

## 论 著

## 食管鳞状细胞癌 piRNA-19166 的表达及其临床病理意义

郭玉莲<sup>1,2</sup>, 颜 云<sup>1</sup>, 王成海<sup>1,3</sup>

(1. 扬州大学医学院/转化医学研究院 病理学教研室, 江苏 扬州, 225009;

2. 江苏省宝应县人民医院 病理科, 江苏 宝应, 225800;

3. 江苏省中西医结合老年病防治重点实验室, 江苏 扬州, 225009)

**摘要:** **目的** 检测食管鳞状细胞癌中 piRNA-19166 的表达水平, 分析其临床病理意义。 **方法** 应用实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 技术检测 piRNA-19166 在 96 例食管鳞状细胞癌组织和癌旁正常组织中的表达, 并分析其与食管鳞状细胞癌患者病理资料的关系。应用 qRT-PCR 检测 piRNA-19166 在 3 种食管癌细胞和正常食管上皮细胞中的表达。 **结果** 96 例食管鳞状细胞癌组织中, 71 例 piRNA-19166 表达下降, 25 例表达正常或升高; 与癌旁正常食管组织相比, piRNA-19166 在食管癌细胞株 EC9706、TE-1、Eca10 中均呈低表达, 其中 Eca10 细胞、EC9706 细胞中 piRNA-19166 低表达差异有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。本研究结果显示, piRNA-19166 低表达与分化程度、淋巴结转移、TNM 分期有显著相关性 ( $P < 0.01$ )。 **结论** piRNA-19166 可能是一种新的食管癌肿瘤抑制基因, 低表达的 piRNA-19166 促进了食管癌的发生、发展和转移。

**关键词:** piRNA-19166; 食管鳞状细胞癌; 实时荧光定量聚合酶链式反应

中图分类号: R 735 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2020)22-001-04 DOI: 10.7619/jcmp.202022001

## Expression and clinicopathological significance of piRNA-19166 in esophageal squamous cell carcinoma

GUO Yulian<sup>1,2</sup>, YAN Yun<sup>1</sup>, WANG Chenghai<sup>1,3</sup>

(1. Teaching and Research Section of Pathology, Medical College of Yangzhou University, Institute of Translational Medicine, Yangzhou, Jiangsu, 225009; 2. Department of Pathology, Baoying County People's Hospital in Jiangsu Province, Baoying, Jiangsu, 225800; 3. Jiangsu Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Treatment of Senile Diseases, Yangzhou, Jiangsu, 225009)

**Abstract: Objective** To detect the expression of piRNA-19166 in esophageal squamous cell carcinoma and analyze its clinicopathological significance. **Methods** The expression of piRNA-19166 was detected by real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) in tissues of esophageal squamous carcinoma and their paracancerous normal esophageal tissues of 96 cases, and the relationship between the expression of piRNA-19166 and pathological materials was analyzed. The qRT-PCR was used to detect the expressions of piRNA-19166 in three types of esophageal cancer cells and normal esophageal epithelial cells. **Results** In the 96 cases of esophageal squamous cell carcinoma, the expression of piRNA-19166 was decreased in 71 cases and was normal or increased in 25 cases. Compared with the paracancerous normal esophageal tissues, the expressions of piRNA-19166 in esophageal cancer cell lines EC9706, TE-1 and Eca10 were relatively low, and the expressions of piRNA-19166 in Eca10 and EC9706 cells were significantly lower than those in the paracancerous normal esophageal tissues ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The results showed that the low expression of piRNA-19166 was significantly correlated with the degree of differentiation, lymph node metastasis and TNM staging ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The piRNA-19166 may be a new tumor suppressor gene in esophageal cancer, and the low expression of piRNA-19166 promotes the occurrence, development and metastasis of esophageal cancer.

**Key words:** piRNA-19166; esophageal squamous cell carcinoma; real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

收稿日期: 2020-06-20

基金项目: 江苏省卫生健康委医学科科研项目指导性项目(Z2019046)

通信作者: 王成海, E-mail: chwang@yzu.edu.cn

食管癌是消化系统常见的恶性肿瘤,其发病率位居所有疾病的第 9 位以及癌症相关死亡疾病的第 6 位<sup>[1]</sup>。食管癌的病理组织学类型主要包括食管鳞状细胞癌和食管腺癌,而食管鳞状细胞癌是亚洲地区常见的病理类型<sup>[2]</sup>。在中国,食管鳞状细胞癌占有食管癌的 90%,其主要发病部位为食管的中下段<sup>[3-4]</sup>。食管癌致病的危险因素有饮食习惯、环境因素和遗传因素等<sup>[5]</sup>。近年来,与 PIWI 蛋白相互作用的核糖核酸(piRNAs)逐渐成为肿瘤研究的热点之一,piRNAs 是在生殖细胞和体细胞中发现的一类非编码 RNA<sup>[6]</sup>,包含 24~31 个核苷酸,piRNAs 与 PIWI 蛋白结合形成 piRNA/PIWI 复合物,对精子形成、表观遗传调节和生殖干细胞维持等均有影响<sup>[7]</sup>。研究<sup>[8-9]</sup>表明 piRNAs 与包括恶性肿瘤在内的多种疾病有关。多项研究<sup>[10-11]</sup>证实,piRNAs 异常表达已经成为肿瘤细胞增殖、凋亡、侵袭、迁移的关键因素。本研究采用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)技术检测 piRNA-19166 在食管鳞状细胞癌及相应癌旁正常组织中的表达水平,分析 piRNA-19166 表达水平与食管鳞状细胞癌病理参数的相关性及其临床病理意义,现报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

选取 2018 年 10 月—2020 年 3 月扬州大学附属医院 96 例外科手术患者的新鲜食管鳞状细胞癌组织和相应正常食管组织标本,年龄 39~74 岁,中位年龄 62.0 岁;男 50 例,女 46 例。所有患者术前未经过放疗和化疗处理。食管鳞状细胞癌由病理科医师明确诊断。标本使用及临床资料的收集均经扬州大学医学院伦理委员会批准,并与患者签署知情同意书。采集新鲜食管鳞状细胞癌组织后立即放入液氮罐里,−80℃冰箱内保存备用。

### 1.2 qRT-PCR

提取食管癌肿瘤组织总 RNA,将 RNA 逆转录成互补 DNA(cDNA),使用 Takara 生物公司 qRT-PCR 反应试剂盒,反应体系为 25.0 μL,cDNA 为 1.0 μL,12×SYBR Premix ExTaq™ II 2.5 μL,上、下游引物各 1.0 μL,加无核酸酶水调整体系至 25.0 μL,每组样本有 3 个复孔,内参为 U6。最后在 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system 仪器上读取定量 PCR 反应 Ct 值,结果以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 10.0 对数据进行统计分析,采用 Microsoft Office Excel 2007 软件进行绘制。符合正态分布的计量资料采用  $(\bar{x} \pm s)$  表示。组间比较采用配对样本 *t* 检验,计数资料比较采用  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 食管鳞状细胞癌组织 piRNA-19166 的表达

96 例食管鳞状细胞癌组织中,71 例 piRNA-19166 表达下降,25 例表达正常或升高;与癌旁正常食管组织相比,食管鳞状细胞癌中 piRNA-19166 呈低表达,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。见图 1。

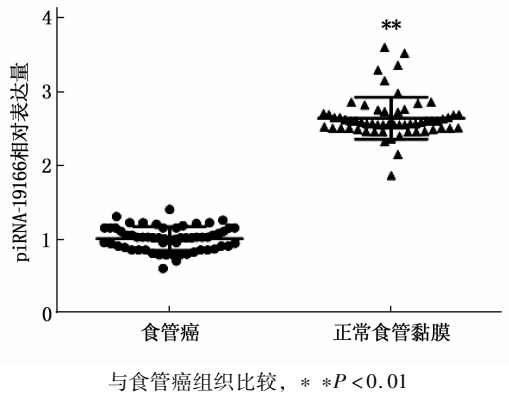


图 1 食管鳞状细胞癌组织中 piRNA-19166 的表达 ( $n = 96$ )

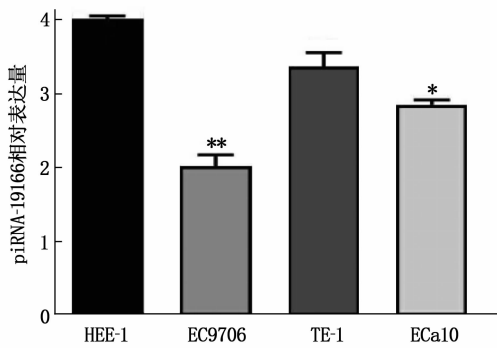
### 2.2 食管癌细胞株中 piRNA19166 的表达

应用实时荧光定量实验方法检测 3 种食管癌细胞系(EC9706, TE-1, ECa10)及正常食管上皮细胞(HEE-1)中 piRNA-19166 的表达情况,结果显示,与正常食管上皮细胞相比,piRNA-19166 在食管癌细胞株 EC9706、TE-1、ECa10 中均呈低表达,其中 ECa10 细胞、EC9706 细胞中 piRNA-19166 低表达差异有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见图 2。

### 2.3 食管鳞状细胞癌组织中 piRNA19166

的异常表达及其与临床病理的关系

本研究分析 piRNA-19166 在 RNA 水平上的相对表达量与患者年龄、性别、吸烟情况、肿瘤大小、分化程度、淋巴结转移和 TNM 分期的关系。根据食管鳞状细胞癌组织中 piRNA-19166 的表达水平分为低表达组和正常/高表达组。结果显示,piRNA-19166 低表达与分化程度( $P = 0.001$ )、淋巴结转移( $P = 0.001$ )、TNM 分期( $P = 0.006$ )有显著相关性。见表 1。



与 HEE-1 比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

图 2 食管癌细胞株中 piRNA19166 的表达

表 1 食管鳞状细胞癌组织中 piRNA19166 的表达及其与临床病理的关系( $\bar{x} \pm s$ )

临床病理特征	低表达组( $n=71$ )	正常/高表达组( $n=25$ )	$\chi^2$	$P$
年龄	<55 岁	44	0.276	0.600
	$\geq 55$ 岁	27		
性别	男	37	0.001	0.992
	女	34		
吸烟	是	40	0.101	0.750
	否	31		
肿瘤大小	<5 cm	35	0.849	0.375
	$\geq 5$ cm	36		
分化程度	高分化	21	11.414	0.001
	中、低分化	50		
淋巴结转移	阳性	51	14.853	0.001
	阴性	20		
TNM 分期	I、II 期	23	7.657	0.006
	III、IV 期	48		

前, piRNA 对肿瘤发生、发展的影响已经成为肿瘤研究的新热点,许多 piRNAs 在肿瘤组织中表达失调,发挥促进或抑制的作用。微小 RNA 也是一类小的非编码蛋白 RNA,通常与靶基因的 3'非翻译区互补结合,抑制其蛋白质翻译,而 piRNAs 一般不与靶基因的 DNA 互补,这表明 piRNAs 通过其他生物学方式发挥表观遗传调节作用<sup>[21-22]</sup>。

目前多认为 piRNAs 的异常表达是一种癌症潜在的病理性特征,LI BB 等<sup>[23]</sup>研究表明,由多发性骨髓瘤细胞外囊泡携带的 piRNA-823 能改变内皮细胞的生物学特性,这一点对于多发性骨髓瘤细胞能适合生长的独特环境至关重要,也为 piRNAs 治疗多发性骨髓瘤的预后评估提供了前期研究基础。在大肠癌患者组织和血清中, piRNA-54265 表达水平升高,并与患者预后较差密切相关。功能性试验<sup>[24]</sup>证明, piRNA-54265 结合 PIWIL2 蛋白通过 PIWIL2/STAT3/p-SRC 复合体激活 STAT3 信号通路,促进大肠癌细胞的增殖、转移以及抗药性。LIN X 等<sup>[25]</sup>运用 piRNAs 芯片

### 3 讨论

食管癌是一类来源于食管鳞状上皮和腺上皮的癌症,其发病率位居消化系统肿瘤的第 3 位<sup>[12-15]</sup>。在中国,绝大多数食管癌的病理类型为鳞状细胞癌,因此研究食管鳞状细胞癌的病因、发病机制、诊断指标和治疗靶点尤为重要。作为一类小的非编码蛋白 RNA, piRNA 与 PIWI 蛋白结合而发挥其生物学活性作用<sup>[16-18]</sup>。大多数 piRNAs 在人类发生肿瘤时会出现表达异常,只有少数 piRNAs 在肿瘤和正常组织中表达一致<sup>[19-20]</sup>。目

技术在胃癌组织中鉴定出 50 种与癌症相关的 piRNAs,得出 piRNAs 在致病因子中扮演重要的角色。在乳腺癌组织中, piRNA-36712 的表达水平显著低于正常乳腺组织,低水平的 piRNA-36712 与患者的临床预后不良相关, piRNA-36712 的下调引起硒蛋白 W1(SEPW1)过度表达,从而促进癌细胞的增殖、侵袭和迁移。研究<sup>[26]</sup>还发现, piRNA-36712 与紫杉醇和阿霉素这 2 种乳腺癌化疗药物具有协同抗癌作用。

本研究采用 qRT-PCR 技术检测出食管鳞状细胞癌组织中 piRNA-19166 表达水平下降的比率约为 74.0%,而在少数患者中 piRNA-19166 是正常表达或高表达;同时, piRNA-19166 在食管癌细胞株中的表达水平也低于正常的食管上皮细胞株。上述结果提示, piRNA-19166 可能是一种新的食管癌肿瘤抑制基因,其失活或受到抑制后影响了食管癌的发生、发展过程。本研究还分析了 piRNA-19166 在食管鳞状细胞癌组织中的表达水平与患者临床病理参数的相关性,证实低表达的

piRNA-19166 与食管鳞状细胞癌的分化程度、淋巴结转移和 TNM 分期密切相关,即 piRNA-19166 表达水平越低,食管癌的分化程度越低,癌细胞恶性程度越高,癌细胞越容易从附近的淋巴结转移,以及 TNM 分期越晚,患者预后也就越差。

综上所述, piRNA-19166 可能是一种新的食管癌肿瘤抑制基因,低表达的 piRNA-19166 促进了食管癌的发生、发展和转移。

#### 参考文献

- [1] FIDLER M M, BRAY F, SOERJOMATARAM I. The global cancer burden and human development: a review[J]. *Scand J Public Health*, 2018, 46(1): 27-36.
- [2] CHIEN C R, LIN C Y, CHEN C Y. Incidence of adenocarcinoma of the esophagus among white Americans by sex, stage, and age[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2009, 101(20): 1428-1429.
- [3] DALY J M, FRY W A, LITTLE A G, *et al.* Esophageal cancer: results of an American college of surgeons patient care evaluation study[J]. *J Am Coll Surg*, 2000, 190(5): 562-573.
- [4] SIEWERT J R, STEIN H J, FEITH M, *et al.* Histologic tumor type is an independent prognostic parameter in esophageal cancer; lessons from more than 1,000 consecutive resections at a single center in the Western world[J]. *Ann Surg*, 2001, 234(3): 360-369.
- [5] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2017[J]. *CA: a Cancer J Clin*, 2017, 67(1): 7-30.
- [6] LIU P W, DONG Y Q, GU J B, *et al.* Developmental PiRNA profiles of the invasive vector mosquito *Aedes albopictus*[J]. *Parasit Vectors*, 2016, 9(1): 524-533.
- [7] HAN Y N, LI Y, XIA S Q, *et al.* PIWI proteins and PIWI-interacting RNA: emerging roles in cancer[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(1): 1-20.
- [8] ROSS R J, WEINER M M, LIN H F. PIWI proteins and PIWI-interacting RNAs in the soma[J]. *Nature*, 2014, 505(7483): 353-359.
- [9] SIDDIQI S, MATUSHANSKY I. PIWIS and PIWI-interacting RNAs in the epigenetics of cancer[J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(2): 373-380.
- [10] WENG W H, LI H H, GOEL A. Piwi-interacting RNAs (piRNAs) and cancer: Emerging biological concepts and potential clinical implications[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2019, 1871(1): 160-169.
- [11] ZHUANG K, WU Q, JIN C S, *et al.* Long non-coding RNA HNF1A-AS is upregulated and promotes cell proliferation and metastasis in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cancer Biomark*, 2016, 16(2): 291-300.
- [12] KRISHNAN P, DAMARAJU S. The challenges and opportunities in the clinical application of noncoding RNAs: the road map for miRNAs and piRNAs in cancer diagnostics and prognostics[J]. *Int J Genomics*, 2018, 2018: 5848046.
- [13] 付娟娟, 徐茜, 杨晨晨. 异黏蛋白及波形蛋白在食管鳞状细胞癌组织中的表达及其预后的关系[J]. *国际检验医学杂志*, 2020, 41(07): 867-872.
- [14] 闵燕飞, 黄荣, 蒋军, 何瀚. 食管癌组织中溶酶体相关膜蛋白 2a 的表达及其临床意义[J]. *实用临床医药杂志*, 2020, 24(07): 72-76.
- [15] 刘明建. 肿瘤坏死因子受体相关蛋白 1 的表达与食管癌临床病理特征及预后的关系探讨[J]. *实用临床医药杂志*, 2019, 23(06): 110-112.
- [16] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2018[J]. *CA: a Cancer J Clin*, 2018, 68(1): 7-30.
- [17] RAMAT A, SIMONELIG M. Functions of PIWI proteins in gene regulation: new arrows added to the PiRNA quiver[J]. *Trends Genet*, 2020.
- [18] ZHANG G W, WANG L, CHEN H Y, *et al.* Promoter hypermethylation of PIWI/PiRNA pathway genes associated with diminished pachytene PiRNA production in bovine hybrid male sterility[J]. *Epigenetics*, 2020, 15(9): 914-931.
- [19] LIU Y, DOU M, SONG X, *et al.* The emerging role of the PiRNA/PIWI complex in cancer[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 123-129.
- [20] BAYLIN S B, JONES P A. A decade of exploring the cancer epigenome-biological and translational implications[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(10): 726-734.
- [21] WANG Q X, ZHU Y Q, ZHANG H, *et al.* Altered MiRNA expression in gastric cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(3): 933-944.
- [22] FELDMAN N, GERSON A, FANG J, *et al.* G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis[J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(2): 188-194.
- [23] LI B B, HONG J X, HONG M, *et al.* PiRNA-823 delivered by multiple myeloma-derived extracellular vesicles promoted tumorigenesis through re-educating endothelial cells in the tumor environment[J]. *Oncogene*, 2019, 38(26): 5227-5238.
- [24] MAI D M, DING P R, TAN L P, *et al.* PIWI-interacting RNA-54265 is oncogenic and a potential therapeutic target in colorectal adenocarcinoma[J]. *Theranostics*, 2018, 8(19): 5213-5230.
- [25] LIN X, XIA Y, HU D, *et al.* Transcriptome wide PiRNA profiling in human gastric cancer[J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(5): 3089-3099.
- [26] TAN L P, MAI D M, ZHANG B L, *et al.* PIWI-interacting RNA-36712 restrains breast cancer progression and chemoresistance by interaction with SEPW<sub>1</sub> pseudogene SEPWIP RNA[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 1-15.