

肿瘤防治研究

Cancer Research on Prevention and Treatment

微小RNA-181d在食管鳞状细胞癌中的表达及其临床意义

龚芬芬, 韩鹏黎, 崔渊博, 曹新广, 赵瑞华, 展翔, 李学民, 曹巍

引用本文:

龚芬芬, 韩鹏黎, 崔渊博, 等. 微小RNA-181d在食管鳞状细胞癌中的表达及其临床意义[J]. 肿瘤防治研究, 2018, 45(12): 981-984.
\$stringUtils.citationAuthorFormate(\$ {article.authorEnNames}, ", ", et al"). Expression and Clinical Significance of miRNA-181d in Esophageal Squamous Cell Carcinoma[J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*, 2018, 45(12): 981-984.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2018.18.0716>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

miR-135a-5p、GATA3和STAT3在宫颈癌中的表达及其相关性

Expression and Correlation of miR-135a-5p, GATA3 and STAT3 in Cervical Cancer

肿瘤防治研究. 2019, 46(04): 338-344 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2019.18.1040>

胃癌患者血清miR-181d与PDCD4的表达及意义

Expression and Clinical Significance of miR-181d in Serum and PDCD4 in Gastric Cancer Patients

肿瘤防治研究. 2019, 46(02): 131-137 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2019.18.0486>

FoxO3基因与膀胱癌临床病理特征及预后的相关性

Correlation of FoxO3 Gene with Clinicopathological Features and Prognosis of Bladder Cancer Patients

肿瘤防治研究. 2019, 46(01): 58-62 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2019.18.0806>

子宫颈鳞状细胞癌组织中LncRNA HCG11和miR-590-3p的表达及其与预后的关系

Expression of LncRNA HCG11 and miR-590-3p in Squamous Carcinoma of Cervix and Their Relationship with Prognosis

肿瘤防治研究. 2018, 45(3): 148-153 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2018.17.0614>

长链非编码RNA ZNF667-AS1在食管鳞状细胞癌组织中的表达及其DNA甲基化状态的研究

Expression and DNA Methylation Status of Long Non-coding RNA ZNF667-AS1 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Tissues

肿瘤防治研究. 2018, 45(12): 976-980 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2018.18.0586>



杂志官网



微信公众号

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2018.18.0716

• 临床研究 •

微小RNA-181d在食管鳞状细胞癌中的表达及其临床意义

龚芬芬¹, 韩鹏黎¹, 崔渊博¹, 曹新广², 赵瑞华³, 展翔¹, 李学民¹, 曹巍¹

Expression and Clinical Significance of miRNA-181d in Esophageal Squamous Cell Carcinoma

GONG Fenfen¹, HAN Pengli¹, CUI Yuanbo¹, CAO Xinguang², ZHAO Ruihua³, ZHAN Xiang¹, LI Xuemin¹, CAO Wei¹

1. Translational Medicine Center, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450007, China; 2. Department of Endoscopy Surgery, He'nan Cancer Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450008, China; 3. Department of Oncology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China
Corresponding Author: CAO Wei, E-mail: caoweiyu@hotmail.com

Abstract: Objective To observe the expression of microRNA(miRNA, miR)-181d in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) tissues and to explore its clinical significance. **Methods** Reverse transcription quantitative real-time PCR(RT-qPCR) was used to detect the miR-181d expression in 37 cases of ESCC tissues and matched adjacent tissues. The correlations of miR-181d expression with clinicopathological features and clinical prognosis were analyzed. **Results** miR-181d expression was up-regulated in 89.2%(33/37) of ESCC tissues, compared with the matched adjacent tissues ($P<0.01$). The expression level of miR-181d was not significantly correlated with gender, age, depth of invasion, lymph node metastasis, histological grade or tumor location($P>0.05$), but significantly related to TNM staging ($P<0.05$). Kaplan-Meier survival analysis showed that the overall survival rate and the disease-free survival rate of the high miR-181d expression group was significantly lower than that of the low miR-181d expression group ($P<0.05$). **Conclusion** miR-181d expression is related to TNM and prognosis of ESCC patients. miR-181d may be used as a potential predictor to evaluate the prognosis of ESCC patients.

Key words: Esophageal squamous cell carcinoma; miR-181d; Prognosis

摘要: 目的 探讨miR-181d在食管鳞状细胞癌组织中的表达, 并分析其临床意义。**方法** 应用反转录实时荧光定量PCR(reverse transcription quantitative real-time PCR, RT-qPCR)技术检测37例食管鳞状细胞癌组织及癌旁组织中miR-181d的表达, 分析miR-181d表达与肿瘤临床病理特征的相关性。**结果** miR-181d在89.2%(33/37)的食管鳞状细胞癌组织中表达水平显著高于对应癌旁组织($P<0.01$); miR-181d表达水平与性别、年龄、浸润深度、淋巴结转移、组织学分级、肿瘤部位均无明显相关性($P>0.05$), 但与TNM分期显著相关($P<0.05$)。Kaplan-Meier生存分析显示, miR-181d高表达组总生存率和无病生存率明显低于低表达组($P<0.05$)。**结论** miR-181d在食管鳞状细胞癌组织中的表达与肿瘤的TNM分期及预后相关, miR-181d可能作为潜在预测指标评估食管鳞状细胞癌患者的预后。

关键词: 食管鳞状细胞癌; 微小RNA-181d; 预后

中图分类号: R735.1

文献标识码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



0 引言

我国是全球食管癌高发地区, 据估计, 2013年全国食管癌新发病例数为27.7万例, 死亡病例数约20.6万例^[1]。食管癌分为鳞癌和腺癌两种亚型, 亚洲90%的食管癌为食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)。食管癌的病因和发生机制目前尚不完全清楚, 虽然近年来在食管癌的诊治方面取得了一定的进展, 但5年生存率

收稿日期: 2018-05-31; 修回日期: 2018-08-29

基金项目: 河南省自然科学基金(162300410279, 182102310328); 河南省教育厅基金(18B310022)

作者单位: 1. 450007 郑州, 郑州大学附属郑州中心医院转化医学中心; 2. 450008 郑州, 郑州大学附属河南省肿瘤医院腔镜外科; 3. 450052 郑州, 郑州大学第一附属医院肿瘤科

通信作者: 曹巍, E-mail: caoweiyu@hotmail.com

作者简介: 龚芬芬(1983-), 女, 硕士, 技师, 主要从事食管癌的临床研究

仅有25%~30%^[2]。深入研究ESCC发生、发展机制对食管癌的早期诊治和提高患者生存期具有重要的意义。微小RNA最早发现于1993年^[3]，是一类长度为21~22个核苷酸内源性的非编码小分子RNA，通过与靶基因mRNA的3'端非编码区互补结合来调节其转录或降解，从而影响细胞增殖、凋亡、侵袭等生物学行为^[4]。越来越多的研究表明miRNAs在多种肿瘤的发生、发展及预后中发挥重要作用^[5-6]。miR-181d位于19号染色体，是一个重要的基因表达调控因子^[7]。近年来研究表明，miR-181d的异常表达与多种肿瘤的发生、发展及预后密切相关^[8-10]。但是miR-181d在ESCC中的表达与预后的关系目前报道甚少。因此本研究通过检测miR-181d在ESCC及其相应癌旁组织中的表达，并进一步分析其与临床病理特征和预后的相关性，为寻找ESCC早期诊断和预后的生物标志物提供依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集2011年8月—2013年4月在河南省肿瘤医院行手术切除并经病理确诊为ESCC组织及相应癌旁组织标本37例，组织标本离体后立即放入液氮保存。患者的临床、预后资料主要通过病历回顾和电话随访获得。末次随访时间为2016年8月。术后分期采用国际抗癌联盟（Union for International Cancer Control, UICC）第7版食管癌分期标准^[11-12]；组织学分级采用WHO病理分级标准^[13]，1级为高度分化，2级为中度分化，3级为低度分化。本研究通过郑州大学附属郑州中心医院医学研究伦理委员会的批准，所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 试剂与仪器

TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司，RNA反转录试剂盒、U6snRNA，实时荧光定量试剂盒均购自上海吉玛生物科技有限公司。无酶枪头、PCR管和EP管购自美国Axygen公司；其余试剂均为国产分析纯。NanoDrop微量核酸蛋白分析仪购自美国Thermo Fisher公司，7500fast实时荧光定量PCR仪购自美国Applied Biosystems公司。

1.3 实验方法

根据说明书应用TRIzol试剂（Invitrogen，美国）提取癌组织及癌旁组织总RNA，NanoDrop微量核酸蛋白分析仪（Thermo Scientific）检测RNA浓度及纯度。根据“Hairpin-itTM microRNA和U6 snRNA Normalization RT-PCR Quantitation Kit（Gene

Pharma）”试剂盒说明书分别配制20 μl反应体系进行反转录实时荧光定量PCR反应。PCR扩增反应程序：预变性95℃ 3 min，PCR反应95℃ 12 s，62℃ 40 s，40个循环，设定统一的阈值，以PCR反应管内荧光信号到达设定阈值时经历的循环数（cycle threshold, Ct）分析结果，并取3次结果的平均值。以U6 snRNA管家基因作为内参，采用1号样本癌旁组织的平均Ct值作为标准对照，应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算样本中miR-181d的相对表达水平。以ESCC组织中miR-181d表达量的中位数为分界点将其分为低表达组和高表达组^[14]。

1.4 统计学方法

采用SPSS19.0软件进行统计学分析，miR-181d在癌组织和癌旁组织中的表达水平差异分析采用Wilcoxon检验；Fisher精确检验分析肿瘤组织中miR-181d的表达水平与临床病理特征的关系；利用Kaplan-Meier生存曲线法及Log rank检验分析无病生存时间（disease-free survival, DFS）和总生存时间（overall survival, OS）。P值为双向性检验，检验水准 $\alpha=0.05$ ， $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-181d在ESCC组织中的表达水平

RT-qPCR检测结果显示，与相应癌旁组织相比，miR-181d在89.2%（33/37）癌组织中相对高表达，且miR-181d在癌组织中的表达水平显著高于癌旁组织中的表达水平，差异有统计学意义（ $P=0.000$ ），见图1。

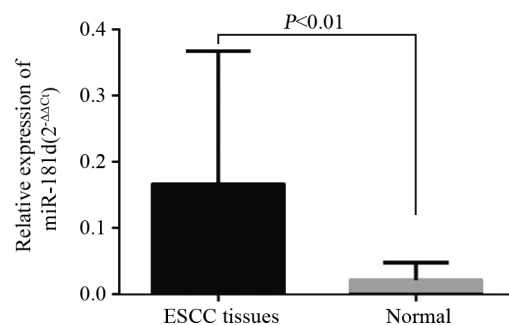


图1 RT-qPCR检测miR-181d在ESCC及对应癌旁组织中的相对表达量

Figure 1 miR-181d expression in ESCC and matched adjacent normal tissues detected by RT-qPCR

2.2 miR-181d的表达与ESCC临床病理特征的关系

以ESCC组织中miR-181d表达量的中位数为分界点将其分为低表达组和高表达组，分析两组与临床病理特征间的关系。结果表明，miR-181d表

达水平与性别、年龄、病理分级、淋巴结转移，组织学分级，肿瘤部位均无明显相关性 ($P>0.05$)，但与TNM分期相关 ($P<0.05$)，见表1。

表1 食管癌组织中miR-181d的表达与临床病理特征的关系
Table1 Correlation between miR-181d expression and clinicopathological features of ESCC patients

Characteristics	n(%)	High miR-181d expression	Low miR-181d expression	P	χ^2
Gender				1.000	0.64
Male	26(70.27)	13	13		
Female	11(29.73)	6	5		
Age(years)				0.604	1.004
≤ 60	33(89.19)	16	17		
>60	4(10.81)	3	1		
pT				1.000	0.01
T1-2	10(27.03)	5	5		
T3-4	27(72.97)	14	13		
pN				0.746	0.232
Negative	17(45.95)	8	9		
Positive	20(54.05)	11	9		
Histological grade				0.368	1.693
1-2	31(83.78)	17	14		
3-4	6(16.22)	5	1		
TNM stage				0.045	4.678
I - II	23(62.16)	9	14		
III	14(37.84)	10	4		
Tumor location				0.235	3.542
Upper thoracic	3(8.11)	0	3		
Middle thoracic	24(64.86)	13	11		
Lower thoracic	10(27.03)	6	4		

2.3 miR-181d的表达与预后的关系

利用Kaplan-Meier法绘制生存曲线以及Log rank检验比较miR-181d高表达和低表达两组之间生存率的差异。结果显示：与miR-181d低表达组比较，miR-181d高表达组患者的中位OS和中位DFS均显著缩短 ($\chi^2=4.15, P=0.042; \chi^2=3.94, P=0.047$)，见图2~3。

3 讨论

miRNAs是一类进化保守、长约22个核苷酸的内源性非编码小RNA。它既可以作为癌基因，又可以作为抑癌基因，参与肿瘤的形成与演进，是肿瘤潜在的诊断和预后标志物及治疗靶点。食管癌是一种多因素作用，多基因参与，多阶段发展的复杂性疾病，其发生发展的分子机制仍未阐明。研究表明，miRNAs与ESCC的发生发展密切相关，如miR-375在ESCC中表达下调，且与远处转移和较低的总体生存率密切相关^[15]。miR-508在ESCC中表达显著上调，是ESCC患者独立的预后因素^[16]。

miR-181d是miR-181家族成员，在肿瘤发生发展中发挥重要的调控作用^[17]。miR-181d在不同的肿

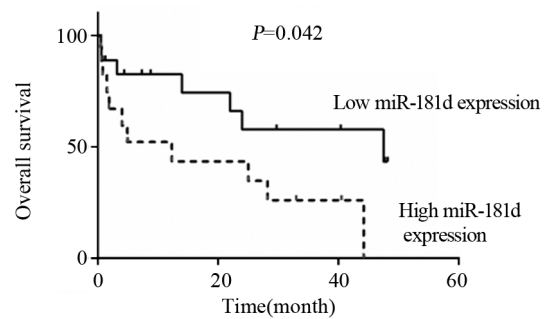


图2 miR-181d高表达和低表达ESCC患者的生存曲线
Figure2 Overall survival curves of ESCC patients with high and low miR-181d expression

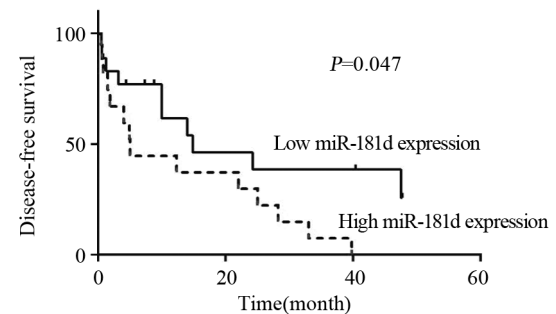


图3 miR-181d高表达和低表达ESCC患者的无病生存曲线
Figure3 Disease-free survival curves of ESCC patients with high and low miR-181d expression

瘤中表达情况不尽相同，在一些肿瘤中高表达发挥致癌作用，而在另一些肿瘤中却低表达发挥抑癌作用。这可能与肿瘤形成过程中一种miRNA可以调控多个靶基因，一个靶基因又可以被多种miRNA所调控，多条信号通路交错形成复杂的信息网络有关^[18]。Guo等^[19]发现miR-181d在结直肠癌组织中表达上调，敲低miR-181d通过影响糖酵解抑制结直肠癌细胞增殖、迁移和侵袭；miR-181d通过直接靶向CRY2和FBXL3发挥癌基因的作用。与之相反，Huang等^[8]发现181d在结直肠癌中低表达，且与患者较短的生存期相关；过表达miR-181d抑制结直肠癌细胞的生长和迁移；miR-181d通过靶向PEAK1发挥抑癌作用。Wang等^[9]发现miR-181d在胶质瘤表达下调，可能通过靶向K-ras和Bcl-2发挥抑癌基因的作用且miR-181d的抑制肿瘤活性与K-ras相关的PI3K/AKT和MAPK/ERK途径有关。Zhang等^[10]发现miR-181d在胰腺癌细胞系及组织中均高表达；下调miR-181d的表达抑制胰腺癌细胞增殖、迁移和氟尿嘧啶抗性，并且抑制裸鼠移植瘤的生长；miR-181d通过靶向调节NKAIN2抑制胰腺癌的进展。Zhang^[20]和Khalil^[21]等发现miR-181d的表达水平与胶质瘤患者总生存期呈负相关，且通过靶向MGMT发挥作用。Li等^[22]检测了16例ESCC患者癌组织及对应癌旁组织中miR-181d的表达，

显示其在ESCC组织中的表达水平均显著低于癌旁组织 ($P < 0.05$), 且在ESCC进展中, miR-181d的分子机制可能是通过对癌基因DERL1的反向调控而起作用的。以上研究表明miR-181d在肿瘤发生发展中发挥重要的作用, 且在不同肿瘤中的表达模式可能与其作用机制有关。

miR-181d在ESCC组织中的表达及临床意义报道甚少, 为了明确miR-181d在ESCC中的作用, 我们检测了miR-181d在37对ESCC组织及癌旁组织中的表达情况。结果显示miR-181d在89.2% (33/37) 癌组织中相对高表达 ($P < 0.01$); 这与Li等^[22]报道的并不一致, 分析原因可能如下: (1) 两项研究中人群分布地域不一样, 遗传背景有差异; (2) Li等检测的16对组织未显示临床病理资料, 可能和本研究中的标本临床分期和术前治疗情况不同从而导致miR-181d在ESCC中的表达存在差异; (3) Li等发现在ESCC进展中, miR-181d通过靶向DERL1发挥作用, 这可能和本研究中的作用机制不一致, 从而导致其表达模式也不一样。

我们进一步分析ESCC患者miR-181d的相对表达水平与临床病理特征之间的关系, 发现miR-181d的表达水平与性别、年龄、肿瘤浸润深度、淋巴结转移、组织学分级、肿瘤部位均无明显相关性 ($P > 0.05$), 但与TNM分期相关 ($P < 0.05$), 即TNM分期为Ⅲ期的ESCC组织中miR-181d的表达量相对于TNM分期为Ⅰ~Ⅱ期显著升高, 说明miR-181d的表达上调可能促进了ESCC的进展; miR-181d的表达与组织学分级不相关, 推测miR-181d的表达可能并不影响ESCC的分化; 本研究并未证实miR-181d的表达与浸润深度、淋巴结转移等因素之间的关系, 分析可能与样本量小及miR-181d不同表达水平的患者其临床病理因素分布不均衡有关。Kaplan-Meier生存分析结果显示, 与miR-181d低表达组相比, miR-181d高表达组患者的总生存期和无病生存期显著缩短 ($P < 0.05$)。

综上所述, miR-181d在ESCC组织中表达上调, 且其表达与肿瘤临床分期及预后相关, 这些结果表明miR-181d可能在食管癌的发展过程中起重要作用, 可能成为食管癌早期诊断和预后的生物标志物。

参考文献:

- [1] 贺宇彤, 李道娟, 梁迪, 等. 2013年中国食管癌发病和死亡估计[J]. 中华肿瘤杂志, 2017, 39(4): 315-20. [He YT, Li DJ, Liang D, et al. Estimated of esophageal cancer incidence and mortality in China, 2013[J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2017, 39(4): 315-20.]
- [2] Takeshita N, Hoshino I, Mori M, et al. Serum microRNA expression profile: miR-1246 as a novel diagnostic and prognostic biomarker for oesophageal squamous cell carcinoma[J]. Br J Cancer, 2013, 108(3): 644-52.
- [3] 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.
- [4] Shen J, Stass SA, Jiang F. MicroRNAs as potential biomarkers in human solid tumors[J]. Cancer Lett, 2013, 329(2): 125-36.
- [5] 王玉霞, 王芳, 崔华胜, 等. miR-205对胃癌细胞侵袭迁移的调控作用及其潜在机制[J]. 肿瘤防治研究, 2018, 45(5): 280-4. [Wang YX, Wang F, Cui HS, et al. Regulatory Effects of miR-205 on Invasion and Migration of Gastric Cancer Cells and Potential Mechanism[J]. Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu, 2018, 45(5): 280-4.]
- [6] 张伟, 赵学辉, 阮腊林, 等. miRNA-130b在骨肉瘤组织中的表达及其对骨肉瘤细胞增殖与凋亡的影响[J]. 肿瘤防治研究, 2017, 44(5): 334-9. [Zhang W, Zhao XH, Ruan LL, et al. Expression of miRNA-130b in osteosarcoma tissues and its impact on proliferation and apoptosis of osteosarcoma cells[J]. Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu, 2017, 44(5): 334-9.]
- [7] Song MK, Park YK, Ryu JC. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-mediated upregulation of hepatic microRNA-181 family promotes cancer cell migration by targeting MAPK phosphatase-5, regulating the activation of p38 MAPK[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 273(1): 130-9.
- [8] Huang L, Wen C, Yang X, et al. PEAK1, acting as a tumor promoter in colorectal cancer, is regulated by the EGFR/KRAS signaling axis and miR-181d[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(3): 271.
- [9] Wang XF, Shi ZM, Wang XR, et al. MiR-181d acts as a tumor suppressor in glioma by targeting K-ras and Bcl-2[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2012, 138(4): 573-84.
- [10] Zhang G, Liu D, Long G, et al. Downregulation of microRNA-181d had suppressive effect on pancreatic cancer development through inverse regulation of KNAIN2[J]. Tumour Biol, 2017, 39(4): 010428317698364.
- [11] 陈龙奇. 食管癌国际TNM分期第7版解读与评价[J]. 中华肿瘤杂志, 2010, 32(3): 237-40. [Chen LQ. Understanding and appraisal of the new TNM classification for esophageal cancer in the AJCC Cancer Staging Manual (7th edition)[J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2010, 32(3): 237-40.]
- [12] Edge S, Byrd DR, Compton CC, et al. AJCC cancer staging manual[M]. New York: Springer-verlag, 2009: 103-15.
- [13] Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, et al. World Health Organization classification of tumours of the digestive system[M]. Lyon: IARC Press, 2010: 16-24.
- [14] Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, et al. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis[J]. JAMA, 2007, 297(17): 1901-8.
- [15] Kong KL, Kwong DL, Chan TH, et al. MicroRNA-375 inhibits tumour growth and metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma through repressing insulin-like growth factor 1 receptor[J]. Gut, 2012, 61(1): 33-42.
- [16] Lin C, Liu A, Zhu J, et al. miR-508 sustains phosphoinositide signalling and promotes aggressive phenotype of oesophageal squamous cell carcinoma[J]. Nat Commun, 2014, 5: 4620.
- [17] Li R, Li X, Ning S, et al. Identification of a core miRNA-pathway regulatory network in glioma by therapeutically targeting miR-181d, miR-21, miR-23b, β -Catenin, CBP, and STAT3[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e101903.
- [18] Gyugos M, Lendvai G, Kenessey I, et al. MicroRNA expression might predict prognosis of epithelial hepatoblastoma[J]. Virchows Arch, 2014, 464(4): 419-27.
- [19] Guo X, Zhu Y, Hong X, et al. miR-181d and c-myc-mediated inhibition of CRY2 and FBXL3 reprograms metabolism in colorectal cancer[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(7): e2958.
- [20] Zhang W, Zhang J, Hoadley K, et al. miR-181d: a predictive glioblastoma biomarker that downregulates MGMT expression[J]. Neuro Oncol, 2012, 14(6): 712-9.
- [21] Khalil S, Fabbri E, Santangelo A, et al. miRNA array screening reveals cooperative MGMT-regulation between miR-181d-5p and miR-409-3p in glioblastoma[J]. Oncotarget, 2016, 7(19): 28195-206.
- [22] Li D, Shi M, Ji H, et al. MicroRNA-181d is a tumor suppressor in human esophageal squamous cell carcinoma inversely regulating Derlin-1[J]. Oncol Rep, 2016, 36(4): 2041-8.

[编辑: 黄园玲; 校对: 刘红武]