

# 血清 miR-193a-3p, miR-337-5p 和 miR-483-5p 在食管鳞状细胞癌诊断和预后中的应用\*

贾亚旭, 王 成, 张春妮 (南京大学医学院附属金陵医院

/南京军区南京总医院 解放军临床检验医学研究所, 南京 210002)

**摘要:**目的 探讨 miR-193a-3p, miR-337-5p 和 miR-483-5p 在食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)患者血清中的表达水平, 评估其临床应用价值。方法 收集 2011 年 6 月~2014 年 5 月南京军区南京总医院及徐州市肿瘤医院住院的 63 例 ESCC 患者术前、术后血清及随访信息, 同时收集 63 例年龄、性别相匹配的健康体检者血清作为正常对照。利用 TaqMan 低密度芯片方法筛选出 ESCC 患者中异常表达的 miRNA; 实时荧光定量 PCR 法验证芯片检测到的 ESCC 中明显上调的 miR-193a-3p, miR-337-5p 以及文献报道在口腔鳞状细胞癌(OSCC)表达上调的 miR-483-5p; 最后评价它们的诊断和预后价值。结果 与健康对照相比, ESCC 患者血清 miR-193a-3p ( $0.459 \pm 0.339$  vs  $0.195 \pm 0.084$ ), miR-337-5p ( $5.686 \pm 5.211$  vs  $2.476 \pm 0.808$ ) 和 miR-483-5p ( $32.545 \pm 22.479$  vs  $19.509 \pm 10.601$ ) 的相对含量均显著升高(U 值分别为 591, 605 和 1037, P 值均  $< 0.0001$ ), 且在患者术后明显降低(P 值均  $< 0.05$ ); 三种 miRNA 的 ROC AUC 分别为 0.851, 0.848 和 0.739, 三种 miRNA 组合在一起的 AUC 为 0.873, 均明显大于癌胚抗原; 术后高表达 miR-483-5p 的患者较之低表达的生存期短( $P = 0.022$ )。结论 血清 miR-193a-3p, miR-337-5p 和 miR-483-5p 可作为 ESCC 患者诊断或预后评估的潜在分子标志物。

**关键词:** 食管鳞状细胞癌; miR-193a-3p; miR-337-5p; miR-483-5p; 分子标志物

**中图分类号:** R735.1; R730.43 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2017)02-005-05

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.02.002

## Application of Serum miR-193a-3p, miR-337-5p and miR-483-5p in the Diagnosis and Prognosis of Esophageal Squamous Cell Carcinoma

JIA Ya-xu, WANG Cheng, ZHANG Chun-ni (PLA Institute of Clinical Laboratory Medicine,  
Jinling Hospital, Medical School of Nanjing University/Nanjing General Hospital  
of Nanjing Military Region, PLA, Nanjing 210002, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the expression level of serum miR-193a-3p, miR-337-5p and miR-483-5p in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) patients and to explore their value for diagnosis and prognosis of ESCC. **Methods** Serum samples were collected from 63 ESCC patients before and after surgery in Nanjing General Hospital and Xuzhou Cancer Hospital between June 2013 and May 2014 and serum samples of 63 age- and sex- matched healthy individuals acted as the normal controls. TaqMan Low Density Assay was used to detect the deregulated miRNA in ESCC patients and then quantitative real-time PCR was used to validate the upregulated miRNA miR-193a-3p, miR-337-5p and previously reported miR-483-5p that was upregulated in oral squamous cell carcinoma(OSCC). Finally, the three miRNA were evaluated for their clinical value in the diagnosis and predicting prognosis of ESCC. **Results** Compared with normal controls, serum levels of miR-193a-3p, miR-337-5p and miR-483-5p in ESCC patients were significantly up-regulated ( $0.459 \pm 0.339$  vs  $0.195 \pm 0.084$ ,  $U = 591$ ;  $5.686 \pm 5.211$  vs  $2.476 \pm 0.808$ ,  $U = 605$ ;  $32.545 \pm 22.479$  vs  $19.509 \pm 10.601$ ,  $U = 1037$ , respectively, all  $P < 0.0001$ ) and their levels were significantly reduced after the surgical treatment ( $P < 0.05$ ). The areas under the ROC curve of serum miR-193a-3p, miR-337-5p, miR-483-5p and miR-Panel were all larger than that of CEA. Univariate Kaplan-Meier analysis revealed that ESCC patients with low expression level of miR-483-5p in postoperative serum exhibited higher survival rate than those with high level ( $P = 0.022$ ). **Conclusion** Serum miR-193a-3p, miR-337-5p and miR-483-5p can be potential molecular biomarkers in the diagnosis and predicting prognosis of ESCC.

**Keywords:** esophageal squamous cell carcinoma; miR-193a-3p; miR-337-5p; miR-483-5p; molecular biomarker

食管癌(esophageal cancer)是常见的消化道恶性肿瘤,在我国超过 90% 的病例为鳞癌。食管

\* 基金项目:国家自然科学基金(81472021, 81672102)。

作者简介:贾亚旭(1991—),女,医学硕士研究生,主要研究方向:临床检验诊断学,E-mail:278646605@qq.com。

通讯作者:张春妮(1963—),女,博士,主任技师,博士生导师,主要研究方向:临床检验诊断学,E-mail:zchunni27@hotmail.com。

鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)目前发病机制尚不清楚,早期缺乏典型的临床症状,现有的方法难以实现早期诊断,临床治疗效果和患者预后极差,5年生存率仅为6%~15%<sup>[1]</sup>。虽然目前已有一些肿瘤标志物应用于临床,如癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)和鳞状细胞癌抗原等,但对ESCC诊断的敏感度和特异度不能满足临床需求,迫切需要寻找新的分子标志物。

微小核糖核酸(microRNA, miRNA)是一类长度约22个核苷酸序列的非编码小RNA,与肿瘤的发生发展密切相关。miRNA的稳定性使其可以在血清样本中检测,不仅有助于疾病的诊断,还可以帮助预测病人的预后<sup>[2]</sup>。已有报道表明,ESCC患者具有特异性的血清miRNA表达谱,为寻找肿瘤标志物提供了新思路<sup>[3]</sup>。目前血清miRNA在ESCC患者治疗前后变化及与预后关系研究较少,其作为新型标志物判断疗效及预后的临床价值有待研究。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 本研究纳入2011年6月~2014年5月南京军区南京总医院及徐州市肿瘤医院63例经WHO病理组织学确诊的初诊ESCC患者。有其他肿瘤或急性感染的ESCC患者被排除。平均随访时间 $19.1 \pm 3.7$ 月。患者中男性55例,女性8例,平均年龄 $62.0 \pm 8.3$ 岁。同时收集63例南京军区南京总医院健康体检中心进行体检的年龄、性别相匹配的健康人血清作为对照,其中男性55例,女性8例,平均年龄 $59.7 \pm 6.8$ 岁。所有参与者签订知情同意书且经各自医院伦理委员会批准。

采集ESCC患者术前、术后7~10天及健康对照者空腹静脉血3 ml,室温3 000 g离心5 min,收集血清,随后4℃,10 000 g离心5 min,进一步去除残留的血细胞,置-80℃保存。

1.2 试剂和仪器 酸性水饱和酚(南京大治生物公司);氯仿,异丙醇,无水乙醇(上海化学试剂有限公司);DEPC水(南京凯基生物有限公司),Trizol(美国Invitrogen公司);引物,反向互补探针(美国Applied Biosystem公司);qRT-PCR试剂盒(大连TaKaRa公司);血清CEA测定试剂盒(美国Beckman Coulter公司);7300型荧光定量PCR仪(美国Applied Biosystem公司);1612-1型高速离心机(上海医疗器械集团有限公司);5418型高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司)。

## 1.3 方法

1.3.1 血清RNA提取: TaqMan 低密度芯片

RNA提取:28例ESCC患者和28例健康对照各取500 μl血清分别混合,构成病例组和对照组混合血清(体积均为14 ml),采用Trizol试剂分别提取总RNA,具体操作参照文献<sup>[2]</sup>。其中ESCC患者组男性21例,女性7例,平均年龄 $63.1 \pm 8.8$ 岁,健康对照组男性19例,女性9例,平均年龄 $62.4 \pm 3.2$ 岁。实时荧光定量PCR(qRT-PCR)血清RNA提取参照文献<sup>[4]</sup>采用苯酚-氯仿抽提法从100 μl血清中提取。

1.3.2 TaqMan 低密度芯片分析:利用TaqMan低密度芯片(TaqMan Array Human MicroRNA A+B Cards Set v3.0)(美国Life Technologies公司)测定754种人类miRNA。为提高芯片的敏感度,逆转录过程结束后对得到的cDNA进行预扩增。

1.3.3 qRT-PCR:利用qRT-PCR方法检测血清中miR-193a-3p, miR-337-5p和miR-483-5p水平,所用引物及探针由美国ABI公司设计并合成。血清RNA逆转录反应总体积为10 μl,包括DEPC处理的重蒸馏水(ddH<sub>2</sub>O)3.5 μl,5×PCR缓冲液2 μl,10 mmol/L dNTPs 1 μl,逆转录酶0.5 μl,上、下游引物1 μl, RNA 2 μl。反应参数:16℃30 min, 42℃30 min, 85℃5 min, 4℃保存。qRT-PCR总反应体系为20 μl,包括DEPC处理的ddH<sub>2</sub>O 14.77 μl,10×PCR缓冲液2 μl,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.2 μl,10 mmol/L dNTPs 0.4 μl, Taq酶0.3 μl,探针0.33 μl, cDNA 1 μl。循环参数:95℃5 min; 95℃15 s, 60℃1 min(荧光信号采集),共40个循环。每个样本进行三复孔检测,并以经过DEPC处理ddH<sub>2</sub>O作为阴性对照。设定统一阈值对扩增曲线进行分析,获得循环数(C<sub>q</sub>值),计算miRNA的相对含量。本研究用三个内源性miRNA(let-7d: 5'-AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU-3', let-7g: 5'-UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU-3', let-7i: 5'-UGAGGUAGUAGUUUGU GCU-GUU-3')的三联体(let-7d/g/i)作为内参基因进行校正后分析<sup>[5]</sup>,采用 $2^{-\Delta C_q}$ 法计算miR-193a-3p, miR-337-5p和miR-483-5p相对含量, $\Delta C_q = C_q(\text{目的miRNA}) - C_q(\text{let-7d/g/i})$ 。

1.3.4 血清CEA含量测定:采用Access<sup>®</sup>CEA试剂盒(美国Beckman Coulter公司),用UniCel<sup>™</sup>Dxl800 Access<sup>®</sup>Immunoassay System放射免疫分析仪(美国Beckman Coulter公司)测定。

1.4 统计学分析 用SPSS22.0统计软件进行数据统计分析。MiR-193a-3p, miR-337-5p和miR-483-5p相对含量以均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。组间比较采用非参数Mann-Whitney U检验或配对 $t$

检验,当  $P < 0.05$  时差异有统计学意义。建立 ROC 曲线,并以曲线下面积(AUC)评估血清 miRNA 对 ESCC 的诊断价值。Kaplan-Meier 生存曲线采用 log-rank 检验,评估血清 miRNA 对 ESCC 预后判断价值。

2 结果

2.1 TaqMan 低密度芯片结果 芯片结果显示,ESCC 患者血清 miRNA 表达谱与正常人有差异,其中 21 种 miRNA 在患者血清中表达上调(2 倍以上)。从中选取 miR-193a-3p 和 miR-337-5p(分别升高 244.759 5 和 520 766.2 倍)以及文献[6]报道在 OSCC 患者血清中表达上调的 miR-483-5p 作进

一步分析。

2.2 qRT-PCR 验证结果 与健康对照组相比,ESCC 患者血清 miR-193a-3p,miR-337-5p 和 miR-483-5p 的相对含量显著升高,差异有统计学意义( $U=591,605,1\ 037$ ,均  $P < 0.000\ 1$ )。

2.3 手术治疗前后 miRNA 相对含量变化 见表 1。比较 63 例患者手术前后 miRNA 相对含量,结果显示,患者血清中 miR-193a-3p,miR-337-5p 和 miR-483-5p 相对含量术后较术前均明显降低,差异有统计学意义( $t$  值=3.279,3.876,2.142,均  $P < 0.05$ )。

表 1 ESCC 患者血清 miR-193a-3p,miR-337-5p 和 miR-483-5p 相对含量变化( $\bar{x} \pm s$ )

miRNA	对照组	ESCC 组		术前与对照组 P 值	术前与术后组 P 值
		术前	术后		
miR-193a-3p	0.195 $\pm$ 0.084	0.459 $\pm$ 0.339	0.325 $\pm$ 0.098	<0.000 1	0.001 7
miR-337-5p	2.476 $\pm$ 0.808	5.686 $\pm$ 5.211	3.230 $\pm$ 0.942	<0.000 1	0.000 3
miR-483-5p	19.509 $\pm$ 10.601	32.545 $\pm$ 22.479	27.315 $\pm$ 12.209	<0.000 1	0.036 1

2.4 ROC 曲线分析结果 见图 1。

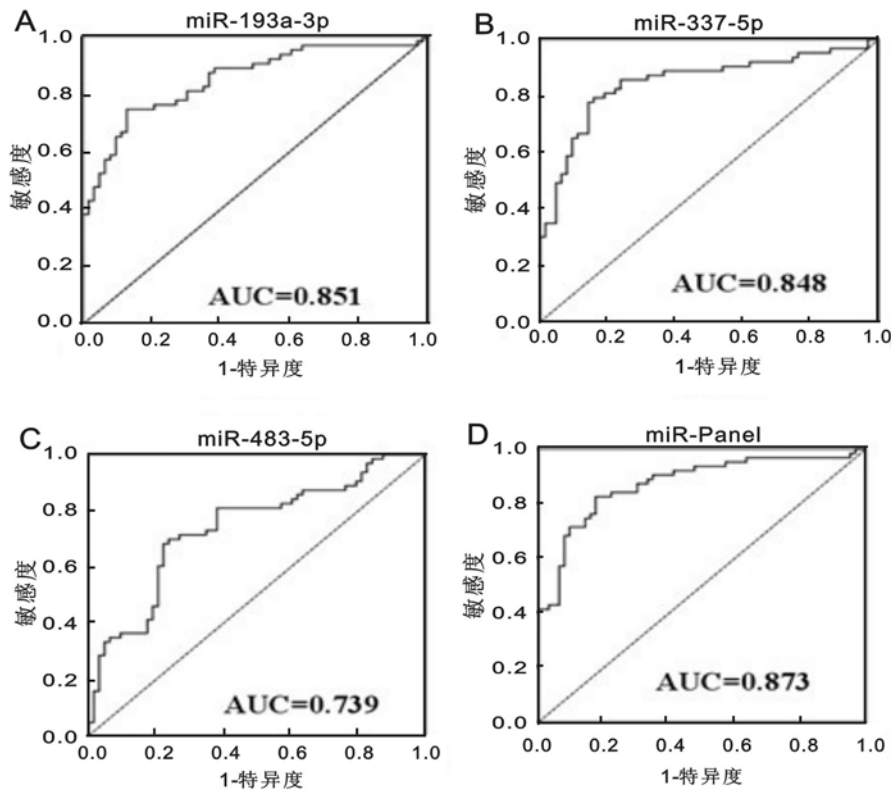
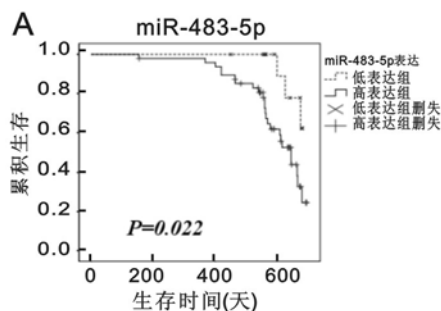


图 1 血清 miR-193a-3p,miR-337-5p 和 miR-483-5p 诊断 ESCC 的 ROC 曲线分析

ROC 曲线显示,miR-193a-3p,miR-337-5p 和 miR-483-5p 检测 ESCC 的 AUC 分别为 0.851 (95%CI 0.784~0.918),0.848(95%CI 0.776~0.919),0.739(95%CI 0.651~0.826),三种 miR-

NA 组合时 AUC 为 0.873 (95% CI 0.810 ~ 0.936)。这些 miRNA 及组合检测 ESCC 的敏感度  $\geq 74.6\%$ 。CEA 的 AUC 为 0.600 (95% CI 0.472~0.723), 当 cut off 值为  $1.85 \mu\text{g/L}$  时, 诊断 ESCC 的特异度为 96.4%, 敏感度仅为 46.0%。结果提示, 血清 miR-193a-3p, miR-337-5p 和 miR-483-5p 单独或联合检测对 ESCC 诊断的敏感度均明显高于 CEA。

**2.5 miRNA 表达水平与患者预后的关系** 运用单因素 Kaplan-Meier 法分析手术前后 miR-193a-3p, miR-337-5p 和 miR-483-5p, 发现术后 miR-483-5p 表达水平与患者生存期长短相关。以患者术后 miR-483-5p 相对含量的 cut off 值 18.370 为界值, 将 63 例患者分为两组: miR-483-5p 低表达组 (相对含量  $15.240 \pm 1.917$ ) 15 例, miR-483-5p 高表达组 (相对含量  $31.089 \pm 11.596$ ) 48 例。结果显示, 低表达组平均生存期为  $614.7 \pm 68.0$  天, 高表达组平均生存期为  $560.3 \pm 118.0$  天, 术后血清 miR-483-5p 低表达患者的生存期高于高表达患者 ( $P=0.022$ ), 结果见图 2。



注: 删失即失访, 因受访者自身因素导致的随访终止。

图2 ESCC 患者术后血清 miR-483-5p 表达水平与预后的关系

**3 讨论** 早期研究表明, ESCC 患者血清中有特异性的 miRNA 表达谱, 如 miR-25, miR-223 等<sup>[3,7]</sup>。之前我们通过 Solexa 测序和 qRT-PCR 相结合的手段发现 7 种 miRNA 在 ESCC 患者血清中显著上调<sup>[3]</sup>, 可作为潜在的分子标志物应用于 ESCC 病人。本研究中, 我们利用 TaqMan 低密度芯片和 qRT-PCR 技术进一步分析 ESCC 病人血清中特殊表达的 miRNA, 发现 miR-193a-3p, miR-337-5p 和 miR-483-5p 在 ESCC 患者血清中也异常升高, 且具有较高的诊断价值, 并且生存分析显示, 患者术后血清 miR-483-5p 水平与生存期的长短密切相关。

在 ESCC 病人中, 关于配对的术前和术后样本研究较少, 有报道表明, miR-21 和 miR-18a 在 ESCC 病人中显著升高而术后明显下降, 因此 miR-21

和 miR-18a 或许可以监测 ESCC 病人肿瘤动力学, 但此研究样本量很少; 本研究中, 在大样本 ESCC 病例基础上, 我们研究了在肿瘤切除前后病人血清中 miR-193a-3p, miR-337-5p 和 miR-483-5p 表达量的变化, 发现其术后含量显著降低, 说明外周血循环中的 miRNA 不仅来源于循环血细胞, 还可能来源于疾病组织如癌细胞。这种肿瘤细胞的主动分泌或被动释放可能是癌症患者异常表达 miRNA 的一个主要原因, 通过外泌体、微小体等载体进入外周血循环中。尽管术后血清 miRNA 没有回归到正常水平, 但它们的显著下降为肿瘤组织分泌或释放部分循环 miRNA 的观点提供了证据。

ESCC 由食管鳞状上皮内瘤变发展而来, 是抑癌基因失活、原癌基因激活等共同作用的结果, 发病率和死亡率在我国消化系统肿瘤甚至总体恶性肿瘤中都占有较高的比例, 因缺乏有效的早期诊断措施, 病人初诊大多属于中晚期, 预后较差。miRNA 作为一种基因表达调控因子, 其异常表达与肿瘤的发生发展有着极为密切的关系。通过研究差异表达的 miRNA, 有助于阐明 ESCC 的发生机制、发展过程和辅助早期诊断、治疗以及预后判断等。miRNA 作为肿瘤抑制因子或促癌因子发挥作用。MiR-193a-3p 可以介导 ESCC 细胞系增加对放疗和化疗的抵抗性<sup>[8]</sup>, 在肾透明细胞癌患者血清中水平显著升高, 有望作为该病早期诊断的血清学指标<sup>[9]</sup>; 与非炎症性乳腺癌患者相比, 炎症性乳腺癌患者血清中 miR-337-5p 表达水平显著降低, 而非炎症性乳腺癌患者相对于正常对照, 血清 miR-337-5p 表达水平上调<sup>[10]</sup>; 在口腔鳞状细胞癌 (OSCC) 患者中, miR-483-5p 水平显著升高, 并与患者的 TNM 分期和淋巴结转移相关 ( $P<0.01$ ), 血清中高表达的 miR-483-5p 使患者生存期较短, 是 OSCC 独立的预后因子<sup>[6]</sup>。

合适的内参对于 miRNA 的准确定量至关重要, 目前为止, 有多种不同的校正方法应用于循环 miRNA 的检测中, 包括内参基因小 RNAU6, 5S, RNU44 和 RNU48, 内源性 miRNA, miR-16 和 miR-191, 以及外源性植物 miRNA 2911 等, 但 these 方法有较多弊端, 如样本差异较大, 短时间保存后不稳定等。本实验采用等体积混合的三种 miRNA let-7d/g/i 作为内参基因检测 ESCC 患者血清中 miRNA 表达水平, 因它们在 ESCC 患者和健康对照中含量保持不变, 可以作为统计学上优越的规范化方法使用, 可以提高检测的敏感度和再现性, 确保实验指标的可靠性。

总之, 血清 miR-193a-3p, miR-337-5p 和 miR-483-5p 的检测有助于 ESCC 病人的诊断, 有作为

分子标志物的潜能。另外,术后血清中 miR-483-5p 的水平可以帮助预测病人的预后,后期研究中需进一步增加研究的病例数,延长随访时间,以便更全面评估术后 miR-483-5p 水平对病人预后的判断。

#### 参考文献:

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases[J]. Cell Res, 2008, 18(10): 997-1006.
- [3] Zhang C, Wang C, Chen X, et al. Expression profile of microRNAs in serum: A fingerprint for esophageal squamous cell carcinoma[J]. Clin Chem, 2010, 56(12): 1871-1879.
- [4] Liu R, Zhang C, Hu Z, et al. A five-microRNA signature identifies from genome-wide serum microRNA expression profiling serves as a fingerprint for gastric cancer diagnosis[J]. Eur J Cancer, 2011, 47(5): 784-791.
- [5] Chen X, Liang H, Guan D, et al. A combination of let-7d, let-7g and let-7i serves as a stable reference for normalization of serum microRNAs[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e79652.
- [6] Xu H, Yang Y, Zhao H, et al. Serum miR-483-5p: a novel diagnostic and prognostic biomarker for patients with oral squamous cell carcinoma[J]. Tumour Biol, 2016, 37(1): 447-453.
- [7] Xu X, Chen Z, Zhao X, et al. MicroRNA-25 promotes cell migration and invasion in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 421(4): 640-645.
- [8] Meng F, Qian L, Lv L, et al. MiR-193a-3p regulation of chemoradiation resistance in oesophageal cancer cells via the PSEN1 gene[J]. Gene, 2016, 579(2): 139-145.
- [9] 唐海霞, 王成, 路美玲, 等. 肾透明细胞癌患者血清 miR-193a-3p 水平增加及早期诊断价值[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(3): 43-45, 49.
- Tang HX, Wang C, Lu ML, et al. Elevated serum miR-193a-3p level in renal clear cell carcinoma and its early clinical value[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(3): 43-45, 49.
- [10] Hamdi K, Goerlitz D, Stambouli N, et al. miRNAs in sera of tunisian patients discriminate between inflammatory breast cancer and non-inflammatory breast cancer[J]. Springerplus, 2014(3): 636.
- 收稿日期: 2017-01-20 修回日期: 2017-02-10
- (上接 4 页)
- [5] CNAS-TRL-001: 2012. 医学实验室—测量不确定度的评定与表达[J]. 北京: 中国合格评定国家认可委员会, 2012.
- [6] Farrance I, Badrick T, Sikaris KA. Uncertainty in measurement and total error—are they so incompatible? [J]. Clin Chem Lab Med, 2016, 54(8): 1309-1311.
- [7] Tate JR, Plebani M. Measurement uncertainty—a revised understanding of its calculation of its calculation and use[J]. Clin Chem Lab Med, 2016, 54(8): 1277-1279.
- [8] Jones GR. Laboratory analytical quality—the process continues[J]. Clin Chem Lab Med, 2016, 54(8): 1275-1276.
- [9] Plebani M. The detection and prevention of errors in laboratory medicine[J]. Ann Clin Biochem, 2010, 47(2): 101-110.
- [10] Plebani M, Sciacovelli L, Aita A, et al. Performance criteria and quality indicators for the preanalytical phase[J]. Clin Chem Lab Med, 2015, 53(6): 943-948.
- [11] Sciacovelli L, Aita A, Padoan A, et al. Performance criteria and quality indicators for the post-analytical phase[J]. Clin Chem Lab Med, 2016, 54(7): 1169-1176.
- [12] Jones GR. Measurement uncertainty for clinical laboratories—a revision of the concept[J]. Clin Chem Lab Med, 2016, 54(8): 1303-1307.
- [13] Fraser CG. Reference change values[J]. Clin Chem Lab Med, 2011, 50(5): 807-812.
- [14] Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Third universal definition of myocardial infarction[J]. Circulation, 2012, 126(16): 2020-2035.
- [15] Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, et al. Acute renal failure—definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group [J]. Crit Care (London England), 2004, 8(4): R204-212.
- [16] Jones GR. Validating common reference intervals in routine laboratories[J]. Clin Chim Acta, 2014, 432(5): 119-121.
- [17] American Diabetes Association. Erratum. Classification and diagnosis of diabetes. Sec. 2. In Standards of Medical Care in Diabetes-2015 [J]. Diabetes Care, 2015, 38(Suppl 1): S8-16.

收稿日期: 2016-09-26  
修回日期: 2017-01-02