

AF131784 在胃癌和胃癌前病变组织中的表达及临床意义

李琪儿 叶国良 郭俊明

摘要 目的 研究 AF131784 在胃癌组织和癌前病变组织中的表达情况并探讨其对胃癌诊断的临床意义。方法 应用实时定量反转录聚合酶链反应 (qRT-PCR) 技术检测 134 例组织样本 (包括 104 例胃癌组织和 30 例胃黏膜异型增生组织) 中 AF131784 的表达量。结果 AF131784 在胃癌组织中的表达量较成对的癌旁组织降低 2.1 倍 ($P=0.000$)。AF131784 在早期胃癌组织及胃黏膜异型增生组织中的表达量也显著降低。结论 AF131784 在胃癌的发生中可能起重要作用,并且有可能成为胃癌早期筛查的肿瘤生物学标志物。

关键词 AF131784 胃癌 异型增生 肿瘤标志物

中图分类号 R73 文献标识码 A DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.12.018

Expression of AF131784 in Gastric Cancer and Gastric Premalignant Lesions and Its Clinical Significance. Li Qier, Ye Guoliang, Guo Junming. Department of Gastroenterology, The Affiliated Hospital of Ningbo University School of Medicine, Zhejiang 315020, China

Abstract Objective To understand the expression and clinical significance of AF131784 in gastric cancer and gastric premalignant lesions. **Methods** AF131784 expression in 134 samples containing 104 gastric cancer tissues and 30 gastric epithelial dysplasia tissues were detected using quantitative reverse transcription - polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Results** AF131784 was down regulated in gastric cancer tissues with a more than two - fold lower level compared to paired adjacent normal tissues ($P=0.000$). More importantly, AF131784 was also significantly down regulated in early gastric cancer and gastric epithelial dysplasia tissues. **Conclusion** AF131784 may play an important role in gastric cancer initiation and also a potential use of AF131784 as a tumor biomarker for screening patients with early gastric cancer.

Key words AF131784; Gastric cancer; Epithelial dysplasia; Tumor marker

胃癌发生率在世界范围内居恶性肿瘤第 4 位,病死率居第 2 位^[1]。尽管胃癌的病死率很高,但早期胃癌的 5 年生存率却可达 90% 以上,因此早期诊断对胃癌的预后起着至关重要的作用^[2]。但我国早期胃癌的诊断率不足 10%^[3]。有文献报道,大范围筛查可提高早期胃癌的检出率^[4]。肿瘤标志物检测是理想的筛查手段,但传统的肿瘤标志物,如癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) 和糖原抗体 19 - 9 (carbohydrate antigen 19 - 9, CA19 - 9),其敏感度和特异性均不高^[5]。因此,探索新型的肿瘤标志物势在必行。基于前期的芯片检测结果,笔者发现 AF131784 在胃癌组织中表达异常^[6]。本实验笔

者扩大了胃癌组织的样本量,还检测了早期胃癌和胃黏膜异型增生组织中 AF131784 的表达量。

材料与方法

1. 组织标本收集:收集 2012 年 12 月 ~ 2014 年 4 月于宁波大学医学院附属医院和鄞州人民医院接受手术治疗或内镜黏膜下剥离术 (endoscopic submucosal dissection, ESD) 的胃癌患者 104 例和胃癌前病变患者 30 例。104 例胃癌患者中男性 74 例,女性 30 例,患者年龄 27 ~ 81 岁,平均年龄 62.6 ± 9.8 岁。30 例胃癌前病变患者中男性 18 例,女性 12 例,患者年龄 38 ~ 81 岁,平均年龄 60.8 ± 10.4 岁。所有诊断均经病理证实,其中早期胃癌是指癌组织局限于胃黏膜或黏膜下层,无论是否有淋巴结转移^[3];胃癌前病变患者均接受 ESD 术,术后病理确诊存在胃黏膜中重度异性增生。所获人体标本均事先由患者或其委托人签署知情同意书并得到宁波大学医学伦理委员会的批准。采集所有病变组织标本的同时采集相应的

基金项目:宁波市自然科学基金资助项目 (2013A610206);宁波市医学科技计划项目 (2013A18)

作者单位:315020 宁波大学医学院附属医院 (李琪儿、叶国良); 315211 宁波大学医学院 (郭俊明)

通讯作者:叶国良,电子邮箱:ndfygl@163.com

距离病灶大于 5 cm 处正常组织 1 份,所有新鲜组织标本立即浸泡于无氮样品保存液(百泰克公司)中, -80℃下保存备用。同时收集患者的临床、病理资料,肿瘤分期采用 TNM 分期^[7]。

2. 总 RNA 提取和实时定量反转录聚合酶链反应 (quantitative reverse transcription - polymerase chain reaction, qRT - PCR): 用 Trizol 法抽提组织总 RNA, 依照 Trizol 试剂 (Invitrogen 公司) 说明书进行操作。提取的总 RNA 用 Smart Spec Plus 分光光度计测定浓度并检测质量。 A_{260}/A_{280} 在 1.8 ~ 2.0 范围内认为总 RNA 纯度可靠。取 2 μ g 总 RNA 用于反转录合成 cDNA, 反转录反应采用 GoScript 反转录试剂盒 (Promega 公司)。所获得的 cDNA 用 RNase - free ddH₂O 稀释 5 倍, -20℃ 保存备用。采用 GoTaq[®] qPCR Master Mix 试剂盒 (Promega 公司), 以反转录所得 cDNA 为模板, 在 Mx3005P 荧光定量 PCR 仪 (Stratagene 公司) 上检测组织中 AF131784 的表达量。AF131784 的引物序列: 上游: 5' - GTTGGTCAAAATATTCCATGTACAA - 3', 下游: 5' - ATCGTC-TACTTTTAACACACTAAAGCA - 3'; 外参甘油醛 - 3 - 磷酸脱氢酶 (GAPDH) 的引物序列: 上游: 5' - ACCACTCCTCCACCTTTGAC - 3', 下游: 5' - TGTTGCTGTAGCCAAATTCGTT - 3'。扩增条件设定: 95℃

5min(预变性),94℃ 15s(变性),52℃ 30s(退火),70℃ 30s(延伸)。循环40次。采用 ΔC_t 法计算AF131784相对表达量。计算公式: $\Delta C_t = C_t(\text{AF131784}) - C_t(\text{GAPDH})$, $\Delta\Delta C_t = C_t(\text{实验组}) - C_t(\text{对照组})$ 。实验组目的基因的表达式相对于对照组变化的倍数用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 来表示。

3. PCR 产物测序: AF131784 的 PCR 产物测序工作委托上海立菲生物技术有限公司完成。

4. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两独立样本 t 检验、配对 t 检验和方差分析根据实际情况灵活运用,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. AF131784 在胃癌组织中低表达:应用 qRT-PCR 技术检测 104 对胃癌组织和配对癌旁组织中 AF131784 的表达量,结果显示,AF131784 在胃癌组织中的表达量显著低于癌旁组织 ($P = 0.000$,图 1A),同之前的芯片结果相符,平均降低 2.1 倍^[6]。更重要的是,其中 16 例早期胃癌组织中 AF131784 的表达量也显著低于癌旁组织 ($P = 0.02$,图 1B)。最后对 PCR 产物进行了测序,将测序结果与权威的基因数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/> AF131784) 中的序列进行比对,结果显示完全吻合 (图 1C)。

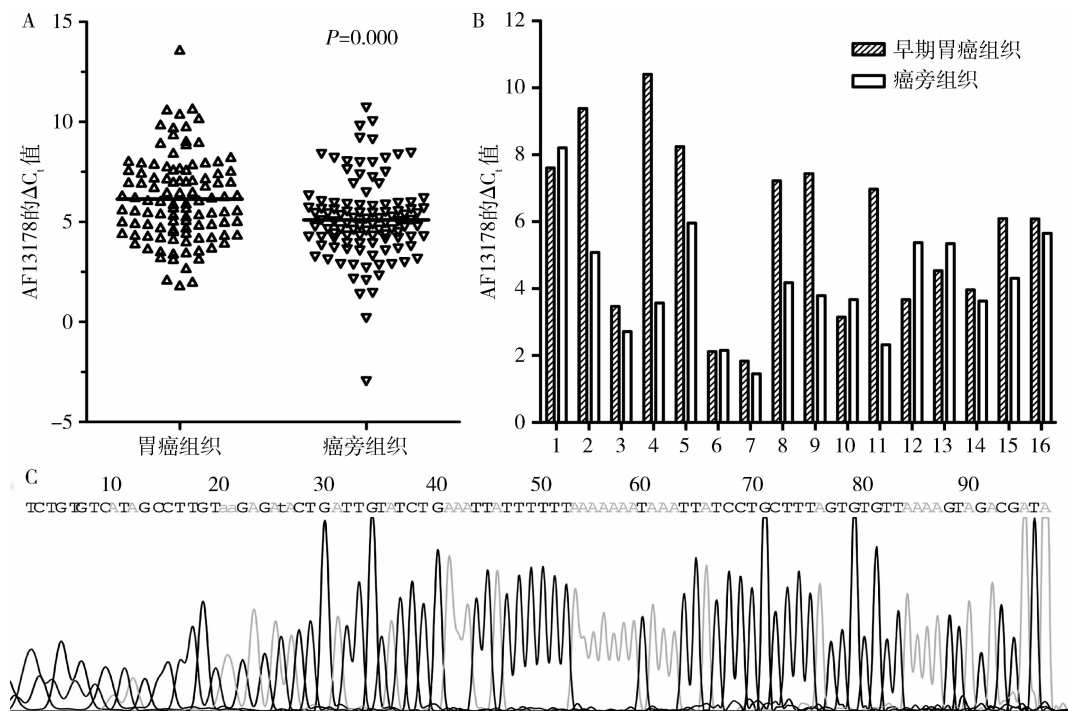


图 1 AF131784 在胃癌组织中低表达

A. AF131784 在胃癌组织中的表达量低于癌旁组织 ($n=104, P=0.000$); B. AF131784 在早期胃癌组织中的表达量低于癌旁组织 ($n=16, P=0.020$); C. AF131784 的 PCR 产物的测序结果

2. AF131784 在胃癌前病变组织中低表达:应用 qRT-PCR 技术检测 30 对胃黏膜异型增生组织和配对正常组织中 AF131784 的表达量,结果显示,AF131784 在胃黏膜异型增生组织中的表达量也显著

降低($P=0.004$,图 2A)。更有意思的是,如图 2B 所示,胃黏膜异型增生组织中 AF131784 的表达量高于胃癌组织($P=0.004$)。

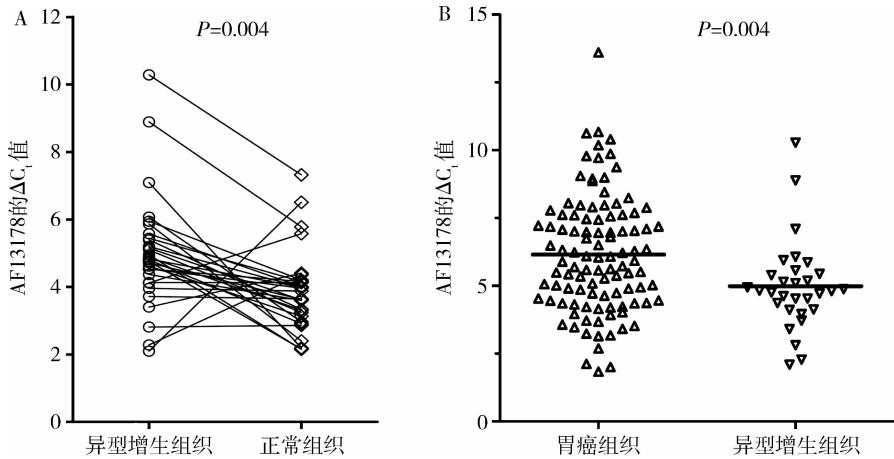


图 2 AF131784 在胃黏膜异型增生组织中低表达

A. AF131784 在胃黏膜异型增生组织中的表达量低于配对的正常组织 ($n=30$, $P=0.004$); B. AF131784 在胃癌组织 ($n=104$) 中的表达量低于胃黏膜异型增生组织 ($n=30$, $P=0.004$)

3. AF131784 在胃癌组织中的表达量与临床病理因素的关系:进一步比较胃癌组织中 AF131784 水平与胃癌患者的年龄、性别、肿瘤直径、分化程度、淋巴结转移、TNM 分期、浸润深度及肿瘤部位的关系,结果显示,AF131784 水平与上述临床病理因素之间无明显关联(表 1)。

4. AF131784 的潜在诊断价值:使用受试者工作特征(ROC)曲线分析 AF131784 的诊断价值。曲线下面积(AUC)达到 0.642(95% CI:0.568~0.719, $P=0.000$,图 3),敏感度和特异性分别为 50.0% 和 79.8%。

讨 论

中国是世界上胃癌高发的国家之一,在我国,胃癌的发生率居恶性肿瘤第 2 位,病死率居恶性肿瘤死因第 3 位^[9]。早期发现、早期诊断以及早期治疗是降低胃癌病死率、提高生存率的主要途径。为了提高胃癌的早期检出率,寻找更多有效的肿瘤标志物应用胃癌的早期筛查显得尤为重要。

AF131784 是一种新型的 RNA,它位于 18 号染色体上,全长 2586 个核苷酸(nucleotide),目前关于它的研究还很少。AF131784 与致癌基因家族成员之一的 Rab27B 同源,但它们的序列又非完全重叠。研究发现 Rab27B 的表达较为局限,它主要在胃、肠、胰腺、血小板、膀胱和脑垂体中表达^[10~13]。

表 1 AF131784 在胃癌组织中的表达水平(ΔCt)与临床病理因素的关系

因素	n	ΔCt ($\bar{x} \pm s$)	P
年龄(岁)			
≥65	46	6.22 ± 2.29	0.784
<65	58	6.10 ± 2.03	
性别			
男性	74	6.07 ± 2.04	0.542
女性	30	6.36 ± 2.40	
直径(cm)			
≥5	50	6.45 ± 2.04	0.187
<5	54	5.89 ± 2.22	
分化程度			
高分化	13	5.37 ± 2.24	0.159
中分化	52	6.01 ± 2.22	
低分化	39	6.61 ± 1.94	
淋巴结转移			
N ₀	39	6.16 ± 2.16	0.988
N ₁ ~N ₃	65	6.15 ± 2.15	
TNM 分期			
0/I	27	6.14 ± 2.40	0.972
II	14	6.11 ± 1.81	
III	54	6.12 ± 1.96	
IV	9	6.49 ± 3.07	
浸润深度			
Tis/T ₁ ~T ₃	37	6.17 ± 2.31	0.967
T ₄	67	6.15 ± 2.06	
肿瘤部位*			
上	17	6.90 ± 1.76	0.131
中/下	84	6.04 ± 2.20	

* 根据 Japanese classification of gastric carcinoma; 3rd edition^[8] 分组,其中 3 例全胃癌被剔除

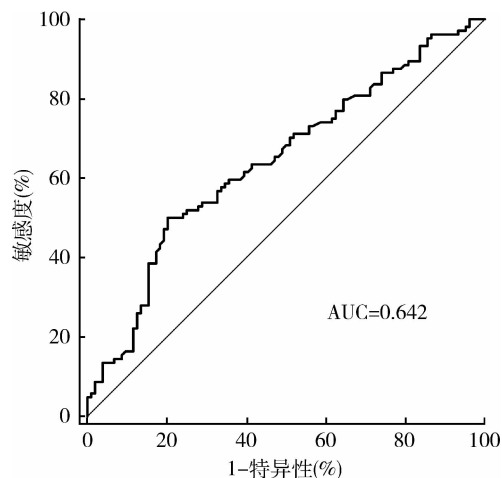


图 3 ROC 曲线

最近一项研究发现 Rab27B 在肝癌组织中的表达量显著低于癌旁组织^[14]。研究首次发现 AF131784 在胃癌组织中低表达,尚未发现 AF131784 与其他肿瘤相关。

众所周知,癌症的发生是一个多阶段的过程,从癌前病变到原位癌,最后发展到浸润和转移。癌前病变不仅仅是癌变的关键阶段,而且为癌症的预防、筛查和早期诊断提供了坚实的基础。已有研究发现很多癌症相关基因在癌前病变组织中已出现了异常表达。Alaiyan 等^[15]证实结肠癌相关转录本 1 (CCAT1) 的低表达贯穿了疾病的全过程,包括结肠腺瘤、结肠癌、结肠癌淋巴转移和肝转移。Shao 等^[16]发现 HMLincRNA717 在胃癌组织和胃黏膜异型增生组织中都出现异常表达情况。本研究证实 AF131784 不仅仅在进展期胃癌组织中表达降低,而且在早期胃癌和胃黏膜异型增生组织中也出现低表达(图 1B,图 2A)。笔者的数据揭示 AF131784 可能在胃癌的发生过程中起重要作用。据报道,2 年内胃黏膜异型增生组织癌变的发生率达到了 9%,及时而有效的治疗可以预防胃黏膜异型增生组织发展为胃癌^[17]。基于笔者的研究发现,AF131784 可能可以作为一种标志物及时筛查出患者存在胃黏膜异型增生。

笔者发现 AF131784 和胃癌的 TNM 分期、浸润深度、肿瘤直径、分化程度和淋巴结转移情况均无明显相关性。该结果提示 AF131784 可能仅仅在胃癌发生的早期阶段起重要作用,而未参与胃癌的进展过程。也许 AF131784 在诊断进展期胃癌方面并不是最优的标志物,但是基于 AF131784 在早期胃癌和癌前病变中的异常表达从而凸显出其在早期胃癌筛查

中的优势。综上所述,AF131784 不仅在进展期胃癌组织中低表达,而且在早期胃癌和胃黏膜异型增生组织中也低表达。这些结果揭示 AF131784 可能参与胃癌的发生过程,有可能成为胃癌早期筛查的新型肿瘤标志物。

参考文献

- 1 Ferlay J, Shin HR, Bray F, *et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008; GLOBOCAN 2008 [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12): 2893 - 2917
- 2 Choi IJ, Lee JH, Kim YI, *et al.* Long-term outcome comparison of endoscopic resection and surgery in early gastric cancer meeting the absolute indication for endoscopic resection [J]. *Gastrointest Endosc*, 2015, 81(2): 333 - 341
- 3 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
- 4 Kim YG, Kong SH, Oh SY, *et al.* Effects of screening on gastric cancer management; comparative analysis of the results in 2006 and in 2011 [J]. *J Gastric Cancer*, 2014, 14(2): 129 - 134
- 5 Bagaria B, Sood S, Sharma R, *et al.* Comparative study of CEA and CA19 - 9 in esophageal, gastric and colon cancers individually and in combination (ROC curve analysis) [J]. *Cancer Biol Med*, 2013, 10(3): 148 - 157
- 6 Song H, Sun W, Ye G, *et al.* Long non-coding RNA expression profile in human gastric cancer and its clinical significances [J]. *J Transl Med*, 2013, 11: 225
- 7 Washington K. 7th Edition of the AJCC cancer staging manual: Stomach [J]. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17(12): 3077 - 3079
- 8 Japanese Gastric Cancer Association. Japanese classification of gastric carcinoma; 3rd edition [J]. *Gastric Cancer*, 2011, 14(2): 101 - 112
- 9 邹小农, 孙喜斌, 陈万青, 等. 2003 - 2007 年中国胃癌发病与死亡情况分析 [J]. *肿瘤*, 2012, 32(2): 109 - 114
- 10 Chan AM, Weber T. A putative link between exocytosis and tumor development [J]. *Cancer Cell*, 2002, 2: 427 - 428
- 11 Palmer RE, Lee SB, Wong JC, *et al.* Induction of BAIAP3 by the EWS - WT1 chimeric fusion implicates regulated exocytosis in tumorigenesis [J]. *Cancer Cell*, 2002, 2(6): 497 - 505
- 12 Wright PK. Targeting vesicle trafficking: an important approach to cancer chemotherapy [J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2008, 3(2): 137 - 147
- 13 Cheng KW, Lahad JP, Gray JW, *et al.* Emerging role of RAB GTPases in cancer and human disease [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(7): 2516 - 2519
- 14 Dong WW, Mou Q, Chen J, *et al.* Differential expression of Rab27A/B correlates with clinical outcome in hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(15): 1806 - 1813
- 15 Alaiyan B, Ilyayev N, Stojadinovic A, *et al.* Differential expression of coloncancer associated transcript1 (CCAT1) along the colonic adenoma - carcinoma sequence [J]. *BMC Cancer*, 2013, 13: 196
- 16 Shao Y, Chen H, Jiang X, *et al.* Low expression of lncRNA - HMLincRNA717 in human gastric cancer and its clinical significances [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(10): 9591 - 9595
- 17 Shen SW, Hui JP, Yuwen Y, *et al.* Study on canceration law of gastric mucosaldysplasia based on syndromes of Chinese medicine [J]. *Chin J Integr Med*, 2011, 17(5): 346 - 350

(收稿日期: 2016 - 01 - 16)

(修回日期: 2016 - 01 - 29)