

# 鼻咽癌患者肿瘤组织及血清长链非编码 RNA BC200 的表达

黄 丽, 李宝瑞

(广元市第四人民医院 耳鼻喉科, 四川 广元 628000)

**[摘 要]** 目的: 探究鼻咽癌(NPC)患者肿瘤组织及血清中长链非编码 RNA BC200 的表达水平及其临床意义。方法: 收集 74 例 NPC 患者肿瘤组织标本及相应癌旁组织标本、患者入院时的血清样本及同期体检中心 50 例正常人群血清样本, 采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 技术检测患者 NPC 组织与相应癌旁组织标本 BC200 表达, 检测 NPC 患者血清与正常人群血清样本中 BC200 表达的差异, 分析 NPC 患者肿瘤组织标本与 TNM 分期、血清样本 BC200 表达与肿瘤淋巴结转移及总生存时间的关系。结果: NPC 患者肿瘤组织 BC200 的表达显著高于相应癌旁组织, 血清中 BC200 的表达显著高于正常人群, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); NPC 患者肿瘤组织中 BC200 高表达与患者 TNM 分期有关, 血清中 BC200 高表达与患者淋巴结转移有关, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); NPC 患者肿瘤组织及血清 BC200 高表达的患者总生存率均显著低于低表达患者, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论: NPC 患者肿瘤组织及血清中均存在 BC200 的高表达, 且其表达水平与患者病情进展及总生存率密切相关, 可能是 NPC 促癌基因。

**[关键词]** 鼻咽肿瘤; 肿瘤转移; 肿瘤分期; 生存时间; 长链非编码

**[中图分类号]** R739.62; R739.63 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)09-1055-05

**DOI:**10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.09.014

## Expression of Long Non-coding RNA BC200 in Tumor Tissues and Serum of Patients with Nasopharyngeal Carcinoma

HUANG Li, LI Baorui

(The Fourth People's Hospital of Guangyuan, Guangyuan 628000, Sichuan, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression level of long non-coding RNA BC200 (BC200) in tumor tissues and serum of patients with nasopharyngeal carcinoma (NPC) and to reveal its potential clinical significance. **Methods:** The tumor tissues and serum samples of 74 cases with NPC and corresponding paracancerous tissues collected from July 2012 to September 2014 in Department of E. N. T. in our hospital and the serum samples of 50 normal controls collected from Medical Examination Center were compared and analyzed. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the difference of the expression of BC200 between the NPC and paracancerous tissues, and the difference between the serum samples of patients with NPC and the normal group. The correlation of the expression of BC200 in NPC tissues and patients' serum samples and the clinical data and prognosis of the patients was analyzed. **Results:** The expression of BC200 in NPC tissues was significantly higher than that in paracancerous tissues, while the expression of BC200 in patients' serum samples was significantly higher than that in the normal group, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The expression of BC200 in tumor tissues was significantly correlated with TNM staging ( $P < 0.05$ ), and the serum was significantly correlated with lymph node metastasis. The overall survival rate of patients with high expression of BC200 in tumor tissues and serum was significantly lower than that in patients with

low expression, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Tumor tissues and serum of patients with NPC possess high expression of BC200 and such expression is closely related to the progression and prognosis of patients. It is a potential promoter of NPC.

[ **Key words** ] nasopharyngeal carcinoma; neoplasm metastasis; neoplasm staging; survival time; long non-coding RNA BC200

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma,NPC)在全世界范围内均有报道,以我国最为常见。据统计数据显示,我国2015年NPC新增病例6.06万人次,死亡3.41万人次,占全世界NPC发病的80%以上<sup>[1]</sup>。NPC细胞多呈低分化,侵袭转移能力强,且NPC血管及淋巴管丰富,导致患者转移率高达60%~80%<sup>[2]</sup>,因此找到影响NPC患者病情进展及预后的关键因子对NPC早期诊断及治疗方案的指导具有重要意义。长链非编码RNA BC200(long non-coding RNA BC200,BC200)属于非编码RNA(non-coding RNA,ncRNA),可通过特定机制调节神经突触小体的形成,在正常组织中表达较低<sup>[3]</sup>。近年有研究显示其在多种恶性肿瘤中高表达,且参与其发生发展过程<sup>[4]</sup>,但BC200与NPC的关系尚不明确。基于此,本研究对BC200在NPC患者肿瘤组织及血清中的表达情况及其与患者病情进展及预后的关系进行探究,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 临床资料

选取耳鼻喉科2012年7月~2014年9月收治NPC患者74例的临床标本,包括肿瘤组织及相应癌旁组织标本。所有患者均为初发且经病理证实,入院前未经任何形式的放化疗及靶向治疗等抗肿瘤治疗,取材后液氮保存,收集患者入院时血清;同时收集同期体检中心50例正常人群血清样本作为对照,取材方法见参考文献<sup>[5]</sup>,以-80℃冰箱保存样本。74例NPC患者中男58例、女16例,26~67岁、平均(44.5±12.7)岁;采用2008版NPC分期系统<sup>[6]</sup>对患者行TNM分期,其中I期患者2例、II期患者17例、III期患者42例、IV期患者13例,T1期患者15例、T2期患者28例、T3期患者26例、T4期患者5例,局部淋巴结转移阳性的患者63例、局部淋巴结转移阴性的患者11例。出院患者每3个月做1次电话随访,并记录患者生存情况,所有患者及家属对本研究知情同意。

1.2 实验材料

实验仪器:高速冷冻离心机(德国Eppendorf,5427 R),PCR基因扩增仪(美国Bio-Rad,T100),微量紫外分光光度计(美国Thermo,Nanodrop2000),实时荧光定量PCR仪(美国Thermo,Applied Biosystems 7500)。实验试剂:RNA提取试剂Trizol(美国Invitrogene,15596018),RNA逆转录试剂盒(美国Invitrogene,4368814),SYBR Green I 核酸荧光染料(美国Bio-Rad,1708895),异丙醇及氯仿等有机溶剂(国药集团化学试剂有限公司),DEPC水(上海生工生物工程公司,B501005-0500),BC200及内参基因β-Actin引物合成(上海生工生物工程公司),合成序列见表1。

表1 引物合成序列  
Tab.1 The sequence of primer synthesis

目的基因	产物大小(bp)	序列(5'-3')
BC200(left)	271	CTCAGGGAGGCTAAGAGGCG
BC200(right)		TTTCCTTTTCTGGAGAACGGG
β-actin(left)	253	CAGGGCGTGATGGTGGGCA
β-actin(right)		CAAACATCATCTGGGTCATCTTCTC

1.3 检测方法

采用实时荧光定量PCR(real-time quantitative PCR,RT-qPCR)技术检测组织及血清中BC200的相对表达量。(1)组织标本的准备:将待测组织从液氮中取出、研磨器压碎,取约50 mg组织研磨成粉末,1 mL Trizol 重悬粉末,冰上裂解5 min;血清样本的准备:将待测血清从-80℃冰箱中取出,冰上自然溶解后充分混匀,取0.5 mL与等体积Trizol混合,冰上裂解5 min。(2)将准备好的样本12 000 g,4℃离心5 min,取上清液加入标记好的1.5 mL离心管中,加入0.2 mL氯仿并震荡混匀,室温静置5 min后12 000 g、4℃离心15 min,取上清液加入标记好的1.5 mL离心管中,加入0.5 mL异丙醇,室温静置10 min后12 000 g、4℃离心10 min,去上清液,75%乙醇清洗RNA沉淀,7 500 g、4℃离心5 min,弃去乙醇,自然干燥后50 μL DEPC水稀释沉淀。(3)检测RNA溶液浓度,取500 ng总

RNA 进行逆转录,得到 20  $\mu$ L cDNA 产物,DEPC 水稀释至 0.5 mL。(4)取 5  $\mu$ L cDNA 模板及 2.5  $\mu$ L 上游及下游引物,与 10  $\mu$ L SYBR Green I 核酸荧光染料配置体系,进行 ABI 7500 荧光定量分析,RT-PCR 条件为 95  $^{\circ}$ C 10 min 后,95  $^{\circ}$ C 15 s,60  $^{\circ}$ C 1 min,40 循环。记录每个反应管中的荧光信号到达所设定的域值时所经历的循环数(Ct 值),以  $\beta$ -Actin 作为内参基因, $2^{(-\Delta\Delta CT)}$  法计算 BC200 的相对表达量。

1.4 观察指标

分析患者 NPC 组织与相应癌旁组织标本 BC200 表达的差异及 NPC 患者血清与正常人群血清样本中 BC200 表达的差异,分析 NPC 患者肿瘤组织标本及血清样本中 BC200 表达水平与患者临床资料及预后的关系。

1.5 统计学方法

计量资料以平均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,独立样本采用  $t$  检验比较计量资料间的统计学差异,计数资料以率表示, $\chi^2$  检验比较计数资料间的统计学差异,采用 Kaplan-meier 生存分析法对 BC200 的表达与患者预后的关系进行分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NPC 患者肿瘤组织及癌旁组织 BC200 的表达水平

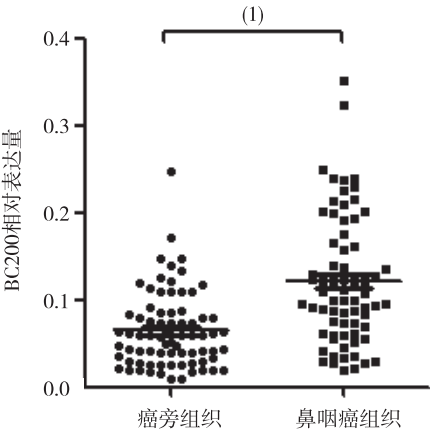
鼻咽癌组织中 BC200 的相对表达量为( $0.121 \pm 0.008$ ),显著高于癌旁组织表达量( $0.065 \pm 0.005$ ),差异有统计学意义( $t = 5.682, P < 0.001$ ),见图 1。

2.2 NPC 患者与正常人群血清 BC200 表达水平比较

鼻咽癌患者血清中 BC200 的相对表达量为( $0.020 \pm 0.001$ ),显著高于正常对照人群血清表达量( $0.012 \pm 0.001$ ),差异有统计学意义( $t = 7.404, P < 0.001$ ),见图 2。

2.3 NPC 患者肿瘤组织及血清中 BC200 表达水平与与患者 TNM 分期、淋巴结转移的关系

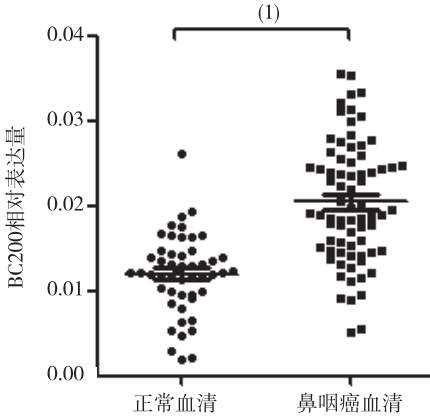
NPC 组织中高表达 BC200 的患者相比低表达患者存在更高的 TNM 分期,NPC 患者血清中高表达 BC200 的患者相比低表达患者具有更高的淋巴结转移率,NPC 组织中高表达 BC200 的表达与患者 TNM 分期、NPC 患者血清中高表达 BC200 与患



(1)与癌旁组织比较, $P < 0.001$

图 1 NPC 患者肿瘤组织及癌旁组织 BC200 的表达水平

Fig. 1 The comparison of the level of BC200 expression in tumor tissue and paracancerous tissue of NPC patients



(1)与正常血清比较, $P < 0.001$

图 2 NPC 患者与正常人群血清 BC200 的表达水平

Fig. 2 The comparison of the level of BC200 expression in serum of NPC patients and normal population

者淋巴结转移有关,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 2。

2.4 NPC 患者肿瘤组织及血清中 BC200 表达水平与患者总生存时间的关系

NPC 组织中高表达 BC200 的患者相比低表达患者总生存时间显著降低,差异有统计学意义( $HR = 1.790, 95\% CI: 1.058 \sim 3.028, P < 0.05$ ),见图 3。NPC 患者血清中高表达 BC200 的患者相比低表达患者总生存时间显著降低,差异有统计学意义( $HR = 1.825, 95\% CI: 1.073 \sim 3.197, P < 0.05$ ),见图 4。

表 2 NPC 组织及血清中 BC200 表达水平与患者 TNM 分期、淋巴结转移的关系  
Tab.2 The relationship between the level of BC200 expression in tissue and serum and the clinicopathological data of the NPC patients

临床指标	n	NPC 组织 BC200				NPC 患者血清 BC200			
		高表达	低表达	$\chi^2$	P	高表达	低表达	$\chi^2$	P
性别									
男	58	25	33	0.873	0.350	27	31	0.416	0.519
女	16	9	7			6	10		
年龄(岁)									
>50	33	14	19	0.297	0.585	16	17	0.365	0.546
≤50	41	20	21			17	24		
TNM 分期									
I、II期	19	4	15	6.378	0.012	6	13	1.753	0.186
III、IV期	55	30	25			27	28		
T 分期(浸润深度)									
T1~T2	43	17	26	1.699	0.192	16	27	2.266	0.132
T3~T4	31	17	14			17	14		
N 分期(淋巴结转移)									
有	63	31	32	1.841	0.178	32	31	6.592	0.010
无	11	3	8			1	10		

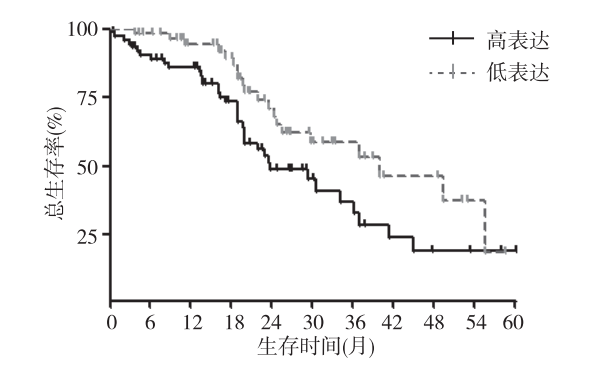


图 3 NPC 组织中 BC200 表达水平与患者生存时间的关系  
Fig.3 The relationship between the expression of BC200 in NPC tissue and the prognosis of the patients

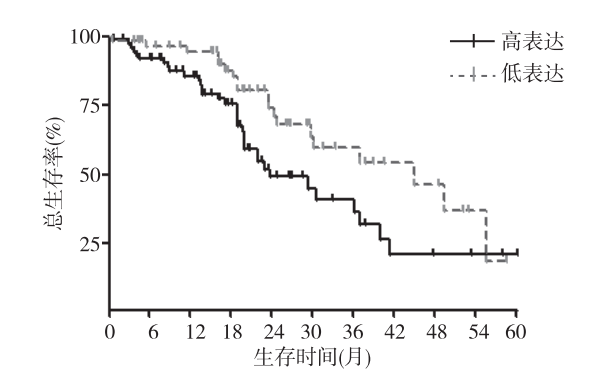


图 4 NPC 患者血清中 BC200 表达水平与患者总生存时间的关系  
Fig.4 The relationship between the expression of BC200 in the serum and the prognosis of the NPC patients

3 讨论

LncRNA 是一类长度超过 200 nt,不编码相应蛋白的 RNA 分子,曾被认为是基因组转录的副产物,随着 LncRNA 表观遗传调控机制研究的不断深入,越来越多的研究显示其与恶性肿瘤的发生发展密切相关<sup>[7]</sup>。BC200 作为 LncRNA 中的一员,选择性地表达于灵长类动物的神经系统<sup>[8]</sup>。近年有研究显示其与多种恶性肿瘤的发生发展密切相关,朱彩华<sup>[9]</sup>在其研究中指出 BC200 在食管癌组织及细

胞系中显著高表达,且食管癌组织中 BC200 的表达与患者总生存时间负相关。Hu T 等人<sup>[10]</sup>在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)组织中发现 BC200 表达的上调,在体外实验中外源性 siRNA 干扰 BC200 的表达后,NSCLC 细胞系 C-myc 及金属基质蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)的表达随之下调,进而导致细胞迁移及侵袭能力均显著下降,表明 BC200 可促进 NSCLC 细胞转移能力。任浩等人<sup>[11]</sup>研究发现胃癌患者血清 BC200 表达相比正常人群显著增高,且血清高表达 BC200 的胃癌患者预后不良。Singh R 等<sup>[12]</sup>在乳

腺癌组织中发现 BC200 表达上调,体外通过 CRISPR/Cas9 系统下调乳腺癌细胞 BC200 的表达后,细胞增殖能力下降,同时凋亡增强,而 Shin H 等<sup>[13]</sup>的研究显示 BC200 还可通过促进钙结合蛋白 S100A11 的稳定性介导乳腺癌细胞侵袭转移能力的增强。同时,BC200 还被发现在卵巢癌组织中高表达且参与促进细胞增殖及化疗抵抗能力<sup>[14-15]</sup>。上述研究表明 BC200 可能作为促癌基因在食管癌、非小细胞肺癌、胃癌及乳腺癌中,通过多种途径增强肿瘤细胞的恶性行为,导致恶性肿瘤的进展及患者不良预后,但其在 NPC 中的临床意义尚不明确,本研究通过 RT-qPCR 手段检测了 NPC 患者肿瘤组织及血清中 BC200 的表达特征,并分析了其与患者临床资料及预后间的关系。

本研究结果显示,BC200 在 NPC 患者肿瘤组织及血清中均为高表达,提示 BC200 可能参与 NPC 细胞的发生及转移。进而本研究分析了患者肿瘤组织及血清 BC200 表达水平与患者临床资料间的关系,发现肿瘤组织中高表达 BC200 的患者存在更高的 TNM 分期,提示 BC200 对 NPC 的进展可能具有促进作用,血清中高表达 BC200 的患者倾向更高的淋巴结转移率,推测可能因为侵入淋巴管的肿瘤细胞在代谢过程中产生了 BC200 并进入循环系统。同时本研究发现,肿瘤组织或血清高表达 BC200 的患者总生存时间均显著低于低表达患者,提示 BC200 可通过促进 NPC 进展导致患者预后不良。

综上所述,本研究发现 BC200 对 NPC 患者病情进展及预后评估具有潜在的价值,尤其是血清 BC200 可作为 NPC 诊断标志物对患者淋巴结转移情况评估及手术方案设计具有一定的指导作用,但循环 BC200 的生物学作用尚不明确,且 BC200 与 NPC 细胞恶性行为及影响 NPC 发生发展的确切机制仍是空白,本研究将通过进一步体内外实验证实 BC200 对 NPC 发生发展的促进作用,并探究其可能的相互作用分子,为揭示 BC200 在 NPC 的诊治中的潜在价值提供新的依据。

4 参考文献

[1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *Ca Cancer J Clin*, 2016, 66 (2):115-132.

[2] 刘秀建, 冯兴义, 郑自刚, 等. PET-CT 与 MRI 诊断中

国人鼻咽癌转移的 Meta 分析[J]. *生物医学工程与临床*, 2014(1):35-38.

[3] LUO Q, CHEN Y. Long noncoding RNAs and Alzheimer's disease [J]. *Clinical Interventions in Aging*, 2016, 11(Issue 1):867-872.

[4] BOOY E P, MCRAE E K, KOUL A, et al. The long non-coding RNA BC200 (BCYRN1) is critical for cancer cell survival and proliferation[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16 (1):109.

[5] 廖秋林, 张卫云, 张宏斌, 等. 鼻咽癌患者血清 sI-CAM-1 和 SAA1 及 HSP70 检测临床意义分析[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2013, 20(2):110-112.

[6] 潘建基. 鼻咽癌分期研究[J]. *中国癌症杂志*, 2011, 12(12):901-905.

[7] HUARTE M. The emerging role of lncRNAs in cancer [J]. *Nat Med*, 2015, 21(11):1253-1261.

[8] WU P, ZUO X, DENG H, et al. Roles of long noncoding RNAs in brain development, functional diversification and neurodegenerative diseases [J]. *Brain Res Bull*, 2013, 97(8):69-80.

[9] 朱彩华. 长链非编码 RNA-BCYRN1 表达与食管鳞癌患者预后的关系[D]. 郑州:郑州大学, 2016.

[10] HU T, LU Y R. BCYRN, a c-MYC-activated long non-coding RNA, regulates cell metastasis of non-small-cell lung cancer[J]. *Cancer Cell Int*, 2015, 15(1):36.

[11] 任浩, 王昌敏, 杨晓敏, 等. 血清长链非编码 RNA BC200 表达在胃癌诊疗中的应用价值[J]. *中华检验医学杂志*, 2017, 40(2):138-142.

[12] SINGH R, GUPTA S C, PENG W X, et al. Regulation of alternative splicing of Bcl-x by BC200 contributes to breast cancer pathogenesis[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7 (6):e2262.

[13] SHIN H, LEE J, KIM Y, et al. Knockdown of BC200 RNA expression reduces cell migration and invasion by destabilizing mRNA for calcium-binding protein S100A11 [J]. *Rna Biology*, 2017,14(10):1418-1430.

[14] DI W U, WANG T, Ren C, et al. Down-regulation of BC200 in ovarian cancer contributes to cancer cell proliferation and chemoresistance to carboplatin[J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(2):1189-1194.

[15] ZHONG Y, DAN G, HE S, et al. Dysregulated Expression of Long Noncoding RNAs in Ovarian Cancer[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2016, 26(9):1564-1570.

(2018-06-27 收稿,2018-08-16 修回)  
中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 丁廷森