



[DOI] 10.3969/j.issn.1005-6483.2019.07.012

<http://www.lcwkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1005-6483.2019.07.012>

Journal of Clinical Surgery, 2019, 27(7):577-580

· 论著 ·

血清长链非编码 RNA ANRIL、基质金属蛋白酶-2 与血清淀粉样蛋白 A 在食管癌中的表达及临床意义

李汉杰 景瑞军 陈鑫 王卫 葛鹏

[摘要] **目的** 分析血清的细胞周期激酶抑制因子4b(INK4b)位点的反义非编码 RNA (anti-sense non-coding RNA in the INK4 Locus, lncRNA ANRIL)、基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 与血清淀粉样蛋白 A (serum amyloid protein A, SAA) 在食管癌中的表达及临床意义。**方法** 食管癌病人 80 例, 同期体检健康人群 100 例。采用实时定量聚合酶链反应 (real-time PCR) 法检测血清 lncRNA ANRIL; 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 和酶法分别检测 MMP-2 与 SAA 水平。**结果** 食管癌病人 lncRNA ANRIL、MMP-2 与 SAA 水平高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。食管癌病人 lncRNA ANRIL、MMP-2 和 SAA 水平与肿瘤 TNM 分期、组织学类型、肿瘤分化程度等显著相关 ($P < 0.05$), 且在中晚期食管癌、食管腺鳞癌及低分化食管癌病人中的增高最为显著。lncRNA ANRIL 联合 MMP-2 与 SAA 在区分食管癌与对照的曲线下面积 (area under the curve, AUC) 为 0.927 (95% CI: 0.900 ~ 0.954, $P < 0.05$), 灵敏度为 80.1%, 特异度为 90.4%。多因素分析显示, 高 lncRNA ANRIL、MMP-2 和 SAA 水平是食管癌发病的独立危险因素。**结论** lncRNA ANRIL、MMP-2 和 SAA 对食管癌具有诊断价值, 可作为食管癌发病风险预测的参考指标。

[关键词] 食管癌; 长链非编码 RNA; 基质金属蛋白酶-2; 血清淀粉样蛋白 A

Expression and clinical significance of long non-coding RNA ANRIL combined with matrix metalloproteinase-2 and serum amyloid protein A in esophageal carcinoma Li Hanjie, JING Ruijun, CHEN Xin, et al. (Department of Cardiothoracic Surgery, Second Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an 710038, China)

[Abstract] **Objective** To explore the diagnostic values of long non-coding RNA (lncRNA) ANRIL, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and serum amyloid protein A (SAA) for esophageal cancer, and the relationship between the three and the clinicopathological features of esophageal cancer. **Methods** 80 cases of esophageal cancer diagnosed in our hospital from January 2016 to December 2017 were collected, and 100 healthy people were recruited in our hospital during the same period. The levels of lncRNA ANRIL in the peripheral blood of subjects were detected by real-time quantitative PCR (RT-PCR). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and enzyme methods were used to detect MMP-2 and SAA levels, respectively. **Results** Serum lncRNA ANRIL, MMP-2 and SAA levels in patients with esophageal cancer were significantly higher than those in healthy subjects, and the difference were statistically significant ($P < 0.05$). In addition, the expressions of lncRNA ANRIL, MMP-2 and SAA in serum of patients with esophageal cancer were significantly correlated with TNM stage, histology classification and differentiation degree of tumor ($P < 0.05$), and the levels of lncRNA ANRIL, MMP-2 and SAA in advanced esophageal cancer, esophageal adenocarcinoma and poorly differentiated esophageal cancer patients were increased most significantly. When combined with lncRNA ANRIL, MMP-2 and SAA, the area under the curve (AUC) to distinguish between esophageal cancer and healthy subjects was 0.927 (95% CI: 0.900 ~ 0.954, $P < 0.05$), the sensitivity was 80.1%, specificity was 90.4%. Multivariate analysis showed that serum lncRNA ANRIL, MMP-2 and SAA levels were independent risk factors for esophageal cancer. **Conclusion** lncRNA ANRIL, MMP-2 and SAA have diagnostic values for esophageal cancer. In addition, lncRNA ANRIL, MMP-2 and SAA can also serve as reference index for predicting the risk of esophageal cancer.

[Key words] esophageal cancer; long non-coding RNA; matrix metalloproteinase-2; serum amyloid protein A

早期食管癌症状不典型甚至无症状,当出现进行性吞咽困难等典型症状时,病情多已进展到中晚期^[2]。目前,食管癌的主要筛查手段是食管脱落细胞学检查(食管拉网),但其敏感性和特异性均较低^[2]。长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)与癌症的发生、发展及转移密切相关^[3]。lncRNA 已被证实 在胃癌、肝癌等消化系统肿瘤中具有较大诊断价值^[4]。基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-1, MMP-2)是一类重要的水解细胞外基质的蛋白水解酶,参与 到肿瘤的生长与转移过程。血清淀粉样蛋白 A(serum amyloid protein A, SAA)是体内重要的急性时相反应蛋白。近年来关于 SAA 在直肠癌等消化道肿瘤的分化、增殖、转移中发挥作用也均有报道^[5]。我们比较食管癌病人与健康人群的 lncRNA ANRIL、MMP-2 与 SAA 水平,分析三者对食管癌的诊断价值。

对象与方法

一、对象

2016 年 1 月~2017 年 12 月确诊的食管癌病人 80 例(病例组),均为首次住院且经内镜组织学检查确诊,其中上段食管癌 14 例,中段食管癌 41 例,下段食管癌 25 例;早期食管癌病人 16 例,中晚期病人 64 例;鳞癌 71 例,腺癌 5 例,腺鳞癌 4 例;高分化癌 21 例,中分化癌 46 例,低分化癌 13 例。同期行健康体检的健康人群 100 例作为对照组。本研究经医院伦理委员会批准。

二、方法

1. 血清 MMP-2 与 SAA 水平检测:采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测每组血清 MMP-2 水平;血清 SAA 的检测采用酶法。同时计算血清 MMP-2 与 SAA 检测

的批内与批间变异系数(CV)。

2. lncRNA ANRIL 表达水平的检测:按照试剂盒说明书提取血清总 RNA,并逆转录为 cDNA,进行实时荧光定量 PCR(RT-PCR)。ANRIL 与 GAPDH 引物序列见表 1。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 lncRNA 的相对表达量。血清 lncRNA ANRIL 和 GAPDH 基因熔解曲线峰形单一,说明没有非特异性扩增。见图 1。

表 1 扩增 lncRNA ANRIL 和 GAPDH 的引物序列

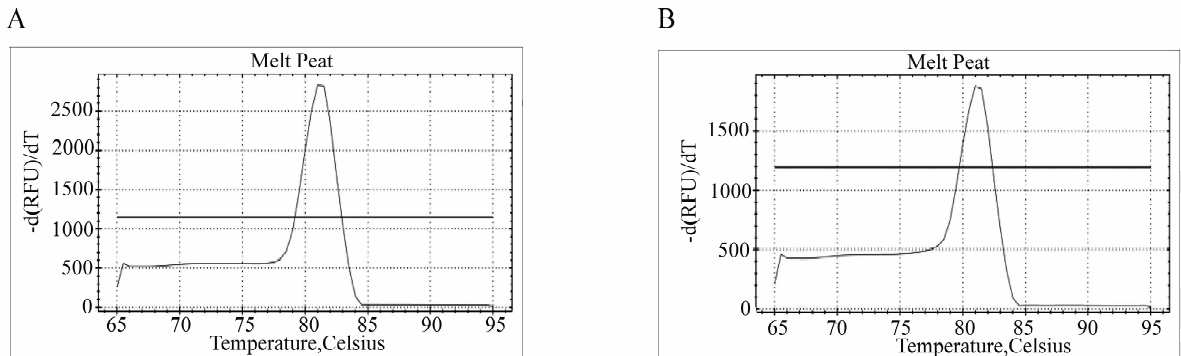
RNA	引物序列(5'-3')
ANRIL 上游	TACCATACAACAGACCAGAA
ANRIL 下游	TTGTTTTTCCAACATCCAT
GAPDH 上游	AGAAGGCTGGGGCTCATTTC
GAPDH 下游	GCAGGAGGCATTGCTGATGAT

三、统计学分析

应用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。正态分布数据用均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验。受试者工作特征曲线(ROC)分析各指标判别食管癌病人的曲线下面积(AUC)及其 95% 置信区间(CI)。Logistic 回归分析计算 lncRNA ANRIL、MMP-2 与 SAA 预测食管癌的比值比(OR)。检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

结 果

1. 两组一般资料及血清 lncRNA ANRIL、MMP-2 与 SAA 表达水平比较:病例组男性 57 例,平均年龄(52.3 ± 3.9)岁,吸烟史 21 例,有饮酒史 55 例;对照组男性 75 例,平均年龄(52.8 ± 3.6)岁,有吸烟史 27 例,饮酒史 61 例。两组年龄、性别、吸烟史、饮酒史比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。病例组血清 ANRIL、



每幅图表示一条基因的熔解曲线峰;A:ANRIL;B:GAPDH

图 1 lncRNA ANRIL 和 GAPDH 基因熔解曲线峰形

MMP-2 与 SAA 水平均高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两组血清 lncRNA ANRIL、MMP-2 和 SAA 水平比较

组别	例数	ANRIL (-log)	MMP-2 (pg/ml)	SAA(mg/L)
病例组	80	12.9 ± 1.6 ^a	22.8 ± 2.1 ^a	37.3 ± 8.1 ^a
对照组	100	5.7 ± 0.7	13.3 ± 1.4	20.1 ± 6.2

注:与对照组比较,^a $P > 0.05$

2. lncRNA ANRIL、MMP-2 和 SAA 水平与食管癌临床病理特征的关系:lncRNA ANRIL、MMP-2 和 SAA 水平与食管癌病人的年龄、性别、吸烟史、饮酒史、肿瘤部位等无关 ($P > 0.05$),与食管癌的分期、分化程度及组织学类型显著相关 ($P < 0.05$)。且 lncRNA ANRIL、MMP-2 和 SAA 水平在中晚期食管癌、食管腺鳞癌及低分化食管癌病人中的增高最为显著。见表 3。

3. lncRNA ANRIL、MMP-2 和 SAA 对食管癌诊断的 ROC 曲线分析:ROC 曲线分析显示,血清 ANRIL、MMP-2 和 SAA 在区分食管癌与对照组的 AUC 分别为 0.892(95% CI:0.858 ~ 0.926, $P < 0.05$)、0.761(95% CI:0.704 ~ 0.817, $P < 0.05$)和 0.540(95% CI:0.472 ~

0.608, $P = 0.247$);在各指标约登指数为最大值时对应的灵敏度及特异度分别为 79.2%/89.0%、80.5%/61.0%和 67.7%/44.0%;诊断界值分别为 9.4(-log)、17.3 pg/ml 和 29.8 mg/L(图 2A)。当联合血清 ANRIL、MMP-2 和 SAA 时,3 种指标在区分食管癌与对照组的 AUC 为 0.927(95% CI:0.900 ~ 0.954, $P < 0.05$),灵敏度 80.1%,特异度 90.4%(图 2B)。

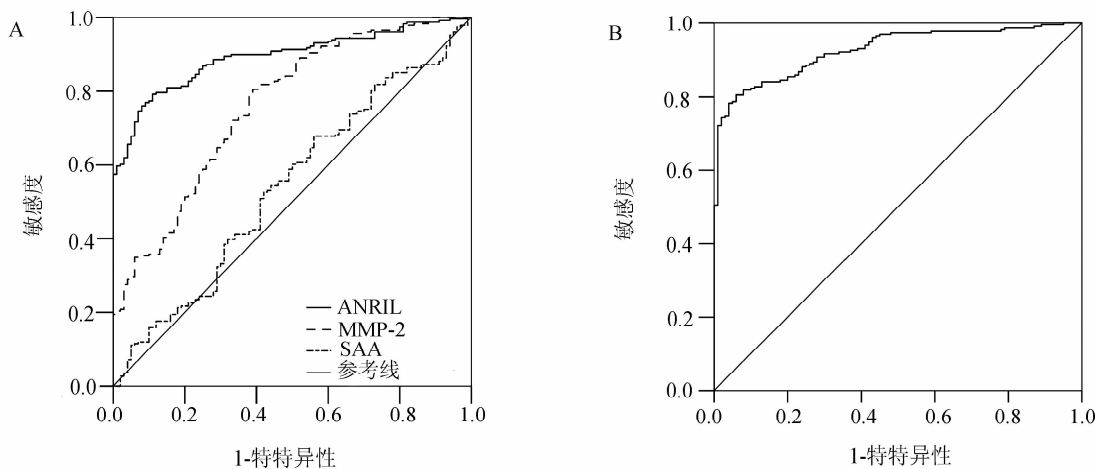
4. lncRNA ANRIL、MMP-2 和 SAA 水平对食管癌发生风险的预测价值分析见表 4。结果显示,在校正年龄、性别、吸烟、饮酒等因素影响后,高 ANRIL、MMP-2 和 SAA 水平仍是食管癌发病的独立危险因素。

讨 论

Lan 等^[6]研究发现,ANRIL 可通过表皮生长因子受体依赖性信号通路促进胃癌细胞生长以及侵袭-转移级联反应,且在胃癌组织中的表达高于正常组织。Ma 等^[7]研究表明,ANRIL 可通过介导上皮细胞-间充质转化的发生,促进肝癌侵袭和转移。Chen 等^[8]发现,lncRNA SBF2-AS1 在食管鳞状癌细胞中的表达显著上调,且在 SBF2-AS1 被沉默抑制后食管鳞状癌细胞的增殖和侵袭能力明显降低,SBF2-AS1 因此被认为

表 3 lncRNA ANRIL、MMP-2 和 SAA 水平与食管癌病人临床病理特征的关系

指标	例数 (n=80)	lncRNA ANRIL (-log)	t/F	P	MMP-2 (pg/ml)	t/F	P	SAA (mg/L)	t/F	P
年龄			-1.711	0.229		-0.245	0.237		-1.127	0.544
<50 岁	36	12.2 ± 1.2			22.0 ± 1.2			36.1 ± 6.0		
≥50 岁	44	13.3 ± 1.5			23.1 ± 1.1			38.0 ± 6.5		
性别			2.105	0.321		1.375	0.227		-1.711	0.229
男	57	12.9 ± 1.4			22.9 ± 1.3			36.0 ± 6.2		
女	23	12.7 ± 1.3			22.6 ± 1.1			38.1 ± 6.6		
吸烟史			-1.127	0.544		-1.425	0.337		-1.525	0.328
有	21	12.7 ± 1.2			22.7 ± 1.2			36.7 ± 6.7		
无	59	12.9 ± 1.5			22.8 ± 1.4			37.8 ± 6.1		
饮酒史			-1.111	0.506		-2.125	0.478		-1.111	0.506
有	55	12.4 ± 1.3			22.3 ± 1.1			36.6 ± 6.8		
无	25	13.1 ± 1.2			23.0 ± 1.5			37.7 ± 6.3		
肿瘤部位			1.121	0.586		1.646	0.138		2.002	0.386
食管上段	14	12.5 ± 1.3			22.0 ± 1.0			37.6 ± 6.5		
食管中段	41	12.7 ± 1.1			23.3 ± 1.4			37.1 ± 6.1		
食管下段	25	13.1 ± 1.4			22.8 ± 1.1			37.4 ± 6.0		
TNM 分期			-4.046	<0.001		-5.164	<0.001		-2.711	0.032
早期	16	8.4 ± 0.9			17.2 ± 1.2			36.1 ± 6.7		
中晚期	64	13.7 ± 1.7			23.6 ± 2.1			37.6 ± 6.0		
组织学类型			4.132	0.002		3.452	0.009		3.519	0.003
鳞癌	71	12.1 ± 1.2			22.4 ± 1.5			36.4 ± 6.5		
腺癌	5	12.5 ± 1.5			22.2 ± 1.6			37.1 ± 6.0		
腺鳞癌	4	20.0 ± 2.0			30.5 ± 3.1			39.9 ± 6.3		
分化程度			3.615	0.004		3.927	0.003		3.754	0.005
高分化	21	10.5 ± 1.0			21.0 ± 1.7			36.6 ± 6.4		
中分化	46	12.4 ± 1.2			22.4 ± 1.8			36.8 ± 6.1		
低分化	13	19.6 ± 1.8			27.2 ± 2.1			40.0 ± 6.3		



A: lncRNA ANRIL、MMP-2 和 SAA 区分食管癌与对照组; B: 联合 ANRIL、MMP-2 和 SAA 区分食管癌与对照组

图 2 lncRNA ANRIL、MMP-2 和 SAA 对食管癌鉴别诊断的 ROC 曲线分析

表 4 lncRNA ANRIL、MMP-2 和 SAA 水平与食管癌发生风险 Logistic 回归分析

指标	多因素分析 ^a	
	OR(95% CI)	P
ANRIL(-log)	3.31(1.59~5.62)	0.002
MMP-2	1.78(1.10~3.08)	0.013
SAA	1.73(1.17~2.28)	0.009
年龄	1.05(0.31~1.74)	0.520
吸烟	1.09(0.81~1.38)	0.547
饮酒	1.21(0.87~1.56)	0.486
性别	1.36(0.77~1.59)	0.224

注:^a 校正年龄、吸烟、饮酒、性别等因素影响

是一种新的食管鳞状癌生物标志物。Huang 等^[9]发现,MEG3 基因的表达在癌组织中显著降低,MEG3 能够诱导癌细胞的凋亡。本研究发现,血清高 ANRIL 水平是食管癌发病的独立危险因素,与文献报道相符^[6-7]。此外还发现,血清 ANRIL 水平在中晚期食管癌、食管腺鳞癌与低分化食管癌病人中的升高最为显著,提示三者与食管癌的不良预后密切相关。

近年研究指出,血清 MMP-2 与 SAA 在重塑肿瘤微环境、促进肿瘤远处转移以及在肿瘤诊断及预后等评价中有重要价值^[10]。早前研究显示,胃癌病人血浆 MMP-2 基因表达水平较健康人显著上调,并认为 MMP-2 的上调参与到胃癌细胞的远处转移^[10]。这些研究均提示 MMP-2 与 SAA 参与肿瘤的发生与发展。我们通过临床大样本检测食管癌病人血清中 MMP-2 与 SAA 的差异表达,并发现血清 MMP-2 与 SAA 水平在中晚期食管癌、食管腺鳞癌与低分化食管癌病人中的升高显著,与文献报道一致^[10]。

ROC 曲线分析显示,ANRIL、MMP-2 和 SAA 在区

分食管癌与对照组时有一定的价值,当联合 ANRIL、MMP-2 和 SAA 等指标时在区分食管癌与对照组时的特异度达到 90.4%,提示联合上述 3 种血清标志物具有较高的临床应用价值。本研究有如下不足:(1)例数有限,后期需要更大样本量的研究;(2)本研究采用的 ANRIL、MMP-2 和 SAA 多个指标的联合模型虽然较各单独指标有较高的临床价值,但该模型的应用仍有待进一步的验证。

参考文献

- [1] 聂龙,周方正,董琳,等. miRNA-155 在食管癌中的表达及与其临床病理特征的关系[J]. 实用癌症杂志,2018,33(6):878-880.
- [2] Naveed M, Kubiliun N. Endoscopic treatment of early-stage esophageal cancer[J]. Curr Oncol Rep,2018,20(9):71.
- [3] 彭卓,牛泽群,万林,等. 长链非编码 RNA MALAT1 与非小细胞肺癌病人肿瘤复发和预后的相关性研究[J]. 实用癌症杂志,2017,32(7):1056-1058,1072.
- [4] 李鑫恒,李正龙,郑汪洋,等. MALAT-1 与消化系统肿瘤关系的研究[J]. 标记免疫分析与临床,2017,24(4):478-480.
- [5] Yang Y, Tang T, Peng W, et al. The comparison of miR-155 with computed tomography and computed tomography plus serum amyloid A protein in staging rectal cancer [J]. J Surg Res, 2015, 193(2):764-771.
- [6] Lan WG, Xu DH, Xu C, et al. Silencing of long non-coding RNA ANRIL inhibits the development of multidrug resistance in gastric cancer cells[J]. Oncol Rep,2016,36(1):263-270.
- [7] Ma J, Li T, Han X, et al. Knockdown of LncRNA ANRIL suppresses cell proliferation, metastasis, and invasion via regulating miR-122-5p expression in hepatocellular carcinoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2018,144(2):205-214.
- [8] Chen R, Xia W, Wang X, et al. Upregulated long non-coding RNA SBF2-AS1 promotes proliferation in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Oncol Lett,2018,15(4):5071-5080.
- [9] Huang ZL, Chen RP, Zhou XT, et al. Long non-coding RNA MEG3 induces cell apoptosis in esophageal cancer through endoplasmic reticulum stress[J]. Oncol Rep,2017,37(5):3093-3099.
- [10] Pei L, He X, Li S, et al. KRAB zinc-finger protein 382 regulates epithelial-mesenchymal transition and functions as a tumor suppressor, but is silenced by CpG methylation in gastric cancer[J]. Int J Oncol, 2018,53(3):961-972.

(收稿日期:2018-09-18)
(本文编辑:杨泽平)