

• 论 著 •

长链非编码 RNA ELFN1-AS1 在结直肠癌患者血清中的表达及临床意义*

董利阳,徐小卫,郑婷婷,刘佳梦,毛朝明

江苏大学附属医院核医学科,江苏镇江 212002

摘要:**目的** 探讨长链非编码 RNA(lncRNA)ELFN1-AS1 在结直肠癌患者血清中的表达及临床意义。**方法** 选取 50 例未予手术和放化疗治疗的结直肠癌患者作为结直肠癌组,另选取 40 例健康志愿者作为对照组;提取两组研究对象血清总 RNA,实时定量 PCR 法检测结直肠癌组和对照组血清中 lncRNA ELFN1-AS1 相对表达水平;分析结直肠癌组 lncRNA ELFN1-AS1 相对表达水平与临床病理特征之间的关系;绘制受试者工作特征(ROC)曲线,分析血清 ELFN1-AS1 对结直肠癌的诊断价值。**结果** 结直肠癌组血清中 lncRNA ELFN1-AS1 相对表达水平明显高于对照组($P<0.001$);lncRNA ELFN1-AS1 相对表达水平在不同性别、年龄、肿瘤部位及肿瘤最大径患者之间,差异无统计学意义($P>0.05$),而在不同淋巴结转移、远处转移状态及 TNM 分期患者之间差异有统计学意义($P<0.05$);血清 lncRNA ELFN1-AS1 诊断结直肠癌的 ROC 曲线下面积为 0.821,灵敏度为 74.0%,特异度为 82.5%。**结论** 血清 lncRNA ELFN1-AS1 可能成为结直肠癌诊断的生物学标志物。

关键词:长链非编码 RNA ELFN1-AS1; 结直肠癌; 血清; 生物学标志物

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.02.003 **中图法分类号:**R735.3

文章编号:1673-4130(2022)02-0143-04 **文献标志码:**A

Expression and clinical significance of serum long non-coding RNA ELFN1-AS1 in colorectal cancer patients*

DONG Liyang, XU Xiaowei, ZHENG Tingting, LIU Jiameng, MAO Chaoming

Department of Nuclear Medicine, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212002, China

Abstract: Objective To explore the expression of serum long non-coding RNA (lncRNA) ELFN1-AS1 in the patients with colorectal cancer and its clinical significance. **Methods** Totally 50 colorectal cancer patients without operation, radiotherapy and chemotherapy were taken as colorectal cancer group, and another 40 healthy volunteers were taken as control group. Total RNA was isolated from two groups, and the relative expression level of ELFN1-AS1 was detected by Real Time PCR. The relationship of the relative expression level of serum lncRNA ELFN1-AS1 in colorectal cancer group with clinicopathological features was analyzed, and the value of serum lncRNA ELFN1-AS1 in the diagnosis of colorectal cancer was evaluated by the receiver operating characteristic (ROC) curve. **Results** The relative expression level of lncRNA ELFN1-AS1 in the colorectal cancer group was significantly higher than that in the control group ($P<0.001$). No significant differences were found among the relative expression level of serum lncRNA ELFN1-AS1 in patients with different gender, age, lesion location and tumor maximum diameter ($P>0.05$), but the differences of relative expression level of lncRNA ELFN1-AS1 in patients with different lymph-node metastasis, distant metastasis status and TNM stage were statistically significant ($P<0.05$). The area under the ROC curve, sensitivity and specificity of serum lncRNA ELFN1-AS1 for the diagnosis of colorectal cancer were 0.821, 74.0% and 82.5%, respectively. **Conclusion** Serum lncRNA ELFN1-AS1 might be a biomarker for the diagnosis of colorectal cancer.

Key words: long non-coding RNA ELFN1-AS1; colorectal cancer; serum; biomarker

2018 年全球肿瘤流行病学调查显示,结直肠癌的发病率在全球恶性肿瘤中排第 3 位,在肿瘤病死率中排第 2 位^[1]。研究表明,结直肠癌患者的生存率与疾病分期明显相关,Ⅰ~Ⅱ期患者的整体生存率约为

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81900562);镇江市重点研发计划(社会发展)项目(SH2019047)。

作者简介:董利阳,男,主管技师,主要从事肿瘤发病机制及其临床检验诊断研究。

本文引用格式:董利阳,徐小卫,郑婷婷,等.长链非编码 RNA ELFN1-AS1 在结直肠癌患者血清中的表达及临床意义[J].国际检验医学杂志,2022,43(2):143-145.

90%，Ⅲ期约为 71%，Ⅳ期约为 14%^[2]。显然，早期发现对提高结直肠癌患者的整体生存率具有重要的临床意义。长链非编码 RNA(lncRNA)是一种长度大于 200 nt 且蛋白质编码能力有限的 RNA。研究发现，lncRNA 在多种类型的肿瘤组织中表达异常，且影响肿瘤的发生、癌变和转移^[3]。lncRNA 亦在血液样品中稳定表达，显示出作为新型肿瘤标志物的潜能，而将循环 lncRNA 作为癌症诊断的标志物已在肺癌、肝癌、乳腺癌中被报道^[4]。lncRNA ELFN1-AS1 是一种新近发现的 lncRNA，位于 ELFN1 基因的反义位置^[5]。GEPIA 数据库分析发现，结直肠癌患者结肠病灶中 lncRNA ELFN1-AS1 高表达，并与患者总生存率降低密切相关^[6]。笔者先前对 22 例结直肠癌患者结肠和其邻近组织中 lncRNA ELFN1-AS1 测定时发现，lncRNA ELFN1-AS1 水平在结直肠癌组织中明显升高。体外细胞实验发现，ELFN1-AS1 的敲除明显抑制了结直肠癌细胞株的生长和迁移，提示 lncRNA ELFN1-AS1 失调在结直肠癌发展中发挥关键作用^[7]。本研究旨在探究 lncRNA ELFN1-AS1 在结直肠癌患者血清中的表达及临床意义，以期对结直肠癌的早期诊断提供新策略。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2019 年 9 月至 2021 年 2 月于本院胃肠外科和肿瘤科诊治的结直肠癌患者 50 例作为结直肠癌组。纳入标准：(1)病理学检查明确诊断；(2)为初次诊治，无放疗、化疗及靶向抗癌治疗史。排除标准：(1)合并其他肿瘤；(2)既往有结直肠肿瘤史，并接受抗肿瘤治疗；(3)患有精神疾病或存在严重的心、肝、肺等其他重要脏器疾病。收集同期本院体检健康者 40 例作为对照组。结直肠癌组男 30 例，女 20 例；年龄<60 岁患者 17 例，≥60 岁 33 例。对照组男 25 例，女 15 例；年龄<60 岁 13 例，≥60 岁 27 例。结直肠癌组和对照组性别、年龄比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。本研究通过本院医学伦理委员会批准，研究对象均知情同意。

1.2 仪器与试剂 MolPure® Blood RNA 提取试剂盒(上海 YEASEN 公司)，lncRNA ELFN1-AS1 及 18S real-time PCR 引物(广州复能基因公司)，All-in-one First-Strand cDNA Synthesis 反转录试剂盒及 All-in-one™ qPCR Mix 实时荧光定量试剂盒(广州复能基因公司)，NnoDrop ONE 微量紫外分光光度计(美国 Thermo 公司)，普通 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)，QuantStudio 5 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo 公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 采集所有研究对象的空腹静脉血 5 mL(结直肠癌患者于手术前采集，体检健康者于体检时采集)，置于含促凝剂的真空采血管中，2 000 r/min 离心 10 min，吸取上层血清置于无 RNase 的 1.5 mL EP 管中并于-80℃冰箱保存备用。同时获

取结直肠癌患者临床资料用于分析。

1.3.2 血清总 RNA 的提取 按照 MolPure® Blood RNA 试剂盒说明书提取血清总 RNA，简化步骤如下：血清样品用裂解液 LB 充分裂解后加入氯仿，混匀后 12 000 r/min 离心，取上层水相并加入无水乙醇(混合液)，将混合液置于 RNA 吸附柱并离心，经过去蛋白液及漂洗液洗涤后收集 RNA。应用 NnoDrop ONE 测定 RNA 浓度及纯度。

1.3.3 反转录 按照反转录试剂盒说明书将获取的合格 RNA 反转录为 cDNA，反应条件为 37℃ 60 min，85℃ 5 min，用 DEPC 水 2 倍稀释 cDNA 后置于-20℃冰箱保存。

1.3.4 实时荧光定量 PCR 荧光定量 PCR 总反应体系为 20 μL，包括 2 μmol/L 上、下游引物各 2 μL，2×All-in-One qPCR Mix 10 μL，cDNA 2 μL，ddH₂O 4 μL。循环参数：95℃ 预变性 10 min，95℃ 变性 10 s，60℃ 退火 20 s，72℃ 延伸 15 s(采集荧光信号)，共 40 个循环。lncRNA ELFN1-AS1：正向引物 5'-CCT GAT GTT CTG CTT GGT TAT-3'，反向引物 5'-ACA CAG CTC CTG CTC TTG-3'；18S(内参基因)：正向引物 5'-ACA GGA TTG ACA GAT TGA-3'，反向引物 5'-TAT CGG AAT TAA CCA GAC A-3'。使用 QuantStudio Design Software v1.4.3 进行熔解曲线分析，评测 PCR 产物的特异度。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 lncRNA ELFN1-AS1 的相对表达水平，公式为 ΔΔCt = 结直肠癌(Ct_{目的} - Ct_{内参}) - 健康对照(Ct_{目的} - Ct_{内参})。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行统计分析。数据为非正态分布，以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示，组间比较采用 Mann-Whitney U 检验。采用受试者工作特征(ROC)曲线评价 lncRNA ELFN1-AS1 对结直肠癌的诊断价值。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结直肠癌组与对照组血清 lncRNA ELFN1-AS1 检测结果 结直肠癌组血清 lncRNA ELFN1-AS1 的相对表达水平[2.291(1.23, 4.55)]明显高于对照组[0.46(0.13, 1.27)]($Z = -5.209, P<0.001$)，见图 1。

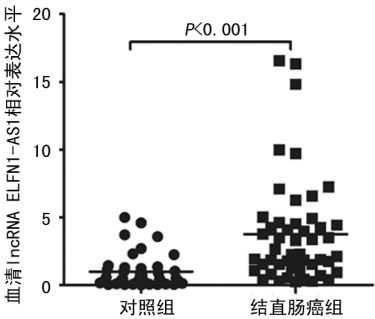


图 1 血清 lncRNA ELFN1-AS1 在对照组与结直肠癌组中的相对表达水平

2.2 血清 lncRNA ELFN1-AS1 相对表达水平与结

直肠癌患者临床病理参数关系 将血清 lncRNA ELFN1-AS1 相对表达水平与结直肠癌患者性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤最大径、淋巴结转移、远处转移状态、TNM 分期进行分析,结果发现血清 lncRNA ELFN1-AS1 相对表达水平在不同淋巴结转移、远处转移状态及 TNM 分期患者之间差异有统计学意义($P<0.05$),而在不同性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤最大径患者之间差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 血清 lncRNA ELFN1-AS1 相对表达水平与结直肠癌患者临床病理参数的关系[M(P_{25} , P_{75})]

参数	n	lncRNA ELFN1-AS1 相对表达水平	Z	P
性别			-0.881	0.378
男	30	2.01(1.01,4.49)		
女	20	3.33(1.60,4.83)		
年龄(岁)			-0.297	0.766
<60	17	2.27(1.52,4.73)		
≥60	33	2.31(1.08,4.54)		
肿瘤部位			-1.247	0.214
直肠	14	3.64(1.54,5.42)		
结肠	36	2.31(1.07,4.39)		
肿瘤最大径(cm)			-0.604	0.546
<5	33	2.67(1.38,4.98)		
≥5	17	1.89(1.02,4.37)		
淋巴结转移			-3.037	0.002
无	23	1.56(0.70,2.31)		
有	27	4.11(1.94,5.03)		
远处转移			-4.026	<0.001
无	40	1.86(0.98,3.71)		
有	10	6.85(4.58,11.00)		
TNM 分期			-3.872	<0.001
I+II 期	21	1.55(0.58,2.06)		
III+IV 期	29	4.26(2.03,6.44)		

2.3 血清 lncRNA ELFN1-AS1 检测对结直肠癌的诊断价值 绘制 ROC 曲线评估 lncRNA ELFN1-AS1 对结直肠癌的诊断效能,结果表明 lncRNA ELFN1-AS1 的 ROC 曲线下面积(AUC)为 0.821(95%CI:0.734~0.908),当最佳截断值为 1.465 时,其诊断结直肠癌的灵敏度为 74.0%,特异度为 82.5%,见图 2。

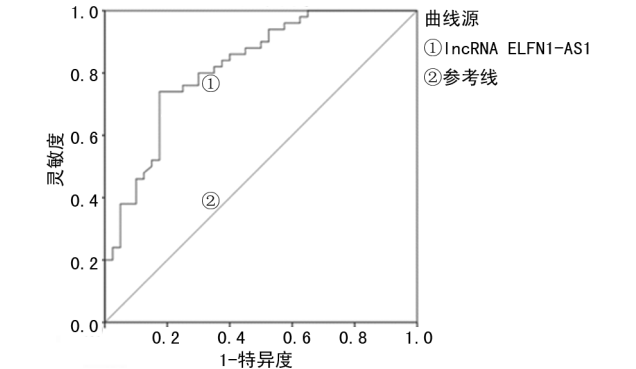


图 2 血清 lncRNA ELFN1-AS1 诊断结直肠癌的 ROC 曲线

3 讨论

近年来,lncRNA 被报道参与了结直肠癌的发生过程^[8]。研究表明,lncRNA ELFN1-AS1 不仅参与结直肠癌的发生,且在细胞迁移及肿瘤侵袭中发挥重要作用。LEI 等^[9]发现,lncRNA ELFN1-AS1 在结直肠癌肿瘤组织中的表达水平明显高于邻近癌旁正常组织,lncRNA ELFN1-AS1 表达水平较高的患者生存率明显降低。DU 等^[10]发现,lncRNA ELFN1-AS1 可以海绵样吸附 miR-191-5p,从而释放特殊 AT 丰富序列结合蛋白 1(SATB1)的促癌作用促进结直肠癌的生长及转移。笔者前期发现,lncRNA ELFN1-AS1 通过激活 Erk 及 EMT 信号通路,促使结直肠癌细胞的增殖和迁移^[7]。本研究结果提示,结直肠癌组血清中可稳定表达 lncRNA ELFN1-AS1,且其相对表达水平明显高于对照组,血清中 lncRNA ELFN1-AS1 相对表达水平在不同性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤最大径患者之间差异无统计学意义($P>0.05$),但在不同临床 TNM 分期、不同淋巴结转移和远处转移状态患者之间差异有统计学意义($P<0.05$),提示 lncRNA ELFN1-AS1 可能成为诊断结直肠癌的生物学标志。

癌症基因组图谱(TCGA)数据库分析发现,结直肠组织(结直肠癌 227 例,正常对照 26 例)中 lncRNA ELFN1-AS1 的表达具有诊断结直肠癌的潜在价值,其诊断结直肠癌的灵敏度为 87.6%,特异度为 100.0%^[11]。本研究结果显示,血清 lncRNA ELFN1-AS1 诊断结直肠癌的 AUC 为 0.821,当最佳截断值取 1.465 时,灵敏度和特异度分别是 74.0%、82.5%,进一步表明 lncRNA ELFN1-AS1 对诊断结直肠癌的重要价值。鉴于血清学的取材方便、无创性的特点,血清 lncRNA ELFN1-AS1 在结直肠癌筛查中可能更具明显优势。

lncRNA ELFN1-AS1 表达水平在结直肠癌患者血清中明显升高,其表达水平与肿瘤转移和 TNM 分期有关,有望成为结直肠癌诊断的重要指标之一。但由于本研究样本量较小,仍需要进行大规模多中心临床研究来验证其有效性。

参考文献

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.

[2] MAI-BRITT W Ø. Review of blood-based colorectal cancer screening: how far are circulating cell-free DNA methylation markers from clinical implementation [J]. Clin Colorectal Cancer, 2018, 17(2): e415-e433.

[3] BHAN A, SOLEIMANI M, MANDAL S S. Long noncoding RNA and cancer: a new paradigm [J]. Cancer Res, 2017, 77(15): 3965-3981.

[4] BOLHA L, RAVNIK-GLAVAC M, GLAVAC D. Long noncoding RNAs as biomarkers in cancer [J]. Dis Markers, 2017, 2017: 7243968.

(下转第 151 页)

参考文献

[1] DULL R, DULL S. Redundant medication use during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease in hospitalized patients[J]. *Int J Clin Pharm*, 2020, 42(5):1278-1285.

[2] KISER T H, REYNOLDS P M, MOSS M, et al. Impact of macrolide antibiotics on hospital readmissions and other clinically important outcomes in critically ill patients with acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: a propensity score-matched cohort study[J]. *Pharmacotherapy*, 2019, 39(3):242-252.

[3] CASUCCI S, LIN L, HEWNER S, et al. Estimating the causal effects of chronic disease combinations on 30-day hospital readmissions based on observational Medicaid data[J]. *J Am Med Inform Assoc*, 2018, 25(6):670-678.

[4] FÜRST D, HAUBER D, REINHARDT P, et al. Gender, cholinesterase, platelet count and red cell count are main predictors of peripheral blood stem cell mobilization in healthy donors[J]. *Vox Sang*, 2019, 114(3):275-282.

[5] 陆世琨, 田山, 苏乐乐, 等. 血清胆碱酯酶评估炎症性肠病活动度的价值分析[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2019, 28(3):282-286.

[6] IZVOLSKAIA M, SHAROVA V, ZAKHAROVA L. Perinatal inflammation reprograms neuroendocrine, immune, and reproductive functions: profile of cytokine biomarkers[J]. *Inflammation*, 2020, 43(4):1175-1183.

[7] 慢性阻塞性肺疾病急性加重(AECOPD)诊治专家组. 慢性阻塞性肺疾病急性加重(AECOPD)诊治中国专家共识(2017 年更新版)[J]. *国际呼吸杂志*, 2017, 37(14):1041-1057.

[8] AGGARWAL A N, LALLAWMKIMA I, BASU D. Psychometric validation of a Hindi version of a chronic obstructive pulmonary disease (COPD) assessment test in patients in northern India[J]. *Natl Med J India*, 2017, 30(4):193-197.

[9] 陈晓灿, 霍建民, 胡古月. 预测慢性阻塞性肺疾病急性加重再入院风险的研究进展[J]. *临床肺科杂志*, 2020, 25(2):293-297.

[10] WU Y K, LAN C C, TZENG I S, et al. The COPD-readmission (CORE) score: a novel prediction model for one-year chronic obstructive pulmonary disease readmissions[J]. *J Formos Med Assoc*, 2021, 120(3):1005-1013.

[11] 余珈漫. 血清胆碱酯酶、总胆汁酸检测在肝脏疾病诊断中的价值研究[J]. *中国医刊*, 2017, 24(1):105-107.

[12] JACOBS D M, NOYES K, ZHAO J, et al. Early hospital readmissions after an acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease in the nationwide readmissions database[J]. *Ann Am Thorac Soc*, 2018, 15(7):837-845.

[13] 许玲芬, 李吉梅, 娄明远. 慢阻肺急性加重期患者炎症因子与肺功能的相关性分析[J]. *医学临床研究*, 2019, 36(6):1153-1154.

[14] 王慧, 徐晓, 闫晓培, 等. 慢性阻塞性肺疾病患者血清前白蛋白、胆碱酯酶与肺功能的关系[J]. *中国医药导报*, 2018, 15(19):91-95.

[15] 张改巾, 申传安, 程文凤, 等. 大面积烧伤患者血清胆碱酯酶与病情变化及预后的相关性分析[J]. *解放军医学杂志*, 2018, 43(3):234-238.

[16] 曹莉莉, 孟晓皓, 张春玲. 重症肺部感染患者血清胆碱酯酶水平与患者预后的关系[J]. *海南医学*, 2018, 29(19):16-19.

[17] 张珣, 唐莎, 袁琳, 等. 气道上皮趋化因子与肺部炎症反应的研究进展[J]. *广东医学*, 2018, 39(21):3277-3282.

[18] 邓清洋, 孙建, 冯晓丽, 等. COPD 患者血清炎症指标与气道炎症的关系[J]. *西部医学*, 2020, 32(1):69-72.

(收稿日期:2021-03-12 修回日期:2021-09-11)

(上接第 145 页)

[5] POLEV D E, KARNAUKHOVA I K, KRUKOVSKAYA L L, et al. ELFN1-AS1: a novel primate gene with possible microRNA function expressed predominantly in human tumors[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014:398097.

[6] TANG Z, KANG B, LI C, et al. GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1):W556-W560.

[7] DONG L, DING C, ZHENG T, et al. Extracellular vesicles from human umbilical cord mesenchymal stem cells treated with siRNA against ELFN1-AS1 suppress colon adenocarcinoma proliferation and migration[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(11):6989-6999.

[8] DASTMALCHI N, SAFARLIZADEH R, NARGESI M M. lncRNAs: potential novel prognostic and diagnostic biomarkers in colorectal cancer[J]. *Curr Med Chem*, 2020, 27(30):5067-5077.

[9] LEI R, FENG L, HONG D. ELFN1-AS1 accelerates the proliferation and migration of colorectal cancer via regulation of miR-4644/TRIM44 axis[J]. *Cancer Biomark*, 2020, 27(4):433-443.

[10] DU Y, HOU Y, SHI Y, et al. Long non-coding RNA ELFN1-AS1 promoted colon cancer cell growth and migration via the miR-191-5p/Special AT-Rich sequence-binding protein 1 Axis[J]. *Front Oncol*, 2020, 10(4):588360.

[11] LIU J X, LI W, LI J T, et al. Screening key long non-coding RNAs in early-stage colon adenocarcinoma by RNA-sequencing[J]. *Epigenomics*, 2018, 10(9):1215-1228.

(收稿日期:2021-03-26 修回日期:2021-08-18)