

LncRNA CCAT1 在大肠癌中的表达研究

葛永利¹, 齐晓艳^{2*}

(1. 内蒙古自治区人民医院 肿瘤内科, 内蒙古 呼和浩特 010017;

2. 内蒙古医科大学附属医院 肿瘤内科, 内蒙古 呼和浩特 010020)

【摘要】目的 观察LncRNA CCAT1在大肠癌演变中(正常组织、癌前期病变、癌)的表达变化情况。方法 收集内蒙古医科大学附属人民医院内镜室活检标本证实为无癌变的上皮内瘤变腺瘤33例及大肠癌根治术切除的组织连同癌旁组织标本74例,通过qRT-PCR检测上述标本中LncRNA CCAT1的表达情况。结果 癌旁组织中、上皮内瘤变腺瘤和大肠癌组织中LncRNA CCAT1的表达逐渐增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在大肠癌中,CCAT1的表达水平与局部浸润深度($P < 0.05$)、肿瘤分期($P < 0.05$)、血管浸润($P < 0.05$)和CA19-9水平($P < 0.05$)显著相关;但与年龄、性别、原发灶大小、CEA水平无关($P > 0.05$)。结论 LncRNA CCAT1可能参与大肠癌的癌前病变发生,LncRNA CCAT1在结肠癌的肿瘤发生中也起着关键作用,有望成为结直肠癌诊断和治疗的新标志物和治疗靶点。

【关键词】 大肠癌;癌前期病变;腺瘤;非编码RNA;LncRNA CCAT1

中图分类号: R376

文献标识码: B

文章编号: 2095-512X(2022)03-0268-04

大肠癌(Colon cancer),即结直肠癌(colorectal cancer, CRC),是全世界常见的癌症之一。2020年最新全球癌症数据,在中国2020年大肠癌是男性和女性癌症病死率的第五和第二大原因,新发大肠癌病例56万例^[1]。此外,发达国家的大肠癌发病率约为发展中国家的4倍^[2]。由于大肠癌的病理机制尚不完全清楚,迫切需要进一步研究来确定和开发新的有效诊断和治疗的生物标志物和靶点。

长非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNAs)是由200多个核苷酸组成的非编码转录本,具有多种调控模式。大量的研究表明, lncRNAs与蛋白质、RNA和DNA相互作用,形成RNA-RNA、RNA-DNA和RNA-蛋白质复合物,使它们能够参与许多重要的生物过程,如转录、核内转运和基因组印记^[3,4]。最近的研究表明, lncRNAs参与了大肠癌发生和发展的调控。一些致癌的lncRNAs与大肠癌细胞的发生、增殖、侵袭、转移和耐药性有关,而一些lncRNAs则抑制肿瘤细胞的生长。

结肠癌相关转录本1(colon cancer associated transcript-1, CCAT1),一种位于染色体8q24.21上的2628 bp长度的lncRNA。LncRNA CCAT1最初在大肠癌中表达,并有助于肿瘤进展^[5]。一些研究证实

CCAT1在各种类型的肿瘤中都有独特的表达模式并促进癌变,如胃癌^[6]、肝细胞癌^[7]、肾细胞癌^[8]和肺癌^[9]。最近,CCAT1被发现作为一个癌基因并促进CRC进展^[10]。但是,LncRNA CCAT1在正常组织-癌前病变-癌变过程中的表达变化目前尚不清楚,因此本课题主要研究LncRNA CCAT1在大肠癌中的表达变化,检测癌旁组织、腺瘤和大肠癌组织中的表达,并通过观察上述LncRNA结合临床病理参数,探讨LncRNA CCAT1的表达水平与结肠癌临床病理参数的关联。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集2018年1月至2020年9月在内蒙古医科大学附属医院内镜中心大肠息肉标本共51例,经术后组织病理证明,上皮内瘤变腺瘤33例,其中低级别28例、高级别5例(无局灶癌变),获得普外科手术切除后74份结直肠癌样本,结肠癌组织及对应癌旁组织标本手术切除后液氮保存的新鲜冰冻组织,术后病理证实为大肠癌,癌旁组织取自上述组织的阴性切缘。所有病例未合并其他肿瘤,且术

收稿日期:2022-02-05;修回日期:2022-04-12

基金项目:内蒙古医科大学联合项目(YKD2021LH034);内蒙古卫健委医疗卫生科技计划项目(202202012);

内蒙古自治区人民医院内科研基金项目(2022YN18)

第一作者:葛永利(1979-),男,硕士,主治医师。研究方向:肿瘤内科学临床和基础研究、肿瘤发生的分子机制。

E-mail:nmggeyl@aliyun.com

*通信作者:齐晓艳,女,硕士,主任医师。研究方向:消化道肿瘤防治。E-mail:122011749@qq.com

前均未行化、放疗及免疫治疗。在每个病例中从肿瘤组织中获得一块癌旁组织(距癌组织边缘 5 cm)。获得手术样品后,在 10 min 内进行无菌取样,用无菌预冷 PBS 冲洗血液和剩余杂质,并浸入 Trizol 中。样品在液氮中保存。男性 42 例,女性 32 例,年龄 43 ~ 80 岁,平均年龄(65.75 ± 5.93)岁。Dukes 分期: A 期 10 例, B 期 34 例, C 期 30 例, D 期 0 例。肿瘤部位:结肠癌 36 例,直肠癌 38 例。所有病例均经病理证实,术前均未进行化疗或放疗。腺瘤、大肠癌和癌旁组织 HE 染色结果见图 1。该研究得到了医院伦理委员会的批准(No.2018APH-YN03),并获得了所有参与者的知情同意。

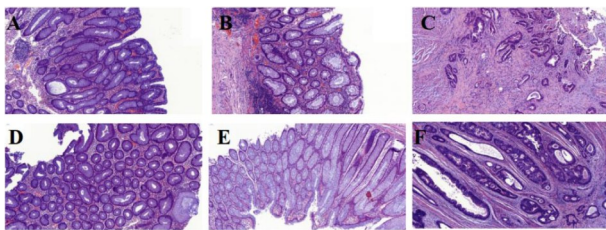


图 1 腺瘤、大肠癌和癌旁组织 HE 染色结果

(A)和(D)为腺瘤患者瘤组织 HE 染色;(B-C)和(E-F)为同一患者大肠癌和癌旁组织 HE 染色结果。(B)和(E)为癌旁组织,(C)和(F)为癌组织

1.2 RNA 提取及实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测

采用 Trizol 法提取结肠癌,癌旁组织及发生癌变的腺瘤的 RNA,测定各组织的 RNA 浓度,OD260 及 OD280 值。按照 TIANGEN InRcute lncRNA cDNA 第一链合成试剂盒说明书将各个组织的总 RNA 逆转录为 cDNA;再以 cDNA 为模板。制备 20 μL SYBR Green qRT-PCR kit (苏州基因制药有限公司)反应体系:cDNA (500 ng/20 μL): 1 μL;引物 (10 pmol/L): 0.6 μL;2 × SYBR 绿色 PCR 主混合物 9 μL;无 RNase 水 8.4 μL。反应条件:95 °C 2 min 加热,95 °C 15 s 变性,55 °C 30 s 退火,68 °C 30 s 延长,40 个周期。所有反应都有 3 个重复,以 GAPDH 为内参基因,得到 CCAT1 及内参基因的 Ct 值。引物由博迈得生物合成(见表 1)采用相对定量法(2^{-ΔΔCt})法计算腺瘤、大肠癌和癌旁组织中 CCAT1 的表达,对实验结果进行比较、分析。

表 1 引物序列(由博迈得生物合成)

Name	Sequence
CCAT1 Forward	5'-TCACTGACAACATCGACTTTGAAG-3'
CCAT1 Reverse	5'-GGAGAAAACGCTTAGCCATACAG-3'
GAPDH Forward	5'-TGTTCGCATCAATGACCCCTT-3'
GAPDH Reverse	5'-CTCCACGACGTA CT CAGCG-3'

1.3 统计学方法

所有数据均使用应用 SPSS 22.0 统计软件进行统计分析,绘图使用 Graphpad prism 6.0 及 Adobe Photoshop CS5 软件。实验中计量资料不满足正态分布的资料用非参数 Mann-Whitney 秩和检验;双侧检验,检验水准为 α = 0.05,以 P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LncRNA CCAT1 在癌旁组织、癌组织、癌前病变中的表达

首先我们利用 qRT-PCR 检测 LncRNA CCAT1 在腺瘤、癌旁组织和大肠癌组织中表达变化,其在癌旁组织、腺瘤和大肠癌组织中表达量呈递增趋势,差异有统计学意义。其中大肠癌组织明显高于癌前病变腺瘤(P < 0.05)和癌旁组织(P < 0.05)的表达量;癌前病变腺瘤中的表达量明显高于癌旁组织(P < 0.05)(见图 2)。

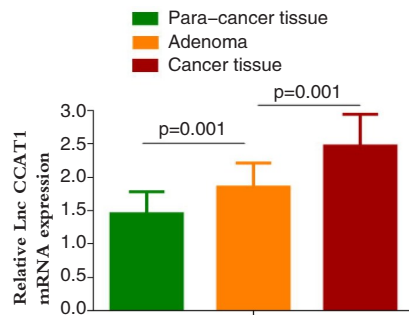


图 2 长链非编码 RNA CCAT1 在腺瘤、大肠癌和癌旁组织中的差异表达(NAdenoma=33,NCancer=74)

2.2 LncRNA CCAT1 在结肠癌中的表达与临床病理参数的关系

为了研究 LncRNA CCAT1 的临床意义,分析其表达水平与临床病理特征之间的相关性(见表 1)。分析结果显示,结肠癌中 LncRNA CCAT1 表达水平在不同年龄组(中位数年龄为 65 岁,≥65 岁组,<65 岁组)、不同性别、肿瘤大小及 CEA(中位数为 6.5 ng/mL,< 6.5 ng/mL 组,≥ 6.5 ng/mL 组)无相关性(见表 2)。

对结肠癌中 LncRNA CCAT1 表达水平高低与局部浸润射深度(图 3A)、Dukes 分期(图 3B)、是否侵袭血管(图 3C)及 CA19-9(中位数 37 U/mL,<37 U/mL 组,≥37 U/mL 组)(图 3D)具有正相关性。结肠癌中,在浸润深度、Dukes 高分期、侵袭血管和高 CA19-9 组中 LncRNA CCAT1 相对表达量较高。这表明,LncRNA CCAT1 在结肠癌中高表达,其可能作

为癌基因发挥对肿瘤促进其侵袭和转移的特性,可作为结肠癌的分子标志物。

表2 CCAT1 表达与癌临床特征的关系

Clinical data	Case (n)	P value
Gender		0.496
Male	40	
Female	34	
Age		0.184
<65 YO	20	
≥65 YO	54	
Tumorsize		0.876
<5 cm	38	
≥5cm	36	
Local invasion depth		0.0002
T1/T2	18	
T3/T4	56	
Dukes staging		0.0001
A/B	44	
C/D	30	
Vascular invasion		0.0001
NO	54	
Yes	20	
CEA(ng/mL)		0.062
<6.5	30	
≥6.5	44	
CA19-9 (U/mL)		0.0005
<37 (U/mL)	50	
≥37 (U/mL)	24	

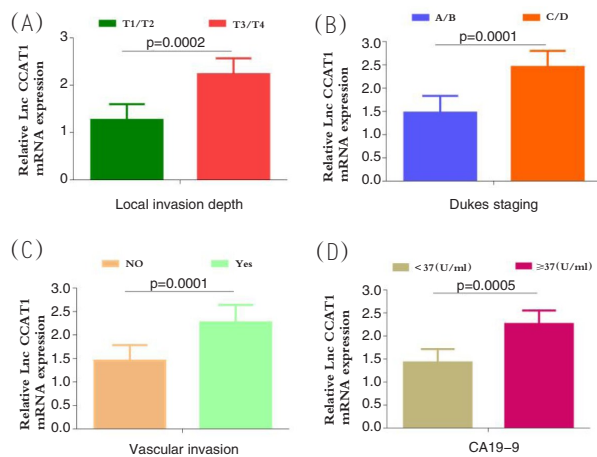


图3 (A)CCAT1 在局部浸润深度组中的相对表达水平
(B)CCAT1 在不同分期组的相对表达水平
(C)CCAT1 在不同血管侵袭组的相对表达水平
(D)CCAT1 在不同CA19-9组别的相对表达水平
NT1/T2=18, NT3/T4=56

3 讨论

大肠癌(CRC)是全球第三大致命恶性肿瘤^[11]。大肠癌在我国发病率日益升高,已经成为常见的恶性肿瘤,其发病率和病死率均位于我国恶性肿瘤的第五位。已有研究表明,遗传或表观遗传异常与大

肠癌的发生和进展有关^[12]。肿瘤进展和转移是大肠癌患者死亡的主要原因,尤其是晚期患者。尽管各种抗癌新药物的出现和诊疗技术的不断改进,但大肠癌患者的总体生存率仍然相对较低。因此,人们期望探索大肠癌发生的事实病理生理机制,有助于大肠癌的早期诊断和治疗。

大肠腺瘤性息肉目前被公认为大肠癌的癌前期病变,腺瘤癌变是导致结肠癌发生的主要原因。研究表明,随着腺瘤到癌变的大约10年的进程中,每个阶段会出现抑癌基因的失活以及癌基因被激活等一系列基因变化。上皮内瘤变是一种以形态学改变为特征的上皮性病变,包括细胞形态和组织结构改变,同时也有细胞分化和增殖动力的异常。上皮内瘤变在大肠肿瘤中分为低级别上皮内瘤变和高级别上皮内瘤变,在我们的研究中,癌前期病变中同时有这两种瘤变形式。

先前的研究表明(通过整合基因组和转录组测序结果),超过90%的DNA序列被积极转录,其中98%被转录成各种非编码RNA,包括小RNA(miRNA或miR)和lncRNAs^[13]。lncRNAs的长度大于200个核苷酸,不编码蛋白质。lncRNAs在不同水平上调节基因表达,并在多种生物过程中发挥关键作用^[14]。越来越多的证据表明,lncRNAs可作为多种癌症诊断和预后的新生物标志物,包括肝癌、胃癌、非小细胞肺癌和胰腺癌。LncRNA CCAT1在参与肿瘤的发生、发展过程中起着重要作用。很多研究显示LncRNA CCAT1已在鼻咽癌、肺癌、肝癌、乳腺癌、膀胱癌、胃癌等多种恶性肿瘤中呈现高表达并有着重要的生物学意义。

在大肠癌方面,目前国内外学者对CCAT1也有一些报道。He等^[15]证实CCAT1与c-Myc相互作用,CCAT1高表达时结肠癌细胞的增殖和侵袭增强,肿瘤进展。还有研究表明,CCAT1在外周血中的表达水平,在健康志愿者、癌前期患者及大肠癌患者呈逐渐递增^[16]。我们的研究发现在肿瘤进展的不同时期,即正常组织、癌前病变组织和大肠癌组织中LncRNA CCAT1在三者中的表达量呈明显的递增趋势,证明LncRNA CCAT1在大肠癌的发生发展过程中起到重要促进作用,其重要意义是在癌前病变的高表达,为以后的大肠癌筛查及早期诊断提供新的有效的早期肿瘤标志物,也为肿瘤治疗寻求新靶点。我们通过分析发现了大肠癌组织中LncRNA CCAT1的相对表达量与临床病理参数的关系,结肠癌中LncRNA CCAT1表达水平在不同年龄组、不同

性别、肿瘤大小及CEA与否无相关性。而对结肠癌中LncRNA CCAT1表达水平高低与局部浸润深度、Dukes分期、是否侵袭血管及CA19-9正相关。结肠癌中,在浸润深度、Dukes高分期、侵袭血管和高CA19-9组中LncRNA CCAT1相对表达量较高。这表明,LncRNA CCAT1在结肠癌中高表达,可能作为癌基因发挥对肿瘤促进其侵袭和转移的特性,其可作为结肠癌分子标志物。

综上所述,长链非编码RNA CCAT1与包括大肠癌在内的多种恶性肿瘤的发生、发展及预后密切相关。但是目前对LncRNA CCAT1与肿瘤相关的分子机制研究尚不深入,本研究仅从临床角度出发,初步探讨其在大肠癌发生、发展中的作用,希望能够为今后的深入研究提供参考及方向。

参考文献

- [1]IARC. Latest global cancer data: cancer burden rises to 19.3 million new cases and 10.0 million cancer deaths in 2020.
 - [2]Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020:GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 Cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3):209-249
 - [3]Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs[J]. Cell, 2009, 136(4):629-641
 - [4]Ulitsky I, Bartel DP. lincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms[J]. Cell, 2013, 154(1):26-46
 - [5]Nissan A, Stojadinovic A, Mitrani RS, et al. Colon cancer associated transcript-1: a novel RNA expressed in malignant and pre-malignant human tissues[J]. Int J Cancer, 2012, 130(7):1598-1606
 - [6]Yang F, Xue X, Bi J, et al. Long noncoding RNA CCAT1, which could be activated by c-Myc, promotes the progression of gastric carcinoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2013, 139(3):437-445
 - [7]Deng L, Yang SB, Xu FF, et al. Long noncoding RNA CCAT1 promotes hepatocellular carcinoma progression by functioning as let-7 sponge[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2015, 34(1):18-19
 - [8]Zhai X, Xue Q, Liu Q, et al. Colon cancer recurrence-associated genes revealed by WGCNA co-expression network analysis[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(5):6499-6505
 - [9]Chen J, Zhang K, Song H, et al. Long noncoding RNA CCAT1 acts as an oncogene and promotes chemoresistance in docetaxel-resistant lung adenocarcinoma cells[J]. Oncotarget, 2016, 7(38):62474-62489
 - [10]Ozawa T, Matsuyama T, Toiyama Y, et al. CCAT1 and CCAT2 long noncoding RNAs, located within the 8q.24.21 'gene desert', serve as important prognostic biomarkers in colorectal cancer[J]. Ann Oncol, 2017, 28(8):1882-1888
 - [11]Chen DL, Chen LZ, Lu YX, et al. Long noncoding RNA XIST expedites metastasis and modulates epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(8):e3011
 - [12]Chen X, Zhu H, Wu X, et al. Downregulated pseudogene CTNNAP1 promote tumor growth in human cancer by downregulating its cognate gene CTNNA1 expression[J]. Oncotarget, 2016, 7(34):55518-55528
 - [13]Guttman M, Amit I, Garber M, et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals[J]. Nature, 2009, 458(7235):223-227
 - [14]Kopp F, Mendell JT. Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs[J]. Cell, 2018, 172(3):393-407
 - [15]He X, Tan X, Wang X, et al. C-Myc-activated long noncoding RNA CCAT1 promotes colon cancer cell proliferation and invasion[J]. Tumour Biol, 2014, 35(12):12181-12188
 - [16]崔戈, 张婷, 崔杰. 结肠癌相关转录因子1表达在结直肠癌早期筛查及预后评估中的作用[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2015, 35(7):1008-1012
-
- (上接第261页)
- [6]李书迪, 布仁, 齐和日玛, 等. 七味广枣散HPLC指纹图谱研究[J]. 中药材, 2020, 12(5):1154-1159
 - [7]李志平, 王加良, 张艳丽, 等. 一测多评法同时测定九味沉香胶囊中9种成分[J]. 中成药, 2020, 42(5):1129-1134
 - [8]王佳铭, 曹境洳, 高小力, 等. 八味沉香散的化学和药理研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(9):2063-2072
 - [9]李卓明, 黄鸣清, 吴燕红, 等. 冠心七味片鉴别方法研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(3):29-31
 - [10]乌汉其木格, 敖登其木格, 锡林其其格, 等. 蒙药绍沙-7丸质量标准研究[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(4):879-881
 - [11]邵峰, 谷丽菲, 钟丹丹, 等. 山楂体外降三酰甘油主要活性组分谱效关系研究[J]. 中草药, 2017, 48(2):339-344
 - [12]李翠芹, 贺浪冲. 白细胞膜色谱模型建立与白术中TLT-4受体拮抗活性成分筛选研究[J]. 中国科学, 2005, 12(6):545-550
 - [13]邵坚, 吴样明, 李诒光, 等. 基于UPLC-LTQ-Orbitrap代谢组学技术的不同产地黄连组分比较研究[J]. 中药材, 2020, 43(2):309-313
 - [14]孙宇飞, 甄晓宇, 刘天舒, 等. 基于“体外-体内”多维化学物质组关联网络的茯苓质量标志物发现及质量评价研究[J]. 中草药, 2019, 50(19):4562-4568
 - [15]王乃利, 倪艳, 陈英杰, 等. 广枣(南酸枣)活血有效成分的研究[J]. 中草药, 1987, 18(11):2-4