

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.06.012

· 临床研究 ·

lncRNA AC007009.1 在非小细胞肺癌组织中的表达及其临床意义

程序^a, 余玲^a, 唐波^b, 王勇^a(四川省自贡市第四人民医院 a. 病理科; b. 胸外科, 四川 自贡 643000)

[摘要] **目的:**探讨 lncRNA AC007009.1 在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)组织中的表达及其临床意义。**方法:**收集 2011 年 6 月至 2016 年 6 月四川省自贡市第四人民医院 105 例 NSCLC 患者;通过实时荧光定量 PCR 法检测 lncRNA AC007009.1 在 105 例 NSCLC 组织、72 例癌旁组织及 33 正常肺组织中的表达水平,分析 lncRNA AC007009.1 的表达与患者部分临床病理学特征之间的关系,了解 lncRNA AC007009.1 的表达与患者 OS 和 PFS 关系及对患者预后的影响。**结果:**lncRNA AC007009.1 在 105 例 NSCLC 癌组织中的表达水平明显高于癌旁组织及正常肺组织(5.30 ± 1.96 vs 1.01 ± 0.33 、 0.99 ± 0.29 , 均 $P < 0.01$), lncRNA AC007009.1 的表达水平与患者癌症分期、远处转移、病理类型及生存状态明显有关($P < 0.05$)。高表达 lncRNA AC007009.1 患者的 OS 及 PFS 较低表达患者明显缩短($P < 0.01$), Cox 多因素回归模型分析显示, lncRNA AC007009.1 的表达水平、淋巴远处转移及临床分期是 NSCLC 独立的预后影响因素($P < 0.05$)。**结论:** lncRNA AC007009.1 参与调节 NSCLC 的发生发展,可作为潜在的 NSCLC 诊断和预后评估的分子标志物。

[关键词] lncRNA AC007009.1; 非小细胞肺癌; 癌旁组织; 表达水平

[中图分类号] R734.2; R730.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2017)06-0645-05

Expression of lncRNA AC007009.1 in tissues of non-small cell lung cancer and its clinical significance

CHENG Xu^a, YU Ling^a, TANG Bo^b, WANG Yong^a(a. Department of Pathology, b. Department of Thoracic surgery, the 4th People's Hospital of Zigong, Zigong 643000, Sichuan China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression and clinical significance of lncRNA AC007009.1 in tissue samples of non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods:** The expression of lncRNA AC007009.1 in 105 NSCLC tissue samples, 72 adjacent normal tissue samples and 33 normal tissue samples was detected by qRT-PCR method; and the relationship between lncRNA AC007009.1 expression and clinical pathological characteristics of NSCLC was analyzed; in addition, the correlation between lncRNA AC007009.1 expression and the OS and PFS of NSCLC patients was also analyzed. **Results:** Expression of lncRNA AC007009.1 was significantly increased in tumor tissues than that in noncancerous tissues (5.30 ± 1.96 vs 1.01 ± 0.33 , 0.99 ± 0.29 , $P < 0.01$). AC007009.1 expression was positively correlated with disease stage, distant metastasis, pathological type and survival status ($P < 0.05$); Moreover, the OS and PFS of patients with high lncRNA AC007009.1 expression were significantly shorter than the patients with low expression ($P < 0.01$). Cox multivariate analysis also indicated that lncRNA AC007009.1 expression, disease stage, distant metastasis were the independent prognostic markers for NSCLC (all $P < 0.05$). **Conclusion:** lncRNA AC007009.1 is involved in the development of NSCLC, and can be used as a molecular marker for the diagnosis and prognosis of non-small cell lung cancer.

[Key words] lncRNA AC007009.1; non-small cell lung cancer (NSCLC); clinical significance; expression level

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(6): 645-649. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.06.008]

肺癌已成为我国病死率最高的恶性肿瘤,其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC) 占有肺癌患者的 80% ~ 85%, 进展期 NSCLC 患者的 5 年生存率只有 15%^[1-2]。因此,探索 NSCLC 治疗的新途径,尤其是从基因水平阐明 NSCLC 发生发展的机制,寻找有效的基因治疗靶点是近年来研

[基金项目] 国家自然科学基金项目(No. 81301910)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81301910)

[作者简介] 程序(1980 -), 女, 硕士生, 主治医师, 主要从事肿瘤的病理诊断及基础与临床研究, E-mail: 357468985@qq.com;

[通信作者] 王勇(WANG Yong, corresponding author), 学士, 副主任医师, 主要从事胸部肿瘤临床治疗研究, E-mail: 523836291@qq.com

究的热点。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类长度大于 200 个核苷酸但不编码蛋白质的 RNA, lncRNA 在调控细胞增殖、分化、凋亡等生物学功能中具有重要的作用^[3-4]。此外, lncRNA 的异常表达与人类疾病密切相关, 参与肿瘤的生长、浸润、转移、复发及耐药等过程。有研究^[5]发现, lncRNA 在多种肿瘤中异常表达, 在肿瘤的发生发展过程中起着癌基因或抑癌基因的作用, 有望成为肿瘤诊断和判断预后新的标志物, 及其新的肿瘤基因治疗靶点。lncRNA AC007009.1 在 NSCLC 组织中的高表达, 提示其可能与 NSCLC 的发生发展相关。本研究通过实时荧光定量 PCR 方法检测 lncRNA AC007009.1 在 NSCLC 患者癌组织及其对应的正常肺组织标本中的表达情况, 分析其表达水平与患者临床病理特征的关系, 探讨 lncRNA AC007009.1 在 NSCLC 早期诊断及预后评估中的潜在作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料

NSCLC 组织标本均来源于 2011 年 6 月至 2016 年 6 月于四川省自贡市第四人民医院行根治性或姑息性切除术的 72 例 NSCLC 原发病灶及癌旁组织, 33 例 IV 期患者癌组织取自支气管镜或 CT 引导下穿刺活检标本, 33 例非肺癌患者的正常肺组织取自各种原因导致的肺外伤患者, 所有患者病例资料完整, 确诊前均未行放疗及中药抗肿瘤治疗。患者一般资料见表 1。全部 105 例患者出院后均随访, 随访方式为电话随访和门诊随访, 随访内容包括一般情况、临床症状及影像学检查。随访起点为手术或病理活检日期, 随访截止日为 2017 年 2 月 1 日。本组患者存活 63 例, 死亡 42 例, 无失访病例。本研究经本院伦理委员会批准, 所有患者均签署知情同意书。

1.2 主要试剂

TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司, AMV 逆转录试剂盒购自美国 TaKaRa 公司, lncRNA AC007009.1 及 GAPDH 引物序列均购自大连宝生生物公司。

1.3 实时荧光定量 PCR 检测 NSCLC 组织中 lncRNA AC007009.1 的表达水平

采用 TRIzol 法提取 NSCLC 组织、癌旁组织及正常肺组织标本中总 RNA, 参照 AMV 逆转录试剂盒说明进行逆转录 cDNA。取适量 cDNA 作为模板, lncRNA AC007009.1 引物序列: 5'-ACCAGCCGGAAT-AGCAACC-3', 5'-GCCTCTGTAACCTTTCTTGCCAG-3'。引物浓度 0.4 $\mu\text{mol/L}$, 15 μl 体系进行扩增, 每个待测

样本设置 3 个平行样, 以 GAPDH 作为内参照 (GAPDH 上游引物为 5'-GGTGAAGGTCGGAGT CAACG-3', 下游引物为 5'-CCATGTAGTTGAGGTCAATGAAG-3')。PCR 反应在实时荧光定量 PCR 反应仪上进行, PCR 扩增的条件是: 95 $^{\circ}\text{C}$ 6 s, (55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s) \times 45 个循环。3 次独立实验后得到的数据运用公式 $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行计算分析。

1.4 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计学软件, lncRNA AC007009.1 在癌组织、癌旁组织及正常组织中的差异表达采用 One-way ANOVA 检验分析, 组内两两比较采用 LSD-t 检验。lncRNA AC007009.1 与各临床病理参数之间的关系采用 Chi-Square 检验; 采用 Kaplan-Meier 法分析 lncRNA AC007009.1 的表达与患者生存时间及预后的关系, 应用 Cox 比例风险模型分析影响 NSCLC 患者预后的因素。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA AC007009.1 在 NSCLC 癌组织标本中高表达

lncRNA AC007009.1 在 105 例 NSCLC 癌组织中的表达水平明显高于癌旁组织及正常肺组织 (5.30 ± 1.96 vs 1.01 ± 0.33 , 0.99 ± 0.29 , 均 $P < 0.01$)。

2.2 lncRNA AC007009.1 的表达与患者部分临床病理学特征相关

根据 lncRNA AC007009.1 平均表达水平 (5.299) 为临界值, 将 105 例 NSCLC 患者分为 lncRNA AC007009.1 高表达组 64 例及低表达组 41 例, 分析 lncRNA AC007009.1 的表达与患者临床病理特征的关系, 结果 (表 1) 发现, lncRNA AC007009.1 的表达与疾病分期、肿瘤分化、淋巴结远处转移、病理类型及生存状态有关 ($P < 0.05$), 而与患者的年龄、性别、肿瘤大小、是否吸烟无关 ($P > 0.05$)。

2.3 lncRNA AC007009.1 的表达与患者 OS 和 PFS 相关

采用 Kaplan-Meier 法评估 lncRNA AC007009.1 的表达与患者生存时间的关系, 结果 (图 1A) 发现, 与高表达 lncRNA AC007009.1 患者比较, 低表达患者的 OS 明显延长 [(36.74 ± 3.22) vs (19.56 ± 3.03) 个月, $P < 0.01$]。与低表达 lncRNA AC007009.1 患者比较, 高表达 lncRNA AC007009.1 的患者 PFS 明显缩短 [(12.78 ± 2.49) vs $(25.00 \pm$

3.45)个月, $P < 0.01$, 图 1B]。

表 1 非小细胞肺癌患者组织标本中 lncRNA AC007009.1 的表达水平与病理特征的关系 [n(%)]

Tab.1 The relationship between lncRNA AC007009.1 expression level and pathological characteristics of NSCLC patients [n(%)]

Feature	LncRNA AC007009.1		χ^2	P
	High	Low		
Total	64(60.95)	41(39.05)		
Age(t/a)			0.675	0.411
<55	26(24.76)	20(19.05)		
≥55	38(36.19)	21(20.00)		
Gender			1.080	0.299
Male	34(32.38)	26(24.76)		
Female	30(28.57)	15(14.29)		
Differentiation			11.040	<0.01
Well	24(22.86)	29(27.62)		
Poor	40(38.10)	12(11.43)		
Tumor size(d/cm)			3.205	0.073
≥3	41(39.05)	19(18.10)		
<3	23(21.90)	22(20.95)		
Disease stage			19.881	<0.01
I	5(4.76)	12(11.43)		
II	12(11.43)	16(15.24)		
III	19(18.10)	8(7.62)		
IV	28(26.67)	5(4.76)		
Lymph node metastasis			11.205	<0.01
Yes	50(47.62)	19(18.10)		
No	14(13.33)	22(20.95)		
Distant metastasis			8.804	<0.01
Yes	27(25.71)	6(5.71)		
No	37(35.24)	35(33.33)		
Smoking			0.027	0.870
Yes	38(36.19)	25(23.81)		
No	26(24.76)	16(15.24)		
Pathological			4.257	0.119
Adenocarcinoma	44(42.31)	20(19.48)		
Squamous carcinoma	15(14.29)	15(14.29)		
Other	5(4.76)	6(5.71)		
Survival status			29.938	<0.01
Survival	25(23.81)	38(36.19)		
Death	39(37.14)	3(2.86)		

2.4 部分临床特征影响 NSCLC 患者的预后

多因素 Cox 回归分析结果(表 2)显示, lncRNA AC007009.1 表达水平、淋巴结转移、远处转移及临床分期是影响 NSCLC PFS 及 OS 的独立预后因素。

3 讨论

NSCLC 包括腺癌、鳞癌、腺鳞癌以及大细胞癌。早期诊断是降低肺癌病死率的重要手段, 转移是影响肺癌预后的重要原因, 大部分 NSCLC 患者诊断时已出现转移, 5 年 OS 不超过 20% [6]。尽管随着分子生物学技术和临床治疗水平的快速发展, 肺癌的临床治疗手段尤其是分子靶向治疗有了一些进步, 但对肺癌发病机制的认识仍然不足, 目前缺乏有效的对早期诊断和判断预后的指标[7-8]。因此, 寻找肺癌早期诊断和肺癌转移治疗的方法, 是当前肺癌研究的热点。

lncRNA 是长度超过 200 个核苷酸单位, 具有调节染色质及基因调节的功能。到目前为止有超过 10 000 多条长链非编码 RNA 被发现, 然而, 仅有不到 1% 的被注释[9-10]。lncRNA 的异常表达与肿瘤的发生密切相关, 越来越多的证据表明 lncRNA 参与 NSCLC 的发生发展。有研究[11]发现, lncRNAlncRNAH19 可调节肺癌细胞对顺铂的抵抗, 可作为肺腺癌预测预后的生物标志物。lncRNAlncRNA RM-RP 通过抑制 miR-206 的表达, 促进肺癌 KRAS、FMNL2 及 SOX9 的表达[12]; lncRNAlncRNA-LET 抑制肺腺癌细胞的生长及上皮间质转化[13]; lncRNAlncRNA MEG3 在肺癌上皮间质转化的表观遗传学过程中发挥着至关重要的作用[14]; 上调 lncRNA-HIT 通过作用于 ZEB1 促进 NSCLC 的迁移和侵袭[15]; lncRNAlncRNA-SNHG7 可促进肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭, 抑制细胞的凋亡[16]; MALAT1 可作为早期肺腺癌中病人预后的一个独立预后标志物[17]。HOTAIR 在 NSCLC 样本中高表达与患者的预后相关[18]。CCAT2 被发现是一个肺腺癌特异的 lncRNAlncRNA[19]。GAS5 在 NSCLC 组织中低表达, 是 NSCLC 患者一个独立预后标志物[20]。研究[10]发现, lncRNA AC007009.1 在 NSCLC 组织标本中的表达较正常肺组织明显增高, 提示 lncRNA AC007009.1 可能与 NSCLC 的发生发展相关。本研究通过比较 105 例临床资料完整的 NSCLC 组织及 72 例癌旁组织标本中的 lncRNA AC007009.1 表达, 分析其表达与患者临床病理特征及预后的关系, 结果发现, lncRNA AC007009.1 在肺癌组织中的表达较癌旁组织明显增高。lncRNA AC007009.1 的表达

与患者的年龄、性别、吸烟史、肿瘤大小、淋巴结转移及肿瘤分化无关,与疾病分期、远处转移、病理类型及生存状态明显有关。此外高表达 lncRNA AC007009.1 患者的 OS 及中位生存时间均较低表达者明显缩短;Cox 多因素回归模型分析提示,lncRNA AC007009.1 的表达、淋巴及远处转移及临床

分期是 NSCLC 独立的预后因素。以上研究结果提示,lncRNA AC007009.1 参与调节 NSCLC 的发生发展,可作为潜在的 NSCLC 诊断和预后评估的分子标志物。但 lncRNA AC007009.1 在调节 NSCLC 预后中的具体作用机制及参与的信号通路,尚需进一步分子实验室及临床研究。

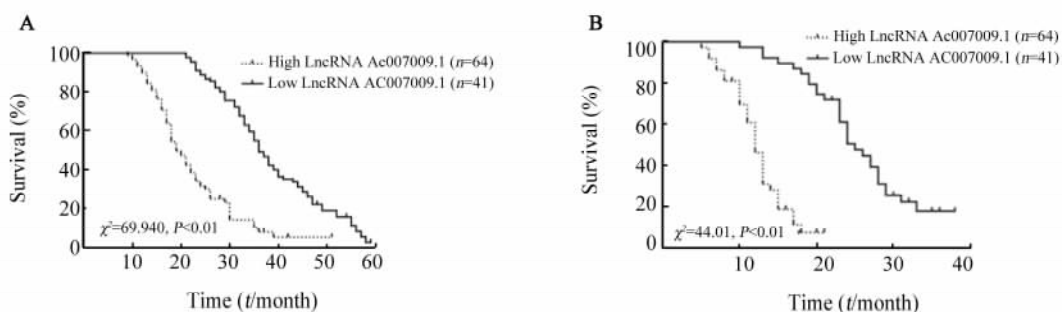


图1 LncRNA AC007009.1 的表达与 NSCLC 患者 OS(A)及 PFS(B)的关系

Fig.1 The relationship between lncRNA AC007009.1 expression and the overall survival time (OS, A) and progress free survival time (PFS, B) in NSCLC patients

表2 临床特征对 NSCLC 患者预后影响的单因素和多因素分析

Tab.2 Univariate and multivariate analyses of prognostic factors for NSCLC patients

Clinical feature	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
Age(t/a) (≥ 55 vs < 55)	1.003	0.605 ~ 1.650	0.134	1.002	0.593 ~ 1.658	0.189
Gender(male vs female)	1.100	0.385 ~ 1.276	0.240	1.087	0.490 ~ 1.730	0.160
Disease stage(III ~ IV vs I ~ II)	5.079	2.820 ~ 8.980	<0.01	4.150	2.630 ~ 7.870	<0.01
Lymph node metastasis(Yes vs No)	2.007	1.880 ~ 4.710	<0.01	1.740	1.490 ~ 3.860	<0.05
Distant metastasis(Yes vs No)	3.790	1.870 ~ 9.950	<0.01	2.509	1.390 ~ 5.250	<0.01
Differentiation(Well vs Poor)	0.720	0.430 ~ 1.470	0.098	0.470	0.750 ~ 1.550	0.109
Pathological(Adenocarcinoma vs Squamous carcinoma or Others)	1.410	0.830 ~ 2.360	0.190	1.350	0.890 ~ 1.910	0.106
Smoking(Yes vs No)	1.260	0.740 ~ 1.620	0.090	1.190	0.560 ~ 1.080	0.420
LncRNA AC007009.1(High vs Low)	7.220	4.030 ~ 14.470	<0.01	4.050	2.530 ~ 8.560	<0.01

HR: Hazard ratio

[参 考 文 献]

[1] BRINKMEYER J K, MOORE D C. Necitumumab for the treatment of squamous cell non-small cell lung cancer[J/OL]. J Oncol Pharm Pract, 2016, 2016[2017-03-13]. <http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1078155216682365>. DOI:10.1177/1078155216682365.

[2] CHEN X Q, ZHENG L X, LI Z Y, et al. Clinicopathological significance of oestrogen receptor expression in non-small cell lung

cancer[J]. J Int Med Res, 2017, 45(1): 51-58. DOI:10.1177/0300060516666229.

[3] ZHANG Y, WAGNER E K, GUO X, et al. Long intergenic non-coding RNA expression signature in human breast cancer[J/OL]. Sci Rep, 2016, 6: 37821[2017-03-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5126689/>. DOI: 10.1038/srep37821.

[4] ZHOU M, ZHANG X Y, YU X. Overexpression of the long non-coding RNA SPRY4-IT1 promotes tumor cell proliferation and in-

- vasion by activating EZH2 in hepatocellular carcinoma[J/OL]. Biomed& pharmacother, 2017, 85: 348-354[2017-03-13]. https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753-3322(16)31909-6 DOI:10.1016/j.biopha.2016.11.035.
- [5] ZHANG D, SUN G, ZHANG H, et al. Long non-coding RNA ANRIL indicates a poor prognosis of cervical cancer and promotes carcinogenesis via PI3K/Akt pathways[J/OL]. Biomed Pharmacother, 2017, 85: 511-516[2017-03-13]. https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753-3322(16)31830-3. DOI:10.1016/j.biopha.2016.11.058.
- [6] HEIST R S. First-line systemic therapy for non-small cell lung cancer[J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2017, 31(1):59-70. DOI:10.1016/j.hoc.2016.08.001.
- [7] REDDY J P, TANG C, SHIH T, et al. Influence of surveillance PET/CT on detection of early recurrence after definitive radiation in stage III non-small-cell lung cancer[J]. Clin Lung Cancer, 2017, 18(2):141-148. DOI:10.1016/j.clcc.2016.11.003.
- [8] THOMAS A A, PEARCE A, O'NEILL C, et al. Urban-rural differences in cancer-directed surgery and survival of patients with non-small cell lung cancer[J]. J Epidemiol Community Health, 2017, 71(5):468-474. DOI:10.1136/jech-2016-208113.
- [9] LI H, HE Z, GU Y, et al. Prioritization of non-coding disease-causing variants and long non-coding RNAs in liver cancer[J]. Oncol Lett, 2016, 12(5):3987-3994. DOI:10.3892/ol.2016.5135.
- [10] WANG D, WANG D D, WANG N, et al. Long non-coding RNA BANCR promotes endometrial cancer cell proliferation and invasion by regulating MMP2 and MMP1 via ERK/MAPK signaling pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 40(3-4):644-656. DOI:10.1159/000452577.
- [11] WANG Q, CHENG N, LI X, et al. Correlation of long non-coding RNA H19 expression with cisplatin-resistance and clinical outcome in lung adenocarcinoma[J]. Oncotarget, 2017, 8(2):2558-2567. DOI:10.18632/oncotarget.13708.
- [12] MENG Q, REN M, LI Y, et al. LncRNA-RMRP acts as an oncogene in lung cancer[J/OL]. PLoS One, 2016, 11(12):e0164845 [2017-03-15]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5132297/. DOI:10.1371/journal.pone.0164845.
- [13] LIU B, PAN C F, HE Z C, et al. Long noncoding RNA-LET suppresses tumor growth and EMT in lung adenocarcinoma[J/OL]. Biomed Res Int, 2016, 2016:4693471[2017-03-13]. https://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/4693471/. DOI:10.1155/2016/4693471.
- [14] TERASHIMA M, TANGE S, ISHIMURA A, et al. MEG3 long noncoding rna contributes to the epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cell lines[J]. J Biol Chem, 2017, 292(1):82-99. DOI:10.1074/jbc.M116.750950.
- [15] JIA X, WANG Z, QIU L, et al. Upregulation of lncRNA-HIT promotes migration and invasion of non-small cell lung cancer cells by association with ZEB1[J]. Cancer Med, 2016, 5(12):3555-3563. DOI:10.1002/cam4.948.
- [16] SHE K, HUANG J, ZHOU H, et al. lncRNA-SNHG7 promotes the proliferation, migration and invasion and inhibits apoptosis of lung cancer cells by enhancing the FAIM2 expression[J]. Oncol Rep, 2016, 36(5):2673-2680. DOI:10.3892/or.2016.5105.
- [17] HUANG N S, CHI Y Y, XUE J Y, et al. Long non-coding RNA metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1) interacts with estrogen receptor and predicted poor survival in breast cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(25):37957-37965. DOI:10.18632/oncotarget.9364.
- [18] ZHOU C, YE L, JIANG C, et al. Long noncoding RNA Hotair, a hypoxia-inducible factor-1 activated driver of malignancy, enhances hypoxic cancer cell proliferation, migration, and invasion in non-small cell lung cancer[J]. Tumour Biol, 2015, 36(12):9179-9188. DOI:10.1007/s13277-015-3453-8.
- [19] QIU M, XU Y, YANG X, et al. CCAT2 is a lung adenocarcinoma-specific long non-coding RNA and promotes invasion of non-small cell lung cancer[J]. Tumour Biol, 2014, 35(6):5375-5380. DOI:10.1007/s13277-014-1700-z.
- [20] SHI X, SUN M, LIU H, et al. A critical role for the long non-coding RNA GAS5 in proliferation and apoptosis in non-small-cell lung cancer[J]. Mol Carcinog, 2015, 54(Suppl 1):1-12. DOI:10.1002/mc.22120-13.
- [收稿日期] 2017-03-03 [修回日期] 2017-04-18
[本文编辑] 王映红

· 更正声明 ·

更正声明

本刊2017年第24卷第4期389-394页基础研究论文《小干扰RNA沉默CXCR4和CXCR7对人子宫内膜癌Ishikawa细胞裸鼠移植瘤生长的抑制作用》(作者:叶园英,黄煜,颜莉莉,赵淑萍,张磊),第一单位应为“青岛大学附属青岛妇女儿童医院”,因作者疏忽,误写成“青岛市妇女儿童医院”,特此更正。

(本刊编辑部)