

miR-21、PDCD4 表达对Ⅱ期食管鳞癌术后患者生存期的影响

张建东¹, 贺利民¹, 马磊¹, 赵旭林¹, 张振¹, 姚传山¹, 闻朋浩², 赵庆亚³, 郭丽丽³

(1. 南阳市第一人民医院, 河南 南阳 473012; 2. 南阳南石医院, 河南 南阳 473065;

3. 上海交通大学附属胸科医院中心实验室, 上海 200030)

摘要: [目的] 探讨微小 RNA 21 (microRNA-21, miR-21) 和细胞程序性死亡蛋白 (programmed cell death protein 4, PDCD4) 在Ⅱ期食管鳞癌术后患者癌组织中表达, 分析其与临床病理特征的关系及对预后的影响。[方法] 收集胸中段Ⅱ期食管鳞癌术后患者标本 97 例, 将样本组织脱蜡提取总 RNA; 应用实时免疫荧光定量聚合酶链反应 (RT-PCR) 法检测所有标本癌组织、癌旁组织 miR-21 的表达情况; 免疫组化法检测癌组织和癌旁组织 PDCD4 蛋白表达水平。[结果] miR-21 在Ⅱ期食管鳞癌术后患者癌组织中的表达较癌旁组织升高 ($t=12.06$, $P<0.01$), PDCD4 在癌组织中的表达较癌旁组织降低 ($t=8.36$, $P<0.01$)。miR-21 和 PDCD4 在癌组织中的表达呈负相关 ($r=-0.41$, $P<0.01$), 在癌旁组织中的表达呈正相关 ($r=0.51$, $P<0.01$)。癌组织中 miR-21 的表达与食管鳞癌的浸润深度、淋巴结转移、内镜下病变长度呈正相关 ($r=0.23$, $P=0.02$; $r=0.22$, $P=0.03$; $r=0.38$, $P<0.01$), 与分化程度呈负相关 ($r=-0.60$, $P<0.01$), PDCD4 蛋白的表达与食管鳞癌的浸润深度、淋巴结转移、内镜下病变长度负相关 ($r=-0.21$, $P=0.04$; $r=-0.24$, $P=0.01$; $r=-0.37$, $P<0.01$), 与分化程度呈正相关 ($r=0.53$, $P<0.01$), 二者与年龄、性别、位置不相关 ($P>0.05$)。COX 回归模型发现Ⅱ期食管鳞癌患者肿瘤浸润深度、淋巴结转移、分化程度、内镜下病变长度、miR-21 表达、PDCD4 表达均为影响患者 PFS 的因素 ($\chi^2=10.36$, $P=0.01$; $\chi^2=7.89$, $P<0.01$; $\chi^2=6.48$, $P=0.02$; $\chi^2=5.32$, $P=0.03$; $\chi^2=9.56$, $P=0.01$; $\chi^2=5.40$, $P=0.02$)。miR-21 对于术后 3 年 PFS、OS 预测曲线下面积分别为 73.5%、81.0% ($P<0.01$); PDCD4 对于术后 3 年 PFS、OS 预测曲线下面积分别为 77.3%、73.2% ($P<0.01$)。miR-21、PDCD4 高、低表达组 PFS 差异有统计学意义 ($\chi^2=19.6$, $P<0.01$; $\chi^2=11.45$, $P<0.01$), OS 差异也有统计学意义 ($\chi^2=27.84$, $P<0.01$; $\chi^2=21.35$, $P<0.01$)。[结论] Ⅱ期食管鳞癌术后患者癌组织与癌旁正常组织中 miR-21、PDCD4 蛋白表达存在明显差异。高表达 miR-21 提示预后较差, 而高表达 PDCD4 提示预后较好。

关键词: 食管鳞癌; miR-21; PDCD4; 生存期; 预后

中图分类号: R735.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2017)12-01047-08

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.12.B001

The Effect of MiR-21 and PDCD4 Expression on the Survival of Patients with Stage II Esophageal Carcinoma After Operation

ZHANG Jian-dong, HE Li-min, MA Lei, et al.

(Nanyang First People's Hospital, Nanyang 473012, China)

Abstract: [Objective] To study the expression of RNA-21 (microR-21 or miR-21) and PDCD4 (programmed cell death protein 4) in patients with stage II esophageal squamous cell carcinoma after operation. To analyze the correlations among microR-21, PDCD4 and clinicopathological features as well as the effect of their expression on prognosis. [Methods] A total of 97 samples were collected from the mid-thoracic portion of patients with stage II esophageal squamous cell carcinoma. Total RNA of these sample tissues was extracted by dewaxing. The expression level of miR-21 in all sample cancer tissues and adjacent tissues was detected by RT-PCR (real-time immunofluorescence quantitative polymerase chain reaction). And the expression level of PDCD4 in cancer tissues and adjacent normal tissues was detected by immunohistochemistry. [Results] The expression of miR-21 in cancer tissues was higher than that in adjacent normal tissues ($t=12.06$, $P<0.01$), and the expression of PDCD4 protein in cancer tissues was lower than that in adjacent normal tissues ($t=8.36$, $P<0.01$). The correlation analysis revealed a negative correlation ($r=-0.41$, $P<0.01$) of the expression of miR-21 and PDCD4 in cancer tissues and a positive correlation ($r=0.51$, $P<0.01$) of their expression in adjacent normal tissues. The expression of miR-21 in cancer tissues was positively correlated with the depth of tumor invasion, lymph node metastasis and endoscopic lesion length ($r=0.23$, $P=0.02$; $r=0.22$, $P=0.03$; $r=0.38$, $P<0.01$), and negatively correlated with the differentiation degree ($r=-0.60$, $P<0.01$). The expression of PDCD4 protein in cancer tis-

通讯作者: 贺利民, 院长, 主任医师, 博士; 南阳市第一人民医院肿瘤科, 河南省南阳市中州路与人民路交叉处 (473012); E-mail: nyhelimin@163.com

收稿日期: 2017-06-05; **修回日期:** 2017-10-15

sues was negatively correlated with the depth of tumor invasion, lymph node metastasis and endoscopic lesion length ($r=-0.21, P=0.04; r=-0.24, P=0.01; r=-0.37, P<0.01$), and positively correlated with the differentiation ($r=0.53, P<0.01$). The expression of both was not correlated with age, gender and location ($P>0.05$). A COX regression model was established to reveal that the depth of tumor invasion, lymph node metastasis, differentiation degree, endoscopic lesion length, expression of microR-21 and expression of PDCD4 were all factors that affect PFS of patients with stage II esophageal squamous cell carcinoma after operation ($\chi^2=10.36, P=0.01; \chi^2=7.89, P<0.01; \chi^2=6.48, P=0.02; \chi^2=5.32, P=0.03, \chi^2=9.56, P=0.01; \chi^2=5.40, P=0.02$, respectively). For miR-21, the area under the 3-year PFS and OS prediction curve was 73.5% and 81.0%, respectively (all $P<0.01$). For PDCD4, the area under the 3-year PFS and OS prediction curve was 77.3% and 73.2%, respectively expression. According to the cutoff values, different expression results of miR-21 and PDCD4 were divided into high and low expression groups. Kaplan-Meier was used to find that different expression of miR-21 and PDCD4 were significantly different in PFS (the results were $\chi^2=19.6, P<0.01; \chi^2=11.45, P<0.01$) and in OS ($\chi^2=27.84, P<0.01; \chi^2=21.35, P<0.01$). [Conclusion] There were significant differences in the expression of miR-21 and PDCD4 protein between cancerous tissues and adjacent normal tissues in patients with stage II esophageal squamous cell carcinoma after operation. Highly expressed miR-21 suggested poor prognosis, while the high expression of PDCD4 protein suggested better prognosis.

Subject words: esophageal squamous cell carcinoma; miR-21; PDCD4; survival; prognosis

食管癌是消化道常见的恶性肿瘤, 食管癌位于世界常见恶性肿瘤第 8 位, 也是导致癌症死亡的第六大原因^[1]。目前主要治疗手段仍为外科手术。美国癌症委员会(AJCC)的研究结果证明肿瘤大小联合 TNM 分期预测食管癌预后 5 年生存率的精确度提高 3.9%, 食管癌淋巴结是否转移是决定预后和治疗方法的关键因素之一^[2], 较多的淋巴结清扫术可提高食管癌患者生存率^[3]。对于食管癌淋巴结转移阴性患者来说肿瘤大小和 T 分期是独立预测因素^[4], 然而, 随着分子诊断的发展, TNM 分期已经不能满足目前对于精准治疗的要求。肿瘤的微环境在肿瘤发生发展中起着重要的作用^[5], 其中较有代表性的是微小 RNA (microRNAs), 他们在不同的细胞发育过程中发挥了重要的作用, 如调节增殖、分化、细胞凋亡、发育、代谢、应激反应与免疫等^[6]。

微小 RNA 属于小分子非编码单链 RNA, 在不同的动植物中广泛存在, 但其序列有一定的保守性, 在不同阶段、不同组织的表达均有特异性。PDCD4 是一种与肿瘤细胞凋亡相关的基因, 有研究证明其在恶性肿瘤组织中的表达较正常组织明显降低, 甚至缺失^[7]。miR-21 通过靶向 PDCD4 mRNA 促进肿瘤细胞的侵袭迁移^[8], 但这些理论基础尚未在食管癌中得到证实。本研究目的在于明确 miR-21、PDCD4 的表达在 II 期食管鳞癌组织中的相关性; 分析其诊

断 II 期食管鳞癌患者术后的生存期临界值, 为 II 期食管鳞癌患者根治术后生存期的预测提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集南阳市第一人民医院 2010 年 1 月 1 日至 2013 年 1 月 1 日胸中段 II 期食管鳞癌术后患者标本 97 例, 有完整的临床资料及随访资料, 经南阳市第一人民医院伦理委员会同意后纳入研究。入组标准: 患者年龄 ≤ 70 岁, 卡氏评分 ≥ 80 分; 术前各项检查结果无严重的心肺功能不全及代谢系统相关疾病; 按照 2017 年第 8 版食管鳞癌 TNM 分期标准, 根据术前检查结果及术后病理组织特征诊断为 II 期食管鳞癌; 所有患者手术方式均为常规开胸颈胸腹三切口食管癌根治术, 且均由一位术者操作, 术后淋巴结清扫 ≥ 5 枚, 术后病理证实为 R0 切除; 术前影像检查所见病灶及术中发现病灶均切除完整; 不同时进行其他脏器手术; 入组患者术前未进行化疗, 术后告知病情明确拒绝放化疗, 并签有相关知情同意书; 术前无其它器官肿瘤, 术后未再发与食管鳞癌无关的其它肿瘤。共筛选出符合上述研究标准的 II 期食管鳞癌根治术后患者 97 例, 其中男性 52 例, 女性 45 例; >60 岁患者 48 例, ≤ 60 岁患者 49 例; 高分化

40 例, 中分化 57 例; T₁ 51 例, T₂ 46 例; N₀ 50 例, N₁ 47 例; 肿瘤长度 <3cm 50 例, ≥3cm 47 例; 中上段 30 例, 中段 32 例, 中下段 35 例; 入组患者术后 3 年内每次间隔 3~6 个月复查 1 次, 发生异常情况和体征时随时复查, 对于未能按照要求时间返回手术医院复查患者均有电话随访记录, 必要时在其他三级以上医院复查后将结果反馈至随访医生进行评估。统计分析得出 miR-21、PDCD4 表达量的 cutoff 值, 通过二者的 cutoff 值将全部患者分为高表达组、低表达组。

1.2 免疫组化

免疫组化所有仪器均由上海交通大学附属胸科医院中心实验室提供, 包括 Anti-PDCD4 抗体 [EPR3431] (购于 Rabccam 公司)、Dako REAL™ EnVision™ (购于 Dako 公司)。将蜡块组织切片呈 2μm 后进行免疫组化, 得到结果后进行分析, 每个样本取 4 个高倍视野, 通过免疫组化半定量检测得出阳性细胞表达的百分比, 取 4 个高倍视野均值设定为最终表达量。

1.3 RT-qPCR 步骤及结果分析

RT-qPCR 所有仪器、耗材均由上海交通大学附属胸科医院中心实验室提供, 包括 The RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (购于 Thermo fisher SCIENTIFIC 公司)、All-in-one™ miRNA qRT-PCR Detection Kit 试剂盒 (购于 Thermo fisher SCIENTIFIC 公司)、PCR 引物 (购于奥科鼎盛生物有限公司)。实验器材准备完毕后, 将每个样本的蜡块组织均切成 5μm 厚, 脱蜡并提取总 RNA; 按照 The RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE 脱蜡试剂盒说明步骤进行核酸提取, 按照 All-in-one™ miRNA qRT-PCR Detection Kit 试剂盒说明步骤冰上制备逆转录反应体系, 将通过逆转录后的样本通过 Nanodrop 2000 分光光度计测定 cDNA 浓度和纯度, 测得 OD260 值、OD280 值、样品浓度、所有样品的 OD260/OD280 比值均在 1.8~2.0 之间, 将逆转录后的 cDNA 储存至 -20℃ 冰箱内备用, 准备 RT-PCR。引物由奥科鼎盛生物有限公司合成 miR-21 引物序列, 上游引物: 5'-GGGGTAGCTTATCAGACTG-3', 下游引物: 5'-TGGAGTCGGCAATTGCACTG-3'; 内参 U6 引物序列, 上游引物: 5'-GCTTCGGCAGCATAT-ACTAAAT-3', 下游引物: 5'-CGCTTCACGAATTT-

GCGTGTTCAT-3'。设置 RT-qPCR 反应程序为 95℃ 10min、95℃ 15s、60℃ 1min, 其中 95℃ 15s、60℃ 1min 重复 45 个循环。60℃ 1min 为荧光采集时间。相对定量法比较癌组织和癌旁组织 miR-21 的表达差异, R 代表相对含量, 计算方法采用 2^{-ΔΔCt} 计算。

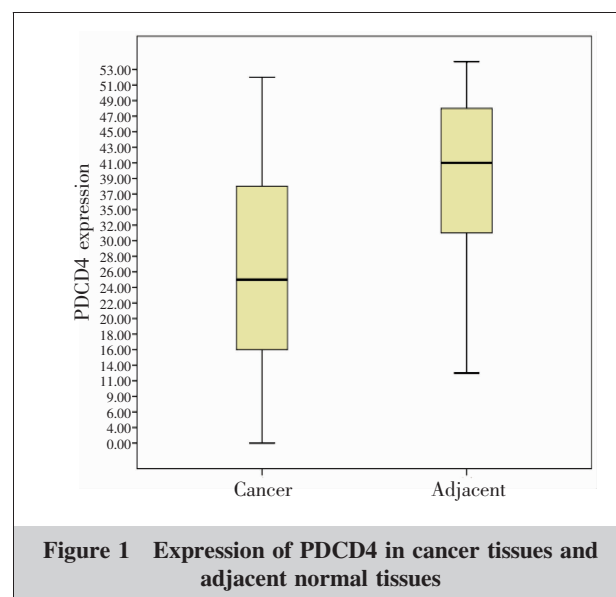
1.4 统计学处理

采用 SPSS 23.0 统计软件对数据进行统计分析, 所有的计量资料均采用 t 检验或单因素方差分析, 计数资料采用卡方拟合优度检验; 计量资料运用 Pearson 相关性分析, 计数资料和等级资料采用 Spearman 相关分析; 建立 COX 回归模型, 分析影响生存期的主要危险因素; 建立 ROC 曲线, 约登指数确定 cutoff 值及相应的敏感性、特异性; 无进展生存期 (PFS) 和总生存期 (OS) 采用 Kaplan-Meier 法计算。设定双侧显著性检验, 检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 miR-21、PDCD4 的表达特征与相关性

97 例 II 期食管鳞癌患者术后癌组织和癌旁组织经过 RT-qPCR 扩增后发现癌组织中 miR-21 表达较癌旁正常组织升高 ($t=12.06, P<0.01$) (Figure 1)。免疫组化的表达量对比, 癌旁组织中的表达较癌组织升高 ($t=8.36, P<0.01$) (Figure 2)。癌组织中 miR-21、PDCD4 表达呈负相关 ($r=-0.41, P<0.05$); 而癌旁正常组织中 miR-21、PDCD4 表达呈正相关 ($r=0.51, P<0.05$)。免疫组化检测癌组织与癌旁组织中 PDCD4



的表达,发现癌旁组织中的 PDCD4 主要表达在细胞核,而癌组织中的 PDCD4 在细胞质、细胞核中均可见表达(Figure 3)。

2.2 miR-21、PDCD4 的表达与临床病理特征的关系

所有入组 II 期食管鳞癌患者性别、年龄、分化程度、T 分期、N 分期、术前内镜下长度、位置的构成比方面进行卡方拟合优度检验,差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。免疫组化检测所有入组 II 期食管鳞癌患者癌组织中 PDCD4 表达,结果显示 PDCD4 的

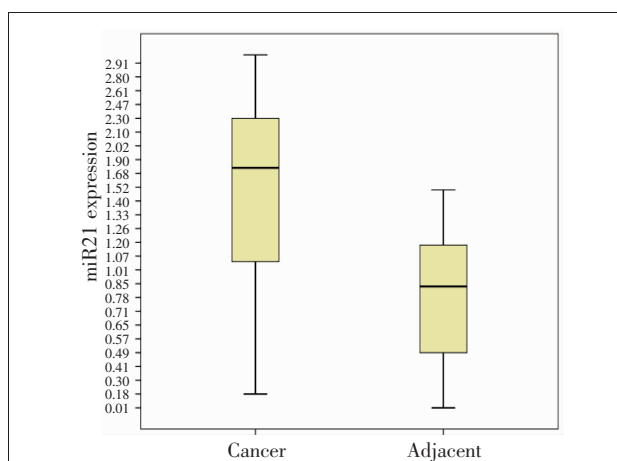
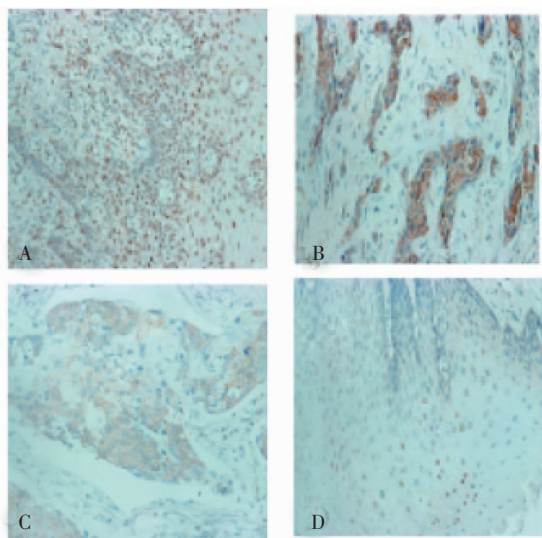


Figure 2 Expression of miR-21 in cancer tissues and adjacent normal tissues



A: PDCD4 is highly expressed in normal tissues adjacent to cancer; B: PDCD4 is highly expressed in cancer tissues; C: PDCD4 is low expressed in cancer tissues; D: PDCD4 is low expressed in adjacent normal tissues.

Figure 3 The expression of PDCD4 in cancer tissues and adjacent normal tissues($\times 40$)

表达情况在不同年龄、性别、位置、内镜下长度、分化程度组差异无统计学意义,而在不同 T 分期、N 分期组差异有统计学意义。RT-qPCR 相对定量法检测 miR-21 的表达,结果显示不同年龄、性别、位置、内镜下长度组差异无统计学意义,而在不同 T 分期、N 分期、分化程度组差异有统计学意义。见 Table 1。

食管鳞癌患者癌组织中 PDCD4、miR-21 的表达与性别、年龄无关($r=0.09, P=0.39; r=0.09, P=0.37; r=0.08, P=0.45; r=0.13, P=0.19$); PDCD4 的表达与 T 分期、N 分期、术前内镜下长度呈负相关($r=-0.21, P=0.04; r=-0.24, P=0.01; r=-0.37, P<0.01$),与分化程度呈正相关($r=0.53, P<0.01$); miR-21 的表达与 T 分期、N 分期、术前内镜下长度呈正相关($r=0.23, P=0.02; r=0.22, P=0.03; r=0.38, P<0.01$),与分化程度呈负相关($r=-0.60, P<0.05$)。

2.3 影响 II 期食管鳞癌术后患者 PFS 的危险因素

建立回归模型,未引入自变量的对数似然值为 664.85,引入自变量后的对数似然值为 592.21,模型系数检验未引入自变量和引入自变量的模型之间差异有统计学意义($\chi^2=72.64, P<0.01$)。

多因素分析结果显示,浸润深度、淋巴结转移、术前内镜下长度、分化程度、miR-21 及 PDCD4 表达是影响患者 PFS 的独立危险因素。见 Table 2。

2.4 miR-21、PDCD4 表达与预后的关系

通过 ROC 分析 miR-21、PDCD4 对于 II 期食管鳞癌术后患者 3 年生存期预测的敏感性、特异性;约登指数=(敏感度+特异度)-1。

2.4.1 miR-21 表达对 II 期食管鳞癌患者术后 3 年生存期的预测

miR-21 预测 3 年 PFS 的曲线下面积为 73.5% ($P<0.01$);约登指数最大值为 0.55,miR-21 对应的表达值为 0.93,敏感性为 90.5%,特异性为 65.2% (Figure 4)。miR-21 预测 3 年 OS 的曲线下面积为 81% ($P<0.01$);约登指数最大值为 0.55,miR-21 对应的表达值为 0.93,敏感性为 90.5%,特异性为 65.2% (Figure 5)。

2.4.2 PDCD4 表达对 II 期食管鳞癌患者术后 3 年生存期的预测

PDCD4 预测 3 年 PFS 的曲线下面积为 77.3% ($P<0.01$);约登指数最大值为 0.51,PDCD4 对应的

Table 1 Relationship of miR-21 and PDCD4 protein expression with clinicopathological features in patients with esophageal carcinoma

Clinicopathologic features	n	χ^2	P	PDCD4	t	P	miR-21	t	P
Age (years)									
<60	48	0.01	0.92	27.35±13.44	1.37	0.18	1.58±0.75	-1.36	0.18
≥60	49			23.61±13.53			1.79±0.82		
Gender									
Male	52	0.51	0.48	25.40±14.64	-0.05	0.96	1.69±0.82	0.01	0.99
Female	45			25.53±12.32			1.68±0.76		
Differentiation Grade									
Well	40	2.20	0.03	27.77±14.61	-1.41	0.16	1.36±0.78	3.87	0.17
Moderate	57			23.84±12.63			1.91±0.71		
T stage									
T ₁	51	0.28	0.61	28.33±14.50	2.71	0.00	1.45±0.83	-2.48	0.00
T ₂	46			22.28±11.77			1.95±0.66		
N stage									
N ₀	50	0.09	0.76	29.02±13.04	3.20	0.00	1.47±0.79	-2.08	0.04
N ₁	47			21.68±13.18			1.92±0.73		
Tumor size (cm)									
<3	50	0.09	0.76	28.30±13.05	1.63	0.11	1.59±0.79	0.07	0.94
≥3	47			22.44±13.54			1.78±0.78		
Location									
Upper thoracic	30	0.39	0.82	25.03±13.92	1.11	0.33	1.61±0.83	0.92	0.40
Middle thoracic	32			22.56±13.93			1.68±0.73		
Lower thoracic	35			28.49±12.60			1.74±0.81		

Table 2 COX regression analysis on the risk factors of PFS in stage II esophagus squamous cell carcinoma

Factor	B	Wald	P	HR
Gender	-0.02	0.02	0.92	1.02
Age	-0.23	0.82	0.37	0.80
Location		4.42	0.11	
T stage	-1.92	10.36	0.01	0.15
N stage	-1.66	7.89	0.00	0.19
Differentiation	0.67	6.48	0.02	1.93
Tumor size	-0.59	5.32	0.03	0.56
miR-21 expression	0.54	9.65	0.01	1.70
PDCD4 expression	-0.03	5.40	0.02	0.97

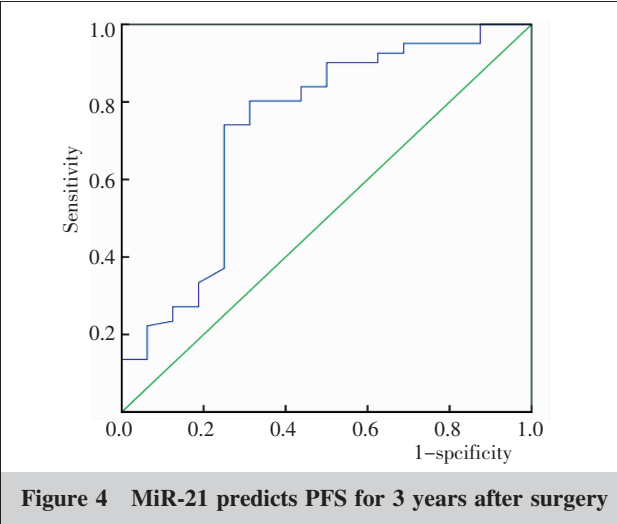


Figure 4 MiR-21 predicts PFS for 3 years after surgery

表达值为26.5,敏感性为64.2%, 特异度为87.5%(Figure 6)。PDCD4 预测3年OS的曲线下面积为73.2%($P<0.01$); 约登指数最大值为0.35,PDCD4对应的表达值为20.5%,敏感性为44.6%, 特异度为91.3%(Figure 7)。

2.4.3 不同 miR-21、PDCD4 表达患者生存分析

通过 ROC 曲线取 cutoff 值, 通过 cutoff 值将所有患者分为 miR-21 高表达组、低表达组和 PDCD4 高表达组、低表达组。

miR-21 低表达组中位 PFS 为 14 个月, 高表达组为 11 个月, 差异有统计学意义 ($\chi^2=19.6, P<0.01$); PDCD4 低表达组中位 PFS 为 12 个月, 高表达组为 14 个月, 差异有统计学意义 ($\chi^2=11.45, P<0.01$)。见 Figure 8。

miR-21 低表达组中位 OS 为 45 个月, 高表达组为 19.6 个月, 差异有统计学意义 ($\chi^2=27.84, P<0.01$); PDCD4 低表达组中位 OS 为 19.2 个月, 高表达组为 28 个月, 差异有统计学意义 ($\chi^2=21.35, P<0.01$)。见 Figure 9。

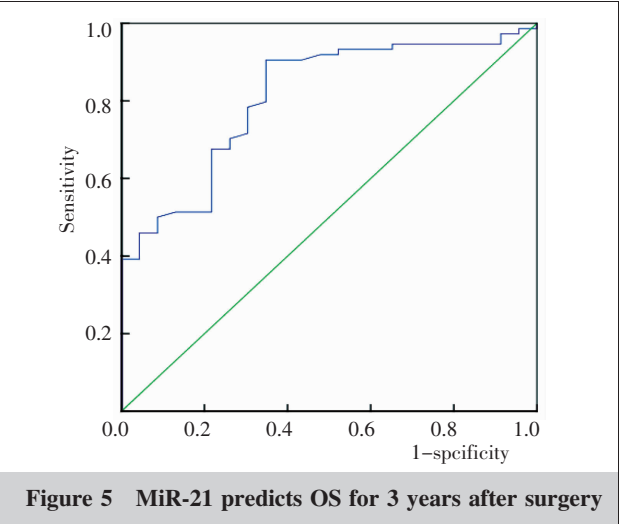


Figure 5 MiR-21 predicts OS for 3 years after surgery

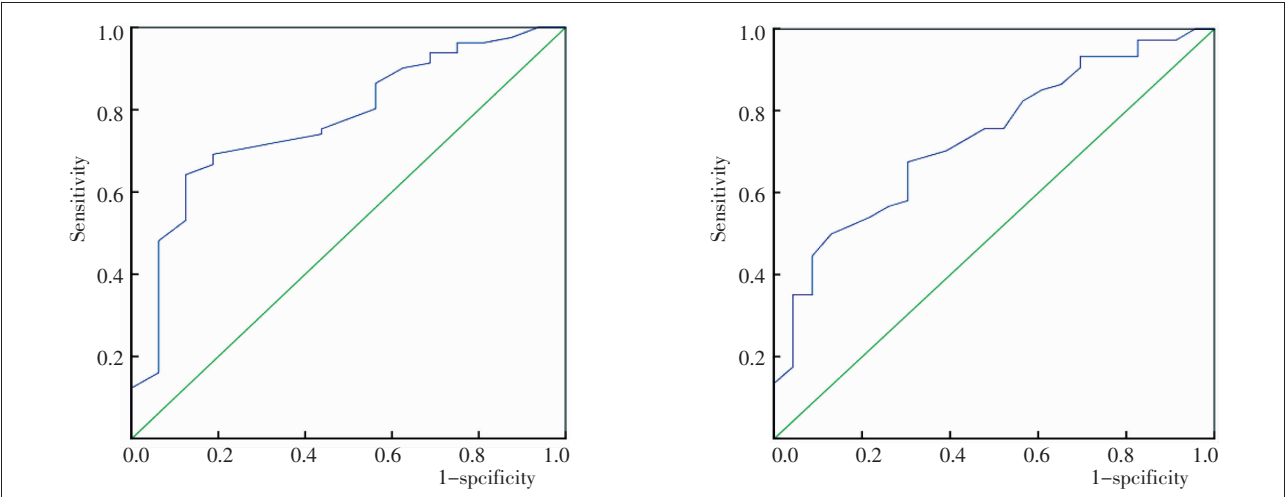


Figure 6 PDCD4 predicts PFS for 3 years after surgery

Figure 7 PDCD4 predicts OS for 3 years after surgery

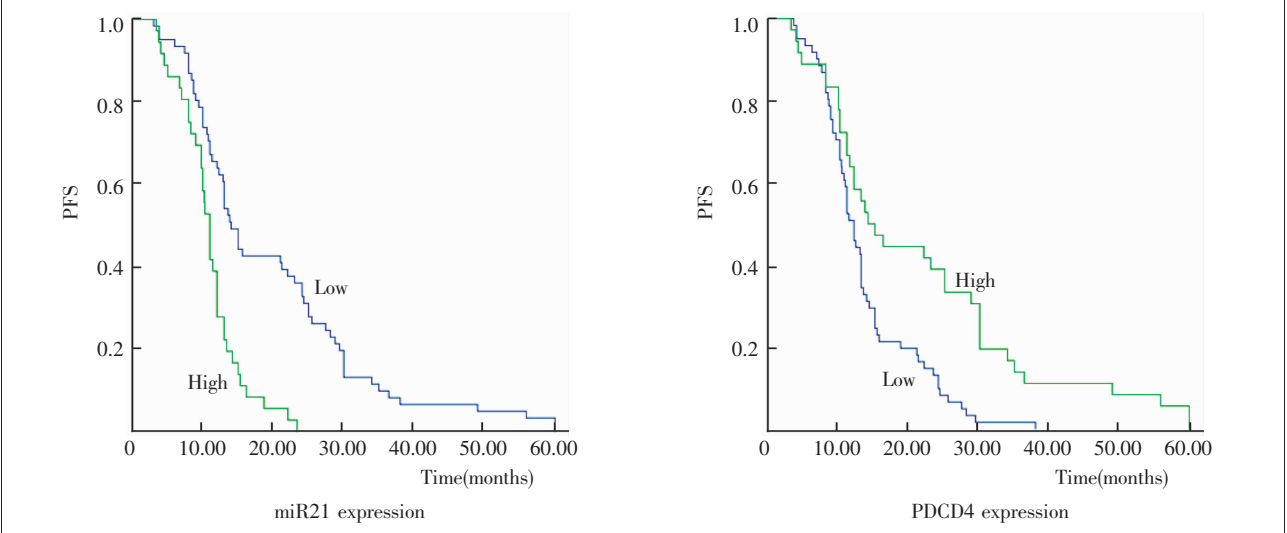


Figure 8 The PFS of patients with esophageal carcinoma

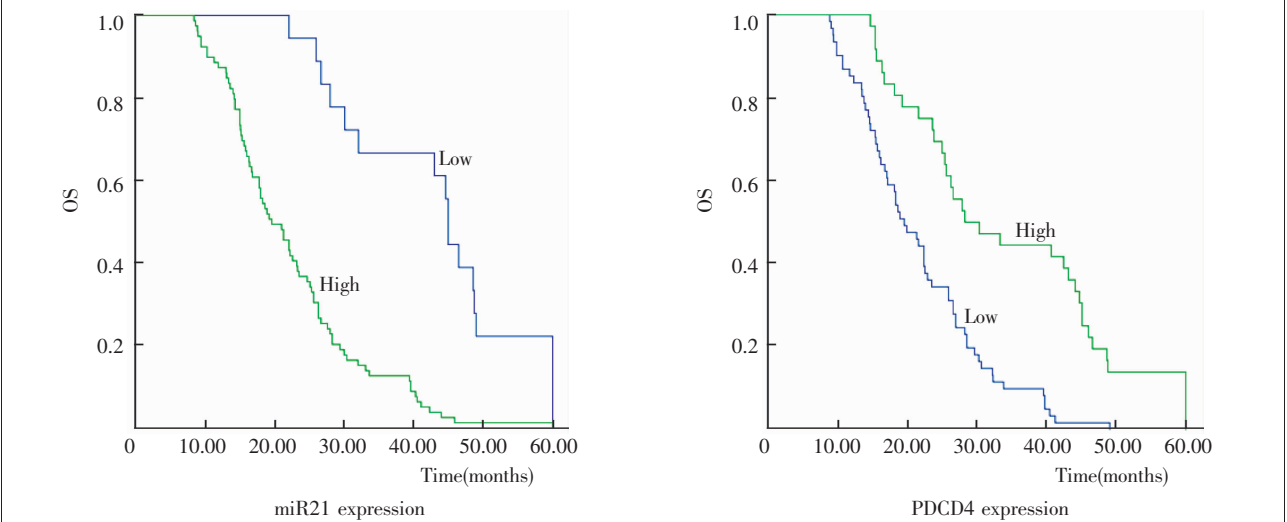


Figure 9 The OS of patients with esophageal carcinoma

3 讨论

目前早期食管癌根治术是食管癌的主要治疗手段,但即使是早期进行手术的患者,其术后5年生存率仍然低于30%,而术后的局部复发和远处转移是直接导致患者死亡的主要原因^[9]。据相关统计,miRNAs可以调控30%的基因表达^[10],分为抑癌基因和原癌基因两大类,贯彻于肿瘤的整个发生、发展过程。miR-21是microRNAs家族中的一员,按照发现顺序进行命名,是一种致癌基因,与正常组织相比其在许多恶性肿瘤组织中表达显著升高,包括乳腺癌、结直肠癌、肺癌、恶性淋巴瘤、膀胱癌等,与肿瘤生物学行为密切相关。在食管癌中miR-21参与了癌组织的增殖、浸润、转移^[11],与肿瘤的发生发展过程密切相关。PDCD4蛋白是miR-21下游的靶基因之一,其表达在正常组织主要集中于细胞核中,癌组织在细胞质和细胞核中均能够发现^[12]。本研究发现,Ⅱ期食管鳞癌术后患者癌组织与癌旁正常组织中miR-21与PDCD4的表达存在相关性。既往的研究结果发现miR-21结合在3'端的非翻译区靶向PDCD4 mRNA,抑制PDCD4蛋白的翻译达到抑制肿瘤生长的功能,所以在大多数癌组织中PDCD4蛋白表达下调^[13]。这与本研究结果相一致。Saxena等^[14]在结肠癌细胞裸小鼠移植模型中,通过醛糖还原酶抑制miR-21表达,发现PDCD4表达较对照组显著升高;Jiao等^[15]分别对67例人皮肤黑色素瘤组织和正常皮肤组织进行对比,在黑色素瘤组织中miR-21的相对含量明显增高,PDCD4 mRNA的相对表达水平明显降低;Li等^[16]在肾癌细胞中发现miR-21不仅促进了肿瘤细胞的增殖、转移,而且转录后下调了PDCD4蛋白的表达,这些研究结果均表明两者之间相互作用的关系,与本次研究结果相一致。食管癌早期手术后复发转移是影响患者生存期的主要因素,鉴定的分子标志物并预测治疗结果是非常有必要的,而且对于指导预后起关键作用。Hwang等^[17]研究胰腺癌中miR-21的表达,发现低miR-21表达具有较低的进展风险($HR=0.316, P<0.05$),低表达miR-21者在辅助治疗中获益,进一步证明了miR-21表达能够对患者预后生存期造成影响。本次研究结果证明在Ⅱ期食管鳞癌术后患者中miR-21、PDCD4表达情况均能显著影响术后生存期,证明了分子表达

情况能够影响Ⅱ期食管鳞癌术后的生存期。

目前Ⅱ期食管鳞癌患者根治术后是否接受辅助化疗仍然存在争议,本次所有入组患者均明确表示术后拒绝放化疗,并签署知情同意书。本研究的创新点在于运用相互作用的基因和蛋白的表达情况去预测术后的生存期,为临床上Ⅱ期食管鳞癌术后患者的病情发展提供了参考。但也存在一定的不足,首先本研究结果仅限于Ⅱ期食管鳞癌术后患者,并不能反映其他分期食管癌的情况。其次,本次研究所有患者淋巴结清扫数目偏少,且未进行区域划分。在今后的研究中我们可以对比在不同的miR-21表达程度上增加淋巴结清扫数量或区域,或根据其表达的不同选择性应用反义寡聚核苷酸,从而延长食管癌术后患者的生存期。

目前最新的研究结果发现miR-21不仅可以靶向PDCD4蛋白促进肿瘤生长,而且与磷酸酶张力蛋白同源物(PTEN)蛋白、caspase-3蛋白有关^[18]。同时还可以作用于PTEN/Akt通路,改善癌细胞对于化疗药物的敏感性^[19]。有研究这已经成功的将反义寡聚核苷酸转染至大肠癌LS174T细胞中,评估PDCD4的变化,发现其转移的特征较转染前显著降低,且通过免疫组化测得PDCD4较转染前显著升高^[20],再次证明了miR-21有可能成为一个潜在治疗的新靶点。

参考文献:

- [1] Hiyoshi Y, Kamohara H, Karashima R, et al. MicroRNA-21 regulates the proliferation and invasion in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(6): 1915-1922.
- [2] Leng XF, Zhu Y, Wang GP, et al. Accuracy of ultrasound for the diagnosis of cervical lymph node metastasis in esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. J Thorac Dis, 2016, 8(8): 2146-2157.
- [3] Wang XY, Yu HD, Liu JH. Evaluation of postoperative lymph node metastasis and postoperative radiotherapy in patients with thoracic esophageal carcinoma [J]. Chinese Journal of Cancer Control, 2016, 23(S1): 78-79. [王晓阳, 俞海东, 刘建华. 胸段食管癌术后淋巴结转移情况与术后放疗效果评价 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2016, 23(S1): 78-79.]
- [4] Zhang H, Tang P, Miao X, et al. Does tumor size improve the accuracy of prognostic prediction in patients with

- esophageal squamous cell carcinoma after surgical resection? [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(41): 66623–66634.
- [5] Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2013, 91(4): 431–437.
- [6] Fu X, Han Y, Wu Y, et al. Prognostic role of microRNA-21 in various carcinomas: a systematic review and meta-analysis [J]. *Eur J Clin Invest*, 2011, 41(11): 1245–1253.
- [7] Jiang Y, Yang DQ, Wang CY, et al. Progress in the study of the relationship between tumor suppressor gene PDCD4 and tumor [J]. *Modern Medical Oncology*, 2015, 23 (22): 3363–3366. [姜艳, 杨大群, 王聪洋, 等. 抑癌基因 PDCD4 与肿瘤关系的研究进展 [J]. *现代肿瘤医学*, 2015, 23 (22): 3363–3366.]
- [8] Liao J, Liu R, Shi YJ, et al. Exosome-shuttling microRNA-21 promotes cell migration and invasion-targeting PDCD4 in esophageal cancer [J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(6): 2567–2579.
- [9] Visbal AL, Allen MS, Miller DL, et al. Ivor Lewis esophagogastrectomy for esophageal cancer [J]. *Ann Thorac Surg*, 2001, 71(6): 1803–1808.
- [10] Anastasov N, Höfig I, Vasconcellos IG, et al. Radiation resistance due to high expression of miR-21 and G2/M checkpoint arrest in breast cancer cells [J]. *Radiat Oncol*, 2012, 7(1): 1–12.
- [11] Mori Y, Ishiguro H, Kuwabara Y, et al. MicroRNA-21 induces cell proliferation and invasion in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Mol Med Rep*, 2009, 2(2): 235–239.
- [12] Lim SC, Hong R. Programmed cell death 4 (Pdc4) expression in colorectal adenocarcinoma: association with clinical stage [J]. *Oncol Lett*, 2011, 2(6): 1053–1057.
- [13] Qiu X, Dong S, Qiao F, et al. HBx-mediated miR-21 up-regulation represses tumor-suppressor function of PDCD4 in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncogene*, 2013, 32 (27): 3296–3305.
- [14] Saxena A, Shoeb M, Ramana KV, et al. Aldose reductase inhibition suppresses colon cancer cell viability by modulating microRNA-21 mediated programmed cell death 4 (PDCD4) expression [J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49(15): 3311–3319.
- [15] Jiao J, Fan Y, Zhang Y. Expression and clinicopathological significance of microRNA-21 and programmed cell death 4 in malignant melanoma [J]. *J Int Med Res*, 2015, 43(5): 672–678.
- [16] Li X, Xin S, He Z, et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor PDCD4 and promotes cell transformation, proliferation, and metastasis in renal cell carcinoma [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 33(6): 1631–1642.
- [17] Hwang JH, Voortman J, Giovannetti E, et al. Identification of microRNA-21 as a biomarker for chemoresistance and clinical outcome following adjuvant therapy in resectable pancreatic cancer [J]. *PLoS One*, 2010, 5(5): e10630.
- [18] Wang Z, Yao W, Li K, et al. Reduction of miR-21 induces SK-N-SH cell apoptosis and inhibits proliferation via PTEN/PDCD4 [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(6): 4727–4733.
- [19] Du G, Cao D, Meng L. miR-21 inhibitor suppresses cell proliferation and colony formation through regulating the PTEN/AKT pathway and improves paclitaxel sensitivity in cervical cancer cells [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(5): 2713–2719.
- [20] Nedaeinia R, Sharifi M, Avan A, et al. Inhibition of microRNA-21 via locked nucleic acid-anti-miR suppressed metastatic features of colorectal cancer cells through modulation of programmed cell death 4 [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(3): 1010428317692261.