

## 长链非编码 RNA PANDAR 在肾癌中的表达分析及临床意义

金 露<sup>1,2,3</sup>, 李一帆<sup>1,2,3</sup>, 何 韬<sup>2,3</sup>, 胡 佳<sup>2,3</sup>, 刘家驹<sup>2,3</sup>, 桂耀庭<sup>2,3</sup>, 杨尚琪<sup>2,3</sup>, 毛向明<sup>2,3</sup>, 来永庆<sup>2,3</sup>

**摘要** 目的 检测长链非编码 RNA PANDAR 在肾癌及癌旁组织中的表达水平, 探讨其在肾癌中的临床意义。方法 提取 48 对组织(肾癌及对应癌旁组织)中的总 RNA 经逆转录获得 cDNA 后通过实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)方法检测 PANDAR 表达量, 分析正常组织与肾癌组织中的表达差异, 探讨其表达水平与患者临床特征之间的联系。结果 肾癌组织中 PANDAR 的表达水平明显低于配对癌旁正常组织( $P < 0.001$ ), 标本中共有 38 例(79.17%)肾癌标本 PANDAR 表达下调, 癌组织中 PANDAR 表达与患者 TNM 分期和 AJCC 分级相关, 与患者年龄、性别及肾癌病理类型无明显相关性( $P > 0.05$ ), PANDAR 低表达组患者生存率低于高表达组患者( $P < 0.05$ )。结论 PANDAR 在肾癌组织中表达明显下调, 且和肾癌 TNM、AJCC 分级和预后相关, 提示其有作为肾癌标志物应用于临床的可能。

**关键词** 肾癌; 肿瘤分期; 长链非编码 RNA; PANDAR

中图分类号 R 737.11

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)09-1342-04

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)又称肾癌, 是泌尿系统常见的恶性肿瘤, 约占成人恶性肿瘤的 3%<sup>[1]</sup>。肾癌对放疗和化疗均不敏感, 手术切除是主要的治疗方式, 但术后复发、转移率极高<sup>[2]</sup>。目前在临床尚无可用于肾癌早期诊断或治疗的生物标志物, 因此有必要对肾癌的发生机制进行深入研

究, 以期找到相关肾癌标志物。近年来, 长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)引起了人们的广泛关注。lncRNA 是一类不具有蛋白质编码功能的 RNA, 长度在 200 个核苷酸以上, 一般低于 20 000 个核苷酸<sup>[3]</sup>。基因组学的研究<sup>[4]</sup>表明, 哺乳动物的基因可以转录出大量不具有蛋白编码功能的 RNA, 有生物活性并在多种疾病中存在异常表达。另外, lncRNA 可在转录、转录后水平调控基因表达<sup>[5]</sup>。该研究选择 lncRNA PANDAR(promoter of CDKN1A antisense DNA damage activated RNA)作为研究对象, 探讨其在肾癌中的临床意义。

### 1 材料与方法

**1.1 组织标本** 选取安徽医科大学第一附属医院和北京大学深圳医院手术切除的 48 对肾癌组织及配对癌旁组织, 标本均得到医院医学伦理委员会批准且患者已签署知情同意书。每对标本包括肾癌组织及癌旁正常组织(取自根治性肾切除术距肾癌组织 > 2 cm 的肾组织)各 1 份, 病理切片证实肾癌组织含癌组织 80% 以上, 癌旁组织中无癌组织侵犯。标本切除后保存于 -80 °C 冰箱中备用。患者临床资料完整(表 1), 术后均进行了常规随访。肾癌临床分期参考国际抗癌组织(UICC)/美国癌症联合会(AJCC)2010 年肾癌分期。

**1.2 RNA 提取** 在液氮下碾磨标本组织, 加入 TRIzol 试剂(美国 Invitrogen 公司), 说明书所述提取肾癌标本组织中的总 RNA, 使用 ND-2000/2000c 紫外分光光度计测定其浓度, 提取后的总 RNA 保存于 -80 °C 冰箱。

**1.3 逆转录** 根据 RNA 反转录试剂 PrimeScript™ RT reagent Kit(日本 TaKaRa 公司)说明书所述, 取

2016-05-04 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81101922); 深圳市科技研发资金知识创新计划基础研究项目(编号: JCYJ20150403091443304); 广东省重点医学专科经费

作者单位: <sup>1</sup>安徽医科大学第二临床医学院, 合肥 230032

<sup>2</sup>北京大学深圳医院泌尿外科, 深圳 518036

<sup>3</sup>广东省男性生殖与遗传重点实验室, 深圳 518036

作者简介: 金 露, 男, 硕士研究生;

来永庆, 男, 副教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yqlord@163.com

of chronic HBV infection using FibroTouch had no significant difference compared to the patient group. **Conclusion**

FibroTouch instantaneous elasticity imaging has high clinical application value in noninvasively diagnosing the degree of liver fibrosis, worth further clinical promotion.

**Key words** hepatitis B virus; liver fibrosis; FibroTouch; noninvasive diagnosis worth further clinical promotion

1  $\mu\text{g}$  总 RNA 加入反应试剂,使用普通 PCR 仪完成逆转录。反应条件: 42  $^{\circ}\text{C}$  15 min,之后 85  $^{\circ}\text{C}$  5 s。产物稀释 10 倍后保存于 -80  $^{\circ}\text{C}$ 。

#### 1.4 实时荧光定量聚合酶链式反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR)

检测 PANDAR 表达量 根据荧光定量 PCR 试剂 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex TaqTM II (日本 TaKaRa 公司) 说明书所述,以合成的 cDNA 为模板,加入反应试剂进行 qPCR 反应。反应体系包括: 模板 cDNA 1  $\mu\text{l}$  2\* SYBR<sup>®</sup> Premix Ex TaqTM II 10  $\mu\text{l}$ , PANDAR 正向引物 1  $\mu\text{l}$ , PANDAR 反向引物 1  $\mu\text{l}$ , 加无菌蒸馏水至总反应体积 20  $\mu\text{l}$ 。PANDAR F: 5'-CAATGCCTTGCT-TCACAGTC-3', R: 5'-TGGGGTCTTAGAAGTGGTGA-3'; 内参选用 GAPDH 基因, GAPDH F: 5'-GAAGGT-GAAGGTCCGAGTC-3', R: 5'-GAAGATGGTGG-GATTTTC-3'。qPCR 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  2 min 预变性; 之后 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s 然后 70  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 共计完成 45 个循环。

1.5 统计学处理 PANDAR 相对表达量采用  $\Delta\Delta\text{Ct}$  法分析,以 GAPDH 为内参进行标准化处理:  $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{PANDAR}} - \text{Ct}_{\text{GAPDH}}$ ,  $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{RCC}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Normal}}$ 。通过  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  计算 PANDAR 在肾癌组织与癌旁正常组织表达量比值,使用 SPSS 17.0 完成统计分析。采用配对  $t$  检验分析配对组织间 PANDAR 表达量的差异; 将患者按 PANDAR 表达水平及临床特征分组列出四格表,采用  $\chi^2$  检验分析; 采用 Kaplan-Meier 法和 Log-rank 检验比较两组患者生存率差异;  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 PANDAR 在肾癌组织中表达下调 48 对肾癌组织中共有 38 例肾癌标本表达量低于配对癌旁组织,肾癌组织与配对癌旁组织中 PANDAR 表达量比值经对数转换后如图 1 所示,纵坐标为  $\log_2\text{Ratio}(T/N)$  横坐标以下表示肾癌组织表达量低于配对癌旁组织; 肾癌组织中 PANDAR 表达量明显低于癌旁正常组织 ( $t = -4.016$ ,  $P < 0.001$ ) 癌旁正常组织中 PANDAR 表达量是肾癌组织的  $2.42 \pm 0.25$  倍。

2.2 PANDAR 的表达水平和患者临床分期、分级相关 以肾癌组织中 PANDAR 的  $-\Delta\Delta\text{CT}$  平均值 -1.27 为界将患者分为高表达组、低表达组,其中低表达组 26 例; 根据患者年龄中位数将患者分为高龄

组、低龄组。列出四格表,行  $\chi^2$  检验,结果显示 PANDAR 表达水平和患者年龄、性别以及肾癌组织类型无关,在 TNM 分期和 AJCC 分级较高的患者 PANDAR 表达水平更低 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

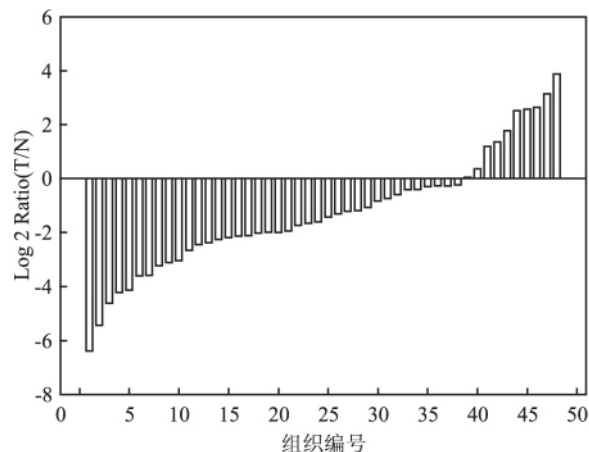


图1 标本组织中 PANDAR 的表达

肾癌组织与配对癌旁组织相对表达量比值经对数转换后结果 (T 代表肾癌组织, N 代表配对癌旁组织)

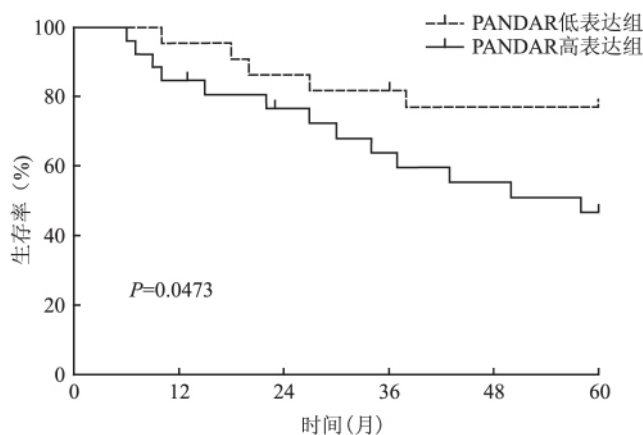


图2 PANDAR 低表达组和高表达组患者生存率比较

2.3 PANDAR 低表达的患者预后较差 纳入研究的患者均进行了常规随访,随访期内死亡 18 例 (37.5%)。将患者分为高表达组、低表达组,采用 Kaplan-Meier 法和 Log-rank 检验比较两组患者生存率,生存曲线见图 2, PANDAR 低表达组患者的中位生存时间为 58 个月,低表达组 5 年生存率 (42.31%) 明显低于高表达组 (72.73%) ( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

肾癌是预后较差的一种肿瘤,已经发生转移的

表1 PANDAR 表达水平和肾癌临床分期、分级相关

临床特征	n	PANDAR 表达水平		χ <sup>2</sup> 值	P 值
		低表达 (n = 26)	高表达 (n = 22)		
年龄(岁)					
≥51	24	15	9	0.755	0.385
<51	24	11	13		
病理类型					
透明细胞癌	37	20	17	0.0998	0.752
乳头状细胞癌	11	6	5		
性别					
男	31	17	14	0.0312	0.860
女	17	9	8		
T 分期					
T1、T2	26	10	16	4.340	0.037
T3、T4	22	16	6		
AJCC 分级					
I、II	21	7	14	5.120	0.024
III、IV	27	19	8		

肾癌患者五年生存率约为 10%<sup>[6]</sup>, 早期诊断对于提高其预后有很大的帮助, 因此有必要寻找可用于肾癌早期诊断的生物标志物。虽然截至目前只发现了少数有功能的 lncRNA, 但综合现有研究可以发现 lncRNA 和一系列的生物进程相关, 如癌基因的激活、X 染色体失活、剂量失活效应、基因的转录和翻译、蛋白质的活性调控等<sup>[5]</sup>。因此, lncRNA 在基因调节中发挥着重要作用。

目前关于 lncRNA PANDAR 在肿瘤中的相关研究较少, 只在肝细胞癌、非小细胞肺癌中有相关报道, 且 lncRNA PANDAR 表达水平和患者预后相关<sup>[7-8]</sup>。在肾细胞癌中尚无关于 lncRNA PANDAR 的研究, 本研究首次在肾细胞癌组织中利用 qPCR 检测 PANDAR 的表达。现有关于 PANDAR 的研究<sup>[7-8]</sup>主要在非小细胞肺癌和肝细胞癌。研究<sup>[8]</sup>显示在非小细胞肺癌组织中 PANDAR 表达下调, 且表达量和肿瘤分期、肿瘤体积以及患者预后相关。在非小细胞癌细胞中, PANDAR 可通过调节 Bcl-2 的表达影响细胞凋亡。在肝细胞癌中, PANDAR 表达上调且表达水平和患者预后、TNM 分级相关, 且在肝癌细胞中敲除 PANDAR 可抑制癌细胞的增殖<sup>[7]</sup>。本研究首次利用 qPCR 在肾癌及配对癌旁组织中检测了 lncRNA PANDAR 的表达, 发现 PANDAR 在肾癌组织中表达明显下调。且 PANDAR 在肾癌中的表达和肾癌 TNM 分期、AJCC 分级相关, PANDAR 低表达组患者生存率低于高表达组患者, 提示 PANDAR 与肾癌患者预后相关, 在肾癌的发生发展中起着一定的作用, 有作为肾癌生物标志物应

用于肾癌诊断、判断预后及治疗的可能性。但本研究病例数偏少, 其所致偏倚不能排除, 下一步的研究目标将是扩大样本量验证 PANDAR 的表达, 并对 PANDAR 在肾癌组织细胞中的功能、机制进行研究。

目前在肾癌中关于 lncRNA 的研究较少, 已经发现在肾癌细胞中具有功能的 lncRNA 有 GAS5、MEG3、MALAT1、RCCRT1、HOTAIR<sup>[9-14]</sup>, 其中高表达的 MALAT1、RCCRT1 发挥着促癌基因的作用, 低表达的 MEG3、GAS5 则发挥着抑癌基因的作用。另外, 研究<sup>[13]</sup>表明 RCCRT1 的表达水平和肿瘤大小、TNM 分级以及淋巴结转移数量相关。因此 lncRNA 的异常表达和肾癌的发生以及进展存在着一定的关系。

### 参考文献

- [1] Cairns P. Renal cell carcinoma [J]. *Cancer Biomark* 2010, 9(1-6): 461-73.
- [2] Tostain J, Li G, Gentil-Perret A, et al. Carbonic anhydrase 9 in clear cell renal cell carcinoma: a marker for diagnosis, prognosis and treatment [J]. *Eur J Cancer* 2010, 46(18): 3141-8.
- [3] Xu Y, Wang J, Qiu M, et al. Upregulation of the long noncoding RNA TUG1 promotes proliferation and migration of esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Tumour Biol* 2015, 36(3): 1643-51.
- [4] Martens-Uzunova E S, Bottcher R, Croce C M, et al. Long non-coding RNA in prostate, bladder, and kidney cancer [J]. *Eur Urol* 2014, 65(6): 1140-51.
- [5] Huang M D, Chen W M, Qi F Z, et al. Long non-coding RNA TUG1 is up-regulated in hepatocellular carcinoma and promotes

- cell growth and apoptosis by epigenetically silencing of KLF2 [J]. *Mol Cancer* 2015 ,14: 165.
- [6] Leung H W ,Chan A L. Multikinase inhibitors in metastatic renal cell carcinoma: indirect comparison meta-analysis [J]. *Clin Ther* , 2011 ,33( 6) : 708 – 16.
- [7] Peng W ,Fan H. Long non-coding RNA PANDAR correlates with poor prognosis and promotes tumorigenesis in hepatocellular carcinoma [J]. *Biomed Pharmacother* 2015 ,72: 113 – 8.
- [8] Han L ,Zhang E B ,Yin D D , et al. Low expression of long non-coding RNA PANDAR predicts a poor prognosis of non-small cell lung cancer and affects cell apoptosis by regulating Bcl-2 [J]. *Cell Death Dis* 2015 ,6: e1665.
- [9] Pei C S ,Wu H Y ,Fan F T , et al. Influence of curcumin on HO-1/TAIR-mediated migration of human renal cell carcinoma cells [J]. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014 ,15( 10) : 4239 – 43.
- [10] Qiao H P , Gao W S , Huo J X , et al. Long non-coding RNA GAS5 functions as a tumor suppressor in renal cell carcinoma [J]. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013 ,14( 2) : 1077 – 82.
- [11] Hirata H , Hinoda Y , Shahryari V , et al. Long noncoding RNA MALAT1 promotes aggressive renal cell carcinoma through Ezh2 and interacts with miR-205 [J]. *Cancer Res* 2015 ,75( 7) : 1322 – 31.
- [12] Wang M , Huang T , Luo G , et al. Long non-coding RNA MEG3 induces renal cell carcinoma cells apoptosis by activating the mitochondrial pathway [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* , 2015 ,35( 4) : 541 – 5.
- [13] Song S , Wu Z , Wang C , et al. RCCRT1 is correlated with prognosis and promotes cell migration and invasion in renal cell carcinoma [J]. *Urology* 2014 ,84( 3) : 730. e1 – 7.
- [14] 夏明 黄卫人 蔡志明. 长链非编码 RNA HOTAIR 对肾癌细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *安徽医科大学学报* ,2015 ,50( 8) : 1095 – 9.

## Expression and clinical significance of long non-coding RNA PANDAR in renal cell carcinoma

Jin Lu<sup>1 2 3</sup> , Li Yifan<sup>1 2 3</sup> , He Tao<sup>2 3</sup> , et al

(<sup>1</sup> *The Second Clinical Medical College , Anhui Medical University , Hefei 230032;*

<sup>2</sup> *Dept of Urology , Peking University Shenzhen Hospital , Shenzhen 518036;* <sup>3</sup> *Guangdong and Shenzhen Key Laboratory of Male Reproductive Medicine and Genetics , Shenzhen 518036)*

**Abstract Objective** To detect the expression level of long non-coding RNA( lncRNA) PANDAR in paired renal cell carcinoma( RCC) and normal tissues and explore PANDAR's clinical significance in renal cell carcinoma. **Methods** Total RNA was isolated from 48 paired tissues , and the total RNA was used to get cDNA by performing reverse transcription. Then real time quantitative PCR( RT-qPCR) was performed to detect the expression of PANDAR. Statistical analysis was performed to explore the differences of PANDAR's expression level and the relationships between the expression of PANDAR and clinical characteristics. **Results** The expression level of lncRNA PANDAR was significantly lower in RCC tissues(  $P < 0.001$ ) than paired normal tissues and PANDAR was down-regulated in 38( 79.17%) RCC tissues. The results showed that the expression of PANDAR was associated with the TNM and AJCC stage. However , no relationships were found between the expression of PANDAR and patients' age , sex and pathological types of RCC. Overall survival rate of patients with lower expression of PANDAR was significantly lower than patients with higher expression of PANDAR(  $P < 0.05$ ) . **Conclusion** In RCC tissues PANDAR is down-regulated , and the expression of PANDAR is associated with prognosis , TNM and AJCC stage of RCC , which indicates that it may be involved in the tumorigenesis and development of RCC.

**Key words** renal cell carcinoma; neoplasm staging; lncRNAs; PANDAR