

mir-183在食管鳞癌中的表达水平及其与临床病理、预后的关系

彭兵锋, 毛伟敏, 罗 君, 袁嘉敏, 郑智国, 凌志强

■背景资料

食管癌是常见恶性肿瘤之一,也是导致死亡的癌症之一。近年来, microRNAs(miRNAs)在肿瘤中的作用机制成为科研热点。miRNAs是新近发现的一组天然丰富的小RNA,长度约17-25个核苷酸。mir-183与食管癌的发生、发展、预后等的相互关系的研究尚处于初步阶段。

彭兵锋, 浙江省肿瘤医院肿瘤研究所 温州医学院附属第一医院 浙江省杭州市 310022

毛伟敏, 郑智国, 凌志强, 浙江省肿瘤医院肿瘤研究所 浙江省杭州市 310022

罗君, 袁嘉敏, 浙江省肿瘤医院 浙江中医药大学 浙江省杭州市 310053

浙江省自然科学基金资助项目, No. Y2080749, Y2091110

浙江省人事优秀留学回国人员科技活动项目择优基金资助项目, No. 2008A004

浙江省科技计划基金资助项目, No. 2009C33143

教育部优秀留学回国人员科研基金资助项目, No. 2010609

卫生部科研基金资助项目, No. WKJ2010-2-004

浙江省重大科技专项计划基金资助项目, No. 2011C13039-1
作者贡献分布: 文献检索、实验操作、结果分析及论文撰写由彭兵锋完成; 凌志强与郑智国参与选题、指导及浙江肿瘤标本的病理诊断; 临床病例随访资料、部分实验、数据分析研究所用的新试剂及分析工具由罗君与袁嘉敏协助完成; 稿件由毛伟敏审校。

通讯作者: 凌志强, 副研究员, 310022, 浙江省杭州市半山桥广济路38号, 浙江省肿瘤医院肿瘤研究所. lingzq@hotmail.com
电话: 0571-88122423 传真: 0571-88122413

收稿日期: 2011-09-01 修回日期: 2011-11-01

接受日期: 2011-11-04 在线出版日期: 2011-11-08

Correlation between miR-183 expression and pathological features of esophageal squamous cell carcinoma

Bing-Feng Peng, Wei-Min Mao, Jun Luo, Jia-Min Yuan, Zhi-Guo Zheng, Zhi-Qiang Ling

Bing-Feng Peng, Institute of Cancer Research, Zhejiang Cancer Hospital, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Hangzhou 310022, Zhejiang Province, China

Wei-Min Mao, Zhi-Guo Zheng, Zhi-Qiang Ling, Institute of Cancer Research, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, Zhejiang Province, China

Jun Luo, Jia-Min Yuan, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Zhejiang Province, No. Y2080749, Y2091110; the Science and Technology Foundation for Selected Overseas Chinese Scholars, Ministry of Personnel of Zhejiang Province, No. 2008A004; the Science and Technology Program of Zhejiang Province, No. 2009C33143; Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, Ministry of Education, No. 2010609; the Research Fund of Ministry of Health, No. WKJ2010-2-004; and the Major Science and Technology Project of Zhejiang Province, No. 2011C13039-1

Correspondence to: Zhi-Qiang Ling, Associate Professor, Institute of Cancer Research, Zhejiang Cancer Hospital, 38 Guangji Road, Banshanqiao District, Hangzhou 310022, Zhejiang Province, China. lingzq@hotmail.com
Received: 2011-09-01 Revised: 2011-11-01

Accepted: 2011-11-04 Published online: 2011-11-08

■同行评议者

欧希龙, 副教授, 东南大学中大医院消化科

Abstract

AIM: To detect the expression of miR-183 in primary esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and to analyze its correlation with clinicopathological features of ESCC.

METHODS: The expression of miR-183 in 53 ESCC samples and matched tumor-adjacent tissue samples was detected by real-time PCR. PCR data were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

RESULTS: Of the 53 ESCC samples analyzed, microRNA-183 was significantly up-regulated (2-6411 folds) in 22 samples compared to the matched tissue samples. Up-regulation of mir-183 expression was correlated with lymph node metastasis and poor prognosis in ESCC (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: Up-regulation of mir-183 expression was significantly correlated with the development and progression of ESCC.

Key Words: MiR-183; Esophageal squamous cell carcinoma; Clinicopathological features; Prognosis

Peng BF, Mao WM, Luo J, Yuan JM, Zheng ZG, Ling ZQ. Correlation between miR-183 expression and pathological features of esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(31): 3246-3249

摘要

目的: 探讨原发性食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)组织中mir-183的表达状况及其与食管鳞癌临床病理特征之间的关系。

方法: 应用实时RT-PCR方法及 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 分析法分别检测ESCC患者癌组织及癌旁正常组织中mir-183的表达状况及其与临床病理特征的相关性。

结果: 在53例标本中, 有22例(41.51%) mir-183高表达(2-6411倍), mir-183的高表达分别与患者的淋巴结转移情况及不良预后具有显著统计学意义($P < 0.05$)。

结论: mir-183的高表达在ESCC的发生发展中发挥重要作用。

关键词: Mir-183; 食管鳞癌; 临床病理特征; 预后

彭兵锋, 毛伟敏, 罗君, 袁嘉敏, 郑智国, 凌志强. Mir-183在食管鳞癌中的表达水平及其与临床病理、预后的关系. 世界华人消化杂志 2011; 19(31): 3246-3249
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3246.asp>

0 引言

食管癌是世界8大常见恶性肿瘤之一,也是世界范围内6大导致死亡的癌症之一^[1].随着分子生物学技术的发展,食管癌的基础与临床研究取得巨大进步,但术后生存率仍不容乐观,其发生发展的机制仍有待进一步研究和探讨.近年来,microRNAs(miRNAs)在肿瘤中的作用机制成为科研热点.miRNAs是新近发现的一组天然丰富的小RNA,长度约17-25个核苷酸^[2].大量研究证明,miRNAs在肿瘤的发生发展过程中扮演着癌基因或抑癌基因的角色^[3].mir-183是miRNAs家族的一员,有研究指出,mir-183的异常表达与肿瘤发生发展有关^[4-8].但是,有关mir-183的高表达在ESCC的发生发展过程中的作用及其机制研究尚处于初步阶段.在中国,ESCC是主要病理类型,食管腺癌(esophageal adenocarcinoma, EAC)主要发生于西方国家^[9].本试验运用RT-PCR法检测53例ESCC组织及相应癌旁正常组织中mir-183的表达状况,来探讨原发性ESCC患者组织中mir-183的表达状况及其与食管癌临床病理特征以及预后之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 本试验采用53例ESCC组织及相应癌旁正常组织,病例来自于2009-02/2010-09浙江省肿瘤医院食管癌手术后组织标本;癌旁正常组织取自肿瘤边缘5 cm外区域,为肉眼下正常组织.上述组织切除后,快速用液氮冷冻并储存在-80℃冰箱中用作RNA提取.全部肿瘤组织均经病理诊断为鳞状细胞癌,肿瘤分级、TNM分期分别按照2009年国际抗癌联盟(international union against cancer, UICC)的标准:其中高中分化($n = 41$),低分化($n = 12$);I/II期($n = 22$),III/IV期($n = 31$);上中段病变($n = 14$),下段病变($n = 39$);伴有淋巴结转移($n = 33$),无淋巴结转移($n = 20$).所有肿瘤患者中,男性($n = 45$),女性($n = 8$),年龄44-74岁[≥ 60 岁($n = 24$), < 60 岁

($n = 29$)].术前均未接受化疗或放疗.对本试验中53例ESCC患者进行术后随访,随访时间截止2011-05-10. RNA提取试剂盒MiRNeasy Mini Kit购于Qiagen公司,琼脂糖、0.5%TBE液、EB液、反转录试剂盒PrimeScript[®] miRNA cDNA Synthesis Kit(D350A)和real time RT-PCR试剂盒SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II(DRR081A)购于TaKaRa公司.引物由上海Invitrogen公司合成. Real time RT-PCR上游引物序列: mir-183: 5'-TATGGCACTGGTAGAATTCACT-3', U6: 5'-CGCTTCGGCAGCACATA TAC-3',下游通用引物由反转录试剂盒PrimeScript[®] miRNA cDNA Synthesis Kit(D350A)提供.

1.2 方法

1.2.1 总RNA提取:按照MiRNeasy Mini Kit试剂盒说明书提取肿瘤组织及对应的正常组织的总RNA,紫外分光光度计测量,判定所取总RNA的浓度和纯度,要求吸光度值(A) $A_{260}/A_{280} > 1.8$.取1 μ L 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.

1.2.2 逆转录:取1 μ g总RNA使用PrimeScript[®] miRNA cDNA Synthesis Kit试剂盒进行cDNA的合成,具体操作参照使用说明.

1.2.3 PCR扩增:real time RT-PCR的PCR扩增及溶解曲线分析均使用ABI 7500PCR仪(Applied Biosystems),采用20 μ L的反应体系,具体操作参照SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II的使用说明.反应过程具体为:50℃激活聚合酶2 min,95℃预变性1 min;95℃变性5 s,60℃退火和延伸34 s,扩增40个循环.结束后通过95℃15 s,60℃1 min,85℃15 s,60℃15 s制作溶解曲线.

统计学处理 应用SPSS17.0统计学软件;各组间率的差异统计学意义比较采用 χ^2 检验、似然比 χ^2 检验或Fisher's确切概率法;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. $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 mir-183在ESCC组织中的表达 53例ESCC标本中有22例(41.5%)出现了相对于正常食管组织的mir-183高表达($\Delta\Delta CT < -1$),8例(15.1%)低表达($\Delta\Delta CT > 1$),23例(43.4%)无明显差异($-1 < \Delta\Delta CT < 1$),mir-183在ESCC与癌旁正常食管组织中的表达差异具有统计学意义($P < 0.05$).

■研发前沿

本文主要验证mir-183在ESCC中的异常表达及其与临床病理特征及预后之间的关系. Mir-183对应靶基因及其与ESCC的发病机制的研究尚有待深入。

■相关报道

有文献指出,mir-183在肿瘤中的表达异常(高/低表达),而mir-183在食管癌中高表达;mir-183与食管癌的临床病理特征相关;mir-183与食管癌的预后之间的关系的报导尚未明确。

■应用要点

有关mir-183的异常表达与ESCC的关系的研究尚处于初步阶段,深入研究和探讨mir-183在ESCC发生发展过程中的作用及其机制,将会为ESCC患者的诊断、治疗及预后提供依据。

表 1 食管癌患者组织mir-183的表达与临床病理特征的关系

临床病理特征	n	高表达	非高表达	P值
年龄				
≥60岁	24	11	13	0.561
<60岁	29	11	18	
性别				
男	48	20	28	0.943
女	5	2	3	
分化程度				
高/中	41	18	23	0.513
低	12	4	8	
肿瘤位置				
中/上段	14	5	9	0.608
下段	39	17	22	
浸润程度(T)				
T1/T2	8	4	4	0.597
T3/T4	45	18	27	
淋巴结转移(N)				
N0	20	4	16	0.013
N1/N2	33	18	15	
远处转移(M)				
M0	52	21	31	0.231
M1	1	1	0	
TNM分期				
I / II	22	6	16	0.076
III / IV	31	16	15	

mir-183的高表达与淋巴结转移有关(无淋巴结转移的ESCC组织中mir-183的高表达率为25%,有淋巴结转移的ESCC组织中mir-183高表达率为54.5%,两对比组之间的差异具有统计学意义($\chi^2 = 6.121$, $P = 0.013$),而mir-183的高表达与年龄、性别、分化程度、肿瘤位置、浸润程度、远处转移情况、TNM分期等均无统计学意义($P > 0.05$, 表1)。

2.2 mir-183在ESCC组织中的高表达与预后之间的关系 22例mir-183高表达的ESCC患者中,死亡人数12例(54.5%),而31例非高表达的ESCC患者之中死亡人数11例(35.5%); mir-183高表达的ESCC患者的中位生存时间为13.8 mo,而与之相对应的mir-183非高表达的ESCC患者的中位生存时间为19.9 mo. 2组之间的差异具有统计学意义($\chi^2 = 5.783$, $P = 0.016$, 图1)。

Cox模型回归多因素分析结果显示, mir-183的高表达与淋巴结转移、远处转移一起作为ESCC患者预后的影响因素($P < 0.05$, 表2)。

3 讨论

本试验采用real time RT-PCR方法检测了53例原

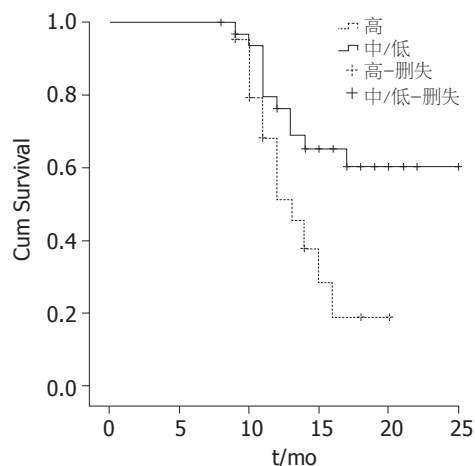


图 1 mir-183的高表达与ESCC患者的生存率。

发ESCC组织及相应的癌旁正常组织中mir-183的表达水平,并用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 分析法53例食管癌组织及正常组织中mir-183的表达差异.结果显示:相对于正常的食管组织,在53例ESCC标本中有22例(41.5%)出现了mir-183的高表达^[10-16]. mir-183在ESCC组织及其对应的癌旁正常组织中的表达差异具有统计学意义($P < 0.05$).

在与临床病理特征关系的统计学分析中发现,有淋巴结转移的ESCC标本中mir-183的高表达率明显高于无淋巴结转移组($\chi^2 = 6.121$, $P = 0.013$),说明mir-183与ESCC的淋巴结转移有关^[15-17],研究结果再次证明, mir-183基因可能在ESCC的发生发展过程中扮演癌基因的角色。

在mir-183的高表达与ESCC患者预后的相关性方面,我们对患者术后生存时间进行随访,并采用Kaplan-Meier法绘制生存曲线、对数秩检验(Log-rank test)进行生存曲线比较,分析mir-183的高表达与ESCC患者预后之间的关系.结果显示,到2011年5月随访截止时, mir-183高表达组的ESCC患者的死亡率高于非高表达组, mir-183高表达组的ESCC患者的中位生存时间明显比非高表达组短($\chi^2 = 5.783$, $P = 0.016$). ESCC患者预后的Cox模型回归多因素分析结果显示, mir-183的高表达与淋巴结转移、远处转移一起作为ESCC患者预后的影响因素($P < 0.05$).因此,本研究结果更直接证实了mir-183的高表达可能是ESCC患者的一个预后不良因素。

总之, mir-183的高表达在ESCC中是一个高发事件, mir-183的高表达与ESCC患者的淋巴结转移及不良预后之间的差异具有统计学意义,因此mir-183可能是ESCC的预后因子之一.有关mir-183的高表达与ESCC的关系的研究尚处于

表 2 mir-183的高表达与临床病理特征的COX多因素分析

Factors	B	SE	Wald	P值	Exp(B)	95 % CI用于Exp(B)	
						下部	上部
淋巴结转移	0.790	0.752	1.102	0.024	2.203	0.054	9.627
远处转移	2.424	1.168	4.310	0.038	11.290	1.145	111.305
TNM分期	0.728	1.007	0.522	0.470	2.070	0.288	14.888
mir-183高表达	1.144	0.517	4.895	0.027	3.138	1.139	8.642

初步阶段, 深入研究和探讨mir-183在ESCC发生发展过程中的作用及其机制, 将有可能为ESCC患者的早期诊断、临床治疗及预后评估提供更多理论依据。

4 参考文献

- Wang J, Wang Q, Liu H, Hu B, Zhou W, Cheng Y. MicroRNA expression and its implication for the diagnosis and therapeutic strategies of gastric cancer. *Cancer Lett* 2010; 297: 137-143
- Zhou SL, Wang LD. Circulating microRNAs: novel biomarkers for esophageal cancer. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 2348-2354
- Nishida N, Yokobori T, Mimori K, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Ishii H, Doki Y, Kuwano H, Mori M. MicroRNA miR-125b is a prognostic marker in human colorectal cancer. *Int J Oncol* 2011; 38: 1437-1443
- Gokhale A, Kunder R, Goel A, Sarin R, Moiyadi A, Shenoy A, Mamidipally C, Noronha S, Kannan S, Shirsat NV. Distinctive microRNA signature of medulloblastomas associated with the WNT signaling pathway. *J Cancer Res Ther* 2010; 6: 521-529
- Zhu W, Liu X, He J, Chen D, Hunag Y, Zhang YK. Overexpression of members of the microRNA-183 family is a risk factor for lung cancer: a case control study. *BMC Cancer* 2011; 11: 393
- Han Y, Chen J, Zhao X, Liang C, Wang Y, Sun L, Jiang Z, Zhang Z, Yang R, Chen J, Li Z, Tang A, Li X, Ye J, Guan Z, Gui Y, Cai Z. MicroRNA expression signatures of bladder cancer revealed by deep sequencing. *PLoS One* 2011; 6: e18286
- Yamada Y, Enokida H, Kojima S, Kawakami K, Chiyomaru T, Tatarano S, Yoshino H, Kawahara K, Nishiyama K, Seki N, Nakagawa M. MiR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology. *Cancer Sci* 2011; 102: 522-529
- Cho YJ, Tsherniak A, Tamayo P, Santagata S, Ligon A, Greulich H, Berhoukim R, Amani V, Goumnerova L, Eberhart CG, Lau CC, Olson JM, Gilbertson RJ, Gajjar A, Delattre O, Kool M, Ligon K, Meyerson M, Mesirov JP, Pomeroy SL. Integrative genomic analysis of medulloblastoma identifies a molecular subgroup that drives poor clinical outcome. *J Clin Oncol* 2011; 29: 1424-1430
- Rawnaq T, Kleinhans H, Uto M, Schurr PG, Reichelt U, Cataldegirmen G, Gawad KA, Yekebas EF, Schachner M, Izbicki JR, Kaifi JT. Subset of esophageal adenocarcinoma expresses adhesion molecule I1 in contrast to squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2009; 29: 1195-1199
- Sacheli R, Nguyen L, Borgs L, Vandenbosch R, Bodson M, Lefebvre P, Malgrange B. Expression patterns of miR-96, miR-182 and miR-183 in the development inner ear. *Gene Expr Patterns* 2009; 9: 364-370
- Hannafon BN, Sebastiani P, de Las Morenas A, Lu J, Rosenberg CL. Expression of microRNA and their gene targets are dysregulated in preinvasive breast cancer. *Breast Cancer Res* 2011; 13: R24
- Li J, Fu H, Xu C, Tie Y, Xing R, Zhu J, Qin Y, Sun Z, Zheng X. miR-183 inhibits TGF-beta1-induced apoptosis by downregulation of PDCD4 expression in human hepatocellular carcinoma cells. *BMC Cancer* 2010; 10: 354
- Goeppert B, Schmezer P, Dutruel C, Oakes C, Renner M, Breinig M, Warth A, Vogel MN, Mittelbronn M, Mehrabi A, Gdynia G, Penzel R, Long-erich T, Breuhahn K, Popanda O, Plass C, Schirmacher P, Kern MA. Down-regulation of tumor suppressor A kinase anchor protein 12 in human hepatocarcinogenesis by epigenetic mechanisms. *Hepatology* 2010; 52: 2023-2033
- Schaefer A, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I, Stephan C, Jentzmik F, Miller K, Lein M, Kristiansen G, Jung K. Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *Int J Cancer* 2010; 126: 1166-1176
- Sarver AL, Li L, Subramanian S. MicroRNA miR-183 functions as an oncogene by targeting the transcription factor EGR1 and promoting tumor cell migration. *Cancer Res* 2010; 70: 9570-9580
- Abraham D, Jackson N, Gundara JS, Zhao J, Gill AJ, Delbridge L, Robinson BG, Sidhu SB. MicroRNA profiling of sporadic and hereditary medullary thyroid cancer identifies predictors of nodal metastasis, prognosis, and potential therapeutic targets. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 4772-4781
- Li J, Liang SH, Lu X. [Potential role of ezrin and its related microRNA in ovarian cancer invasion and metastasis]. *Zhonghua Fuchanke Zazhi* 2010; 45: 787-792

同行评价

本文设计合理, 方法可靠, 图表真实, 结果可信. 对于进一步研究mir-183在食管鳞癌发生发展中的作用和机制有重要的参考意义。

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利