

mir-21在食管鳞癌中的表达及其与临床病理行为的关系

赵俊刚, 任开明, 汤隽, 张磊

赵俊刚, 任开明, 汤隽, 张磊, 中国医科大学附属盛京医院胸外科 辽宁省沈阳市 110004

赵俊刚, 博士, 副教授, 主要从事胸外伤、肺部肿瘤、食管肿瘤、纵隔肿瘤的基础与临床研究。

辽宁省博士科研启动基金资助项目, No. 20091108

作者贡献分布: 此课题由赵俊刚设计; 研究过程由赵俊刚与任开明操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由汤隽提供; 数据分析由赵俊刚、汤隽及张磊完成; 本论文写作由赵俊刚与张磊完成。

通讯作者: 赵俊刚, 副教授, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院胸外科。

zhaoy3@si-hospital.org

电话: 024-66601267

收稿日期: 2012-11-14 修回日期: 2012-12-07

接受日期: 2012-12-20 在线出版日期: 2012-12-28

Relationship between mir-21 expression and clinical and pathological features of esophageal squamous cell carcinoma

Jun-Gang Zhao, Kai-Ming Ren, Jun Tang, Lei Zhang

Jun-Gang Zhao, Kai-Ming Ren, Jun Tang, Lei Zhang, Department of Thoracic Surgery, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Supported by: the Doctor Startup Foundation for Docotors of Liaoning Province, No. 20091108

Correspondence to: Jun-Gang Zhao, Associate Professor, Department of Thoracic Surgery, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. zhaoy3@si-hospital.org

Received: 2012-11-14 Revised: 2012-12-07

Accepted: 2012-12-20 Published online: 2012-12-28

Abstract

AIM: To investigate mir-21 expression in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and to analyze its relationship with the clinical and pathological features of ESCC.

METHODS: Real-time RT-PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method were used to detect the expression of mir-21 in 96 cases of ESCC and tumor-adjacent tissue. The relationship between expression of mir-21 and clinical and pathological features of ESCC was analyzed.

RESULTS: Of 96 cases of ESCC specimens, mir-21 was highly expressed in 40 cases (41.6%). High mir-21 expression was closely related with

the degree of tumor differentiation and TNM stage (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: The high expression of mir-21 may play an important role in the occurrence and development of ESCC.

Key Words: Esophageal squamous cell carcinoma; Real-time RT-PCR; MicroRNA-21

Zhao JG, Ren KM, Tang J, Zhang L. Relationship between mir-21 expression and clinical and pathological features of esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(36): 3773-3776

摘要

目的: 探讨原发性食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)组织中mir-21的表达及其与ESCC临床病理行为的关系。

方法: 应用Real-time RT-PCR法及 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 分析法检测ESCC患者组织及相对应癌旁组织中mir-21的表达及其与ESCC临床病理行为的关系。

结果: 96例ESCC标本中, 40例(41.6%)mir-21存在高表达, mir-21高表达与患者分化程度、淋巴结转移及TNM分期密切相关(均 $P < 0.05$)。

结论: 在原发性ESCC中, mir-21有较高的表达率, 与肿瘤的分化程度、淋巴结转移及TNM分期密切相关, 可能在ESCC的发生发展中有重要作用。

关键词: 食管鳞癌; Real-time RT-PCR; MicroRNA-21

赵俊刚, 任开明, 汤隽, 张磊. mir-21在食管鳞癌中的表达及其与临床病理行为的关系. *世界华人消化杂志* 2012; 20(36): 3773-3776

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3773.asp>

0 引言

食管癌是世界范围内第6大导致死亡的恶性肿瘤, 在我国居第1位, 并且80%以上是食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC),

■背景资料

miRNAs在恶性肿瘤的发生发展中扮演重要角色。mir-21是miRNAs家族成员, 有研究表明mir-21与恶性肿瘤的发生发展关系密切, 但mir-21与ESCC的关系尚不明确。

■同行评议者

姜春萌, 教授, 主任, 大连医科大学附属第二医院消化科; 郭炜, 教授, 河北医科大学第四医院河北省肿瘤医院病理研究室; 李瑗, 教授, 广西肿瘤医院实验研究部

■研究前沿

本研究运用Real-time RT-PCR及 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析法,检测96例ESCC组织及相对应癌旁组织中mir-21的表达变化,探讨原发性ESCC患者组织中mir-21的表达情况及其与ESCC临床病理行为的关系。

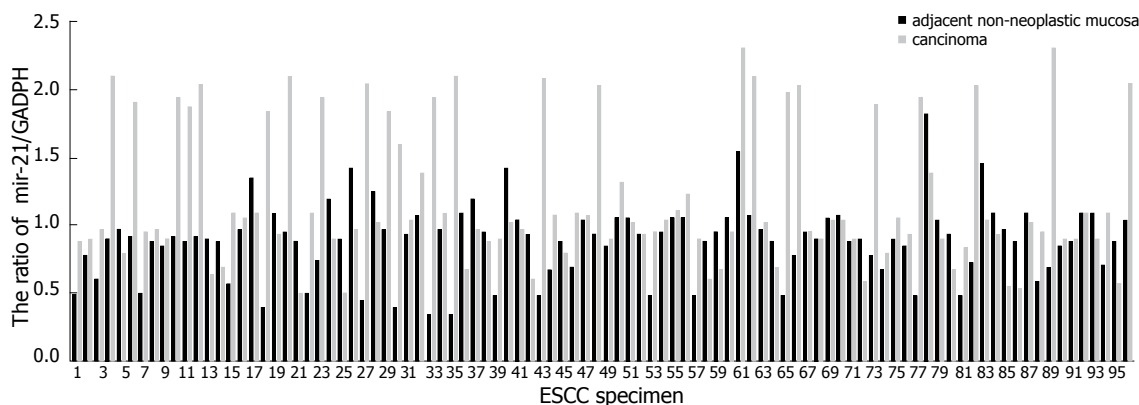


图1 mir-21在食管鳞癌组织和相对应癌旁组织中的表达水平。

随着基础及临床研究的进展,ESCC的治疗有一定进步,但术后生存率仍不容乐观^[1,2]。MicroRNAs(miRNAs)是最近发现的一组天然丰富的小RNA,长度为17-25个核苷酸^[3]。大量研究提示及证实miRNAs在恶性肿瘤的发生发展中扮演重要角色^[4]。mir-21是miRNAs家族成员,有研究表明mir-21与恶性肿瘤的发生发展关系密切^[5,6],但mir-21与ESCC的关系尚不明确。本研究运用Real-time RT-PCR及 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析法,检测96例ESCC组织及相对应癌旁组织中mir-21的表达变化,探讨ESCC患者组织中mir-21的表达情况及其与ESCC临床病理行为的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2006-09/2011-09中国医科大学附属盛京医院胸外科食管癌手术切除标本96例。癌旁组织取自距肿瘤边缘5 cm以上食管黏膜组织,并且经病理诊断证实为癌旁正常食管组织。其中男69例,女27例,年龄42-79岁(中位年龄63.2岁)。按照国际抗癌联盟(UICC)2009年标准,高中分化71例,低分化25例。病变位于食管上中段27例,下段69例。伴有淋巴结转移53例,无淋巴结转移43例。TNM分期I/II期45例,III/IV期51例。全部肿瘤标本术后病理诊断为鳞状细胞癌,所有患者术前未接受放化疗。上述组织切除后,用液氮冷冻并放置于-80℃冰箱中备用。RNA提取试剂盒购自Qiagen公司;反转录试剂盒购自Promega(美国)公司;RT-PCR试剂盒购自TakaRa(日本)公司,引物由南京金斯瑞公司提供。

1.2 方法 总RNA提取和Real-time RT-PCR检测mir-21的表达:总RNA采用TRIzol reagent提取,按照说明书的操作方法进行常规操作;然后使用RevertAid™ reverse transcriptase将这些RNA样品逆转录为cDNA。然后进行PCR扩增,反应

条件:50℃ 2 min, 95℃ 10 min, 95℃ 15 s, 50个循环, 60℃ 1 min。GAPDH作为内参,上游引物:5'-CAATGACCCCTTCATTGACC-3',下游引物:5'-TGGAAGATGGTGTATGGGATT-3'; mir-21上游引物:5'-TGACCACAGTCCATGCCATC-3',下游引物:5'-CCACCCTGTTGCTGTAGCC-3'。

统计学处理 GAPDH mRNA作为内参来监控,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算ESCC与癌旁组织胞之间目标miRNA表达水平的差异, mir-21的mRNA水平表示为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$,其中 $\Delta Ct = Ct_{(mir-21)} - Ct_{(GAPDH)}$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(肿瘤组织)} - \Delta Ct_{(正常组织)}$,采用SPSS11.5统计学软件,使用Student's *t*-test进行数据统计。以 $P < 0.05$ 判定有显著统计学意义。

2 结果

2.1 mir-21在ESCC组织中的表达 我们通过Real-time RT-PCR方法检测了96例ESCC标本组织及相对应癌旁组织中mir-21的表达情况,在96例ESCC标本中有40例(41.6%)出现了相对于癌旁组织的mir-21高表达($\Delta\Delta Ct < -1$)。14例(14.6%)出现了低表达($\Delta\Delta Ct > 1$)。42例(43.7%)表达无明显差异($-1 < \Delta\Delta Ct < 1$)。mir-21在ESCC及相对应癌旁组织中的表达差异有统计学意义($P < 0.05$,图1)。

2.2 mir-21的表达与ESCC临床病理行为的关系 经统计学分析发现, mir-21的高表达与患者分化程度、淋巴结转移及TNM分期密切相关,有淋巴结转移的ESCC标本中mir-21的表达明显高于无淋巴结转移组($\chi^2 = 5.913$, $P < 0.05$),低分化组ESCC标本中mir-21的表达明显高于高分化组($\chi^2 = 5.647$, $P < 0.05$),与患者的年龄、性别和肿瘤的位置无关(表1)。

3 讨论

许多miRNA可作为原癌基因或抑癌基因,在

■相关报道

Wong等发现,在原发性胶质母细胞瘤组织中mir-21表达上调,证明mir-21不仅影响神经胶质瘤的形成,还能抑制神经胶质瘤对化疗药物的敏感性。

表1 食管鳞癌患者组织中mir-21的表达与食管鳞癌临床病理行为的关系

临床资料	n	mean ± SD	P值
年龄(岁)			>0.05
≥60	63	0.9927 ± 0.1312	
<60	33	0.7275 ± 0.2039	
性别			>0.05
男	69	0.9735 ± 0.1513	
女	27	0.8279 ± 0.1987	
分化程度			0.039
低	25	1.5031 ± 0.5832	
中、高	71	0.7402 ± 0.0401	
肿瘤位置			>0.05
食管上中段	27	1.2135 ± 0.4423	
下段	69	1.0321 ± 0.2578	
淋巴转移			0.026
N0	43	0.8313 ± 0.0399	
N1/N2	53	1.6234 ± 0.7232	
TNM分期			0.017
I / II	45	1.3372 ± 0.4989	
III / IV	51	1.5343 ± 0.5129	

肿瘤的发生发展中扮演着重要的角色^[7,8], 其中mir-21最受人重视^[9], 大量实验证明在多种肿瘤细胞中mir-21的表达均出现显著异常, 揭示mir-21作为一个致癌的miRNA^[10], 在多种肿瘤的发生发展中起重要作用, mir-21可以抑制细胞凋亡而促进肿瘤增殖^[11,12].

Wong等^[13]发现, 在原发性胶质母细胞瘤组织中mir-21表达上调, 证明mir-21不仅影响神经胶质瘤的形成, 还能抑制神经胶质瘤对化疗药物的敏感性. Kurashige等^[14]发现ESCC患者血清中mir-21表达下调, 化疗敏感者mir-21的水平明显下降, 提示血清mir-21的表达水平可能成为潜在的ESCC诊断生物标志物, 也可能作为化疗的反应标志物.

本研究采用Real-time RT-PCR法检测了96例ESCC患者组织中及相对应癌旁组织中mir-21的表达, 并用2^{-ΔΔCt}分析法分析96例ESCC患者组织及癌旁组织中mir-21的表达差异情况. 结果显示, 相对于癌旁组织, 96例ESCC标本中有40例(41.6%)出现mir-21的高表达, mir-21在ESCC及相对应癌旁组织中的表达差异有统计学意义. 研究结果表明, 在原发性ESCC中, mir-21有较高的表达率, 与肿瘤的分化程度、淋巴结转移及TNM分期密切相关, mir-21基因在ESCC发生发展中可能扮演着癌基因的角色.

mir-21与ESCC的关系的研究尚处于初步阶

段, 对其深入研究有助于ESCC发生发展机制的探索, 将可能为ESCC的早期诊断、临床诊疗、提高化疗敏感性、提供更多理论依据^[15,16].

4 参考文献

- Hao M, Chen X, Zhang T, Shen T, Xie Q, Xing X, Gu H, Lu F. Impaired nuclear export of tumor-derived c-terminal truncated cyclin D1 mutant in ESCC cancer. *Oncol Lett* 2011; 2: 1203-1211
- Hasan R, Chauhan SS, Sharma R, Ralhan R. siRNA-mediated downregulation of TC21 sensitizes esophageal cancer cells to cisplatin. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 4127-4135
- Das N. MicroRNA Targets - How to predict? *Bioinformatics* 2012; 8: 841-845
- Wan SM, Lv F, Guan T. Identification of genes and microRNAs involved in ovarian carcinogenesis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13: 3997-4000
- Kanaan Z, Rai SN, Eichenberger MR, Roberts H, Keskey B, Pan J, Galandiuk S. Plasma miR-21: a potential diagnostic marker of colorectal cancer. *Ann Surg* 2012; 256: 544-551
- Han M, Wang Y, Liu M, Bi X, Bao J, Zeng N, Zhu Z, Mo Z, Wu C, Chen X. MiR-21 regulates epithelial-mesenchymal transition phenotype and hypoxia-inducible factor-1α expression in third-sphere forming breast cancer stem cell-like cells. *Cancer Sci* 2012; 103: 1058-1064
- Jiao A, Slack FJ. MicroRNAs Micromanage Themselves. *Circ Res* 2012; 111: 1395-1397
- Leonardo TR, Schultheisz HL, Loring JF, Laurent LC. The functions of microRNAs in pluripotency and reprogramming. *Nat Cell Biol* 2012; 14: 1114-1121
- Bose D, Jayaraj G, Suryawanshi H, Agarwala P, Pore SK, Banerjee R, Maiti S. The tuberculosis drug streptomycin as a potential cancer therapeutic: inhibition of miR-21 function by directly targeting its precursor. *Angew Chem Int Ed Engl* 2012; 51: 1019-1023
- Li Y, Li W, Ouyang Q, Hu S, Tang J. Detection of lung cancer with blood microRNA-21 expression levels in Chinese population. *Oncol Lett* 2011; 2: 991-994
- Tavano F, di Mola FF, Piepoli A, Panza A, Copetti M, Burbaci FP, Latiano T, Pellegrini F, Maiello E, Andriulli A, di Sebastiano P. Changes in miR-143 and miR-21 expression and clinicopathological correlations in pancreatic cancers. *Pancreas* 2012; 41: 1280-1284
- Han L, Yue X, Zhou X, Lan FM, You G, Zhang W, Zhang KL, Zhang CZ, Cheng JQ, Yu SZ, Pu PY, Jiang T, Kang CS. MicroRNA-21 expression is regulated by β-catenin/STAT3 pathway and promotes glioma cell invasion by direct targeting RECK. *CNS Neurosci Ther* 2012; 18: 573-583
- Wong ST, Zhang XQ, Zhuang JT, Chan HL, Li CH, Leung GK. MicroRNA-21 inhibition enhances in vitro chemosensitivity of temozolomide-resistant glioblastoma cells. *Anticancer Res* 2012; 32: 2835-2841
- Kurashige J, Kamohara H, Watanabe M, Tanaka Y, Kinoshita K, Saito S, Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Baba Y, Baba H. Serum microRNA-21 is a novel biomarker in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 2012; 106: 188-192
- Cai EH, Gao YX, Wei ZZ, Chen WY, Yu P, Li K. Se-

■创新盘点

探讨原发性ESCC患者组织中mir-21的表达情况及其与ESCC临床病理行为的关系.

■应用要点

mir-21与ESCC的关系的研究尚处于初级阶段, 对其深入研究有助于ESCC发生发展机制的探索, 将可能为ESCC的早期诊断、临床诊疗、提高化疗敏感性、提供更多理论依据.

■同行评价

本文探讨食管鳞癌组织中mir-21的表达及其与ESCC临床病理行为的关系,文章有一定的新颖性、科学性和可读性。

rum miR-21 expression in human esophageal squamous cell carcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13: 1563-1567

16 Zhu L, Yan W, Rodriguez-Canales J, Rosenberg AM,

Hu N, Goldstein AM, Taylor PR, Erickson HS, Emmert-Buck MR, Tangrea MA. MicroRNA analysis of microdissected normal squamous esophageal epithelium and tumor cells. *Am J Cancer Res* 2011; 1: 574-584

编辑 李军亮 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文。以下逐条陈述: (1)引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。(2)材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。(3)结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。(4)讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 第3套为^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t=4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴。(5)志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。