

长链非编码RNA FAL1在肝细胞癌患者的表达及其与预后的相关性

王航, 潘莎 (重庆市九龙坡区中医院 普外科, 重庆 400050)

摘要: 目的 研究肝细胞癌患者癌组织与癌旁组织中长链非编码RNA FAL1 (long non-coding RNA FAL1, lncRNA FAL1) 表达差异及其与预后的关系。方法 回顾性选取2014年11月至2015年5月重庆市九龙坡区中医院进行手术治疗的89例肝细胞癌患者为研究对象, 术中留取患者的癌组织及距癌组织边缘 > 5 cm的癌旁组织标本。采用q-RT PCR检测各组织中lncRNA FAL1表达水平, 观察lncRNA FAL1表达水平与患者临床病理特征的关系。采用Kaplan-Meier生存曲线和Log-Rank检验分析lncRNA FAL1相对表达量对患者预后的影响。通过COX多因素分析判别肝细胞癌预后的独立危险因素。结果 肝细胞癌患者癌组织lncRNA FAL1的表达水平显著高于癌旁组织, 差异有统计学意义 ($t = 24.00, P < 0.001$)。以癌组织中lncRNA FAL1表达水平的中位值1.70为界, 分为高表达组(60例)和低表达组(29例), 两组患者的性别、年龄、TBil、ALT、吸烟史、肿瘤数目、肿瘤直径、是否感染肝炎病毒、是否患自身免疫性肝炎等差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。lncRNA FAL1在有淋巴结转移、分化程度低、TNM分期为III~IV期、有门静脉癌栓、包膜完整、有肝硬化患者中的表达量高于无淋巴结转移、分化程度高、TNM分期为I~II期、无门静脉癌栓、包膜不完整、无肝硬化患者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Kaplan-Meier分析表明, lncRNA FAL1高表达组患者3年内存活率(20.1%)显著低于低表达组(61.2%), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 11.575, P = 0.001$)。lncRNA FAL1高表达是肝细胞癌预后的独立危险因素 ($RR = 1.952, 95\%CI: 0.627 \sim 2.106, P = 0.014$)。结论 lncRNA FAL1在肝细胞癌患者癌组织中高表达, 是预测肝细胞癌预后的独立危险因素, 可成为临床早期诊断与治疗的潜在靶标。

关键词: 肝细胞癌; 长链非编码RNA FAL1; 预后

Expression of long non-coding RNA FAL1 in patients with hepatocellular carcinoma and its relationship with prognosis

WANG Hang, PAN Sha (Department of General Surgery, Jiulongpo Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400050, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of long non-coding RNA FAL1 (lncRNA FAL1) in patients with hepatocellular carcinoma and its relationship with prognosis. **Methods** Total of 89 cases with HCC who underwent surgical treatment in Jiulongpo Hospital of Traditional Chinese Medicine from November 2014 to May 2015 were selected retrospectively. During the operation, the cancer tissues of the patients and the non-cancerous tissue specimens with a distance of longer than 5 cm from the edge of the cancer tissues were collected. The expression of lncRNA FAL1 in hepatocellular carcinoma tissues and para-cancerous tissues were detected by q-RT PCR, and the relationship between the expression of lncRNA FAL1 and the clinicopathological features of the patients were observed. Kaplan-Meier survival curve and Log-Rank test were used to analyze the effects of relative expression of lncRNA FAL1 on the prognosis of patients. Multivariate COX analysis was used to identify the independent risk factors of prognosis of hepatocellular carcinoma. **Results** The expression level of lncRNA FAL1 in hepatocellular carcinoma tissue was much higher than that in para-cancerous tissue ($t = 24.00, P < 0.001$). According to the median value (1.70) of lncRNA FAL1 expression in cancer tissues, the patients were divided into two groups: high expression group (60 cases) and low expression group (29 cases). There were no significant differences in sex, age, TBil, ALT, smoking history, tumor numbers, tumor diameter, hepatitis virus infection and autoimmune hepatitis between the two groups ($P > 0.05$). The expression levels of lncRNA FAL1 in patients with lymph node metastasis, low differentiation degree, TNM III~IV phase, portal vein tumor thrombus, completed envelope and liver cirrhosis were higher than those of patients without lymph node

metastasis, high differentiation degree, TNM I ~ II phase, without portal vein tumor thrombus, uncompleted envelope and without liver cirrhosis, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Kaplan-Meier analysis showed that the three-year survival rate (20.1%) in lnc RNA FAL1 high expression group was lower than that of the low expression group (61.2%), the difference was statistically significant ($\chi^2 = 11.575$, $P = 0.001$). lncRNA FAL1 level was an independent risk factor for the prognosis of hepatocellular carcinoma ($RR = 1.952$, 95%CI: 0.627~2.106, $P = 0.014$). **Conclusions** lnc RNA FAL1 is highly expressed in hepatocellular carcinoma tissues, which is an independent risk factor for the prognosis of hepatocellular carcinoma, and can be a potential target for early diagnosis and treatment.

Key words: Hepatocellular carcinoma; Long non-coding RNA FAL1; Prognosis

肝细胞癌的病死率在肿瘤致死疾病中占第2位^[1],但其发病机制尚未完全明确,有研究表明肝细胞癌受自身遗传与环境因素的共同影响^[2]。长链非编码RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 约占全部基因组的98.5%,远高于编码蛋白的1.5%,之前通常被认为对人体无作用^[3],自ENCODE研究计划重启后发现,lncRNA可在转录及转录后水平调节蛋白编码基因的表达^[4],从而广泛参与包括细胞分化和个体发育在内的重要生命过程,lncRNA的异常表达还与多种人类重大疾病的发生密切相关^[5]。FAL1为近年发现的lncRNA,定位于染色体1q21.2,可促进癌细胞株的增殖、迁移与侵袭^[6]。目前国内鲜有关于lncRNA FAL1在肝细胞癌中表达的报道,因此本研究探讨肝细胞癌组织及癌旁组织中lncRNA FAL1表达水平及其与患者临床病理特征和预后的关系,为进一步探究lncRNA FAL1对肝细胞癌的具体作用机制和临床应用提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象 回顾性分析2014年11月至2015年5月于重庆市九龙坡区中医院进行手术治疗的89例肝细胞癌患者的临床病理资料,包括性别、年龄、肿瘤直径、有无淋巴结转移、分化程度、TNM分期、有无门静脉癌栓、有无肝硬化等。所有患者均经病理证实为肝细胞癌。留取患者的癌组织标本及距癌组织边缘>5cm的癌旁组织标本。纳入标准:

①均经肝组织病理证实;②未进行放射治疗和化学治疗等影响试验结果的治疗;③病灶无明显坏死区;④均签署医院伦理委员会知情同意书。排除标准:①临床资料不完整者;②有活动性病毒感染或细菌感染;③合并其他恶性肿瘤者。

1.2 研究方法

1.2.1 实时定量PCR检测lncRNA FAL1表达水平 取冻存的组织标本按照Trizol试剂盒(Fermentas公司)说明书提取总RNA,将RNA反转录为cDNA并以其为模板对lnc RNA FAL1进行实时定量PCR检测。反应体系为25 ml: SYBR Green I qPCR Master Mix 12 ml,上下游引物各1 ml, cDNA模板1 ml,

ddH₂O 10 ml。引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,序列见表1。反应程序为:95℃ 10 min; 95℃ 15 s; 48℃ 30 s; 72℃ 30 s,共40个循环。lnc RNA FAL1以GAPDH为内参基因,采用2^{-ΔΔCt}法计算lnc RNA FAL1的相对表达量。

1.2.2 随访 2015年5月至2018年5月定期通过电话和门诊复查的方式对所有患者进行随访,以连续3次随访失败时间为总体生存时间,统计总生存率。

1.3 统计学处理 采用SPSS 17.0统计软件对数据进行分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验;计数资料以例(%)表示,采用 χ^2 检验;采用Kaplan-Meier生存曲线对肝细胞癌患者术后3年的生存情况进行分析,COX多因素分析判别肝细胞癌预后的独立危险因素,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者的一般资料 89例肝细胞癌患者中男性61例,女性28例;年龄49~70岁,平均(59.51±8.17)岁;病程1~3年,平均病程(2.1±0.4)年;肝硬化15例,肝炎病毒感染17例,自身免疫性肝炎18例,酒精性肝病19例,非酒精性脂肪性肝病20例。

2.2 lncRNA FAL1的表达 肝细胞癌组织lnc RNA FAL1相对表达量为1.73±0.24,显著高于癌旁组织(1.01±0.15),差异有统计学意义($t = 24.00$, $P < 0.001$)。

2.3 肝细胞癌组织lncRNA FAL1的表达与患者临床病理特征的关系 以肝细胞癌组织lnc RNA FAL1表达水平的中位值1.70为界分为低表达组(29例)和高表达组(60例),两组患者的性别、年龄、TBil、ALT、吸烟史、肿瘤数目、肿瘤直径、是否感染肝炎病毒、是否患自身免疫性肝炎等差异无统计学意义($P > 0.05$)。lncRNA FAL1在有淋巴结转移、分化程度低、TNM分期为III~IV期、有门静脉癌栓、包膜完整、有肝硬化患者中的表达量高于无淋巴结转移、分化程度高、TNM分期为I~

II期、无门静脉癌栓、包膜不完整、无肝硬化患者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表2。

2.4 肝细胞癌组织中 lnc RNA FAL1 表达水平与患者预后的关系 用Kaplan-Meier法分析肝细胞癌组织中 lnc RNA FAL1 表达水平与患者生存率的关系, 结果显示 lnc RNA FAL1 高表达组3年内存活率(20.22%)显著低于 lnc RNA FAL1 低表达组(58.62%), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 11.575$, $P = 0.001$), 见图1。

2.5 肝细胞癌患者预后的独立危险因素 为分析与肝细胞癌患者总生存期有关的独立预后因素, 选择性别、年龄、肿瘤数量、肿瘤大小、有无淋巴结转移、分化程度、TNM分期、有无门静脉癌栓、包膜是否完整、有无肝硬化、lncRNA FAL1高表达等变量进行COX多因素分析, 结果显示 lnc RNA FAL1 高表达是预测肝细胞癌患者术后生存期预后的独立危险因素 ($RR = 1.952$, $95\% CI: 0.627 \sim 2.106$, $P = 0.014$), 见表3。

表1 qRT-PCR引物序列

基因	正向引物	反向引物
lnc RNA FAL1	5'-GCAAGCGGAGACTTGTCTTT-3'	5'-TTGAACCTCTGACCTCGTGA-3'
GAPDH	5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'	5'-TGGTGAAGACGCCAGTGA-3'

表2 lncRNA FAL1表达水平与肝细胞癌患者临床参数的关系

组别	性别 (男/女, 例)	年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	TBil ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{mol/L}$)	ALT ($\bar{x} \pm s$, U/L)	吸烟史 (有/无, 例)
低表达组 ($n=29$)	21/8	55.12 \pm 9.18	25.13 \pm 4.05	49.13 \pm 8.12	14/15
高表达组 ($n=60$)	40/20	56.33 \pm 8.97	27.61 \pm 6.12	51.2 \pm 10.18	28/32
统计量值	$\chi^2 = 0.299$	$t = 0.592$	$t = 1.980$	$t = 0.971$	$\chi^2 = 0.020$
P值	0.584	0.555	0.051	0.334	0.887

组别	肿瘤直径 ($\bar{x} \pm s$, cm)	肿瘤数目 (单发/多发, 例)	淋巴结转移 (有/无, 例)	分化程度 (高/中低, 例)	TNM分期 (I ~ II/III ~ IV, 例)
低表达组 ($n=29$)	4.25 \pm 0.16	11/18	6/23	25/4	18/21
高表达组 ($n=60$)	4.32 \pm 0.53	30/30	41/19	13/47	11/49
统计量值	$\chi^2 = 0.639$	$\chi^2 = 1.146$	$\chi^2 = 17.807$	$\chi^2 = 38.285$	$\chi^2 = 8.833$
P值	0.489	0.284	< 0.001	< 0.001	< 0.001

组别	门静脉癌栓 (有/无, 例)	包膜 (完整/不完整, 例)	肝硬化 (有/无, 例)	肝炎病毒感染 (有/无, 例)	自身免疫性肝炎(有/无, 例)
低表达组 ($n=29$)	3/26	3/26	2/27	13/16	10/19
高表达组 ($n=60$)	37/23	37/23	25/35	20/40	27/32
统计量值	$\chi^2 = 16.565$	$\chi^2 = 16.565$	$\chi^2 = 11.184$	$\chi^2 = 1.107$	$\chi^2 = 1.015$
P值	< 0.001	< 0.001	0.001	0.293	0.314

表3 肝细胞癌预后独立危险因素的COX多因素分析

参数	RR (95%CI)	P值
性别	0.535 (0.613~2.174)	0.624
年龄	1.736 (0.920~3.241)	0.630
肿瘤数量	2.703 (1.402~4.237)	0.412
肿瘤大小	0.621 (0.321~1.057)	0.357
有无淋巴结转移	2.211 (0.964~3.218)	0.089
包膜是否完整	2.012 (0.912~2.126)	0.062
分化程度	1.420 (0.628~2.631)	0.053
TNM分期	1.982 (1.021~3.284)	0.067
有无门静脉癌栓	2.134 (1.063~3.125)	0.130
有无肝硬化	1.249 (0.627~2.106)	0.210
lncRNA FAL1高表达	1.952 (0.954~3.276)	0.014

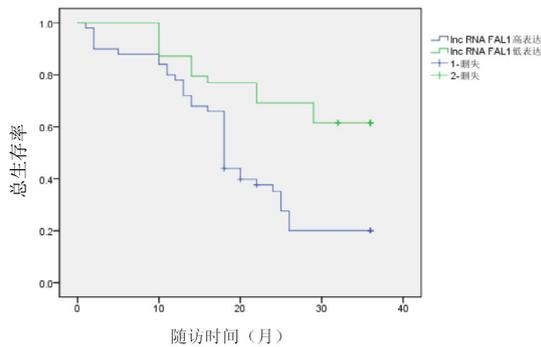


图1 肝细胞癌患者癌组织 lncRNA FAL1 表达水平与总生存率的关系

3 讨论

肝细胞癌是一种常见的恶性肿瘤,占原发性肝癌的91.5%^[7-10],在肿瘤致死疾病中致死率居第2位,男女比例约为2.4:1。肝细胞癌受自身遗传与环境因素共同影响,早期通常无特异性症状,待出现肝部疼痛、有包块等明显症状时已为中晚期,且伴随病灶转移^[11-13]。目前临床多用介入或辅助治疗中晚期肝细胞癌患者^[14]。肝细胞癌的发展是多基因参与的过程,目前已发现多种抑癌基因可能参与癌变进程^[15-20]。lncRNA是一类长度约200 nt的无编码蛋白质功能的RNA分子,有研究表明,lncRNA FAL1异常表达与多种恶性肿瘤发生发展相关^[23]。而有关肝细胞癌中lncRNA FAL1表达的研究较少,因此本研究主要探讨lncRNA FAL1在肝细胞癌中的表达及其与预后的关系。

lncRNA FAL1为近年来新近发现的lncRNA,王晓彤等研究表明,lncRNA FAL1在上皮性卵巢癌中高表达,下调lncRNA FAL1表达可抑制卵巢癌细胞的增殖^[24]。石兴源等研究表明,lncRNA FAL1相对表达量下降可抑制宫颈癌Hela细胞的增殖、侵袭与迁移能力^[25]。本研究结果表明,肝细胞癌组织中lncRNA FAL1的表达水平显著高于癌旁组织,与相关结果类似,提示lncRNA FAL1可能参与肝细胞癌的发生发展。lncRNA FAL1与淋巴结转移、分化程度、TNM分期、门静脉癌栓及肝硬化密切相关,其中高分化组织中lncRNA FAL1的表达水平相对较低,中低分化癌组织中lncRNA FAL1的表达水平相对较高,临床分期III~IV期患者lncRNA FAL1的表达水平显著高于I~II期,提示lncRNA FAL1在肝细胞癌的发展过程中发挥促癌基因的作用且可促进肿瘤细胞的增殖及迁移。Kaplan-Meier生存曲线表明lncRNA FAL1低表达组3年内总生存率高于lncRNA FAL1高表达组,说明肝细胞癌组织中

lncRNA FAL1高表达不利于患者预后,可能原因为lncRNA FAL1在肝细胞癌的迁移过程中发挥重要作用,通过上调表达而增强肿瘤细胞的转移能力进而对患者的预后产生不利影响。此外,COX多因素分析表明,lncRNA FAL1是患者预后的独立危险因素,提示检测lncRNA FAL1对预测肝细胞癌的生物行为与评估预后均具有一定价值。

综上所述,lncRNA FAL1在肝细胞癌组织中高表达,与患者临床病理特征具有显著相关性,其表达水平可成为预测患者肿瘤进展情况与评估预后的重要指标,关于lncRNA FAL1在肝细胞癌中的具体作用机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Li B, Mao R, Liu C, et al. lncRNA FAL1 promotes cell proliferation and migration by acting as a CeRNA of miR-1236 in hepatocellular carcinoma cells[J]. Life Sci,2018,197:122-129.
- [2] Pan C, Yao G, Liu B, et al. Long noncoding RNA FAL1 promotes cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition through the PTEN/AKT signaling axis in non-small cell lung cancer[J]. Cell Physiol Biochem,2017,43(1):339-352.
- [3] Hu X, Feng Y, Zhang D, et al. A functional genomic approach identifies FAL1, as an oncogenic long noncoding RNA that associates with BMI1 and represses p21 expression in cancer[J]. Cancer Cell,2014,26(3):344-357.
- [4] Yang L, Lin C, Jin C, et al. lncRNA-dependent mechanisms of androgen receptor-regulated gene activation programs[J]. Nature,2013,500(7464):598-602.
- [5] 李启炯,宋军民,陆敏,等. CyclinD1在肝细胞癌中的表达及与肝细胞癌患者预后的关系[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版),2012,6(2):355-360.
- [6] 王斌锋,朱昱,王斌,等. PAK5和CyclinD1在肝细胞肝癌中的表达及预后意义[J]. 中华普通外科杂志,2016,31(4):312-315.
- [7] 王玉兰,杜经丽,石怀银,等. Cyclin D1、p21WAF1、p53及Ki-67在肝细胞癌中的表达及与预后的关系[J]. 解放军医学杂志,2014,39(1):20-24.
- [8] 余俊,刘彤鸥,李晓兰. 小分子干扰RNA沉默黏着斑激酶基因对人宫颈癌Hela细胞生物学特征的影响[J]. 新乡医学院学报,2018,35(4):266-271.
- [9] 孙伟鹏,聂常富,韩风,等. 长链非编码RNA CCAT1在肝细胞癌组织及细胞株中的表达及临床意义[J]. 临床肿瘤学杂志,2016,21(4):325-328.
- [10] 张婧婧,化瑞芳,姬颖华,等. 长链非编码RNA基因CCAT2抑制TGF-β信号通路促进非小细胞肺癌细胞的增殖[J]. 第三军医大学学报,2018,40(2):122-129.
- [11] 惠慧,吴磊,付玉兰,等. 长链非编码RNA FAL1对宫颈癌Hela细胞增殖、侵袭与迁移的影响[J]. 现代肿瘤医学,2015,23(15):2096-2099.
- [12] 彭卓,牛泽群,万林,等. 长链非编码RNA MALAT1与非小细胞肺癌患者肿瘤复发和预后的相关性研究[J]. 实用癌症杂志,2017,32(7):1056-1058.
- [13] 张军旗,祝德. 长链非编码RNA MALAT1与非小细胞肺癌患者肿瘤复发和预后的相关性研究[J]. 广西医科大学学报,2016,33(3):459-463.

- [14] Andreana L, Isgrò G, Marelli L, et al. Treatment of hepatocellular carcinoma (HCC) by intra-arterial infusion of radio-emitter compounds: trans-arterial radio-embolisation of HCC[J]. *Cancer Treat Rev*,2012,38(6):641-649.
- [15] 刘兴强, 王霞, 刘超, 等. 长链非编码RNA MALAT1在肝细胞癌行肝切除患者中的表达及临床意义[J]. *天津医药*,2016,44(12):1484-1488.
- [16] 莽源祎, 李立, 冉江华, 等. 长链非编码RNA核富集转录体1调节不均一核糖核蛋白A2蛋白对人肝细胞癌进展的研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2016,33(11):2516-2518.
- [17] 陈嵘, 郭静, 陈丽, 等. 长链非编码RNA AB073614的表达对卵巢上皮性癌细胞系OVCAR3细胞生物学行为的影响[J]. *中华妇产科杂志*,2016,51(12):937-940.
- [18] 李建军, 胡道予, 汤浩, 等. 肝细胞肝癌CT动脉期强化特点与肿瘤病理分化关系的研究[J]. *放射学实践*,2012,27(1):61-64.
- [19] 王玉兰, 杜经丽, 石怀银, 等. Cyclin D1、p21WAF1、p53及Ki-67在肝细胞癌中的表达及与预后的关系[J]. *解放军医学杂志*,2014,39(1):20-24.
- [20] 谢军, 孟凡, 刘永萍, 等. 苦参碱对人肝癌细胞HepG2增殖及凋亡相关蛋白的影响[J]. *实用医学杂志*,2015,31(24):4007-4009.
- [21] 雷蕾, 袁国强, 刘健锋, 等. 枸杞叶中总黄酮对人肝癌细胞HepG2增殖与凋亡的影响[J]. *宁夏大学学报(自然版)*,2014,35(3):255-260.
- [22] Li Y, Zhou L, Lu C, et al. Long non-coding RNA FAL1 functions as a ceRNA to antagonize the effect of miR-637 on the down-regulation of AKT1 in Hirschsprung's disease[J]. *Cell Prolif*,2018,51(5):e12489.
- [23] Jeong S, Lee J, Kim D, et al. Relationship of focally amplified long noncoding on chromosome 1 (FAL1) lncRNA with E2F transcription factors in thyroid cancer[J]. *Medicine (Baltimore)*,2016,95(4):e2592.
- [24] 王晓彤, 谭文华, 刘巍. 抑制长链非编码RNA FAL1表达对上皮性卵巢癌细胞生物学行为的影响及其分子机制[J]. *国际妇产科学杂志*,2018,45(2):221-225.
- [25] 石兴源, 余宏伟, 黄文瑾, 等. 沉默人宫颈癌细胞Hela中FAL1的表达对人宫颈癌细胞Hela增殖、侵袭及迁移的影响[J]. *中国现代医学杂志*,2016,26(17):34-38.

收稿日期: 2018-08-09

王航, 潘莎. 长链非编码RNA FAL1在肝细胞癌患者的表达及其与预后的相关性[J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*, 2019,11(1):58-62.