

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.10.008

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2016.10.008

长链非编码RNAuc.339在非小细胞肺癌中的表达及临床意义

蒋记心¹, 顾学文¹, 肖芹¹, 郝多男², 耿艳鸣³

(1. 江苏省苏北人民医院病理科, 江苏 扬州 225001; 2. 扬州大学, 江苏 扬州 225001;

3. 江苏省苏北人民医院呼吸科, 江苏 扬州 225001)

[摘要] 目的: 分析uc.339在非小细胞肺癌中的表达及其与临床病理特征的关系。方法: 非小细胞肺癌新鲜标本及其癌旁肺组织各30例, 提取总RNA, 采用实时定量PCR方法检测uc.339在非小细胞肺癌组织及其癌旁肺组织中的表达, 分析差异性及其与临床病理特征的关系。癌性胸腔积液及非癌性胸腔积液各20例, 离心沉淀, 提取总RNA, 采用实时定量PCR方法检测uc.339在癌性胸腔积液及非癌性胸腔积液中的表达; 免疫组织化学检测P53在非小细胞肺癌中的表达。结果: uc.339在非小细胞肺癌组织中的表达低于癌旁肺组织($P < 0.05$), 与临床分期有相关性($P < 0.05$), 与p53的表达呈负相关($P < 0.05$), 而与肿瘤病理类型、年龄、性别无明显相关性($P > 0.05$); uc.339在癌性胸腔积液中的表达低于非癌性胸腔积液($P < 0.05$)。结论: uc.339可能作为一种抑癌因子作用于非小细胞肺癌的发生、发展中, 其作用机制可能与p53信号通路有关, 在作为肿瘤标志物、判断预后及靶向治疗等方面具有应用价值。

[关键词] 非小细胞肺癌; 长链非编码RNA; 超保守序列

Expression and clinical significance of long non-coding RNA uc.339 in non-small cell lung cancer

JIANG Jixin¹, GU Xuewen¹, XIAO Qin¹, YU Duonan², GENG Yanming³

(1. Department of Pathology, Northern Jiangsu People's Hospital, Yangzhou Jiangsu 225001; 2. Yangzhou University, Yangzhou Jiangsu 225001; 3. Department of Respiratory, Northern Jiangsu People's Hospital, Yangzhou Jiangsu 225001, China)

Abstract **Objective:** To investigate the expression of uc.339 and its association with clinicopathologic features in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods:** The total RNA in 30 fresh specimens of NSCLC and the adjacent normal lung tissues were extracted respectively. The expressions of uc.339 in the tissues were detected by real-time quantitative PCR. The difference and its relationship with clinicopathological features were analyzed. The total RNA in the centrifugation precipitation of 20 specimens of NSCLC pleural effusions and 20 specimens of non-cancer pleural effusions were extracted respectively. The expressions of uc.339 were detected by real-

收稿日期 (Date of reception): 2016-07-14

通信作者 (Corresponding author): 耿艳鸣, Email: gengyanming2005@163.com

基金项目 (Foundation item): 江苏省苏北人民医院科研基金项目资助 (yzucms201427)。This work was supported by Northern Jiangsu People's Hospital Science and Research Project Foundation (yzucms201427), P. R. China.

time quantitative PCR. Expressions of P53 in NSCLC tissues were detected by immunohistochemistry. **Results:** The expression level of uc.339 in NSCLC tumor tissues was much lower than that in the normal tissues ($P < 0.05$), which was significantly correlated with clinical stage ($P < 0.05$), while was not associated with the histological type, age and gender of the patients ($P > 0.05$). A strongly negative correlation was observed between uc.339 and p53 expression ($P < 0.05$). The expression level of uc.339 in malignant pleural effusions was significantly lower than that in the benign pleural effusions ($P < 0.05$). **Conclusion:** uc.339 might act as an anti-oncogene in NSCLC, its mechanism may be related to p53 signaling pathways. uc.339 plays a role in tumor makers, prognosis and target therapy.

Keywords non-small cell lung cancer (NSCLC); long non-coding RNA; transcribed ultraconserved regions

肺癌是最常见的肺原发性恶性肿瘤, 近50多年来, 其发病率迅速上升, 已居我国恶性肿瘤首位, 其病因至今尚不完全明确。Bejerano等^[1]早在2004年对大鼠、小鼠及人类的基因组进行了生物信息学的研究对比, 发现481个100%一致的DNA序列, 即超保守区(ultraconserved regions, UCRs)。人类大部分UCR可以转录, 其产物称为超保守转录子(transcribed ultra-conserved regions, T-UCRs), 是一种超保守RNA。已有研究^[2]显示, 多种T-UCRs在慢性淋巴细胞性白血病、结直肠癌、肝癌等组织中与其在相应正常组织中的表达具有显著差异性。有基因微阵列资料中显示uc.339在肺组织中表达水平较高^[2], 但尚未有研究加以进一步验证。本文通过检测其在肺癌组织与癌旁肺组织中及在癌性胸腔积液与非癌性胸腔积液中的表达, 分析其差异性及其与临床病理特征的关系, 探讨其在肺癌发生发展过程中的作用以及其在作为肿瘤标志物、判断预后及靶向治疗等方面的应用价值。

1 资料与方法

1.1 临床资料

本研究随机选取扬州大学临床医学院2014年7月至2015年12月间30例手术切除非小细胞癌组织及癌旁肺组织新鲜标本、20例癌性胸腔积液及20例非癌性胸腔积液。所选患者术前均未行放疗和化疗等治疗。样本采集、使用及临床资料的收集均经苏北人民医院伦理委员会批准。病理组织学类型: 腺癌22例, 鳞状细胞癌8例; 年龄41~73岁, 中位年龄58岁, 男性12例, 女性18例。TNM分期: I A期2例, I B期4例, II A期6例, II B期5例, III A期7例, III B期5例, IV期1例; 癌性胸腔积液20例均取自原发肺非小细胞癌患者, 腺癌19例, 鳞状细胞癌1例, 非癌性胸腔积液20例取自结核性胸膜炎及心衰、肝硬化等患者。30例新鲜标本新鲜

结肺癌组织及癌旁肺组织, 离体30 min内迅速取材置于无RNA酶的EP管, 立即置于液氮, 及时转移入-80℃冰箱备用。20例癌性胸腔积液及20例非癌性胸腔积液标本收集后离心沉淀, 收集沉渣, 存于-80℃冰箱备用。

1.2 试剂与仪器

Trizol等提取RNA所用试剂购于Invitrogen公司; 反转录试剂盒, 实时荧光定量PCR试剂盒购于大连Takara公司; 生物分光光度仪购于德国Eppendorf公司; ABI7500实时荧光定量PCR仪购自美国Applied Biosystems公司; 免疫组化试剂购自北京中杉公司。在UCSC GENENOME BROWSER中检索到uc.339+序列如下: 5'-CAGGCACACCCC GGCCGGCGATAAAAACCGCCGCTGAAAGCCCA CGGAGCAATTTCCCGGGACCCCGAGCGACGC CATTACAGGAATGTAATTTTGCCCGGATGAGGC CCCGAGTTTAATTATCCTCGCGGAGGAATTTT AATGCGGCCAATCCATCTTGCAGGCGGGCGGC AGAGGGATTATATGGGCCCGTTATTTTCACACC GATCCTCCATCTGCATTTTTATGGCCCTGAGCT CCTGAAAGGGAGGG-3'。

uc.339及内参18SrRNA在Real time-PCR仪扩增的引物由泰州芯超医学检验所公司合成, 序列如下: uc.339上游引物5'-AGCG ACGCCATTACAGGAAT-3', uc.339下游引物5'-ATGGAGGATCGGTGTGAAAT-3', 18SrRNA上游引物5'-TATGGTTCCCTTTGGTCGCTC-3', 18SrRNA下游引物5'-GATCTGATAAATGCACGCAT-3'。

1.3 方法

1.3.1 总RNA提取

将冷冻组织置于研钵内用研磨棒研磨成粉末状(所有用到的器械经DEPC水浸泡过夜, 使用前30 min干冰预冷), 用匙收集入1.5 mL EP管中, 提取总RNA, 测定RNA浓度及纯度, OD 260/280值

在1.8~2.0之间。

1.3.2 反转录生成 cDNA

使用RNA反转录试剂盒, 总反应体系10 μ L, 按说明书进行。

1.3.3 Real time-PCR 检测uc.339的表达

使用RT-PCR试剂盒, 总反应体系20 μ L, 按说明书进行。

每个样本设3个复孔, 以18SrRNA为内参来校正PCR模板的拷贝数; 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算。如下所示: $\Delta Ct = Ct_{uc.339} - Ct_{18SrRNA}$ 。新鲜标本 $\Delta\Delta Ct_{uc.339} = \text{非小细胞肺癌组织}(Ct_{uc.339} - Ct_{18SrRNA}) - \text{癌旁肺组织}(Ct_{uc.339} - Ct_{18SrRNA})$ 胸腔积液标本 $\Delta\Delta Ct_{uc.339} = \text{癌性胸腔积液}(Ct_{uc.339} - Ct_{18SrRNA}) - \text{非癌性胸腔积液}(Ct_{uc.339} - Ct_{18SrRNA})$ 。

1.3.4 免疫组织化学 Envision 二步法检测 p53 在肺癌组织中的表达

具体步骤按说明书进行。结果判读: 棕黄色颗粒状着色定位于细胞核, 随机选取10个高倍镜视野($\times 400$), 以阳性细胞比例 $\leq 10\%$ 判读为阴性,

>10%判读为阳性。

1.4 统计学处理

实验数据以用($\bar{x} \pm s$)表示, 采用SPSS17.0统计软件分析, 配对资料间的比较采用配对t检验法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, $P > 0.05$ 表示差异无统计学意义。

2 结果

2.1 uc.339在非小细胞肺癌中的相对表达(图1)

非小细胞肺癌组织中uc.339的表达低于其在癌旁肺组织中的表达, 癌性胸腔积液中uc.339的表达低于其在非癌性胸腔积液中的表达, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 p53在非小细胞肺癌中的表达(图2)

p53在癌细胞的表达定位于细胞核, 呈棕黄色颗粒状着色, 阳性细胞数量比例>10%。

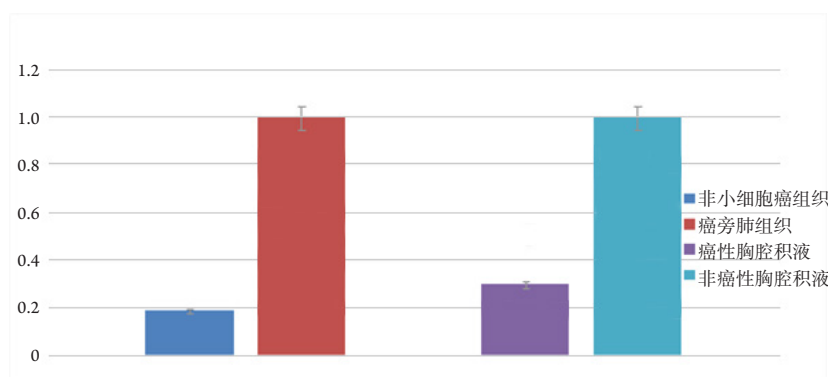


图1 uc.339在非小细胞癌中的相对表达

Figure 1 Expression of uc.339 in non-small cell lung cancer (NSCLC)

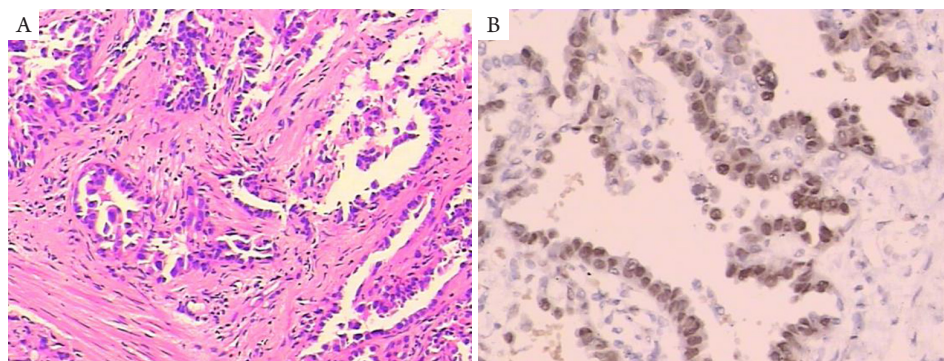


图2 p53在非小细胞癌中的表达

Figure 2 Expression of p53 in non-small cell lung cancer (NSCLC)

(A) HE, $\times 200$; (B) 免疫组织化学染色, Envision二步法, $\times 200$ 。

(A) HE, $\times 200$; (B) immunohistochemistry, Envision two footwork, $\times 200$.

2.3 uc.339在非小细胞肺癌中的表达与临床病理特征的关系(表1)

在30例非小细胞肺癌患者的癌组织中, uc.339的表达与临床分期有关($P < 0.05$), 与p53的表达呈负相关($P < 0.05$), 而与肿瘤病理类型、年龄、性别无明显相关性($P > 0.05$)。

表1 uc.339在非小细胞肺癌中的表达与临床病理特征的关系($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Relationships between uc.339 expression and the clinicopathologic features of NSCLC patients ($\bar{x} \pm s$)

临床参数	例数	uc.339的相对表达	P
性别			>0.05
男	12	2.38 ± 0.21	
女	18	2.42 ± 0.26	
年龄			>0.05
<50	13	2.41 ± 0.24	
>50	17	2.39 ± 0.23	
病理类型			>0.05
腺癌	21	2.50 ± 0.29	
鳞状细胞癌	9	2.47 ± 0.25	
临床分期			<0.05
I + II	17	2.66 ± 0.09	
III + IV	13	2.07 ± 0.05	
P53表达			<0.05
阳性	20	1.93 ± 0.07	
阴性	10	2.52 ± 0.11	

3 讨论

随着长链非编码RNA及miRNA研究的越来越深入, 各种肿瘤包括非小细胞肺癌的发生发展的机制越来越多地在分子水平上被阐释, 对临床诊断及靶向治疗等提供了理论基础^[3-5]。

在慢性淋巴细胞性白血病、结直肠癌、肝细胞癌^[2,6]、神经母细胞瘤^[7-8]、前列腺癌^[9-11]、胰腺癌^[12]等人类肿瘤中发现多种T-UCRs等明显高表达或低表达。有基因芯片资料显示, 肺组织内uc.339、uc.167、uc.282、uc.398表达水平较高, 其中uc.339表达最高^[2]。本研究通过实时定量PCR的方法检测其在非小细胞肺癌组织与癌旁肺组织中的表达, 发现了两种组织中的表达具有明显差异, 并分析了其与临床病理特征的关系。同时用免疫组织化学的方法检测了p53在非小细胞肺癌组织与癌旁肺

组织两种组织中的表达, 发现uc.339的表达与p53的表达呈负相关, 提示其作用机制可能与p53信号通路有关, 二者可能共同作用于非小细胞肺癌的发生发展中。本文中同时检测了uc.339在非小细胞肺癌患者的胸腔积液及非癌性患者的胸腔积液中的表达, 发现其表达差异性与在新鲜组织中表达具有一致性, 可作为肿瘤标志物应用于非小细胞肺癌的诊断、判断预后及靶向治疗等方面。

本研究中, 在新鲜标本中由于癌组织中除癌细胞之外, 肿瘤间质成分复杂, 如实验条件允许, 用DNA纯化试剂盒消除基因组DNA的干扰, 结果将更加客观、准确。非小细胞癌患者的胸腔积液出现血性胸腔积液的情况时有发生, 对于此类含红细胞较多的胸腔积液标本, 需用冰醋酸去除红细胞后进行相关检测, 但此处理过程对最终检测结果的影响尚不完全明确。在癌性胸腔积液与非癌性胸腔积液的表达对比中, 其表达差异稍低于在新鲜非小细胞癌组织与癌旁肺组织的表达差异, 可能与癌细胞脱落入胸腔内的数量及胸腔积液中较多的间皮细胞及炎细胞等因素有关。本例在胸腔积液中的研究对象为胸腔积液离心沉渣, 接下来可研究其在胸腔积液中的整体表达情况, 使检测过程更简便, 其作为肿瘤标志物的临床意义更大, 更适合将其应用于临床样本的常规检测。另外, 由于实验时间及经费限制, 标本来源不足, 样本数量仍然相对偏少, 实验数据需要更大的标本量的进一步检验, 并可进一步研究其在石蜡包埋组织内的表达情况。

T-UCRs的失调普遍存在于人类癌症中, T-UCRs与miRNA之间存在大量互补序列, 提示二者具有相互作用。Calin^[2]、Scaruffi^[7]等发现在白血病及神经母细胞瘤中, 发现多组T-UCR: miRNA作用关系对。有文献^[2]显示, 在慢性淋巴细胞白血病中, 本文所研究的uc.339与hsa-miR-17-5p、hsa-miR-140、hsa-let-7d等microRNA存在相互作用, 由于实验条件及实验时间的限制, 本研究中未对相关microRNA等进行检测, 在非小细胞肺癌及其他肿瘤中二者表达的相关性及相关作用机制有待进一步研究。

T-UCRs位于肿瘤相关区域, 目前非小细胞肺癌的治疗主张个体化、靶向治疗, 提高低表达的T-UCRs或者下调过表达的T-UCRs可能会改变非小细胞肺癌的表型。具有确切功能的T-UCRs及UCR的甲基化可以辅助传统化疗, 甚至发现一种新的靶向治疗途径, 治疗前后的T-UCRs的表达变化

可作为治疗疗效的判断指标。随着在人类疾病中 miRNA 的研究^[13]越来越深入, 对 T-UCRs 的研究可能会进一步阐释 miRNA 的作用机制, 甚至在肿瘤的发生发展过程中可能起到更加核心的作用。

综上, uc.339 可能作为一种抑癌因子作用于非小细胞肺癌的发生、发展中, 作用机制可能与 p53 信号通路有关, 在判断预后、靶向治疗及作为肿瘤标志物方面具有潜在应用价值。

参考文献

1. Bejerano G, Pheasant M, Makunin I, et al. Ultraconserved elements in the human genome[J]. *Science*, 2004, 304(5675): 1321-1325.
2. Calin GA, Liu CG, Ferracin M, et al. Ultraconserved regions encoding ncRNAs are altered in human leukemias and carcinomas[J]. *Cancer Cell*, 2007, 12(3): 215-229.
3. 张磊, 肇毅. lncRNA 与非小细胞肺癌[J]. *中国肿瘤外科杂志*, 2015, 7(3): 192-195.
ZHANG Lei, ZHAO Yi. lncRNA and non-small cell lung cancer[J]. *Chinese Journal of Surgical Oncology*, 2015, 7(3): 192-195.
4. Ricciuti B, Mencaroni C, Paglialunga L, et al. Long noncoding RNAs: new insights into non-small cell lung cancer biology, diagnosis and therapy[J]. *Med Oncol*, 2016, 33(2): 18.
5. 何丹, 段朝军. 长链非编码 RNA 在肿瘤研究中的进展[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2012, 32(4): 297-301.
HE Dan, DUAN Chaojun. Progress with long non-coding RNA in cancer research[J]. *Journal of International Pathology and Clinical Medicine*, 2012, 32(4): 297-301.
6. Braconi C, Valeri N, Kogure T, et al. Expression and functional role of a transcribed noncoding RNA with an ultraconserved element in hepatocellular carcinoma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(2): 786-791.
7. Scaruffi P, Stigliani S, Moretti S, et al. Transcribed-Ultra Conserved Region expression is associated with outcome in high-risk neuroblastoma[J]. *BMC Cancer*, 2009, 9: 441.
8. Mestdagh P, Fredlund E, Pattyn F, et al. An integrative genomics screen uncovers ncRNA T-UCR functions in neuroblastoma tumours[J]. *Oncogene*, 2010, 29(24): 3583-592.
9. Hudson RS, Yi M, Volfovsky N, et al. Transcription signatures encoded by ultraconserved genomic regions in human prostate cancer[J]. *Mol Cancer*, 2013, 12: 13.
10. Bao BY, Lin VC, Yu CC, et al. Genetic variants in ultraconserved regions associate with prostate cancer recurrence and survival[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22124.
11. Goto K, Ishikawa S, Honma R, et al. The transcribed-ultraconserved regions in prostate and gastric cancer: DNA hypermethylation and microRNA-associated regulation[J]. *Oncogene*, 2016, 35(27): 3598-3606.
12. Jiang J, Azevedo-Pouly AC, Redis RS, et al. Globally increased ultraconserved noncoding RNA expression in pancreatic adenocarcinoma[J]. *Oncotarget*, 2016, Epub ahead of print.
13. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(11): 857-866.

本文引用: 蒋记心, 顾学文, 肖芹, 郁多男, 耿艳鸣. 长链非编码 RNAuc.339 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义[J]. *临床与病理杂志*, 2016, 36(10): 1505-1509. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.10.008

Cite this article as: JIANG Jixin, GU Xuwen, XIAO Qin, YU Duonan, GENG Yanming. Expression and clinical significance of long non-coding RNA uc.339 in non-small cell lung cancer[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2016, 36(10): 1505-1509. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.10.008