

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00566

• 短篇论著 •

RCRF 在高级别肾癌组织中表达上调并影响肾癌患者预后

宋尚卿, 吴震杰, 王承, 刘冰, 王林辉*

第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433

[摘要] **目的** 研究不同病理级别肾细胞癌中差异表达的长链非编码 RNAs(lncRNAs), 找到其中一种 lncRNA——RCRF 与肾癌患者临床病理资料的关系, 从而判断肾癌预后。 **方法** 取 6 例肾细胞癌原发灶肿瘤组织, 3 例病理分级为 Fuhrman I 级, 另 3 例为 Fuhrman III~IV 级, 采用 lncRNA 芯片技术, 筛选差异表达的 lncRNAs。另取 40 例肾细胞癌患者的癌组织及癌旁正常组织, 22 例病理分级为 Fuhrman I~II (低级别), 18 例为 Fuhrman III~IV (高级别), 利用实时定量 PCR 技术检测在癌及癌旁非肿瘤组织中 RCRF 的表达, 并研究 RCRF 与临床分期、病理分级、淋巴结转移、远处转移之间的关系。 **结果** 筛选出 320 个与肾细胞癌病理级别相关的差异表达 lncRNAs。肾癌组织尤其是高级别肾癌组织中 RCRF 的相对表达上调 ($P < 0.01$)。RCRF 表达与肾癌病理分级、淋巴转移及远处转移有关 ($P < 0.05$)。 **结论** RCRF 在高级别肾癌组织中表达上调, 并且影响肾癌患者的预后。

[关键词] 肾肿瘤; 肾细胞癌; 长链非编码 RNA; RCRF; 预后

[中图分类号] R 737.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)05-0566-03

Renal carcinoma related factor is up-regulated in high Fuhrman grade renal cell carcinoma tissues and affects prognosis of patients

SONG Shang-qing, WU Zhen-jie, WANG Cheng, LIU Bing, WANG Lin-hui*

Department of Urology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To identify differentially expressed long non-coding RNAs (lncRNAs) in different Fuhrman grade renal cell carcinoma (RCC) tissues, and to investigate the association of one of these lncRNAs—renal carcinoma related factor (RCRF) with the clinicopathologic features of RCC patients, helping the prognosis of RCC patients. **Methods** A total of 6 RCC tumor tissues were used for lncRNA chip screening, with 3 being Fuhrman I grade and the rest being Fuhrman III-IV grade. Then another 40 RCC tumor tissues (22 Fuhrman I-II grade and 18 Fuhrman III-IV grade) and the matched adjacent noncancerous tissues were subjected to qPCR examination for RCRF expression, and the relationship of RCRF expression with the clinical stage, tumor grade, lymph node metastasis and distant metastasis was analyzed. **Results** A total of 320 differentially expressed lncRNAs were screened out from RCC tumor tissues. Compared with the adjacent normal tissues, RCC tissues, especially the high grade ones, had significantly up-regulated RCRF expression ($P < 0.01$). It was also found that RCRF expression was associated with the pathological grade, lymph node metastasis and distant metastasis of RCC ($P < 0.05$). **Conclusion** RCRF is up-regulated in high Fuhrman grade tissues and may affect the prognosis of RCC patients.

[Key words] kidney neoplasms; renal cell carcinoma; long non-coding RNAs; RCRF; prognosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(5): 566-568]

肾细胞癌(简称肾癌)在所有成人恶性肿瘤中约占 3%, 在泌尿系统恶性肿瘤中致死率最高^[1], 5 年生存率为 69.4%^[2]。肾癌早期无症状, 约 20%~30% 的患者首次就诊时已经存在转移, 进展期肾癌的 5 年生存率低于 10%^[3]。对于转移性或复发性肾癌, 尚无有效的治疗方法。肾细胞癌对放射线治疗

不敏感, 化疗总有效率仅为 6%, 免疫治疗总有效率约 20%, 转移性肾癌 5 年存活率仅为 11% 左右^[4]。因此, 找到能预测肾癌转移的早期诊断指标意义重大。而目前的研究显示长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)有可能会成为一种潜在的肾癌早期诊断和治疗的新途径^[5]。

[收稿日期] 2014-01-02 **[接受日期]** 2014-03-12

[作者简介] 宋尚卿, 硕士生. E-mail: songsq@126.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31161719, E-mail: wlhui@medmail.com.cn

近年关于 lncRNA 的研究逐渐成为热点, lncRNA 在真核生物的生命活动调节中发挥十分重要的作用, 参与了细胞信号转导^[5]。研究发现许多 lncRNAs 与疾病的病因密切相关, 尤其是在肿瘤疾病中发生错调^[6]。如在白血病中 p15 的反义链表达^[7], 前列腺癌中 DD3(PCA3) 的表达^[8]。目前未见有关 lncRNA 在肾癌领域的相关研究。

RCRF(renal carcinoma related factor) 是本研究通过 lncRNA 表达谱芯片技术筛选出来在肾癌组织中表达差异较明显的 lncRNA 之一, 其位于染色体 chr3:156866430~156866717, 在高级别肾癌组织中表达上调。通过研究证实 RCRF 的表达和肾癌临床病理及预后有关, 提示其可能是肾癌的一个预后因子。

1 材料和方法

1.1 标本来源 6 例肾细胞癌的肿瘤标本用于芯片筛选, 其中 3 例肿瘤组织病理分级为 Fuhrman I 级, 另 3 例肿瘤组织病理分级为 Fuhrman III~IV 级。

共收集 40 例患者的肾细胞癌组织标本及癌旁正常组织标本用于实时定量 PCR。患者年龄为 37~75 岁, 平均(59.5±6.8)岁。男 28 例、女 12 例。32 例临床分期为 pT1~pT2, 8 例临床分期为 pT3~pT4; 22 例病理分级为低级别(Fuhrman I~II), 18 例病理分级为高级别(Fuhrman III~IV)。手术后 6 例出现淋巴结转移, 9 例出现远处转移。平均随访期限为(19.55±3.4)个月。

以上组织均来源于 2011 年 1 月至 2013 年 4 月在第二军医大学长海医院泌尿外科行手术治疗且术前未行其他治疗的患者, 所有标本均术后病理确诊为肾透明细胞癌。标本采集均经过患者家属同意并签署知情同意书, 并经医院伦理委员会审核通过。

1.2 芯片筛选差异表达 lncRNA 选择 Affymetrix 公司 Glue Grant Human Transcriptome Array 芯片, 设计探针为 60 nt 的长寡核苷酸, 针对每条序列都设计了多条探针, 以增加了信号的可靠性。实验由上海其明生物信息公司完成。将高级别肾癌组织 lncRNAs 表达量与低级别肾癌组织比较: 其中 2 倍以上变化且差异有统计学意义($P < 0.05$)的 lncRNAs, 认为是差异表达的 lncRNAs。

1.3 反转录及实时定量 PCR 总 RNA 提取于 40 例患者的肾癌组织及对应癌旁组织, 提取试剂选用

TRIzol(Invitrogen 公司)。采用 PrimeScript II First Strand cDNA Synthesis Kit(TaKaRa 公司)合成 cDNA。以反转录所获 cDNA 为模板, SYBR Green I(TaKaRa 公司)为荧光标记物, 进行实时定量 PCR 测定。U6 作为内参。特异性引物由 BioTNT 生物技术有限公司合成。RCRF 上游引物 TGA ACC TCT GCT GCC CAT AC, 下游引物 GCC ACC TTC AAG AAG TAG CCT AT。U6 上游引物 CTC GCT TTG GCA GCA CA, 下游引物 AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT。所有步骤重复 3 次, 取平均值计算相对表达量($2^{-\Delta Ct}$)及表达差异倍数($2^{-\Delta\Delta Ct}$)。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 17.0 进行统计学分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异采取独立样本 Student's *t* 检验或方差分析, 生存分析采用 Kaplan-Meier 法并进行 log-rank 检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 芯片筛选结果 提示与低级别肾癌组织相比, 高级别肾癌组织中有 320 个 lncRNAs 呈显著异常表达。其中 206 个 lncRNAs 表达上调, 有 114 个 lncRNAs 表达下调。根据差异倍数以及错误发现率(false discovery rate, FDR), 选择差异倍数大且错误发现率小的 lncRNAs, 最终选定探针编号为 TI01730NT(差异倍数: 5.39; FDR: 0.0054)的 lncRNA 进行进一步实验。我们将编号为 TI01730NT 的 lncRNA 命名为 RCRF。

2.2 RCRF 的表达及与临床病理资料关系 结果显示, RCRF 的表达与患者年龄、性别、肿瘤大小及临床分期无关($P > 0.05$), 而与病理分级、淋巴结转移、远处转移有关($P < 0.05$, 表 1)。与癌旁正常组织(0.0003±0.0002)相比, 肾癌组织(0.0012±0.0003)中的 RCRF 表达上调($P < 0.01$)。

2.3 生存分析 以出现淋巴转移或远处转移视为终点事件进行无进展生存分析, 将样本分为两组, RCRF 表达差异倍数 \geq 中位数 2.5 的为高表达, $<$ 2.5 的为低表达。根据两组的相对表达绘制 Kaplan-Meier 生存曲线, 并进行 log-rank 检验, 结果显示两组间无进展生存期的差异有统计学意义(图 1, $P < 0.01$)。表明肿瘤组织中高表达 RCRF 的患者更有可能出现转移。

表1 RCRF的表达与临床病理特征的关系

临床指标	例数(n)	RCRF 相对表达倍数	$\bar{x} \pm s$	P 值
N	40	3.098 ± 1.803		
性别				0.258
男	28	2.885 ± 1.729		
女	12	3.597 ± 1.951		
年龄(岁)				0.803
≤60 ^a	23	3.036 ± 1.893		
>60	17	3.183 ± 1.728		
肿瘤直径 d/cm				0.054
≤5.0 ^a	23	2.584 ± 1.629		
>5.0	17	3.095 ± 1.839		
临床分期				0.174
pT1	26	2.793 ± 1.798		
pT2	6	3.332 ± 1.828		
pT3-pT4	8	4.289 ± 1.508		
病理分级				0.017
I	8	1.975 ± 1.780		
II	14	2.624 ± 1.447		
III-IV	18	3.896 ± 1.739		
淋巴结转移				0.003
无	34	2.758 ± 1.658		
有	6	5.028 ± 1.408		
远处转移				0.021
无	31	2.749 ± 1.758		
有	9	4.303 ± 1.471		

^a 中位值

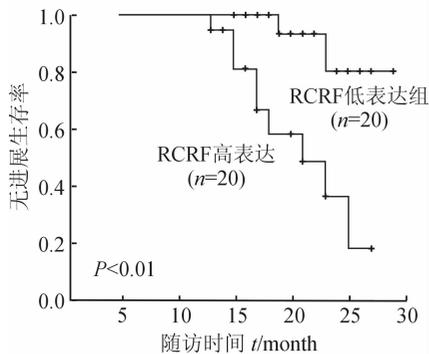


图1 患者无进展生存分析

3 讨论

研究证实 lncRNAs 与一些恶性肿瘤比如结肠癌、乳腺癌等有关^[9-10]。本研究首次发现 RCRF 在肾癌中的异常表达,并对其进行表达谱的探究以及与肾癌患者临床病理指标的统计分析。本研究通过芯片筛选并采用实时定量 PCR 发现并证实了 RCRF 与肾癌的关系。对 40 例患者肿瘤组织标本进行实时定量 PCR 显示,与癌旁正常肾组织相比,肾细胞癌组织中的 RCRF 表达上调($P < 0.01$),并且 RCRF 的上调与肾癌患者的一些临床病理资料如病理分级、淋巴结转移、远处转移有关($P < 0.05$)。另外,RCRF 的过表达与低生存率可能有关。这些结果均提示 RCRF 很可能在肾细胞癌的发生发展中

起到关键作用。然而,对于 RCRF 的研究尚属起步阶段,RCRF 对肾癌细胞的作用机制还未完全阐明,可能是影响某种 mRNA 及其表达的蛋白,并通过某种信号通路发挥促进肿瘤进展的作用。

然而本研究的样本量及随访时间有限,仍然需要更大的样本量及更长的随访时间来证实 RCRF 与肾癌 5 年生存率的相关性。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Rini B I, Rathmell W K, Godley P. Renal cell carcinoma [J]. *Curr Opin Oncol*, 2008, 20: 300-306.
- [2] Motzer R J, Russo P. Systemic therapy for renal cell carcinoma [J]. *J Urol*, 2000, 163: 408-417.
- [3] Pantuck A J, Zisman A, Beldegrun A S. The changing natural history of renal cell carcinoma [J]. *J Urol*, 2001, 166: 1611-1623.
- [4] Guinan P D, Vogelzang N J, Fremgen A M, Chmiel J S, Sylvester J L, Sener S F, et al. Renal cell carcinoma: tumor size, stage and survival. Members of the Cancer Incidence and End Results Committee [J]. *J Urol*, 1995, 153(3 Pt 2): 901-903.
- [5] ENCODE Project Consortium, Birney E, Stamatoyannopoulos J A, Dutta A, Guigó R, Gingeras T R, et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project [J]. *Nature*, 2007, 447: 799-816.
- [6] Costa F F. Non-coding RNAs: new players in eukaryotic biology [J]. *Gene*, 2005, 357: 83-94.
- [7] Yu W, Gius D, Onyango P, Muldoon-Jacobs K, Karp J, Feinberg A P, et al. Epigenetic silencing of tumour suppressor gene p15 by its antisense RNA [J]. *Nature*, 2008, 451: 202-206.
- [8] de Kok J B, Verhaegh G W, Roelofs R W, Hessels D, Kiemeny L A, Aalders T W, et al. DD3 (PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors [J]. *Cancer Res*, 2002, 62: 2695-2698.
- [9] Calin G A, Liu C G, Ferracin M, Hyslop T, Spizzo R, Sevignani C, et al. Ultraconserved regions encoding ncRNAs are altered in human leukemias and carcinomas [J]. *Cancer Cell*, 2007, 12: 215-229.
- [10] Augoff K, Mccue B, Plow E F, Sossey-Alaoui K. miR-31 and its host gene lncRNA LOC554202 are regulated by promoter hypermethylation in triple-negative breast cancer [J]. *Mol Cancer*, 2012, 11: 5.