

- veals context – dependent ovarian cancer sensitivity to miRNA overexpression[J]. *Mol Systems Biol*, 2015, 11(12):842
- 18 Zhang S, Ng MK. Gene – microRNA network module analysis for ovarian cancer[J]. *Bmc Systems Biol*, 2016, 10(4):445 – 455
- 19 郭红艳, 孙晓杰, 刘秀财, 等. 蛋白激酶 SGK3 过表达对乳腺癌细胞株 MDA – MB – 231 影响的研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2016, 23(24):1601 – 1606
- 20 吕文杰, 王洪涛, 黄芳, 等. 过表达 SGK3 肝癌细胞 BEL – 7402 在去甾体激素血清中的抗凋亡研究[J]. *生物技术通讯*, 2016, 27(1):27 – 31
- 21 Bruhn MA, Pearson RB, Hannan RD, *et al.* AKT – independent PI3 – K signaling in cancer – emerging role for SGK3[J]. *Cancer Manag Res*, 2013, 5:281 – 292
- 22 Wang Y, Zhou D, Chen S. SGK3 is an androgen – inducible kinase promoting prostate cancer cell proliferation through activation of p70 S6 kinase and up – regulation of cyclin D1[J]. *Mol Endocrinol*, 2014, 28(6):935 – 948
- 23 胡可可, 宋泓, 于渊毅. 蛋白激酶 SGK3 过表达促进卵巢癌细胞 SKOV3 增殖和侵袭[J]. *临床合理用药杂志*, 2017, 10(17):159 – 161
- (收稿日期:2018 – 02 – 24)
- (修回日期:2018 – 03 – 12)

长链非编码 RNA CCAT1 在肝细胞肝癌中的表达及预后意义

陈思思 陈 霞 蒋琼英 徐永富 朱 昱 胡 鹏

摘 要 目的 探讨 lnc RNA CCAT1 在肝细胞肝癌中的表达及其临床意义。方法 采用荧光定量 PCR 检测检测 96 例肝癌癌灶组织及癌旁组织中 lnc RNA CCAT1 的表达情况,并分析与各临床病理因素以及患者预后的相关性。结果 lnc RNA CCAT1 在肝癌癌灶组织表达升高;肝癌癌灶组织中 lnc RNA CCAT1 表达量和门静脉癌栓、TNM 分期等因素相关。进一步生存分析发现 lnc RNA CCAT1 表达阳性者术后平均生存时间(32.1 个月,95% CI:26.3 ~ 38.0 个月)明显短于阴性患者(47.2 个月,95% CI:42.5 ~ 52.0 个月),差异有统计学意义($\chi^2 = 7.607, P = 0.006$)。并且 lnc RNA CCAT1 表达是肝癌患者总体生存的独立危险因素。结论 lnc RNA CCAT1 表达在肝癌发生、发展中发挥重要作用;lnc RNA CCAT1 表达是肝癌患者的独立预后因素。

关键词 长链非编码 RNA CCAT1 肝细胞肝癌 生存分析

中图分类号 R4 文献标识码 A DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.09.020

Expression and Prognostic Significance of Long non – coding RNA CCAT1 in Hepatocellular Carcinoma. Chen Sisi, Chen Xia, Jiang Qiongying, *et al.* Oral and Ocular Center, Taizhou Hospital of Zhejiang Province, Wenzhou Medical University, Zhejiang 317000, China

Abstract Objective To investigate the expression and clinical significance of lnc RNA CCAT1 in Hepatocellular carcinoma tissues. **Methods** HLA – F expression in the primary tumor lesions and their adjacent normal liver tissues from 96 HCC patients were analyzed by quantitative real – time polymerase chain reaction (qRT – PCR), and its relationship between lnc RNA CCAT1 expression and the clinicopathological features and prognosis of HCC patients was also analyzed. **Results** CCAT2 expression was upregulated in cancerous tissues compared with adjacent normal tissue samples. The level of CCAT2 was positively associated with portal vein invasions and TNM stages. Survival analysis revealed that the mean survival time of the CCAT2 positive HCC patients was 32.1 months(95% CI:26.3 – 38.0 months), which was significantly shorter than that of CCAT2 negative HCC patients(47.2 months, 95% CI:42.5 – 52.0 months)($\chi^2 = 7.607, P = 0.006$). Moreover, lnc RNA CCAT2 expression was an independent predictor of overall survival of HCC patients. **Conclusion** lnc RNA CCAT2 high expression may play an important role in the malignant progression of HCC, and lnc RNA CCAT2 expression could be an independent prognostic factor for HCC patients.

Key words Long non – coding RNA CCAT1; Hepatocellular carcinoma; Survival analysis

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(LQ18H160028、LY17H160069);浙江省医药卫生科技项目(2014KYA227);台州市科技计划项目(1701KY05)

作者单位:317000 温州医科大学附属浙江省台州医院口腔中心(陈思思、蒋琼英);肝胆外科(陈霞、徐永富、朱昱、胡鹏)

通讯作者:胡鹏,电子信箱:hupeng@enzemed.com

肝癌是世界范围内的高发恶性肿瘤之一,尽管随着现代医疗技术的进步,肝癌的诊疗手段已渐趋成熟,但是其术后5年复发率仍高达80%,每年约有超过600000人死于肝癌,缺乏有效的诊疗、监测靶点是造成肝癌患者预后低下的原因^[1]。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lnc RNA)是一组长度>200个核苷酸、缺少完整的开放阅读框和无蛋白质编码功能的RNA。近年来研究显示,lnc RNA具有各种不同的生物学功能,作为抑癌或致癌基因参与肿瘤的发生、发展。lnc RNA CCAT1被证实高表达于结肠癌、胃癌、胆囊癌,然而在肝细胞肝癌中的表达情况仍不清楚^[2-4]。

本研究中笔者采用荧光定量PCR法检测肝癌组织中lnc RNA CCAT1的表达情况,并分析其与临床病理因素的相关性。

材料与方法

1. 标本来源:收集2005年9月~2010年10月在温州医科大学附属浙江省台州医院接受手术治疗的96例HCC患者的组织标本(包括癌灶组织及相应癌旁组织),术后均确诊为肝细胞肝癌。肿瘤病理诊断参照世界卫生组织标准、临床分期标准参照美国癌症联合委员会(AJCC)制定的第7版TNM分期标准^[5]。术前患者均未接受放化疗或其他任何药物干预。并有完整临床病理资料(年龄、性别、病理诊断、门静脉癌栓、酗酒、肿瘤直径、TMN分期等)。所有患者中位随访时间为38.5个月(2.0~60.0个月),其中57例死于肝癌。为研究lnc RNA CCAT1的临床相关性,笔者根据CCAT1表达量将数据平均分为两组,即CCAT1高表达组和CCAT1低表达组,并对肝癌组织中lnc RNA CCAT1的表达量与各临床病理因素的关系进行分析。所有人体标本的研究均事先获得伦理委员会的批准。

2. 实时定量聚合酶链反应(real-time PCR)检测肝癌及癌旁组织中lnc RNA CCAT1的表达:采用Trizol试剂盒(美国Invitrogen公司, Carlsbad, CA)试剂盒抽提总RNA。采用ABI公司的High Capacity cDNA Reverse Transcription试剂盒将RNA反转录合成cDNA,反转录反应:25℃ 10min, 37℃ 120min, 85℃ 5min, 4℃保存。RT-PCR采用ABI公司Power SYBR Green PCR Master mix试剂盒及ABI 7900HT系统,以GAPDH为内参基因,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算lnc RNA CCAT1在肝癌组织相对于癌旁组织的表达量,并根据其表达水平中位数将肝癌患者分为低表达组

和高表达组,分析CCAT1表达与临床病理参数及预后的关系。引物序列如下:CCAT1上游引物:5'-GCCGTGTTAAGCATTGCGAA-3',下游引物:5'-AGAGTAGTGCCTGGCCTAGA-3'; GAPDH上游引物:5'-GAAATCCCATCACCCTTCCAGG-3',下游引物:5'-GAGCCCCAGCCTTCTCCATG-3'。

3. 统计学方法:实验结果应用SPSS 20.0统计学软件进行统计分析。不同组间的差异评估采用Student's *t*-test或 χ^2 检验,生存分析用Kaplan-Meier和Log-rank检验,多因素分析用COX回归模型,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. lnc RNA CCAT1在肝癌癌灶及癌旁组织中的表达:qRT-PCR结果经Student's *t*-test检验提示肝癌组织中lnc RNA CCAT1较癌旁组织明显低表达($P=0.000$),见图1。

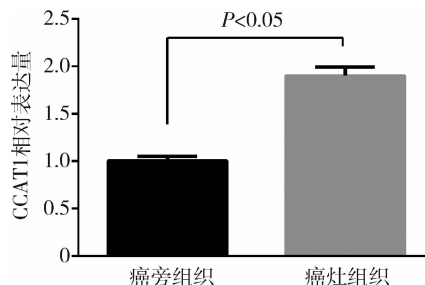


图1 lnc RNA CCAT1在肝癌癌灶组织、癌旁组织中的表达

2. 肝癌中lnc RNA CCAT1的表达量与临床病理因素的关系:lnc RNA CCAT1的表达量与门静脉癌栓($\chi^2=15.229, P<0.05$)及TNM分期($\chi^2=4.196, P=0.041$)具有相关性,而与患者年龄、性别、肿瘤直径、酗酒等无明显相关($P>0.05$,表1)。

3. lnc RNA CCAT1与肝癌患者预后的关系:对96例肝癌患者进行生存分析。Kaplan-Meier分析显示:HLA-F阳性患者术后平均生存时间为32.1个月(95%CI:26.3~38.0个月);HLA-F阴性患者术后平均生存时间为47.2个月(95%CI:42.5~52.0个月)。HLA-F阳性患者生存时间短于阴性患者,差异有统计学意义($\chi^2=7.607, P=0.006$,图2)。COX回归模型分析肝癌患者预后影响因素,单因素分析显示:HLA-F表达、TNM分期均是肝癌患者术后生存时间的危险因素。多因素分析显示HLA-F更是影响肝癌患者术后生存的独立危险因素(表2)。

表 1 lnc RNA CCAT1 的表达量与临床病理因素的关系[采用 Pearson χ^2 检验, $n(\%)$]

临床病理因素	总例数	lnc RNACCAT1 表达			
		阴性	阳性	χ^2	<i>P</i>
性别					
男性	69	32 (46.4)	37 (53.6)	1.288	0.256
女性	27	16 (59.3)	11 (40.7)		
年龄(岁)					
≤53	50	22 (44.0)	28 (56.0)	1.503	0.220
>53	46	26 (56.5)	20 (43.5)		
肿瘤直径(cm)					
≤5	40	22 (55.0)	18 (45.0)	0.686	0.408
>5	56	26 (46.4)	30 (53.6)		
酗酒					
是	50	24 (48.0)	26 (52.0)	0.167	0.683
否	46	24 (52.2)	22 (47.8)		
门静脉癌栓					
有	21	4 (19.0)	17 (81.0)	15.229	0.000
无	65	44 (67.7)	21 (32.3)		
TNM 分期					
I / II	52	31 (59.6)	21 (40.4)	4.196	0.041
III / IV	44	17 (38.6)	27 (61.4)		

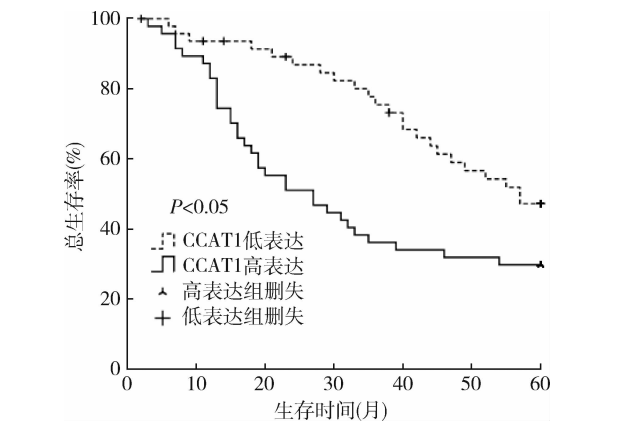


图 2 肝癌组织中 lnc RNA CCAT1 高低表达与患者预后的关系

讨 论

长链非编码 RNA(long noncoding RNA,lnc RNA)是一群长度>200bp 的 RNA,不具有编码功能,以往认为其是 RNA 聚合酶 II 的转录副产物,不具备生物学功能^[6]。但是近些年来研究表明,lnc RNA 可以在转录、转录后等不同水平参与下游基因的调控,与肿瘤发生、发展密切相关^[6~8]。其可能的作用机制:①按照碱基配对原则,参与 mRNA 前体修饰;②与蛋白质或 miRNA 结合,调控相关基因的表达;③招募染色质修饰酶复合物致目标基因区域,参与其表观遗传学修饰^[9~11]。

表 2 COX 单因素和多因素模型筛选危险因素及参数估计

临床病理参数	组别	单因素	多因素		
		RR(95% CI)	<i>P</i>	RR(95% CI)	<i>P</i>
性别	男性(vs 女性)	0.754(0.411~1.384)	0.362		
年龄	>53 岁(vs≤53 岁)	1.151(0.681~1.946)	0.598		
肿瘤直径	>5cm(vs≤5cm)	1.548(0.900~2.661)	0.114		
酗酒	是(vs 否)	1.507(0.891~2.548)	0.126		
门静脉癌栓	有(vs 无)	0.451(0.252~0.810)	0.008	0.935(0.455~1.921)	0.854
TNM 分期	I / II(vs III / IV)	2.327(1.367~3.959)	0.002	2.167(1.159~4.053)	0.015
CCAT1	高表达(vs 低表达)	2.083(1.219~3.558)	0.007	1.954(1.107~3.449)	0.010

RR. 相对危险度

lnc RNA CCAT1 是一个拥有 2628bp 的非编码 RNA 分子,最早在结肠癌中被发现,位于 8q24.21、转录因子 C-Myc 附近,研究表明这是基因突变的高发区^[12]。近年来已有研究显示 CCAT1 在胆管癌等肿瘤组织中高表达^[13~15],参与肿瘤恶性进展。Jiang 等^[13]研究发现 CCAT1 在胆管癌组织中的表达较癌旁组织高,其表达量与组织分化程度、淋巴结侵袭、

TNM 分期及患者预后相关,是胆管癌患者的独立预后因素。Zhang 等^[14]研究显示 CCAT1 可通过负调控 miR-218-5P 促进视网膜母细胞瘤 SO-RB50 及 Y79 细胞株的增殖、侵袭、迁徙、并减少凋亡,可作为视网膜母细胞瘤的潜在治疗靶点。研究发现,结肠癌患者中 lnc RNA CCAT1 和 HOTAIR 表达升高,有望成为结肠癌筛查指标,提高结肠癌阳性诊断率。笔者采

用 RT-PCR 法分析了 lnc RNA CCAT1 肝癌组织中的表达情况, 结果发现: ①lnc RNA CCAT1 在肝癌癌灶组织中表达升高; ②其表达量与患者年龄、肿瘤直径、浆膜侵犯、TNM 分期等无明显相关, 而与门静脉癌栓和肿瘤数目表现出一定相关性; 结合上述两点, 笔者推测 lnc RNA CCAT1 高表达可能在肝癌恶性进展中发挥重要作用; ③生存分析发现 lnc RNA CCAT1 表达阳性患者预后较差, 可作为肝癌患者预后的独立危险因素。

总之, 笔者研究了 lnc RNA CCAT1 在肝癌组织中的表达特点和预后意义, 推测 lnc RNA CCAT1 表达在肝癌发生、发展中发挥重要作用; 并且 lnc RNA CCAT1 表达与预后相关, 是肝癌患者的独立预后影响因素, 对判断肝癌患者预后具有重要参考价值。但 lnc RNA CCAT1 在人体生理病理中其临床意义及作用机制等研究刚刚起步, 仍需要进一步探索。

参考文献

- Jeong SO, Kim EB, Jeong SW, *et al.* Predictive factors for complete response and recurrence after transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma[J]. Gut Liver, 2017, 11(3): 409-416
- Nissan A, Stojadinovic A, MitraniRosenbaum S, *et al.* Colonicancer associated transcript1: A novel RNA expressed in malignant and premalignant human tissues[J]. Int J Cancer, 2012, 130: 1598-1606
- Yang F, Xue X, Bi J, *et al.* Long noncoding RNA CCAT1, which could be activated by c-Myc, promotes the progression of gastric carcinoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2013, 139: 437-445
- Ma MZ, Chu BF, Zhang Y, *et al.* Long non-coding RNA CCAT1 promotes gallbladder cancer development via negative modulation of

- miRNA-218-5p[J]. Cell Death Dis, 2015, 6: e1583
- Edge SB, Byrd DR, Compton CC, *et al.* AJCC cancer staging manual[J]. New York: Springer-Verlag, 2009: 117-126
- Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions[J]. Nat Rev Genet, 2009, 10(3): 155-159
- Wilusz JE, Sunwoo H, Spector DL. Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world[J]. Genes Dev, 2009, 23(13): 1494-1504
- Han P, Chang CP. Long non-coding RNA and chromatin remodeling[J]. RNA Biol, 2015, 12(10): 1094-1098
- Tsai MC, Manor O, Wan Y, *et al.* Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes[J]. Science, 2010, 329(5992): 689-693
- Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, *et al.* The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation[J]. Mol Cell, 2010, 39(6): 925-938
- Gao Y, Meng H, Liu S, *et al.* LncRNA-HOST2 regulates cell biological behaviors in epithelial ovarian cancer through a mechanism involving microRNA let-7b[J]. Hum Mol Genet, 2015, 24(3): 841-852
- Zanke BW, Greenwood CM, Rangrki J, *et al.* Genomewide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on chromosome 8q24[J]. Nat Genet, 2007, 39(8): 989-994
- Jiang XM, Li ZL, Li JL, *et al.* LncRNA CCAT1 as the unfavorable prognostic biomarker for cholangiocarcinoma[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(6): 1242-1247
- Zhang H, Zhong J, Bian Z, *et al.* Long non-coding RNA CCAT1 promotes human retinoblastoma SO-RB50 and Y79 cells through negative regulation of miR-218-5p[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 87: 683-691

(收稿日期: 2017-11-01)

(修回日期: 2017-12-01)

(上接第 75 页)

- Bennett S, Grant MM, Aldred S. Oxidative stress in vascular dementia and Alzheimer's disease: a common pathology[J]. J Alzheimer's Dis, 2009, 17(2): 245-257
- 王海红, 王涛, 钱时兴, 等. 中重度阿尔茨海默病与血管性痴呆患者脑脊液 tau 蛋白的预研究[J]. 上海精神医学, 2016, 28(5): 271-279
- 丁彬彬, 邬建民, 介勇, 等. 阿尔茨海默病和血管性痴呆患者血清炎症因子和生化指标的检测及临床意义[J]. 检验医学, 2016, 31(5): 363-367
- 方丽丽. 超敏 C 反应蛋白和同型半胱氨酸在鉴别阿尔茨海默病及血管性痴呆中的对比分析[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2016, 37(14): 1831-1832
- Karran E, De Strooper B. The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure[J]. J Neurochem, 2016, 139: 237-252
- 胡仁琳, 唐智敏, 张细六, 等. 血清 β 淀粉样蛋白与 tau 蛋白在血管性痴呆早期诊断中的临床意义分析[J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(5): 817-818
- 梁国聪, 石胜良, 毕桂南, 等. β 淀粉样蛋白和 Tau 蛋白在血管性痴呆发病机制中的作用[J]. 广西医科大学学报, 2011, 28(5): 661-664

- 赵虹, 骆庆和, 殷明, 等. 氧化应激与阿尔茨海默病[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(16): 4090-4093
- Mao P, Reddy PH. Aging and amyloid beta-induced oxidative DNA damage and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: implications for early intervention and therapeutics[J]. Biochim Biophys Acta-Mol Basis Dis, 2011, 1812(11): 1359-1370
- Bonda DJ, Wang X, Lee HG, *et al.* Neuronal failure in Alzheimer's disease: a view through the oxidative stress looking-glass[J]. Neurosci Bull, 2014, 30(2): 243-252
- Du J, Ma M, Zhao Q, *et al.* Mitochondrial bioenergetic deficits in the hippocampi of rats with chronic ischemia-induced vascular dementia[J]. Neuroscience, 2013, 231: 345-352
- Skoumalová A, Hort J. Blood markers of oxidative stress in Alzheimer's disease[J]. J Cellular Mol Med, 2012, 16(10): 2291-2300
- Kamnev AA, Tugarova AV. Sample treatment in MSbauer spectroscopy for protein-related analyses: nondestructive possibilities to look inside metal-containing biosystems[J]. Talanta, 2017, 174: 819-837
- 宋玉菲, 付剑亮. 阿尔茨海默病与氧化应激[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2015, 42(3): 290-293

(收稿日期: 2017-11-17)

(修回日期: 2017-12-04)