

LncRNA CRNDE在肾母细胞瘤中的表达及其临床意义

鲁滢新¹, 鲍苗¹, 呼延逸然¹, 李振江², 朱燕亭^{2*}

¹西安医学院, 陕西 西安

²陕西省人民医院肾病血透中心, 陕西 西安

收稿日期: 2022年12月28日; 录用日期: 2023年1月21日; 发布日期: 2023年1月31日

摘要

目的: 本研究是为了探讨长链非编码RNA (LncRNA) CRNDE在肾母细胞瘤中的表达以及它的预后意义。方法: 通过实时荧光定量PCR技术检测CRNDE在肾母细胞瘤组织中的表达水平; 采用卡方检验确定CRNDE表达与肾母细胞瘤患者临床病理指标的相关性。最后利用Kaplan-Meier曲线、对数秩检验和Cox分析阐明CRNDE在肾母细胞瘤中的临床意义。结果: 肿瘤组织中的CRNDE表达水平较癌旁组织高; CRNDE表达水平的高低与临床分期、病理分型以及有无淋巴结转移相关。CRNDE的过度表达可作为肾母细胞瘤患者预后不良的独立预测因子。结论: CRNDE在肾母细胞瘤组织中高表达, 高CRNDE表达的患者预后不良, 提示我们CRNDE可能是肾母细胞瘤患者相关预后/治疗的潜在靶点。关于肾母细胞瘤中CRNDE的意义需要更多的研究深入探讨。

关键词

肾母细胞瘤, 长链非编码RNA, CRNDE, 表达水平, 预后

Expression and Clinical Significance of Long Non-Coding RNA CRNDE in Wilms Tumor

Yanxin Lu¹, Miao Bao¹, Yiran Huyan¹, Zhenjiang Li², Yanting Zhu^{2*}

¹Xi'an Medical University, Xi'an Shaanxi

²Kidney Disease and Dialysis Center, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an Shaanxi

Received: Dec. 28th, 2022; accepted: Jan. 21st, 2023; published: Jan. 31st, 2023

*通讯作者。

文章引用: 鲁滢新, 鲍苗, 呼延逸然, 李振江, 朱燕亭. LncRNA CRNDE 在肾母细胞瘤中的表达及其临床意义[J]. 临床医学进展, 2023, 13(1): 864-870. DOI: 10.12677/acm.2023.131125

Abstract

Objective: The aim of this study was to investigate the expression and prognostic significance of the long non-coding RNA (LncRNA) CRNDE in Wilms tumor. **Methods:** First, we detect the expression level of CRNDE in Wilms tumor tissues by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. Then determine correlation between CRNDE expression and clinicopathological parameters of patients with Wilms tumor by chi-square test. Finally, we use Kaplan-Meier curve, log-rank test and Cox analysis to clarify the clinical significance of CRNDE in Wilms tumor. **Results:** The expression of CRNDE was increased in patients with Wilms tumor, and the expression level was related to the clinical stage, pathological type and lymph node metastasis. Meanwhile, the overexpression of CRNDE can be used as an independent predictor of the prognosis of patients with Wilms tumor. **Conclusion:** CRNDE is highly expressed in Wilms tumor tissues, and patients with high CRNDE expression have poor prognosis, suggesting that CRNDE may be a potential prognostic/therapeutic target for Wilms tumor patients. More studies are needed to explore the significance of CRNDE in Wilms tumor.

Keywords

Wilms Tumor, Long Non-Coding RNA, CRNDE, Expression Level, Prognosis

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

肾母细胞瘤又称肾胚胎瘤或 Wilms 瘤，是小儿泌尿系统最常见的恶性肿瘤，起源于肾囊胚细胞，约占儿童肾脏肿瘤的 90% 和所有儿童癌症的 7% [1] [2]。肿瘤的发病部位隐蔽，进展较快，缺乏特定的肿瘤标记物，严重威胁着全世界儿童的生命和健康。近年来的综合性多学科治疗能显著提高 WT 患者的总体生存率，但在预后不良组织学类型(unfavorable histology, UFH)肿瘤、首次诊断为无法切除的大肿瘤、双侧肿瘤的患者时仍然面临很大困难，这部分肿瘤仍然是儿童癌症相关死亡的主要原因[3] [4]。目前寻找预测肾母细胞瘤患者临床进展和预后的有效生物标记物是研究的热点之一[5]，确定有效的生物标记物并了解肾母细胞瘤进展的详细分子机制对于制定有效干预措施和指导肾母细胞瘤患者的管理至关重要。

长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNAs)是指长度大于 200 nt 且无蛋白质编码潜能的 RNA 转录本，由于具有调节肿瘤进展和肿瘤生物学行为(如基因表达，细胞增殖，细胞分化，免疫反应和凋亡)等重要作用，它与癌症之间的关系越来越得到重视[6] [7]。CRNDE 是近年来新发现的一种长链非编码 RNA，从 16 号染色体长臂(16q12.2)转录而来，在各种类型的人类癌症中过度表达[8]。它与癌细胞的增殖与迁移有关，具体的分子机制是目前研究的热点[9] [10] [11]。临床研究发现 CRNDE 不仅可以作为一种诊断性生物标志物，还是与各种癌症的临床病理学特征和结果相关的预后预测因子[4]。在肾母细胞瘤中，研究已经证实 CRNDE 肿瘤组织和细胞系中呈异常高表达状态，CRNDE 表达相对更高的患者淋巴结转移风险更高，细胞实验发现 CRNDE 可能通过调节 microRNA-424 加速肿瘤的进展[3]。然而，关于 CRNDE 在肾母细胞瘤发生发展中发挥的具体作用以及其在评估肾母细胞瘤患者预后方面的功能尚未得到充分的讨论。本研究将观察 CRNDE 对肾母细胞瘤患者预后的评估意义并进一步探索其在肾母细胞瘤发生发展

过程中的作用。

2. 方法

2.1. 临床样本和资料收集

从陕西省人民医院泌尿外科在 2014 年 5 月至 2016 年 5 月间收治的肾母细胞瘤患者中选取 64 例, 包括 34 例男性, 30 例女性; 患者年龄 0.8~6.5 岁, 平均年龄(3.6 ± 0.8)岁。手术留取患者肿瘤组织和癌旁组织(肿瘤未侵犯)作为研究材料, 存储在 -80°C 下供使用。患者纳入标准: ① 肾母细胞瘤的诊断经影像学检查确认; ② 既往无其他癌症病史者。这项调查得到了陕西省人民医院伦理委员会的批准(批件编号: 20140508), 且与《世界医学协会赫尔辛基宣言》相符。在研究之前, 所有患者的法定监护人都已获得知情同意。

2.2. 实时荧光定量 PCR 检测 CRNDE 的表达量

采用 Trizol 法提取手术中获得的肾母细胞瘤组织和癌旁组织的总 RNA, 并用紫外分光光度计评估 RNA 提取的纯度: 测定标本组织在波长为 260 nm/280 nm 处的吸光度值(OD 值), 选取 OD 值范围为 1.9~2.0 的样品。之后按照反转录试剂盒操作说明将总 RNA 反转录合成 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 RT-PCR 反应。反应结束后用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法相对定量 CRNDE 的表达, 并以 CRNDE 表达量的平均数为界, 分为高表达组和低表达组。以上实验均重复 3 次。该过程中使用的引物为: CRNDE 5'-ATATTCAGCCGTGGTCTTTGA-3' (正向)和 5'-TCTCGTGACAAGTGGAGGATT-3' (反向); GAPDH 5'-AGGTGGAGGTGTCGCTGTT-3' (上游引物)和 5'-CCGGGAAACTGTGGCGTGTG-3' (下游引物)。GAPDH 基因作为基因内对照。

2.3. 统计学处理

使用 GraphPad Prism 8 和 SPSS22.0 对实验所得数据进行统计分析, 计量数据以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 Student t 检验对肾母细胞瘤组织与癌旁组织中 CRNDE 水平进行比较, 卡方检验分析肾母细胞瘤患者 CRNDE 表达情况与临床病理特征之间的关系, 其中的临床分期、病理分型都根据 NWTS-5 分层系统进行划分。生存分析采用 Kaplan-Meier 方法和 log-rank 检验, 评价总生存率并计算生存率差异。采用单变量和多变量 Cox 比例危险法分析临床病理变量及 CRNDE 表达水平与患者生存时间的关系。p 值 < 0.05 被认为具有统计学意义。

3. 结果

3.1. CRNDE 在肾母细胞瘤组织中过度表达

通过 RT-qPCR 对肾母细胞瘤组织和癌旁无肿瘤侵袭的正常肾组织进行 CRNDE 的表达水平检测, 结果用相对定量的数据显示, 统计分析后发现 CRNDE 在肾母细胞瘤组织中的表达显著高于正常肾组织(肿瘤组织 CRNDE 表达: 2.58 ± 0.22 , 癌旁正常组织: 1.12 ± 0.18 , $p < 0.01$), 结果如图 1 所示。

3.2. CRNDE 表达水平与肾母细胞瘤患者各项临床病理指标的相关性

根据 CRNDE 表达均值, 将 64 例肾母细胞瘤患者分为低表达组(31 例)和高表达组(33 例)。对可能影响 CRNDE 表达水平的临床病理指标进行分析, 结果如表 1 所示, CRNDE 的表达水平与肾母细胞瘤临床分期、病理分型、是否有淋巴结转移显著相关, 与年龄、性别、肿瘤位置、肿瘤大小、术前是否进行放疗无明显相关性。

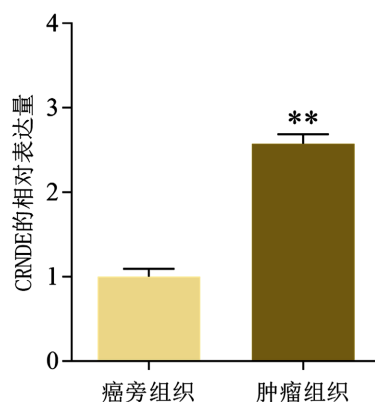


Figure 1. Expression level of CRNDE in Wilms cytoplasm tumor and paracancer normal tissues

图 1. CRNDE 在肾母细胞质瘤组织和癌旁正常组织中的表达水平

Table 1. Correlation between CRNDE expression level and clinicopathologic indexes in patients with Wilms tumor

表 1. CRNDE 表达水平与肾母细胞瘤患者临床病理指标的相关程度

临床病理特征	n	CRNDE 表达水平		X ²	p
		低表达组(31)	高表达组(33)		
年龄					
<3 岁	35	15	20	0.033	0.8561
≥3 岁	29	14	15		
性别					
男	34	17	21	0.025	0.874
女	30	14	16		
临床分期					
I~II期	33	25	8	12.206	0.001
III~IV期	31	10	21		
病理分型					
预后良好的组织结构(FH)	27	19	8	8.995	0.003
预后不良的组织结构(UFH)	37	12	25		
淋巴结转移					
有	30	10	20	10.392	0.001
无	34	25	9		
肿瘤位置					
左侧	31	13	18	0.277	0.599
右侧	33	16	17		
肿瘤大小					
<5 cm	42	20	22	0.027	0.869
≥5 cm	22	10	12		
术前放化疗治疗					
是	38	16	22	1.502	0.220
否	26	15	11		

FH, 预后良好的组织结构; UFH, 预后不良的组织结构。

3.3. 高 CRNDE 表达提示肾母细胞瘤患者预后不良

使用 Kaplan-Meier 分析和对数秩检验来评估我们研究中的肾母细胞瘤患者的 CRNDE 和总生存率之间的相关性, 结果显示: CRNDE 水平与肾母细胞瘤患者的总体生存率呈负相关($p = 0.04$, 图 2)。可以说明 CRNDE 表达水平升高与肾母细胞瘤患者整体生存期较差存在显著相关性。

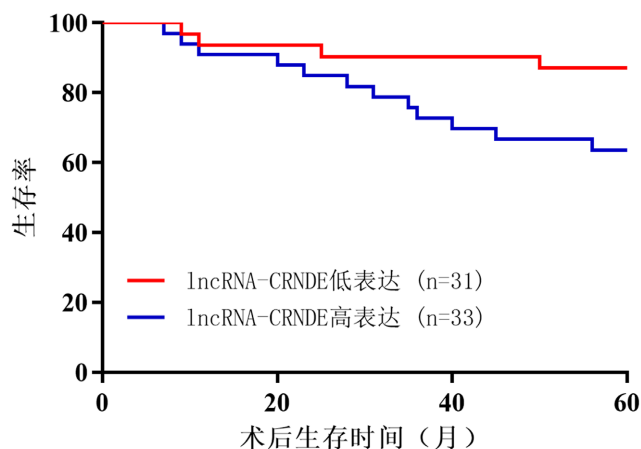


Figure 2. Comparison of survival time between patients with high and low CRNDE expression

图 2. 高 CRNDE 表达和低 CRNDE 表达患者的生存时间比较

3.4. 对影响总生存率的临床病理变量进行单因素和多因素分析

用单因素变量进一步评估包括 CRNDE 表达水平在内的临床病理特征在肾母细胞瘤患者临床进展中的预后意义, 结果显示临床分期($p = 0.036$)、病理分型($p = 0.024$)、术前放化疗($p = 0.031$)和 CRNDE 表达($p = 0.026$)与肾母细胞瘤患者的不良预后有关(表 2)。接下来检测 CRNDE 高表达是否是肾母细胞瘤患者的独立不良预后因素, 根据临床分期、病理分型、术前放化疗和 CRNDE 的表达情况进行多变量 Cox 回归模型调整, 最后确认 CRNDE 的高表达是肾母细胞瘤患者预后不良的独立因素。

Table 2. Univariate and multivariate analyses of clinicopathologic indicators in patients with Wilms tumor
表 2. 肾母细胞瘤患者各项临床病理指标的单因素和多因素分析表

临床病理特征	单因素分析		多因素分析	
	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
年龄(\geq vs. $<$ 岁)	1.362 (0.771~2.421)	0.285		
性别(男 vs. 女)	1.186 (0.513~2.076)	0.572		
临床分期(III-IV vs. I-II)	1.594 (1.063~3.046)	0.036	2.431 (1.455~4.768)	0.015
病理分型(FH vs. UH)	1.932 (1.086~3.384)	0.024	2.316 (1.218~4.335)	0.009
肿瘤大小(≥ 5 vs. < 5 厘米)	0.689 (0.395~1.542)	0.337		
肿瘤位置(左侧 vs 右侧)	0.461 (0.125~1.580)	0.226		
淋巴结转移(有 vs. 无)	0.708 (0.289~1.707)	0.485		
术前放化疗(是 vs. 否)	1.604 (1.022~3.108)	0.031	2.650 (1.432~5.103)	0.013
CRNDE 表达(高 vs. 低)	1.891 (1.095~3.562)	0.026	2.520 (1.388~5.145)	0.016

HR, 风险比; CI, 置信区间。

4. 讨论

lncRNA 是一种不能被翻译为蛋白质的 RNA 分子, 最初被认为是错误的转录产物[12]。随着研究的深入, 人们发现 lncRNA 可以在多个水平上调节基因的表达, 逐渐认识到了 lncRNA 在细胞发育、增殖、分化和迁移等生物学过程中发挥着重要作用[13] [14]。在一些癌症中会出现特定 lncRNA 表达失调的现象, 这提示 lncRNA 或许可以作为癌症患者潜在的诊断和预后生物标志物以及新的治疗靶点[15]。近年来, 一些 lncRNA 分子在肿瘤中发挥的作用得到了很好的研究[16] [17]。lnc-CRNDE 最初被发现在结直肠癌中特异性高表达, 作为结直肠癌的原癌基因在早期被激活[18] [19]。除了结直肠癌, 在包括直肠癌, 胃癌, 胶质细胞癌, 肝癌, 胆囊癌等其他多种癌症中, CRNDE 也被证实过度表达[20]。此外, CRNDE 的高表达还与癌症的临床进展相关, 高表达 CRNDE 已被确定为胰腺癌、肝癌、结直肠癌、胃癌、胶质瘤和卵巢癌的不良预后因素[21]。在本研究关注的肾母细胞瘤中, 已有文献证实 CRNDE 在肾母细胞瘤患者中表达过度且表达水平与淋巴结转移相关, 但关于 CRNDE 在肾母细胞瘤中发挥的预后意义并不清楚。因此, 我们对 CRNDE 在肾母细胞瘤中发挥的临床预后意义进行了更加充分深入的研究。

我们的研究证实, CRNDE 在肾母细胞瘤中异常高表达, 是肿瘤早期诊断的潜在标志物。分析 CRNDE 的表达水平与患者多项临床病理指标之间的关系发现, 肾母细胞瘤的临床分期、病理分型、有无淋巴结转移与 CRNDE 的表达水平密切相关; 年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤位置, 术前是否进行放化疗与 CRNDE 的水平并无明显的相关关系。既往研究认为, 被发现在肿瘤中高表达的 lncRNA 分子往往与肿瘤发生发展过程有关, 具有抑制或促进肿瘤生长的作用[22]。在不同病理组织类型的肾母细胞瘤中, CRNDE 的表达水平差别明显, 预后不良组织结构的 CRNDE 表达水平更高, 可以推测 CRNDE 在肾母细胞瘤中发挥了促进肿瘤恶性进展的作用。如前所述, 已经有研究证实了 CRNDE 可以通过调节 micro RNA 介导肾母细胞瘤的发生发展, 但具体的分子机制还没有完全明确, CRNDE 的其他生物学功能是否也影响了肾母细胞瘤的发生也尚未研究。进一步探寻肾母细胞瘤患者的预后与 CRNDE 之间的联系, 统计结果显示 CRNDE 的高表达与患者五年生存率低下有关, 单因素和多因素分析则表明高表达的 CRNDE 水平与高临床分期、预后不良的病理组织类型、术前没有进行放化疗都是影响预后的独立危险因素。可以作为肾母细胞瘤预后和生存期独立预测因素的 CRNDE 分子在其中发挥的作用值得我们进一步的探索。

综上所述, CRNDE 在肾母细胞瘤组织中高表达且表达水平与临床进展相关; CRNDE 的过表达可能是导致肾母细胞瘤患者不良预后的因素。因此可以认为, CRNDE 在完善肾母细胞瘤的诊断和治疗方面能够发挥重要的作用, 需要进行下一步的研究进行探讨。

利益冲突

所有作者均声明没有利益冲突。

参考文献

- [1] Treger, T.D., Chowdhury, T., Pritchard-Jones, K., et al. (2019) The Genetic Changes of Wilms Tumour. *Nature Reviews Nephrology*, **15**, 240-251. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0112-0>
- [2] Zheng, H., Li, B., Liu, C., et al. (2020) Comprehensive Analysis of lncRNA-Mediated ceRNA Crosstalk and Identification of Prognostic Biomarkers in Wilms' Tumor. *BioMed Research International*, **2020**, Article ID: 4951692. <https://doi.org/10.1155/2020/4951692>
- [3] Cui, W., Sun, Y., Chen, C., et al. (2020) LncRNA9 CRNDE Promotes the Development of Wilms' Tumor by Regulating microRNA-424. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, **24**, 1088-1097.
- [4] Zhang, J., Yin, M., Peng, G., et al. (2018) CRNDE: An Important Oncogenic Long Non-Coding RNA in Human Cancers. *Cell Proliferation*, **51**, e12440. <https://doi.org/10.1111/cpr.12440>
- [5] 黄朝友, 李响, 赖飞, 等. 肾母细胞瘤组织中 Par-4 基因表达量检测及其与肿瘤增殖、侵袭的关系研究[J]. 陕西

- 医学杂志, 2018, 47(10): 1230-1232. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-7377.2018.10.002>
- [6] 吴艳萍, 马晓, 韩四萍, 等. LncRNA XIST/FUS/TLR9 分子轴在 IgA 肾病 Th17/CD4+T 细胞中的表达及其功能性研究[J]. 临床肾脏病杂志, 2022, 22(5): 396-402. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1671-2390.2022.05.008>
- [7] Slaby, O., Laga, R. and Sedlacek, O. (2017) Therapeutic Targeting of Non-Coding RNAs in Cancer. *Biochemical Journal*, **474**, 4219-4251. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170079>
- [8] Szafron, L.M., Balcerak, A., Grzybowska, E.A., et al. (2015) The Novel Gene CRNDE Encodes a Nuclear Peptide (CRNDEP) Which Is Overexpressed in Highly Proliferating Tissues. *PLOS ONE*, **10**, e127475. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127475>
- [9] Yu, B., Ye, X., Du, Q., et al. (2017) The Long Non-Coding RNA CRNDE Promotes Colorectal Carcinoma Progression by Competitively Binding miR-217 with TCF7L2 and Enhancing the Wnt/beta-Catenin Signaling Pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **41**, 2489-2502. <https://doi.org/10.1159/000475941>
- [10] Ding, J., Li, J., Wang, H., et al. (2017) Long Noncoding RNA CRNDE Promotes Colorectal Cancer Cell Proliferation via Epigenetically Silencing DUSP5/CDKN1A Expression. *Cell Death & Disease*, **8**, e2997. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.328>
- [11] Han, P., Li, J.W., Zhang, B.M., et al. (2017) The lncRNA CRNDE Promotes Colorectal Cancer Cell Proliferation and Chemoresistance via miR-181a-5p-Mediated Regulation of Wnt/beta-Catenin Signaling. *Molecular Cancer*, **16**, 9. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0583-1>
- [12] Ponting, C.P., Oliver, P.L. and Reik, W. (2009) Evolution and Functions of Long Noncoding RNAs. *Cell*, **136**, 629-641. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.006>
- [13] Flippet, R., Beinse, G., Boileve, A., et al. (2019) Long Non-Coding RNAs in Genitourinary Malignancies: A Whole New World. *Nature Reviews Urology*, **16**, 484-504. <https://doi.org/10.1038/s41585-019-0195-1>
- [14] 胡晋平, 何丽洁, 王汉民. 长链非编码 RNA 在人类疾病中的研究进展[J]. 陕西医学杂志, 2016, 45(4): 503-504. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-7377.2016.04.059>
- [15] Guo, X. and Hua, Y. (2017) CCAT1: An Oncogenic Long Noncoding RNA in Human Cancers. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **143**, 555-562. <https://doi.org/10.1007/s00432-016-2268-3>
- [16] Xu, J., Liu, X.Y., Zhang, Q., et al. (2021) Crosstalk among YAP, LncRNA, and Tumor-Associated Macrophages in Tumorigenesis Development. *Frontiers in Oncology*, **11**, Article ID: 810893. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.810893>
- [17] Chen, X., Song, J., Wang, X., et al. (2022) LncRNA LINC00460: Function and Mechanism in Human Cancer. *Thoracic Cancer*, **13**, 3-14. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.14238>
- [18] Graham, L.D., Pedersen, S.K., Brown, G.S., et al. (2011) Colorectal Neoplasia Differentially Expressed (CRNDE), a Novel Gene with Elevated Expression in Colorectal Adenomas and Adenocarcinomas. *Genes & Cancer*, **2**, 829-840. <https://doi.org/10.1177/1947601911431081>
- [19] 李双, 李洋. 结直肠肿瘤差异表达 RNA 在疾病中作用的研究进展[J]. 基础医学与临床, 2022, 42(10): 1616-1620.
- [20] Wang, W., Yuan, F. and Xu, J. (2019) The Prognostic Role of Long Noncoding RNA CRNDE in Cancer Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neoplasma*, **66**, 73-82. https://doi.org/10.4149/neo_2018_180320N191
- [21] Xie, H., Ma, B., Gao, Q., et al. (2018) Long Non-Coding RNA CRNDE in Cancer Prognosis: Review and Meta-Analysis. *Clinica Chimica Acta*, **485**, 262-271. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.07.003>
- [22] 钟剑锋, 钟莉莉, 于双. LncRNA 与肿瘤关系的研究进展[J]. 中国实验诊断学, 2022, 26(6): 930-933.