

食管鳞癌血浆 miR-143 表达与肿瘤深肌层浸润及淋巴结转移的关系

吴 鹏, 廖世均, 梁卫东

(成都医学院第一附属医院, 四川 成都 610500)

摘 要: [目的] 分析血浆 miR-143 表达与食管鳞癌浸润肌层深度及淋巴结转移的关系, 为食管鳞癌转移的早期防治及作用机制提供理论依据。[方法] 收集食管鳞癌患者术前一血标本 40 例, 同期收集 40 例健康体检者血标本, 运用实时定量荧光 PCR 检测两组人群血浆中 miR-143 表达水平, 探讨食管鳞癌患者血浆中 miR-143 表达水平与食管鳞癌深肌层浸润及淋巴结转移的关系。[结果] 与健康人群相比, 食管鳞癌患者血浆中 miR-143 表达水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。食管鳞癌患者血浆 miR-143 表达水平与年龄 ($P = 0.154$)、性别 ($P = 0.131$)、肿瘤部位 ($P = 0.092$) 均无关; $T_3 + T_4$ 期患者血浆中 miR-143 表达水平低于 $T_1 + T_2$ 期患者 ($P = 0.008$); 与无深肌层浸润患者相比, 有深肌层浸润患者血浆 miR-143 表达水平降低 ($P = 0.012$); 有淋巴结转移的患者血浆中 miR-143 表达水平较无淋巴结转移患者低 ($P = 0.003$)。[结论] 食管鳞癌患者血浆 miR-143 表达水平较健康人群下调, 且在深肌层浸润和发生淋巴结转移的食管鳞癌患者血浆中表达水平明显下调, 其有望作为评估食管鳞癌患者肿瘤进展的新生物学标志。

关键词: 食管鳞癌; 血浆 miR-143; 淋巴结转移; 肌层浸润

中图分类号: R735.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2017)12-01060-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.12.B003

Relationship between Plasma miR-143 Expression with Deep Myometrial Invasion and Lymph Node Metastasis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma

WU Peng, LIAO Shi-jun, LIANG Wei-dong

(The First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China)

Abstract: [Objective] To investigate the relationship between miR-143 expression and esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), and to provide a theoretical basis for the early prevention and treatment of ESCC metastasis. [Methods] Forty blood samples from patients with esophageal squamous cell carcinoma and 40 samples from healthy subjects were collected. The expression of miR-143 in plasma was detected by real-time quantitative PCR. The relationship between plasma levels of miR-143 and ESCC in deep ESCC and lymph node metastasis were analyzed. [Results] Compared with the healthy population, the expression of miR-143 in ESCC was significantly decreased ($P < 0.001$). The expression level of miR-143 in the plasma of patients with ESCC was not correlated with age ($P = 0.154$), gender ($P = 0.131$), or tumor location ($P = 0.092$). Patients at $T_3 + T_4$ stage had a lower expression level of miR-143 than those at $T_1 + T_2$ stage ($P = 0.008$), and patients with myometrial invasion and lymph node metastasis had a lower expression level of miR-143 than those without ($P = 0.012$ and 0.003 , respectively). [Conclusion] The expression of miR-143 in ESCC is lower than that in healthy people, and is down-regulated in patients with deep myometrial invasion and lymph node metastasis. It may be used as a new biological marker for assessing tumor progression in ESCC.

Subject words: esophageal squamous cell carcinoma; plasma miR-143; lymph node metastasis; myometrial invasion

食管癌存在两种主要的病理类型, 食管鳞状细胞癌 (esophageal squamous cell carcinoma, ESCC) 和食管腺癌 (esophageal adenocarcinoma, EAC)^[1]。中国

是食管癌的高发地区, 全球每年诊断为食管癌的患者将近 50% 集中在中国^[2], 其中以 ESCC 较为常见^[3,4], 西方国家则以 EAC 为主。由于食管癌缺乏早期症状、体征, 以及许多传统检查手段, 如内镜、食管脱落细胞学检查创伤性较大, 存在一定的取样误差, 对早期诊断可行性不高。此外, SCC、CA-199 及 CEA 敏感

通讯作者: 梁卫东, 副主任医师, 硕士生导师, 硕士; 成都医学院第一附属医院胸外科, 四川省成都市新都区宝光大道 278 号 (610500); E-mail: 53701944@qq.com

收稿日期: 2017-07-13; **修回日期:** 2017-08-21

性和特异性较低,导致食管癌的诊断大多出现在中晚期^[5],失去最佳手术机会。肿瘤的深肌层浸润是食管鳞癌分期的重要分界点,同时食管鳞癌的淋巴结转移是影响预后的重要因素,因此寻找与食管鳞癌早期深肌层浸润及淋巴结转移的循环生物学标志显得十分迫切。

MicroRNA(miRNA)是内源性、约20~24个核苷酸长度的、非编码的单链小分子RNA,在大量肿瘤相关的生物学进程中扮演着关键性的角色。Mitchell等^[6]研究发现肿瘤细胞可以主动释放miRNA进入外周血。循环miRNA较短,且具有茎环结构,从而具有耐受RNA酶的高度稳定性,其在血浆或血清中能够稳定存在。miR-143是miRNA家族中的一员,目前已有研究证明,miR-143参与食管鳞癌肿瘤细胞的增殖过程,其有可能是通过作用于mRNA的STAT3 3'UTR,从而对肿瘤起到调控作用^[7,8]。然而,miR-143与食管鳞癌深肌层浸润及淋巴结转移是否有关尚少见报道。因此,本研究旨在探讨食管鳞癌患者血浆miR-143表达水平的变化,及与食管肿瘤的深肌层浸润、淋巴结转移的关系,为评估食管鳞癌术前分期、淋巴结转移和治疗提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 研究对象

收集2016年7月至2017年6月成都医学院第一附属医院胸心外科术前1周ESCC患者血标本40例,符合以下纳入标准:①术前未采取放射及药物治疗;②术中均常规行纵隔、腹腔淋巴结清扫术;③术后病理类型为ESCC,未出现远处转移。同期收集40例健康体检者血标本。

1.1.2 临床资料

40例ESCC患者年龄40~70岁之间,中位年龄58岁;男性32例,女性8例;胸中段食管鳞癌25例,胸上、下段共15例;肿瘤临床分期根据美国癌症联合会(AJCC)与国际抗癌联盟(UICC)共同制定的食管恶性肿瘤TNM分期标准,T₁+T₂期16例,T₃+T₄期24例;术后病理发现27例肿瘤出现深肌层浸润,13例未发生深肌层浸润(食管深肌层浸润指镜下见肿瘤侵及食管下1/3肌层或以上);术中淋巴结清扫

示30例阳性,10例阴性。同期收集40例健康体检者,年龄35~60岁,中位年龄46岁,其中男性23例,女性17例,健康体检者均未发现患有高血压、糖尿病等慢性病史。

1.2 方法

1.2.1 标本来源

所有食管癌患者及健康对照组均于清晨使用统一规格静脉采血针采集肘正中静脉血5ml,离心后置于-80℃中保存待用;术后根据病理结果有无深肌层浸润及淋巴结转移分组。

1.2.2 血浆RNA提取

根据北京TIANGEN公司提供的miRNA提取分离试剂盒说明书(TIANGEN,DP150416,miRcute miRNA isolation kit)进行血浆总RNA的提取,使用超微量核酸蛋白测定仪(Thermo Scientific)软件检测RNA纯度,并采用电泳技术进行RNA定量分析。以测定的A260/A280值位于1.8~2.1视为无蛋白及其他杂质污染,以电泳条带显示18s、28s和5s视为完整性良好,并用以进行RNA逆转录。

1.2.3 cDNA合成

根据北京TIANGEN公司提供的反转录试剂盒说明书(TIANGEN,KR160112,miRcute Plus miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit)配置反应体系并进行反转录程序。

1.2.4 目的基因的构建与合成

通过PubMed数据库查询获得基因序列,再用primer 3软件设计引物,引物由上海生工技术公司合成。miR-143 Forward:5'-TGTTAGTTTTTCGGAGTTAG-TGTCGCGC-3',Reverse:5'-CCTACGATCGAAAAC-GACGCGAACG-3',产物长度为58bp;U6 Forward:5'-GTTTTGTAGTTTTTGGAGTTAGTGTGTGT-3',Reverse:5'-CTCAACCTACAATCAAAAACAACACAAACA-3',产物长度为62bp。

1.2.5 实时定量荧光PCR(qRT-PCR)

根据北京TIANGEN公司荧光定量PCR反应试剂盒说明书(TIANGEN,FP160303,miRcute Plus miRNA SYBR Green qPCR Detection Kit),以上述合成的cDNA为模板,U6为内参,冰上配置反应体系,扩增体系为:95℃ 15min起始模板变性;94℃ 20s,64℃ 30s,72℃ 34s共5个循环;94℃ 20s,60℃ 34s共45个循环退火、延伸;95℃ 15s,60℃ 1min,95℃ 15s,60℃ 15s溶解曲线分析。

1.2.6 目的基因表达分析

计算不同样品平均 Ct 值,以-ΔΔCt 法分析目的基因相对表达量,ΔCt 食管鳞癌=Ct 食管鳞癌-Ct 内参,ΔCt 对照组=Ct 对照-Ct 内参,ΔΔCt=ΔCt 食管鳞癌-ΔCt 对照组,2^{-ΔΔCt} 为食管鳞癌相对健康人的表达量。所得数值<1.0,表示目的基因较健康人表达下调;所得数值=1.0,表示目的基因表达无变化;所得数值>1.0,表示目的基因表达上调。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 21.0 软件进行数据分析,实验数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间计量资料分析采用 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 食管鳞癌患者与健康人群血浆 miR-143 表达水平比较

食管鳞癌患者血浆中 miR-143 表达水平为 0.15±0.11,健康人群血浆中 miR-143 表达水平为 1.73±0.15,与健康人群相比,食管鳞癌患者血浆 miR-143 表达水平下调,差异有统计学意义(*P*<0.001)。见 Figure 1。

2.2 食管鳞癌患者血浆 miR-143 表达水平与其临床特征的关系

食管鳞癌患者血浆 miR-143 表达水平与年龄(*P*=0.154)、性别(*P*=0.131)、肿瘤部位(*P*=0.092)均无关,与肿瘤分期、肌层浸润深度及有无淋巴结转移有关(*P*均 <0.05)。术后经病理活检示 T₃+T₄ 期食管鳞癌患者血浆中 miR-143 表达水平低于 T₁+T₂ 期患者(*P*=0.008)(Figure 2);与无深肌层浸润的食管鳞癌患者相比,有深肌层浸润的食管鳞癌患者血浆 miR-143 表达水平较低(*P*=0.012)(Figure 3);有淋巴结转移的食管鳞癌患者血浆中 miR-143 表达水平较无淋巴结转移的食管鳞癌患者下调(*P*=0.003)(Figure 4)。血浆 miR-143 与食管鳞癌患者临床病理特征间的关系详见 Table 1。

3 讨 论

肿瘤是在机体内在因素与外界因素联合作用下,细胞中基因改变并积累而逐渐形成的,癌变是一

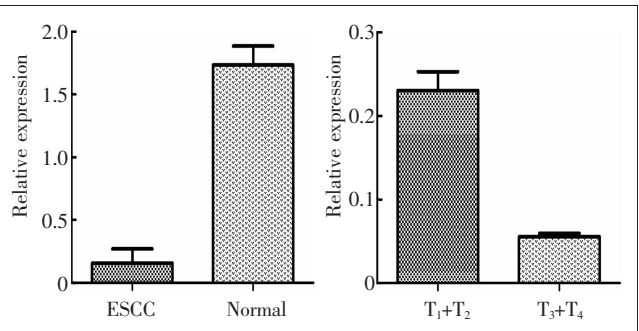


Figure 1 Expression of plasma miR-143 in ESCC and normal group

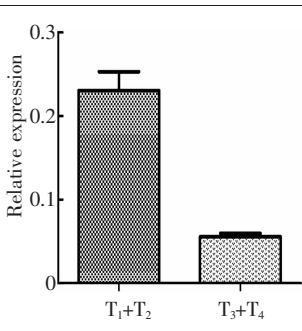


Figure 2 Expression of plasma miR-143 in ESCC patients with different T sage

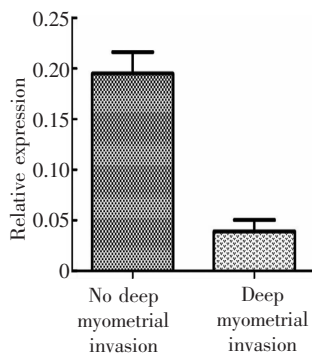


Figure 3 Expression of plasma miR-143 in ESCC patients with different deep myometrial invasion

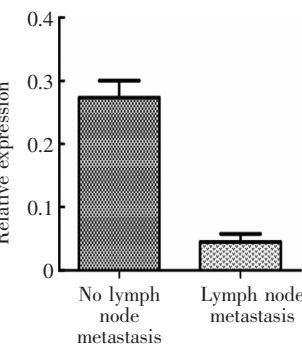


Figure 4 Expression of plasma miR-143 in ESCC patients with different lymph node metastasis

Table 1 The relationship between plasma miR-143 and clinicopathological features of ESCC

Index	n(%)	miR-143	<i>t</i>	<i>P</i>
Age(years)			0.23	0.154
≤60	28(70.0)	1.08±0.56		
>60	12(30.0)	0.75±0.21		
Gender			0.56	0.131
Male	32(80.0)	1.23±0.70		
Female	8(20.0)	0.42±0.23		
Tumor site			0.65	0.092
Middle section	25(62.5)	1.11±0.89		
Upper and lower	15(37.5)	0.82±0.34		
T stage			37.37	0.008
T ₁ +T ₂	16(40.0)	0.23±0.02		
T ₃ +T ₄	24(60.0)	0.05±0.01		
Deep myometrial invasion			30.41	0.012
Negative	13(32.5)	0.20±0.02		
Positive	27(67.5)	0.04±0.01		
Lymph node metastasis			36.52	0.003
No	10(25.0)	0.27±0.02		
Yes	30(75.0)	0.05±0.01		

个多基因参与、多步骤发展的非常复杂的过程。正因为如此,癌基因的异常表达成为目前研究肿瘤发病机制的热点之一。miRNA 被视为蛋白转录过程中重

要的调控因子,并且能通过作用于特殊靶位点从而起到癌基因或抑癌基因的作用^[9],异常表达的 miRNA 能引起人类肿瘤的发生。MiRNA 中超过 50% 位于肿瘤相关的基因组区和脆性位点,该区域染色体异常缺失、扩增或转位可引起 miRNA 差异性表达。通过比较基因组杂交发现人类第 5 号染色体长臂是一个频繁缺失的片段,缺失率在 18%~75% 之间^[10]。而 miRNA-143 恰恰位于人第 5 号染色体长臂 3 区 3 带(5q33),许多研究报告指出 miR-143 在一些肿瘤类型中处于下调状态,例如结直肠癌^[11]、前列腺癌^[12]、口腔鳞状细胞癌^[13]。

肿瘤的增殖与转移是影响患者预后主要因素,因此防止其发生发展是目前亟待解决的问题。Yu 等^[14]通过研究证实,在食管鳞癌中 miR-143 可通过作用于 FAM83 的 3'UTR,从而使 FAM83 mRNA 降解,使细胞周期停滞于 G₁/G₀,进而抑制细胞的增殖和促进细胞凋亡。此外有研究指出,miR-143 与肿瘤的分期和转移密切相关,Wang 等^[15]通过体外实验发现在胆囊癌中,miR-143 能够直接与相应区域的 3'UTR 结合,抑制 IGF-1R 的表达,异常表达的 IGF-1R 激活 PI3K/Akt 和 MAPK/ERK 信号旁路途径,从而促进肿瘤细胞的侵袭和转移。在骨肉瘤中,Bcl-2 为 miR-143 的潜在靶位点,miR-143 通过作用于 Bcl-2 蛋白 3'UTR,使 caspase-8 和 10 发生自剪切而被激活后,剪切其下游的 Bcl-2 家族中的 Bid,形成具有活性的 t-Bid。之后在线粒体外产生 Bax 和 Bak 二聚体,形成 PT 孔,释放线粒体中的 cytochrom C,形成含有 cytochrom C,caspase-9 和 Apaf-1 的凋亡复合体,后者剪切 pro-caspase-3 而产生活化的 cleaved-caspase-3,进一步剪切下游底物,抑制肿瘤增殖、浸润及转移,促进凋亡^[16]。

由此可见 miR-143 在肿瘤的发生发展过程中扮演着重要的角色。尽管如此,有关 miR-143 与食管鳞癌深肌层浸润和淋巴结转移的研究报道甚少,本实验通过运用 qRT-PCR 检测食管鳞癌患者和健康人群血浆中 miR-143 表达水平变化,以及探讨其与肌层浸润和淋巴结转移的关系,发现食管鳞癌患者血浆 miR-143 表达水平低于健康人群,两者差异具有统计学意义,同时发现,食管鳞癌患者血浆 miR-143 表达水平与肿瘤 T 分期、深肌层浸润及淋巴结转移相关,而与肿瘤患者的年龄、性别、肿瘤部位均无关。

综上所述,血浆 miR-143 表达水平在食管鳞癌

患者中降低,且与食管鳞癌肿瘤分期、深肌层浸润、淋巴结转移相关,提示 miR-143 在食管鳞癌发生发展过程中发挥重要作用,有望为食管鳞癌的诊断、治疗及预后提供具有指导意义的实验学数据。但本研究样本量收集尚不充分,数据存在偏倚,未能对不同类型食管癌、食管良性肿瘤做出验证,存在一定局限性,因此其是否能够作为食管癌检测的生物学标志尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Ahmad B, Nicole GS, Volkhard H, et al. Expression of the IGF2 mRNA binding protein 2 (IGF2BP2/IMP2) is linked to short survival and metastasis in esophageal adenocarcinoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(31):49743-49750.
- [2] Shen GR, Li WZ, Liu YC, et al. Association between a microRNA-214 binding site polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Genet Mol Res*, 2015, 15(2):1-8.
- [3] Qi YJ, Wang M, Liu RM, et al. Downregulation of 14-3-3 σ correlates with multistage carcinogenesis and poor prognosis of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4):e95386.
- [4] Liu Y, Li K, Ren Z, et al. Clinical implication of elevated human cervical cancer oncogene-1 expression in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *J Histochem Cytochem*, 2012, 60(7):512-520.
- [5] Zhou XW, Zhu H, Li W, et al. Diagnostic value of a plasma microRNA signature in gastric cancer: a microRNA expression analysis[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:11251.
- [6] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(30):10513-10518.
- [7] Ni Y, Meng L, Wang L, et al. MicroRNA-143 functions as a tumor suppressor in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Gene*, 2013, 517(2):197-204.
- [8] Lee JH, Chiang SY, Nam D, et al. Capillarisin inhibits constitutive and inducible STAT3 activation through induction of SHP-1 and SHP-2 tyrosine phosphatases [J]. *Cancer Lett*, 2014, 345(1):140-148.
- [9] Chen JH, Yang R, Zhang W, et al. Functions of microRNA-143 in the apoptosis, invasion and migration of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(6):3749.
- [10] Mayama T, Fukushima S, Shineha R, et al. Frequent loss of copy number on the long arm of chromosome 21 in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2000, 17(2):245-252.
- [11] Dassow H, Aigner A. MicroRNAs (miRNAs) in colorectal cancer: from aberrant expression towards therapy. [J]. *Curr Pharm Des*, 2013, 19(7):1242-1252.
- [12] Clapé C, Fritz V, Henriquet C, et al. miR-143 interferes with ERK5 signaling, and abrogates prostate cancer progression in mice[J]. *PLoS One*, 2009, 4(10):e7542.
- [13] Yu T, Wang XY, Gong RG, et al. The expression profile of microRNAs in a model of 7,12-dimethyl-benz(a)anthracene-induced oral carcinogenesis in Syrian hamster[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2009, 28(1):64.
- [14] Mao Y, Liu J, Zhang D, et al. miR-143 inhibits tumor progression by targeting FAM83F in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(7):9009-9022.
- [15] Wang H, Li Q, Niu X, et al. miR-143 inhibits bladder cancer cell proliferation and enhances their sensitivity to gemcitabine by repressing IGF-1R signaling. [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(1):435.
- [16] Li WH, Wu HJ, Li YX, et al. MicroRNA-143 promotes apoptosis of osteosarcoma cells by caspase-3 activation via targeting Bcl-2[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 80:8-15.