

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.01.004

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.01.004>

LncRNA MALAT1在EGFR突变相关肺癌中的表达与临床意义

金善丰¹, 廖锦容², 陈增², 陈宝珍¹, 许春伟¹, 林贤东²

(福建省肿瘤医院, 福建医科大学附属肿瘤医院 1. 病理科分子病理研究室;
2. 放射生物学及肿瘤放射治疗研究室, 福州 350014)

[摘要] 目的: 探讨长链非编码RNA MALAT1在EGFR突变肺癌中的表达及其临床意义。方法: 收集福建省肿瘤医院2015年6月到2018年6月进行外科手术的47例非小细胞肺癌病例(癌组织和癌旁组织), 通过实时荧光定量PCR分析lncRNA MALAT1表达情况, 通过多因素分析, 研究lncRNA MALAT1表达对肺癌发生发展影响。分析EGFR基因突变情况, 探讨lncRNA MALAT1与EGFR基因突变的相关性及其在肺癌中的意义。结果: 肺癌病例中癌组织的lncRNA MALAT1表达量高于癌旁组织($P=0.0263$), lncRNA MALAT1表达量与淋巴结转移有显著相关($P=0.0275$); lncRNA MALAT1表达量与EGFR突变无相关。结论: LncRNA MALAT1可能作为原癌基因, 参与肺癌的发生发展, lncRNA MALAT1与肿瘤转移有密切关系, 可能作为肺癌预后判断指标。

[关键词] 肺癌; EGFR基因; 长链非编码RNA; MALAT1

Expression and clinical significance of lncRNA MALAT1 in EGFR mutation-related lung cancer

JIN Shanfeng¹, LIAO Jinrong², CHEN Zeng², CHEN Baozhen¹, XU Chunwei¹, LIN Xiandong²

(1. Molecular Pathology Laboratory, Department of Pathology; 2. Laboratory of Radiation Oncology and Radiobiology, Fujian Cancer Hospital, Fujian Medical University Cancer Hospital, Fuzhou 350014, China)

Abstract **Objective:** To investigate the expression of long-chain non-coding RNA (lncRNA) MALAT1 in EGFR mutation lung cancer and its clinical significance. **Methods:** We collected 47 cases of non-small cell lung cancer, and analyse the expression of lncRNA MALAT1 by real-time fluorescence quantitative PCR, through multivariate analysis, to study the effect of lncRNA MALAT1 expression on the occurrence and development of lung cancer. We analyzed of EGFR gene mutation, to explore the correlation between lncRNA MALAT1 and EGFR gene mutation and its significance in lung cancer. **Results:** The expression of lncRNA MALAT1 in lung cancer tissues was higher than that in adjacent tissues ($P=0.0263$). The expression of lncRNA MALAT1 was significantly correlated with lymph node metastasis ($P=0.0275$). There was no correlation between the expression of lncRNA MALAT1 and EGFR mutation. **Conclusion:** LncRNA MALAT1 may be a proto-oncogene involved in the occurrence and

收稿日期 (Date of reception): 2019-06-26

通信作者 (Corresponding author): 林贤东, Email: linxdong1970@yeah.net

基金项目 (Foundation item): 福建省卫生与计划生育委员会青年科研课题 (2016-2-7, 2017-1-16); 福建省科技计划项目 (2018Y2003)。

This work was supported by Fujian Province Health Department Youth Fund Projects (2016-2-7, 2017-1-16); Fujian Province Science and Technology Project (2018Y2003), China.

development of lung cancer. LncRNA MALAT1 is closely related to the metastasis of lung cancer and may be used as a prognostic indicator of lung cancer.

Keywords lung cancer; EGFR gene; lncRNA; MALAT1

肺癌作为全球最为普遍的恶性肿瘤之一, 在男性中的发病率居所有恶性肿瘤的首位, 在女性中其发病率居第3位, 病死率居第1位^[1], 尤其是非小细胞肺癌, 在世界范围内成为癌症致使患者死亡的重要因素。近年来表皮生长因子酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI)在临床上应用于治疗非小细胞肺癌的效果显著。EGFR突变与多种肿瘤的发生发展相关, 约40%的非小细胞肺癌患者携带EGFR的阳性突变。长链非编码RNA(lncRNA)是一类转录本长度超过200个核苷酸的非编码RNA, 根据其基因位置可分为正义lncRNA、反义lncRNA、双向lncRNA、基因内lncRNA及基因间lncRNA五种类型^[2]。肺腺癌转移相关转录因子1(metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1)长度约为800 nt, 在人类正常组织中广泛分布^[3]。研究^[4]表明: MALAT1可以调控细胞的迁移。在肺腺癌细胞中敲除MALAT1以后, 迁移相关的基因表达受到影响, 同时细胞的迁移受到抑制。MALAT1首次在非小细胞肺癌中发现并进行报道, 高表达的MALAT1被认为与肿瘤的高转移率以及低的术后存活率相关^[3]。国外有文献^[5]报道MALAT1的表达量相对于正常组织有明显升高, 但是目前在亚裔人群肺癌中MALAT1的表达罕有相关报道, 基于前期肺癌和肺腺癌MALAT1研究基础上, 应用real-time PCR方法检查肺癌组织和相对应癌旁组织MALAT1表达情况, 并对临床病理资料和EGFR突变情况关系进行分析。

1 材料与方法

1.1 组织标本

选取福建省肿瘤医院2015年6月到2018年6月行外科手术的47例肺癌病例(癌组织和癌旁组织), 其中男22例, 女25例。新鲜组织获取后立即放入液氮中, 随后放置在-80℃冰箱中保存, 整个收集及保存过程均按照无菌原则操作, 并完整收集患者的性别、年龄、肿瘤大小、淋巴结是否转移、EGFR是否突变等临床资料。本研究已获得福建省肿瘤医院医学伦理委员会同意。

1.2 试剂和仪器

Rneasy Mini Kit购自德国凯杰公司, 荧光定量

试剂盒、RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit购自瑞士罗氏公司, PCR扩增仪为日本TaKaRa公司。Real-time PCR仪器型号为安捷伦Mx300p。

1.3 Real-time PCR

取100 mg的冰冻新鲜组织, 按照Rneasy Mini Kit操作说明书抽提取RNA, 使用分光光度计测定RNA浓度。然后按照反转录试剂盒操作说明书将提取RNA反转录成cDNA, -80℃保存备用。荧光定量PCR按照说明书配置反应体系, 反应条件如下: 95℃ 15 min, 40个循环, 每个循环中95℃ 15 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 s, 40℃ 1 min, 每个样本重复3次, 并进行熔解曲线检测。PCR引物序列为: GAPDH正向引物5'-GTCAACGGATTGTTGGTCTGTATT-3', 反向引物5'-AGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3'; MALAT1正向引物5'-ATGCGAGTTGTTCTCCGTCT-3', 反向引物5'-TATCTGCGGTTTCCTCAAGC-3'。

1.4 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件进行统计分析。以GAPDH作为内参基因, mRNA的相对定量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法比较MALAT1的相对表达量, 配对肿瘤与癌旁组织lncRNA MALAT1表达量的比较采用配对t检验, 两组间的比较先进行正态性检验及方差齐性分析, 然后进行两独立样本的t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LncRNA MALAT1 表达量

real-time PCR测定结果显示: 肿瘤组织MALAT1的表达水平显著高于对应的癌旁组织($P = 0.0263$, 图1)。

2.2 LncRNA MALAT1 表达与临床病理特征及EGFR 突变关系

MALAT1的表达水平高低与患者年龄、性别、肿瘤大小无相关, 与EGFR基因突变无相关(表1)。MALAT1的表达水平高低与患者淋巴结转移有密切相关, 淋巴结不转移的表达量高($P = 0.0275$)。

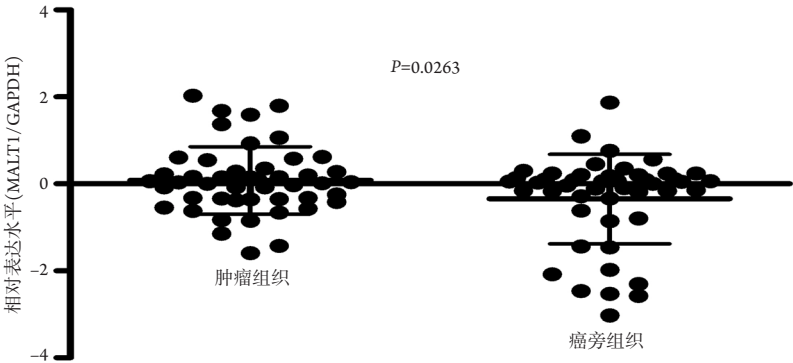


图1 LncRNA MALAT1在肺癌肿瘤组织及对应癌旁组织中的相对表达量
Figure 1 Relative expression of lncRNA MALAT1 in lung cancer tissues and adjacent tissue

表1 MALT1表达与临床病理特征相关性
Table 1 Association between MALT1 and clinicopathologic features

临床病理特征	n	MALT1表达/例		P
		高	低	
性别				0.992
男	22	8	14	
女	25	13	12	
年龄/岁				0.679
≤58	25	14	11	
>58	22	8	14	
淋巴结转移				0.028
转移	16	4	12	
未转移	31	17	14	
肿瘤最小直径/cm				0.227
≤2	22	14	8	
>2	25	8	17	
EGFR基因				0.884
突变型	13	5	8	
野生型	14	9	5	

3 讨论

非编码RNA一度被认为是转录的“噪音”或“垃圾”，没有任何生物学功能^[6]。但随着研究的深入，发现lncRNA表达异常与人类肿瘤关系密切，在肿瘤发生过程中起类似癌基因或抑癌基因的作用^[7]。LncRNA在各种疾病中的作用越来越突出，已成为继microRNA之后又一研究热点。LncRNA的异常表达在肿瘤的发生发展中有重要

作用，如母系表达基因3(maternally expressed gene 3, MEG3)在多种正常组织中表达，特别在脑组织中高表达，而在脑肿瘤及一些肿瘤细胞株中不表达，且MEG3的异常表达可抑制肿瘤细胞的生长^[8]，说明MEG3具有抑癌基因的作用。相反，HOX基因的反义基因间RNA(HOX transcript anti-sense intergenic RNA, HOTAIR)在乳腺癌中显著上调，高出正常乳腺组织2 000倍，HOTAIR的表达与乳腺癌转移和预后欠佳有关^[9]。研究^[10]表明：

MALAT1可以调控细胞的迁移, MALAT1的调控机制没有完全被理解, 目前MALAT1已经作为肝移植手术的预后因子, 用以预测肿瘤的发生。MALAT1被证实与非小细胞肺癌患者的转移显著相关^[11], 并且与肿瘤患者化疗用药密切相关^[12-13]。

本实验应用real-time PCR检测肺癌组织与对应的癌旁组织中MALAT1的表达, 发现癌组织的表达量高于对应的癌旁组织, 这一结果与Lin等^[14]的报道相同。提示不论亚裔还是非亚裔人群中肺癌MALAT1表达水平没有非常大的变化, 肿瘤组织表达量高, 提示MALAT1与肺癌发生、发展有密切相关, 可能是肺癌发生的原癌基因, 但相关发病机制还有待深入的研究。

治疗肺癌的标准疗法包括手术切除、基于铂的双重化疗和放射治疗等。但是这些疗法很少能达到治愈肺癌的目的, 5年生存率仍只有17%^[15]。治疗失败的原因主要是局部复发和远处转移, Bonner等^[16]等证实手术的I期肺癌患者中, 有15%的患者存在跳跃性转移。Ludwing等^[17]的研究发现肺癌术后生存期与术中淋巴结清扫数目密切相关。MALAT1转录调控在肿瘤中起关键作用^[18]。本研究中淋巴结无转移患者MALAT1高表达, 显示MALAT1可能抑制肿瘤细胞转移, 提示这一指标可能与肿瘤患者预后有着非常大的临床意义。

目前以EGFR TKI为靶点的抗肿瘤治疗现已成为癌症研究中十分活跃的领域之一, 并已取得了较大进展。MALAT1驱动的癌症提供了新的抗癌疗法和分子探针的基础^[19], MALAT1可能是脑缺血/再灌注损伤潜在的新治疗靶点^[20], lncRNA与肺癌的发生发展有密切关系, 如ALAT1, H19, lincRNA p21等^[21-23], 为寻找肺癌诊断及预后标志物提供了新思路。本研究中有27例患者进行了EGFR基因检测, 结果显示MALAT1表达在肺癌中EGFR突变无明显关系, 这一结果可能是检测病例例数不够, 期待以后增大样本量再进行更深入研究。

综上所述, 本研究表明MALAT1在肺癌中发挥“原癌基因”的作用, MALAT1表达抑制肺癌肿瘤细胞转移, 可能作为肺癌预后判断的生物指标。因此探索lncRNA MALAT1在其肺癌中发挥的作用, 以及癌变分子基础、致癌危险因素和耐药相关关系, 对肺癌的治疗有重大意义。

参考文献

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs[J]. Cell, 2009, 136(4): 629-641.
- Ji P, Diederichs S, Wang W, et al. MALAT-1, a novel non-coding RNA, and thymo-sin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer[J]. Oncogene, 2003, 22(39): 8031-8041.
- Tano K, Mizuno R, Okada T, et al. MALAT-1 enhances cell motility of lung adenocarcinoma cells by influencing the expression of motility-related genes[J]. FEBS Lett, 2010, 584(22): 4575-4580.
- Gutschner T, Hammerle M, Diederichs S. MALAT1 a paradigm for long noncoding RNA function in cancer[J]. J Mol Med (Berl), 2013, 91(7): 791-801.
- Ponting CP, Oliver PL, Reik W, et al. Evolution and functions of long noncoding RNAs[J]. Cell, 2009, 136(4): 629-641.
- Poliseno L, Salmenal L, Zhang J, et al. A coding-independent function of gene and pseudo gene mRNAs regulates tumour biology[J]. Nature, 2010, 465(7301): 1033-1038.
- Wang P, Ren Z, Sun P. Overexpression of the long non-coding RNA MEG3 impairs in vitro glioma cell proliferation[J]. J Cell Biochem, 2012, 113(6): 1868-1874.
- Gupta RA, Shah N, Wang KC, et al. Long non-coding RNA HO-TAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis[J]. Nature, 2010, 464(7291): 1071-1076.
- Lai MC, Yang Z, Zhou L, et al. Long non-coding RNA MALAT-1 overexpression predicts tumor recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation[J]. Med Oncol, 2012, 29(3): 1810-1816.
- Ji P, Diederichs S, Wang W, et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer[J]. Oncogene, 2003, 22(39): 8031-8041.
- Chen W, Zhao W, Zhang L, et al. MALAT1-miR-101-SOX9 feedback loop modulates the chemo-resistance of lung cancer cell to DDP via Wnt signaling pathway[J]. Oncotarget, 2017, 8(55): 94317-94329.
- Wang H, Wang L, Zhang G, et al. MALAT1/miR-101-3p/MCL1 axis mediates cisplatin resistance in lung cancer [J]. Oncotarget, 2017, 9(7): 7501-7512.
- Lin R, Mada S, Liu C, et al. A large non-coding RNA is a marker for murine hepatocellular carcinomas and a spectrum of human carcinomas[J]. Oncogene, 2007, 26(6): 851-858.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013[J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11-30.
- Booner JA, Cares YI, Sawyer TE, et al. Frequency of noncontiguous lymph node involvement in patients with respectable non-small cell lung carcinoma[J]. Cancer, 1999, 86(7): 1159-1164.
- Ludwing MS, Goodman M, Miller D L, et al. Postoperative survival and the number of lymph nodes sampled during resection of node negative

- non-small cell lung cancer[J]. Chest, 2005, 128(3): 1545-1550.
18. Li S, Wang Q, Qiang Q, et al. Sp1-mediated transcriptional regulation of MALAT1 plays a critical role in tumor[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2015, 141(11): 1909-1920.
 19. Abulwerdi FA, Xu W, Ageeli AA, et al. Selective small-molecule targeting of a triple helix encoded by the long noncoding RNA, MALAT1[J]. ACS Chem Biol, 2019, 14(2): 223-235.
 20. Xin JW, Jiang YG. Long noncoding RNA MALAT1 inhibits apoptosis induced by oxygen-glucose deprivation and reoxygenation in human brain microvascular endothelial cells[J]. Exp Ther Med, 2017, 13(4): 1225-1234.
 21. Barsyte-Lovejoy D, Lau SK, Boutros PC, et al. The c-Myc oncogene directly induces the H19 noncoding RNA by allele-specific binding to potentiate tumorigenesis[J]. Cancer Res, 2006, 66(10): 5330-5337.
 22. Pan YF, Feng L, Zhang XQ, et al. Role of long non-coding RNAs in gene regulation and oncogenesis[J]. Chin Med J (Engl), 2011, 124(15): 2378-2383.
 23. Huarte M, Guttman M, Feldser D, et al. A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response[J]. Cell, 2010, 142(3): 409-419.

本文引用：金善丰, 廖锦容, 陈增, 陈宝珍, 许春伟, 林贤东. LncRNA MALAT1在EGFR突变相关肺癌中的表达与临床意义[J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(1): 23-27. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.01.004

Cite this article as: JIN Shanfeng, LIAO Jinrong, CHEN Zeng, CHEN Baozhen, XU Chunwei, LIN Xiandong. Expression and clinical significance of lncRNA MALAT1 in EGFR mutation-related lung cancer[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2020, 40(1): 23-27. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.01.004