

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.12.003

肝细胞癌患者血清长链非编码 RNA LINC00673 水平及其临床意义^{*}

任虎虎,李 晨,陈 建,吴智群[△]

空军军医大学唐都医院介入科,陕西西安 710032

摘要:目的 研究肝细胞癌(HCC)患者血清长链非编码核糖核酸(lncRNA) LINC00673 水平及其临床意义。方法 选取 2015 年 1 月至 2017 年 1 月空军军医大学唐都医院收治并确诊的 103 例 HCC 患者为 HCC 组,选择同期体检健康志愿者 103 例为对照组。采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 lncRNA LINC00673 在 HCC 组和对照组血清中水平,采用受试者工作特征(ROC)曲线分析血清 lncRNA LINC00673 诊断 HCC 的效能,分析不同临床病理特征 HCC 患者血清 lncRNA LINC00673 表达的差异,通过 Kaplan-Meier 生存曲线分析不同血清 lncRNA LINC00673 水平 HCC 患者的生存情况。结果 RT-PCR 检测结果显示,lncRNA LINC00673 在 HCC 组血清中的水平(4.37 ± 1.06)明显高于对照组(1.29 ± 0.31),差异有统计学意义($t=28.303, P<0.001$)。ROC 曲线分析结果显示,血清 lncRNA LINC00673 诊断 HCC 的曲线下面积(AUC)为 0.783(95%CI:0.718~0.849),最佳截断值为 2.87 时,灵敏度为 75.70%,特异度为 81.61%,准确度为 78.70%。lncRNA LINC00673 高表达患者血清 AFP 水平 $\geq 400 \mu\text{g/L}$ 、肿瘤最大径 $\geq 3 \text{ cm}$ 、TNM 分期Ⅲ~Ⅳ期、有血管侵犯、有淋巴结转移情况的比例明显高于 lncRNA LINC00673 低表达患者($P<0.05$),而 lncRNA LINC00673 高表达患者和 lncRNA LINC00673 低表达患者在性别、年龄、肝硬化、肿瘤分化程度、微癌栓情况方面比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。103 例 HCC 患者随访 5 年间,失访 6 例,获得随访 97 例,其中生存 53 例,死亡 44 例,总生存率为 54.64%;Kaplan-Meier 生存曲线显示,血清 lncRNA LINC00673 高表达患者 5 年生存率显著低于 lncRNA LINC00673 低表达患者(Log-Rank $\chi^2=6.007, P=0.014$)。结论 HCC 患者血清 lncRNA LINC00673 水平与患者肿瘤最大径、TNM 分期、血管侵犯、淋巴结转移、血清 AFP 水平相关,可促进 HCC 的发生和发展,导致不良预后,有望成为 HCC 诊疗相关的血清学标志物。

关键词:肝细胞癌; 长链非编码 RNA LINC00673; 临床病理特征; 预后

中图法分类号:R735.7

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2023)12-1677-05

Serum long chain non-coding RNA LINC00673 level in patients with hepatocellular carcinoma and its clinical significance^{*}

REN Huhu, LI Chen, CHEN Jian, WU Zhiquan[△]

Department of Intervention, Tangdu Hospital of Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China

Abstract: **Objective** To study the expression level of serum long chain non coding ribonucleic acid (lncRNA) LINC00673 in the patients with hepatocellular carcinoma (HCC) and its clinical significance. **Methods** A total of 103 patients with HCC treated and diagnosed in Tangdu Hospital of Air Force Military Medical University from January 2015 to January 2017 were selected as the HCC group, meanwhile 103 healthy volunteers undergoing physical examination were selected as the control group. The reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the serum lncRNA LINC00673 level in the HCC group and control group. The efficiency of serum lncRNA LINC00673 level in diagnosing HCC was analyzed by using the receiver operating characteristic (ROC) curve. The differences in serum lncRNA LINC00673 levels between HCC patients with different clinicopathological characteristics were analyzed. The survival situation in HCC patients with different serum lncRNA LINC00673 levels was analyzed by using the Kaplan Meier survival curve. **Results** The RT-PCR detection results showed that the serum lncRNA LINC00673 level in the HCC group (4.37 ± 1.06) was significantly higher than that in the control group (1.29 ± 0.31), and the difference was

^{*} 基金项目:陕西省 2021 年科技计划青年项目(2021JQ-539)。

作者简介:任虎虎,男,主治医师,主要从事肝癌综合诊治方向的研究。 [△] 通信作者, E-mail:867398791@qq.com。

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20230421.1715.004.html\(2023-04-23\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20230421.1715.004.html(2023-04-23))

statistically significant ($t=28.303, P<0.001$). The ROC curve showed that the area under the curve (AUC) of serum lncRNA LINC00673 for diagnosing HCC was 0.783 (95%CI: 0.718–0.849). When the optimal cut-off value was 2.87, the sensitivity was 75.70%, the specificity was 81.61%, and the accuracy was 78.70%. The proportions of patients with high expression of lncRNA LINC00673 with serum AFP level $\geq 400 \mu\text{g/L}$, maximum tumor diameter $\geq 3 \text{ cm}$, TNM stage III to IV, vascular invasion and lymph node metastasis were significantly higher than those with low expression of lncRNA LINC00673 ($P<0.05$), however, there were no statistically significant differences in gender, age, cirrhosis, degree of tumor differentiation and microcarcinoma embolus between the patients with high expression of lncRNA LINC00673 and the patients with low expression of lncRNA LINC00673 ($P>0.05$). During the 5-year follow-up period of 103 HCC patients, 6 cases lost to follow up and 97 cases were followed up, among them, 53 cases survived and 44 died, with a total survival rate of 54.64%, the Kaplan-Meier survival curve showed that the 5-year survival rate of the patients with serum lncRNA LINC00673 high expression was significantly lower than that of the patients with low expression (Log-Rank $\chi^2=6.007, P=0.014$). **Conclusion** The serum lncRNA LINC00673 expression level in the patients with HCC correlates to the tumor maximal diameter, TNM stage, vascular invasion, lymph node metastasis and serum AFP level, which could promote the occurrence and development of HCC, and lead to the poor prognosis. It is expected to become a serological marker related to the diagnosis and treatment of HCC.

Key words: hepatocellular carcinoma; long chain non coding RNA LINC00673; clinicopathological characteristic; prognosis

原发性肝癌是一种起源于肝脏组织的恶性肿瘤, 75%~85%为肝细胞癌(HCC)^[1]。据 2014 年数据统计, 肝癌分别位居我国恶性肿瘤发病谱、死亡谱的第 4 位、第 2 位^[2]。肝癌早期症状不典型, 不易被发现, 确诊时常伴随肿瘤转移及相关并发症, 预后总体较差^[3]。因此, 对肝癌的研究受到临床高度重视, 寻找肝癌相关分子标志物, 对于肝癌的病因诊断、治疗指导、预后评估有重要意义。肝癌形成机制复杂, 除了与病毒性肝炎、饮酒、黄曲霉毒素等因素相关外, 还涉及分子学机制^[4]。长链非编码核糖核酸(lncRNA)是一类定位于细胞核或细胞质中且长度大于 200 个核苷酸的 RNA 分子, 可参与基因表观遗传学表达调控, 并在恶性肿瘤形成及进展过程中发挥重要作用^[5]。lncRNA LINC00673 为新近发现的 lncRNA 分子, 定位于 17q24.3 上, 在恶性肿瘤中呈异常表达^[6]。但 lncRNA LINC00673 在肝癌中的确切表达情况少见报道, 该分子能否作为血清标志物应用于 HCC 的临床诊治尚不明确。基于上述背景, 本研究拟观察 HCC 患者血清 lncRNA LINC00673 水平变化情况及其与临床病理特征及预后的关系, 以明确其临床意义, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 1 月至 2017 年 1 月空军军医大学唐都医院收治并确诊的 103 例 HCC 患者为 HCC 组。HCC 组中男 86 例, 女 17 例; <60 岁 72 例, ≥ 60 岁 31 例; TNM 分期 I~II 期 73 例, III~IV 期 30 例; 淋巴结转移 26 例; 血管侵犯 54 例; 肝硬化 83 例; 微癌栓 15 例; 肿瘤分化程度: 中高分化 80 例,

低分化 23 例; 肿瘤最大径 $<3 \text{ cm}$ 25 例, $\geq 3 \text{ cm}$ 78 例; 血清甲胎蛋白(AFP) $<400 \mu\text{g/L}$ 62 例, $\geq 400 \mu\text{g/L}$ 41 例。纳入标准: (1) 符合《肝细胞癌临床指南更新》中的相关诊断标准, 经病理检查确诊^[7]; (2) 术前未进行射频消融、肝动脉栓塞化疗、免疫治疗等医学干预; (3) 无凝血功能障碍; (4) 无精神系统疾病。排除标准: (1) 合并其他恶性肿瘤; (2) 临床资料不完整; (3) 不配合研究要求; (4) 认知功能不正常或无法正常沟通; (5) 生命终末期; (6) 妊娠期或哺乳期女性。另选择同期体检健康志愿者 103 例为对照组, 其中男 84 例、女 19 例, <60 岁 69 例、 ≥ 60 岁 34 例。HCC 组和对照组性别、年龄比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 具有可比性。本研究经空军军医大学唐都医院医学伦理委员会批准。所有患者均知情同意并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 血清 lncRNA LINC00673 水平检测 收集受试者外周静脉血 5 mL, 室温环境下静置 60 min, 在 4℃ 下以 1 000 r/min 离心 10 min, 收集上层血清并转至收集管后, 再在 4℃ 下以 12 000 r/min 离心 10 min, 离心操作结束后于一 80℃ 冰箱内冻存。采用 TRIzol™ LS 试剂盒(上海联硕生物科技有限公司)提取受试者血清中的总 RNA, 采用反转录试剂盒(上海信帆生物科技有限公司)合成 cDNA, cDNA 模板按 5 倍稀释后置于一 20℃ 冰箱内冻存。采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)进行基因扩增, 反应条件: 95℃ 下 30 s 预变性, 95℃ 下 10 s 变性, 60℃ 下 30 s 退火延伸, 循环 40 次。lncRNA LINC00673 上、下游引物分别

为 5'-TAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGG -3' 与 5'-GCACAGCTTGGAGGCTTGA-3';内参 GAPDH 上、下游引物分别为 5'-CTATGCAGCTCTTCTATGTGG -3' 与 5'-ATCCAACGTGTGAATCAGCC -3'。lncRNA LINC00673 水平以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。

1.2.2 随访情况 对 103 例患者进行 5 年门诊复查随访,2022 年 1 月截止,统计患者总生存情况。第 1 年每 3 个月随访 1 次,从第 2 年开始每 6 个月随访 1 次,检查项目包括超声、电子计算机断层扫描(CT)、磁共振成像(MRI)等。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件分析数据。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验;计数资料以例数、百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;采用受试者工作特征(ROC)曲线分析血清 lncRNA LINC00673 诊断 HCC 的效能;通过 Kaplan-Meier 生存曲线分析不同血清 lncRNA LINC00673 水平 HCC 患者的生存情况。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HCC 组和对照组血清 lncRNA LINC00673 水平分析 RT-PCR 结果显示,lncRNA LINC00673 在 HCC 组血清中的水平 (4.37 ± 1.06) 明显高于对照组 (1.29 ± 0.31),差异有统计学意义 ($t = 28.303, P < 0.001$)。

2.2 血清 lncRNA LINC00673 诊断 HCC 的 ROC 曲线分析 血清 lncRNA LINC00673 诊断 HCC 的曲线下面积(AUC)为 0.783(95%CI:0.718~0.849),

最佳截断值为 2.87 时,灵敏度为 75.70%,特异度为 81.61%,准确度为 78.70%。见图 1。

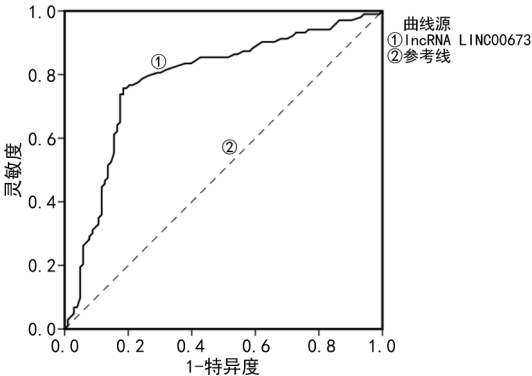


图 1 血清 lncRNA LINC00673 诊断 HCC 的 ROC 曲线

2.3 不同临床病理特征 HCC 患者血清 lncRNA LINC00673 表达情况比较 以 ROC 曲线最佳截断值 2.87 为分界点,将 103 例 HCC 患者分为 lncRNA LINC00673 低表达组(血清 lncRNA LINC00673 水平 < 2.87 , 41 例)与 lncRNA LINC00673 高表达组(血清 lncRNA LINC00673 水平 ≥ 2.87 , 62 例)。lncRNA LINC00673 高表达患者血清 AFP 水平 $\geq 400 \mu\text{g/L}$ 、肿瘤最大径 $\geq 3 \text{ cm}$ 、TNM 分期 III~IV 期、有血管侵犯、有淋巴结转移情况的比例明显高于 lncRNA LINC00673 低表达患者 ($P < 0.05$),而 lncRNA LINC00673 高表达患者和 lncRNA LINC00673 低表达患者在性别、年龄、肝硬化、肿瘤分化程度、微癌栓情况方面比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 不同临床病理特征 HCC 患者血清 lncRNA LINC00673 表达情况比较[n(%)]

临床病理特征	n	低表达(n=41)	高表达(n=62)	χ^2	P
性别				0.016	0.899
男	86	34(82.93)	52(83.87)		
女	17	7(17.07)	10(16.13)		
年龄				0.345	0.556
<60 岁	72	30(73.17)	42(67.74)		
≥ 60 岁	31	11(26.83)	20(32.26)		
肝硬化				0.279	0.597
无	20	9(21.95)	11(17.74)		
有	83	32(78.05)	51(82.26)		
微癌栓				0.000	0.986
无	88	35(85.37)	53(85.48)		
有	15	6(14.63)	9(14.52)		
肿瘤分化程度				0.311	0.576
中高分化	80	33(80.49)	47(75.81)		
低分化	23	8(19.51)	15(24.19)		

续表 1 不同临床病理特征 HCC 患者血清 lncRNA LINC00673 表达情况比较[n(%)]

临床病理特征	n	低表达(n=41)	高表达(n=62)	χ^2	P
肿瘤最大径				10.952	0.001
<3 cm	25	17(41.46)	8(12.90)		
≥3 cm	78	24(58.54)	54(87.10)		
血管侵犯				9.126	0.003
无	49	27(65.85)	22(35.48)		
有	54	14(34.15)	40(64.52)		
淋巴结转移				8.656	0.003
无	77	37(90.24)	40(64.52)		
有	26	4(9.76)	22(35.48)		
TNM 分期				15.694	<0.001
I ~ II 期	73	38(9.27)	35(56.45)		
III ~ IV 期	30	3(7.32)	27(43.55)		
血清 AFP 水平				6.755	0.009
<400 μg/L	62	31(75.61)	31(50.00)		
≥400 μg/L	41	10(24.39)	31(50.00)		

2.4 不同血清 lncRNA LINC00673 水平 HCC 患者的 Kaplan-Meier 生存曲线分析 103 例 HCC 患者在随访 5 年间,失访 6 例,获得随访 97 例,其中生存 53 例,死亡 44 例,总生存率为 54.64%。血清 lncRNA LINC00673 高表达组与 lncRNA LINC00673 低表达组 5 年总生存率分别为 44.83%(26/58)、69.23%(27/39)。Kaplan-Meier 生存曲线显示,血清 lncRNA LINC00673 高表达患者 5 年生存率显著低于 lncRNA LINC00673 低表达患者(Log-Rank $\chi^2=6.007, P=0.014$)。见图 2。

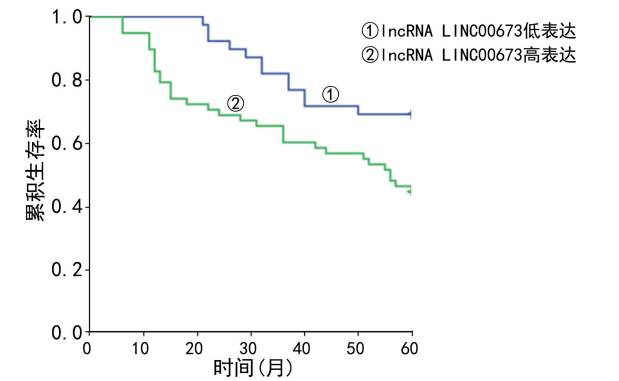


图 2 不同血清 lncRNA LINC00673 水平 HCC 患者的 Kaplan-Meier 生存曲线

3 讨 论

随着医疗技术的不断发展,手术切除、射频消融、肝动脉化疗栓塞、放射性疗法、分子靶向药物等手段应用于肝癌治疗,患者预后情况得到较大改善,但高复发与高转移仍制约着患者的长期生存。有报道称,肝癌患者根治性切除术后 5 年累积复发率可达 70%,且复发肿瘤的侵袭性相较于原发肿瘤更高^[8]。肝癌

发病率较高,预后较差,对人类健康造成严重威胁。故寻找在肝癌早期诊断、病情评估、预后判断中具有潜在应用价值的分子标志物十分必要。

lncRNA 是一种无蛋白质编码功能的 RNA 分子,能够参与基因组印记、X 染色体沉默、转录激活、染色质修饰、核内运输等多个生命过程,还可参与调节细胞增殖和凋亡^[9]。多项研究提示,在肝癌发病过程中,lncRNA 起促进作用^[10-11]。lncRNA LINC00673 为 lncRNA 家族中的一种,在不同癌组织中存在高或低表达,在恶性肿瘤诊断或预后评估方面具有潜在优势^[12]。本研究显示,lncRNA LINC00673 在 HCC 组血清中的水平明显高于对照组,提示 lncRNA LINC00673 在 HCC 中呈高表达,该分子可能参与了 HCC 发生。以往研究也提示恶性肿瘤的形成可能与 lncRNA LINC00673 有关,如李涛等^[13]和高勇等^[14]检测结肠癌和胃癌患者癌组织中 lncRNA LINC00673 的水平,并与其对应的癌旁正常组织作对照研究,发现癌灶组织内 lncRNA LINC00673 水平明显更高。本研究显示血清 lncRNA LINC00673 诊断 HCC 的 AUC 为 0.783(95%CI:0.718~0.849),最佳截断值为 2.87 时,灵敏度为 75.70%,特异度为 81.61%,准确度为 78.70%,提示血清 lncRNA LINC00673 对于 HCC 有一定的诊断价值,有望作为 HCC 的辅助诊断指标。此外,本研究发现 lncRNA LINC00673 高表达患者血清 AFP 水平≥400 μg/L、肿瘤最大径≥3 cm、TNM 分期 III~IV 期、有血管侵犯、有淋巴结转移情况的比例明显高于 lncRNA LINC00673 低表达患者($P<0.05$),提示血清 lncRNA LINC00673 与 HCC 临床病理特征关联密

切,该分子可能参与了 HCC 迁移、侵袭等癌细胞进展。郭红艳等^[15]报道,lncRNA LINC00673 高表达能促进磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)信号途径关键分子表达,上调肿瘤相关因子 zeste 基因增强子同源物 2(EZH2)和 β -catenin 水平,继而促进胃癌 MGC-803 细胞增殖和克隆。ZHANG 等^[16]研究提示,lncRNA LINC00673 沉默对抑制肝癌细胞上皮-间充质转化及增殖、侵袭有积极作用。本研究 103 例 HCC 患者随访 5 年间,失访 6 例,Kaplan-Meier 生存曲线显示血清 lncRNA LINC00673 高表达患者 5 年生存率显著低于 lncRNA LINC00673 低表达患者,提示血清 lncRNA LINC00673 高表达与 HCC 不良预后有关。ZHANG 等^[17]和张依等^[18]的研究与此相符。ZHANG 等^[17]发现 lncRNA LINC00673 高表达与胰腺癌患者存活率下降有关,可作为该肿瘤预后的标志物。张依等^[18]提到,lncRNA LINC00673 水平上升与肺癌预后不良相关。进一步分析可能原因为 lncRNA LINC00673 通过与组蛋白赖氨酸特异性去甲基化酶 1(LSD1)和果蝇 EZH2 相互作用,进而促进 HCC 的发生和发展,导致其预后不良^[19]。

综上所述,HCC 患者血清 lncRNA LINC00673 水平升高,其水平与患者肿瘤最大径、TNM 分期、血管侵犯、淋巴结转移、血清 AFP 水平有关,可导致预后不良,有望成为 HCC 诊疗相关的血清标志物。但其具体机制不明,有待细胞学实验或动物模型实验进一步验证。

参考文献

[1] 安澜,曾红梅,冉显会,等.肝细胞癌和肝内胆管细胞癌流行病学研究进展[J].中国肿瘤,2020,29(11):6-7.

[2] 陈万青,孙可欣,郑荣寿,等.2014 年中国分地区恶性肿瘤发病和死亡分析[J].中国肿瘤,2018,27(1):1-14.

[3] CHIDAMBARANATHAN-REGHUPATY S,FISHER P B,SARKAR D. Hepatocellular carcinoma (HCC):epidemiology,etiology and molecular classification [J]. Adv Cancer Res,2021,149(8):1-61.

[4] 鲜林峰,方乐天,刘文斌,等.原发性肝癌流行现状、主要发病机制及防控策略[J].中国癌症防治杂志,2022,14(3):320-328.

[5] SONG W,MEI J Z,ZHANG M. Long noncoding RNA plncRNA-1 promotes colorectal cancer cell progression by regulating the PI3K/Akt signaling pathway [J]. Oncol

Res,2018,26(2):261-268.

[6] 王上桥,吴远桥.沉默 LINC00673 表达对胶质瘤细胞增殖和侵袭能力的影响及其机制[J].山东医药,2018,58(28):411-412.

[7] 叶胜龙,陈荣新.《肝细胞癌临床指南更新》解读[J].中华肝病杂志,2011,19(4):251-253.

[8] 沈中阳.供肝短缺背景下我国肝癌患者肝移植的策略[J].中华器官移植杂志,2013,34(9):513-515.

[9] 苏立贞,孟洁,晋婕. lncRNA H19、VEGF、TSGF 在卵巢癌中的表达及与卵巢超声血流参数的相关性[J]. 检验医学与临床,2022,19(16):2263-2266.

[10] 樊莉,魏子湘,杨希蕊,等. LncRNA 与肝疾病的研究现状[J]. 现代生物医学进展,2018,18(9):1794-1797.

[11] 靳秀丽,李异玲. lncRNA 与肝癌相关性研究进展[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2019,28(3):5-6.

[12] 方健,王辰辰,孟庆刚. 买麻藤下调 LINC00673 表达对肝癌细胞增殖,迁移和细胞周期的影响[J]. 山东医药,2021,8(4):25-26.

[13] 李涛,王占文,王海军,等. 结肠癌中 LINC00673 表达与肿瘤上皮-间充质转化的关系及其作用机制[J]. 中华实验外科杂志,2020,37(2):23-28.

[14] 高勇,李林,郭红艳,等. 血清非编码 RNA Linc00673 在胃癌患者诊断中的临床应用[J]. 中国临床药理学杂志,2022,38(19):2268-2272.

[15] 郭红艳,徐亚茹,李耕慧,等. 长链非编码 RNA Linc00673 过表达对胃癌 MGC-803 细胞增殖与凋亡的影响[J]. 中国应用生理学杂志,2022,7(1):38-39.

[16] ZHANG L G,ZHOU X K,ZHOU R J,et al. Long non-coding RNA LINC00673 promotes hepatocellular carcinoma progression and metastasis through negatively regulating miR-205[J]. Am J Cancer Res,2017,7(12):2536-2544.

[17] ZHANG B,LI C,SUN Z. Long non-coding RNA LINC 00346, LINC00578,LINC00673,LINC00671,LINC00261,and SNHG9 are novel prognostic markers for pancreatic cancer[J]. Am J Transl Res,2018,10(8):2648-2658.

[18] 张依,杜维桓,纪红. LINC00673 基因在非小细胞肺癌中的表达及临床意义[J]. 现代肿瘤医学,2021,29(11):1903-1907.

[19] BA M C, LONG H,CUI S Z,et al. Long noncoding RNA LINC00673 epigenetically suppresses KLF4 by interacting with EZH2 and DNMT1 in gastric cancer[J]. Oncotarget,2017,8(56):95542-95553.