

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.20.013

宫颈癌组织中长链非编码 RNA ZNF667-AS1 的表达及临床意义

胡 萃, 刘 双

湖南省妇幼保健院妇产科, 湖南长沙 410008

摘要:目的 探讨宫颈癌组织中长链非编码 RNA ZNF667-AS1(lncRNA ZNF667-AS1)的表达及临床意义。方法 选取 2019 年 1 月至 2020 年 12 月该院收治的 80 例宫颈癌患者,收集术后宫颈癌组织及癌旁组织,另选取行全子宫切除术的 80 例子宫肌瘤患者作为对照,收集术后正常宫颈组织,应用荧光定量 PCR(RT-qPCR)法分别检测标本组织中 lncRNA ZNF667-AS1 的表达,采用受试者工作特征(ROC)曲线分析 lncRNA ZNF667-AS1 诊断宫颈癌的临床价值。结果 宫颈癌组织中 lncRNA ZNF667-AS1 的相对表达量明显低于癌旁组织及正常宫颈组织($P < 0.01$);癌旁组织中 lncRNA ZNF667-AS1 的相对表达量低于正常宫颈组织,但差异无统计学意义($P > 0.05$);在不同 FIGO 分期、分化程度及淋巴结转移情况的宫颈癌组织中 lncRNA ZNF667-AS1 的相对表达水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);ROC 曲线分析显示,lncRNA ZNF667-AS1 诊断宫颈癌的曲线下面积为 0.834(95%CI:0.739~0.968),诊断的灵敏度为 92.35%,特异度为 81.12%。结论 宫颈癌组织中 lncRNA ZNF667-AS1 呈低表达,其表达水平与 FIGO 分期呈负相关,可能成为预测宫颈癌的生物学标志物及潜在治疗靶标。

关键词:宫颈癌; 长链非编码 RNA; 生物学标志物; 灵敏度与特异度

中图分类号:R737.33

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)20-2973-04

Expression and clinical significance of long non-coding RNA ZNF667-AS1 in cervical cancer

HU Cui, LIU Shuang

Department of Obstetrics and Gynecology, Hunan Maternal and Child Health Hospital, Changsha, Hunan 410008, China

Abstract: Objective To explore the expression and clinical significance of long-chain non-coding RNA ZNF667-AS1 (lncRNA ZNF667-AS1) in cervical cancer tissues. **Methods** From January 2019 to December 2020, 80 patients with cervical cancer admitted to this hospital were included in the study, and collect postoperative cancer tissues and adjacent tissues. In addition, 80 patients who underwent total hysterectomy for the same factor uterine fibroids were selected as controls, and collect normal cervical tissues after surgery. The RT-qPCR method was used to detect the expression of lncRNA ZNF667-AS1 in the sample tissues, and analyze the correlation between the expression level and the clinical characteristics of cervical cancer patients. ROC curve was used to analyze the clinical value of lncRNA ZNF667-AS1 in diagnosis of cervical cancer. **Results** The relative expression of lncRNA ZNF667-AS1 in cervical cancer tissue was lower than adjacent tissues and normal cervical tissues ($P < 0.01$). The relative expression of lncRNA ZNF667-AS1 in adjacent tissues was lower than that in normal cervical tissues, but there was no significant difference between them ($P > 0.05$). There were significant differences on the relative expression level of lncRNA ZNF667-AS1 in cervical cancer tissues with different FIGO stages, degrees of differentiation, and lymph node metastasis occurs or not ($P < 0.05$). ROC curve analysis showed that the area under the curve for the diagnosis of cervical cancer by lncRNA ZNF667-AS1 was 0.834 (95%CI: 0.739-0.968), the diagnostic sensitivity was 92.35%, and the specificity was 81.12%. **Conclusion** The expression of lncRNA ZNF667-AS1 in cervical cancer tissue is low, and its expression level negatively correlates with FIGO staging. It may become a biomarker and potential therapeutic target for predicting cervical cancer.

Key words: cervical cancer; long non-coding RNA; biological markers; sensitivity and specificity

宫颈癌的发病率呈逐年升高趋势,且呈年轻化发展,有研究显示,宫颈癌患者术后仍存在较高的复发风险,严重影响患者预后^[1-2]。因此,寻找宫颈癌临床诊断标志物具有重要意义。长链非编码 RNA(lnc-

作者简介:胡萃,女,医师,主要从事妇产科临床研究。

本文引用格式:胡萃,刘双.宫颈癌组织中长链非编码 RNA ZNF667-AS1 的表达及临床意义[J].检验医学与临床,2021,18(20):2973-2975.

cRNA)是一类不编码蛋白质的 RNA,其参与调控基因表达^[3]。临床研究显示,lncRNA 在宫颈癌、非小细胞肺癌等多种肿瘤组织中呈异常表达^[4-5]。ZNF667-AS1 为新近发现的一种 lncRNA,其对肿瘤细胞周期及细胞迁移有一定影响^[6]。有文献报道,鼻咽癌组织中 lncRNA ZNF667-AS1 的表达下调,其可能影响鼻咽癌细胞的生物学行为^[7]。本课题组前期通过芯片技术发现,宫颈癌组织中 lncRNA ZNF667-AS1 表达异常。因此,本研究对比分析了宫颈癌组织、癌旁组织、正常宫颈组织中 lncRNA ZNF667-AS1 的表达,并探讨其临床意义,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2019 年 1 月至 2020 年 12 月本院收治的 80 例宫颈癌患者纳入研究,年龄 39~71 岁,平均(51.72±4.19)岁。纳入标准:(1)均经临床病理检查确诊,且均为首次发病;(2)术前均未接受放疗治疗。排除标准:(1)合并严重心、肝、肾等脏器功能异常者;(2)术前接受激素治疗者;(3)合并严重感染性疾病者。另选取行全子宫切除术的 80 例子宫颈癌患者作为对照,均经临床病理检查确诊,年龄 36~72 岁,平均(50.68±3.75)岁。宫颈癌患者与子宫肌瘤患者年龄等一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究通过医院伦理学委员会审批,入组患者均对本研究知情同意,并签订知情同意书。

1.2 仪器与试剂 LEPGEN-96 实时荧光定量 PCR 仪由北京乐普医疗科技公司提供;紫外可见超微量分光光度计由南京菲勒公司提供;Trizol 试剂盒购自杭州新景生物公司;逆转录试剂盒、PCR 试剂盒购自上海联迈生物公司;lncRNA ZNF667-AS1 及内参 β -ACTIN 引物委托上海生工生物公司合成。

1.3 方法

1.3.1 标本收集 收集宫颈癌患者术后癌组织及对应癌旁组织(距癌组织边缘 ≥ 2 cm),收集子宫肌瘤患者术后正常宫颈组织,新鲜组织标本经液氮冷冻后保存于 -80°C 冰箱中待检。

1.3.2 lncRNA ZNF667-AS1 检测方法 总 RNA 提取:分别取 50 mg 宫颈癌组织、癌旁组织、正常宫颈组织标本超声匀浆,应用 Trizol 试剂盒提取总 RNA,经焦碳酸二乙酯(DEPC)水溶解后检测 RNA 的完整性, RNA 的纯度和浓度应用光度计检测。逆转录反应:反应体系 20 μL ,按照试剂盒说明书操作,总 RNA 1 μL , RNA 酶抑制剂 0.19 μL ,上、下游引物各 3 μL , dNTPs 0.15 μL , MultiScribeTM Reverse Transcriptase 1.0 μL ,10 \times RT buffer 1.5 μL ,加 DEPC 水补至 20 μL 。反应条件:25 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,42 $^{\circ}\text{C}$ 30 min,90 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,产物置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。lncRNA ZNF667-AS1 上游引物为 5'-GCTGGAAG-CACAGAGATGAG-3',下游引物为 5'-CGTAGTA-AGCGCCACGACTG-3', β -Actin 上游引物为 5'-

GCGGACTACTGGCTCACTAC-3',下游引物为 5'-ACTCATCTGTCTGCCTGATT-3'。PCR 扩增:反应体系 20 μL ,按照试剂盒说明书操作,cDNA 1 μL ,TaqMan GEx MASTER Mix 10 μL ,上、下游引物各 1 μL ,双蒸水 7 μL 。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,65 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,共 40 个循环。

1.3.3 结果计算 每组设 3 个复孔,分别计算各标本平均循环阈值(Ct 值),根据公式 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$,计算 lncRNA ZNF667-AS1 的相对表达量。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组比较采用方差分析,进一步比较采用 SNK- q 检验;计数资料以率表示,采用 χ^2 检验。应用受试者工作特征(ROC)曲线分析 lncRNA ZNF667-AS1 诊断宫颈癌的临床价值。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织标本中 lncRNA ZNF667-AS1 的相对表达量分析 宫颈癌组织中 lncRNA ZNF667-AS1 的相对表达量,明显低于癌旁组织及正常宫颈组织,差异均有统计学意义($t=33.501,31.658,P<0.01$);癌旁组织中 lncRNA ZNF667-AS1 的相对表达量低于正常宫颈组织,但差异无统计学意义($t=1.689,P=0.931$),见图 1。

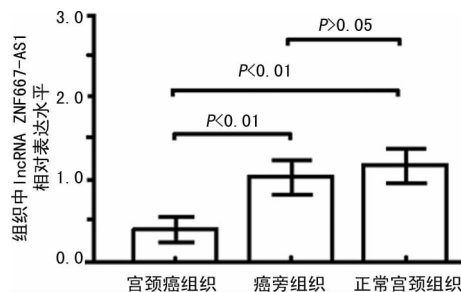


图 1 不同组织标本中 lncRNA ZNF667-AS1 的相对表达量比较

2.2 不同临床特征宫颈癌患者 lncRNA ZNF667-AS1 相对表达量比较 在不同 FIGO 分期、分化程度及淋巴结转移情况的宫颈癌组织中 lncRNA ZNF667-AS1 的相对表达量比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 不同临床特征宫颈癌患者 lncRNA ZNF667-AS1 相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)

临床特征	n	lncRNA ZNF667-AS1 的相对表达量	t/F	P
肿瘤类型			0.417	0.569
鳞癌	39	0.40±0.05		
腺癌	30	0.43±0.08		
透明细胞癌	11	0.42±0.06		
绝经			1.590	0.116
是	52	0.40±0.06		

续表 1 不同临床特征宫颈癌患者 lncRNA ZNF667-AS1 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

临床特征	n	lncRNA ZNF667-AS1 的相对表达量	t/F	P
否	28	0.42±0.05		
年龄			1.475	0.144
<60 岁	43	0.39±0.07		
≥60 岁	37	0.42±0.11		
FIGO 分期			4.764	<0.001
I~II 期	31	0.43±0.09		
III~IV 期	49	0.36±0.04		
分化程度			6.009	<0.001
中、低分化	36	0.34±0.05		
高分化	44	0.45±0.10		
淋巴结转移			4.145	<0.001
是	42	0.35±0.07		
否	38	0.44±0.12		

2.3 lncRNA ZNF667-AS1 诊断宫颈癌的 ROC 曲线分析 ROC 曲线分析显示, lncRNA ZNF667-AS1 诊断宫颈癌的曲线下面积为 0.834(95%CI: 0.739~0.968), 诊断灵敏度为 92.35%, 特异度为 81.12%。

3 讨论

随着临床研究的深入, lncRNA 参与调控肿瘤细胞的增殖、迁移等热点问题受到临床关注^[8]。lncRNA 与某些特定疾病密切相关, 其在某些恶性肿瘤细胞中表达异常, 或将成为临床恶性肿瘤诊疗的潜在靶标^[9-10]。既往研究显示, lncRNA LINC01503^[11]、lncRNA NPPA-AS1^[12] 等 lncRNA 均与宫颈癌发生及进展密切相关。ZNF667-AS1 基因是 ZNF667 基因的反义链, 位于 19q13.43 染色体上, 其在结肠腺癌、乳腺癌等多种肿瘤中存在表观遗传学沉默^[13]。本课题组前期通过芯片技术发现, lncRNA ZNF667-AS1 在宫颈癌组织中表达异常。

本研究发现, 宫颈癌组织中 lncRNA ZNF667-AS1 的相对表达量明显低于癌旁组织及正常宫颈组织, 提示宫颈癌组织中 lncRNA ZNF667-AS1 的低表达可能与宫颈癌发病有关, lncRNA ZNF667-AS1 可能发挥抑癌作用。郑杰等^[14]研究发现, 下调 lncRNA ZNF667-AS1 的表达可抑制胶质瘤细胞的转移及侵袭。吴璇等^[15]研究报道, 食管鳞状细胞癌组织中 lncRNA ZNF667-AS1 表达明显降低, 其表达水平与肿瘤组织 TNM 分期及分化程度有关。

本研究结果发现, 不同 FIGO 分期、分化程度及淋巴结转移情况的宫颈癌组织中 lncRNA ZNF667-AS1 的相对表达量差异明显, 且 FIGO 分期越高、分化程度越低、发生淋巴结转移的宫颈癌组织中 lncRNA ZNF667-AS1 表达越低。因高 FIGO 分期、低分化是肿瘤恶性生物学行为的表现, 淋巴结转移是预后不良的指标, 故推测 lncRNA ZNF667-AS1 低表达可能是预测宫颈癌患者预后不良的潜在指标。有学者研究报道, ZNF667-AS1 在喉癌组织中表达下调, 且其低表达与喉癌组织的病理分化程度相关, 下调 ZNF667-AS1 的表达可增强 AMC-HN-8 和 TU177 细胞的增殖、迁移、侵袭能力^[16]。另有文献报道, lncRNA ZNF667-AS1 在结直肠癌组织中表达下调, 其可通过调节 ANK2/JAK2 的表达, 进而抑制结直肠癌的进展^[17]。由以上研究可知, lncRNA ZNF667-AS1 与多种恶性肿瘤的发生及发展相关。通过 ROC 曲线分析发现, lncRNA ZNF667-AS1 诊断宫颈癌的曲线下面积为 0.834(95%CI: 0.739~0.968), 诊断的灵敏度为 92.35%, 特异度为 81.12%。因此, 推测 lncRNA ZNF667-AS1 可作为宫颈癌临床诊断的生物标志物。

综上所述, 宫颈癌组织中 lncRNA ZNF667-AS1 呈低表达, 其表达水平与 FIGO 分期呈负相关, 可作为预测宫颈癌的生物标志物及潜在治疗靶标, 但相关机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] BERMÚDEZ P C, ARRIVILLAGA M, POVEDA K J T, et al. Barriers and facilitators of adherence for cervical cancer prevention in low-income women in Colombia[J]. Eur J Public Health, 2020, 30(5): 1156-1161.
- [2] 段律芳, 杜辉, 肖爱民, 等. 宫颈癌早期诊断中细胞学 p16INK4a 检测的价值[J]. 中华病理学杂志, 2020, 49(8): 812-815.
- [3] LUAN Y, XIE B, WEI W. REST-repressed lncRNA NPPA-AS1 regulates cervical cancer progression by modulating miR-302e/DKK1/Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. J Cell Biochem, 2021, 122(1): 16-28.
- [4] ZHANG L, GE S, CAO B. Long non-coding RNA MIAT promotes cervical cancer proliferation and migration[J]. J Biochem, 2020, 168(2): 183-190.
- [5] 李基伟, 张全, 徐磊, 等. 长链非编码 RNA MIF-AS1 调控非小细胞肺癌增殖、侵袭和转移的机制研究[J]. 中华实验外科杂志, 2020, 37(1): 75-80.
- [6] EL-KHAZRAGY N, ESMAIEL M A, MOHAMED M M, et al. Upregulation of long noncoding RNA Lnc-IRF2-3 and Lnc-ZNF667-AS1 is associated with poor survival in B-chronic lymphocytic leukemia. [J]. Int J Lab Hematol, 2020, 42(3): 284-291.
- [7] CHEN X, HUANG Y, SHI D, et al. LncRNA ZNF667-AS1 promotes ABLIM1 expression by adsorbing microRNA-1290 to suppress nasopharyngeal carcinoma cell progression[J]. Onco Targets Ther, 2020, 11(13): 4397-4409.

结果发现,与对照组比较,观察组患者血清 BGP 和 OPG 水平明显升高,与以往文献报道结果一致^[18]。

综上所述,中医综合康复治疗膝关节骨性关节炎的疗效显著,能够明显改善膝关节功能和骨质代谢平衡。

参考文献

[1] 许琳. 中西医结合治疗老年性骨关节炎的临床效果观察[J]. 中外医学研究, 2018, 16(6): 155-157.

[2] 赵祖峰. 中医综合康复治疗老年膝关节骨性关节炎的临床疗效分析[J]. 饮食保健, 2018, 5(28): 51-52.

[3] 吕雄. 中医骨科综合康复治疗老年骨性关节炎的临床分析[J]. 中国保健营养, 2018, 28(22): 253.

[4] 邢丹, 林剑浩. 《骨关节炎诊疗指南(2018 年版)》更新解读及方法学评价[J/CD]. 中华关节外科杂志(电子版), 2019, 13(4): 391-395.

[5] 陈卫衡. 膝骨关节炎中医诊疗指南(2020 年版)[J]. 中医正骨, 2020, 32(10): 1-14.

[6] 尤焱南, 周涛, 赵霞. 《中医病证诊断疗效标准》修订中文文献研究法探析[J]. 中医药导报, 2019, 25(21): 22-25.

[7] XIE K, PAN X, HUANG F, et al. Needle knife therapy plus sodium hyaluronate injection for knee osteoarthritis: a protocol for a systematic review and meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(46): e23242.

[8] 张锡玮, 侯德才, 金国英, 等. 中医康复综合治疗膝骨关节炎随机对照多中心临床试验[J]. 辽宁中医杂志, 2020, 47(1): 93-96.

[9] 王俊雅, 张孝静. 中医综合康复手段对膝骨关节炎老年患者疼痛及膝关节功能的影响[J]. 新中医, 2016, 48(8):

128-130.

[10] COLLINS N J, HART H F, MILLS K. Osteoarthritis year in review 2018: rehabilitation and outcomes[J]. *Osteoarthr Cartilage*, 2019, 27(3): 378-391.

[11] LI J, LI Y X, LUO L J, et al. The effectiveness and safety of acupuncture for knee osteoarthritis: an overview of systematic reviews[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(28): e16301.

[12] 贾柯, 杨广武, 刘海洋, 等. 中药熏洗疗法治疗膝关节骨性关节炎 60 例[J]. 中医研究, 2020, 33(2): 22-25.

[13] 李志红, 杨孟孟, 杨伟伟, 等. 中药熏洗对膝关节骨性关节炎患者膝关节功能、血管内皮生长因子、软骨寡聚基质蛋白水平的影响[J]. 陕西中医, 2019, 40(9): 1226-1228.

[14] 孙润洁, 田亮. 火龙灸治疗风寒湿痹型膝骨性关节炎临床观察[J]. 亚太传统医药, 2019, 15(9): 126-128.

[15] 朱修苍. 消刺止痛汤内服联合熏洗与推拿治疗膝关节骨性关节炎随机平行对照研究[J]. 实用中医内科杂志, 2015, 29(7): 137-138.

[16] 廖建青, 吕静, 赖福崇, 等. 中药内服治疗膝骨性关节炎的用药规律分析[J]. 云南中医学院学报, 2020, 43(1): 83-88.

[17] 贾涛, 刘盾, 赖福崇, 等. 中药内服治疗腰椎骨性关节炎近 10 年文献潜在用药规律探讨[J]. 世界中医药, 2018, 13(12): 3212-3218.

[18] 吴昊, 周正球, 周定华, 等. 骨增生痛汤治疗膝骨性关节炎的临床疗效及对关节功能、骨代谢、血清炎症因子水平的影响[J]. 河北中医药学报, 2019, 34(4): 10-14.

(收稿日期: 2021-01-26 修回日期: 2021-07-07)

(上接第 2975 页)

[8] WANG L, YANG J, WANG H N, et al. LncRNA BCYRN1-induced autophagy enhances asparaginase resistance in extranodal NK/T-cell lymphoma[J]. *Theranostics*, 2020, 11(2): 925-940.

[9] LIU C, ZHOU H, MU Y, et al. LncRNA MALAT1 promoted high glucose-induced pyroptosis of renal tubular epithelial cell by sponging miR-30c targeting for NLRP3[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2020, 36(9): 682-691.

[10] XU J, YANG B, WANG L, et al. LncRNA BBOX1-AS1 upregulates HOXC6 expression through miR-361-3p and HuR to drive cervical cancer progression[J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(7): e12823.

[11] PENG X, GAO J, CAI C, et al. LncRNA LINC01503 aggravates the progression of cervical cancer through sponging miR-342-3p to mediate FXRD3 expression[J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(6): BSR20193371.

[12] LUAN Y, XIE B, WEI W. REST-repressed lncRNA NPPA-AS1 regulates cervical cancer progression by modulating miR-302e/DKK1/Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2021, 122(1): 16-28.

[13] LI Y J, YANG Z, WANG Y Y, et al. Long noncoding

RNA ZNF667-AS1 reduces tumor invasion and metastasis in cervical cancer by counteracting microRNA-93-3p-dependent PEG3 downregulation[J]. *Mol Oncol*, 2019, 13(11): 2375-2392.

[14] 郑杰, 庞长河, 邢振义, 等. 长链非编码 RNA 锌指蛋白 667 反义 RNA1 通过下调微小 RNA-296 表达抑制胶质瘤细胞 U87MG 侵袭、转移[J]. 中华实验外科杂志, 2020, 37(10): 1844-1847.

[15] 吴璇, 邝钢, 任利兵, 等. 长链非编码 RNA ZNF667-AS1 在食管鳞状细胞癌组织中的表达及其 DNA 甲基化状态的研究[J]. 肿瘤防治研究, 2018, 45(12): 976-980.

[16] MENG W, CUI W, ZHAO L, et al. Aberrant methylation and downregulation of ZNF667-AS1 and ZNF667 promote the malignant progression of laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *J Biomed Sci*, 2019, 26(1): 13.

[17] ZHUANG L, DING W, DING W, et al. LncRNA ZNF667-AS1 (NR_036521.1) inhibits the progression of colorectal cancer via regulating ANK2/JAK2 expression[J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(3): 2178-2193.

(收稿日期: 2020-12-16 修回日期: 2021-08-01)