

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201906015

· 论著 ·

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

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0.5cm)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 TMmiR 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: TATGGTTTCTCTCTCTCTCTCTC
<i>GAPDH</i>	F: ACACCCACTCTCCACCTTT
	R: TTACTCCTTGGAGCCATGT

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。

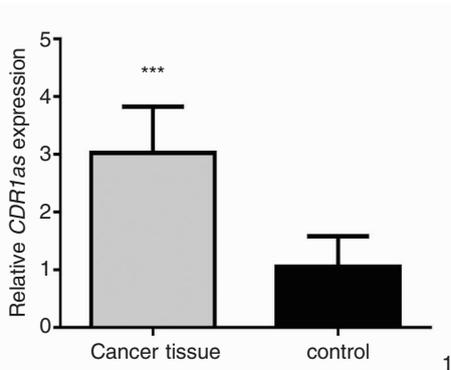


图 1 LSCC 与癌旁正常组织中 CDR1as 的表达 *** $P < 0.001$

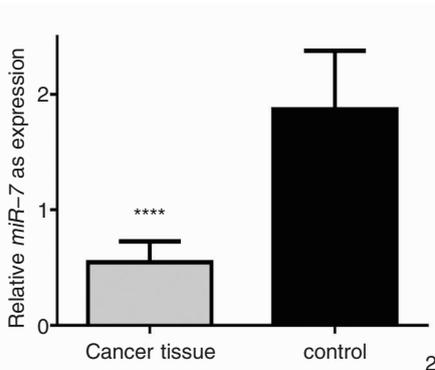


图 2 LSCC 与癌旁正常组织 miR-7 的表达 **** $P < 0.0001$

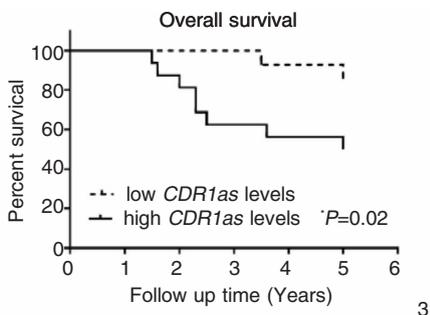


图 3 LSCC 组织中 CDR1as 表达的生存曲线图

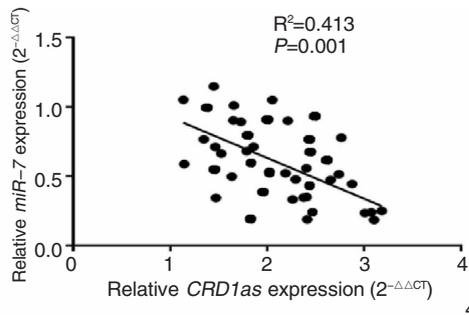


图 4 CDR1as 与 miR-7 表达在 LSCC 患者中的相关性分析

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>