

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.02.010

· 基础研究 ·

转移性喉鳞状细胞癌组织中长链非编码 RNA 的筛选及鉴定

蒋新霞¹, 池伟伟², 曹欢¹, 杨建旺¹, 王宝山¹ (1. 河北医科大学第二医院耳鼻咽喉科, 河北石家庄 050011; 2. 河北医科大学第一医院耳鼻咽喉科, 河北石家庄 050000)

[摘要] **目的:**应用高通量基因芯片技术进行转移性喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC)中差异表达长链非编码 RNA(long noncoding RNA, lncRNA)的筛选及鉴定,寻找有价值的 LSCC 相关候选基因和分子标志物。**方法:**4 例 LSCC 组织标本均来自河北医科大学耳鼻咽喉头颈外科生物样本库,病理证实为淋巴结转移的 LSCC 组织及癌旁黏膜组织。提取标本组织总 RNA 后,应用 SBC-lncRNA 基因芯片检测差异表达的 lncRNA 及 mRNA,采用差异倍数以及 Student's *t* 法对差异表达基因进行筛选,将差异倍数 (linear) ≤ 0.5 或者 ≥ 2.0 和 $P < 0.05$ 判断为差异表达基因。选取特定的差异表达 lncRNA,应用 qRT-PCR 技术验证芯片结果的可靠性。**结果:**通过对转移性 LSCC 组织和癌旁组织的 lncRNA 表达谱分析显示,转移性 LSCC 组织与癌旁组织的 lncRNA 表达谱存在明显差异,差异表达的 lncRNA 3 073 个,其中癌组织中表达上调 1 967 个、下调 1 106 个;差异表达的 mRNA 2 809 个,其中癌组织中表达上调 1 791 个、下调 1 018 个。差异表达的 lncRNA 主要参与细胞增殖、凋亡及免疫应答等生物学过程,涉及细胞因子及其受体的相互作用、趋化因子信号通路、细胞周期调节、P53 信号通路等。选取其中 10 条具有显著差异表达的 lncRNA,在 25 例 LSCC 标本组织中进行 qRT-PCR 验证,发现表达趋势与芯片检测结果一致。**结论:**转移性 LSCC 组织及癌旁组织的 lncRNA 表达谱存在明显差异,深入分析这些差异表达 lncRNA 的分子作用机制对阐明转移性 LSCC 的侵袭转移机制有重要的意义,可为 LSCC 特异性肿瘤标志物的筛选及有效的靶向治疗提供实验依据。

[关键词] 转移性喉鳞状细胞癌;长链非编码 RNA;差异表达;基因芯片

[中图分类号] R734.1; R730.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)02-0163-07

Screening and identification of long non-coding RNAs in metastatic laryngeal squamous cell carcinoma

JIANG Xinxia¹, CHI Weiwei², CAO Huan¹, YANG Jianwang¹, WANG Baoshan¹ (1. Otorhinolaryngology Department, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 2. Otorhinolaryngology Department, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To search valuable candidate molecular markers for LSCC by screening and identifying differentially expressed long non-coding RNAs (lncRNAs) in metastatic laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) with high throughput gene microarray technique. **Methods:** Four pairs of LSCC tissues and corresponding para-cancer tissues that pathologically confirmed with lymph node metastasis were collected from Bio-sample lab of Otorhinolaryngology Department, the Second Hospital of Hebei Medical University. After total RNA extraction, the SBC-lncRNA (human 4x180k) chip assay was then applied to detect the differentially expressed lncRNAs and mRNAs, and Fold-change and Student's *t*-test methods were used to identify differentially expressed genes; the Fold Change (linear) ≤ 0.5 or ≥ 2.0 , $P < 0.05$ was used to identify the differentially expressed genes. The reliability of the chip results was confirmed by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Results:** The gene expression profiles of metastatic LSCC tissues and corresponding para-cancer tissues were significantly different. There were 3 073 differentially expressed lncRNAs, including 1 967 up-regulated and 1 106 down-regulated lncRNAs in cancer tissues. There were 2 809 differentially expressed mRNAs, including 1 791 up-regulated and 1 018 down-regulated mRNAs in cancer tissues. The differentially expressed lncRNAs were mainly in-

[基金项目] 河北省自然科学基金重点资助项目(No.H2017206391); 河北省政府资助临床医学优秀人才培养和基础课题项目(No.H2017-46)。Project supported by the Key Projects of Natural Science Foundation of Hebei Province(No.H2017206391), and the Subsidized Training and Basic Project of Clinical Medical Talents by Hebei Provincial Government (No.H2017-46)

[作者简介] 蒋新霞(1970-),女,硕士,副主任医师,副教授,主要从事咽喉头颈肿瘤的基础和临床研究,E-mail:jiang_xinxia@163.com

[通信作者] 王宝山(WANG Baoshan, corresponding author),博士,教授,博士生导师,主要从事耳鼻咽喉头颈部肿瘤发病机制的基础和临床研究,E-mail:hebwangbs@163.com

involved in cell proliferation and apoptosis, immune response biological process, and were associated with cytokine and cytokine receptor interaction, chemokine signaling pathway, cell cycle regulation, P53 signaling pathway, etc. In addition, 10 significantly differentially expressed lncRNAs were chosen and validated by qRT-PCR in 25 cases of LSCC tissues, and the results were in agree with microarray detection. **Conclusions:** There were obvious differences in lncRNAs expression between metastasis LSCC and corresponding para-cancer tissues; in-depth analysis of these differences may has important significance on clarifying the mechanisms of invasion and metastasis of LSCC, which can provide the theoretical basis for biomarker screening and effective targeted therapy for LSCC.

[Key words] metastatic laryngeal squamous cell carcinoma; long non-coding RNA (lncRNA); differential expression; gene chip

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(2): 163-169. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.01.010]

喉癌是耳鼻咽喉-头颈外科常见的恶性肿瘤之一,主要组织学类型为喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC)^[1]。由于喉癌发病部位隐蔽,早期自觉症状不明显,其早期发现率及诊断率均较低,其中60%~70%患者就诊时已属于中晚期,尤其是声门上型及声门下型喉癌,常伴有局部或颈淋巴结转移,且喉癌术后复发和转移是导致喉癌患者病死率居高不下的主要原因^[2]。因此,探索喉癌的分子发病机制和转移机制,寻找能够用于喉癌风险评估和预后判断的分子靶点,提供简便的喉癌高危个体筛查及能有效地预测淋巴结转移的候选分子标志物,有效地抑制肿瘤细胞的转移能力,是降低喉癌发病率及病死率的重要途径。近年来,非编码RNA在调控发育、分化和代谢等多个生物学过程中的重要性已引起生物学界的高度关注^[3]。其中长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)作为非编码RNA的一员,可广泛参与多种重要的调控过程^[4]。有研究^[5]表明,lncRNA表达水平上的差异或某些肿瘤类型特异性lncRNA的表达有可能作为肿瘤早期诊断及预后判断的分子标志物和潜在的药物靶点。当前lncRNA和喉癌关系的研究尚处于初级阶段,尚缺乏系统的与喉癌发生、发展及预后相关的特异性lncRNA的筛选及鉴定。本研究采用高通量基因芯片技术筛选及鉴定与LSCC转移相关的特异性lncRNA,以期为LSCC转移相关特异性肿瘤标志物的筛选及有效的靶向治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象和标本来源

研究对象及组织标本来自河北医科大学耳鼻咽喉头颈外科生物样本库。用于芯片检测的4例转移性LSCC患者,均为男性,年龄54~64岁,平均年龄(60.0±4.7)岁。另外用于芯片结果验证的LSCC患者25例,其中男性18例,女性7例,年龄45~73岁,平均(62.0±6.2)岁。所有组织标本的检测均取得患者和家属知情同意,并上报医院伦理委员会批准。所有LSCC患者术前均未经化疗和放疗。每例患者均取LSCC原发灶及癌旁黏膜组织,肿瘤组织及癌旁组织

均经常规病理诊断证实。手术切除标本一部分在新鲜状态下放入液氮冷藏后转到-80℃低温冰箱保存以提取RNA;一部分标本以10%中性甲醛溶液固定,常规制作蜡块保存。4例LSCC患者的临床病理资料见表1。

表1 用于芯片检测的4例LSCC患者的临床病理资料

Tab. 1 The clinicopathological characteristics of the 4 LSCC cases for chip assay

Sample	Gender	Age(t/a)	Pathologic type	TNM stage
1	Male	64	LSCC	T1N2M0
2	Male	54	LSCC	T1N2M0
3	Male	65	LSCC	T1N2M0
4	Male	57	LSCC	T4N2M0

1.2 主要材料和试剂

所用基因芯片为Agilent SBC-lncRNA表达谱芯片,包含77 103个lncRNA及18 853个mRNA,来源于Gencode v21/Ensemble Lncrnadb Noncode数据库。总RNA提取试剂盒和RNA纯化试剂盒购自QIAGEN公司,逆转录试剂盒购自罗氏公司,Agilent表达谱芯片配套试剂盒购自Agilent公司,qPCR试剂盒购自Promega公司。

1.3 基因芯片筛查

根据TaKaRa公司总RNA提取试剂盒说明书提供的标准操作流程进行样品的总RNA抽提,抽提所得总RNA经分光光度及电泳进行质检,评估样本总RNA的完整性、浓度和纯度,质检合格的RNA进行纯化。实验样品RNA按照Agilent表达谱芯片配套试剂盒标准操作流程对样品总RNA进行放大和标记,并用纯化标记后的cDNA。按照Agilent表达谱芯片配套提供的杂交标准流程和配套试剂盒,在65℃杂交炉以10 r/min滚动杂交17 h,得到杂交cDNA上样量1.65 μg,再在洗缸中洗片。完成杂交的芯片采用Agilent微阵列芯片扫描仪进行扫描,绿色扫描分辨率为3 μm,软件设置染色通道。用10.7特征提取软件读取数据,最后采用R软件中Limma包进行归一化处理,采用Quantile方法计算分析。

1.4 基因芯片的数据处理

将原始数据进行归一化处理后,用箱线图(Box plot)来观察各样本归一化数据分布的整体特征。采用表达差异倍数(Fold-change)以及 Student's-*t* 检验方法对差异表达基因进行筛选。挑选条件如下:(1) Fold change (linear)≤0.5 或 Fold change (linear) ≥2.0; (2)*t*检验后 *P*<0.05。将表达基因或者差异基因数据做聚类分析。芯片的原始数据经过标准化处理,转化为 log₂数值后,在一个二维坐标系中,绘制散点图(scatter plot)用于评估两组数据总体分布情况。对样本和基因分别进行分级聚类之后,通过聚类热图(heatmap)直观地展现基因在不同样本中的表达情况。对差异表达的基因进行基因功能分类分析(gene ontology, GO)和 KEGG pathway 注释分析(*P*值阈值设为0.05),寻找差异表达基因集中的生物学信号通路,同时进行 lncRNA 靶基因的预测。

1.5 采用 qRT-PCR 法验证基因芯片的数据结果

根据 QIAGEN 公司总 RNA 提取试剂盒说明书提供的标准操作流程提取 25 例 LSCC 患者(表 2)的癌组织及癌旁组织中总 RNA,并参照罗氏公司逆转录试剂盒说明书要求加样,将 RNA 逆转录成 cDNA。对芯片结果中部分差异表达基因进行 qRT-PCR 验

证。以 cDNA 为模板,扩增目的基因,以 *GAPDH* 基因作为内参照,引物序列见表 3。每个样本同时做 3 个复孔,根据获得的 Ct 值进行基因相对定量分析,以 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 计算 LSCC 组织与其癌旁组织目的基因的相对表达水平^[6]。随机选取 10% 的样本进行重复实验。

表 2 用于 qRT-PCR 验证的 25 例 LSCC 患者的临床病理资料
Tab.2 The clinicopathological characteristics of the 25 LSCC cases for qRT-PCR test

Characteristics		n(%)
Gender	Male	18(72)
	Female	7(28)
Age(<i>t/a</i>)	≥65	14(56)
	<65	11(44)
TNM stage	I	6(24)
	II	8(32)
	III	9(36)
	IV	2(8)
Lymphnode metastasis	Yes	13(52)
	No	12(48)
Pathological differentiation	High	10(40)
	Medium	10(40)
	Low	5(20)

表 3 采用 qRT-PCR 方法进行验证的差异表达的 lncRNA 引物及产物大小
Tab. 3 Primer sequences and product size of differentially expressed lncRNAs by qRT-PCR

Gene	Expression status in microarray	Primer sequence	Product size (bp)
<i>TINCR</i>	up	F:5'-TCCCAGGTGGACCATGAAAC-3' R:5'-ACAGCAGAGCTGAAAGGCTC-3'	152
<i>LINC00520</i>	up	F:5'-CCATTGAAGACCGTAACAC-3' R:5'-GAAGTAGAGTAGCCAGGATT-3'	103
<i>LINC00511</i>	up	F:5'-GGGCGACTACTGTTACCTCG-3' R:5'-TCCTCACACGTCCAAACAG-3'	104
<i>MIR155HG</i>	up	F:5'-CCCAAATCTAGGTTCAAGTTC-3' R:5'-CATCTAAGCCTCACAACAAC-3'	138
<i>H19</i>	up	F:5'-TTTAGTAGCAGGCACAGGGG-3' R:5'-CTCCTTGCTGCGCAATGTC-3'	171
<i>HOTAIR</i>	up	F:5'-AGGCAAATGTCAGAGGGTT-3' R:5'-CTTAAATTGGGCTGGGTC-3'	199
<i>ZNF667-AS1</i>	down	F:5'-CATCACTACCATCCATCACTA-3' R:5'-CCAGGCAGAGAAGGATAA-3'	186
<i>MEG3</i>	down	F:5'-TACACCTCACGAGGGCACTA-3' R:5'-CAGGGCTTAATGCCCAATGC-3'	187
<i>MALAT1</i>	No difference	F:5'-ATTCCGGTGATGCGAGTTGT-3' R:5'-TCTGCGGTTTCCTCAAGCTC-3'	125
<i>HULC</i>	No difference	F:5'-CAGACCAAAGCATCAAGCAAGA-3' R:5'-ACAAATTTGCCACAGGTTGAACA-3'	100
<i>GAPDH</i>		F:5'-AGGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3' R:5'-AGGGGTCATTGATGGCAACA-3'	104

1.6 统计学处理

应用 SPSS 19.0 软件学统计, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用配对或不配对的 t 检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 提取的样本总 RNA 纯度较高

所有组织样本总 RNA 经电泳质检后, 可观察到 18 S 和 28 S 两条清晰的电泳条带, 说明提取的样本总 RNA 完整性较好、未发生降解。此外, 测定各样本总 RNA 的 D_{260}/D_{280} 比值为 1.8~2.0, 说明样本总 RNA 的纯度较高, 无明显的蛋白质污染, 可用于芯片实验和 qRT-PCR 检测(表 4)。

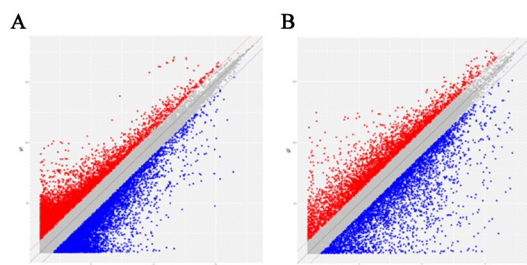
表 4 用于芯片检测的 LSCC 组织 RNA 质检结果

Tab.4 The quality control of the LSCC tissues for chip assay

Sample	RNA [$\rho_{\text{B}}/(\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1})$]	D_{260}/D_{280}	RIN	28S/18S
1C	677	2.01	7.2	1.1
1N	230	1.92	7.2	0.7
2C	382	1.92	7.0	0.7
2N	164	1.85	7.1	0.9
3C	344	1.96	7.8	1.3
3N	203	1.88	7.0	0.8
4C	466	2.03	8.4	1.5
4N	74	1.92	7.7	1.1

2.2 LSCC 组织中筛选的 lncRNA 和 mRNA 的差异表达情况

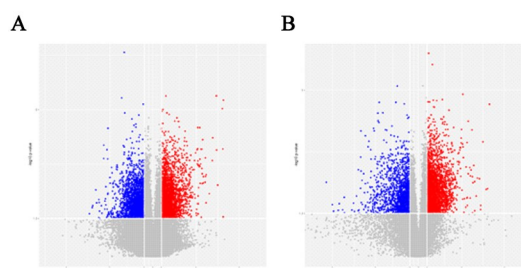
按照差异基因筛选标准, 差异表达的 lncRNA 共 3 073 个, 其中癌组织中表达上调 1 967 个、下调 1 106 个; 差异表达的 mRNA 共 2 809 个, 其中癌组织中表达上调 1 791 个、下调 1 018 个(图 1、2)。



A: lncRNA distribution; B: mRNA distribution. Up-regulated genes in cancer tissue by red expression; Down-regulated genes in cancer tissue by blue expresses

图 1 LSCC 组织和癌旁组织中差异表达的 lncRNA 及 mRNA 散点分布图

Fig. 1 Scatter plot of the lncRNA and mRNA distribution in LSCC tissues and corresponding para-cancer tissues



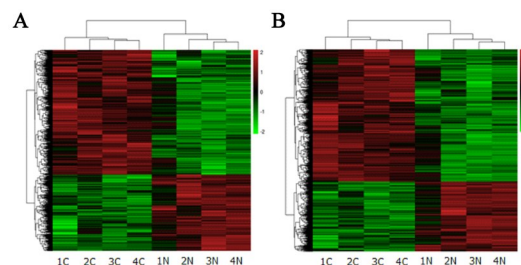
A: lncRNA distribution; B: mRNA distribution. Up-regulated genes in cancer tissue by red expression; Down-regulation genes in cancer tissue by blue expresses

图 2 LSCC 组织和癌旁组织中差异表达的 lncRNA 及 mRNA 火山分布图

Fig. 2 Volcano plot of the lncRNA and mRNA distribution in LSCC tissues and corresponding para-cancer tissues

2.3 lncRNA 和 mRNA 表达谱明显不同

分层聚类分析是使用较广泛的一种分析核苷酸表达数据的聚类方法, 根据差异表达数据的特征进行分类, 得到样本和核苷酸在表达模式上的关系, 可得出具有生物学意义的结论。红色表示差异表达相对较高的核苷酸, 绿色表示表达相对较低的核苷酸, 可以看出两组间的 lncRNA 和 mRNA 表达谱明显不同(图 3)。



A: lncRNA distribution; B: mRNA distribution

图 3 LSCC 组织和癌旁组织中 lncRNA 及 mRNA 表达的聚类热图

Fig. 3 Heat-map of the lncRNA and mRNA expression in LSCC tissues and corresponding para-cancer tissues

2.4 GO 富集分析富集倍数最高的生物过程、细胞组成及分子功能

通过 GO 分析差异表达的 mRNA 结果(图 4)显示, 富集倍数最高的生物过程是 DNA 复制中的解螺旋过程(DNA unwinding involved in DNA replication), 富集倍数最高的细胞组成是着丝点外浓度染色质(condensed chromosome outer kinetochore), 富集倍数最高的分子功能包括单链 DNA 介导的 ATP 酶激活(single-stranded DNA-dependent ATPase activity)和肌球蛋白轻链结合(myosin light chain binding)。

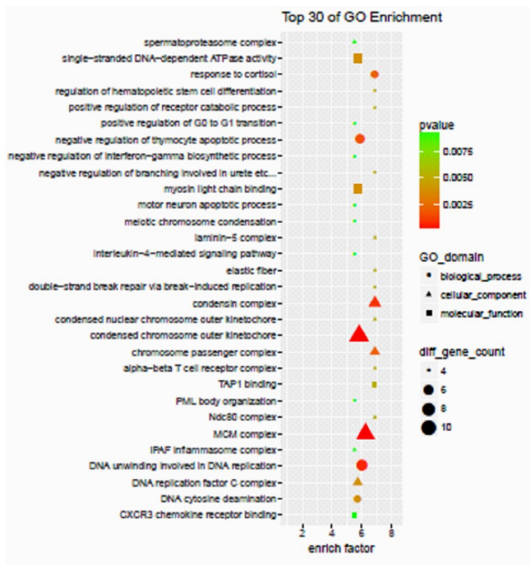


图4 差异表达mRNA的GO分析
Fig. 4 GO analysis of the differentially expressed mRNAs

2.5 KEGG pathway 分析发现多条与差异表达mRNA 相关的信号通路

通过对差异表达 mRNA 进行 KEGG pathway 分析, 结果发现多条与差异表达 mRNA 相关的信号通路, 其中富集程度较高为细胞因子与细胞因子受体的相互作用通路、趋化因子信号通路、细胞周期调节通路和 P53 信号通路等(图5)。

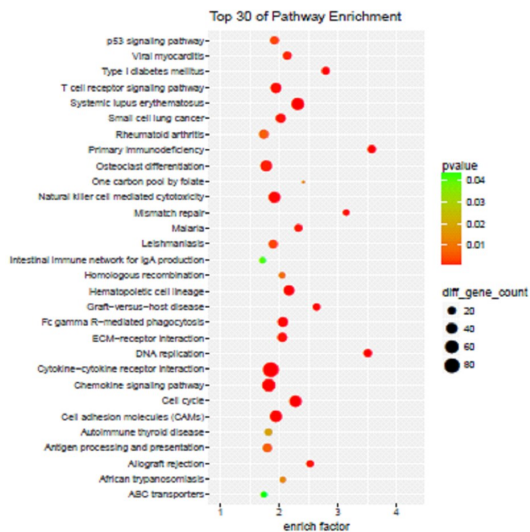


图5 差异表达mRNA的KEGG pathway分析
Fig. 5 KEGG pathway analysis of the differentially expressed mRNAs

2.6 lncRNA 的表达情况与基因芯片中的结果有很好的 一致性

根据基因芯片检测结果, 选择了在肿瘤组织中 高表达 lncRNA 有 *TINCR*、*LINC00520*、*LINC00511*、

MIR155HG、*HI9*、*HOTAIR*, 在肿瘤组织中低表达 lncRNA 有 *ZNF667-AS1* 和 *MEG3*, 表达无明显差异 lncRNA 有 *MALAT1* 和 *HULC*, 应用 qRT-PCR 的方法检测了其在 25 例 LSCC 患者的癌组织及癌旁组织中的表达情况, 对基因芯片结果进行进一步的验证。结果(图6)显示, qRT-PCR 检测的各 lncRNA 的表达情况与基因芯片中的结果有很好的 一致性, 芯片中在 LSCC 组织中表达高 40 倍的 *LINC00520* 在验证结果中表达显著高于癌旁组织 ($P < 0.01$), *ZNF667-AS1* 和 *MEG3* 在 LSCC 组织中的表达显著低于癌旁组织, 而且在芯片中表达无差异的 *MALAT1* 和 *HULC*, 在验证结果中也无明显差异 ($P > 0.05$)。

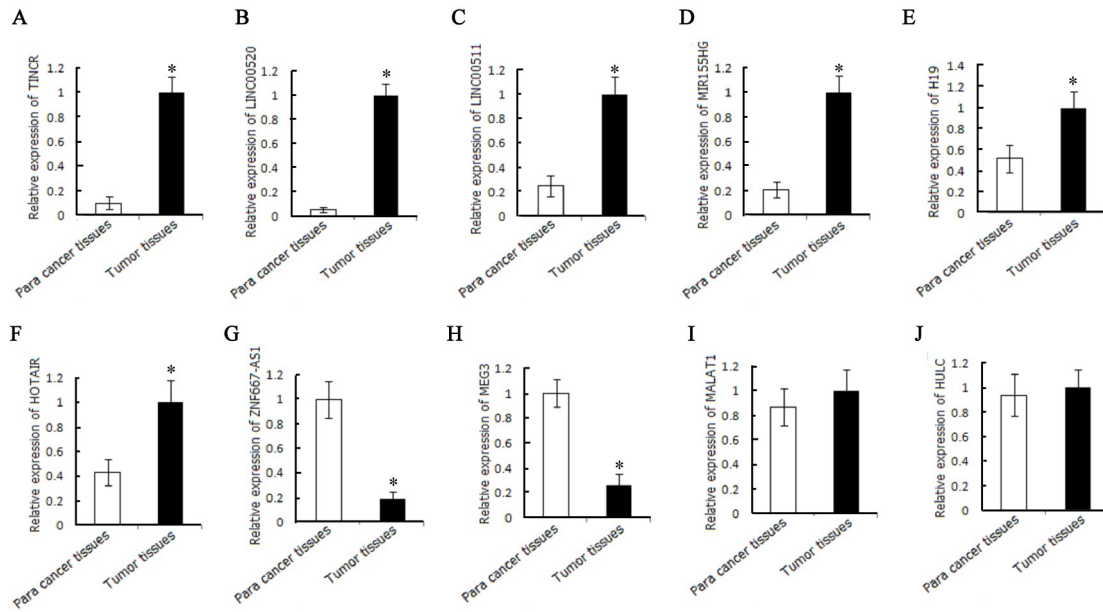
3 讨 论

喉癌是耳鼻咽喉-头颈外科常见的恶性肿瘤之一, 位居头颈部上皮源性恶性肿瘤的第 2 位, 约占全身肿瘤发病的 5.7%~7.6%, 占每年全球新发恶性肿瘤的约 2.4%, 其主要组织学类型为 LSCC^[1]。LSCC 易转移的特征和较高的术后复发率使得病死率居高不下。研究^[2]表明, LSCC 的发病原因包括吸烟、乳头状瘤病毒感染以及不良饮食习惯等, 但 LSCC 发生发展的原理及肿瘤细胞转移分子机制仍未明确, 针对 LSCC 的靶向药物及基因治疗方法亦十分有限。

人类基因组包含两类遗传信息: 一类是传统意义上的遗传信息, 即 DNA 序列所提供的生命必须的蛋白质模板遗传信息; 另一类是表观遗传学信息, 它提供具体遗传信息的指令, 调控某组基因何时、何处表达及其表达的程度。两者密不可分并相互协调, 共同确保细胞乃至生命有机体的正常功能^[7]。非编码 RNA 作为参与表观遗传调控的重要分子, 近年来越来越受到人们的关注。基因组测序结果显示, 具有编码蛋白质功能的基因仅占全部基因组序列的大约 1.5%, 大量的非编码调控序列转录成非编码 RNA^[3]。非编码 RNA 包括 microRNA (miRNA)、siRNA 等为代表的短小 RNA 和 lncRNA, 与 miRNA 相比, lncRNA 在数量上占的比例更大。lncRNA 主要由 RNA 聚合酶 II 所转录, 是一类转录本长度大于 200 nt 的 RNA, 其本身缺乏明显的开放阅读框, 位于细胞核内或细胞质中, 不参与蛋白质编码功能, 最初被认为是基因组转录的“噪音”, 不具有任何生物学功能。但近年来的研究^[4]表明, lncRNA 可以 RNA 形式在表观遗传学、转录调控及转录后调控等多种层面上调控基因的表达水平, 可参与基因组印记以及染色质修饰、X 染色体沉默、转录干扰、转录激活、核内运输等多种重要的调控过程。当前 lncRNA 和 LSCC 关系的研究尚处于初级阶段, 仅有极少量的研究表明 lncRNA

cRNA 参与了 LSCC 的发生发展过程, 而且仅涉及 *H19*、*HOTAIR* 等比较热点的 lncRNA 在 LSCC 浸润转

移中的作用^[8-9], 尚缺乏与 LSCC 发生、发展、预后相关的特异性 lncRNA 系统的筛选及鉴定。



* $P < 0.01$ vs Para cancer tissues

A: *TINCR*; B: *LINC00520*; C: *LINC00511*; D: *MIR155HG*; E: *H19*; F: *HOTAIR*; G: *ZNF667-AS1*; H: *MEG3*; I: *MALAT1*; J: *HULC*

图6 LSCC组织及癌旁组织中10个lncRNAs的相对表达水平

Fig 6 Relative expression of 10 lncRNAs in LSCC tissues and corresponding para-cancer tissues

LncRNA 微阵列芯片是目前应用较广泛的高通量检测 lncRNA 表达情况的重要工具, 本研究以 4 例转移性 LSCC 患者的癌组织与癌旁组织样本作为研究对象, 在全基因组范围内研究与转移性 LSCC 相关的 lncRNA 及 mRNA 表达谱的变化。结果显示, 转移性 LSCC 患者的癌组织与癌旁组织样本的 lncRNA 及 mRNA 表达谱有显著差异, 选取 10 个 lncRNA 应用 qRT-PCR 的方法在扩大样本中进行验证的结果也与芯片结果一致, 结合样本间较好的相关性及基因层级聚类分析, 提示本研究中的芯片结果是可信的。

虽然 LSCC 中 lncRNA 的研究较少, 但也有报道 lncRNA 的表达与本研究的芯片结果及验证结果一致。如 Wu 等^[8]研究显示, *H19* 在 LSCC 组织中表达显著上调并且与不良预后相关, 敲低 *H19* 可抑制 LSCC 细胞的增殖、侵袭及转移。Li 等^[9]发现, *HOTAIR* 在 LSCC 组织中表达显著上调并与组织学分化程度和临床病理分期明显相关。Zheng 等^[10]也发现, *HOTAIR* 在 LSCC 组织中表达上调并参与了 *EZH2* 的调节。本研究同样发现并验证了 *H19* 与 *HOTAIR* 在 LSCC 中的高表达, 与文献报道有很大的一致性。同时, 虽然一些 lncRNA 在 LSCC 中无相关报道, 但经文献检索发现, 在其他类型肿瘤中有报道的 lncRNA 的表达与本研究中的芯片结果依然有很好的 consistency。如本研究中发现在 LSCC 组织中比癌旁组织中表达

高将近 35 倍的 *LINC00520*, 在乳腺癌中同样显著高表达^[11], 本研究中在 LSCC 组织中显著表达降低的 *ZNF667-AS1* 及 *MEG3*, 在乳腺癌^[12]、食管癌^[13]、贲门癌^[14]中有同样的表达趋势。但是, 在对差异 lncRNA 进行文献分析时, 笔者还发现一些与文献^[15-16]报道不一致的 lncRNA, 有研究者报道在多种肿瘤中均表达增高^[17-18], 但本实验的基因芯片检测结果及验证结果中均未显示出其在 LSCC 组织及癌旁组织中表达有显著差异。主要原因: (1) lncRNA 的表达存在肿瘤组织类型特异性, 如肝癌细胞中可特异性地高表达 *HULC*^[19], 而在其他肿瘤细胞中表达变化却不明显, 本研究基因芯片结果也同样提示 *HULC* 在 LSCC 组织及癌旁组织中的表达无差异; (2) 可能是 LSCC 患者的个体差异所致, 某些 lncRNA 在不同的患者中的表达可能存在差异; (3) 样本量较少, 有待扩大样本量进行下一步验证。

本研究通过表达谱芯片筛选了与 LSCC 转移相关的 lncRNA, 并进行了初步验证。通过文献比较也肯定了本研究中表达谱芯片检测结果的可信性, 但由于表达谱芯片的费用昂贵, 在目前的检测样本下实验结果具有一定的局限性。下一步研究扩大样本量, 对结果进行进一步的验证, 并在后续实验中对差异表达的 lncRNA 进行进一步的功能分析, 以期阐明 LSCC 转移的分子机制, 为早期诊断和治疗提供可靠的保障。

[参考文献]

- [1] BARROSO RIBEIRO R, RIBEIRO BREDA E, FERNANDES MONTEIRO E. Prognostic significance of nodal metastasis in advanced tumors of the larynx and hypopharynx[J]. *Acta Otorrinolaringol Esp*, 2012, 63(4): 292-298. DOI:10.1016/j.otorri.2012.02.012.
- [2] SPRIANO G, PIANTANIDA R, PELLINI R, et al. Elective treatment of the neck in squamous cell carcinoma of the larynx: clinical experience[J]. *Head & Neck*, 2002, 25(2): 97-102. DOI: 10.1002/hed.10170.
- [3] DENG G, SUI G. Noncoding RNA in oncogenesis: a new era of identifying key players[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(9): 18319-18349. DOI:10.3390/ijms140918319.
- [4] YAN B, WANG Z. Long noncoding RNA: its physiological and pathological roles[J]. *DNA Cell Biol*, 2012, 31(Suppl 1): S34-S41. DOI: 10.1089/dna.2011.1544.
- [5] GUTSCHNER T, DIEDERICH S. The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view[J]. *RNA Biol*, 2012, 9(6): 703-719. DOI:10.4161/rna.20481.
- [6] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-delta C(T) method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- [7] YOU J S, JONES P A. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin[J]. *Cancer Cell*, 2012, 22(1): 9-20. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.06.008.
- [8] WU T, QU L, HE G, et al. Regulation of laryngeal squamous cell cancer progression by the lncRNA H19/miR-148a-3p/DNMT1 axis [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(10): 11553-11566. DOI:10.18632/oncotarget.7270.
- [9] LI D, FENG J, WU T, et al. Long intergenic noncoding RNA hotair is overexpressed and regulates PTEN methylation in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Am J Pathol*, 2013, 182(1): 64-70. DOI:10.1016/j.ajpath.2012.08.042.
- [10] ZHENG J, XIAO X, WU C, et al. The role of long non-coding RNA HOTAIR in the progression and development of laryngeal squamous cell carcinoma interacting with EZH2[J]. *Acta Otolaryngol*, 2017, 137(1): 90-98. DOI:10.1080/00016489.2016.1214982.
- [11] 刘胜男,徐凤楼,卢帆,等.长链非编码RNAXLOC_005009对食管鳞状细胞癌生物学特性的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(7): 700-707. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.07.002.
- [12] HENRY W S, HENDRICKSON D G, BECA F, et al. LINC00520 is induced by Src, STAT3, and PI3K and plays a functional role in breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(50): 81981-81994. DOI: 10.18632/oncotarget.11962.
- [13] VRBA L, FUTSCHER B W. Epigenetic silencing of MORT is an early event in cancer and is associated with luminal, receptor positive breast tumor subtypes[J]. *J Breast Cancer*, 2017, 20(2): 198. DOI:10.4048/jbc.2017.20.2.198.
- [14] DONG Z, ZHANG A, LIU S, et al. Aberrant methylation-mediated silencing of lncRNA MEG3 functions as a ceRNA in esophageal cancer[J]. *Mol Cancer Res*, 2017, 15(7): 800-810. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0385.
- [15] GUO W, DONG Z, LIU S, et al. Promoter hypermethylation-mediated downregulation of miR-770 and its host gene MEG3, a long non-coding RNA, in the development of gastric cardia adenocarcinoma [J]. *Mol Carcinog*, 2017, 56(8): 1924-1934. DOI:10.1002/mc.22650.
- [16] 董龙宝,薛洁,黄安乐,等.褪黑素通过促凋亡协同增强顺铂对人喉癌细胞增殖的抑制作用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(6): 620-626. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.06.008.
- [17] LI C, CUI Y, LIU L F, et al. High expression of longnoncodingrna malat1 indicates a poorprognosis and promotesclinicalprogression and metastasis in bladdercancer[J]. *Clin Genitourin Cancer*, 2017, 15(5): 570-576. DOI:10.1016/j.clgc.2017.05.001.
- [18] WU L, WANG X, GUO Y. Long non-coding RNA MALAT1 is up-regulated and involved in cell proliferation, migration and apoptosis in ovarian cancer[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(6): 3055-3060. DOI: 10.3892/etm.2017.4304.
- [19] PANZITT K, TSCHERNATSCH M M, GUELLY C, et al. Characterization of HULC, a novel gene with striking up-regulation in hepatocellular carcinoma, as noncoding RNA[J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(1): 330-342. DOI:10.1053/j.gastro.2006.08.026.

[收稿日期] 2017-09-30

[修回日期] 2017-11-20

[本文编辑] 王映红

· 读者·作者·编者·

文稿中须写成斜体的外文字符

在科技文稿中出现许多外文字符,它们有的是正体、有的是斜体。正体和斜体外文字符各有其特定含义和用法,切不可混淆使用。现根据有关标准和规则,把生物医学文稿中须要写成斜体的外文字符归纳为以下几类:

- (1) 生物学中拉丁学名的属名和种名(包括亚属、亚种、变种)应斜体,例如大肠杆菌 *Escherichia coli*、幽门螺杆菌 *Helicobacter pylori* 等。
- (2) 各种基因的缩写符号应斜体(基因表达产物缩写符号应写成正体),例如人脆性X智力低下基因1的符号为 *FMR1*、原癌基因 *RAF1*(人)、病毒癌基因 *v-raf-1*(鼠)、抑癌基因 *p53*(鼠)等。
- (3) 限制性内切核酸酶缩写符号中前3个字母应斜体,例如 *Hind* III、*Bam* H I、*Sal* I 等。
- (4) 各种统计学符号应斜体,例如样本数 *n*、均数 \bar{x} 、样本差 *s*、*t* 检验、*F* 检验、概率 *P*、相关系数 *r* 等。
- (5) 各种物理量的量符号应斜体(pH用正体除外),例如长度 *L*(*l*)、面积 *A*(或 *S*)、体积 *V*、质量 *m*、时间 *t*、压力 *p*、相对分子质量 *M_r*、物质的量浓度 *c_B* 等。
- (6) 化学中表示旋光性、分子构型、构象、取代基等符号应斜体,例如左旋 *L*—、右旋 *D*—、邻位 *o*—、对位 *p*—、反式 *trans*—、顺式 *cis*— 等。
- (7) 数学中用字母表示的变数和一般函数应斜体。
- (8) 英文中使用的某些拉丁词应斜体,例如 *vs*、*in situ*、*in vivo*、*in vitro* 等。

(本刊编辑