

环状 RNA *ciRS-7*、*circ_0058514* 和 *circ-Foxo3* 在食管鳞癌患者癌组织与血清中的表达及意义

马卫国^{1,2}, 高云^{1,2}, 王伟¹, 张俊华^{1,2}, 贾丽娜^{1,2}, 姚晓宾^{1,2}, 许青霞^{1,2}

(1. 河南省肿瘤医院/郑州大学附属肿瘤医院, 河南 郑州 450008; 2. 郑州市消化系统肿瘤标志物重点实验室, 河南 郑州 450008)

摘要: [目的] 探讨环状 RNA *ciRS-7*、*circ_0058514* 和 *circ-Foxo3* 在食管鳞癌患者癌组织与血清中的表达及意义。[方法] 选择 2015 年 1 月—2017 年 6 月在河南省肿瘤医院接受食管鳞癌手术治疗的 97 例食管鳞癌患者, 以同期于本院健康体检的 97 名健康者为对照组。分析所有患者的一般资料, 包括肿瘤位置、直径、分化程度、TNM 分期、有无淋巴结转移等; 采用荧光定量 PCR 测定癌组织、癌旁组织和术前术后血清中环状 RNA *ciRS-7*、*circ_0058514* 和 *circ-Foxo3* 表达水平。统计分析不同组间 *ciRS-7*、*circ_0058514* 和 *circ-Foxo3* 表达差异与食管鳞癌患者临床特征的关系。术后随访患者并计算其 1 年、2 年和 3 年生存率, 单因素生存分析 *ciRS-7*、*circ_0058514* 和 *circ-Foxo3* 表达与生存率之间的关系, Cox 回归分析影响患者生存时间的危险因素, Pearson 相关性分析癌组织和血清中 *ciRS-7*、*circ_0058514* 和 *circ-Foxo3* 水平间的关系。[结果] 食管鳞癌癌组织中 *ciRS-7* 和 *circ_0058514* 表达水平明显高于癌旁组织, *circ-Foxo3* 表达水平明显低于癌旁组织 ($P<0.05$), 且其水平变化与患者 TNM 分期和淋巴结转移有关 ($P<0.05$); 癌组织中 *ciRS-7* 高表达患者 1 年无病生存率, 2 年、3 年总生存率和无病生存率均低于 *ciRS-7* 低表达患者 ($P<0.05$), *circ_0058514* 高表达患者 1 年无病生存率低于 *circ_0058514* 低表达患者 ($P<0.05$), *circ-Foxo3* 高表达患者 2 年和 3 年总生存率和无病生存率均高于 *circ-Foxo3* 低表达患者 ($P<0.05$); TNM 分期为 III 期 ($OR=0.516, P=0.040$)、合并淋巴结转移 ($OR=0.485, P=0.019$)、*ciRS-7* 高表达 ($OR=0.523, P=0.037$)、*circ-Foxo3* 低表达 ($OR=1.929, P=0.030$) 为影响食管鳞癌患者 3 年无病生存率的独立危险因素; 食管鳞癌患者血清 *ciRS-7* 和 *circ_0058514* 水平明显高于对照组, *circ-Foxo3* 水平明显低于对照组 ($t=14.680, 14.659, 15.202, P<0.05$), 且术后血清 *ciRS-7* 和 *circ_0058514* 水平明显低于术前, *circ-Foxo3* 水平明显高于术前 ($t=7.998, 5.103, 8.372, P<0.05$); 术前癌组织和血清中 *ciRS-7*、*circ_0058514* 和 *circ-Foxo3* 水平具有一致性 ($r=0.776, 0.722, 0.789, P<0.05$), 且 *ciRS-7* 和 *circ-Foxo3* 呈显著负相关关系 ($r=-0.422, -0.338, P<0.05$)。[结论] 食管鳞癌癌组织和血清中 *ciRS-7* 和 *circ_0058514* 表达水平明显升高, *circ-Foxo3* 表达水平明显降低, 且其水平变化与患者的生存有关。

关键词: 食管鳞癌; 环状 RNA; *ciRS-7*; *circ_0058514*; *circ-Foxo3*

中图分类号: R735.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2021)05-0393-08

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2021.05.A012

Expression and Significance of Cyclic RNA *CiRS-7*, *Circ_0058514* and *Circ-Foxo3* in Serum and Cancer Tissues of Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma

MA Wei-guo^{1,2}, GAO Yun^{1,2}, WANG Wei¹, ZHANG Jun-hua^{1,2}, JIA Li-na^{1,2}, YAO Xiao-bin^{1,2}, XU Qing-xia^{1,2}

(1. Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450008, China; 2. Zhengzhou Key Laboratory of Digestive Tumor Markers, Zhengzhou 450008, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression and significance of cyclic RNA *ciRS-7*, *circ_0058514* and *circ-Foxo3* in serum and cancer tissues of patients with esophageal squamous cell carcinoma. [Methods] Ninety-seven patients with esophageal squamous cell carcinoma who underwent surgical treatment in Henan Cancer Hospital from January 2015 to June 2017 and 97 healthy subjects (control group) were enrolled in the study. The expression of *ciRS-7*, *circ_0058514*, *circ-Foxo3* in cancer tissues, para-cancerous tissues and serum before and after surgery were detected by fluorescent quantitative RT-PCR. The patients were followed up after treatment and 1-year, 2-year and 3-year survival rates were calculated. The relationship of *ciRS-7*, *circ_0058514*, *circ-Foxo3* expression with the clinicopathological features and the survival of patients were analyzed. The risk factors affecting the survival time of patients were analyzed by Cox analysis. The relationship between *ciRS-7*, *circ_0058514* and *circ-Foxo3* levels in cancer tissues and serum were analyzed by Pearson correlation analysis. [Results] The expression levels of *ciRS-7* and *circ_0058514* in cancer tissues were significantly higher than those in para-cancerous tissues, while the levels of *circ-Foxo3* were significantly lower than that in para-cancerous tissues ($P<0.05$). Moreover, their expression levels were related to TNM staging and lymph node metastasis ($P<0.05$). The 1-year disease-free survival (DFS) rate, 2-year and 3-year overall survival (OS) rates and DFS rates in patients with high-expression *ciRS-7* were lower than those

收稿日期: 2020-11-18; 修回日期: 2021-01-09

通信作者: 许青霞, E-mail: hnxqx12@163.com

with low-expression *ciRS-7* ($P<0.05$). The 1-year DFS rate in patients with high-expression *circ_0058514* was lower than those with low-expression *circ_0058514* ($P<0.05$). The 2-year and 3-year OS rates and DFS rates in patients with high-expression *circ-Foxo3* were higher than those with low-expression *circ-Foxo3* ($P<0.05$). TNM stage III (OR=0.516, $P=0.040$), lymph node metastasis (OR=0.485, $P=0.019$), *ciRS-7* high expression (OR=0.523, $P=0.037$) and *circ-Foxo3* low expression (OR=1.929, $P=0.030$) were independent risk factors for 3-year DFS of patients. The levels of serum *ciRS-7* and *circ_0058514* in patients were significantly higher than those in control group, while the level of *circ-Foxo3* was significantly lower than that in control group ($t=14.680, 14.659, 15.202, P<0.05$). The levels of serum *ciRS-7* and *circ_0058514* after surgery were significantly lower than those before surgery, while the level of *circ-Foxo3* after surgery was significantly higher than that before surgery ($t=7.998, 5.103, 8.372, P<0.05$). The levels of *ciRS-7*, *circ_0058514* and *circ-Foxo3* in cancer tissues and serum before surgery were correlated with each other ($r=0.776, 0.722, 0.789, P<0.05$). There was significant negative correlation between *ciRS-7* and *circ-Foxo3* ($r=-0.422, -0.338, P<0.05$). [Conclusion] The expression levels of *ciRS-7* and *circ_0058514* are significantly increased in serum and cancer tissues, while the expression level of *circ-Foxo3* is significantly decreased in patients with esophageal squamous cell carcinoma, which are correlated with the survival of patients.

Key words: esophageal squamous cell carcinoma; cyclic RNA; *ciRS-7*; *circ_0058514*; *circ-Foxo3*

食管鳞癌是一种常见的消化道恶性肿瘤,早期症状通常不明显,易出现漏诊,延误病情,随病情进展可表现为进行性吞咽困难,死亡率高^[1]。目前,食管鳞癌发生发展的机制尚不明确,临床主要采用以手术联合放化疗的综合治疗手段,但治疗效果并不十分理想^[2-3]。分析食管鳞癌发生发展的机制,寻找特异的分子标志物,指导临床早期诊断和治疗受到了研究者的广泛关注。环状RNA(circular RNA, circRNA)是一类不含5'和3'末端的结构稳定的非编码RNA,可以发挥小分子RNA(miRNA)海绵作用,调节对应miRNA的功能,参与多种癌症的发生发展^[4-5]。*ciRS-7*是目前研究相对较多的一种circRNA,可抑制miR-7的功能,在食管鳞癌的进展中发挥重要作用^[6]。*Circ_0058514*和*circ-Foxo3*均是近年发现的circRNA,在乳腺癌、食管鳞癌等多种恶性肿瘤的进展中发挥重要作用^[7-8]。但*ciRS-7*、*circ_0058514*和*circ-Foxo3*在食管鳞癌中的作用研究报道较少,且其表达变化与食管鳞癌预后之间的关系尚不清楚,其相互作用的机制尚不明确。因此,本研究检测了食管鳞癌患者癌组织与血清中*ciRS-7*、*circ_0058514*和*circ-Foxo3*表达,并进一步分析了其表达水平与患者临床特征和预后之间的关系,以期指导临床诊治。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择2015年1月到2017年6月在河南省肿瘤医院接受食管鳞癌手术治疗的97例食管鳞癌患者,年龄40~76岁,平均(57.02±9.01)岁,男性58例,女性39例。纳入标准:经影像学 and 病理学活检确诊为食管鳞癌并适合手术治疗者;术前均未接受过放化疗;均获得患者及其家属同意,经医院伦理委员会审核通过(批准号:2014ys38)。排除标准:合并急性严重感染者;合并明显肝肾功能不全者;肿瘤转移其它组织器官者;合并其他系统恶性肿瘤者。根据国际抗癌联盟食管癌TNM分期^[9]:I期18例,II期50例,III期29例;根据组织学病理分级:高分化22例,中分化45例,低分化30例;经术后确诊肿瘤直径<4cm 55例,直径≥4cm 42例;均为食管鳞状细胞癌,合并淋巴结转移46例,无淋巴结转移51例。以同期于本院健康体检的97名健康者为对照组,年龄40~75岁,平均(57.33±8.46)岁,男性56例,女性41例。两组之间的年龄、性别的构成比差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 治疗方案

根据患者TNM分期制定相应的手术治疗方案^[10],

I a、I b 期病灶直径 $\leq 2\text{cm}$ 患者行内镜下黏膜切除术和系统性淋巴结清扫术, II 和 III 期患者行食管鳞癌根治性切除术和系统性淋巴结清扫术, 术后辅助放化疗。术中取食管鳞癌患者癌组织和癌旁组织(距离癌组织边缘 $>5\text{cm}$), 暂存于 -80°C 冰箱中备用。

1.3 反转录酶—聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测 *ciRS-7*、*circ_0058514* 和 *circ-Foxo3* 表达

分别于术前和术后 2 周, 采用不抗凝试管采集患者和对照组空腹静脉血液 3~5ml, 3500r/min 离心 10min, 取血清, 暂存于 -20°C 冰箱备用。取患者血清样本、食管鳞癌癌组织及癌旁组织, 采用 Trizol 法提取血清和组织样本总 RNA, 总 RNA 经反转录合成 cDNA, 进行定量 PCR 反应, *ciRS-7*(上游引物: 5'-ACGCTCTCCAGTGTGCTGA-3', 下游: 5'-CTTGA-CACAGGTGCCATC-3')、*circ_0058514*(上游引物: 5'-CCAGTTGTAGTTCGTTCTCAAG-3', 下游: 5'-GGATTT-AATCCTCGCCTGCATG-3')和 *circ-Foxo3*(上游引物: 5'-GTGGGGAACCTTCACTGCTGCTAAG-3', 下游: 5'-GGGTTGATGATCCACCAAGAGCTCTT-3')以 *GAPDH* 作为内参, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析 *ciRS-7*、*circ_0058514* 和 *circ-Foxo3* 的相对表达量。

1.4 随访

患者自病理确诊之日起开始门诊复查或电话随访, 治疗后 1 年内每 3 个月门诊复查 1 次, 2 年内每半年复查 1 次, 以后至少每年复查一次, 随访截至 2020 年 7 月, 共计随访 36 个月。随访记录患者复发情况、生存时间及随访时状态(存活、死亡或其他)等。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件对所得数据进行分析, 满足正态性的计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用两样本独立 *t* 检验分析比较组间差异, 单因素方差分析比较三组间差异, 配对 *t* 检验比较组内术前和术后差异。采用 GraphPad prism 5.0 软件进行生存分析, Kaplan-Meier 绘制生存曲线, 比较采用 Log-rank 检验。采用 Cox 风险比例回归分析影响食管鳞癌患者预后的危险因素。Pearson 相关性分析癌组织和血清中 *ciRS-7*、*circ_0058514* 和 *circ-Foxo3* 表达之间的关

系, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 食管鳞癌患者癌组织中 *ciRS-7*、*circ_0058514* 和 *circ-Foxo3* 表达水平

食管鳞癌癌组织中 *ciRS-7* 和 *circ_0058514* 表达水平明显高于癌旁组织, *circ-Foxo3* 表达水平明显低于癌旁组织($P < 0.05$)(Table 1)。

Table 1 The expression levels of *ciRS-7*, *circ_0058514* and *circ-Foxo3* in esophageal squamous cell carcinoma tissues

Groups	N	<i>ciRS-7</i> / <i>GAPDH</i>	<i>circ_0058514</i> / <i>GAPDH</i>	<i>circ-Foxo3</i> / <i>GAPDH</i>
Cancer tissues	97	2.85 $\pm$ 0.72	2.13 $\pm$ 0.67	0.66 $\pm$ 0.21
Para-cancerous tissues	97	1.34 $\pm$ 0.37	1.06 $\pm$ 0.31	1.54 $\pm$ 0.43
<i>t</i>		18.371	14.275	18.111
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 癌组织中 *ciRS-7*、*circ_0058514* 和 *circ-Foxo3* 表达与食管鳞癌患者临床特征的关系

癌组织中 *ciRS-7*、*circ_0058514* 和 *circ-Foxo3* 表达与患者年龄、性别、肿瘤直径、肿瘤位置和肿瘤分化程度无关($P > 0.05$), 与 TNM 分期和淋巴结转移有关($P < 0.05$)(Table 2)。

2.3 癌组织中 *ciRS-7*、*circ_0058514* 和 *circ-Foxo3* 表达与食管鳞癌患者预后关系

97 例符合条件的患者, 其中 92 例患者坚持随访 1 年, 90 例患者坚持随访 2 年, 78 例患者坚持随访 3 年。根据癌组织中 *ciRS-7*、*circ_0058514* 和 *circ-Foxo3* 的相对表达水平, 采用中位数法分成高表达($>$ 中位数)和低表达($\leq$ 中位数)组。癌组织中 *ciRS-7* 高表达患者 2 年、3 年总生存率和 1 年、2 年、3 年无病生存率均低于 *ciRS-7* 低表达患者 (P 均 <0.05)(Figure 1A、B); 癌组织中 *circ_0058514* 高表达患者 1 年无病生存率低于 *circ_0058514* 低表达患者 ($P < 0.05$)(Figure 1C、D); 癌组织中 *circ-Foxo3* 高表达患者 2 年和 3 年总生存率和无病生存率均高于 *circ-Foxo3* 低表达患者(P 均 <0.05)(Figure 1E、F; Table 3)。

2.4 Cox 回归分析影响食管鳞癌患者无病生存率的危险因素

对食管鳞癌患者癌组织和血清中 *ciRS-7*、*circ_0058514*、*circ-Foxo3* 表达进行变量赋值并采用单因素分析, 年龄 <60 岁=0, ≥ 60 岁=1; 男性=0, 女

Table 2 The relationship of *ciRS-7*, *circ_0058514*, *circ-Foxo3* and their clinical characteristics of patients with esophageal squamous cell carcinoma

Groups	Cases	<i>ciRS-7</i> / <i>GAPDH</i>	t/F	P	<i>circ_0058514</i> / <i>GAPDH</i>	t/F	P	<i>circ-Foxo3</i> / <i>GAPDH</i>	t/F	P
Age (years)										
<60	59	2.81±0.64	0.983	0.328	2.09±0.33	0.884	0.379	0.68±0.18	0.836	0.405
≥60	38	2.94±0.63			2.15±0.32			0.65±0.16		
Gender										
Male	58	2.88±0.69	0.211	0.833	2.13±0.65	0.226	0.822	0.67±0.20	0.502	0.617
Female	39	2.85±0.68			2.10±0.63			0.65±0.18		
Tumor diameter (cm)										
<4	55	2.80±0.62	1.197	0.234	2.06±0.58	1.119	0.266	0.69±0.16	1.687	0.095
≥4	42	2.95±0.60			2.19±0.55			0.63±0.19		
Tumor location										
Locus superior	12	2.92±0.60	0.072	0.931	2.15±0.58	0.035	0.965	0.63±0.20	0.434	0.649
Locus medialis	53	2.87±0.63			2.12±0.56			0.65±0.17		
Locus inferior	32	2.84±0.65			2.10±0.58			0.68±0.19		
Tumor differentiation										
High level	22	2.72±0.57	1.762	0.177	1.97±0.47	1.493	0.230	0.72±0.16	2.909	0.059
Middle level	45	2.84±0.61			2.11±0.52			0.67±0.17		
Low level	30	3.02±0.56			2.22±0.54			0.61±0.16		
TNM stage										
I	18	2.47±0.47	9.725	0.001*	1.81±0.41	7.365	0.001*	0.77±0.16	10.334	<0.001*
II	50	2.83±0.60			2.08±0.52			0.68±0.17		
III	29	3.20±0.54			2.37±0.50			0.56±0.14		
Lymphatic metastasis										
Yes	46	3.16±0.65	4.720	<0.001*	2.31±0.62	3.283	0.001*	0.59±0.17	4.352	<0.001*
No	51	2.58±0.56			1.92±0.55			0.75±0.19		

Note: *: with statistically significant difference

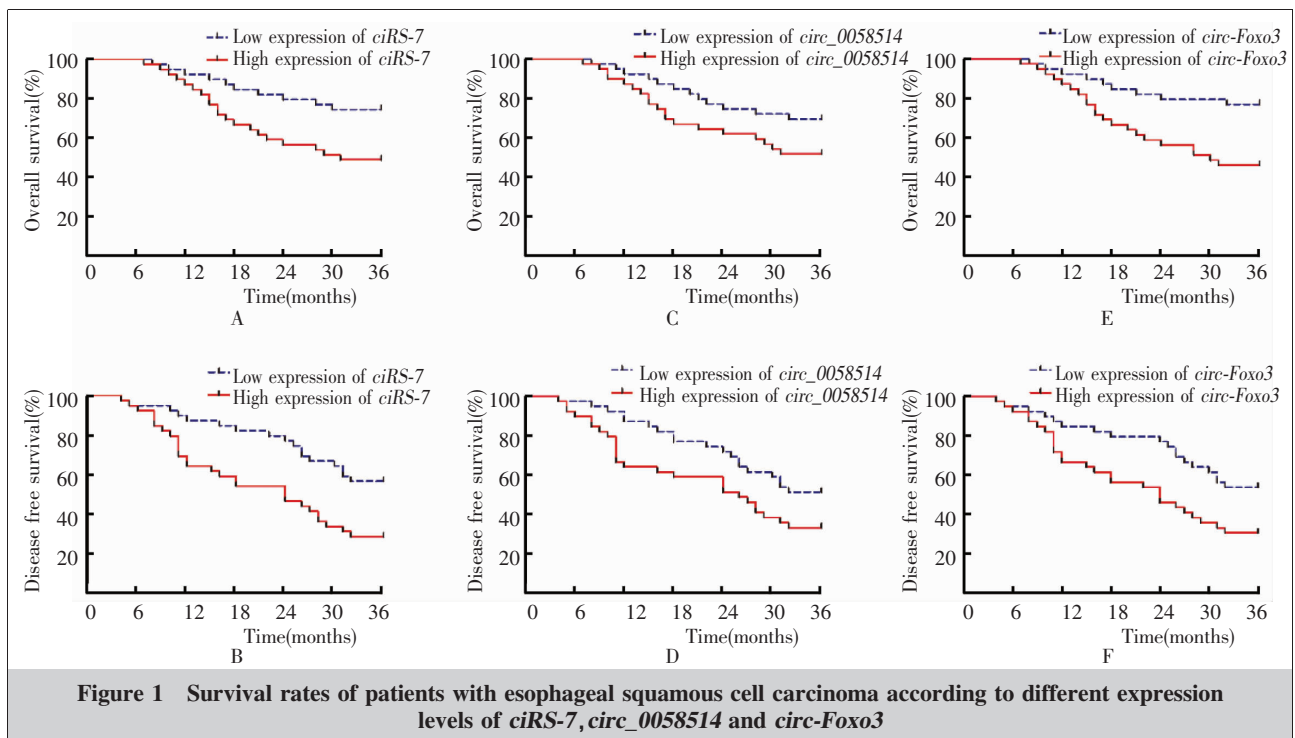


Table 3 Survival rate of patients with esophageal squamous cell carcinoma according to different expression levels of *ciRS-7*, *circ_0058514* and *circ-Foxo3*(%)

Survival rate	N	<i>ciRS-7</i>				<i>circ_0058514</i>				<i>circ-Foxo3</i>			
		Low	High	χ^2	P	Low	High	χ^2	P	Low	High	χ^2	P
Overall survival rate													
1-year	92	95.65	91.30	0.700	0.403	95.65	91.30	0.716	0.398	89.13	97.83	2.769	0.096
2-year	90	84.44	64.44	4.643	0.031*	80.00	68.88	1.663	0.197	64.44	84.44	4.807	0.028*
3-year	78	74.36	48.72	5.531	0.019*	69.23	51.28	2.817	0.093	46.15	76.92	7.587	0.006*
Disease-free survival rate													
1-year	92	86.96	67.39	4.929	0.026*	89.13	65.22	7.236	0.007*	71.11	84.78	2.364	0.124
2-year	90	73.33	48.89	6.203	0.013*	68.89	53.33	3.202	0.074	48.89	73.33	5.542	0.019*
3-year	78	56.41	28.21	7.795	0.005*	51.28	33.33	3.529	0.060	30.77	53.84	5.416	0.020*

Note:*, with statistically significant difference

性=1;肿瘤直径<4 cm=0, ≥4 cm=1;肿瘤位置上段=0,中段=1,下段=2;低分化=0,中分化=1,高分化=2;TNM 分期 I 期=0, II 期=1; III 期=2;无淋巴结转移=0,有淋巴结转移=1;*ciRS-7* 低表达=0,*ciRS-7* 高表达=1;*circ_0058514* 低表达=0,*circ_0058514* 高表达=1;*circ-Foxo3* 低表达=0,*circ-Foxo3* 高表达=1。Cox 比例风险回归显示:TNM 分期为 III 期、合并淋巴结转移、*ciRS-7* 高表达、*circ-Foxo3* 低表达为影响食管鳞癌患者 3 年无病生存率的危险因素(Table 4)。

2.5 食管鳞癌患者血清中 *ciRS-7*、*circ_0058514* 和 *circ-Foxo3* 表达水平

食管鳞癌患者血清 *ciRS-7* 和 *circ_0058514* 水平明显高于对照组,*circ-Foxo3* 水平明显低于对照组($P<0.05$)(Table 5)。

2.6 食管鳞癌患者术前术后血清中 *ciRS-7*、*circ_0058514* 和 *circ-Foxo3* 表达水平变化

食管鳞癌患者术后血清 *ciRS-7* 和 *circ_0058514* 表达水平明显低于术前,*circ-Foxo3* 表达水平明显高于术前 ($P<0.05$)(Table 6)。

2.7 癌组织和血清中 *ciRS-7*、*circ_0058514* 和 *circ-Foxo3* 表达水平的相关性

食管鳞癌患者术前癌组织和血清中 *ciRS-7*、*circ_0058514*、*circ-Foxo3* 表达水平具有一致性($r=0.776, r=0.722, r=0.789, P<0.05$)(Table 7);术前癌组织和血清中 *ciRS-7* 和 *circ-Foxo3* 呈显著负相关关系($r=-0.422, r=-0.338, P<0.05$)(Table 8)。

Table 4 Cox regression analysis of the risk factors affecting the disease-free survival of patients with esophageal squamous cell carcinoma

Clinical characteristics	β	SE	Wald χ^2	Exp(B)	95%CI	P
Age	-0.462	0.394	1.375	0.630	0.291~1.364	0.242
Gender	0.078	0.428	0.033	1.081	0.467~2.501	0.855
Tumor diameter	-0.512	0.387	1.750	0.599	0.281~1.280	0.187
Tumor location	0.365	0.419	0.759	1.441	0.634~3.275	0.384
Tumor differentiation	0.584	0.352	2.753	1.793	0.899~3.575	0.098
TNM stage	-0.662	0.321	4.253	0.516	0.275~0.968	0.040*
Lymphatic metastasis	-0.723	0.306	5.583	0.485	0.266~0.884	0.019*
<i>ciRS-7</i>	-0.648	0.310	4.369	0.523	0.285~0.960	0.037*
<i>Circ_0058514</i>	-0.592	0.314	3.555	0.553	0.299~1.024	0.060
<i>Circ-Foxo3</i>	0.657	0.301	4.764	1.929	1.069~3.480	0.030*

Note:*, with statistically significant difference

Table 5 The expression of *ciRS-7*, *circ_0058514* and *circ-Foxo3* in serum of esophageal squamous cell carcinoma patients and controls

Groups	N	<i>ciRS-7</i> / GAPDH	<i>circ_0058514</i> / GAPDH	<i>circ-Foxo3</i> / GAPDH
Esophageal squamous cell carcinoma group	97	0.90±0.25	0.77±0.21	0.36±0.12
Control group	97	0.48±0.13	0.41±0.12	0.72±0.20
t		14.680	14.659	15.202
P		<0.001	<0.001	<0.001

Table 6 Comparison of *ciRS-7*, *circ_0058514* and *circ-Foxo3* expressions in serum before and after operation

Groups	N	<i>ciRS-7</i> /GAPDH	<i>circ_0058514</i> /GAPDH	<i>circ-Foxo3</i> /GAPDH
Pre-operation	97	0.90±0.25	0.77±0.21	0.36±0.12
Post-operation	97	0.63±0.20	0.62±0.17	0.53±0.16
t		7.998	5.103	8.372
P		<0.001	<0.001	<0.001

Note: Paired t test

3 讨论

食管鳞癌是由多种发病因素共同作用导致的一种常见消化道癌症,其发病机制尚不明确,临床

Table 7 Consistency of *ciRS-7*, *circ_0058514* and *circ-Foxo3* expression in cancer tissues and serum

Index	Serum <i>ciRS-7</i>		Serum <i>circ_0058514</i>		Serum <i>circ-Foxo3</i>	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
Cancer tissues <i>ciRS-7</i>	0.776	<0.001	—	—	—	—
Cancer tissues <i>circ_0058514</i>	—	—	0.722	<0.001	—	—
Cancer tissues <i>circ-Foxo3</i>	—	—	—	—	0.789	<0.001

Table 8 Correlation of *ciRS-7*, *circ_0058514* and *circ-Foxo3* expressions in cancer tissues and serum

Index	Cancer tissues		Serum	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
<i>ciRS-7</i> vs <i>circ_0058514</i>	0.196	0.051	0.150	0.137
<i>ciRS-7</i> vs <i>circ-Foxo3</i>	-0.422	<0.001	-0.338	0.001
<i>circ_0058514</i> vs <i>circ-Foxo3</i>	-0.182	0.070	-0.143	0.157

上尚无有效的治疗药物和方法。分析食管鳞癌发生发展的机制,寻找关键的调控因子,对于指导临床诊治工作的进行具有重要的临床意义。CircRNA 是一类广泛存在于真核生物细胞中的非编码 RNA,内含多个蛋白和 miRNA 结合位点,在肿瘤的发生发展中发挥重要作用^[11]。本研究中,食管鳞癌癌组织中 *ciRS-7* 和 *circ_0058514* 表达水平明显高于癌旁组织, *circ-Foxo3* 表达水平明显低于癌旁组织。*CiRS-7* 是一种特殊的 circRNA, 包含多个 miR-7 的结合位点,可作为 miR-7 海绵,阻断 miR-7 的生物活性,导致 miR-7 靶基因表达异常^[12]。MiR-7 是多种癌症中的癌症抑制剂,可以抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移,发挥抑癌作用^[13-14]。Su 等^[15]的研究显示, *ciRS-7* 可以靶向 miR-7,调节炎症信号通路 NF- κ B 的表达,促进非小细胞肺癌的进展。本文提示食管鳞癌的发生与 *ciRS-7* 表达异常升高有关。*Circ_0058514* 是 Arf-GAP 域与 FG 重复域含蛋白 1(Arf-GAP with FG repeats 1, *AGFG1*) 基因的第 2 到第 5 个外显子经剪接后形成的 circRNA, 其表达下调可以诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡,提示 *circ_0058514* 表达上调可能通过促进食管鳞癌细胞的恶性生物学行为,推进食管鳞癌的恶性进展。*Circ-Foxo3* 是由叉形头转录因子 O 亚型 3 (fork-head transcription factor O subtype 3, *Foxo3*) 编码的环状 RNA,可以促进 *Foxo3* 的表达,调控肿瘤细胞的多个信号通路,抑制肿瘤发生和血管生成^[17-18],提示 *circ-Foxo3* 表达下调可能通过下调 *Foxo3* 表达,促进食管鳞癌的发生发展。

本研究中,癌组织中 *ciRS-7*、*circ_0058514*、*circ-*

Foxo3 表达水平与患者 TNM 分期和淋巴结转移有关。TNM 分期和淋巴结转移是临床常用的指导食管鳞癌患者治疗和预后评估的重要指标^[19],提示癌组织中 *ciRS-7*、*circ_0058514*、*circ-Foxo3* 表达水平与食管鳞癌患者的病情进展有关。本研究采用生存分析,发现 *ciRS-7* 低表达患者的 1 年、2 年和 3 年无病生存率和 2 年、3 年总生存率显著升高, *circ-Foxo3* 高表达患者的 2 年和 3 年总生存率显著升高,而 *circ_0058514* 表达仅与患者的 1 年无病生存率有关。分析本研究结果变化原因,可能是由于 *ciRS-7*、*circ_0058514*、*circ-Foxo3* 参与食管鳞癌进展的不同阶段, *ciRS-7* 可能参与食管鳞癌进展的各个时期, *circ-Foxo3* 可能主要参与食管鳞癌进展的早中期, *circ_0058514* 可能主要参与食管鳞癌进展的晚期,但其具体的作用机制有待于进一步分析。*CiRS-7* 可以发挥 miRNA 海绵作用,阻断 miR-7 的活性,进而影响 miR-7 介导的 PTEN/PI3K/AKT 信号通路的表达,促进肿瘤细胞的恶性生物学行为,推进肿瘤的恶性进展^[20]。研究显示, *ciRS-7* 还可以调节 miR-1299、miR-135a-5p 等多种 miRNA 的功能,调节靶基因表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, *EGFR*)、瞬时受体电位通道 1(transient receptor potential canonical 1, *TRPC1*)等的表达,调节食管鳞癌、胃癌等细胞的转移^[21-22],提示 *ciRS-7* 可能通过发挥 miRNA 海绵作用,调节食管鳞癌细胞的生物学行为,影响食管鳞癌的临床病理特征,推进食管鳞癌的恶性进展。Xing 等^[23]的研究显示,不仅可以调节 *Foxo3* 的表达,发挥抑癌作用,也可以发挥 miRNA 海绵作用,影响 miR-23a 调控的抑癌基因 *PTEN* 的表达,抑制食管鳞癌的进展,提示 *ciRS-7* 和 *circ-Foxo3* 与食管鳞癌患者的预后显著相关,有望成为食管鳞癌治疗的分子生物学标志物。

本研究中,食管鳞癌患者血清 *ciRS-7*、*circ_0058514* 表达水平明显高于对照组, *circ-Foxo3* 表达水平明显低于对照组,且术后血清中 *ciRS-7*、*circ_0058514* 表达水平明显降低, *circ-Foxo3* 表达水平明显升高,进一步证实 *ciRS-7*、*circ_0058514*、*circ-Foxo3* 参与食管鳞癌的发生发展,可用于食管鳞癌

患者的预后评估。本研究中,食管鳞癌患者癌组织和血清中 *ciRS-7*、*circ_0058514*、*circ-Foxo3* 表达水平具有一致性,提示临床可根据血清中 *ciRS-7*、*circ_0058514*、*circ-Foxo3* 表达水平,评估食管鳞癌患者的病情进展和预后。本研究中,术前癌组织和血清中 *ciRS-7* 和 *circ-Foxo3* 呈显著负相关关系,与 *circ_0058514* 无明显相关性。分析本研究结果变化原因,可能是由于 *ciRS-7*、*circ_0058514*、*circ-Foxo3* 参与食管鳞癌进展的不同阶段。已有研究显示, *ciRS-7* 和 *circ-Foxo3* 均可以调控核因子 κ B(nuclear factor, NF- κ B)等信号通路的表达,调控肿瘤细胞的恶性生物学行为^[24-25],提示 *ciRS-7* 和 *circ-Foxo3* 可能通过相互作用共同调控食管鳞癌的发生发展,但其具体的作用机制尚不明确,有待于进一步深入研究探索。

本研究不足之处在于样本量较少,且本研究仅初步探讨了 *ciRS-7*、*circ_0058514* 和 *circ-Foxo3* 在食管鳞癌中的表达变化,其具体的作用机制尚不明确,有待于进一步扩大样本量深入研究。

综上所述,术前食管鳞癌癌组织和血清中 *ciRS-7* 和 *circ_0058514* 表达水平明显升高, *circ-Foxo3* 表达水平明显降低,且其水平变化与患者 TNM 分期和淋巴结转移有关, *ciRS-7* 低表达、*circ-Foxo3* 高表达患者的生存率明显升高,有望作为食管鳞癌分子治疗的新靶点。

参考文献:

- [1] Rice TW, Gress DM, Patil DT, et al. Cancer of the esophagus and esophagogastric junction-major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual [J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(4): 304-317.
- [2] Watanabe M, Otake R, Kozuki R, et al. Recent progress in multidisciplinary treatment for patients with esophageal cancer[J]. Surg Today, 2020, 50(1): 12-20.
- [3] 许挺辉, 岑浩锋, 申文明, 等. 胸腹腔镜联合食管癌根治术中管状胃两种上提途径分析[J]. 肿瘤学杂志, 2019, 25(4): 104-107.
Xu TH, Cen HF, Shen WM, et al. An analysis of two ways of ascending the tubular stomach in thoracoscopic and laparoscopic combined radical resection of esophageal squamous cell carcinoma[J]. Journal of Chinese Oncology, 2019, 25(4): 104-107.
- [4] Zhang Q, Zhang C, Ma JX, et al. Circular RNA PIP5K1A promotes colon cancer development through inhibiting miR-1273a[J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(35): 5300-5309.
- [5] Zhao ZJ, Shen J. Circular RNA participates in the carcinogenesis and the malignant behavior of cancer[J]. RNA Biol, 2017, 14(5): 514-521.
- [6] Huang H, Wei L, Qin T, et al. Circular RNA ciRS-7 triggers the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma via miR-7/KLF4 and NF- κ B signals [J]. Cancer Biol Ther, 2019, 20(1): 73-80.
- [7] Lu WY. Roles of the circular RNA circ-Foxo3 in breast cancer progression[J]. Cell Cycle, 2017, 16(7): 589-590.
- [8] Du WW, Fang L, Yang W, et al. Induction of tumor apoptosis through a circular RNA enhancing Foxo3 activity[J]. Cell Death Differ, 2017, 24(2): 357-370.
- [9] Talsma K, Hagen PV, Grotenhuis BA, et al. Comparison of the 6th and 7th Editions of the UICC-AJCC TNM Classification for Esophageal Cancer [J]. Ann Surg Oncol, 2012, 19(7): 2142-2148.
- [10] Allum WH, Bonavina L, Cassivi SD, et al. Surgical treatments for esophageal cancers[J]. Ann New York Acad Sci, 2015, 1325(1): 242-268.
- [11] 陈杰. 环状 RNA 与肿瘤: 生物标志物和主要调节因子 [J]. 肿瘤学杂志, 2020, 26(3): 234-239.
Chen J. Circular RNA and cancer: biomarkers and master regulators [J]. Journal of Chinese Oncology, 2020, 26(3): 234-239.
- [12] Liu L, Liu FB, Huang M, et al. Circular RNA ciRS-7 promotes the proliferation and metastasis of pancreatic cancer by regulating miR-7-mediated EGFR/STAT3 signaling pathway [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2019, 18(6): 580-586.
- [13] Vera O, Jimenez J, Pernia O, et al. DNA methylation of miR-7 is a mechanism involved in platinum response through MAFG overexpression in cancer cells [J]. Theranostics, 2017, 7(17): 4118-4134.
- [14] Gao D, Qi X, Zhang X, et al. Hsa_circRNA_0006528 as a competing endogenous RNA promotes human breast cancer progression by sponging miR-7-5p and activating the MAPK/ERK signaling pathway [J]. Mol Carcinog, 2019, 58(4): 554-564.
- [15] Su C, Han Y, Zhang H, et al. CiRS-7 targeting miR-7 modulates the progression of non-small cell lung cancer in a manner dependent on NF- κ B signalling [J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(6): 3097-3107.
- [16] 杨睿, 陈俊霞. 环状 RNA hsa_circ_0058514 在三阴性乳

- 腺癌中的表达及作用研究 [J]. 中国癌症杂志, 2019, 29(1): 9–18.
- Yang R, Chen JX. Effects of circular RNA hsa_circ_0058514 on the development and progression of triple-negative breast cancer[J]. China Oncology, 2019, 29(1): 9–18.
- [17] Du WW, Yang W, Liu E, et al. Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2 [J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44(6): 2846–2858.
- [18] Du WW, Fang L, Yang W, et al. Induction of tumor apoptosis through a circular RNA enhancing Foxo3 activity[J]. Cell Death Differ, 2017, 24(2): 357–370.
- [19] 吴敏杰. 494 例食管腺鳞癌临床特征和治疗分析 [J]. 中国肿瘤临床, 2016, 43(12): 521–526.
- Wu MJ. Analysis of the clinical characteristics and treatment of 494 cases of esophageal adeno-squamous carcinoma[J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2016, 43(12): 521–526.
- [20] Meng L, Liu S, Ding P, et al. Circular RNA ciRS-7 inhibits autophagy of ESCC cells by functioning as miR-1299 sponge to target EGFR signaling[J]. J Cell Biochem, 2020, 121(2): 1039–1049.
- [21] Pan H, Li T, Jiang Y, et al. Overexpression of circular RNA ciRS-7 abrogates the tumor suppressive effect of miR-7 on gastric cancer via PTEN/PI3K/AKT signaling pathway[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(1): 440–446.
- [22] Zhang Z, Ren L, Zhao Q, et al. TRPC1 exacerbate metastasis in gastric cancer via ciRS-7/miR-135a-5p/TRPC1 axis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 529(1): 85–90.
- [23] Xing Y, Zha WJ, Li XM, et al. Circular RNA circ-Foxo3 inhibits esophageal squamous cell cancer progression via the miR-23a/PTEN axis[J]. J Cell Biochem, 2020, 121(3): 2595–2605.
- [24] Shi Z, Chen T, Yao Q, et al. The circular RNA ciRS-7 promotes APP and BACE1 degradation in an NF- κ B-dependent manner[J]. FEBS J, 2017, 284(7): 1096–1109.
- [25] Thompson MG, Larson M, Vidrine A, et al. FOXO3-NF- κ B RelA protein complexes reduce proinflammatory cell signaling and function[J]. J Immunol, 2015, 195(12): 5637–5647.