

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.04.008

· 临床研究 ·

hsa_circ_0087378在食管鳞状细胞癌组织中的表达及其对患者预后的影响

朱永刚^{a,b}, 王明博^b, 孟令娇^a, 单保恩^a (河北医科大学第四医院 a. 科研中心; b. 胸外科, 河北 石家庄 050011)

[摘要] **目的:** 探讨 hsa_circ_0087378 在食管鳞状细胞癌(ESCC)组织中的表达及其对 ESCC 患者临床病理指标及预后的影响。**方法:** 通过 GEO 数据库筛选 ESCC 组织及相应癌旁组织中差异表达的 circRNA, 采用 qPCR 法在 10 例 ESCC 组织及相应癌旁组织中进行验证。选取河北医科大学第四医院 2015 年 10 月至 2016 年 4 月收治的 90 例 ESCC 患者癌组织及配对癌旁组织标本, 通过 FISH 法检测 hsa_circ_0087378 的表达, 分析其表达与 ESCC 患者临床病理指标及预后的关系。**结果:** GEO 数据库及 qPCR 分析结果显示, hsa_circ_0087378 在 ESCC 组织中表达最明显。FISH 结果显示, 90 例癌旁组织中 21 例 hsa_circ_0087378 呈高表达, 高表达率为 23.3%; 90 例 ESCC 组织中有 65 例 hsa_circ_0087378 呈高表达, 高表达率为 72.2%, 癌组织中表达明显高于癌旁组织 ($P<0.05$)。hsa_circ_0087378 在 ESCC 组织中的高表达与患者的临床分期和淋巴结转移有关联 ($P<0.05$), hsa_circ_0087378 高表达组 ESCC 患者的 5 年总生存率明显低于低表达组患者 ($P<0.05$)。**结论:** hsa_circ_0087378 在 ESCC 组织中呈高表达, 且与患者的临床分期与淋巴结转移和预后不良有关, 其可能是 ESCC 的治疗靶点。

[关键词] 食管鳞状细胞癌; 环状 RNA; hsa_circ_0087378; 预后

[中图分类号] R735.1; R730.2; R730.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)04-0327-05

Expression of hsa_circ_0087378 in esophageal squamous cell carcinoma tissues and its effect of prognosis of patients

ZHU Yonggang^{a,b}, WANG Mingbo^b, MENG Lingjiao^a, SHAN Baoen^a (a. Research Center; b. Thoracic Surgery, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of hsa_circ_0087378 in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) tissues, and its effect on the clinicopathological characteristics and prognosis of ESCC patients. **Methods:** The differentially expressed circRNAs between ESCC tissues and corresponding para-cancerous tissues were screened by GEO database, which were then validated in 10 pairs of ESCC tissues and corresponding para-cancerous tissues by qPCR method. 90 pairs of cancer tissues and corresponding para-cancerous tissues resected from ESCC patients who admitted to the Fourth Hospital of Hebei Medical University from October 2015 to April 2016 were collected to detect the expression of hsa_circ_0087378 by FISH method, and the relationship between the expression of hsa_circ_0087378 and the clinicopathological indicators and prognosis of ESCC patients were also analyzed. **Results:** GEO database and qPCR analysis results showed that hsa_circ_0087378 was significantly up-regulated in ESCC tissues. FISH results showed that hsa_circ_0087378 were highly expressed in 21 (23.3%) of 90 cases of para-cancerous tissues, but in 65 (72.2%) of 90 cases of ESCC tissues. The hsa_circ_0087378 over-expression rate in ESCC tissues was significantly higher than that in para-cancerous tissues ($P<0.05$). The high expression of hsa_circ_0087378 in ESCC tissues was related to the clinical stage and lymph node metastasis of ESCC patients ($P<0.05$). The 5-year overall survival rate of patients with high hsa_circ_0087378 expression was significantly lower than that in patients with low hsa_circ_0087378 expression ($P<0.05$). **Conclusion:** hsa_circ_0087378 is highly expressed in ESCC tissues and positively correlated with the clinical stage, lymph node metastasis, and poor prognosis of patients, suggesting that hsa_circ_0087378 can be used as a potential therapeutic target for ESCC.

[Key words] esophageal squamous cell cancer (ESCC); circRNA; hsa_circ_0087378; prognosis

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(4): 327-331. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.04.008]

食管癌是全球第七大常见的恶性肿瘤,也是全球癌症相关死亡的第六大原因^[1]。食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是中国人群食管癌的主要组织学类型^[2]。尽管近年来关于 ESCC 的治疗方案已有很大改进,但患者的 5 年生存率仍不理想^[3]。环状 RNA(circular RNA, circRNA)是

近年来发现的一类由共价键形成的闭合环状 RNA^[4-5]。由于缺乏 Poly A 尾, circRNA 与其相应的线

[基金项目] 河北省卫健委科研基金资助项目(No.20210074)

[作者简介] 朱永刚(1976—),男,硕士,主治医师,主要从事胸部恶性肿瘤治疗的研究, E-mail: zyghbyd@163.com

[通信作者] 单保恩, E-mail: baoshan@hotmail.com

性RNA相比具有高度稳定性^[6-7]。越来越多的研究结果^[8-12]表明,circRNA在人类细胞中广泛表达并参与包括肿瘤在内的许多疾病的发生发展。本课题分析了GEO数据库中ESCC和癌旁组织差异表达的circRNA,并采用qPCR法在中国人ESCC组织标本中进行验证,采用FISH法在90例ESCC组织及癌旁组织中对筛选到的hsa_circ_0087378进行检测,分析其表达与ESCC患者临床病理指标和预后的关系,为寻找ESCC的治疗靶点提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料

10对经过病理验证的ESCC及癌旁组织新鲜标本取自2020年12月在河北医科大学第四医院行手术治疗的ESCC患者;进行FISH检测的组织样本取自于2015年10月至2016年4月在河北医科大学第四医院行手术治疗的90例ESCC患者。所有癌组织标本均经病理学检查证实为ESCC,且患者术前未行放疗、化疗。研究方案征得医院伦理委员会批准(2020ky357),入组患者或其家属均签署知情同意书。

1.2 qPCR法检测ESCC组织中hsa_circ_0087378的表达

采用TRIzol试剂提取组织的总RNA,根据反转录试剂盒(购自Promega公司)说明书将提取的总RNA反转录为cDNA,然后使用GoTaq® qPCR Master Mix(购自Promega公司)进行qPCR检测,所用引物序列:U6上游为5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',下游为5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3';hsa_circ_0087378上游为5'-CTGTGGTGGTGATTGCGTCT-3',下游为5'-ATGTCATTCGCTGCAGTTCC-3'。qPCR反应条件:预变性95℃5min;95℃15s,58℃30s,72℃30s,共40个循环;72℃延伸10min。以U6为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算hsa_circ_0087378的相对表达量。

1.3 FISH法检测ESCC组织中hsa_circ_0087378的表达

组织切片经脱蜡入水后用PBS冲洗,加入预热的蛋白酶K溶液37℃处理20min,PBS冲洗,加入封闭液37℃处理1h,加入生物素标记的针对hsa_circ_0087378环化剪接点的特异性探针(序列为5'-TAATTTGGGTTTGCACCTTTTCATGC-3')在37℃下杂交过夜。次日,使用缓冲液洗脱非特异性结合位点,使用Cy5标记的链霉亲和素(ZyMAX™ Grade, Invitrogen公司)检测荧光信号。DAPI复染10min,封片后采用LSM 900共聚焦显微镜(Zeiss公司)捕获图像。

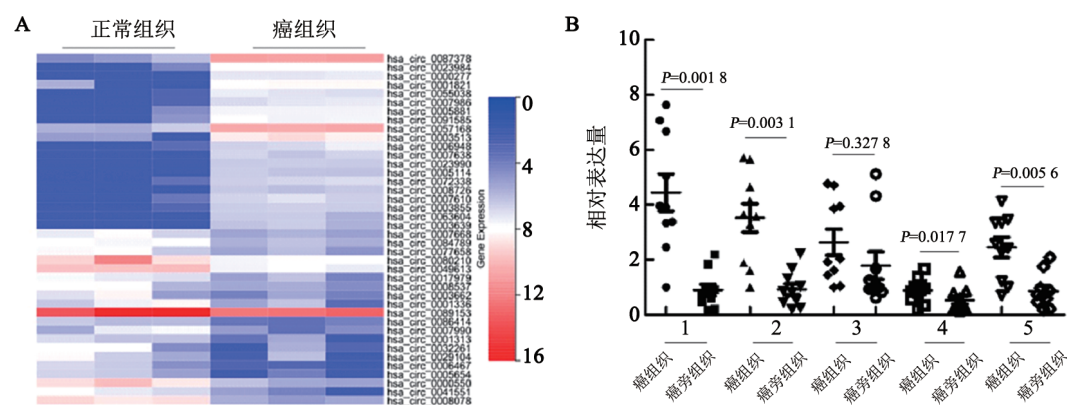
1.4 统计学处理

采用SPSS 22.0统计软件分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用t检验分析circRNA在组织中的表达情况。计数资料以率表示,采用卡方检验分析hsa_circ_0087378的表达与临床病理学指标之间的关系。通过Kaplan-Meier方法评估患者的总体生存率,通过Log-Rank检验比较各组之间的差异,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ESCC组织中hsa_circ_0087378表达升高最为显著

从GEO数据库中查找ESCC及癌旁组织的circRNA芯片数据集GSE131969,以 $|\log_2(FC)| \geq 1$ 和 $P < 0.05$ 为标准,共筛选得到602个在ESCC中上调的circRNA,89个下调的circRNA。图1A为上调及下调倍数居高端的20个circRNA的差异表达图。选取10对ESCC组织及相应癌旁组织,采用qPCR法对数据库中筛选到的呈高上调前5位的circRNA进行验证,结果显示,hsa_circ_0087378、hsa_circ_0023984、hsa_circ_0000277、hsa_circ_0055038在ESCC组织中呈高表达,其中hsa_circ_0087378的表达水平最高($P < 0.01$;图1B)。



1: hsa_circ_0087378; 2: hsa_circ_0023984; 3: hsa_circ_0000277; 4: hsa_circ_0001821; 5: hsa_circ_0055038

A: GEO数据库GSE131969数据集中circRNA在ESCC组织及相应的癌旁组织中的差异表达;

B: 通过qPCR法验证circRNA在10对ESCC组织及相应的癌旁组织中的差异表达

图1 ESCC组织和相应癌旁组织中差异表达的circRNA

2.2 hsa_circ_0087378在ESCC组织中呈高表达

FISH检测结果(图2)显示,90例癌旁组织中,21例 hsa_circ_0087378 呈高表达,高表达率为 23.3% (21/95);90 例 ESCC 组织 中,有 65 例 hsa_circ_

0087378 呈高表达,高表达率为 72.2%(65/95),结果表明,ESCC 组织中 has_circ_0087387 表达水平明显高于癌旁组织($P<0.05$)。

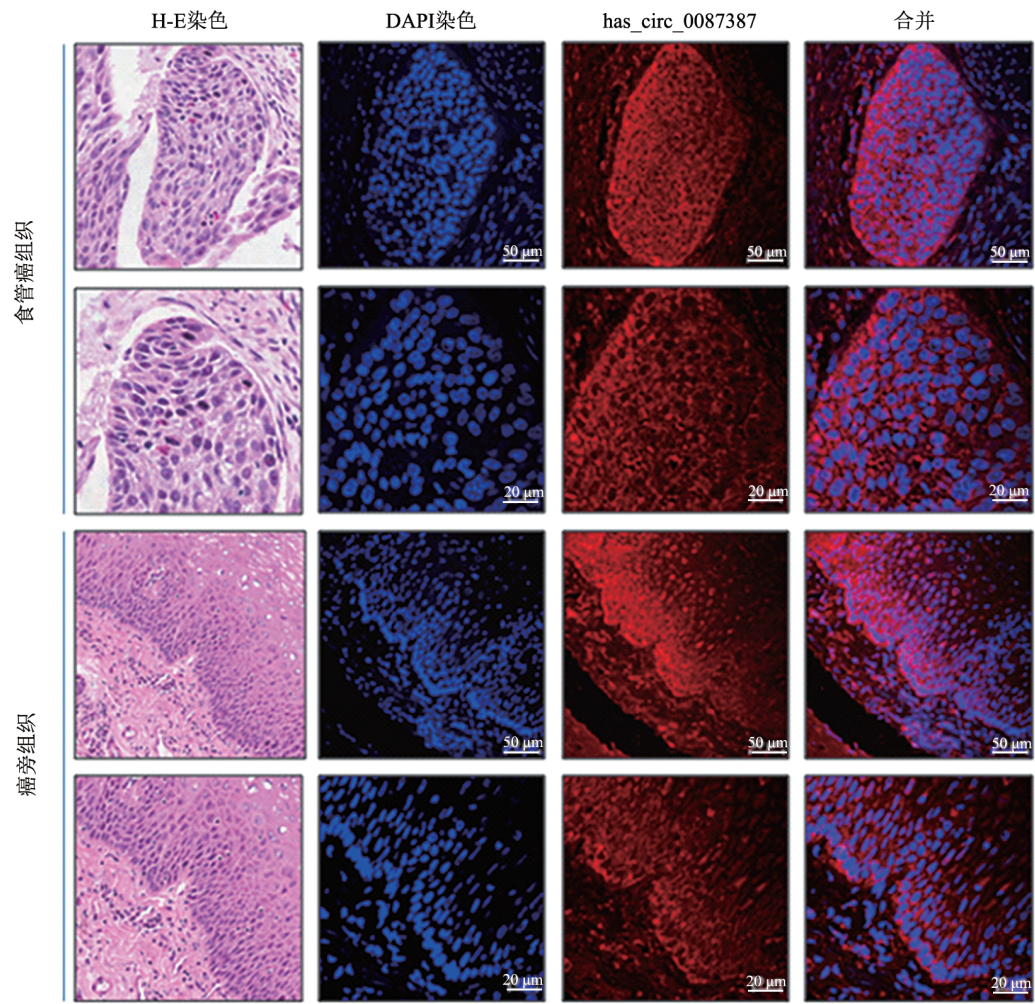


图2 FISH法检测ESCC组织和癌旁组织中 hsa_circ_0087378 的表达

2.3 ESCC 组织中 hsa_circ_0087378 表达与 ESCC 患者临床指标的关系

分析ESCC 组织中 has_circ_0087387 表达与患者临床指标的关系,结果(表1)显示,hsa_circ_0087378 的高表达与临床分期和淋巴结转移具有明显关联(均 $P<0.05$)。

2.4 hsa_circ_0087378 高表达的ESCC患者预后较差

生存分析结果(图3)显示,hsa_circ_0087378 高表达组的ESCC 患者5年总生存率明显低于低表达组患者($P=0.005$),提示 hsa_circ_0087378 可能是ESCC 患者预后不良的重要指标。

3 讨论

近年来,越来越多的研究表明,circRNA 在食管癌的发展中起着至关重要的作用,有望成为食管癌

早期诊断、预后判断的分子标志物及治疗靶点^[13-16]。例如,hsa_circ_0000277 可以通过抑制 miR-4766-5p 的功能,从而上调层粘连蛋白 $\alpha 1$ (laminin alpha 1, LAMA1),促进 ESCC 的进展^[17]。circRNA has_circ_0006168 可通过调节 miR-194-5p/JMJD1C 轴而增强 ESCC 对紫杉醇的抗性^[18]。hsa_circ_0000700 通过作为 miR-1229 的分子海绵促进 ESCC 细胞的增殖和迁移^[19-20]。

本研究通过 GEO 数据库分析了 ESCC 组织和其相应癌旁组织中差异表达的 circRNA,并以 qPCR 法验证,结果发现 hsa_circ_0087378、hsa_circ_0023984、hsa_circ_0000277、hsa_circ_0055038 在 ESCC 组织中呈高表达,其中 hsa_circ_0087378 表达水平最高。随后采用 FISH 法检测了 hsa_circ_0087378 在 90 例中国人 ESCC 组织及其相应的癌旁组织中的表达,发现其

在ESCC组织中的表达明显高于其相应的癌旁组织,并且其表达与ESCC患者的临床分期及淋巴结转移具有明显关联。此外,生存分析结果表明,hsa_circ_0087378的高表达与ESCC患者的5年总生存率较差有关联,其可作为ESCC患者预后不良的指标。以上结果表明,hsa_circ_0087378可能在ESCC进展中发挥了促癌作用,推动了ESCC的发展进程。

表1 ESCC组织中hsa_circ_0087378表达与ESCC患者临床指标的关系

临床指标	hsa_circ_0087378		χ^2	P
	低	高		
年龄/岁				
<60	8	22	0.028	0.868
≥60	17	43		
性别				
男	19	47	0.126	0.723
女	6	18		
病理分期				
I~II	18	27	6.702	0.010
III~IV	7	38		
淋巴结转移				
是	8	40	6.330	0.012
否	17	25		

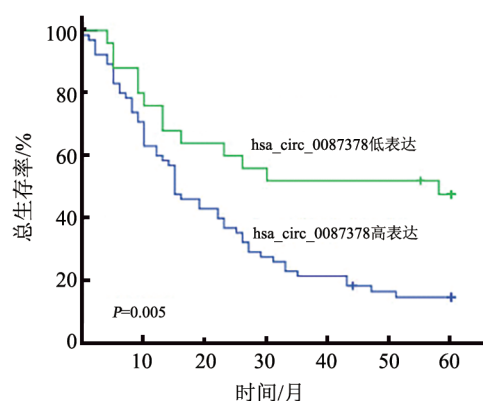


图3 hsa_circ_0087378的表达与ESCC患者5年总生存率的关系

综上所述,本研究为寻找ESCC的新型肿瘤生物标志物和潜在治疗靶点提供了实验依据。然而,hsa_circ_0087378在ESCC中发挥作用的具体分子机制仍不明确,需要今后深入研究。

参考文献

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424. DOI:10.3322/caac.21492.

[2] ABNET C C, ARNOLD M, WEI W Q. Epidemiology of esophageal squamous cell carcinoma[J]. Gastroenterology, 2018, 154(2): 360-373. DOI:10.1053/j.gastro.2017.08.023.

[3] PENNATHUR A, GIBSON M K, JOBE B A, *et al.* Oesophageal carcinoma[J]. Lancet, 2013, 381(9864): 400-412. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60643-6.

[4] WU Q F, WANG Y, CAO M J, *et al.* Homology-independent discovery of replicating pathogenic circular RNAs by deep sequencing and a new computational algorithm[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(10): 3938-3943. DOI:10.1073/pnas.1117815109.

[5] JECK W R, SHARPLESS N E. Detecting and characterizing circular RNAs[J]. Nat Biotechnol, 2014, 32(5): 453-461. DOI: 10.1038/nbt.2890.

[6] JECK W R, SORRENTINO J A, WANG K, *et al.* Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats[J]. RNA, 2013, 19(2): 141-157. DOI:10.1261/rna.035667.112.

[7] LEDFORD H. Circular RNAs throw genetics for a loop[J/OL]. Nature, 2013, 494(7438): 415[2012-09-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23446397/>. DOI:10.1038/494415a.

[8] ZHANG Y, CHEN Y, WAN Y, *et al.* Circular RNAs in the regulation of oxidative stress[J/OL]. Front Pharmacol, 2021, 12: 697903 [2021-09-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34385919/>. DOI:10.3389/fphar.2021.697903.

[9] MA Y L, ZHENG L W, GAO Y Y, *et al.* A comprehensive overview of circRNAs: emerging biomarkers and potential therapeutics in gynecological cancers[J/OL]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 709512 [2021-09-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34368160/>. DOI: 10.3389/fcell.2021.709512.

[10] JI X Y, SUN W, LV C Z, *et al.* Circular RNAs regulate glucose metabolism in cancer cells[J]. Onco Targets Ther, 2021, 14: 4005-4021. DOI:10.2147/OTT.S316597.

[11] SOLÉ C, MENTXAKA G, LAWRIE C H. The use of circRNAs as biomarkers of cancer[J]. Methods Mol Biol, 2021, 2348: 307-341. DOI:10.1007/978-1-0716-1581-2_21.

[12] LIU S S, LI Q Y, MA Y, *et al.* Circular RNAs as novel potential biomarkers for pancreatic cancer[J]. J Cancer, 2021, 12(15): 4604-4615. DOI:10.7150/jca.58640.

[13] FAN L Y, CAO Q, LIU J, *et al.* Circular RNA profiling and its potential for esophageal squamous cell cancer diagnosis and prognosis[J/OL]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 16 [2021-09-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30674324/>. DOI:10.1186/s12943-018-0936-4.

[14] JIANG C, XU D F, YOU Z B, *et al.* Dysregulated circRNAs and CeRNA network in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2019, 24(2): 277-290. DOI:10.2741/4717.

[15] SHI P Y, SUN J, HE B Y, *et al.* Profiles of differentially expressed circRNAs in esophageal and breast cancer[J]. Cancer Manag Res, 2018, 10: 2207-2221. DOI:10.2147/CMAR.S167863.

[16] FENG Q Q, ZHANG H L, YAO D L, *et al.* Emerging role of non-coding RNAs in esophageal squamous cell carcinoma[J/OL]. Int J Mol Sci, 2019, 21(1): 258 [2021-09-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31905958/>. DOI:10.3390/ijms21010258.

[17] ZHOU P L, WU Z Y, ZHANG W G, *et al.* Circular RNA hsa_circ_0000277 sequesters miR-4766-5p to upregulate LAMA1 and promote esophageal carcinoma progression[J/OL]. Cell Death Dis,

2021, 12(7): 676 [2021-09-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34226522/>. DOI:10.1038/s41419-021-03911-5.

[18] QU F Y, WANG L N, WANG C Y, *et al.* Circular RNA circ_0006168 enhances Taxol resistance in esophageal squamous cell carcinoma by regulating miR-194-5p/JMJD1C axis[J/OL]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 273 [2021-09-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34022910/>. DOI:10.1186/s12935-021-01984-y.

[19] FANG J, JI W H, WANG F Z, *et al.* Circular RNA hsa_circ_0000700 promotes cell proliferation and migration in esophageal squamous cell carcinoma by sponging miR-1229[J]. *J Cancer*, 2021, 12(9): 2610-2623. DOI:10.7150/jca.47112.

[20] HU X T, WU D G, HE X T, *et al.* circGSK3 β promotes metastasis in esophageal squamous cell carcinoma by augmenting β -catenin signaling[J/OL]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 160 [2021-09-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31722716/>. DOI: 10.1186/s12943-019-1095-y.

[收稿日期] 2021-10-28 [修回日期] 2022-04-04

[本文编辑] 向正华, 沈志超