

## 长链非编码 RNA LOC285194 在乳腺癌组织中的表达及临床意义

黄秋霞, 陈 罡<sup>△</sup>, 冯震博, 韦康来, 陈 皓

(广西医科大学第一附属医院病理科, 南宁 535021)

**[摘要]** **目的** 探讨长链非编码 RNA(lncRNA) LOC285194 在乳腺癌及癌旁组织中的表达及其临床意义。**方法** 选取石蜡包埋的乳腺癌组织 42 份及癌旁组织 16 份, 用实时荧光定量 PCR 技术检测 lncRNA LOC285194 的表达, 分析其与临床病理特征的相关性。**结果** lncRNA LOC285194 在乳腺癌组织中表达水平明显低于癌旁组织( $P < 0.01$ ); lncRNA LOC285194 在人类表皮生长因子受体 2(HER2)过表达乳腺癌组织较 HER2 阴性乳腺癌组织表达水平上调( $P = 0.013$ ), 二者呈正相关( $r = 0.385, P = 0.012$ )。**结论** lncRNA LOC285194 可能在乳腺癌起抑癌基因的作用, 可能是通过与 HER2 的关联参与乳腺癌的发生, 其有可能成为乳腺癌治疗的靶基因。

**[关键词]** 乳腺肿瘤; 长链非编码 RNA; LOC285194; 肿瘤发生; 人类表皮生长因子受体 2

**[中图分类号]** R73-35

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2017)09-1223-03

## Expression and clinical significance of long chain non-coding RNA LOC285194 in human breast cancer tissue

Huang Qiuxia, Chen Gang<sup>△</sup>, Feng Zhenbo, Wei Kanglai, Chen Hao

(Department of Pathology, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expression of long chain non-coding(lnc) RNA LOC285194 in breast cancer tissue and paracancerous tissue and its clinical significance. **Methods** Forty-two samples of paraffin embedded breast cancer tissue and 16 samples of paraffin embedded paracancerous tissue were selected. The expression of lncRNA LOC285194 in these tissue were detected by using quantitative real-time polymerase chain reaction(PCR). Then its correlation with clinicopathological features was analyzed. **Results** The expression level of lncRNA LOC285194 in breast cancer tissue was significantly lower that in the paracancerous tissue ( $P < 0.01$ ); the level of lncRNA LOC285194 in human epidermal growth factor receptor-2(HER2)overexpression tissues was up-regulated compared with HER2 negative breast cancer tissue( $P = 0.013$ ), there was a positive correlation between them( $r = 0.385, P = 0.012$ ). **Conclusion** lncRNA LOC285194 may play the role of cancer suppressor gene and may be involved in the generation of breast cancer by HER2 association, which may become a target gene of breast cancer treatment.

**[Key words]** breast neoplasms; long chain non-coding RNA; LOC285194; tumorigenesis; human epidermal growth factor receptor-2

乳腺癌是危害女性健康常见的恶性肿瘤, 其具有异质性强、具有多种组织学分类, 有研究显示, 通过基因谱改变进行分子分类, 相对组织学分类更为精确、有效, 因此寻求特异性强的分子诊治靶标可为乳腺癌的诊疗提供更有效的新方案。长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一类长度大于 200 bp, 无编码蛋白质功能的 RNA, 参与肿瘤的发生、发展<sup>[1]</sup>。lncRNA 在乳腺癌中有异常表达, 影响乳腺癌细胞的增殖、转移等。lncRNA LOC285194 是近年来新发现在肿瘤中异常表达的基因, 其在乳腺癌中表达情况少见报道。本研究通过检测 lncRNA LOC285194 在乳腺癌及癌旁组织中的表达, 分析其与各临床病理特征的相关性, 探讨 lncRNA LOC285194 在乳腺癌发生、发展中的作用。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取本院病理科 2012 年 1—12 月行乳腺癌根治术的石蜡标本, 包括 42 份癌组织及 16 份癌旁组织, 患者术前均未进行辅助性的放疗或化疗。病理类型为浸润性导管癌, 癌旁组织距离肿瘤至少 5 cm。并收集相关临床病理资料, 包括年龄、肿瘤 TMN 分期、免疫组化结果等。

## 1.2 方法

**1.2.1 总 RNA 提取** 在本组实验中癌组织成分大于等于 50% 的, 切片厚度为 6  $\mu\text{m}$  3 片; 癌组织成分小于 50% 及癌旁组

织, 均为切片厚度 8  $\mu\text{m}$  5 片。当脂肪面积达大于等于 30% 的癌及癌旁组织, 需将切片置于玻片上, 根据 HE 镜下定位, 用盖玻片剔除多余的脂肪组织, 尽量保证提取总 RNA 为腺体的。其后操作步骤按 miRNeasy FFPE Kit (QIAGEN) 的试剂盒说明书进行。经用核酸检测仪检测总 RNA 达使用标准( $A_{260} : A_{280}$  为 1.9~2.1)的标本方能使用。

**1.2.2 cDNA 合成** 使用 miScript II RT Kit (QIAGEN) 试剂盒, 按 20  $\mu\text{L}$  反应体系, 经普通 PCR 37  $^{\circ}\text{C}$  60 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min 逆转录, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。其中 5  $\times$  miScript HiFlex Buffer 4  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  Nucleics Mix 2  $\mu\text{L}$ , RNase-free water variable, miScriptReverse Transcriptase Mix 2  $\mu\text{L}$ , Template RNA variable, 总容积总容量 20  $\mu\text{L}$ 。

**1.2.3 qRT-PCR 检测** 使用 LightCycler<sup>®</sup> 480 SYBR Green I Master(Roche)试剂盒, 按 20  $\mu\text{L}$  反应体系, 参照说明书步骤进行。其中 dH<sub>2</sub>O 6  $\mu\text{L}$ , SYBR Green I Master 10  $\mu\text{L}$ , PCR Forward Primer 1  $\mu\text{L}$ , PCR Reverse Primer 1  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ , 总容积总容量 20  $\mu\text{L}$ 。引物序列 lncRNA LOC285194 上游: 5'-TGT GCC TGT TTG ACC TCT GA-3', 下游: 5'-AGG AAG GAT AAA AGA CCG ACC A-3'。

**1.3 统计学处理** 数据采用 SPSS16.0 统计软件进行分析。本实验采用计算 2<sup>- $\Delta\Delta\text{Ct}$</sup>  值的方法来进行各标本的相对定量检

测<sup>[2]</sup>。组间比较采用秩和检验。计数资料采用  $\chi^2$  检验, lncRNA LOC285194 表达与各临床病理特征的相关性采用 Spearman 相关分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

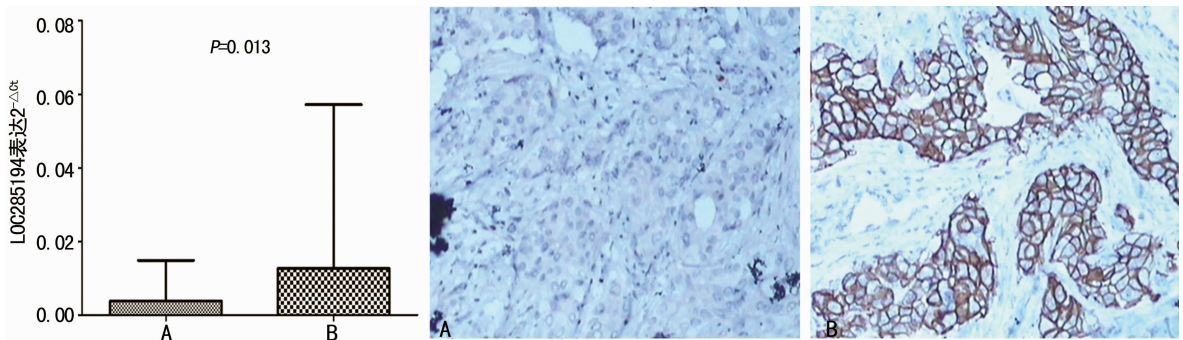
**2.1 qRT-PCR 扩增曲线和溶解曲线** GAPDH 及 lncRNA LOC285194 Ct 值为 25~35。扩增曲线出现平台期, 各组扩增效率相近。

**2.2 qRT-PCR 检测结果** 以癌和癌旁  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  的中位数分界, 将 lncRNA LOC285194 表达分为高表达组及低表达组。经秩和检验分析, 在癌组织中 lncRNA LOC285194 的表达水平较癌旁组织明显降低 ( $P < 0.01$ ), 见表 1。lncRNA LOC285194 的表达水平在 HER2 过表达, 即 HER2(3+) 的乳腺癌组织中较

HER2 阴性的乳腺癌组织表达明显上调 ( $P = 0.013$ ), 见图 1。相关性分析显示, lncRNA LOC285194 的表达水平与 HER2 过表达呈正相关 ( $r = 0.385, P = 0.012$ ), 其余临床病理特征指标中 lncRNA LOC285194 的表达水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 2。

表 1 lncRNA LOC285194 在乳腺癌和癌旁组织中的表达比较 [ $n(\%)$ ]

组织	<i>n</i>	高表达	低表达	<i>P</i>
癌	42	21(50.00)	21(50.00)	<0.01
癌旁	16	15(93.75)	1(6.25)	



A: HER2(-); B: HER2(3+)。

图 1 LOC285194 在 HER2(-) 和 HER2(3+) 乳腺癌组织中相对表达量及 HER2 在乳腺癌中的免疫组化染色 ( $\times 100$ )

表 2 LOC285194 的表达水平与乳腺癌临床病理特征的相关性 [ $n(\%)$ ]

指标	<i>n</i>	高表达	低表达	<i>r</i>	<i>P</i>
年龄(岁)					
<50	20	9(45.00)	11(55.00)	-0.095	0.548
$\geq 50$	22	12(54.55)	10(45.46)		
组织学分级					
I~II	34	15(44.12)	19(55.88)	-0.243	0.122
III	8	6(75.00)	2(25.00)		
肿瘤大小					
pT <sub>1~2</sub>	31	15(48.39)	16(51.61)	-0.054	0.733
pT <sub>3~4</sub>	11	6(54.55)	5(45.46)		
淋巴结转移					
N <sub>0</sub>	18	10(55.56)	8(44.44)	0.096	0.544
N <sub>1~3</sub>	24	11(45.83)	13(54.17)		
临床分期					
I~II	24	12(50.00)	12(50.00)	0.001	1.000
III	18	9(50.00)	9(50.00)		
ER					
+	8	3(37.50)	5(62.50)	-0.121	0.444
-	34	18(52.94)	16(47.06)		
PR					
+	6	1(16.67)	5(83.33)	-0.272	0.081
-	36	20(55.56)	16(44.44)		
HER2					
+++	18	13(72.22)	5(27.78)	0.385	0.012
-	24	8(33.33)	16(66.67)		

## 3 讨 论

乳腺癌近年来发病率不断上升, 患者发病年龄呈年轻化趋势。在美国 2014 年乳腺癌的新发病例为 234 190 例, 其中女性 231 840 例; 死亡人数 40 730 例, 其中女性为 40 290 例, 死亡率在女性恶性肿瘤中位居第 2 位<sup>[3]</sup>。《2014 年中国肿瘤登记年报》显示, 乳腺癌的发病人数约为 25 万, 居女性恶性肿瘤发病率第 1 位, 死亡率在女性恶性肿瘤中占第 4 位, 严重威胁女性健康和生命<sup>[4]</sup>。随着分子病理学技术的发展, 研究发现多个 lncRNA 与乳腺癌的发生、发展具有密切关联<sup>[5-13]</sup>, 如 HO-TAIR 影响乳腺癌的转移, H19 影响乳腺癌细胞周期, Gas5、Zfas1、LSINCT5 影响乳腺癌细胞增殖等, 这些研究提示 lncRNA 可能为乳腺癌的诊治带来新的思路, 发现对乳腺癌细胞特异性高的 lncRNA 对推动乳腺癌精准治疗具有重大意义。

LOC285194 是位于染色体 3q13.31 的一个反义 lncRNA, Pasic 等<sup>[14]</sup>首次在骨肉瘤组织中发现并命名。在骨肉瘤<sup>[14]</sup>、结直肠癌<sup>[15]</sup>、食管癌<sup>[16]</sup>、胰腺癌<sup>[17]</sup>、胶质瘤<sup>[18]</sup>的研究中, 均显示在肿瘤组织中 LOC285194 表达水平降低或缺失, 且与患者的不良预后相关, 起着抑癌基因的作用。其低表达与肿瘤大小、临床分期、淋巴结转移和远处转移相关<sup>[14-18]</sup>。LOC285194 抑癌作用的机制, 在骨肉瘤中, 主要通过抑制细胞周期、细胞凋亡及 VEGF/VEGFR1 的调节, 进而影响骨肉瘤细胞的增殖性<sup>[14]</sup>。在结直肠癌中, LOC285194 受到抑癌基因 P53 的调节, 且在癌基因 miRNA-211 竞争靶点抑制细胞增殖<sup>[19]</sup>。在胶质瘤的研究中, 上调 LOC285194 可增加 P53 蛋白的表达量<sup>[18]</sup>。由此可见, LOC285194 在肿瘤中可能通过与 P53 相互作用, 调控相关基因的表达, 抑制肿瘤细胞的增殖性, 从而起到抑癌的作用。

本研究结果显示, LOC285194 在乳腺癌中的表达, 较癌旁组织表达水平明显下降, 与之前在其他肿瘤中的结果一致。同

时,试验结果显示,LOC285194 在 HER2 过表达较 HER2 阴性的乳腺癌组织表达上调。而 HER2 作为乳腺癌靶向用药的临床指标,与 LOC285194 存在相关性的发现,使 LOC285194 进一步深入研究具有重大的意义。而其是否也通过 P53、miRNA-211 影响乳腺癌细胞的增殖性,需要进一步的研究证实。

综上所述,LOC285194 在乳腺癌中可能起着抑制癌的作用,与 HER2 的表达存在相关性,可望成为乳腺癌诊断的分子标记物及治疗的靶点。

#### 参考文献

- [1] Novikova IV, Hennelly SP, Sanbonmatsu KY. Sizing up long non-coding RNAs: do lncRNAs have secondary and tertiary structure[J]. *Bioarchitecture*, 2012, 2(6): 189-199.
- [2] 黄秋霞,陈罡,韦康来,等.长链非编码 RNA UC001kfo 在乳腺癌组织中的表达及临床意义[J]. *临床与病理杂志*, 2015, 35(11):1992-1998.
- [3] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(1):5-29.
- [4] 陈万青,郑荣寿,曾红梅,等.2011 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. *中国肿瘤*, 2015, 24(1):1-10.
- [5] Gupta RA, Shah N, Wang KC, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis[J]. *Nature*, 2010, 464(7291):1071-1076.
- [6] Lottin S, Adriaenssens E, Dupressoir T, et al. Overexpression of an ectopic H19 gene enhances the tumorigenic properties of breast cancer cells[J]. *Carcinogenesis*, 2002, 23(11):1885-1895.
- [7] Mourtada-Maarabouni M, Pickard MR, Hedge VL, et al. GAS5, a non-protein-coding RNA, controls apoptosis and is downregulated in breast cancer[J]. *Oncogene*, 2009, 28(2):195-208.
- [8] Askarian-Amiri ME, Crawford J, French JD, et al. SNORD-host RNA Zfas1 is a regulator of mammary development and a potential marker for breast cancer [J]. *RNA*, 2011, 17(5):878-891.
- [9] Salvador MA, Wicinski J, Cabaud O, et al. The histone deacetylase inhibitor abexinostat induces cancer stem cells differentiation in breast cancer with low Xist expression [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(23):6520-6531.
- [10] Cooper C, Guo J, Yan Y, et al. Increasing the relative expression of endogenous non-coding Steroid Receptor RNA Activator (SRA) in human breast cancer cells using modified oligonucleotides [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(13):4518-4531.
- [11] Huang J, Zhou N, Watabe K, et al. Long non-coding RNA UCA1 promotes breast tumor growth by suppression of p27 (Kip1)[J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(1):e1008.
- [12] Silva JM, Boczek NJ, Berres MW, et al. LSINCT5 is over expressed in breast and ovarian cancer and affects cellular proliferation[J]. *RNA Biol*, 2011, 8(3):496-505.
- [13] Iacoangeli A, Lin Y, Morley EJ, et al. BC200 RNA in invasive and preinvasive breast cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25(11):2125-2133.
- [14] Pasic I, Shlien A, Durbin AD, et al. Recurrent focal copy-number changes and loss of heterozygosity implicate two noncoding RNAs and one tumor suppressor gene at chromosome 3q13.31 in osteosarcoma[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(1):160-171.
- [15] Qi P, Xu MD, Ni SJ, et al. Low expression of LOC285194 is associated with poor prognosis in colorectal cancer[J]. *J Transl Med*, 2013, 11(1):122-128.
- [16] Tong YS, Zhou XL, Wang XW, et al. Association of decreased expression of long non-coding RNA LOC285194 with chemoradiotherapy resistance and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *J Transl Med*, 2014, 12(1):233-241.
- [17] Ding YC, Yu W, Ma C, et al. Expression of long non-coding RNA LOC285194 and its prognostic significance in human pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(11):8065-8070.
- [18] 潘俊辰,徐拓野,余震南,等.胶质瘤中过表达长链非编码 RNA loc285194 促进胶质瘤细胞凋亡[J]. *临床神经外科杂志*, 2015, 12(2):118-122.
- [19] Liu Q, Huang J, Zhou N, et al. LncRNA loc285194 is a p53-regulated tumor suppressor [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(9):4976-4987.

(收稿日期:2016-07-20 修回日期:2016-11-18)

(上接第 1222 页)

- [11] 余晓婷,朱克毅,徐雁,等.短肽和整蛋白型联合肠内营养对重症患者免疫功能及营养状况影响的研究[J]. *全科医学临床与教育*, 2015, 13(1):50-53.
- [12] 马许辉.组合型血液净化联合早期肠内营养在高脂血症性急性胰腺炎治疗中的探索[J]. *牡丹江医学院学报*, 2014, 35(2):37-38.
- [13] 骆永富,曾之耀,王湘英,等.早期多时点多部位 B 超引导下穿刺置管引流联合血液净化治疗高脂血症性重症急性胰腺炎的疗效[J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2015, 22(1):33-36.
- [14] 郑凤祥.血液净化联合早期肠内营养治疗高脂血症性胰腺炎的临床分析[J]. *现代诊断与治疗*, 2014, 25(2):397-397.
- [15] 喻超,孙诚谊,江建新,等.组合型血液净化联合早期肠内营养治疗急性高脂血症性胰腺炎[J]. *贵阳医学院学报*, 2012, 37(3):228-230.

(收稿日期:2016-07-19 修回日期:2016-11-17)