

• 论著 •

miR-125b 在食管鳞癌中的表达变化及临床意义

方玉松¹ 刘峻岭² 张志平¹ 王宗明¹ 尹立国¹ 许鹏¹

【摘要】 **目的** 观察 miR-125b 在食管鳞癌组织和不同分化程度的食管鳞癌细胞中的表达变化, 并分析其与食管鳞癌患者临床病理参数及预后的相关性。**方法** 体外培养不同分化程度的食管鳞癌细胞系 (KYSE410、TE-13、EC9706、KYSE510) 和人正常食管细胞系 Het-1A, 收集 89 例手术切除的食管鳞癌和癌旁组织标本及其患者的临床和随访资料。采用 qRT-PCR 检测上述组织和细胞中 miR-125b 的表达; 分析组织标本中 miR-125b 表达与患者临床病理参数及预后的相关性。**结果** 体外培养的食管鳞癌细胞中 miR-125b 表达显著低于正常食管细胞 ($P < 0.05$), 且低分化食管鳞癌细胞 (KYSE410、TE-13) 中 miR-125b 表达显著低于高分化食管鳞癌细胞 (EC9706、KYSE510) ($P < 0.05$)。食管鳞癌组织中 miR-125b 表达显著低于癌旁组织 ($P < 0.05$), 且其 miR-125b 低表达与 pTNM 分期、淋巴结转移及肿瘤分化程度相关 ($P < 0.05$)。生存分析显示 miR-125b 低表达患者的预后较差 ($P < 0.05$), Cox 回归分析显示 miR-125b 低表达是影响食管鳞癌患者预后的独立影响因子 ($P < 0.05$)。**结论** miR-125b 的异常低表达与食管鳞癌的发生和进展密切相关, 是影响患者预后的独立危险因素。

【关键词】 食管肿瘤; 鳞癌; miR-125b

Expression and clinical significance of miR-125b in esophageal squamous cell carcinoma Fang Yusong¹, Liu Junling², Zhang Zhiping¹, Wang Zongming¹, Yin Ligu¹, Xu Peng¹. ¹Department of Thoracic and Esophageal Surgery, ²Department of Operative Anesthesiology, Jinan Central Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250013, China
Corresponding author: Xu Peng, Email qlyxlw001@163.com

【Abstract】 **Objective** To detect the expression of miR-125b in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) tissues and differentiated ESCC cells, and to analyze its correlation with clinicopathological parameters and prognosis of ESCC patients. **Methods** ESCC cell lines including KYSE410, TE-13, EC9706, KYSE510 and human normal esophageal cell lines, Het-1A were cultured in vitro. The clinical data of 89 cases of esophageal squamous cell carcinoma and adjacent tissues were collected. The expression of miR-125b in the above tissues and cells was detected by qRT-PCR. The clinicopathological parameters and follow-up data of ESCC patients were collected, and the correlation between the expression of miR-125b in tissue samples and clinicopathological parameters and prognosis was analyzed. **Results** The expression of miR-125b in ESCC cells was significantly lower than that in human normal esophageal cells ($P < 0.05$), and the expression of miR-125b in low-differentiated ESCC cells (KYSE410, TE-13) was significantly lower than that in highly differentiated ESCC cells (EC9706, KYSE510) ($P < 0.05$). The expression of miR-125b in ESCC tissues was also significantly lower than that in adjacent tissues ($P < 0.05$), and the low expression of miR-125b was closely related to pTNM, lymph node metastasis and the degree of differentiation of tumors ($P < 0.05$). Survival analysis showed that the prognosis of patients with low expression of miR-125b was poor ($P < 0.05$). Cox regression analysis showed that low expression of miR-125b was an independent prognostic factor in patients with ESCC ($P < 0.05$). **Conclusions** The abnormal low expression of miR-125b is closely related to the occurrence and progression of ESCC, and is an independent risk factor affecting the prognosis of patients.

DOI: 10.3877/ema.j.issn.2095-8773.2019.02.06
作者单位: 250013 山东大学附属济南市中心医院胸食管外科¹, 手术麻醉科²
通讯作者: 许鹏, E-mail: qlyxlw001@163.com

【Key words】 Esophageal neoplasms ; Squamous cell carcinoma ; miR-125b

食管癌是一种高度恶性的消化系统肿瘤,病死率高,危害极大。我国是食管癌的高发地区,病理类型以食管鳞癌为主^[1]。尽管近年来手术技术和药物治疗手段取得一定的进步,但绝大多数食管癌患者仍难免死于肿瘤局部复发及远处转移,5 年总体生存率仍较低^[2]。食管癌的形成过程中牵涉到一系列基因和表观遗传学变化,具体作用机制尚不清楚。虽然近年来的研究在分子生物学水平上取得了很大的进展,发现了食管癌发生发展中许多重要的分子事件,但仍不能有效地做到早期检测、早期诊断和特异性治疗。因此,对食管癌发生、发展机制的深入研究是早期诊断和治疗食管癌、提高食管癌患者生存率的关键。

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一组由 19~25 个核苷酸组成的单链非编码小 RNA,在机体基因调控网络中发挥着重要的作用^[3]。越来越多的研究已证实 miRNA 能够调节肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭及转移能力,并且在肿瘤的早期诊断、特异性治疗及预后判断方面具有良好的前景^[4]。在食管癌的发生进展过程中目前也发现了许多异常表达的 miRNA^[5]。miR-125b 是 miRNA 家族的重要成员之一,研究显示 miR-125b 在胃癌^[6]、甲状腺癌^[7]、骨肉瘤^[8]等许多恶性肿瘤中表达异常,与肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭、转移等肿瘤生物学行为密切相关,参与了恶性肿瘤的发生、进展过程。但目前有关 miR-125b 在食管鳞癌中的研究甚少。本研究检测了 miR-125b 在食管鳞癌组织和细胞中的表达变化,并进一步分析其与患者临床病理参数及预后的关系,以期对食管癌的早期诊断及预后判断提供新的方向。

材料与方 法

一、研究对象

1. 组织标本和资料:选取 2012 年 1 月—2013 年 1 月在山东大学附属济南市中心医院行手术切除的 89 例食管癌手术标本,均经术后病理学检查确诊为鳞状细胞癌。癌组织标本取自手术切除标本中肉眼观察的肿瘤组织,癌旁组织标本取自距离肿瘤边缘至少 5 cm 的无瘤组织标本。标本离体后立即液

氮暂存,后保存于 -80 °C 冰箱待测。89 例患者均具有完整的临床病历资料,术前均未进行化疗、放疗等特殊抗肿瘤治疗,于术后开始随访,随访至患者死亡或者术后 5 年,失访及其他原因的死亡作为截尾数据。所有患者对本研究知情,并签署知情同意书,本研究经医院医学伦理委员会批准。

2. 细胞和主要试剂:人低分化食管鳞癌细胞系 KYSE410、TE-13,人高分化食管鳞癌细胞系 EC9706、KYSE510 及人正常食管细胞系 Het-1 均购自中国科学院上海细胞研究所。所有细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基(青霉素 100 mg/L、链霉素 100 mg/L),置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中,每隔 2~3 d 传代 1 次。TRIzol 试剂购自北京天根生化公司;反转录试剂盒及 PrimeScript™ RT reagent Kit 试剂盒购自大连 TaKaRa 公司;PCR 引物由广州锐博生物科技公司设计合成。

二、qRT-PCR 检测 miR-125 表达

按照 TRIzol 试剂说明书操作分别提取食管鳞癌组织、癌旁组织、食管鳞癌细胞系中的总 RNA。取 100 ng 总 RNA,按照反转录试剂盒说明书操作反转录合成 cDNA。以合成的 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 扩增,按照 PrimeScript™ RT reagent Kit 试剂盒说明书配置反应体系进行反应。反应条件:95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 34 s,扩增 40 个循环。miR-125 引物:正向:5'-TCCCTGAGACC CTA ACT TGTGA-3',反向:5'-GCGAGCACAGAATTAATA CGAC-3';内参 U6 引物:正向:5'-CTCGCTTCGGCAGCACATA TACT-3',反向:5'-ACGCTTC ACGAATTT GCGTGTC-3'。以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法表示 miR-125b 的相对表达量。

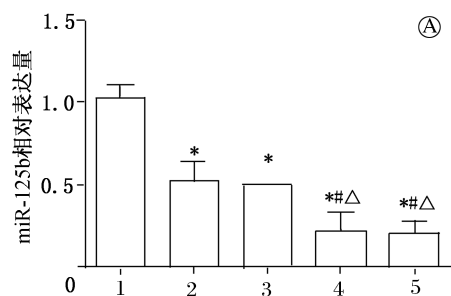
三、统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验或单因素方差分析;计数资料以 *n*(%) 表示,两组间比较采用卡方检验;采用 Kaplan-Meier 法进行生存分析,比较采用 Log-rank 检验;采用 Cox 比例风险回归模型进行多因素生存分析。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

结 果

一、miR-125b 的表达

1. 体外培养的食管鳞癌细胞和食管正常细胞: qRT-PCR 检测结果显示, 食管鳞癌细胞 (KYSE410、TE-13、EC9706、KYSE510) 中 miR-125b 的表达显著低于正常食管细胞 Het-1A ($P < 0.05$), 且在低分化食管鳞癌细胞 (KYSE410、TE-13) 中 miR-125b 的表达显著低于高分化食管鳞癌细胞 (EC9706、KYSE510) ($P < 0.05$) (图 1A)。



2. 食管鳞癌组织和癌旁组织标本

qRT-PCR 检测结果显示, 食管鳞癌组织中 miR-125b 表达水平显著低于癌旁组织 ($P < 0.05$) (图 1B)。

二、miR-125b 的表达与食管鳞癌患者临床病理参数的关系

以 miR-125b 的中值为界值, 将患者分为低表达组 45 例和高表达组 44 例。统计学分析结果显示, miR-125b 低表达与 pTNM 分期、淋巴结转移及肿瘤分化程度有关 ($P < 0.05$), 而与性别、年龄、肿瘤长度及浸润深度无关 ($P > 0.05$) (表 1)。

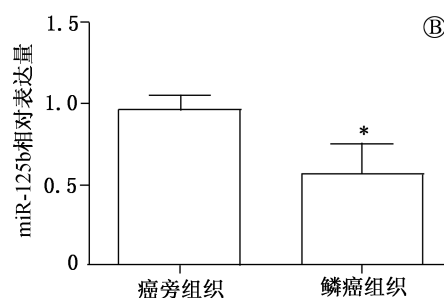


图 1 miR-125b 的表达。A. miR-125b 在体外培养的食管鳞癌细胞和食管正常细胞中的表达。1~5 分别表示 Het-1、EC9706、KYSE510、KYSE410、TE-13。与 Het-1 比较, * $P < 0.05$; 与 EC9706 比较, # $P < 0.05$; 与 KYSE510 比较, Δ $P < 0.05$ 。B. miR-125b 在食管鳞癌组织和癌旁组织中的表达。与癌旁组织比较, * $P < 0.05$

表 1 miR-125b 低表达与患者临床病理参数的关系 [n(%)]

参数	低表达组 (N=45)	高表达组 (N=44)	χ^2 值	P 值
性别			0.279	0.597
男性	32 (52.46)	29 (47.54)		
女性	13 (46.43)	15 (53.57)		
年龄/岁			1.465	0.226
≥ 60 岁	40 (53.33)	35 (46.67)		
< 60 岁	5 (35.71)	9 (64.29)		
分化程度			5.298	0.021
中高分化	22 (40.74)	32 (59.26)		
低分化	23 (65.71)	12 (34.29)		
肿瘤长度			2.589	0.108
≥ 5 cm	24 (60.00)	16 (40.00)		
< 5 cm	21 (42.86)	28 (57.14)		
pTNM 分期			5.951	0.015
I 期+II A 期	17 (37.78)	28 (62.22)		
II B 期+III 期	28 (63.64)	16 (36.36)		
淋巴结转移			8.461	0.004
有	26 (68.42)	12 (31.58)		
无	19 (37.25)	32 (62.75)		

三、食管鳞癌组织中 miR-125b 表达与患者预后的关系

Kaplan-Meier 生存分析结果显示:miR-125b 低表达组总生存率显著低于 miR-125b 高表达组 ($P < 0.05$) (图 3)。Cox 回归多因素分析显示:淋巴结转移、pTNM 分期、miR-125b 低表达是食管癌根治术后患者 预后的独立影响因子 ($P < 0.05$) (表 2)。

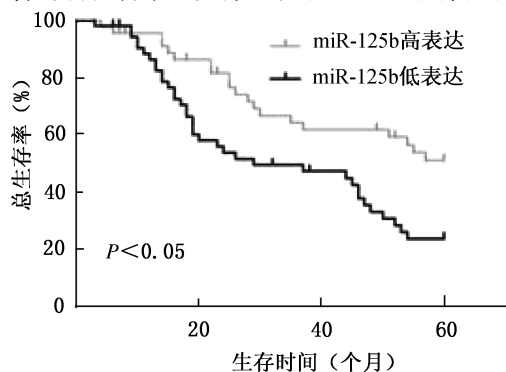


图 3 食管鳞癌患者的 Kaplan-Meier 生存曲线

表 2 影响食管鳞癌患者预后因素的 Cox 回归分析

因素	HR	95% CI	P 值
性别	1.449	0.901~2.421	0.119
年龄	1.126	0.757~1.897	0.178
分化程度	0.724	0.495~1.214	0.226
肿瘤长度	1.354	0.799~2.250	0.137
pTNM 分期	2.268	1.517~4.014	0.031
淋巴结转移	2.781	1.716~4.436	0.014
miR-125b 表达	3.147	2.358~5.578	0.009

讨 论

食管癌是目前世界范围内发病率及死亡率均较高的恶性肿瘤之一,虽然食管癌的手术治疗及放化疗方面在一定程度上取得了进步,但由于食管癌的早期诊断困难,其 5 年生存率仍没有取得明显的提高,因此寻找能够用于食管癌筛选、早期诊断及预后判断的有效的分子标志物意义重大,也是目前研究的热点问题。目前,食管癌发生发展的具体机制尚不完全明确,研究发现多种 miRNA 在恶性肿瘤中异常表达,调控恶性肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭及转移,参与肿瘤的发生发展,在肿瘤的早期诊断、预后判断方面起着重要的作用,已成为目前肿瘤研究的热点问题^[9]。研究已经证实,许多 miRNA 表达

失衡在食管癌的发生发展中发挥着重要作用,与食管癌的分期及预后密切相关^[10]。Chang 等^[11]在研究中发现 miR-655 在食管癌中表达降低,并且与食管癌的不良预后密切相关,上调 miR-655 的表达能够抑制食管癌细胞的增殖和侵袭。陈述等^[12]通过基因芯片技术对中国新疆地区食管癌组织中 miRNA 水平进行筛查,最终通过 qRT-PCR 证实 miR-181c-3p 和 miR-5692b 在食管癌组织中表达升高,并且认为 miR-181c-3p 和 miR-5692b 可作为食管癌进展和预后的潜在预测指标。

miR-125b 是近期新发现的 miRNA 家族成员之一,定位于人类染色体 19q13,研究发现其在调控肿瘤细胞增殖、凋亡、分化、侵袭及转移等众多肿瘤细胞生物学活性方面发挥着重要作用^[13]。既往研究显示 miR-125b 在胃癌^[6]、肾细胞癌^[14]等癌组织中表达增高,作为癌基因发挥作用,而在甲状腺癌^[7]、骨肉瘤^[8]、乳腺癌^[15]等癌组织中表达降低,作为抑癌基因发挥作用。因此认为,miR-125b 可能在不同的肿瘤、不同的上下游通路中发挥着不同的作用。本研究中我们通过 qRT-PCR 检测了食管鳞癌组织、癌旁组织和食管鳞癌细胞系、人正常食管细胞系中 miR-125b 的表达水平,发现 miR-125b 在食管鳞癌组织中的表达较癌旁组织明显降低,并且 miR-125b 在食管鳞癌细胞系中的表达较人正常食管细胞系明显降低,提示 miR-125b 在食管鳞癌中可能起着抑癌基因的作用。进一步统计分析发现,miR-125b 在低分化食管鳞癌细胞中的表达显著低于高分化食管鳞细胞,并且食管鳞癌组织中 miR-125b 低表达与 pTNM 分期、淋巴结转移及肿瘤分化程度相关,进一步提示 miR-125b 的异常低表达与食管鳞癌的发生发展及转移密切相关。

目前有关 miR-125b 表达异常与恶性肿瘤患者预后关系的研究较少。Wu 等^[6]在研究中发现胃癌组织中 miR-125b 的异常高表达的胃癌患者 5 年生存率较低。Li 等^[16]报道脑胶质瘤组织中 miR-125b 高表达的患者预后较差。Luo 等^[17]发现骨肉瘤患者血清中 miR-125b 低表达患者无病生存期和总生存期较短。至今尚未见 miR-125b 与食管鳞癌患者预后关系的研究报道。本研究发现,miR-125b 低表达组患者的预后较差,并且 miR-125b 低表达是影响食管癌根治术后患者预后的独立影响因子。

综上所述,miR-125b 在食管鳞癌组织和细胞中

表达异常降低,食管鳞癌中 miR-125b 的异常低表达与食管鳞癌的发生发展及预后具有相关性,为寻找食管鳞癌早期诊断及预后预测分子生物学标志物提供了新的参考。

参 考 文 献

- 1 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(1):7-30.
- 2 Miller KD, Siegel RL, Lin CC, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(4):271-289.
- 3 Gruber AR, Martin G, Müller et al. Global 3'UTR shortening has a limited effect on protein abundance in proliferating T cells [J]. Nat Commun, 2014, 5:5465.
- 4 Di Leva G, Garofalo M, Croce CM. MicroRNAs in cancer[J]. Annu Rev Pathol, 2014, 9:287-314.
- 5 Mei LL, Qiu YT, Zhang B, et al. MicroRNAs in esophageal squamous cell carcinoma: Potential biomarkers and therapeutic targets[J]. Cancer Biomark, 2017, 19(1):1-9.
- 6 Wu JG, Wang JJ, Jiang X, et al. MiR-125b promotes cell migration and invasion by targeting PPP1CA-Rb signal pathways in gastric cancer, resulting in a poor prognosis[J]. Gastric Cancer, 2015, 18(4):729-739.
- 7 Bu Q, You F, Pan G, et al. MiR-125b inhibits anaplastic thyroid cancer cell migration and invasion by targeting PIK3CD [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 88:443-448.
- 8 Wang F, Yu D, Liu Z, et al. MiR-125b functions as a tumor suppressor and enhances chemosensitivity to cisplatin in osteosarcoma[J]. Technol Cancer Res Treat, 2016, 15(6):NP105-NP112.
- 9 Pereira DM, Rodrigues PM, Borralho PM, et al. Delivering the promise of miRNA cancer therapeutics [J]. Drug Discov Today, 2013, 18(5-6):282-289.
- 10 Gu J, Wang Y, Wu X. MicroRNA in the pathogenesis and prognosis of esophageal cancer[J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(7):1292-1300.
- 11 Chang P, Wang X, Zhou Y, et al. Analysis of the correlation between the expression of miR-655 and esophageal cancer prognosis[J]. Oncol Lett, 2017, 13(6):4691-4694.
- 12 陈述,艾尼瓦尔·巴巴依,卿松,等. miR-181c-3p 和 miR-5692b 在食管癌患者中的表达水平及其临床意义[J]. 中华病理学杂志, 2015, 44(12):905-909.
- 13 刘爱飞,王金霞,等. miR-125 在恶性血液疾病中的研究进展 [J]. 中国实验血液学杂志, 2017, 25(6):1842-1846.
- 14 Jin L, Zhang Z, Li Y, et al. miR-125b is associated with renal cell carcinoma cell migration, invasion and apoptosis[J]. Oncol Lett, 2017, 13(6):4512-4520.
- 15 Hong L, Pan F, Jiang H, et al. miR-125b inhibited epithelial-mesenchymal transition of triple-negative breast cancer by targeting MAP2K7 [J]. Onco Targets Ther, 2016, 9:2639-2648.
- 16 Li X, Zheng J, Chen L, et al. Predictive and Prognostic Roles of Abnormal Expression of Tissue miR-125b, miR-221, and miR-222 in Glioma[J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(1):577-583.
- 17 Luo Z, Liu M, Zhang H, et al. Association of circulating miR-125b and survival in patients with osteosarcoma-A single center experience[J]. J Bone Oncol, 2016, 5(4):167-172.

(收稿日期:2019-02-15)

(本文编辑:王淑平)

方玉松,刘峻岭,张志平,等. miR-125b 在食管鳞癌中的表达变化及临床意义[J/CD]. 中华胸部外科电子杂志, 2019, 6(2):106-110.