

• 论著 •

环状 RNA FN1 在食管癌组织中的表达及预后预测价值

韩晓锐 陈小芳

【摘要】 目的 探究环状 RNA 纤维连接蛋白 1 (circRNA FN1, 下文简称 FN1) 在食管癌组织中的表达水平, 分析其与食管癌患者临床病理特征的关系和预后预测价值。**方法** 选择 2015 年 1 月至 2017 年 1 月在西安国际医学中心医院和西安高新医院接受食管癌切除术的 115 例食管癌患者, 收集患者的食管癌组织和癌旁组织, 术后随访 60 个月。采用实时荧光定量 PCR 法检测食管癌组织及癌旁组织中 FN1 的表达水平, 采用 Kaplan-Meier 法分析食管癌组织中 FN1 的表达水平与患者预后的关系, 采用 Cox 回归模型分析食管癌患者预后的独立危险因素。**结果** 食管癌组织中 FN1 的相对表达量为 2.88 ± 0.63 , 显著高于癌旁组织 (1.02 ± 0.02), 差异有统计学意义 ($t=11.293$, $P=0.001$)。FN1 高表达组与 FN1 低表达组的性别、年龄、肿瘤浸润深度差异均无统计学意义 (P 均 >0.05), 2 组的淋巴结转移、肿瘤直径、临床分期差异均有统计学意义 (P 均 <0.05)。Kaplan-Meier 生存分析结果显示, FN1 高表达组的累积生存率显著低于 FN1 低表达组, 差异有统计学意义 ($P=0.047$)。单因素 Cox 回归模型分析结果显示, 食管癌患者的预后与淋巴结转移、肿瘤直径、临床分期及食管癌组织中 FN1 表达水平均有相关性 (P 均 <0.05)。多因素 Cox 回归模型分析结果显示, 淋巴结转移、临床分期、食管癌组织中 FN1 表达水平均为食管癌患者预后的独立危险因素 (P 均 <0.05)。**结论** 食管癌组织中 FN1 表达上调, 其可作为预测食管癌患者预后的生物标志物。

【关键词】 食管癌; 癌组织; 环状 RNA; 预后预测

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-534X. 2023. 06. 004

Expression and prognostic predictive value of circRNA FN1 in esophageal cancer

tissues HAN Xiaorui, CHEN Xiaofang. Department of Pathology, Xi'an International Medical Center Hospital, Xi'an 710100, China

【Abstract】 Objective This paper attempts to investigate the expression of circle RNA fibronectin 1 (circRNA FN1, hereinafter referred to as FN1) in esophageal cancer tissues and to analyze its relationship with clinicopathological features and prognostic predictive value in patients with esophageal cancer. **Methods** A total of 115 esophageal cancer patients who underwent esophagectomy for esophageal cancer at Xi'an International Medical Center Hospital and Xi'an Gaoxin Hospital from January 2015 to January 2017 were selected, whose esophageal cancer tissues and paracancerous tissues were collected and followed up for 60 months after surgery. The expression of FN1 in esophageal cancer tissues and paracancerous tissues was detected by real-time fluorescence quantitative PCR, the relationship between the expression level of FN1 in esophageal cancer tissues and patients' prognosis was analyzed utilizing the Kaplan-Meier method, and the independent risk factors for the prognosis of esophageal cancer patients were analyzed using the Cox regression model. **Results** The relative expression of FN1 in esophageal cancer tissues is 2.88 ± 0.63 , which is significantly higher than that in paraneoplastic tissues (1.02 ± 0.02), with a statistically significant

作者单位: 710100 西安国际医学中心医院病理科

通信作者: 陈小芳, Email: chenxiaofang122@126.com

difference ($t=11.293$, $P=0.001$). The differences in gender, age, and depth of tumor infiltration between the FN1 high-expression group and the FN1-low-expression group are not statistically significant ($P>0.05$), and the differences between the 2 groups in lymph node metastasis, tumor diameter, and clinical stage are statistically significant ($P<0.05$). The results of Kaplan-Meier survival analysis show that the cumulative survival rate of the FN1 high-expression group is significantly lower than that of the FN1 low-expression group, with a statistically significant difference ($P=0.047$). The results of one-way Cox regression model analysis show that the prognosis of esophageal cancer patients is related to lymph node metastasis, tumor diameter, clinical stage, and the FN1 expression in esophageal cancer tissues ($P<0.05$). The results of multifactorial Cox regression model analysis show that lymph node metastasis, clinical stage, and the FN1 expression in esophageal cancer tissues are all independent risk factors for the prognosis of esophageal cancer patients ($P<0.05$). **Conclusion** FN1 expression is upregulated in esophageal cancer tissues, which can be used as a biomarker for prognostic prediction in esophageal cancer patients.

【Key words】 Esophageal cancer; Cancer tissue; Circular RNA; Prognosis

食管癌是常见的恶性肿瘤，其特点是病死率较高，患者预后较差，5 年生存率低于 25%^[1]。食管癌的常规治疗包括手术、化学治疗和放射治疗，尽管目前食管癌的诊断和治疗已取得较大进展，但患者的预后仍不理想^[2]。因此，寻找食管癌的潜在生物靶点从而开发靶向治疗方案具有重要意义。

环状 RNA (circRNA) 为内源性非编码 RNA，其可在真核细胞中表达；circRNA 的特点是具有闭环结构，不易被 RNA 酶降解^[3]。研究表明，circRNA 通过 miRNA 或与 RNA 结合蛋白相互作用参与调节蛋白质的表达^[4]。在肿瘤组织和细胞系中，circRNA 异常表达可调控肿瘤细胞的恶性表型。circRNA 纤维连接蛋白 1 (FN1) 是来源于 FN1 基因的外显子，circRNA FN1 (下文简称 FN1) 是一种高度保守且在恶性肿瘤中呈高表达的 circRNA。Song 等^[5]的研究发现，FN1 在人食管癌组织中呈高表达，表明其具有致癌作用。胃肠道平滑肌瘤多发生于食管、胃和结肠，Panagopoulos 等^[6]采用 RNA 测序技术进行检测，发现食管平滑肌瘤组织中 FN1 表达水平显著升高，这提示 FN1 是胃肠道平滑肌瘤的潜在生物靶点。本研究分析了食管癌组织及癌旁组织中 FN1 的表达水平，并探究了食管癌组织中 FN1 表达水平对患者预后的预测价值，以期对食管癌的诊断及治疗提供参考依据。

1 研究对象与方法

1.1 研究对象

选择 2015 年 1 月至 2017 年 1 月在西安国际医学中心医院和西安高新医院接受食管癌切除术的 115 例食管癌患者作为研究对象，其中男性 65 例，女性 50 例，年龄 52~78 岁，平均年龄为

(65.39±10.22) 岁。纳入标准：(1) 患者的诊断符合《食管癌规范化诊治指南》^[7]中的诊断标准，并经病理组织学确诊为食管癌；(2) 临床资料完整；(3) 患者为首次确诊食管癌且未接受放射治疗和化学治疗。排除标准：(1) 合并其他恶性肿瘤；(2) 术后曾接受治疗；(3) 随访资料不完整。所有患者及家属均签署知情同意书，本研究经医院医学伦理委员会批准。

1.2 FN1 的表达水平检测

收集 115 例患者手术切除的食管癌组织及癌旁组织 (距肿瘤边缘 ≥ 2 cm)。使用 TRIzol 试剂 (购自美国 Invitrogen 公司) 提取总 RNA，使用 Nanodrop 2000 型分光光度计检测总 RNA 的浓度和纯度。使用 cDNA 反转录试剂盒 (购自美国 Roche 公司) 将总 RNA 反转录为 cDNA。采用实时荧光定量 PCR 法检测 FN1 的表达水平 (CFX96 型 PCR 仪，购自美国 Bio-Rad 公司)。PCR 反应条件：95 °C 预变性 5 min；之后 95 °C 变性 20 s，60 °C 下退火 1 min，72 °C 延伸 30 s，共计 45 个循环。以 U6 为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 FN1 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物名称	序列
FN1	正向：5'-AGGAAGCCGAGGTTTAACTG-3'
	反向：5'-AGGAAGCCGAGGTTTAACTG-3'
U6	正向：5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'
	反向：5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'

1.3 随访

采用电话询问或门诊复查的方式对入组患者

进行为期 60 个月的随访, 每 3 个月随访 1~2 次, 随访截至 2022 年 1 月 31 日, 或以患者死亡为随访终点。

1.4 统计学分析

应用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 t 检验。计数资料以例 (%) 表示, 组间比较采用 χ^2 检验。采用 Kaplan-Meier 法分析 FN1 的表达水平与食管癌患者总生存期的关系。采用 Cox 回归模型分析影响食管癌患者预后的危险因素。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 食管癌组织和癌旁组织中 FN1 的表达水平比较

实时荧光定量 PCR 法检测结果显示, 食管癌组织中 FN1 的相对表达量为 2.88 ± 0.63 , 显著高于癌旁组织 (1.02 ± 0.02), 差异有统计学意义 ($t = 11.293$, $P = 0.001$)。

2.2 食管癌组织中 FN1 的表达水平与患者临床病理特征的关系

以食管癌组织中 FN1 相对表达量的中位数将患者分为 FN1 高表达组 (≥ 1.78 , 63 例) 和 FN1 低表达组 (< 1.78 , 52 例)。分析结果显示, FN1 高表达组与 FN1 低表达组的性别、年龄、肿瘤浸润深度差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05), 2 组的淋巴结转移、肿瘤直径、临床分期差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。见表 2。

2.3 食管癌组织中 FN1 的表达水平与患者预后的关系

随访结果显示, FN1 高表达组死亡 17 例, 累积生存率为 73.02%; FN1 低表达组死亡 2 例, 累积生存率为 96.15%, FN1 高表达组的累积生存率显著低于 FN1 低表达组, 差异有统计学意义 ($P = 0.047$)。见图 1。

表 2 食管癌组织中 FN1 的表达水平与患者临床病理特征的关系 / 例 (%)

项目	例数	高表达组	低表达组	χ^2 值	P 值
性别				0.053	0.818
男性	65	35 (30.43)	30 (26.09)		
女性	50	28 (24.35)	22 (19.13)		
年龄				0.084	0.772
< 60 岁	58	31 (26.96)	27 (23.48)		
≥ 60 岁	57	32 (27.82)	25 (21.74)		
浸润深度				0.192	0.661
未浸润至肌层	66	35 (30.43)	31 (26.96)		
浸润至肌层	49	28 (24.35)	21 (18.26)		
淋巴结转移				11.532	0.001
无	53	20 (17.39)	33 (28.70)		
有	62	43 (37.39)	19 (16.52)		
肿瘤直径				5.145	0.023
< 5.0 cm	53	23 (20.00)	30 (26.09)		
≥ 5.0 cm	62	40 (34.78)	22 (19.13)		
临床分期				5.017	0.025
I~II 期	51	22 (19.13)	29 (25.22)		
III~IV 期	64	41 (35.65)	23 (20.00)		

2.4 影响食管癌患者预后的单因素分析

单因素 Cox 回归模型分析结果显示, 食管癌患者的预后与淋巴结转移、肿瘤直径、临床分期及食管癌组织中 FN1 的表达水平均有相关性 (P 均 < 0.05)。见表 3。

2.5 影响食管癌患者预后的多因素分析

多因素 Cox 回归模型分析结果显示, 淋巴结转移、临床分期及食管癌组织中 FN1 的表达水平均为食管癌患者预后的独立危险因素 (P 均 < 0.05)。见表 4。

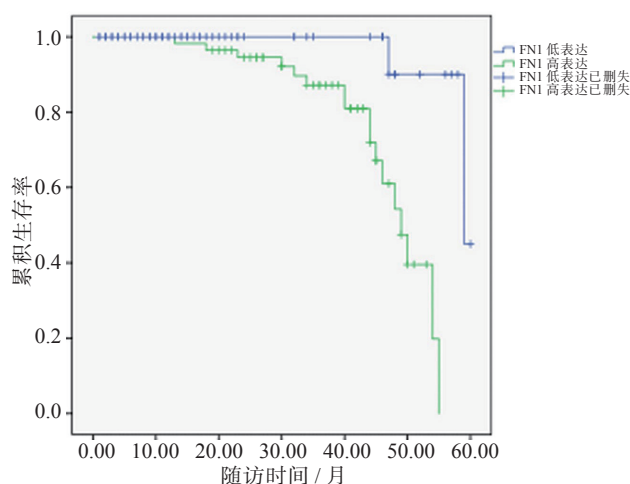


图1 食管癌组织中FN1的表达水平与患者预后的关系

表3 影响食管癌患者预后的单因素分析

项目	HR 值	95%CI	P 值
性别 (男性 / 女性)	1.023	0.387~1.467	0.447
年龄 (≥ 65 岁 / <65 岁)	1.126	0.489~1.316	0.296
浸润深度 (未浸润至 / 浸润至肌层)	1.187	0.834~1.532	0.228
淋巴结转移 (有 / 无)	4.362	1.953~6.073	0.001
肿瘤直径 (<5.0 cm / ≥ 5.0 cm)	3.286	1.974~8.062	0.001
临床分期 (I~II 期 / III~IV 期)	2.267	1.129~4.645	0.021
FN1 (低表达 / 高表达)	3.119	1.428~5.264	0.001

表4 影响食管癌患者预后的多因素分析

项目	HR 值	95%CI	P 值
淋巴结转移 (有 / 无)	2.342	1.524~4.864	0.014
肿瘤直径 (<5.0 cm / ≥ 5.0 cm)	1.345	0.873~3.221	0.108
临床分期 (I~II 期 / III~IV 期)	1.875	1.667~3.256	0.001
FN1 (低表达 / 高表达)	2.212	1.265~4.087	0.025

3 讨论

食管癌的发病率和病死率均较高,其治疗虽已取得了一定的进展,但疗效仍不理想,因此寻找食管癌的生物标志物对其诊疗及预后预测具有重要意义。circRNA 是由 mRNA 反向剪接而产生的共价闭合环,在肿瘤的发生和进展中起着重要的调节作用,可能可以作为恶性肿瘤诊断和预后预测的生物标志物^[8]。研究表明, FN1 参与了食管鳞状细胞癌 (以下简称为食管鳞癌) 的发生和进展,食管鳞癌组织和细胞中 FN1 的表达水平均显著升高^[9],这与本研究结果一致。本研究结果显示,食管癌组织中 FN1 的相对表达量为 2.88 ± 0.63 ,显著高于癌旁组织 (1.02 ± 0.02),差异有统计学意义 ($t=11.293$, $P=0.001$)。FN1 高表达组与 FN1 低表达组

的性别、年龄、肿瘤浸润深度差异均无统计学意义 (P 均 >0.05), 2 组的淋巴结转移、肿瘤直径、临床分期差异均有统计学意义 (P 均 <0.05)。

随着高通量测序技术的发展, circRNA 在生物学领域的应用逐渐受到关注。circRNA 在人体体液 (包括血液、唾液、组织液) 及组织中呈高表达,是食管癌潜在的生物标志物^[10]。研究发现,裸鼠食管癌组织中 circRNA B 细胞特异性莫洛尼鼠白血病病毒整合位点 1 (BMI1) 的表达水平显著升高,提示其可促进移植瘤进展^[11]。Niu 等^[12]的研究表明, circRNA 可以调控食管癌的发生和进展,对该病的诊断具有重要意义。circRNA 溶血磷脂酸受体 3 (LPAR3) 可以通过促进食管癌细胞的侵袭和迁移,从而促进食管癌进展^[13]。研究表明, circRNA 转录因子样 5 (TCFL5) 在食管癌中的表达水平显著升高,并且 circRNA TCFL5 可通过 miR-543/ 形成素同源蛋白 2 (FMNL2) 信号通路调控 M2 巨噬细胞的极化,促进食管癌进展,提示其可能是食管癌的治疗靶点^[14]。

研究表明, FN1 参与了细胞增殖过程中的细胞黏附和迁移,与肿瘤细胞迁移和侵袭密切相关,其参与了甲状腺癌、肾癌、鼻咽癌及食管癌的进展^[14]。Cai 等^[15]的研究发现, FN1 过表达可促进食管鳞癌的进展,而潜在转化生长因子 β 结合蛋白 1 (LTBP1) 表达下调则可抑制 FN1 表达,从而抑制食管鳞癌发生淋巴结转移;此外, FN1 还可抑制肿瘤细胞的恶性生物学行为,调控上皮间充质转化进程,这提示 FN1 可能是食管鳞癌患者的潜在治疗靶点。Li 等^[16]的研究结果显示,分泌性磷蛋白 1 (SPP1) 和 FN1 与食管癌患者的总生存率均呈正相关,并且可能可以预测食管癌复发,该研究表明 SPP1 和 FN1 可能可以作为预测食管癌进展和预后的生物标志物。FN1 可促进食管鳞癌细胞的增殖、迁移和侵袭,其高表达与患者的预后不良有关^[17]。研究表明, miR-1 可通过调控 FN1 抑制食管鳞癌细胞的增殖和侵袭,并促进食管鳞癌细胞凋亡, miR-1/FN1 信号通路可能是食管鳞癌潜在的治疗靶点^[18]。食管鳞癌组织中 FN1 的高表达与患者的预后不良密切相关, FN1 高表达可促进食管鳞癌细胞发生形态学改变和迁移,从而促进肿瘤转移^[19],这与本研究结果一致。本研究结果表明, FN1 高表达组的累积生存率显著低于 FN1 低表达组。多因素 Cox 回归模型分析结果显示,淋巴结转移、临床分期及食管癌

组织中 FN1 表达水平均为食管癌患者预后的独立危险因素。

综上所述,食管癌组织中 FN1 表达上调,其为食管癌患者预后的独立危险因素,可作为预测患者预后的生物标志物和潜在治疗靶点。本研究存在一些不足之处:其一,本研究的样本量较小,今后应扩大样本量,进一步验证本文结论;其二,本研究未阐明 FN1 在食管癌进展中的调控机制,今后应在本研究基础上进一步探究其作用机制。

参考文献

- 1 Almatroudi A. The incidence rate of esophageal cancer in Saudi Arabia: an observational and a descriptive epidemiological analyses[J]. *Front Public Health*, 2022, 10: 818691.
- 2 Zhang W, Bhagwath AS, Ramzan Z, et al. Itraconazole exerts its antitumor effect in esophageal cancer by suppressing the HER2/AKT signaling pathway[J]. *Mol Cancer Ther*, 2021, 20(10): 1904-1915.
- 3 Zang HL, Ji FJ, Ju HY, et al. Circular RNA AKT3 governs malignant behaviors of esophageal cancer cells by sponging miR-17-5p[J]. *World J Gastroenterol*, 2021, 27(3): 240-254.
- 4 Lin C, Xi Y, Yu H, et al. circRNA TCFL5 promote esophageal cancer progression by modulating M2 macrophage polarization via the miR-543-FMNL2 axis[J]. *J Oncol*, 2022, 2022: 5075615.
- 5 Song G, Liu K, Yang X, et al. SATB1 plays an oncogenic role in esophageal cancer by up-regulation of FN1 and PDGFRB[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(11): 17771-17784.
- 6 Panagopoulos I, Gorunova L, Lund-Iversen M, et al. Recurrent fusion of the genes FN1 and ALK in gastrointestinal leiomyomas[J]. *Mod Pathol*, 2016, 29(11): 1415-1423.
- 7 赫捷. 食管癌规范化诊治指南 [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2013.
- 8 Tang X, Ren H, Guo M, et al. Review on circular RNAs and new insights into their roles in cancer[J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2021, 19: 910-928.
- 9 Zhang Y, Tang Q, Huang XM, et al. Circular RNA circCNOT6L regulates cell development through modulating miR-384/FN1 axis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(7): 3674-3685.
- 10 Zhang X, Lu N, Wang L, et al. Circular RNAs and esophageal cancer[J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20: 362.
- 11 Zhao Q, Zhu X, Ke JM, et al. Circular RNA BMI1 serves as a potential target for diagnosis and treatment in esophageal cancer[J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2021, 20: 15330338211033075.
- 12 Niu C, Zhao L, Guo X, et al. Diagnostic accuracy of circRNAs in esophageal cancer: a meta-analysis[J]. *Dis Markers*, 2019, 2019: 9673129.
- 13 Shi Y, Fang N, Li Y, et al. Circular RNA LPAR3 sponges microRNA-198 to facilitate esophageal cancer migration, invasion, and metastasis[J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(8): 2824-2836.
- 14 Huang S, Huang P, Wu H, et al. LINC02381 aggravates breast cancer through the miR-1271-5p/FN1 axis to activate PI3K/AKT pathway[J]. *Mol Carcinog*, 2022, 61(3): 346-358.
- 15 Cai R, Wang P, Zhao X, et al. LTBP1 promotes esophageal squamous cell carcinoma progression through epithelial-mesenchymal transition and cancer-associated fibroblasts transformation[J]. *J Transl Med*, 2020, 18(1): 139.
- 16 Li M, Wang K, Pang Y, et al. Secreted phosphoprotein 1 (SPP1) and fibronectin 1 (FN1) are associated with progression and prognosis of esophageal cancer as identified by integrated expression profiles analysis[J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e920355.
- 17 Ma J, Xiao Y, Tian B, et al. Long noncoding RNA lnc-ABCA12-3 promotes cell migration, invasion, and proliferation by regulating fibronectin 1 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(2): 1374-1387.
- 18 Wei Q, Li X, Yu W, et al. microRNA-messenger RNA regulatory network of esophageal squamous cell carcinoma and the identification of miR-1 as a biomarker of patient survival[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(8): 12259-12272.
- 19 Xiao J, Yang W, Xu B, et al. Expression of fibronectin in esophageal squamous cell carcinoma and its role in migration[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 976.

(收稿日期: 2023-01-10)

(本文编辑: 严靖)