

唾液 miR-10b 对食管癌诊断及预后的预测价值

卢艳娴^{1, 2}, 吴映红², 谢子钧³, 罗刚¹, 陈瑜^{1, 2}, 李锐锋^{1, 2}, 陈刚², 李子俊²

(1 南方医科大学, 广东广州 510515, 2 广东省人民医院//广东省医学科学院, 广东广州 510080, 3 中山大学附属第三医院, 广东广州 510630)

摘要:【目的】探讨唾液 miR-10b 对食管癌诊断及预后的预测价值。【方法】收集 40 例食管癌患者和 40 例健康对照组的唾液并提取总 RNA, 采用 RT-PCR 方法检测 miR-10b 表达量, 并分析其对食管癌的临床病理特征、诊断及预后的关系。【结果】食管癌患者唾液上清及全唾液中 miR-10b 表达水平显著高于正常对照组 ($P < 0.0001$), 平均上调倍数分别为 26.60 倍和 36.99 倍, 其诊断食管癌的敏感性和特异性分别为 100.0% 和 77.5%、77.5% 和 97.5%。miR-10b 的表达水平不受淋巴结转移、癌症分期的影响 ($P > 0.05$)。Kaplan-Meier 分析表明唾液上清 miR-10b 低表达组 ($< 35.49 \pm 58.90$) 的生存时间长于高表达组 ($> 35.49 \pm 58.90$, $P = 0.046$)。【结论】唾液中 miR-10b 是食管癌预测诊断的敏感性指标, 唾液上清液中 miR-10b 表达量可作为评价预后的预测指标。

关键词: 唾液; miR-10b; 食管癌; 诊断; 预后

中图分类号: R735.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2016)03-0438-05

Diagnostic and Prognostic Value of Salivary MiR-10b for Esophageal Cancer

LU Yan-xian^{1,2}, WU Ying-hong², XIE Zi-jun³, LUO Gang¹, CHEN Yu^{1,2}, LI Rui-feng^{1,2}, CHEN Gang², LI Zi-jun²

(1. Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Guangdong Academy of Medical Sciences//Guangdong General Hospital, Guangzhou 510080, China. 3. The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Corresponding to: LI Zi-jun, E-mail: zijunli2005@aliyun.com

Abstract: 【Objective】 To evaluate the diagnostic and prognostic value of salivary miR-10b for esophageal cancer (EC). 【Methods】 Forty patients with EC and forty healthy controls were recruited. Total RNA was extracted from saliva samples for measurement of miR-10b using RT-PCR. The correlations between the expression of miR-10b and pathological characteristics, diagnostic and prognosis were analyzed. 【Results】 The levels of miR-10b in both the saliva supernatant and whole saliva were significantly higher in EC group than in the control group ($P < 0.0001$), with the average fold-change of 26.60 and 36.99, respectively. The sensitivity and specificity of miR-10b for EC were 100.0% and 77.5%, 77.5% and 97.5%, respectively. Salivary miR-10b showed no significant correlation with nodal metastasis and cancer stages ($P > 0.05$). The overall survival of EC in the low expression of miR-10b ($< 35.49 \pm 58.90$) was significantly higher than that in the high expression group ($> 35.49 \pm 58.90$, $P = 0.046$). 【Conclusion】 The salivary miR-21 can be a sensitive biomarkers for EC, and the expression miR-21 of saliva supernatant has the potential to assessment prognosis.

Key words: saliva; miR-10b; esophagus cancer; diagnosis; prognosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2016, 37(3):438-442]

食管癌是世界上八大常见的恶性肿瘤之一, 我国太行山地区及广东潮汕地区发病率超过 100/10 万, 而 5 年生存率低至 3% ~ 10%^[1]。早期手术治疗可提高患者 5 年生存率至 90%。因此, 早诊早治是提高食管癌生存率的重要因素之一, 而寻找一种简便、无创且易于接受的诊断食管癌方法有助于高发地区的普查。研究表明 miRNA 在多种生

物学过程中发挥作用, 包括调控细胞的发育、分化、增殖和凋亡以及在肿瘤的发生、侵袭、转移中起着重要作用。Tian 等^[2]研究表明 miR-10b 普遍存在于食管癌组织中且是高表达的, 并可通过调节 KLF4 基因来参与肿瘤侵袭与转移。此外, 多个研究也证实血循环中的 miRNAs 可以作为肿瘤诊断及预后指标^[3], 而唾液中含有复杂的分子物质,

收稿日期: 2015-12-24

作者简介: 卢艳娴, 硕士研究生, 研究方向: 消化道肿瘤早期诊断, E-mail: xianxian021226@163.com; 李子俊, 通信作者, 主任医师, 学术型博导, E-mail: zijunli2005@aliyun.com

既与血液相似又具有其特异性。研究发现 miR-10b 在血浆中表达降低^[4],但是它在唾液中表达尚未清楚。为此,我们通过无创的方法收集患者的唾液,检测 miR-10b 表达,探讨其对食管癌的诊断与预测预后价值。

1 材料与方 法

1.1 研究对象

收集 2011 年 6 月至 2012 年 3 月广东省人民医院(广东省医学科学院)收治的 40 例食管癌患者唾液标本,其中 8 例为女性,32 例为男性,均为汉族,年龄范围为 44 ~ 75 岁。所有食管癌患者均经病理活检证实为食管鳞状细胞癌,且无伴发其他器质性、系统性疾病,如肝炎、糖尿病等。I 期 4 例,II 期 13 例,III 期 23 例。癌症分期按 UICC 第 7 版指南标准划分,癌症分期为 I ~ III 期的患者由手术切除标本病理确定。以同期 40 例年龄 (Mann-Whitney U 检验统计量=598.500 $P=0.052$)、性别 (χ^2 检验 $\chi^2=0.287 P=0.592$)、种族匹配 (均是汉族),无任何肿瘤病史的健康体检者作为健康对照组。所有研究个体均签署知情同意书。

1.2 方 法

1.2.1 唾液收集方法 收集前需禁食、禁饮、禁烟和禁止口腔清洁 2 h 以上。唾液收集量需达 5 mL 以上,收集管使用 50 mL 无菌无酶离心管。其中取 2 mL 作全唾液标本,余下 3 mL 唾液作唾液上清标本。同一研究个体各留取一份全唾液样本和一份唾液上清样本。唾液上清收集条件:4 °C、3 000 $\times g$ 离心 15 min 取上层上清至 1.5 mL EP 管,再以 4 °C、12 000 $\times g$ 离心 10 min 后再弃沉淀取上清。标本处理后均置-80 °C 保存。

1.2.2 miR-10b 检测采用 mirVanaPARIS Kit (Ambion)试剂盒抽提唾液总 RNA。取 1.5 mL 样本严格按照试剂盒的操作说明抽提总 RNA,使用 30 μL 无核酸酶水溶解 RNA 放-80 °C 保存。取 2 μL RNA 进行反转录。每 2 μL 的 RNA 中加入 2 μL 的 RT Primer 和 7 μL 的无核酸酶水。70 °C 反应 10 min 后立即冰浴 2 min。然后在上述 11 μL 混合物中分别加入 5 μL RT buffer、2 μL dNTP(2.5 mmol/L)、0.5 μL RNase inhibitor (40 U/ μL)、0.5 μL RT 酶 (200 U/ μL)、6 μL ddH₂O, 然后继续进行反转录,反应条件为 42 °C 60 min,70 °C 10 min,维持 4 °C。

取反转产物 3 μL 作为模板,用 SYBRPremix ExTaq II 试剂盒 (TaKaRa 公司) 进行 RT-PCR 检测,以 miR-16 为内参,所有反应采用 3 复孔,反应条件为 95 °C 2 min, 然后 95 °C 5 s,60 °C 10 s,50 个循环。溶解曲线设置: Melt curve: 65.0 °C ~ 95.0 °C, increment 0.5 °C for 0.05 min + plate read。采用 Biorad CFX96 2.1 实时定量 PCR 仪进行检测。miRNA 的表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示。

1.3 统计学分析

采用 SPSS19.0 及 MedCalc12.7.8 统计软件进行处理。性别组间差异使用卡方检验。年龄组间与 miR-10b 表达量差异使用 Mann-Whitney U (2 组间) 或 Kruskal-Wallis H 检验 (3 组或以上间)。miR-10 在唾液上清与全唾液中的相关性使用 Spearman 相关性检验。应用 ROC (Receiver Operating Characteristic) 曲线评价诊断效能。唾液上清及全唾液 miR-10b 对食管癌诊断效能的差异性比较使用 MedCalc 的 Delong 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 食管癌患者和健康对照的唾液 miR-10b 水平比较及对食管癌的诊断预测价值

与健康对照相比,食管癌患者的唾液上清与全唾液 miR-10b 都显著上调(Mann-Whitney U 检验统计量分别是 76.000 及 85.500, $P < 0.001$),平均上调倍数分别为 26.60 倍和 36.99 倍(图 1)。构建唾液上清与全唾液 miR-10 在食管癌表达的 ROC 曲线,以 Youden 指数 (Youden 指数 = 敏感性+特异-1) 达到最大时所得方程为最优截断值(图 2)。本研究中唾液上清 AUC 为 0.953,截断值取 0.775,此时唾液上清 miR-10 对食管癌诊断的敏感性为 100.0%,特异性为 77.5%。全唾液 AUC 为 0.947,截断值取 0.750,此时全唾液 miR-10 对食管癌诊断的敏感性为 77.5%,特异性为 97.5%。唾液上清与全唾液 miR-10b 对食管癌诊断价值的差异性没有统计学意义 (Delong $Z = 0.214, P = 0.822$),提示唾液上清与全唾液 miR-10b 都对食管癌具有相似的良好诊断价值。

2.2 唾液上清与全唾液 miR-10b 的相关性分析

在健康对照组中,唾液上清与全唾液 miR-10b 相关系数 $r = 0.44$ (Spearman 相关性检验, $P =$

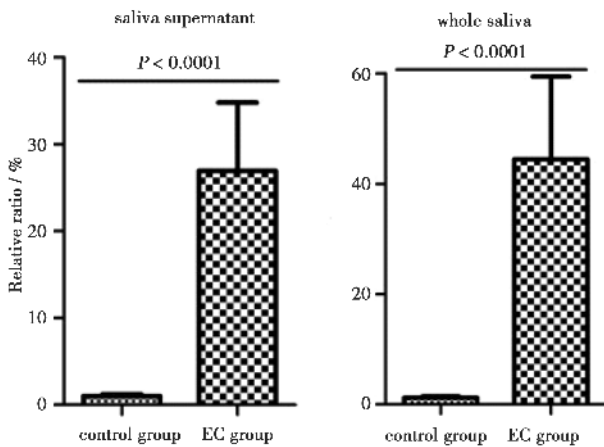


图 1 唾液上清与全唾液 miR-10b 在食管癌组及健康对照组的表达水平比较

Fig.1 Comparison of the expression levels of miR-10b in the esophageal cancer group and control group with both the saliva supernatant and whole saliva

0.004);在食管癌患者中,唾液上清与全唾液 miR-10b 相关系数 $r = 0.70$ (Spearman 相关性检验, $P < 0.0001$);在健康对照+患者联合组中,唾液上清与全唾液的 miR-10b 相关系数 $r = 0.84$ (Spearman 相关性检验, $P < 0.0001$, 图 3)。无论在健康对照个体、或食管癌患者、或健康对照+患者的联合组中,miR-10b 在唾液上清与全唾液表达量都呈显著的正相关性。

2.3 食管癌分期、淋巴结转移对唾液 miR-10b 表达水平的影响

在 I、II、III 期的食管癌患者的唾液上清和全

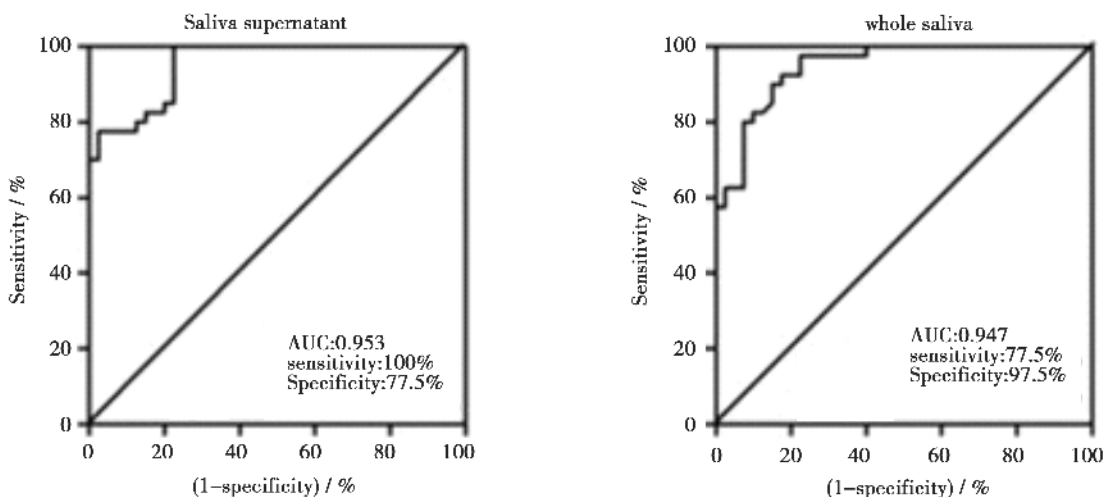
唾液 miR-10b 的表达量没有显著区别 (Kruskal-Wallis H 检验, χ^2 分别是 0.736、3.019, P 值分别是 0.692、0.221)。在有无淋巴结转移的患者中唾液上清和全唾液 miR-10b 的表达量没有显著区别 (Mann-Whitney U 检验统计量分别是 141.500 和 115.00, P 值分别是 0.251、0.590)。

2.4 唾液 miR-10b 与食管癌患者预后的关系

将食管癌患者按照唾液上清和全唾液 miR-10b 的平均水平 (35.49 ± 58.90) 为分界点,分别为低表达组及高表达组。Kaplan-Meier 分析显示唾液上清 miR-10b 低表达组手术后的生存时间明显高于高表达组 (Log rank 检验 $\chi^2 = 3.978, P = 0.046$, 图 4)。全唾液 miR-10b 表达量对预后无影响 (Log rank 检验 $\chi^2 = 0.404, P = 0.525$)。唾液上清 miR-10b 表达与肿瘤分化 (Kruskal-Wallis H 检验 $\chi^2 = 0.432, P = 0.511$)、淋巴结转移 (Mann-Whitney U 检验统计量 = 112.000, $P = 0.607$)、TNM 分期 (Kruskal-Wallis H 检验, $\chi^2 = 1.663$ 检验, $P = 0.435$) 无显著差别 (表 1)。

3 讨论

与西方国家不同,我国食管癌的组织类型是以鳞状细胞癌为主。有关它的生物标志物研究特别是 miRNAs 研究为现今热点。Hu 等^[5]研究发现多个 miRNAs 在食管癌组织中普遍存在,其中 miR16-2 和 miR30e 与预后不良相关。Chen 等^[6]证



AUC: area under curve

图 2 唾液上清与全唾液 miR-10b 表达诊断食管癌的 ROC 曲线

Fig.2 ROC curves of the saliva supernatant and whole saliva miR-21 for detecting esophageal cancer. AUC: Area Under ROC Curve

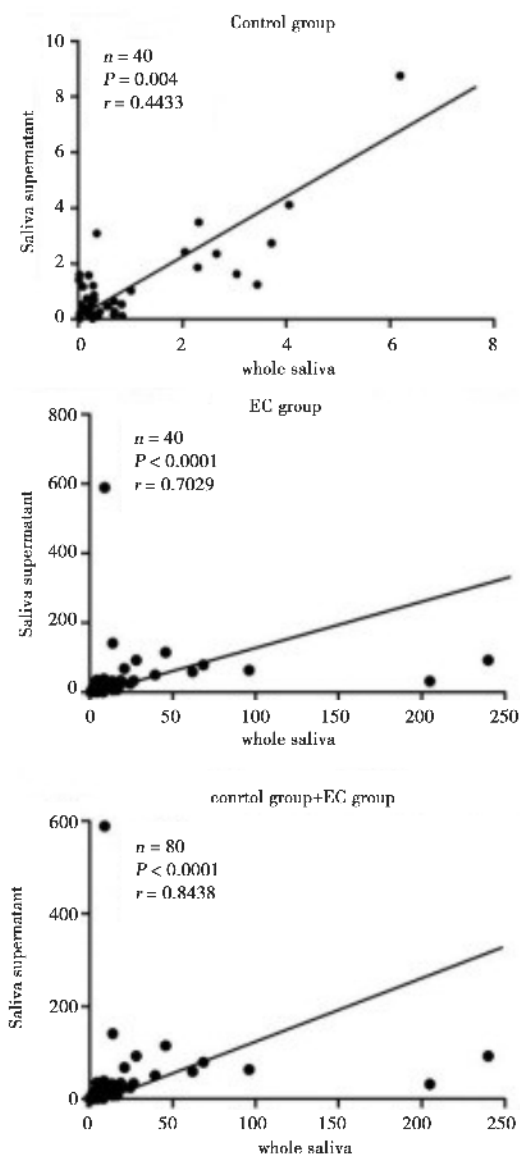


图3 唾液上清与全唾液 miR-10b 的相关性

Fig.3 The correlation between saliva supernatant and whole saliva in miR-10b

食管鳞癌中 miR92a 与预后不良、淋巴结转移及 TMN 分期相关。以上研究表明 miRNAs 参与食管癌发生和发展机制, 且对食管癌的诊断及预后预测有重要意义。

miR10b 是 miRNA 家族成员之一, 首先是在乳腺癌发现的, 是第一个被证实与侵袭和转移相关的 miRNA^[7]。Tian 等^[2]在对食管癌细胞系研究后发现 miR10b 的高表达与细胞运动及侵袭行为相关, 并通过影响 KLF4 抑癌基因发挥作用。KLF4 可调节 p21 表达和介导依赖 p53 细胞周期从而造成 DNA 损伤^[2]。TIP30 是一个肿瘤转移抑制基因, 在肝癌、前列腺癌、乳腺癌、胃癌等恶性肿瘤中发

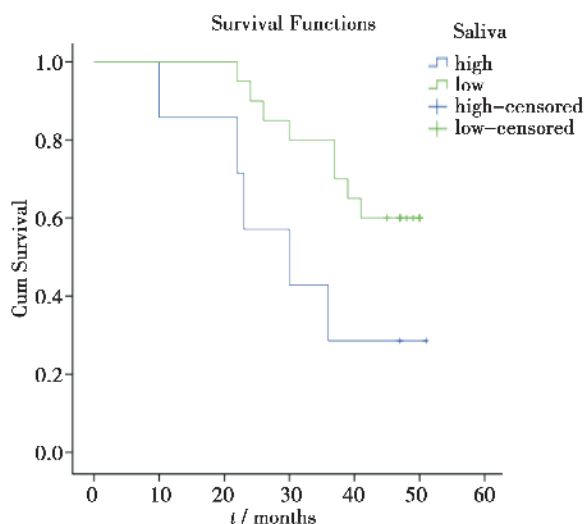


图4 唾液上清 miR-10b 的表达水平与食管癌患者预后的关系

Fig.4 The relationship between miR-10b of the saliva supernatant and survival in patients with EC

表1 唾液上清 miR-10b 与食管癌患者临床病理特征的关系

Table 1 The relationship between miR-10b of the saliva supernatant and pathological characteristics in patients with EC

Characteristics	High expression of miR-10b (n=8)	Lowexpression of miR-10b (n=32)	P value
Differentiation			0.511
High	0	3	
Moderate	7	19	
Moderate-poor	1	4	
Moor	0	6	
Lymphatic metastasis			0.607
No	6	20	
Yes	2	12	
TNM stage			0.435
I	0	4	
II	2	11	
III	6	17	

挥抑制肿瘤生长和转移的作用, 已证实 miR10b 是 TIP30 上游调控因子^[8]。

唾液中含有复杂的分子物质与血液中有许多相似部分, 包括多种酶类、激素、抗体、抗微生物成分及生长因子等。这些分子物质在血循环中通过唾液腺细胞内的跨膜转运或细胞间缝隙连接进入唾液中, 而唾液中还含非唾液腺分泌的龈沟液、黏

膜或炎症部位的渗出液、上皮细胞和免疫细胞及许多微生物^[9]。唾液检查已经被应用于检测或监测疾病如癌症、感染性疾病、心血管疾病等^[10]。已有研究报道唾液中 C-erbB-2 可以成为诊断乳腺癌的标志物^[11]。唾液微生物变化可预测胰腺癌^[12]。食管癌患者因肿瘤阻塞食管导致进食后反流或呕吐,全唾液中可能含有从食管反流入口腔的食管癌细胞。而唾液上清是全唾液经过离心得到的,被认为是血液循环的终末产品,它可以反映我们身体的内环境。

至今研究认为唾液 miRNA 来源不清,且与血液、组织的表达谱不完全一致^[13],如 miR-203a-3p、miR205-5p、miR141-3p、miR375 在正常人唾液中是高表达,而血液中却是低表达^[14];但不影响唾液检测成为诊断疾病的新型手段。研究发现 miR-10b 在食管癌患者血浆中表达下调,而在唾液上清与全唾液的食管癌患者中都显著上调,结果发现唾液上清 miR-10b 对食管癌预测诊断敏感性达 100.0%,特异性 77.5%;全唾液 miR-10b 敏感性 77.5%,特异性达 97.5%。

本研究还发现唾液中 miR-10b 的表达水平不受癌症的分期、淋巴结转移情况的影响,随后我们对部分食管癌患者进行术后 4 年随访,并用 Kaplan-Meier 生存曲线发现,唾液上清 miR-10b 低表达组手术后的生存时间明显高于高表达组,而全唾液 miR-10b 的表达对预后无影响。由此证表明唾液上清在预测预后方面比全唾液更具有前景。虽然 miR-10b 不受淋巴结转移、癌症分期影响却能影响预后,对此 miR-10b 如何参与肿瘤侵袭或转移,通过何种机制参与调控则需要进一步深入研究。

综上所述,本研究证实唾液 miR-10b 对食管癌的具有良好的预测诊断和预后的价值,结果可能为食管癌的早诊早治提供有研究价值的生物标志物。

参考文献

- [1] KIM T, GROBMYER SR, SMITH R, et al. Esophageal cancer--the five year survivors [J]. *J Surg Oncol*, 2011, 103(2): 179-183.
- [2] 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.
- [3] REID G, KIRSCHNER MB, VAN ZANDWIJK N. Circulating microRNAs: association with disease and potential use as biomarkers [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2011, 80(2): 193-208.
- [4] 谢子钧,陈刚,黄健,等.血浆 miR-10b 对食管癌的诊断价值[J]. *广东医学*, 2013, 34(16): 请补充起止页. XIE ZJ, CHEN G, HUANG J, et al. The diagnostic significance of plasma miR-10b for esophageal cancer [J]. *Guangdong Medical Journal*, 2013, 34(16): 2465-2468.
- [5] HU Y, CORREA AM, HOQUE A, et al. Prognostic significance of differentially expressed miRNAs in esophageal cancer [J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(1): 132-143.
- [6] CHEN ZL, ZHAO XH, WANG JW, et al. MicroRNA-92a promotes lymph node metastasis of human esophageal squamous cell carcinoma via E-cadherin [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(12): 10725-10734.
- [7] MA L, TERUYA-FELDSTEIN J, WEINBERG RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer [J]. *Nature*, 2007, 449(7163): 682-688.
- [8] DONG W, SHEN R, CHENG S. Reduction of TIP30 in esophageal squamous cell carcinoma cells involves promoter methylation and microRNA-10b [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 453(4): 772-777.
- [9] PFAFFE T, COOPER-WHITE J, BEYERLEIN P, et al. Diagnostic potential of saliva: current state and future applications [J]. *Clin Chem*, 2011, 57(5): 675-687.
- [10] LEE YH, WONG DT. Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases [J]. *Am J Dent*, 2009, 22(4): 241-248.
- [11] BIGLER LR, STRECKFUS CF, COPELAND L, et al. The potential use of saliva to detect recurrence of disease in women with breast carcinoma [J]. *J Oral Pathol Med*, 2002, 31(7): 421-431.
- [12] FARRELL JJ, ZHANG L, ZHOU H, et al. Variations of oral microbiota are associated with pancreatic diseases including pancreatic cancer [J]. *Gut*, 2012, 61(4): 582-588.
- [13] GAO K, ZHOU H, ZHANG L, et al. Systemic disease-induced salivary biomarker profiles in mouse models of melanoma and non-small cell lung cancer [J]. *PLoS One*, 2009, 4(6): e5875.
- [14] WANG Z, ZHOU D, CAO Y, et al. Characterization of microRNA expression profiles in blood and saliva using the Ion Personal Genome Machine System (Ion PGM System) [J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2015, 20: 140-146.