

· 论 著 · DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2021. 05. 011

长链非编码 RNA Lnc00478 在卵巢癌组织及细胞系中的表达及临床意义

胡玉利

东部战区总医院妇产科, 江苏南京 210002

摘要:**目的** 探讨长链非编码 RNA(LncRNA) Lnc00478 在卵巢癌中的表达及其对卵巢癌生物学行为的影响。**方法** 收集该院 2018—2019 年收治的卵巢癌患者病历资料,选择手术后病理诊断为卵巢癌的标本,且癌旁组织未检测到癌细胞的标本 80 例,采用实时荧光定量 PCR 检测卵巢癌组织及癌旁组织中 Lnc00478 的表达水平,分析其表达水平与卵巢癌的临床病理特征的关系;利用 Lnc00478 小干扰 RNA(siRNA)转染人高转移卵巢癌细胞(HO-8910PM 细胞),验证 Lnc00478 对 HO-8910PM 细胞增殖、侵袭及迁移的影响。**结果** 与癌旁组织相比,卵巢癌组织中 Lnc00478 表达水平更高,差异有统计学意义($P<0.05$)。卵巢癌组织中 Lnc00478 的表达水平与肿瘤大小、发病年龄、肿瘤 TNM 分期及淋巴结转移有关。与 siRNA-NC 相比,siRNA-1 敲低 Lnc00478 后,HO-8910PM 细胞增殖有所减慢,迁移能力和侵袭能力也有所降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** Lnc00478 在卵巢癌组织中的表达水平受多种因素的影响,敲低 Lnc00478 可抑制卵巢癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力,借助 Lnc00478 有望提高对卵巢癌的诊断和治疗水平。

关键词:长链非编码 RNA; Lnc00478; 卵巢癌; 细胞增殖; 迁移; 侵袭
中图法分类号:R737.31 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2021)05-0617-04

Expression and clinical significance of long non-coding RNA Lnc00478
in ovarian cancer tissues and cell lines

HU Yuli

Department of Obstetrics and Gynecology, the General Hospital of the
Eastern Theater Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China

Abstract: Objective To investigate the expression of long non-coding RNA (LncRNA) Lnc00478 in ovarian cancer and its influence on the biological behavior of ovarian cancer. **Methods** The data of ovarian cancer patients admitted to this hospital from 2018 to 2019 were collected, and 80 specimens with ovarian cancer diagnosed pathologically after operation and without cancer cells detected in paracancerous tissue were selected. Real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect the expression level of Lnc00478 in ovarian cancer tissue and its paracancerous tissues, and analyze the relationship between its expression level and the clinico-pathological characteristics of ovarian cancer. Lnc00478 small interfering RNA (siRNA) was used to transfect human highly metastatic ovarian cancer cells (HO-8910PM cells) to verify its effect on the proliferation, invasion and migration of HO-8910PM cells. **Results** Compared with paracancerous tissues, the expression level of Lnc00478 in ovarian cancer tissues was higher, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The expression level of Lnc00478 in ovarian cancer tissue was related to tumor size, age of onset, tumor TNM stage and lymph node metastasis. Compared with siRNA-NC, after knocking down Lnc00478 by siRNA-1, the proliferation of HO-8910PM cells was slowed down, and the migration and invasion capabilities were also reduced, the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** The expression level of Lnc00478 in ovarian cancer tissues is affected by many factors. Knockdown of Lnc00478 can inhibit the proliferation, migration and invasion of ovarian cancer cells. Lnc00478 is expected to improve the diagnosis and treatment of ovarian cancer.

Key words: long non-coding RNA; long non-coding RNA 00478; ovarian cancer; cell proliferation; migration; invasion

卵巢癌是女性个体中发病率和病死率都较高的生殖系统恶性肿瘤^[1],由于早期缺乏特异的症状和筛查手段,卵巢癌确诊时一般已经发展至晚期,同时还对化疗药物耐药导致复发率高达 70%,是卵巢癌难以

作者简介:胡玉利,女,医师,主要从事妇科肿瘤方面的研究。
本文引用格式:胡玉利. 长链非编码 RNA Lnc00478 在卵巢癌组织及细胞系中的表达及临床意义[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(5): 617-619.

治愈的主要原因^[2]。尽管目前外科手术联合传统的化疗在卵巢癌治疗上取得很大的进展,但由于卵巢癌易广泛转移,绝大部分晚期患者在 5 年内复发^[3]。虽然很多生物标志物已经确认为卵巢癌重要的预测因子^[4-5],却很少能作为独立的预测因子,因此开发卵巢癌早期的生物标志物,将为卵巢癌的早期诊断和治疗提供帮助。

长链非编码 RNA(LncRNA)是不具有蛋白编码功能且长度多于 200 个核苷酸的 RNA,既往研究表明 LncRNA 在肿瘤的多种生物学行为中发挥重要的调控作用,如肿瘤发生、转移等^[6-8]。长链非编码 RNA Lnc00478 尚未明确在卵巢癌中的临床价值,本研究应用实时荧光定量 PCR(qPCR)技术分析 Lnc00478 在卵巢癌中的表达情况,结合 RNA 干扰技术和功能试验探讨 Lnc00478 在卵巢癌组织和细胞株中扮演的角色。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集东部战区总医院妇产科 2018—2019 年行手术治疗的卵巢癌患者病历资料。入组标准:(1)标本均病理诊断为卵巢癌,且癌旁组织未检测到肿瘤细胞;(2)术前未接受激素治疗及放化疗;(3)患者均系首次诊断、首次治疗,未合并其他疾病或其他肿瘤。满足上述条件的病例共计 80 例,年龄 30~75 岁,标本获取后根据病理结果分为癌组织、癌旁组织(距肿瘤 0.5 cm)。本研究经医院伦理委员会批准,患者均知情同意。

1.2 细胞来源 人高转移卵巢癌细胞(HO-8910PM 细胞)购于中国上海中科院生物研究所。HO-8910PM 细胞是一株来源于人卵巢癌细胞(HO-8910)的高转移亚系。

1.3 试剂与仪器 Trizol 试剂盒和 Lipofectamine™2000 购自美国 Invitrogen 公司,反转录试剂盒购自日本 Takara 公司,SYBR Green PCR 试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司,7900 型 qPCR 仪购自美国 ABI 公司,2510E-MTH 型超声震荡仪购自美国 Branson Ultrasonics 公司,Tanon-5200 化学放光成像系统源自上海天能科技公司。

1.4 方法

1.4.1 RNA 的提取及 qPCR 采用 Trizol 试剂提取卵巢癌组织、癌旁组织和卵巢癌细胞株中的 RNA,测得 RNA 水平后反转录成 cDNA。qPCR 反应按照 SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒说明书在 qPCR 仪上进行。Ct 值的获取主要借助于 RQman-ager 软件,分别统计 96 孔板各孔的 Ct 值,取肿瘤组织、癌旁组织及内参 β -Actin 的平均 Ct 值,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算:即 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{肿瘤组织}} - Ct_{\beta\text{-Actin}}) - (Ct_{\text{癌旁组织}} - Ct_{\beta\text{-Actin}})$, $\Delta\Delta Ct$ 值为负数提示 Lnc00478 在肿瘤组织表达高于癌旁组织,并且数值越大,表示 Lnc00478 在卵巢癌的肿瘤组织中的表达越高。相应引物序列如下:

Lnc00478,正向引物 5'-TTACAGCGTCTCTG-GTCGTG-3';反向引物 5'-CCAATTGTTCT-GGGCTGCAC-3'。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAP-DH),正向引物 5'-CCACTGGCATCGTGATGGA-3';反向引物 5'-CCAATTGTTCTGGGCTGCAC-3'。

1.4.2 细胞培养 HO-8910PM 细胞株在含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基,37℃、5%CO₂ 湿润条件下培养,每 3 天传代 1 次。

1.4.3 小干扰 RNA(siRNA)转染 将 HO-8910PM 细胞接种到 6 孔板中,待细胞长到 80%交融后,采用 Lipofectamine™2000 进行 Lnc00478 siRNA 转染,同时设置对照组并用 PCR 技术检测 siRNA 的转染效率。Lnc00478 siRNA 和 siRNA 对照序列如下:siRNA-1, 5'-ACTTGTATTCTGGGCTGCAC-3'。siRNA-2, 5'-CTGCACGTTCTGGGCTGCAC-3'。siRNA-NC, 5'-TGCACTGTTCTGGGCTGCAC-3'。

1.4.4 克隆形成实验 HO-8910PM 细胞分别用 Lnc00478 siRNA(siRNA-1 和 siRNA-2)转染,种于 12 孔板并置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养,在培养后的第 10 天,用 75%乙醇固定细胞 30 min,0.1%结晶紫溶液对细胞染色 30 min,显微镜下计数。

1.4.5 细胞迁移和侵袭实验 用 75%乙醇溶液固定穿出小室膜部的 HO-8910PM 细胞,20 min 后,将上层的小室放置于 0.1%结晶紫染液中,对穿过膜部的细胞染色 30 min。染色过后用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 2 遍,将小室放置在光学显微镜下观察,选取多个角度进行拍照。

1.5 统计学处理 采用 SPSS26.0 软件对数据进行统计学分析。正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料用频数、率表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Lnc00478 在卵巢癌组织和癌旁组织中的表达比较 qPCR 结果表明卵巢癌组织中 Lnc00478 高表达和低表达例数分别为 59 例和 21 例,与癌旁组织中 28 例高表达和 52 例低表达相比,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 卵巢癌组织和癌旁组织中 Lnc00478 的表达情况(n)			
组织类型	n	Lnc00478 高表达	Lnc00478 低表达
卵巢癌组织	80	59	21
癌旁组织	80	28	52
χ^2		20.60	
P		<0.01	

2.2 Lnc00478 与临床病理特征的关系 Lnc00478 的表达水平与肿瘤大小、发病年龄、淋巴结转移、

TNM 分期等多种因素有关,肿瘤最大径 ≥ 2 cm、年龄 ≥ 50 岁、有淋巴结转移及 TNM 分期Ⅲ~Ⅳ期的卵巢癌患者 Lnc00478 表达水平更高($P<0.05$)。Lnc00478 与有无卵巢癌家族史无关($P>0.05$),见表 2。

表 2 Lnc00478 的表达水平与患者临床病理特征的关系(n)

病理特征	n	Lnc00478 高表达	χ^2	P
肿瘤最大径(cm)			7.483	0.017
<2	34	16		
≥ 2	46	43		
年龄(岁)			5.875	0.023
≥ 50	42	37		
<50	38	22		
家族史			3.233	0.231
有卵巢癌	33	21		
无卵巢癌	47	38		
淋巴结转移			6.966	0.024
有	53	44		
无	27	15		
TNM 分期			9.875	0.012
I~Ⅱ期	31	13		
Ⅲ~Ⅳ期	49	46		

2.3 siRNA 干扰 Lnc00478 的表达水平对 HO-8910PM 细胞增殖的影响 PCR 结果提示,siRNA-1、siRNA-2 敲低 Lnc00478 后 HO-8910PM 细胞的增殖分别下调了(71 $\pm$ 6)%、(50 $\pm$ 7)%,siRNA-1 的干扰效率优于 siRNA-2,差异有统计学意义($P<0.05$),故采用 siRNA-1 来干扰 Lnc00478 的表达,克隆形成实验结果显示,Lnc00478 干扰后,siRNA-1 干扰的 HO-8910PM 细胞数量为(122 $\pm$ 16)个,siRNA-NC 干扰的 HO-8910PM 细胞数量为(321 $\pm$ 27)个,HO-8910PM 细胞克隆形成能力降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.4 Lnc00478 干扰对 HO-8910PM 细胞的迁移和侵袭能力的影响 细胞迁移实验结果显示,Lnc00478 干扰后穿出小室膜部的 HO-8910PM 细胞数量为(95 $\pm$ 8)个,少于对照组的(142 $\pm$ 11)个,差异有统计学意义($P<0.05$)。细胞侵袭实验结果显示,Lnc00478 干扰后侵袭的 HO-8910PM 细胞数量为(56 $\pm$ 8)个,少于对照组的(98 $\pm$ 4)个,差异有统计学意义($P<0.01$)。

3 讨 论

LncRNA 属于非编码 RNA,但对基因的表达发挥着重要的调控作用。目前研究表明 LncRNA 不仅是细胞生理水平的重要调节因子,还可通过免疫应答、表观遗传、基因降解等途径调控肿瘤细胞的生物学行为^[9-10]。目前,肿瘤相关性 LncRNA 的功能已经被逐渐整理归类,肿瘤特异性 LncRNA 调节异常可能

作为新的预测性生物标志物,从而对肿瘤进行早期的诊断及肿瘤的发展和预后进行评估^[11]。LncRNA 被证实与多种肿瘤密切相关,调控着肿瘤细胞的增殖、侵袭、迁移能力^[12],赵清等^[13]的研究表明 LncRNA 的异常表达与铂类、紫杉醇耐药有关,降低卵巢癌患者病死率的关键是早期诊断和治疗,以及对化疗耐药的有效预测。LncRNA 为药物设计、治疗和耐药性评估提供新的研究靶点。林丽等^[14]研究表明 LncRNA MCM3AP-AS1 可通过靶向抑制 miR-876-5p 促进卵巢癌细胞的增殖、迁移和侵袭。李晗宇等^[15]研究表明 LncRNA DRAIC 调控 miR-181,通过 STAT 信号通路对卵巢癌迁移和侵袭带来影响。沈芳芳等^[16]研究表明 LncRNA Lnc00261 在卵巢癌患者癌组织中表达下调,其表达水平与卵巢癌患者的恶性程度有关,上调 LncRNA Lnc00261 表达可抑制卵巢癌细胞 SK-OV3 的增殖、迁移和侵袭能力。

本研究发现,Lnc00478 在卵巢癌组织中的表达水平高于癌旁组织,并且与卵巢癌的多种临床病理特征相关。同时 HO-8910PM 细胞的体外功能实验结果表明,Lnc00478 能促进卵巢癌细胞的增殖和侵袭能力,但具体分子机制有待进一步研究,其可能成为卵巢癌早期诊断的潜在标志物和治疗新靶点。

参考文献

[1] 陈萱,黄静莹,吕育纯. STAT2 在卵巢癌中表达升高并与卵巢癌患者生存不良有关[J]. 南方医科大学学报,2020 (1):34-41.

[2] 张春兰,贺红英,韦露薇,等. LncRNAs 在卵巢癌诊断和预后评估研究中的进展[J]. 中国肿瘤,2019,28(11):852-860.

[3] MOUFARRIJ S, DANDAPANI M, ARTHOFER E, et al. Epigenetic therapy for ovarian cancer: promise and progress[J]. Clin Epigenetics,2019,11(1):7.

[4] 王静,王思思,马会,等. 长链非编码 linc00511 在卵巢癌中的表达、临床意义及预后分析[J]. 实用医学杂志,2019,35,(16):2584-2586.

[5] 谭芳春,李力. 卵巢癌中相关长链非编码 RNA 的研究进展[J]. 国际妇产科学杂志,2020,47(1):24-27.

[6] YUE X J, SU S, LIU P, et al. Role of long non-coding RNA in the pathogenesis of diabetic retinopathy[J]. Int Eye Sci,2017,17(10)1852-1855.

[7] SHAO M, LIU W Y, WANG Y. Differentially expressed LncRNAs as potential prognostic biomarkers for glioblastoma[J]. Cancer Genet,2018,226:23-29.

[8] BOONE D N, WARBURTON A, SOM S, et al. SNHG7 is a lncRNA oncogene controlled by insulin-like growth factor signaling through a negative feedback loop to tightly regulate proliferation[J]. Sci Rep,2020,10(1):8583.

[9] 安志远. 长链非编码 RNA 对免疫应答调节的研究进展[J]. 中国免疫学杂志,2016,32(12):1878-1884.

[10] 葛逸弘,房付春,吴补领. 长链非编码 RNA(下转第 624 页)

由于实验条件限制,未进行酮康唑、特比萘芬等局
常用抗真菌药物的药物敏感性检测,将在后续的工作
中进一步完善。

综上所述,广东省 CSOM 患者中常见病原体的
种类与国内其他地区的报道一致,以葡萄球菌、铜绿
假单胞菌、念珠菌和曲霉菌为主,但是真菌的检出率
明显高于国内其他地区。检出的主要细菌对于常用
的抗菌药物,如喹诺酮类仍然具有较高的敏感性。

参考文献

[1] 吴学文,王风君,高可雷,等.我国慢性化脓性中耳炎患者
的病原学及其动态变化分析[J].中国耳鼻咽喉颅底外科
杂志,2016,22(3):193-197.

[2] 李明,廖剑绚,沈宝茗,等.慢性化脓性中耳炎病原菌分析
及临床意义[J].中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2017,23
(6):563-565.

[3] Clinical and Laboratory Standards Institute. Interpretive
criteria for identification of bacteria and fungi by DNA
target sequencing: approved guideline: MM18-A [S].
Wayne,PA,USA:CLSI,2008.

[4] Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference
method for broth dilution antifungal susceptibility tes-
ting of filamentous fungi: approved standard: M38-A
[S]. Wayne,PA,USA:CLSI,2008.

[5] Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference
method for broth dilution antifungal susceptibility tes-
ting of yeasts: approved standard: M27-S4 [S]. Wayne,
PA,USA:CLSI,2012.

[6] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance
standards for antifungal disk diffusion susceptibility tes-
ting of non-dermatophyte filamentous fungi: M51-S1[S].

Wayne,PA,USA:CLSI,2010.

[7] JENSEN R G,KOCH A,HOMØE P. The risk of hearing
loss in a population with a high prevalence of chronic sup-
purative otitis media[J]. Int J Pediatr Otorhinolaryngol,
2013,77(9):1530-1535.

[8] NANDA A,ZEKI D,PARPERIS K. Chronic suppurative
otitis media complicated with mastoiditis: an unusual
presentation of tuberculosis[J]. Am J Med Sci,2016,352
(5):544.

[9] 苏莉莎,彭涛,冯俊.慢性中耳炎细菌学动态研究及在细
菌生物膜形成中的作用[J].基因组学与应用生物学,
2019,38(4):1747-1753.

[10] 李丽,郝瑾,刘冬梅.慢性化脓性中耳炎患者病原菌分布
及耐药性分析[J].传染病信息,2020,33(2):183-189.

[11] 张蒙,赵厚育,唐刘霞,等.贵州地区中耳胆脂瘤与慢性化
脓性中耳炎致病菌及药物敏感性分析[J].医学信息,
2018,31(4):78-80.

[12] SHILPA C,SANDEEP S,THANZEEMUNISA U,et al.
Current microbiological trends of chronic suppurative oti-
tis media in a tertiary care centre,Mysuru,India[J]. Indi-
an J Otolaryngol Head Neck Surg,2019,71(Suppl 2):
1449-1452.

[13] 汪洋,吉建,王朱健,等.成人慢性化脓性中耳炎耳道分泌
物病原菌分布及耐药性分析[J].中国眼耳鼻喉科杂志,
2019,19(6):383-387.

[14] 王金玉.慢性化脓性中耳炎伴外耳道真菌病诊治[J].中
国耳鼻咽喉头颈外科,2019,26(9):509-510.

[15] 刘文静,孙宏莉,张小江,等.2014—2018年北京协和医
院酵母菌血流感染菌种分布和抗真菌药物敏感性分析
[J].中国真菌学杂志,2019,14(6):357-361.

(收稿日期:2020-05-16 修回日期:2020-12-28)

(上接第 619 页)

在间充质干细胞多向分化过程中的调节作用[J].国际口
腔医学杂志,2018,45(3):267-271.

[11] 叶明侠,孟元光.卵巢癌的靶向治疗新进展[J].中国计划
生育和妇产科,2019,11(10):30-32.

[12] 徐苏娟,付子毅,刘丝雨,等.lncRNA TUG1 对卵巢癌细
胞 OVCAR3 的增殖迁移及能量代谢的影响[J].临床肿
瘤学杂志,2019,24(1):26-31.

[13] 赵清,刘倩.长链非编码 RNA 在卵巢癌化疗耐药过程
中的调控作用[J].国际妇产科学杂志,2020,47(2):134-
137.

[14] 林丽,李喜梅,毛郁蕾,等.长链非编码 RNA MCM3AP-
AS1 靶向调控 miR-876-5p 对卵巢癌细胞增殖和转移的
影响[J].中华内分泌外科杂志,2020,14(1):72-76.

[15] 李晗宇,陈飞.长链非编码 RNA DRAIC 调控 miR-181 通
过 STAT 信号通路对卵巢癌迁移和侵袭的影响[J].转化
医学杂志,2020,9(2):70-74.

[16] 沈方方,阮爱春,刘丽江.长链非编码 RNA linc00261 在
卵巢癌组织中的表达及其临床意义[J].华中科技大学学
报(医学版),2019,48(5):508-512.

(收稿日期:2020-05-05 修回日期:2020-12-24)