

长链非编码 RNA-uc003 ykw.1 在肝细胞癌中的表达及临床意义

谢文轩^{1#}, 孙开宇^{2#}, 陈斌¹, 彭宝岗¹, 沈顺利¹

1.中山大学附属第一医院肝外科, 广东 广州 510080

2.中山大学附属第一医院胃肠外科中心, 广东 广州 510080

【摘要】 目的 检测长链非编码 RNA-uc003 ykw.1(lncRNA-uc003 ykw.1)在肝细胞癌组织中的表达并探究其对预后的影响。方法 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 74 对肝细胞癌组织及癌旁组织中 lncRNA-uc003 ykw.1 的表达, 将病例分为高表达和低表达组, 分析其与临床指标的关系, Kaplan-Meier 曲线分析其预后, COX 比例风险模型进行预后的单因素分析和多因素分析。结果 肝细胞癌中 lncRNA-uc003 ykw.1 表达量显著小于癌旁组织($P<0.05$), lncRNA-uc003 ykw.1 的表达与肿瘤最大直径、早期复发相关($P<0.05$), 单因素和多因素分析均表明 lncRNA-uc003 ykw.1 低表达是肝细胞癌患者预后不佳的独立预后因素。结论 lncRNA-uc003 ykw.1 有望成为预测肝细胞癌预后的重要指标。

【关键词】 长链非编码 RNA-uc003 ykw.1; 肝细胞癌; 预后

Expression and clinical significance of long non-coding RNA uc003 ykw.1 in hepatocellular carcinoma

XIE Wen-xuan¹, SUN Kai-yu², CHEN Bin¹, PENG Bao-gang¹, SHEN Shun-li¹

1. Department of Hepatic Surgery, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

2. Department of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

【Abstract】 **Objective** To test the expression of long non-coding RNA uc003 ykw.1 (lncRNA-uc003 ykw.1) in hepatocellular carcinoma (HCC) and investigate its influence on prognosis. **Methods** Quantitative realtime PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression of lncRNA-uc003 ykw.1 in 74 pairs of hepatocellular carcinoma tissues and adjacent tissues, which were divided into high expression group and low expression group. The relationship between lncRNA-uc003 ykw.1 and clinical characteristics was analyzed. Kaplan-Meier curve was performed to predict clinical prognosis. The univariate and multivariate analysis were carried out by COX hazard model. **Results** The expression of lncRNA-uc003 ykw.1 in hepatocellular carcinoma tissues was significantly lower than that of the adjacent tissues ($P<0.05$), and it was related with maximum diameter and early recurrence ($P<0.05$), COX hazard model showed that the low expression of lncRNA-uc003 ykw.1 was an independent poor prognostic factor for HCC patients. **Conclusion** lncRNA-uc003 ykw.1 is expected to be an important marker to predict the prognosis of HCC.

【Key words】 Long non-coding RNA uc003 ykw.1; Hepatocellular carcinoma; Prognosis

前言

肝细胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) 是

基金项目: 广东省自然科学基金 (项目编号: 2014A030313108, 2015A030310061, 2018A030310326)

谢文轩与孙开宇为共同第一作者

作者简介: 谢文轩, 医师, E-mail: xiewenx@mail2.sysu.edu.cn; 孙开宇,

主治医师, E-mail: sunkaiyu07@126.com

通信作者: 沈顺利, 副主任医师, E-mail: shunlishen@163.com

威胁人类健康的重大疾病之一, 在我国恶性肿瘤死亡率中位列第 2, 且目前发病率呈上升趋势。HCC 诊断时多已届入中晚期, 且即使是获得根治性切除的病例, 仍有 60%~70% 的患者在 5 年内出现复发转移, 预后极差^[1,2], 从分子机制水平预测新的治疗靶点对于提高肝癌整体疗效具有十分重要意义^[3]。

转录组学研究表明, 仅有 1.2% 的哺乳动物基

因会编码蛋白,而剩下超过90%的基因会转录为非编码RNA^[4,5]。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一类转录本长度超过200 nt的RNA分子,它们并不编码蛋白,起初被认为是基因组转录的“噪音”,是RNA聚合酶II转录的副产物,不具有生物学功能。但近年来的研究揭示,lncRNA能够在多种层面调控基因的表达水平,如表观遗传学、基因印迹、染色体沉默、转录激活和干扰、转录后修饰剪切等多种重要的调控过程^[6]。目前,肝细胞癌^[7-9]、前列腺癌^[10,11]、宫颈癌^[12]、食管癌^[13]等多种肿瘤的发生发展被证实和HOTAIR、MALAT-1、H19、MEG3、GAS5、UCA1、HOTTIP、XIST等lncRNA密切相关,lncRNA在肝细胞癌的增殖、凋亡、上皮间质转化、侵袭、转移中发挥重要作用^[14]。在前期研究中,我们采用芯片筛查和qRT-PCR验证发现肝癌组织中lncRNA-uc003 ykw.1表达量较癌旁组织下降,但目前国内外均无报道其在肝细胞癌中担任何种角色;本研究将检测分析lncRNA-uc003 ykw.1表达与HCC患者临床病理特征之间的关系,并探讨lncRNA-uc003 ykw.1能否成为肝细胞癌的潜在治疗靶点。

1 资料与方法

1.1 研究对象及临床资料 用于行qRT-PCR检测mRNA水平的74对肝细胞癌及相应的癌旁组织标本取自2012年5月至2012年9月之间在广州中山大学附属第一医院肝胆外科接受肝切除手术且临床病理资料和随访资料完整的肝细胞癌患者,所有患者术前均未接受其他针对肝细胞癌的任何特殊治疗,所有组织标本于离体后30分钟内迅速取材,并立即于液氮中保存备用;癌旁组织定义为距肿瘤边缘2 cm以上的肝细胞组织。采用电话或者门诊的方式进行随访,截止日期为2017年11月。总生存期定义为患者自手术之日起至随访截止日或者死亡之日间的总体时间,无瘤生存时间定义为患者自手术之日起至随访截止日(未复发)或者临床确诊肝癌复发之日的总体时间(单位:月)。

1.2 主要试剂 按Trizol法(Invitrogen,USA)提取RNA,逆转录获取组织cDNA,lncRNA-uc003 ykw.1引物正向序列:F:5' GCAAGGGAATGACATCGGT3',反向序列:R:5' TGGTGGAGAAGGGTCTGTG3'; GAPDH引物正向序列:F:5' GGGAACTGTGGCGTGAT3',反向:R:5' GAGTGGGTGTCGCT

GTTGA3'。PCR反应体系为10 ul, 2×Master Mix (Superarray公司) 5 μl,上下游引物各0.5 μl, cDNA模板2 ul,加水至10 ul。PCR反应条件:95℃, 10 min; 36个PCR循环(95℃, 10 s; 60℃, 60 s)。以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算lncRNA-uc003 ykw.1的相对表达水平。

1.3 统计学分析 采用SPSS 22.0统计软件对数据进行处理,结果以均数±标准差表示,均数比较采用方差检验和t检验,生存曲线Kaplan-Meier方法计算总生存时间与无瘤生存时间,并用Log-rank对数秩检验进行分析;Cox风险比例回归模型进行单变量和多变量分析,所有检验结果 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA-uc003 ykw.1在肝细胞癌和癌旁组织中的表达情况和74位患者的临床病理特征 采用qRT-PCR法检测lncRNA-uc003 ykw.1在肝细胞癌中及其对应的癌旁组织中的表达情况, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算癌组织中lncRNA-uc003 ykw.1之于癌旁组织的相对表达水平。结果显示:设定癌旁组织中lncRNA-uc003 ykw.1相对表达量为1,则癌组织中lncRNA-uc003 ykw.1相对表达量为 0.434 ± 0.237 ,配对t检验提示癌组织中lncRNA-uc003 ykw.1相对表达量较癌旁组织下降,差异具有统计学意义($t=-20.502, P<0.001$);74位患者的临床病理特征见表1。

2.2 74位肝细胞癌患者临床病理特征与lncRNA-uc003 ykw.1表达之间的关系 以lncRNA-uc003 ykw.1在74例肝细胞癌组织中相对表达量的中位数0.434作为界线,将其分为高表达组和低表达组,并分析与临床病理特征之间的关系。结果可见,lncRNA-uc003 ykw.1与肿瘤最大直径($P=0.007$)、早期复发($P=0.005$)相关,而与性别、年龄、HBsAg、AFP、包膜完整程度、肝硬化、子灶、大血管侵犯、Edmonson分级、TNM分期无关(表2)。

2.3 lncRNA-uc003 ykw.1与肝细胞癌患者临床预后的关系 从74例肝细胞癌患者的生存曲线(图3、4)可以看出:lncRNA-uc003 ykw.1高表达组肝细胞癌患者5年总生存率为61.3%,低表达组5年总生存率为32.6%,两者差值有统计学意义($P=0.015$);高表达组5年复发率58.1%,低表达组5年复发率79.1%,两者差值有统计学意义($P=0.016$);

AFP、肿瘤包膜完整度、TNM分期、lncRNA-

表 1 74 位肝细胞癌患者的临床病理特征

		n=74	
		数量	比例(%)
性别	男	65	87.8
	女	9	12.2
年龄	≤50 岁	10	13.5
	>50 岁	64	86.5
HBsAg	阳性	63	85.1
	阴性	11	14.9
AFP	<20 ug/L	28	37.8
	≥20 ug/L	46	62.2
包膜	完整	61	82.4
	不完整/无	13	17.6
肿瘤最大直径	≤5 cm	21	28.4
	>5 cm	53	71.6
肝硬化	有	60	81.1
	无	14	18.9
子灶	有	23	31.1
	无	51	68.9
大血管侵犯	有	15	20.3
	无	59	79.7
Edmonson 分级	I + II 级	53	71.6
	III + IV 级	21	28.4
TNM 分期	I + II 期	46	62.2
	III + IV 期	28	37.8
早期复发	<24 个月	47	63.5
	>24 个月	27	36.5

表 2 lncRNA-uc003ykw.1 在肝细胞癌组织中的表达与临床病理特征之间的关系

		lncRNA-uc003ykw.1		χ^2	P 值
		高表达	低表达		
性别	男	25	40	1.555	0.212
	女	6	3		
年龄	≤50 岁	5	5	0.312	0.576
	>50 岁	26	38		
HBsAg	阳性	26	37	0.067	0.795
	阴性	5	6		
AFP	<20 ug/L	12	16	0.017	0.896
	≥20 ug/L	19	27		
包膜	完整	27	34	0.343	0.558
	不完整/无	4	9		
肿瘤最大直径	≤5cm	14	7	7.393	0.007
	>5cm	17	36		
肝硬化	有	25	35	0.007	0.935
	无	6	8		
子灶	有	8	15	0.693	0.405
	无	23	28		
大血管侵犯	有	4	11	1.093	0.296
	无	27	32		
Edmonson 分级	I + II 级	24	29	0.882	0.348
	III + IV 级	7	14		
TNM 分期	I + II 期	23	23	3.283	0.070
	III + IV 期	8	20		
早期复发	<24 个月	14	33	7.754	0.005
	>24 个月	17	10		

uc003 ykw.1 表达水平是总生存时间的预后指标 ($P<0.05$),同时也是无瘤生存时间的预后指标 ($P<0.05$);而性别、年龄、HBsAg、肿瘤最大直径、肝硬化、大血管侵犯、Edmonson 分级均对总生存时间和无瘤生存时间没有预测作用(表 3)。

利用 COX 比例风险模型对 AFP、肿瘤包膜完整度、TNM 分期、lncRNA-uc003 ykw.1 表达水平进

行多因素分析,我们可以判断 AFP、肿瘤包膜完整度、lncRNA-uc003 ykw.1 表达水平既是是总生存时间 ($P<0.05$),也是无瘤生存时间 ($P<0.05$)的独立预后因素(表 4)。

3 讨论

随着现代分子技术的发展,从分子水平去探

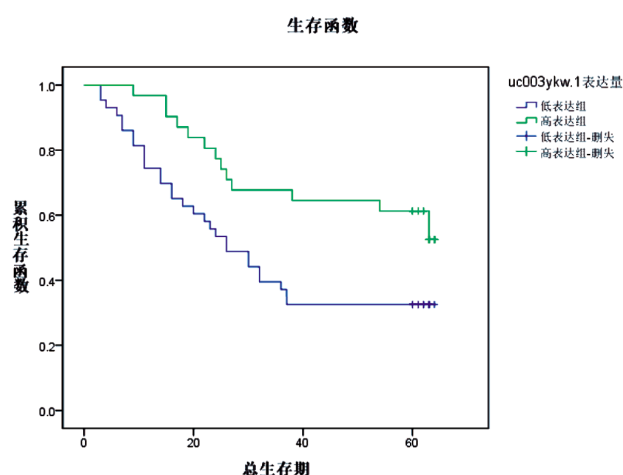


图 1 74 例肝细胞癌患者术后总体生存曲线(单位:月)

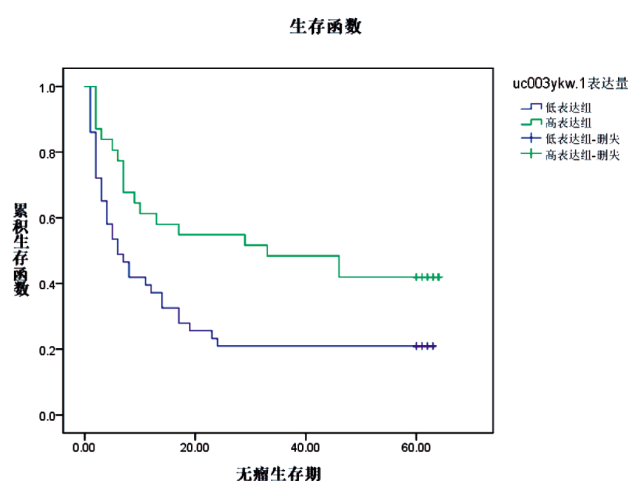


图 2 74 例肝细胞癌患者术后无瘤生存曲线(单位:月)

表 3 74 例肝细胞癌病人总生存时间和无瘤生存时间的单因素分析

病理特征(单因素)	总生存时间		无瘤生存时间	
	相对危险度(95%CL)	P 值	相对危险度(95%CL)	P 值
性别	1.639(0.583-4.610)	0.349	1.420(0.564-3.574)	0.456
年龄	1.662(0.592-4.661)	0.335	1.629(0.647-4.100)	0.300
HBsAg	0.721(0.333-1.562)	0.407	0.531(0.264-1.070)	0.076
AFP	2.259(1.134-4.501)	0.020	2.131(1.178-3.854)	0.012
包膜	0.218(0.110-0.434)	0.000	0.308(0.161-0.589)	0.000
肿瘤最大直径	0.498(0.230-1.076)	0.076	0.711(0.385-1.314)	0.277
肝硬化	1.199(0.532-2.701)	0.662	1.286(0.605-2.734)	0.514
子灶	2.175(1.178-4.016)	0.013	2.400(1.366-4.219)	0.002
大血管侵犯	1.763(0.865-3.597)	0.119	1.386(0.711-2.700)	0.337
Edmonson 分级	1.257(0.653-2.420)	0.493	1.415(0.791-2.532)	0.242
TNM 分期	1.855(1.010-3.405)	0.046	1.932(1.108-3.339)	0.020
lncRNA-uc003ykw.1	0.454(0.235-0.875)	0.018	0.509(0.286-0.904)	0.021

表 4 74 例肝细胞癌病人总生存时间和无瘤生存时间的多因素分析

病理特征(单因素)	总生存时间		无瘤生存时间	
	相对危险度(95%)	P 值	相对危险度(95%)	P 值
AFP	2.362(1.136-4.892)	0.021	1.973(1.079-3.606)	0.027
包膜	0.164(0.071-0.379)	0.000	0.330(0.154-0.708)	0.004
子灶	1.026(0.415-2.537)	0.956	1.293(0.605-2.761)	0.507
TNM 分期	1.050(0.454-2.428)	0.909	1.201(0.599-2.409)	0.606
lncRNA-uc003ykw.1	0.316(0.155-0.647)	0.002	0.444(0.242-0.817)	0.009

讨研究肝细胞癌发生、发展、侵袭、转移的机制越来越受到人们的重视。研究表明,人体正常肝细胞的癌变受多种内源性或者外界因素影响,癌基因的过度表达或抑癌基因的表达减弱、缺失以及二者相互关系的异常均可导致肿瘤的发生发展。

长链非编码 RNA 在肝细胞癌发生发展中扮演重要角色,国内孙树汉教授课题组较早开展了相关研究,他们通过 lncRNA 芯片筛查和 qRT-PCR 验证找到了一个在 HCC 中高表达的 lncRNA (lncRNA-HEIH);lncRNA-HEIH 表达升高的 HCC 患者预后较差,lncRNA-HEIH 是 HCC 患者的独立预后因子。采用过表达技术 (gain of function) 和 RNAi 技术 (loss of function),他们发现 lncRNA-HEIH 能促进 HCC 细胞增殖,在细胞周期调控过程中也起到重要作用。RNA 免疫共沉淀和 ChIP 等实验则揭示 lncRNA-HEIH 可以通过结合 EZH2 招募 PRC2,进而抑制下游靶基因的表达、调控细胞周期^[15]。此外,为了验证乙肝病毒 X 蛋白(HBx)对 HCC 的影响,该课题组对 HBx 转基因小鼠同正常小鼠 C57/BL 进行差异 lncRNA 比较,发现转基因鼠中 lncRNA-Dreh 明显下调,且随着小鼠年龄增长,下调更加明显。细胞实验显示抑制 lncRNA-Dreh 表达能够促进细胞增殖,迁移和侵袭能力增强,上调表达则有相反效果,这种作用依赖于 lncRNA-Dreh 和蛋白 Vimentin 相互作用改变细胞内中间丝的排列,进而改变细胞形态,促进细胞侵袭和转移^[16]。郑树森教授课题组也较早开展了 lncRNA 相关研究,他们发现 MALAT-1 在 HCC 中表达增强,MALAT-1 表达升高是 HCC 患者肝移植术后复发的不良预后因素;细胞实验则显示下调 MALAT-1 后细胞迁移和侵袭能力明显下降^[17]。

上述研究表明,在 HCC 发生过程中伴随着 lncRNA 表达变化,且这些变化和 HCC 的预后及肿瘤细胞的分子生物学特性调控存在一定的关系,lncRNA 可能是一个重要的调控“枢纽”。

本研究通过实时荧光定量 PCR 方法首次证明:lncRNA-uc003 ykw.1 在癌组织中的相对表达量较癌旁组织明显下降 ($P<0.001$),将 qRT-PCR 结果与临床病理因素及生存资料结合进行统计分析提示 lncRNA-uc003 ykw.1 在肝细胞癌中的低表达与肿瘤最大直径 ($P=0.007$)、早期复发 ($P=0.005$) 有关,而与其他因素无直接相关;lncRNA-uc003 ykw.1 低表达组肝细胞癌患者的总体生存时

间和无瘤生存时间均显著短于 lncRNA-uc003 ykw.1 高表达组 ($P<0.05$)。另外,lncRNA-uc003 ykw.1 表达也是肝细胞癌根治性切除术后患者总生存期和无瘤生存期的独立预后因素 ($P<0.05$)。我们推测 lncRNA-uc003 ykw.1 的低表达在肝细胞癌的癌性转化中可能发挥着重要作用,lncRNA-uc003 ykw.1 低表达的肝细胞癌患者肿瘤体积偏大,易伴有子灶,恶性程度较高,术后容易复发,预后不良。由此可得出结论:lncRNA-uc003 ykw.1 可能是一个与肝细胞癌病理学特性密切相关的抑癌基因,lncRNA-uc003 ykw.1 的低表达可能在肝细胞癌的发生、发展中起着重要作用,其有可能成为判断肝细胞癌恶性程度和术后复发的一个新的预测因子,以及成为肝细胞癌基因治疗的新靶点;但该研究仅仅揭示了 lncRNA-uc003 ykw.1 在肝细胞癌组织中的表达和临床意义,其与肿瘤侵袭转移关系的机制仍不清楚,我们下一步工作将利用生物信息学分析 lncRNA-uc003 ykw.1 的上下游分子,探究 lncRNA-uc003 ykw.1 通过何种基因调控通路在肝细胞癌中发挥作用。

参考文献

- [1] Forner, A., M. Reig, J. Bruix, et al. Hepatocellular carcinoma [J]. *Lancet*, 2018, 391(10127): 1301-1314.
- [2] Morise, Z., et al., Recent advances in liver resection for hepatocellular carcinoma [J]. *Front Surg*, 2014, 1: 21.
- [3] 钦伦秀. 肝癌转移复发的分子机制与预测:从组学研究到临床应用[A]. 中国抗癌协会、中华预防医学会、中国癌症基金会、中国健康促进与教育协会.第十三届中国科协年会第18分会场-癌症流行趋势和防控策略研究研讨会论文集(补充)[C].中国抗癌协会、中华预防医学会、中国癌症基金会、中国健康促进与教育协会:中国抗癌协会,2011:4.
- [4] Rinn, J.L. and H.Y. Chang, et al. Genome regulation by long noncoding RNAs [J]. *Annu Rev Biochem*, 2012, 81: 145-166.
- [5] Spizzo, R., et al., Long non-coding RNAs and cancer: a new frontier of translational research? [J] *Oncogene*, 2012, 31(43): 4577-4587.
- [6] Gong, C., L.E. Maquat, et al. lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements [J]. *Nature*, 2011, 470(7333): 284-288.
- [7] Yang, L., et al. The long noncoding RNA HOTAIR activates autophagy by upregulating ATG3 and ATG7 in hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Biosyst*, 2016, 12(8): 2605-2612.
- [8] Tu, Z.Q., et al. Down-regulation of long non-coding RNA GAS5 is associated with the prognosis of hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(7): 4303-4309.
- [9] Huang, J.L., et al. Characteristics of long non-coding RNA and

- its relation to hepatocellular carcinoma [J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(3): 507-514.
- [10] Zhu, M., et al. lncRNA H19/miR-675 axis represses prostate cancer metastasis by targeting TGFBI [J]. *FEBS J*, 2014, 281(16): 3766-3775.
- [11] Klecka, J., et al. Differential display code 3 (DD3/PCA3) in prostate cancer diagnosis [J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(2): 665-670.
- [12] Lee, M., et al. The long non-coding RNA HOTAIR increases tumour growth and invasion in cervical cancer by targeting the Notch pathway [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(28): 44558-44571.
- [13] Wu, T., et al. Regulation of laryngeal squamous cell cancer progression by the lncRNA H19/miR-148a-3p/DNMT1 axis [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(10): 11553-11566.
- [14] Ning, S., et al. Lnc2Cancer: a manually curated database of experimentally supported lncRNAs associated with various human cancers [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44 (D1): 980-985.
- [15] Yang, F., et al. Long noncoding RNA high expression in hepatocellular carcinoma facilitates tumor growth through enhancer of zeste homolog 2 in humans [J]. *Hepatology*, 2011, 54(5): 1679-1689.
- [16] Huang, J.F., et al. Hepatitis B virus X protein (HBx)-related long noncoding RNA (lncRNA) down-regulated expression by HBx (Dreh) inhibits hepatocellular carcinoma metastasis by targeting the intermediate filament protein vimentin [J]. *Hepatology*, 2013, 57(5): 1882-1892.
- [17] Lai, M.C., 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.

·读者·作者·编者·

本刊对视频投稿的要求

为了促进同行之间进行技术交流,以及强化继续教育,本刊特开辟的视频之窗栏目,为此提供一个极佳的交流平台。本刊视频发表要求如下:可采用 AVI、MPEG 和 RAM 等常用格式。视频文件的压缩格式需计算机常用操作系统支持。视频文件的音频和视频图像要同步。窗口尺寸要能够清晰显示图像细节,不低于 352×288 像素。字幕工整、清晰、易于辨认。字幕出现时间应与配音或者内容相协调一致。视频时长 20 分钟左右为宜。需要有对该手术进行文字说明和简要的步骤说明,此外需附上个人照片和简介,包括目前任职情况、主攻方向、已经发表的文章情况,以及主持的科研项目等。来稿请发送至本刊编辑部邮箱:digestiveoncology@163.com 或通过我刊网上投稿系统投稿。此栏目不收取任何费用,欢迎各位作者踊跃投稿。