

食管鳞状细胞癌转移相关 miRNAs 差异表达谱分析

周萍 董贺 刘群 孙青[△]

(山东省千佛山医院, 山东 济南 250014)



孙青, 1979 级校友。山东省千佛山医院病理科主任, 医学博士, 主任医师/教授。现担任中国病理工作者委员会常委, 中国医师协会病理科医师分会常委, 山东省医师协会临床病理科医师分会主任委员, 山东省病理质量控制中心主任, 山东省医学会病理专业委员会副主任委员, 山东省抗癌协会病理专业委员会副主任委员, 山东生物化学与分子生物学会常务理事, 山东省青年医师协会理事, 山东省医疗事故鉴定委员会专家库专家。

从事临床肿瘤病理诊断和研究工作 30 年。发表核心期刊论文 50 余篇, 其中 SCI 论文 4 篇。主编、参编专著 5 部。作为承担者获省科技进步二等奖 1 项, 三等奖 1 项; 省科技创新三等奖 1 项; 作为参加者获国家科技进步二等奖 1 项, 省科技进步二等奖 2 项, 山东省卫生厅科技进步二等奖 1 项。现承担 1 项国家自然科学基金面上项目, 1 项山东省科技发展计划项目, 1 项山东省自然科学基金项目和 1 项济南市科技发展计划项目。读研究生期间曾获广东省南粤优秀研究生暨曾宪梓奖学金一等奖, 第一军医大学研究生优秀论文评比第 1 名和第一军医大学“院士杯”优秀论文奖。2001 年赴美国参加第十届国际分子病理大会并在美国国立卫生研究院(NIH)肿瘤研究中心从事博士课题研究工作。2005 年提交论文参加加拿大第 56 届病理工作者年会。2007 在美国 GEORGETOWN 大学 LOMBARDI 癌症中心从事博士后研究工作 1 年, 2008 在加拿大 CALGARY 大学医学院访问学习 3 个月。

摘要 目的 应用 microRNA 表达谱芯片技术, 选取有详细临床病理数据及随访资料的食管鳞状细胞癌组织及相应正常食管粘膜组织, 分析食管鳞癌患者有淋巴转移组和无转移组差异性表达的 miRNA。**方法** 选取 10 例新鲜冻存的食管鳞癌组织及其相应的正常食管粘膜组织, 使用 microRNA 芯片(miRCURY LNA microRNA 芯片, Exiqon 公司), 筛选出食管鳞状细胞癌组织中差异表达的 miRNA 并进行聚类分析; 运用实时定量逆转录聚合酶链反应(real time RT-PCR)验证结果的可靠性; 最后通过生物信息学分析预测其靶基因。**结果** 有淋巴转移组与无淋巴转移组相比较, 差异表达的 miRNA 共有 40 个, 其中表达上调者 miRNA 22 个, 表达下调者 miRNA 18 个, 经过聚类和 PAM 分析及 real-time RT-PCR 技术验证, 筛选出二个具有组织特异性表达的 miRNAs(miRNA-612 和 miRNA-583)。miRNA-612 的表达上调及 miRNA-583 的表达下调在有淋巴转移和无淋巴转移食管癌中差异具有显著意义。**结论** 通过 miRNA 芯片发现的相关差异性表达的 miRNA, 有可能成为食管鳞状细胞癌淋巴转移特征性的分子标志物, 并为进一步认识和研究 miRNA 在食管鳞癌发生发展中的作用, 寻找并鉴定与临床诊治相关的靶分子奠定基础。

关键词 食管鳞状细胞癌; 淋巴转移; miRNA; miRNA 芯片; 实时定量 RT-PCR

中图分类号: R7351 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9760(2012)10-387-06

The analyzation of miRNAs screening expression in esophageal squamous cell carcinoma

ZHOU Ping, DONG He, LIU Qun, et al

(Qianfoshan Hospital, Jinan 250014, China)

Abstract: Objective We selected the esophageal squamous cell carcinoma cases with detailed clinical-patho-

* [基金项目] 山东省自然科学基金面上项目(ZR2012HM085)

△ [通信作者] 孙青, E-mail: qingsw99@163.com

logical data and follow-up information. The miRNA expression profiles with miRNA microarray were investigated. The expression of miRNAs screening was analyzed between lymph node metastasis group and non-metastasis group. **Methods** 10 cases of fresh frozen samples of esophageal squamous cell carcinoma tissues and their normal tissues were selected. miRNA microarray(miRCURY LNA ? microRNA chip, Exiqon company) was used to detect differential expression of miRNAs. And the expression of miRNAs screening was analyzed. Real time quantitative PCR was applied to verify the reliability of miRNA array results. The target genes were predicted through the database of bioinformatics analysis. **Results** The expression of 40 miRNAs was different between lymph node metastasis group and non-metastasis group. 22 of them were up-regulated, and 18 of them were down-regulated. After clustering and PAM analysis and real-time RT-PCR technology demonstration, we screened out two kinds of tissue specific expression of miRNAs(miRNA-612 and miRNA-583) between lymph node metastasis group and non-metastasis group. miRNA-612 was obviously up-regulated and miRNA-583 obviously down-regulated. **Conclusion** The miRNAs detected in the miRNA microarray analysis may be characteristic molecular markers for lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. And we can get better understanding of the miRNAs' functions in the development of esophageal squamous cell carcinomas, and go further in searching for relevant target molecule of clinical diagnosis and treatment in esophageal squamous cell carcinomas.

Key words: Esophageal squamous cell carcinomas; Lymph node metastasis; MiRNA; MiRNA microarray; Real-time RT-PCR

食管癌是人类常见的恶性肿瘤之一,在世界范围内发病率居第八位,其致死率却高居第六位,其中70%发生在我国。目前食管癌临床治疗仍以手术、放疗及化疗等综合治疗为主,5年生存率不到15%^[1],肿瘤的侵袭以及转移是食管癌预后差的主要原因^[2]。

miRNAs是真核生物中一类长度约为22个核苷酸的参与基因转录后水平调控的小分子非编码RNA,通过与特定靶mRNA的3'端非翻译调控区(3'-UTR)结合,负性调控靶mRNA的转录和翻译,发挥类似于癌基因或抑癌基因的作用。

本研究运用miRNA芯片技术,通过检测分析食管鳞状细胞癌及正常黏膜组织中miRNA的表达特点,寻找食管鳞癌有淋巴结转移和无淋巴结转移患者中差异表达的miRNA,探讨其与食管癌侵袭、迁移和增殖的关系,并预测其靶基因,从分子水平探讨食管鳞癌的发病机制,从而为后续寻找潜在的与食管癌早期诊断及转移相关的分子标志物打下基础,为最终改善食管癌的治疗效果,提高其生存率提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样本的采集

选取新鲜标本组织库内冻存的食管癌肿瘤组织及相应正常食管黏膜组织共10例,其相应根治标本检查有淋巴结转移者5例,无淋巴结转移者5

例。所有样本均来自山东省千佛山医院胸外科2002年4月至2005年2月期间食管癌根治手术病人,并对所有病例进行了详细临床病理资料分析和随访观察。患者均为男性初治患者,此前未接受过其他治疗,病理类型皆为鳞状细胞癌。所有手术标本在离体后15min内取材。切取肿瘤中央区域组织,避免出血、坏死区,每块约100mg;癌旁正常黏膜组织距肿瘤边缘3~5cm以上,只切取黏膜层。所取样本标记后立即放入液氮中,然后转入-80℃超低温冰箱贮存。所有样本提取的总RNA均通过质量验证,符合芯片杂交的要求。

1.2 食管癌组织miRNA表达谱分析

本实验采用由Exiqon公司提供的商品化第5代miRCURY LNATM寡核苷酸芯片,所含miRNA探针共计1891个。

1.2.1 总RNA提取及质量检测 切取约30mg食管癌组织和食管正常组织块,Trizol法提取总RNA,紫外吸收测定法检测总RNA,以A260/A280在1.8~2.1之间的标本进行逆转录。

1.2.2 miRNA的标记与芯片杂交 采用miRCURYTM Array Power标记试剂盒,按说明将盒内试剂与样本RNA混合均匀、孵育,反应充分后加入标记缓冲液和荧光标记物(Hy3),再行孵育后,加入杂交缓冲液及核酸酶释放缓冲液。将载玻片和芯片按说明组合后放入热压缩袋,使加热收缩后注入备好的杂交液,旋转孵育过夜。次日以配套缓冲液冲洗后进行芯片扫描。

1.2.3 芯片扫描及数据处理 采用 Axon Gene-Pix 4000B 芯片扫描仪获取芯片的荧光强度,使用 GenePix pro V6.0 生物芯片扫描分析仪进行数据分析及统计处理,数据差异显著性分析采用 Volcano Plot filtering 和 PAM(Prediction Analysis of Microarrays) 结合完成;再采用 MEV software (v4.6,TIGR)对筛选出的 miRNA 进行聚类分析。根据表达水平定义高表达和低表达的 miRNAs,筛选出在食管癌淋巴结转移中上调表达的 miRNAs ($P<0.05$)。

1.2.4 实时定量 RT-PCR 验证 挑选芯片测定中上调明显的 miRNA-612,以及下调明显的 miRNA-583,使用实时定量 PCR 方法予以验证。以 U6 为内参基因进行校正和标准化。根据已知 miRNA 序列设计双向引物(见表 1)。使用芯片法中提取的样品 RNA 加入按说明调配的逆转录反应液,进行逆转录合成 cDNA 后,按照 95℃变性 10 s、60℃变性 20 s、72℃变性 20 s(收集荧光)的方法进行实时定量 PCR。建立各标本 miRNA-612、miRNA-583 及 U6 各 PCR 产物的标准曲线和熔解曲线,测量出各组标本的 Ct 值,数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析。

表 1 实时定量 PCR 引物列表

基因名	双向引物序列	退火温度 (℃)	产物长度 (bp)
U6	F:5GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT3' R:5CGCTTCACGAATTTGCGTGCAT3'	60	89
hsa-miR-612	GSP:5GCTGGGCAGGGCTTCT3' R:5CAGTGCCTGTCGTGGAGT3'	60	65
hsa-miR-583	GSP:5GGCAAAGAGGAAGGTC3' R:5TGCGTGTCGTGGAGTC3'	60	61

1.3 靶基因预测及基因功能分类

采用 TargetScans、Pictar、miRanda 和 Mir-Target2 数据库进行生物信息学分析,以四个数据库中出现 3 次以上的 miRNA 靶基因作为预测的靶基因,进行通路分析和初步基因功能分类(基因功能分析网站: Gene Ontology: <http://www.Geneontology.org/>)。

2 结果

2.1 标本 RNA 纯度及质量检测

使用分光光度计测定各标本 RNA 的 OD 值,OD260/OD280 比值为 1.8~2.01。甲醛变性琼脂糖凝胶电泳,条带分析未见明显 DNA 污染及 RNA 降解情况(见图 1)。

2.2 miRNA 芯片扫描结果

荧光强度数据进行标准化后,将有淋巴结转移组和无淋巴结转移组数据相比,计算出各 miRNA 的差异倍数,筛选出上调与下调的 microRNA。按照目前 microRNA 谱系研究常用的标准,差异倍数 >2 为明显上调,差异倍数 <0.5 为明显下调为标准,经过 t 检验($P<0.05$)后,结果显示有淋巴结转移组和无淋巴结转移组比较,差异表达的 miRNA 共有 40 个,其中上调的 miRNA 有 22 个,下调的 miRNA 有 18 个。经过聚类 and PAM 分析,并与差异倍数和 P 值比较,得到两种有显著意义的 miRNAs 即表达上调的 miRNA-612 和表达下调的 miRNA-583。

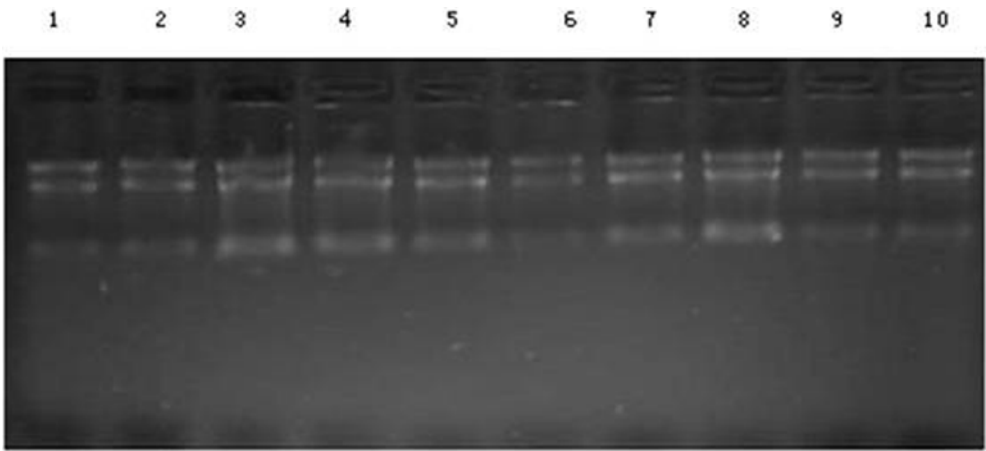


图 1 提取的总 RNA 电泳图

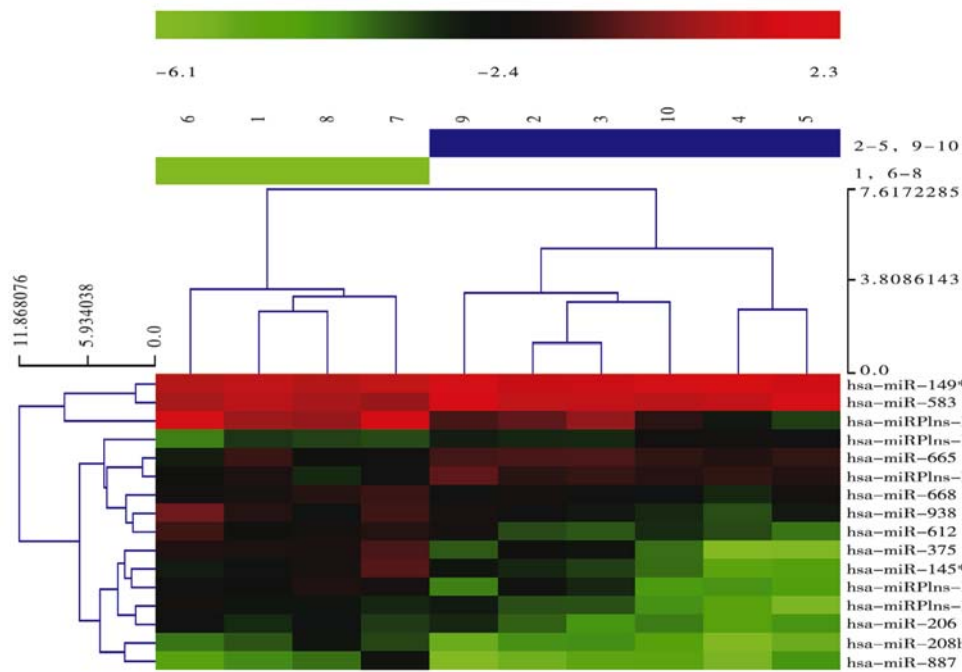


图2 淋巴结转移组比非转移组差异表达的 miRNA 聚类分析

2.3 实时定量 PCR 验证

以 U6 为内参,对 miRNA-612 及 miRNA-583 进行实时定量 PCR 验证,绘制其产物的扩增曲线,每条扩增曲线与阈值交点的横坐标为该标本产物的 Ct 值。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算结果, $2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$,表示 miRNA 表达上调, $2^{-\Delta\Delta Ct} < 1$,表示下调。有淋巴结转移组和无淋巴结转移组相比,miRNA-612 及 miRNA-583 差异倍数 > 2 ,表达差异明显。变化趋势与芯片法一致。见图 3、图 4。熔解曲线均为单峰,显示产物特异性良好。

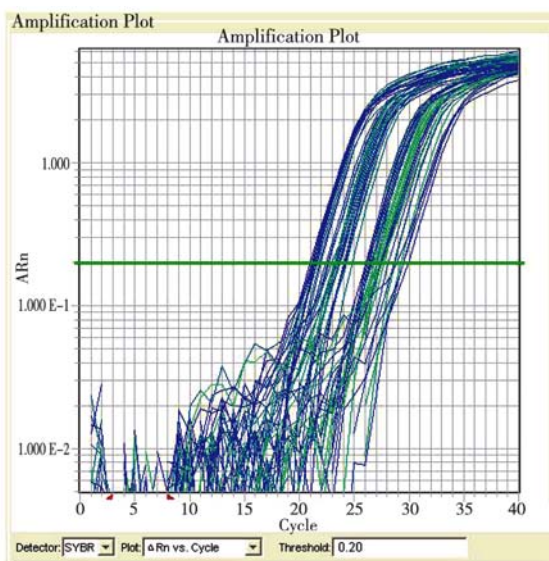


图3 miRNA-612 扩增曲线

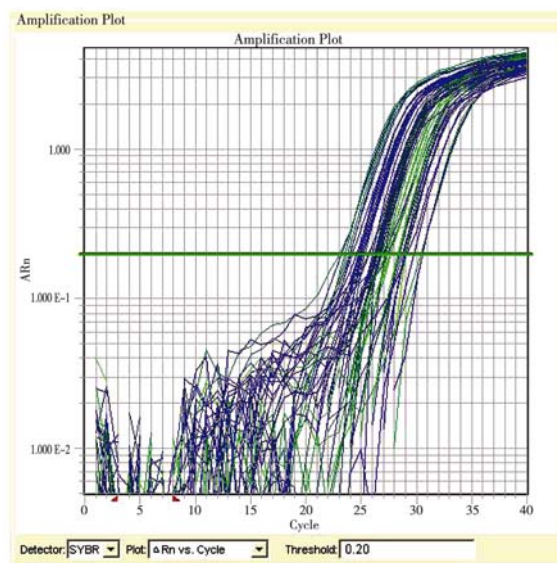


图4 miRNA-583 扩增曲线

2.4 miRNA-612 靶基因预测

通过 TargetScans、Pictar、miRanda 和 Mir-Target 2 数据库进行生物信息学分析,采用以上 4 个数据库中均有的 miRNA 靶基因作为预测的靶基因。结合既往食管鳞状细胞癌基因检测研究中证实的食管鳞状细胞癌相关基因,共筛选出 107 个预测靶基因,部分结果见表 4。其中 miR-612 共筛选出 45 个基因,miR-583 共筛选出 62 个基因。见表 4。

表 4 miR-612 及 miR-583 肿瘤相关靶基因

miRNA 名称	靶基因
miRNA-612	P53、BCL2、cIAPs、TRAFs、CytC、PPARS、RXR、PPEP、MST1、PDGFβ、VEGF、HIF-β、TGFα 等
miRNA-583	P27、P21、TCF、PPFP、MDM-2、BCL-2、TRAF5、GLI3、JAK1、KIT、IGF1 等

3 讨论

一项研究显示,超过 50% 的 miRNA 基因位于肿瘤相关的基因组区或脆性位点^[3],miRNAs 既可作为抑癌基因,下调原癌基因的活性,也可作为癌基因下调抑癌基因的活性。miRNAs 还可通过介入细胞周期、凋亡、血管生成和转移影响肿瘤的发生发展等过程^[4-5]。迄今为止,人们只是对极少数 miRNAs 及其所调控的靶基因有所了解,绝大多数 miRNAs 的功能尚不清楚,而对 miRNAs 功能的深入研究主要是寻找新的 miRNAs 及其靶序列。

miRNA 在食管鳞癌发生发展中的功能研究越来越受到人们的关注。Guo 等^[6]通过 miRNA 芯片技术首次探测到了冰冻食管癌组织中的 miRNAs 表达情况,结果显示:46 种 miRNAs 在食管癌组织中的表达明显区别于癌旁正常组织。Ferber 等^[7]研究发现 miR-194、miR-192 和 miR-200c 在食管腺癌中表达较食管鳞癌显著增高,miR-21、miR-205、miR-203 和 miR-93 则在肿瘤和正常组织中表达有显著差异,应用 miRNA 表达谱可在组织学上区分正常组织和肿瘤组织,依此可鉴别食管肿瘤。

随后越来越多的研究发现,miRNA 的异常表达与食管癌发生相关,且有可能作为一种分子标志物用于食管癌的诊断。例如,ANXA1 是抑癌基因,本身具有抑制细胞增殖以及促进细胞凋亡的作用,而 miR-196a 可能是通过抑制 ANXA1 的表达从而引发食管癌^[8]。LATS2 也是一种抑癌基因,miR-373 可能是通过抑制其下游靶基因 LATS2 的表达,从而发挥了致癌基因的作用,参与了食管鳞癌的发生^[9]。Hiyoshi 等^[10]研究表明,miR-21 不但在食管鳞癌中过表达,而且在有淋巴结转移的食管癌患者中显著高表达,miR-21 可能是通过抑制下游抑癌基因 PDCC4 的表达,从而参与了食管鳞癌的发展和侵袭。而 Tian 等^[11]在研究食管鳞癌细胞株时发现,miR-10b 通过抑制了其下游抑癌基因 KLF4 的表达,从而影响了肿瘤细胞的迁移和浸润。但是,就目前食管癌的相关研究而言,尚未发现兼具早期敏感性和组织特异性的 miRNA。

虽然 miR-205、miR-10a 和 miR-143、miR-145 对食管鳞癌显示出一定特异性^[12-13],但尚需大样本研究证实。

本课题选取 10 例有和无淋巴结转移的食管鳞状细胞癌新鲜冻存的癌组织及相应正常食管黏膜组织,采用 Exiqon 公司提供的 miRNAs 表达谱芯片通过聚类分析,共发现了 63 个差异性表达的 miRNAs,以表达差异 2 倍为标准进行筛选,发现了 42 个在癌组织中表达上调的 miRNA 和 21 个在癌组织中表达下调的 miRNA。再结合微阵列预测分析(PAM),发现在淋巴结转移和无淋巴结转移食管癌中,miRNA-612 的表达上调以及 miRNA-583 表达下调差异具有显著意义。通过 real-time RT-PCR 验证,miRNA-612 以及 miRNA-583 在区分转移和进展性食管癌方面有很好的对应性,且国内外未见相关报道。

迄今为止,人们只是对极少数 miRNAs 及其所调控的靶基因有所了解,绝大多数 miRNAs 的功能尚不清楚。已知 miRNA-612 的编码序列定位于 11 号染色体 q13.1 上,Tian S 等研究发现,其碱基序列与 miRNA-1285 相同,但不能与 P53 的 3' 非编码区结合^[14],故 miRNA-612 是一种功能及机制尚未研究清楚的 miRNAs。miRNA-583 的编码序列定位于 5 号染色体 q15 上,国内外未见其相关研究。我们对显著上调的 miRNA-612 以及下调的 miRNA-583 进行基因靶点预测表明,miRNA-612 的靶基因包括癌基因 TRAFs、PPARS、RXR、PPEP、MST1 等,抑癌基因 P53 等,凋亡相关基因 BCL2、CytC、cIAPs 等,参与 VEGF 信号通路的 VEGF、TGFα、PDGFβ 等;miRNA-583 的靶基因包括癌基因 P27、P21、TCF、PPFP、JAK1、KIT 等,抑癌基因 GLI3,凋亡相关基因 BCL2、MDM-2、TRAF5 等。上述结果提示,两种 miRNA 的作用靶点非常广泛,涉及癌基因、抑癌基因、凋亡相关基因、信号转导基因等。进一步对其进行功能和机制的研究,以期对食管癌分子靶向治疗提供新的靶点和策略。

参考文献:

- [1] 林东昕. 中国食管癌分子流行病学研究[J]. 中华流行病学杂志, 2003, 24(10): 939-943.
- [2] Furihata T, Sakai T, Kawamata H, et al. A new in vivo model for studying invasion and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma[J]. Int J Oncol, 2001, 19(5): 903-907.

(下转第 401 页)

3 讨论

近年来的研究表明,心肌缺血再灌注时,血管内皮细胞、白细胞和巨噬细胞的激活,导致多种炎症因子大量生成、释放,并介导组织细胞炎症损伤,可能是缺血再灌注损伤的重要发病机制^[2]。ICAM-1 属于黏附分子,存在于内皮细胞、白细胞、心肌细胞的表面,可使白细胞和内皮细胞发生稳定的黏附。IL-8 是最强的多形核白细胞和 T 淋巴细胞趋化因子,可使白细胞进一步与细胞外基质蛋白结合,并通过产生氧自由基和释放蛋白水解酶造成组织损伤。大量的研究表明,利多卡因可对心肌缺血再灌注损伤产生保护作用^[3-5]。通过本研究可知,利多卡因后处理可抑制血浆 ICAM-1 与 IL-8 的表达。心肌缺血可诱发心肌炎症反应,再灌注则使炎症反应加重且 I κ B 磷酸化和降解使 NF- κ B 移位,可能是急性炎症发生发展的最早启动的关键环节^[6]。NF- κ B 结合序列广泛存在于炎症介质、黏附分子如 ICAM-1、IL-8 等基因上游的启动子和增强子中,NF- κ B 活化会导致上述基因的表达。本研究发现心肌细胞在缺血再灌注时,NF- κ B 表达增加,且与 ICAM-1、IL-8 的表达呈正相关。通过免疫组化观察,NF- κ B 强阳性表达的区域其炎性

浸润严重,故推测,缺血心肌细胞再灌注时 NF- κ B 表达增加可上调炎症介质,如 ICAM-1、IL-8 合成释放增多,进而引起心肌炎症损伤。

综上所述,利多卡因可减少家兔心肌缺血再灌注时心肌组织 NF- κ B 的表达,抑制炎症介质释放反应,减轻心肌炎性损伤。

参考文献:

- [1] 王友,王保生,林丽文,等.利多卡因减轻家兔心肌缺血-再灌注炎症损伤的研究[J]. 济宁医学院学报,2012,35(2):100-102.
- [2] 金惠铭,王建枝.病理生理学[M].7 版.北京:人民卫生出版社,2008:147-149.
- [3] 雍文成,冷玉芳.利多卡因对家兔心肌缺血-再灌注损伤氧自由基及 Na⁺-K⁺-ATPase、Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase 的作用[J]. 江西医药,2008,43(7):662-663.
- [4] Azuma Y,Shinohara M,Wang PL,et al. Comparison of inhibitory effects of local anesthetics on immune functions of neutrophils[J]. Int J Immunopharmacol,2000,22(10):789-796.
- [5] 刘红亮,戴体俊,王钧,等.利多卡因对大鼠顿抑心肌 ATP 酶活性及丙二醛含量的影响[J]. 中华麻醉学杂志,2001,21(11):688-689.
- [6] 王云,渠川铮,王莉,等.抑制核转录因子减轻心肌缺血再灌注损伤[J]. 中华胸心血管外科杂志,2001,17(2):105-107.

(收稿日期 2012-10-12)

(上接第 391 页)

- [3] Calin GA,Sevignani C,Dumitru CD,et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2004,101(9):2999-3004.
- [4] Nelson KM,Weiss GJ. MicroRNAs and cancer: past, present, and potential future[J]. Mol Cancer Ther,2008,7(12):3655-3660.
- [5] Latronico MV,Catalucci D,Condorelli G. MicroRNA and cardiac pathologies[J]. Physiol Genomics,2008,34(3):239-242.
- [6] Guo Y,Chen Z,Zhang L,et al. Distinctive microRNA profiles relating to patient survival in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Res,2008,68(1):26-33.
- [7] Feber A,Xi L,Luketich JD,et al. MicroRNA expression profiles of esophageal cancer[J]. J Thorac Cardiovasc Surg,2008,135(2):255-260.
- [8] Luthra R,Singh RR,Luthra MG,et al. MicroRNA-196a targets annexin A1:a microRNA-mediated mechanism of annexin A1 downregulation in cancers[J]. Oncogene,2008,27(52):6667-6678.
- [9] Lee KH,Goan YG,Hsiao M,et al. MicroRNA-373(miR-373)

post-transcriptionally regulates large tumor suppressor, homolog 2(LATS2)and stimulates proliferation in human esophageal cancer[J]. Exp Cell Res,2009,315(15):2529-2538.

- [10] Hiyoshi Y,Kamohara H,Karashima R,et al. MicroRNA-21 regulates the proliferation and invasion in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Clin Cancer Res,2009,15(6):1915-1922.
- [11] Tian Y,Luo A,Cai Y,et al. MicroRNA-10b promotes migration and invasion through KLF4 in human esophageal cancer cell lines[J]. J Biol Chem,2010,285(11):7986-7994.
- [12] Matsushima K,Isomoto H,Kohno S,et al. MicroRNAs and esophageal squamous cell carcinoma[J]. Digestion,2010,82(3):138-144.
- [13] Wu BL,Xu LY,Du ZP,et al. MiRNA profile in esophageal squamous cell carcinoma: downregulation of miR-143 and miR-145[J]. World J Gastroenterol,2011,17(1):79-88.
- [14] Tian S,Huang S,Wu S,et al. MicroRNA-1285 inhibits the expression of p53 by directly targeting its 3' untranslated region[J]. Biochem Biophys Res Commun,2010,396(2):435-439.

(收稿日期 2012-12-07)