

LncRNA AC010145.4与小细胞肺癌预后及化疗耐药的关系

赵冲¹, 汪强¹, 武奋萍¹, 刘胜兰²

Relationship of LncRNA AC010145.4 Expression with Prognosis and Chemoresistance of Small Cell Lung Cancer

ZHAO Chong¹, WANG Qiang¹, WU Fenping¹, LIU Shenglan²

1. Department of Radiotherapy, The Seventh People's Hospital of Chengdu, Chengdu 610041, China; 2. Department of Ultrasonography, West China Health Care Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Corresponding Author: LIU Shenglan, E-mail: lanlan16358221@qq.com



Abstract: Objective To investigate the expression of long non-coding RNA AC010145.4 (LncRNA AC010145.4) and its relationship with prognosis and chemoresistance of small cell lung cancer (SCLC) patients. **Methods** The expression of LncRNA AC010145.4 in 67 cases of SCLC tissues, 27 cases of para-cancerous tissues and 40 cases of normal lung tissues were detected by real-time fluorescent quantitative PCR. The relationship of LncRNA AC010145.4 expression with clinicopathological characteristics was analysed by χ^2 test. The relationship between AC010145.4 expression and survival time of SCLC patients were analyzed by Kaplan-Meier analysis. Univariate and multivariate analysis were used to analyze prognosis factor of SCLC. **Results** The expression level of LncRNA AC010145.4 in SCLC tissues was higher than those in para-cancerous tissues and normal lung tissues (all $P < 0.001$). The expression of LncRNA AC010145.4 was significantly higher in chemoresistance patients than that in chemosensitive patients ($P < 0.05$). LncRNA AC010145.4 expression was positively correlated with disease stage, lymph node metastasis, distant metastasis, chemosensitivity (all $P < 0.05$). The overall survival time and progression-free survival time of the patients with high LncRNA AC010145.4 expression were shorter than those with low LncRNA AC010145.4 expression (all $P < 0.001$). LncRNA AC010145.4 expression, disease stage and distant metastasis were independent prognostic factors (all $P < 0.05$). **Conclusion** LncRNA AC010145.4 is involved in the occurrence and development of SCLC, and may be used as a molecular marker for the prognosis evaluation of SCLC patients.

Key words: Small cell lung cancer; Lnc RNA; LncRNA AC010145.4; Prognosis

摘要: 目的 探讨LncRNA AC010145.4在小细胞肺癌患者组织中的表达及其与患者化疗敏感度和预后的关系。**方法** 应用实时荧光定量PCR法检测67例SCLC、27例癌旁及40例正常肺组织中LncRNA AC010145.4的表达, 采用 χ^2 检验分析LncRNA AC010145.4表达与SCLC患者临床病理特征的关系, Kaplan-Meier法分析LncRNA AC010145.4表达与SCLC患者生存时间的关系, 单因素及多因素分析影响SCLC预后的因素。**结果** SCLC组织中LncRNA AC010145.4的表达水平明显高于癌旁组织及正常肺组织(均 $P < 0.001$)。LncRNA AC010145.4在化疗耐药患者中的表达明显高于化疗敏感者($P < 0.05$)；LncRNA AC010145.4表达与SCLC患者的性别、年龄无关, 而与疾病分期、淋巴结转移、远处转移、化疗耐药相关(均 $P < 0.05$)。高表达LncRNA AC010145.4患者的总生存时间及无进展生存时间均短于低表达者(均 $P < 0.001$)。单因素及多因素分析发现LncRNA AC010145.4表达、疾病分期、远处转移是SCLC患者独立的预后因素(均 $P < 0.05$)。**结论** LncRNA AC010145.4参与调节SCLC的发生和发展, 可能是潜在的SCLC患者预后评估的生物标志物。

关键词: 小细胞肺癌; 长链非编码RNA; LncRNA AC010145.4; 预后

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A

0 引言

肺癌(Lung cancer)是世界上发病率和死亡率最高的肿瘤。据世界卫生组织最新报道, 每年超过110万人死于肺癌, 占有癌症死亡人数的17.8%^[1-2]。其中小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)的发病率约占全部肺癌的20%~25%, SCLC的治疗以化疗为主, 虽然SCLC患者早期对

收稿日期: 2017-05-08; 修回日期: 2017-07-14

作者单位: 1. 610041 成都, 成都市第七人民医院放疗科; 2. 610041 成都, 四川大学华西保健医院超声科

通信作者: 刘胜兰, E-mail: lanlan16358221@qq.com

作者简介: 赵冲(1980-), 男, 主治医师, 主要从事非编码RNA与小细胞肺癌耐药的研究

一线化疗方案敏感,但极易出现多药耐药(multi-drug resistance, MDR)现象而导致治疗失败^[3],因此,SCLC的多药耐药已成为目前临床亟待解决的难题。

前期预实验通过LncRNA芯片发现长链非编码RNA AC010145.4在SCLC耐药细胞株中的表达较化疗敏感细胞株明显增高,提示LncRNA AC010145.4可能与SCLC的耐药相关,然而关于LncRNA AC010145.4在SCLC中的表达及意义目前国内外尚未见相关报道。本研究应用实时荧光定量PCR法检测LncRNA AC010145.4在SCLC组织及其对应的癌旁组织或正常肺组织中的表达情况,分析其表达与患者临床病理特征间的关系,探讨LncRNA AC010145.4在SCLC疗效及预后评估中的潜在作用。

1 资料与方法

1.1 病例资料

收集2012年1月至2016年12月在成都市第七人民医院肿瘤科、胸外科及呼吸内科进行手术、穿刺活检或支气管镜活检的SCLC组织标本67例。其中27例是手术后SCLC原发灶及相应的癌旁组织(距离癌组织 ≥ 2 cm),40例未行手术治疗SCLC患者的癌组织取自支气管镜或CT引导下的穿刺活检标本,收集同期40例因各种原因导致肺外伤的正常肺组织标本作为阴性对照组。所有患者的病例资料完整,手术前均未接受过放化疗。67例SCLC中,男37例、女30例;年龄为33~76岁,平均年龄为(52 ± 6.0)岁;局限期29例、广泛期38例;淋巴结转移者42例、无淋巴结转移者25例;远处转移者38例、无远处转移者29例。67例患者均接受以铂类为主的化疗,首先给予一线化疗方案(依托泊苷+铂类)化疗;出现耐药后,给予二线化疗方案(伊立替康+铂类)。其中化疗敏感者(化疗4~5周期后肿瘤缩小30%以上或消失)26例、化疗耐药者(化疗4~5周期后肿瘤增大30%及以上或出现新的转移灶)41例;41例耐药者给予二线化疗方案治疗,所有患者原发灶及淋巴引流区均接受了X线放疗(放疗剂量4500 cGy/30 F, 10 F/W)。本研究经成都市第七人民医院伦理委员会批准,所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 随访

所有患者出院后都进行了随访,主要以电话和门诊进行随访,随访内容包括一般情况、临床症状及影像学检查(胸腹部CT、浅表淋巴结彩

超)。随访起点为手术或病理活检日期,随访时间为2~60月,中位随访时间为37月,随访截止日期为2017年2月20日。至随访结束,存活28例,死亡39例。无失访病例。

1.3 材料与试剂

应用TRIzol(美国Invitrogen公司产品)试剂提取SCLC组织、癌旁组织及正常肺组织标本中的总RNA。将提取的总RNA,参照AMV反转录试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司产品)说明书提供的方法将其反转录成cDNA。采用2 $\times$ SYBR Green PCR Master Mix(宝生物工程(大连)有限公司产品),以cDNA为模板,进行实时荧光定量PCR。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。PCR反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; (95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s) $\times 40$ 个循环。以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值表示LncRNA AC010145.4的表达水平。

1.4 统计学方法

采用SPSS 13.0软件对研究的数据结果进行统计分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间的比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验;计数资料采用 χ^2 检验,Kaplan-Meier法绘制患者的生存曲线,并进行Log rank检验;单因素及多因素分析影响SCLC预后的因素。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

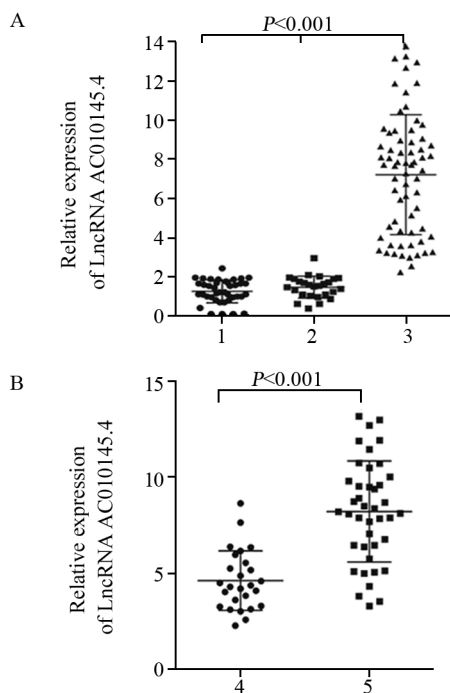
2 结果

2.1 LncRNA AC010145.4在SCLC组织中的表达

实时荧光定量PCR检测LncRNA AC010145.4在SCLC组织中的表达,结果显示,SCLC组织中LncRNA AC010145.4的平均表达水平(7.225 ± 1.840)显著高于癌旁组织(1.480 ± 0.590)及正常肺组织(1.290 ± 0.660),差异有统计学意义($F = 28.06, P < 0.001$),见图1A。进一步分析发现LncRNA AC010145.4在耐药患者中的表达明显高于化疗敏感者,差异具有统计学意义($t = 6.303, P < 0.001$),见图1B。

2.2 LncRNA AC010145.4的表达与SCLC患者临床病理特征的关系

根据LncRNA AC010145.4平均表达水平(7.225)将67例SCLC患者分为高表达组(LncRNA AC010145.4 ≥ 7.225)36例及低表达组(LncRNA AC010145.4 < 7.225)31例,分析LncRNA AC010145.4表达与患者临床病理特征的关系,结果发现,LncRNA AC010145.4表达与患者的年龄、性别、吸烟无关(均 $P > 0.05$),而与疾病分



1: normal tissues($n=40$); 2: paracarcinoma($n=27$); 3: SCLC($n=67$); 4: sensitivity($n=26$); 5: resistance($n=41$)

图1 实时荧光定量PCR法检测LncRNA AC010145.4在小细胞肺癌组织中的表达

Figure1 Expression of LncRNA AC010145.4 in small cell lung cancer(SCLC) tissues detected by real-time fluorescent quantitative PCR

期、淋巴及远处转移、化疗敏感度及患者的生存状态明显相关（均 $P<0.05$ ），见表1。

2.3 Kaplan-Meier法分析LncRNA AC010145.4表达与SCLC患者生存时间的关系

采用Kaplan-Meier法绘制SCLC患者的无进展生存及总生存曲线，结果发现LncRNA AC010145.4高表达患者的无进展生存时间（ 10.45 ± 1.90 ）月短于低表达者的（ 22.30 ± 2.45 ）月，差异有统计学意义（ $\chi^2=46.94$, $P<0.001$ ）；LncRNA AC010145.4高表达患者的总生存时间（ 23.00 ± 3.50 ）月短于低表达者的（ 36.63 ± 2.90 ）月，差异有统计学意义（ $\chi^2=18.67$, $P<0.001$ ），见图2。

表2 单因素和多因素分析影响小细胞肺癌患者OS的临床病理因素

Table2 Univariate and multivariate analysis of clinicopathological features for OS of SCLC patients

Clinicopathological feature	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	95%CI	P	HR	95%CI	P
Age (≥ 52 vs. <52 years)	1.011	0.750-1.460	0.190	1.014	0.640-1.670	0.170
Gender (male vs. female)	1.090	0.720-1.620	0.220	1.017	0.770-1.840	0.108
Disease stage (advanced vs. limited)	5.950	1.970-13.240	0.001	3.960	1.590-7.630	0.001
Lymph node metastasis (yes vs. no)	2.770	1.950-5.580	0.002	1.460	0.990-2.320	0.085
Distant metastasis (yes vs. no)	3.550	1.930-8.104	0.001	2.550	1.890-6.080	0.001
Smoking (yes vs. no)	1.120	0.860-1.750	0.290	1.090	0.630-1.470	0.680
Chemotherapy (resistance vs. sensitivity)	3.530	1.980-6.540	0.001	2.250	1.708-5.380	0.004
LncRNA AC010145.4 expression (high vs. low)	5.950	2.340-11.330	<0.001	3.600	1.930-6.870	<0.001

表1 LncRNA AC010145.4表达与小细胞肺癌患者临床病理特征间的关系

Table1 Relationship between LncRNA AC010145.4 expression and clinicopathological characteristics of small cell lung cancer (SCLC) patients

Characteristic	LncRNA AC010145.4 expression		P
	Low($n=31$)	High [#] ($n=36$)	
Age(years)			0.866
<52	17	19	
≥ 52	14	17	
Gender			0.664
Male	18	19	
Female	13	17	
Disease stage			<0.001
Limited	21	8	
Advanced	10	28	
Lymph node metastasis			<0.001
Yes	12	30	
No	19	6	
Distant metastasis			<0.001
Yes	9	29	
No	22	7	
Smoking			0.434
Yes	16	22	
No	15	14	
Chemotherapy			<0.001
Sensitive	20	6	
Resistance	11	30	
Survival status			0.012
Survival	18	10	
Death	13	26	

Notes: [#]: Low: LncRNA AC010145.4 <7.225 ; High: LncRNA AC010145.4 ≥ 7.225

2.4 单因素及多因素分析影响SCLC患者预后的因素

单因素分析发现，疾病分期、淋巴转移、远处转移、化疗敏感度、LncRNA AC010145.4表达与SCLC患者的OS有关（均 $P<0.05$ ）；多因素分析结果显示，疾病分期、远处转移、化疗敏感度、LncRNA AC010145.4表达是SCLC患者预后的独立影响因素（均 $P<0.05$ ），见表2。

3 讨论

肺癌的死亡率位居各种恶性肿瘤的前列，

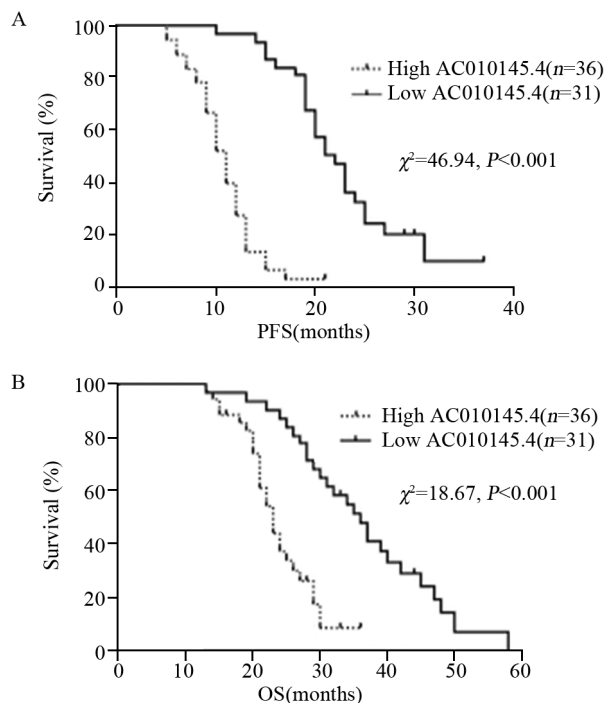


图2 小细胞肺癌患者的无进展生存及总生存曲线
Figure 2 Progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) curves of SCLC patients

发病率也逐年上升。SCLC占原发性肺癌的15%~20%^[4]。由于其生长迅速、早期转移和高度侵袭性,预后较差^[5]。SCLC以全身化疗为主,也可联合放疗和手术^[6-7]。早期SCLC患者对化疗和放疗都非常敏感,但极易产生耐药和放疗抵抗,导致治疗失败,其具体的作用机制尚未完全阐明。

在早期的肿瘤研究中,人们的注意力主要集中在蛋白编码基因在肺癌发病机制上。近年来的研究发现,在人类基因组的转录本当中,大约只有2%的基因具有编码蛋白能力,与此同时,90%以上的基因并不具备编码蛋白的能力,他们往往被转录成非编码RNA(non-coding RNA, ncRNA),这些ncRNAs发挥的基因调控作用在肺癌的发生、发展过程中发挥着重要的作用^[8-9]。

LncRNA是一类转录本长度超过200 nt的ncRNA, LncRNA一度被认为仅仅是RNA聚合酶II转录时的副产物,是基因转录时的“噪音”和“垃圾”,并不具有特定的生物学功能,是一个“暗物质”。然而,近年来的研究发现, LncRNA在多种类型肿瘤细胞(包括肺腺癌、肝癌、前列腺癌、肺癌、黑色素瘤等)的增殖、克隆、凋亡、侵袭、转移及耐药等方面均发挥着重要作用,越来越多的LncRNA在基因调节等方面的功能被揭示出来^[10-12]。LncRNA有望成为新的肿瘤标志物和肿瘤治疗靶点,在肿瘤诊断和治疗

方面显示出良好的临床应用前景。近年来研究发现,转移相关肺腺癌转录本1(metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1)作为早期肺腺癌患者预后的一个独立预后标志物,是第一个在肺癌中被研究的LncRNA^[13]。HOX转录反义RNA(HOX transcript antisense RNA, HOTAIR)在NSCLC组织中高表达, HOTAIR高表达状态与NSCLC患者的淋巴结转移及临床分级相关,并预示着患者预后相对较差^[14]。结肠癌相关转录因子2(colon cancer associated transcript 2, CCAT2)在NSCLC组织中高表达,其高表达与肺腺癌预后较差相关,提示CCAT2可能是一个肺腺癌特异的LncRNA^[15]。LncRNA生长停滞特异性转录本5(growth arrest-specific transcript 5, GAS5)在NSCLC组织中低表达,其表达水平与NSCLC的肿瘤大小及临床分级有关。LncRNA GAS6-AS1在NSCLC组织中低表达,其表达水平与NSCLC患者的淋巴结转移以及临床分级有关,而且GAS6-AS1是NSCLC患者的一个独立预后标志物^[16]。Niu等^[17]研究发现,牛磺酸调节基因1(taurine upregulated gene 1, TUG1)参与调节SCLC的生长和化疗耐药。LncRNA浆细胞瘤变异易位基因1(plasmacytoma variant translocation 1, PVT1)的上调是SCLC患者预后较差的标志物,参与调节SCLC的侵袭和迁移^[18]。

本研究小组前期通过LncRNA芯片发现, LncRNA AC010145.4在SCLC耐药细胞株中的表达高于化疗敏感细胞株,提示LncRNA AC010145.4可能与SCLC的发生和发展有关。本研究通过实时荧光定量PCR法检测67例SCLC组织、27例癌旁组织及40例正常肺组织中LncRNA AC010145.4的表达,分析LncRNA AC010145.4表达与SCLC患者临床病理特征及预后的关系。结果发现SCLC组织中LncRNA AC010145.4的表达水平明显高于癌旁组织及正常肺组织。LncRNA AC010145.4在化疗耐药患者中的表达明显高于化疗敏感者; LncRNA AC010145.4表达与SCLC患者的性别、年龄无关,而与疾病分期、淋巴结转移、远处转移、化疗耐药相关。高表达LncRNA AC010145.4患者的总生存时间及无进展生存时间均短于低表达者。单因素及多因素分析发现LncRNA AC010145.4表达、疾病分期、化疗敏感度和远处转移是SCLC患者独立的预后因素。以上研究结果提示, LncRNA AC010145.4参与调节SCLC的发生和发展,可能作为潜在的SCLC患者疗效及预后评估的生物

标志物。然而,影响SCLC预后的分子机制复杂,LncRNA AC010145.4调节SCLC患者预后的具体作用机制及参与的信号通路,尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Butler KM, Rayens MK, Wiggins AT, *et al.* Association of smoking in the home with lung cancer worry, perceived risk, and synergistic risk[J]. *Oncol Nurs Forum*, 2017, 44(2): E55-63.
- [2] Caswell G, Seymour J, Crosby V, *et al.* Lung cancer diagnosed following an emergency admission: exploring patient and carer perspectives on delay in seeking help[J]. *Support Care Cancer*, 2017, 25(7): 2259-66.
- [3] Huang J, Peng J, Guo L. Non-coding RNA: a new tool for the diagnosis, prognosis, and therapy of small cell lung cancer[J]. *J Thorac Oncol*, 2015, 10(1): 28-37.
- [4] Park S, Lee E, Rhee S, *et al.* Correlation between semi-quantitative (18)F-FDG PET/CT parameters and Ki-67 expression in small cell lung cancer[J]. *Nucl Med Mol Imaging*, 2016, 50(1): 24-30.
- [5] Xiao F, Bai Y, Chen Z, *et al.* Downregulation of HOXA1 gene affects small cell lung cancer cell survival and chemoresistance under the regulation of miR-100[J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50(8): 1541-54.
- [6] Haixia P, Yifeng B, and Honglin H. Role and clinical significance of RLIP76 in regulation of multi-drug resistance of small cell lung cancer[J]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 2015, 37(4): 266-71.
- [7] Luo S, Bai Y, Lan H. Influence of interference of WIG-1 on the multi-drug resistance in small cell lung cancer[J]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 2014, 36(10): 733-8.
- [8] Williamson L, Saponaro M, Boeing S, *et al.* UV Irradiation Induces a Non-coding RNA that Functionally Opposes the Protein Encoded by the Same Gene[J]. *Cell*, 2017, 168(5): 843-55.
- [9] Zhuo C, Hou W, Hu L, *et al.* Genomic editing of non-coding rna genes with crispr/cas9 ushers in a potential novel approach to study and treat schizophrenia[J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10: 28.
- [10] Jin Y, Cui Z, Li X, *et al.* Upregulation of long non-coding RNA PlncRNA-1 promotes proliferation and induces epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(16): 26090-9.
- [11] Li H, Jiang X, Niu X. Long Non-Coding RNA Reprogramming (ROR) Promotes Cell Proliferation in Colorectal Cancer via Affecting P53[J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 919-28.
- [12] Qi X, Shao M, Sun H, *et al.* Long non-coding RNA SNHG14 promotes microglia activation by regulating miR-145-5p/PLA2G4A in cerebral infarction[J]. *Neuroscience*, 2017, 348: 98-106.
- [13] Huang NS, Chi YY, Xue JY, *et al.* Long non-coding RNA metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1) interacts with estrogen receptor and predicted poor survival in breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(25): 37957-65.
- [14] Zhou C, Ye L, Jiang C, *et al.* Long noncoding RNA HOTAIR, a hypoxia-inducible factor-1alpha activated driver of malignancy, enhances hypoxic cancer cell proliferation, migration, and invasion in non-small cell lung cancer[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(12): 9179-88.
- [15] Qiu M, Xu Y, Yang X, *et al.* CCAT2 is a lung adenocarcinoma-specific long non-coding RNA and promotes invasion of non-small cell lung cancer[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(6): 5375-80.
- [16] Shi X, Sun M, Liu H, *et al.* A critical role for the long non-coding RNA GAS5 in proliferation and apoptosis in non-small-cell lung cancer[J]. *Mol Carcinog*, 2015, 54 (Suppl 1): E1-12.
- [17] Niu Y, Ma F, Huang W, *et al.* Long non-coding RNA TUG1 is involved in cell growth and chemoresistance of small cell lung cancer by regulating LIMK2b via EZH2[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 5.
- [18] Huang C, Liu S, Wang H, *et al.* LncRNA PVT1 overexpression is a poor prognostic biomarker and regulates migration and invasion in small cell lung cancer[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(11): 5025-34.

[编辑: 周永红; 校对: 安凤]