

论著·临床研究

长链非编码 RNA AK057037 在原发性肝癌患者组织和血液检测中的应用^{*}

范颖超¹,曹雅楠¹,吴亚红²,柏晓松^{1△}

(1. 上海市杨浦区市东医院检验科,上海 200000;2. 郑州大学生命科学学院,河南郑州 450000)

摘要:目的 探讨长链非编码 RNA(lncRNA)在原发性肝癌(HCC)患者组织和血液检测中的临床价值。**方法** 选取 2016 年 1—12 月上海市杨浦区市东医院的 HCC 患者癌旁标本、肿瘤组织标本、血液标本、肝癌疑似患者穿刺标本和健康体检者血液标本进行研究,在异常高表达(平均变化倍数大于 5)的 338 条转录本中挑出 6 条 lncRNA,用实时定量聚合酶链反应和原位杂交等方法检测 lncRNA AK057037 在肝癌组织和血清中相对表达量,对结果进行统计分析。**结果** 6 条 lncRNA 在肝癌组织和血液中呈高表达,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与健康人相比,AK057037 在肝癌组织和血液中的相对表达量明显增高,且在肿瘤和癌旁组织中的相对表达量差异有统计学意义($P < 0.05$)。随着肿瘤的进展,AK057037 相对表达量有进一步提升,特别在晚期肝癌中相对表达量更高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。受试者工作特征曲线结果显示,血液标本中 AK057037 的曲线下面积为 0.834(95%CI: 0.705~0.918),诊断效率优于肝癌检测常用的核酸标志物 miR-29a。**结论** lncRNA AK057037 在肝癌组织和血液中水平明显升高,可用于肝癌的临床检测。

关键词:肝癌组织; 血液; 长链非编码 RNA

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.06.008

文章编号:1673-4130(2018)06-0664-04

中图法分类号:R542.22

文献标识码:A

Application of lncRNA AK057037 in tissues and blood samples of patient with hepatocellular cancer *

FAN YinChao¹, CAO Yanan¹, WU Yahong², BAI Xiaosong^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Shidong Hospital of Shanghai Yangpu District, Shanghai 200000;

2. College of Life Science, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450000, China)

Abstract: Objective To investigate the clinical value of tissue and blood long noncoding RNA(lncRNA) detection in the patients with hepatocellular cancer(HCC). **Methods** The HCC tissue sample, blood sample, suspected HCC puncture sample and blood sample from the persons undergoing healthy physical examination were selected for conducting the study. The six lncRNAs which were more than 5-fold expression amount were picked out in the 338 transcripts with abnormal high expression. The expression amount of lncRNA AK057037 in HCC tissue and serum tissue was detected by using the real time quantitative polymerase chain reaction and in situ hybridization. Then the results were statistically analyzed. **Results** The six lncRNAs were highly expressed in the tissues and blood of the liver cancer, and the difference was statistically significant($P < 0.05$). Compared with healthy people, the relative expression of AK057037 in the tissues and blood of the liver cancer increased significantly, and the relative expression level in tumor and paracancerous tissues was statistically significant($P < 0.05$). As the tumor progresses, the relative expression of AK057037 was further enhanced. There was a higher relative expression in advanced liver cancer especially, and the difference was statistically significant($P < 0.05$). The results of the receiver operating characteristic curve showed that the area under curve of AK057037 was 0.834(95% CI 0.705~0.918) in the blood specimen, and its diagnostic efficiency was better than that of commonly used nucleic acid marker miR-29a. **Conclusion** lncRNA AK057037 is highly expressed in HCC sample and blood, and can be used for clinical detection of HCC.

Key words: liver cancer tissue; blood; long noncoding RNA

肝癌是我国最严重的肿瘤之一,其中肝细胞癌是最常见的肝癌类型。肝癌的诊断,特别是早期诊断,

* 基金项目:河南省基础与前沿技术研究项目(162300410125)。

作者简介:范颖超,女,技师,主要从事分子学诊断研究。 △ 通信作者, E-mail: BXS0720@163.com。

本文引用格式:范颖超,曹雅楠,吴亚红,等.长链非编码 RNA AK057037 在原发性肝癌患者组织和血液检测中的应用[J].国际检验医学杂志,2018,39(6):664-667.

对肝癌的治疗至关重要。随着检测手段的进步,越来越多的肝癌标志物被发现,但是这些标志物以蛋白质为主,其检测手段对抗体的依赖性较大,且成本高、步骤多^[1]。核酸(包括 RNA 和 DNA)检测可以摆脱对抗体的依赖,且可进行链式反应,其灵敏度高,是肿瘤检测的新策略^[2]。肿瘤检测中的一大难点是非特异性造成的假阳性。与蛋白质、DNA 和普通 mRNA 不同,长链非编码 RNA(lncRNA)组织特异度极高,往往只在一种或少数几种组织中特异性表达^[3],非常适合肿瘤检测。目前,关于 lncRNA 在肝癌检测中的应用尚未见报道。本研究利用网上的大批量肝癌转录本数据,分析肝癌中高表达的转录本,找到了 6 条异常高表达的 lncRNA,然后采用实时定量聚合酶链反应(PCR)、原位杂交等多种策略,对肝癌组织和血液标本进行检测,证实了 lncRNA AK057037 可用于肝癌患者的组织和血液检测。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 1—12 月上海市杨浦区市东医院肝胆外科收治的原发性肝癌(HCC)患者 75 例进行研究,其中 51 例取肝组织作为标本,包括相应癌旁组织标本 51 份(A 组)和肿瘤组织标本 51 份(T 组),24 例采集血液作为标本(B 组)。A 组男 39 例,女 12 例,平均年龄(55±13)岁;B 组男 14 例,女 10 例,平均年龄(50±15)岁。按病情严重程度将 T 组和 B 组进一步分为 T1 组(早期肝癌 18 例)、T2 组(晚期肝癌为 33 例)和 B1 组(早期肝癌 9 例)、B2 组(晚期肝癌为 15 例)。将所有患者均经 CT 扫描和增强核磁共振成像检测,发现肝脏占位性病变,手术切割组织标本之后,经过病理组织学检测,诊断为 HCC。甲胎蛋白表达量较高,而无明显肝癌症状和体征者为早期肝癌;有明显不适伴随较大肿瘤体积,且经病理组织学检测发现肿瘤有远端转移者为晚期肝癌。同时选取 3 例肝癌疑似患者的穿刺标本(P 组)和 20 例健康体检者的血液标本(H 组)对照。P 组经肝脏穿刺最终确认无肝癌、肝硬化、肝炎等疾病,分别为 52、58 和 56 岁。H 组男 11 例,女 9 例,平均年龄(55±10)岁。本研究经医院伦理委员会批准实施,所有研究对象均知情同意并签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 全血 RNA 快速抽提试剂盒购自北京博凌科为公司,反转录试剂盒购自美国 Promega 公司,Trizol 购自美国 Invitrogen 公司,原位杂交探针购自美国 Invitrogen 公司,引物由上海生工公司合成。实时定量 PCR 仪购自美国 ABI7300 公司,通风厨购自北京格迈科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 组织 RNA 提取 从 A 组和 T 组中分别随机选取 32 份癌旁标本和 32 份肿瘤标本,采用实时定量 PCR 检测 lncRNA 的相对表达量。肝癌组织和穿刺标本收集之后,快速放到液氮中保存。采用 TRIZOL-

异丙醇法提取 RNA 的具体步骤为:从液氮中取出肝癌组织,用无 RNA 酶的刀片切下 0.2 g 左右标本,加 1 mL Trizol,用组织破碎仪破碎,加入 200 μL 氯仿,颠倒摇动 15 s,室温放置 5 min 后,4 ℃ 下 12 000×g 离心 15 min,取 500 μL 上清液至无 RNA 酶的 EP 管中,加 500 μL 异丙醇沉淀,然后加入 100 μL RNase Free 水溶解。

1.3.2 血液 RNA 提取 血液标本收集之后,加入抗凝血因子,其 RNA 提取具体步骤为:加入 3 倍体积的红细胞裂解液,孵育 10 min,期间间歇性颠倒混匀,然后 12 000×g 离心 20 s,弃掉红色上清,留下白色细胞团,加入 1 mL RL 裂解细胞,剧烈震动后,室温孵育 5 min,加 200 μL 氯仿,上下剧烈颠倒摇动 15 s,12 000×g 离心 10 min 后,取水层到新管中,加入 1 倍体积的 70% 乙醇,转移到吸附柱 RA 中,离心 45 s,去掉废液,溶解离心。

1.3.3 免疫组化和原位杂交 取一块标本用福尔马林固定 24 h,包埋蜡块。石蜡融化,脱蜡,双氧水封闭 10 min,抗原修复后,自然冷却,37 ℃ 湿盒中封闭 1 h,滴加一抗或者 lncRNA 对应的探针,在湿盒过夜,PBS 漂洗 5 min,滴加二抗、SABC, DBA 染色,苏木素复染,氨水泛蓝,脱水封片备用。

1.3.4 反转录和实时定量 PCR 每一个 30 μL 反应体系中加入 1 μg RNA、1 μL Radam Primer、4 μL dNTP, 补水至 30 μL, 混匀, 65 ℃ 孵育 5 min, 快速放到冰上静置 5 min, 然后加入 6 μL 5×buffer、1 μL RNA 酶抑制剂和 1 μL 反转录酶, 42 ℃ 孵育 1 h, 75 ℃ 孵育 10 min。

用反转录的 cDNA 作为模板,具体的加样体系为:引物各 1 μL, 混合物 10 μL, cDNA 模板 1 μL, 水 7 μL。实时定量 PCR 反应在 ABI7300 仪器中进行,其引物序列如下:AK057037 上、下游引物分别为 5'-CAG CTG AAT GCG GGA GCC GA-3'、5'-GCA GGT TCG GCT GGT GAT GC-3'; BC044843 上、下游引物分别为 5'-CTG ACT GAT GCT TCC CCA AA-3'、5'-TCA TCA ACT TCC TGA GGT TC-3'; BC041431 上、下游引物分别为 5'-ATC ATT GTG AGT TCT GAA TC-3'、5'-GAG TTA CAT CAC TTA GGC AC-3'; AK096932 上、下游引物分别为 5'-CTT CAC CTC CTC GGT CTC AG-3'、5'-CTG GGT GTT CTC CAA GAG CA-3'; BC130504 上、下游引物分别为 5'-CTT TTG AGG CAA CCT TCT TC-3'、5'-ATT AGT TGA GTC CAG GAG AT-3'; AK056814 上、下游引物分别为 5'-GAC CCC GAC CCA CCC GTG CA-3'、5'-CCT GGG GCG GGG AAG GGG CT-3'。

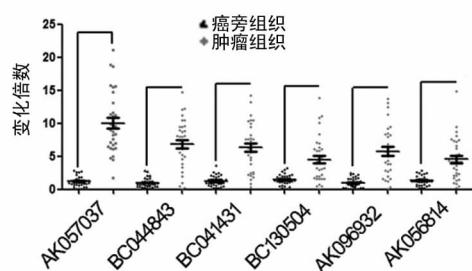
1.3.5 肝癌组织高表达 lncRNA 获取 为了甄选肝癌组织中高表达的 lncRNA, 本研究对网上的转录组数据(GSE25097)进行了生物信息学分析^[4], 在异常

高表达(平均变化倍数大于5)的338条转录本中挑出6条lncRNA进行试验。

1.4 统计学处理 采用Excel软件进行数据分析;所有柱状图和散点图数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式呈递,两组变量之间比较采用t检验,方差不同时采用双样本异方差检测;采用受试者工作特征(ROC)曲线分析AK057037的诊断效能;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

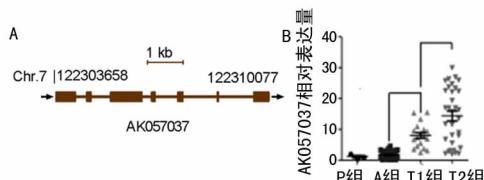
2.1 肝癌组织中高表达lncRNA鉴定结果 32对肝癌标本中,6条lncRNA均呈不同程度的高表达,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图1。



注:对于每一个lncRNA,癌旁标本的平均值被定义为1

图1 肝癌组织中高表达lncRNA鉴定

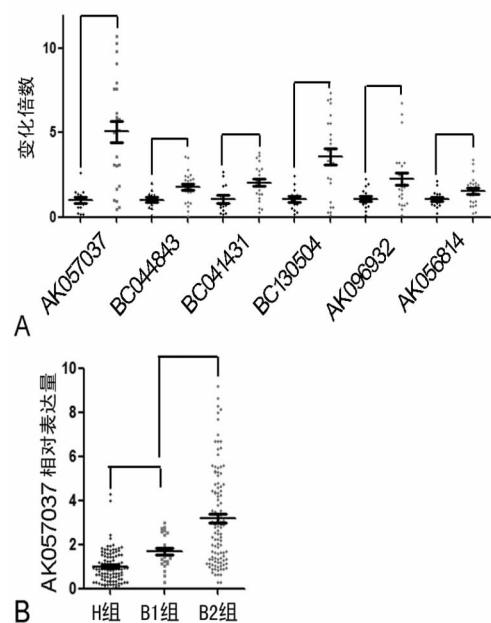
2.2 AK057037在肝癌组织标本中的表达情况 与P组相比,AK057037在肝癌组织中的相对表达量明显增高,且在肿瘤和癌旁组织中的相对表达量差异有统计学意义($P < 0.05$)。随着肿瘤的进展,AK057037相对表达量有进一步提升,特别在晚期肝癌中相对表达量更高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图2。



注:A为AK057037基因位点示意图;B为AK057037在P组、A组、T1组和T2组中的表达情况,P组平均值被定义为1

图2 AK057037在肝癌组织标本中表达情况

2.3 AK057037在肝癌血液标本中的表达情况 6条lncRNA在肝癌血液标本中呈现出不同程度的高表达,且AK057037的相对表达量最高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与H组相比,AK057037在血液标本中的相对表达量明显增高,而且随着肿瘤的进展,血液中AK057037相对表达量有进一步提升,特别在晚期肝癌中相对表达量更高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。ROC曲线分析结果显示,AK057037的曲线下面积为0.834,95%CI为0.705~0.918,而常用核酸标志物miR29-a的曲线下面积为0.763,95%CI为0.635~0.829,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图3。



注:A为血液标本中不同lncRNA水平比较;B为血液标本中AK057037相对表达量比较,健康人血液中lncRNA的平均值被定义为1

图3 AK057037在肝癌血液标本中表达情况

3 讨 论

在肿瘤的诊断中,蛋白质检测对抗体的依赖性较强、成本高、步骤多^[5-7],而核酸检测可以摆脱对抗体的依赖,可以节约成本,同时可以进行链式扩增(如PCR等),能够检测到标本中极其微量的核酸,极大地提高了检测灵敏度。核酸检测非常符合液体活检的要求,有望在肿瘤早期筛查、诊断、治疗方案指导、疗效评估和预后测评等领域发挥作用,为精准医学提供技术支撑^[8]。由于重要的临床应用价值和市场前景,核酸检测越来越受到人们的青睐,其技术可以用于循环肿瘤细胞^[9]、循环肿瘤DNA^[10]和外泌体^[11]的检测,然而在肝癌检测方面的应用研究还较少。有研究指出,一些miRNA能够作为肝癌检测的指标^[12],而lncRNA是否可以作为肝癌检测的指标尚不清楚。本研究结果显示,lncRNA可以作为肝癌组织和血液检测的靶标。

有文献报道,lncRNA在肝癌细胞中高表达且能用于组织检测^[13]。然而,本研究结果显示,有一些lncRNA,如AK057037,在肝癌血液中同样呈高表达。这可能是由于在肝癌患者循环肿瘤细胞中,AK057037表达量极高,且lncRNA的组织特异性度高,但其在血液系统的正常细胞中不表达。因此,由于循环肿瘤细胞的存在,肝癌患者血液中AK057037表达量有较大提升。同时,一些lncRNA也能在外泌体中富集,会造成血液中lncRNA的存在及富集^[14]。虽然AK057037在血液检测中获得理想结果的具体原因尚不清楚,但ROC曲线分析结果显示,AK057037确实可以作为肝癌组织和血液检测的指标。

综上所述, lncRNA AK057037 在肝癌组织和血液中水平明显升高, 可用于肝癌的临床检测。

参考文献

- [1] ASHHAB A A, RODIN H, POWELL J, et al. Hepatocellular carcinoma diagnosis and surveillance: socioeconomic factors don't seem to matter, unless you are an immigrant [J]. *J Hepatol*, 2017, 67(3): 648-649.
- [2] BRUIX J, REIG M, SHERMAN M. Evidence-based diagnosis, staging and treatment of patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(4): 835-853.
- [3] ZHU P, WANG Y, HUANG G, et al. Inc-beta-Catm elicits EZH2-dependent beta-catenin stabilization and sustains liver CSC self-renewal [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2016, 23(7): 631-639.
- [4] ZHU P, WANG Y, WU J, et al. LncBRM initiates YAP1 signalling activation to drive self-renewal of liver cancer stem cells [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13608.
- [5] 闫慧, 薛冰. 血清肿瘤标志物 CA125、CEA 联合检测在宫颈癌诊断中的临床价值 [J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(1): 134-135.
- [6] 盛红玲, 姜元培, 马燕, 等. 血清降钙素原、超敏 C 反应蛋白及白细胞介素 6 在小儿急性上呼吸道感染中的诊断价值 [J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(9): 1207-1209.
- [7] 陈玉, 韩刚. 冠心病合并糖尿病患者的血脂检验的研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(1): 98-99.
- [8] ZHU P, WANG Y, HE L, et al. ZIC2-dependent OCT4 activation drives self-renewal of human liver cancer stem cells [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(10): 3795.
- [9] RACK B, SCHINDLBECK C, JUCKSTOCK J, et al. Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2014, 106(5): 2504-2511.
- [10] THIERRY A R, MOULIERE F, EL MESSAOUDI S, et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA [J]. *Nat Med*, 2014, 20(4): 430-435.
- [11] ZHANG H, DENG T, LIU R, et al. Exosome-delivered EGFR regulates liver microenvironment to promote gastric cancer liver metastasis [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15016.
- [12] 张伟, 董政, 荣义辉. MicroRNA 与肝癌诊治研究进展 [J]. 肝脏, 2017, 22(2): 159-161.
- [13] CHEN Z Z, HUANG L, WU Y H, et al. LncSox4 promotes the self-renewal of liver tumour-initiating cells through Stat3-mediated Sox4 expression [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12598.
- [14] GEZE U, OZGUR E, CETINKAYA M, et al. Long non-coding RNAs with low expression levels in cells are enriched in secreted exosomes [J]. *Cell Biol Int*, 2014, 38(9): 1076-1079.

(收稿日期: 2017-06-06 修回日期: 2017-09-06)

(上接第 663 页)

- 周血 T 淋巴细胞及 DNT 细胞在恶性肿瘤早期诊断中的应用 [J]. 标记免疫分析与临床, 2016, 23(2): 139-142.
- [2] TAMURA K, KAWAI Y, KIGUCHI T, et al. Efficacy and safety of febuxostat for prevention of tumor lysis syndrome in patients with malignant tumors receiving chemotherapy: a phase III, randomized, multi-center trial comparing febuxostat and allopurinol [J]. *Int J Clin Oncol*, 2016, 21(5): 996-1003.
- [3] 钱香, 马建锋. 血清降钙素原与 C-反应蛋白联合检测对恶性肿瘤患者早期感染诊断的临床价值 [J]. 中国实验诊断学, 2017, 21(3): 399-402.
- [4] 王智, 马晋平, 林建伟, 等. 术前中性粒细胞与淋巴细胞比值与结直肠癌患者预后的关系 [J/CD]. 消化肿瘤杂志 (电子版), 2011, 3(4): 246-250.
- [5] 刘永成, 李书红, 双泽宇, 等. 术前外周血中性粒细胞/淋巴细胞比值对肝内胆管细胞癌术后预后的影响 [J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(2): 160-165.
- [6] 王静, 陆晓媛. 术前中性粒细胞/淋巴细胞比值与子宫内膜癌分期术患者预后的关系 [J]. 中国肿瘤外科杂志, 2016, 8(6): 377-380.
- [7] 李晓惠, 徐冰清, 高劲, 等. 中性粒细胞与淋巴细胞比值对鼻咽癌放射敏感性及预后影响的研究 [J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2016, 25(5): 432-436.
- [8] 马晓路, 吴炯, 周琰, 等. 术前中性粒细胞/淋巴细胞比值对肝细胞肝癌根治性切除术后肿瘤早期复发的影响 [J].

检验医学, 2016, 31(10): 863-868.

- [9] 邵嘉艺, 刘倩, 唐丽萍. 中性粒细胞与淋巴细胞比值和妇科系统恶性肿瘤患者预后关系的研究进展 [J]. 肿瘤学杂志, 2016, 22(7): 560-564.
- [10] 张兴, 李森, 郭忠武, 等. 75 岁以上老年胃癌患者术前外周血中性粒细胞与淋巴细胞比值的临床意义 [J]. 中华胃肠外科杂志, 2016, 19(5): 526-529.
- [11] 姚娟, 师传帅, 续薇. 中性粒细胞/淋巴细胞比值与消化系统肿瘤的临床研究进展 [J]. 实用检验医师杂志, 2016, 8(1): 48-50.
- [12] 庄肃非, 孟光冉, 王恩龙, 等. 结直肠癌患者术前术后中性粒细胞与淋巴细胞比值的变化及意义 [J]. 宁夏医学杂志, 2016, 38(5): 414-416.
- [13] 宋杨梅, 樊勇, 艾比拜·玉素甫, 等. 甲状腺癌术前中性粒细胞与淋巴细胞比值和血小板与淋巴细胞比值与临床病理特征及预后关系研究 [J]. 中国全科医学, 2015, 4(15): 1748-1752.
- [14] 陈本均, 何茂兰, 冉约曼, 等. 宫颈癌患者凝血指标与肿瘤临床病理特征的相关性研究 [J]. 河北医学, 2015, 13(1): 39-42.
- [15] 朱莉, 张静琼. 恶性肿瘤患者凝血和纤溶指标的临床分析以及相关护理对策 [J]. 血栓与止血学, 2016, 22(5): 588-589.

(收稿日期: 2017-08-22 修回日期: 2017-11-03)