

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.30.009

文章编号: 1005-8982(2017)30-0051-05

长链非编码 RNA- 尿路上皮癌相关分子 1 在宫颈癌中的表达及临床意义

刘珊珊¹, 张国胜¹, 潘静²

(1. 潍坊护理职业学院, 山东 潍坊 262500; 2. 山东省潍坊市益都中心医院 妇产科, 山东 潍坊 262500)

摘要:目的 检测长链非编码 RNA(lncRNA)- 尿路上皮癌相关分子(UCA1)在宫颈癌组织中的表达,探讨 UCA1 与宫颈癌临床病理特征、术后生存率及预后间的关系。**方法** 利用 lncRNA 芯片筛选宫颈癌及癌旁组织中差异表达的 lncRNAs;利用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测宫颈癌组织及配对癌旁组织中 UCA1 的表达;利用 Spearman 秩相关分析 UCA1 与宫颈癌患者临床病理特征之间的关系;利用生存分析曲线 UCA1 与宫颈癌患者术后 5 年生存率的关系;利用 Cox 风险比例模型分析 UCA1 与宫颈癌患者预后的关系。**结果** UCA1 在宫颈癌表达水平高于癌旁组织;UCA1 的表达与宫颈癌 FIGO 分期相关 ($P=0.015$);UCA1 高表达的宫颈癌患者术后 5 年生存率低于低表达的患者,UCA1 表达及 FIGO 分期为宫颈癌患者独立的预后指标。**结论** UCA1 在宫颈癌中表达升高,并与宫颈癌患者生存及预后密切相关。

关键词: 尿路上皮癌相关分子;宫颈癌;预后;生存

中图分类号: R737.33

文献标识码: A

Significance of long non-coding RNA urothelial cancer associated 1 in cervical cancer

Shan-shan Liu¹, Guo-sheng Zhang¹, Jing Pan²

(1. Weifang Nursing Vocational College, Weifang, Shandong 262500, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Yidu Central Hospital of Weifang, Weifang, Shandong 262500, China)

Abstract: Objective To investigate the expression level of long non-coding RNA (lncRNA) urothelial cancer associated 1 (UCA1) in cervical cancer, and evaluate its prognostic value in cervical cancer. **Methods** Cancer tissue as well as adjacent normal tissue from patients diagnosed with cervical cancer were harvested in this study. lncRNA arrays were performed to identify differentially expressed lncRNAs. Expression of UCA1 was measured by qRT-PCR. Spearman rank correlation analysis was performed to evaluate the association between UCA1 and clinical manifestation of cervical cancer patients. K-M survival analysis was utilized to determine correlation of UCA1 expression with 5-year survival. Cox's proportional hazards regression models were applied to analyze the relationships between UCA1 and prognosis of cervical cancer patients. **Results** UCA1 was upregulated in cervical cancer tissues compared with normal tissues. Expression of UCA1 was closely associated with FIGO stage of cervical cancer ($P = 0.015$). Expression of UCA1 was negatively correlated with 5-years survival rate. UCA1 and FIGO stage were independent prognostic risk factor of cervical cancer. **Conclusion** UCA1 is upregulated in cervical cancer, and is negatively associated with outcome of cervical cancer.

Keywords: UCA1; cervical cancer; prognosis; survival

全球每年因宫颈癌而死亡的患者数高达 53 万, 死亡人数位居妇科肿瘤的第 2 位^[1]。放射治疗、化学

治疗和根治性切除术已成为了宫颈癌的标准化治疗方案^[2]。然而,宫颈癌患者术后预后差异仍非常显著,且临床上缺乏有效的判断患者预后的分子标志物。因此,更深入的理解宫颈癌发生、发展的分子机制、鉴定有效的治疗靶点及预后判断分子标志物对宫颈癌患者的个体化治疗及提高整体生存率意义重大。

随着基因芯片及基因测序技术的飞速发展,越来越多的非编码 RNA 已被证实在疾病的诊断及治疗中具有重要的作用。长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)在过去被认为是基因组 RNA 中的“转录噪声”,近年来也被证实,可在表观遗传水平、转录及转录后水平调控基因的表达^[3]。H19^[4]、MALAT1^[5]和 HOTAIR^[6]也被证实在中的发生、发展中扮演着重要的角色。有研究报道,TUG1^[7]、MEG3^[8]和 ANRIL 等^[9]lncRNAs 可促进宫颈癌细胞的增殖及转移。然而,尿路上皮癌相关分子 1(urothelial cancer associated 1,UCA1)在宫颈癌中表达及临床相关性尚无研究报道。本研究通过基因芯片筛选出 UCA1 在宫颈癌组织中表达上调,并证实 UCA1 的表达与宫颈癌患者生存及预后密切相关。本研究有助于鉴定新的宫颈癌治疗分子靶点及预后判断标志物。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 临床标本 选取 2007 年 12 月 -2010 年 12 月于本研究所用宫颈癌组织及癌旁组织,入组患者在潍坊市益都中心医院妇产科确诊为宫颈癌并行根治性切除术。同一患者肿瘤组织及配对癌旁组织切除后,立刻储存于液氮之中,备后续实验使用。所有入组患者均亲自签署知情同意书,同意其标本用于本项研究。患者入组前均未接受放化疗,且无其他器官重大疾病史。术后生存资料采用电话方式进行回访,回访时间以患者死亡或本研究截止之日。

1.1.2 实验试剂和仪器 RNA 提取试剂 RNAiso reagent、逆转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)试剂盒(购自日本 TaKaRa 公司)。宫颈癌组织及癌旁组织间 lncRNA 表达谱差异委托上海伯豪公司行 lncRNA 芯片检测。4℃高速离心机(购自德国 Eppendorf 公司),置入 -80℃冰箱冷冻保存(购自青岛海尔公司)。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取 研磨组织至粉末状,加入适量的

RNAiso reagent,再研磨直至裂解液呈透明状,将匀浆转移至离心管,12 000 r/min,4℃离心 5 min。向上清液中加入 1/5 体积 RNAiso reagent 的氯仿,震荡至溶液呈乳白状,再次 12 000 r/min,4℃离心 15 min。离心后溶液分为 3 层,即无色的上清液、中间白色蛋白层及下层有机层。吸取上清液转移至新的离心管,加入等体积异丙醇,12 000 r/min,4℃离心 10 min,弃上清液,加入 500 μl 75%的乙醇,再次 12 000 r/min,4℃离心 5 min。所得沉淀即为 RNA,加入 200 μl 去离子水,置入 -80℃冰箱冷冻储存。

1.2.2 逆转录 取总 RNA 2 μl,加入 10 mmol/L dNTP, Oligo(dT)(0.5 μg/μl)各 1 μl。70℃ 5 min,冰上放置 2 min。加入 10× Buffer 2 μl, RNase 抑制剂 1 μl, 逆转录酶 1 μl。混匀后 42℃ 60 min, 80℃ 5 min。所得产物即为 cDNA 模板。

1.2.3 qRT-PCR 加入 125 μl 的 20× SYBR 溶液至 1.0 ml 2.5× Real Master Mix 中,所得溶液作为试剂 A。实验采用 20 μl 体系,内还有 9 μl 试剂 A, 1 μl 20× ROX Reference Dye, 1 μl 正向引物, 1 μl 反向引物, cDNA 模板 2 μl, 6 μl 去离子水。qRT-PCR 的反应条件为:95℃ 2 min;95℃ 20 s, 60℃ 20 s, 72℃ 30 s, 共循环 35 个。UCA1 正向引物:5'-CTCTCCATTGGGTTCCACCATTC-3';反向引物:5'-GCGGCAGGTCCTAAGAGATGAG-3';U6 正向引物:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',反向引物:5'-AACGCTTCACGAAYYYGCGT-3'。计算公式为:UCA1 相对表达量: $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[(Ct_{UCA1} - Ct_{U6})_{待测样本} - (Ct_{UCA1} - Ct_{U6})_{校准样本}]}$ 。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件,采用配对设计的 *t* 检验分析宫颈癌组织与癌旁组织间 UCA1 的表达水平差异,采用 Spearman 秩相关分析 UCA1 表达水平与宫颈癌患者临床病理特征之间的关系,采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线及 Log-rank 检验分析 UCA1 表达水平与宫颈癌患者生存周期间的关系,采用 Cox 风险比例模型分析 UCA1 的表达水平与宫颈癌患者预后的关系,检验水准 $\alpha_{入} = 0.050$, $\alpha_{出} = 0.100$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 宫颈癌及癌旁组织中差异表达的 lncRNAs

提取 5 例宫颈癌及同一患者配对癌旁组织标本的 RNA,利用 lncRNA 芯片检测在宫颈癌组织及癌

旁组织中差异表达的 lncRNAs。经数据分析后检测发现,与癌旁组织比较,在宫颈癌中有 21 个上调、63 个下调的 lncRNA。取上调和下调的 30 个 lncRNAs 制备热图,结果显示 UCA1 在宫颈癌组织中表达上调,而在癌旁组织中表达下调(见图 1),提示 UCA1 可能参与宫颈癌发生、发展的调控。

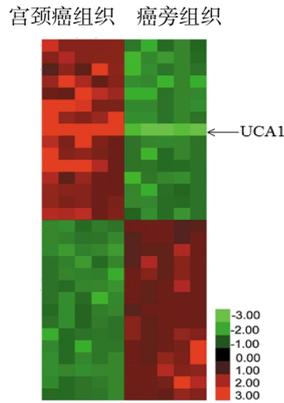


图 1 宫颈癌组织及癌旁组织中差异表达的 lncRNAs

2.2 UCA1 在宫颈癌和癌旁组织中的表达

qRT-PCR 结果显示,71 例癌旁组织中 UCA1 的相对表达量为 (0.914 ± 0.751) ,71 例宫颈癌组织中 UCA1 的相对表达量为 (6.137 ± 2.984) ,经 *t* 检验,差异有统计学意义($t=5.194, P=0.015$),见图 2。宫颈癌组织中 UCA1 的表达水平高于癌旁组织。

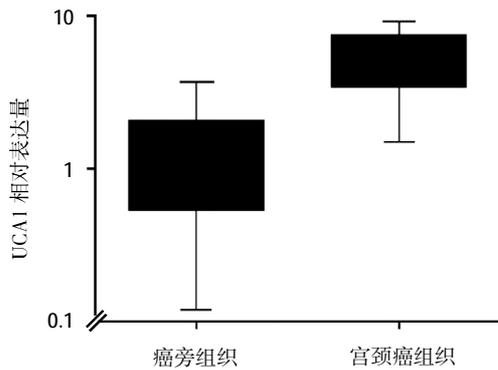


图 2 宫颈癌组织及癌旁组织中 UCA1 的相对表达水平

2.3 UCA1 与宫颈癌临床病理特征的关系

根据宫颈癌组织中 UCA1 表达的均数 6.137,将 UCA1 表达水平高于 6.137 的患者作为 UCA1 高表达组,将 UCA1 表达水平低于 6.137 的患者作为 UCA1 低表达组,利用 Spearman 秩相关分析 UCA1 表达水平与宫颈癌临床病理特征的关系。结果显示,UCA1 的表达水平与宫颈癌 FIGO 分期密切相关,随着 FIGO 分期的进展,UCA1 的表达逐渐升高($r=0.614,$

$P=0.015$),见表 1。而 UCA1 表达水平与宫颈癌的其他临床病理特征,包括年龄、HPV 状态、肿瘤类型及组织分化程度均无相关性(见表 1)。提示 UCA1 的表达与宫颈癌的病情进展呈正相关。

表 1 UCA1 的表达与宫颈癌临床病理特征的关系

临床病理特征	例数	UCA1		r 值	P 值
		高表达	低表达		
FIGO 分期					
I + II	33	14	19	0.614	0.015 [†]
III + IV	38	27	11		
年龄					
≤65 岁	34	21	13	0.014	0.381
>65 岁	37	20	17		
HPV					
阳性	38	24	14	0.319	0.063
阴性	33	17	16		
肿瘤类型					
鳞癌	30	19	11	0.135	0.453
腺癌	29	16	13		
透明细胞癌	12	6	6		
组织分化程度					
高分化	32	18	14	0.141	0.161
中/低分化	39	23	16		

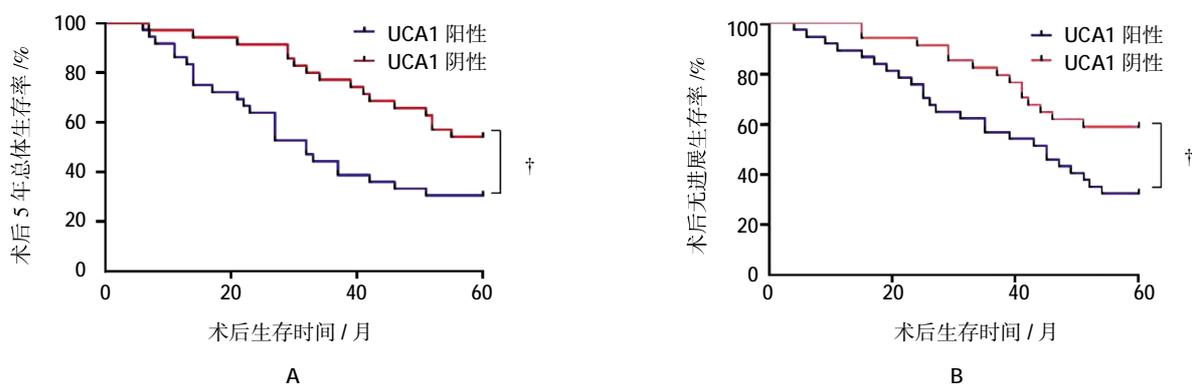
注:† 与 FIGO 分期 III + IV 比较, $P < 0.05$

2.4 UCA1 与宫颈癌术后 5 年生存率的关系

生存曲线结果显示,UCA1 的表达与宫颈癌患者术后 5 年总体生存率(Log-rank 检验: $P=0.008$,见图 3A)及无进展生存率(Log-rank 检验: $P=0.021$,见图 3B)密切相关,UCA1 高表达组的宫颈癌患者术后 5 年生存率及无进展生存率低于 UCA1 低表达组。

2.5 UCA1 与宫颈癌预后的关系

Cox 风险比例模型多因素分析结果显示,UCA1 高表达组宫颈癌患者术后总体生存风险系数为 3.791 (95%CI: 1.984, 10.314, $P=0.019$),UCA1 高表达组宫颈癌患者术后无进展生存风险系数为 2.715 (95%CI: 1.613, 5.187, $P=0.032$)。UCA1 为宫颈癌患者术后总体生存预后及无进展生存预后的独立预测指标。此外,FIGO 分期也被证实为宫颈癌患者术后总体生存预后($\hat{H}R=4.185, 95\%CI: 2.145, 13.314, P=0.008$)及无进展生存预后($\hat{H}R=5.134, 95\%CI: 2.114, 7.875, P=0.011$)的独立预测指标。而其他病理特征与宫颈癌患者术后预后无关。见表 2、3。



† 与 UCA1 低表达组比较, $P < 0.05$

图 3 UCA1 的表达与宫颈癌患者术后生存率的关系

表 2 UCA1 的表达与宫颈癌术后总体生存预后的关系

临床病理特征	b	S_b	Wald χ^2	HR	95%CI		df	P 值
					下限	上限		
UCA1	-0.719	0.254	4.142	3.791	1.984	10.314	1	0.019 [†]
FIGO 分期	-0.894	0.231	6.892	4.185	2.145	13.314	1	0.008 [†]
年龄	0.021	0.021	1.032	1.451	0.716	2.819	1	0.315
HPV	-0.043	0.314	0.403	2.131	0.772	3.814	1	0.119
肿瘤类型	0.053	0.214	1.342	1.514	0.913	2.159	1	0.331
组织分化程度	-0.245	0.324	1.542	1.325	0.819	1.914	1	0.214

注: † $P < 0.05$

表 3 UCA1 的表达与宫颈癌术后无进展生存预后的关系

临床病理特征	b	S_b	Wald χ^2	HR	95%CI		df	P 值
					下限	上限		
UCA1	-0.543	0.325	5.986	2.715	1.613	5.187	1	0.032 [†]
FIGO 分期	-0.457	0.226	6.132	5.134	2.114	7.875	1	0.011 [†]
年龄	0.032	0.152	1.324	2.145	0.763	3.452	1	0.238
HPV	-0.044	0.242	0.575	1.871	0.829	2.485	1	0.184
肿瘤类型	0.065	0.335	1.553	1.149	0.716	1.981	1	0.371
组织分化程度	-0.153	0.145	2.973	2.148	0.913	2.981	1	0.289

注: † $P < 0.05$

3 讨论

LncRNA 为近年来的研究热点,一系列研究结果表明 lncRNA 的表达与肿瘤的发生、发展密切相关。与编码蛋白的 mRNA 不同,大多数 lncRNAs 的表达具有极高的组织特异性。YANG 等的研究显示, lncRNA PVT1 在宫颈癌患者血清中表达异常升高,并与患者的肿瘤体积及临床分期密切相关,且可作为宫颈癌早期诊断的分子标志物^[10]。CAO 等的研究显示, lncRNA-SPRY4-IT1 在宫颈癌组织中的表达

水平高于癌旁组织,且可作为判断宫颈癌患者生存及预后的独立分子标志物^[11]。lncRNA 在宫颈癌的发生、发展中发挥重要的作用,然而,仅仅少数的 lncRNAs 得到较为充分的研究,大多数 lncRNAs 在宫颈癌中的表达及功能尚未得到充分研究。

通过 lncRNA 芯片筛选宫颈癌组织及癌旁组织中差异表达的 lncRNAs,本研究发现 lncRNA-UCA1 在宫颈癌组织中的表达高于癌旁组织,根据宫颈癌中 UCA1 的表达水平将患者分为 UCA1 高表达组及低表达组,结果显示 UCA1 的表达与宫颈癌 FIGO

分期密切相关,UCA1 高表达的宫颈癌患者术后 5 年生存率高于低表达的患者,UCA1 表达及 FIGO 分期为宫颈癌患者独立的预后判断指标。UCA1 在胰腺癌^[12]、结肠癌^[13]及脑胶质瘤^[14]多种肿瘤中已证实发挥重要的作用。NI 等的研究显示,UCA1 在结肠癌中表达上调,并与结肠癌的淋巴结转移、远处转移及肿瘤分期密切相关,并可作为结肠癌独立的判断预后的分子标志物^[15]。FANG 等的研究显示,UCA1 在口腔鳞状细胞癌中表达上调,此外,在发生淋巴结转移的患者的组织中 UCA1 的表达要高于原位肿瘤患者^[16]。与既往研究结果相符,笔者的研究也证实 UCA1 在宫颈癌中可能作为癌基因发挥作用,并与肿瘤的分期密切相关。

近年来,有研究认为 UCA1 可作为调控不同信号通路中关键分子而参与肿瘤的发生及进展。YANG 等的研究显示,UCA1 可通过 PI3K/AKT 而调控 CRBE 的表达,进而调控膀胱癌细胞周期^[17]。另有研究报道,UCA1 可通过 mTOR-STAT3/miR-143-HK2 途径而调控膀胱癌肿瘤细胞的葡萄糖代谢水平^[18]。此外,研究显示在膀胱癌中 miR-1 可调控 UCA1 的表达^[19],提示 microRNA 和 lncRNA 间有着复杂的调控机制。因此,后续研究有必要进一步深入研究 UCA1 在肿瘤中扮演癌基因的分子机制。

本研究通过 lncRNA 芯片及 qRT-PCR 技术筛选并证实长链非编码 RNA-UCA1 在宫颈癌组织中表达上调,并与宫颈癌患者的 FIGO 分期密切相关。更为重要的是,研究发现 UCA1 可作为判断宫颈癌患者生存及预后的分子标志物。本研究结果为鉴定宫颈癌诊断及治疗的分子靶点奠定必要的基础。

参 考 文 献:

- [1] SIEGEL R, MA J, ZOU Z, et al. Cancer statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1): 9-29.
- [2] SAUVAGET C, NISHINO Y, KONNO R, et al. Challenges in breast and cervical cancer control in Japan [J]. Lancet Oncol, 2016, 17(7): e305-312.
- [3] SCHMITZ S U, GROTE P, HERRMANN B G. Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease[J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73(13): 2491-2509.
- [4] PENG L, YUAN X Q, LIU Z Y, et al. High lncRNA H19 expression as prognostic indicator: data mining in female cancers and polling analysis in non-female cancers[J]. Oncotarget, 2016, 8(1): 1655-1667.
- [5] LEI R, XUE M, ZHANG L, et al. Long noncoding RNA MALAT1-regulated microRNA 506 modulates ovarian cancer growth by targeting iASPP[J]. Onco Targets Ther, 2017(10): 35-46.
- [6] HAJJARI M, SALAVATY A. HOTAIR: an oncogenic long non-coding RNA in different cancers[J]. Cancer Biol Med, 2015, 12(1): 1-9.
- [7] HU Y, SUN X, MAO C, et al. Upregulation of long noncoding RNA TUG1 promotes cervical cancer cell proliferation and migration[J]. Cancer Med, 2017,6(2): 471-482.
- [8] ZHANG J, LIN Z, GAO Y, et al. Downregulation of long non-coding RNA MEG3 is associated with poor prognosis and promoter hypermethylation in cervical cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2017, 36(1): 5.
- [9] ZHANG D, SUN G, ZHANG H, et al. Long non-coding RNA ANRIL indicates a poor prognosis of cervical cancer and promotes carcinogenesis via PI3K/Akt pathways [J]. Biomed Pharmacother, 2017(85): 511-516.
- [10] YANG J P, YANG X J, XIAO L, et al. Long noncoding RNA PVT1 as a novel serum biomarker for detection of cervical cancer[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(19): 3980-3986.
- [11] CAO Y, LIU Y, LU X, et al. Upregulation of long noncoding RNA SPRY4-IT1 correlates with tumor progression and poor prognosis in cervical cancer[J]. FEBS Open Bio, 2016, 6(9): 954-960.
- [12] CHEN P, WAN D, ZHENG D, et al. Long non-coding RNA UCA1 promotes the tumorigenesis in pancreatic cancer [J]. Biomed Pharmacother, 2016(83): 1220-1226.
- [13] BIAN Z, JIN L, ZHANG J, et al. LncRNA-UCA1 enhances cell proliferation and 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer by inhibiting miR-204-5p[J]. Sci Rep, 2016(6): 23892.
- [14] ZHAO W, SUN C, CUI Z. A long noncoding RNA UCA1 promotes proliferation and predicts poor prognosis in glioma[J]. Clin Transl Oncol, 2017, 19(6): 735-741.
- [15] NI B, YU X, GUO X, et al. Increased urothelial cancer associated 1 is associated with tumor proliferation and metastasis and predicts poor prognosis in colorectal cancer [J]. Int J Oncol, 2015, 47(4): 1329-1338.
- [16] FANG Z, WU L, WANG L, et al. Increased expression of the long non-coding RNA UCA1 in tongue squamous cell carcinomas: a possible correlation with cancer metastasis[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2014, 117(1): 89-95.
- [17] YANG C, LI X, WANG Y, et al. Long non-coding RNA UCA1 regulated cell cycle distribution via CREB through PI3-K dependent pathway in bladder carcinoma cells[J]. Gene, 2012, 496(1): 8-16.
- [18] LI Z, LI X, WU S, et al. Long non-coding RNA UCA1 promotes glycolysis by upregulating hexokinase 2 through the mTOR-STAT3/microRNA143 pathway[J]. Cancer Sci, 2014, 105(8): 951-955.
- [19] WANG T, YUAN J, FENG N, et al. Hsa-miR-1 downregulates long non-coding RNA urothelial cancer associated 1 in bladder cancer[J]. Tumour Biol, 2014, 35(10): 10075-10084.

(王荣兵 编辑)