

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.07.013

· 临床研究 ·

lncRNA RP5-1185K9.17 在结直肠癌组织中的表达及其临床意义

胡洪林, 杨兰, 邓颖, 白义凤 (四川省医学科学院 四川省人民医院 肿瘤中心, 四川 成都 610072)

[摘要] **目的:** 探讨 lncRNA RP5-1185K9.17 在结直肠癌组织中的表达及其临床意义。**方法:** 实时荧光定量-PCR 法检测 2011 年 1 月至 2016 年 6 月四川省人民医院收治的 117 例结直肠癌患者手术切除的癌组织及癌旁组织 lncRNA RP5-1185K9.17 的表达; 使用 Chi-Square 检验、Kaplan-Meier 法和 Cox 比例风险模型分别分析 lncRNA RP5-1185K9.17 表达与患者临床病理特征、生存时间及预后的关系和影响结直肠癌预后的因素。**结果:** lncRNA RP5-1185K9.17 在结直肠癌组织中的表达明显较癌旁正常组织增高 [(结肠癌: 6.850 ± 0.420 ; 直肠癌: 7.180 ± 0.380) vs (癌旁组织: 1.080 ± 0.220 ; 正常组织: 0.980 ± 0.140), $P < 0.01$], lncRNA RP5-1185K9.17 的表达与疾病分期、淋巴结转移、远处转移、肿瘤分化和血清 CEA 水平及生存状态显著相关 (均 $P < 0.05$); 而与患者的性别、年龄及肿瘤部位无显著关系 (均 $P > 0.05$); lncRNA RP5-1185K9.17 高表达患者的总生存 (OS) 时间及无进展生存 (PFS) 时间均较低表达患者明显缩短 [OS: (25.45 ± 4.28) 月 vs (42.69 ± 3.72) 月; PFS: (13.88 ± 2.97) 月 vs (26.65 ± 5.33) 个月均 $P < 0.01$]; lncRNA RP5-1185K9.17 的表达、远处转移、临床分期和血清 CEA 水平是结直肠癌独立的预后影响因素 (均 $P < 0.05$)。**结论:** lncRNA RP5-1185K9.17 可能参与调节结直肠癌的发生发展, 可作为潜在的结直肠癌诊断和预后分子标志物。

[关键词] 长链非编码 RNA RP5-1185K9.17; 结直肠癌; 总生存时间; 无进展生存时间

[中图分类号] R735.3; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)07-0773-05

Expression of lncRNA RP5-1185K9.17 in cancer tissues of the patients with colorectal cancer and its clinical significance

HU Honglin, YANG Lan, DENG Ying, BAI Yifeng (Tumor Center, Sichuan Academy of Medical Sciences and Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, Sichuan, China)

[Abstract] Objective: To explore expression of long non-coding RNA (lncRNA) RP5-1185K9.17 in colorectal cancer tissue and its clinical significance. **Methods:** Expression of lncRNA RP5-1185K9.17 in surgery removed cancer tissues and corresponding paracancerous tissues of the patients with colorectal cancer who hospitalized in the Sichuan Provincial People's Hospital during January 2011 to June 2016 were detected by qRT-PCR assay. Chi-Square inspection, Kaplan-Meier assay and Cox proportional analysis model were used respectively to analyze relationships of the lncRNA RP5-1185K9.17 expression with clinicopathological parameters, survival time and prognosis of the patients with colorectal cancer as well as factors effecting prognosis of the patients. **Results:** Expressions of lncRNA RP5-1185K9.17 in the colorectal cancer tissues were more significantly heightened than that in paracancerous normal tissues ([colon cancer: 6.850 ± 0.420 ; rectal cancer: 7.180 ± 0.380] vs [paracancerous tissue: 1.080 ± 0.220 ; normal tissue: 0.980 ± 0.140], $P < 0.01$). The expression of lncRNA RP5-1185K9.17 was obviously related to TNM staging, lymph node metastasis, distant metastasis, tumor differentiation, serum CEA level and survival state of the patients (all $P < 0.05$), but not related to gender, age and tumor location of the patients (all $P > 0.05$). Overall survival (OS) and progression free survival (PFS) of the patients with high expression of lncRNA RP5-1185K9.17 were obviously shorten than those of the patients with low expression of lncRNA RP5-1185K9.17 (OS: [25.45 ± 4.28] month vs [42.69 ± 3.72] months; PFS: [13.88 ± 2.97] months vs [26.65 ± 5.33] months, all $P < 0.01$). Expression of lncRNA RP5-

[作者简介] 胡洪林 (1969-), 男, 副主任医师, 主要从事消化道肿瘤的发生发展、转移和耐药性研究, E-mail: 754417834@qq.com

[通信作者] 胡洪林 (Hu Honglin, Corresponding author)

[优先发表] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170616.1647.004.html>

1185K9.17, distant metastasis, TNM staging and serum CEA level were independent factors effecting prognosis of the patients (all $P < 0.05$). **Conclusion:** lncRNA RP5-1185K9.17 could be involved in occurrence and development of the colorectal cancer, and might be a potential molecular marker of diagnosis and prognosis of the patients with colorectal.

[Key words] long non-coding RNA RP5-1185K9.17(lncRNA RP5-1185K9.17); colorectal cancer(CRC); overall survival (OS); progression free survival (PFS)

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(7): 773-777. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.07.013]

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是世界范围内常见的消化道肿瘤之一,女性中排第二位,男性中居第三,其病死率排名第二^[1]。随着中国国民生活水平的提高,CRC在人群中的发病率和病死率均有所增加,越来越成为威胁人们健康和生命的杀手。除原发性CRC(病灶中无腺瘤的新生结直肠癌)外,大部分CRC发生前常有家族性腺瘤性息肉病、炎性肠病和结直肠腺瘤等病变^[2]。结直肠腺瘤性息肉病是散发型CRC最常见的癌前病变,60岁以上患者约40%体内都有这种腺瘤性息肉病,普通人群中出现结直肠腺瘤的比例高达50%,但其中只有6%的结直肠腺瘤性息肉病患者最终转变为CRC^[3-4]。目前,由于CRC的确切发病机制还不十分清楚,因此仍没有研究出高效的根治CRC的治疗手段和药物。近年来的研究^[4-5]表明,长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)在恶性肿瘤的发生发展过程中发挥至关重要的作用。lncRNA曾一度被认为是RNA聚合酶II转录的副产物,是基因组转录的“噪音”,不具有生物学功能^[6]。然而,最近的大量报道^[7-8]表明,lncRNA参与调节DNA甲基化、组蛋白修饰、miRNA前体、mRNA降解、磷酸化作用、染色质重塑、蛋白修饰等多种生物学过程。更重要的是lncRNA在疾病诊断和治疗领域表现出重要的研究价值,其临床应用前景巨大。研究其在CRC发生发展中的作用及相关性将为CRC的早期诊断及治疗提供新突破。课题组前期通过lncRNA芯片发现lncRNA RP5-1185K9.1在CRC组织标本中的表达较正常癌旁组织明显增高,提示lncRNA RP5-1185K9.1可能与CRC的发生发展相关。本研究通过实时荧光定量PCR方法检测lncRNA RP5-1185K9.1在CRC患者癌组织及其对应的癌旁组织中的表达情况,并分析其与患者临床病理特征的关系,揭示lncRNA RP5-1185K9.1在CRC中的可能作用及其在诊断及预后评估中的潜在价值。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集2011年1月至2016年6月四川省人民医院收治的117例CRC患者手术切除的癌组织及癌旁组织标本,其中结肠癌55例,直肠癌62例;I期患者15例,II期患者32例,III期患者40例,IV期患者30例(结肠癌15例,直肠癌15例);癌组织取自肠镜活检。30例非结直肠癌患者的正常组织取自各种原因的肠破裂穿孔、肠扭转、嵌顿疝患者。所有患者获取标本前均未行抗肿瘤治疗,术前均抽血经检验科免疫荧光法测定CEA值。组织标本均在术后半小时内获取,液氮保存备用。入选患者入院后即采集静脉血,置于4℃冷藏30 min后,室温下1 000×g离心15 min,取血清,置-20℃冰箱备用。本研究经本院伦理委员会批准,患者均签署知情同意书。患者出院后均随访,初次随访时间为手术或病理活检日期,末次随访时间为2016年12月1日,至随访截止日,患者存活67例、死亡50例,无失访患者。

1.2 实时荧光定量PCR检测RP5-1185K9.1的表达水平

采用TRIzol (Invitrogen, Grand Island, NY)方法提取组织标本中总RNA。参照AMV逆转录试剂盒说明书操作将提取的总RNA逆转录成cDNA,采用2×SYBR Green PCR Master Mix[宝生物工程(大连)有限公司产品],以cDNA为模板,进行实时荧光定量PCR。按照SYBR Green PCR Master(TaKaRa,大连宝生生物,中国)试剂盒说明书操作进行PCR扩增,以GAPDH作为内参照。lncRNARP5-1185K9.1及GAPDH引物序列见表1。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。PCR反应条件:95℃ 10 min后;95℃ 15 s、60℃ 30 s、72℃ 30 s,共40个循环。重复3次实验得到的数据采用公式 $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算RP5-1185K9.1的表达水平。

1.3 统计学处理

用SPSS13.0软件进行统计分析。癌组织、癌旁组织和正常组织中RP5-1185K9.17表达差异采用t检验或One way ANOVA分析。使用Chi-Square检验分析RP5-1185K9.17的表达与各临床病理参数之间的

关系;RP5-1185K9.17的表达与生存时间及预后的关系采用Kaplan-Meier法分析,应用Cox比例风险模型分析影响CRC预后的因素。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 为差异具有统计学意义。

表1 引物序列
Tab.1 Sequence of the primers

Primer	Sequence
RP5-1185K9.1	F: 5'-CAGATGGAGTTTGTGGACTT-3' R: 5'-CTTTTGATTGCCAGAGTAGGG-3'
GAPDH	F: 5'-GTCAACGGATTGGTCTGTATT-3' R: 5'-AGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3'

2 结果

2.1 RP5-1185K9.17在CRC组织中的表达增高

实时荧光定量PCR检测RP5-1185K9.17在结肠癌、直肠癌、相应癌旁组织及正常组织中表达的结果(图1)提示,与癌旁组织(1.080 ± 0.220)及正常组织(0.980 ± 0.140)比较,RP5-1185K9.17在直肠癌(7.180 ± 0.380)及结肠癌(6.850 ± 0.420)组织标本中的表达明显增高,差异具有统计学意义($F=57.65, P<0.01$)。

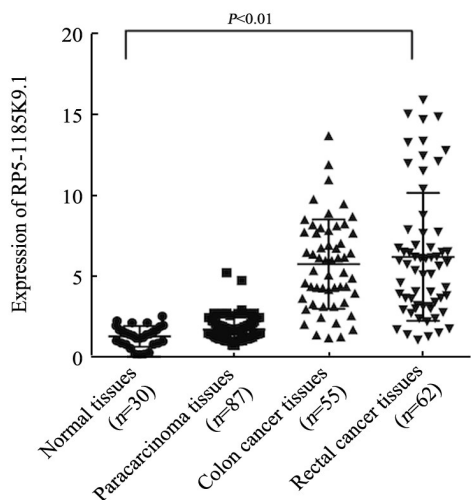


图1 实时荧光定量PCR法检测RP5-1185K9.17在癌旁组织、正常组织及癌组织中的表达。

Fig.1 Expressions of RP5-1185K9.17 in the paracarcinoma tissues, the normal tissues and the carcinoma tissues measured by qRT-PCR

2.2 RP5-1185K9.17的表达与CRC患者疾病分期、淋巴结转移、远处转移、肿瘤分化和血清CEA水平及生

存状态明显相关

以结肠癌患者癌组织标本RP5-1185K9.17的中位值6.850为界, $RQ\geq 6.850$ 为高表达, $RQ<6.850$ 为低表达,将全部标本的RP5-1185K9.17的表达分为高表达组和低表达组。CRC患者肿瘤组织RP5-1185K9.17表达情况与患者病理资料相关性分析(表2)发现,RP5-1185K9.17的表达与患者的性别、年龄及肿瘤部位无关(均 $P>0.05$);与疾病分期、淋巴结转移、远处转移、肿瘤分化、血清CEA水平及生存状态明显相关(均 $P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表2 CRC组织中RP5-1185K9.17表达与病理特征的关系(n)
Tab.2 Relationship of lncRNA RP5-1185K9.17 expression with pathological characteristics of the patients with CRC(n)

Features	RP5-1185K9.17 expression		χ^2	P
	Low	High		
Age(t/a)			0.841	0.359
<53	48	69		
≥ 53	25	30		
Gender			1.755	0.185
Male	24	26		
Female	24	43		
Differentiation			11.584	0.01
Median and well	25	15		
Poorly and mucinous adenocarcinoma	23	54		
Tumor location			1.535	0.464
Right	15	14		
Left	10	16		
Rectum	24	38		
TNM stage			21.998	<0.01
I	12	3		
II	19	13		
III	10	30		
IV	7	23		
Lymphnode metastasis			15.876	<0.01
Yes	17	50		
No	31	19		
Distant metastasis			13.396	<0.01
Yes	5	25		
No	43	34		
CEA[ρ_n /(ng·ml ⁻¹)]			21.089	<0.01
<5	28	12		
≥ 5	20	57		
Survival status			8.148	0.004
Survival	35	32		
Death	13	37		

2.3 RP5-1185K9.17高表达CRC患者生存期显著缩短

Kaplan-Meier法分析(图2)发现,RP5-1185K9.17的高表达患者无进展生存时间(PFS)为(13.88±2.97)个月,较低表达患者[(26.65±5.33)个月]缩短($\chi^2=45.630, P<0.01$);lncRNA RP5-1185K9.17低表达患者的总生存时间(OS)为(42.69±3.72)个月,较高表达患者[(25.45±4.28)个月]明显延长($\chi^2=38.550, P<0.01$)。

2.4 CRC患者RP5-1185K9.17的表达、远处转移、血清CEA水平及临床分期是独立的预后影响因素

多因素Cox回归分析结果(表3)显示,RP5-1185K9.17的表达、远处转移、血清CEA水平及临床分期是CRC独立的预后因素(均 $P<0.01$)。

3 讨论

CRC是临床常见的恶性肿瘤之一,随着社会经济的发展、人们生活环境、生活方式以及膳食结构的改变,CRC的发病率呈不断上升趋势,尽管在CRC的诊断和治疗上取得了巨大进展,但由于其发现晚、进展快,5年生存率仍然较低^[1-9]。CRC的临床诊断目前多依靠影像学、肠镜以及粪便隐血试验等方法,但CRC患者早期症状不明显,极易漏诊、误诊。因此深入研究与CRC发病机制相关的基因,及时发现可治愈的癌前病变或早期CRC理想生物标志物具有重要的临床意义^[10-12]。

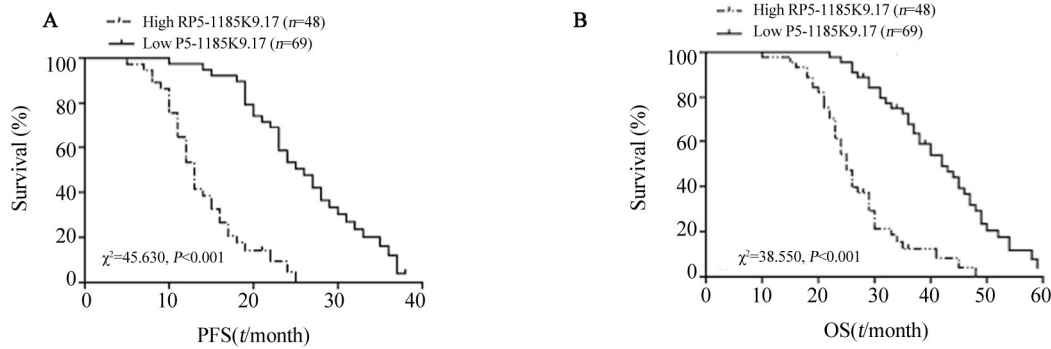


图2 CRC患者RP5-1185K9.17表达与DFS及OS的关系

Fig. 2 The relationship of RP5-1185K9.17 expression with the DFS and OS of the patients with CRC

表3 COX多因素分析CRC患者DFS和OS影响的因素

Tab.3 Factors influencing prognosis for DFS and OS of the patients with CRC analyzed by COX multivariate

Feature	DFS			OS		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
Age (t/a)(≥53 vs <53)	1.012	0.729-1.430	0.320	1.017	0.833-1.570	0.416
Gender (male vs female)	1.050	0.602-1.973	0.382	1.052	0.670-1.340	0.354
TNMstage (III-IV vs I-II)	5.540	1.970-8.920	0.001	4.450	1.963-7.740	0.001
Lymph node metastasis (yes vs no)	1.358	0.860-3.054	0.096	1.230	0.883-1.746	0.083
Distant metastasis (yes vs no)	3.280	1.480-7.730	0.001	2.760	1.830-6.694	0.001
Differentiation (low vs well and median)	1.710	1.030-3.870	0.041	1.540	1.190-2.930	0.044
RP5-1185K9.17(high vs low)	5.930	2.710-13.600	<0.001	4.760	2.450-9.770	<0.001
SerumCEA [ρ_B /(ng·ml ⁻¹)](≥5 vs <5)	2.270	1.650-3.880	0.003	2.090	1.680-3.940	0.007

既往研究^[13-15]表明,lncRNA在癌组织中的表达水平主要有三种模式:上调、下调、双向调节,其中以上调报道的最为多见。在癌组织中表达上调的lncRNA

往往扮演类似“癌基因”的作用,如肝细胞核因子1A反义链1 (hepatocyte nuclear factor 1 alpha-antisense 1, HNF1A-AS1)在肝癌中通过结合 hsa-miR-30b-5p

促进肝癌细胞的增殖,发挥着癌基因的功能^[16];上调的 lncRNA,如UCA1(urothelial carcinoma-associated 1)通过抑制 miR-216b 的表达以及活化 FGFR1/ERK 信号通路影响肿瘤的进展^[17];HOTAIR 在乳腺癌中表达上调,其通过结合 PRC2 复合物促进恶性肿瘤转移相关基因的表达,在乳腺癌的侵袭转移过程中发挥重要的调控作用^[18]。然而关于 RP5-1185K9.1 在 CRC 功能的研究,目前国内外尚无相关报道。本研究通过实时荧光定量 PCR 法检测 RP5-1185K9.17 在 117 例 CRC 组织及癌旁正常组织中的表达,分析其表达的临床意义。结果发现,与癌旁正常组织比较,lncRNA RP5-1185K9.17 在 CRC 组织中的表达明显增高,而且其表达与疾病分期、淋巴结转移、远处转移、肿瘤分化和血清 CEA 水平及生存状态明显相关;而与患者的性别、年龄及肿瘤部位无关;高表达 RP5-1185K9.17 患者的总生存时间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,RP5-1185K9.17 的表达、远处转移及临床分期是 CRC 独立的预后因素。以上研究结果提示,RP5-1185K9.17 是 CRC 预后不良的影响因子,参与调节 CRC 的发生发展,可作为 CRC 诊断和预后评估潜在的分子标志物,但其具体的分子机制尚需进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] LI S, KONSTANTINOV S R, SMITS R, et al. Bacterial biofilms in colorectal cancer initiation and progression[J]. Trends Mol Med, 2016, 23(1): 18-30. DOI:10.1016/j.molmed.2016.11.004.
- [2] ARRIBA M, GARCIA J L, RUEDA D, et al. Unsupervised analysis of array comparative genomic hybridization data from early-onset colorectal cancer reveals equivalence with molecular classification and phenotypes[J]. Neoplasia, 2016, 19(1): 28-34. DOI:10.1016/j.neo.2016.11.006.
- [3] NGUYEN T T, TSOH J Y, WOO K, et al. Colorectal cancer screening and Chinese Americans: efficacy of lay health worker outreach and print materials[J/OL]. Am J Prev Med, 2016, 52(3): e67-e76 [2017-05-16]. [http://www.ajpmonline.org/article/S0749-3797\(16\)30509-8/fulltext](http://www.ajpmonline.org/article/S0749-3797(16)30509-8/fulltext). DOI:10.1016/j.amepre.2016.10.003.
- [4] KHANDELWAL A, MALHOTRA A, JAIN M, et al. The emerging role of long non-coding RNA in gallbladder cancer pathogenesis[J]. Biochimie, 2017, 132: 153-160. DOI:10.1016/j.biochi.2016.11.007.
- [5] TAKENAKA K, CHEN B J, MODESITT S C, et al. The emerging role of long non-coding RNAs in endometrial cancer[J]. Cancer Genet, 2016, 209(10): 445-455. DOI:10.1016/j.cancergen.2016.09.005.
- [6] McMULLEN J R, DREW B G. Long non-coding RNAs (lncRNAs) in skeletal and cardiac muscle: potential therapeutic and diagnostic targets?[J]. Clin Sci (Lond), 2016, 130(24): 2245-2256. DOI:10.1042/cs20160244.
- [7] CHEN J, MIAO Z, XUE B, et al. Long non-coding RNAs in urologic malignancies: functional roles and clinical translation[J]. J Cancer, 2016, 7(13): 1842-1855. DOI:10.7150/jca.15876.
- [8] JIANG C, LI X, ZHAO H, et al. Long non-coding RNAs: potential new biomarkers for predicting tumor invasion and metastasis[J]. Mol Cancer, 2016, 15(1): 62. DOI:10.1186/s12943-016-0545-z.
- [9] CANAVESE M, NGO D T, MADDERN G J, et al. Biology and therapeutic implications of VEGF-A splice isoforms and single-nucleotide polymorphisms in colorectal cancer[J]. Int J Cancer, 2017, 140(10): 2183-2191. DOI:10.1002/ijc.30567.
- [10] MELOSKY B. Meeting an unmet need in metastatic colorectal carcinoma with regorafenib[J]. Asia Pac J Oncol Nurs, 2016, 3(1): 58-65. DOI:10.4103/2347-5625.178174.
- [11] PIETRZYK L. Biomarkers discovery for colorectal cancer: a review on tumor endothelial markers as perspective candidates[J/OL]. Dis Markers, 2016, 2016: 4912405 [2017-05-16]. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4912405>. DOI:10.1155/2016/4912405.
- [12] SEKIGUCHI M, MATSUDA T, SAITO Y. Surveillance after endoscopic and surgical resection of colorectal cancer[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2016, 30(6): 959-970. DOI:10.1016/j.bpg.2016.09.002.
- [13] WENG M, WU D, YANG C, et al. Noncoding RNAs in the development, diagnosis, and prognosis of colorectal cancer[J]. Transl Res, 2017, 181:108-120. DOI:10.1016/j.trsl.2016.10.001.
- [14] GUPTA S C, TRIPATHI Y N. Potential of long non-coding RNAs in cancer patients: from bio-markers to therapeutic targets[J]. Int J Cancer, 2017, 140(9): 1955-1967. DOI:10.1002/ijc.30546.
- [15] DENG H, ZHANG J, SHI J, et al. Role of long non-coding RNA in tumor drug resistance[J]. Tumour Biol, 2016, 37(9): 11623-11631. DOI:10.1007/s13277-016-5125-8.
- [16] LIU Z, WEI X, ZHANG A, et al. Long non-coding RNA HNF1A-AS1 functioned as an oncogene and autophagy promoter in hepatocellular carcinoma through sponging hsa-miR-30b-5p[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 473(4): 1268-1275. DOI:10.1016/j.bbrc.2016.04.054.
- [17] WANG F, YING H Q, HE B S, et al. Upregulated lncRNA-UCA1 contributes to progression of hepatocellular carcinoma through inhibition of miR-216b and activation of FGFR1/ERK signaling pathway[J]. Oncotarget, 2015, 6(10): 7899-7917. DOI:10.18632/oncotarget.3219.
- [18] MILEVSKIY M J, AL-EJEH F, SAUNUS J M, et al. Long-range regulators of the lncRNA HOTAIR enhance its prognostic potential in breast cancer[J]. Hum Mol Genet, 2016, 25(15): 3269-3283. DOI:10.1093/hmg/ddw177.

[收稿日期] 2017-02-14

[修回日期] 2017-05-25

[本文编辑] 宋关鸿