

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2021.03.11

· 临床研究 ·

miR-2861 在食管鳞癌患者血清中的表达及临床意义

史露宾^{1,2}, 李世宝^{1,2}, 彭晴^{1,2}, 毛逸琪¹, 马萍²(1.徐州医科大学医学技术学院, 江苏徐州 221000; 2.徐州医科大学附属医院检验科, 江苏徐州 221000)

摘要:目的 探讨 miR-2861 在食管鳞状细胞癌(ESCC)患者血清中的表达水平,分析其与患者临床病理参数之间的关系以及对 ESCC 的诊断效能。方法 收集 ESCC、食管良性疾病及体检健康者血清样本,采用实时荧光定量 PCR 检测 miR-2861 在各组血清样本中的表达水平,并分析其与 ESCC 患者临床病理参数之间的关系;绘制 ROC 曲线评估 miR-2861 在 ESCC 中的诊断效能。结果 miR-2861 在 ESCC 患者血清中的表达水平显著高于体检健康者($P < 0.01$),但与良性疾病组相比差异无统计学意义($P > 0.05$);miR-2861 的表达水平与 ESCC 患者的分化程度及肿瘤大小有关($P < 0.01$),但与年龄、性别、淋巴结转移、神经侵犯、肿瘤标志物升高均无显著相关性($P > 0.05$);miR-2861 诊断 ESCC 的 ROC 曲线下面积(AUC^{ROC})为 0.67(95%CI:0.58~0.76),当 cut-off 值为 1.584 时,其敏感性为 87.5%,特异性为 49.41%。结论 miR-2861 在 ESCC 中高表达,并且与分化程度和肿瘤大小有关,可能作为 ESCC 潜在的诊断标志物。

关键词:miR-2861;食管鳞癌;受试者工作曲线;临床病理参数

中图分类号:R446

文献标志码:A

中国作为食管癌高发地区之一,发病率和死亡率均高于世界平均水平^[1]。根据其组织来源不同,可将其分为食管鳞癌(ESCC)和食管腺癌(EAC),在我国 ESCC 患者占比超过 90%,且预后较差,5 年生存率不足 20%^[2]。癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)、糖类抗原 19-9(carbohydrate antigen 19-9, CA19-9)作为目前临床上常用的食管癌的诊断和预后标志物,其敏感性和特异性均较低。因此,急需一种敏感性较高且容易获得的新型标志物以提高 ESCC 早期检出率。研究证实,miR-2861 在多种肿瘤中发挥着重要的作用,例如乳头状甲状腺癌^[3],宫颈癌^[4],肺癌^[5]等。然而,其在食管癌中的报道少见。本研究检测了 miR-2861 在 ESCC 患者血清中的表达水平,分析了其与患者临床病理参数的关系,并且评估其对 ESCC 的诊断效能,以期为 ESCC 诊断提供新的肿瘤标志物。

1 材料与方法

1.1 一般资料 收集 2018 年 9 月至 2019 年 6 月徐州医科大学附属医院消化内科、胸外科就诊的食管癌患者 49 例,男 41 例,女 8 例,年龄(66.0±8.4)岁。纳入标准:(1)均经病理组织活检证实为 ESCC;(2)入组前未经手术、放疗、化疗等治疗;(3)临床资料完整。排除标准:(1)合并其他肿瘤者;

(2)患有严重心、肺、肾、神经系统等疾病;(3)患有严重精神疾病者。临床分期:按国际抗癌联盟(UICC)第七版 TNM 标准分期分为 T1/T2 期 24 例,T3/T4 期 25 例;肿瘤大小:≥5 cm 22 例,<5 cm 27 例;存在淋巴结转移 21 例,无淋巴结转移 28 例;存在神经侵犯 21 例,无神经侵犯 28 例;分化程度:高分化 18 例,中、低分化 31 例;肿瘤标志物(包括 CEA、CA19-9、CA125、CA72-4、SCCA)升高:是 15 例,否 34 例。收集同期于本院消化内科就诊的食管良性疾病(主要为食管良性肿瘤、食管炎)患者 36 例,患者均经内镜检查确诊,男 31 例,女 5 例,年龄(52.9±12.6)岁;另收集同期在本院体检健康者 48 例作为健康人对照组,男 39 例,女 9 例,年龄(66.8±7.8)岁,各组的年龄、性别差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。本研究经徐州医科大学附属医院医学伦理委员会批准(XYFY2021-JS004-01),患者均知情同意。

1.2 主要仪器及试剂 TRIzol Universal 总 RNA 提取试剂(北京天根生化科技公司),逆转录试剂盒(上海同科生物科技有限公司),PCR 试剂盒(广州锐博生物技术公司)。Applied Biosystems ABI 7500 型定量 PCR 仪(美国 ABI 公司),NanoDrop 1000 分光光度计(美国 Thermo 公司)。

1.3 标本采集 使用含有分离胶的促凝采血管采

作者简介:史露宾,1993 年生,男,住院医师,硕士研究生,临床检验诊断学专业。

通信作者:马萍,主任技师,E-mail: pingm62@aliyun.com。

集各研究对象住院时(体检健康者于体检时采集)的空腹静脉血 5 mL, 2 h 内于 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min, 吸取上层血清, 置于无 RNase 的 EP 管中, 样本置-80 °C 保存。

1.4 RNA 提取及逆转录反应 按照 TRIzol Universal 总 RNA 提取试剂说明书提取血清总 RNA, 紫外分光光度计检测及浓度及纯度, 选取吸光度 ($A_{260/280\text{ nm}}$) 在 1.8~2.0 的样本用于后续实验。按照逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录为 cDNA, 标本置于-20 °C 保存。

1.5 引物设计及实时荧光定量 PCR 根据 GenBank 中 miR-2861 和内参 *U6* 基因的序列号(分别为 NR_037217 和 NR_138085), 用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 并送广州锐博生物技术公司合成^[6]。miR-2861 上游引物序列: 5'-CCTCTGCAGCTCCGGC-3', 下游引物序列: 5'-CTCTTCCGGTCTCCGCC-3', 退火温度 60 °C, 产物片段大小 82 bp。 *U6* 上游引物序列: 5'-TAGGGAGACAGGGTGCTGAA-3', 下游引物序列: 5'-AAAGCCCTTCAGGATACCGC-3', 退火温度 60 °C, 产物片段大小 94 bp。 荧光定量 PCR 反应体系为 20 μL , 包括: 2 \times SYBR Green Mix 10 μL , 上、下游引物各 0.8 μL , cDNA 2 μL , ddH₂O 6.4 μL 。 循环参数: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 2 s, 60 °C 20 s, 72 °C 34 s, 共 50 个循环。用 PCR 仪配套的 LightCycler[®] 96 分析软件在 70~95 °C 采集荧光信号。每个样本设置 3 个复孔, 以 *U6* 为内参照。结果以 Ct 值表示, miR-2861 的相对表达水平以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算。公式: $\Delta\Delta\text{Ct} = [(\text{实验组 Ct}_{\text{目的基因}} - \text{实验组 Ct}_{\text{内参基因}}) - (\text{健康人对照组 Ct}_{\text{目的基因}} - \text{健康人对照组 Ct}_{\text{内参基因}})]$ 。

1.6 统计学分析 用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析和绘图。对数据进行正态性和方差齐性分析, 符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量资料用两独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析, 组间两两比较用 SNK-*q* 检验, 率的比较用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。以食管良性疾病+体检健康者为对照组, 以 ESCC 为疾病组, 绘制 ROC 曲线评估血清 miR-2861 在食管癌诊断中的临床价值。

2 结果

2.1 miR-2861 在各组血清样本中的表达水平 miR-2861 在 49 例 ESCC 患者 (8.34 ± 7.81)、36 例食管良性疾病患者 (8.89 ± 7.98) 及 48 例体检健康者

(1.71 ± 1.70) 血清标本中的表达水平差异有统计学意义 ($F = 13.42, P < 0.001$), 进一步进行组间两两比较结果表明, ESCC 组血清 miR-2861 相对表达量与良性疾病组比较差异无统计学意义 ($t = 5.677, P > 0.05$), 但食管癌组较健康人对照组明显升高, 差异有统计学意义 ($t = 1.310, P < 0.01$)。

2.2 血清 miR-2861 的表达与 ESCC 患者临床病理参数的关系 以 ESCC 患者血清 miR-2861 相对表达量的中位数 (5.23) 为分界, 将其分为高表达组 (31 例) 和低表达组 (18 例), 分析两组与 ESCC 患者临床病理参数的关系。结果发现 miR-2861 的表达水平与年龄、性别、淋巴结转移、神经侵犯、分化程度、肿瘤标志物升高均无显著相关性 ($P > 0.05$), 但与分期、大小有关 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 血清 miR-2861 的表达与 ESCC 患者临床病理参数的关系

临床参数	n (%)	相对表达量		χ^2 值	P 值	
		高	低			
性别	男	41 (83.7)	25	16	0.122	0.725
	女	8 (16.3)	6	2		
年龄 (岁)	≥ 60	32 (65.3)	19	13	0.601	0.438
	< 60	17 (34.7)	12	5		
分期	T1+T2	25 (51.0)	12	13	5.118	0.024
	T3+T4	24 (49.0)	19	5		
大小 (cm)	≥ 5	27 (55.1)	13	14	4.553	0.033
	< 5	22 (44.9)	18	4		
淋巴结转移	是	21 (42.9)	16	5	2.642	0.104
	否	28 (57.1)	15	13		
神经侵犯	是	21 (42.9)	14	7	0.183	0.669
	否	28 (51.7)	17	11		
分化程度	高	18 (36.7)	9	9	2.154	0.142
	中低	31 (63.3)	22	9		
肿瘤标志物*	阳性	15 (30.6)	10	5	0.108	0.743
	阴性	34 (69.4)	21	13		

注: *, 任何一项肿瘤标志物升高即为肿瘤标志物阳性, 否则为阴性。

2.3 miR-2861 对 ESCC 的诊断效能评估 ROC 曲线结果显示, 血清 miR-2861 诊断 ESCC 的 ROC 曲线下面积 (AUC^{ROC}) 为 0.67 (95% CI: 0.58~0.76), 当 cut-off 值为 1.584 时, 其敏感性为 87.5%, 特异性为 49.41%。见图 1。

3 讨论

研究表明, miRNA 在食管癌组织或细胞系中的表达谱与正常组织或细胞中的表达谱存在明显差异, 为食管癌诊断提供了重要的参考价值^[7]。不同种类的 miRNA 在食管癌中的表达水平可能升高或者下降, 有望成为食管癌诊断的生物学标志物。例

如,miR-7 在食管癌患者血清标本中呈低表达,并且其表达与淋巴结转移和肿瘤大小有关,表明血清 miR-7 可能作为食管癌诊断的无创生物学标志物^[8]。与之相反的是,Lin 等^[9]通过比较 101 例食管癌患者与 97 例健康人血浆中 miR-34a 的表达水平,结果发现食管癌患者血浆 miR-34a 的表达上调,并且在早期食管癌诊断中敏感性及特异性均较高。

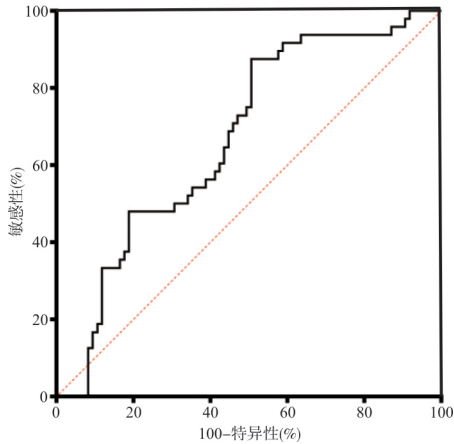


图 1 miR-2861 对 ESCC 诊断的 ROC 曲线

本研究通过实时荧光定量 PCR 检测证实了 miR-2861 在 ESCC 患者血清标本的表达水平明显升高,其可能作为致癌基因在 ESCC 中发挥作用。此外,本研究还发现,miR-2861 在 ESCC 组与食管良性疾病患者中的差异无统计学意义 ($P>0.05$),分析原因可能与纳入的食管良性疾病患者数量较少有关。笔者通过分析 miR-2861 的表达与 ESCC 患者临床病理参数之间的关系,发现 miR-2861 水平与分化程度和肿瘤大小明显相关 ($P<0.05$)。在诊断效能方面,Zheng 等^[10]通过 ROC 曲线评估 miR-155 在食管癌诊断中的临床价值,结果发现其诊断食管癌的 AUC^{ROC} 为 0.870,敏感性和特异性分别为 83.5% 和 77.5%,是食管癌患者总生存期的 1 个独立预测因子,并且可作为 ESCC 潜在的诊断标志物。本研究以食管良性疾病+体检健康者为对照组,以 ESCC 为疾病组,采用 ROC 曲线评估其诊断 ESCC 的临床效能,结果发现其敏感性为 87.5%,特异性为 49.41%,表明 miR-2861 有望作为 ESCC 潜在的新型诊断标志物。

本研究尚存在一些不足之处,例如由于实验时间有限以及随访困难,目前尚未对食管癌患者进行

跟踪采血检测 miR-2861 的变化水平,也并未在细胞水平检测 miR-2861 的表达,并分析其生物学功能。下一步我们将扩大样本量,收集患者随访资料分析预后信息,通过生物信息学方法预测并验证 miR-2861 潜在的靶基因以及可能参与的信号通路,同时进行体外和体内实验深入研究 miR-2861 在 ESCC 中的发病机制,为个性化治疗提供依据。

4 参考文献

- [1] 陈茹, 郑荣寿, 张思维, 等. 2015 年中国食管癌发病和死亡情况分析[J]. 中华预防医学杂志, 2019, 53(11): 1094-1097.
- [2] Chen YS, Lu Y, Ren YL, et al. Starvation-induced suppression of DAZAP1 by miR-10b integrates splicing control into TSC₂-regulated oncogenic autophagy in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Theranostics, 2020, 10(11): 4983-4996.
- [3] Chen FK, Yin ST, Zhu JL, et al. lncRNA DGCR5 Acts as a tumor suppressor in papillary thyroid carcinoma via sequestering miR-2861[J]. Exp Ther Med, 2019, 17(1): 895-900.
- [4] Xu JF, Wan XY, Chen XJ, et al. miR-2861 Acts as a tumor suppressor via targeting EGFR/AKT2/CCND1 pathway in cervical cancer induced by human papillomavirus virus 16 E6[J]. Sci Rep, 2016, 6: 28968.
- [5] Zhao M, Li L, Zhou J, et al. MiR-2861 behaves as a biomarker of lung cancer stem cells and regulates the HDAC5-ERK system genes[J]. Cell Reprogram, 2018, 20(2): 99-106.
- [6] Zhu LJ, Li QM, Li QM, et al. MicroRNA-2861 and microRNA-5115 regulates myocardial ischemia-reperfusion injury through the GPR30/mTOR signaling pathway by binding to GPR30[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(11): 7791-7802.
- [7] 潘蓓, 王旭鸿, 王书奎, 等. 循环 microRNA-193 簇对乳腺癌的筛查价值[J]. 临床检验杂志, 2019, 37(8): 574-578.
- [8] Dong W, Li BS, Wang J, et al. Diagnostic and predictive significance of serum microRNA-7 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Oncol Rep, 2016, 35(3): 1449-1456.
- [9] Lin YL, Lin ZY, Fang ZX, et al. Plasma MicroRNA-34a as a potential biomarker for early diagnosis of esophageal cancer[J]. Clin Lab, 2019, 65(11).
- [10] Zheng YJ, Liang TS, Wang J, et al. MicroRNA-155 acts as a diagnostic and prognostic biomarker for oesophageal squamous cell carcinoma[J]. MicArtif Cells Nanomed Biotechnol, 2020, 48(1): 977-982.

(收稿日期:2020-12-23)

(本文编辑:许晓蒙)