

• 论 著 •

# 循环标志物 let-7b 对食道癌的早期诊断意义研究\*

李鹏程<sup>1</sup>, 吴 斌<sup>1,2</sup>, 沈关心<sup>3</sup>, 邓 莉<sup>4</sup>, 刘 娟<sup>4</sup>, 王 顺<sup>1△</sup>

(1. 华中科技大学同济医学院附属中西医结合医院/武汉市第一医院输血科, 湖北武汉 430022;  
2. 湖北文理学院医学院分子医学研究中心, 湖北襄阳 441053; 3. 华中科技大学同济医学院  
免疫学系, 湖北武汉 430030; 4. 丹江口市第一医院检验科, 湖北丹江口 442700)

**摘 要:**目的 探讨血浆 miRNAs 作为食道癌早期诊断标志物的意义。方法 采集食道癌初诊患者的血浆, 检测候选 miRNAs(miR-30a, miR-126a 和 let-7b), 通过与健康对照者血浆中 miRNAs 表达水平比较, 判断其表达是否存在差异; 通过校正长期吸烟与酗酒之后, 利用 Logistic 回归判断哪一候选 miRNAs 具有更好的指导临床诊断的价值; 利用 ROC 曲线分析候选 miRNAs 是否具有较高的诊断效能。结果 两组人群在年龄上并无显著性差异( $P>0.05$ ), 而在吸烟支数、饮酒水平及肿瘤家族史方面具有显著性差异( $P<0.05$ )。两组人群相比, 血浆 let-7 与 miR-126a 与食道癌发病风险相关( $P<0.05$ ); 校正吸烟与酗酒 2 个危险因素后, let-7b 水平与食道癌发病风险相关( $P<0.05$ )。let-7b 的 ROC 曲线下面积为 0.712, 其具有一定的食道癌诊断效能。结论 血浆 let-7b 可以作为诊断食道癌的生物标志物。

**关键词:**食道癌; 生物标志物; let-7b

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2017.20.001

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2017)20-2801-04

## The early diagnostic value of Let-7b for esophageal cancer\*

LI Pengcheng<sup>1</sup>, WU Bin<sup>1,2</sup>, SHEN Guanxin<sup>3</sup>, DENG Li<sup>4</sup>, LIU Juan<sup>4</sup>, WANG Shun<sup>1△</sup>

(1. Department of Blood Transfusion, Integrative Medicine Hospital Affiliated of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology/First Hospital of Wuhan, Wuhan, Hubei 430022, China;

2. Molecular Medicines Research Laboratory, Hubei University of Arts and Science, Xiangyang, Hubei 441053, China; 3. Department of Immunology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430032, China; 4. Department of Clinical Laboratory, First Hospital of Danjiangkou, Danjiangkou, Hubei 442700, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate diagnostic value of miRNAs for esophageal cancer. **Methods** Blood samples were obtained from patients with esophageal cancer. MiRNAs including miR-30a, miR-126a, let-7b were detected and compared with healthy controls. After adjusting smoking and insobriety, Logistic regression was used to judging which was best for clinical guidance. ROC curve was used to analyzed the clinic value of these miRNAs. **Results** Age of the two groups had no significant difference( $P>0.05$ ). The levels of smoking, alcoholism and family history of cancer in the two groups had significant difference( $P<0.05$ ). Two groups' miR-30a levels in plasma had no significant differences( $P>0.05$ ). Let-7b and miR-126a levels in plasma in patients with esophageal were significantly higher in healthy volunteers( $P<0.05$ ). After adjustment the factors of smoking and alcohol, let-7b levels were associated with the risk of esophageal cancer ( $P<0.05$ ). Area under the ROC curve was 0.712, which had a certain esophageal cancer diagnostic performance. **Conclusion** Plasma let-7b could be treated as a biomarker for the diagnosis of esophageal cancer.

**Key words:** esophageal cancer; biomarkers; let-7b

miRNAs 是一类由内源性基因编码的非翻译单链 RNA 分子, 大小约为 22 nt。miRNAs 参与内源性转录后调控, 通过对靶基因完全或不完全配对结合, 诱导靶基因 mRNA 降解或转录抑制, 从而调节相关靶基因表达水平。血清中 miRNAs 不仅能抵抗核糖核酸酶的消化, 能耐酸和碱催化, 且稳定时间较长, 提示该类小分子可用于肿瘤的筛查、个体诊断和疗效监测。在中国, 食道癌发病率和病死率均较高, 其 5 年生存率不足 15%, 在常见的恶性肿瘤发病及死亡风险中排在第四位。早期食道癌患者通常没有较为显著的临床症状, 导致食道癌患

者在中晚期才能被确诊和接受相应的治疗。miR-30a、miR-126a 和 let-7b 等已被证实参与心血管疾病、糖尿病及肿瘤等发生发展, 调节某些相关基因的表达<sup>[1-5]</sup>。本研究通过检测初诊食道癌患者与健康人血浆 miRNAs 水平, 结合临床资料分析, 探讨血浆 miRNAs 用于食道癌早期诊断的意义。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 本研究总共纳入研究对象 70 例, 其中 35 例初诊为食道癌的患者(食道癌组), 35 例为健康人(健康对照组), 所有纳入对象均在湖北省丹江口市招募。35 例食道癌患

\* 基金项目: 湖北省卫生和计划生育委员会科研项目(WJ2015CB006); 湖北省教育厅科学研究计划项目(B2016170)。

作者简介: 李鹏程, 男, 主管技师, 主要从事临床免疫及分子诊断研究。 △ 通信作者, E-mail: wang\_shun6688@sina.com。

者均接受组织病理学检查并临床诊断为食道癌,并且均未接受手术治疗及放疗、化疗,均为食道鳞状细胞癌患者,招募时间为 2013 年 1—10 月;每位纳入对象均接受本项目调查员面试,并进行详细的问卷调查,其中危险因素纳入吸烟与否、吸烟支数、是否饮酒或酗酒及酗酒情况下饮酒量。每例食道癌患者均使用 Trizol LS 试剂保存食道癌组织。同时采集每例受试对象至少 5 mL 肝素抗凝全血,置于常温 6 h 后,采用三步离心法(300×g 离心 30 min;1 200×g 离心 5 min;2 500×g 离心 5 min)分离出无细胞血浆。血浆冻存于-80℃备用。

**1.2 仪器与试剂** TGL-16H 型台式低温高速离心机;美国应用系统生物公司(ABI)StepOne 实时定量 PCR 仪;美国 BD Vacutainer 肝素锂真空采血管;美国 Eppendorf UV 微型台式分光光度计。美国 Life 公司 Invitrogen Trizol LS 试剂盒;天津科密欧公司分析纯级氯仿、分析纯级异丙醇,国药化学公司分析纯级无水乙醇、75%乙醇及纯水;日本 TaKaRa 公司 MMLV 逆转录酶;美国 Life 公司 Invitrogen dNTP/逆转录反应缓冲液/核酸酶抑制剂;日本 TaKaRa 公司 Taq 聚合酶。

1.3 方法

**1.3.1 引物设计与序列** 根据已有文献报道设计引物,由广州锐博生物技术公司合成,引物序列见表 1。

**1.3.2 RNA 抽提** 按照 Trizol LS 试剂盒说明书要求,抽提食道癌组织及血浆样品 RNA;将食道癌组织匀浆后取 30~50

mg 加 1 mL Trizol LS 试剂,每 200 μL 血浆中加 800 μL Trizol LS 试剂,均质化。以上混合物随后添加 200 μL 氯仿,混匀后置于冰上 5 min。随后 12 000×g 离心 15 min,吸取上层 RNA 层,加入 550 μL 异丙醇,轻摇振荡后 12 000×g 离心 10 min。离心后吸取上层水相,加入 75%乙醇清洗,然后风干,PCR 级纯水溶解备用。260 nm/280 nm 波长下测定 RNA 浓度。

**1.3.3 逆转录反应** 采用 MMLV 逆转录酶逆转录约 20 ng 总 RNA,逆转录反应后生成 cDNA。10 μL 反应体系:5 nmol/L miRNA 特异性 Stem-loop 逆转录引物、500 μmol/L dNTP 混合物、2 μL 5×RT(逆转录)缓冲液、10 U 核酸酶抑制物及 100 U MMLV 逆转录酶,无 RNA 酶(RNase-free)纯水补足体积。逆转录反应过程:16℃ 30 min,42℃ 60 min,85℃ 5 min,保存于-20℃备用。

**1.3.4 逆转录产物预扩增** 根据已有文献报道设计引物,由广州锐博生物技术公司合成,Stem-loop 逆转录引物序列见表 2。在实时定量 PCR 检测产物水平前先行预扩增。预扩增 20 μL 体系:10 pmol miRNA 特异性引物,0.4 μL 10 mmol/L dNTP 混合物,0.4 μL 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,1 U Taq 聚合酶,1 μL 逆转录产物;然后补足体系至 20 μL。预扩增 PCR 反应参数:预变性 94℃ 5 min,95℃ 30 s,17 个循环,退火 30 s,72℃ 延伸 5 min。

表 1 预扩增及实时定量 PCR 引物序列

| miRNA    | 类型       | 引物序列                                             |
|----------|----------|--------------------------------------------------|
| miR-30a  | 预扩增      | 5'-CTA GCC TGC AGG ATA AAC TTA CTC ATG TTC TA-3' |
|          | 实时定量 PCR | 5'-ATC CGG CCG GCC TAC TCT GAG ATT TGA TAA AT-3' |
| miR-126a | 预扩增      | 5'-CTA GCC TGC AGG ACA GCA GGT AAA CTT GCC TT-3' |
|          | 实时定量 PCR | 5'-ATC CGG CCG GCC CCT GTT CTA GCA CAT CAA CC-3' |
| let-7b   | 预扩增      | 5'-ACA CTC CAG CTG GGT GAG GTA GTA GGT TGT-3'    |
|          | 实时定量 PCR | 5'-TTC AGT TGA GAA CCA CAC-3'                    |

表 2 Stem-loop 逆转录引物序列

| miRNA    | 引物序列                                                             |
|----------|------------------------------------------------------------------|
| miR-30a  | 5'-CTC AAC TGG TGT CGT GGA GTC GGC AAT TCA GTT GAG CTT CCA GT-3' |
| miR-126a | 5'-CTC AAC TGG TGT CGT GGA GTC GGC AAT TCA GTT GAG CGC ATT AT-3' |
| let-7b   | 5'-CTC AAC TGG TGT CGT GGA GTC GGC AAT TCA GTT GAG AAC CAC AC-3' |

**1.3.5 实时定量 PCR 检测** 实时定量 PCR 反应采用 ABI StepOne 实时定量 PCR 仪进行检测。U6 snRNA 作为反应检测内参基因,引物序列为 5'-GTC GTA TCC ATG GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCC ATG GAT ACG ACA CAA AAA TAT GGA ACG CTT-3'。检测时采用 20 μL 反应检测体系,48 孔板上机检测。实时定量 PCR 20 μL 反应体系:1 μL 预扩增产物,10 μL 2×SYBR Green I Dye 染料混合缓冲液,0.6 μmol/L 寡核苷酸引物(每对);PCR 级纯水补足至 20 μL。PCR 反应参数:95℃ 变性 5 min,95℃ 15 s,40 个循环,60℃ 60 s。采用以下方法计算候选 miRNAs 的表达水平:对所有的

测试样本和校准样本(U6),用内参基因的 Ct 值归一目标基因的 Ct 值,ΔCt(test)=Ct(target,test)-Ct(ref,test);ΔCt(calibrator)=Ct(target,calibrator)-Ct(ref,calibrator)。采用校准样本的 ΔCt 值归一试验样本的 ΔCt 值:ΔΔCt=ΔCt(test)-ΔCt(calibrator)。表达水平比率为 2<sup>-ΔΔCt</sup>,通过参照校准基因表达水平的试验样本中目标基因相对于校准样本的增加或较少的倍数,用参照基因校准目标基因表达水平,用以弥补样本组织量的差异。

**1.4 统计学处理** 统计学软件为 SPSS13.0 和 Prism5.0,数据采用单因素的方差分析(ANOVA)、卡方检验、Logistic 回归

分析。相关性分析采用 Pearson 相关分析。优势比(OR)与 95%可信区间(CI)计算的相对风险为校正吸烟及酗酒两大危险因素。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 研究对象一般资料分析 表 3 总结了本研究纳入对象的年龄、吸烟支数及饮酒水平等危险因素。两组人群年龄无显著性差异( $P>0.05$ )。吸烟支数、饮酒水平及肿瘤家族史在 ESCC 患者组与健康对照组间具有显著性差异( $P<0.05$ )。

2.2 食道癌组与健康对照组候选循环 miRNAs 表达差异比较 如表 4 所示,食道癌组 miR-126a 与 let-7b 水平明显高于健康对照组( $P<0.05$ ),而 miR-30a 则在两组间无显著差异( $P>0.05$ )。

2.3 候选循环 miRNAs 表达水平与食道癌风险相关性分析 未校正危险因素前,let-7b 与 miR-126a 两者均与食道癌发病风险相关,OR 及 95%CI 分别为 1.578(1.099~2.012)、1.278(1.023~1.488),均有统计学意义( $P$  分别为 0.005、0.031);校正吸烟与饮酒危险因素后,仅 let-7b 与食道癌发病风险相关,OR 及 95%CI 为 1.687(1.122~2.252),差异有统计学意义( $P=0.005$ )。

2.4 let-7b 对食道癌的诊断效能 ROC 曲线分析显示,let-7b 对食道癌的诊断为灵敏度为 72.16%,特异度为 64.33%,曲线下

面积(AUC)为 0.712(95%CI 为 0.59~0.82),见图 1。

表 3 食道癌组与健康对照组一般资料对比

| 参数       | 食道癌组(n=35) | 健康对照组(n=35) |
|----------|------------|-------------|
| 年龄(岁)    | 58.39±5.6  | 61.03±7.3   |
| 吸烟史(n)   |            |             |
| 无        | 17*        | 28          |
| 有        | 18         | 7           |
| 吸烟支数#(支) |            |             |
| <400     | 5          | 2           |
| ≥400     | 13         | 5           |
| 饮酒史(n)   |            |             |
| 从不饮酒     | 15*        | 29          |
| 有饮酒史     | 20         | 6           |
| 家族史(n)   |            |             |
| 有        | 7          | 0           |
| 无        | 28*        | 35          |

注: # 吸烟支数=平均每年吸烟支数×吸烟年数;与健康对照组比较, \*  $P<0.05$ 。

表 4 ESCC 患者与健康人循环 miRNAs 表达水平

| 组别    | let-7b       |             | miR-126a     |             | miR-30a     |             |
|-------|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
|       | ΔCt          | ΔΔCt        | ΔCt          | ΔΔCt        | ΔCt         | ΔΔCt        |
| 食道癌组  | 3.215±1.237* | 1.066±2.421 | 4.897±1.669* | 0.996±2.669 | 3.568±1.771 | 0.770±2.796 |
| 健康对照组 | 2.489±1.668  | —           | 3.784±1.887  | —           | 2.723±2.105 | —           |

注:与健康对照组比较, \*  $P<0.05$ 。ΔCt=Ctinterest-CtU6, ΔΔCt=ΔCtcase-ΔCtcontrol, 表示两种不同计算方法间的差异。—表示无数据。

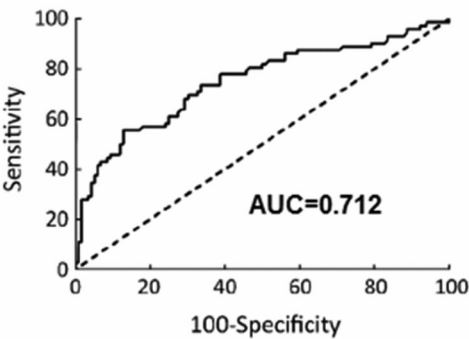


图 1 let-7b 诊断食道癌的 ROC 曲线

3 讨 论

近年来,通过 miRNA 表达谱芯片技术与实时定量 PCR 方法筛选出 miR-30a、miR-126a 及 let-7b 等小分子 RNA 在上消化道肿瘤患者外周血异常表达<sup>[1-5]</sup>,然而其表达意义尚待进一步探讨。本研究通过招募未接受任何手术及放化疗等治疗方法的食道癌患者,同时匹配年龄、性别与民族一致的健康对照人群,确定候选 miRNAs 是否能作为食道癌患者早期诊断的生物标志物。结果显示,食道癌患者的外周血 let-7b 与 miR-126a 显著升高,而 miR-30a 未有明显改变。血浆 let-7b 与 miR-126a 表达水平升高与食道癌发生风险正相关。Logistic

回归分析显示,校正吸烟与饮酒危险因素后,仅血浆 let-7b 表达水平升高与食道癌发病风险显著性相关。

本研究结果显示,血浆 miRNAs 水平与食道癌组织提取的 miRNAs 水平不呈现相关性,食道癌组织 miRNAs 水平与食道癌发病风险相关性低,且无显著性差异( $P>0.05$ )。这一结果与其他研究小组报道的结果并不完全一致。Lodes 等<sup>[6]</sup>认为食道癌组织 let-7b 表达水平升高与食道癌发病风险正相关,而血浆水平并无明显相关,但与前列腺癌、结肠癌、乳腺癌及肺癌等不同类型研究结果一致<sup>[7]</sup>。研究显示,miRNAs 在不同性质的器官组织表达水平或受到其他因素的影响,可能存在种族差异和不同组织器官系统的不完全一致,还有待扩大样本量进一步研究证实。

隆德大学研究小组探讨了癌细胞与周围细胞的通讯机制,以及这一机制是如何促进恶性肿瘤形成的,其目的是通过破坏这种通讯来尝试抑制肿瘤,其研究焦点是外泌体(exosome)<sup>[8]</sup>。因此,miRNAs 有可能通过外泌体抵抗核酸酶的降解或被运输到胞外达到某种调节靶细胞的作用<sup>[7]</sup>。这一重要研究成果说明,循环 miRNAs 可能不单作为诊断标志,也存在作为治疗靶点的可能性。新的药物或可通过阻断此种特殊 miRNAs 通讯方式,达到抑制其病理状态下异常的调节功能,有可能作为肿瘤治疗的靶点。(下转第 2807 页)

- 展[J]. 中华全科医学, 2011, 9(1): 112-113.
- [3] Yu HH, Chiang BL. Diagnosis and classification of IgA nephropathy[J]. *Autoimmun Rev*, 2014, 13 (4/5): 556-559.
  - [4] 贺理宇, 刘虹, 彭佑铭. IgA 肾病免疫机制与治疗靶点研究进展[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2014, 39(1): 96-101.
  - [5] Wang LQ, Dai Y, Qi SW, et al. Comparative proteome analysis of peripheral blood mononuclear cells in systemic lupus erythematosus with iTRAQ quantitative proteomics[J]. *Rheumatol Int*, 2012, 32(3): 585-593.
  - [6] Monteiro MB, Thieme K, Santos-Bezerra DP, et al. Beta-2-microglobulin(B2M) expression in the urinary sediment correlates with clinical markers of kidney disease in patients with type 1 diabetes[J]. *Metabolism*, 2016, 65(6): 816-824.
  - [7] Jovanovic D, Krstivojevic P, Obradovic I, et al. Serum Cystatin C and  $\beta$ 2-Microglobulin as Markers of Glomerular Filtration Rate, Renal Failure, Informa Healthcare[J]. *Renal Failure*, 2003, 25(1): 123-133.
  - [8] Frey SK, Nagl B, Henze A, et al. Isoforms of Retinol binding protein 4(RBP4) are increased in chronic diseases of the kidney but not of the liver[J]. *Lipids Health Dis*, 2008, 7(1): 1-9.
  - [9] Tin A, Astor BC, Boerwinkle E, et al. Genome-wide association study identified the human leukocyte antigen region as a novel locus for plasma beta-2 microglobulin[J]. *Hum Genet*, 2013, 132(6): 619-627.
  - [10] Cheung CL, Lam KS, Cheung BM. Serum beta-2 microglobulin predicts mortality in People with diabetes[J]. *Eur J Endocrinol*, 2013, 169(1): 1-7.
  - [11] Spaggiari E, Dreux S, Czerkiewicz I, et al. Fetal obstructive uropathy complicated by urinary ascites: outcome and prognostic value of fetal serum  $\beta$ 2-microglobulin[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2013, 41(2): 185-189.
  - [12] Foster MC, Coresh J, Hsu CY, et al. Serum  $\beta$ -Trace protein and  $\beta$ 2-Microglobulin as predictors of ESRD, mortality, and cardiovascular disease in adults with CKD in the chronic renal insufficiency cohort(CRIC) study[J]. *Am J Kidney Dis*, 2016, 68(1): 68-76.
  - [13] Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function[J]. *Physiol Rev*, 2002, 82(2): 331-371.
  - [14] Pan B, Kong JE, Jin JR, et al. A novel anti-inflammatory mechanism of high density lipoprotein through up-regulating annexin A1 in vascular endothelial cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1861(6): 501-512.
  - [15] Hetherington S, Hughes AR, Mosteller M, et al. Genetic variations in HLA-B region and hypersensitivity reactions to abacavir[J]. *Lancet*, 2002, 359(9312): 1121-1122.
  - [16] Merk HF. Diagnosis of drug hypersensitivity: lymphocyte transformation test and cytokines[J]. *Toxicology*, 2005, 209(2): 217-220.
  - [17] Schejbel L, Fadnes D, Permin H, et al. Primary complement C5 deficiencies-molecular characterization and clinical review of two families[J]. *Immunobiology*, 2013, 218(10): 1304-1310.

(收稿日期: 2017-04-17 修回日期: 2017-06-21)

(上接第 2803 页)

综上所述, 小分子标志物 let-7b 被证实参与众多的病理生理过程, 特别是在肿瘤研究领域, 本研究证实血液循环系统来源的 let-7b 可以作为早期食道癌的诊断生物标志物。

## 参考文献

- [1] Lionetti M, Biasiolo M, Agnelli L, et al. Identification of microRNA expression patterns and definition of a microRNA/mRNA regulatory network in distinct molecular groups of multiple myeloma[J]. *Blood*, 2009, 114 (25): e20-e26.
- [2] Wang Y, Li L, Qu Z, et al. The expression of miR-30a \* and miR-30e \* is associated with a dualistic model for grading ovarian papillary serious carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2014, 44(6): 1904-1914.
- [3] Perez-Rivas LG, Jerez JM, Carmona R, et al. A microRNA Signature Associated with Early Recurrence in Breast Cancer[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e91884.
- [4] Liu Z, Chen L, Zhang X, et al. RUNX3 regulates vimentin expression via miR-30a during epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer cells[J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(4): 610-623.
- [5] Fu J, Xu X, Kang L, et al. miR-30a suppresses breast cancer cell proliferation and migration by targeting Eya2[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 445 (2): 314-319.
- [6] Lodes MJ, Caraballo M, Suci D, et al. Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray[J]. *PLoS One*, 2009, 4(7): e6229.
- [7] Pantaleo MA, Ravegnini G, Astolfi A, et al. Integrating miRNA and gene expression profiling analysis revealed regulatory networks in gastrointestinal stromal tumors[J]. *Epigenomics*, 2016, 8(10): 1347-1366.
- [8] van Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S, et al. Exosomes: a common pathway for a specialized function[J]. *J Biochem*, 2006, 140(1): 13-21.

(收稿日期: 2017-04-18 修回日期: 2017-06-22)