

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.010

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.010>

长链非编码RNA WIF1-1在食管鳞状细胞癌组织中的表达及其临床意义

许海蓉¹, 黄磊², 姚国亮³, 司新敏¹

(1. 南京医科大学第一附属医院消化内科, 南京 210029; 2. 南京医科大学附属南京市儿童医院普外科, 南京 210008; 3. 苏州大学第三附属医院心胸外科, 江苏 常州 213003)

[摘要] 目的: 探究食管鳞状细胞癌组织及癌旁组织中长链非编码RNA(long noncoding RNA, lncRNA) WIF1-1的表达水平, 并评估其对患者预后的价值。方法: 使用实时荧光定量PCR检测50例食管鳞状细胞癌组织样本及其对应同源的癌旁组织样本中lncRNA WIF1-1的表达水平, 分析临床病理特征及其与患者预后的相关性。结果: 食管鳞状细胞癌组织中lncRNA WIF1-1的表达水平明显低于癌旁组织, 差异有统计学意义($P < 0.001$)。进一步分析发现: lncRNA WIF1-1的表达水平与食管鳞状细胞癌的淋巴结转移、TNM分期和临床分期之间呈负相关。对预后资料分析发现: lncRNA WIF1-1表达水平较低的食管鳞癌患者的总生存时间(overall survival, OS)以及无进展生存期(progression-free survival, PFS)均较短。单因素及多因素分析结果显示: lncRNA WIF1-1可作为食管鳞状细胞癌患者OS和PFS的独立危险因素。结论: lncRNA WIF1-1可能在食管鳞状细胞癌中发挥抑癌基因的作用, 其表达量与患者预后具有相关性, 有可能成为食管鳞状细胞癌的治疗靶点。

[关键词] WIF1-1; 长链非编码RNA; 食管鳞癌; 预后

Expression and clinical significance of long noncoding RNA WIF1-1 in esophageal squamous cell carcinoma

XU Hairong¹, HUANG Lei², YAO Guoliang³, SI Xinmin¹

(1. Department of Gastroenterology, Jiangsu Province Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210029; 2. Department of Pediatric Surgery, Nanjing Children's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210008; 3. Department of Cardiothoracic Surgery, Third Affiliated Hospital of Soochow University, Changzhou Jiangsu 213003, China)

Abstract **Objective:** To investigate the expression level of long noncoding RNA (lncRNA) WIF1-1 and its related prognostic value in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **Methods:** The expressions of lncRNA WIF1-1 in 50 ESCC tissues and the corresponding normal tissues were detected via RT-qPCR method. The association between long non-coding RNA WIF1-1 expression and clinical characteristics was evaluated via Chi-square test. **Results:** The expression of WIF1-1 in ESCC tissues decreased significantly compared with that in the corresponding normal tissues, the difference was statistically significant ($P < 0.5$). Furthermore, WIF1-1 was

收稿日期 (Date of reception): 2017-06-15

通信作者 (Corresponding author): 司新敏, Email: sixinmin@126.com

negatively related to the lymph nodes metastasis, TNM and clinical stage. Overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) were significantly shorter in ESCC patients with lower expression level of lncRNA WIF1-1. Moreover, the down-regulated WIF1-1 expression was significantly correlated with the shorter survival of ESCC patients. The results of univariate and multivariate analysis revealed the WIF1-1 expression acted as an independent prognostic factor both in OS and PFS. **Conclusion:** The lncRNA WIF1-1 can be an important and potential suppressor of ESCC, and the expression of WIF1-1 may serve as another promising therapeutic target and prognostic biomarker in future clinic.

Keywords WIF1-1; long non-coding RNA; esophageal squamous cell carcinoma; prognosis

食管癌是世界上第九大常见的恶性肿瘤^[1]。在中国, 食管癌的发病率在所有恶性肿瘤中排第五位, 病死率排第四位。在食管癌中, 最为常见的病理亚型是食管鳞状细胞癌^[2]。大多数的食管鳞状细胞癌患者在初次就诊时就已出现晚期转移, 这也导致食管鳞状细胞癌患者的5年存活率较低, 给患者家庭带来噩耗的同时也增加患者家庭的经济负担。因此, 目前迫切需要找出新的生物标志物, 用于改善食管鳞状细胞癌患者的不良预后和临床治疗。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一组长度大于200 bp的RNA, 在各种生物学过程中发挥重要的作用^[3]。先前一些相关实验室研究^[4-6]的结果表明: lncRNA对多种恶性肿瘤的增殖或者迁移起着重要的作用, 包括肝癌、肺癌、食管鳞状细胞癌等。近期一些相关研究^[7]发现: lncRNA WIF1-1存在于多种恶性肿瘤组织和细胞中。然而, 至今为止, 尚无相关研究探索lncRNA WIF1-1在食管鳞状细胞癌所扮演的角色。本次研究旨在评估lncRNA WIF1-1在食管鳞状细胞癌组织的表达水平, 以及其与食管鳞状细胞癌的临床特点和预后之间的关系。

1 对象与方法

1.1 一般资料

50份新鲜食管鳞癌肿瘤组织样本及其对应的正常组织标本选自2008至2012年在南京医科大学附属第一临床医学院接受食管癌根治术的食管鳞状细胞癌患者。所有患者术前均无放射治疗及化学药物治疗史。相关临床数据取自患者的临床病历记录。在手术的过程中采集组织样本, 并迅速冷冻于液氮中, 长期保存于液氮中。术后根据世界卫生组织的标准, 对肿瘤组织进行严格分

期^[8]。每6个月对患者进行一次随访, 直到手术治疗后5年。总生存时间(overall survival, OS)指从患者接受手术开始, 至最后一次随访或者死亡的时间。无进展生存期(progression-free survival, PFS)指从患者接受手术开始, 至疾病复发的时间。本次研究获得南京医科大学伦理委员会的批准, 所有食管鳞状细胞癌患者均签署书面知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取

收集组织样品: 离心机温度设定于4 °C预冷30 min; 将待研磨的组织样品置于液氮中研磨成小块状, 置于装有1 mL TRIzol的1.5 mL去酶EP管后, 放于冰上用匀浆机尽量匀碎; 收集细胞样品: 向长满70%细胞的六孔板中加入1 mL TRIzol, 充分混匀后室温静置5 min, 后转至1.5 mL去酶EP管; EP管中加入200 μL氯仿(1/5总体积), 上下颠倒混匀15 s, 后室温静置5 min; 4 °C, 12 000 r/min高速离心机离心15 min, 将管中上层液体小心移入新去酶的1.5 mL EP管; 向EP管中添加等体积异丙醇, 颠倒混匀, 4 °C静置10 min; 4 °C, 12 000 r/min高速离心机中离心10 min, 弃上清; 向EP管中加入75%冰乙醇(DEPC水配制)1 mL, 轻微洗涤; 4 °C, 7 500 r/min离心5 min, 弃上清; 室温下干燥沉淀至基本透明; 根据沉淀的大小, 用适量DEPC水(20~30 μL)完全溶解。保存于-80 °C冰箱。RNA纯度及浓度的测定: NanoDrop 2000分光光度计测定RNA在260及280 nm波长的吸光度比值(以1.7~2.0为最佳)。

1.2.2 cDNA 合成

使用Takara反转录试剂盒, 按15 μL反应体系, 顺序加入如下混合物: 100 mmol/L dNTPS Mixture 0.15 μL, 10× Reverse Transcription Buffer 1.50 μL, Reverse TranscriptaseTM 1.00 μL,

RNase抑制剂0.19 μL, dH2O 4.16μL, 5× RT引物 3.00 μL, 总RNA 5.00 μL, 混匀, 4 °C下2 000 r/min 离心3 min。按如下步骤进行反转录: 16 °C 30 min; 42 °C 30 min; 85 °C 5 min; 4 °C维持保存。

1.2.3 qRT-PCR 检测

使用Takara SYBR Master Mixture试剂盒, 按20 L反应体系, 参照说明书步骤进行。其中dH2O 4 μL, SYBR premix ex taq 10 μL, PCR正向引物2 μL, PCR反向引物2 μL, cDNA 2 μL, 总容积20 μL。引物序列lncRNA WIF1-1上游: 5'-GATGGAAATCGTCAGAGGCT-3', 下游: 5'-TGGCACTTAGTTGGAAATGC-3'。

1.3 统计学处理

采用SPSS 21.0软件进行数据分析。采用配对t检验对食管鳞状细胞癌组织样本及对应的正常组织间lncRNA WIF1-1的不同表达水平进行对比。采用χ²检验评估lncRNA WIF1-1水平和临床病理参数之间的关联。通过Kaplan-Meier生存曲线方法检验OS和PFS。使用对数秩检验评估统计学意义。采用单因素和多因素Cox分析评估食管鳞状细胞癌的独立危险因素。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 食管鳞状细胞癌组织中 lncRNA WIF1-1 的表达水平下调

实时荧光定量PCR技术评估50例食管鳞状细胞癌组织和对应的正常组织中lncRNA WIF1-1的表达水平。结果显示: 与癌旁组织相比, 在食管鳞

状细胞癌组织中lncRNA WIF1-1的表达水平明显下调(图1)。

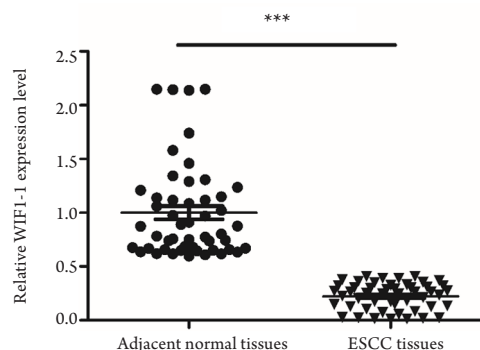


图1 RT-qPCR检测ESCC及同源正常食管组织中lncRNA WIF1-1表达水平(***P*<0.001)

Figure 1 Expression levels of lncRNA WIF1-1 was monitored in human ESCC tissues and corresponding normal tissues by RT-qPCR (***P*<0.001)

2.2 lncRNA WIF1-1 表达水平与食管鳞状细胞癌患者临床病理资料之间的关系

根据lncRNA WIF1-1相对表达倍数的中值, 将患者分为lncRNA WIF1-1高表达组及lncRNA WIF1-1低表达组。结果显示, lncRNA WIF1-1的表达水平与食管鳞状细胞癌的T分期(*P*=0.034)、临床分期(*P*=0.002)以及淋巴结转移(*P*<0.001)呈负相关。而lncRNA WIF1-1的表达水平和食管鳞状细胞癌患者的性别、年龄、吸烟史、饮酒史以及食管鳞状细胞癌的发生部位与分化等临床特征无明显相关性(表1)。

表1 WIF1-1 mRNA表达水平与ESCC患者临床病理特征之间的关系

Table 1 Correlation between lncRNA WIF1-1 expression and clinicopathological characteristics in ESCC patients

临床特征	<i>n</i>	lncRNA WIF1-1表达水平		<i>P</i>
		低表达组(<i>n</i> =21)	高表达组(<i>n</i> =29)	
年龄/岁				0.349
≤60	20	10	10	
>60	30	11	19	
性别				0.230
男	36	17	19	
女	14	4	10	

续表1

临床特征	n	lncRNA WIF1-1表达水平		P
		低表达组(n=21)	高表达组(n=29)	
吸烟史				0.661
无	22	10	12	
有	28	11	17	
饮酒史				0.704
无	27	12	15	
有	23	9	14	
肿瘤位置				0.598
食管上、中段	24	11	13	
食管下段	26	10	16	
T分期				0.034
T1~2	18	4	14	
T3~4	32	17	15	
淋巴结转移				<0.001
阴性	25	3	22	
阳性	25	18	7	
临床分期				0.002
I~II	20	3	17	
III~IV	30	18	12	
分化程度				0.632
高	23	11	12	
中	17	7	10	
低	10	3	7	

2.3 食管鳞状细胞癌组织中 lncRNA WIF1-1 的表达水平对预后判断的价值

生存分析结果显示:与lncRNA WIF1-1表达水平无上调的食管鳞状细胞癌患者相比, WIF1-1表达水平上调的食管鳞状细胞癌患者其5年OS和PFS均比较长,提示lncRNA WIF1-1的高表达与较好的

临床预后相关(图2, 3)。单因素及多因素分析的结果显示:lncRNA WIF1-1的表达水平及食管鳞状细胞癌的临床分期是患者OS的独立预后因素(表2)。除此以外, lncRNA WIF1-1的表达水平、食管鳞状细胞癌的临床分期和T分期则是患者PFS的独立预后因素(表3)。

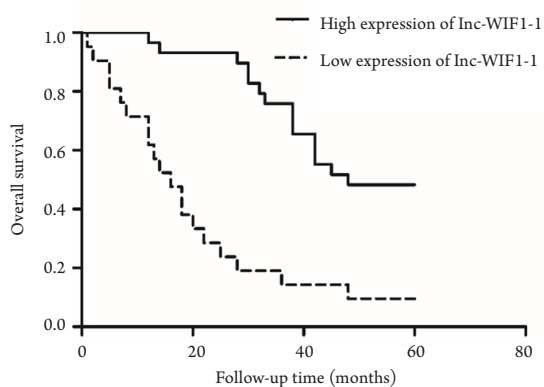


图2 食管癌根治术后ESCC患者Kaplan-Meier生存曲线

Figure 2 Kaplan-Meier survival curves of ESCC patients after esophagectomy

WIF1-1高表达组ESCC患者总生存时间明显优于低表达组(log-rank test, $P=0.004$)。

The overall survival of patients in the lncRNA WIF1-1 high-expression group was significantly better than that of patients in the low-expression group (log-rank test, $P=0.004$).

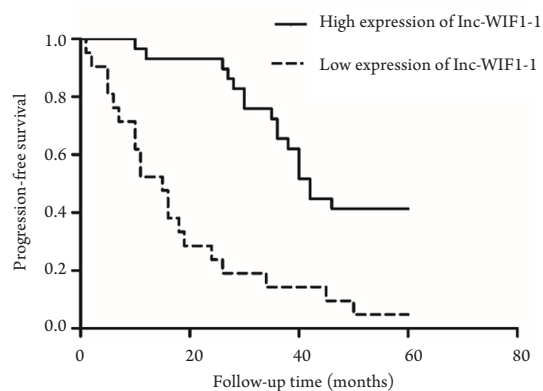


图3 食管癌根治术后ESCC患者Kaplan-Meier生存曲线

Figure 3 Kaplan-Meier survival curves of ESCC patients after esophagectomy

WIF1-1高表达组ESCC患者无进展生存时间明显优于低表达组(log-rank检验, $P<0.001$)。

The progression-free survival of patients in the lncRNA WIF1-1 high-expression group was significantly better than that of patients in the low-expression group (log-rank test, $P<0.001$).

表2 单因素及多因素分析ESCC患者临床病理特征与总生存时间之间的关系

Table 2 Univariate and multivariate analysis on the correlation between overall survival and clinicopathological features in patients with ESCC

临床特征	n	单因素分析		多因素分析	
		HR (95%CI)	P	HR (95%CI)	P
WIF1-1表达		0.292 (0.111~0.768)	0.013	0.271 (0.128~0.574)	0.001
高	29				
低	21				
年龄/岁		1.130 (0.471~2.713)	0.785		
>60	30				
≤60	20				
性别		1.370 (0.508~3.698)	0.534		
男	36				
女	14				
吸烟史		1.519 (0.487~4.740)	0.472		
有	28				
无	22				
饮酒史		1.167 (0.478~2.852)	0.734		
有	23				
无	27				

续表2

临床特征	n	单因素分析		多因素分析	
		HR (95%CI)	P	HR (95%CI)	P
肿瘤位置		1.279 (0.448~3.655)	0.646		
食管下段					
食管上段、中段					
T分期		2.340 (0.825~6.636)	0.110		
T3~4	32				
T1~2	18				
淋巴结转移		1.104 (0.437~2.790)	0.835		
阳性	25				
阴性	25				
临床分期		2.440 (0.941~6.331)	0.067	2.997 (1.299~6.911)	0.010
III~IV	30				
I~II	20				
分化水平		0.977 (0.312~3.061)	0.968		
低	10				
中、高	40				

表3 单因素及多因素分析ESCC患者临床病理特征与无进展生存时间之间的关系

Table 3 Univariate and multivariate analysis on the correlation between progression-free survival and clinicopathological features in patients with ESCC

临床特征	n	单因素分析		多因素分析	
		HR (95%CI)	P	HR (95%CI)	P
WIF1-1表达		0.321 (0.126~0.814)	0.017	0.335 (0.161~0.699)	0.004
高	29				
低	21				
年龄/岁		1.376 (0.590~3.211)	0.461		
>60	30				
≤60	20				
性别		1.235 (0.477~3.201)	0.664		
男	36				
女	14				
吸烟史		1.820 (0.597~5.551)	0.293		
有	28				
无	22				

续表3

临床特征	n	单因素分析		多因素分析	
		HR (95%CI)	P	HR (95%CI)	P
饮酒史		1.186 (0.500~2.811)	0.699		
有	23				
无	27				
肿瘤位置		1.248 (0.440~3.538)	0.677		
食管下段					
食管上段、中段					
T分期		2.778 (1.013~7.616)	0.047	2.438 (0.998~5.956)	0.05
T3~4	32				
T1~2	18				
淋巴结转移		1.332 (0.537~3.304)	0.537		
阳性	25				
阴性	25				
临床分期		2.188 (0.892~5.366)	0.087	2.382 (1.069~5.310)	0.034
III~IV	30				
I~II	20				
分化水平		0.920 (0.304~2.786)	0.883		
低	10				
中、高	40				

3 讨论

食管鳞状细胞癌是一种全世界范围内高发病率以及高病死率的恶性肿瘤,尤其在今天的中国^[9]。尽管食管鳞状细胞癌早期手术的成功率较高,但仍有许多食管鳞状细胞癌患者在不久后出现癌症转移^[10]。为提高食管鳞状细胞癌患者的存活率,我们迫切需要更清楚、深入地解食管鳞状细胞癌的发病机制。最新的研究^[11-12]结果显示: lncRNA可能在食管鳞状细胞癌的细胞生物学过程中发挥关键作用。这些细胞生物学过程主要包括迁移、增殖和分化,如相关研究^[11]表明: lncRNA SPRY4-IT1能够促进食管鳞状细胞癌的转移。除此之外, lncRNA MALAT1能够通过Ezh2靶向调控β-连环蛋白,进而促进食管鳞状细胞癌的恶变^[12]。

lncRNA WIF1-1最初由Ensembl基因组生物信息学发现。lncRNA WIF1-1位于反向链12q14.3区,

其长度为447 bps。相关研究^[13-14]表明:该区域的一系列基因簇在食管鳞状细胞癌的转移和进展中发挥重要作用,包括食管鳞状细胞WIF1(WNT抑制因子-1)。尚未探究lncRNA WIF1-1在食管鳞状细胞癌中所起的具体作用。本研究结果显示:在食管鳞状细胞癌组织中, lncRNA WIF1-1的表达水平明显下调,提示lncRNA WIF1-1可能作为抑癌因子参与调控食管鳞状细胞癌发展过程。

转移是导致食管鳞状细胞癌患者预后较差的主要原因,并且对患者造成巨大的身心及经济负担。最近有研究表明: lncRNA可能参与食管鳞状细胞癌的转移过程。例如, lncRNA SPRY4-IT1促进食管鳞状细胞癌的迁移和侵袭^[15]。敲除lncRNA CASC9明显抑制食管鳞状细胞癌的细胞迁移和侵袭^[16]。此外,体外试验^[17]中lncRNA PEG10能够明显促进食管鳞状细胞癌的转移。本研究首次探讨lncRNA WIF1-1的表达水平与食管鳞状细胞

癌患者临床预后之间的关系。结果显示: lncRNA WIF1-1的表达水平与食管鳞状细胞癌的T分期、临床分期和淋巴结转移明显呈现负相关, 这提示lncRNA WIF1-1可能对食管鳞状细胞癌的发展起抑制作用。进一步分析结果表明: lncRNA WIF1-1的表达水平与食管鳞状细胞癌患者的OS和PFS之间存在明显关联, 高表达WIF1-1对食管鳞状细胞癌患者的生存期起明显的保护作用。此外, lncRNA WIF1-1还是食管鳞状细胞癌患者OS和PFS的独立危险因素, 可参与指导后续治疗。对低长链非编码RNA WIF1-1表达组的患者进行严密的随访是提高该部分患者存活率的重要途径, 并且在必要时需对患者进行术后辅助治疗。

综上所述, lncRNA WIF1-1对于食管鳞状细胞癌的发展过程起重要作用。lncRNA WIF1-1的表达水平可能能够作为食管鳞状细胞癌发病及预后判断的新型生物标志物并成为食管鳞状细胞癌潜在的治疗靶点。因此, 需要进一步进行体内和体外试验, 探讨lncRNA WIF1-1对食管鳞状细胞癌的作用机制。

参考文献

- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(1): 5-29.
- Zeng H, Zheng R, Zhang S, et al. Esophageal cancer statistics in China, 2011: Estimates based on 177 cancer registries[J]. *Thorac Cancer*, 2016, 7(2): 232-237.
- Zuckerwise L, Li J, Lu L, et al. H19 long noncoding RNA alters trophoblast cell migration and invasion by regulating T β R3 in placenta with fetal growth restriction[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(25): 38398-38407.
- Chen FJ, Sun M, Li SQ, et al. Upregulation of the long non-coding RNA HOTAIR promotes esophageal squamous cell carcinoma metastasis and poor prognosis[J]. *Mol Carcinog*, 2013, 52(11): 908-915.
- Zhao J, Liu Y, Zhang W, et al. Long non-coding RNA linc00152 is involved in cell cycle arrest, apoptosis, epithelial to mesenchymal transition, cell migration and invasion in gastric cancer[J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(19): 3112-3123.
- Yang Y, Li H, Hou S, et al. The noncoding RNA expression profile and the effect of lncRNA ak126698 on cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer cell[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e65309.
- Derrien T, Johnson R, Bussotti G, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression[J]. *Genome Res*, 2012, 22(9): 1775-1789.
- Takeo S, Noguchi T, Takahashi Y, et al. Assessment of clinical outcome in patients with esophageal squamous cell carcinoma using TNM classification score and molecular biological classification[J]. *Ann Surg Oncol*, 2007, 14(4): 1431-1438.
- Lv XB, Lian GY, Wang HR, et al. Long noncoding RNA HOTAIR is a prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma progression and survival[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63516.
- Lin Y, Totsuka Y, He Y, et al. Epidemiology of esophageal cancer in japan and china[J]. *J Epidemiol*, 2013, 23(4): 233-242.
- Zhang CY, Li RK, Qi Y, et al. Upregulation of long noncoding RNA spry4-it1 promotes metastasis of esophageal squamous cell carcinoma via induction of epithelial-mesenchymal transition[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2016, 32(5): 391-401.
- Wang W, Zhu Y, Li S, et al. Long noncoding RNA malat1 promotes malignant development of esophageal squamous cell carcinoma by targeting beta-catenin via ezh2[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(18): 25668-25682.
- Yang SH, Li SL, Dong ZM, et al. Epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Res*, 2012, 20(2/3): 123-130.
- Guo Q, Wang HB, Li YH, et al. Correlations of promoter methylation in WIF-1, RASSF1A, and CDH13 genes with the risk and prognosis of esophageal cancer[J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 2816-2824.
- Cui F, Wu D, He X, et al. Long noncoding RNA spry4-it1 promotes esophageal squamous cell carcinoma cell proliferation, invasion, and epithelial-mesenchymal transition[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(8): 10871-10876.
- Pan Z, Mao W, Bao Y, et al. The long noncoding RNA casc9 regulates migration and invasion in esophageal cancer[J]. *Cancer Med*, 2016, 5(9): 2442-2447.
- Zang W, Wang T, Huang J, et al. Long noncoding RNA peg10 regulates proliferation and invasion of esophageal cancer cells[J]. *Cancer Gene Ther*, 2015, 22(3): 138-144.

本文引用: 许海蓉, 黄磊, 姚国亮, 司新敏. 长链非编码RNA WIF1-1在食管鳞状细胞癌组织中的表达及其临床意义[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(9): 1825-1832. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.010
Cite this article as: XU Hairong, HUANG Lei, YAO Guoliang, SI Xinmin. Expression and clinical significance of long noncoding RNA WIF1-1 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(9): 1825-1832. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.010