

长链非编码 RNA CRNDE 检测在乳腺癌诊断中的意义

李子博, 周江, 周琳, 杨芳慧

长沙医学院医学检验系, 湖南 长沙 410219

摘要: **目的** 探讨长链非编码 RNA(lncRNAs) CRNDE 在乳腺癌患者血浆中的表达及临床意义。 **方法** 采用实时荧光定量聚合酶链反应方法检测 76 例乳腺癌患者组织、远端癌旁组织及血浆 lncRNA CRNDE 的表达情况。分析血浆中 lncRNA CRNDE 表达与乳腺癌的临床病理特征关系, 采用受试者工作特征曲线(ROC)评价血浆 lncRNA CRNDE 水平对乳腺癌的诊断效能。同时收集同期 80 例健康体检者为对照组检测其血浆中 lncRNA CRNDE 表达情况。 **结果** lncRNA CRNDE 在乳腺癌组织中的表达(2.73 ± 1.66)明显高于癌旁组织(2.06 ± 1.67), 且在患者血浆中的表达水平(1.79 ± 1.05)高于健康对照者(1.40 ± 1.12), 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 血浆中 lncRNA CRNDE 的表达水平与患者临床病理特征无关($P > 0.05$); ROC 曲线分析发现 AUC 为 0.66。 **结论** 血浆中高表达的 lncRNA CRNDE 可作为乳腺癌诊断的一个潜在的新型生物标志物。

关键词: 长链非编码 RNA; CRNDE; 乳腺癌

中图分类号: R711.74 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2018)03-0276-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2018.03.006

Value of detection of long non-coding RNA CRNDE in the diagnosis of breast cancer

LI Zi-bo, ZHOU Jiang, ZHOU Lin, YANG Fang-hui

Department of Clinical Laboratory, Changsha Medical College, Changsha, Hunan 410219, China

Abstract: **Objective** To explore the expression of long non-coding RNA (lncRNA) colorectal neoplasia differentially expressed (CRNDE) in the plasma of breast cancer patients and its clinical significance. **Methods** Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression of lncRNA CRNDE in breast cancer tissues, matched para-cancerous tissues and plasma from 76 patients with breast cancer. The correlation between lncRNA CRNDE expression in plasma and clinical pathological characteristics of breast cancer was analyzed. The receiver operating characteristic curve (ROC) was constructed to evaluate the efficiency of plasma levels of lncRNA CRNDE in the diagnosis of breast cancer. 80 physical examinees were simultaneously selected as the control group, and the expression of plasma lncRNA CRNDE was detected. **Results** The expression level of lncRNA CRNDE was significantly higher in cancer tissues than in matched para-cancerous tissues ((2.73 ± 1.66) vs. (2.06 ± 1.67)) as well as significantly higher in the patients with breast cancer than in the healthy controls ((1.79 ± 1.05) vs. (1.40 ± 1.12)), showing statistically significant differences (both $P < 0.05$). There was no correlation between the expression level of lncRNA CRNDE in plasma and clinicopathological characteristics of breast cancer patients ($P > 0.05$). The area under the ROC curve (AUC) was 0.66. **Conclusion** High expression of plasma lncRNA CRNDE may serve as a novel potential biomarker for the diagnosis of breast cancer.

Key words: long non-coding RNA; colorectal neoplasia differentially expressed (CRNDE); breast cancer

乳腺癌是一种严重危害妇女健康的恶性肿瘤。在我国,乳腺癌发病率和死亡率近年来呈上升趋势^[1-2]。目前临床常用的筛查或诊断方法存在许多缺点^[3-4],因此,寻找新型有效的肿瘤生物标志物为乳腺癌的诊断提供更为准确及时的信息具有重要意义。研究发现,长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNAs)能通过表观遗传、转录以及转录后等方面多层次地发挥基因表达调控作用^[5-6],与肿瘤的发生发展

关系密切。其中,lncRNA 结直肠癌肿瘤差别表达基因(colon rectal neoplasia differentially expressed, CRNDE)被发现在结直肠癌、肝癌以及宫颈癌等多种肿瘤中表达异常^[7-9]。但目前国内关于 lncRNA CRNDE 与乳腺癌的相关研究较少,因此,本研究通过检测 CRNDE 在乳腺癌组织与血浆中的表达情况,分析其与乳腺癌临床病理资料的相关性以及对其潜在诊断价值,旨在为乳腺癌的诊断提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

基金项目: 湖南省科技厅科技计划项目(2014FJ3062)

作者简介: 李子博(1975-),男,博士,副教授,研究方向:肿瘤诊断。

1.1.1 研究对象 76 例乳腺癌患者来源于 2010 年 10 月-2017 年 2 月长沙医学院附属医院确诊患者,均为女性。所有患者手术之前未接受化疗、放疗。收集患者肿瘤组织以及远端癌旁组织(距肿瘤组织>5 cm 的正常组织)。同时收集患者术前静脉全血以及同期 80 例健康体检者全血。患者年龄 37~75 岁,平均年龄(53.4±9.7)岁;健康体检者年龄 34~72 岁,平均年龄(54.7±10.6)岁。所有患者签署了知情同意书。

1.1.2 主要试剂 RNA-TRIzol 试剂盒购自北京天根生物科技有限公司;血浆 RNA 提取试剂盒购自北京百泰克生物技术公司;cDNA 合成试剂盒 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis 购自 Thermo Scientific 公司;SYBR Green PCR 试剂盒购自 Roche 公司。

1.1.3 引物 利用 Primer 5.0 软件设计引物, lncRNA CRNDE 扩增正向引物为:5'-CGATCACTC-CCCACAAGGC-3',反向引物为:5'-GCTCTCTGC-CACGTTCTAAGCCCA-3'。选择磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内参照,其正向引物:5'-GCGGAGGT-TAAGTGT-3',反向引物:5'-AACAGGTTTACCTCCT-TATCTTCAGAA-3';由上海生工生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 组织与血浆 RNA 提取 所取组织在液氮研磨成粉,应用 RNA-TRIzol 试剂盒提取癌组织和癌旁组织的总 RNA。所取乳腺癌患者及对照组全血标本以 1 500 r/min 离心 30 min 分离血浆。按照试剂盒说明书提取血浆中的总 RNA。1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定样品总 RNA 的完整性,Nanodrop 2000 测定 RNA 的浓度和纯度。

1.2.2 cDNA 逆转录及实时定量聚合酶链反应 应用 cDNA 合成试剂盒,以组织与血浆 RNA 为模板,按照操作说明合成 cDNA,然后进行荧光定量 PCR 扩增,反应体系为:2×FastStart Universal SYBR GreenMaster 5 μl,primer(5 μM)0.8 μl,ddH₂O 3.2 μl,cDNA 1 μl。反应条件:95 ℃ 预热 5 min,95 ℃ 30 s 变性,60 ℃ 1 min 退火,72 ℃ 30 s 延伸,35 个循环。采用相对定量 2^{-ΔΔCt}的方法对获得的 CT 值进行统计分析。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析。计量数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,样本均数间比较用 *t* 检验,计数资料采用 χ^2 检验;lncRNA CRNDE 对乳腺癌的诊断效能以受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线来描述。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA CRNDE 在乳腺癌组织中的表达 采用实时荧光定量 PCR 检测患者的肿瘤组织和相对应的癌旁组织中的 CRNDE 表达情况。lncRNA CRNDE 相对表达量在肿瘤组织中的表达水平(2.73±1.66)明显高于癌旁组织(2.06±1.67),差异有统计学意义(*t*=2.48,*P*=0.014)。

2.2 lncRNA CRNDE 在血浆中的表达 采用定量 PCR 的方法分析 76 例乳腺癌患者术前血浆中 lncRNA CRNDE 相对于 80 例健康对照组的表达水平,发现 lncRNA CRNDE 在乳腺癌患者组血浆中表达水平(1.79±1.05)明显高于对照组(1.40±1.12),差异有统计学意义(*t*=2.24,*P*=0.026)。

2.3 乳腺癌患者血浆 lncRNA CRNDE 表达与临床病理特征关系 为分析 lncRNA CRNDE 的表达水平与乳腺癌患者临床病理特征关系,2^{-ΔΔCt}≤1 定义为低表达,2^{-ΔΔCt}>1 为高表达^[10]。通过对 76 例乳腺癌患者病理资料统计分析发现,乳腺癌患者血浆中 lncRNA CRNDE 的表达水平与患者年龄、肿瘤分期、雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、人表皮生长因子受体-2(Her-2)表达、淋巴结转移及 Ki-67 水平不具有相关性。见表 1。

表 1 乳腺癌患者血浆中 lncRNA CRNDE 表达水平与临床特征相关性

病理特征	例数	CRNDE 表达		χ^2 值	<i>P</i> 值
		低表达	高表达		
年龄(岁)					
≤50	41	24	17	0.139	0.709
>50	35	19	16		
TNM 分期					
I~II 期	46	20	26	0.090	0.764
III~IV 期	30	12	18		
ER					
+	51	21	30	0.188	0.664
-	25	9	16		
PR					
+	43	19	24	2.833	0.092
-	33	21	12		
Her2					
+	55	30	25	0.029	0.865
-	21	11	10		
淋巴结转移					
有	32	12	20	2.768	0.096
无	44	25	19		
Ki67					
≤10	50	28	22	0.032	0.858
>10	26	14	12		

2.4 乳腺癌患者血浆 lncRNA CRNDE 表达水平对乳腺癌的诊断价值 用 ROC 曲线评价血浆中 lncRNA CRNDE 水平对乳腺癌的潜在诊断价值。分析发现, ROC 曲线下面积 (area under the curve, AUC) 为 0.66 (95% CI: 0.546~0.762, $P < 0.05$); 灵敏性和特异性分别是 80% 和 60.5%。见图 1。

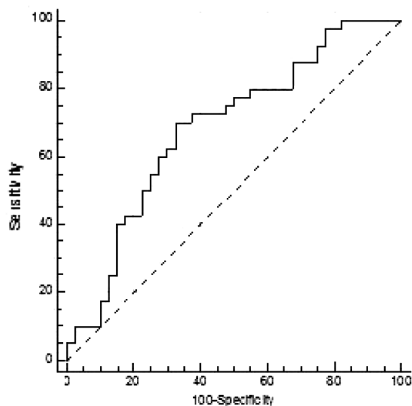


图 1 血浆 lncRNA CRNDE 诊断 ROC 曲线图

3 讨论

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNAs) 是一类内源性 RNA 转录分子, 其长度一般大于 200 个核苷酸, 但无蛋白质编码功能。此类转录物能通过多种机制多层次调节基因表达, 从而参与包括肿瘤在内的多种疾病的发生与发展, 并被认为是一种非常具有潜力的肿瘤分子标记物^[11-12]。同时, 有研究证明肿瘤细胞能向机体体液, 例如血液、尿液、唾液等分泌外泌体 (exosome), 分泌到体液中外泌体内含大量 lncRNA^[13-14]。因而血浆中外泌体可能为疾病诊断提供了相应的 RNA 信息, 同时肿瘤细胞可能通过多种方式, 释放部分核酸到外周血中。因此, 检测血浆中 lncRNA 成为可能。由于血液样本取材方式简便、具有微创性。因而应用循环核酸研究肿瘤无创诊断已引起了广泛的关注, 显示出较高的临床应用价值和前景, 为肿瘤的诊断提供一个新的思路。

lncRNA CRNDE 是一种于 2011 年首先被发现在结直肠癌肿瘤组织中表达上调的 lncRNA, 由定位于 16 号染色体上的 IRX5 基因编码^[15]。研究发现, lncRNA CRNDE 可通过表观遗传学调控, 比如组蛋白甲基化调节进行基因转录调控, 或作为 miRNA“分子海绵” (molecular sponge) 发挥作用, 影响 PI3K-AKT、胰岛素/IGF 以及 mTOR 等信号通路^[16-18], 促进肿瘤的发生发展, 调控肿瘤细胞增殖、侵袭转移等生物学行为。

在本研究中, 通过实时荧光定量 PCR 检测了 lncRNA CRNDE 在乳腺癌及其血浆中的表达水平, 结果表明, lncRNA CRNDE 在乳腺癌组织中的表达水平高于癌旁组织, 在患者血浆中的表达水平高于健康对照者 ($P < 0.05$)。这与 Huan 等^[19]的研究结果一致, 提示 lncRNA CRNDE 可能参与乳腺癌的发生发展过程, 其表达上调对这个过程起着一定的促进作用。Huan 等^[19]研究认为, lncRNA CRNDE 作为 miR-136 的“分子海绵”发挥作用, 活化 Wnt/ β -catenin 信号通路, 促使乳腺癌的发生。通过对 lncRNA CRNDE 的表达与临床病理特征相关性分析发现: lncRNA CRNDE 的表达与患者年龄、肿瘤分期、ER、PR、Her2、淋巴结转移以及 Ki-67 表达水平差异均不具有相关性 ($P > 0.05$), 说明 lncRNA CRNDE 表达水平改变可能独立于乳腺癌的这些病理学参数变化, 提示 lncRNA CRNDE 的异常改变可能是乳腺癌发生的独立危险因素。但 Huan 等^[19]的研究结果发现, lncRNA CRNDE 的表达与肿瘤分期相关, 表现为在 III~IV 乳腺癌组织中呈高表达。这种差异可能与本实验样本量较少有关, 需扩大样本量进一步进行证实。李昊文等^[20]研究认为 lncRNA CRNDE 可能通过调节 MAPK/ERK 通路系列相关基因表达, 影响胶质瘤细胞的增殖和迁移能力。但在本研究中, lncRNA CRNDE 表达水平与乳腺癌淋巴结转移无明显相关性, 其机制不明, 需要做进一步研究。此外, 通过 ROC 曲线分析进一步研究血浆中 lncRNA CRNDE 对乳腺癌中的诊断价值, 发现 AUC 值为 0.66, 结合其诊断敏感度, 提示血浆中 lncRNA CRNDE 检测在乳腺癌的诊断中具有一定价值, 可作为乳腺癌筛查或诊断的一个潜在的生物标记, 但需要扩大样本量进一步证明。

综上所述, lncRNA CRNDE 在乳腺癌中呈现高表达状态, 血浆中其表达水平可作为乳腺癌诊断一个潜在的分子标志物, 但其在乳腺癌中的发病机理以及临床实用价值还需要进一步研究。

参考文献

- [1] Fan L, Strasser-Weippl K, Li JJ, et al. Breast cancer in China [J]. Lancet Oncol, 2014, 15(7): 279-289.
- [2] 董昀球, 杨坚波, 徐明, 等. 2009-2014 年无锡市女性乳腺癌死亡状况和趋势分析 [J]. 实用预防医学, 2017, 24(1): 12-14.
- [3] Yang RX, Pflutze K, Zucknick M, et al. DNA methylation array analyses identified breast cancer-associated *HYAL2* methylation in peripheral blood [J]. Int J Cancer, 2015, 136(8): 1845-1855.
- [4] Tabár L, Vitak B, Chen TH-H, et al. Swedish two-county trial: impact of mammographic screening on breast cancer mortality during 3 decades [J]. Radiology, 2011, 260: 658-663.
- [5] Batista PJ, Chang HY. Long Noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease [J]. Cell, 2013, 152(6): 1298-1309.

圆尾鲎不同组织中河豚毒素的小鼠单位法分析及评价

黄宗锈¹, 管秋美², 郑仁锦¹

1. 福建省人兽共患病研究重点实验室(福建省疾病预防控制中心), 福建 福州 350001;

2. 福建医科大学

摘要: **目的** 了解福州、南平两地私售圆尾鲎不同组织受 TTX 污染的状况。 **方法** 采用小鼠单位法检测圆尾鲎的肌肉、卵和结缔组织中 TTX 的毒素量。 **结果** 在采集的 10 只圆尾鲎中, 共有 9 只出现明显的 TTX 中毒症状。其中 9 只圆尾鲎的肌肉提取液致小鼠死亡、5 只的卵提取液致小鼠死亡、6 只的结缔组织提取液致小鼠死亡。 **结论** 圆尾鲎不同组织部位受 TTX 污染的状况不同, 本批标本各组织中所含毒素量依次为肌肉>卵>结缔组织。

关键词: 圆尾鲎; 河豚毒素; 鼠单位; 小鼠

中图分类号: R155.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2018)03-0279-03 DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2018.03.007

Assessment of tetrodotoxin in different tissues of the horseshoe crab *Carcinoscorpius rotundicauda* by mouse unit method

HUANG Zong-xiu*, GUAN Qiu-mei, ZHENG Ren-jin

* Fujian Provincial Key Laboratory of Zoonosis Research, Fujian Provincial Center for Disease Control and Prevention, Fuzhou, Fuzhou 350001, China

Corresponding author: ZHENG Ren-jin, E-mail: 402109842@qq.com

Abstract: **Objective** To investigate the pollution situation of tetrodotoxin (TTX) in different tissues of the horseshoe crab *Carcinoscorpius rotundicauda* sampled from private stalls in Fuzhou and Nanping. **Methods** Mouse unit method was used to determine the TTX content in muscles, eggs and connective tissues of the horseshoe crabs. **Results** Among the 10 horseshoe crabs sampled, totally 9 showed significant symptoms of TTX poisoning. And mouse deaths were induced by muscle extract collected from 9 horseshoe crabs, egg extract from 5 ones and connective tissue extract from 6 ones respectively. **Conclusions** Different

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(2015J01296)

作者简介: 黄宗锈(1974-), 男, 福建闽侯人, 学士, 副主任技师, 主要从事毒理学研究工作。

通信作者: 郑仁锦, E-mail: 402109842@qq.com。

- [6] 邓镇涛, 许朋, 王燕. 长链非编码 RNA 与恶性肿瘤发生发展关系的研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(9): 2286-2288.
- [7] 韩懿, 劳美琼, 雷巧如, 等. 宫颈癌中长链非编码 RNA CRNDE 表达及其临床意义[J]. 中国肿瘤临床, 2015, 42(14): 705-708.
- [8] Han P, Li JW, Zhang BM, et al. The lncRNA CRNDE promotes colorectal cancer cell proliferation and chemoresistance via miR-181a-5p-mediated regulation of Wnt/ β -catenin signaling[J]. Mol Cancer, 2017, 16(1): 9-16.
- [9] Chen Z, Yu C, Zhan L, et al. lncRNA CRNDE promotes hepatic carcinoma cell proliferation, migration and invasion by suppressing miR-384[J]. Am J Cancer Res, 2016, 6(10): 2299-2309.
- [10] 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.
- [11] Kung JT, Colognori D, Lee JT. Long noncoding RNAs: past, present, and future[J]. Genetics, 2013, 193(3): 651-669.
- [12] Iyer MK, Niknafs YS, Malik R, et al. The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome[J]. Nat Genet, 2015, 47(3): 199-208.
- [13] Chen M, Xu R, Ji H, et al. Transcriptome and long noncoding RNA sequencing of three extracellular vesicle subtypes released from the human colon cancer LIM1863 cell line[J]. Sci Rep, 2016, 6: 38397-38411.
- [14] Xu CG, Yang MF, Ren YQ, et al. Exosomes mediated transfer of lncRNA UCA1 results in increased tamoxifen resistance in breast cancer cells[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(20): 4362-4368.
- [15] Liu T, Zhang X, Gao S, et al. Exosomal long noncoding RNA CRNDE-h as a novel serum-based biomarker for diagnosis and prognosis of colorectal cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(51): 85551-85563.
- [16] Shen S, Liu H, Wang Y, et al. Long non-coding RNA CRNDE promotes gallbladder carcinoma carcinogenesis and as a scaffold of DMBT1 and C-IAP1 complexes to activating PI3K-AKT pathway [J]. Oncotarget, 2016, 7(52): 72833-72844.
- [17] Wang Y, Wang Y, Li J, et al. CRNDE, a long-noncoding RNA, promotes glioma cell growth and invasion through mTOR signaling [J]. Cancer Lett, 2015, 367(2): 122-128.
- [18] Ellis BC, Graham LD, Molloy PL. CRNDE, a long non-coding RNA responsive to insulin/IGF signaling, regulates genes involved in central metabolism[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1843(2): 372-386.
- [19] Huan JL, Xing L, Lin QH, et al. Long noncoding RNA CRNDE activates Wnt/ β -catenin signaling pathway through acting as a molecular sponge of microRNA-136 in human breast cancer[J]. Am J Transl Res, 2017, 9(4): 1977-1989.
- [20] 李昊文, 李楠, 董成亚, 等. 长链非编码 RNA CRNDE 调控胶质瘤细胞凋亡[J]. 标记免疫分析与临床, 2016, 23(2): 190-193.

收稿日期: 2017-05-16