

MicroRNA-31在食管鳞状细胞癌中的表达及其与预后的关系

罗君 凌志强 彭兵锋 袁嘉敏 郑智国 毛伟敏

浙江省肿瘤医院, 浙江省肿瘤研究所,
浙江省胸部肿瘤(肺、食管)诊治技术研究重点实验室, 浙江 杭州 310022

[摘要] **背景与目的:** 研究发现, 许多微小RNA(microRNAs, miRNAs)与恶性肿瘤密切相关, 其中miR-31(microRNA-31)在许多肿瘤中呈异常改变。中国是食管鳞状上皮细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)最高发的地区之一。本研究旨在调查miR-31在ESCC中的表达水平与临床病理学因素以及预后的关系。**方法:** 采用实时反转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)技术检测食管癌细胞株KYSE410、EC1和EC9706, 以及81例ESCC组织和癌旁正常组织中miR-31的表达水平。结果与临床资料和随访结果结合作统计分析。**结果:** 在3株ESCC细胞株以及75.31%的ESCC组织中, miR-31表达上调。并且miR-31的高表达与更严重的淋巴结转移($P=0.043$)、更深的浸润深度($P=0.002$)以及更晚期的病理分期有关($P=0.027$), 而与其他临床病理学因素无关($P>0.05$)。此外, miR-31的高表达与较差的无进展生存期(progression-free survival, PFS)有关(Kaplan-Meier分析 $P=0.014$, 多变量Cox分析 $P=0.021$)。**结论:** miR-31可能是ESCC一项新的诊断和预后评价指标。

[关键词] 食管鳞状细胞癌; miR-31; 临床病理学; 生存期

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2013.07.002

中图分类号: R735.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2013)07-0487-06

The expression of microRNA-31 in esophageal squamous cell carcinoma and its prognostic value

LUO Jun, LING Zhi-qiang, PENG Bing-feng, YUAN Jia-min, ZHENG Zhi-guo, MAO Wei-min (Zhejiang Province Cancer Hospital, Zhejiang Cancer Research Institute, Zhejiang Key Laboratory of the Diagnosis and Treatment Technology on Thoracic Oncology, Hangzhou Zhejiang 310022, China)

Correspondence to: LING Zhi-qiang E-mail: lingzq@hotmail.com

[Abstract] **Background and purpose:** It was reported that many microRNAs (miRNAs) have close relation with carcinomas. miR-31 (microRNA-31) shows abnormal change in numerous cancers. China is one of the most high-risk areas of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). The aim of the present study was to investigate the expression of miR-31 in ESCC, and analyze the relationship of its expression with clinicopathological features and prognosis. **Methods:** The expression of miR-31 in KYSE410, EC1 and EC9706 cell lines, as well as 81 cases of ESCC tissues and adjacent normal esophageal tissues were detected by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The result was combined with clinical and follow-up data and statistical analysis was conducted. **Results:** MiR-31 was up-expression in 3 cell lines and 75.31% of the ESCC tissues. miR-31 up-expression was positively related to severer lymph node metastasis ($P=0.043$), deeper invasion of tumors ($P=0.002$) and advanced pathological stage ($P=0.027$). There was no relationship of miR-31 with other clinicopathological features ($P>0.05$). Furthermore, high expression of miR-31 was associated with poor progression-free survival (PFS) in 81 ESCC patients by Kaplan-Meier analysis ($P=0.014$) and by multivariate Cox analysis ($P=0.021$). **Conclusion:** Our results identified miR-31 may be a new diagnostic criteria and prognostic biomarker for ESCC.

[Key words] Esophageal squamous cell carcinoma; miR-31; Clinicopathology; Survival

食管癌是常见的消化道肿瘤, 其发生率排在全世界恶性肿瘤的第七位, 病死率居第六位^[1]。中国是食管癌高发区, 每年全球50%的食管癌发生在中国, 而其中约90%是食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)。大部分ESCC直到疾病的晚期症状都不明显, 因此此类患者往往诊断晚、预后差、死亡率高。人们亟需找到能够在病变早期被特异性识别的分子标志, 以有效地帮助早期诊断和判断预后, 但目前对这种“完美”的分子标志的探索尚未成功^[2]。

微小RNA(micro-RNA, miRNA)是一类长约21~25个核苷酸的高度保守的非编码单链小分子RNA, 由相应的基因编码, 转录加工形成, 通过调控靶基因的表达, 产生转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing)。miRNA在细胞增殖、凋亡、发展和分化中起重要的调控作用, 并与肿瘤的发病和进展关系密切。而在业已发现的众多miRNA中, miR-31被认为是调控肿瘤恶性生物学行为的重要基因之一^[3]。本研究应用实时RT-PCR技术, 分别检测ESCC细胞株及手术切除标本中miR-31的表达水平, 并结合临床病理资料及生存分析, 探讨miR-31在ESCC发生、发展及预后中的潜在作用。

1 材料和方法

1.1 材料

人食管癌细胞株KYSE410、EC1及EC9706为本所保存, 正常食管上皮细胞采用癌旁正常组织中分离的细胞原代培养72 h获得。本实验采用81例ESCC组织及相应癌旁正常组织, 均来自于2009年2月—2010年9月浙江省肿瘤医院食管癌手术后组织标本, 均经病理诊断为鳞状细胞癌, 标本的使用得到医院伦理委员会批准。其中51例标本手术切除后立即取材, 癌组织取自手术切除标本中肉眼观察的肿瘤组织, 癌旁正常组织标本取自距肿瘤边缘至少5 cm处的肉眼下无瘤组织。另30例标本于手术切除后快速液氮冷冻储存, 后经显微病理切割手工分类。所

有肿瘤及正常组织标本收集后储存于-80 °C冰箱中以备RNA提取。肿瘤分级、TNM分期按照国际抗癌联盟(international union against cancer, UICC)2009年第七版食管癌分期标准: 其中高、中分化65例, 低分化16例; I、II期34例, III、IV期47例; 伴有淋巴结转移50例, 无淋巴结转移31例。81例肿瘤患者中, 男性70例, 女性11例, 年龄40~74岁, 平均59.7岁, 其中≥60岁41例, <60岁40例。术前均未接受化疗或放疗。电话随访截止2011年10月10日, 其中失访5例(6.17%), 失访者在生存分析中以最后有效随访日期作为截尾值处理。

细胞培养用RPMI-1640培养基、胎牛血清均购自Gibco公司。RNA提取试剂盒miRNeasy迷你试剂盒(编码: 130171813)购于Qiagen公司, 琼脂糖、0.5% TBE液、EB液、逆转录试剂盒PrimeScript[®] miRNA cDNA合成试剂盒(编码: D350A)和real time RT-PCR试剂盒SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II(编码: DRR081A)购于TaKaRa公司。引物由上海Invitrogen公司合成。实时RT-PCR上游引物序列: mir-31: 5'-AGGCAAGATGCTGGCATAGCT-3', 内参基因RNU6B(U6 small nuclear RNA): 5'-CGCTTCGGCAGCACATATAC-3', 下游通用引物由逆转录试剂盒PrimeScript[®] miRNA cDNA合成试剂盒提供。

1.2 细胞培养

3株食管癌细胞培养于含15%胎牛血清、青霉素100 mg/L、链霉素100 mg/L的RPMI-1640培养液中, 细胞置于37 °C、CO₂体积分数为5%的培养箱中培养, 每隔2~3 d传代1次, 取指数生长期细胞用于试验。

1.3 总RNA提取

按照miRNeasy迷你试剂盒的说明书提取肿瘤细胞及组织中的总RNA, 紫外分光光度计测量, 判定所取总RNA的浓度和纯度, 要求光密度值 $A_{260}/A_{280} > 1.8$ 。取1 μL RNA溶液与1.5%的变性琼脂糖凝胶中进行电泳, 测定RNA的完整性。

1.4 逆转录

取1 μ g总RNA使用PrimeScript[®] miRNA cDNA合成试剂盒进行cDNA的合成, 具体操作参照使用说明。

1.5 PCR扩增

实时RT-PCR的PCR扩增及熔解曲线分析均使用ABI 7500PCR仪(Applied Biosystems), 采用20 μ L的反应体系, 每个样本重复3次, 求平均Ct值作为实验结果。具体操作参照SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II的使用说明。反应过程具体为: 50 $^{\circ}$ C激活聚合酶2 min, 95 $^{\circ}$ C预变性1 min; 95 $^{\circ}$ C变性5 s, 60 $^{\circ}$ C退火和延伸34 s, 扩增40个循环。结束后通过95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 85 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s制作熔解曲线。RT-PCR结果按照 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[4]进行处理: 首先获取每个样本中miR-31及内参基因RNU6B的Ct值, 计算 $\Delta CT = Ct_{(miR-31)} - Ct_{(U6)}$; 再根据 $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{(肿瘤组织/细胞)} - \Delta CT_{(癌旁正常组织/细胞)}$, 进一步计算miR-31在肿瘤组织与癌旁正常组织之间表达倍数的差异: 若 $\Delta\Delta CT < 0$, 则表达升高 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 倍; 若 $\Delta\Delta CT \geq 0$, 则表达降低 $2^{\Delta\Delta CT}$ 倍。

1.6 统计学处理

应用SPSS 17.0统计学软件, 各组间miR-31表达倍数均值的差异采用独立样本t检验分析, 生存曲线绘制用乘积极限法(Kaplan-Meier)进行单因素生存分析, 对数秩检验(Log-Rank test)进行生存曲线比较, 多因素分析采用Cox比例风险模型。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 miR-31在ESCC中的表达与临床病理学参数的关系

在81例ESCC标本中, 61例(75.31%)出现了相对于癌旁正常食管组织的不同程度的miR-31表达上调, 20例(24.69%)表现出miR-31的表达下调。其中最高的表达上调489.85倍, 最低的

表达下调28.70倍, 平均表达上调29.58倍。57例(70.37%)癌组织中的miR-31表达高于癌旁正常组织2倍以上(图1)。3株食管癌细胞株与正常食管上皮细胞相比, miR-31均出现了明显上调, 其中在KYSE410中高表达110.59倍、在EC1中高表达77.05倍, 而在EC9706中高表达51.92倍(图2)。将miR-31在癌和(或)癌旁正常组织中的差异性表达倍数与临床病理参数比较。结果发现miR-31在肿瘤中的高表达与浸润深度、淋巴结转移及病理分期有关: 浸润深度超过肌层的食管癌组织相比未超过肌层的食管癌组织, miR-31的表达提高约27倍($P=0.002$); 有淋巴结转移的癌组织相比无淋巴结转移的癌组织, miR-31的表达提高约4倍($P=0.043$); 而miR-31在Ⅲ、Ⅳ期食管癌组织中较Ⅰ、Ⅱ期表达提高约5倍($P=0.027$)。另外, miR-31的表达水平与性别、年龄、肿瘤长径、是否存在神经浸润以及分化程度差异无统计学意义($P > 0.05$, 表1)。结合流行病学资料分析, miR-31与吸烟、饮酒及肿瘤家族史亦无统计学意义($P > 0.05$)。

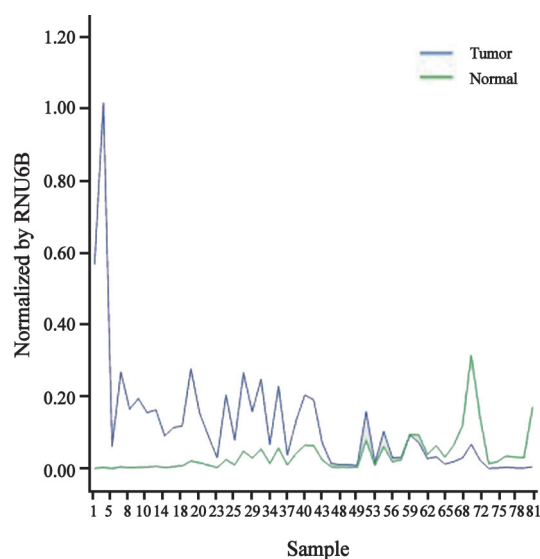


图1 miR-31在ESCC组织/正常组织中的表达水平($n=81$)
Fig. 1 Level of miR-31 in ESCC tissue compared to normal tissue ($n=81$)

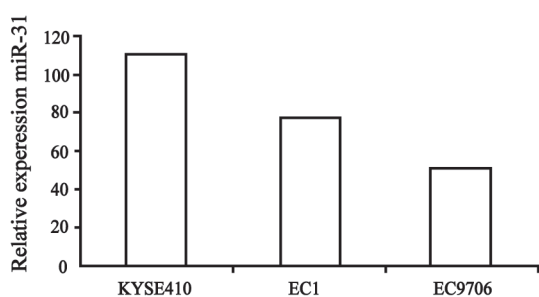


图2 miR-31在ESCC细胞株KYSE410、EC1、EC9706中的表达水平

Fig. 2 Relative expression level of miR-31 in ESCC cell lines (KYSE410, EC1 and EC9706) compared to normal esophageal epithelial cells

2.2 miR-31在ESCC中的表达与预后的关系

以miR-31在ESCC组织中表达提高是否超过2倍为标准, 将所有患者分为miR-31高表达组及miR-31未高表达组。两组间在性别、年龄、吸烟史、饮酒史及家族史等因素方面差异无统计学意义($P>0.05$)。根据电话随访结果, 以复发、转移或死亡代表肿瘤进展事件, 分别统计两组的无进展生存期(progression-free survival, PFS)。Kaplan-Meier分析提示, miR-31高表达组的平均PFS为(16.30 ± 1.39)个月, 而miR-31未高表达组为(20.30 ± 1.27)个月, 差异有统计

表1 miR-31在食管鳞癌组织中的异常表达与临床病理参数的关系

Tab. 1 Relationship of miR-31's abnormal expression and clinicopathological factors in ESCC tissues

Clinicopathological data	<i>n</i>	Mean expression level(tumor/normal)	<i>P</i>
Gender			0.676
Male	70	31.06 ± 84.52	
Female	11	20.12 ± 42.55	
Age/year			0.474
< 60	40	36.08 ± 105.05	
≥ 60	41	23.24 ± 44.29	
Tumor size/cm			0.913
< 5	39	30.60 ± 83.66	
≥ 5	42	28.63 ± 77.48	
pT			0.002
T ₁ -T ₂	14	1.31 ± 7.58	
T ₃ -T ₄	67	35.48 ± 86.86	
pN			0.043
N ₀	31	10.12 ± 40.27	
N ₁₋₃	50	41.64 ± 95.25	
Pathological stage			0.027
I - II	34	9.00 ± 38.59	
III - IV	47	44.46 ± 97.61	
Differentiation			0.614
High/moderate	65	27.34 ± 70.03	
Poor/undifferentiation	16	38.69 ± 114.51	
Neural invasion			0.365
Absent	39	21.16 ± 82.00	
Present	42	37.39 ± 78.29	

学意义($\chi^2=6.031$, $P=0.014$, 图3), 说明miR-31表达未超过2倍者有显著的无进展生存优势。进一步行Cox回归分析显示, miR-31表达未超过2倍者有独立的无进展生存优势($RR=2.546$, $95\%CI:1.154\sim5.614$, $P=0.021$), 而年龄、性别、浸润深度、淋巴结是否转移、病理分期等却均与患者预期PFS无显著相关性($P>0.05$)。

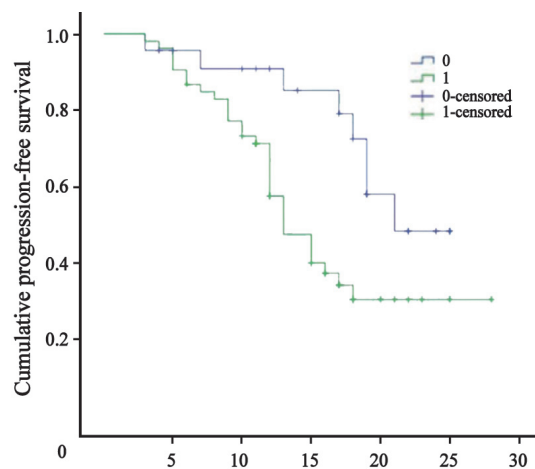


图3 不同miR-31表达水平的ESCC患者的PFS

Fig. 3 The progression free survival (PFS) curves according to different miR-31 expression levels in ESCC

High expression times of miR-31 (1 represent more than 2 times; 0 represent not more than 2 times).

3 讨 论

许多研究表明, miRNA在调节肿瘤相关基因表达的同时, 其本身也具有癌基因或抑癌基因的特点。其中某些miRNA, 如miR-21在大多数肿瘤中呈现高水平表达, 并充当癌基因的角色^[5]。而miR-31却在不同的肿瘤中存在不同水平的表达。Valastyan等^[6]发现miR-31能介导乳腺癌肺部转移灶荷瘤的减小, 抑制其表达能提高乳腺癌细胞的活动性、侵袭性及抗凋亡能力。因此研究者认为miR-31在乳腺癌中是一种降低转移发生率的抑癌基因。而miR-31在结肠癌中表达的提高却促进了肿瘤侵袭性^[7], 因此又被认为具有癌基因特点。

miR-31在不同肿瘤中存在截然不同的表达, 这一看似矛盾现象在许多相关实验中均有报道。例如miR-31在结直肠癌^[8]、肺癌^[9]及口腔癌^[10]中一般处于高表达水平, 而在胃癌^[11]、乳腺癌^[12]及卵巢癌^[13]中则显著低表达。即便同是食管癌中, miR-31在腺癌和鳞癌的表达水平也不尽相同。Leidner等^[14]研究Barrett化生与食管腺癌演进关系时发现, miR-31在腺癌和高级别异型增生组织中的表达较Barrett食管中明显下调, 因此推断miR-31可能具有抑制食管腺癌发生的作用。而本研究却在食管鳞癌中发现miR-31较正常组织表达上调, 因此推测其可能具有促进肿瘤发生的作用。可以看出, miR-31并非在所有肿瘤中都呈现高表达或低表达状态。在鳞状细胞癌中, miR-31大都为高表达, 而在泌尿生殖系统肿瘤中往往呈低表达。上述现象提示人们不能排除该基因存在组织特异性的可能^[15]。若此假想成立, 其原因可能是因为所有类型的细胞都具有分泌和接受miRNA的能力, 同一细胞可分泌多种miRNA, 而一种miRNA则能调节多个基因的翻译。因此miR-31的信号传递方式可以是双向或多向的, 这与传统的细胞间信号单向传递不同。在某特定肿瘤组织中, 若miR-31调控的抑癌因素占主要地位, 则miR-31展现出抑癌倾

向; 反之则展现出促癌倾向。对于本身不编码蛋白的miRNA来说, 其靶基因的性质往往决定了其组织特异性。

本研究中的81例ESCC手术切除标本中, 57例(70.37%)癌组织miR-31的表达高于正常组织2倍以上, 在3株食管癌细胞中的表达更是上调超过50倍。这一数据与Zhang等^[16]的报道较为符合(30/45, 66.7%), 进一步验证了miR-31在ESCC中特异性表达升高, 有癌基因倾向。另外发现: 肿瘤浸润越深, miR-31表达越高($P=0.002$); 病理分期越晚, miR-31表达越高($P=0.027$); 在有淋巴结转移的癌组织中, miR-21表达比无淋巴结转移的癌组织中更高($P=0.043$)。TNM分期是公认的评估肿瘤进展、转移情况以及预测预后的指标, 因此miR-31可能也具有一定的评估及预测作用。Zhang等^[16]报道了miR-31与临床病理学因素的关系, 揭示miR-31在晚期肿瘤患者中表达更高。相比而言, 本研究除病理分期和淋巴结转移以外, 还发现了miR-31与浸润深度的关系, 进一步提示miR-31可能对ESCC的侵袭及转移具有促进作用。Wang等^[17]报道在结直肠癌中也存在miR-31表达提高, 并且其高表达与TNM分期及浸润深度呈正相关, 这一现象与ESCC中相似。而另一些恶性肿瘤中则可见与本实验不同的结果, Zhang等^[18]在胃癌中发现miR-31表达明显下调, 虽差异无统计学意义($P>0.05$), 但仍可看出其下调与TNM因素呈一定的负相关。miRNA调控作为一种表观遗传学现象, 是否受到环境因素的影响, 导致其靶基因发生致瘤性的改变。Xi等^[19]发现, 香烟烟雾冷凝液可诱导正常呼吸道上皮及肺癌组织中的miR-31表达提高, 增加肺癌细胞的增殖性和致瘤性, 因此认为miR-31与吸烟史以及肺癌的发生相关。但在本研究中miR-31与吸烟、饮酒及肿瘤家族史并无明显相关性($P>0.05$)。

有关miR-31的异常表达与肿瘤患者生存期的关系, 不同的肿瘤研究结果不同。在乳腺癌中miR-31的高表达可提高患者生存时间^[6]; 而本研究中, 高表达的miR-31不但与较差的PFS

显著相关, 而且还超过了浸润深度、淋巴结转移及病理分期等因素对PFS的影响, 成为ESCC独立的危险因素。相比其他研究中针对总生存期进行统计分析, 本研究着眼于PFS, 能更为客观地评判肿瘤相关生存水平。

综上所述, miR-31的表达上调在ESCC中是一高频分子事件, 与患者的淋巴结转移、浸润深度、病理分期及不良预后显著相关, 提示miR-31可作为ESCC早期诊断及评估预后的候选指标之一。相信随着表观遗传学研究的不断深入, 有关miR-31以及更多肿瘤相关性miRNA的分子机制及临床价值会被人们进一步了解。

[参 考 文 献]

- [1] PARKIN D M, BRAY F, FERLAY J, et al. Global cancer statistics, 2002 [J] . CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74-108.
- [2] FAREED K R, KAYE P, SOOMRO I N, et al. Biomarkers of response to therapy in oesophago-gastric cancer [J] . Gut, 2009, 58(1): 127-143.
- [3] VALASTYAN S, WEINBERG R A. miR-31: a crucial overseer of tumor metastasis and other emerging roles [J] . Cell Cycle, 2010, 9(11): 2124-2129.
- [4] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method [J] . Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [5] PAN X, WANG Z X, WANG R. MicroRNA-21: a novel therapeutic target in human cancer [J] . Cancer Biol Ther, 2011, 10(12): 1224-1232.
- [6] VALASTYAN S, CHANG A, BENAICH N, et al. Activation of miR-31 function in already-established metastases elicits metastatic regression [J] . Genes Dev, 2011, 25(6): 646-659.
- [7] COTTONHAM C L, KANEKO S, XU L. miR-21 and miR-31 converge on TIAMI to regulate migration and invasion of colon carcinoma cells [J] . J Biol Chem, 2010, 285(46): 35293-35302.
- [8] SLABY O, SVOBODA M, FABIAN P, et al. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer [J] . Oncology, 2007, 72(5-6): 397-402.
- [9] LIU X, SEMPERE L F, OUYANG H, et al. MicroRNA-31 functions as an oncogenic microRNA in mouse and human lung cancer cells by repressing specific tumor suppressors [J] . J Clin Invest, 2010, 120(4): 1298-1309.
- [10] LIU C J, KAO S Y, TU H F, et al. Increase of microRNA miR-31 level in plasma could be a potential marker of oral cancer [J] . Oral Dis, 2010, 16(4): 360-364.
- [11] ZHANG Y, GUO J, LI D, et al. Down-regulation of miR-31 expression in gastric cancer tissues and its clinical significance [J] . Med Oncol, 2010, 27(3): 685-689.
- [12] YAN L X, HUANG X F, SHAO Q, et al. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis [J] . RNA, 2008, 14(11): 2348-2360.
- [13] CREIGHTON C J, FOUNTAIN M D, YU Z, et al. Molecular profiling uncovers a p53-associated role for microRNA-31 in inhibiting the proliferation of serous ovarian carcinomas and other cancers [J] . Cancer Res, 2010, 70(5): 1906-1915.
- [14] LEIDNER R S, RAVI L, LEAHY P, et al. The microRNAs, MiR-31 and MiR-375, as candidate markers in Barrett's esophageal carcinogenesis [J] . Genes Chromosomes Cancer, 2012, 51(5): 473-479.
- [15] VALASTYAN S, WEINBERG R A. miR-31: a crucial overseer of tumor metastasis and other emerging roles [J] . Cell Cycle, 2010, 9(11): 2124-2129.
- [16] ZHANG T, WANG Q, ZHAO D, et al. The oncogenetic role of microRNA-31 as a potential biomarker in oesophageal squamous cell carcinoma [J] . Clin Sci (Lond), 2011, 121(10): 437-447.
- [17] WANG C J, ZHOU Z G, WANG L, et al. Clinicopathological significance of microRNA-31, -143 and -145 expression in colorectal cancer [J] . Dis Markers, 2009, 26(1): 27-34.
- [18] ZHANG Y, GUO J, LI D, et al. Down-regulation of miR-31 expression in gastric cancer tissues and its clinical significance [J] . Med Oncol, 2010, 27(3): 685-689.
- [19] XI S, YANG M, TAO Y, et al. Cigarette smoke induces C/EBP- β -mediated activation of miR-31 in normal human respiratory epithelia and lung cancer cells [J] . PLoS One, 2010, 5(10): e13764.

(收稿日期: 2013-02-25 修回日期: 2013-04-25)