

# Study on the Correlation between Pathological Staging of Gastric Carcinoma and Expressions of Long-Chain Non-Coding lncRNA

Xichun Gao, Jun Qian\*, Ming Wei, Xingrong Xu, Rurong Wang, Xiangbin Xin

Zhangye People's Hospital Affiliated to Hexi University, Zhangye Gansu  
Email: gaoxichong@sina.com, \*3587702257@qq.com

Received: Oct. 4<sup>th</sup>, 2019; accepted: Oct. 21<sup>st</sup>, 2019; published: Oct. 28<sup>th</sup>, 2019

## Abstract

**Objective:** To explore the expression of lncRNA-19, FER1L4, LINC00152 and AK054979 in long noncoding RNA (lncRNA) in gastric carcinoma. **Methods:** We collected 24 cases gastric carcinoma tissues. The expression levels of lncRNA-19, FER1L4, LINC00152 and AK054979 in gastric carcinoma tissues, para-cancer tissues and normal tissues were measured by real-time fluorescence quantitative PCR, and the correlation between the expressions of lncRNA-19, FER1L4, LINC00152 and AK054979 and gastric carcinoma tissues was analyzed. **Results:** lncRNA-19, FER1L4, LINC00152 and AK054979 were highly expressed in gastric cancer tissues ( $P < 0.01$ ). It was positively correlated with the clinical pathological stages of gastric carcinoma ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** lncRNA-19, FER1L4, LINC00152 and AK054979 were all highly expressed in gastric carcinoma tissues and positively correlated with the pathological stages of gastric cancer.

## Keywords

Gastric Cancer, Long Non-Coding RNA, lncRNA-19, FER1L4, LINC00152, AK054979

# 胃癌病理分期与长链非编码lncRNA表达的相关性研究

高希春, 钱 军\*, 魏 铭, 徐星榕, 汪如荣, 辛向斌

河西学院附属张掖人民医院, 甘肃 张掖

\*通讯作者。

Email: gaoxichong@sina.com, \*3587702257@qq.com

收稿日期: 2019年10月4日; 录用日期: 2019年10月21日; 发布日期: 2019年10月28日

## 摘要

**目的:** 探讨长链非编码RNA(long noncoding RNA, lncRNA)中的lncRNA-19、FER1L4、LINC00152及AK054979在胃癌组织的表达。**方法:** 收集24例胃癌患者癌组织, 采用实时荧光定量PCR测定胃癌组织、癌旁组织及正常组织中lncRNA-19、FER1L4、LINC00152及AK054979的表达水平, 分析lncRNA-19、FER1L4、LINC00152及AK054979表达与胃癌组织表达的相关性。**结果:** 胃癌组织中lncRNA-19、FER1L4、LINC00152及AK054979的表达水平呈高表达( $P$ 均  $< 0.01$ ); 且与胃癌临床病理分期呈正相关( $P < 0.05$ )。**结论:** lncRNA-19、FER1L4、LINC00152及AK054979在胃癌组织中均高表达, 且与胃癌病理分期呈正相关。

## 关键词

胃癌, 长链非编码RNA, lncRNA-19, FER1L4, LINC00152, AK054979

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

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

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



Open Access

## 1. 引言

胃癌是危害人类健康的最常见癌症之一, 根据 Globocan 数据库, 胃癌是全球第五个最常见的癌症, 在男性中甚至排在第 4 位, 在女性中排在第 5 位, 也是全球癌症相关死亡的第三大原因[1] [2]。自从 2010 年以来, 癌症成为我国疾病死亡的首要原因, 严重威胁人们的健康和生命, 并已成为全球的癌症负担。新近研究发现长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA)在包括胃癌等多种癌症中异常表达, 为探索肿瘤发生机制、寻找新标志物和治疗靶点提供了新机遇。lncRNA 是一种长度超过 200 个核苷酸 (nucleotide, nt)的非编码 RNA, 在细胞核中, lncRNA 具有正负调控转录、调整细胞核的亚显微结构、介导染色体相互作用的功能。多项研究表明 lncRNA 既可起引发癌基因的作用, 促进恶性肿瘤的发生、发展, 也可起抑癌基因的作用[3] [4] [5]。Liu 等通过 qRT-PCR 监测组织和血浆中的 FER1L4 含量, 发现 FER1L4 的表达水平在 91.8% (56/61)的胃癌组织中明显下调, 并且 FER1L4 的低表达与肿瘤大小、组织学分型、浸润程度、淋巴侵袭、远处转移、TNM 肿瘤分期、血管和神经侵袭以及血清 CA72-4 的含量都相关[6] [7]。

本研究应用实时荧光定量 PCR 法检测胃癌组织中 lncRNA-19、FER1L4、LINC00152 及 AK054979 的表达情况, 并进一步分析 lncRNA 表达与患者临床病理的关系。

## 2. 资料与方法

### 2.1. 研究对象

收集 2016 年 6 月~2017 年 12 月河西学院附属张掖人民医院普外及肿瘤科收治的 24 例胃癌患者的组织标本。24 例均来自手术切除的胃癌组织。收集胃癌患者术前均未进行过化疗、放疗治疗和免疫治疗等

其他治疗方案。24 例患者均可准确完全查找到其临床资料信息,其中包括姓名、性别、年龄、肿瘤直径、分化程度、淋巴结转移、浸润深度(见表 1)、TNM 分期等。排除其他部位恶性肿瘤病史;24 例患者中,男性共 16 例,女性共 8 例,男女比例为 2:1,年龄在 42~73 岁之间,中位年龄为 56 岁;根据国际抗癌联盟/美国癌症联合委员会胃癌 TNM 分期标准(2010) [6]进行 TNM 分期, I 期 6 例, II 期 8 例, III 期 2 例, IV 期 4 例;有淋巴结转移者 14 例,无淋巴结转移者 10 例;发生远处转移者 14 例,未发生远处转移者 10 例。胃癌组织经病理学检查确诊(见表 2)。本研究经河西学院临床医学院伦理委员会批准,所有研究对象均签署知情同意书。

**Table 1.** Preoperative Borrmann type and pathological manifestations of gastric cancer

**表 1.** 胃癌术前 Borrmann 分型与病理表现对照

MSCT 大体分型	病理结果				合计
	蕈伞型	局限溃疡型	浸润溃疡型	弥漫浸润型	
蕈伞型(I)	4	0	0	0	4
局限溃疡型(II)	0	0	2	5	7
浸润溃疡型(III)	1	1	3	4	9
弥漫浸润型(IV)	0	1	1	2	4
合计	5	2	6	11	24

**Table 2.** Results of preoperative enhanced MSCT T staging in 24 patients with gastric cancer were compared with pathology

**表 2.** 24 例胃癌患者术前增强 MSCT T 分期结果与病理对照

MSCT 分期	病理分期			
	T1	T2	T3	T4
T1	15	5	0	0
T2	0	7	5	0
T3	0	4	13	6
T4	0	0	6	7

## 2.2. 实时荧光定量 PCR 法检测胃癌组织中 lncRNA 表达水平

应用 TRIzol 试剂和 AMV 反转录试剂盒(均为美国 Invitrogen 公司产品)提取胃癌组织的总 RNA,并将其反转录成 cDNA;以此 cDNA 为模板,应用 2 × SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒(美国 Invitrogen 公司产品)检测组织中 lncRNA RP11-513G11.1 的表达情况。

### 实验步骤

#### 1) RNA 提取

将样本分别用液氮研磨粉碎,加入 1 ml Trizol (Invitrogen),吸取到 1.5 ml EP 管中,加入 500 ul 酚氯仿,振荡混匀,静止 5 分钟,置于离心机中于 4℃ 离心十分钟,小心吸取上层上清于一新的离心管中,加入 700 ul 异丙醇,混匀,于 4℃ 12,000 rpm 离心 10 分钟,小心去上清,用 75%乙醇洗涤一次,晾干,溶于 50 ul DEPC 处理水中,电泳检测。

#### 2) 反转录(反转录使用 Invitrogen 的反转录试剂盒 superscript III)

按照以下体系建立反应体系(RNA 均取 200 ng,补水到 10 ul):

RNA 10 ul  
 Oligo-dT 1 ul (HOPEGENE)  
 Random 1 ul (HOPEGENE)

混匀，离心。65℃，5 分钟，结束后置于冰上。

在上述反应体系中加入下列反应液：

dNTP (10 uM) 1ul (HOPEGENE)  
 0.1M DTT 2 ul  
 5X Buffer 4 ul  
 RT 酶 1 ul (ABI)

混匀，离心。置于 42℃，水浴 60 分钟。

取出后置于 85℃，反应 10 分钟，灭活逆转录酶。反应结束后置于-20℃待用。

### 3) qPCR 扩增

每个样本分别用待检测基因和内参基因引物扩增，每个反应做 3 个重复，按照以下体系建立扩增体系(20 ul)：

cDNA 2 ul  
 qPCR mix 10 ul  
 primer F 1 ul  
 primer R 1 ul  
 ddH<sub>2</sub>O 6 ul

于 ABI 7900 qPCR 仪上，按照以下条件反应：

95℃ 2 min  
 94℃ 20 s  
 60℃ 20 s  
 72℃ 30 s 40 循环

根据目的基因分别设计合成引物，引物序列见列表 3。

**Table 3.** Primer sequence list

**表 3.** 引物序列表

Symbol	primer F	primer R
actin	GACAGGATGCAGAAGGAGATTACT	TGATCCACATCTGCTGGAAGGT
lncRNA-H19	TGCTGCACTTTACAACCACG	ATGGTGTCTTTGATGTTGGGC
lncRNA-AK054979	ACTCTGCCTACATCGCTCTC	GCCACCTCTCTCTTTCCCT
lncRNA-FER1L4	CCGTGTTGAGCTGCTGTTC	GGCAAGTCCACTGTCAGATG
lncRNA-LINC00152	TTGATGGCTTGAACATTTGG	TCG TGATTTTCGGTGTCTGT

所有引物为美国 Invitrogen 公司产品。PCR 反应条件：95℃ 20 s；95℃ 10 s、60℃ 20 s，共 40 个循环。

### 2.3. 统计学方法

应用 SPSS18.0 统计软件包处理数据，对研究的结果数据进行统计分析。结果以均数±标准误差(mean ± SD)表示，采用配对 *t* 检验进行两样本均数之间的比较，*P* < 0.05 认为差异具有统计学意义。胃癌组织

中 lncRNA-19、FER1L4、LINC00152 及 AK054979 的表达与胃癌患者临床病理参数之间的关系采用  $X^2$  检验。  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3. 结果

采用北京华普奥科生物科技有限公司基因芯片,对胃癌肿瘤组织标本中筛选出 lncRNA-19、FER1L4、LINC00152 及 AK054979 四种高表达 lncRNA 检测基因。然后应用实时荧光定量 PCR 法检测 24 例胃癌组织 lncRNA-19、FER1L4、LINC00152 及 AK054979 的表达水平显著升高(见图 1~5 QPCR 结果扩增曲线及相应的溶解曲线)。课题研究显示,胃癌组织中 lncRNA-19、FER1L4、LINC00152 及 AK054979 的表达水平显著 shenggao 升高,均有统计学意义( $P$  值均  $< 0.01$ )。和临床资料分析结果表明:lncRNA 在胃癌组织中的表达水平与分化程度、是否淋巴结转移、TNM 分期有关,其表达程度越高,分化程度也越高。

QPCR 的结果:

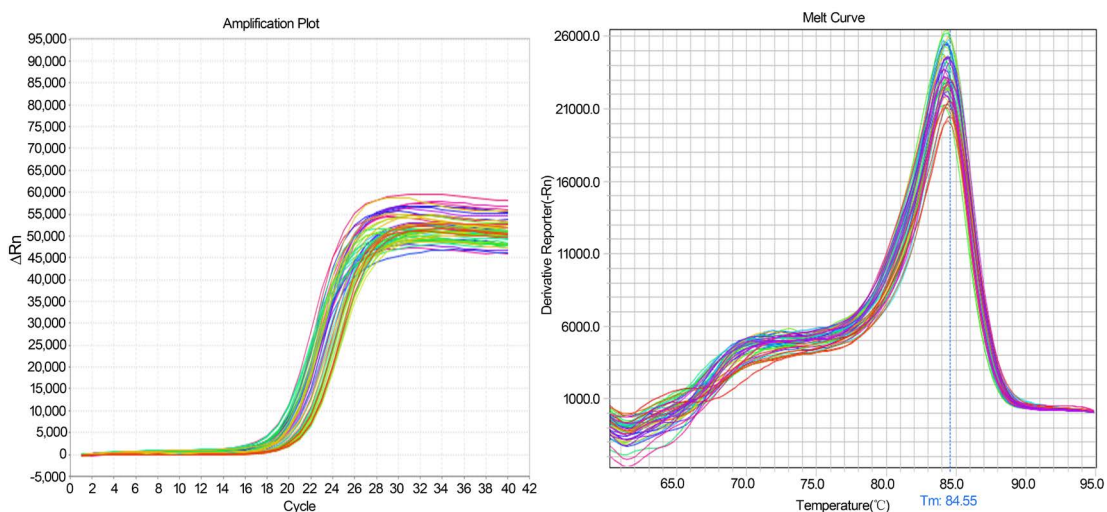


Figure 1. Amplification curve and dissolution curve of Actin gene

图 1. 基因 Actin 扩增曲线及其溶解曲线

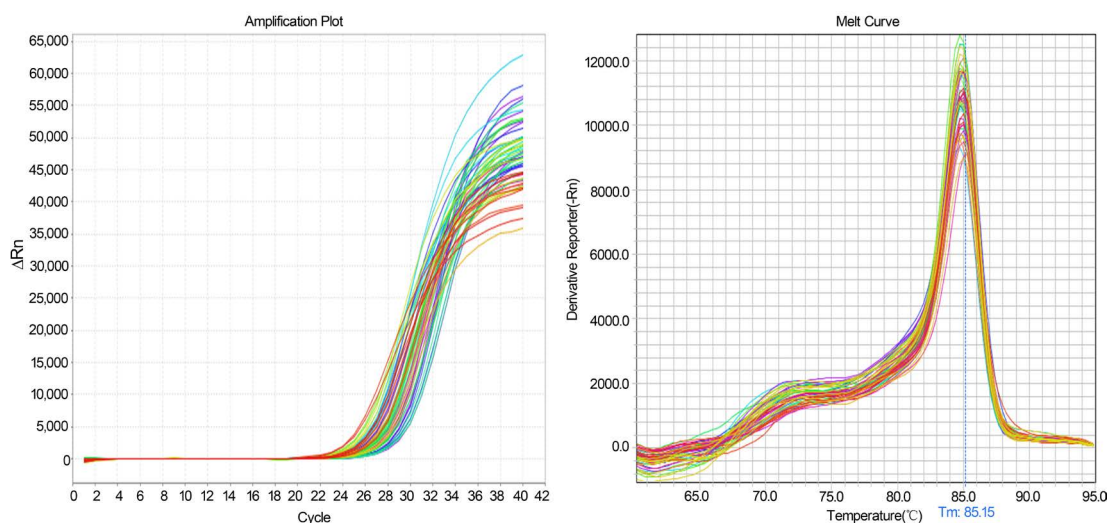
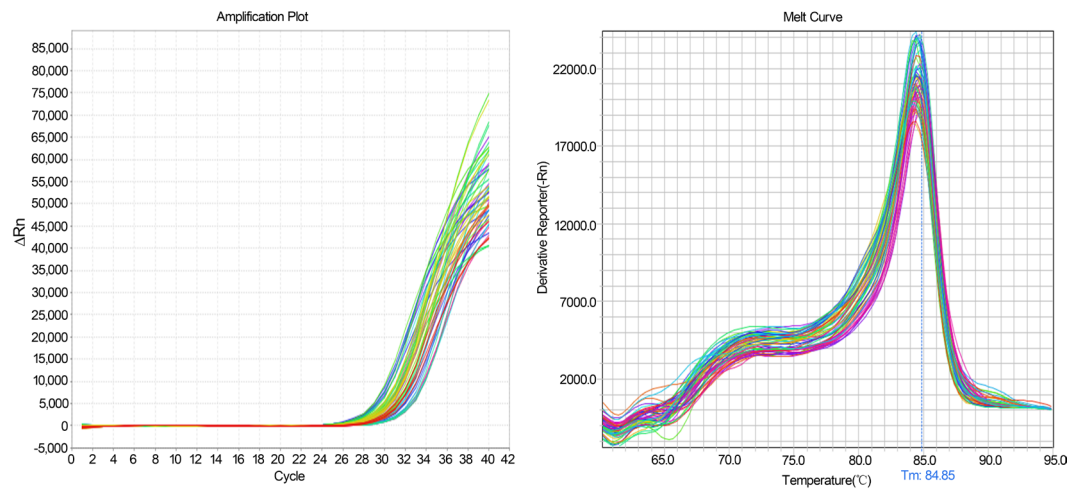


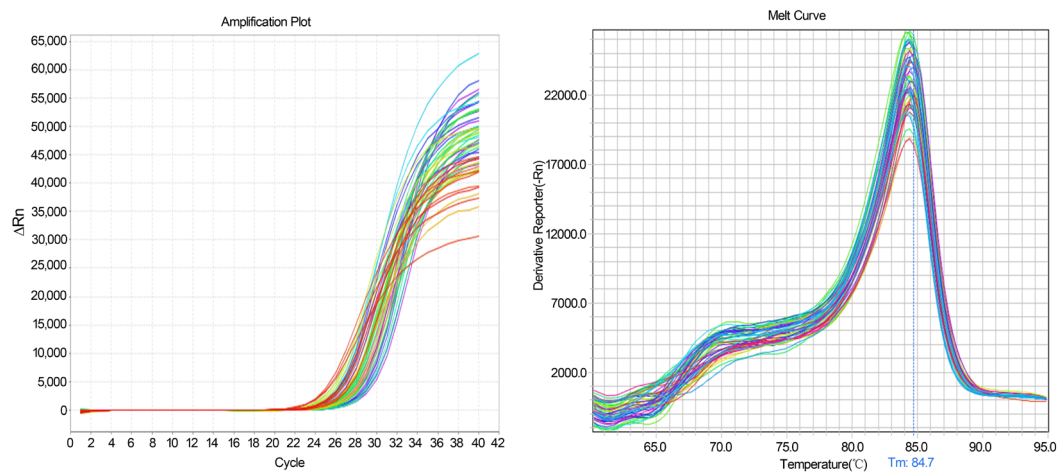
Figure 2. Amplification curve and dissolution curve of lncRNA-H19 gene

图 2. 基因 lncRNA-H19 扩增曲线及其溶解曲线

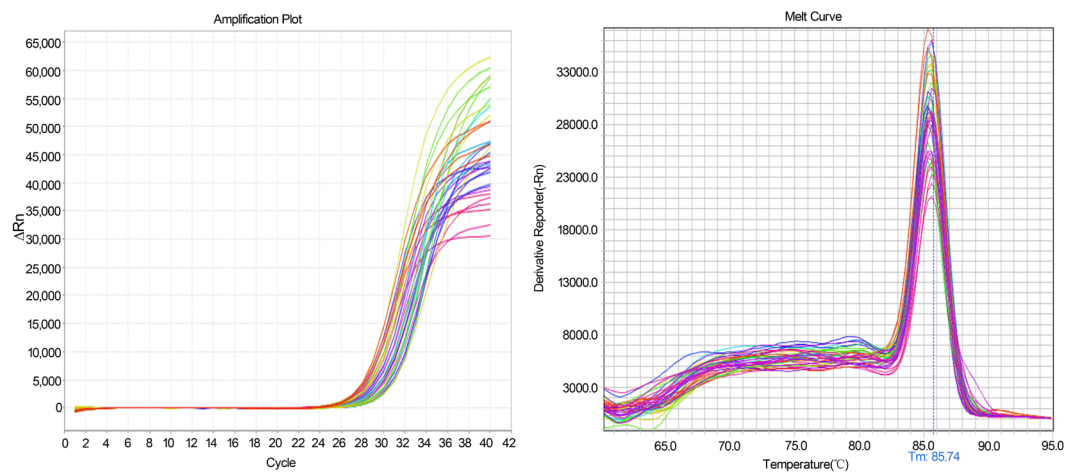




**Figure 3.** Amplification curve and dissolution curve of lncRNA-FER1L4 gene  
**图 3.** 基因 lncRNA-FER1L4 扩增曲线及其溶解曲线



**Figure 4.** Amplification curve and dissolution curve of lncRNA-LINC00152 gene  
**图 4.** 基因 lncRNA-LINC00152 扩增曲线及其溶解曲线



**Figure 5.** Amplification curve and dissolution curve of lncRNA-AK054979 gene  
**图 5.** 基因 lncRNA-AK054979 扩增曲线及其溶解曲线

## 4. 讨论

癌症的发展有一个过程,以胃癌为例,经历了从癌前病变(异型增生)到早期胃癌,最后发展为进展期胃癌[8] [9]。癌前病变不但是组织发生癌变的关键性步骤,而且更为肿瘤的早期诊断和预防提供了坚实的基础。目前已有研究发现 lncRNA 不但在癌组织中异常表达,而且部分在癌前病变组织中也出现异常表达[10] [11] [12]。与癌旁正常组织相比, lncRNA 在肿瘤组织中或过表达或低表达甚至失表达,以此特异性表达来实现其调节作用,并且这种特异性表达有望成为新的肿瘤预测因子[13] [14] [15] [16]。Li [17]等研究发现,血浆中 lncRNALINC00152 对胃癌的诊断灵敏度和特异度分别为 48.1%和 85.2%,并能在外周血中稳定存在。

目前对于 lncRNA 的认识尚处在初级阶段,但已有研究发现这类分子在细胞分化、生长、新陈代谢过程及肿瘤发生中起到至关重要的作用。在分子生物学领域中,以新兴的 lncRNA 为代表的肿瘤表观遗传学在短短数年间得到了长足进展。H19 是最早被发现的癌症相关 lncRNA,它是胰岛素样生长因子 2 (insulin-like growth factor2, IGF2)的印记基因的产物,一般只在胚胎组织中出现表达,而不在成年组织中表达,但是研究发现它在组织再生或者发生肿瘤时则被重新激活。此后的研究发现, H19 具有抑制癌细胞凋亡、促进癌细胞增殖、增强细胞对缺氧的耐受能力和促进新生血管出现等作用[16] [17]。随着当前癌症相关基因转录研究的迅速进展,越来越多的肿瘤相关 lncRNA 被发现。现阶段,对于 lncRNA 的研究还大多集中于组织学上,而我们则与临床密切结合,将目标聚集在血浆中的 lncRNA 的测定。本研究拟通过基因芯片技术筛选胃部癌相关 lncRNA,发现在肿瘤组织中表达异常的 lncRNA;然后运用生物信息技术预测胃部癌相关 lncRNA 的靶基因,为研究 lncRNA 的功能、信号通路及在胃部癌发生发展中的作用奠定基础。从疾病的生物分子水平来了解和认识胃部肿瘤的生物学特征,进一步明确相关 lncRNA 基因在胃部癌发生和发展中的作用,以期寻找胃连接部癌早期诊断、早期治疗以及检测依据,并对肿瘤的浸润转移以及预后做出较为准确的估计。最后结合患者的临床影像病理因素,分析 lncRNA 与 MSCT、临床病理因素的相互关系,探讨 lncRNA 的临床意义,以提高胃部癌的非创性诊断水平。

## 基金项目

甘肃省高等学校科研项目资助(项目编号:2017B-37)。

## 参考文献

- [1] 中华医学会消化内镜学分会,中国抗癌协会肿瘤内镜专业委员会.中国早期胃癌筛查及内镜诊治共识意见(2014年,长沙)[J].中华消化内镜杂志,2014,31(7):361-373.
- [2] Hasegawa, S., Yoshikawa, T., et al. (2013) Esophagus or Stomach? The Seventh TNM Classification for Siewert Type II/III Junctional Adenocarcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, **20**, 773-779. <https://doi.org/10.1245/s10434-012-2780-x>
- [3] Wapinski, O. and Chang, H.Y. (2011) Long Non-Coding RNAs and Human Disease. *Trends in Cell Biology*, **21**, 354-361. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.04.001>
- [4] Qi, P. and Du, X. (2013) The Long Non-Coding RNAs, a New Cancer Diagnostic and Therapeutic Gold Mine. *Modern Pathology*, **26**, 155-165. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.160>
- [5] Gabory, A., Jammes, H. and Dandolo, L. (2010) The H19 Locus: Role of an Imprinted Non-Coding RNA in Growth and Development. *BioEssays*, **32**, 473-480. <https://doi.org/10.1002/bies.200900170>
- [6] Ilhan, E., Ureyen, O. and Meral, U.M. (2016) Ongoing Problems Concerning 7th TNM Staging System of Gastric Cancer. *Przegląd Gastroenterologiczny*, **11**, 223-225. <https://doi.org/10.5114/pg.2016.64069>
- [7] Matouk, I.J., Degrooy, N., Mezan, S., et al. (2007) The H19 Non-Coding RNA Is Essential for Human Tumor Growth. *PLoS ONE*, **2**, e845. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000845>
- [8] Yang, F., Bi, J., Xue, X., et al. (2012) Up-Regulated Long Non-Coding RNA H19 Contributes to Proliferation of Gas-

- tric Cancer Cells. *The FEBS Journal*, **279**, 3159-3165. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08694.x>
- [9] Gupta, R.A., Shah, N., Wang, K.C., *et al.* (2010) Long Non-Coding RNA HOTAIR Reprograms Chromatin State to Promote Cancer Metastasis. *Nature*, **464**, 1071-1076. <https://doi.org/10.1038/nature08975>
- [10] Brunner, A.L., Beck, A.H., Edris, B., *et al.* (2012) Transcriptional Profiling of LncRNAs and Novel Transcribed Regions across a Diverse Panel of Archived Human Cancers. *Genome Biology*, **13**, R75. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-8-r75>
- [11] Yin, D.D., Liu, Z.J., Zhang, E., *et al.* (2015) Decreased Expression of Long Non-Coding RNA MEG3 Affects Cell Proliferation and Predicts a Poor Prognosis in Patients with Colorectal Cancer. *Tumor Biology*, **36**, 4851-4859. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3139-2>  
<http://link.springer.com/10.1007/s13277-015-3139-2>
- [12] Fang, X.Y., Pan, H.F., Leng, R.X. and Ye, D.-Q. (2015) Long Non-Coding RNAs: Novel Insights into Gastric Cancer. *Cancer Letters*, **356**, 357-366. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.11.005>
- [13] Lin, X.C., Zhu, Y., Chen, W.B., *et al.* (2014) Integrated Analysis of Long Non-Coding RNAs and mRNA Expression Profiles Reveals the Potential Role of lncRNAs in Gastric Cancer Pathogenesis. *International Journal of Oncology*, **45**, 619-628. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2431>
- [14] Huang, X., Yuan, T., Tschannen, M., *et al.* (2013) Characterization of Human Plasma-Derived Exosomal RNAs by Deep Sequencing. *BMC Genomics*, **14**, 319. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-319>
- [15] Gibb, F.A., Enfield, K.S., Stewart, G.L., *et al.* (2011) Long Non-Coding RNAs Are Expressed in Oral Mucosa and Altered in Oral Premalignant Lesions. *Oral Oncology*, **47**, 1055-1061. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.07.008>
- [16] Li, Q., Shao, Y.F., Zhang, X.J., *et al.* (2015) Plasma Long Noncoding RNA Protected by Exosomes as a Potential Stable Biomarker for Gastric Cancer. *Tumor Biology*, **36**, 2007-2013. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2807-y>
- [17] Song, H., Sun, W., Ye, G., *et al.* (2013) Long Non-Coding RNA Expression Profile in Human Gastric Cancer and Its Clinical Significances. *Journal of Translational Medicine*, **11**, 225-234. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-225>