

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2019.12.037

◇临床医学◇

子宫内膜癌中癌症相关区域长链非编码 RNA5 表达意义及预后价值

管群, 张秦, 任青玲

作者单位: 南京中医药大学附属医院妇科, 江苏 南京 210029

通信作者: 任青玲, 女, 主任医师, 研究方向为妇科肿瘤, E-mail: 2200732@sina.com

摘要: **目的** 探讨子宫内膜癌中癌症相关区域长链非编码 RNA5 (CARLo-5) 表达意义及对预后的预测价值。 **方法** 于 2011 年 1 月至 2013 年 1 月, 采用实时荧光定量多聚核苷酸链式反应 (qPCR) 检测采集于南京中医药大学附属医院的 79 份子宫内膜癌组织标本和 50 份正常子宫内膜组织标本 CARLo-5 表达水平, 并分析其与子宫内膜癌病人临床病理参数及总生存期的关系。所有病人均接受至少 5 年的随访, 记录病人的 5 年总生存期 (OS) 和无进展生存期 (PFS)。 **结果** 子宫内膜癌组织 CARLo-5 表达量 (3.76 ± 0.78) 显著高于正常子宫内膜组织 (0.38 ± 0.12), 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); CARLo-5 表达量与年龄、子宫内膜癌病理类型无关 ($P > 0.05$), 与国际妇产科联盟 (FIGO) 分期、细胞分化程度、血管浸润程度、淋巴结转移情况有关 ($P < 0.05$); 截止随访时间, 5 年 PFS 率为 50.63% (40/79), 5 年 OS 率为 68.35% (54/79); 无病生存者 CARLo-5 表达量低于带瘤生存者, 存活者 CARLo-5 表达量低于死亡者, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); Cox 多因素分析显示, 年龄、FIGO 分期、细胞分化程度、血管浸润程度、淋巴结转移、CARLo-5 表达与子宫内膜癌病人 OS 有关 ($P < 0.05$)。经受试者工作特征曲线 (ROC) 的绘制和分析, CARLo-5 表达量的临界值为 3.31 时, 预测 5 年生存率的灵敏度和特异度最高, AUC 为 0.817, 灵敏度和特异度分别为 76.0%、77.8%; 以 3.31 为 CARLo-5 的临界值, 分为 CARLo-5 ≤ 3.31 组 (51 例) 和 CARLo-5 > 3.31 组 (28 例), 两组 5 年 OS 率分别为 78.43% (40/51)、50.0% (14/28), 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 **结论** CARLo-5 高表达可能参与子宫内膜癌发生、发展, 且其是影响病人预后的独立危险因素, 可用于预测子宫内膜癌病人预后。

关键词: 子宫内膜肿瘤; 长链非编码 RNA; 肿瘤标记, 生物学; 实时聚合酶链反应; 临床病理; 预后

Expression of cancer-associated region long non-coding RNA 5 in endometrial carcinoma and its value in predicting the prognosis

GUAN Qun, ZHANG Qin, REN Qingling

Author Affiliation: Department of Gynecology, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210029, China

Abstract: Objective To investigate the significance of the expression of cancer-associated region long non-coding RNA (CARLo-5) in endometrial carcinoma and its value in predicting the prognosis. **Methods** The expression levels of CARLo-5 in 79 specimens of endometrial carcinoma and 50 normal endometrial tissue specimens which were collected from the Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine between January 2011 and January 2013 were detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The relationship between clinicopathological parameters and the overall survival of patients with endometrial carcinoma was analyzed. All patients were followed for at least 5 years, and the 5-year overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) were recorded. **Results** The expression level of CARLo-5 in endometrial carcinoma tissues was significantly higher than that in normal endometrial tissues [(3.76 ± 0.78) vs. (0.38 ± 0.12)] ($P < 0.01$). The expression of CARLo-5 was not related to age or the pathological type of endometrial carcinoma ($P > 0.05$), but it was related to the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) staging, cell differentiation degree, degree of vascular invasion or lymph node metastasis ($P < 0.05$). At the end of follow-up, the 5-year PFS rate and OS rate were 50.63% (40/79) and 68.35% (54/79), respectively. The expression quantity of CARLo-5 in disease-free survivors was lower than that in tumor-survivors, and it was lower in survivors than in the dead ($P < 0.01$). Cox multivariate analysis showed that age, FIGO staging, cell differentiation degree, degree of vascular invasion, lymph node metastasis and the expression of CARLo-5 expression were related to the OS of patients with endometrial carcinoma ($P < 0.05$). The receiver operating characteristic (ROC) curve analysis showed that when the critical value of the expression quantity of CARLo-5 was 3.31, the sensitivity and specificity in predicting the 5-year survival rate were the highest. The AUC, sensitivity and specificity were 0.817, 76.0% and 77.8%, respectively. With 3.31 as the critical value, the patients were divid-

ed into ≤ 3.31 group (51 cases) and > 3.31 group (28 cases). The 5-year OS rates of the two groups were 78.43% (40/51) and 50.0% (14/28) respectively ($P < 0.05$). **Conclusion** The high expression of CARLo-5 may be involved in the occurrence and development of endometrial carcinoma, and it is an independent risk factor for the prognosis. It can be used for predicting the prognosis of patients with endometrial carcinoma.

Key words: Endometrial neoplasms; Long non-coding RNA; Tumor markers, biological; Real-time polymerase chain reaction; Clinical pathology; Prognosis

子宫内膜癌的发病机制尚未完全明确。最近的研究表明,长链非编码RNA(Lnc RNA)存在于细胞质和细胞核,可调节基因表达水平,其异常表达与肿瘤发生密切相关^[1]。癌症相关区域长链非编码RNA5(CARLo-5)又称结肠癌相关转录因子-1(CCAT-1),最初在结肠癌中发现,后发现在肺癌、肝癌等恶性肿瘤中也呈高表达^[2-3],但CARLo-5与子宫内膜癌临床病理参数关系的研究报道相对较少。本研究分析CARLo-5表达与子宫内膜癌病人临床病理参数及预后的关系,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2011年1月至2013年1月南京中医药大学附属医院经手术病理确诊的初治子宫内膜癌病人79例作为子宫内膜癌组,选取同期该院年龄相匹配的行子宫全切除术但病理结果证实为正常子宫内膜的妇科良性疾疾病病人50例作为对照组,无其他原发性肿瘤。两组均排除术前接受辅助治疗(如激素治疗、放化疗、内分泌治疗等)、既往恶性肿瘤史、病例或随访资料不完整的病人。

1.2 资料收集及随访 收集79例子宫内膜癌病人的病例资料,包括年龄、组织分级、肌层浸润深度、淋巴结转移情况等。术后采用电话、门诊复查等方式进行随访,随访截止时间为2018年1月,所有病人都接受至少5年的随访,记录病人的5年总生存期(OS)和无进展生存期(PFS)。病人或其近亲属知情同意,本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

1.3 实验方法 收集所有病人手术切除的新鲜组织标本,取得标本后立即放入液氮中速冻,10 min后转入 -80°C 冰箱保存备用。采用实时荧光定量多聚核苷酸链式反应(qPCR)检测79份子宫内膜癌组织标本和50份正常子宫内膜组织标本CARLo-5表达。具体方法:RNA提取后用0.1%焦碳酸二乙酯(DEPC)水调零后,取2 μL RNA稀释液进行浓度和纯度检测,如 $1.8 < A_{260}/A_{280} < 2.0$ 时, RNA纯度合格,即刻读取RNA浓度。采用Invitrogen公司的反转录试剂盒进行从RNA到cDNA的制备, CARLo-5引物序列,正向序列:5'-GCCACAAATCAACAA-

CAACAACAACAA-3',反向序列:5'-AGAGTGATGCCAAGGTGTTATTGTCAA-3'; GAPSH引物序列,正向序列:5'-CGGATTTGGTCGTATTGGG-3',反向序列:5'-TGCTGGAAGATGGTGATGGGATT-3'。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min,循环参数:95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,共循环40次,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min;以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参照,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算目的基因mRNA的相对表达量。

1.4 统计学方法 采用SPSS 18.0统计学软件进行数据分析,计数资料用率表示,采用 χ^2 检验,资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用成组 t 检验或方差分析,采用Cox分析法做影响因素分析,采用KM生存模型进行生存率分析,组间比较行Log-rank检验。此外绘制受试者工作特征曲线(ROC)分析CARLo-5预测子宫内膜癌病人的预后的价值,并用抛物线估算法计算ROC曲线下面积(AUC)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 子宫内膜癌组织和正常子宫内膜组织CARLo-5表达量比较 子宫内膜癌组织CARLo-5表达量为 (3.76 ± 0.78) 显著高于正常子宫内膜组织的 (0.38 ± 0.12) ,差异有统计学意义($t = 30.372, P < 0.01$)。

2.2 CARLo-5表达与子宫内膜癌病人临床病理的关系 CARLo-5表达与年龄、子宫内膜癌病理类型无关($P > 0.05$),与国际妇产科联盟(FIGO)分期、细胞分化程度、血管浸润程度、淋巴结转移情况有关($P < 0.05$),见表1。

2.3 预后分析 截止随访时间,79例子宫内膜癌病人的5年PFS率为50.63%(40/79),中位PFS时间为69.8个月,5年OS率为68.35%(54/79),中位OS为79.2个月,见图1。

2.4 子宫内膜癌病人CARLo-5表达量与预后的关系 79例子宫内膜癌病人中无病生存者(40例)CARLo-5表达量 (3.15 ± 0.67) 低于带瘤生存者(14例) (3.81 ± 0.72) ,差异有统计学意义($t = 3.113, P = 0.003$);存活者(54例)CARLo-5表达量 (3.32 ± 0.71) 低于死亡者(25例) (4.71 ± 0.89) ,差异有统计学意义($t = 7.456, P < 0.01$)。

表1 CARLo-5表达与子宫内膜癌病人临床病理参数的关系 $\bar{x} \pm s$

项目	例数	CARLo-5表达量	$t(F)$ 值	P 值
年龄			0.690	0.492
<60岁	24	3.68±0.69		
≥60岁	55	3.80±0.72		
病理类型			0.309	0.758
腺癌	69	3.77±0.76		
非腺癌	10	3.69±0.81		
FIGO分期			3.361	0.001
I ~ II	66	3.64±0.71		
III	13	4.39±0.86		
细胞分化程度			(20.327)	<0.010
G ₁	23	3.15±0.67		
G ₂	41	3.77±0.72		
G ₃	15	4.69±0.83		
血管浸润			6.612	<0.010
0 ~ 50%	48	3.35±0.64		
≥50%	31	4.40±0.76		
淋巴结转移			3.873	<0.010
是	19	4.42±0.72		
否	60	3.55±0.89		

注:CARLo-5为癌症相关区域长链非编码RNA5,FIGO为国际妇产科联盟

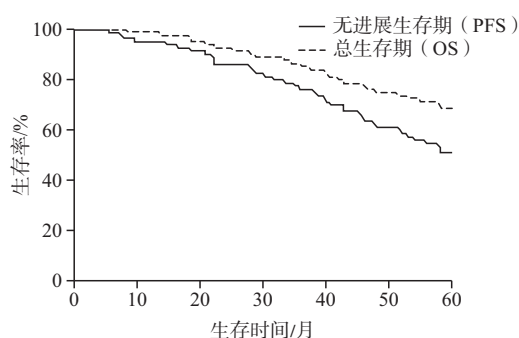


图1 子宫内膜癌病人79例生存曲线图

2.5 子宫内膜癌病人总生存期(OS)影响因素的Cox分析 多因素分析显示,年龄、FIGO分期、细胞分化程度、血管浸润程度、淋巴结转移、CARLo-5表

达与子宫内膜癌病人OS有关($P < 0.05$),见表2。

2.6 CARLo-5对子宫内膜癌病人预后的预测价值 经过ROC曲线的绘制和分析(见图2),发现当CARLo-5表达量的临界值为3.31时,预测5年生存率AUC为0.817,灵敏度和特异度最高,分别为76.0%、77.8%。以3.31为临界值,分为≤3.31组(51例)和>3.31组(28例),两组5年OS率分别为78.43%(40/51)、50.0%(14/28),差异有统计学意义(Log-rank = 7.609, $P = 0.006$),见图3。

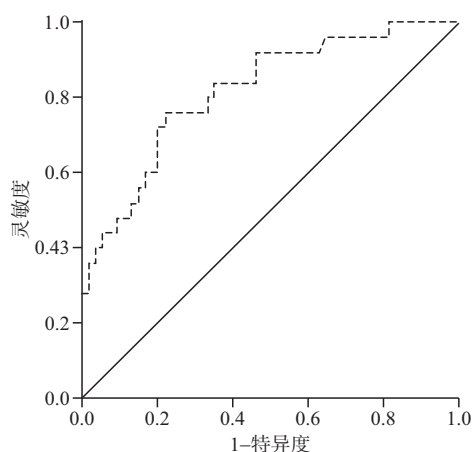


图2 CARLo-5预测子宫内膜癌病人79例预后的受试者工作特征曲线(ROC)

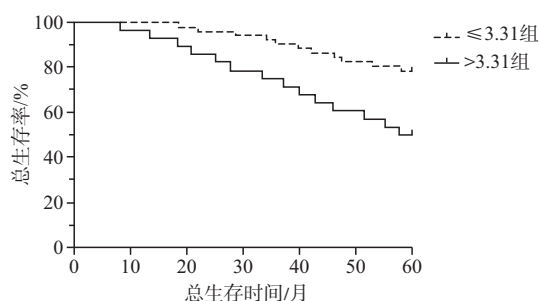


图3 子宫内膜癌病人79例癌症相关区域长链非编码RNA5 (CARLo-5)≤3.31组和CARLo-5>3.31组5年总生存曲线图

3 讨论

Lnc RNA是一种长度为200个核苷酸的非编码RNA,近年来越来越多的证据显示,LncRNA可调控多种细胞凋亡、增殖、损伤、分化等过程,在疾病发

表2 子宫内膜癌病人79例总生存期(OS)影响因素的Cox分析

项目	单因素分析		多因素分析	
	P 值	$RR(95\%CI)$	P 值	$RR(95\%CI)$
年龄(<60 vs. ≥60岁)	0.042	1.752(1.161 ~ 2.351)	0.021	1.954(1.351 ~ 2.615)
病理类型(腺癌 vs. 非腺癌)	0.315	0.895(0.513 ~ 1.102)		
FIGO分期(I ~ II vs. III ~ IV)	0.003	2.864(1.305 ~ 3.615)	0.035	1.812(1.512 ~ 2.234)
细胞分化程度(G ₁ vs. G ₂ ~ G ₃ 期)	0.015	1.638(1.305 ~ 2.128)	0.0298	2.315(1.346 ~ 3.016)
血管浸润(0 ~ 50% vs. ≥50%)	<0.010	4.351(3.164 ~ 6.205)	<0.010	6.581(4.431 ~ 8.946)
淋巴结转移(是 vs. 否)	<0.010	3.619(2.021 ~ 5.313)	<0.010	4.261(1.612 ~ 7.612)
CARLo-5表达(低 vs. 高)	<0.010	2.987(1.564 ~ 4.351)	<0.010	7.612(3.315 ~ 12.618)

注:FIGO为国际妇产科联盟,CARLo-5为癌症相关区域长链非编码RNA5

生、进展中发挥广泛的生物学作用^[4-5]。有学者指出, LncRNA可能参与癌症发生、发展^[6-7]。CARLo-5为LncRNA的一种,最初由Nissan等发现其在结直肠癌、癌前病变中呈高表达,随着临床研究深入,发现CARLo-5在其他肿瘤中也呈高表达^[8-9]。Dou等^[10]指出, CARLo-5基因敲除可抑制肿瘤生长,其可作为肝癌一种新的治疗靶点。Lai等^[11]报道,人肝癌组织中LncRNA CARLo-5是乳腺癌预后的潜在生物标志物。Zhang等^[12]指出, CARLo-5在肝内胆管癌组织中呈高表达,且与肿瘤进展密切相关;但子宫内膜癌病人CARLo-5表达及其与临床病理参数、预后关系的报道尚少。

本研究分析79例子宫内膜癌和50例正常子宫内膜癌CARLo-5表达情况,发现子宫内膜组织中CARLo-5表达量显著高于正常子宫内膜癌组织($P < 0.05$),说明子宫内膜癌组织CARLo-5表达上调, Zhao等^[13]、熊加秀等^[14]等研究中也发现与正常组织比较,癌组织中CARLo-5表达上调,本研究与其结果一致;但其具体的生物学功能尚未明确,推测CARLo-5可能通过抑制细胞凋亡诱导肿瘤细胞增殖。Mcclelland等^[15]研究发现CARLo-5表达与癌症的易感性增加有关,可能参与细胞周期调控和肿瘤进展;Liu等^[16]指出,肿瘤分期高、伴随淋巴结转移的胃癌病人CARLo-5表达高于肿瘤分期低、无淋巴结转移的病人。那么, CARLo-5是否在子宫内膜癌的发展中起相同作用尚有待观察。本研究发现, CARLo-5表达量与FIGO分期、细胞分化程度、血管浸润程度、淋巴结转移有关($P < 0.05$),原因可能为CARLo-5通过调控基质金属蛋白酶(MMP)2、MMP9,促进细胞外基质降解,促使肿瘤细胞侵袭和转移。另外, Cox回归分析显示,除年龄、淋巴结转移等传统因素外, CARLo-5高表达也是影响子宫内膜癌病人OS的独立危险因素。以上结果说明, CARLo-5可能在子宫内膜癌进展中发挥重要作用,且有望成为监测子宫内膜癌病人预后的重要指标。Wang等^[17]指出, CARLo-5与肝癌病人的预后密切相关,可作为预测预后的独立因子,本研究结果与其一致。

综上所述,子宫内膜癌组织中CARLo-5表达升高,其与肿瘤分期、血管浸润程度、淋巴结转移及预后密切相关。

参考文献

- [1] ZHANG J, GAO C, MENG M, et al. Long noncoding RNA MHRT protects cardiomyocytes against H2O2-induced apoptosis[J]. *Biomol Ther*, 2016, 24(1): 19-24.
- [2] ZHANG J, GAO Y. CCAT-1 promotes proliferation and inhibits apoptosis of cervical cancer cells via the Wnt signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(40): 68059-68070.
- [3] OZAWA, T, MATSUYAMA, T, TOIYAMA, Y, et al. CCAT1 and CCAT2 long noncoding RNAs, located within the 8q.24.21 'gene desert', serve as important prognostic biomarkers in colorectal cancer[J]. *Ann Oncol*, 2017, 28(8): 1882-1888.
- [4] ZEMMOUR D, PRATAMA A, LOUGHHEAD SM, et al. Flicr, a long noncoding RNA, modulates Foxp3 expression and autoimmunity[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(17): E3472-3472, E3480. DOI: 10.1073/pnas.1700946114.
- [5] ALVAREZ - DOMINGUEZ JR, LODISH HF. Emerging mechanisms of long noncoding RNA function during normal and malignant hematopoiesis[J]. *Blood*, 2017, 130(18): 1965-1975.
- [6] CHIU HS, SOMVANSHI S, PATEL E, et al. Pan-cancer analysis of lncRNA regulation supports their targeting of cancer genes in each tumor context[J]. *Cell Rep*, 2018, 23(1): 297-312.
- [7] CUI C, ZHAI D, CAI L, et al. Long noncoding RNA HEIH promotes colorectal cancer tumorigenesis via counteracting miR-939-Mediated transcriptional repression of Bcl-xL [J]. *Cancer Res Treat*, 2018, 50(3): 992-1008.
- [8] MIZRAHI I, MAZEH H, GRINBAUM R, et al. Colon cancer associated transcript-1 (CCAT1) expression in adenocarcinoma of the stomach[J]. *J Cancer*, 2015, 6(2): 105-110.
- [9] 李景林, 郑汪洋, 李鑫恒, 等. lncRNA-CCAT1与消化道肿瘤关系的研究进展[J]. *基础医学与临床*, 2018, 38(2): 237-240.
- [10] DOU C, SUN L, JIN X, et al. Long non-coding RNA CARLo-5 promotes tumor progression in hepatocellular carcinoma via suppressing miR-200b expression[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(41): 70172-70182.
- [11] LAI Y, CHEN Y, LIN Y, et al. Down-regulation of lncRNA CCAT1 enhances radiosensitivity via regulating miR-148b in breast cancer[J]. *Cell Biol Int*, 2018, 42(2): 227-236.
- [12] ZHANG S, XIAO J, CHAI Y, et al. lncRNA-CCAT1 Promotes Migration, Invasion, and EMT in Intrahepatic Cholangiocarcinoma Through Suppressing miR-152 [J]. *Dig Dis Sci*, 2017, 62(11): 3050-3058.
- [13] ZHAO X, WEI X, ZHAO L, et al. The rs6983267 SNP and long non-coding RNA CARLo-5 are associated with endometrial carcinoma[J]. *Environ Mol Mutagen*, 2016, 57(7): 508-515.
- [14] 熊加秀, 叶棋浓, 卫勃, 等. 敲低Runx2相关转录因子2(Runx2)表达抑制结肠癌细胞生长和迁移[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2016, 32(7): 950-953.
- [15] MCCLELLAND ML, MESH K, LORENZANA E, et al. CCAT1 is an enhancer-templated RNA that predicts BET sensitivity in colorectal cancer[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(2): 639-652.
- [16] LIU JN, SHANGGUAN YM. Long non-coding RNA CARLo-5 up-regulation associates with poor prognosis in patients suffering gastric cancer[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(3): 530-534.
- [17] WANG F, XIE C, ZHAO W, et al. Long non-coding RNA CARLo-5 expression is associated with disease progression and predicts outcome in hepatocellular carcinoma patients[J]. *Clin Exp Med*, 2017, 17(1): 33-43.

(收稿日期: 2018-10-23, 修回日期: 2019-01-24)