

· 论 著 ·

# 长链非编码 RNA FOXC2-AS1 在弥漫大 B 细胞淋巴瘤组织中的表达及意义

刘伟<sup>1</sup>, 雷磊<sup>1</sup>, 叶绥艳<sup>1</sup>, 刘强<sup>2</sup>

1. 榆林市第一医院血液科, 陕西 榆林 719000; 2. 河南省肿瘤医院血液科, 河南 郑州 450052

**摘要:** **目的** 探讨长链非编码叉头框蛋白 C2-反义 RNA1(LncRNA FOXC2-AS1)在弥漫大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)组织中的表达及意义。**方法** 选取 2012 年 4 月至 2017 年 4 月收治的 DLBCL 患者 93 例和同期因淋巴结反应性增生就诊的 45 例患者(对照组)作为研究对象。实时荧光定量 PCR 术检测 DLBCL 患者淋巴瘤组织和对照组淋巴结组织标本中 LncRNA FOXC2-AS1 表达;分析 LncRNA FOXC2-AS1 在不同病理特征 DLBCL 患者中的表达差异,以及对患者预后的影响。**结果** LncRNA FOXC2-AS1 在 DLBCL 患者组织中的相对表达量为  $2.47 \pm 0.34$ , 高于对照组组织中的  $1.03 \pm 0.12$ , 差异有统计学意义( $P < 0.01$ );LncRNA FOXC2-AS1 在有 B 症状(发热、乏力、盗汗和消瘦)、B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)阳性、多发骨髓瘤基因 1(MUM1)阳性、Ki-67 阳性、LDH 升高、结外病变数量  $> 2$  个、Arbor 临床分期 III ~ IV 期、IPI 评分  $> 2$  分和治疗效果未完全缓解的 DLBCL 患者组织中表达量升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );Kaplan-Meier 生存分析结果显示,低表达组患者平均生存时间[(62.83  $\pm$  6.00)月 vs (33.48  $\pm$  3.28)月]和累积生存率(66.67% vs 21.74%)均高于高表达组( $P < 0.01$ );Cox 比例风险回归模型结果显示,Bcl-2、LDH、Arbor 临床分期、治疗效果和 LncRNA FOXC2-AS1 表达是影响 DLBCL 患者预后的风险因素( $HR = 1.943, 2.077, 2.115, 2.082, 2.966, P < 0.05$ )。**结论** LncRNA FOXC2-AS1 在 DLBCL 组织中呈高表达,且可能与其恶性增殖、侵袭及治疗效果有关,是影响患者预后的指标。

**关键词:** 弥漫大 B 细胞淋巴瘤; 长链非编码叉头框蛋白 C2-反义 RNA1; 预后

**中图分类号:** R 733.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2020)08-1023-04

## Expression and significance of long-chain non-coding RNA FOXC2-AS1 in diffuse large B-cell lymphoma

LIU Wei\*, LEI Lei, YE Sui-yan, LIU Qiang

\* Department of Hematology, the First Hospital of Yulin, Yulin, Shaanxi 719000, China

Corresponding author: LEI Lei, E-mail: 1564570864@qq.com

**Abstract: Objective** To investigate the expression and significance of long-chain non-coding RNA FOXC2-AS1 (LncRNA FOXC2-AS1) in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) tissues. **Methods** Ninety-three patients with DLBCL admitted from April 2012 to April 2017 were selected as DLBCL group and during the same period, 45 patients with lymph node reactive hyperplasia were collected as control group. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression of LncRNA FOXC2-AS1 in lymphoma tissues of DLBCL patients and lymph node tissues of control group. The expression difference of LncRNA FOXC2-AS1 in DLBCL patients with different pathological indicators and their effects on the prognosis of patients were analyzed. **Results** The expression level of LncRNA FOXC2-AS1 in DLBCL group was significantly higher than that in control group ( $2.47 \pm 0.34$  vs  $1.03 \pm 0.12$ ,  $P < 0.01$ ). The expression of LncRNA FOXC2-AS1 increased in patients with B symptoms, Bcl-2 positive, MUM1 positive, Ki-67 positive, higher LDH, the number of extranodal lesions  $> 2$ , Arbor clinical stage III ~ IV, IPI score  $> 2$  points and the treatment effect not completely relieved ( $P < 0.05$ ). Kaplan-Meier survival analysis showed that the average survival time [(62.83  $\pm$  6.00) months vs (33.48  $\pm$  3.28) months,  $P < 0.01$ ] and cumulative survival rate (66.67% vs 21.74%,  $P < 0.01$ ) of patients in the low expression group were higher than those in the high expression group. Cox proportional hazards regression model results showed that Bcl-2, LDH, Arbor clinical stage, treatment effect and LncRNA FOXC2-AS1 expression were risk factors that affect the

prognosis of DLBCL patients ( $HR = 1.943, 2.077, 2.115, 2.082, 2.966, P < 0.05$ ). **Conclusion** LncRNA FOXC2-AS1 is highly expressed in DLBCL tissues, and may be related to its malignant proliferation, invasion and treatment effect, which is an indicator that affects the prognosis of patients.

**Key words:** Diffuse large B-cell lymphoma; Long non-coding RNA FOXC2-AS1; Prognosis

**Fund program:** Science and Technology Development Plan of Henan Province (152300410161)

弥漫大 B 细胞淋巴瘤 (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) 作为一种血液系统恶性肿瘤, 是非霍奇金淋巴瘤中最常见的类型, 侵袭力强, 且在临床、免疫、分子遗传等方面的异质性较高<sup>[1]</sup>。近年来, 由于该病的诊疗方案取得很大进展, 特别是联合化疗和生物靶向治疗的临床使用, 患者临床缓解率及生存率提高, 但仍有约 1/3 的患者在治疗后进展为难治或复发, 严重影响患者预后<sup>[2]</sup>。目前, DLBCL 发病机制尚未完全清楚, 给其诊疗进展带来限制。长链非编码 RNA (long non-coding RNAs, LncRNAs) 作为一类含有 200 个核苷酸以上、而不具有或少有编码蛋白功能的长链非编码 RNA, 已被证实参与多种疾病发生、进展及诊疗过程<sup>[3]</sup>, 且在调控癌症的表观遗传方面发挥重要作用<sup>[4]</sup>。长链非编码叉头框蛋白 C2-反义 RNA1 (LncRNA FOXC2-AS1) 作为一类重要的 LncRNAs, 已被发现在体内可促进肿瘤生长, 在体外则可促进肿瘤细胞增殖<sup>[5]</sup>, 且与乳腺癌的不良预后有关<sup>[6]</sup>。本研究拟分析 DLBCL 淋巴瘤组织中 LncRNA FOXC2-AS1 表达情况, 探讨其在不同病理指标间表达的差异性, 以及其对预后的影响, 以期对 DLBCL 临床诊疗及预后评估提供参考。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2012 年 4 月至 2017 年 4 月榆林市第一医院血液科收治的 DLBCL 患者, 纳入标准: (1) 均经病理学检查确诊, 且符合 2018 年 WHO 提出的关于 DLBCL 诊断标准; (2) 治疗前未接受任何放疗或靶向治疗; (3) 临床及病理资料完整, 且能完成随访。排除标准: (1) 合并其他恶性肿瘤者; (2) 合并严重糖尿病及极高危高血压、大面积心肌梗死、脑梗死及精神病史者。共纳入患者 93 例, 其中男 52 例, 女 41 例; 年龄 18 ~ 83 (53.42 ± 13.18) 岁; 有 B 症状 (发热、乏力、盗汗和消瘦) 57 例, 无 B 症状 36 例; Arbor 临床分期: I 期 17 例, II 期 23 例, III 期 32 例, IV 期 21 例; 根据非霍奇金淋巴瘤国际预后指数 (IPI) 评分, 0 ~ 2 分 36 例, > 2 分 57 例。收集同期因淋巴结反应性增生就诊的 45 例患者作为对照组, 其中男 27 例, 女 18 例; 年龄 (54.84 ± 12.75) 岁。DLBCL 患者的淋巴瘤组织与对照组的淋巴结性别、年

龄等比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。留取 DLBCL 患者的淋巴瘤组织和对照组的淋巴结组织标本后, 即刻置于液氮中, 于 -80 °C 冰箱保存。本研究通过医院伦理委员会批准, 患者均签署知情同意书。

1.2 实时荧光定量 PCR 检测 LncRNA FOXC2-AS1 表达 取 DLBCL 患者和对照组淋巴结组织标本, 剪碎后研磨, 加入细胞裂解液, 利用 Trizol 试剂盒 (购自美国 Life Technologies 公司, 批号: 15596026) 对组织标本中总 RNA 进行提取, 利用紫外可见分光光度计 (购自上海谱元仪器有限公司) 检测总 RNA 纯度, 1.80 < A260/280 < 2.20 为合格。按逆转录试剂盒 (购自日本 TaKaRa 公司, 批号: AK3101) 操作步骤将提取的总 RNA 进行逆转录为 cDNA。利用 LightCycler® 480 实时荧光定量 PCR 仪 (购自瑞士 Roche 公司) 按 PCR 扩增试剂盒 (购自美国 Promega 公司, 批号: SK2491-50) 说明对引物进行扩增。引物序列: LncRNA FOXC2-AS1: 上游: 5'-CAC AGT GTA GGA GAG TAA TCA G-3', 下游: 5'-AAG CTC CAT TTC GCA ACC TTA C-3'; GAPDH: 上游: 5'-CTA AGG CCA ATG ACC GAA AG-3', 下游: 5'-ACC AGA GGC GGA TAC AGA CA-3'。PCR 反应条件: 92 °C 3 min, 92 °C 30 s, 59 °C 30 s, 76 °C 30 s, 连续循环 38 次, 每组样品设 6 个复孔。利用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法分析两组组织中 LncRNA FOXC2-AS1 表达量。

1.3 其他指标检测 全自动生化分析仪检测血清乳酸脱氢酶 (LDH) 水平; 收集患者初诊时病理切片, 对 CD10、B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2)、多发性骨髓瘤基因 1 (MUM1) 和细胞核增殖抗原 Ki-67 等指标进行免疫组化染色检测, 并根据 CD10、Bcl-2 和 MUM1 表达情况将患者分为非生发中心型和生发中心型。

1.4 病例随访 所有 DLBCL 患者于院外随访, 随访形式包括电话、门诊、住院病历等, 截止日期 2019 年 4 月 30 日, 以术后第 1 天为起始, 以死亡或最后一次随访时间为终点, 获得患者总生存时间。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 23.0 软件进行分析。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用独立样本 *t* 检验, 生存分析采用 Kaplan-Meier 法和 Log-rank 检验, 影响生存时间的多因素分析采用 Cox 比例风险回归模型。检验水准取  $\alpha = 0.05$ , 双侧检验。

## 2 结果

2.1 LncRNA FOXC2-AS1 在 DLBCL 患者和对照组组织中的表达 LncRNA FOXC2-AS1 在 DLBCL 患者组织中的相对表达量为  $2.47 \pm 0.34$ , 高于对照组组织中的  $1.03 \pm 0.12$  ( $t = 27.488, P < 0.01$ )。

2.2 LncRNA FOXC2-AS1 在不同临床病理特征 DLBCL 患者组织中表达的差异 LncRNA FOXC2-AS1 在不同性别、年龄、肿瘤大小、CD10、病理类型和治疗方案的患者组织中表达量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); LncRNA FOXC2-AS1 在有 B 症状、Bcl-2 阳性、MUM1 阳性、Ki-67 阳性、乳酸脱氢酶 (LDH) 升高、结外病变数量  $> 2$  个、Arbor 临床分期 III ~ IV 期、IPI 评分  $> 2$  分和疗效未完全缓解患者组织中表达量高于无 B 症状、Bcl-2 阴性、MUM1 阴性、Ki-67 阴性、LDH 正常、结外病变数量  $\leq 2$  个、Arbor 临床分期 I ~ II 期、IPI 评分 0 ~ 2 分和疗效完全缓解患者, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 1。

2.3 LncRNA FOXC2-AS1 表达对 DLBCL 患者预后的影响 截止 2019 年 4 月 30 日, 死亡 42 例, 存活 51 例, 随访时间 3 ~ 83 个月, 以 LncRNA FOXC2-AS1 表达量的  $P_{25}$  值为界值, 将患者分为低表达组 ( $n = 24$ ) 和高表达组 ( $n = 69$ ), Kaplan-Meier 生存分析结果显示, 低表达组患者生存时间 ( $62.83 \pm 6.00$ ) 个月, 高表达组 ( $33.48 \pm 3.28$ ) 个月; 低表达组患者累积生存率 66.67%, 高表达组 21.74%, 经 Log-Rank 检验, 差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 13.527, P < 0.01$ )。见图 1。

2.4 影响 DLBCL 患者预后的多因素分析 Cox 比例风险回归模型结果显示, Bcl-2、LDH、Arbor 临床分期、治疗效果和 LncRNA FOXC2-AS1 表达是影响 DLBCL 患者预后的风险因素 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

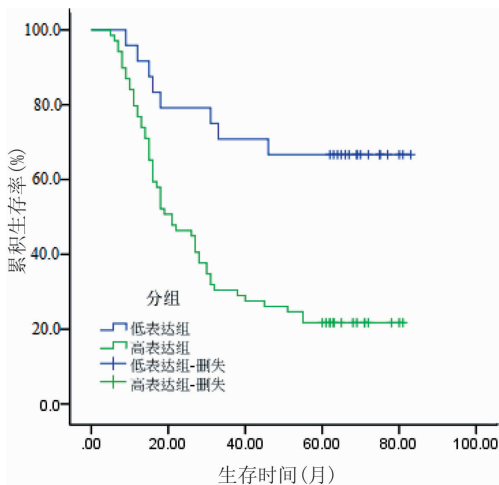


图 1 Kaplan-Meier 法分析 LncRNA FOXC2-AS1 表达对 DLBCL 患者预后的影响

表 1 LncRNA FOXC2-AS1 在不同临床病理特征 DLBCL 患者组织中的表达差异 ( $\bar{x} \pm s$ )

指标	例数	LncRNA FOXC2-AS1 表达量	t 值	P 值	
性别	男	52	2.44 ± 0.35	0.853	0.396
	女	41	2.50 ± 0.33		
年龄	≥60 岁	42	2.43 ± 0.32	0.831	0.408
	<60 岁	51	2.49 ± 0.36		
B 症状	有	57	2.55 ± 0.34	3.024	0.003
	无	36	2.34 ± 0.31		
CD10	阴性	55	2.48 ± 0.32	0.416	0.678
	阳性	38	2.45 ± 0.36		
Bcl-2	阴性	47	2.33 ± 0.32	4.199	0.000
	阳性	46	2.60 ± 0.31		
MUM1	阴性	52	2.40 ± 0.31	2.071	0.041
	阳性	41	2.55 ± 0.36		
Ki-67	阴性	40	2.37 ± 0.29	2.481	0.015
	阳性	53	2.54 ± 0.36		
肿瘤大小	<5 cm	43	2.41 ± 0.33	1.444	0.152
	≥5 cm	50	2.51 ± 0.34		
病理类型	生发中心 <sup>a</sup>	37	2.48 ± 0.35	0.475	0.636
	非生发中心 <sup>a</sup>	56	2.46 ± 0.33		
LDH(U/L)	正常	38	2.31 ± 0.29	4.104	0.000
	升高	55	2.58 ± 0.33		
结外病变数量	≤2 个	54	2.38 ± 0.34	2.894	0.005
	>2 个	39	2.58 ± 0.30		
Arbor 临床分期	I ~ II 期	40	2.30 ± 0.31	4.650	0.000
	III ~ IV 期	53	2.59 ± 0.30		
IPI 评分	0 ~ 2 分	36	2.37 ± 0.32	2.114	0.037
	>2 分	57	2.52 ± 0.34		
治疗方案	CHOP	69	2.45 ± 0.33	0.614	0.541
	R-CHOP	24	2.50 ± 0.36		
疗效	完全缓解	57	2.37 ± 0.29	3.852	0.000
	未完全缓解	36	2.63 ± 0.35		

注: CHOP: 环磷酰胺、长春新碱、泼尼松、羟基柔红霉素方案; R-CHOP: 利妥昔单抗联合 CHOP 方案; <sup>a</sup> 表示 B 细胞类型。

表 2 影响 DLBCL 患者预后的多因素分析

指标	$\beta$	SE	Wald	P 值	HR(95% CI)
性别	-0.516	0.323	2.550	0.110	0.597(0.317 ~ 1.125)
年龄	0.547	0.309	3.134	0.077	1.729(0.943 ~ 3.169)
B 症状	0.313	0.330	0.900	0.343	1.367(0.716 ~ 2.610)
CD10	0.328	0.309	1.128	0.288	1.388(0.758 ~ 2.542)
Bcl-2	0.664	0.322	4.256	0.039	1.943(1.034 ~ 3.651)
MUM1	0.505	0.303	2.783	0.095	1.657(0.915 ~ 3.000)
Ki-67	-0.367	0.342	1.153	0.283	0.693(0.355 ~ 1.354)
肿瘤大小	-0.437	0.323	1.831	0.176	0.646(0.343 ~ 1.217)
病理类型	0.451	0.303	2.216	0.137	1.570(0.867 ~ 2.845)
LDH	0.731	0.351	4.330	0.037	2.077(1.043 ~ 4.135)
结外病变数量	-0.515	0.327	2.477	0.116	0.598(0.315 ~ 1.135)
Arbor 临床分期	0.749	0.376	3.965	0.046	2.115(1.012 ~ 4.420)
IPI 评分	-0.186	0.367	0.257	0.612	0.830(0.405 ~ 1.704)
治疗方案	-0.582	0.338	2.966	0.085	0.559(0.288 ~ 1.084)
治疗效果	0.733	0.314	5.443	0.020	2.082(1.124 ~ 3.854)
LncRNA FOXC2-AS1 表达	1.087	0.440	6.106	0.013	2.966(1.252 ~ 7.025)

### 3 讨论

DLBCL 发病机制复杂,目前,现有的联合治疗方案使多数患者可长期生存,但仍有一部分患者出现复发而最终导致死亡<sup>[2]</sup>。有研究指出,肿瘤细胞过度增殖及高侵袭性是导致 DLBCL 患者复发及预后不良的重要因素<sup>[7]</sup>。研究表明,DLBCL 异质性的过程中涉及众多信号通路异常失活或激活,以及多种基因异常表达,从而导致细胞过度增殖、分化、凋亡及侵袭力改变<sup>[8]</sup>。因此,从分子生物学角度研究影响 DLBCL 细胞增殖及侵袭的敏感基因,对患者临床诊疗及改善预后具有重要意义。LncRNA 尽管低表达甚至不表达功能性蛋白,但其可通过调控基因转录、mRNA 加工、入核转运等而在多种生理过程中发挥重要作用<sup>[9]</sup>,同时,其在肿瘤组织中呈现表达特异性,与肿瘤细胞恶性增殖、凋亡及侵袭、转移等密切相关<sup>[10]</sup>。有研究指出,LncRNA 在 DLBCL 表观遗传、转录及转录后水平中起重要作用,与肿瘤的发生和发展密切相关,并且有望成为预后指标或治疗靶点<sup>[11]</sup>。LncRNA FOXC2-AS1 作为一种 LncRNA,有研究利用基因芯片技术发现其在骨肉瘤组织中呈高表达,且沉默该基因可增加人骨肉瘤细胞对阿霉素的敏感性<sup>[12-13]</sup>。亦有研究指出,LncRNA FOXC2-AS1 通过沉默 p15 加速非小细胞肺癌的发生<sup>[14]</sup>。本研究结果显示,LncRNA FOXC2-AS1 在 DLBCL 患者组织中表达量高于对照组,说明 LncRNA FOXC2-AS1 可能参与了 DLBCL 发生过程。本研究结果显示,LncRNA FOXC2-AS1 在有 B 症状、Bel-2 阳性、MUM1 阳性、Ki-67 阳性、LDH 升高、结外病变数量 > 2 个、Arbor 临床分期 III ~ IV 期、IPI 评分 > 2 分和疗效未完全缓解患者淋巴瘤组织中呈高表达,提示 LncRNA FOXC2-AS1 表达可能与 DLBCL 恶性增殖、侵袭以及临床疗效等有关。

有研究指出,LncRNA FOXC2-AS1 高表达与乳腺癌患者不良预后有关,有望成为患者预后预测的生物标志物<sup>[6]</sup>。本研究生存分析结果显示,低表达组患者平均生存时间和累积生存率均高于高表达组,说明 LncRNA FOXC2-AS1 表达与 DLBCL 患者预后有关,其高表达则患者预后不佳。本研究 Cox 比例风险回归模型结果显示,LncRNA FOXC2-AS1 表达是影响 DLBCL 患者预后的风险因素,提示其可作为评估患者预后的指标。

综上所述,LncRNA FOXC2-AS1 在 DLBCL 组织中呈高表达,且可能与其恶性增殖、侵袭及治疗效果有关,是影响患者预后的指标。但 LncRNA FOXC2-AS1 具体作用机制尚需进一步开展分子细胞学相关研究予以明确。

### 参考文献

- [1] Sakakibara A, Inagaki Y, Imaoka E, et al. Divergence and heterogeneity of neoplastic PD-L1 expression; two autopsy case reports of intravascular large B-cell lymphoma [J]. *Pathol Int*, 2019, 69(3):148.
- [2] Dada R. Diagnosis and management of follicular lymphoma: a comprehensive review [J]. *Eur J Haematol*, 2019, 103(3):152-163.
- [3] Rafiee A, Riazi-Rad F, Havaskary M, et al. Long noncoding RNAs: regulation, function and cancer [J]. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 2018, 34(2):153-180.
- [4] 张中民, 庞达. 长链非编码 RNA 调控癌症细胞信号通路的研究进展 [J]. *实用肿瘤学杂志*, 2018, 32(2):184-188.
- [5] Chen YB, Gu M, Liu C, et al. Long noncoding RNA FOXC2-AS1 facilitates the proliferation and progression of prostate cancer via targeting miR-1253/EZH2 [J]. *Gene*, 2019, 686:37-42.
- [6] Yang HS, Chen TX, Xu S, et al. Long noncoding RNA FOXC2-AS1 predicts poor survival in breast cancer patients and promotes cell proliferation [J]. *Oncol Res*, 2019, 27(2):219-226.
- [7] Wang HY, Wang AH, Hu ZB, et al. A critical role of miR-144 in diffuse large B-cell lymphoma proliferation and invasion [J]. *Cancer Immunol Res*, 2016, 4(4):337-344.
- [8] 何志媛, 谢双锋, 聂大年, 等. mPGES-1、NF- $\kappa$ B p65 在弥漫大 B 细胞淋巴瘤中的表达及临床意义 [J]. *中山大学学报(医学版)*, 2018, 39(1):73-81.
- [9] Yao RW, Wang Y, Chen LL. Cellular functions of long noncoding RNAs [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(5):542-551.
- [10] Liu JQ, Song WA, Li J, et al. LINK-A lncRNA is upregulated in metastatic non-small cell lung cancer and is associated with poor prognosis [J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(3):3049-3057.
- [11] 杨萍, 吴楚, 唐运莲. 长链非编码 RNA 在弥漫大 B 细胞淋巴瘤中的研究进展 [J]. *中南医学科学杂志*, 2019, 47(1):81-84.
- [12] Zhang CL, Zhu KP, Ma XL. Antisense lncRNA FOXC2-AS1 promotes doxorubicin resistance in osteosarcoma by increasing the expression of FOXC2 [J]. *Cancer Lett*, 2017, 396:66-75.
- [13] 张义, 张擎柱, 谷锐, 等. LncRNA FOXC2-AS1 逆转骨肉瘤细胞对阿霉素耐药性的影响 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2019, 24(5):385.
- [14] Sun Z, He CZ, Xiao M, et al. LncRNA FOXC2 antisense transcript accelerates non-small-cell lung cancer tumorigenesis via silencing p15 [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(7):4552-4560.

收稿日期:2020-02-10 修回日期:2020-03-01 编辑:王宇