

LincRNA-ROR 在高级别浆液性卵巢癌中的表达及临床意义

李会俭¹, 付军¹, 赵敏¹, 程文俊²

1. 南京医科大学附属无锡妇幼保健院妇科, 江苏 无锡 214000;

2. 南京医科大学第一附属医院妇科, 江苏 南京 210000

摘要: **目的** 探讨长链非编码 RNA 重编程调节器 (LincRNA-ROR) 在高级别浆液性卵巢癌 (HGSOC) 中的表达及临床意义。**方法** 选取 2011 年 1 月至 2018 年 4 月行手术治疗的 HGSOC 组织标本 58 例作为实验 I 组, 选取同期因子宫肌瘤行子宫全切除 + 双侧附件切除术患者的正常卵巢上皮组织标本 18 例作为实验 II 组, 将 20 例正常输卵管伞端组织标本作为对照组。采用实时荧光定量 PCR 法 (Real-time PCR) 分析 LincRNA-ROR 在 HGSOC 中的表达及 LincRNA-ROR 的表达与 HGSOC 的关系。**结果** 对总 RNA 提取后进行 RNA 质量鉴定, 根据组织样本提取出的 RNA 结果, 检测 RNA 纯度核酸的光度/蛋白吸光度 (A260/A280), 在 1.8 ~ 2.0 之间认定为合格。在三个不同样本的琼脂糖凝胶电泳图中能够清晰看到 3 个 RNA 电泳条带, 其中 28S/18S 条带亮度比为 2:1, 表明 RNA 完整无明显降解。三组患者组织中 LincRNA-ROR 表达水平以及 LincRNA-ROR 高表达量发生率比较差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01), 且以实验 I 组最高。临床分期 I ~ II 期、肿瘤直径 ≤ 3 cm、淋巴结未转移患者 LincRNA-ROR 高表达发生率分别明显低于临床分期 III ~ IV 期、肿瘤直径 > 3 cm、有淋巴结转移患者, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.05)。**结论** LincRNA-ROR 在 HGSOC 组织中高度表达, 且 LincRNA-ROR 高表达与临床分期高、肿瘤较大 (> 3 cm) 及有淋巴结转移相关。提示未来应进一步为筛选 HGSOC 的分子标志物和寻找 HGSOC 的分子治疗靶标进行研究。

关键词: 浆液性卵巢癌, 高级别; 长链非编码 RNA-重编程调节器; 临床特征

中图分类号: R 737.31 文献标识码: B 文章编号: 1674-8182(2019)04-0538-04

Expression of LincRNA-ROR in high-grade serous ovarian cancer and its clinical significance

LI Hui-jian*, FU Jun, ZHAO Min, CEHNG Wen-jun

* Department of Gynaecology, Wuxi Maternal and Child Health Care Hospital Affiliated

to Nanjing Medical University, Wuxi, Jiangsu 214000, China

Corresponding author: FU Jun, E-mail: little-ant512@sina.com

Abstract: Objective To investigate the expression of large intergenic non-coding RNA-regulator of reprogramming (LincRNA-ROR) in high-grade serous ovarian cancer (HGSOC) and its clinical significance. **Methods** Fifty-eight samples of HGSOC tissues of surgical resection from January 2011 to April 2018 were served as experimental I group, and 18 samples of normal epithelial ovarian tissues from total hysterectomy and bilateral adnexectomy due to hysteromyoma at the corresponding period were served as experimental II group, and 20 samples of normal oviduct umbrella end tissues were served as control group. Real time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) method was used to detect the expression of LincRNA-ROR in HGSOC and analyze its association with HGSOC. **Results** After extraction of total RNA, RNA quality appraisal was conducted. The RNA purity was detected according to RNA results extracted from tissues samples: (1) absorbance of nucleic acid/protein absorbance (A260/A280) between 1.8 - 2.0 was identified as qualified; (2) there were three electrophoretic bands in agarose gel electrophoregram with brightness ratio of 2:1 of 28S/18S in three different samples, indicating that RNA was intact and no obvious degradation. There were significant differences in LincRNA-ROR expression level and incidence of LincRNA-ROR high-expression in tissues of three groups (all $P < 0.01$)

in which experimental I group was the highest. LincRNA-ROR high-expression rates in patients with clinical staging I - II, tumor size ≤ 3 cm and without lymph node metastasis were significantly lower than those in patients with clinical staging III - IV, tumor size > 3 cm and lymph node metastasis (all $P < 0.05$). **Conclusions** LincRNA-ROR is highly expressed in HGSOC tissues. High expression of LincRNA-ROR is associated with high clinical stage, large tumors (> 3 cm) and lymph node metastasis. It is suggested that HGSOC markers should be further screened, and the molecular therapeutic targets of HGSOC should be found in the future.

Key words: Serous ovarian cancer, high grade; Large intergenic non-coding RNA-regulator of reprogramming; Clinical features

Fund program: Jiangsu Medical Innovation Team Project (CXTDA2017008)

高级别浆液性卵巢癌 (high-grade serous ovarian cancer, HGSOC) 是女性卵巢癌的一种类型, 恶性程度高, 侵袭性较强, 发展迅速^[1-2]。该病早期并无典型的临床症状, 肿瘤发生后快速往临近器官转移, 严重威胁女性的生命健康^[3]。近年来, 随着测序技术的发展, 基因在肿瘤性疾病中的研究越来越深入, 找出肿瘤发生与发展的分子机制已成为目前的研究热点。有研究显示, 长链非编码 RNA-重编程调节器 (large intergenic non-coding RNA-regulator of reprogramming, LincRNA-ROR) 在细胞重编程的过程中有着重要的调控作用^[4-6]。本研究就 LincRNA-ROR 在 HGSOC 中的表达及临床意义作如下具体分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2011 年 1 月至 2018 年 4 月我院 58 例 HGSOC 患者手术切除的肿瘤组织标本作为实验 I 组, 选取同期因子宫肌瘤行子宫全切除 + 双侧附件切除术 18 例患者的正常卵巢上皮组织标本作为实验 II 组, 20 例患者的正常输卵管伞端组织标本作为对照组。本研究经医学伦理委员会批准, 患者及其家属均同意参加本研究, 并自愿签署知情书。实验 I 组年龄 45 ~ 75 (56.62 \pm 8.47) 岁; 按照国际妇产科联盟 2014 年的分期标准: I 期 5 例, II 期 28 例, III 期 22 例, IV 期 3 例; 伴有淋巴结转移 32 例, 淋巴结未转移 26 例。实验 II 组年龄 46 ~ 73 (55.43 \pm 9.07) 岁。对照组年龄 45 ~ 72 (55.89 \pm 9.21) 岁。三组对象年龄对比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

1.2 入选标准 纳入标准: HGSOC 患者均经临床病理确诊; 年龄 ≥ 45 岁; 所有患者临床资料完整; 所有 HGSOC 患者术前均未接受放化疗。排除标准: 合并其他肿瘤疾病; 有自身免疫性疾病患者; 有严重的肝肾功能不全及消化道疾病者。

1.3 主要试剂 Trizol (美国 Invitrogen); 焦碳酸二乙酯 (DEPC, 上海生工公司); RNA 反转录试剂盒 (日本 TaKaRa 公司); 荧光定量 PCR 试剂 (日本 TaKaRa 公司); PCR 引物合成 (上海生工生物工程公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 标本处理 所有组织样本分割成若干组织块, 存放于灭菌冻存管中, 组织块直径约 5 mm, 切块后转入液氮转移罐中, 置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

1.4.2 RNA 纯度鉴定 (1) RNA 提取: 组织块置于液氮中磨碎后, 每 50 ~ 100 mg 组织加入 1 ml Trizol。每 1 ml Trizol 加入 0.2 ml 氯仿, 剧烈振荡 15 s, 室温放置 5 min。2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 10 000 \times g 离心 15 min。样品分为三层。RNA 主要在水相中, 水相体积约为所用 Trizol 试剂的 60%。把水相转移到新的 EP 管中加入等体积的异丙醇, 室温放置 10 min。2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 10 000 \times g 离心 10 min, 离心前看不出 RNA 沉淀, 离心后在管侧和管底出现胶状白色沉淀。弃上清进行下一步操作。用 75% 冰预冷的乙醇洗涤 RNA 沉淀。每使用 1 ml Trizol 至少加 1 ml 75% 乙醇。2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 不超过 7 500 \times g 离心 5 min, 弃上清。超净台中风干大约 10 min。不要过于干燥, 否则会导致 RNA 的溶解性大大降低。加入 25 ~ 200 μl 无核糖核酸酶 (RNase) 的水使 RNA 溶解。总 RNA 提取后进行 RNA 纯度鉴定。(2) 电泳: 提取各组 RNA 后, 测量其浓度, 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。各取 1 μl 用溴化乙锭 (EB) 染色 10 min, 1% 琼脂糖凝胶电泳 80 V \times 20 min, 凝胶成像系统观察并拍照。

1.4.3 互补脱氧核糖核酸 (cDNA) 的合成 混匀后放入 PCR 仪进行反转录, 反应条件: 37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s。cDNA -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 备用。

1.4.4 实时定量 PCR (Real-time PCR) 检测 LincRNA-ROR mRNA 表达水平 LincRNA-ROR 基因的引物序列: 上游, 5'-GAA GGT TCA ACA TGG AAA CTG G-3', 下游, 5'-TGA GAC CTG CTG ATC CCA TTC-3'; 内参照 GAPDH 基因的引物序列: 上游, 5'-CAC CCA CTC CTC CAC CTT TG -3', 下游, 5'-CCA CCA CCC TGT TGC TGT AG -3', Real-time PCR 反应在 ABI 7300 荧光定量 PCR 仪上进行。反应条件: 预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min 后, 进行 40 个循环反应: 94 $^{\circ}\text{C}$ 20 min, 55 ~ 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 读取循环阈值 (Ct) 值。根据相对定量法即

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 LincROR 的扩增比例。 ΔCt 值 = LincROR Ct 值 - GAPDH Ct 值。实验重复 3 次。

1.5 观察指标 (1) RNA 质量鉴定; (2) LincRNA-ROR 在不同组织类型样本中的表达水平,若患者 LincRNA-ROR 表达高于其相对表达量的平均值则定义为高表达,反之则定义为低表达; (3) LincRNA-ROR 的表达水平与 HGSOC 临床特征之间的关系;

1.6 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件处理数据。计数资料以例 (%) 表示,多组间比较用行 \times 列表 χ^2 检验;计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 总 RNA 提取 对总 RNA 提取后进行 RNA 质量鉴定,根据组织样本提取出的 RNA 结果, RNA 纯度核酸吸光度/蛋白质吸光度 (A260/A280) 在 1.8 ~ 2.0 之间认定为合格。在三个不同样本的琼脂糖凝胶电泳图中能够清晰看到 3 个 RNA 电泳条带,其中 28S/18S 条带亮度比为 2:1,表明 RNA 完整无明显降解。见图 1。

2.2 LincRNA-ROR 表达水平比较 三组患者组织中 LincRNA-ROR 表达水平以及 LincRNA-ROR 高表达量发生率比较差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01),且以实验 I 组最高。见表 1。

2.3 LincRNA-ROR 高、低表达发生率与 HGSOC 患者临床病理特征的关联 临床分期 I ~ II 期、肿瘤直径 ≤ 3 cm、淋巴结未转移患者 LincRNA-ROR 高表达发生率分别明显低于临床分期 III ~ IV 期、肿瘤直径 > 3 cm、淋巴结转移患者,差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。见表 2。

3 讨论

HGSOC 是 II 型卵巢癌的一种,由输卵管伞端前驱病变引起,晚期患者盆腔多处种植转移以及淋巴结转移^[7-8]。近年 LincRNA 普遍受到研究人员的关

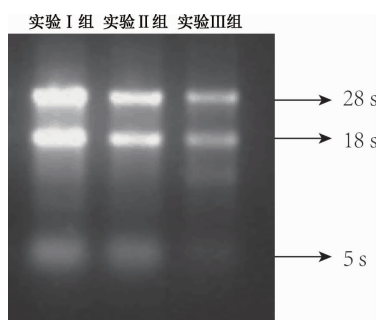


图 1 三组电泳图谱

表 1 三组患者组织中 LincRNA-ROR 表达情况比较

组别	例数	LincRNA-ROR ($\bar{x} \pm s$)	高表达 LincRNA-ROR [例 (%)]
实验 I 组	58	4.86 \pm 2.51	31 (53.45)
实验 II 组	18	1.84 \pm 1.35	5 (27.27)
对照组	20	1.65 \pm 1.45	2 (10.00)
F/χ^2 值		24.193	13.030
P 值		0.000	0.001

表 2 LincRNA-ROR 高、低表达发生率与 HGSOC 患者临床病理特征的关联 例 (%)

项目	例数	高表达 LincRNA-ROR		χ^2 值	P 值
		LincRNA-ROR ($n = 31$)	LincRNA-ROR ($n = 27$)		
年龄					
≤ 60 岁	30	17 (56.67)	13 (43.33)	0.259	0.611
> 60 岁	28	14 (50.00)	14 (50.00)		
临床分期					
I ~ II	33	13 (39.39)	20 (60.61)	6.078	0.014
III ~ IV	25	18 (72.00)	7 (29.00)		
肿瘤直径					
≤ 3 cm	26	9 (34.62)	17 (65.38)	6.718	0.010
> 3 cm	32	22 (68.75)	10 (31.25)		
淋巴结转移					
无转移	26	10 (38.46)	16 (61.54)	4.254	0.039
有转移	32	21 (65.63)	11 (34.37)		

注,这是一类长度大于 200 个核苷酸不编码蛋白质 RNA 分子^[9-10],其序列原件保守,空间二级结构较为特殊,具有复杂的亚细胞定位^[11]。LincRNA 存在于胞浆或者细胞核中,调控机体基因序列,与众多疾病有着一定的关联,故考虑可将其作为肿瘤治疗药物研究的新靶点^[12-14]。

LincRNA-ROR 与乳腺癌、肝癌等癌肿的发生转移密切相关,是 LincRNA 的一种^[15]。ROR 能够诱导多能性干细胞形成,Oct4、Sox2 以及 Nanog 等关键性转录因子也能被其调控,维持胚胎干细胞的多分化潜能,在机体氧化应激过程中有着重要的作用^[16]。在特殊条件下细胞由上皮性向间质性转化的过程称为上皮间质转化过程,上皮细胞发生极性消失,细胞间黏附能力下降,细胞获得间质性改变^[17-19]。高表达的 ROR 能够增强肿瘤细胞的生长、转移及上皮间质转化过程,进一步影响肿瘤干细胞功能^[20-21]。本研究显示,HGSOC 患者组织中 LincRNA-ROR 表达水平和 LincRNA-ROR 高表达率均明显高于良性病变患者及正常人群,这可能是由于 LincRNA-ROR 调控机体靶基因的表达,干扰 miR-145 的功能,促进机体干细胞的分化,从而促进肿瘤细胞的生长^[22]。从机体信号通路方面解释,正常细胞中,胞浆内上皮钙粘附素 (E-cadherin) 及 β 环连素 (β -catenin) 相互结合形成复合体,能维持细胞间的黏附能力,从而调控机体 Wnt/ β -catenin 信号通路^[23]。而在肿瘤细胞中,ROR

表达过量、上皮间质转化过程异常、异常激活的 Wnt/ β -catenin 抑制机体糖原合成激酶等物质对 Wnt/ β -catenin 的磷酸化,导致下游众多靶基因过度表达诱导癌细胞的转移与分化^[24]。此外,本研究结果还显示,HGSOC 临床分期高、肿瘤大、淋巴结有转移者 LincRNA-ROR 高表达发生率明显升高,提示 LincRNA-ROR 可能是肿瘤进展的生物学指标,笔者将对 LincRNA-ROR 通过某些基因调控肿瘤细胞的增殖机制以及调控某些基因的转录水平促进肿瘤增殖的机制,进一步探讨。

综上所述,本研究显示 LincRNA-ROR 在 HGSOC 组织中高度表达,且其高表达与 HGSOC 临床分期高、肿瘤较大及有淋巴结转移相关,提示 LincRNA-ROR 或可成为 HGSOC 临床诊疗的特异性指标。本研究也存在不足,未能扩大样本量进行分析,未对 LincRNA-ROR 异常表达机制深入探讨。由于 HGSOC 发病机制比较复杂,多种基因调控都参与其中,具体的作用机制有待进一步研究,但随着相关研究的深入,明确 LincRNA-ROR 的作用机制,可对其他因子的探索提供一定的依据,也可能成为 HGSOC 靶向药物研究的一个方向。

参考文献

- [1] Zhang H, Liu T, Zhang Z, et al. Integrated proteogenomic characterization of human high-grade serous ovarian cancer [J]. *Cell*, 2016, 166(3):755-765.
- [2] Webb JR, Milne K, Kroeger DR, et al. PD-L1 expression is associated with tumor-infiltrating T cells and favorable prognosis in high-grade serous ovarian cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2016, 141(2):293.
- [3] 黄礼燕, 黄安亮, 刘金星, 等. 预防性切除双附件降低高级别浆液性卵巢癌风险的临床研究 [J]. *中国实验诊断学*, 2018, 22(4):638-641.
- [4] Zhu CM, Yan F. Functions of large intergenic non-coding RNA-regulator of reprogramming [J]. *World Chinese J Digestol*, 2016, 24(3):331.
- [5] Wang J, Fu L, Koganti PP, et al. Identification and functional prediction of large intergenic noncoding RNAs (lincRNAs) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Mar Biotechnol*, 2016, 18(2):271-282.
- [6] Lu L, Sun K, Chen X, et al. Genome-wide survey by ChIP-seq reveals YY1 regulation of lincRNAs in skeletal myogenesis [J]. *Embo J*, 2014, 32(19):2575-2588.
- [7] 杨晗, 马毓梅, 夏娜, 等. 49 例晚期高级别浆液性卵巢癌的预后相关因素分析 [J]. *肿瘤学杂志*, 2015, 21(11):880-884.
- [8] 刘宗瑜, 杨瑞琦, 李丹, 等. 应用克隆进化理念治疗高级别浆液性卵巢癌 [J]. *中国妇幼保健*, 2018, 33(2):464-467.
- [9] 刘芳腾, 曲强冠, 朱正明, 等. 长链非编码 RNA CRNDE 在恶性肿瘤中的研究进展 [J]. *广东医学*, 2017, 38(11):1767-1769.
- [10] 席小龙, 姜波健, 俞继卫. 长链非编码 RNA 在胃癌中的作用研究进展 [J]. *国际外科学杂志*, 2014, 41(7):484-486.
- [11] Jiang GX, Luo X, Zhang LL, et al. Conservation of long noncoding RNA and its application in screening long noncoding RNA in non-model organisms [J]. *Acad J Second Mil Med Univ*, 2017, 38(10):1304-1310.
- [12] 陈登宇, 徐志本, 郑庆委. 下调 lincRNA HOTAIR 对胃癌细胞迁移及增殖抑制作用的研究 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2015, 37(8):1081-1086.
- [13] 叶辰阳, 柴莹. 长链非编码 RNA 与肺癌相关性的研究进展 [J]. *国际呼吸杂志*, 2015, 35(6):449-452.
- [14] Shang C, Guo Y, Zhang J, et al. Silence of long noncoding RNA UCA1 inhibits malignant proliferation and chemotherapy resistance to adriamycin in gastric cancer [J]. *Can Chemo Pharmacol*, 2016, 77(5):1061.
- [15] Zhan HX, Wang Y, Li C, et al. LincRNA-ROR promotes invasion, metastasis and tumor growth in pancreatic cancer through activating ZEB1 pathway [J]. *Cancer Lett*, 2016, 374(2):261-271.
- [16] Wang Y, Xu Z, Jiang J, et al. Endogenous miRNA sponge lincRNA-RoR regulates Oct4, Nanog, and Sox2 in human embryonic stem cell self-renewal [J]. *Dev Cell*, 2013, 25(1):69-80.
- [17] 诸葛春风, 刘诗权. 上皮-间质转化在结直肠癌中的研究进展 [J]. *胃肠病学*, 2016, 21(5):307-310.
- [18] Ning L, Li Z, Wei D, et al. LincRNA, NEAT1 is a prognosis biomarker and regulates cancer progression via epithelial-mesenchymal transition in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Cancer Biomarkers*, 2017, 19(1):75-83.
- [19] 丁祥黎, 龚泉, 颜汝平, 等. lincRNA 在调控膀胱癌上皮-间质转化中作用的研究进展 [J]. *实用肿瘤杂志*, 2017, 32(3):275.
- [20] 李冰, 熊正方, 郭亚民. 长链非编码 RNA ROR 通过 notch1 蛋白调控胰腺癌细胞的增殖凋亡 [J]. *实用医学杂志*, 2017, 33(12):1922-1927.
- [21] 骆青松, 胡晓焯, 朱垚, 等. 长链非编码 RNA LINC01140 对急性髓系白血病 U937 细胞增殖及周期的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2018, 40(9):768-773.
- [22] 夏凡. Linc-ROR 与 p53 通过 miRNA-145 靶向 Oct4、Sox2 调控肺癌干细胞干性的功能和机制研究 [D]. 上海:第二军医大学, 2017.
- [23] 田鲜艳, 李荣岗, 陈晨. II 型子宫内膜癌中 E-cadherin、 β -catenin 和 HER2 的表达及意义 [J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(14):2298.
- [24] 聂金霞, 刘娅, 徐明明. 长链非编码 RNA PVT1 调控 miR-551 通过 Wnt 信号通路对卵巢癌迁移和侵袭的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(2):232-238.