

喉癌患者血浆及组织中长链非编码 RNA 的检测及临床意义

王 剑¹, 崔 翔¹, 李 群², 陈声灿¹, 沈志森^{1,2*}, 郭俊明^{1*}

(1. 宁波大学 医学院, 浙江 宁波 315211; 2. 宁波大学 医学院附属李惠利医院, 浙江 宁波 315041)

摘要: 为研究长链非编码 RNA (Long non-coding RNA, LncRNA) RP11-552E20.1-001 在喉鳞状细胞癌患者血浆和组织中的表达水平及临床价值, 采用实时定量聚合酶链反应(Real-time PCR)方法, 检测 67 例喉癌患者手术前后一周的血浆, 以声带息肉患者血浆作对照, 观察喉癌组织、转移的淋巴结和癌旁正常黏膜组织的表达情况, 分析其与喉癌临床病理学特征的联系, 构建受试者工作特征曲线(Receiver Operating Characteristic Curve, ROC), 探讨其诊断价值. 研究发现, 喉癌患者血浆 LncRNA 表达水平高于声带息肉患者, 且术后较术前显著降低; 喉癌组织中该链表达较癌旁组织上调, 转移的淋巴结比原发病灶表达水平更高; 术前血浆及喉癌组织中该链表达与肿瘤分化程度、淋巴结转移和 TNM 分期显著相关. ROC 曲线下面积为 0.734, 其敏感性为 80.6%, 特异性为 67.2%. 提示该 LncRNA 可能是喉癌诊断的潜在标记物, 并在喉癌的侵袭、转移过程中起重要作用.

关键词: 长链非编码 RNA; RP11-552E20.1-001; 喉鳞状细胞癌; 血浆; 组织

中图分类号: Q279

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2016) 03-0123-05

喉癌是头颈部最常见恶性肿瘤之一, 居呼吸道肿瘤发病率第二位^[1], 且以鳞状细胞癌为主. 手术及术后放疗是喉癌的主要治疗手段. 但部分晚期喉癌患者, 尤其是跨声门型喉癌, 因未早期发现, 造成术后失声、言语障碍及永久造瘘, 甚至复发转移, 严重影响患者的生存率与生存质量. 因此, 早期诊断尤为重要.

长链非编码 RNA (Long non-coding RNA, LncRNA) 是长度大于 200 个核苷酸的调节性非编码 RNA^[2]. 研究表明, LncRNA 在基因转录调节、转录后加工、表观遗传调控、细胞周期调控和细胞分化调控等众多生命活动中起着重要作用^[3]. 近年来越来越多的研究表明, LncRNA 作为致癌或者抑癌基因在多种类型肿瘤发生发展中有重要作用, 尤其是在患者体液(血浆、唾液、尿液和胃液等)中具有特异性 LncRNA 水平的变化^[4-7]. 因此, 探索血浆 LncRNA 能

否成为一种喉癌微创诊断及预后评价的可能标志物尤为重要. 本文检测了 LncRNA (RP11-552E20.1-001) 在喉癌患者手术前后一周血浆、肿瘤组织、转移性淋巴结和癌旁正常组织中表达水平, 并以声带息肉患者的血浆作对照, 探索其临床相关性.

1 材料和方法

1.1 临床资料

以 2009 年 1 月至 2013 年 1 月在李惠利医院耳鼻喉头颈外科住院手术的喉鳞状细胞癌患者作为研究对象, 随机选取 70 例, 剔除 3 例实验时无 PCR 产物结果样本, 得到有效样本 67 例. 以上患者均经 2 位病理医师确诊, 其中男性 63 例, 女性 4 例, 年龄 45~80 岁(中位年龄 62 岁), 高中分化 45 例, 低分化 22 例. TNM 分期^[8]分别为 T₁₋₂N₀M₀ 35 例, T₃₋₄N₁₋₃M₀ 32 例. 经宁波大学附属李惠利医院伦理

收稿日期: 2016-03-25.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 浙江省自然科学基金 (LY14H160003); 宁波市科技创新团队 (2012B82019); 宁波市重大择优委托项目 (2012C5015); 宁波市自然科学基金 (2012A610217); 浙江省医药卫生科技计划项目 (2012ZDA042); 浙江省医药卫生省部培育计划 (2014PYA017).

第一作者: 王剑 (1989-), 男, 浙江台州人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 头颈肿瘤疾病. E-mail: wangjian_nbu@163.com

*通信作者: 沈志森 (1959-), 男, 浙江宁波人, 主任医师, 主要研究方向: 头颈肿瘤疾病. E-mail: szs7216@163.com

委员会批准,并经患者本人同意,术前与术后一周各抽 5 mL 血液样本,并用 67 例声带息肉患者血液标本作对照。同时,取得经病理确定的喉癌组织、转移的淋巴结组织及癌旁正常黏膜组织标本。

1.2 血液及组织处理

已收集的血液样本迅速转入乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA)采血管中,在 4℃ 环境下静置 15~30 min, 4℃, 2 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 吸取上层血浆至冻存管中,置 -80℃ 冰箱中保存待检。组织样本使用 RNA 保存液, -80℃ 保存备用。

1.3 总 RNA 的提取及反转录

取上述血浆和组织,分别使用 TRIzol LS 和 TRIzol 试剂提取总 RNA。总 RNA 样本通过分光光度计(Agilent 2100 Bioanalyzer, Palo Alto, CA)测量浓度,样品在 260/280 nm 吸光度比值为 1.8~2.0,认为提取的 RNA 纯度较满意^[9]。将上述提取的 RNA,根据 GoScript Reverse Transcription (RT) System (Promega, Madison, WI, USA)试剂盒说明书反转录成 cDNA。

1.4 定量聚合酶链反应

取反转录产物,按照 GoTaq qPCR master mix (Promega)试剂盒说明书提供的方法,在 Mx3005P QPCR 仪器(Stratagene, La Jolla, USA)上进行实时荧光定量 PCR 反应。退火温度设置为 58℃,以 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参基因,记录每个孔荧光强度到达设定阈值时的循环数,即 C_t 值。实验重复 3 次,取平均值。所得数据运用 ΔC_t ($\Delta C_t = C_t$ 目的基因 - C_t 内参基因)法分析 LncRNA 的表达水平, ΔC_t 值越小表示该目的基因表达量越高^[5]。RP11-552E20.1-001 和 GAPDH 的引物序列见表 1。

表 1 Real-time PCR 引物信息

基因	引物序列(5'-3')	引物方向
RP11-552E20.1-001	5'-TGCTGTGTCTATATCCTTTGTTC-3'	正向
	5'-CAGTGGTTTTGTCTGTCTTTTC-3'	反向
GAPDH	5'-ACCACTCTCCACCTTTGAC-3'	正向
	5'-TGTTGCTGTAGCCAAATTCGTT-3'	反向

1.5 扩增产物测序

血浆 RP11-552E20.1-001 荧光定量 PCR 产物使用 UNIQ-10 PCR 产物提纯试剂盒处理,由

Invitrogen 公司完成测序。

1.6 统计处理

采用 SPSS 20.0 软件对实时荧光定量 PCR 检测结果进行分析,计量数据以均数±标准差表示。配对的喉癌患者术前/后血浆样本、喉癌组织和癌旁正常黏膜组织表达量数据分析均采用 t 检验;术前血浆和肿瘤组织中 LncRNA 表达水平与患者临床病理特征资料之间的关系分析采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。通过受试者工作特征曲线(ROC)判断血浆 LncRNA (RP11-552E20.1-001)水平在喉癌诊断中的灵敏度和特异度。

2 结果

2.1 LncRNA(RP11-552E20.1-001)在患者血浆中的表达

血浆基因扩增产物测序结果如图 1 所示。喉癌患者术前一周的表达水平为 6.26 ± 4.20 ,而术后一周降低为 9.24 ± 4.37 ($P < 0.01$),如图 2 所示。且喉癌患者术前血浆表达水平较对照组 9.29 ± 2.56 明显升高($P < 0.01$),如图 3 所示。

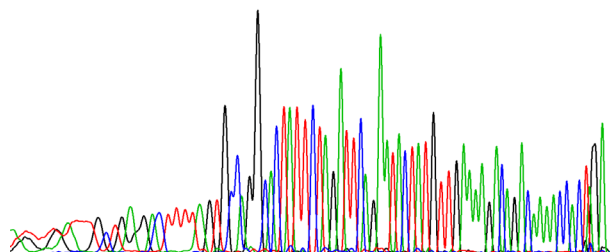


图 1 血浆 LncRNA(RP11-552E20.1-001)测序结果

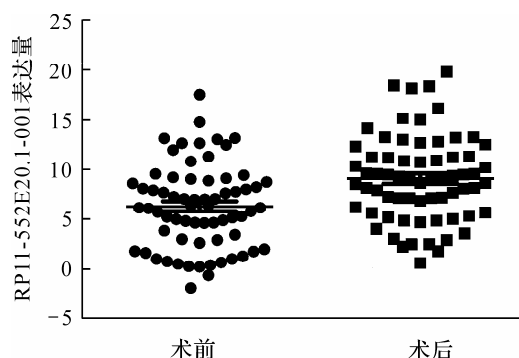


图 2 喉癌患者血浆 LncRNA(RP11-552E20.1-001)表达变化

2.2 LncRNA (RP11-552E20.1-001)在喉癌患者组织中表达

67 例喉癌组织 LncRNA(RP11-552E20.1-001)表达量为 7.97 ± 5.02 ,而配对癌旁正常黏膜组织表

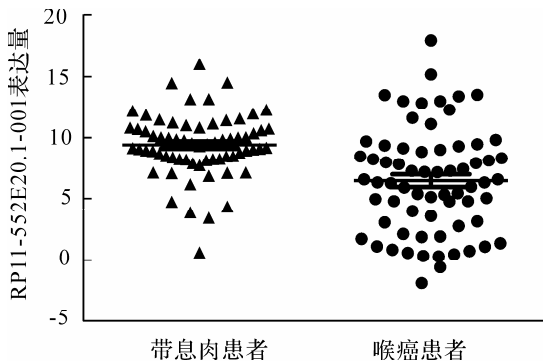


图 3 喉癌患者血浆与声带息肉患者血浆 PCR 结果

达量为 10.38 ± 4.37 , 如图 4 所示, 统计分析表明其差异具有显著的统计学意义($P < 0.01$). 同时, 32 例转移的颈部淋巴结与原发病灶比较差异显著($P < 0.01$), 如图 5 所示.

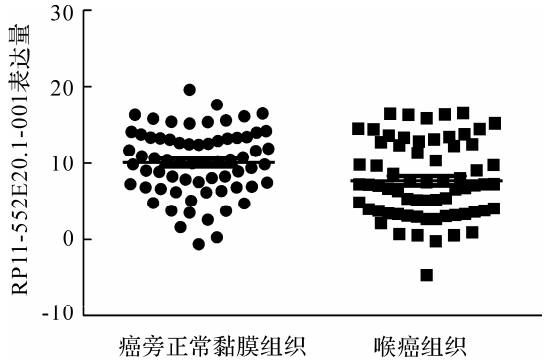


图 4 喉癌组织与癌旁正常黏膜组织 PCR 结果

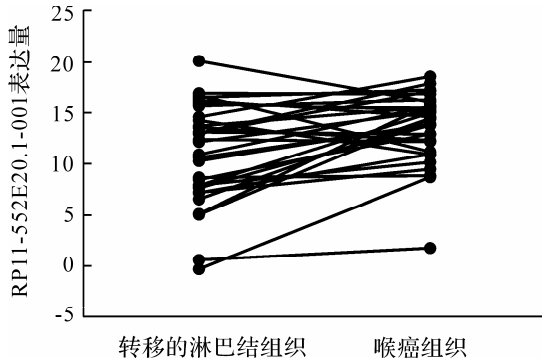


图 5 喉癌组织与转移的淋巴结组织 PCR 结果

2.3 RP11-552E20.1-001 表达与喉癌患者的临床特征

t 检验结果表明, 术前血浆 RP11-552E20.1-001 的表达水平与喉癌患者年龄、性别、吸烟和肿瘤部位等因素之间无明显相关性($P > 0.05$, 表 2). 而与肿瘤细胞分化程度($P = 0.043$)、有无淋巴结转移($P = 0.021$)及临床分期($P = 0.038$)相关. 同时发现, 在组织中, 喉癌组织 RP11-552E20.1-001 的表达水平与

喉癌患者年龄、性别、吸烟和肿瘤部位等因素之间无明显相关性($P > 0.05$, 表 3), 而与肿瘤细胞分化程度($P = 0.016$)、有无淋巴结转移($P = 0.021$)和临床分期($P = 0.003$)有关. ROC 曲线下面积为 0.734 (95% CI 为 0.645~0.823), 其敏感性为 80.6%, 特异性为 67.2%, 如图 6 所示.

表 2 术前血浆 RP11-552E20.1-001 表达与喉癌患者临床病理特征之间的关系

项目	患者特征	例数/例	RP11-552E20.1-001	P 值
年龄	≥ 60 岁	33	6.90 ± 4.34	0.314
	< 60 岁	34	5.79 ± 4.17	
性别	男	63	6.51 ± 4.25	0.310
	女	4	3.72 ± 4.64	
吸烟史	有	49	6.52 ± 4.07	0.476
	无	18	5.65 ± 5.48	
肿瘤部位	声门上型	52	5.99 ± 4.62	0.343
	声门型	15	7.33 ± 3.23	
肿瘤细胞分化程度	中高分化	45	6.18 ± 4.53	0.043
	低分化	22	7.42 ± 2.43	
淋巴结转移	N0	35	6.14 ± 4.43	0.021
	N1-N3	32	6.83 ± 4.01	
	Tis/T1-T2	35	6.39 ± 4.17	
T 分期	T3-T4	32	6.38 ± 4.47	0.874
	O/I/II	29	6.44 ± 4.41	
TNM 分期	III/IV	38	6.34 ± 4.20	0.038

表 3 组织 RP11-552E20.1-001 表达与喉癌患者临床病理特征之间的关系

项目	患者特征	例数/例	RP11-552E20.1-001	P 值
年龄	≥ 60 岁	33	9.41 ± 4.40	0.054
	< 60 岁	34	11.31 ± 4.20	
性别	男	63	10.22 ± 3.97	0.165
	女	4	12.92 ± 9.20	
吸烟史	有	49	10.89 ± 3.92	0.201
	无	18	8.97 ± 5.29	
肿瘤部位	声门上型	52	10.65 ± 4.43	0.256
	声门型	15	12.91 ± 3.11	
肿瘤细胞分化程度	中高分化	45	10.76 ± 4.21	0.016
	低分化	22	7.92 ± 4.85	
淋巴结转移	N0	35	11.02 ± 4.82	0.021
	N1-N3	32	9.79 ± 3.89	
	Tis/T1-T2	35	10.00 ± 4.31	
T 分期	T3-T4	32	10.84 ± 4.48	0.329
	O/I/II	29	10.84 ± 4.55	
TNM 分期	III/IV	38	9.78 ± 4.12	0.003

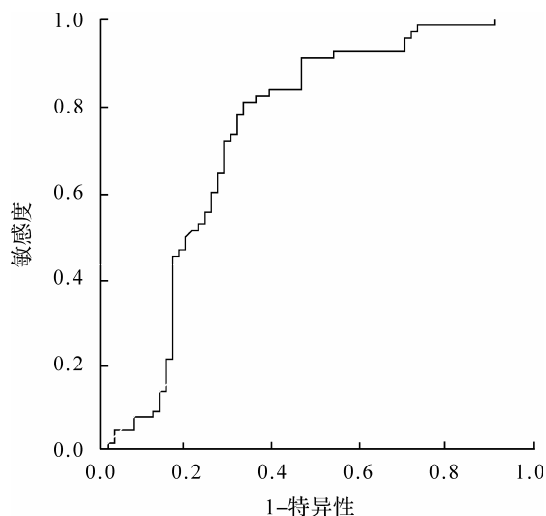


图6 ROC 曲线

3 讨论

肿瘤的早期诊断通常认为是提高肿瘤疗效的重要手段,因此寻找便捷有效的早期诊断标记物非常必要.文献[9]通过 LncRNA 芯片表达谱发现,在喉癌组织中有 684 种 LncRNAs 上调,747 种 LncRNAs 下调,并通过 RT-PCR 大样本确认 2 条显著异常表达的 LncRNA(AC026166.2-001 和 RP11-169D4.1-001)在喉癌组织中呈现低表达水平,且与肿瘤进展及预后密切相关,其 ROC 曲线下面积分别为 0.65 和 0.67.因此,一些异常表达的 LncRNA 有可能成为喉癌肿瘤诊断及预后的分子标志物.

许多研究表明, LncRNA 在血液中具有高稳定性,同时 LncRNA 可以通过包被在微粒(外泌体、微泡和凋亡小体)中,避免被血液当中核糖核酸酶降解^[10-11].而通过使用 PCR 技术进行基因扩增可以在患者体液中捕捉到 LncRNA 水平变化.据文献[12]报道,长链非编码 RNA HOTAIR 稳定存在于喉癌患者血浆外泌体中,且患者血浆 HOTAIR 水平高于声带息肉病人,但其特异性并不高(57.1%).为进一步探究血液 LncRNA 在喉癌早期诊断中的意义,本研究挑选了 LncRNA 芯片中高(5.80±2.44)倍表达的 RP11-552E20.1-001 作为研究对象,它是 6 号染色体反义链上基因 ENSG00000227131 (40,271,566-40,276,237)的转录产物,其长度为 539 bp,并且被 Ensembl Genes 数据库标注为长链基因间非编码 RNA.本实验运用 RT-PCR 技术进一步检测喉癌患者术前、术后血浆、

声带息肉患者血浆、喉癌组织、转移性淋巴结和癌旁正常黏膜组织的表达情况,探讨血浆非编码 RNA 基因诊断喉癌的可行性.

研究结果发现,喉癌患者术前血浆 LncRNA (RP11-552E20.1-001)显著高于声带息肉患者,并且喉癌术后一周血浆中有 71.6%的下调.这一现象说明手术作为喉癌的主要治疗方式之一发挥了重要作用,同时 LncRNA(RP11-552E20.1-001)在术后水平明显降低,预期该链可能在喉癌患者术后疗效评估中有一定的临床价值.癌旁组织中 LncRNA (RP11-552E20.1-001)表达量低于癌组织,且癌组织低于转移的淋巴结组织,提示该链表达水平与肿瘤远处转移风险呈正相关.同时,血液和组织样本 LncRNA(RP11-552E20.1-001)表达水平与喉癌患者肿瘤细胞分化程度、淋巴结转移和临床分期存在相关性,尤其在低分化(G3)、淋巴结转移以及 III/IV 期喉癌患者血液和组织中呈现高水平.因此, LncRNA(RP11-552E20.1-001)不仅可能在肿瘤发生过程中起作用,而且可能参与肿瘤侵袭与转移过程.敏感性和特异性可能表明该长链血浆与组织检测喉癌具有一定潜在应用价值,但其参与喉癌生物学行为的机制尚需进一步研究,揭示其在喉癌中的生物学功能,将为喉癌的基因治疗提供新的治疗靶点.

参考文献:

- [1] DU L, LI H, ZHU C, et al. Incidence and mortality of laryngeal cancer in China, 2011[J]. Chin J Cancer Res, 2015, 27(1):52-58.
- [2] YANG Q Q, DENG Y F. Long non-coding RNAs as novel biomarkers and therapeutic targets in head and neck cancers[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(4):1286-1292.
- [3] QI P, DU X. The long non-coding RNAs, a new cancer diagnostic and therapeutic gold mine[J]. Mod Pathol, 2013, 26(2):155-165.
- [4] TANG H, WU Z, ZHANG J, et al. Salivary LncRNA as a potential marker for oral squamous cell carcinoma diagnosis[J]. Mol Med Rep, 2013, 7(3):761-766.
- [5] TONG Y S, WANG X W, ZHOU X L, et al. Identification of the long non-coding RNA POU3F3 in plasma as a novel biomarker for diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma[J]. Mol Cancer, 2015, 14(1):3-10.
- [6] RIVAS A, BURZIO V, LANDERER E, et al.

- Determination of the differential expression of mitochondrial long non-coding RNAs as a noninvasive diagnosis of bladder cancer[J]. BMC Urology, 2012, 12(1):1-8.
- [7] SHAO Y, YE M, JIANG X, et al. Gastric juice long noncoding RNA used as a tumor marker for screening gastric cancer[J]. Cancer, 2014, 120(21):3320-3328.
- [8] EDGE S B, COMPTON C C. The american joint committee on cancer: The 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM[J]. Annals of Surgical Oncology, 2010, 17(6):1471-1474.
- [9] SHEN Z, LI Q, DENG H, et al. Long non-coding RNA profiling in laryngeal squamous cell carcinoma and its clinical significance: Potential biomarkers for LSCC[J]. PLoS One, 2014, 9(9):108-113.
- [10] SPRINGER N L, SMITH E, BROOKS M B, et al. Flow cytometric detection of circulating platelet-derived microparticles in healthy adult horses[J]. Am J Vet Res, 2014, 75(10):879-885.
- [11] HUANG X, YUAN T, TSCHANNEN M, et al. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing[J]. BMC Genomics, 2013, 14(1):1-14.
- [12] WANG J, ZHOU Y, LU J, et al. Combined detection of serum exosomal miR-21 and HOTAIR as diagnostic and prognostic biomarkers for laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Med Oncol, 2014, 31(9):513-518.

Detection of Long Non-Coding RNAs in Plasma and Tissues with Larynx Squamous Cell Carcinoma and its Clinical Significance

WANG Jian¹, CUI Xiang¹, LI Qun¹, CHEN Sheng-can¹, SHEN Zhi-sen^{1,2*}, GUO Jun-ming^{1*}

(1. Medical School, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. The Affiliated Lihuili Hospital of Medical School of Ningbo University, Ningbo 315041, China)

Abstract: This paper contributes to investigating LncRNA (RP11-552E20.1-001) expression level in patients' plasma and tissues with larynx squamous cell carcinoma (LSCC), and to determining its clinical significance. Using real-time quantitative PCR, 67 cases of preoperative and postoperative one-week of LSCC plasma samples, the vocal cord polyp patients' plasma, LSCC tissues, metastatic lymph nodes and adjacent normal laryngeal mucosa are tested for quantitative analysis of RP11-552E20.1-001. The relationship between the expression of LncRNA (RP11-552E20.1-001) and clinicopathological features is analyzed. A receiver constructing the characteristic (ROC) curve is rendered to check the diagnostic value. It is found that the levels of RP11-552E20.1-001 expression are significantly higher in LSCC patients' plasma than the control, and they decrease notably after the operation compared with the preoperative levels. The relative expression of LncRNA (RP11-552E20.1-001) in LSCC tissues is significantly higher than that in adjacent tissues, and metastatic lymph nodes has the higher expression of LncRNA relative to primary lesion. The expression of LncRNA also shows the significant correlation with tumor differentiation, lymph node metastasis and TNM staging in preoperative plasma and LSCC tissues. The area under the ROC curve accounts up to 0.734. Its sensitivity and specificity are found to be 80.6% and 67.2%, respectively. LncRNA (RP11-552E20.1-001) may be a potential marker for the diagnosis of laryngeal cancer and play an important role in the invasion and metastasis of LSCC.

Key words: LncRNA; RP11-552E20.1-001; larynx squamous cell carcinoma; plasma; tissues

(责任编辑 史小丽)