

血清 miR-25、miR-223 和 miR-373 作为食管鳞癌生物标志物的评价

秦建平^{1,2}, 陶娟³, 李迎迎¹, 常卫东¹, 王丽¹, 赵西茹¹, 王林嵩¹

(1. 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007; 2. 郑州金域临床检验中心, 郑州 450000;
3. 新乡医学院三全学院 生命科学技术学院, 河南 新乡 453003)

摘要:为了探讨血清 miRNA 作为诊断标志物的可行性, 利用茎环引物进行 qRT-PCR, 检测了 miR-25、miR-223 和 miR-373 在正常人血清、食管鳞癌患者术前和术后第 7 d 血清、癌组织和癌旁组织的相对表达量。实验结果表明: 术前食管鳞癌病人的 3 种血清 miRNA 相对表达量高于正常人和手术后第 7 d 病人, AUC 分别为 0.794、0.839 和 0.873, 癌组织的这 3 种 miRNA 相对表达量高于癌旁组织。这 3 种 miRNA 在食管癌患者癌组织的高表达导致血清的这 3 种 miRNA 含量增高, 因此这 3 种血清 miRNA 可以作为候选诊断标志物。

关键词:食管鳞癌; 血清; miRNA; 诊断标志物

中图分类号: Q522

文献标志码: A

食管鳞癌是消化道的主要肿瘤, 其死亡率高居肿瘤死亡率的第 6 位^[1]。我国食管癌死亡率占全世界食管癌死亡率的 50%, 究其原因主要是不能早期诊断治疗^[2]。为此, 从 20 世纪 70 年代的拉网细胞学检测, 医学影像技术, 到最近的癌细胞抗原等分子生物学标志物筛查, 科学家们在不断寻找早期诊断方法, 以图提高食管鳞癌患者的生存率^[1-2]。

MicroRNA 是一类小的非编码 RNA, 通过加速 mRNA 降解或者抑制 mRNA 翻译, 从而调控基因表达^[3]。大量有关食管鳞癌 miRNA 芯片或转录组分析表明, 许多 miRNA 与食管鳞癌有关, 例如与正常人相比血清 miR-29c 和 miR-205 表达水平在食管鳞癌病人显著下调, 而 miR-10b 显著上调^[4]。与食管鳞癌组织相比, 食管鳞癌组织中 miR-483^[5]、miR-642^[6]、miR-1308^[7]、miR-1246^[8-9] 以及 miR-665^[10] 水平显著上调, 而 miR-195^[11]、miR-126^[12] 等水平显著下调。许多研究者认为血清 miRNA 有可能作为食管鳞癌的生物标志物。

在查阅有关食管鳞癌血清 miRNA 芯片文献的基础上^[13-14], 发现大多数研究是分析患者与正常人之间血清 miRNA 变化; 或者分析肿瘤组织与癌旁组织 miRNA 变化。较少同时分析术前术后、癌组织和癌旁组织的 miRNA 表达。为此, 本实验选择 miR-25 等 3 种 miRNAs, 同时探讨它们在正常人、食管鳞癌患者手术前后血清以及食管癌组织和癌旁组织相对表达量变化等, 评价其生物标志物的可行性。

1 材料与方法

1.1 病人和样品

23 例食管鳞癌组织和癌旁组织样品、术前及术后一周血液样品分别取自 2014 年 9 月至 2015 年 5 月在河南省新乡市中心医院接受手术治疗患者。术后经病理学组织切片诊断为食管鳞癌。11 例正常人血清取自河南师范大学校医院。

收稿日期: 2016-06-20; 修回日期: 2016-12-20。

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目(16A180028); 新乡市重大科技攻关项目(ZG13002)。

作者简介: 秦建平(1979-), 男, 山东日照人, 在读硕士研究生, 研究方向为临床检验, E-mail: labqjp@kingmed.com.cn。

通信作者: 王林嵩, 博士, 教授, 研究方向为生物化学与分子生物学, E-mail: wls@htu.cn。

1.2 RNA 提取

将血液样品经 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 所取上清再经 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心 5 min, 取上清为血清样品. 所取组织样品立即放入液氮冷冻, 所有血清及组织样品均于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮存备用.

总 RNA 的提取根据 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂说明书进行, RNA 纯度使用 NanoDrop - 2000 超微量分光光度计检测. 逆转录反应采用宝生物的 PrimeScriptTM RT reagent Kit, 以总 RNA 为模板, 以 miRNAs 特异性茎环引物作为逆转录引物(见表 1), 获得 cDNA, 用于实时荧光定量 PCR 反应.

表 1 miRNAs 的茎环引物(RT)及实时定量 PCR 引物(F)序列

引物名称	引物序列
miR - 16 - 5p - RT	GTCGTATCCATGGCAGGGTCCGAGGTATTCCGCATGGATACGACCGCCAAT
miR - 16 - 5p - F	GCGGTAGCAGCACGTAATATTT
miR - 25 - 3p - RT	GTCGTATCCATGGCAGGGTCCGAGGTATTCCGCATGGATACGACTCAGAC
miR - 25 - 3p - F	CATTGCACTGTCTCGGTCT
miR - 223 - 3p - RT	GTCGTATCCATGGCAGGGTCCGAGGTATTCCGCATGGATACGACTGGGGT
miR - 223 - 3p - F	TGTCAGTTTGTCAAATACCCCA
miR - 373 - 3p - RT	GTCGTATCCATGGCAGGGTCCGAGGTATTCCGCATGGATACGACACACCC
miR - 373 - 3p - F	GAAGTCTTCGATTITGGGGTG
通用反向引物	TGGCAGGGTCCGAGGT

1.3 实时定量 PCR

PCR 反应体系体积为 $15 \mu\text{L}$, 包括 $1.5 \mu\text{L}$ 的 cDNA, $7.5 \mu\text{L}$ AceQTMqPCR SYBR[®] Green Master Mix, $0.5 \mu\text{L}$ 正向引物, $0.5 \mu\text{L}$ 通用引物, $5 \mu\text{L}$ 无菌水. 按下列条件进行反应: 预变性, $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min; 2 步法, $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s, $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, 45 个循环; $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s, $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 s, $97 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 s. miR - 16 为内参(表 1), 采用相对定量法计算血清和组织中 miRNAs 表达量. 相对表达量计算公式为 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

1.4 PCR 产物验证

用茎环引物进行 RT - PCR, 3% 的琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物, 采用凝胶回收试剂盒将符合预期大小的 PCR 产物进行回收, 并与 PMD18 - T 载体连接, 转化 DH5 α 感受态细胞, PCR 鉴定阳性克隆后, 送北京英俊公司进行测序, 将测序结果与 miRBase 公布的 miRNA 成熟序列和所设计的引物序列对进行比对分析.

1.5 统计学分析

采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析, 两样本均数用 t 检验, 术前和术后、癌组织和癌旁组织的两组间数据用 Mann - Whitney U 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结 果

2.1 血清中 3 种 miRNA 的表达水平

为了确保实验的准确性, 将所扩增的 miRNAs 进行测序, 测序结果表明所得序列与 miRNAs 文库序列一致(见图 1). 在所研究的 3 种 miRNAs 表达水平中 miR - 25 - 3p 最低(正常人为 0.18, 食管癌患者术前为 0.86, 术后为 0.41), miR - 223 - 3p 最高(正常人为 3.29, 食管癌患者术前为 7.83, 术后为 3.42). 与正常人相比, 食管癌患者这 3 种血清 miRNAs 显著增高, 手术后血清 miRNA 显著下降($P < 0.01$), 接近于正常人水平. 应用受试者工作特征曲线(Receiver operating characteristic curve, ROC)进行分析 miRNA 表达水平, 并计算 ROC 曲线下面积(Area under curve, AUC)来评估候选的 3 种血清 miRNAs 对食管鳞癌的预测能力, 在 AUC 值中, miR - 373 - 3p 最高为 0.873, miR - 25 - 3p 最低为 0.794. miR - 25 - 3p 的特异性为 81.0%, 灵敏性为 66.7%; miR - 223 - 3p 的特异性为 100.0%, 灵敏性为 61.9%; miR - 373 - 3p 的灵敏性为 90.5%, 特异性为 81.0% (详见图 2, 图 3, 图 4).

2.2 食管鳞癌组织中 3 种 miRNAs 表达水平

为了探讨食管鳞癌组织和癌旁组织中 3 种 miRNA 的表达水平, 用 qRT - PCR 检测结果表明类似于血清

miRNA 的检测结果,食管鳞癌组织中的仍然是 miR-223 相对表达水平最高,miR-25 相对表达水平最低,但是所研究的 3 种 miRNA 的癌组织的相对表达水平大多数高于癌旁组织(详见图 2C,3C,4C).

miR-16-5p 测序结果
ATTGCGGTAGCAGCACGTAAAATATTGGCGGTCTGATCCATGGCGAAT**4CCTCGG4CCCTGCCAAAT**

miR-25-3p 测序结果
CCAGAGATTCATTGCACCTTGTCTCGGTCTGAGTCGTATCCATGGCGAAT4CCTCGG4CCCTGCCAAAT

miR-223-3p 测序结果
CAGAGATTGTCAAGTTTGTCAAATACCCCAAGTCGTATCCATGGCGAAT4CCTCGG4CCCTGCCAAAT

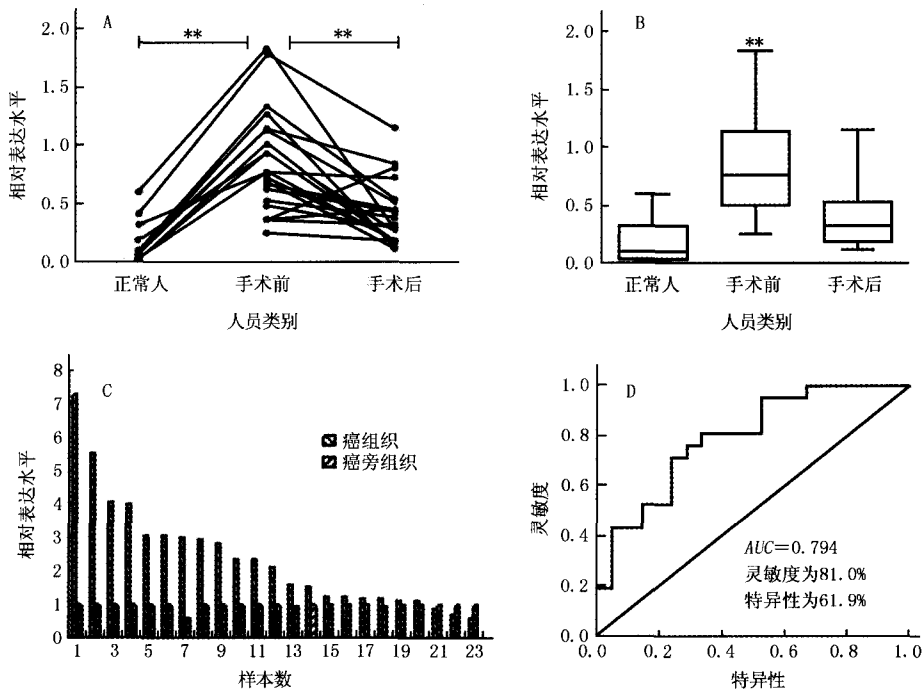
miR-373-3p 测序结果
GAGATTGAAGTGCTTCGATTTTGGGGTGTGTCGTATCCATGGCGAAT4CCTCGG4CCCTGCCAAAT

正向粗体序列代表4种miRNAs的正向引物;斜体序列代表通用引物的反向互补序列

图1 4种血清miRNAs的测序结果分析

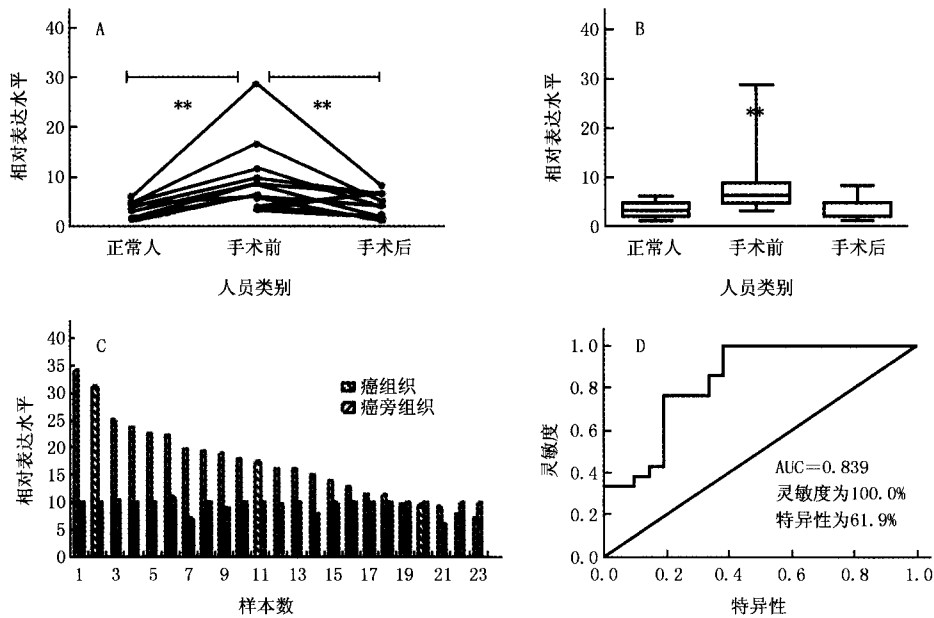
3 讨 论

作为微创诊断方法,血清 miRNA 检测越来越受到重视,相关的文献报道也越来越多.相比于 miRNA 的芯片检测的高费用,操作繁杂,周期长.qRT-PCR 的检测也逐渐增多.而在 qRT-PCR 中,Taqman 探针的检测灵敏度高,费用也高,茎环引物灵敏度相对较低但费用也相对较低,有利于推广应用^[15].选择合适的 miRNA 是关键因素,为此在本实验中我们从文献中,筛选出表达量相对较高的 3 种 miRNAs(miR-25,miR-373,miR-223)作为研究对象,并对 RT-PCR 结果进行测序,确保实验的准确性(图 1).同时,本实验 3 种血清 miRNA 检测结果与文献报道的 Taqman 探针检测结果相一致^[13-14,16-17],也说明在高表达的 miRNA 中,茎环引物可以取代 Taqman 探针用于检测血清 miRNA 表达水平.



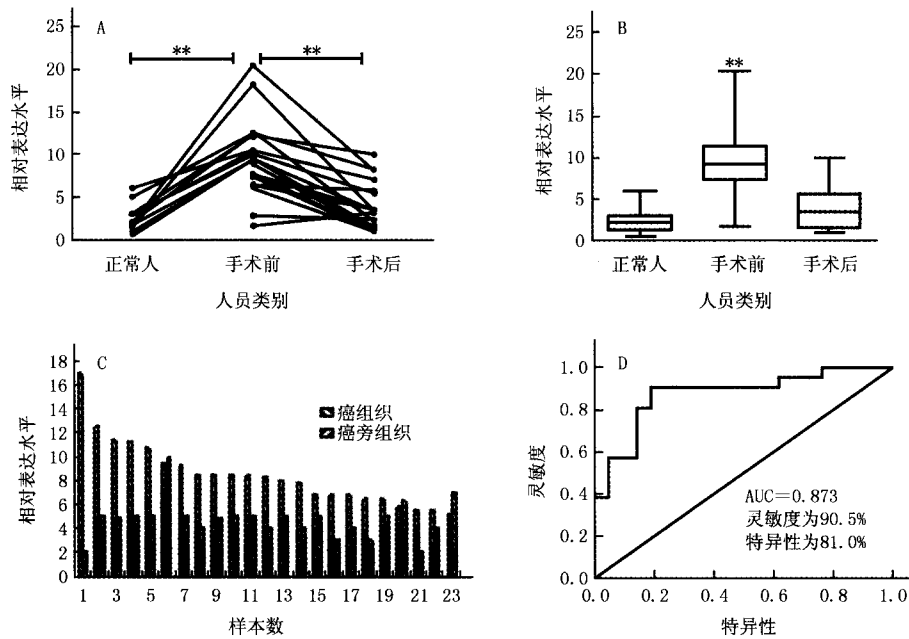
(A)miR-25-3p在正常人和食管鳞癌患者术前术后血清中的表达水平;(B)miR-25-3p在正常人和食管鳞癌患者术前术后血清中的平均表达水平;(C)miR-25-3p在食管鳞癌患者癌组织和癌旁组织中的表达水平;(D)血清 miR-25-3p的ROC曲线分析;**代表P<0.01

图2 miR-25-3p的表达水平



(A)miR-223-3p在正常人和食管鳞癌患者术前术后血清中的表达水平(B)miR-223-3p在正常人和食管鳞癌患者术前术后血清中的平均表达水平;(C)miR-223-3p在食管鳞癌患者癌组织和癌旁组织中的表达水平;(D)血清miR-223-3p的ROC曲线分析;**代表 $P<0.01$

图3 miR-223-3p的表达水平



(A)miR-373-3p在正常人和食管鳞癌患者术前术后血清中的表达水平;(B)miR-373-3p在正常人和食管鳞癌患者术前术后血清中的平均表达水平;(C)miR-373-3p在食管鳞癌患者癌组织和癌旁组织中的表达水平;(D)血清miR-373-3p的ROC曲线分析;**代表 $P<0.01$

图4 miR-373-3p的表达水平

血清 miRNA 既可以来自癌组织,也可以来自正常组织,由于血清 miRNA 容易获得,是一个相对无创的采样方式,同时在血清中 miRNA 与蛋白质、脂类、外分泌体等形成复合物,从而保持较高的稳定性,重现性好^[18],因此,许多学者通过芯片技术、RT-qPCR, Northern 杂交、原位杂交、高通量测序等检测食管鳞癌患者

的血清 miRNAs,但同时检测食管鳞癌患者的血清和组织中 miRNAs 的研究相对较少.在检测血清 miRNA 的同时,也对食管癌患者的术前、术后 7 d 的血清 miRNA 和癌组织、癌旁组织的 miRNA 进行检测.实验结果表明,3 种研究的 miRNA 在食管癌患者术前血清相对表达量高于正常人及术后血清.同样,大多数癌组织的相对表达量高于癌旁组织.这表明,血清中的这 3 种 miRNA 主要来自于组织,食管癌组织和癌旁组织均能表达这些 miRNA,并将其释放入血液.在食管癌组织,这些 miRNA 的高表达不仅说明这些 miRNA 与食管癌的病理变化有关,同时也导致了血清相应 miRNA 的高表达水平.当手术切除癌组织后,血清 miRNA 表达水平的下降,进一步说明血清 miRNA 主要来自于组织表达的释放,为这些 miRNA 作为诊断指标提供实验依据.

许多研究对血清 miRNAs 受试者工作特征曲线(ROC)进行分析,并计算 ROC 曲线下面积(AUC)来评估候选血清 miRNAs 对食管鳞癌的预测能力^[17-19].AUC 越接近 1,准确性越高^[19].本实验结果的 AUC 值有 2 个均在文献报道范围内,而有关血清 miR-373-3p 的 AUC 值尚未见文献报道^[18].其中血清 miR-25-3p 的 AUC 值最小为 0.794,血清 miR-373-3p 的 AUC 值最高为 0.873.将图 2、图 3 和图 4 综合分析不难发现,食管鳞癌患者的术前血清和癌组织的 miRNA 表达的个体差异较大,miRNA 表达水平高的 AUC 值也越高,灵敏度也越高.这进一步证明,茎环引物可以用来在临床上检测 miRNAs,同时在选择 miRNA 作为生物标志物时应选择高表达水平的 miRNA,以提高准确性和灵敏度.由于本实验中的食管癌患者均是需要手术治疗,病例临床分期大多为 TNM III 期,所以这 3 种 miRNA 作为早期食管癌诊断标志物尚需进一步研究.

参 考 文 献

- [1] FU Wenbo, PANG Lijuan, CHEN Yunzhao, et al. The microRNAs as prognostic biomarkers for survival in esophageal cancer: a meta-analysis[J]. *The Scientific World Journal*, 2014, 2014: 523979.
- [2] SONG Yongmei, LI Lin, OU Yunwei, et al. Identification of genomic alterations in oesophageal squamous cell cancer[J]. *Nature*, 2014, 509(7498): 91-95.
- [3] HAMMOND S M. An overview of microRNAs[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2015, 87: 3-14.
- [4] XU Hang, YAO Yuanfei, MENG Fanyu, et al. Predictive Value of Serum miR-10b, miR-29c and miR-205 as Promising Biomarkers in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Screening[J]. *Medicine*, 2015, 94(44): e1558.
- [5] WU Caiyun, WANG Cheng, GUAN Xiaocui, et al. Diagnostic and prognostic implications of a serum miRNA panel in oesophageal squamous cell carcinoma[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92292.
- [6] CRUZ-SANTOS M, ARAGON-RAYGOZA A, ESPINAL-CENTENO A, et al. The role of microRNAs in animal cell reprogramming[J]. *Stem Cells and Development*, 2016, 25(14): 1035-1049.
- [7] SALIDO-GUADARRAMA I, ROMERO-CORDOBA S, PERL-ZARAGOZA O, et al. MicroRNAs transported by exosomes in body fluids as mediators of intercellular communication in cancer[J]. *Onco Targets Therapy*, 2014, 7: 1327-1338.
- [8] TAKESHITA N, HOSHINO I, MORI M, et al. Serum microRNA expression profile; miR-1246 as a novel diagnostic and prognostic biomarker for oesophageal squamous cell carcinoma[J]. *British Journal of Cancer*, 2013, 108(3): 644-652.
- [9] FU Hailong, WU Deping, WANG Xiufang, et al. Altered miRNA expression is associated with differentiation, invasion and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) in patients from Huaian, China[J]. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2013, 67(2): 657-668.
- [10] ZANG Wenqiao, WANG Yuanyuan, DU Yuwen, et al. Differential expression profiling of microRNAs and their potential involvement in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Tumor Biology*, 2014, 35(4): 3295-3304.
- [11] FU Mingen, LI Shuo, YU Tingting, et al. Differential expression of miR-195 in esophageal squamous cell carcinoma and miR-195 expression inhibits tumor cell proliferation and invasion by targeting of Cdc42[J]. *FEBS Letters*, 2013, 587(21): 3471-3479.
- [12] NIE Zhengchao, WENG Wenhao, SHANG Yushan, et al. MicroRNA-126 is down-regulated in human esophageal squamous cell carcinoma and inhibits the proliferation and migration in EC109 cell via PI3K/AKT signaling pathway[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2015, 8(5): 4745-4754.
- [13] ZHANG Chunni, WANG Cheng, CHEN Xi, et al. Expression profile of microRNAs in serum: a fingerprint for esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Clinical Chemistry*, 2010, 56(12): 1871-1879.
- [14] KOMATSU S, ICHIKAWA D, HIRAJIMA S, et al. Plasma microRNA profiles; identification of miR-25 as a novel diagnostic and monitoring biomarker in oesophageal squamous cell carcinoma[J]. *British Journal of Cancer*, 2014, 111(8): 1614-1624.
- [15] JUNG U, JIANG Xiaou, KAUFMANN S H E, et al. A universal TaqMan-based RT-PCR protocol for cost-efficient detection of small noncoding RNA[J]. *RNA*, 2013, 19(12): 1864-1873.
- [16] TANAKA K, MIYATA H, SUGIMURA K, et al. miR-27 is associated with chemoresistance in esophageal cancer through transformation of normal fibroblasts to cancer-associated fibroblasts[J]. *Carcinogenesis*, 2015, 36(8): 894-903.

- [17] WU Chaohui, LI Minjie, HU Chao, et al. Clinical significance of serum miR-223, miR-25 and miR-375 in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Molecular Biology Reports*, 2014, 41(3): 1257-1266.
- [18] 李迎迎, 刘志广, 王丽, 等. 血清 miRNAs 作为食管鳞癌新的生物标志物[J]. *遗传*, 2015, 37(4): 315-320.
- [19] ABRUZZO P M, GHEZZO A, BOLOTTA A, et al. Perspective Biological Markers for Autism Spectrum Disorders: Advantages of the Use of Receiver Operating Characteristic Curves in Evaluating Marker Sensitivity and Specificity[J]. *Disease Markers*, 2015, 2015: 329607.

Predictive Value of Serum miR - 25 , miR - 223 , and miR - 373 as Promising Biomarkers in Esophageal Squamous Cell Carcinoma

Qin Jianping^{1,2}, Tao Juan³, Li Yingying¹, Chang Weidong¹, Wang Li¹, Zhao Xiru¹, Wang Linsong¹

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xixiang 453007, China;

2. King Clinical Laboratorial Centre, Zhengzhou 450000, China;

3. School of Life Science and Technology, Sanquan Medical College, Xixiang Medical College, Xixiang 453003, China)

Abstract: It is to investigate the feasibility of serum miRNA as a diagnostic marker. The relative expression of miR - 25, miR - 223 and miR - 373 were detected in serum among health control, esophageal squamous cell carcinoma patients before and after 7 days of surgery and in esophageal squamous cell carcinoma and adjacent tissues by qRT - PCR with stem - loop primer. The experiment results showed that the relative expression of three kinds of serum miRNAs were higher at preoperative esophageal squamous cell cancer patients than health control and the patients at 7 days after surgery. AUC were 0.794, 0.839 and 0.873 among three miRNA, respectively. At the same time the levels of three miRNAs were higher in cancerous tissue than in adjacent tissues. Therefore the three miRNAs in serum mainly come from tissues and higher expression of three serum miRNAs resulted from esophageal cancer tissues. These results suggested that miR - 25, miR - 223, and miR373 have great potential to be as candidate of diagnostic markers.

Keywords: esophageal squamous cell carcinomas; serum; miRNA; diagnostic markers

(上接第 60 页)

Cloning and Analysis of Sex-biased NUPTs in Spinach

Li Shufen, Jia Keli, Su Ting, Yuan Jinhong, Deng Chuanliang, Gao Wujun

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xixiang 453007, China)

Abstract: The transfer of plastid DNA into nuclear genome leads to the formation of nuclear plastid DNA (NUPT). The insertion of NUPTs is an important force to drive the evolution of genome and chromosomes both in animals and in plants. However, it is still unclear about the relationship between the insertion of NUPTs and plant sex chromosome origin and evolution. In this study, sex different NUPT sequences were screened and isolated using genome subtractive hybridization technique, and further validation and analysis were also conducted. A total of 39 valid sequences with the length between 75 bp and 308 bp (average of 154 bp) were obtained from the spinach subtractive hybridization library. Blastn searching revealed that 12 sequences were related to chloroplast DNA, showing over 98% similarity with spinach chloroplast DNA. The results indicated that these 12 sequences were NUPTs in spinach genome. Finally, two stable male-biased NUPTs with size of 146 bp and 199 bp were obtained by further genomic semi-quantitative PCR validation, demonstrating that these two NUPTs accumulated more in spinach male genome than in female genome.

Keywords: Spinaciaoleracea; nuclear plastid DNA; male-biased