doi:10.11659/jjssx.05E019109

·临床研究·

肺腺癌转移相关转录因子1在口腔鳞状细胞癌组织中的表达及临床意义

张 鹏[1],赵军伟[2],安红丽[2],郑淑萍[2],代亚欣[2] (1.河北省唐山市第九医院手术室,河北 唐山 063000;2.河北省唐山市协和医院口腔科,河北 唐山 063000)

[摘 要] **目的** 分析口腔鳞状细胞癌组织中长链非编码RNA(lncRNA)肺腺癌转移相关转录因子1(MALAT1)的表达及其临床意义。**方法** 收集口腔鳞癌组织标本81例和正常口腔黏膜组织20例,分别设为口腔鳞癌组和健康对照组。采用RT-PCR方法检测2组组织中lncRNA MALAT1表达情况,统计分析lncRNA MALAT1表达与病理资料特征的关系,Kaplan-Meier分析lncRNA MALAT1表达和生存预后间的关系。**结果** 与健康对照组相比,lncRNA MALAT1在口腔鳞癌组中表达明显增高,差异有统计学意义($P<0.05$);口腔癌组织中lncRNA MALAT1的相对表达量在不同肿瘤分期、肿瘤分化程度和有无颈部淋巴结转移间比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);而在不同年龄、性别、肿瘤大小及肿瘤类型间比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);lncRNA MALAT1高表达组和低表达组患者的3年总体生存率(OS)分别为45.9%(17/37)、65.9%(29/44),Kaplan-Meier生存分析(log-rank检验)表明MALAT1高表达组患者3年OS显著低于MALAT1低表达组患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 口腔鳞癌组织中lncRNA MALAT1表达增高,其表达水平与口腔鳞癌患者的不良预后有关,在口腔鳞癌组织中检测其表达可能有助于肿瘤的诊断及作为药物治疗的靶点。

[关键词] 口腔鳞状细胞癌;肺腺癌转移相关转录因子1;长链非编码RNA;临床意义

[中图分类号] R739.85 [文献标识码] A [收稿日期] 2019-05-22

Expression and clinical significance of long non-coding RNA metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 in oral squamous cell carcinoma

ZHANG Peng[1],ZHAO Jun-wei[2],AN Hong-li[2],ZHENG Shu-ping[2],DAI Ya-xin[2] (1.Operating Room,Ninth Hospital of Tangshan, Tangshan Hebei 063000 China;2.Department of Stomatology,Tangshan Union Medical College Hospital,Tangshan Hebei 063000,China)

Abstract: Objective To analyze the expression of long non-coding RNA(lncRNA) metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1(MALAT1) in oral squamous cell carcinoma and its clinical significance. **Methods** A total of 81 cases of oral squamous cell carcinoma tissue specimens and 20 cases of normal oral mucosa tissue specimens were collected and divided into the oral squamous cell carcinoma group and the healthy control group. The expression of lncRNA MALAT1 in tissues of the two groups was detected by RT-PCR,and the relationship between the expression of lncRNA MALAT1 and pathological data were analyzed. Kaplan-Meier was used to analyze the relationship between the expression of lncRNA MALAT1 and survival prognosis. **Results** Compared with the healthy control group, the expression of lncRNA MALAT1 in oral squamous cell carcinoma group was significantly increased($P<0.05$). There were significant difference in the relative expression of lncRNA MALAT1 at different stages of oral cancer, degree of differentiation and cervical lymph node metastasis ($P<0.05$),but there was no significant differences in age,sex,size and type of tumor($P>0.05$). The 3-year overall survival rate(OS) of the high and low expression groups of lncRNA MALAT1 was 45.9% (17/37) and 65.9% (29/44),respectively. Kaplan-Meier survival analysis (log-rank test) showed that OS in high MALAT1 expression group was significantly lower than that in low MALAT1 expression group in 3 years ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of lncRNA MALAT1 is increased in oral squamous cell carcinoma. The expression level of lncRNA MALAT1 is related to the poor prognosis of oral squamous cell carcinoma patients. Detection of the expression of lncRNA MALAT1 in oral squamous cell carcinoma tissues may be helpful for the diagnosis of tumors,and it may be a target for drug therapy.

Keywords: oral squamous cell carcinoma;metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1;long non-coding RNA;clinical significance

口腔癌是常见的头颈部恶性肿瘤,其发病率和死亡率因地域而异,我国口腔癌发病率0.36/万~0.8/万,在全身恶性肿瘤中排第10位[1]。90%以上的口腔癌为鳞状细胞癌,恶性程度高,发生颈部淋巴结转移者预后较差。近年来随着手术、放化疗、分子靶向治疗及联合治疗的发展,口腔癌患者的生存率逐步提高,但患者长期生存率仍然较低,中低分化和Ⅲ、Ⅳ期患者2年累积生存率仅60%左右,5年生存率低于50%[2-3]。近年来人们寻找新的口腔鳞癌诊断和治疗标志物,发现长链非编码RNA(long non-codingribonu-

[基金项目] 河北重点科技研究计划项目(20191626)

cleic acid,lncRNA)参与肿瘤的发生发展过程,但其具体调控机制尚不清楚。肺腺癌转移相关转录因子1(metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1,MALAT1)是lncRNA家族成员,编码基因位于11q13,长约6 700 bp。研究表明在肺癌、肝癌、卵巢癌等多种肿瘤中存在MALAT1表达失调(上调或下调)的现象,通过影响多种相关基因表达,参与肿瘤细胞的增殖、代谢、侵袭和转移等过程,与肿瘤患者的临床病理学特征有关,可以作为肿瘤不良预后的标志物[4-6]。既往研究报道,MALAT1在口腔鳞癌中表达异常,可能参与口腔鳞癌的发生发展,但其调节口腔鳞癌进展的潜在机制尚未明确[7-8]。本研究旨在通过研究口腔鳞癌组织中MALAT1的表达情况,探讨其与临床病理特征和口腔癌患者预后之间的关系。

1 材料与方法

1.1 临床资料

选择2013年2月至2015年2月于河北省唐山市协和医院诊治的行外科手术切除并且经术后病理证实的口腔鳞癌患者81例为口腔鳞癌组。其中男54例,女27例;年龄38~77岁,中位年龄55岁;舌鳞癌33例,牙龈鳞癌27例,口底鳞癌13例,颊鳞癌8例;根据2002年AJCC口腔癌分期标准,Ⅰ~Ⅱ期患者46例,Ⅲ~Ⅳ期35例[9]。同期选取口腔外伤患者修整创缘的唇颊部正常口腔黏膜组织20例为健康对照组,其中男11例,女9例;年龄35~75岁,中位年龄53岁。2组人群性别、年龄等临床资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究经院医学伦理委员会审查批准。所有受试者及家属知情并签署同意书。

纳入标准:①无放化疗或生物治疗病史;②无全身免疫系统疾病。排除标准:①合并严重心肺功能障碍,不能耐受手术;②合并急性感染性疾病,如急性肝炎、泌尿系统感染,感染尚未控制。

1.2 方法

所有组织标本均为刚离体组织标本,迅速置于冻存管后-80 ℃液氮罐保存,转运至实验室后置于-80 ℃冰箱保存。所有患者术后随访2~36个月,中位随访时间31.3个月,以门诊或电话方式随访,随访终止时间为2018年2月,无失联病例。采用Real-time PCR(RT-PCR)法检测组织中MALAT1的表达在Genebank中获取MALAT1的基因序列,引物设计采用Oligo7软件。内参GAPDH的上游引物序列:5′-GCTTCAGCAAAGACAACGAG-3′,下游引物序列:5′-GTGTAATGCAGGACCACAGC-3′。MALAT1上游引物序列:5′-CTTAAGCGCAGCGCCATTTT-3′,下游引物序列:5′-CCTCCAAACCCCAAGACCAA-3′。癌组织和正常口腔黏膜组织中总RNA的提取采用Trizol法,试剂盒购于Invitrogen公司,具体步骤按照反转录试剂盒说明书进行,得到的反应产物cDNA置于-20 ℃冰箱保存。PCR反应条件为95 ℃ 5 min,95 ℃ 10 s,60 ℃ 45 s,共反应40个循环。所有反应在ABI 7500 PCR仪上完成,每个样本重复3次。采用相对Ct值方法进行数据分析,目的基因MALAT1的表达水平相对内参基因GAPDH的比值为$2^{-\Delta\Delta Ct}$,用于计算MALAT1的相对定量表达水平,以癌组织MALAT1相对表达量的中位数9.230为标准分为高MALAT1表达组和低MALAT1表达组。

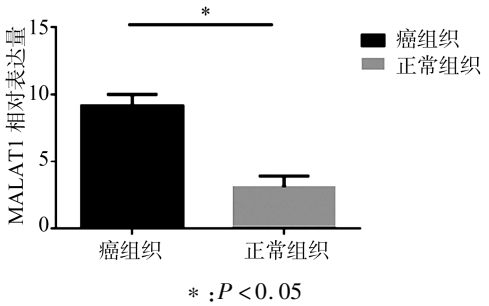
1.3 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计学分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,2组间比较采用t检验或近似t检验,多组间比较采用单因素方差分析,计数资料以百分比(%)表示,Kaplan-Meier分析不同MALAT1表达对预后生存的影响。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 口腔鳞癌组与健康对照组MALAT1表达比较

口腔鳞癌组织中MALAT1的相对表达量为(9.127±0.854),正常口腔黏膜组织相对表达量为(3.127±0.803)。口腔鳞癌组织中MALAT1的相对表达量显著高于正常口腔黏膜组织,差异有统计学意义($t=2.471$,$P=0.011$),见图1。



*:$P<0.05$

图1 2组MALAT1相对表达量比较

2.2 口腔癌组织MALAT1表达水平与患者临床病理特征之间的关系

口腔癌组织中MALAT1的相对表达量在不同肿瘤分期、肿瘤分化程度和有无颈部淋巴结转移之间比较,差异有统计学意义($P<0.05$);在不同年龄、性别、肿瘤大小及肿瘤类型之间比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表1。

表 1 口腔癌组织 MALAT1 表达水平与临床病理特征间的关系

项目	n	MALAT1 相对表达量	t/F	P
年龄			0.649	0.482
≤50 岁	27	8.921 ± 1.021		
>50 岁	54	9.227 ± 0.963		
性别			0.730	0.421
男	54	9.127 ± 0.852		
女	27	9.013 ± 0.907		
肿瘤类型			1.193	0.292
舌鳞癌	33	8.924 ± 0.966		
牙龈鳞癌	27	9.004 ± 1.058		
颊鳞癌	8	8.957 ± 1.782		
口底鳞癌	13	9.228 ± 0.824		
肿瘤大小			0.694	0.527
T1 ~ T2	48	9.238 ± 0.816		
T3 ~ T4	33	9.057 ± 0.975		
肿瘤分期			2.817	0.010
Ⅰ ~ Ⅱ	46	8.632 ± 1.251		
Ⅲ ~ Ⅳ	35	9.350 ± 0.983		
肿瘤分化			2.670	0.012
高分化	27	8.527 ± 1.289		
中分化	38	9.440 ± 1.247		
低分化	16	9.852 ± 0.882		
颈部淋巴结转移			2.798	0.011
无	59	8.932 ± 0.825		
有	22	10.120 ± 0.854		

2.3 MALAT1 表达水平对患者生存预后的影响

81 例口腔鳞癌患者的癌组织中，MALAT1 高表达组 37 例，低表达组 44 例。MALAT1 高表达组患者 3 年总体生存率(OS)为 45.9%(17/37)，低表达组患者为 65.9%(29/44)。进一步行 Kaplan-Meier 生存分析(log-rank 检验)发现，MALAT1 高表达组患者 3 年 OS 显著低于低表达组患者，差异有统计学意义(χ^2 = 4.850，P = 0.028)，见图 2。

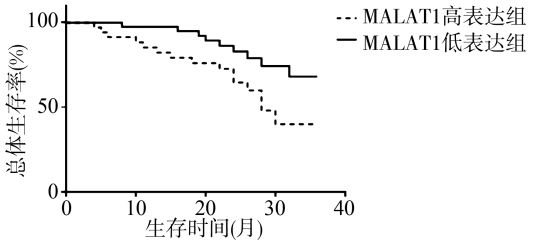


图 2 不同 MALAT1 表达水平对患者生存预后的影响

3 讨论

口腔鳞状细胞癌是头颈部常见的恶性肿瘤。20 世纪 50 年代至 90 年代，口腔鳞癌的诊断和治疗技术得到较大发展，患者生存率逐渐提高；但 20 世纪 90 年代至今，口腔鳞癌患者的生存率没有发生明显变化[10]。寻找早期诊断治疗的标志物是提高患者长期生存率的关键。非编码 RNA(ncRNA)是新兴的多种生物功能的调节分子，在肿瘤发生和进展中发挥重要作用[11]。ncRNA 基于其转录物大小分为两类：小 ncRNA(<200 bp)和长 ncRNA(≥200 bp，lncRNA)，目前人们已经发现 8 000 多个 lncRNAs。lncRNA 是一组长度大于 200 bp 并且无蛋白编码功能的一类 RNA。lncRNA 在数量上远多于编码 RNA，功能较为广泛。近年来很多国内外学者开始关注 lncRNA 与疾病的关系，特别是与肿瘤的关系。以往认为正常细胞和肿瘤细胞间 lncRNA 表达的差异仅是癌症转化后的表现，但有研究表明多种 lncRNA 如 HOTAIR、NEAT-1 等能直接调节基因转录，也可作为内源竞争性 RNA 影响小 RNA 基因表达的调节作用，与癌症进展和转移等过程密切相关[12]。

MALAT1 为 lncRNA 家族成员之一，最早发现于肺癌的研究中，被认为是非小细胞肺癌侵袭转移的相关标志物之一[13]。MALAT1 具有高保守性，在哺乳动物进化过程中扮演重要角色，表达于人体内多种组织，可通过控制关键细胞周期调节基因的转录和基因前处理来调节细胞增殖，在细胞有丝分裂进程中发挥关键作用[14]。近年来的研究显示，MALAT1 与结直肠癌、胃癌等恶性肿瘤均显著相关[15-16]。在结直肠癌的研究中，Yang 等[15]发现 MALAT1 通过 PRKA 激酶锚定蛋白 9 增加肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力，促进肿瘤的发展，表明其在该疾病中的致癌作用。Zhu 等[16]发现 LncRNA MALAT1 在胃癌组织中过度表达，并通过激活 PI3K/Akt 途径促进胃癌的发展。本研究发现，口腔鳞癌组织中 LncRNA MALAT1 的表达明显高于正常口腔黏膜组织的表达，与国内报道一致[9]。其机制可能与 LncRNA MALAT1 通过调控 Wnt/β-catenin 通路的基因表达，影响肿瘤的增殖、侵袭和凋亡过程有关。国内有研究通过降低口腔鳞癌细胞 MALAT1 的表达水平，出现细胞周期阻滞的现象：G1 期细胞明显增多，S 期细胞明显减少，因而 MALAT1 能够调节口腔鳞癌细胞增殖[17]。国外研究表明 SKL2001 激活 Wnt/β-catenin 信号通路，可以通过下调 MALAT1 表达实现对肿瘤细胞侵袭和迁移的抑制作用[6]。肿瘤的恶性进展是多因素、多步骤且导致多个信号转导通路异常的过程。在这个过程中，细胞周期改变，肿瘤细胞过度增殖；凋亡与抗凋亡平衡失调，细胞凋亡减少；细胞表面黏附分子表达减少及发生上皮间质转化，引起肿瘤细胞浸润和转移能力加强。本研究结果显示，口腔鳞癌组织中 MALAT1 的表达与肿瘤分期、肿瘤分化程度和颈部淋巴结转移有关，高分期、中低分化及伴颈部淋巴结转移的患者癌组织中 MALAT1 的表达均明显高于低分期、高分化及无颈部淋巴结转移的患者，与国内学者报道一致[18]。其原因可能是高分期、高级别肿瘤

能高表达 MALAT1,进而诱导肿瘤细胞发生上皮间质转化,促进肿瘤细胞的增殖和转移,因而 MALAT1 亦可通过影响肿瘤浸润和转移过程影响肿瘤的恶性程度[19]。有学者在膀胱癌研究中亦发现, MALAT1 高表达与高组织学分级,高肿瘤分期和淋巴结转移相关,且除肿瘤分期外, MALAT1 高表达是影响膀胱癌患者总体生存时间的独立预后不良指标[20]。

近年来,在肺癌、结直肠癌等多种肿瘤中均发现肿瘤组织中高表达 MALAT1 与患者不良预后密切相关,高表达 MALAT1 组患者的 5 年总体生存时间明显短于低表达组患者[21]。本研究对 81 例口腔鳞癌患者的 3 年随访过程中发现, MALAT1 高表达组患者的3 年 OS 为 45.9%,显著低于低表达组患者的 65.9%。其机制可能是 MALAT1 高表达能够通过激活 PI3K-AKT、Ezh2-Notch1 通路促进肿瘤细胞发生上皮间质转化,转化后的肿瘤细胞易出现局部浸润和远处转移,患者术后复发和转移的风险增加,因此总体生存期明显短于 MALAT1 低表达组[22]。

综上所述,口腔鳞癌组织中 lncRNA MALAT1 表达上调,并且与口腔鳞癌患者不良预后有关,分析其表达水平有助于肿瘤的诊断、治疗和随访。对于 lncRNA MALAT1 调控肿瘤细胞生物学行为的具体分子机制,还需进行多中心、大样本深入研究。

[参考文献]

[1] 陶 冶,朱 霖. 口腔癌的危险因素研究[J]. 安徽卫生职业技术学院学报,2017,16(4):48 - 49. doi:10.3969/j.issn.1671 - 8054.2017.04.026.

[2] 黄江峰,王靖雯,何保昌,等. 口腔鳞状细胞癌患者生存影响因素研究[J]. 中华预防医学杂志,2016,50(10):880 - 886. doi:10.3760/cma.j.issn.0253 - 9624.2016.10.009.

[3] Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer[J]. Nat Rev Cancer,2011,11(1):9 - 22. doi:10.1038/nrc2982.

[4] Gutschner T, Hämmerle M, Diederichs S. MALAT1-a paradigm for long noncoding RNA function in cancer[J]. J Mol Med (Berl),2013,91(7):791 - 801. doi: 10.1007/s00109 - 013 - 1028 - y.

[5] Sun X, Malhotra A. Noncoding RNAs (ncRNA) in Hepato Cancer: A Review[J]. J Environ Pathol Toxicol Oncol,2018,37(1):15 - 25. doi:10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2018025223.

[6] Guo C, Wang X, Chen LP, et al. Long non-coding RNA MALAT1 regulates ovarian cancer cell proliferation, migration and apoptosis through Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2018,22(12):3703 - 3712. doi: 10.26355/eurrev_201806_15249.

[7] Chang SM, Hu WW. Long non-coding RNA MALAT1 promotes oral squamous cell carcinoma development via microRNA-125b/STAT3 axis[J]. J Cell Physiol,2018,233(4):3384 - 3396. doi: 10.1002/jcp.26185.

[8] 刘 速,周 旋,王晓非,等. 长链非编码 RNA MALAT1 影响口腔鳞状细胞癌侵袭的实验研究[J]. 中国肿瘤临床,2015,42(9):460 - 465. doi:10.3969/j.issn.1000 - 8179.20150313.

[9] 尚 伟,王 琪. 2002 年唇及口腔癌分期方案[J]. 国外医学(耳鼻咽喉科学分册),2004,28(1):60 - 62. doi:10.3760/cma.j.issn.1673 - 4106.2004.01.024.

[10] 陈 新,徐文华,周 健,等. 口腔鳞状细胞癌现状[J]. 口腔医学,2017,37(5):462 - 465. doi:10.13591/j.cnki.kqyx.2017.05.018.

[11] Huarte M, Rinn JL. Large non-coding RNAs: missing links in cancer?[J]. Hum Mol Genet,2010,19(R2):R152 - 161. doi: 10.1093/hmg/ddq353.

[12] Shi XS, Li J, Yang RH, et al. Correlation of increased MALAT1 expression with pathological features and prognosis in cancer patients: a meta-analysis[J]. Genet Mol Res,2015,14(4):18808 - 18819. doi:10.4238/2015.December.28.30.

[13] 宋铁峰,袁 颖,王会琴,等. 长链非编码 RNA MALAT1 的研究进展[J]. 生物技术通报,2016,32(1):20 - 28. doi:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2016.01.005.

[14] Tripathi V, Shen Z, Chakraborty A, et al. Long noncoding RNA MALAT1 controls cell cycle progression by regulating the expression of oncogenic transcription factor B-MYB[J]. PLoS Genet,2013,9(3):e1003368. doi: 10.1371/journal.pgen.1003368.

[15] Yang MH, Hu ZY, Xu C, et al. MALAT1 promotes colorectal cancer cell proliferation/migration/invasion via PRKA kinase anchor protein 9[J]. Biochim Biophys Acta,2015,1852(1):166 - 174. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.11.013.

[16] Zhu K, Ren Q, Zhao Y. lncRNA MALAT1 overexpression promotes proliferation, migration and invasion of gastric cancer by activating the PI3K/AKT pathway[J]. Oncol Lett,2019,17(6):5335 - 5342. doi:10.3892/ol.2019.10253.

[17] 王佳鑫,段远胜,岳 恺,等. MALAT1 通过 VHL/β-catenin 通路影响口腔鳞状细胞癌生长侵袭的实验研究[J]. 中国肿瘤临床,2017,44(9):418 - 423. doi:10.3969/j.issn.1000 - 8179.2017.09.246.

[18] 王 军,赵思语,欧阳少波,等. 长链非编码 RNA MALAT1 在口腔鳞状细胞癌患者血浆中的表达及意义[J]. 实用口腔医学杂志,2018,34(2):188 - 192. doi:10.3969/j.issn.1001 - 3733.2018.02.009.

[19] Liang J, Liang L, Ouyang K, et al. MALAT1 induces tongue cancer cells′ EMT and inhibits apoptosis through Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. J Oral Pathol Med,2017,46(2):98 - 105. doi: 10.1111/jop.12466.

[20] Li C, Cui Y, Liu LF, et al. High expression of long noncoding RNA MALAT1 indicates a poor prognosis and promotes clinical progression and metastasis in bladder cancer[J]. Clin Genitourin Cancer,2017,15(5):570 - 576. doi: 10.1016/j.clgc.2017.05.001.

[21] Kang K, Huang YH, Li HP, et al. Expression of UCA1 and MALAT1 long-chain non-coding RNAs in esophageal squamous cell carcinoma tissues is predictive of patient prognosis[J]. Arch Med Sci,2018,14(4):752 - 759. doi: 10.5114/aoms.2018.73713.

[22] West JA, Davis CP, Sunwoo H, et al. The long noncoding RNAs NEAT1 and MALAT1 bind active chromatin sites[J]. Mol Cell,2014,55(5):791 - 802. doi: 10.1016/j.molcel.2014.07.012.

(编辑:陈庆利)