

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.04.012

· 临床研究 ·

## lncRNA DGCR5在食管鳞状细胞癌组织中的表达及其临床意义

段玉青<sup>a</sup>, 王梦杰<sup>a</sup>, 王洪琰<sup>b</sup>, 王郁<sup>a</sup>, 桑梅香<sup>c</sup>, 刘丽华<sup>a</sup>(河北医科大学第四医院 a. 肿瘤免疫科; b. 胸外科; c. 科研中心, 河北 石家庄 050035)

**[摘要]** **目的:** 探讨长链非编码RNA DiGeorge综合征临界区基因5(digeorge syndrome critical region gene 5, DGCR5)在食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)组织中的表达及其与患者临床病理特征和预后的相关性。**方法:** 利用生物信息学方法对TCGA数据库中ESCC数据集的DGCR5表达进行分析。收集2016年8月至2017年3月河北医科大学第四医院手术切除60例ESCC患者的癌及癌旁组织标本,用qPCR检测ESCC组织中DGCR5的表达水平,分析DGCR5表达与ESCC患者临床病理特征和预后的相关性。**结果:** TCGA数据库分析结果显示,DGCR5在ESCC组织中的表达水平显著高于正常食管组织( $P<0.01$ )。ESCC组织中DGCR5表达水平显著高于癌旁组织( $P<0.01$ )。DGCR5表达水平与ESCC患者TNM分期和淋巴结转移呈显著性相关(均 $P<0.05$ )。Kaplan-Meier单因素分析显示,高表达DGCR5的ESCC患者2年生存率显著低于低表达DGCR5患者( $P<0.05$ )。**结论:** DGCR5在ESCC组织中呈高表达状态,共表达与TNM分期、淋巴结转移及预后不良密切相关,可能成为ESCC早期诊断及预后判断的分子标志物。

**[关键词]** 食管鳞状细胞癌;长链非编码RNA;DiGeorge综合征临界区基因5;TCGA数据库;生存分析

**[中图分类号]** R735.1;R730.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)04-0416-04

## Expression of lncRNA DGCR5 in esophageal squamous cell carcinoma tissues and its clinical significance

DUAN Yuqing<sup>a</sup>, WANG Mengjie<sup>a</sup>, WANG Hongyan<sup>b</sup>, WANG Yu<sup>a</sup>, SANG Meixiang<sup>c</sup>, LIU Lihua<sup>a</sup> (a. Department of Tumor Immunotherapy; b. Department of Chest Surgery; c. Research Center, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050035, Hebei, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression of long non-coding RNA (lncRNA) DiGeorge syndrome critical region gene 5 (DGCR5) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) tissues, and to analyze its relationship with clinicopathological features and prognosis of ESCC patients. **Methods:** The expression of DGCR5 in ESCC data set from TCGA database was analyzed by bioinformatics method. Sixty pairs of ESCC tissues and para-cancerous tissues resected at the Fourth Hospital of Hebei Medical University from August 2016 to March 2017 were collected for this study. The expression of DGCR5 in ESCC tissues was detected by qPCR. The correlation between the expression of DGCR5 and the clinicopathological features and prognosis of ESCC patients was analyzed. **Results:** TCGA database analysis showed that the expression of DGCR5 in ESCC tissues was significantly higher than that in normal esophageal tissues ( $P<0.01$ ). The expression of DGCR5 in ESCC tissues was significantly higher than that in para-cancerous tissues ( $P<0.01$ ). The expression level of DGCR5 was significantly correlated with TNM staging and lymph node metastasis in ESCC patients (all  $P<0.05$ ). Kaplan-Meier univariate analysis showed that the 2-year survival rate of ESCC patients with high DGCR5 expression was significantly lower than that of patients with low expression ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** DGCR5 is highly expressed in ESCC tissues and is closely related to TNM staging, lymph node metastasis and poor prognosis, which may serve as a molecular marker for early diagnosis and prognosis prediction of ESCC.

**[Key words]** esophageal squamous cell carcinoma (ESCC); long non-coding RNA (lncRNA); DiGeorge syndrome critical region gene 5 (DGCR5); TCGA database; survival analysis

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(4): 416-419. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.04.012]

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 81871894)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81871894)

**[作者简介]** 段玉青(1987-),女,博士,主治医师,主要从事肿瘤免疫治疗的临床与基础研究,E-mail: duanyuqing29@sina.cn

**[通信作者]** 刘丽华(LIU Lihua, corresponding author),博士,教授、主任医师,博士生导师,主要从事肿瘤免疫治疗的临床与基础研究,E-mail: lihualiu567@hotmail.com

食管癌在世界范围内是第7大常见癌症,也是第6大常见癌症相关的死亡原因<sup>[1]</sup>。在中国,食管癌作为常见的上消化道恶性肿瘤,发病率及病死率均较高,严重影响全民身体健康。根据病理类型,食管癌分为鳞状细胞癌和腺癌2种,中国90%左右的食管癌病理类型为食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)<sup>[2]</sup>。尽管近年来手术、放疗、化疗、免疫治疗等不断取得进步,但中国食管癌患者的5年生存率仅为30%<sup>[3]</sup>。随着高通量RNA测序技术(RNA-Seq)和生物信息学分析技术的发展,越来越多的差异表达的长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)被鉴定出来,并发现lncRNA的异常表达与ESCC的发生、发展和转移均密切相关<sup>[4-5]</sup>。DiGeorge综合征临界区基因5(digeorge syndrome critical region gene 5, DGCR5)是位于人类染色体22q11.2区域上的lncRNA,其长度为3 334 bp,在肺癌、膀胱癌、肝癌等细胞增殖、凋亡、侵袭和转移中发挥重要的调控作用<sup>[6-8]</sup>,然而DGCR5在ESCC中的表达及临床意义尚未见报道。本研究通过检测DGCR5在ESCC组织中的表达水平,分析其表达与患者临床病理特征及预后的关系,旨在为ESCC的临床诊断和治疗提供新的理论基础。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

随机选取2016年8月至2017年3月在河北医科大学第四医院胸外科行根治性肿瘤切除术的60例ESCC患者的癌及癌旁组织(取自距离癌灶边缘5 cm以外的癌旁组织)标本,其中男性33例、女性27例,年龄50~76岁、中位年龄63岁。所有患者术前3个月内未行任何放化疗等抗肿瘤治疗,并均于术后经病理学确诊为ESCC。组织标本按照国际抗癌联盟(UICC)第八版标准进行TNM分期:I/II期29例、III期31例。标本取材后迅速置于RNA保存液中,提取总RNA,逆转录成cDNA后保存于-80℃冰箱待用。所有研究对象对本研究均签署知情同意书,研究方案经河北医科大学第四医院伦理委员会批准。

### 1.2 主要试剂及仪器

DGCR5和GAPDH引物由上海瑞博生物技术公司合成。RNA保存液购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司,TRIzol Quick总RNA提取试剂购自北京索莱宝科技有限公司,qPCR Mix购自武汉爱博泰克生物科技有限公司,逆转录试剂盒购自美国Thermo Fisher Scientific公司。qPCR仪、电泳仪和凝胶成像系统均购自美国Thermo Fisher Scientific公司,超速冷冻离心机购自北京六一生物科技有限公司。

### 1.3 DGCR5在TCGA数据库中表达分析

利用UALCAN在线分析工具(<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>)对TCGA数据库中ESCC数据进行基因表达分析。在网站主页输入目的基因DGCR5,选择ESCC组织,获得目的基因DGCR5在ESCC组织和正常食管组织中表达的相关数据。

### 1.4 qPCR检测ESCC组织中DGCR5的表达水平

按TRIzol说明书提取收集的ESCC组织和癌旁组织中的总RNA,测定RNA纯度及浓度,按照逆转录试剂盒说明书进行从RNA到cDNA的操作制备,反应条件为:40℃ 60 min,25℃ 5 min,75℃ 5 min。然后以1 μl cDNA配置qPCR体系,采用GAPDH作为内参,引物序列:DGCR5 F为5'-TCAGAGTGGCGAAGGCAGGAG-3',R为5'-GCAACTCAAGTAAGTCCGCACCT-3';GAPDH F为5'-TCAGAGTGGCGAAGGCAGGAG-3',R为5'-GCAACTCAAGTAAGTCCGCACCT-3'。qPCR扩增条件:95℃ 3 min;95℃ 5 s,60℃ 32 s,共40个循环。扩增结束后,根据每孔荧光信号达到阈值时经历的循环数作为Ct值,结果采用相对定量法: $\Delta CT = CT_{DGCR5} - CT_{GAPDH}$ , $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{癌组织}} - \Delta CT_{\text{癌旁组织}}$ ,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因的相对表达量。实验重复3次。

### 1.5 随访

术后根据美国国家综合癌症网络(NCCN)食管癌诊治指南进行规范化治疗,随访期间每3个月对患者进行1次复查(包括胸腹部CT、头部MRI和肿瘤标志物),每6个月对患者进行骨扫描及内镜检查。当出现局部复发及远处转移时,经皮穿刺获取标本进行病理学检测。定期电话随访,随访从术后开始到患者出现转移或随访截止时间,时间为24个月。计算各例患者的生存时间(月),根据分组情况用乘积极限法(Kaplan-Meier)进行生存分析。

### 1.6 统计学处理

采用SPSS20.0软件进行统计分析,用GraphPad Prism8对实验数据进行相关图片的绘制。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;计数资料以率表示,采用 $\chi^2$ 检验比较各组DGCR5表达与临床病理特征的关系;生存分析比较采用Kaplan-Meier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 DGCR5在ESCC组织中高表达

利用UALCAN在线分析工具,对TCGA数据库中DGCR5在ESCC和正常食管组织中表达水平的分析发现,DGCR5在ESCC组织中的表达水平明显高于正常食管组织( $t=2.657$ , $P < 0.01$ ;图1A)。DGCR5在ESCC组织中表达明显异常,因此,选择DGCR5进

行后续临床研究。

qPCR 检测结果(图 1B)显示, 60 例 ESCC 组织中 DGCR5 mRNA 表达水平显著高于癌旁组织( $t=3.94, P<0.01$ )。实验结果表明, 在 ESCC 组织中 DGCR5 的表达水平明显升高, 其可能影响 ESCC 细胞的生物学功能, 并可能成为 ESCC 诊断的分子标志物。

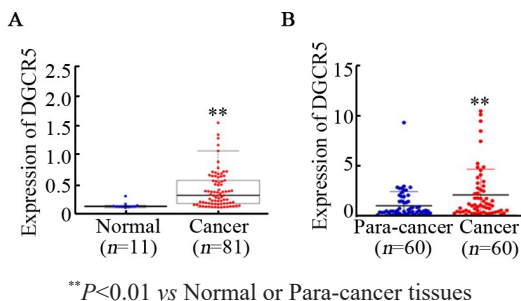


图 1 TCGA 数据库 ESCC 数据集(A)和 ESCC 组织(B)中 DGCR5 的表达

Fig.1 Expression of DGCR5 in ESCC data set of TCGA database (A) and ESCC tissues (B)

### 2.2 DGCR5 表达与 ESCC 患者临床病理特征的关系

为进一步分析 DGCR5 与 ESCC 患者的临床病理特征的关系, 本研究将所有 ESCC 患者的相对表达倍数临界阈值定义为 1, >1 为 DGCR5 高表达( $n=35$ ),  $\leq 1$  为 DGCR5 低表达( $n=25$ )。ESCC 组织中 DGCR5 表达水平与患者 TNM 分期( $\chi^2=9.425, P<0.01$ )和淋巴结转移( $\chi^2=6.720, P<0.01$ )均具有显著关联, 而与患者性别、年龄、饮酒均无显著关联(均  $P>0.05$ , 表 1)。结果表明, DGCR5 可能作为癌基因参与 ESCC 的发展进程。

表 1 DGCR5 表达与 ESCC 患者临床病理特征的关系(n)  
Tab.1 Correlation of DGCR5 expression with the clinicopathological features of ESCC patients (n)

| Clinicopathological feature | N  | Expression of DGCR5 |     | P     |
|-----------------------------|----|---------------------|-----|-------|
|                             |    | High                | Low |       |
| Gender                      |    |                     |     |       |
| Male                        | 33 | 22                  | 11  | 0.192 |
| Female                      | 27 | 13                  | 14  |       |
| Age (t/a)                   |    |                     |     |       |
| $\leq 60$                   | 22 | 14                  | 8   | 0.594 |
| $> 60$                      | 38 | 21                  | 17  |       |
| Drinking                    |    |                     |     |       |
| No                          | 33 | 16                  | 17  | 0.117 |
| Yes                         | 27 | 19                  | 8   |       |
| TNM stage                   |    |                     |     |       |
| I                           | 7  | 1                   | 6   | 0.009 |
| II                          | 22 | 11                  | 11  |       |
| III                         | 31 | 23                  | 8   |       |
| Metastasis                  |    |                     |     |       |
| No                          | 20 | 7                   | 13  | 0.010 |
| Yes                         | 40 | 28                  | 12  |       |

### 2.3 DGCR5 表达与 ESCC 患者预后的关系

Kaplan-Meier 生存分析结果(图 2)显示, 高表达 DGCR5 组的 ESCC 患者 2 年生存率明显低于低表达 DGCR5 组( $\chi^2=4.004, P<0.05$ )。结果表明, ESCC 组织中高表达 DGCR5 可作为预后不良的指标。

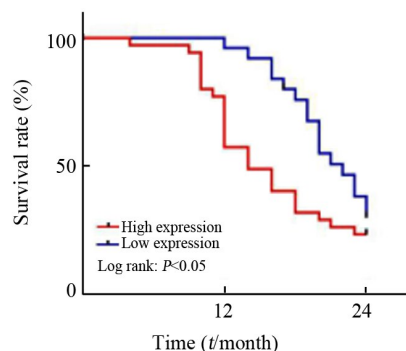


图 2 DGCR5 表达与 ESCC 患者预后的生存分析

Fig.2 Survival analysis of DGCR5 expression and prognosis of ESCC patients

## 3 讨论

lncRNA 是一种无开放阅读框和不编码蛋白质的大小约 200 个核苷酸的单链 RNA<sup>[9]</sup>, 在表观遗传、基因转录及转录后调节和蛋白质的翻译后修饰等多个重要节点调控肿瘤的进展<sup>[10-11]</sup>。多项研究<sup>[12-14]</sup>表明, lncRNA 的异常表达参与并通过多种机制调控 ESCC 的发生发展。lncRNA 有望成为恶性肿瘤早期诊断和预后判断的分子标志物及治疗靶点。因此, 识别和调控 ESCC 发生发展的 lncRNA 对于 ESCC 的诊治具有重要意义。

DGCR5 亦称为 linc00037, 早期研究<sup>[15]</sup>发现与人脑正常发育密切相关, 其异常表达会引起一系列精神分裂症状。近几年来, 随着对 DGCR5 研究的不断深入, 越来越多的证据表明 DGCR5 在恶性肿瘤的发生发展中起重要作用<sup>[6,16-17]</sup>。DGCR5 可通过调控 Wnt 信号通路, 抑制宫颈癌细胞的迁移和侵袭能力<sup>[18]</sup>。在胃癌中, DGCR5 可通过直接结合 miR-23b 来调节 PTEN 和 BTG1 的表达, 进而抑制胃癌的发生发展<sup>[19]</sup>。但关于 DGCR5 在 ESCC 中的表达及相关作用机制研究至今尚未见报道。

为了明确 lncRNA DGCR5 在 ESCC 中的表达是否异常, 本研究首先利用 UALCAN 在线分析工具对 TCGA 数据库中 DGCR5 在 ESCC 的表达水平进行分析, 发现 DGCR5 在 ESCC 组织中的表达水平明显高于正常食管组织, 这提示 DGCR5 可能与 ESCC 的发生发展有关联。为了验证 TCGA 数据库 ESCC 数据集中 DGCR5 表达的分析结果, 本研究采用 qPCR 技

术检测 60 例 ESCC 患者的癌及相应癌旁组织中 DGCR5 表达水平, 结果显示, ESCC 组织中 DGCR5 的表达水平明显高于癌旁组织, 提示在 ESCC 进展中 DGCR5 表达明显上调, 印证了生物信息学 TCGA 数据库分析结果。进一步分析发现, DGCR5 的表达水平与 ESCC 患者 TNM 分期和淋巴结转移具有显著关联, TNM 分期较晚和有淋巴结转移的 ESCC 患者肿瘤组织内 DGCR5 的表达水平明显上调, 而与患者性别、年龄、饮酒均无显著关联, 这表明 DGCR5 在 ESCC 的侵袭与转移中可能发挥了重要作用。另外本实验还分析了 DGCR5 的表达与患者预后生存的关联, 结果表明高表达 DGCR5 的 ESCC 患者的 2 年生存率较低表达 DGCR5 的患者明显下降, 提示 DGCR5 高表达可能是 ESCC 患者预后的负性调节因子, 与患者不良预后密切相关。以上实验结果从临床水平证实 DGCR5 可能作为 ESCC 的新型肿瘤生物标志物和潜在的治疗靶点。

综上所述, 本研究通过 TCGA 数据库和临床样本证实 DGCR5 在 ESCC 组织中呈高表达状态, 其高表达与 ESCC 患者 TNM 分期、淋巴结转移和不良预后均密切相关, 故 DGCR5 可作为 ESCC 治疗的潜在新靶标。

#### [参 考 文 献]

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424. DOI:10.3322/caac.21492.
- [2] VAN LOON K, MWACHIRO M M, ABNET C C, et al. The African esophageal cancer consortium: a call to action[J/OL]. *J Glob Oncol*, 2018, 4: 1-9[2019-10-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6223465/>. DOI:10.1200/JGO.17.00163.
- [3] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019[J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(1): 7-34. DOI:10.3322/caac.21551.
- [4] LIN C Y, ZHANG S N, WANG Y, et al. Functional role of a novel long noncoding RNATTN-AS1 in esophageal squamous cell carcinoma progression and metastasis[J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(2): 486-498. DOI:10.1158/1078-0432.ccr-17-1851.
- [5] DONG Z, LI S, WU X, et al. Aberrant hypermethylation-mediated downregulation of antisense lncRNA ZNF667-AS1 and its sense gene ZNF667 correlate with progression and prognosis of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(12): 930. DOI: 10.1038/s41419-019-2171-3.
- [6] HUANG R Y, WANG X C, ZHANG W J, et al. Down-regulation of LncRNA DGCR5 correlates with poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(3/4): 707-715. DOI: 10.1159/000452582.
- [7] WANG R, DONG H X, ZENG J, et al. LncRNA DGCR5 contributes to CSC-like properties via modulating miR-330-5p/CD44 in NSCLC[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 7447-7456. DOI:10.1002/jcp.26590.
- [8] FANG C, HE W, XU T, et al. Upregulation of lncrna DGCR5 correlates with better prognosis and inhibits bladder cancer progression via transcriptionally facilitating p21 expression[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 6254-6262. DOI:10.1002/jcp.27356.
- [9] LIU B, YE B Q, YANG L L, et al. Long noncoding RNA lncKdm2b is required for ILC3 maintenance by initiation of Zfp292 expression [J]. *Nat Immunol*, 2017, 18(5): 499-508. DOI:10.1038/ni.3712.
- [10] BHAN A, SOLEIMANI M, MANDAL S S. Long noncoding RNA and cancer: a new paradigm[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(15): 3965-3981. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-16-2634.
- [11] SCHMITT A M, CHANG H Y. Long noncoding RNAs in cancer pathways[J/OL]. *Cancer Cell*, 2016, 29(4): 452-463[2019-10-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4831138/>. DOI: 10.1016/j.ccell.2016.03.010.
- [12] 杨柳, 梁佳, 沈素朋, 等. 过表达 lncRNA LINC00886 抑制食管鳞状细胞癌 Eca109 细胞的恶性生物学行为[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(7): 751-756. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2019.07.005.
- [13] KANG M, REN M P, LI Y, et al. Exosome-mediated transfer of lncRNA PART1 induces gefitinib resistance in esophageal squamous cell carcinoma via functioning as a competing endogenous RNA[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 171[2019-10-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6063009/>. DOI: 10.1186/s13046-018-0845-9.
- [14] ZHANG E B, HAN L, YIN D D, et al. H3K27 acetylation activated-long non-coding RNA CCAT1 affects cell proliferation and migration by regulating SPRY4 and HOXB13 expression in esophageal squamous cell carcinoma[J/OL]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(6): 3086-3101[2019-10-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5389582/>. DOI:10.1093/nar/gkw1247.
- [15] MENG Q, WANG K, BRUNETTI T, et al. The DGCR5 long non-coding RNA may regulate expression of several schizophrenia-related genes [J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(472). DOI: 10.1126/scitranslmed.aat6912.
- [16] CHEN E G, ZHANG J S, XU S, et al. Long non-coding RNA DGCR5 is involved in the regulation of proliferation, migration and invasion of lung cancer by targeting miR-1180[J/OL]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(7): 1463-1475[2019-10-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5523028/>.
- [17] TANG T, SHAN G. DGCR5 promotes cancer stem cell-like properties of radioresistant laryngeal carcinoma cells by sponging miR-506 via Wnt pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 18423-18431. DOI:10.1002/jcp.28478.
- [18] LIU Y, CHANG Y, LU S X, et al. Downregulation of long noncoding RNA DGCR5 contributes to the proliferation, migration, and invasion of cervical cancer by activating Wnt signaling pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7): 11662-11669. DOI:10.1002/jcp.27825.
- [19] XU Y, ZHANG G H, ZOU C, et al. Long noncoding RNA DGCR5 suppresses gastric cancer progression by acting as a competing endogenous RNA of PTEN and BTG1[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7): 11999-12010. DOI:10.1002/jcp.27861.

[收稿日期] 2019-10-18

[修回日期] 2020-01-29

[本文编辑] 党瑞山