

• 论 著 •

长链非编码 RNA HOXA11-AS 在结直肠癌患者血清中的表达和意义*

李安明¹, 王旭东², 鞠少卿², 高灵宝^{1△}

(1. 南通大学第五附属医院输血科, 江苏泰州 225300; 2. 南通大学附属医院检验科, 江苏南通 226000)

摘要:目的 利用实时荧光定量 PCR 建立一种检测血清 HOXA11-AS 的方法,并探索其在诊断、治疗结直肠癌中的效果及预后价值。方法 应用实时荧光定量 PCR 法检测 53 例结直肠癌初诊患者、16 例结直肠癌手术患者、42 例结直肠息肉患者、20 例结直肠癌术后复发或转移患者和 40 例体检健康者血清 HOXA11-AS 水平。结果 结直肠癌初诊患者 HOXA11-AS 水平 $M(P_{25} \sim P_{75})$ 为 2.69(1.69~3.49), 显著高于结直肠息肉患者($t=6.622, P<0.05$)和体检健康者($t=6.535, P<0.05$); 结直肠癌术后复发或转移患者 HOXA11-AS 水平显著高于结直肠癌初诊患者($t=7.141, P<0.05$)和结直肠癌手术患者($t=4.673, P<0.05$); 追踪 16 例患者血清 HOXA11-AS 表达各异,但总体术后较术前呈下降的趋势($t=3.666, P=0.000$); HOXA11-AS 高表达组患者的总体生存率明显低于 HOXA11-AS 低表达组患者($t=2.463, P<0.05$); 结直肠癌初诊患者受试者工作特征曲线下面积为 0.867 2, 将 1.495 设为临界值时, HOXA11-AS 作为结直肠癌血清诊断标志物的灵敏度为 80.00%, 特异度为 83.02%, 阳性预测值为 82.49%, 阴性预测值为 85.59%。结论 实时荧光定量 PCR 法检测血清 HOXA11-AS 稳定可靠, HOXA11-AS 可作为新型分子诊断标志物, 辅助诊断结直肠癌, 评价治疗效果和评估预后。

关键词: 结直肠癌; 长链非编码 RNA; 血清标志物; HOXA11-AS

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.04.002

中图法分类号: R735.3+5

文章编号: 1673-4130(2020)04-0389-04

文献标识码: A

Expression and significance of long-chain non-coding RNA HOXA11-AS in serum of patients with colorectal cancer*

LI Anming¹, WANG Xudong², JU Shaoqing², GAO Lingbao^{1△}

(1. Department of Blood Transfusion, the Fifth Affiliated Hospital of Nantong University, Taizhou, Jiangsu 225300, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226000, China)

Abstract: **Objective** To establish a method for detecting serum HOXA11-AS by real-time fluorescent quantitative PCR and explore its effect evaluation and prognosis in the diagnosis and treatment of colorectal cancer. **Methods** The serum HOXA11-AS levels of 53 newly diagnosed patients with colorectal cancer, 16 patients with colorectal cancer surgery, 42 patients with colorectal polyps, 20 patients with recurrence or metastasis of colorectal cancer and 40 healthy people were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** The HOXA11-AS level of $M(P_{25} - P_{75})$ of newly diagnosed colorectal cancer patients was 2.69(1.69 - 3.49), which was significantly higher than that of patients with colorectal polyps($t=6.622, P<0.05$) and those who were healthy in physical examination($t=6.535, P<0.05$). The levels of HOXA11-AS in patients with recurrence or metastasis of colorectal cancer were significantly higher than those in newly diagnosed colorectal cancer($t=7.141, P<0.05$) and patients with colorectal cancer surgery($t=4.673, P<0.05$). The expressions of HOXA11-AS in serum of 16 patients were different, but the overall postoperative showed a downward trend compared with preoperative($t=3.666, P=0.000$). The overall survival rate of patients with HOXA11-AS high expression group was significantly lower than that of patients with HOXA11-AS low expression group($t=2.463, P<0.05$). When the area under receiver operating characteristic curve of newly diagnosed patients with colorectal cancer was 0.867 2, and 1.495 was set as the critical value, the sensitivity,

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81672099); 江苏省重点研发专项项目(BE2015654); 南通市“临床实验诊断研究中心”建设项目(HS2015002)。

作者简介: 李安明, 男, 主管技师, 主要从事分子诊断方面的研究。△ 通信作者, E-mail: gxq1818@163.com。

本文引用格式: 李安明, 王旭东, 鞠少卿, 等. 长链非编码 RNA HOXA11-AS 在结直肠癌患者血清中的表达和意义[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(4): 389-392.

specificity, positive predictive value and negative predictive value of HOXA11-AS were 80.00%, 83.02%, 82.49% and 85.59%, respectively. **Conclusion** Serum HOXA11-AS can be stably and reliably detected by real-time fluorescent quantitative PCR, and can be used as a new molecular diagnostic marker to assist in the diagnosis of colorectal cancer, evaluate the treatment effect and evaluate the prognosis.

Key words: colorectal cancer; long non-coding RNA; serum marker; HOXA11-AS

结直肠癌是临床最常见的消化道恶性肿瘤之一,在全球发病率居恶性肿瘤的第 4 位,病死率居第 2 位^[1]。尽管最近在治疗和实验肿瘤学方面取得了进展,但诊断为结直肠癌的患者预后仍然很差^[2]。因此,早期诊断结直肠癌对改善患者的生活质量和提高生存率有着极其重要的意义^[3]。HOXA11-AS 是近年来发现的长链非编码 RNA(lncRNA)分子,在胃癌和上皮性卵巢癌中均有重要作用^[4-5]。在对肿瘤的鉴别诊断方面,目前研究者们大多采用的方法是从组织中提取 lncRNA,再将肿瘤组织的某种或某几种 lncRNA 的表达水平和癌旁组织进行比对^[6-8]。从组织中提取的 lncRNA 比从血清中提取的 lncRNA 丰度高,有利于对提取的 lncRNA 进行后续一系列的研究,但其取材困难,对患者造成的创伤较大,难以推广,因而对血清 lncRNA 的研究尤为重要。本文就 lncRNA HOXA11-AS 在结直肠癌患者血清中的表达及其临床价值进行探讨。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 4 月至 2016 年 9 月南通大学附属医院结直肠癌初诊患者血清标本 53 例(男性 33 例、女性 20 例,年龄 37~81 岁,中位数 61 岁),结直肠息肉患者 42 例(男性 25 例、女性 17 例,年龄 43~80 岁,中位数 64 岁),结直肠癌术后复发或转移患者 20 例(男性 12 例、女性 8 例,年龄 48~82 岁,中位数 66 岁),门诊体检健康者 40 例(男性 24 例、女性 16 例,年龄 43~80 岁,中位数 63 岁)。对 16 例结直肠癌手术患者采集各时间段的血清标本并进行术前、术后追踪随访。纳入标准:经过内镜室活检及手术后经病理证实为结直肠癌的初诊患者。排除标准:(1)结直肠癌初诊患者在手术前均未接受过化疗、放疗及免疫治疗且未合并其他肿瘤;(2)结直肠息肉患者均未合并其他疾病;(3)体检健康者的白细胞计数为在 $(4\sim 8)\times 10^9/L$ 且肝肾功能均在正常范围。本研究获得该院伦理委员会批准,所有标本均得到受试者的知情同意后采集。

1.2 仪器与试剂 主要仪器:落地式多用途离心机购自日本 Hitachi 公司,型号 CF16RX;逆转录扩增仪购自美国 Bio-Rad 公司;实时荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司,型号 7500;制冰机购自日本 Sanyo 公司,型号 SIM-F140AY65;−80℃超低温冰箱购自美国 Backman-Coulter 公司;化学发光仪购自美国雅培诊断有限公司;漩涡振荡仪购自德国 Ika 公司,型号 MS 3digital;微量离心机购自日本 Tomy 公司,型号

PMC-880;紫外分光光度计购自德国 Implen 公司,型号 Nano Photometer。主要试剂:异丙醇、无水乙醇购自中国国药集团化学试剂有限公司;HOXA11-AS、GAPDH 荧光定量 PCR 引物购自中国广州锐博生物科技有限公司;血液(液体标本)总 RNA 快速提取试剂盒购自中国北京百泰克生物技术有限公司;逆转录试剂盒购自美国 Thermo 公司;荧光染料 SYBR Green I Master 购自德国 Roche 公司。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 采用含分离胶的真空管采集血液标本,3 000 r/min 离心 15 min,将 2 mL 血清立即移入无菌小型离心管内,并于 −80℃冻存备用。

1.3.2 实时荧光定量 PCR 取 3 μL cDNA,采用相对定量的方法进行实时荧光定量 PCR;每次 PCR 反应时另取由 60 例体检健康者混合血清组成的对照血清作为每次反应的参比;采用相对定量 PCR 的方法计算相对表达值;HOXA11-AS 的上游引物序列为 5'-GTA AGG CTG TGA CAT TGG-3',HOXA11-AS 下游引物序列为 5'-GCT CTG GGT TGA CGA TAA-3';GAPDH 上游引物序列为 5'-CCC TTC ATT GAC CTC AAC TA-3',GAPDH 下游引物序列为 5'-TGG AAG ATG GTG ATG GGA TT-3'。反应条件为 95℃ 10 min;95℃ 15 s,58℃ 31 s,72℃ 31 s,45 个循环;95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 15 s,60℃ 15 s。58~95℃收集荧光,通过溶解曲线评估 PCR 反应的特异性。血清 HOXA11-AS 的检测及参考值:收集 53 例结直肠癌初诊患者,16 例结直肠癌手术患者,20 例结直肠癌术后复发或转移患者,42 例结直肠息肉患者和 40 例同期门诊体检健康者的血清标本。在优化 PCR 反应条件后,采用实时荧光定量 PCR 的方法检测 HOXA11-AS 的相对表达值。绘制受试者工作特征曲线(ROC 曲线),根据约登指数定义,选取 ROC 曲线下特异度与灵敏度之和最大时所对应的 RQ 值为临界值,血清 HOXA11-AS 水平 ≥ 临界值时为阳性结果,反之则为阴性结果。

1.4 统计学处理 使用 Graphpad Prism 5.0 版软件进行绘图,SPSS19.0 版软件进行统计学分析。各组血清 HOXA11-AS 相对表达量以 RQ 值中位数(四分位数)[$M(P_{25}\sim P_{75})$]表示;两个独立标本比较,采用独立标本 *t* 检验,多个独立标本比较采用单因素卡方检验;ROC 曲线及曲线下面积(AUC)评价血清 HOXA11-AS 检测对结直肠癌的诊断效能, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 线性分析 将混合对照血清 cDNA 进行 10 倍梯度稀释后绘制标准曲线。计算 GAPDH 的标准曲线为 $Y = -3.3198X + 24.972$, $\chi^2 = 0.9879$; HOXA11-AS 的标准曲线为 $Y = -3.0404X + 28.511$, $\chi^2 = 0.9921$; 依据扩增效率公式 $E\% = (10 - 1/\text{斜率} - 1) \times 100\%$ 计算得该法扩增效率为 EGAPDH% = 100.09%, EHOXA11-AS% = 113.26%, 说明该检测方法线性良好, 即可以检测血清中不同水平的 HOXA11-AS。

2.2 重复性与特异性 将同一份混合血清参照品的同一批次进行 20 个平行孔检测 HOXA11-AS 和 GAPDH, 统计循环阈值 (Ct 值) 计算批内变异系数 (CV); 将混合血清等分成 20 份, 每天 1 份, 连续检测 20 天, 统计 Ct 值测得批间重复性; 计算批间 CV。实时荧光定量 PCR 溶解曲线呈平滑单峰, HOXA11-AS 溶解温度为 76.00 ℃。见表 1。

表 1 HOXA11-AS 和 GAPDH 批内/批间重复性				
项目	HOXA11-AS		GAPDH	
	$\bar{x} \pm s$	CV (%)	$\bar{x} \pm s$	CV (%)
批内	28.290 0 ± 0.101 2	1.60	24.990 0 ± 0.109 7	1.96
批间	28.270 0 ± 0.1900	3.01	25.070 0 ± 0.208 4	3.72

2.3 比较均值 对 53 例结直肠癌初诊患者、42 例结直肠息肉患者和 40 例体检健康者血清 HOXA11-AS 的相对表达值进行检测, 结直肠癌初诊患者的相对表达值显著高于结直肠息肉患者 ($t = 6.622, P < 0.05$) 和体检健康者 ($t = 6.535, P < 0.05$), 结直肠息肉患者 $M(P_{25} \sim P_{75})$ 为 1.25 (0.86 ~ 1.45), 体检健康者 $M(P_{25} \sim P_{75})$ 为 1.17 (0.67 ~ 1.40), 差异比较无统计学意义 ($t = 0.519, P = 0.605$)。见图 1。

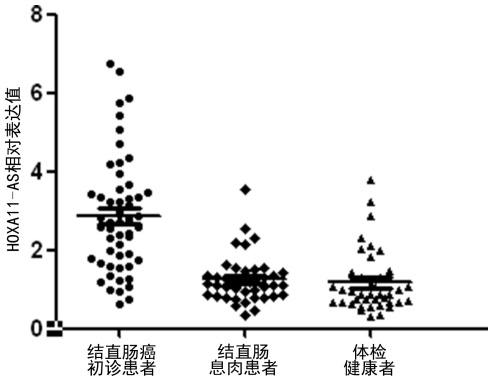


图 1 结直肠癌初诊患者、结直肠息肉患者、体检健康者血清 HOXA11-AS 相对表达量

2.4 诊断效能 对 53 例结直肠癌初诊患者和 40 例体检健康者血清 HOXA11-AS 水平进行检测。AUC 为 0.8672 (95% CI 0.7928 ~ 0.9416)。将血清 HOXA11-AS 相对表达值 1.495 设为临界值时, HOXA11-AS 作为结直肠癌血清诊断标志物的特异度为 83.02%, 灵敏度为 80.00%, 阳性预测值为

82.49%, 阴性预测值为 85.59%。见图 2。

2.5 追踪随访 对 53 例结直肠癌初诊患者、16 例结直肠癌手术患者、20 例结直肠癌术后复发或转移患者血清 HOXA11-AS 进行检测比较。3 组间两两比较结直肠癌术后复发或转移患者血清 HOXA11-AS 显著高于结直肠癌初诊患者 ($t = 7.141, P < 0.05$) 和结直肠癌手术患者 ($t = 4.673, P < 0.05$); 追踪 16 例患者血清 HOXA11-AS 表达各异, 但总体术后较术前呈下降的趋势 ($t = 3.666, P = 0.000$)。见图 3。

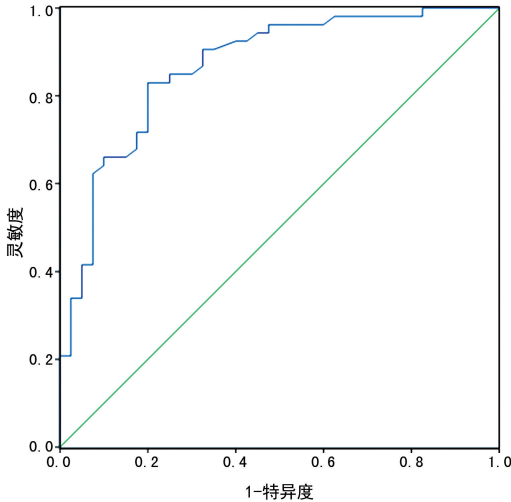


图 2 结直肠癌初诊患者与体检健康者的 ROC 曲线

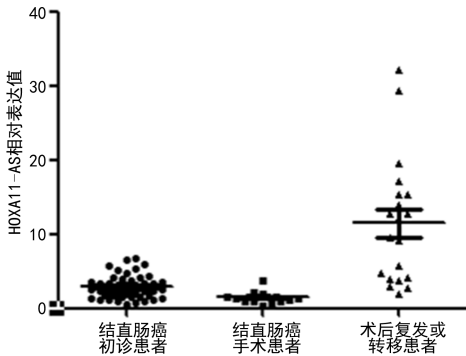


图 3 结直肠癌初诊、结直肠癌手术和结直肠癌术后复发或转移患者血清 HOXA11-AS 相对表达量

2.6 生存曲线分析 在长期随访观察中, 笔者发现 HOXA11-AS 高表达组患者 ($n = 27$) 的生存时间明显低于 HOXA11-AS 低表达组 ($n = 26$), HOXA11-AS 高表达组患者的总体生存率明显低于 HOXA11-AS 低表达组患者 ($t = 2.463, P < 0.05$)。见图 4。

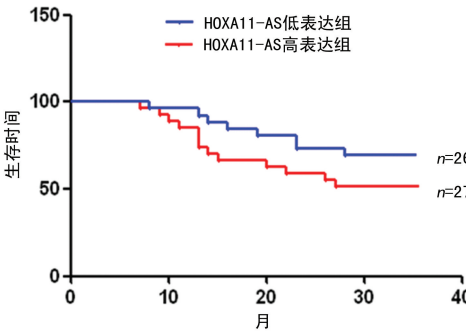


图 4 结直肠癌生存曲线分析

3 讨 论

近几年关于血清 lncRNA 的研究在国内逐渐受到重视, lncRNA 与肿瘤之间的关系也逐渐得到证实^[9-14]。人类全基因组分析显示, 基因组中只有不超过 2% 的序列能够编码出有生物学功能的蛋白质, 而超过 90% 的序列会被转录成非编码 RNA^[15-18]。其中的 lncRNA 是分子生物学领域近来的研究热点。大量的文献显示, lncRNA 广泛参与了各种生理和病理过程, 包括染色体修饰、细胞分化、免疫反应和疾病状态。杨歆^[19]成功建立了血清中 lncRNAs (linc01608、linc00594、rp11-91j3. 3、h19 及 HOTAIR) 的检测方法。SVOBODA 等^[20]研究发现, 大肠癌原发灶和血液中 HOTAIR 相对表达上调与预后不良有关, 其水平可能是评估散发性结直肠癌预后的替代标记。这些研究为血清 lncRNAs 的临床应用奠定了基础。

本研究成功建立起了一种稳定、灵敏、特异的 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测血清 HOXA11-AS 的方法, 方法的可行性为后期的实验研究数据的可靠性打下了坚实的基础。另外结果还显示, HOXA11-AS 有成为结直肠癌血清诊断标志物的潜在价值, 且在联合检测的应用上意义显著, 能够明显提高结直肠癌初诊患者的诊断效能。在预后方面, 对同一患者进行的术前、术后不同时间段的追踪实验结果显示, 16 例患者血清循环 HOXA11-AS 在结直肠癌术后总体较术前呈下降趋势, 故 HOXA11-AS 的检测可用于术后病情监测。生存曲线分析 HOXA11-AS 发现, 53 例患者中 HOXA11-AS 高表达组的患者总体生存时间比 HOXA11-AS 低表达组的患者要短。从而证实血清中 HOXA11-AS 可作为结直肠癌诊断及预后判断的良好指标。

4 结 论

血清 HOXA11-AS 能通过实时荧光定量 PCR 法稳定可靠地检测, 可作为新型分子诊断标志物, 辅助诊断结直肠癌, 评价治疗效果和评估预后。

参考文献

- [1] 姜毅楠, 蔡逊, 马丹丹, 等. 趋化因子受体 1 在人结肠癌中的表达及其与肿瘤转移的相关性研究[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2014, 43(4): 427-430.
- [2] LI T, XU C, CAI B, et al. Expression and clinicopathological significance of the lncRNA HOXA11-AS in CRC[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(5): 4155-4160.
- [3] 张巨彪, 苏秀兰, 欧阳晓晖. 联合检测血清肿瘤标志物对结肠癌的诊断价值[J]. 医学综述, 2015, 21(20): 3800-3801.
- [4] SUN M, NIE F, WANG Y, et al. LncRNA HOXA11-AS promotes proliferation and invasion of gastric cancer by scaffolding the chromatin modification factors PRC2, LSD1, and DNMT1[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(21): 6299-6310.
- [5] RICHARDS E J, PERMUTH-WEY J, LI Y, et al. A functional variant in HOXA11-AS, a novel long non-cod-

ing RNA, inhibits the oncogenic phenotype of epithelial ovarian cancer [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(33): 34745-34757.

- [6] KAM Y, RUBINSTEIN A, NAIK S, et al. Detection of a long non-coding RNA (CCAT1) in living cells and human adenocarcinoma of colon tissues using FIT-PNA molecular beacons[J]. *Cancer Lett*, 2014, 352(1): 90-96.
- [7] ATALA A. The long noncoding RNA SchLAP1 promotes aggressive prostate cancer and antagonizes the SWI/SNF complex[J]. *J Urol*, 2014, 192(2): 613.
- [8] KHAKIANI M N, EMADI-BAYGI M, NIKPOUR P. Augmented expression levels of lncRNAs ecCEBPA and UCA1 in gastric cancer tissues and their clinical significance[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2017, 20(10): 1149-1158.
- [9] ZHAO X, LIU M, ZHANG J, et al. Long noncoding RNA CPS1-IT1 suppresses cell proliferation and metastasis in human lung cancer[J]. *Oncol Res*, 2016, 25(3): 373-380.
- [10] 李渊. 长链非编码 RNA GAS5, SLC25A25-AS1 在结直肠癌中的作用及机理研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2016.
- [11] 张弦, 廖端芳, 曹德良. AKR1B10 对结肠癌和肺癌细胞生长的作用及其机制研究[J/CD]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(67): 5-6.
- [12] 崔盈盈. HOXA11 在胃癌中的表观遗传学调控及其在 Wnt 信号通路中的功能研究[D]. 北京: 中国人民解放军军医进修学院, 2013.
- [13] 刘东楠, 张锦辉, 夏荣钧, 等. 检测结直肠癌患者血清中长链非编码 RNA-SchLAP1 和 DEK 表达的临床意义[J]. 辽东学院学报(自然科学版), 2017, 24(2): 120-124.
- [14] 张鸿程, 宋广元, 谈伟健, 等. lncRNA HOXA11-AS 对骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(5): 497-502.
- [15] DJEBALI S, DAVIS C A, MERKEL A, et al. Landscape of transcription in human cells [J]. *Nature*, 2012, 489(7414): 101-108.
- [16] PONTING C P, BELGARD T G. Transcribed dark matter: meaning or myth? [J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(2): 162-168.
- [17] LOCKE J A, BLACK P C. Next generation biomarkers in prostate cancer[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2016, 21: 328-342.
- [18] WANG Q, ZHANG J, LIU Y, et al. A novel cell cycle-associated lncRNA, HOXA11-AS, is transcribed from the 5-prime end of the HOXA transcript and is a biomarker of progression in glioma[J]. *Cancer Lett*, 2016, 373(2): 251-259.
- [19] 杨歆. 血清中长链非编码 RNA 检测方法的建立及其在结直肠癌诊断中的应用[D]. 重庆: 陆军军医大学, 2016.
- [20] SVOBODA M, SLYSKOVA J, SCHNEIDEROVA M, et al. HOTAIR long non-coding RNA is a negative prognostic factor not only in primary tumors, but also in the blood of CRC patients[J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(7): 1510-1515.