

- ment C3 and superoxide dismutase in patients with moderate-to-severe obstructive sleep apnea hypopnea syndrome [J]. *Biomark Med*, 2018, 12(3):217-228.
- [8] 史一君, 李国歌, 钱玲焯, 等. 补体系统在阿尔茨海默病中的研究进展[J]. *中华检验医学杂志*, 2019, 42(12):994-997.
- [9] 周海舟, 关秀茹. 补体系统在系统性红斑狼疮诊疗中的价值[J]. *中华检验医学杂志*, 2019, 42(12):1002-1006.
- [10] 朱月香, 李丽莎, 杨冬明, 等. 过敏性鼻炎集群皮下注射免疫治疗二例[J]. *中华临床免疫和变态反应杂志*, 2019, 13(5):387-390.
- [11] TROLDORF A, STEFFENSEN R, TRENDELEBURG M, et al. Ficolin-3 deficiency is associated with disease and an increased risk of systemic lupus erythematosus [J]. *J Clin Immunol*, 2019, 39(9):421-429.
- [12] HE YD, XU BN, WANG ML, et al. Dysregulation of complement system during pregnancy in patients with preeclampsia: a prospective study [J]. *Mol Immunol*, 2020, 122(1):69-79.
- [13] MANSOOR N, WAHID F, AZAM M, et al. Molecular mechanisms of complement system proteins and matrix metalloproteinases in the pathogenesis of age-related macular degeneration [J]. *Curr Mol Med*, 2019, 19(10):705-718.
- [14] CAI G, LI L, CHEN Y, et al. Complement C3 gene polymorphisms are associated with lipid levels, but not the risk of coronary artery disease: a case-control study [J]. *Lipids Health Dis*, 2019, 18(1):217-223.
- [15] 郭艳霞. 血清中补体C3水平与小儿支气管哮喘发病率及患儿病情的关系[J]. *国际检验医学杂志*, 2018, 39(12):1514-1516.
- [16] 郎军添, 孙爱华, 范静平, 等. 变应性鼻炎大鼠鼻黏膜补体C3和C4 mRNA的表达[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2006, 41(12):928-931.
- [17] TOMAZIC PV, BIRNER-GRUENBERGER R, LEITNER A, et al. Nasal mucus proteomic changes reflect altered immune responses and epithelial permeability in patients with allergic rhinitis [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2014, 133(3):741-750.
- [18] 张燕霞, 刘燕, 吕国锋, 等. 儿童支气管哮喘合并肺炎支原体感染外周血 MCP-1 和 CYSLTS 与 Ficolin-3 水平 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2021, 31(21):3346-3349.
- [19] 胡晓春, 杨礼丽, 李霞. 过敏性鼻炎发病的危险因素与护理干预措施 [J]. *护理实践与研究*, 2019, 16(16):101-102.

(收稿日期:2020-08-04, 修回日期:2022-01-07)

引用本文:万全会,徐晓宁,王刘玉,等.长链非编码RNA-ROR在骨肉瘤组织中表达及对预后的影响[J].*安徽医药*, 2022, 26(7):1332-1335.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.07.014.

◇临床医学◇



长链非编码RNA-ROR在骨肉瘤组织中表达及对预后的影响

万全会¹,徐晓宁¹,王刘玉¹,李刚²

作者单位:¹南阳市第二人民医院骨科,河南 南阳473000;

²郑州大学第一附属医院肿瘤科,河南 郑州450001

通信作者:徐晓宁,女,副主任医师,研究方向为肿瘤专业,Email:niangao5566@126.com

基金项目:2019年河南省科技攻关计划(LHGJ20190168)

摘要: **目的** 探讨长链非编码-重编程调节器(LncRNA-ROR)在骨肉瘤组织中表达及对病人预后的影响。**方法** 选取南阳市第二人民医院2008年2月至2014年5月行手术切除的原发性骨肉瘤病人96例,采用实时荧光定量PCR术分析骨肉瘤和正常骨组织中LncRNA-ROR表达水平,所有病人术后随访,随访时间范围7~60个月,记录病人生存时间,获得病人5年生存率。使用Kaplan-Meier法开展生存分析,使用Cox回归模型分析生存时间的相关影响因素。**结果** LncRNA-ROR在骨肉瘤组织中表达量为(2.31±0.20),高于正常骨组织的(1.03±0.11)($t=39.94, P<0.001$);LncRNA-ROR在不同Enneking分期、KPS评分及是否发生远处转移间的表达量差异有统计学意义($P<0.05$);生存分析显示,低表达组病人中位生存时间51.00个月,生存时间(45.42±3.26)个月,5年生存率50.00%,均高于高表达组病人,分别为21.00个月、(27.31±2.04)个月和18.57%,差异有统计学意义($\chi^2=13.20, P<0.001$);Enneking分期、远处转移和LncRNA-ROR表达是影响骨肉瘤病人5年生存率的独立风险因素($HR=2.15, 2.83$ 和 $2.09, P<0.05$)。**结论** LncRNA-ROR在骨肉瘤组织中表达量升高,且与不良预后有关,是病人生存时间的独立影响因素。

关键词: 骨肉瘤; 长链非编码RNA-重编程调节器; 生存分析; Cox回归分析

Expression of long non-coding RNA-ROR in osteosarcoma tissues and its influence on prognosis

WANG Quanhui¹, XU Xiaoning¹, WANG Liuyu¹, LI Gang²

Author Affiliations:¹Department of Orthopedics, Nanyang Second People's Hospital, Nanyang, Henan 473000, China;

²Department of Oncology, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450001, China

Abstract: Objective To investigate the expression of long non-coding RNA-regulator of reprogramming (LncRNA-ROR) in osteosarcoma tissues and its influence on prognosis of patients. **Methods** A total of 96 cases of patients with primary osteosarcoma who underwent surgical resection in Nanyang Second People's Hospital from February 2008 to May 2014 were selected. The expression levels of LncRNA-ROR in osteosarcoma and normal bone tissues were detected by real-time fluorescent quantitative PCR. All patients were followed up after surgery. And the follow-up time ranged from 7 to 60 months. The survival times of the patients were recorded, and the 5-year survival rate of the patients was obtained. Kaplan-Meier method was used to analyze the survival analysis. The Cox regression model was used to analyze the related influencing factors of survival time. **Results** The relative expression level of LncRNA-ROR in osteosarcoma tissues was (2.31 ± 0.20) , which was higher than that of normal bone tissue, which was (1.03 ± 0.11) ($t=39.94$, $P<0.001$). The differences of the expression levels of LncRNA-ROR among different Enneking stages, KPS scores and whether distant metastasis occurred were statistically significant ($P<0.05$). Survival analysis showed that the median survival time, average survival time and the 5-year survival rate in the low expression group were 51.00 months, (45.42 ± 3.26) months and 50.00%, respectively, which were higher than those in the high expression group, which was 21.00 months, (27.31 ± 2.04) months and 18.57% ($\chi^2=13.20$, $P<0.001$). Cox proportional hazard regression model showed that Enneking stage, distant metastasis and LncRNA-ROR expression were independent risk factors affecting 5-year survival rate of osteosarcoma patients ($HR=2.15, 2.83$ and 2.09 , $P<0.05$). **Conclusions** The expression level of LncRNA-ROR expressed in osteosarcoma tissues is increased. It is related with poor prognosis, and is an independent factor affecting the survival time of patients.

Key words: Osteosarcoma; Long non-coding RNA-reprogramming; Survival analysis; Cox regression analysis

骨肉瘤恶性程度高、侵袭力强、易发生早期转移,有约30%的病人确诊时已存在肺组织转移^[1],尽管新的辅助治疗手段不断提高,但晚期及发生转移病人5年生存率依然较低^[2]。尽管目前对骨肉瘤病因、发病机制及诊疗等方面有所了解,但影响骨肉瘤发生及进展的关键性基因尚不清楚,为该病临床分子诊断及靶向药物治疗带来了困难。

长链非编码RNA(long non-coding RNA, LncRNA)作为机体内普遍存在的一种长度>200 nt的无编码蛋白功能的RNA,在诸多疾病病理过程中发挥重要作用^[3],尤其是参与了多种癌种的病程进程,参与调控了癌细胞增殖、凋亡、转移、侵袭等过程^[4]。LncRNA-重编程调节器(LncRNA-regulator of reprogramming, LncRNA-ROR)是一种重要的LncRNA,在细胞重编程过程中发挥重要的调控作用^[5],有研究指出,慢性盆腔炎病人血清中LncRNA-ROR水平升高^[6]。亦有研究指出,LncRNA-ROR表达水平与心力衰竭严重程度相关^[7]。近年来研究发现,其在乳腺癌^[8]、前列腺癌^[9]、卵巢癌^[10]等多种恶性肿瘤组织中表达异常。但其是否参与了骨肉瘤进程,鲜有报道。本研究分析了LncRNA-ROR在骨肉瘤组织中表达情况,比较了不同骨肉瘤临床病理指标该基因表达差异,探讨其对病人预后的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取南阳市第二人民医院2008年2月至2014年5月行手术切除的原发性骨肉瘤病人,纳入标准:①病人入院前未行放化疗;②经临床、影像学及术后病理学检查确诊为原发性骨肉瘤。排除标准:①同时患有其他恶性肿瘤或者其他

恶性肿瘤继发骨肉瘤者;②有代谢性骨病病史,心肝肾等重要脏器严重功能障碍者;③不能完成随访或随访资料不全者。共纳入96例,男性58例,女性38例,年龄范围7~64岁,中位年龄21岁。肿瘤位置:股骨42例,胫骨19例,其他35例。按照Enneking分期标准:ⅡA期33例,ⅡB期43例,Ⅲ期20例。组织学分型:成骨细胞型45例,软骨细胞型15例,成纤维细胞型18例,混合型18例。同期,留取行手术治疗的非肿瘤病人新鲜正常骨组织45例,中位年龄23岁,与骨肉瘤病人差异无统计学意义($Z=1.75$, $P=0.079$)。

本研究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。

1.2 方法

1.2.1 采用实时荧光定量PCR术分析骨肉瘤和正常骨组织中LncRNA-ROR表达水平 取液氮中保存的骨肉瘤及正常骨组织,剪碎,冰浴中研磨充分,按Trizol试剂盒(美国Invitrogen公司,批号15596-026)说明对组织中总RNA进行提取,重复进行3次,利用核酸蛋白定量仪(美国Invitrogen公司,型号Qubit 3.0)分别对260 nm和280 nm处吸光度OD值进行测定,OD260/OD280在1.70~2.10为合格。将总RNA按反转录试剂盒(美国Fermentas,批号K1622)操作说明反转录成cDNA。按照应该定量PCR试剂盒(日本TaKaRa公司,批号AK5805)说明利用实时荧光定量PCR仪(美国ABI公司,型号StepOnePlus)对引物(由上海生工生物公司设计合成)扩增。引物序列:LncRNA-ROR:正向5'-GAGGGGACATTTTC-CATCCT-3',反向5'-TCCAGTGGCTGTGCTAGATG-

3' ; GAPDH: 正向 5' -AATGGACAACCTGGTCGTG-GAC-3', 反向 5' -CCCTCCAGGGGATCTGTTT-3'。反应条件: 95 °C、3 min, 95 °C、30 s, 59 °C、30 s, 74 °C、30 s, 循环 38 次, 独立重复实验 6 次。用 2^{-ΔΔCt} 法计算骨肉瘤和正常骨组织中 LncRNA-ROR 表达量。

1.2.2 病例随访 所有病人均在术后第 1 天开始随访, 对病人进行电话随访、门诊随诊等, 截至 2019 年 5 月 31 日, 随访时间范围 7 ~ 60 个月, 记录病人生存时间, 获得病人 5 年生存率。

1.3 统计学方法 使用 SPSS 21.0 统计软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较行 *t* 检验, 多组间比较行单因素方差分析, 生存分析使用 Kaplan-Meier 法, 病人预后生存时间影响因素分析采用 Cox 回归模型。P < 0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LncRNA-ROR 在骨肉瘤和正常骨组织中表达水平 LncRNA-ROR 在骨肉瘤组织中表达量为 (2.31±0.20), 正常骨组织中则为 (1.03±0.11), 差异有统计学意义 (*t* = 39.94, *P* < 0.001)。

2.2 LncRNA-ROR 在不同临床特征指标的骨肉瘤组织中表达差异 LncRNA-ROR 在不同年龄、性别、肿瘤位置、肿瘤大小、组织学分型及是否发生病理性骨折间的表达量差异无统计学意义 (*P* > 0.05), 而在不同 Enneking 分期、KPS 评分及是否发生远处转移间的表达量差异有统计学意义 (*P* < 0.05), 见表 1。

2.3 LncRNA-ROR 在骨肉瘤组织中表达水平对病人 5 年生存率的影响 以 LncRNA-ROR 在骨肉瘤组织中表达量的 *P*₂₅ 值 (2.16) 为界值, 将病人分为低表达组 (*n* = 26) 和高表达组 (*n* = 70), Kaplan-Meier 生存分析结果显示, 低表达组病人中位生存时间 51.00 个月, 生存时间 (45.42±3.26) 个月, 5 年生存率 50.00%; 高表达组病人中位生存时间 21.00 个月, 生存时间 (27.31±2.04) 个月, 5 年生存率 18.57%, Log-Rank 检验差异有统计学意义 (χ^2 = 13.20, *P* < 0.001)。

2.4 影响骨肉瘤病人 5 年生存率的多因素分析 以临床指标及 LncRNA-ROR 表达量为自变量, 以病人生存状态为因变量, 行 Cox 回归分析, 结果显示, Enneking 分期、远处转移和 LncRNA-ROR 表达是影响骨肉瘤病人 5 年生存率的独立风险因素 (*HR* = 2.15、2.83、2.09, *P* < 0.05), 见表 2。

3 讨论

骨肉瘤作为一种恶性肿瘤极高的来源于间叶组织的肿瘤, 具有较高的侵袭转移潜力, 已成为儿童及青年人群第二大癌症相关死亡原因^[11]。近年来, 随诊技术进步, 在治疗骨瘤方面新的化疗药物及技术方案的不断涌现, 在改善病人生命质量及降

表 1 LncRNA-ROR 在不同临床特征指标的骨肉瘤组织中表达差异 $\bar{x} \pm s$

指标	例数	LncRNA-ROR 表达量	<i>t</i> (<i>F</i>)值	<i>P</i> 值
年龄			1.43	0.157
<21 岁	42	2.27±0.20		
≥21 岁	54	2.33±0.19		
性别			0.38	0.708
男	58	2.30±0.21		
女	38	2.32±0.19		
肿瘤位置			0.49	0.623
股骨/胫骨	61	2.32±0.20		
其他	35	2.29±0.20		
肿瘤大小			1.73	0.087
≥5 cm	59	2.34±0.19		
<5 cm	37	2.26±0.21		
Enneking 分期			2.78	0.006
II A 期	33	2.23±0.22		
II B ~ III 期	63	2.35±0.18		
组织学分型			(0.99)	0.397
成骨细胞型	45	2.29±0.21		
软骨细胞型	15	2.26±0.23		
成纤维细胞型	18	2.35±0.17		
混合型	18	2.36±0.18		
KPS 评分			2.72	0.008
≥70 分	35	2.24±0.19		
<70 分	61	2.35±0.20		
病理性骨折			1.46	0.147
是	23	2.36±0.19		
否	73	2.29±0.20		
远处转移			4.23	<0.001
是	55	2.38±0.18		
否	41	2.22±0.20		

注: LncRNA-ROR 为长链非编码-重编程调节器, KPS 为 Karnofsky 功能状态。

表 2 影响骨肉瘤病人 5 年生存率的多因素分析

自变量	β 值	SE 值	Wald χ^2 值	<i>P</i> 值	HR 值	95%CI
年龄	-0.06	0.27	0.05	0.83	0.95	(0.56, 1.59)
性别	-0.31	0.27	1.29	0.26	0.74	(0.43, 1.25)
肿瘤位置	0.04	0.29	0.02	0.90	1.04	(0.59, 1.81)
肿瘤大小	0.19	0.27	0.48	0.49	1.21	(0.71, 2.05)
Enneking 分期	0.76	0.31	6.23	0.01	2.15	(1.18, 3.91)
组织学分型	-0.06	0.12	0.27	0.61	0.94	(0.74, 1.20)
KPS 评分	-0.06	0.27	0.04	0.83	0.95	(0.56, 1.60)
病理性骨折	-0.26	0.31	0.71	0.40	0.77	(0.42, 1.42)
远处转移	1.04	0.29	12.56	0.00	2.83	(1.59, 5.02)
LncRNA-ROR 表达	0.74	0.33	4.86	0.03	2.09	(1.09, 4.02)

低肺转移率方面发挥一定作用^[12], 但病人总体预后依然不尽如人意, 超过 1/3 的病人最终死于该病^[13]。研究表明, 骨肉瘤发生、进展是一个涉及众多基因及信号通路累积突变的综合作用的结果^[14-15]。Ln-

cRNA 作为广泛存在于胞浆及胞核内的不具有编码蛋白功能的 RNA 分子, 不仅参与了多种疾病的发生, 而且越来越多的研究开始关注其在癌症病程中的作用^[16-17]。LncRNA-ROR 是一种 LncRNA 类型, 在诱导多能性干细胞形成及维持干细胞多分化潜能中发挥重要作用, 同时参与了机体氧化应激过程^[5]。研究表明, LncRNA-ROR 高表达参与了肿瘤恶性增殖及细胞侵袭过程, 并且可促进上皮-间质转化过程^[18]。本研究结果显示, LncRNA-ROR 在骨肉瘤组织中表达量高于正常骨组织, 说明 LncRNA-ROR 在骨肉瘤组织中表达升高, 可能参与了骨肉瘤发生过程。本研究结果显示, LncRNA-ROR 在 Enneking 分期 II B ~ III 期、KPS 评分 < 70 及发生远处转移的骨肉瘤组织中呈高表达, 说明 LncRNA-ROR 表达量升高可能参与了骨肉瘤恶性进展, 且与骨肉瘤远处侵袭转移有关, 可能是骨肉瘤诊疗的潜在目标靶基因。

Shi 等^[19]指出, LncRNA-ROR 促进肾癌增殖, 且与良好预后呈负相关。Lu 等^[20]采用荟萃分析的方法评估 lncRNA-ROR 在人类癌症预后中的意义, 结果显示, 高 lncRNA ROR 表达与较短的总生存期显著相关, 与癌症预后较差有关, 可以作为各种癌症中不利的预后因素。本研究结果显示, 低表达组病人中位生存时间、平均生存时间和 5 年生存率 50.00% 均高于高表达组, 说明 LncRNA-ROR 表达与骨肉瘤病人预后有关, 高表达预示病人预后不良。Cox 回归分析显示, Enneking 分期、远处转移和 LncRNA-ROR 表达是影响骨肉瘤病人 5 年生存率的独立风险因素, 进一步说明 LncRNA-ROR 高表达是骨肉瘤病人不良预后的独立风险因素, 可作为评估病人预后的指标。

综上所述, LncRNA-ROR 在骨肉瘤组织中呈高表达, 参与了骨肉瘤发生及恶性化进展, 且与不良预后有关, 是病人生存时间的独立影响因素, 有望为骨肉瘤早期诊断及靶向治疗提供新的基因靶位, 但 LncRNA-ROR 可能的作用机制, 尚待进一步利用分子生物学技术予以研究明确。

参考文献

- [1] ZHANG H, GUO L, ZHANG Z, et al. Co-expression network analysis identified gene signatures in osteosarcoma as a predictive tool for lung metastasis and survival [J]. *J Cancer*, 2019, 10(16):3706-3716.
- [2] WANG W, YANG J, WANG Y, et al. Survival and prognostic factors in Chinese patients with osteosarcoma: 13-year experience in 365 patients treated at a single institution [J]. *Pathol Res Pract*, 2017, 213(2):119-125.
- [3] 万淑琼, 刘佳栋, 陈静青, 等. 长链非编码 RNA 肿瘤易感候选基因 11 在卵巢癌组织中的表达及意义 [J]. *实用临床医药杂志*, 2021, 25(17):114-118, 123.
- [4] RAFIEE A, RIAZI-RAD F, HAVASKARY M, et al. Long non-coding RNAs: regulation, function and cancer [J]. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 2018, 34(2):153-180.
- [5] YANG Z, TANG Y, LU H, et al. Long non-coding RNA reprogramming (lncRNA-ROR) regulates cell apoptosis and autophagy in chondrocytes [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(10):8432-8440.
- [6] 熊英, 秦燕. 宫颈 SIgA 联合血清 LncRNA-ROR 与 miR-29 检测对女性慢性盆腔炎的诊断价值 [J]. *中南医学科学杂志*, 2019, 47(4):382-385.
- [7] 张立臻, 刘淑珍, 马军, 等. 长链非编码 RNA-ROR 在慢性心力衰竭患者血清中的表达及临床意义 [J]. *中国临床新医学*, 2019, 12(4):388-391.
- [8] 吴立春, 谷仕艳, 李吉满, 等. 长链非编码 RNA-ROR 在乳腺癌中的表达及临床意义研究 [J]. *现代预防医学*, 2017, 44(2):354-357, 361.
- [9] ZHAI XQ, MENG FM, HU SF, et al. Mechanism of LncRNA ROR promoting prostate cancer by regulating Akt [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(5):1969-1977.
- [10] 李会俭, 付军, 赵敏, 等. LincRNA-ROR 在高级别浆液性卵巢癌中的表达及临床意义 [J]. *中国临床研究*, 2019, 32(4):538-541.
- [11] SHI K, WANG SL, SHEN B, et al. Clinicopathological and prognostic values of fibronectin and integrin $\alpha\beta 3$ expression in primary osteosarcoma [J]. *World J Surg Oncol*, 2019, 17(1):23-35.
- [12] WANG W, ZHAO HF, YAO TF, et al. Advanced development of ErbB family-targeted therapies in osteosarcoma treatment [J]. *Invest New Drugs*, 2019, 37(1):175-183.
- [13] LIU Y, SUN X, HUO C, et al. Monocarboxylate transporter 4 (MCT4) overexpression is correlated with poor prognosis of osteosarcoma [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25(6):4278-4284.
- [14] 梁仁政, 吉光荣. 自噬与凋亡在骨肉瘤中的作用 [J]. *医学综述*, 2019, 25(5):904-908.
- [15] LIU H, GAO Y, DONG Y, et al. Flavonoids active against osteosarcoma: a review of the molecular mechanisms involved [J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23(13):1993-2001.
- [16] 牛春阳, 薛琳琳. lncRNA 生物学功能研究进展 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2019, 32(2):228-232, 237.
- [17] ZHAO J, LI L, HAN ZY, et al. Long noncoding RNAs, emerging and versatile regulators of tumor-induced angiogenesis [J]. *Am J Cancer Res*, 2019, 9(7):1367-1381.
- [18] 赵喜博, 刘巍, 冯书君, 等. 长链非编码 RNA ROR 在恶性肿瘤中的作用及相关机制 [J]. *国际免疫学杂志*, 2018, 41(4):467-471.
- [19] SHI J, ZHANG W, TIAN H, et al. LncRNA ROR promotes the proliferation of renal cancer and is negatively associated with favorable prognosis [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6):9561-9566.
- [20] LU R, CHEN J, KONG L, et al. Prognostic value of LncRNA ROR expression in various cancers: a meta-analysis [J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(5):1-10.

(收稿日期:2020-08-23,修回日期:2021-10-13)