

长链非编码 RNA LINC00152 在喉鳞状细胞癌中的表达及其临床意义*

赵雷^{1△} 池伟伟² 曹欢¹ 孟文霞¹ 崔卫娜¹ 王宝山¹

[摘要] 目的:探讨长链非编码 RNA LINC00152 在喉鳞状细胞癌(LSCC)中的表达及其与临床病理特征的相关性。方法:通过实时荧光定量 PCR 的方法,检测 LINC00152 在 LSCC 细胞系以及 36 对 LSCC 癌组织与配对癌旁正常组织中的相对表达水平,并分析其表达水平与患者年龄、吸烟、饮酒、病理分化程度、临床分期及颈部淋巴结转移的相关性。结果:LINC00152 在 LSCC 细胞系中呈高表达,且在癌组织中的相对表达水平明显高于配对癌旁正常组织($P=0.006$),其表达水平与患者病理分化程度($P=0.032$)、临床分期($P=0.044$)相关,与患者年龄、吸烟、饮酒及颈部淋巴结转移无明显相关性($P>0.05$)。结论:LINC00152 在 LSCC 中表达增高,其有可能作为 LSCC 临床诊断、治疗和预后的标志物。

[关键词] 喉肿瘤;长链非编码 RNA;标志物;LINC00152

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2019.08.010

[中图分类号] R739.65 **[文献标志码]** A

Expression of long-chain non-coding RNA LINC00152 in laryngeal squamous cell carcinoma and its clinical significance

ZHAO Lei¹ CHI Weiwei² CAO Huan¹ MENG Wenxia¹ CUI Weina¹ WANG Baoshan¹

(¹Department of Otorhinolaryngology, Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, 050000, China; ²Department of Otorhinolaryngology, First Hospital of Hebei Medical University)

Cosponding author: WANG Baoshan, E-mail: hebwangbs@163.com

Abstract Objective: The aim of this study is to explore the relative expression level of LINC00152 in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) and its clinical significance. **Method:** The relative expression levels of LINC00152 in LSCC cell lines and 36 paired LSCC specimens were measured by qRT-PCR method. And the correlations between the expression level of LINC00152 and the clinical features derived from LSCC patients were analyzed and compared through the independent sample *t*-test. **Result:** The relative expression level of LINC00152 was over-expressed in LSCC cell lines and cancerous tissues than that in paired adjacent normal tissues, and the difference was statistically significant($P=0.006$). Even the associations between LINC00152 expression level and clinicopathological features($P=0.044$ for clinical stage, $P=0.032$ for pathological differentiation degree) were significantly. **Conclusion:** LINC00152 is highly expressed in LSCC and it may become a new tumor marker for the diagnosis and prognosis of LSCC.

Key words laryngeal neoplasms; long non-coding RNA; biomarker; LINC00152

喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC)占头颈部鳞状细胞癌(head and neck

squamous cell carcinoma, HNSCC)的 30%~40%,而 HNSCC 是世界上第 6 位最常见恶性肿瘤^[1]。虽然 LSCC 治疗方法不断得到改善,但其预后仍不容乐观。因此,探索 LSCC 相关肿瘤标志物,对其诊断、治疗和预后研究有一定帮助。随着长链非编码 RNA 的认识和深入研究,其在包括 LSCC 在内的多种肿瘤中的作用逐渐受到重视,目

*基金项目:河北省自然科学基金重点项目(No:H2017206391)

¹ 河北医科大学第二医院耳鼻咽喉科(石家庄,050000)

² 河北医科大学第一医院耳鼻咽喉科

△现在河北大学附属医院耳鼻咽喉科(河北保定,071000)

通信作者:王宝山, E-mail: hebwangbs@163.com

[5] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66: 115-132.

[6] CHO Y Y, JANG H W, JOUNG J Y, et al. Trends in thyroid cancer incidence in Korean children (1999-2012) based on palpation and nonpalpation detection methods[J]. Eur Thyroid J, 2015, 4: 252-259.

[7] FAGIN J A, WELLS S A Jr. Biologic and Clinical Perspectives on Thyroid Cancer[J]. N Engl J Med, 2016, 375: 1054-1067.

[8] 吴娟, 冯红, 李祥. 1358 例甲状腺结节的临床与病理特征分析[J]. 临床外科学杂志, 2016, 24(3): 197-200.

(收稿日期: 2019-03-10)

前研究发现有部分长链非编码 RNA 参与了 LSCC 的发生、发展^[2]。长链非编码 RNA LINC00152 在口腔鳞状细胞癌、甲状腺癌、脑胶质瘤等多种肿瘤中高表达,并参与了某些生物学行为的调控^[3-5],但其在 LSCC 中的相关研究尚未见报道。因此,探讨 LINC00152 在 LSCC 中的表达及其与临床病理特征的相关性具有重要意义。

1 资料与方法

1.1 细胞系来源

实验用 LSCC 细胞系(TU212、TU686、TU177、AMC-HN-8)均由河北医科大学耳鼻咽喉头颈外科生物样本库提供。其中,TU212、TU686、TU177 细胞系培养于含 10% 胎牛血清(BI, USA)的 RPMI1640 培养液(GIBCO, USA),AMC-HN-8 细胞系培养于含 10% 胎牛血清(BI, USA)的 DMEM 培养液(GIBCO, USA),各细胞系均置于含 5% CO₂ 的 37℃ 恒温培养箱(Thermo Fisher, USA)孵育。

1.2 组织样本来源

实验用 36 对 LSCC 组织样本均由河北医科大学耳鼻咽喉头颈外科生物样本库收集并提供。所有样本均来源于 2016-11-2018-10 住院接受手术的 LSCC 患者,均事先获得患者书面同意。癌组织为瘤体中心非坏死组织,癌旁正常组织为瘤体旁 3 mm(声门型)、5 mm(声门上、声门下型),均经术后病理证实。样本在离体 30 min 内切成直径约 2 mm 的小碎块置入 RNA 保护液 RNAstore (CoWin Biosciences, China),室温静置 24 h 待保护液充分浸润后转移至 -80℃ 低温冰箱储存。本实验获得河北医科大学伦理委员会及河北医科大学第二医院伦理委员会批准。

1.3 临床资料

所有 36 例组织样本均来源于男性喉癌患者(期间共收集组织样本 43 对,其中 5 对男性和 2 对女性患者组织样本因 RNA 降解不能满足实验要求,故未纳入该实验),年龄 44~76 岁,中位年龄 60 岁,见表 1。60 岁为纳入实验患者的中位年龄,临床分期参照国际抗癌协会(UICC,2012)标准。

1.4 细胞系、组织样本总 RNA 提取及 cDNA 合成

采用总 RNA 提取试剂盒 Total RNA Extraction Kit(Promega, USA)提取细胞系及所有组织样本总 RNA,按照试剂盒说明书操作步骤进行。所获得总 RNA 部分用于质控,通过 1% 琼脂糖凝胶电泳(DEPC)法完成,部分用于反转录合成 cDNA。各样本 cDNA 合成通过普通 PCR 仪(BIO-RAD, USA)和反转录试剂盒 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(Roche, Germany)按照说明书操作步骤完成。

表 1 LSCC 患者临床病理特征

临床病理特征	例数(%)	临床病理特征	例数(%)
性别		临床分期	
男	36(100.0)	I~II	12(33.3)
女	0(0)	III~IV	24(66.7)
年龄/岁		病理分化程度	
<60	17(47.2)	中-高	27(75.0)
≥60	19(52.8)	低	9(25.0)
吸烟史		颈部淋巴结转移	
无	6(16.7)	不伴有	16(44.4)
有	30(83.3)	伴有	20(55.6)
饮酒史		解剖分型	
无	15(41.7)	声门型	23(63.9)
有	21(58.3)	声门上型	13(36.1)
		声门下型	0(0)

1.5 细胞系及组织样本中 LINC00152 相对表达水平检测

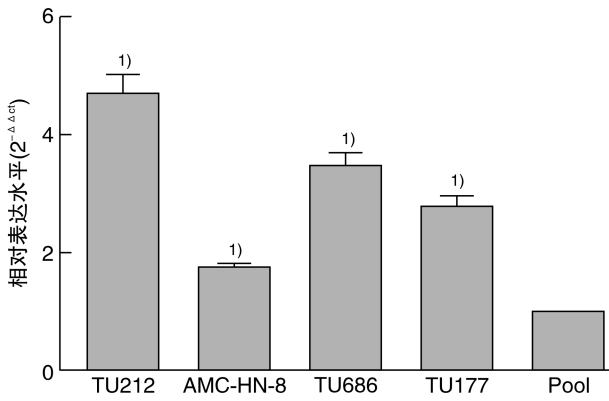
实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 方法用于检测 LINC00152 在 LSCC 细胞系及各组织样本中的相对表达水平,通过 qRT-PCR 仪(BIO-RAD, USA)和 qRT-PCR 试剂盒 GoTaq[®] qPCR Master Mix(Promega, USA)按照说明书操作步骤完成。以 2^{-ΔΔCt} 计算 LINC00152 相对表达量,GAPDH 为内参照。相关引物如下,LINC00152 上游 5'-TTGATGGCTTGAACATTTGG-3',下游 5'-TCGTGATTTTCGGTGTCTGT-3',产物 165bp; GAPDH 上游 5'-AGGTGAAGGTCGGAGTCAA CG-3',下游 5'-AGGGGTCATTGATGGCAACA-3',产物 104 bp。

1.6 统计学分析

所有数据采用 SPSS 19.0 软件完成,配对样本 t 检验用于比较 2 组样本表达水平的差异,独立样本 t 检验用于分析 LINC00152 相对表达水平与临床病理特征间的相互关系,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

与正常对照组相比, LSCC 细胞系中 LINC00152 表达水平增高。将 10 例 LSCC 癌旁正常组织样本中 LINC00152 的相对表达水平平均值视为正常对照组,定义为 Pool,与正常对照相比(Pool),LINC00152 在各 LSCC 细胞系中表达水平增高(图 1)。Pool 代表 10 例 LSCC 癌旁正常组织中 LINC00152 的平均表达水平,与 Pool 相比, LSCC 各细胞系中 LINC00152 相对表达水平明显增高(TU212, P = 0.005; AMC-HN-8, P = 0.006; TU686, P = 0.006; TU177, P = 0.007)。



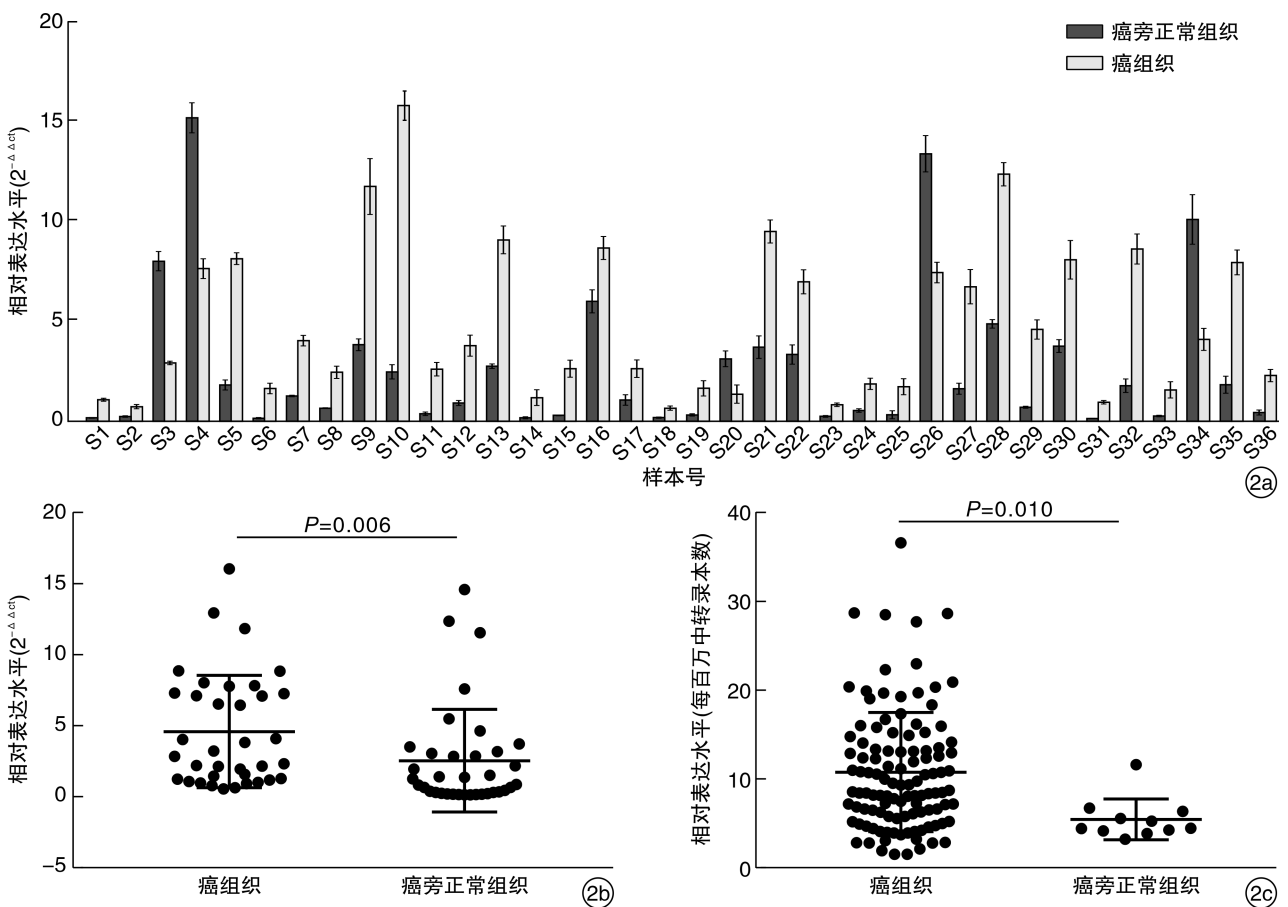
与 Pool 比较, ¹⁾ $P < 0.05$ 。

图 1 LINC00152 在 LSCC 细胞系中的相对表达水平

与配对癌旁正常组织相比, 36 例 LSCC 组织样本中, 有 31 例 LSCC 癌组织 LINC00152 表达水平增高(图 2a), 进一步总体分析发现, LINC00152 在 LSCC 癌组织中相对表达水平明显增高 ($P = 0.006$), 其在癌组织中相对表达水平 (4.58 ± 3.94) 和在癌旁正常组织中相对表达水平 (2.53 ± 3.61) 差异有统计学意义(图 2b)。考虑样本量相对较小, 本研究进一步通过公共数据库 TCGA (THE

CANCER GENOME ATLAS)^[6] 下载 LSCC 相关表达谱数据样本 123 例, 其中癌组织 112 例, 癌旁正常组织 11 例。LINC00152 在 LSCC 癌组织中高表达(图 2c), 差异有统计学意义 ($P = 0.010$), 提示 LINC00152 在 LSCC 癌组织中高表达, 具有癌基因特性。

癌组织中 LINC00152 相对表达水平与 LSCC 患者临床病理特征密切相关。通过临床相关性分析发现, 晚期 LSCC (III~IV) 患者中 LINC00152 相对表达水平 (5.51 ± 4.09) 明显高于早期 LSCC (I~II) (2.73 ± 2.97), 二者差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但 I、II、III、IV 各分期间 LINC00152 相对表达水平无明显差异 ($P = 0.259$), 可能与分组后样本量小, 不能反映真实的表达趋势有关。低分化 LSCC 患者中 LINC00152 相对表达水平 (6.99 ± 5.14) 明显高于高-中分化 LSCC (3.78 ± 3.17), 二者差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。而 LINC00152 相对表达水平的变化与是否发生淋巴结转移无明显相关性 ($P = 0.509$), 但不伴有颈部淋巴结转移的 LSCC 患者中, 低分化 LSCC 癌组织中 LINC00152 相对表达水平 (8.35 ± 5.57) 明显高于



2a: LINC00152 在各样本中的表达分布情况; 2b: LINC00152 在 LSCC 癌组织和癌旁正常组织中的相对表达水平; 2c: 基于 TCGA 数据分析显示 LINC00152 在 LSCC 癌组织中相对表达水平高于癌旁正常组织。

图 2 LINC00152 在组织中的相对表达水平

高-中分化 LSCC 癌组织 (3.11 ± 2.57) ($P = 0.021$),而在伴有颈部淋巴结转移的 LSCC 癌组织中,LINC00152 相对表达水平与组织分化程度(低分化组和高-中分化组)无明显相关性($P = 0.966$)。同时,相关性分析未发现 LINC00152 相对表达水平与患者年龄、吸烟及饮酒有明显相关性($P > 0.05$),见表 2。因组织样本 RNA 降解原因,纳入患者均为男性,故未进行性别相关性分析。因声门下型喉癌罕见,纳入样本中无声门下型喉癌病例,故未进行声门下型相关性分析。

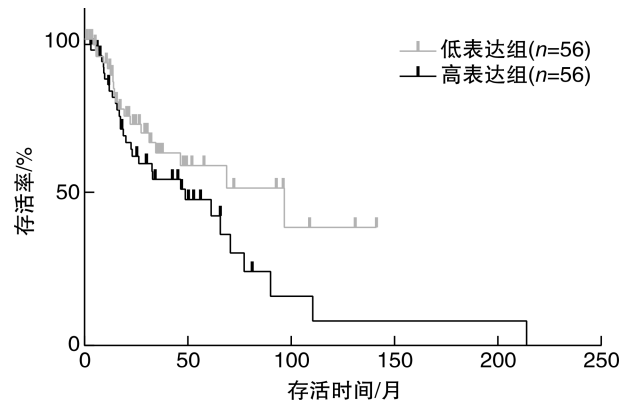
表 2 LINC00152 表达水平与临床病理特征相关性

临床病理特征		相对表达量	$\bar{x} \pm s$	P 值
性别	男性	—	—	—
	女性	—	—	—
年龄	<60 岁	4.79 ± 4.86		0.775
	≥ 60 岁	4.40 ± 3.02		
吸烟史	无	1.85 ± 1.43		0.062
	有	5.13 ± 4.08		
饮酒史	无	3.52 ± 3.29		0.175
	有	5.34 ± 4.26		
临床分期	I ~ II	2.73 ± 2.97		0.044
	III ~ IV	5.51 ± 4.09		
病理分化程度	中-高	3.78 ± 3.17		0.032
	低	6.99 ± 5.14		
颈部淋巴结转移	不伴有	5.08 ± 4.60		0.509
	伴有	4.19 ± 3.39		
解剖分型	声门型	3.71 ± 2.79		0.075
	声门上型	6.14 ± 5.19		
	声门下型	—		

癌组织中 LINC00152 相对表达水平与患者生存时间无明显相关性。考虑本研究中所收集的样本尚无随访资料,为进一步探讨 LINC00152 相对表达水平与生存时间的相关性,我们通过下载分析公共数据库 TCGA 中 LSCC 相关表达谱及随访资料,分析发现在同一时间节点,LINC00152 相对表达水平较高者具有较低的生存率,但整体趋势 LINC00152 相对表达水平与 LSCC 患者总生存时间无明显相关性($P = 0.107$),差异无统计学意义(图 3),提示 LINC00152 相对表达水平与患者生存时间无关。因本研究所收集样本尚无随访资料,尚需在今后的研究中进一步验证。

3 讨论

LSCC 是耳鼻咽喉头颈外科常见恶性肿瘤,其发病率有逐渐上升趋势,目前其相关标志物研究取得了一些进展^[7],然而有关长链非编码 RNA 在 LSCC 中的相关研究相对较少^[2]。长链非编码 RNA 是一种长度大于 200 个核苷酸的非编码



基于 TCGA 数据,依据 LINC00152 相对表达水平中位数(每百万中转录本数=9.01)将 112 例 LSCC 患者分为高表达组(56 例)和低表达组(56 例),生存分析提示 LINC00152 相对表达水平与总生存时间无明显相关性($P = 0.107$)。

图 3 LINC00152 表达水平与生存时间相关性

RNA,可以通过向导、骨架、诱饵等多种机制,在转录、转录后及表观遗传学水平调控包括肿瘤在内的多种疾病的生物学行为^[8]。多项研究发现,长链非编码 RNA 可以通过多种机制调控 LSCC 细胞的增殖、迁移及侵袭能力,并可影响细胞周期及细胞凋亡的进展^[2]。如长链非编码 RNA LINC00668 在 LSCC 中高表达,其表达水平与 LSCC 患者临床分期、颈部淋巴结转移、组织分化程度等临床特征相关,体外实验进一步证实 LINC00668 可作为癌基因促进 LSCC 细胞的增殖、迁移及侵袭能力^[9]。

长链非编码 RNA LINC00152 在多种肿瘤中表达增高,作为癌基因促进口腔鳞状细胞癌、舌鳞状细胞癌、甲状腺癌、脑胶质瘤等多种肿瘤的发生发展^[3-5,10]。LINC00152 通过与 miR-139-5p 直接结合,促进口腔鳞状细胞癌的增殖、迁移及侵袭能力及体内移植瘤的生长^[3]。LINC00152 在舌鳞状细胞癌中表达增高,并与舌鳞状细胞癌 TNM 分期、总生存率等相关^[10]。上皮-间充质转化在肿瘤的进展和转移过程中发挥着至关重要的作用,而 LINC00152 可促进口腔鳞状细胞癌、乳腺癌的上皮-间充质转化进程,从而促进肿瘤的进展^[3,11]。诸多研究证实 LINC00152 具有确切的癌基因作用,可作为肿瘤的重要标志物,但目前尚未发现 LINC00152 在 LSCC 中的相关研究。为填补这一空白,本研究初步证实了 LINC00152 在 LSCC 细胞系及癌组织中表达增高,且在癌组织中的表达水平与 LSCC 患者的临床分期、组织分化程度相关,与 LINC00152 在口腔鳞状细胞癌、舌鳞状细胞癌中的报道一致。既往研究发现,LINC00152 在癌组织中的相对表达水平与舌鳞状细胞癌、胆囊癌、胃癌等多种肿瘤的总生存时间、无病生存时间呈负相关,可作为肿瘤预后标志物^[11-13]。鉴于此,本课

题进一步通过下载分析公共数据库 TCGA 中 LSCC 相关表达谱,分析发现 LINC00152 在 LSCC 癌组织中表达水平明显高于癌旁正常组织,但其相对表达水平与患者总生存时间无明显相关性。因此,我们推测 LINC00152 在一定程度上参与了 LSCC 发生发展的某些生物学过程,但对患者生存时间未产生明显影响,而由于本研究所收集样本尚未完成随访,因此未能进一步验证这一发现。本研究仅初步探讨和分析了 LINC00152 在 LSCC 中的表达及临床意义,而肿瘤研究相关的体内、体外功能实验尚需开展,以进一步探讨 LINC00152 在 LSCC 中潜在的功能及可能的作用机制。

综上,LINC00152 在 LSCC 细胞系及癌组织中表达增高,其相对表达水平与 LSCC 患者的临床分期、组织分化程度相关,有可能作为 LSCC 诊断和预后的重要标志物。

参考文献

- [1] JEMAL A, BRAY F, CENTER M M, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61: 69—90.
- [2] 赵雷,王宝山.长链非编码 RNA 在喉鳞状细胞癌中的研究进展[J]. *国际耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2018, 42(1): 16—21.
- [3] LI M, NING J, LI Z, et al. LINC00152 promotes the growth and invasion of oral squamous cell carcinoma by regulating miR-139-5p[J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 6295—6304.
- [4] SUN Z, GUO X, ZANG M, et al. Long non-coding RNA LINC00152 promotes cell growth and invasion of papillary thyroid carcinoma by regulating the miR-497/BDNF axis[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234: 1336—1345.
- [5] REON B J, TAKAO REAL KARIA B, KIRAN M, et al. LINC00152 Promotes Invasion through a 3'-Hairpin Structure and Associates with Prognosis in Glioblastom[J]. *Mol Cancer Res*, 2018, 16: 1470—1482.
- [6] CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways[J]. *Nature*, 2008, 455: 1061—1068.
- [7] 葛珊珊,吴勇延,高伟,等.长链非编码 RNA LINC00460 在喉鳞状细胞癌中的表达及意义[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2018, 32(1): 18—22.
- [8] SHI X, SUN M, LIU H, et al. Long non-coding RNAs: a new frontier in the study of human diseases[J]. *Cancer Lett*, 2013, 339: 159—166.
- [9] ZHAO L, CAO H, CHI W, et al. Expression profile analysis identifies the long non-coding RNA landscape and the potential carcinogenic functions of LINC00668 in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Gene*, 2019, 687: 47—55.
- [10] YU J, LIU Y, GUO C, et al. Upregulated long non-coding RNA LINC00152 expression is associated with progression and poor prognosis of tongue squamous cell carcinoma[J]. *J Cancer*, 2017, 8: 523—530.
- [11] HU X L, WANG J, HE W, et al. Down-regulation of lncRNA Linc00152 suppressed cell viability, invasion, migration, and epithelial to mesenchymal transition, and reversed chemo-resistance in breast cancer cells[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22: 3074—3084.
- [12] ZHANG J, YIN M, HUANG J, et al. Long noncoding RNA LINC00152 as a novel predictor of lymph node metastasis and survival in human cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Clin Chim Acta*, 2018, 483: 25—32.
- [13] MIAO C, ZHAO K, ZHU J, et al. Clinicopathological and Prognostic Role of Long Noncoding RNA Linc00152 in Various Human Neoplasms: Evidence from Meta-Analysis[J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 6010721.

(收稿日期:2018-12-16)