

食管癌组织中microRNA-21的表达及其意义

向正凯, 严宝国

microRNA-21 Expression in Esophageal Cancer and Its Clinical Significance

XIANG Zhengkai, YAN Baoguo

Department of Thoracic and Bone-softtissue Surgery, Hubei Cancer Hospital, Wuhan 430022, China

Corresponding Author: YAN Baoguo, E-mail: baoguoy718@126.com

Abstract: Objective To investigate microRNA-21(miR-21) expression in esophageal cancer (EC) and its relationship with clinicopathological features. **Methods** Expression levels of miR-21 in 72 pairs of EC and adjacent normal tissues were detected by real-time quantitative RT-PCR assay, and the relevance between miR-21 and clinicopathological features was evaluated. Kaplan-Meier and Cox proportional regression analysis were performed to determine the association of miR-21 expression and survival of EC patients. **Results** miR-21 expression in EC tissues was significantly higher than that in adjacent normal tissues ($P=0.001$). There was a significant correlation between miR-21 expression and TNM stage, EC progression($P=0.023$, $P=0.025$). In addition, EC patients with higher miR-21 expression had significantly poorer overall survival ($P=0.004$). **Conclusion** miR-21 may serve as a potent prognostic marker for tumor recurrence and survival of EC patients, and might be a promising target in the treatment of EC.

Key words: Esophageal cancer; MiR-21; Clinicopathological features; Prognosis

摘要: 目的 探讨microRNA-21(miR-21)在食管癌组织中的表达并分析其与临床病理因素之间的关系。**方法** 采用实时定量PCR方法检测72例食管癌组织和同一患者的邻近正常食管组织中miR-21的表达,并评估miR-21与临床病理因素之间的相关性。运用Kaplan-Meier和Cox回归分析方法对食管癌患者进行生存分析。**结果** miR-21在肿瘤组织中的表达明显高于正常组织($P=0.001$)。同时,miR-21的表达与肿瘤的TNM分期、病情恶化之间有明显的相关性($P=0.023$, $P=0.025$)。另外,miR-21高表达的患者有着显著更差预后($P=0.004$)。**结论** miR-21可作为食管癌患者预后的一个指标,是治疗食管癌潜在的靶点。

关键词: 食管癌; miR-21; 临床病理因素; 预后

中图分类号: R735.1 **文献标识码:** A

0 引言

食管癌是最常见的八大恶性肿瘤之一,其致死率在恶性肿瘤中排第六位,在我国食管癌的死亡率约为17.38/10万^[1]。食管癌多隐匿性起病,大多数患者就诊时已处于中晚期。虽然目前对食管癌采取了手术、化疗与放疗相结合的综合治疗方式,但五年生存率仍只有15%~25%,约75%的患者多在确诊后一年内死亡^[1-2]。因此,提高食管癌早期诊断率以降低其死亡率,寻找更有效的生物学标志物是十分必要的。

微小RNA (microRNA, miRNA) 是一类内源

性的单链非编码小分子RNA,约17~25 bp大小,miRNA主要是通过与其靶基因mRNA 3'-UTR结合,导致靶基因mRNA降解或转录后翻译抑制,从而调控靶基因的表达^[3]。大量研究表明,miRNA在肿瘤细胞的生物学行为以及肿瘤的发生发展中发挥重要作用,包括细胞的增殖、分化、侵袭、凋亡和转移等^[4]。目前研究发现,miR-21在多种人肿瘤细胞中均有较高的表达,并影响肿瘤细胞的生物学行为^[5-6]。本文作者通过实时定量PCR方法检测miR-21在食管鳞癌组织和周围正常食管组织中的表达,并分析其与临床病理之间的关系。

1 资料和方法

1.1 临床资料

本研究中72例食管癌患者的肿瘤组织和邻近正常食管组织样本由湖北省肿瘤医院在2004年3

收稿日期: 2013-10-08; 修回日期: 2014-02-20

作者单位: 430000武汉, 湖北省肿瘤医院胸与骨软组织外科

通信作者: 严宝国, E-mail: baoguoy718@126.com

作者简介: 向正凯(1985-),男,硕士,住院医师,主要从事胸与骨软组织肿瘤的基础和临床研究

月至2008年12月间活检或手术切除取得,所有患者术前均未行放疗和化疗。临床资料和相关病理信息从患者的病历和本院病理报告中获得。所有患者均知晓其资料信息用于本实验研究,见表1。其中,男40例,女32例,年龄35~67岁,平均年龄51.5岁。胸上段食管癌13例,中段35例,下段24例。组织学为低分化16例,中分化22例,高分化34例。术中取肿瘤中心(去除坏死组织后)及距肿瘤边缘至少5 cm的食管切缘组织,病理确认食管残端为正常食管黏膜上皮,组织类型均为鳞癌。本研究中所有患者均获随访,随访从手术后第一天开始,以患者死亡或失随访的时间为截止时间,至2012年3月止,时间1~72月,平均为37.5月。

表1 miR-21在食管癌组织中的表达及其与临床病理因素之间的关系

Table1 Association between miR-21 expression and conventional clinicopathologic parameters in 72 EC patients

Factors	n	miR-21 expression		P
		High (n=46)	Low (n=26)	
Gender				0.784
Male	40	25	15	
Female	32	21	11	
Age(years)				0.544
<52	34	22	12	
≥52	38	24	14	
Location				0.710
Upper	13	8	5	
Middle	35	24	11	
Lower	24	14	10	
Differentiation				0.736
Poor	16	9	7	
Moderate	22	14	8	
Well	34	23	11	
TNM stage				0.023
I	8	3	5	
II	31	16	15	
III	24	19	5	
IV	9	8	1	
Progression				0.025
Yes	26	21	5	
No	46	25	21	
Death				0.026
Yes	55	39	16	
No	17	7	10	

Notes:EC:esophageal cancer

1.2 方法

组织样本均在液氮中研碎,总RNA由TaqMan miRNA Isolation Kit (美国Life公司)提取, RNA样品 A_{260}/A_{280} 吸光度值在1.8左右为合格。合格的RNA样品运用M-MLV First-Strand Synthesis System for qRT-PCR (美国Life公司)进行反转录反应, 反应条件如下: 16℃ 30 min, 42℃ 30 min, 85℃ 5

min。利用二步法M-MLV Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG试剂盒(美国Life公司)进行PCR扩增,反应条件为50℃ 2 min, 95℃ 10 min预变性, 95℃ 15 s, 60℃ 30 s, 共40个循环。以U6作为内参基因,每样本重复3孔,对比内参U6的Ct值分别计算其 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

1.3 统计学方法

采用SPSS18.0软件进行处理,组间差异通过 t 检验和 χ^2 检验,生存分析采用Kaplan-Meier和Cox回归分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-21在食管癌组织和邻近食管组织中的表达

运用实时定量PCR方法检测所有组织中miR-21的表达,结果表明miR-21在所有组织中均有表达,且在72例食管癌组织中有63例miR-21的表达,明显高于邻近的正常食管组织,两者之间差异有统计学意义($P=0.001$),见图1。

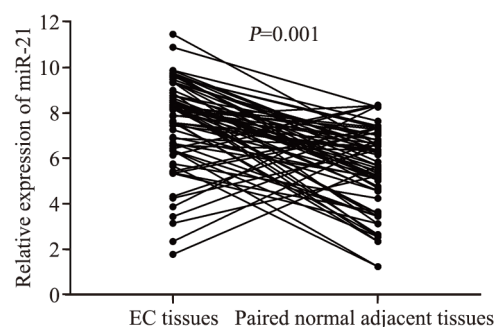


图1 miR-21在食管癌和正常食管组织中的表达

Figure1 miR-21 expression in 72 pairs of EC and adjacent normal esophageal tissues detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis

2.2 miR-21的表达与食管癌患者临床病理之间的关系

根据miR-21表达的中位值[(7.562±1.072) , 内参为U6],将72名患者分为两组,其中高表达组46例,低表达组26例。经统计分析发现,miR-21的表达与患者的肿瘤TNM分期和进展恶化明显相关,患者miR-21表达越高,TNM分期越晚($P=0.023$),恶化的可能性越高($P=0.025$)。而与患者的性别、发病年龄、肿瘤的部位、肿瘤组织类型以及分化程度无关,见表1。

2.3 miR-21在食管癌患者预后中的意义

在随访中,我们定义术后肿瘤复发或/和发生转移为恶化,通过对比复查时CT与术前CT的表现来进行判定。在随访过程中,有26例患者发生恶

化，其中21例是miR-21高表达患者，5例是miR-21低表达患者。高表达组5年生存率为15.22%，低表达组为38.46%。根据Kaplan-Meier生存分析表明，高表达miR-21的食管癌患者相比低表达的患者5年生存率更低（ $P=0.004$ ），见图2；同时发现TNM分期越晚（ $P=0.005$ ）、病情恶化（ $P=0.011$ ）的患者5年生存率越低，见表2。

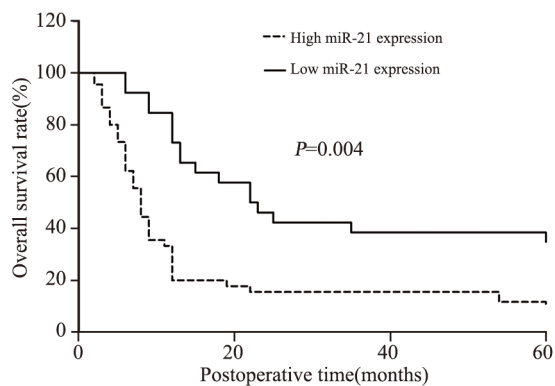


图2 食管癌患者miR-21表达和生存时间之间的关系
Figure2 Correlation between miR-21 expression and survival time in 72 EC patients

表2 miR-21及一般临床病理因素在食管癌患者预后中的单因素分析

Table2 Univariate analysis of miR-21 expression and general clinicopathologic parameters in the prognosis of EC patients

Factors	Median survival time (month)	χ^2	P
Age(years)		0.909	0.340
<52	35.147		
≥52	22.086		
Location		0.059	0.971
Upper	16.077		
Middle	26.971		
Lower	31.708		
Differentiation		1.939	0.379
Poor	38.375		
Moderate	22.591		
Well	27.391		
TNM stage		30.219	<0.001
I	35.000		
II	40.581		
III	17.330		
IV	5.556		
Progression		14.435	<0.001
Yes	42.809		
No	9.519		
miR-21 expression		12.488	<0.001
High	19.674		
Low	46.615		

进一步多元Cox回归分析表明，miR-21表达（ $P=0.042$ ）、TNM分期（ $P=0.002$ ）和病情恶化

（ $P=0.009$ ）均是食管癌患者预后的独立指标，见表3。

表3 miR-21及一般临床病理因素在食管癌患者预后中的多因素分析

Table3 Multivariate analysis of miR-21 expression and general clinicopathologic parameters in the prognosis of EC patients

Factors	Overall survival		
	HR	95% CI	P
TNM stage	1.829	1.257-2.660	0.002
Progression	2.150	1.213-3.811	0.009
miR-21 expression	1.922	1.024-3.606	0.042

3 讨论

miRNAs最早由Lee等^[7]在秀丽隐杆线虫中首次发现。目前超过1 000种miRNA被发现，其在动物、植物和病毒中广泛表达。在动物体内miRNA主要通过靶基因3'端非编码区(3'-UTR)不完全配对，从而抑制靶基因mRNA翻译来参与细胞分化、增殖、侵袭、凋亡等生物学过程^[8-9]。近年大量研究发现miRNA在多种恶性肿瘤组织中与其相应正常组织表达存在显著差异^[10-11]，同时大量研究表明miRNA在肿瘤中的表达高低与肿瘤的发生发展有密切关系^[12-13]。

目前发现多种miR在食管癌中均有明显的表达，与食管癌的发生发展有密切关系^[14]。同时，最近研究证实miR-21是唯一在多种实体肿瘤肺癌、胃癌、前列腺癌、结肠癌、食管癌、胰腺癌等中高表达的miRNA。但关于miR-21与肿瘤临床病理因素之间关系的研究少有报道。本实验中运用实时定量PCR方法检测miR-21在食管癌组织和邻近正常食管组织中的表达，证实了miR-21在食管癌组织和周围相邻正常食管组织中表达存在明显差异，且miR-21在食管癌组织中也呈明显的高表达，该结论与以前的一些相关研究一致^[5-6, 15]。在miR-21对肿瘤发生发展机制研究方面也有较多的报道，Ziyan等^[5]也证实了在骨肉瘤MG-63细胞中miR-21通过直接作用RECK基因促进肿瘤的侵袭和转移。Song等^[15]发现在乳腺癌细胞中miR-21通过调节TIMP3基因来调节乳腺肿瘤细胞的侵袭。

通过术后的随访统计结果，发现高表达miR-21的患者有着更差的预后，说明miR-21可以作为食管癌患者一个有效预后的指标。同样在其他研究也有类似的报道，Gu等^[10]发现miR-372的高表达与肝癌患者术后生存时间存在明显的正相关。同样在膀胱癌患者中减少的miR-31表达也证实和术后生存时间缩短有明显的关系^[12]。近期Markou等^[16]报道miR-21高表达可以作为非小细胞

肺癌患者总生存率一个独立的预后因素。

肿瘤的形成是一个非常复杂的过程, 包括从起初的基因改变引起的恶性转变到最后的肿瘤形成, 甚至远处转移。在这些过程中, 不同的肿瘤都有着独特的分子事件, 因此肿瘤的预后往往取决于不同基因之间的相互作用。Qian等^[17]发现miR-21在344例乳腺癌病例中均有表达, 但高表达的miR-21与患者预后无明显相关性。同样, 在食管癌形成的过程中, miR-21并不是唯一一个发生改变基因, 因此进一步研究的重点是发现更多发生改变的基因, 研究他们相关的机制, 从而为更好理解食管癌的发生发展以及为预后提供理论支持。

总之, 在本研究中发现miR-21在食管癌组织的表达明显高于邻近正常食管组织, 高表达的miR-21与食管癌的进展和预后呈明显的相关性。miR-21可作为食管癌患者总生存率一个独立的预后因素。

参考文献:

- [1] Enzinger PC, Mayer RJ. Esophageal cancer[J]. N Engl J Med, 2003,349(23): 2241-52.
- [2] Xing D, Tan W, Lin D. Genetic polymorphisms and susceptibility to esophageal cancer among Chinese population (review) [J]. Oncol Rep, 2003,10(5): 1615-23.
- [3] Cho WC. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers[J]. Mol Cancer, 2007, 6: 60.
- [4] Croce CM, Calin GA. miRNAs, cancer, and stem cell division[J]. Cell, 2005, 122(1): 6-7.
- [5] Ziyan W, Shuhua Y, Xiufang W, *et al.* MicroRNA-21 is involved in osteosarcoma cell invasion and migration[J]. Med Oncol, 2011,28(4): 1469-74.
- [6] Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells[J]. Cancer Res, 2005,65(14): 6029-33.
- [7] 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): 843-54.
- [8] Villanueva A, Hoshida Y, Toffanin S, *et al.* New strategies in hepatocellular carcinoma: genomic prognostic markers[J]. Clin Cancer Res, 2010,16(19): 4688-94.
- [9] Milazzo M, Fornari F, Gramantieri L. MicroRNA and hepatocellular carcinoma: biology and prognostic significance[J]. Minerva Gastroenterol Dietol, 2011,57(3): 257-71.
- [10] Gu H, Guo X, Zou L, *et al.* Upregulation of microRNA-372 associates with tumor progression and prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. Mol Cell Biochem, 2013,375(1-2): 23-30.
- [11] Liu M, Wang Z, Yang S, *et al.* TNF- α is a novel target of miR-19a[J]. Int J Oncol, 2011, 38(4): 1013-22.
- [12] Wang S, Li Q, Wang K, *et al.* Decreased expression of microRNA-31 associates with aggressive tumor progression and poor prognosis in patients with bladder cancer[J]. Clin Transl Oncol, 2013, 15(10):849-54.
- [13] Yan LX, Huang XF, Shao Q, *et al.* MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis[J]. RNA, 2008, 14(11): 2348-60.
- [14] Liu SG, Qin XG, Zhao BS, *et al.* Differential expression of miRNAs in esophageal cancer tissue[J]. Oncol Lett, 2013, 5(5): 1639-42.
- [15] Song B, Wang C, Liu J, *et al.* MicroRNA-21 regulates breast cancer invasion partly by targeting tissue inhibitor of metalloproteinase 3 expression[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2010,29: 29.
- [16] Markou A, Tsaroucha EG, Kaklamanis L, *et al.* Prognostic value of mature microRNA-21 and microRNA-205 overexpression in non-small cell lung cancer by quantitative real-time RT-PCR[J]. Clin Chem,2008,54(10): 1696-704.
- [17] Qian B, Katsaros D, Lu L, *et al.* High miR-21 expression in breast cancer associated with poor disease-free survival in early stage disease and high TGF-beta1[J]. Breast Cancer Res Treat, 2009,117(1): 131-40.

[编辑: 周永红; 校对: 尤婷婷]