

临床研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.002957

外周血中肺腺癌转移相关转录本 1 对口腔鳞状细胞癌的临床诊断价值

陈 睿¹,曾宗跃²

(重庆医科大学附属第一医院 1. 口腔颌面外科;2. 检验科,重庆 400016)

[摘要]目的:探讨外周血中肺腺癌转移相关转录本 1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1) 对口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC) 的临床诊断价值。方法:采用荧光定量 RT-qPCR 方法检测 OSCC 患者术前外周血样本及配对术后癌组织中 MALAT1 的表达。结果: MALAT1 在 OSCC 患者外周血中的平均表达水平明显高于健康志愿者 (1.845 ± 0.142 vs. $0.642 \pm 0.090, P < 0.001$) ; MALAT1 在外周血中的表达水平与配对癌组织成正相关, 相关系数为 0.783 ($P < 0.001$) ; MALAT1 在外周血中的表达水平与肿瘤 TNM 分期 ($P = 0.001$) 及细胞分化程度相关 ($P = 0.010$) ; MALAT1 对 OSCC 诊断的 ROC 曲线下面积为 0.892, 当截断值为 0.788 时, 其诊断灵敏度为 85%, 特异度为 81%。结论: MALAT1 对 OSCC 具有较好的临床诊断价值, 有望成为 OSCC 疾病诊断、预后判断的血清分子标志物。

[关键词]口腔鳞状细胞癌;肺腺癌转移相关转录本 1;外周血;诊断价值

[中图分类号]R782

[文献标志码]A

[收稿日期]2021-04-12

Clinical diagnostic value of metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 in peripheral blood of patients with oral squamous cell carcinoma

Chen Rui¹, Zeng Zongyue²

(1. Department of Oral and Maxillofacial Surgery; 2. Department of Laboratory Medicine,
The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

[Abstract]Objective: To investigate the clinical diagnostic value of metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1) in the peripheral blood of patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC). Methods: Fluorescence quantitative RT-qPCR was used to detect the expression of MALAT1 in the preoperative peripheral blood samples and paired postoperative tumor tissues of patients with OSCC. Results: The mean expression level of MALAT1 in peripheral blood of patients with OSCC was significantly higher than that of healthy volunteers (1.845 ± 0.142 vs. $0.642 \pm 0.090, P < 0.001$). The expression level of MALAT1 in peripheral blood was positively correlated with the paired tumor tissues with a correlation coefficient of 0.783 ($P < 0.001$). The expression level of MALAT1 in peripheral blood was correlated with tumor TNM stage ($P = 0.001$) and cell differentiation ($P = 0.010$). The area under the ROC curve of MALAT1 for the diagnosis of OSCC was 0.892. When the cutoff value was 0.788, the diagnostic sensitivity and specificity of MALAT1 were 85% and 81% respectively. Conclusion: MALAT1 has potential clinical value of diagnosing OSCC, and is expected to be a serum molecular marker for the diagnosis and prognosis of OSCC.

[Key words]oral squamous cell carcinoma; metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1; peripheral blood; diagnostic value

作者介绍:陈 睿,Email:934208268@qq.com,

研究方向:口腔颌面部肿瘤相关研究。

通信作者:曾宗跃,Email:zengzongyue@126.com。

基金项目:中国博士后科学基金第 66 批面上资助二等资助项目(编号:

2019M663446);重庆市自然科学基金博士后资助项目(编号:
cstc2019jcyj-bsh0006)。

优先出版:<https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20211221.1338.010.html>

(2021-12-23)

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC) 是头颈部最常见的肿瘤类型, 侵袭性较高, 常导致肿瘤侵袭、浸润和远处转移^[1-2]。OSCC 起病隐匿, 发病机制复杂, 诊断主要依靠病理学检查, 缺少较好的可用于临床诊断及预后的特异性血清学指标。因此, 寻找可用于 OSCC 早期诊断的血清标志物具有重要意义。

长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是指长度大于 200 个核苷酸,不具有蛋白质编码功能的核糖核酸。随着 ENCODE 研究计划的启动以及近年来对 lncRNA 作用机制的深入研究,越来越多的学者发现 lncRNA 并非真正意义上的“无意义”。相反,lncRNA 广泛参与细胞分裂与分化、肿瘤发生与形成等生理病理过程。肺腺癌转移相关转录本 1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1)位于 11q13.1,全长 8.5 kb,在非小细胞肺癌中首次被发现且命名,并被证实在非小细胞肺癌生存和转移等预后评价中具有重要临床价值^[3]。多位学者证实 MALAT1 在非小细胞肺癌、乳腺癌、膀胱癌、鼻咽癌、骨肉瘤、上皮性卵巢癌等肿瘤中均被证实对肿瘤具有潜在诊断价值^[4]。有研究表明 MALAT1 可以促进 OSCC 肿瘤进展或转移^[5-6],但是外周血中的 MALAT1 对 OSCC 的临床诊断价值尚未被挖掘。为此,本文通过对 OSCC 患者术前血清及配对术后癌组织检测 MALAT1 的表达并进行差异化数据分析和诊断性能评价,挖掘 MALAT1 对 OSCC 的临床诊断价值,以期为 OSCC 提供分子诊断标志物。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 收集重庆医科大学附属第一医院口腔颌面外科 2020 年 1 月至 12 月间诊治的 OSCC 患者术前外周血及术后癌组织样本。所有患者的明确诊断需经 2 名高级职称病理医生阅片并明确病理诊断为 OSCC。血液样本及手术样本在收集前均已获得患者知情同意。排除标准:伴有或合并其他肿瘤;病理未明确诊断及分型;术后获取的血清样本、病例资料不完整。对照者为本院体检的健康志愿者。

1.1.2 实验试剂与设备 TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂盒购自天根公司(DP424),OneTaq RT-PCR 试剂盒购自美国 NEB 公司,SYBR Green 荧光定量 PCR 预混液购自德国罗氏公司(Roche 04913914001)。引物由华大公司-北京合成,实时荧光定量 PCR 仪为伯乐 CFX 系列-96 孔。

1.2 实验方法

50 mg 癌组织匀浆后或者 2 mL 患者外周血按总 RNA 提取试剂盒(DP424)说明书提取总 RNA,0.5 μg 提取后的总 RNA 采用 OneTaq RT-PCR 试剂盒说明书进行逆转录 PCR,逆转录产物稀释 100 倍后作为 cDNA 模板备用,25 μL

SYBR Green 荧光定量 PCR 反应体系构成如下:2 × SYBR Green 预混液 12.5 μL,cDNA 1 μL,上、下游引物各 1 μL,dH₂O 9.5 μL。MALAT1 上游引物为 5'-GGGAG-CAGCTCTGTG-GTG-3',MALAT1 下游引物为 5'-CCTGCGACTGCTCC-CAA-3';GAPDH 上游引物为 5'-GTCAAGGCTGAGAAC-GGGAA-3',GAPDH 下游引物为 5'-AAATGAGCCCCAGC-CTTCTC-3'。PCR 主要反应程序为:95℃预变性 3 min;95℃ 20 s,55℃ 10 s,70℃ 1 min,共进行 40 个循环。每个样本同时进行 3 次重复检测,将 3 次重复检测结果取 1 个平均值,相对于内参基因 GAPDH 的(1+e)-ΔC_t 值为该样本的实际表达值,其中 $\Delta C_t = C_{t_{\text{MALAT1}}} - C_{t_{\text{GAPDH}}}$, e 为 MALAT1 的 PCR 扩增效率。

1.3 统计学处理

所有数据均采用 Graph-Pad Prism 5.0 工具进行统计分析并绘制相关图表。MALAT1 的相对表达水平为正态计量资料,采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 形式表达;其中 MALAT1 的临床表达及其与临床病理因素的关系采用卡方检验进行统计分析,两样本组间比较采用 Mann-Whitney U 秩和检验。MALAT1 诊断效能评价以受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线进行描述,MALAT1 外周血与配对癌组织的表达相关性采用 Spearman 进行相关分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 MALAT1 在 OSCC 患者外周血中高表达

已收集的 53 例 OSCC 患者血清及健康志愿者外周血中 MALAT1 的表达结果显示,MALAT1 在 OSCC 患者外周血的平均表达水平明显高于健康志愿者(1.845 ± 0.142 vs. 0.642 ± 0.090 , $P<0.001$)(图 1),提示血清 MALAT1 对 OSCC 具有潜在临床价值。

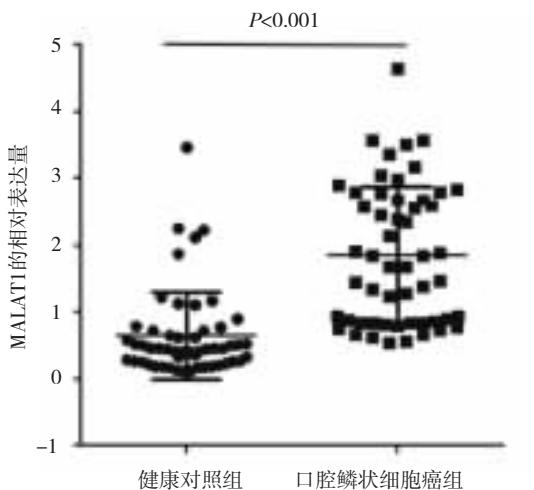


图 1 口腔鳞状细胞癌与健康体检者血清 MALAT1 的表达水平比较

2.2 MALAT1 在 OSCC 患者血清及配对癌组织中的表达相关

对收集的 53 例 OSCC 患者外周血及配对癌组织同时检测 MALAT1 表达,并且对两者的相关性进行分析,结果显示 MALAT1 在血清中的表达与其对应癌组织正相关($r=0.783$, $P<0.001$)(图 2)。

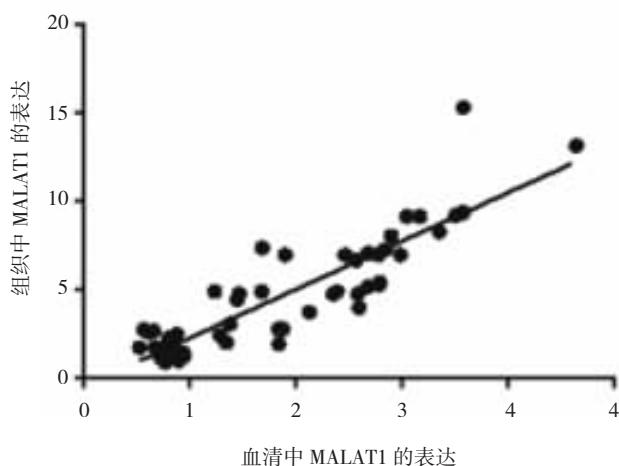


图 2 口腔鳞状细胞癌组织及其配对血清中 MALAT1 表达水平相关性分析

2.3 血清 MALAT1 的表达水平与各临床病理参数的关系

进一步分析血清 MALAT1 表达水平与临床各病理参数之间的关系,结果显示 MALAT1 表达水平与肿瘤 TNM 分期($P=0.001$)及细胞分化程度($P=0.010$)具有相关性,TNM 分期越晚,MALAT1 表达水平越高;细胞分化程度越低,MALAT1 表达越高。这一结果提示 MALAT1 可能是肿瘤恶性程度的重要标志(表 1)。

表 1 血清 MALAT1 的临床表达及其与临床病理因素的关系

临床病理参数	组别	例数	低表达	高表达	χ^2 值	P 值
年龄/岁	≤55	25	12	13	0.013	0.909
	>55	28	13	15		
性别	男性	29	12	17	0.862	0.353
	女性	24	13	11		
抽烟	否	34	16	18	0.001	0.983
	是	19	9	10		
肿瘤部位	舌	34	16	18	0.039	0.981
	颊	11	5	6		
	牙龈	8	4	4		
TNM 分期	I + II	27	19	8	11.890	0.001
	III + IV	26	6	20		
分化程度	低分化	29	9	20	6.691	0.010
	中或高分化	24	16	8		
淋巴结转移	是	19	7	12	1.268	0.260
	否	34	18	16		

2.4 外周血 MALAT1 对 OSCC 诊断的性能评价

为探究外周血中升高的 MALAT1 对 OSCC 的临床诊断价值,对 OSCC 患者及健康志愿者血清中的 MALAT1 表达水平进行 ROC 曲线分析,结果显示 ROC 曲线下面积(area under the ROC curve, AUC)为 0.892(95%CI=0.830~0.955, $P<0.001$,当截断值为 0.788 时,其诊断灵敏度为 85%,特异度为 81%,似然比为 4.091(图 3)。这一研究结果提示血清 MALAT1 对 OSCC 有较好的诊断性能。

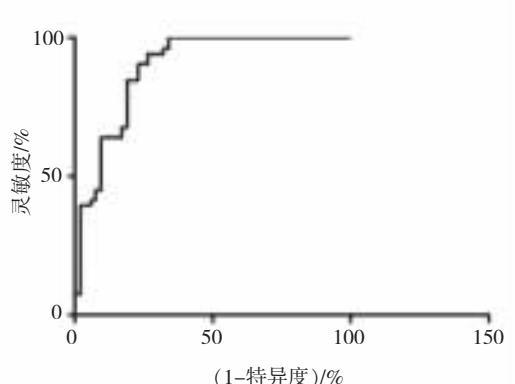


图 3 血清 MALAT1 诊断 OSCC 的 ROC 曲线分析

3 讨 论

OSCC 在诊断和联合治疗方面有大量研究报道,但口腔因其环境特殊性,容易暴露于各种危险因素,OSCC 治愈率近十几年一直维持在 45%~50%,未有明显改善^[7]。目前,针对 OSCC 的诊断和治疗决策选择主要还是依靠病理学手段,缺少特异的血清标志物。因此,发现新的可用于疾病诊断和预后的分子标志物对帮助 OSCC 患者早期诊断和改善预后具有较大意义。

lncRNA 广泛参与细胞生长和发育过程,包括细胞增殖、凋亡和分化,以及癌症进展,例如 HOTAIR、TUG1、ANDRIL 等。lncRNA 参与 OSCC 肿瘤进展调控,并且与肿瘤预后相关^[8-9]。MALAT1 是肿瘤进展中的重要 lncRNA。既往研究表明 MALAT1 在非小细胞肺癌、结直肠癌、头颈部鳞状细胞癌等肿瘤中表达上调^[5,10-12]。Xiao L 等^[5]研究发现 MALAT1 可以通过 miR-101/EZH2 调控轴促进 OSCC 生长。Wang R 等^[13]研究亦证实 MALAT1 可以通过 PI3K/Akt/m-TOR 信号通路调控 OSCC 细胞上皮细胞-间质细胞

转化和顺铂化疗耐药。但是,外周血中的 MALAT1 作为分子标志物在 OSCC 的临床价值研究还处在初级阶段。本研究通过收集 53 例 OSCC 患者术前外周血及配对术后癌组织,提取总 RNA 检测 MALAT1 表达,并进行差异性分析。结果发现,与健康志愿者相比,MALAT1 在 OSCC 患者外周血中高表达,MALAT1 在患者血清及其配对癌组织中的表达呈正相关($r=0.783$)。进一步分析血清 MALAT1 表达水平与临床各病理参数之间的关系,结果显示 MALAT1 表达水平与肿瘤 TNM 分期及细胞分化程度相关。对 OSCC 患者及健康志愿者血清中的 MALAT1 表达水平进行 ROC 曲线分析,结果显示 AUC 为 0.892 (95%CI=0.830~0.955, $P<0.001$),当截断值为 0.788 时,诊断灵敏度为 85%,特异度为 81%,似然比为 4.091,诊断性能较为满意,提示 MALAT1 对 OSCC 有较好的诊断价值。该研究结果与 MALAT1 在非小细胞肺癌、乳腺癌、膀胱癌、鼻咽癌、骨肉瘤、上皮性卵巢癌等肿瘤中的诊断性能较接近^[4]。

综上所述,MALAT1 作为外周血中易于检测的分子标志物,对 OSCC 具有一定的诊断价值,有望成为 OSCC 早期诊断、预后判断的临床可用的分子标志物。由于本研究收集的临床病例数有限,OSCC 与临床病理各参数的精细关系有待后续研究中深入。

参 考 文 献

- [1] Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer[J]. Oral Oncol, 2009, 45(4/5):309–316.
- [2] Hoffman HT, Porter K, Karnell LH, et al. Laryngeal cancer in the United States: changes in demographics, patterns of care, and survival [J]. Laryngoscope, 2006, 116(9 Pt 2 S 111):1–13.
- [3] Ji P, Diederichs S, Wang WB, et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer[J]. Oncogene, 2003, 22(39):8031–8041.
- [4] Li ZX, Zhu QN, Zhang HB, et al. MALAT1: a potential biomarker in cancer[J]. Cancer Manag Res, 2018, 10:6757–6768.
- [5] Xiao L, Wang WP, Zhao JJ, et al. lncRNA MALAT1 promotes cell proliferation and invasion by regulating the miR-101/EZH2 axis in oral squamous cell carcinoma[J]. Oncol Lett, 2020, 20(5):164.
- [6] Zhou X, Liu S, Cai GS, et al. Long non coding RNA MALAT1 promotes tumor growth and metastasis by inducing epithelial–mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma[J]. Sci Rep, 2015, 5:15972.
- [7] Bloebaum M, Poort L, Böckmann R, et al. Survival after curative surgical treatment for primary oral squamous cell carcinoma[J]. J Cranio-maxillofac Surg, 2014, 42(8):1572–1576.
- [8] Lu MY, Liao YW, Chen PY, et al. Targeting LncRNA HOTAIR suppresses cancer stemness and metastasis in oral carcinomas stem cells through modulation of EMT[J]. Oncotarget, 2017, 8(58):98542–98552.
- [9] Zhang L, Meng X, Zhu XW, et al. Long non-coding RNAs in oral squamous cell carcinoma: biologic function, mechanisms and clinical implications[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1):102.
- [10] Tang DX, Yang Z, Long FX, et al. Inhibition of MALAT1 reduces tumor growth and metastasis and promotes drug sensitivity in colorectal cancer[J]. Cell Signal, 2019, 57:21–28.
- [11] Yao Y, Chen XY, Lu S, et al. Circulating long noncoding RNAs as biomarkers for predicting head and neck squamous cell carcinoma [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 50(4):1429–1440.
- [12] Zhuo M, Yuan CC, Han T, et al. A novel feedback loop between high MALAT-1 and low miR-200c-3p promotes cell migration and invasion in pancreatic ductal adenocarcinoma and is predictive of poor prognosis[J]. BMC Cancer, 2018, 18(1):1032.
- [13] Wang R, Lu XX, Yu RY. lncRNA MALAT1 promotes EMT process and cisplatin resistance of oral squamous cell carcinoma via PI3K/Akt/m-TOR signal pathway[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13:4049–4061.

(责任编辑:冉明会)