

CDR1as 在喉鳞状细胞癌中的表达及临床意义

张建中,赵耀新,胡华勇,王燕玲,黄海琼,蔡 刚

(广州医科大学附属第五医院 耳鼻咽喉科,广东 广州 510700)

摘 要: **目的** 探讨环状 RNA ciR-7 (*CDR1as*) 在喉鳞状细胞癌 (laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC) 中的表达及临床意义,并分析 *CDR1as* 与 *miR-7* 的相关性。**方法** 收集 2011—2013 年手术切除并病理确诊为鳞状细胞癌的标本 61 例,同期选取病理确诊为炎症或正常黏膜的癌旁组织 (距肿瘤切缘大于 0.5 cm) 标本 48 例,采用实时荧光定量 PCR 方法检测喉癌及癌旁组织中 *CDR1as*、*miR-7* 的转录表达水平。**结果** Real-time PCR 显示,在 LSCC 组织中,*CDR1as* mRNA 表达水平均显著高于癌旁组织 ($P < 0.001$);*miR-7* mRNA 表达水平均显著低于癌旁组织 ($P < 0.0001$); *CDR1as* 在淋巴结转移患者的 LSCC 组织中表达水平较无淋巴结转移患者的 LSCC 组织中显著增高 ($P < 0.01$); *CDR1as* 在不同 TNM 分期患者的喉癌组织中表达水平差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); *CDR1as* 在 LSCC 组织中表达水平与患者的预后相关 ($P = 0.02$); 同时, *CDR1as* 表达水平与 *miR-7* 表达呈负性相关 ($r = -0.643, P = 0.001$)。**结论** *CDR1as* 参与 LSCC 的发生和发展,其表达可以作为判断预后的一项指标, *CDR1as* 与 *miR-7* 呈现出的一定的相关性, *CDR1as* 可能通过靶向调控 *miR-7* 的表达影响喉癌进展。

关 键 词: 喉鳞状细胞癌; *CDR1as*; *miR-7*; 预后

中图分类号: R739.65

Expression and clinic significance of *CDR1as* in laryngeal squamous cell carcinoma

ZHANG Jian-zhong, ZHAO Yao-xin, HU Hua-yong, WANG Yan-ling, HUANG Hai-qiong, CAI Gang
(Department of Otorhinolaryngology, the Fifth Hospital Affiliated to Guangzhou Medical University, Guangzhou 510700, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression and clinical significance of ci-RNA ciR-7 (*CDR1as*) in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC), and to analyze the correlation between *CDR1as* and *miR-7*. **Methods** From 2011 to 2013, real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the transcriptional expression levels of *CDR1as* and *miR-7* in 61 specimens of laryngeal squamous cell carcinoma and 48 of normal tissues adjacent to tumor. **Results** RT-PCR showed that the expression of *CDR1as* in the LSCC tissues was significantly higher than that in the adjacent tissues ($P < 0.001$), the expression of *miR-7* in the LSCC tissues was significantly lower than that in the adjacent tissues ($P < 0.0001$), the expression of *CDR1as* in LSCC tissues from patients with lymph node metastasis was significantly higher than that from those without lymph node metastasis ($P < 0.01$), and the expression level of *CDR1as* in the LSCC tissues of patients with different TNM stages were significantly different ($P < 0.05$). The difference of 5-year survival rate between patients with high expression level of *CDR1as* in the LSCC tissues and those with low expression level was statistically significant ($P = 0.02$), meanwhile, the expression level of *CDR1as* was negatively correlated with that of *miR-7* ($r = -0.643, P = 0.001$). **Conclusions** *CDR1as* is involved in the occurrence and development of LSCC, and its expression can be used as a prognostic indicator of this tumor. *CDR1as* has a certain correlation with *miR-7*. *CDR1as* may affect the progression of LSCC by targeted-regulating the expression of *miR-7*.

Keywords: Laryngeal squamous cell carcinoma; *CDR1as*; *miR-7*; Prognosis

喉恶性肿瘤中 90% 的病理为鳞状细胞癌,喉鳞状细胞癌 (laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC) 也是呼吸道第二大常见的恶性肿瘤,2016 年,大约 13 430 例新的 LSCC 患者被确诊,3 620 例患者死

基金项目:广东省医学科研基金项目(B2018199)。
作者简介:张建中,男,在读博士研究生,副主任医师。
通信作者:张建中,Email:525567166@qq.com

亡^[1]。尽管在过去 20 年里 LSCC 治疗得到很大进步,但晚期 LSCC 治疗结果并没有得到明显改善,5 年生存率甚至从 66% 减少至 63%,原因与早期诊断困难、术后局部或区域性复发、过度要求保喉及放/化疗抵抗等相关^[2-3],这些因素需要临床医师进一步深入地研究和探索新的 LSCC 潜在的分子机制,以寻找更加有效的诊断方法和新的治疗靶点。在 LSCC 组织中,*miR-7* 作为抑癌基因作用已被研究证实^[4],但未见有关 *CDR1as* 的表达及与 *miR-7* 关系的研究报道。本研究中,笔者选择 61 例 LSCC 标本及 48 例癌旁正常组织测定 *CDR1as* 和 *miR-7* 表达,分析其表达和临床因素的关系,探讨 *CDR1as* 在 LSCC 中的表达及临床意义。

1 材料和方法

1.1 标本

按照医院的伦理委员会规定取得患者的知情同意,收集广州医科大学附属第五医院耳鼻咽喉科 2011—2013 年手术切除、病理确诊为 LSCC 的标本 61 例,所有患者术前均未行放疗或化疗,其中男 58 例,女 3 例;年龄 41 ~ 76 岁,平均年龄 57 岁;有吸烟史 49 例;高分化 17 例,中分化 35 例,低分化 9 例;声门上型 26 例,声门型 34 例,声门下型 1 例;淋巴结转移 22 例;TNM 分期 (UICC2002) I、II 期 44 例,III、IV 期 17 例;采取电话或上门随访,存活患者随访时间截止时间点为 5 年,死亡患者以死亡时间为随访截止时间,具体临床资料见表 1。同期选取病理确诊为炎症或正常黏膜的癌旁组织 (距肿瘤切缘大于 0.5 cm) 标本 48 例,作为对照。

1.2 试剂

TRIzol 试剂盒,转录试剂盒及 qRT-PCR kit 试剂盒均购自广州维伯鑫生物公司,相关实验配件有本院中心实验室提供。

1.3 Real-time PCR

按照 All-in-one TM*miR* qRT-PCR kit 试剂盒说明书,根据 Mibase 生物信息网站检测出 *CDR1as*, *miR-7* 及 *GAPDH* 上下游引物序列,由广州维伯鑫生物技术公司合成,按照标准的程序执行实时定量 PCR 实验,按照 TRIzol 试剂盒说明书在细胞和肿瘤标本中提取总 RNA,转录试剂盒逆转录 cRNA,PCR 扩增步骤:95℃ 10s,94℃ 30s,60℃ 30s,72℃ 30s,

40 个循环,目的基因的表达量 $F = 2^{-\Delta\Delta CT}$,每次实验重复 3 次,引物序列见表 2。

表 1 *CDR1as* 表达与临床病理指标的关系 (例, $\bar{x} \pm s$)

临床指标	例数	<i>CDR1as</i> 表达水平
性别		
男	58	2.996 ± 2.231
女	3	3.105 ± 1.827
年龄 (岁)		
>59	35	3.127 ± 2.528
≤59	26	2.893 ± 1.928
吸烟史		
无	12	2.735 ± 2.046
有	49	3.215 ± 2.273
分化程度		
高	17	1.836 ± 1.241
中	35	2.718 ± 1.618
低	9	4.225 ± 1.774
淋巴结转移		
无	39	2.431 ± 1.582
有	22	3.557 ± 1.910
T 分期		
T1、T2	40	2.027 ± 1.413
T3、T4	21	3.985 ± 1.916
临床分期		
I、II	44	2.148 ± 1.376
III、IV	17	3.822 ± 2.109
临床分型		
声门上型	26	3.106 ± 2.137
声门型	34	2.915 ± 1.975
声门下型	1	3.216 ± 2.447

表 2 引物序列表

Gene	Primer 5' - 3'
<i>CDR1as</i>	F: TAGTACGTCGTGCCCTGA
	R: CACTTGACGTGCAGCATC
<i>miR-7</i>	F: CCACGTTGGAAGACTAGTGATTT
	R: TATGGTTTCTCTGCTCTCTGTCTC
<i>GAPDH</i>	F: ACACCCACTCCTCCACCTTT
	R: TTACTCCTTGGAGGCCATGT

1.4 统计学分析

采用 SPSS 16.0 分析,每组实验结果数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用独立样本 *t* 检验用于两组数据之间的比较分析,单因素方差分析 (ANOVA) 用于两组以上数据之间的比较,单因素及多因素比例风险回归模型用于评估预后相关因素,生存分析使用 Cox 风险回归模型,并绘制 Kaplan-Meier 生存曲线,采用 Spearman 进行相关性分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义,所用数据均计算 3 次。

2 结果

2.1 LSCC 组织与癌旁组织中 *CDR1as* 及 *miR-7* mRNA 表达情况

qRT-PCR 检测结果显示 61 例 LSCC 组织中的 *CDR1as* mRNA 表达水平(3.029 ± 0.102)明显高于 48 例癌旁对照组织中的 *CDR1as* mRNA 表达水平(1.053 ± 0.082),两独立样本 *t* 检验发现差异具有统计学意义($P < 0.001$,图 1);61 例喉癌组织中的 *miR-7* mRNA 表达水平(0.546 ± 0.023)明显低于 48 例癌旁对照组织中的 *miR-7* mRNA 表达水平(1.870 ± 0.074),两独立样本 *t* 检验发现差异具有统计学意义($P < 0.0001$,图 2)。

2.2 *CDR1as* 与 LSCC 临床指标的关系

单因素及多因素比例风险回归模型用于评估预后相关因素,在 LSCC 中 *CDR1as* 高表达与 LSCC 患者的肿瘤分化程度、TNM 分期、淋巴结转移及临床分期(P 均 < 0.05)显著相关,具体数据见表 1。而与年龄、性别及有无吸烟史无关(P 均 > 0.05)。

2.3 Kaplan-Meier 生存分析

通过电话访谈、门诊复查等形式对患者进行随访,随访时间从患者确诊 LSCC 之日开始,全部患者

随访时间均为 5 年,死亡患者以死亡时间为随访截止时间,将生存时间由小到大排序,通过计算出每一段时间内的死亡概率和生存概率,以生存时间(单位:年)为横轴,生存率为纵轴,分别绘制 LSCC 患者中 *CDR1as* 高表达和低表达者的 K-M 阶梯形生存曲线(图 3),Cox 比例风险回归模型分析喉癌组织中 *CDR1as* 的表达对生存期的影响,计算风险比(HR ratio),结果提示:*CDR1as* 高表达(实线)的喉癌患者与 *CDR1as* 低表达(虚线)的喉癌患者相比,生存率较低(HR ratio: 0.2484; 95% CI: 0.07 - 0.87, $P = 0.02$),说明 *CDR1as* 高表达患者的 5 年生存率较 *CDR1as* 低表达的喉癌患者低,预后差。

2.4 Spearman 进行相关性分析

将 LSCC 中 *CDR1as*、*miR-7* 的表达绘制散点图(图 4),可见 *CDR1as* 与 *miR-7* 有线性趋势,从总的趋势来看,*CDR1as* 高表达的患者 *miR-7* 呈低表达,说明 *CDR1as* 与 *miR-7* 的表达量之间存在联系且方向相反,可行线性相关分析,计算 Spearman 秩相关系数($r = -0.643$, $P = 0.001$),即 *CDR1as*、*miR-7* mRNA 两者呈负相关,*CDR1as* mRNA 表达越高,*miR-7* 表达反而降低;*CDR1as* mRNA 表达越低,*miR-7* 表达越高。

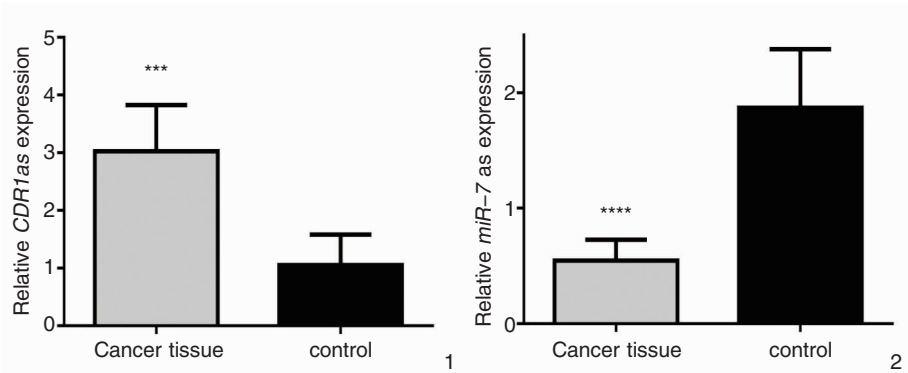


图 1 LSCC 与癌旁正常组织中 *CDR1as* 的表达 *** $P < 0.001$ 图 2 LSCC 与癌旁正常组织 *miR-7* 的表达 **** $P < 0.0001$

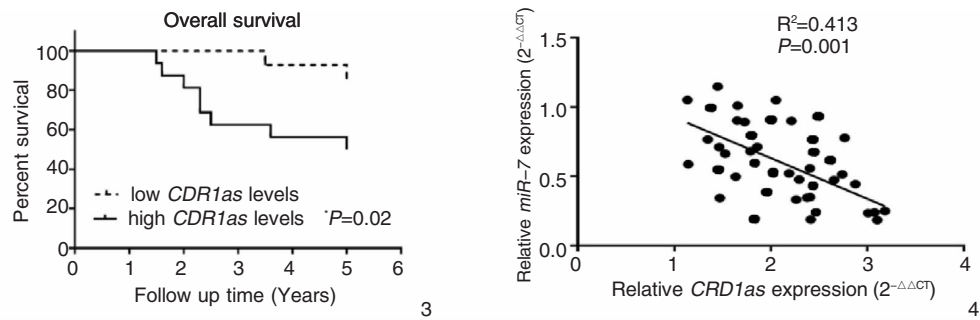


图 3 LSCC 组织中 *CDR1as* 表达的生存曲线图 图 4 *CDR1as* 与 *miR-7* 表达在 LSCC 患者中的相关性分析

3 讨论

真核细胞转录的 RNA 中 95% 为非编码 RNA, 包含短链微小 RNAs (miRNAs)、长链无编码 RNAs (LncRNAs) 和环状 RNAs (CircRNAs)。环状 RNA 是近年来发现的内生性无编码、高度保守、以共价环存在的 RNA 分子, 在哺乳动物中扮演着基因调节作用, 越来越多的研究证实环状 RNA 可作为竞争内源性 RNA 或微小 RNA 的海绵体, 与 miRNAs、LncRNAs 存在相互调控的关系, 被认为在多种生物过程和疾病发生、发展中发挥重要基因调节作用^[5]。小脑变性相关蛋白 1 反义转录物 (*CDR1as*) 是稳定存在于血浆外泌体中, 并被证实与诸多疾病预后相关的一类环状 RNA 分子, 且拥有 74 位与微小 RNA-7 (*miR-7*) 相结合的位点^[6-8]。

本研究收集了 61 例新鲜 LSCC 组织及 48 例癌旁组织, 进行 qRT-PCR 检测 *CDR1as* 在基因层面的表达情况, 结果显示 LSCC 组织中 *CDR1as* mRNA 表达水平明显高于癌旁组织, 后续又采用单因素及多因素比例风险回归模型, 评估本研究中 LSCC 患者预后相关因素, 结果表明, 伴发淋巴结转移患者的 LSCC 组织中 *CDR1as* 表达量较未转移的 LSCC 组织显著升高, *CDR1as* 高表达提示 LSCC 患者生存率较低, 同时, LSCC 中 *CDR1as* 的高表达还和肿瘤分化程度、TNM 分期等显著相关, 说明 *CDR1as* 参与了 LSCC 的发生发展, 是喉癌预后不佳的指标, 具有致癌特性, 可促进肿瘤生长, 加快肿瘤侵袭转移, 这与 *CDR1as* 在多种其他肿瘤如肝癌、头颈肿瘤、胃癌中其作为 miRNA 基因表达海绵体发挥着致癌作用的特性相似^[9-12]。

另有研究表明, 环状 *CDR1as* 被认为可以抑制抑癌基因 *miR-7* 从而在多种肿瘤中发挥着重要作用, 并作为患者诊断和预后的一项生物标记物^[13-15], 如在肝细胞癌中, *CDR1as* 呈高表达, 敲除其基因后, *miR-7* 表达上调, 抑制其靶基因及蛋白 CCNE1 和 PIK3CD 的表达, 癌细胞的分化及侵袭受到抑制^[16], 在结直肠癌中, 抑制 *CDR1as* 可以阻止结直肠癌细胞的分化及侵袭, 而 *miR-7* 抑制剂可以抵消 *CDR1as* 被敲除的功能, 这种抵消作用可能是因为 *miR-7* 相关的靶点 EGFR 和 IGF-1R 促进肿瘤生长及侵袭相关, 体内实验进一步证实, *CDR1as* 能阻止 *miR-7* 的肿瘤抑制作用, 促进肿瘤的生长^[17], 可见, *CDR1as* 目前主要通过 *miR-7* 信号途径在多种

肿瘤中发生作用。本研究结果显示 *miR-7* 在 LSCC 组织中较癌旁组织低表达, 且相关性分析结果显示 *CDR1as* 与 *miR-7* 呈负相关性, 根据此实验结果及相关文献报道我们推测, 在 LSCC 组织中, *CDR1as* 表达上调, 使靶基因 *miR-7* 的表达受抑制, *miR-7* 及其他相关抑癌基因失活, 从而加速 LSCC 进展, 当然, 这一推测的具体机制还需要进一步研究。

综上所述, 笔者发现在 LSCC 组织中 *CDR1as* 较癌旁组织显著高表达, 其表达可以作为临床判断预后的一项指标, *CDR1as* 可能成为喉鳞癌的一项新的生物标记物和治疗靶点, 同时, *CDR1as* 与抑癌基因 *miR-7* 呈现出的一定的相关性, *CDR1as* 可能通过靶向调控 *miR-7* 的表达影响 LSCC 进展, 其作用机制也有待临床进一步深入的探索。

参考文献:

- [1] Steuer CE, El-Deiry M, Parks JR, et al. An update on larynx cancer[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(1): 31-50.
- [2] Megwalu UC, Sikora AG. Survival outcomes in advanced laryngeal cancer[J]. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg, 2014, 140(9): 855-860.
- [3] Braakhuis BJ, Leemans CR, Visser O. Incidence and survival trends of head and neck squamous cell carcinoma in the Netherlands between 1989 and 2011[J]. Oral Oncol, 2014, 50(7): 670-675.
- [4] 徐瑶, 欧阳学农, 陈曦, 等. *miR-7* 抑制喉鳞癌 Hep-2 细胞增殖及迁移的研究[J]. 临床肿瘤学杂志, 2015, 20(3): 193-197.
Xu Y, Ouyang XN, Chen X, et al. Inhibition effect of *miR-7* on proliferation and metastasis of Hep-2 laryngeal carcinoma cells[J]. Chinese Clinical Oncology, 2015(3): 193-197.
- [5] Yamamura S, Imai-Sumida M, Tanaka Y, et al. Interaction and cross-talk between non-coding RNAs[J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75(3): 467-484.
- [6] Jiang XM, Li ZL, Li JL, et al. A novel prognostic biomarker for cholangiocarcinoma: circRNA Cdr1as[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(2): 365-371.
- [7] Zhang L, Li Y, Liu W, et al. Analysis of the complex interaction of *CDR1as*-*miRNA*-protein and detection of its novel role in melanoma[J]. Oncol Lett, 2018, 16(1): 1219-1225.
- [8] Xu H, Guo S, Li W, et al. The circular RNA *Cdr1as*, via *miR-7* and its targets, regulates insulin transcription and secretion in islet cells[J]. Sci Rep, 2015, 5(1): 12453.
- [9] Greene J, Baird AM, Brady L, et al. Circular RNAs: biogenesis, function and role in human diseases[J]. Front Mol Biosci, 2017, 4(1): 38.
- [10] Xuan L, Qu L, Zhou H, et al. Circular RNA: a novel biomarker for progressive laryngeal cancer[J]. Am J Transl Res, 2016, 8(2): 932-939.

[11]

Qin M, Liu G, Huo X, et al. Hsa_circ_0001649: A circular RNA and potential novel biomarker for hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Biomark,2016,16(1):161 – 169.

[12]

Li P, Chen S, Chen H, et al. Using circular RNA as a novel type of biomarker in the screening of gastric cancer[J]. Clin Chim Acta,2015,444:132 – 136.

[13]

Yao W, Li Y, Han L, et al. The CDR1as/miR-7/TGFBR2 axis modulates EMT in silica-induced pulmonary fibrosis[J]. Toxicol Sci,2018,166(2):465 – 478.

[14]

Xu B, Yang T, Wang Z, et al. CircRNA CDR1as/miR-7 signals promote tumor growth of osteosarcoma with a potential therapeutic and diagnostic value [J]. Cancer Manag Res,2018,10:4871 – 4880.

[15]

Zhang X, Yang D, Wei Y. Overexpressed CDR1as functions as an oncogene to promote the tumor progression via miR-7 in non-small-cell lung cancer[J]. Onco Targets Ther,2018,11:3979 – 3987.

[16]

Yu L, Gong X, Sun L, et al. The Circular RNA Cdr1as act as an

oncogene in hepatocellular carcinoma through targeting miR-7 expression[J]. PLoS One,2016,11(7):e158347.

[17]

Tang W, Ji M, He G, et al. Silencing CDR1as inhibits colorectal cancer progression through regulating microRNA-7[J]. Onco Targets Ther, 2017,10:2045 – 2056.

(收稿日期:2019 – 03 – 12)

本文引用格式:张建中,赵耀新,胡华勇,等. *CDR1as* 在喉鳞状细胞癌中的表达及临床意义[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2019,25(6):645 – 649. DOI:10. 11798/j. issn. 1007-1520. 201906015
Cite this article as: ZHANG Jian-zhong, ZHAO Yao-xin, HU Hua-yong, et al. Expression and clinic significance of *CDR1as* in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg, 2019, 25(6): 645 – 649. DOI: 10. 11798/j. issn. 1007-1520. 201906015

· 消息 ·

远程投稿、查稿系统启事

本刊采用远程稿件采编系统进行投稿、查稿等,现就有关问题说明如下。

1. 作者投稿:登陆在线投稿系统(中文版),按操作提示投稿。第一次需先注册,原则上不再受理邮寄稿件和 Email 稿件。

2. 稿件查询:使用作者注册用户名和密码,可查询作者稿件审理进程和费用信息等。

有关投稿要求,请登陆本刊网站浏览。

网站登陆:<http://www.xyosbs.com/index.htm>

• 649 •