DOI:10.16016/j.1000-5404.201504138

miRNA-205 在食管鳞状细胞癌患者组织中的表达及临床意义

董树岭[1,2],尹惠卿[1],吕彦萌[3],孟伟伟[1],董翠翠[1],贺付成[1] (450052 郑州,郑州大学:第一附属医院检验科[1],河南省高等学校临床医学重点学科开放实验室[2],临床医学系[3])

[摘要] **目的** 探讨 miRNA-205 在食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma,ESCC)患者组织中的表达情况。**方法** 收集 56 例经病理确诊的 ESCC 患者的手术切除组织(癌组织及其癌旁组织),采用实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time quantitative polymerase chain reaction,qRT-PCR)检测 miRNA-205 的表达,并分析 miRNA-205 在不同临床病理资料之间的差异。**结果** ESCC 患者组织中 miRNA-205 相对表达量为 1.475(0.444~5.478),显著高于癌旁组织($Z=-3.067$,$P=0.002$);miRNA-205 在不同 TNM 分期 ESCC 患者组织中存在差异,TNM 分期越高,miRNA-205 表达量越高,差异具有统计学意义($F=36.335$,$P<0.001$);miRNA-205 在淋巴结转移阴性/阳性组织中存在差异,淋巴结转移阳性组 miRNA-205 表达量显著高于淋巴结转移阴性组($Z=-3.353$,$P=0.001$)。**结论** miRNA-205 在 ESCC 患者癌组织中表达升高,并可能参与 ESCC 的发生与发展。

[关键词] 鳞状细胞癌;食管癌;miRNA-205;聚合酶链反应
[中图法分类号] R394.2; R730.261; R735.1 [文献标志码] A

Expression and clinical significance of miRNA-205 in esophageal squamous cell carcinoma

Dong Shuling[1,2], Yin Huiqing[1], Lyu Yanmeng[3], Meng Weiwei[1], Dong Cuicui[1], He Fucheng[1] ([1]Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital, [2]Opening Laboratory of Clinical Medical Key-disciplines of Colleges and Universities of Henan Province, [3]Faculty of Clinical Medicine, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan Province, 450052, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the expression profile of miRNA-205 in the patients with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **Methods** Matched ESCC and corresponding adjacent non-cancerous tissue samples were obtained from 56 patients who were pathologically diagnosed with ESCC and surgically treated in our hospital from August to December 2014. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression levels of miRNA-205, and the results were analyzed with clinicopathological parameters. **Results** The expression level of miRNA-205 was 1.475 (0.444 ~ 5.478) in ESCC tissues, significantly higher than that in the corresponding adjacent non-cancerous tissues ($Z=-3.067$, $P=0.002$). The expression level of miRNA-205 in ESCC tissues was well correlated with TNM stages, with the higher expression level, the higher grade of the TNM stages ($F=36.335$, $P<0.001$). Its expression level was higher in the patients with metastatic lymph node than those without ($Z=-3.353$, $P=0.001$). **Conclusion** The expression level of miRNA-205 is up-regulated in ESCC, and it might be involved in the initiation and progression of ESCC.

[**Key words**] squamous cell carcinoma; esophageal cancer; microRNA-205; reverse transcriptase polymerase chain reaction

Corresponding author: He Fucheng, E-mail:hefucheng@126.com

[通信作者] 贺付成,E-mail:hefucheng@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151124.0853.013.html(2015-11-24)

食管癌分为鳞癌和腺癌两种主要病理类型,是常见肿瘤之一,致死率在所有肿瘤中排名第六[1]。目前食管癌的治疗仍以手术及放化疗等方法为主,患者总体5年生存率为15%~25%,早期食管癌患者5年生存率超过90%[2]。阐明食管癌的发病机制,寻找早期诊断和治疗方法是目前提高食管癌临床治疗效果的有效途径。

微小RNAs(microRNAs,miRNAs)是一种长度约22 nt的内源性非编码小RNAs,通过结合到靶mRNAs的3′-UTR,使mRNAs降解或抑制其转录,调节基因表达[3]。研究表明,miRNAs可以影响细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移等多种生理进程,其异常调节与许多肿瘤的发生、发展有关[4]。

2007年,Tran等[5]通过寡核苷酸阵列平台技术对9种头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma,HNSCC)细胞系中261种成熟miRNAs相对表达量进行检测,结果显示,包括miRNA-205在内的33种miRNAs表达升高。相对于其他类型的细胞,无论是正常的还是恶性的鳞状上皮细胞,miRNA-205都呈现出特异性的高表达,推测miRNA-205可能为鳞状上皮细胞所特有[6-7]。2011年,Matsushima等[8]通过微阵列分析技术和实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time quantitative polymerase chain reaction,qRT-PCR)技术证实,miRNA-205在ESCC细胞系OE21和TE10中表达量明显高于良性食管鳞状细胞系Het-1A。因此,我们推测miRNA-205在ESCC组织中也应该是表达升高的。因此,本研究旨在检测ESCC患者组织中miRNA-205的表达,并进一步分析其在不同临床病理资料之间的差异。

1 材料与方法

1.1 一般资料

收集2014年8-12月郑州大学第一附属医院胸外科56例经病理确诊的ESCC患者手术切除的新鲜食管癌组织及相应癌旁组织(距癌组织>5 cm),并立即置于-80 ℃超低温冰箱保存备用。其中男性35例,女性21例;年龄43~80(59.66±8.73)岁;高中分化26例,低分化30例;淋巴结转移阳性29例,淋巴结转移阴性27例;肿瘤位于胸上段20例,胸中段19例,胸下段17例;TNM分期Ⅰ期12例,Ⅱ期24例,Ⅲ期12例,Ⅳ期8例。肿瘤分化程度和分期参照国际抗癌联盟(union for international cancer control,UICC)第7版食管癌TNM分期标准。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂及仪器 TRI Reagent BD(美国MRC Gene公司);RT反转录试剂盒和荧光定量PCR试剂盒(日本TaKaRa公司);miRNA-205及U6引物(广州锐博生物有限公司);Nano-Drop 2000C紫外分光光度计(美国赛默飞世尔公司);7500 Fast qRT-PCR仪(美国ABI公司)。

1.2.2 组织总RNA提取 取30 mg冻存组织,于冰上磨碎,加入1 mL TRIzol匀浆,振荡15 s,静置5 min,加入200 μL氯仿,剧烈振荡15 s,静置5 min,4 ℃ 12 000×g离心15 min,吸取500 μL上层无色液相,加入500 μL异丙醇,颠倒混匀,静置15 min,4 ℃ 12 000×g离心15 min,弃上清,加入75%乙醇1 mL混匀,4 ℃ 7 500×g离心5 min,弃上清,自然干燥5 min,加入10 μL无RNA酶水溶解。然后,用Nano-Drop 2000C紫外分光光度计测定RNA浓度及纯度,并选取光密度$D(260)/D(280)$比值在1.8~2.1者进一步实验。

1.2.3 反转录及实时荧光定量PCR 按反转录试剂盒说明书将从组织中提取的RNA反转录成cDNA,反应条件:42 ℃ 15 min;85 ℃ 5 s;然后按照qRT-PCR试剂盒说明书进行操作,反应条件为:95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,40个循环。U6作为内参基因,7500 Fast System SDS软件计算Ct值,miRNA-205相对表达量用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算。所有反应设立3个复孔。

1.3 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件进行。正态计量资料以$\bar{x}\pm s$表示;非正态计量资料以中位数(四分位数)表示;配对设计定量资料的比较采用配对资料的Wilcoxon符号秩和检验;两组独立样本的比较采用Mann-Whitney U检验;多组定量资料的比较采用Kruskal-Wallis检验。检验水准:$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 miRNA-205在ESCC组织中的表达

miRNA-205在56例ESCC组织中的相对表达量为1.475(0.444~5.478),高于癌旁组织,差异有统计学意义($Z=-3.067$,$P=0.002$)。

2.2 miRNA-205在ESCC患者不同临床病理资料之间的差异

miRNA-205表达在不同TNM分期之间的差异(图1):TNM分期越高,miRNA-205表达越高,差异有统计学意义($F=36.335$,$P<0.01$);miRNA-205在淋巴结转移阳性、阴性组织之间的差异(图2):淋巴结转移阳性组miRNA-205表达明显高于淋巴结转移阴性组($Z=-3.353$,$P=0.001$)。miRNA-205表达和年龄、性别、肿瘤位置、组织分化程度无关(表1)。

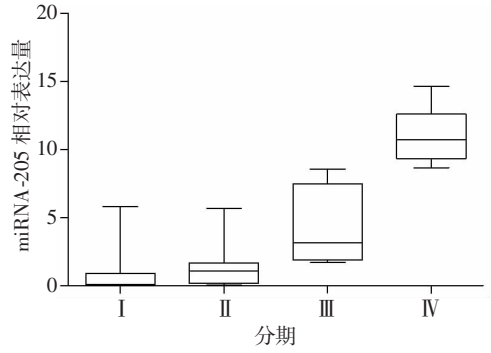
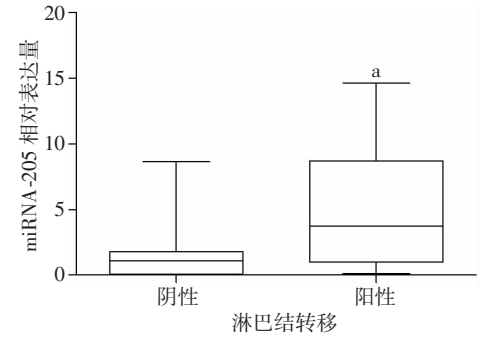


图 1 miRNA-205 在不同 TNM 分期中的表达差异



a:$P<0.05$,与淋巴结转移阴性比较

图 2 miRNA-205 在淋巴结转移阴性、阳性组织中的表达差异

表 1 miRNA-205 在 ESCC 患者不同临床病理资料之间的差异

临床病理资料	例数	miRNA-205 相对表达量	Z 值或 F 值	P 值
例数	56	1.475(0.444~5.478)	-3.067	0.002
性别			-0.770	0.441
男	35	1.831(0.580~5.798)		
女	21	1.121(0.098~2.161)		
年龄(岁)			-0.175	0.861
≤60[a]	33	1.736(0.563~5.275)		
>60	23	1.450(0.112~7.540)		
肿瘤位置			0.574	0.750
上段	20	1.757(0.495~7.105)		
中段	19	1.100(0.083~4.001)		
下段	17	1.698(0.346~6.641)		
组织分化程度			-0.756	0.450
高中分化	26	1.599(0.352~7.758)		
低分化	30	1.073(0.430~3.810)		
TNM 分期			36.335	<0.01
Ⅰ	12	0.870(0.020~0.911)		
Ⅱ	24	1.070(0.171~1.677)		
Ⅲ	12	3.150(1.876~7.494)		
Ⅳ	8	10.720(9.323~12.600)		
淋巴结转移			-3.353	0.001
阳性	29	3.746(1.004~8.712)		
阴性	27	1.100(0.063~1.778)		

a:60 岁为 56 例 ESCC 患者年龄中位数

3 讨论

研究表明,一种 miRNA 可以调节多种基因的表达,并且 30%~60% 的人类基因都受 miRNAs 的调节,miRNAs 可以参与多种细胞生物进程,包括细胞增殖、分化、凋亡、侵袭和迁移等[4]。miRNAs 在肿瘤中既可以发挥致癌作用,也可发挥抑癌作用,取决于它所作用的靶基因[9],并且相同的 miRNA 在不同肿瘤中的作用不尽相同[10-11]。

本研究通过 qRT-PCR 分析了 56 例 ESCC 组织和癌旁组织中 miRNA-205 表达情况,发现癌组织中 miRNA-205 表达显著高于癌旁组织($Z=-3.067$,$P=0.002$)。2013 年,Zhao 等[12]通过 qRT-PCR 检测处于同一 TNM 分期但不同预后的 ESCC 患者组织中 miRNA 的表达,结果显示:与预后较差的患者相比,预后较好的患者食管癌组织中 miRNA-205 表达量明显升高。2015 年,Stanitz 等[13]探讨食管癌患者组织中 miRNA 变化与患者生活方式和社会环境因素的关系,发现食管癌患者组织中 miRNA-205 表达量明显高于正常食管组织,且 miRNA-205 表达量与吸烟呈正相关,与饮酒呈负相关。本研究及以上研究表明:miRNA-205 在食管癌组织中表达升高,且与患者的预后及生活方式有关,有可能参与了食管癌的发生并影响其预后。

进一步分析 miRNA-205 在 ESCC 患者不同临床病理资料之间的差异发现,miRNA-205 在不同 TNM 分期和淋巴结转移阴性/阳性组织中存在差异,即 TNM 分期越高,miRNA-205 表达越高,差异有统计学意义($F=36.335$,$P<0.01$);淋巴结转移阳性组 miRNA-205 表达显著高于淋巴结转移阴性组($Z=-3.353$,$P=0.001$)。研究结果显示,miRNA-205 在鉴别头颈鳞癌患者是否发生颈部转移时具有较高的敏感性、特异性和准确度,推测 miRNA-205 可能参与了癌细胞的转移,可以作为判断肿瘤是否发生转移的潜在指标[14]。然而,Matsushima 等[8]通过细胞实验证实,miRNA-205 虽然对 ESCC 细胞的增殖、凋亡和分化无影响,但却可以抑制其侵袭和迁移。本研究结果显示,miRNA-205 在高 TNM 分期组及淋巴结转移阳性组织中表达升高,对 ESCC 细胞转移起促进作用,产生这种差异的原因可能是 miRNA 作用的靶基因不同。例如在关于 miRNA-205 与乳腺癌的研究中,Wu 等[15]证实 ErbB3 和 VEGFA 是 miRNA-205 的靶基因,而 Wang 等[16]证实 HER3 也可以作为 miRNA-205 的靶基因。因此,进一步确定 miRNA-205 的靶基因,才能更好地

理解其在 ESCC 转移中的作用。此外,本研究结果显示,miRNA-205 表达情况与患者的年龄、性别、肿瘤位置、组织分化程度均无关。

综上所述,miRNA-205 在 ESCC 组织中表达升高,且表达量在不同 TNM 分期及淋巴结转移阴性/阳性组织中存在差异,说明 miRNA-205 可能参与了 ESCC 的发生、发展,但由于 miRNA 和上下游基因作用的复杂性,miRNA-205 调节 ESCC 发生、发展的作用机制尚不十分明确,关于 miRNA-205 上下游调节基因的确定以及其对 ESCC 细胞功能的研究仍需大量的研究工作。另外,能否通过检测早期 ESCC 患者血浆中 miRNA-205 含量来辅助诊断 ESCC,以达到早发现、早治疗的目的,也是一个值得探索和期待的方向。

参考文献:

[1] Rustgi A K, El-Serag H B. Esophageal carcinoma[J]. N Engl J Med, 2014, 371(26): 2499 – 2509. DOI:10.1056/NEJMra1314530

[2] Pennathur A, Gibson M K, Jobe B A, *et al*. Oesophageal carcinoma[J]. Lancet, 2013, 381(9864): 400 – 412.

[3] Song J H, Meltzer S J. MicroRNAs in pathogenesis, diagnosis, and treatment of gastroesophageal cancers[J]. Gastroenterology, 2012, 143(1): 35 – 47. e2. DOI:10.1053/j.gastro.2012.05.003

[4] Nana-Sinkam S P, Croce C M. Clinical applications for microRNAs in cancer[J]. Clin Pharmacol Ther, 2013, 93(1): 98 – 104. DOI:10.1038/clpt.2012.192

[5] Tran N, McLean T, Zhang X, *et al*. MicroRNA expression profiles in head and neck cancer cell lines[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 358(1): 12 – 17. DOI:10.1016/j.bbrc.2007.03.201

[6] Kimura S, Naganuma S, Susuki D, *et al*. Expression of microRNAs in squamous cell carcinoma of human head and neck and the esophagus: miR-205 and miR-21 are specific markers for HNSCC and ESCC[J]. Oncol Rep, 2010, 23(6): 1625 – 1633.

[7] Fletcher A M, Heaford A C, Trask D K. Detection of metastatic head and neck squamous cell carcinoma using the relative expression of tissue-specific mir-205[J]. Transl Oncol, 2008, 1(4): 202 – 208.

[8] Matsushima K, Isomoto H, Yamaguchi N, *et al*. MiRNA-205 modulates cellular invasion and migration *via* regulating zinc finger E-box binding homeobox 2 expression in esophageal squamous cell carcinoma cells[J]. J Transl Med, 2011, 9: 30.

[9] Bandyopadhyay S, Mitra R, Maulik U, *et al*. Development of the human cancer microRNA network[J]. Silence, 2010, 1(1): 6.

[10] Ye Y, Wang K K, Gu J, *et al*. Genetic variations in microRNA-related genes are novel susceptibility loci for esophageal cancer risk[J]. Cancer Prev Res (Phila), 2008, 1(6): 460 – 469.

[11] 韩超,王健东. 非编码微小 RNA 在胆囊癌中的表达及功能[J]. 中华消化外科杂志, 2015, 14(10): 877 – 880. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673 – 9752.2015.10.021

[12] Zhao B S, Liu S G, Wang T Y, *et al*. Screening of microRNA in patients with esophageal cancer at same tumor node metastasis stage with different prognoses[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(1): 139 – 143.

[13] Stanitz E, Juhasz K, Gombos K, *et al*. Alteration of miRNA expression correlates with lifestyle, social and environmental determinants in esophageal carcinoma[J]. Anticancer Res, 2015, 35(2): 1091 – 1097.

[14] de-Carvalho A C, Scapulatempo-Neto C, Maia D C, *et al*. Accuracy of microRNAs as markers for the detection of neck lymph node metastases in patients with head and neck squamous cell carcinoma[J]. BMC Med, 2015, 13:108. DOI:10.1186/s12916 – 015 – 0350 – 3

[15] Wu H, Zhu S, Mo Y Y. Suppression of cell growth and invasion by miR-205 in breast cancer[J]. Cell Res, 2009, 19(4): 439 – 448. DOI:10.1038/cr.2009.18

[16] Wang Z, Liao H, Deng Z, *et al*. miRNA-205 affects infiltration and metastasis of breast cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 441(1): 139 – 143. DOI:10.1016/j.bbrc.2013.10.025

(**收稿**:2015-04-24;**修回**:2015-06-25)

(编辑 汪勤俭)