

Linc00152 在脑胶质瘤中的表达及其与患者临床预后的关系

徐凡^{1,2}, 杜荣¹, 吴长武¹, 秦超影¹, 汪浚泉¹, 肖凯¹, 刘庆¹

1. 中南大学湘雅医院神经外科, 湖南 长沙 410008
2. 湘潭市中心医院神经外科, 湖南 湘潭 411100

摘要: **目的** 研究 Linc00152 在脑胶质瘤中的表达及其与患者临床预后的关系。 **方法** 分别检测 linc00152 在胶质瘤细胞系与肿瘤组织中的表达, 分析其与临床病理特征及预后的关系, 初步探讨 linc00152 在脑胶质瘤中的功能。 **结果** 与癌旁脑组织 ($n = 73$) 相比, 在胶质瘤组织 ($n = 73$) 中 Linc00152 的表达显著上调 ($P < 0.001$); Linc00152 高表达与肿瘤的高级别临床分级显著相关 ($P < 0.05$); Kaplan-Meier 分析显示 Linc00152 低表达患者总生存期显著高于高表达者 ($P < 0.001$); Cox 回归分析显示, Linc00152 表达与临床病理分级是胶质瘤患者预后的独立危险因素 ($P < 0.05$)。 **结论** Linc00152 在脑胶质瘤组织和细胞系中表达显著上调, Linc00152 的高表达提示脑胶质瘤患者预后较差, 是候选脑胶质瘤预后检测分子标志物及治疗的潜在分子靶点。

关键词: 脑胶质瘤; Linc00152; 预后

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2018.03.007

Expression of Linc00152 in glioma and its association with prognosis

XU Fan^{1,2}, DU Rong¹, WU Changwu¹, QIN Chaoying¹, WANG Junquan, XIAO Kai¹, LIU Qing¹. 1 Department of Neurosurgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan, China; 2 Department of Neurosurgery, Xiangtan Central Hospital, Xiangtan 411100, Hunan, China

Corresponding author: LIU Qing, E-mail: liuqingdr@csu.edu.cn

Abstract: Objective To investigate the expression of Linc00152 in glioma and its association with prognosis. **Methods** The expression of Linc00152 in glioma cell line and glioma tissue was measured, and its association with clinicopathological features and prognosis was analyzed to investigate the function of Linc00152 in glioma. **Results** Compared with the adjacent brain tissue (73 samples), the glioma tissue (73 samples) had significantly up-regulated expression of Linc00152 ($P < 0.001$). High expression of Linc00152 was significantly associated with advanced clinical classification of glioma ($P < 0.05$). The Kaplan-Meier analysis showed that patients with low expression of Linc00152 had significantly longer overall survival than those with high expression of Linc00152 ($P < 0.001$). The Cox regression analysis showed that expression of Linc00152 and clinicopathological grade were independent risk factors for the prognosis of glioma patients ($P < 0.05$). **Conclusions** The expression of Linc00152 is significantly up-regulated in glioma tissue and cell lines, and high expression of Linc00152 suggests poor prognosis of glioma patients. Therefore, Linc00152 can be used as a candidate molecular maker for the prognosis of glioma and a potential molecular target for treatment.

Key words: Glioma; Linc00152; Prognosis

人脑胶质瘤是神经系统中最常见的原发性肿瘤, 具有侵袭性, 约占原发性恶性脑肿瘤的 80%^[1]。尽管相关治疗手段(包括手术, 放疗和化

疗等)发展迅速, 但并未大幅度改善脑胶质瘤患者的预后, 其中位生存期仅为诊断后约 15 个月^[2]。因此, 探讨脑胶质瘤侵袭的分子机制, 为发现潜在

收稿日期: 2018-03-18; 修回日期: 2018-05-15

作者简介: 徐凡(1978-), 男, 硕士研究生, 副主任医师, 现单位湘潭市中心医院, 目前为中南大学湘雅医院神经外科在职研究生。主要研究方向: 中枢神经系统肿瘤的诊断和治疗。

通信作者: 刘庆, 主任医师, 博士研究生导师。科副主任兼颅底神经外科主任、湖南省颅底外科与神经肿瘤研究中心副主任、中南大学神经外科研究所副所长, 研究方向: 颅底脑干肿瘤显微手术和神经肿瘤发病机制与靶向治疗研究。E-mail: liuqingdr@csu.edu.cn。

的治疗靶点提供重要的理论依据,对改善患者预后具有重要意义。

长链非编码 RNA (Long intergenic non-coding RNA, lncRNA) 是长度超过 200 个核苷酸的内源性小 RNA,其不具有蛋白质编码能力^[3]。目前研究显示,lncRNAs 与肿瘤发生、发展、转移密切相关^[4]。

最近研究发现 lncRNAs 参与脑胶质瘤的发生和发展^[5]。Linc00152 为 lncRNAs 中的成员之一,在多种肿瘤组织中表达上调并可作为诊断和预后的潜在分子标志物;细胞水平研究显示,linc00152 可促进细胞增殖、运动,抑制细胞凋亡^[6]。新近研究表明,Linc00152 在胶质瘤组织和胶质瘤干细胞 (glioma stem cells, GSCs) 中表达上调^[7]。本研究分别检测 linc00152 在胶质瘤细胞系与肿瘤组织中的表达,分析其与临床病理特征及预后的关系,以探索 linc00152 在脑胶质瘤中的功能,并探讨其作为脑胶质瘤治疗靶点的可行性。

1 材料和方法

1.1 细胞系和培养

人类神经胶质瘤细胞系 (SF126, SHG-44, SF767, A172, U87 和 U251) 和正常人星形胶质细胞 (NHA) 购自于美国模式培养物集存库 (Manassas, VA, USA)。用含 10% 胎牛血清和抗生素 (100u/ml 青霉素和 100mg/ml 链霉素) DMEM 培养基在 37℃、5% CO₂ 的孵箱中培养。在使用之前,所有细胞系均通过短串联重复 DNA (STR) 分析进行鉴定,且排除支原体感染。

1.2 人体组织样本

收集 2013 年 3 月至 2017 年 10 月在中南大学湘雅医院神经外科接受外科手术切除并经术后病理组织学检查确诊为脑胶质瘤的 73 个脑胶质瘤组织和 73 个癌旁脑组织样本,将新鲜组织浸入 RNA-later (Ambion 公司) 中,立即置于液氮冷冻,并于 -80℃ 保存。性别、年龄、随访和预后等临床数据从医疗记录中获得。本研究获得了所有患者的书面知情同意书及医院伦理委员会的批准。

1.3 RNA 提取和 qRT-PCR

取适量细胞或冻存组织,利用 Trizol 试剂 (Invitrogen, CA, USA) 提取总 RNA。取 1 μg 总 RNA,利用逆转录试剂盒 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) 合成 cDNA, -80℃ 保存备用。按照 SYBR Premix Dimer Eraser (Takara, Dalian, China) 说明书配制荧光实时定量 PCR 反应体系,利用 CFX96 荧光实时定

量 PCR 检测系统 (Bio-Rad, CA, USA) 检测靶基因的相对表达水平。通过测量 Ct 值并使用相对于 GAPDH 的 2^{-ΔΔCt} 方法进行归一化来量化每个基因的表达。引物序列如下: Linc00152: F: 5'-AAAAT-CACGACTCAGCCCC-3'; R: 5'-AATGGGAAAC-CGACCAGACC-3'; GAPDH: F: 5'-GGGAGC-CAAAAGGTCAT-3'; R: 5'-GTCCTTCCACGATAC-CAA-3'。

1.4 统计分析

所有实验进行三次,数据用 SPSS 17.0 及 GraphPad Prism 5 分析。组间分析采用配对 t 检验; Linc00152 表达水平与各病理参数关系分析采用 χ^2 检验分析; Linc00152 表达与脑胶质瘤总生存期之间的关系采用 Kaplan-Meier 法分析;各个协变量的联合效应采用 Cox 比例风险回归模型分析。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Linc00152 在脑胶质瘤组织及细胞系中的表达情况

我们分别分析了 73 例脑胶质瘤组织和 73 例癌旁脑组织中 Linc00152 的表达情况。如图 1 所示,与癌旁脑组织 ($n = 73$) 相比,在胶质瘤组织 ($n = 73$) 中 Linc00152 的表达显著上调 ($P < 0.001$, 图 1a)。根据世界卫生组织 (WHO) 的分类,将胶质瘤样本分为 4 级,其中 I 级 (4 例), II 级 (21 例), III 级 (25 例) 和 IV 级 (23 例)。与癌旁组相比,肿瘤组中的 Linc00152 均显著上调;高级别肿瘤 (WHO III 级和 IV 级) 中的 Linc00152 表达显著高于低级别肿瘤 (WHO 级别 I 和 II) ($P < 0.001$, 图 1b)。

我们对六种神经胶质瘤细胞系 (SF126, SHG-44, SF767, A172, U87 和 U251) 和正常人星形胶质细胞 (NHA) Linc00152 的表达进行分析。与 NHA 相比,脑胶质瘤细胞系中 Linc00152 的表达显著升高 ($P < 0.001$, 图 1c)。

2.2 Linc00152 表达与胶质瘤患者临床病理参数相关性分析

根据 Linc00152 的表达情况,73 例神经胶质瘤患者被分为两组:高 Linc00152 表达组 ($n = 44$) 和低 Linc00152 表达组 ($n = 29$)。如表 1 中所示,高水平的 Linc00152 表达与临床分级显著相关 ($P = 0.011$)。Linc00152 表达与年龄、性别、肿瘤大小之间均无统计学相关性。

2.3 Linc00152 表达与胶质瘤患者生存时间的关系

我们使用 Kaplan-Meier 分析来评估 Linc00152 表达对患者总体存活 (OS) 的影响。结果显示, Linc00152 低表达患者的总生存期显著高于高表达者, 差异具有统计学意义 ($p < 0.001$, 图 1d)。使用 COX 风险比例回归模型分析 73 例患者的生存率和病理特征 (表 2)。单因素分析显示胶质瘤临床分级 ($RR = 0.383$; $95\% CI: 1.089 - 5.216$) 和 Linc00152 表达 ($RR = 6.131$; $95\% CI: 2.634 - 14.272$) 与脑胶质瘤患者预后相关; 多因素分析显示胶质瘤临床分级 ($RR = 3.030$; $95\% CI: 1.185 - 5.551$) 和 Linc00152 表达 ($HR = 3.043$; $95\% CI: 1.231 - 7.522$) 是脑胶质瘤患者预后的独立危险因素 (见表 2)。

表 1 Linc00152 在原发性脑胶质瘤中的表达与临床病理参数的相关性分析

参数	例数	Linc00152		χ^2	P
		低	高		
年龄 (岁)		29	44		
<45	42	15 (35.7)	27 (64.3)	0.665	0.415
≥45	31	14 (45.2)	17 (54.8)		
性别					
女性	36	13 (36.1)	23 (63.8)	0.038	0.845
男性	37	16 (43.2)	21 (56.8)		
肿瘤直径 (cm)					
<5	39	16 (41.0)	23 (59.0)	0.059	0.808
≥5	34	13 (38.2)	21 (61.8)		
组织病理学					
I~II 级	25	15 (60.0)	10 (40.0)	6.527	0.011
III~IV 级	48	14 (29.2)	34 (70.8)		

表 2 单因素和多因素 Cox 回归分析总体生存 (Cox 比例风险回归模型)

变量	单因素分析			多因素分析		
	RR	95% CI	P	RR	95% CI	P
年龄 (≤45 vs. >45)	1.034	0.544 - 1.965	0.920	--	--	--
性别 (男 vs. 女)	1.031	0.543 - 1.955	0.927	--	--	--
组织病理学 (I-II 级 vs. III-IV 级)	0.383	1.089 - 5.216	0.030	3.030	1.185 - 5.551	0.044
Linc00152 (低 vs. 高)	6.131	2.634 - 14.272	0.000	3.043	1.231 - 7.522	0.016

$P < 0.1$. 缩写: RR: 相对风险, CI: 可信区间。

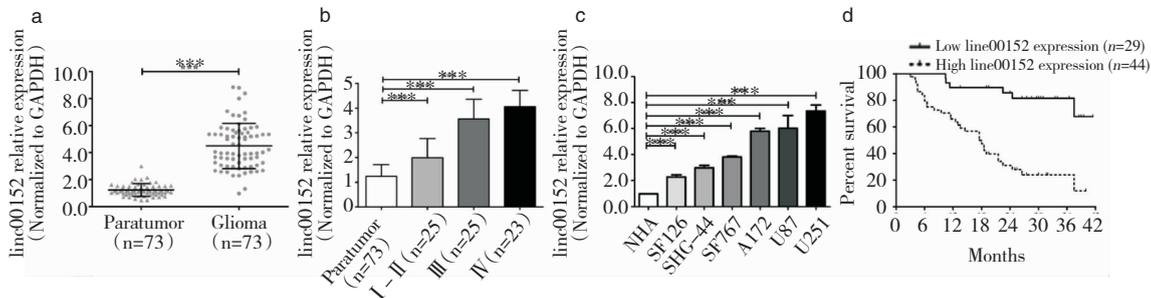


图 1 Linc00152 在胶质瘤组织和细胞系中表达上调, 并且与胶质瘤患者的不良预后相关。a. Linc00152 在胶质瘤组织 ($n = 73$) 和瘤旁脑组织 ($n = 73$) 中的相对表达。通过 qRT-PCR 测定 Linc00152 的表达, 并归一化为 GAPDH 表达 ($P < 0.001$)。b. 通过 qRT-PCR 在不同病理分级的胶质瘤组织中测定 Linc00152 的表达水平。c. 通过 qRT-PCR 在正常人星形胶质细胞 (NHA) 和不同脑胶质瘤细胞系中测量 Linc00152 表达水平。d. 胶质瘤患者的总体生存相对于 Linc00152 表达水平的 Kaplan-Meier 曲线。低水平 Linc00152 表达患者的存活时间显著长于高水平 Linc00152 表达患者的存活时间。

3 讨论

在过去的几十年中, 随着测序技术和生物信息学的研究进展, 越来越多的非编码 RNA 被发现并鉴定, 目前已经鉴定的 lncRNAs 有上百个。最近的研究表明, lncRNA 异常表达与多种类型肿瘤的发

生、发展紧密相关^[8-12]。

Linc00152 编码 828 个核苷酸, 定位于 2p11.2, 属基因间 lncRNA, 位于 PAFAH1B1P1 和 LOC107985796 两基因之间。报道显示, Linc00152 参与多种肿瘤发生发展过程。Ji J 等^[13] 发现, linc00152 通过调

控 mTOR 信号通路靶向 EpCAM 进而促进肝癌细胞增殖。Linc00152 的过表达与肺癌患者不良预后显著相关,分子机制研究表明,linc00152 可与 EZH2 相互作用,抑制 IL24 表达,进而促进肺腺癌细胞增殖^[14-15]。Linc00152 在 Hela 细胞中显著高表达,参与调控细胞周期 M 的进程,促进细胞有丝分裂^[16]。Linc00152 还通过结合 EZH2,抑制 p15 和 p21 表达,参与调控胃癌细胞的细胞周期进程^[17]。另外,Linc00152 可作为内源竞争性 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 增强结直肠癌细胞对奥沙利铂的耐药性^[18]。

在本研究中,我们分析了脑胶质瘤组织与细胞系中的 Linc00152 表达情况,发现 Linc00152 在胶质瘤组织和胶质瘤细胞系中的表达显著上调。进一步分析发现 Linc00152 高表达与肿瘤的高级别临床分级显著相关;Linc00152 低表达患者总生存期显著高于高表达者;Linc00152 表达是胶质瘤患者预后的独立危险因素。

综上所述,Linc00152 在脑胶质瘤组织与肿瘤细胞系中表达上调,且与患者肿瘤进展程度和预后显著相关,表明其可能参与脑胶质瘤的发生发展过程。Linc00152 的表达可作为胶质瘤患者的独立预后因素,可进一步研究其作为脑胶质瘤治疗的分子靶点的潜在价值。

参 考 文 献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018,68(1):7-30.
- [2] Omuro A, DeAngelis LM. Glioblastoma and other malignant gliomas: A clinical review [J]. *JAMA*, 2013,310(17):1842-1850.
- [3] Huarte M. The emerging role of lncRNAs in cancer [J]. *Nat Med*, 2015,21(11):1253-1261.
- [4] Gomes CC, de Sousa SF, Calin GA, et al. The emerging role of long noncoding RNAs in oral cancer [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2017,123(2):235-241.
- [5] Fan C, Tang Y, Wang J, et al. Role of long non-coding RNAs in glucose metabolism in cancer [J]. *Mol. Cancer*, 2017,16(1):130.
- [6] Li J, Wang XC, Tang JW, et al. HULC and Linc00152 act as novel biomarkers in predicting diagnosis of hepatocellular carcinoma [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015,37(2):687-696.
- [7] Yu M, Xue Y, Zheng J, et al. Linc00152 promotes malignant progression of glioma stem cells by regulating miR-103a-3p/FEZF1/CDC25A pathway [J]. *Mol Cancer*, 2017,16(1):110.
- [8] Prensner JR, Chinnaiyan AM. The emergence of lncRNAs in cancer biology [J]. *Cancer Discov*. 2011,1(5):391-407.
- [9] Hosseini ES, Meryet-Figuere M, Sabzalipoor H, et al. Dysregulated expression of long noncoding RNAs in gynecologic cancers [J]. *Mol Cancer*, 2017,16(1):107.
- [10] Deguchi S, Katsushima K, Hatanaka A, et al. Oncogenic effects of evolutionarily conserved noncoding RNA ECONEIN on gliomagenesis [J]. *Oncogene*, 2017,36:4629-4640.
- [11] Liu C, Sun Y, She X, et al. CASC2c as an unfavorable prognosis factor interacts with miR-101 to mediate astrocytoma tumorigenesis [J]. *Cell Death Dis*, 2017,8(3):e2639.
- [12] Wang ZY, Hu M, Dai MH, et al. Upregulation of the long non-coding RNA AFAP1-AS1 affects the proliferation, invasion and survival of tongue squamous cell carcinoma via the Wnt/beta-catenin signaling pathway [J]. *Mol Cancer*, 2018,17(1):3.
- [13] Ji J, Tang JW, Deng L, et al. LINC00152 promotes proliferation in hepatocellular carcinoma by targeting EpCAM via the mTOR signaling pathway [J]. *Oncotarget* 2015,6(40):42813-42824.
- [14] Feng S, Zhang J, Su W, et al. Overexpression of LINC00152 correlates with poor patient survival and knock-down impairs cell proliferation in lung cancer [J]. *Sci Rep*, 2017,7(1):2982-2988.
- [15] Chen QN, Chen X, Chen ZY, et al. Long intergenic non-coding RNA 00152 promotes lung adenocarcinoma proliferation via interacting with EZH2 and repressing IL24 expression [J]. *Mol Cancer*, 2017,16:17.
- [16] Notzold L, Frank L, Gandhi M, et al. The long non-coding RNA LINC00152 is essential for cell cycle progression through mitosis in HeLa cells [J]. *Sci Rep*, 2017,7(1):2265-2271.
- [17] Chen WM, Huang MD, Sun DP, et al. Long intergenic non-coding RNA 00152 promotes tumor cell cycle progression by binding to EZH2 and repressing p15 and p21 in gastric cancer [J]. *Oncotarget*, 2016,7(9):9773-9787.
- [18] Yue B, Cai D, Liu C, et al. Linc00152 functions as a competing endogenous RNA to confer oxaliplatin resistance and holds prognostic values in colon cancer [J]. *Mol Ther*, 2016,24(12):2064-2077.