DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2025.02.006

·临床研究·

食管鳞状细胞癌患者血清外泌体miR-1246的表达及其临床意义

赵薇,崔雯瑄,黄焙炫,尚晓雅,王振达,杜彦艳,赵红峥,焦文静,马鸣(河北医科大学第四医院 检验科,河北 石家庄 050011)

[摘 要] **目的:**通过筛选在食管鳞状细胞癌(ESCC)患者血清外泌体(Exo)中高表达的微小RNA(miRNA)并分析其与患者临床病理特征的关系,探讨Exo来源的miRNA是否具有成为ESCC临床辅助诊断标志物的潜力。**方法:**采集2021年12月至2023年6月期间在河北医科大学第四医院收治的45例ESCC初诊患者和50例健康受试者的血清及相关临床资料,分别作为ESCC组和对照组。用基因表达综合数据库(GEO)和qPCR法筛选、鉴定出ESCC患者血清表达升高的候选miRNA-miR-1246,用受试者工作特征曲线分析血清miR-1246对ESCC的诊断效能,Logistic回归分析其与ESCC患者临床特征进展的关系,χ^2检验分析其与ESCC患者临床病理特征的关系。分离纯化受试者血清中的Exo并进行表征验证,qPCR检测Exo中miR-1246的表达。常规培养ESCC KYSE150和KYSE30细胞,用Lipofectamine 2000分别将mimics-NC、miR-1246 mimics转染至KYSE150细胞,将inhibitor-NC和miR-1246 inhibitor转染至KYSE30细胞,分别记为mimics-NC、miR-1246mimics、inhibitor-NC和miR-1246-inhibitor组。用mimics-NC和miR-1246 mimics组KYSE150细胞来源的Exo处理KYSE150和KYSE30细胞。用CCK-8法、划痕愈合实验、Transwell小室实验分别检测各组细胞的增殖、迁移和侵袭能力。WB法检测Exo标志物及各组细胞中上皮间皮转化相关蛋白及Tet甲基胞嘧啶双加氧酶2(TET2)和细胞黏附分子1(CADM1)蛋白的表达。双萤光素酶报告基因实验验证miR-1246与TET2和CADM1的靶向结合关系。**结果:**生物信息学筛选ESCC患者血清中差异表达最为显著的miRNA为miR-1246。试验提取患者的血清Exo符合典型Exo表征。Ⅰ~Ⅱ期ESCC患者血清Exo-miR-1246表达水平显著高于健康受试者($P < 0.01$);Ⅲ~Ⅳ期ESCC患者的血清Exo-miR-1246水平明显高于Ⅰ~Ⅱ期患者($P < 0.01$)。ROC曲线分析表明,血清中的Exo-miR-1246对ESCC有较高的辅助鉴别诊断价值($P < 0.05$),并且Exo-miR-1246对ESCC患者临床进展的辅助诊断效能高于CEA与SCC-Ag($P < 0.05$),三者联合检测会进一步提高辅助诊断患者分期效能($P < 0.01$)。Exo-miR-1246可能是ESCC患者临床进展的独立危险因素($P < 0.05$)。血清Exo-miR-1246表达水平与ESCC的T分期、N分期和临床分期有关联($P < 0.01$)。过表达miR-1246可促进ESCC细胞增殖、迁移、侵袭、上皮间质转化和抑制凋亡而抑制miR-1246则相反。数据库数据分析发现,TET2和CADM1是miR-1246的靶基因,双萤光素酶报告基因实验证实miR-1246可直接与TET2和CADM1 mRNA结合并抑制其表达($P < 0.01$)。用过表达miR-1246的细胞来源的Exo处理KYSE150和KYSE30细胞与在其中过表达miR-1246的作用一致。**结论:**Exo来源的miR-1246具有成为ESCC临床辅助诊断标志物的潜力,其可能通过调控TET2和CADM1的表达水平来影响ESCC的发生发展。

[关键词] 外泌体;miR-1246;食管鳞状细胞癌;Tet甲基胞嘧啶双加氧酶2;细胞黏附分子1;临床意义
[中图分类号] R735.1;R730.43 [文献标识码] A [文章编号] 1007-385x(2025)02-0176-13

Expression and clinical significance of serum exosome miR-1246 in patients with esophageal squamous cell carcinoma

ZHAO Wei, CUI Wenxuan, HUANG Beixuan, SHANG Xiaoya, WANG Zhenda, DU Yanyan, ZHAO Hongzheng, JIAO Wenjing, MA Ming (Department of Clinical Laboratory, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] Objective: To screen for microRNAs (miRNAs) highly expressed in the serum exosomes (Exo) of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) patients and analyze their relationship with the clinicopathological characteristics of the patients, and to explore the potential of Exo-derived miRNAs as clinical auxiliary diagnostic markers for ESCC. **Methods:** Serum and relevant clinical data of 50 healthy subjects and 45 newly diagnosed ESCC patients admitted to the Fourth Hospital of Hebei Medical University between

[基金项目] 河北省自然科学基金(No. H201806115,No. H2024206074);河北医科大学"十四五"临床医学创新研究团队支持计划(No. 2022LCTD-B43);河北省政府资助临床医学优秀人才培养项目(No. ZF2025191);河北省卫生健康创新专项(No. 22377791D);河北省医学科学研究重点课题计划(20180483)
[作者简介] 赵薇(1998—),女,硕士生,初级检验师,主要从事食管癌诊断及免疫治疗的临床研究,E-mail: ZW15847@163.com;崔雯瑄(1997—),女,硕士生,初级检验师,主要从事食管癌诊断及免疫治疗的临床研究,E-mail: cwx1910@126.com
[通信作者] 马鸣,E-mail: 48301094@hebmu.edu.cn

December 2021 and June 2023 were collected, serving as the control group and the ESCC group respectively. The Gene Expression Omnibus (GEO) database and qPCR were used to screen and identify the candidate miRNA for increased expression in the serum of ESCC patients-miR-1246. The diagnostic efficacy of serum miR-1246 for ESCC was analyzed by the receiver operating characteristic curve. The relationship between miR-1246 and the clinical feature progression of ESCC patients was analyzed by Logistic regression, and the relationship between miR-1246 and the clinicopathological characteristics of ESCC patients was analyzed by the χ^2 test. Exosomes in the serum of the subjects were isolated, purified and characterized for verification. The expression of miR-1246 in Exo was detected by qPCR. ESCC KYSE150 and KYSE30 cells were routinely cultured. mimics-NC and miR-1246 mimics were transfected respectively into KYSE150 cells using Lipofectamine 2000. Inhibitor-NC and miR-1246 inhibitor were transfected into KYSE30 cells, which were respectively denoted as the minics-NC, miR-1246 mimics, inhibitor-NC and miR-1246-inhibitor groups. KYSE150 and KYSE30 cells were treated with Exo derived from KYSE150 cells in the mimics-NC and miR-1246 mimics groups. The proliferation, migration and invasion abilities of cells in each group were detected by the CCK-8 assay, scratch wound healing assay and Transwell chamber assay respectively. The expressions of Exo markers, epithelial-mesenchymal transition-related proteins, TET family methylcytosine dioxygenase 2 (TET2) and cell adhesion molecule 1 (CADM1) proteins in each group of cells were detected by WB assay. The targeting binding relationship between miR-1246 and TET2 and CADM1 was verified by the dual-luciferase reporter gene assay. **Results:** Bioinformatics screening showed that the miRNA with the most significant differential expression in the serum of ESCC patients was miR-1246. The serum Exo extracted from the patients conformed to the typical Exo characteristics. The expression level of serum Exo-miR-1246 in ESCC patients at stages Ⅰ-Ⅱ was significantly higher than that in healthy subjects ($P < 0.01$); the level of serum Exo-miR-1246 in ESCC patients at stages Ⅲ-Ⅳ was significantly higher than that in patients at stages Ⅰ-Ⅱ ($P < 0.01$). ROC curve analysis showed that Exo-miR-1246 in serum had a high value for auxiliary differential diagnosis of ESCC ($P < 0.05$), and the auxiliary diagnostic efficacy of Exo-miR-1246 for the clinical progression of ESCC patients was higher than that of CEA and SCC-Ag ($P < 0.05$). The combined detection of the three could further improve the efficacy of auxiliary diagnosis of patient staging ($P < 0.01$). Exo-miR-1246 might be an independent risk factor for the clinical progression of ESCC patients ($P < 0.05$). The expression level of serum Exo-miR-1246 was associated with the T-stage, N-stage and clinical stage of ESCC ($P < 0.01$). Overexpression of miR-1246 could promote the proliferation, migration, invasion, epithelial-mesenchymal transition and inhibit apoptosis of ESCC cells, while inhibition of miR-1246 had the opposite effect. Database data analysis found that TET2 and CADM1 were the target genes of miR-1246. The dual-luciferase reporter gene assay confirmed that miR-1246 could directly bind to TET2 and CADM1 mRNA and inhibit their expressions ($P < 0.01$). Treatment of KYSE150 and KYSE30 cells with Exo derived from cells overexpressing miR-1246 had the same effect as overexpressing miR-1246 in these cells. **Conclusion:** Exo-derived miR-1246 has the potential to be a clinical auxiliary diagnostic marker for ESCC. It may affect the occurrence and development of ESCC by regulating the expression levels of TET2 and CADM1.

[Key words] exosome; miR-1246; esophageal squamous cell carcinoma (ESCC); Tet methylcytosine dioxygenase 2 (TET2); cell adhesion molecule 1 (CADM1); clinical significance

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(2): 176-188. DOI：10.3872/j.issn.1007-385x.2025.02.006]

在世界范围内，食管癌是预后较差的消化道恶性肿瘤之一，由于缺乏早期典型症状，多数患者在确诊时已为中晚期[1]。血清肿瘤标志物检测是肿瘤辅助诊断及监测临床进展的重要途径，具有微创、操作简便、报告周期短等优点[2]。然而，目前应用于食管鳞状细胞癌（esophageal squamous cell carcinoma, ESCC）患者临床辅助诊断的血清肿瘤志物较少，仅有癌胚抗原（carcino-embryonic antigen, CEA）和鳞状细胞癌抗原（squamous-cell carcinoma antigen, SCC-Ag）[3]。因此，寻找新的肿瘤标记物及临床治疗靶点对于ESCC患者的临床诊疗和预后改善尤为重要。外泌体（exosome, Exo）是一种具有双层膜的脂质小囊泡，由TRAMS等[4]在1981年发现并报道。其作为核酸、脂质和蛋白质等物质的运输载体，具有在细胞和组织间传递信号分子的功能，在肿瘤形成和进展过程中发挥重要作用，Exo来源的微小RNA（microRNA, miRNA）作为一种很有前景的肿瘤辅助诊断标志物，是液体活检技术的主要检测对象之一[5]。miR-1246在消化系统恶性肿瘤细胞分泌的Exo中高度富集，并且可通过激活相关信号通路发挥促癌作用[6]。然而，Exo中的miR-1246在ESCC中的促癌机制相关研究较少。因此，本文收集ESCC患者血清检测并分析外泌体miR-1246（Exo-miR-1246）与ESCC临床进展的相关性，同时构建体外ESCC细胞模型，探究miR-1246的相关调控机制。

1 材料与方法

1.1 临床样本与细胞

采集2021年12月至2023年6月期间在河北医科大学第四医院收治的45例ESCC初诊患者和50例

健康受试者的血清及相关临床资料，分别作为ESCC组和对照组，ESCC患者之前均未接受过任何抗肿瘤治疗。所有患者和受试者均充分知情并签署了知情同意书。本研究方案经河北医科大学第四医院伦理委员会批准（批准号：2021KS037）。

ESCC细胞ECA109、KYSE180和TE1均购自上海生物科学研究所，KYSE30细胞由TAGAWA教授（日本千叶大学分子生物学和癌症生物学系）提供。KYSE150细胞由中国医学科学院肿瘤医院詹启敏实验室捐赠。将所有ESCC细胞在37 ℃、5% CO_2恒温培养箱中培养。其中KYSE150在混合培养基中（RPMI 1640∶Ham 's F-12 = 1∶1）添加10%胎牛血清、青霉素和链霉素，KYSE30在上述培养基中添加浓度为2 mmol/L的*L*-谷氨酰胺培养，其余细胞在添加了10%胎牛血清、青霉素和链霉素的RPMI 1640培养基中培养。

1.2　主要试剂与仪器

exoRNeasy Serum/Plasma Starter Kit购自德国QIAGEN公司，Go Taq qPCR Master Mix和反转录试剂盒购自美国Promega公司，特异性引物购自上海生工生物工程有限公司和广州锐博生物科技有限公司，兔抗CD81、CD9、肿瘤易感基因101（tumor susceptibility gene 101, TSG101）、HSP70、钙连蛋白（calnexin）、Tet甲基胞嘧啶双加氧酶2（Tet methylcytosine dioxygenase 2, TET2）、细胞黏附分子1（cell adhesion molecule 1, CADM1）抗体和辣根过氧化物酶（HRP）标记羊抗兔IgG均购自英国Abcam公司，兔抗E-cadherin和vimentin购自武汉三鹰生物技术有限公司，兔抗GAPDH抗体购自亚科因生物技术有限公司，胎牛血清（FBS）购自上海达特希尔生物科技有限公司，RPMI 1640和Ham's F-12购自赛默飞世尔科技有限公司，胰蛋白酶、细胞冻存液购自赛文生物科技有限公司，CCK-8试剂盒购自美国MedChemExpess公司，Lipofectamine 2000购自赛默飞世尔科技有限公司，细胞凋亡试剂盒购自美国BD公司，Transwell小室购自甄选公司，双萤光素酶报告基因检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。miR-1246 mimics、miR-1246-NC、miR-1246-inhibitor和inhibitor-NC质粒均购自锐博生物科技有限公司。

实时荧光定量PCR仪购自赛默飞世尔科技有限公司，酶联免疫分析仪购自杭州奥盛仪器有限公司，电泳仪购自北京韦克斯科技有限公司，双色红外激光成像系统购自美国LI-COR公司，透射电子显微镜购自Hitachi有限公司，纳米颗粒追踪分析仪购自德国Particle Metrix公司，双色红外激光成像系统购自美国LI-COR公司，倒置生物显微镜和倒置荧光显微镜购自日本Nikon公司，多功能成像分析工作站系统购自美国伯腾仪器有限公司。

1.3　生物信息学分析

在基因表达综合数据库（gene expression omnibus, GEO）（https∶/ww.ncbinlm.nih.gov/geo/）中选择miRNA芯片数据集GSE122497和mRNA芯片数据集GSE161533。在GSE122497血清miRNA图谱中，包含566例ESCC患者和566例健康对照组样本，GSE161533中包含ESCC患者肿瘤组织和配对正常组织各28例。利用R 4.2.1 limma软件包对GSE122497和GSE161533数据集进行分析，得到差异表达的miRNA和mRNA，绘制差异表达miRNA的火山图，应用EVmiRNA数据库分析ESCC患者血清中表达显著上调的miRNA在Exo中的表达情况。差异miRNA设置筛选标准为校正后$P < 0.05$、log FC > 2，差异mRNA设置标准为校正$P < 0.05$和log FC < −2，使用TargetScan和miRDB数据库对筛选得到miRNA进行靶基因预测，取两个数据库结果的交集，通过R4.2.1 venn软件包对两数据库预测的靶基因与GSE161533数据集中差异表达下调的mRNA取交集。

1.4　受试者血清中Exo分离、纯化与表征验证

取1 mL血清，16 000 × *g*离心10 min，取上清液并经0.22 μm过滤器过滤。使用试剂盒分离Exo。Exo经BCA蛋白法定量检测后于－80 ℃保存备用。采用透射电镜观察Exo、纳米颗粒跟踪分析（nanoparticle tracking analysis, NTA）和WB法验证Exo提取效果。

1.5　qPCR检测Exo中miR-1246的表达

用exoRNeasy Midi试剂盒和TRIzol试剂提取细胞总RNA，用反转录试剂盒将其反转录为cDNA。用Go Taq qPCR Master Mix与1∶4比例稀释的cDNA混合后进行qPCR反应，qPCR参数：95 ℃ 2 min，95℃ 15 s、60 ℃ 60 s，循环数为40 ℃。以U6和GAPDH为内参基因，用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各目的基因的相对表达量。

1.6　WB法检测Exo标志物及ESCC细胞中的TET2和CADM1蛋白的表达

用RIPA缓冲液提取细胞和Exo的总蛋白，BCA蛋白检测试剂盒测定浓度后，用SDS-PAGE分离蛋白并转移至PVDF膜上，然后用5%的脱脂牛奶室温下封闭1 h，一抗（TET2、CADM1、钙连蛋白、TSG101、CD9和CD81抗体稀释比例为1∶1 000，E-cadherin和GAPDH抗体稀释比例为1∶5 000，vimentin抗体稀释比例为1∶3 000）4 ℃下处理过夜后，与荧光标记羊抗兔二抗室温下处理1 h，用双色红外激光成像系统对膜进行可视化分析，GAPDH作为内参，分析目的蛋白的相对表达水平。

1.7 细胞转染及分组

用 Lipofectamine 2000 分别将 mimics-NC、miR-1246 mimics 转染至 KYSE150 细胞，将 inhibitor-NC 和 miR-1246 inhibitor 转染至 KYSE30 细胞，分别记为 minics-NC、miR-1246 mimics、inhibitor-NC和miR-1246 inhibitor组。转染48 h后进行后续实验。

将 miR-1246 mimics 组 KYSE150 细胞上清液来源的 Exo 用 PKH67 标记处理 KYSE30 细胞，24 h 后，用 PBS 清洗细胞 3 次，4% 多聚甲醛固定后，通过荧光显微镜观察，以验证 Exo-miR-1246 在 ESCC 细胞间的转运情况。

用 miR-1246 mimics 和 mimics-NC 组 KYSE150 细胞来源的 Exo（20 μg/mL）处理 KYSE150 和 KYSE30 细胞 48 h 后进行后续实验。

表1 qPCR引物序列(5'~3')

基因名称	正向	反向
miR-1246	GCGCGAATGGATTTTTGG	ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG
miR-191-5p	CGGGCCAACGGAATOCCAAAA	CAGOCACAAAAGAGCACAAT
miR-19b-3p	广州锐博生物科技有限公司	
TET2	GTGGATGAGTTTGGGAGTGTGGAAG	CGGCAAGTCTTGACTGGCTCTG
CADM1	CATGCTGTGCTTGCTCATCATTCTG	GTCTGCGTCTGCTGCGTCATC
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT
GAPDH	CAGGAGGCATTGCTGATGAT	GAAGGCTGGGGCTCATTT

1.8 CCK-8法检测各组细胞的增殖能力

用 CCK-8 法检测转染各组或 Exo 共培养的 KYSE150 和 KYSE30 细胞的增殖情况，将 3×10^3 个细胞接种于 96 孔板，分别在培养 0、24、48、72 h 时向每孔中加入 10 μL CCK-8 试剂，继续培养 2 h 后，用酶标仪测定各孔在 450 nm 处的光密度（*D*）值，以 *D* 值代表细胞的增殖活力。

1.9 划痕愈合实验检测各组细胞的迁移能力

将转染后或者 Exo 共培养后的 5×10^5 个细胞接种于 6 孔板，当细胞汇合度 100% 时，用 200 μL 无菌吸头尖端划痕，PBS 洗涤，去除悬浮细胞，用不含血清的培基进行培养，用倒置显微镜分别记录同一位置在 0、24 h 时划痕的面积，并用“划痕愈合率 =（0 h 划痕面积或 24 h 划痕面积）/0 h 划痕面积×100%”公式计算划痕愈合率。

1.10 Transwell 小室实验检测各组细胞的侵袭能力

侵袭实验中，将 5×10^4 个细胞用无血清培基重悬，将 50 μL 的基质胶覆盖在 Transwell 小室上表面，再接种细胞，下室则加入 600 μL 含 10% 胎牛血清的培养基，培养 48 h 后，将膜下表面的穿膜细胞用 4% 的多聚甲醛固定，0.1% 结晶紫染色，记录穿膜细胞的数量。

1.11 双萤光素酶报告基因实验验证 miR-1246 与 TET2 和 CADM1 的靶向结合关系

克隆 TET2 和 CADM1 的 mRNA 到海肾萤光素酶基因 3'-UTR，将 TET2 和 CADM1 的野生型（WT）或突变型（MUT）miR-1246 结合序列插入 psiCHECK2 质粒中，构建萤光素酶报告质粒，用转染试剂将 TET2 WT、TET2 MUT 或 CADM1 WT、CADM MUT 分别与 miR-1246、mimics-NC 共转染 KYSE150 细胞，分别记为 TET2 WT + mimics-NC 组、TET2 WT + miR1246 mimics 组、TET2 MUT + mimics-NC 组、TET2 MUT + miR1246 mimics 组、CADM1 WT + mimics-NC 组、CADM1 WT + miR1246 mimics 组、CADM1 MUT + mimics-NC 组和 CADM1 MUT + miR1246 mimics 组。培养 48 h 后使用双萤光素酶报告检测试剂盒检测各组细胞的海肾萤光素酶活性。

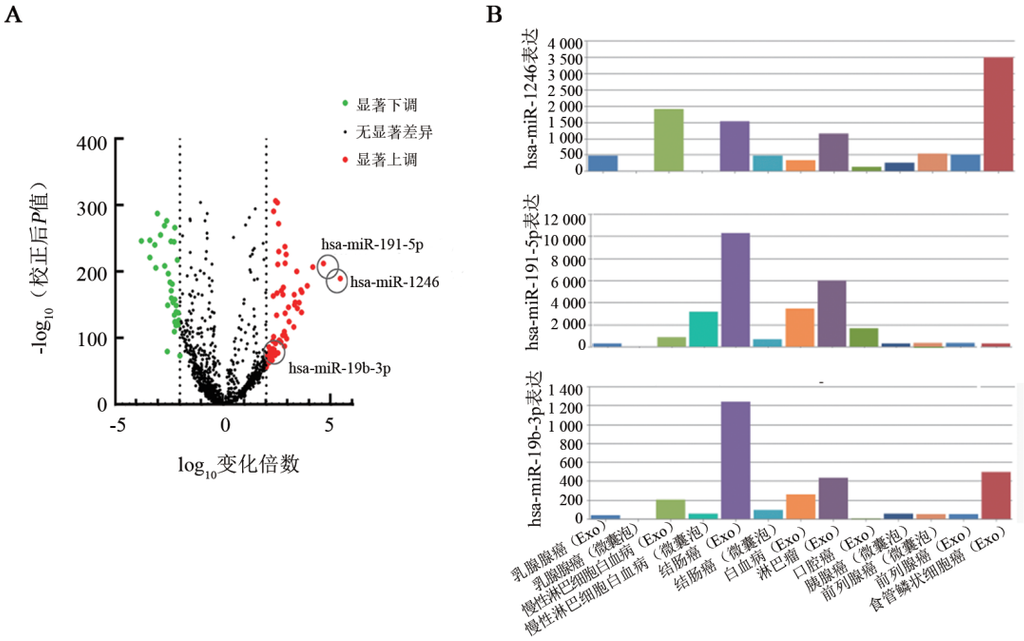
1.12 统计学处理

以上实验均独立重复 3 次。实验结果统一采用 IBM SPSS Statistics 25 软件进行数据分析，GraphPad Prism 8.4.0 软件作图，符合正态分布的计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间数据比较采用两独立样本 *t* 检验，不符合正态分布的数据采用 Mann-Whitney *U* 检验，计数资料用频数（%）表示，两组间数据比较采用 χ^2 检验，Logistic 回归分析检验指标与临床特征的相关性，绘制 ROC 曲线评价各检测指标的诊断效能。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 生物信息学筛选 ESCC 患者血清中差异表达最为显著的 miRNA 为 miR-1246

通过 GEO 数据库数据分析，共筛选出 119 个血清差异 miRNA，其中 81 个差异 miRNA 表达显著上调，38 个表达显著下调，对差异表达的 miRNA 绘制火山图（$P < 0.05$）（图 1A）。在 log FC 值 > + 2 或 log FC < − 2 的差异 miRNA 中，结合以往文献分析，发现仅有 miR-1246、miR-191-5p 和 miR-19b-3p 在 ESCC 中表达升高且具有明显的促癌作用[7-9]，经 EVmiRNA 数据库数据验证，miR-1246 和 miR-19b-3p 在 ESCC Exo 中表达较高，miR-191-5p 表达较低（图 1B）。

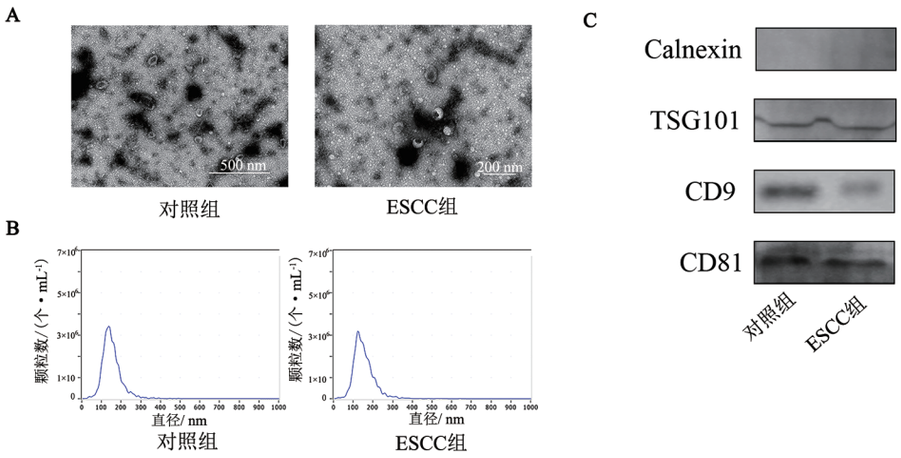


A：ESCC组与对照组血清差异miRNA火山图；B：在泛癌Exo中miR-1246、miR-191-5p和miR-19b-3p的表达情况。

图1　筛选差异miRNA的生物信息学分析

2.2　试验提取的血清Exo符合典型Exo表征

Exo提取物在透射电镜下观察结果（图2A）显示，其形态呈杯口状小囊泡样，直径为30~150 nm；NTA检测Exo浓度粒径，结果（图2B）显示，Exo直径峰聚集于120 nm左右。WB法检测结果（图2C）表明，提取的血清Exo表达CD81、CD9和TSG101蛋白，而不表达Calnexin蛋白。实验结果表明，提取的血清Exo符合国际细胞外囊泡研究协会对Exo表征的要求。



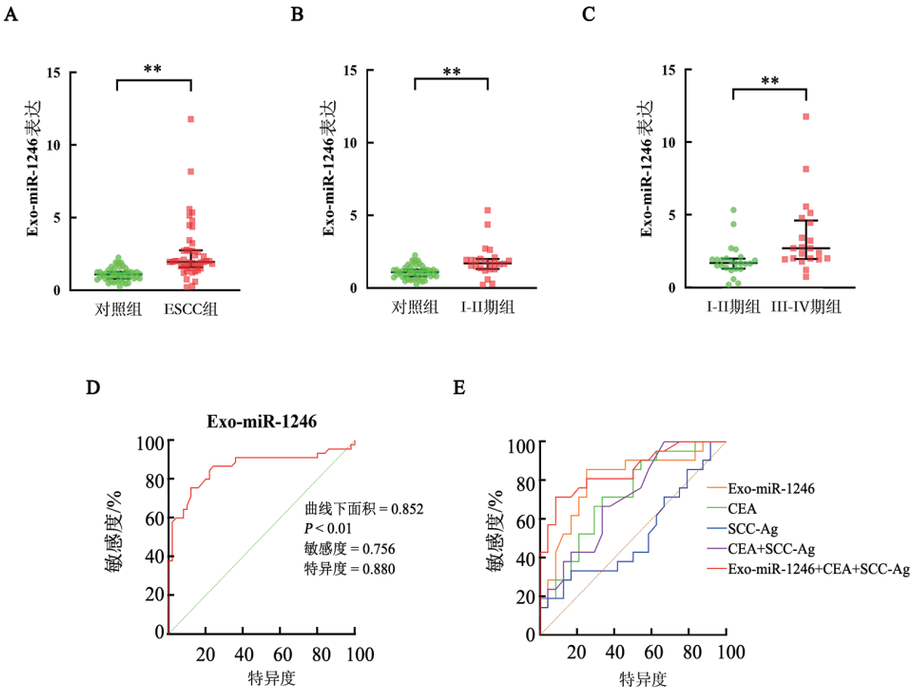
A：透射电镜观察Exo的结果；B：NTA法检测Exo的结果；C：WB法检测血清Exo的结果。

图2　血清Exo表征

2.3　血清Exo-miR-1246的表达水平与ESCC患者临床进展的相关性

qPCR法检测结果（图3A）显示，相较于健康受试者，miR-1246在ESCC患者血清Exo中呈显著高表达（$P < 0.01$），miR-191-5p和miR-19b-3p表达均有升高趋势，但差异没有统计学意义（$P > 0.05$）。同时Ⅰ~Ⅱ期ESCC患者血清Exo-miR-1246表达水平显著高于健康受试者（$P < 0.01$）（图3B）；Ⅲ~Ⅳ期ESCC患者的血清Exo-miR-1246水平明显高于Ⅰ~Ⅱ期患者（$P < 0.01$）（图3C）。ROC曲线表明血清中的Exo-miR-1246对ESCC有较高的辅助鉴别诊断价值（图3D）。并且Exo-miR-1246对ESCC患者临床进展的辅助诊断效能

高于CEA与SCC-Ag，三者联合检测会进一步提高辅助诊断患者分期效能（$P < 0.01$）（图3E）（表2）。Logistic回归分析，结果显示，Exo-miR-1246和CEA可能是ESCC患者临床进展的独立危险因素（$P < 0.05$）（表3）。



A：ESCC患者与健康受试者血清中Exo-miR-1246的表达差异；B：Ⅰ~Ⅱ期ESCC患者与健康受试者血清中Exo-miR-1246的表达差异；C：Ⅰ~Ⅱ期与Ⅲ~Ⅳ期ESCC患者血清中Exo-miR-1246的表达差异；D：ESCC患者与健康受试者血清中Exo-miR-1246的诊断效能；E：Exo-miR-1246、CEA、SCC-Ag、CEA + SCC-Ag和Exo-miR-1246 + CEA + SCC-Ag在Ⅰ~Ⅱ期和Ⅲ~Ⅳ期对ESCC临床进展的诊断效能。$^{**}P < 0.01$。

图3　血清Exo-miR-1246的表达水平与ESCC患者临床进展的相关性

表2　Ⅰ~Ⅱ期和Ⅲ~Ⅳ期ESCC患者血清Exo-miR-1246、CEA和SCC-Ag表达水平的ROC曲线分析

临床参数	曲线下面积	95% *CI*	*P*值	敏感度（%）	特异度（%）	截断值
Exo-miR-1246	0.798	0.661，0.934	< 0.01	85.7	75.0	1.95
CEA/(ng·mL^{-1})	0.720	0.572，0.869	0.012	71.4	66.7	1.86
SCC-Ag/(ng·mL^{-1})	0.518	0.343，0.693	0.838	33.3	83.3	2.14
CEA+SCC-Ag	0.706	0.556，0.856	0.018	66.7	66.7	-----
Exo-miR-1246+CEA+SCC-Ag	0.847	0.732，0.963	< 0.01	71.4	91.7	-----

表3　ESCC患者血清Exo-miR-1246、CEA和SCC-Ag表达水平的Logistic回归分析

临床参数	单因素Logistic回归分析		多因素Logistic回归分析	
	*OR*值（95% *CI*）	*P*值	*OR*值（95% *CI*）	*P*值
Exo-miR-1246	1.985（1.110，3.550）	0.021	2.322（1.212, 4.451）	0.011
CEA/(ng/mL)	1.540（1.022，2.321）	0.039	1.841（1.121, 3.024）	0.016
SCC-Ag/(ng/mL)	1.223（0.912，1.640）	0.178		

2.4　血清Exo-miR-1246表达水平与ESCC的T分期、N分期和临床分期有关联

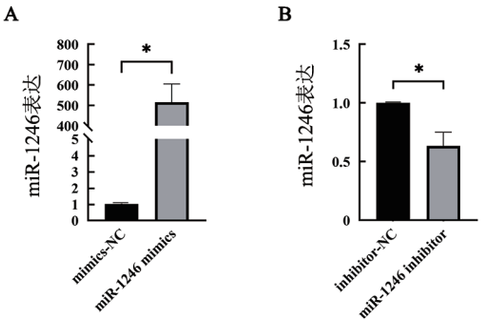
按照ROC曲线分析得到的Exo-miR-1246的截断值为1.95，将ESCC患者分为血清Exo-miR-1246高表达组和低表达组，χ^2检验结果（表4）表明，ESCC的T分期、N分期和临床分期均与血清Exo-miR-1246的表达水平均有关联（均$P < 0.05$）。

表4　血清Exo-miR-1246表达水平与ESCC患者临床病理特征相关性[*n*(%)]

临床参数		*n*	低表达组	高表达组	*P*值
年龄/岁	< 68岁	23	9（39.1）	14（63.6）	0.100
	≥ 68岁	22	14（60.9）	8（36.4）	
性别	男	29	12（52.2）	17（77.3）	0.079
	女	16	11（47.8）	5（22.7）	
T分期	T1~T2	26	18（78.3）	8（36.4）	< 0.01
	T3~T4	19	5（21.7）	14（63.6）	
N分期	N0	19	13（56.5）	6（27.3）	0.047
	N1~N3	26	10（43.5）	16（72.7）	
临床分期	Ⅰ~Ⅱ	24	18（78.3）	6（27.3）	< 0.01
	Ⅲ~Ⅳ	21	5（21.7）	16（72.7）	

2.5　成功构建过表达或敲减miR-1246表达的KYSE150或KYSE30细胞

qPCR法检测结果（图4）表明，在KYSE150细胞中，miR-1246表达相对较低，KYSE30细胞中表达相对较高，因此，KYSE150和KYSE30细胞分别用于后续实验的过表达或敲减实验。与mimics-NC组比较，miR-1246 mimics组KYSE150细胞中miR-1246表达水平显著上调（$P < 0.05$），与inhibitor-NC组比较，miR-1246 inhibitor组KYSE30细胞中miR-1246表达水平显著下降（$P < 0.05$）。实验结果表明，在KYSE150或KYSE30细胞中成功地过表达或敲减了miR-1246的表达。



A：KYSE150细胞转染miR-1246 mimics的效率检测；B：KYSE30细胞转染miR-1246-inhibitor的效率检测。*$P < 0.05$。

图4　在KYSE150和KYSE30细胞中过表达或敲减miR-1246的效率检测

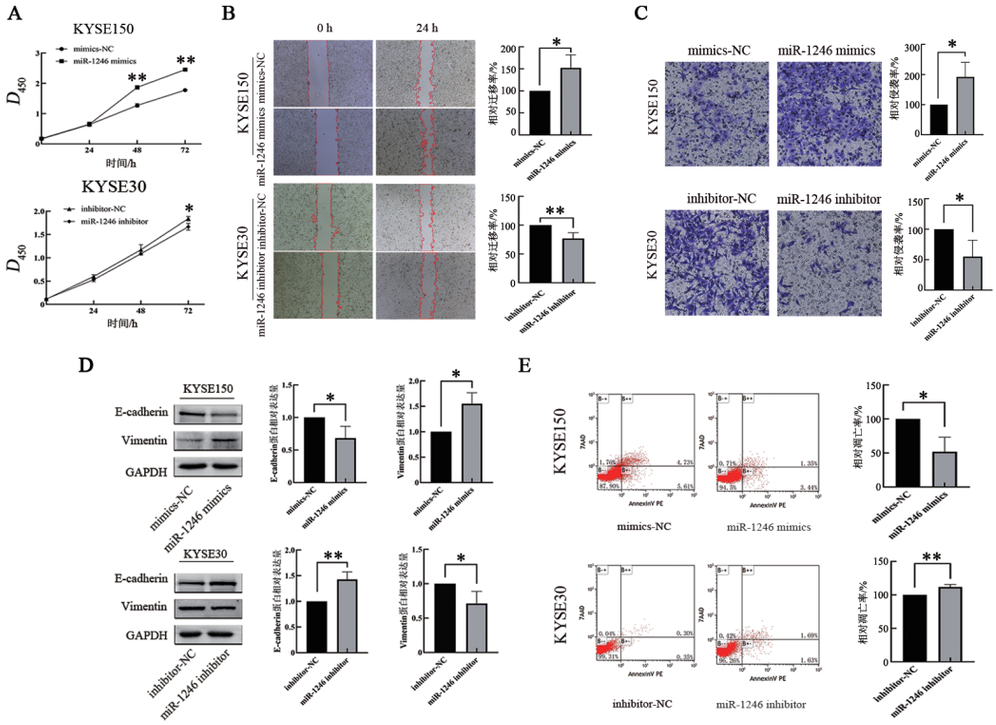
2.6　过表达miR-1246可促进ESCC细胞增殖、迁移、侵袭、上皮间质转化和凋亡而抑制miR-1246则相反

CCK-8法检测结果（图5A）表明，与NC组相比，miR-1246 mimics组KYSE150细胞的增殖能力显著增强（$P < 0.01$），miR-1246 inhibitor组KYSE30细胞的增殖能力显著下降（$P < 0.05$）。划痕愈合实验检测结果（图5B）表明，与NC组相比，miR-1246 mimics组KYSE150细胞划痕愈合能力显著升高（$P < 0.05$），miR-1246 inhibitor组KYSE30细胞的划痕愈合能力显著降低（$P < 0.01$）。Transwell小室实验检测结果（图5C）显示，与NC组相比，miR-1246 mimics组KYSE150细胞的侵袭能力显著提高（$P < 0.05$），miR-1246 inhibitor组KYSE30细胞的侵袭能力显著降低（$P < 0.05$）。WB法检测结果（图5D）显示，相较于NC组，miR-1246 mimics组KYSE150细胞中E-cadherin蛋白表达显著降低（$P < 0.05$），vimentin蛋白表达显著升高（$P < 0.05$），miR-1246 inhibitor组KYSE30细胞表中E-cadherin蛋白显著升高（$P < 0.01$），vimentin蛋白显著降低（$P < 0.05$）。流式细胞术检测结果（图5E）显示，与NC组比较，miR-1246 mimics组KYSE150细胞的凋亡率显著降低（$P < 0.05$），而miR-1246 inhibitor组KYSE30细胞的凋亡率显著升高（$P < 0.01$）。实验结果表明，过表达miR-1246可促进KYSE150细胞的增殖、迁移、侵袭能力、上皮间质转化（EMT）和抑制细胞凋亡，抑制miR-1246的作用则相反。

2.7　用数据库数据和qPCR法筛选miR-1246的靶基因

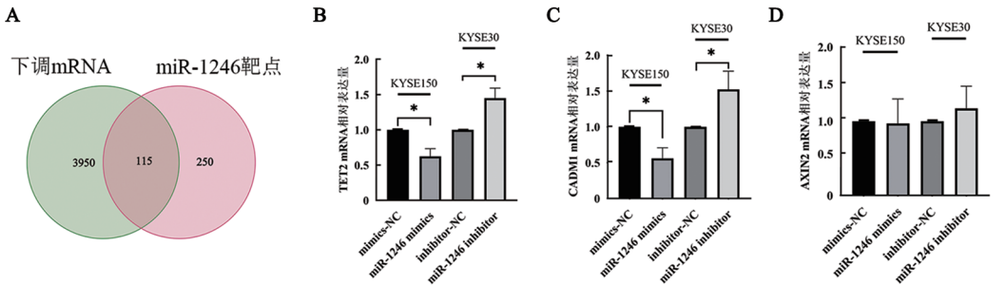
通过TargetScan、miRDB数据库预测miR-1246的下游靶基因并取交集，共得到的365个，从GSE161533数据集分析得到4 820个表达上调的差异mRNA，4 065个表达下调的差异mRNA。Venn包将数据库预测的靶基因与GSE161533数据集中表达下调的差异mRNA取交集，得到115个miR-1246的靶基因（图6A），其中，CCNG2、TET2、CADM1和AXIN2被多数研究证实为抑癌基因[10-13]，而CCNG2与miR-1246在ESCC中的靶向调控关系已被大量文献报道，由此本研究选择了TET2、CADM1和AXIN2在ESCC细胞中进行验证，qPCR法结果（图6B~D）显示，TET2、CADM1在转染miR-1246 mimics的KYSE150细胞中的表达均显著降低（均$P < 0.05$），而AXIN2无明显变化（$P > 0.05$）。在转染miR-1246 inhibitor的KYSE30中TET2、CADM1

均显著升高(均$P < 0.05$),AXIN2同样无明显变化($P > 0.05$)(图6B~D)。既往有研究发现,TET2和CADM1可抑制ESCC的增殖、侵袭活性[14-15],两者的缺失与恶性肿瘤的低分化、淋巴结转移和不良预后相关[16-17]。因此,选取TET2和CADM1进行后续的验证实验。



A:CCK-8法检测ESCC细胞增殖情况;B:划痕愈合实验检测ESCC细胞的迁移能力;C:Transwell小室实验检测ESCC细胞的侵袭能力;D:WB法检测各组ESCC细胞中EMT相关蛋白的表达;E:流式细胞术检测ESCC细胞的凋亡。与NC组比较,$^{*}P < 0.05$,$^{**}P < 0.01$。

图5 过表达和抑制miR-1246对ESCC细胞增殖、迁移、侵袭、EMT相关蛋白表达和凋亡的影响



A:TargetScan和miRDB数据库预测ESCC中miR-1246靶基因与GSE161533数据集中表达下调的差异mRNA的交集;B:qPCR法检测转染后各组ESCC细胞中TET2 mRNA的表达水平;C:qPCR法检测转染后各组ESCC细胞中CADM1mRNA的表达水平;D:qPCR法检测转染后各组ESCC细胞中AXIN2 mRNA的表达水平。$^{*}P < 0.05$。

图6 筛选miR-1246的靶基因

2.8 miR-1246可与TET2和CADM1 mRNA的3'UTR结合并抑制其表达

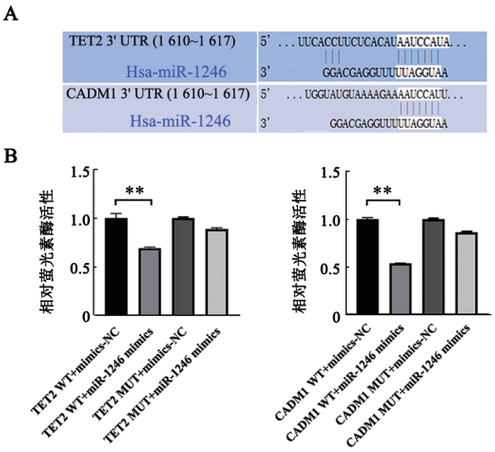
搜索TargetScan数据库的结果(图7A)发现,TET2和CADM1的3'-UTR区存在与miR-1246序列互补的序列。双萤光素酶报告基因实验检测结果(图7B)显示,与TET2 WT + mimics-NC或CADM1 WT + mimics-NC组比较,TET2 WT + miR-1246 mimics或CADM1WT + miR-1246 mimics组萤光素酶活性明显降低($P < 0.01$),而与TET2 MUT + mimics-NC或CADM1 MUT + mimics-NC组比较,TET2 MUT + miR-1246 mimics或CADM1 MUT + miR-1246 mimics组萤光素酶活性无明显变化。实验结果表明,miR-1246可与TET2和CADM1的mRNA 3'UTR结合并抑制其表达。

2.9　过表达或抑制miR-1246可显著抑制或促进ESCC细胞中TET2和CADM1蛋白的表达

通过生物信息学分析确定了TET2及CADM1是miR-1246的下游靶基因，为进一步验证miR-1246对TET2及CADM1的靶向调控关系，在KYSE150细胞中转染mimics-NC、miR-1246 mimics，以及在KYSE30细胞中转染inhibitor-NC、miR-1246 inhibitor，转染48 h后，用WB法检测TET2及CADM1蛋白的表达水平，结果（图8）显示，相较于NC组，miR-1246 mimics组KYSE150细胞中TET2和CADM1的表达水平均显著降低（$P < 0.05$或$P < 0.01$），miR-1246 inhibitor组KYSE30细胞中TET2和CADM1蛋白表达水平均显著升高（均$P < 0.01$）。

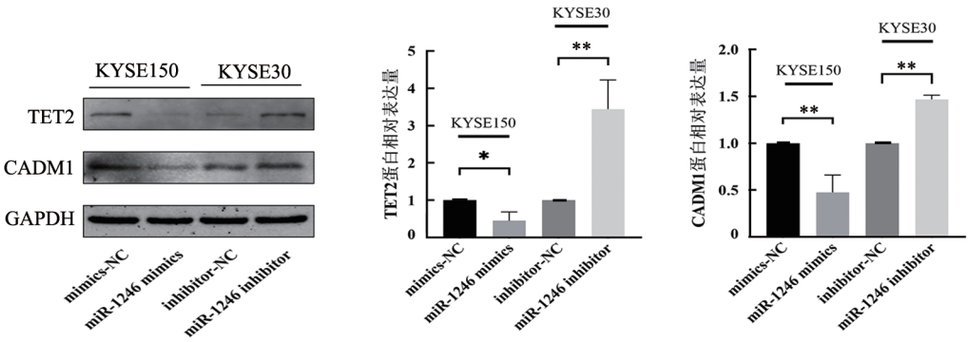
2.10　KYSE150细胞来源的Exo可转运至KYSE30细胞中

用exoEasy Maxi Kit成功提取KYSE150，KYSE30细胞Exo，透射电镜与NTA分析验证了提取物符合Exo形态要求（图9A~B），WB法检测结果（图9C）显示，细胞Exo中CD9、TSG101和HSP70蛋白阳性，calnexin蛋白阴性，符合典型Exo表征。



A：Targetscan数据库中has-miR-1246在TET2和CADM1的3 'UTR区域的结合位点；B：采用双萤光素酶报告基因实验验证miR-1246与TET2和CADM1mRNA的靶向结合关系。$^{**}P < 0.01$。

图7　双萤光素酶报告基因实验验证miR-246与TET2和CADM1 mRNA的靶向结合关系



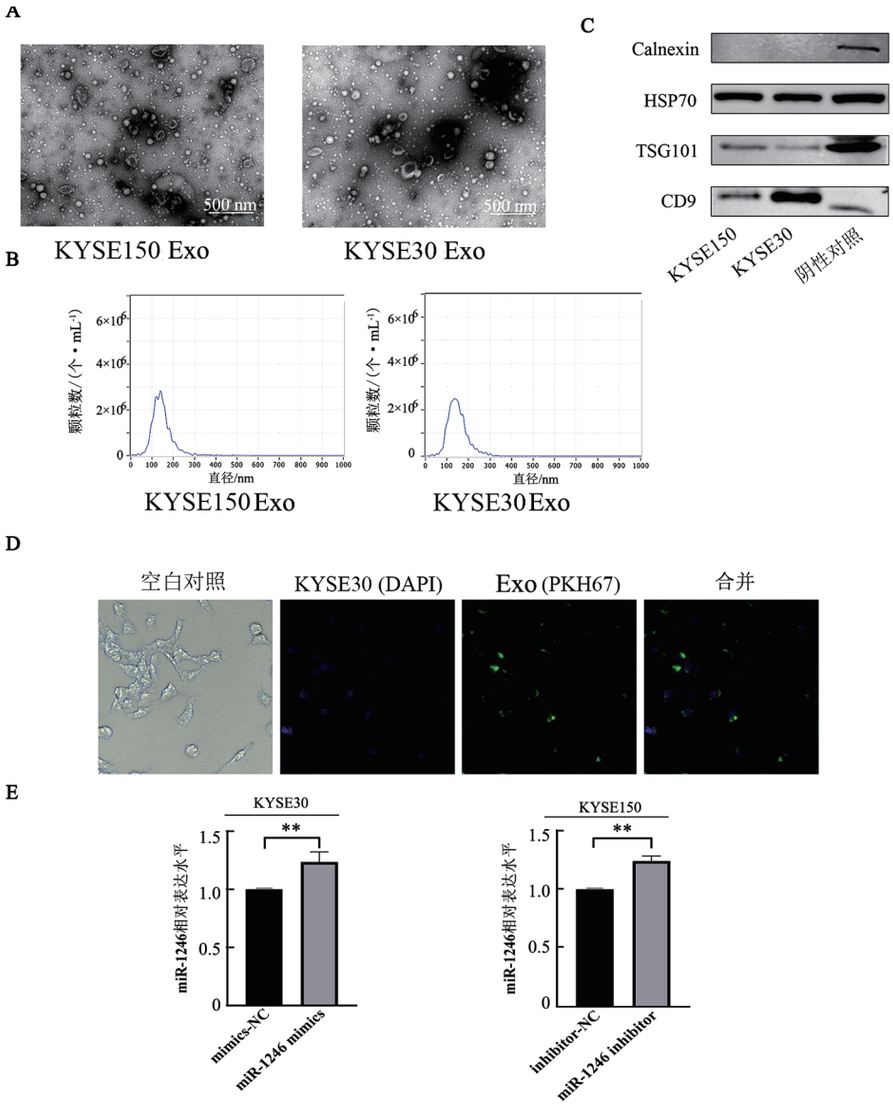
$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

图8　过表达或抑制miR-1246对KYSE150细胞或KYSE30细胞中TET2及CADM1蛋白表达的影响

为了验证Exo-miR-1246在ESCC细胞间的转运调节作用，从转染了mimics-NC和miR-1246 mimics的KYSE150细胞上清中提取Exo，使用绿色荧光染料PKH67标记并与KYSE30细胞共培养后，荧光显微镜下检测结果（图9D）发现，PKH67标记的Exo可以被KYSE30细胞所摄取，且主要定位于细胞质中。同时，qPCR法检测结果（图9E）也表明，KYSE150和KYSE30细胞摄取Exo后，miR-1246表达水平均显著升高（$P < 0.01$）。实验结果证实，miR-1246可以通过Exo介导转移到受体细胞中。

2.11　过表达miR-1246细胞来源的Exo处理KYSE150和KYSE30细胞与在其中过表达miR-1246的作用一致

根据是否与过表达miR-1246的Exo共培养，分为Exo-NC组和Exo-miR-1246组。与Exo-NC组相比，Exo-miR-1246组KYSE150和KYSE30细胞的增殖能力、划痕愈合能力、侵袭能力均显著升高（图10A~C，$P < 0.05$或$P < 0.01$），E-cadherin表达均显著降低（图10 D，$P < 0.05$或$P < 0.01$），vimentin均显著升高（图10 D，$P < 0.05$或$P < 0.01$），细胞凋亡率均明显下降（图10 E，均$P < 0.05$）。与Exo-NC组相比，Exo-miR-1246组的KYSE150和KYSE30细胞中TET2和CADM1蛋白表达水平均显著降低（图11，$P < 0.05$或$P < 0.01$）。实验结果说明，过表达miR-1246细胞来源的Exo处理KYSE150和KYSE30细胞与在其中过表达miR-1246的作用一致。



A：透射电镜观察KYSE150和KYSE30细胞的Exo形态；B：NTA分析KYSE150和KYSE30Exo；C：WB法检测Exo表征蛋白的表达；D：荧光显微镜观察PKH67标记Exo的摄取情况（× 200）；E：qPCR法检测摄取Exo后KYSE150和KYSE30细胞中miR-1246的表达。$^{**}P < 0.01$。

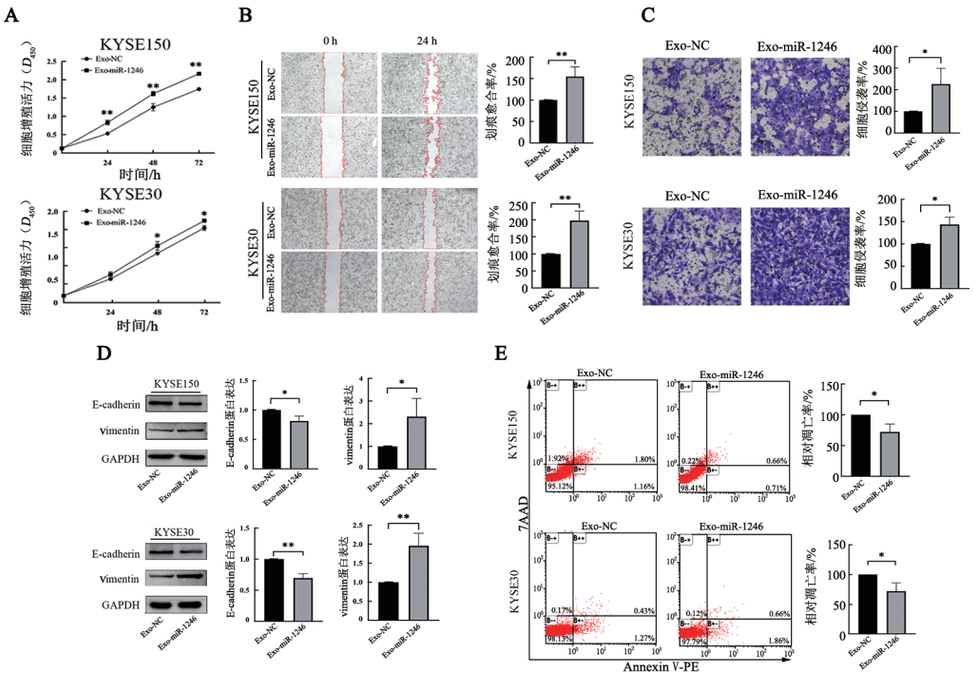
图9　验证Exo中miR-1246在ESCC细胞间的转运

3　讨　论

Exo等细胞外囊泡在癌细胞和肿瘤微环境通信之间有着重要作用，肿瘤来源的囊泡被正常细胞捕获时，会促进炎症的发生、血管的生成、肿瘤细胞的免疫逃逸等，介导或抑制肿瘤的发生发展[18]。miRNA通过细胞内的特殊机制被选择性打包到Exo中转运至邻近细胞发挥功能，最近研究[19-21]表明，miR-1246在ESCC等多种肿瘤Exo中高度富集，成为癌细胞活动的关键致癌因子。

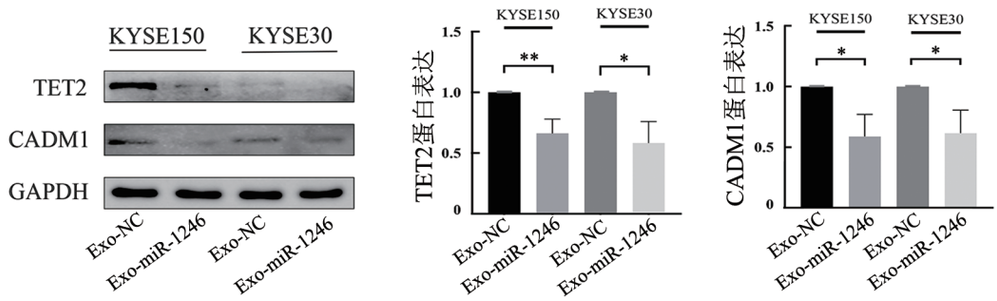
在log FC > 2或log FC < －2的差异miRNA中，miR-1246、miR-191-5p和miR-19b-3p在ESCC中表达水平明显升高，且对ESCC细胞的增殖、侵袭或恶性程度具有明显促进作用[7-9]。本研究qPCR检测结果显示，在ESCC血清Exo中，miR-191-5p和miR-19b-3p仅有升高的趋势，但差异没有统计学意义，而Exo-miR-1246表达水平显著上调，ROC曲线分析结果显示其在ESCC患者辅助诊断方面具有较高的诊断效能。

Ⅰ～Ⅱ期ESCC患者外周血清中Exo-miR-1246表达水平明显高于健康受试者，同时低于Ⅲ~Ⅳ期患者，提示其在ESCC早期诊断及临床进展预测中可能均具有一定价值。对Ⅰ～Ⅱ期和Ⅲ~Ⅳ期ESCC患者进行分析发现，Exo-miR-1246的诊断效能、敏感度和特异性均明显高于CEA和SCC-Ag，且Exo-miR-1246、CEA和SCC-Ag联合检测的辅助诊断ESCC临床进展效能进一步升高，临床分析也提示了Exo-miR-1246可能与ESCC患者的临床进展密切相关。



与Exo-mimic-NC组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

图10　过表达miR-1246的Exo处理KYSE150和KYSE30细胞后的细胞增殖能力（A）、迁移能力（B × 100）、侵袭能力（C × 200）、EMT相关蛋白表达（D）和细胞凋亡情况（E）



$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

图11　WB法检测过表达miR-1246或NC的细胞来源Exo处理KYSE150和KYSE30细胞后TET2及CADM1蛋白的表达

在液体活检技术的主要检测对象中，肿瘤相关Exo来源的循环核酸具有明显优势，miR-1246在许多高转移性消化道肿瘤的Exo中被发现，但Exo富集miR-1246的详细机制尚不清楚。Exo-miR-1246水平在早期胃癌中具有明显增高趋势，其水平显著高于良性疾病和健康对照组，提示其在胃癌早期诊断中可能也具有一定意义[6]。在结肠癌患者中，Exo-miR-1246通过诱导巨噬细胞转变为肿瘤相关巨噬细胞而参与肿瘤微环境形成并造成患者免疫功能低下，这也进一步说明了Exo-miR-1246还可能影响肿瘤免疫微环境介导免疫逃逸，具有成为结肠癌免疫治疗新靶点的潜力[22-23]。此外，有学者发现，Exo-miR-1246在ESCC患者血浆中也明显升高，检测血浆Exo来源的miR-1246水平对预测ESCC患者淋巴结转移有良好的表现，同时抑制Exo-miR-1246的表达可显著抑制ESCC的恶性进展[24]，这与本研究结论是一致的，提示Exo-miR-1246具有成为ESCC临床治疗新靶点的潜力。

为了探索Exo-miR-1246在ESCC中的靶向作用机制，本研究用转染技术分别构建了过表达和抑制miR-1246的ESCC细胞模型，结果发现，miR-1246对ESCC细胞增殖、迁移及侵袭活性具有明显的促进作用，且该作用可能与其抑制瘤细胞凋亡有关。此外，还证实miR-1246可能具有促进ESCC细胞EMT进程的作用，进而促进ESCC的进展和转移。

本研究进一步发现，过表达miR-1246的KYSE150细胞中TET2和CADM1的表达水平均明显减低，而抑制miR-1246的KYSE30细胞中TET2和

CADM1的表达水平均明显增加。同时，经过表达miR-1246细胞来源的Exo处理后，ESCC细胞表达E-cadherin蛋白降低，vimentin蛋白升高，同时TET2和CADM1蛋白表达均明显降低。进一步提示miR-1246可能以Exo为传递载体，促进ESCC细胞的增殖、迁移和侵袭，抑制细胞凋亡，其具体机制可能是通过直接靶向抑制TET2和CADM1的表达实现的。

TET2和CADM1作为抑癌基因，其在ESCC发生及进展中的主要作用目前已有较多研究，其中，TET2已被证实在ESCC、胃癌、肝癌、乳腺癌多种肿瘤组织中表达降低，这与肿瘤细胞增殖、侵袭及免疫逃逸密切相关[16,25]。HU等[13]证明，miR-196a可以直接靶向泛素样含PHD和环指域蛋白2（UHRF2）来下调TET2的表达，进而促进ESCC细胞增殖和迁移，抑制其凋亡。在SAWADA等[15]的研究队列中，TET2突变与ESCC患者较低的生存率相关。同样，体外侵袭实验证明敲低TET2增加KYSE410的侵袭活性，此外，与突变等位基因相比，野生型TET2等位基因的转导可以抑制侵袭活性，表明TET2功能的丧失可能是ESCC发生发展的重要促进因素。

CADM1作为肿瘤抑制蛋白，在多种恶性肿瘤中表达水平也呈显著下调趋势，由于其表达水平降低，正常鳞状上皮细胞中STAT3被激活，过度活化的JAK/STAT信号通路是导致细胞恶性转化、凋亡途径受抑及癌细胞的化疗抵抗作用的重要机制[26-27]。QIAN等[11]的研究发现，ESCC患者组织中CADM1的mRNA和蛋白表达均显著低于邻近组织，且与ESCC的淋巴结转移和TNM分期呈负相关。ZENG等[17]也证明，CADM1的缺失与ESCC组织分化程度较低和临床不良预后相关。LEE的研究[28]则强调了CADM1高甲基化与较差的无复发生存时间及周期蛋白依赖性激酶抑制剂2A（p14）的高甲基化相关，p14联合CADM1的共高甲基化可能是Ⅰ期ESCC的一个有价值的复发相关预后指标。CADM1表达的降低与肿瘤晚期进展、恶性病理分级和预后不良相关，CADM1表达越低，肿瘤侵袭性越强，预后越差[29]。

此外，CADM1在肝癌、白血病、胃癌、乳腺癌等组织和细胞中表达水平也呈降低趋势，且与癌细胞增殖、侵袭及化疗耐药等密切相关，涉及STAT3/MAPK/PI3K-Akt等多条信号通路[25, 30-33]。因此，CADM1具有成为肿瘤临床治疗新靶点的潜力。

本研究的不足之处在于ESCC患者同期食管良性病例数极少，无法满足本研究统计需要，故在本研究中未设食管良性病变组。同时，患者为近2年新就诊患者，未能随访患者5年总生存期，在今后研究中，会继续扩大样本例数并对患者进行预后随访及深入研究。

总之，本研究证实，ESCC患者外周血清中Exo-miR-1246表达显著升高，其水平与患者临床进展密切相关。因此，作为血清肿瘤液体活检标志物，血清Exo-miR-1246检测在ESCC临床辅助诊断及进展监测中可能具有一定意义。且Exo-miR-1246可能通过靶向抑制TET2和CADM1促进ESCC细胞增殖、迁移和侵袭，并抑制ESCC细胞凋亡。因此，Exo-miR-1246可能具有成为ESCC临床治疗新型靶点的潜力。

[参 考 文 献]

[1] JIN Z, CAO Y S, LU Z H, *et al*. Rechallenge with immune checkpoint inhibitors for advanced esophageal squamous cell carcinoma[J/OL]. Int Immunopharmacol, 2024, 137: 112364[2024-11-10]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38865752/. DOI:10.1016/j.intimp.2024.112364.

[2] PARIKH N D, TAYOB N, SINGAL A G. Blood-based biomarkers for hepatocellular carcinoma screening: approaching the end of the ultrasound era?[J]. J Hepatol, 2023, 78(1): 207-216. DOI:10.1016/j.jhep.2022.08.036.

[3] HOSHINO I, ISHIGE F, IWATATE Y, *et al*. Cell-free microRNA-1246 in different body fluids as a diagnostic biomarker for esophageal squamous cell carcinoma[J/OL]. PLoS One, 2021, 16(3): e0248016[2024-11-10]. https://pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/33690683/. DOI:10.1371/journal.pone.0248016.

[4] TRAMS E G, LAUTER C J, SALEM N Jr, *et al*. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles[J]. Biochim Biophys Acta, 1981, 645(1): 63-70. DOI: 10.1016/0005-2736(81)90512-5.

[5] KO S Y, LEE W, NAORA H. Harnessing microRNA-enriched extracellular vesicles for liquid biopsy[J/OL]. Front Mol Biosci, 2024, 11: 1356780[2024-11-10]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38449696/. DOI:10.3389/fmolb.2024.1356780.

[6] LUKOSEVICIUS R, ALZBUTAS G, VARKALAITE G, *et al*. 5'-isoforms of miR-1246 have distinct targets and stronger functional impact compared with canonical miR-1246 in colorectal cancer cells *in vitro*[J/OL]. Int J Mol Sci, 2024, 25(5): 2808[2024-11-10]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38474054/. DOI:10.3390/ijms25052808.

[7] GAO X T, XIE Z Q, WANG Z G, *et al*. Overexpression of miR-191 predicts poor prognosis and promotes proliferation and invasion in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Yonsei Med J, 2017, 58(6): 1101-1110. DOI:10.3349/ymj.2017.58.6.1101.

[8] HOSHINO I, ISHIGE F, IWATATE Y, *et al*. Usefulness of serum miR-1246/miR-106b ratio in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J/OL]. Oncol Lett, 2020, 20(6): 350[2024-11-10]. https://pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/33123261/. DOI: 10.3892/ol.2020.12213.

[9] ZHANG Y, LU W Q, CHEN Y L, *et al*. The miR-19b-3p-MAP2K3-STAT3 feedback loop regulates cell proliferation and invasion in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Mol Oncol, 2021, 15(5): 1566-1583. DOI:10.1002/1878-0261.12934.

[10] ZHAI J N, CHEN H R, WONG C C, *et al*. ALKBH5 drives immune suppression *via* targeting AXIN2 to promote colorectal cancer and is a target for boosting immunotherapy[J]. Gastroenterology, 2023,

165(2): 445-462. DOI:10.1053/j.gastro.2023.04.032.

[11] QIAN J B, LIU H B, ZHU Y, *et al*. CADM1 mRNA expression and clinicopathological significance in esophageal squamous cell carcinoma tissue[J/OL]. Genet Mol Res, 2017, 16(2): gmr16029178 [2024-11-10]. https://pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/28510248/. DOI: 10.4238/gmr16029178.

[12] HEIDARI HORESTANI M, ATRI ROOZBAHANI G, BANIAHMAD A. The clock gene BHLHE40 and atypical CCNG2 control androgen-induced cellular senescence as a novel tumor suppressive pathway in prostate cancer[J/OL]. J Exp Clin Cancer Res, 2024, 43(1): 174[2024-11-10]. https://pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/38902772/. DOI: 10.1186/s13046-024-03097-6.

[13] HU C M, PENG J, LV L, *et al*. miR-196a promotes the proliferation and migration of esophageal cancer *via* the UHRF2/TET2 axis[J]. Mol Cell Biochem, 2022, 477(2): 537-547. DOI:10.1007/s11010-021-04301-3.

[14] WEN H, LIU X B, ZHU Z D, *et al*. TET2 is downregulated in early esophageal squamous cell carcinoma and promotes esophageal squamous cell malignant behaviors[J]. Dig Dis Sci, 2024, 69(7): 2462-2476. DOI:10.1007/s10620-024-08311-1.

[15] SAWADA G, NIIDA A, UCHI R, *et al*. Genomic landscape of esophageal squamous cell carcinoma in a Japanese population[J]. Gastroenterology, 2016, 150(5): 1171-1182. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.01.035.

[16] SHIMOMURA A, HAGIWARA T, YAMADA K, *et al*. Induction of kallikrein-related peptidase 13 and TET2/3 by anticancer drugs and poor prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma after preoperative treatment[J]. Ann Surg Oncol, 2024, 31(1): 251-261. DOI:10.1245/s10434-023-14364-9.

[17] ZENG D, WU X, ZHENG J, *et al*. Loss of CADM1/TSLC1 expression is associated with poor clinical outcome in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J/OL]. Gastroenterol Res Pract, 2016, 2016: 6947623[2024-11-10]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26880895/. DOI:10.1155/2016/6947623.

[18] ZHONG D Y, WANG Z Y, YE Z C, *et al*. Cancer-derived exosomes as novel biomarkers in metastatic gastrointestinal cancer[J/OL]. Mol Cancer, 2024, 23(1): 67[2024-11-10]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38561768/. DOI:10.1186/s12943-024-01948-6.

[19] MAHESWARI R, URS A B, KUMAR P, *et al*. Exploring miR-155-5p and miR-1246 as diagnostic and prognostic markers in oral squamous cell carcinoma[J/OL]. Mol Biol Rep, 2024, 51(1): 341 [2024-11-10]. https://pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/38400867/. DOI: 10.1007/s11033-024-09234-w.

[20] LIU Z C, ZHAO W, YANG R S. miR-1246 is responsible for lung cancer cells-derived exosomes-mediated promoting effects on lung cancer stemness *via* targeting TRIM17[J]. Environ Toxicol, 2022, 37 (11): 2651-2659. DOI:10.1002/tox.23625.

[21] ZHUANG D X, WANG S S, LIU G Y, *et al*. Phenformin suppresses angiogenesis through the regulation of exosomal microRNA-1246 and microRNA-205 levels derived from oral squamous cell carcinoma cells [J/OL]. Front Oncol, 2022, 12: 943477[2024-11-10]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36158698/. DOI:10.3389/fonc.2022.943477.

[22] OGATA-KAWATA H, IZUMIYA M, KURIOKA D, *et al*. Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer[J/OL]. PLoS One, 2014, 9(4): e92921[2024-11-10]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24705249/. DOI:10.1371/journal.pone.0092921.

[23] COOKS T, PATERAS I S, JENKINS L M, *et al*. Mutant p53 cancers reprogram macrophages to tumor supporting macrophages *via* exosomal miR-1246[J/OL]. Nat Commun, 2018, 9(1): 771[2024-11-10]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29472616/. DOI:10.1038/s41467-018-03224-w.

[24] WANG Y J, LI X Y, WEI X J, *et al*. Identification of combinatorial miRNA panels derived from extracellular vesicles as biomarkers for esophageal squamous cell carcinoma[J/OL]. MedComm, 2023, 4 (5): e377[2024-11-10]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37731947/. DOI:10.1002/mco2.377.

[25] SONG S J, POLISENO L, SONG M S, *et al*. microRNA-antagonism regulates breast cancer stemness and metastasis *via* TET-family-dependent chromatin remodeling[J]. Cell, 2013, 154 (2): 311-324. DOI:10.1016/j.cell.2013.06.026.

[26] WU D M, ZHENG Z H, ZHANG Y B, *et al*. Down-regulated lncRNA DLX6-AS1 inhibits tumorigenesis through STAT3 signaling pathway by suppressing CADM1 promoter methylation in liver cancer stem cells[J/OL]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 237[2024-11-10]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31171015/. DOI: 10.1186/s13046-019-1239-3.

[27] LI H X, GAO J, ZHANG S J. Functional and clinical characteristics of cell adhesion molecule CADM1 in cancer[J/OL]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 714298[2024-11-10]. https://pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/34395444/. DOI:10.3389/fcell.2021.714298.

[28] LEE E, LEE B B, KO E, *et al*. Cohypermethylation of p14 in combination with CADM1 or DCC as a recurrence-related prognostic indicator in stage I esophageal squamous cell carcinoma [J]. Cancer, 2013, 119(9): 1752-1760. DOI:10.1002/cncr.27948.

[29] LI C Y, WANG Y, WANG H, *et al*. miR-486 promotes the invasion and cell cycle progression of ovarian cancer cells by targeting CADM1[J/OL]. Anal Cell Pathol, 2021, 2021: 7407086[2024-11-10]. https://pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/34395181/. DOI: 10.1155/2021/7407086.

[30] CAI H Q, MIAO M Y, WANG Z G. miR-214-3p promotes the proliferation, migration and invasion of osteosarcoma cells by targeting CADM1[J]. Oncol Lett, 2018, 16(2): 2620-2628. DOI: 10.3892/ol.2018.8927.

[31] SI X Q, XU F X, XU F H, *et al*. CADM1 inhibits ovarian cancer cell proliferation and migration by potentially regulating the PI3K/Akt/mTOR pathway[J/OL]. Biomed Pharmacother, 2020, 123: 109717[2024-11-10]. https://pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/31865146/. DOI:10.1016/j.biopha.2019.109717.

[32] JR R R. Blockade of mutant RAS oncogenic signaling with a special emphasis on KRAS[J/OL]. Pharmacol Res, 2021, 172: 105806[2024-11-10]. https://pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/34450320/. DOI:10.1016/j.phrs.2021.105806.

[33] HE H, CONG S, WANG Y, *et al*. Analysis of the key ligand receptor CADM1_CADM1 in the regulation of thyroid cancer based on scRNA-seq and bulk RNA-seq data[J/OL]. Front Endocrinol, 2022, 13: 969914[2024-11-10]. https://pubmed. ncbi. nlm.nih.gov/36523593/. DOI:10.3389/fendo.2022.969914.

［收稿日期］ 2024-11-18　　［修回日期］ 2025-01-15
［本文编辑］ 向正华