 多因素回归分析相关参数

临床病理特征	b	S _b	Wald χ^2	P 值	OR	95%CI	
						下限	上限
分化程度	0.573	0.389	2.175	0.140	1.774	0.828	3.799
T 分期	0.694	0.368	3.551	0.060	2.002	0.973	4.120
淋巴结转移	0.832	0.377	4.876	0.027	2.297	1.098	4.805
临床分期	0.164	0.407	0.162	0.687	1.178	0.531	2.614
miRNA-182 表达水平	0.775	0.360	4.624	0.032	2.170	1.071	4.397

3 讨论

食管癌是临床常见的恶性肿瘤之一,病死率较高,且预后较差。目前很多临床病理学特征可作为食管癌患者预后的重要提示,但是其不能准确且个体化预测患者预后情况^[4]。因此,研究食管癌发生、发展过程中关键分子生物学事件,寻找能早期诊断、靶向治疗以及预后预测的重要分子标记物具有重要临床意义。

现已在哺乳动物中发现超过 1 900 条 miRNAs,该 miRNAs 可调控超过 60% 基因功能^[2]。在肿瘤研究中已证实异常表达的 miRNAs 可发挥促癌或者抑癌的作用;且该异常表达的 miRNAs 也可作为潜在的诊断和预后判断的标志物^[5]。近年来,食管癌中的研究发现越来越多异常表达的 miRNAs;其中 miR-21^[6]、miR-192^[7]和 miR-106b 等^[8]上调,可促进肿瘤细胞增殖和侵袭转移;miR-375^[9]、miR-203 等^[10]下调,可抑制肿瘤细胞周期并且促进其凋亡。此外,miR-21^[11]和 miR-375^[12]在食管癌预后判断中的研究也已经被证实。本研究主要就 miR-182 在食管癌中的表达及其临床意义就行探讨。

本研究结果显示,相较于癌旁组织,miR-182 在食管癌组织中表达上调。JIANG 等^[9]发现,食管癌细胞系 KYSE410 中 miR-182 上调,并且食管癌患者血清中 miR-182 同样高于正常对照。以上结果提示 miR-182 在食管癌中具有癌基因的倾向。但是,目前研究发现,miR-182 在不同肿瘤中发挥不同的作用。在宫颈癌^[13]、乳腺癌^[14]以及肝癌^[15]中,miR-182 可促进肿瘤进展;但是在胃腺癌^[16]和肺癌^[17]中,miR-182 可抑制肿瘤的进展。由于 miRNA 的作用机制是通过和目的 mRNA 结合抑制其功能,其产生的总体生物学效应依赖于其调控的不同基因之和,因此,同一 miRNA 在不同肿瘤中能发挥不同的生物学效应。此外,检测手段的差异以及肿瘤患者的异质性也是 miRNA 不同生物学效应产生原因。

此外,笔者发现 miR-182 的高表达跟食管癌分化程度、浸润深度、是否淋巴结转移以及临床分期密切相关,生存分析结果显示高表达 miR-182 患者预后较低表达患者差,且单因素和多因素回归分析结果也证实 miR-182 的表达水平跟食管癌患者预后相关,以上结果提示 miR-182 在肿瘤的侵袭转移相关,且具有一定的病情评估和预后判断作用。JANG 等^[18]发现 miR-182 在黑色素瘤肿瘤组织表达上调,且其

表达水平跟病理分级以及预后密切相关。LIU 等^[19]发现结肠癌中高表达的 miR-182 跟肿瘤大小和肿瘤转移密切相关,并可以作为预后判断的有效指标。

本研究主要从临床角度去研究 miR-182 异常高表达与食管癌临床特征的相关性,未进一步从分子角度探讨其促进食管癌发生、发展的机制。在多种肿瘤中,miR-182 的促癌机制均有报道。miR-182 在成神经管细胞瘤中可通过活化 PI3K/Akt/mTOR 通路促进肿瘤细胞的增殖^[20]。在乳腺癌中,miR-182 可抑制多种抑癌基因的表达,如 BRCA1、FOXO1 和 FOXO3 等^[21-23]。而在葡萄膜黑色素瘤细胞中,miR-182 主要通过靶向调节 MITF、BCL2 或细胞周期蛋白 D2 起到抑癌基因的作用^[24]。miR-182 在食管癌中的研究不多,JIANG 等发现 miR-182 可通过抑制 MTSS1 促进食管癌细胞的增殖和侵袭转移^[25]。miR-183 和 miR-182 属于同一家族,可能具有相似的生物学功能,研究也发现 miR-183 可通过调节食管癌细胞中 PDCD4 抑制其凋亡^[26]。

综上所述,miR-182 在食管癌中的表达水平具有重要的临床意义,其在肿瘤的发展过程中可能发挥癌基因的作用,并且可以作为一个潜在的独立预测预后的因素。

参 考 文 献:

- [1] 赫捷,邵康. 中国食管癌流行病学现状、诊疗现状及未来对策[J]. 中国癌症杂志, 2011(7): 501-504.
- [2] ESTELLER M. Non-coding RNAs in human disease[J]. Nature Reviews Genetics, 2011, 12(12): 861-874.
- [3] JIAN W, LI J, SHEN J, et al. MicroRNA-182 downregulates metastasis suppressor 1 and contributes to metastasis of hepatocellular carcinoma[J]. BMC Cancer, 2012, 12(1): 227.
- [4] NAPIER K J, SCHEERER M, MISRA S. Esophageal cancer: A Review of epidemiology, pathogenesis, staging workup and treatment modalities[J]. World Journal of Gastrointestinal Oncology, 2014, 6(5): 112.
- [5] Silvia Giordano, Amedeo Columbano. MicroRNAs: New tools for diagnosis, prognosis, and therapy in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2013, 57(2): 840-847.
- [6] NOURAEI N, ROOSBROECK K V, VASEI M, et al. Expression, tissue distribution and function of miR-21 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. PloS one, 2013, 8(9): e73009.
- [7] SHUJUN L, FENG L, REN N, et al. MiR-192 suppresses apoptosis and promotes proliferation in esophageal squamous cell carcinoma by targeting bim[J]. International Journal of Clinical & Experimental Pathology, 2015, 8(7): 8048-8056.
- [8] DAI F, LIU T, ZHENG S, et al. MiR-106b promotes migration

- and invasion through enhancing EMT via downregulation of Smad 7 in Kazakh's esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Tumor Biology*, 2016: 1-10.
- [9] LI J, LI X, LI Y, et al. Cell-specific detection of miR-375 downregulation for predicting the prognosis of esophageal squamous cell carcinoma by miRNA in situ hybridization[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53582-e53582.
- [10] ZHANG F, YANG Z, CAO M, et al. MiR-203 suppresses tumor growth and invasion and down-regulates MiR-21 expression through repressing Ran in esophageal cancer[J]. 2013, 342(1): 121.
- [11] FU C, DONG W, WANG Z, et al. The expression of miR-21 and miR-375 predict prognosis of esophageal cancer [J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2014, 446(4): 1197-1203.
- [12] KOMATSU S, ICHIKAWA D, TAKESHITA H, et al. Prognostic impact of circulating miR-21 and miR-375 in plasma of patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2012, 1(1): 53-59.
- [13] TANG T, WONG H K, GU W, et al. MicroRNA-182 plays an onco-miRNA role in cervical cancer [J]. *Gynecologic Oncology*, 2013, 129(1): 199-208.
- [14] YU J, SHEN W, GAO B, et al. MicroRNA-182 targets FOXF2 to promote the development of triple-negative breast cancer [J]. *Neoplasia*, 2016, 64(2): 209.
- [15] JIAN W, LI J, SHEN J, et al. MicroRNA-182 downregulates metastasis suppressor 1 and contributes to metastasis of hepatocellular carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12(1): 227.
- [16] KONG W Q, BAI R, LIU T, et al. MicroRNA-182 targets cAMP-responsive element-binding protein 1 and suppresses cell growth in human gastric adenocarcinoma[J]. 2012, 279(7): 1252-1260.
- [17] ZHANG L, LIU T, HUANG Y, et al. microRNA-182 inhibits the proliferation and invasion of human lung adenocarcinoma cells through its effect on human cortical actin-associated protein[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2011, 28(3): 381.
- [18] JIANG L, MAO P L, WU J, et al. miR-182 as a prognostic marker for glioma progression and patient survival[J]. *American Journal of Pathology*, 2010, 177(1): 29-38.
- [19] LIU H, DU L, WEN Z, et al. Up-regulation of miR-182 expression in colorectal cancer tissues and its prognostic value[J]. *International Journal of Colorectal Disease*, 2013, 28(5): 697.
- [20] WEERARATNE S D, AMANI V, TEIDER N, et al. Pleiotropic effects of miR-183-96-182 converge to regulate cell survival, proliferation and migration in medulloblastoma [J]. *Acta Neuropathologica*, 2012, 123(4): 539-552.
- [21] SEGURA M F, HANNIFORD D, MENENDEZ S, et al. Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(6): 1814-1819.
- [22] GUTTILLA I K, WHITE B A. Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(35): 23204-23216.
- [23] MOSKWA P, BUFFA F M, PAN Y, et al. miR-182-mediated downregulation of BRCA1 impacts DNA repair and sensitivity to PARP inhibitors[J]. *Molecular cell*, 2011, 41(2): 210-220.
- [24] YAN D, DONG X D, CHEN X, et al. Role of microRNA-182 in posterior uveal melanoma: regulation of tumor development through MITF, BCL2 and cyclin D2[J]. *PLoS one*, 2012, 7(7): e40967.
- [25] JIANG Q, REN Y, CHENG J, et al. Effect of miR-182 targeting MTSS1 on the proliferation and metastasis of esophageal cancer[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2016, 9(11): 10871-10877.
- [26] REN L H, CHEN W X, LI S, et al. MicroRNA-183 promotes proliferation and invasion in oesophageal squamous cell carcinoma by targeting programmed cell death 4[J]. *British journal of cancer*, 2014, 111(10): 2003-2013.

(王荣兵 编辑)