

# 胃液长链非编码 RNA RMRP 的检测及其临床价值分析

周善学 朱春霞 陆蓉丹 邵永富 叶国良

**【摘要】目的** 检测长链非编码 RNA(lncRNA)线粒体 RNA 处理核糖核酸内切酶 RNA 组份(RMRP)在不同患者胃液中的水平及其变化规律,结合临床病理因素探讨胃液 RMRP 作为胃癌筛查标志物的临床价值。**方法** 以胃液 GAPDH 为参照,采用 qRT-PCR 法检测并比较 45 例正常或轻度胃炎患者胃液、30 例胃溃疡患者胃液、16 例慢性萎缩性胃炎患者胃液和 39 例胃癌患者胃液中 RMRP 水平及其变化规律,结合临床病理因素探讨胃液 RMRP 水平与胃癌的相关性,构建 ROC 曲线确定胃液 RMRP 作为胃癌筛查标志物的灵敏度与特异度,通过联合检测胃液 RMRP、血清癌胚抗原(CEA)和胃液 CEA 在早期胃癌和进展期胃癌中的阳性率探讨胃液 RMRP 的临床价值。**结果** 相对于正常或轻度胃炎患者,胃溃疡患者胃液 RMRP 水平无明显变化( $P > 0.05$ ),而慢性萎缩性胃炎患者胃液 RMRP 水平明显降低,胃癌患者胃液 RMRP 水平显著升高(均  $P < 0.01$ )。胃癌患者胃液 RMRP 水平与患者年龄、幽门螺杆菌感染情况均有关(均  $P < 0.05$ )。ROC 曲线显示胃液 RMRP 的灵敏度和特异度分别为 0.56 和 0.75。胃液 RMRP 联合血清或胃液 CEA 筛查胃癌的效果明显优于传统肿瘤标志物血清 CEA 水平(均  $P < 0.05$ )。**结论** 胃液 lncRNA RMRP 是潜在的胃癌筛查标志物,为临床诊治胃癌研究提供了新的思路。

**【关键词】** 胃癌 长链非编码 RNA RMRP 临床意义

Detection of long non-coding RNA RMRP expression levels in gastric juice and its clinical significance ZHOU Shanxue, ZHU Chunxia, LU Rongdan, et al. Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Medical School of Ningbo University, Ningbo 315020, China

**【Abstract】Objective** To investigate the expression of long non-coding RNA (lncRNA) component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease(RMRP) in gastric juice and its clinical significance. **Methods** The expression levels of RMRP were detected by real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR) in gastric juice samples from 45 cases of normal mucosa or minimal gastritis (NMMG), 30 cases of gastric ulcer (GU), 16 cases of atrophic gastritis (AG) and 39 cases of gastric cancer (GC). The correlation between gastric juice RMRP level and gastric cancer was analyzed. Using receiver operating characteristic (ROC)curve the sensitivity and specificity of RMRP in diagnosis of gastric cancer were evaluated, and compared with serum CEA and gastric juice CEA for diagnosis of early GC and advanced GC. **Results** There was no significant difference in expression of gastric juice RMRP between NMMG group and GU group ( $P > 0.05$ ), while gastric juice RMRP levels were significantly decreased in AG group and increased in GC group(both  $P < 0.01$ ). The expression levels of RMRP in GC group were significantly associated with age and H.pylori infection of patients (both  $P < 0.05$ ). The sensitivity and specificity of RMRP in gastric juice for diagnosis of GC were 0.56 and 0.75, respectively. Combined gastric juice RMRP with CEA in serum and gastric juice improved the detection rate of GC compared to serum CEA alone(all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** RMRP in gastric juice may be used as a potential screening marker for gastric cancer.

**【Key words】** Gastric cancer LncRNA RMRP Clinical significance

长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是

一类转录本长度  $> 200$  个核苷酸并且不具备蛋白质编码功能的 RNA 分子。lncRNA 以 RNA 的形式在表观遗传学水平、转录水平和转录后水平等多个层面调控基因的表达,是重要的基因表达调控元件<sup>[1-2]</sup>,参与染色质重构、细胞分化、蛋白转运、mRNA 选择性剪切等过程<sup>[3-4]</sup>。在前期研究中,本课题组采用芯片分析了胃癌 lncRNA 表达谱的差异,发现线粒体 RNA 处理核糖核酸内切酶 RNA

doi:10.12056/j.issn.1006-2785.2018.40.2.2017-1013

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2017KY598)

作者单位:315020 宁波大学医学院附属医院普外科(周善学),消化内科(朱春霞、陆蓉丹、邵永富、叶国良)

通信作者:叶国良, E-mail:ndfygl@126.com

组份 (RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease, RMRP) 在胃癌组织中表达水平显著改变。本研究拟在前期研究的基础上, 进一步检测 RMRP 在不同患者胃液中的水平及变化规律, 结合临床病理因素探讨胃液 RMRP 作为胃癌筛查标志物的临床价值, 并通过联合比较检测胃液 RMRP、癌胚抗原(CEA)和血清 CEA 在早期胃癌和进展期胃癌中的阳性率, 以期为胃癌早期筛查提供新思路。

## 1 材料和方法

1.1 标本来源 45 例正常或轻度胃炎患者胃液、30 例胃溃疡患者胃液、16 例慢性萎缩性胃炎患者胃液和 39 例胃癌(7 例早期胃癌、32 例进展期胃癌)患者胃液标本取自 2012 年 9 月至 2015 年 1 月在本院进行胃镜检查的患者, 且均经病理检查证实。所有患者胃镜检查前均空腹 8h, 检查前 2 周内未接受任何药物治疗。上述新鲜胃液标本采集后保存在  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用。肿瘤病理类型参照 WHO 的胃癌病理学分类标准, 并根据美国癌症联合委员会(AJCC)胃癌 TNM 分期(2010 年第 7 版)进行 TNM 分期。本研究经宁波大学医学研究伦理道德委员会批准和患者知情同意。

1.2 总 RNA 的提取 经 Trizol LS 试剂(美国 Invitrogen 公司)抽提胃液总 RNA, DEPC 水复溶后, 用核酸蛋白分析仪测定总 RNA 浓度, 根据总 RNA A260/A280 比值和 1.5% 非变性琼脂糖凝胶电泳 RNA 条带完整性鉴定总 RNA 质量。取  $10\mu\text{l}$  总 RNA 加入 GoScript 逆转录试剂盒(美国 Promega 公司)进行逆转录反应, 得到 cDNA 溶液, 加  $80\mu\text{l}$  DEPC 稀释后, 保存于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱。

1.3 胃液 RMRP 检测 采用 miScript SYBR Green PCR 检测试剂盒(德国 Qiagen 公司)对上步的  $5\mu\text{l}$  cDNA 溶液进行 qRT-PCR(美国 Stratagene 公司), 内参 GAPDH mRNA 引物序列如下: 上游为  $5'$ -ACCCACTC-CTCCACCTTTGAC- $3'$ , 下游为  $5'$ -TGTTGCTGTAGC-CAAATTCGTT- $3'$ ; RMRP 引物序列如下: 上游为  $5'$ -AC-TCCAAAGTCCGCAAGA- $3'$ , 下游为  $5'$ -TGCCTAACTA-GAGGAGCTGAC- $3'$ , 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。qRT-PCR 反应体系为:  $1\mu\text{l}$  RMRP 特异性扩增上下游引物或 GAPDH 上下游引物,  $12.5\mu\text{l}$  GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix,  $5.5\mu\text{l}$  无 RNase 水和  $5\mu\text{l}$  cDNA。qRT-PCR 反应条件为:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 5min; 然后  $94^{\circ}\text{C}$  变性 15s,  $55^{\circ}\text{C}$  退火 30s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 30s, 共 45 个循环。所有样本做 3 个复孔。通过对胃液 RMRP 的 PCR 产物克隆测序明确了胃液 RMRP 的存在, 采用 qRT-PCR

检测胃液 RMRP 的特异性。本研究采用  $\Delta\text{Ct}$  法分析目的 RMRP 的相对表达水平。  $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{RMRP}} - \text{Ct}_{\text{GAPDH}}$ 。  $\Delta\text{Ct}$  数值越大, 则基因表达水平越低。

1.4 胃液和血清 CEA 水平检测 采用 ELISA 法检测胃液和血清 CEA 水平。所有操作过程严格按照 CEA 定量检测试剂盒(广州健仑生物科技有限公司)说明书进行。本研究中胃液和血清 CEA 定量检测  $>10\text{ng/ml}$  视为阳性。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用两独立样本  $t$  检验, 多组间比较采用方差分析。计数资料组间比较采用 Fisher 确切概率法或  $\chi^2$  检验。绘图由 GraphPad Prism v5.0 软件完成。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 正常或轻度胃炎、胃溃疡、慢性萎缩性胃炎和胃癌患者胃液 RMRP 水平比较 相对于正常或轻度胃炎患者, 胃溃疡患者胃液 RMRP 水平无明显变化( $P > 0.05$ ), 而慢性萎缩性胃炎患者胃液 RMRP 水平明显降低, 胃癌患者胃液 RMRP 水平显著升高(均  $P < 0.01$ ), 见表 1。

表 1 正常或轻度胃炎、胃溃疡、慢性萎缩性胃炎和胃癌患者胃液 RMRP 水平比较

组别	<i>n</i>	胃液 RMRP 水平
胃溃疡患者	30	$0.674 \pm 1.927$
慢性萎缩性胃炎患者	16	$1.991 \pm 2.153^*$
胃癌患者	39	$-0.670 \pm 1.961^*$
正常或轻度胃炎患者	45	$0.445 \pm 1.783$

注: 与正常或轻度胃炎患者比较,  $*P < 0.01$

2.2 胃液 RMRP 水平与胃癌患者临床病理因素关系分析 胃癌患者胃液 RMRP 水平与患者年龄、幽门螺杆菌感染情况均有关(均  $P < 0.05$ ), 而与性别、吸烟史、饮酒史、肿瘤位置、血清 CEA 水平、糖类抗原(CA)19-9 水平等因素均无关(均  $P > 0.05$ ), 见表 2。同时, 笔者构建了胃液 RMRP 的 ROC 曲线, AUC 为 0.699; 当其截断值为  $-0.592$  时, 胃液 RMRP 的灵敏度和特异度分别为 0.56 和 0.75, 见图 1。

2.3 不同标志物筛查早期胃癌和进展期胃癌的阳性率比较 通过联合检测血清或胃液 CEA 和胃液 RMRP, 笔者分别检测了 7 例早期胃癌和 32 例进展期胃癌的阳性率。结果显示, 胃液 RMRP 联合血清或胃液 CEA 筛查胃癌的效果明显优于传统肿瘤标志物血清 CEA(均  $P < 0.05$ ), 见表 3。

表2 胃液 RMRP 水平与胃癌患者临床病理因素分析

病理因素	n	胃液 RMRP 水平	P 值
年龄			
≥60 岁	25	-0.164 ± 1.996	0.029
<60 岁	14	-1.574 ± 1.586	
性别			
男	29	-0.638 ± 1.754	0.862
女	10	-0.765 ± 2.578	
吸烟史			
有	26	-0.742 ± 1.607	0.787
无	13	-0.526 ± 2.600	
饮酒史			
有	28	-0.696 ± 1.865	0.898
无	11	-0.605 ± 2.283	
幽门螺杆菌感染			
阳性	21	0.085 ± 2.077	0.006
阴性	18	-1.552 ± 1.412	
肿瘤位置			
胃窦	16	-1.417 ± 1.558	0.237
胃体	14	-0.325 ± 2.182	
胃角	4	0.291 ± 1.662	
贲门	5	-0.200 ± 2.402	
肿瘤直径			
>5cm	10	-1.139 ± 1.356	0.166
≤5cm	29	-0.308 ± 2.289	
组织分化			
高分化	7	-0.354 ± 1.768	0.644
低分化	32	-0.739 ± 2.021	
肿瘤分期			
早期	7	-0.523 ± 1.636	0.830
进展期	32	-0.703 ± 2.047	
进展期胃癌 Borrmann 分型			
I 型	6	-1.732 ± 1.748	0.220
II 型	8	-0.870 ± 2.581	
III 型	12	0.213 ± 1.894	
IV 型	6	-1.280 ± 1.406	
Lauren 分型			
肠型	29	-0.671 ± 2.130	0.997
弥漫型及混合型	10	-0.668 ± 1.454	
胃液 CEA 水平			
阳性	27	-0.345 ± 2.078	0.121
阴性	12	-1.403 ± 1.493	
血清 CEA 水平			
阳性	25	-0.507 ± 2.269	0.427
阴性	14	-0.961 ± 1.261	
血清 CA19-9 水平			
阳性	9	-0.822 ± 2.120	0.795
阴性	30	-0.625 ± 1.947	

### 3 讨论

胃癌是世界上最常见的肿瘤之一,占肿瘤死亡原因

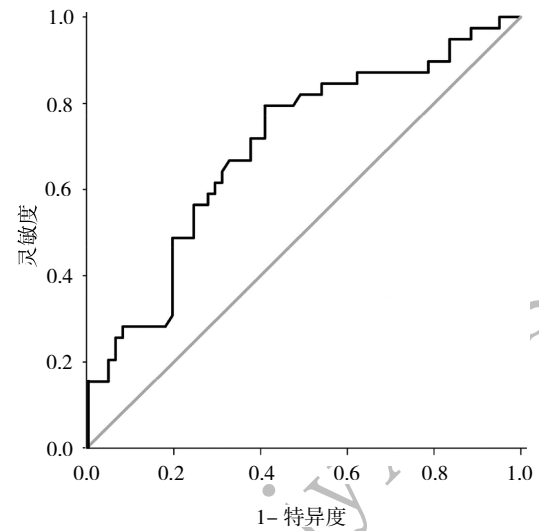


图1 胃液 RMRP 水平诊断胃癌的 ROC 曲线

的第3位,每年死于胃癌的人数约占全球死亡人数的10.4%<sup>[5]</sup>。因胃癌的发生、发展是一个多因素、多阶段、多步骤的过程,涉及到大量的基因参与及复杂的网络调控,胃癌的病理生理机制迄今尚未完全阐明,其早期诊断及治疗受到极大的限制<sup>[6]</sup>。研究表明 lncRNA 参与胃癌的发生、发展过程,并通过复杂的分子机制对胃癌的侵袭和转移起着极为重要的作用<sup>[7-8]</sup>。

RMRP 定位于人类染色体 9p13.3,全长 277 个核苷酸,由 10 个不同的亚基及单个 RNA 分子组成<sup>[9-10]</sup>。研究发现,RMRP 绝大部分存在于细胞核与核仁,仍有小部分存在于线粒体内,可在小鼠及人类组织中表达<sup>[11-12]</sup>。在线粒体内,RMRP 充当核酸内切酶角色,能够劈开一段从 DNA 复制起始点合成的 RNA 产生一条 RNA 引物,供线粒体 DNA 领头链合成用。而在核仁,RMRP 通过劈开 5.8S rRNA 前体上最后的短 RNA 片段,产生成熟的功能性 5.8S rRNA 分子<sup>[13]</sup>。此外,RMRP 还能与端粒酶相关逆转录酶形成复合物而展示出 RNA 依赖的 RNA 活性<sup>[14]</sup>。

RMRP 在核糖体合成、细胞周期调控和线粒体 DNA 的复制中均发挥一定的作用<sup>[9]</sup>。在肿瘤领域,研究发现 RMRP 的异常表达可导致肿瘤的发生。Shao 等<sup>[9]</sup>发现胃组织 RMRP 表达水平只在胃癌前病变阶段和胃癌阶段显著降低,显示它是胃癌相关性 lncRNA。Meng 等<sup>[15]</sup>发现 RMRP 在肺腺癌组织中高表达,其过表达可促进细胞增殖、克隆形成和侵袭,通过调控 miR-26 发挥致癌活性。Park 等<sup>[9]</sup>研究发现 RMRP 在许多恶性肿瘤细胞及结直肠癌组织、乳腺癌组织中高表达。由此可见,RMRP 是一个潜在的肿瘤检测及诊治新靶点。

本课题组通过 lncRNA 芯片检测了胃癌组织及其

表 3 不同标志物筛查早期胃癌和进展期胃癌的阳性率比较[例(%)]

组别	n	血清 CEA	胃液 CEA	胃液 RMRP	胃液 RMRP+ 血清 CEA	胃液 RMRP+ 胃液 CEA	胃液 RMRP+ 胃液 CEA+ 血清 CEA
早期胃癌	7	1(14.3)	4(57.1)	4(57.1)	5(71.4)	5(71.4)	6(85.7)*
进展期胃癌	32	13(40.6)	18(56.3)	18(56.3)	23(71.9)*	27(84.4)*	30(93.8)*

注:与血清 CEA 比较,\* $P<0.05$

配对癌旁组织 lncRNA 表达谱的差异<sup>[6]</sup>,发现 RMRP 荧光强度大、差异倍数高,在组织中的变化趋势一致,以此作为研究对象,检测其在胃液中的表达水平,探究其临床意义。本实验通过 qRT-PCR 验证 130 例患者胃液中 RMRP 的实际表达情况,发现相对于正常或轻度胃炎患者,胃溃疡患者胃液 RMRP 水平无明显变化,而慢性萎缩性胃炎患者胃液 RMRP 水平显著降低,胃癌患者胃液 RMRP 水平显著升高,证实了 RMRP 与胃癌的相关性,具有作为胃癌筛查标志物的潜质。本课题组前期研究发现胃组织 RMRP 表达水平只在胃癌前病变阶段和胃癌阶段显著降低<sup>[6]</sup>,而胃液 RMRP 水平在胃癌患者中却反常性显著升高。由此推测,胃黏膜细胞癌变时细胞 RMRP 主动分泌加强,而检测胃液 RMRP 水平可进一步提高胃癌检出率。

幽门螺杆菌感染是引起胃癌进展的主要原因,与宿主炎症因子密切相关,在这一过程中,微环境的改变可能导致胃癌细胞发生随机突变,从而导致胃癌的发生<sup>[17-18]</sup>。结合胃癌患者临床病理因素,进一步发现了 RMRP 水平与患者年龄、幽门螺杆菌感染密切相关。由此推测,RMRP 可能在胃癌的起始阶段发挥炎症作用,通过以 RNA 的形式在表观遗传学水平、转录水平和转录后水平等多个层面调控基因的表达进一步促进胃癌的发生。

胃液来源较为单一,其反映上消化道肿瘤具有显著优势。通过构建胃液 RMRP 的 ROC 曲线,发现 AUC 为 0.699,结合其灵敏度和特异度分别为 0.56 和 0.75,有较高的临床诊断价值。早期诊断是降低胃癌病死率的关键一环<sup>[9]</sup>,肿瘤标志物联合检测是提高胃癌检出率的重要手段。通过联合血清或胃液 CEA 和胃液 RMRP,检测了早期胃癌和进展期胃癌的阳性率,发现胃液 RMRP 联合血清或胃液 CEA 筛查胃癌的效果明显优于传统肿瘤标志物血清 CEA,联合检测胃液 RMRP、血清 CEA 和胃液 CEA 可提高胃癌检出率。

本研究证实了胃癌相关 lncRNA 的存在,并进一步分析了胃癌相关 lncRNA RMRP 在胃液中的临床意义。胃液 RMRP 作为潜在的早期胃癌筛查标志物,为临床诊治胃癌研究提供了新的思路。

#### 4 参考文献

- [1] 滕卫军,郑晓娟,华宏军,等.长链非编码 RNA UCA1 在胃癌组织中的表达及其效应分析[J].浙江医学,2015,37(12):1022-1026.
- [2] Spizzo R, Almeida MI, Colombatti A, et al. Long non-coding RNAs and cancer: a new frontier of translational research?[J]. *Oncogene*, 2012, 31(43): 4577-4587. doi: 10.1038/onc.2011.621.
- [3] Klattenhoff CA, Scheuermann JC, Surface LE, et al. Braveheart, a long noncoding RNA required for cardiovascular lineage commitment[J]. *Cell*, 2013, 152(3): 570-583. doi: 10.1016/j.cell.2013.01.003.
- [4] Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, et al. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating S R splicing factor phosphorylation[J]. *Mol Cell*, 2010, 39(6): 925-938. doi: 10.1016/j.molcel.2010.08.011.
- [5] Khazaei S, Rezaeian S, Soheylizad M, et al. Global incidence and mortality rates of stomach cancer and the human development index: an ecological study[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 17(4): 1701-1704. doi: 10.7314/APJCP.2016.17.4.1701.
- [6] Shao Y, Ye M, Jiang X, et al. Gastric juice long noncoding RNA used as a tumor marker for screening gastric cancer[J]. *Cancer*, 2014, 120(21): 3320-3328. doi: 10.1002/cncr.28882.
- [7] Wang P, Xue Y, Han Y, et al. The STAT3-binding long noncoding RNA lnc-DC controls human dendritic cell differentiation[J]. *Science*, 2014, 344(6181): 310-313. doi: 10.1126/science.1251456.
- [8] 潘涛,俞振佳,吴熊焰,等.长链非编码 RNA 调控胃癌侵袭和转移的研究进展[J].上海交通大学学报(医学版),2016,36(9):1388-1393. doi: 10.3969/j.issn.1674-8115.2016.09.025.
- [9] Park J, Jeong S. Wnt activated  $\beta$ -catenin and YAP proteins enhance the expression of non-coding RNA component of RNase MRP in colon cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(33): 34658-34668. doi: 10.18632/oncotarget.5778.
- [10] Saito Y, Takeda J, Adachi K, et al. RNase MRP cleaves pre-tRNA<sup>Ser</sup>-Met in the tRNA maturation pathway[J]. *PLoS One*, 2013, 9(11):e112488. doi: 10.1371/journal.pone.0112488.
- [11] Rosenbluh J, Nijhawan D, Chen Z, et al. RMRP is a non-coding RNA essential for early murine development[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10):e26270. doi: 10.1371/journal.pone.0026270.
- [12] Li K, Smagula CS, Parsons WJ, et al. Subcellular partitioning of MRP RNA assessed by ultrastructural and biochemical analysis [J]. *J Cell Biol*, 1994, 124(6): 871-882. doi: 10.1083/jcb.124.6.871.
- [13] Rogler LE, Kosmyna B, Moskowitz D, et al. Small RNAs derived from lncRNA RNase MRP have gene-silencing activity relevant

(下转第 141 页)