

lncRNA NCRNA00173 在骨肉瘤组织中的表达及其临床意义

潘海霞, 杨兰, 胡洪林, 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 NCRNA00173 在骨肉瘤组织中表达及其临床意义。**方法:** 通过实时荧光定量 PCR 法检测 lncRNA NCRNA00173 在 54 例骨肉瘤组织及癌旁组织标本(收集自四川省人民医院骨科 2012 年 10 月至 2016 年 12 月手术患者)中的表达, 分析其表达的临床意义。**结果:** 与癌旁组织比较, lncRNA NCRNA00173 在骨肉瘤组织标本中的表达明显降低(1.793 ± 0.158 vs 5.368 ± 0.285 , $t=10.96$, $P<0.01$)。lncRNA NCRNA00173 的表达与疾病分期、淋巴结转移、远处转移、肿瘤分化及生存状态明显相关(均 $P<0.05$), 而与患者的性别、年龄无关(均 $P>0.05$); 此外, 高表达 lncRNA NCRNA00173 患者的 OS 及 PFS 均较表达者明显延长($P<0.01$)。Cox 多因素回归模型分析提示, lncRNA NCRNA00173 的表达、远处转移及临床分期是骨肉瘤独立的预后因素($P<0.05$)。**结论:** lncRNA NCRNA00173 参与调节骨肉瘤的发生发展, 可作为潜在的骨肉瘤诊断和预后评估的分子标志物。

[关键词] lncRNA NCRNA00173; 骨肉瘤; 临床意义

[中图分类号] R730.2; R738.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)08-0884-05

Expression and clinical significance of lncRNA NCRNA00173 in osteosarcoma tissues

PAN Haixia, YANG Lan, HU Honglin, BAI Yifeng (Department of Oncology, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, Sichuan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression and clinical significance of lncRNA NCRNA00173 in the tissues of osteosarcoma patients. **Methods:** The expression of lncRNA NCRNA00173 mRNA was detected in 54 cases of osteosarcoma tissues and adjacent tissues (collected from the patients underwent surgery between October, 2012 and December, 2016 at the Department of Orthopedic, Sichuan Provincial People's Hospital) by real-time fluorescence quantification PCR, and its clinical significance was analyzed. **Results:** The expression of lncRNA NCRNA00173 in osteosarcoma tissues was obviously decreased compared with that in paracarcinoma tissues (1.793 ± 0.158 vs 5.368 ± 0.285 , $t=10.96$, $P<0.01$). lncRNA NCRNA00173 expression was not significantly correlated with patients' gender or age (both $P>0.05$), but remarkably correlated with disease stage, distant metastasis, tumor differentiation and the survival (all $P<0.05$); Furthermore, patients with high lncRNA NCRNA00173 expression had significant longer OS and median PFS. Cox multivariate regression analysis suggested that lncRNA NCRNA00173 expression, distant metastasis and clinical stage were the independent prognostic factors for osteosarcoma ($P<0.05$). **Conclusion:** lncRNA NCRNA00173 is involved in the occurrence and development of osteosarcoma, and can be used as a molecular marker for the diagnosis and prognosis of osteosarcoma.

[Key words] lncRNA NCRNA00173; osteosarcoma; clinical significance

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(8): 884-888. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.08.012]

骨肉瘤是青少年最常见的原发恶性骨肿瘤, 多发生于生长快速的长骨干骺端, 50%~70%发生在膝关节周围, 发病率约为 6~8/100 万, 且有增加的趋势^[1-2]。由于骨肉瘤侵袭性强, 主要经血液转移, 肺部转移较为常见, 预后较差, 5 年存活率在 70% 左右, 大部分患者发现时已进入晚期或者发生肺部转移, 缺乏早期诊断指标^[3]。虽然骨肉瘤在病因、发生发展、

[基金项目] 四川省科技支撑项目资助 (No.2012SZ0181)。Project support by the Science and Technology Program of Sichuan (No. 2012SZ0181)

[作者简介] 潘海霞 (1969-), 女, 学士, 副主任医师, 主要从事软组织瘤发生发展的机制研究及治疗, E-mail: 1206682648@qq.com

[通信作者] 潘海霞 (PAN Haixia, corresponding author), 副主任医师, 主要从事软组织瘤发生发展的机制研究及治疗, E-mail: 1206682648@qq.com

诊断和治疗等方面有一些进展,但进展十分缓慢,尚缺少骨肉瘤诊断和治疗的有效指标,如能获得骨肉瘤血清诊断标志物,将对骨肉瘤的诊断和治疗带来深远的影响^[4]。

长链非编码 RNA (long non coding RNA, lncRNA) 是一种长度大于 200 个核苷酸单位、缺乏编码蛋白的开放阅读框且不同于任何一类已知的非编码 RNA 的非编码 RNA 转录本。研究^[5-6]表明, lncRNA 和一些编码蛋白的基因有某些类似的地方,比如都是由 RNA 聚合酶 II 转录复合物转录生成的、大部分序列 5' 端有帽状结构及由内含子和外显子序列组成, lncRNA 在基因组中被广泛转录并在基因调节中起重要作用,但其起源仍然是一个谜。lncRNA 的表达和一系列的人类疾病相关,如癌症和神经系统疾病。lncRNA 参与众多的生命调节活动,从转录干扰、基因印迹和染色体重构到转录激活、X 染色体失活和核转运等^[7]。lncRNA 还参与细胞增殖、分化等活动,与癌症的发生相关^[8-9]。关于 lncRNA 在骨肉瘤的发病机制、疾病诊断及治疗方面的作用仍不清楚。课题组前期通过 lncRNA 芯片发现 lncRNA NCRNA00173 在骨肉瘤组织标本中的表达较癌旁组织明显降低,提示 lncRNA NCRNA00173 可能与骨肉瘤的发生发展相关。本研究通过实时荧光定量 PCR 方法检测 lncRNA NCRNA00173 在骨肉瘤患者癌组织及其对应的癌旁组织标本中的表达情况,并分析其与患者临床病理特征的关系,探讨 lncRNA NCRNA00173 在骨肉瘤诊断及预后评估中的潜在作用。

1 资料与方法

1.1 标本来源

选取 2012 年 1 月至 2016 年 12 月在我院骨科行手术治疗精细切除的 54 例骨肉瘤患者的肿瘤标本及癌旁组织,肿瘤标本病理诊断均证实为骨肉瘤。患者一般资料见表 1。其中男 35 例、女 19 例,年龄 9~50 岁、中位年龄 23.0 岁。肿瘤组织学分型参照 Dahlin 标准:成骨细胞型 23 例,成软骨细胞型 18 例,成纤维细胞型 10 例,混合型 3 例;Enneking 外科分期: I A 期 6 例, I B 期 5 例, II A 期 10 例, II B 期 12 例, III 期 21 例。

所有组织标本都是在术后 30 min 内用液氮保存备用。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。所有患者出院后均随访,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 31 日,至随访截止日,存活病例 24 例,死亡病例 30 例,无失访病例。

1.2 实时荧光定量 PCR 分析 lncRNA NCRNA00173 在骨肉瘤组织中的表达水平

采用 TRIzol (Invitrogen, Grand Island, NY) 方法提取骨肉瘤组织及癌旁组织标本中总 RNA。将提取的总 RNA,参照 AMV 逆转录试剂盒说明逆转录成 cDNA,按照 SYBR Green PCR Master (TaKaRa, 大连宝生生物, 中国) 试剂盒说明书在 Real-time PCR 仪上进行 PCR 扩增,以 GAPDH 作为内参照。lncRNA NCRNA00173 上游引物为 5'-ACCTAGTCTTCCTTG-GCACATC-3', 下游引物为 5'-GGGATATTGATCT-GAAGGGTGA-3'; GAPDH 上游引物为 5'-GTCAAC-GGATTTGGTCTGTATT-3', 下游引物为 5'-AGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3'。PCR 扩增的条件是: 95 °C 10 min, (95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s) × 40 个循环。3 次独立实验后得到的数据采用公式 $RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行计算。

1.3 统计学处理

所有结果均通过 SPSS 13.0 统计软件进行分析。lncRNA NCRNA00173 在癌组织、癌旁组织和正常组织中的差异表达采用 *t* 检验或 One way ANOVA 分析。使用 Chi-Square 检验分析 lncRNA NCRNA00173 的表达与各临床病理参数之间的关系; lncRNA NCRNA00173 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骨肉瘤患者预后的因素。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA NCRNA00173 在骨肉瘤组织中低表达

实时荧光定量 PCR 检测结果(图 1)显示, lncRNA NCRNA00173 在 54 例骨肉瘤组织中的表达水平显著低于癌旁组织(1.793 ± 0.158 vs 5.368 ± 0.285 , $t = 10.96$, $P < 0.01$)。

2.2 lncRNA NCRNA00173 的表达与骨肉瘤患者临床病理特征的关系

分析 lncRNA NCRNA00173 的表达与患者年龄、性别、疾病分期、转移、肿瘤分化水平及患者的生存期的关系,结果(表 1)发现, lncRNA NCRNA00173 的表达与患者的性别、年龄无关(均 $P > 0.05$);与疾病分期、转移、肿瘤分化水平及生存状态明显相关(均 $P < 0.05$)。

2.3 lncRNA NCRNA00173 的表达与骨肉瘤患者生存分析

采用 Kaplan-Meier 法分析 lncRNA NCRNA00173 的表达与患者生存时间的关系,结果发现,高表达 lncRNA NCRNA00173 的患者的 PFS 为 (24.44 ± 3.58) 个月,较低表达者 (12.00 ± 4.32) 个月明显延长,差异有统计学意义($\chi^2 = 52.44$, $P < 0.01$, 图 2A);低表达 lncRNA

NCRNA00173 的患者的 OS 为(20.77±4.92)个月, 较高表达者的(37.00±5.32)个月明显缩短, 差异有统计学意义($\chi^2=42.140, P<0.01$, 图 2B)。

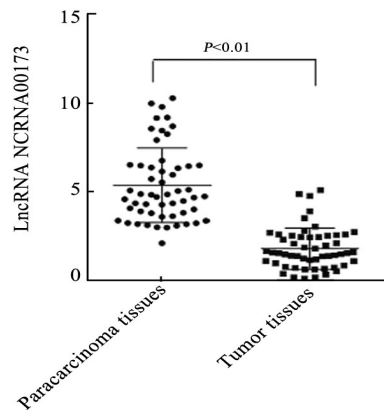


图 1 lncRNA NCRNA00173 在骨肉瘤组织中的表达低于癌旁组织

Fig. 1 Expression of lncRNA NCRNA00173 of osteosarcoma tissues were lower than that of paracarcinoma tissues

表 1 lncRNA NCRNA00173 的表达与骨肉瘤患者临床病理特征的关系(n)

Tab. 1 Relationship of lncRNA NCRNA00173 expression with pathological characteristics of osteosarcoma patients (n)

Characteristic	lncRNA NCRNA00173		χ^2	P
	Low [#]	High [#]		
All cases (N=54)	31	23		
Age (t/a)			0.038	0.846
<23	14	11		
≥23	17	12		
Gender			0.003	0.957
Male	20	15		
Female	11	8		
Differentiation			4.676	0.031
Median/Well	11	15		
Poor	20	8		
Tumor size (d/cm)			0.654	0.419
≥3 cm	15	11		
<3 cm	16	12		
Disease stage			15.722	0.003
I A	2	4		
I B	2	3		
II A	3	7		
II B	5	7		
III	19	2		
Distant metastasis			15.369	<0.01
Yes	19	2		
No	12	21		
Survival status			29.325	<0.01
Survival	4	20		
Death	27	3		

[#]: $2^{-\Delta\Delta Ct} < 1.793$ as low-expression, $2^{-\Delta\Delta Ct} \geq 1.793$ as high-expression

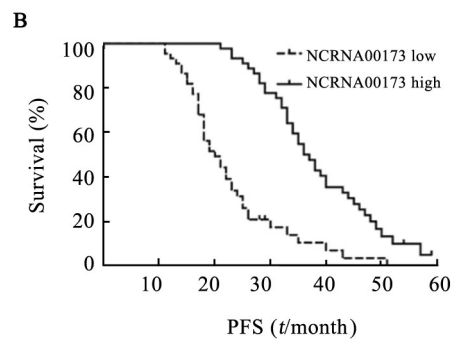
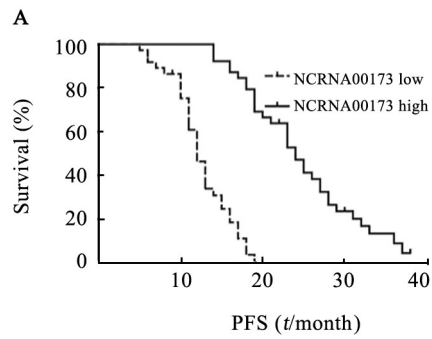


图 2 lncRNA NCRNA00173 的表达与骨肉瘤患者 PFS 及 OS 的关系

Fig. 2 Relationship of lncRNA NCRNA00173 expression with the PFS and OS time in osteosarcoma patients

2.4 预后影响因素

多因素 Cox 回归分析结果(表 2)显示, lncRNA NCRNA00173 的表达、肿瘤分化、转移及临床分期是骨肉瘤患者独立的预后因素。

3 讨论

骨肉瘤是一种起源于间叶组织的恶性肿瘤, 以能产生骨样组织的梭形基质细胞为特征, 是一种病死率及致残率极高的恶性肿瘤, 其具体发病机制目前尚不明确^[10-11]。lncRNA 作为近年来新发现的一类调控型非编码 RNA 成为肿瘤生物学领域中的研究热点, 有报道^[12]提示, lncRNA UCC 通过抑制 miR-143 的表达促进结直肠癌的进展; HOTAIR 通过诱导染色质的重排而促进乳腺癌的转移^[13]。研究^[14]发现, lncRNA 参与调节骨肉瘤的发生发展, lncRNA PANDA 促进骨肉瘤细胞的增殖^[4]; lncRNA EWSAT1 通过抑制 MEG3 的表达促进骨肉瘤细胞的生长和转移^[15]; 上调 lncRNA MF12 的表达可促进骨肉瘤细胞的增殖抑制其凋亡^[16]。lncRNA BCAR4 通过活化 GLI2 依赖的基因转录促进骨肉瘤的进展^[17]。本课题组前期通过 lncRNA 芯片检测发现 lncRNA NCRNA00173 在骨肉瘤组织中的表达较癌旁组织明显降低, 然而关于 lncRNA NCRNA00173 在骨肉瘤中的表达及临床意义

目前国内外尚未见相关报道。本研究通过检测 lncRNA NCRNA00173 在 54 例骨肉瘤组织及癌旁组织标本中的表达, 分析其表达与患者临床病理特征及预后的关系, 结果发现, 与癌旁组织比较, lncRNA NCRNA00173 在骨肉瘤组织标本中的表达明显降低, 其表达与疾病分期、远处转移、肿瘤分化及生存状态明显相关; 而与患者的性别、年龄及肿瘤大小无

关; 此外高表达 lncRNA NCRNA00173 患者的 OS 及 PFS 均较低表达者明显延长; Cox 多因素回归模型分析提示, lncRNA NCRNA00173 的表达、远处转移、肿瘤分化及临床分期是骨肉瘤独立的预后因素。以上研究结果提示, lncRNA NCRNA00173 参与调节骨肉瘤的发生发展, 可作为潜在的骨肉瘤诊断和预后评估的分子标志物。

表 2 COX 多因素分析影响骨肉瘤患者 PFS 和 OS 的预后因素

Tab. 2 Influence prognosis factors of osteosarcoma PFS and OS were analyzed by COX multivariate analysis

Characteristic	PFS			OS		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
Age(<i>t</i> /a) (≥23 vs <23)	1.013	0.609~1.270	0.168	1.016	0.584~1.535	0.183
Gender (Male vs Female)	1.050	0.633~1.803	0.354	1.074	0.615~1.856	0.193
Disease stage (III vs IA~IIB)	3.465	1.733~6.604	0.001	3.570	1.378~6.733	0.001
Distant metastasis (Yes vs No)	3.870	1.680~8.843	0.001	3.075	1.470~6.880	0.001
Differentiation (Poor vs Well/median)	1.960	1.136~3.790	0.031	1.840	1.290~2.830	0.032
lncRNA NCRNA00173 (High vs Low)	5.860	4.973~14.795	<0.001	4.740	2.023~9.970	0.001

[参考文献]

[1] BIELACK S S, HECKER-NOLTING S, BLATTMANN C, et al. Advances in the management of osteosarcoma[J/OL]. *F1000Res*, 2016, 5:2767[2017-03-27]. <https://f1000research.com/articles/5-2767/v1>. DOI:10.12688/f1000research.9465.1.

[2] CHEN N, ZHANG R, KONISHI T, et al. Upregulation of NRF2 through autophagy/ERK 1/2 ameliorates ionizing radiation induced cell death of human osteosarcoma U-2 OS[J/OL]. *Mutat Res*, 2017, 813:10-17[2017-03-27]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383571816300742>. DOI:10.1016/j.mrgentox.2016.11.006.

[3] GIULIA B, DANIELA D P, CHIARA T, et al. The role of mifamurtide in chemotherapy-induced osteoporosis of children with osteosarcoma[J/OL]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2016, [Epub ahead of print] [2017-03-27]. <http://www.eurekaselect.com/148390/article>.

[4] KOTAKE Y, GOTO T, NAEMURA M, et al. Long noncoding RNA PANDA positively regulates proliferation of osteosarcoma cells[J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(1):81-85. DOI:10.21873/anticancer.11292.

[5] CHAUDHARY R, LAL A. Long noncoding RNAs in the p53 network[J/OL]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2016, 8(3): e1410[2017-03-27]. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/wrna.1410/abstract>. DOI:10.1002/wrna.1410.

[6] FAN Y H, YE M H, WU L, et al. BRAF-activated lncRNA predicts gastrointestinal cancer patient prognosis: a meta-analysis[J]. *Oncotarget*, 2016, 8(4):6295-6303. DOI:10.18632/oncotarget.14061.

[7] GUAN G F, ZHANG D J, WEN L J, et al. Overexpression of lncRNA H19/miR-675 promotes tumorigenesis in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Int J Med Sci*, 2016, 13(12): 914-922. DOI:10.7150/ijms.16571.

[8] LI J H, ZHANG S Q, QIU X G, et al. Long non-coding RNA NEAT1 promotes malignant progression of thyroid carcinoma by regulating miRNA-214[J]. *Int J Oncol*, 2016, 50(2): 708-716. DOI: 10.3892/ijo.2016.3803.

[9] MA S, MING Z, GONG A Y, et al. A long noncoding RNA, lincRNA-Tnfaip3, acts as a coregulator of NF-kappaB to modulate inflammatory gene transcription in mouse macrophages[J]. *Faseb J*, 2016, 31(3):1215-1225. DOI:10.1096/fj.201601056R.

[10] LIU B, HUANG Y, SUN Y, et al. Prognostic value of inflammation-based scores in patients with osteosarcoma[J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6: 39862 [2017-03-27]. <https://www.nature.com/articles/srep39862>. DOI:10.1038/srep39862.

[11] LUO Z, LIU M, ZHANG H, et al. Association of circulating miR-125b and survival in patients with osteosarcoma-a single center experience[J]. *J Bone Oncol*, 2016, 5(4): 167-172. DOI:10.1016/j.jbo.2016.06.002.

[12] HUANG F T, CHEN W Y, GU Z Q, et al. The novel long intergenic noncoding RNA UCC promotes colorectal cancer progression by

- sponging miR-143[J/OL]. 2017, 8(5): e2778[2017-03-27]. <https://www.nature.com/cddis/journal/v8/n5/full/cddis2017191a.html>. DOI: 10.1038/cddis.2017.191.
- [13] 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.
- [14] YANG Y, WANG S, LI T. Altered long non-coding RNAs predict worse outcome in osteosarcoma patients: evidence from a meta-analysis[J/OL]. *Oncotarget*, 2017 [Epub ahead of print] [2017-03-27]. [http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path\[\]=16470&pubmed-link-out=1](http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=16470&pubmed-link-out=1). DOI:10.18632/oncotarget.16470.
- [15] SUN L, YANG C, XU J, et al. Long noncoding RNA EWSAT1 promotes osteosarcoma cell growth and metastasis through suppression of me3 expression[J]. *DNA Cell Biol*, 2016, 35(12): 812-818. DOI: 10.1089/dna.2016.3467.
- [16] YIN Z, DING H, HE E, et al. Overexpression of long non-coding RNA MFI2 promotes cell proliferation and suppresses apoptosis in human osteosarcoma[J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(4): 2033-2040. DOI: 10.3892/or.2016.5013.
- [17] CHEN F, MO J, ZHANG L. Long noncoding RNA BCAR4 promotes osteosarcoma progression through activating GLI2-dependent gene transcription[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(10): 13403-13412. DOI:10.1007/s13277-016-5256-y.
- [收稿日期] 2017-02-22 [修回日期] 2017-05-23
[本文编辑] 黄静怡

· 读者·作者·编者·

常见参考文献著录格式示例

1 专著

著录格式: 主要责任者. 题名[文献类型标志]. 其他责任者(例如翻译者). 版本项(1版不著录). 出版地: 出版者, 出版年: 起页—止页.

- [1] ABRAMS W B, BEERS M H, BERKOW R. 默克老年病手册[M]. 陈灏珠, 王赞舜, 刘厚钰, 等. 译. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 22-25.

2 专著析出文献

著录格式: 析出文献主要责任者. 文献题名[文献类型标志]//专著主要责任者. 专著题名. 版本项. 出版地: 出版者, 出版年: 起页—止页.

- [1] WEINSTEIN L, SWARTZ M N. Pathogenic properties of invading microorganisms[M]//SODERMAN W A Jr, SODEMAN W A. Pathologic physiology: mechanisms of disease. Philadelphia: Saunders, 1974: 457-472.

3 期刊文献

著录格式: 主要责任者. 题名[文献类型标志]. 刊名, 出版年, 卷号(期号): 起页—止页. 数字对象唯一标识符.

- [1] NOBLES K N, GUAN Z, XIAO K, et al. The active conformation of beta-arrestin 1: direct evidence for the phosphate sensor in the N-domain and conformational differences in the active states of beta-arrestins 1 and-2[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282 (29): 21370-21381. DOI: 10.1074/jbc.M611483200.

4 专利文献

著录格式: 专利申请者或所有者. 专利题名: 专利国别, 专利号[文献类型标志]. 公告日期或公开日期.

- [1] 钱其军, 李琳芳, 吴红平, 等. 一种多功能免疫杀伤转基因细胞(PiK)、其制备方法及应用: 中国, 2010101496839[P]. 2010-10-14.

5 学位论文

著录格式: 责任者. 题名[文献类型标志]. 学位授予单位所在地: 学位授予单位, 年.

- [1] 曹新广. Cathepsin L和Cystatin B的表达与大肠癌生物学行为的关系[D]. 郑州, 郑州大学, 2007.

6 电子文献

著录格式: 主要责任者. 题名[文献类型标志/文献载体标志]. 刊名, 出版年, 卷号(期号): 起页—止页(更新或修改日期)[引用日期]. 获取和访问路径. 数字对象唯一标识符.

- [1] KALOS M, LEVINE B L, PORTER D L, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia[J/OL]. *Sci Transl Med*, 2011, 3: 95ra73 [2016-06-08]. <http://stm.sciencemag.org/content/3/95/95ra73.long>. DOI: 10.1126/scitranslmed.3002842.
- [2] HOPKINSON A. UNIMARC and metadata: Dublin core[EB/OL]. [1999-12-08]. <http://www.ifla.org/IV/ifla64/138-161e.htm>.