

PVT1 基因在胃癌患者血液中的表达及其临床意义

任显显¹,肖永彪²,张蕾³,习羽³,徐洁⁴,潘泽民¹,李洪涛¹,李冬妹¹(1. 石河子大学医学院生物化学教研室,新疆石河子 832002; 2. 新疆喀什地区第一人民医院消化肿瘤外科,新疆喀什 844000; 3. 石河子大学医学院第一附属医院检验科,新疆石河子 832002; 4. 新疆医科大学第五附属医院心内科,新疆乌鲁木齐 830001)

[摘要] **目的:** 检测人浆细胞瘤转化迁移基因 1 (plasmacytoma variant translocation 1, *PVT1*) 在胃癌患者血液中的表达水平及临床常用肿瘤标志物的含量,探讨 *PVT1* 与肿瘤标志物和临床分期分级的关系。**方法:** 采集 2015 年 1 月至 12 月石河子大学医学院一附院收住院的 51 例胃癌、63 例慢性萎缩性胃炎患者与 54 名正常人外周静脉血,提取血液总 RNA。实时定量 PCR (qRT-PCR) 技术检测血液中 *PVT1* mRNA 表达水平;电化学发光法检测胃癌患者血清中 AFP、CEA、CA19-9 的含量。**结果:** *PVT1* mRNA 在胃癌、慢性萎缩性胃炎患者血液中的表达量较高,胃癌组与正常组相比 *PVT1* mRNA 表达量差异有统计学意义 ($t=0.000, P<0.01$),慢性萎缩性胃炎组与正常组相比 *PVT1* mRNA 表达量差异也有统计学意义 ($t=0.000, P<0.01$),但是胃癌患者与慢性萎缩性胃炎患者比较其差异无统计学意义 ($t=0.459, P>0.05$)。*PVT1* mRNA 表达与淋巴结转移有明显相关 ($r=0.024, P<0.05$)。此外,*PVT1* mRNA 的表达与血清肿瘤标志物 CA19-9 具有相关性 ($r=0.429, P<0.01$)。**结论:** *PVT1* mRNA 在胃癌、慢性萎缩性胃炎患者血液中表达高于正常人,且与 CA19-9 具有相关性,提示 *PVT1* mRNA 可能成为胃癌早期诊断及预后的分子标志物之一。

[关键词] 胃癌;人浆细胞瘤转化迁移基因 1 (*PVT1*);早期诊断;肿瘤标志物

[中图分类号] R739.5; R730.51; R967

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)05-0688-04

Expression and clinical significance of *PVT1* gene in blood of the patients with gastric cancer

REN Xianxian¹, XIAO Yongbiao², ZHANG Lei³, XI Yu³, XU Jie⁴, PAN Zemin¹, LI Hongtao¹, LI Dongmei¹(1. Department of Biochemistry, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832002, Xinjiang, China; 2. Department of Digestive Tumor Surgery, The 1st People Hospital of Kashgar District, Kashgar 844000, Xinjiang, China; 3. Department of Clinical Laboratory, The 1st Hospital Affiliated to School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832008, Xinjiang, China; 4. Department of Cardiology, The 5th Hospital Affiliated to the Xinjiang Medical University, Urumqi 830001, Xinjiang, China)

[Abstract] **Objective:** To examine expression level of human plasmacytoma variant translocation 1 (*PVT1*) gene and content of clinical commonly used tumor markers in blood of the patients with gastric cancer and to explore the relationship between *PVT1* as well as tumor markers and clinical stages. **Methods:** Peripheral venous bloods of 51 cases with gastric cancer and 63 cases with chronic atrophic gastritis who hospitalized in the First Hospital Affiliated to School of Medicine, Shihezi University during January to December, 2015 as well as 54 normal persons were collected, from which total blood RNA was extracted. Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect expression levels of *PVT1* mRNA in the bloods; contents of AFP, CEA and CA19-9 in the bloods of the patients with gastric cancer were examined by electrochemical luminescence assay. **Results:** Expression amounts of *PVT1* mRNA in bloods of the patients with gastric cancer

[基金项目] 新疆生产建设兵团应用基础研究资助项目(No. 2015AG015);石河子大学高层次人才研究项目(No. RCZX201332)。Project supported by the Basic Research for Application of Xinjiang Province(No. 2015AG015), and the Research Project of High Level Talents of Shihezi University (No. RCZX201332)

[作者简介] 任显显(1992-),女,山东济宁人,硕士生,主要从事人体重要功能蛋白的克隆与基因工程研究,E-mail: rxx0214@163.com.

[通信作者] 李冬妹(LI Dongmei, correspondence author),E-mail: lidong_abc@126.com

and chronic atrophic gastritis were higher, there was statistical difference of *PVTI* mRNA expression amounts between gastric cancer group and normal group ($t=0.000, P<0.01$), there also was statistical difference of *PVTI* mRNA expression amounts between chronic atrophic gastritis group and normal group ($t=0.000, P<0.01$), but there was no statistic difference of *PVTI* mRNA expression amounts between gastric cancer group and chronic atrophic gastritis group ($t=0.459, P>0.05$). In addition, expression of *PVTI* mRNA and serum tumor marker CA19-9 had correlation ($r=0.429, P<0.01$). **Conclusion:** Expression of *PVTI* mRNA in blood of the patients with gastric cancer and chronic atrophic gastritis could be higher than that in blood of normal persons, and which might be correlated with CA19-9, indicating that *PVTI* mRNA might be as one of molecular markers for early diagnosis and prognosis.

[**Key words**] gastric cancer; plasmacytoma variant translocation 1(*PVTI*); early diagnosis; tumor marker

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(5): 688-691. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.05.018]

胃癌是全球第二大致死性肿瘤。我国胃癌死亡率占世界胃癌死亡率的 44%, 在老年男性癌症排名中居于第二位, 女性居于第四位^[1-2]。胃癌患者的预后与肿瘤的分期显著相关, I 期患者的 5 年生存率达 90%, IV 期患者 5 年生存率不足 5%, 治疗效果差^[3]。因此, 早期诊断分子标志物的确定对于胃癌防治和患者预后极关键, 是有效提高患者生存率的瓶颈问题^[4]。人浆细胞瘤转化迁移基因 1(plasmacytoma variant translocation 1, *PVTI*) 是近几年发现的 lnc RNA, 定位于 8q24, 已证实 *PVTI* 在胃癌组织中高表达^[5-7]。但 *PVTI* 在胃癌患者血液中的表达情况尚不清楚。本研究采集胃癌、慢性萎缩性胃炎患者和正常人的血液标本, 通过实时定量 PCR(qRT-PCR) 技术检测血液中 *PVTI* 表达水平, 同时通过电化学发光法检测胃癌患者血液中肿瘤标志物的含量, 旨在探讨 *PVTI* 作为胃癌血液中早期诊断标志物的可能性及其与其他肿瘤标志物的相关性。

1 资料与方法

1.1 临床资料

采集于石河子大学医学院第一附院 2015 年 1 月至 12 月住院胃癌患者 51 例(男性 36 例, 女性 15 例)、慢性萎缩性胃炎患者 63 例、正常人 54 名的外周静脉血。其中, 胃癌患者患病中位年龄 59.86 岁, 以中老年人群为主。每例采血 1.5 ml, 采血后随即进行 RNA 提取。样本的采集已取得患者本人或其家属的知情同意, 并签署知情同意书; 研究方案经医院伦理委员会批准。

1.2 主要试剂

血液总 RNA 提取试剂盒购自天根宝信公司, 双链 cDNA 合成试剂盒购自 Life Technologies 公司, SYBR Green qRT-PCR 试剂盒购自凯杰公司。引物由上海生工生物公司合成。AFP、CEA、CA19-9 等肿

瘤标志物定量测定试剂盒均购自 Roche Diagnostics GmbH 公司。

1.3 患者外周血总 RNA 的提取及逆转录

每位患者取 1.5 ml 血液, 加入血液量 5 倍的红细胞裂解液, 13 800 × g 离心 10 min, 弃上清, 再加入 2 倍红细胞裂解液, 离心 10 min, 弃上清, 加入 1 ml TRIzol 与白细胞沉淀充分混匀, 按照试剂盒说明提取总 RNA。测量样本 RNA 在分光光度计 260 nm 和 280 nm 处的光密度(*D*) 值, 以评估所提取 RNA 纯度和浓度。使用 Life Technologies 逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录成 20 μl 体系, 并将 RNA 总浓度定为 1 μg, 剩余 RNA 冻存于 -80 °C。

1.4 实时定量荧光 PCR 检测血液 *PVTI* mRNA 水平

PVTI 表达量使用 SYBR Green qRT-PCR 试剂盒检测。引物 *PVTI*, F: 5'-CATCCGGCGCTCAGCT-3', R: 5'-TCATGATGGCTGTATGTGCCA-3'; β-actin, F: 5'-CCCAGCACAATGAAGATCAAGATCAT-3', R: 5'-ATCTGCTGGAAGGTGGACAGCGA-3'。反应条件为 95 °C 预变性 5 min、95 °C 变性 10 s、55 °C 退火/延伸 30 s, 共 40 个循环, 结果用 β-actin 的表达量标准化, 通过 $2^{-\Delta CT}$ 计算血中 *PVTI* mRNA 的表达量。

1.5 电化学发光法检测血液 AFP、CEA 和 CA19-9 的含量

清晨空腹抽取胃癌患者外周静脉血 4 ml, 900 × g 离心 10 min, 按照 AFP、CEA、CA19-9 测定试剂盒说明书方法分离血清, 以罗氏公司生产的 E170 全自动电化学发光仪检测上述 3 种标志物含量。结果判定: AFP > 5.6 U/ml、CEA > 3.4 ng/ml、CA19-9 > 27 U/ml 为阳性。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 Spearman 相关性分析、秩和检验及四格表 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 成功提取胃癌患者外周静脉血总 RNA

经电泳分析6位胃癌患者血液RNA提取结果显示,血液总RNA中28s、18s、5s三条带清晰可见, $D_{260/280}$ 均大于2.0,可以进行下一步实验。

2.2 PVTI mRNA 在胃癌和慢性萎缩性胃炎患者外周血中高表达

qRT-PCR技术检测结果显示,胃癌患者和慢性萎缩性胃炎血液中PVTI mRNA(0.0070 ± 0.0340)、(0.0144 ± 0.1141) vs (0.0002 ± 0.0005)表达明显高于正常人血样($t=0.000$, 均 $P < 0.01$),但是胃癌组与慢性萎缩性胃炎组血液PVTI mRNA(0.0097 ± 0.0404) vs (0.0005 ± 0.0014)表达量之间差异无统计学意义($t=0.459$, $P > 0.05$)。男性PVTI mRNA表达量高于女性,但是差异无统计学意义($t=0.374$, $P > 0.05$)。

2.3 PVTI mRNA 表达和胃癌患者性别、淋巴结转移相关

收集具有详细临床信息的28名胃癌患者,将胃癌患者与正常患者做ROC曲线分析,根据Cut Off值将PVTI mRNA划分为高表达组和低表达组。PVTI mRNA表达与胃癌患者年龄、原发肿瘤(T)、远处转移(M)、临床分期、分化无相关性($P > 0.05$),与胃癌患者性别、淋巴结转移具有相关性($P < 0.05$)。见表1。

2.4 PVTI mRNA 与胃癌血液中CA19-9相关

根据试剂说明书要求以及全自动电化学发光仪检测结果判定,将51位胃癌患者肿瘤标志物划分为阳性和阴性,分别用Spearman和四格表 χ^2 检验分析PVTI mRNA与胃癌肿瘤标志物之间的相关性。Spearman方法分析发现,PVTI mRNA与CA19-9呈正相关($r=0.429$, $P < 0.001$),但与AFP、CEA等肿瘤标志物无相关性($P > 0.05$); χ^2 检验PVTI mRNA同样只与CA19-9呈正相关($P < 0.05$)。见表2。

3 讨论

早期诊断对胃癌患者的治疗和预后尤其重要,寻找有效的分子标志物是实现胃癌早期诊断的关键。有研究者^[8-9]发现,PVTI mRNA在胃癌组织中表达上调。有学者^[5]在31例胃癌及癌旁正常组织中检测了PVTI mRNA的表达,发现PVTI mRNA在胃癌组织中的表达水平明显高于正常组织。研究^[10]发现,PVTI mRNA是胃癌诊断和治疗靶点的

表1 PVTI mRNA 表达与胃癌患者临床病理特征的关系(n)

Tab. 1 Relationship between the expression of PVTI mRNA and clinicopathological features of patients with gastric cancer(n)

Clinical feature	High PVTI mRNA	Low PVTI mRNA	P
Age (t/a)	56.23 ± 10.74	58.40 ± 11.98	0.645
Sex			
Male	12	8	0.038
Female	1	7	
T			
T1-2	3	4	1.000
T3-4	10	11	
N			
N0	2	9	0.024
N1-N3	11	6	
M			
M0	12	15	0.464
M1	1	0	
Pathologic stage			
I-II	3	6	0.435
III-IV	10	9	
Histopathological grade			
Poorly	5	6	1.000
Well + Moderately	8	9	

T:Primary tumor site; N:The involvement of regional lymph node; M:The presence of distant metastasis

表2 PVTI mRNA 表达与肿瘤标志物的关系(n)

Tab. 2 Correlation between PVTI mRNA expression and tumor markers (n)

Tomor marker	High PVTI mRNA	Low PVTI mRNA	P
AFP			
Positive	2	0	0.120
Negative	16	33	
CEA			
Positive	5	5	0.296
Negative	13	28	
CA19-9			
Positive	4	1	0.047
Negative	14	32	

候选标志物之一,其可能通过表观遗传学调节p15与p16的表达。除了肿瘤组织,体液标本如外周血、

尿液等也可以检测到标志物的水平异常。血清中出现标志物要远早于临床症状,因此早期诊断标志物的临床应用有非常重要的作用,且具有更易于测定、操作便捷、经济、可重复和可监控等优点。然而目前关于 *PVTI* mRNA 在血液中的表达情况,尤其是胃癌发生发展过程中,从正常人慢性萎缩性炎症再到胃癌患者,*PVTI* mRNA 在血液中的表达是如何变化的,是否能够对诊断有提示作用,目前尚未见报道。

本研究发现,*PVTI* mRNA 在胃癌和慢性萎缩性胃炎患者的血液中的表达量明显高于正常人,说明在胃癌发生过程中血液中 *PVTI* mRNA 的监测有诊断价值,可作为胃癌早期诊断的候选肿瘤标志物之一;也表明在胃癌发展阶段,慢性萎缩性胃炎是一个不可忽视的过程。*PVTI* mRNA 表达与临床病理特征分析的结果显示,*PVTI* mRNA 异常表达可作为胃癌患者伴淋巴结转移的特异性标志物。在临床检查中,若出现胃癌患者 *PVTI* mRNA 异常表达应警惕其有淋巴结转移的可能性。

多项肿瘤标志物的联合应用可能对患者的诊断和预后有更好的提示作用。研究^[11]发现,血清 CEA 水平在腺癌患者中明显升高,CEA 水平异常患者其无疾病进展时间明显少于 CEA 正常患者。也有研究^[12]表明,在胃癌发展晚期 CEA、CA19-9 水平升高,且对胃癌的转移和预后判断有一定的价值。胃癌中 CA19-9、CEA、AFP、CA72-4 的联合检测较单独检测有更高的敏感性^[13]。*PVTI* 作为非编码 RNA 是否能与蛋白质肿瘤标志物联合进行检测,提高肿瘤诊断和预后判断的效率值得研究。在一些相关研究中,也报道了 *PVTI* 与血清肿瘤标志物的相关性。Ding 等^[6]发现,*PVTI* 在肝癌组织中高表达与血清 AFP 高表达量相关,二者均高表达患者其复发率高。本研究表明,在胃癌患者血液中 *PVTI* 表达与 CA19-9 正相关,提示 *PVTI* 和 CA19-9 可能可以联合作为胃癌早期诊断的分子标志物。因此,在临床就诊时,如果出现血液中 CA19-9 和 *PVTI* 均高表达,应警惕胃癌的发生。但是,对于胃癌患者是否可以通过 *PVTI* 和 CA19-9 血液含量的增加来判定胃癌分期还需进一步探讨。总之,本研究结果为胃癌的早期诊断提供新的思路,进而为胃癌的预防、诊断、预后提供更好的方案。

[参考文献]

[1] LI S, ZHANG X, YAN Y, et al. High cancer burden in elderly

Chinese, 2005-2011 [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2015,12(10):12196-12211. DOI:10.3390/ijerph121012196.

- [2] FIORICA F, STEFANELLI A, PASCALE G, et al. Elderly gastrointestinal cancer patients and radiochemotherapy: a review [J]. *Clin Ter*,2014,165(1):57-61. DOI:10.7471/CT.2014.1662.
- [3] ELLISON L F, BRYANT H, LOCKWOOD G, et al. Conditional survival analyses across cancer sites [J]. *Health Rep*,2011,22(2):21-25.
- [4] FERRARI F, REIS M A. Study of risk factors for gastric cancer by populational databases analysis [J]. *World J Gastroenterol*,2013,19(48):9383-9391. DOI: 10.3748/wjg.v19.i48.9383.
- [5] DING J, LI D, GONG M, et al. Expression and clinical significance of the long non-coding RNA *PVTI* in human gastric cancer [J/OL]. *Oncol Targets Ther*, 2014, 7: 1625-1630[2016-07-13]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4172193/>. DOI: 10.2147/OTT.S68854. eCollection 2014.
- [6] DING C, YANG Z, LV Z, et al. Long non-coding RNA *PVTI* is associated with tumor progression and predicts recurrence in hepatocellular carcinoma patients [J]. *Oncol Lett*, 2015,9(2):955-963. DOI:10.3892/ol.2014.2730.
- [7] GUTSCHNER T, DIEDERICH S. The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view [J]. *RNA Biol*,2012,9(6):703-719. DOI: 10.4161/rna.20481.
- [8] KAPRANOV P, CHENG J, DIKE S, et al. RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription [J]. *Science*, 2007, 316(5830): 1484-1488. DOI: 10.1126/science.1138341.
- [9] CAO W J, WU H L, HE B S, et al. Analysis of long non-coding RNA expression profiles in gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol*,2013,19(23):3658-3664. DOI: 10.3748/wjg.v19.i23.3658.
- [10] KONG R, ZHANG E B, YIN D D, et al. Long noncoding RNA *PVTI* indicates a poor prognosis of gastric cancer and promotes cell proliferation through epigenetically regulating p15 and p16 [J/OL]. *Mol Cancer*,2015,14:82[2016-07-13]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4399399/>. DOI:10.1186/s12943-015-0355-8.
- [11] 杜军华,乔洪源,尹宜发.血清 CEA、CA125 及 Cyfra21-1 水平对晚期非小细胞肺癌患者预后的影响 [J]. *肿瘤防治研究*, 2016, 43(2): 137-140. DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2016.02.009.
- [12] 张永乐,薛英威,蓝秀文,等.肿瘤标记物 CA19-9、CEA 对胃癌转移和预后预测价值的分析 [J]. *哈尔滨医科大学学报*,2010,44(2):181-188. DOI:1000-1905(2010)02-0181-04.
- [13] XIE Y, ZHI X, SU H, et al. A novel electrochemical microfluidic chip combined with multiple biomarkers for early diagnosis of gastric cancer [J]. *Nanoscale Res Lett*, 2015,10(1): 477. DOI: 10.1186/s11671-015-1153-3.

[收稿日期] 2016-04-11

[修回日期] 2016-08-20

[本文编辑] 党瑞山