

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.03.013

## 长链非编码 RNA AFAP1-AS1 在胃癌组织中的表达及其临床意义

熊钢<sup>1,2</sup>, 龚江波<sup>2</sup>, 周靖<sup>3</sup>, 刘焰<sup>1</sup> (1. 武汉大学基础医学院, 湖北武汉 430071; 2. 宜昌市第二人民医院 放化疗二科, 湖北宜昌 443000; 3. 三峡大学仁和医院 妇产科, 湖北宜昌 443000)

**[摘要]** **目的:** 探讨长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 肌动蛋白纤维相关蛋白-1 反义 RNA1 (actin filament-associated protein 1-antisense RNA1, AFAP1-AS1 RNA1) 在胃癌组织中的表达情况及其临床意义。**方法:** 采用 Real-time PCR 方法检测 2010 年 1 月至 2014 年 12 月宜昌市第二人民医院及三峡大学仁和医院手术切除的 274 例胃癌组织及相应癌旁正常胃组织中 AFAP1-AS1 的表达, 并分析 AFAP1-AS1 表达量与临床及病理特征的关系。**结果:** AFAP1-AS1 在胃癌组织比癌旁正常组织显著高表达 ( $P < 0.01$ )。AFAP1-AS1 在早期胃癌组织中平均表达量明显低于进展期胃癌 ( $P < 0.01$ )。在不同病理类型胃癌中, AFAP1-AS1 的表达量没有差异 ( $P > 0.05$ )。AFAP1-AS1 表达量和胃癌淋巴侵袭或远处转移密切相关, 在伴有淋巴结侵袭或远处转移的胃癌组织中, AFAP1-AS1 明显高表达 ( $P < 0.01$ )。**结论:** AFAP1-AS1 可能是胃癌发生发展的一个重要因素; 有望成为新的胃癌预后标志物, 用于胃癌的临床诊断和预后判断。

**[关键词]** 长链非编码 RNA; 肌动蛋白纤维相关蛋白-1 反义 RNA1; 胃癌

**[中图分类号]** R735.2; R730.2; R392.13 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)03-0290-05

## Expression of AFAP1-AS1 which belongs to lncRNA in gastric carcinoma tissues and its clinical significance

XIONG Gang<sup>1,2</sup>, GONG Jiangbo<sup>2</sup>, ZHOU Jing<sup>3</sup>, LIU Yan<sup>1</sup> (1. School of Basic Medical Science, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei China; 2. the 2<sup>nd</sup> Department of Radiochemotherapy, the 2<sup>nd</sup> People Hospital of Yichang City, Yichang 443000, Hubei China; 3. the Department of Obstetrics and Gynecology, Renhe Hospital, Sanxia University, Yichang 443000, Hubei China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore expression of actin filament-associated protein 1-antisense RNA1 (AFAP1-AS1), long non-coding RNA (lncRNA), in the gastric carcinoma tissues and its clinical significance. **Methods:** Using real-time PCR assay, expressions of AFAP1-AS1 in 274 cases of gastric carcinoma tissues and their corresponding adjacent normal gastric tissues which collected from the patients with gastric carcinoma who were hospitalized in the 2<sup>nd</sup> People Hospital of Yichang City and Renhe Hospital of Sanxia University for operative treatment during January 2010 to December 2014 were detected. And relationship between the expression of AFAP1-AS1 and clinicopathological features of the patients with gastric carcinoma was analyzed. **Results:** Expression of AFAP1-AS1 in the gastric carcinoma tissue was obviously higher than that in the adjacent normal gastric tissues. Mean expression amount of AFAP1-AS1 in the early gastric carcinoma tissue was significantly lower than that in the advanced gastric carcinoma tissue ( $P < 0.01$ ). Among the gastric carcinoma tissues of various pathological types, expression amounts of AFAP1-AS1 were not significantly different ( $P > 0.05$ ). Expression amounts of AFAP1-AS1 were closely correlated with lymphatic invasion and distant metastasis of the gastric carcinoma. Expression amounts of AFAP1-AS1 in the gastric carcinoma tissue with local invasion and distant metastasis were obviously higher than those in the gastric carcinoma tissues without local invasion and distant metastasis ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** AFAP1-AS1 could be an important regulatory factor in the gastric carcinogenesis and development. It could be expected to become a novel marker for judging prognosis of the gastric carcinoma and used for clinical diagnosis and prognosis evaluation of the gastric carcinoma.

**[作者简介]** 熊钢(1974-),男,硕士,副主任医师,主要从事恶性肿瘤的放化疗研究, E-mail: 153440770@qq.com

**[通信作者]** 刘焰(LIU Yan, corresponding author),副教授,硕士生导师,主要从事肿瘤免疫及感染免疫的研究, E-mail: liuyan@whu.edu.cn

[ **Key words** ] long non-coding RNA ( lncRNA ); actin filament-associated protein 1-antisense RNA1 ( AFAP1-AS1 ); gastric cancer

[ Chin J Cancer Biother, 2017, 24( 3 ): 290-294. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.03.013 ]

胃癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一,在我国有很高的发病率和死亡率。2015 年癌症统计数据<sup>[1]</sup>表明,我国恶性肿瘤中胃癌发病率及死亡率都居于第 2 位,对人民的健康有着极大的威胁。但胃癌的发生发展机制还没有完全阐明<sup>[2]</sup>。长链非编码 RNA ( long non-coding RNA, lncRNA ) 是一类转录长度超过 200 nt 的非编码 RNA 分子,在真核细胞内普遍转录,但不具有或很少具有蛋白编码功能。近年来许多研究<sup>[3-5]</sup>表明, lncRNA 在多种生物学行为中发挥重要作用。肌动蛋白纤维相关蛋白-1 反义 RNA1 ( actin filament-associated protein 1-antisense RNA1, AFAP1-AS1 ) 是一个长 6 810 nt 的长链非编码 RNA,在食管癌、鼻咽癌、肺癌、胰腺癌等肿瘤的发生发展中发挥重要作用。但在胃癌中的作用研究较少,本研究通过检测 AFAP1-AS1 在胃癌组织及其相应癌旁正常胃组织中的表达情况,分析 AFAP1-AS1 表达量和临床及病理特征的关系,为进一步研究 AFAP1-AS1 与胃癌的关系积累资料。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

收集 2010 年 1 月至 2014 年 12 月宜昌市第二人民医院及三峡大学仁和医院手术切除的胃癌标本 274 例及相应距离肿瘤边缘 5 cm 以上的癌旁正常胃组织,所有胃癌标本都经病理学确诊。其中早期胃癌 118 例,进展期胃癌 156 例。组织学分型为乳头状腺癌 87 例、管状腺癌 69 例、低分化腺癌 34 例、未分化癌 14 例、黏液腺癌 37 例和印戒细胞癌 33 例。274 例胃癌患者中,114 例伴有淋巴结和/或远处转移。所有患者术前均未做化学、免疫或放射等抗肿瘤治疗。同时收集各标本的临床病理资料。患者均已签署知情同意书,并经医院伦理委员会审查批准。

### 1.2 主要试剂

Reverse Transcription System 试剂盒、SYBR Green Realtime PCR Master Mix 购自 TOYOBO 公司; AFAP1-AS1 引物 Invitrogen 公司合成。DEPC 购自美国 Sigma 公司。

### 1.3 组织标本和病理切片

274 例胃癌组织标本经 4% 多聚甲醛溶液固定,常规脱水、透明和石蜡包埋,4  $\mu$ m 连续切片。

### 1.4 Real-time PCR 检测胃癌组织中 AFAP1-AS1 表达

用 TRIzol 试剂常规提取胃癌组织细胞总 RNA。以管家基因 *GAPDH* 为内对照。按照逆转录试剂盒说明书逆转录为 cDNA。反应总体积 20  $\mu$ l,通过相对荧光定量 PCR 方法,用 BIO-RAD 定量 PCR 仪检测 AFAP1-AS1 和 *GAPDH*,计算出不同样本的目的基因相对表达量。反应条件为 95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 15 s, 72  $^{\circ}$ C 15 s, 40 个循环。获得 CT 值,基因表达量采用 qRT-PCR 相对定量方法对  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  进行统计学计算。用  $Folds = 2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示实验组与对照组目的基因表达的倍数比关系,重复 3 次实验,计算平均值。运用 Primer 5.0 设计引物,AFAP1-AS1 的上游引物为 5'-CCGTCCATGCGGAAGATC-3',下游引物为 5'-ATGGCCAGCGGAAGAC-3'。*GAPDH* 的上游引物为 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3',下游引物为 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'。

### 1.5 统计学处理

用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间比较采用 *t* 检验,相关性分析采用 Pearson 检验。以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

Real-time PCR 显示 AFAP1-AS1 在 274 例胃癌和相应的癌旁正常胃组织中均有表达。根据 Real-time PCR 结果(图 1),AFAP1-AS1 在胃癌组织中的平均表达量(  $1.895 \pm 0.325$  )显著高于癌旁正常胃组织(  $1.409 \pm 0.589$  ) (  $P < 0.01$  )。进一步以相对表达量 1.90 为界,将 274 例胃癌分为 AFAP1-AS1 高表达组和低表达组,分析 AFAP1-AS1 表达量与患者病理特征的关系(表 1),发现 AFAP1-AS1 表达量与患者的年龄、性别、肿瘤的病理类型无显著相关(  $P > 0.05$  ),与肿瘤大小、分期、有无转移显著相关(  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  )。AFAP1-AS1 在早期胃癌组织中的平均表达量(  $1.905 \pm 0.429$  )明显低于进展期胃癌的表达量(  $1.613 \pm 0.513$  ) (  $P < 0.01$  ) (图 2)。在不同病理类型的胃癌中,AFAP1-AS1 的表达量没有显著差异(  $\chi^2 = 1.467, P > 0.05$  )。AFAP1-AS1 的表达量与肿瘤是否发生淋巴转移或者远处转移有密切相关(  $r^2 = 0.351, P < 0.05$  )。AFAP1-AS1

的表达量与胃癌组织是否发生淋巴侵犯或者远处转移密切相关,在伴有淋巴结侵犯或者远处转移的胃癌组织中,AFAP1-AS1 明显高表达(  $1.975 \pm 0.558$  ) 显著的高于不伴有局部侵袭和远处转移的胃癌组织(  $1.785 \pm 0.632$  ) (  $P < 0.05$  ) ( 图 3 )。

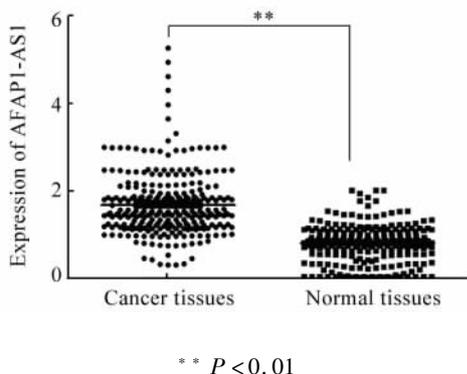


图 1 AFAP1-AS1 在胃癌组织中高表达  
Fig.1 High expression of AFAP1-AS1 in the gastric cancer tissue

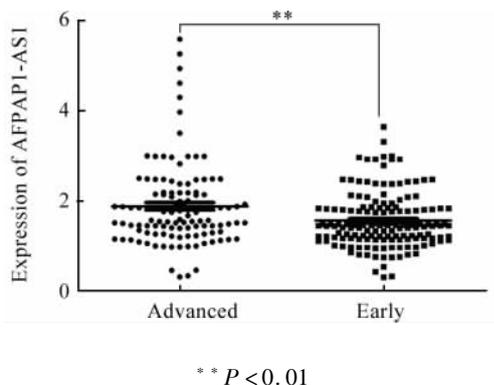


图 2 AFAP1-AS1 在进展期胃癌和早期胃癌组织中的表达  
Fig.2 Expressions of AFAP1-AS1 in the advanced and early gastric cancer tissues

### 3 讨论

LncRNA 是一类转录长度超过 200 nt 的非编码 RNA 分子,在真核细胞内被普遍转录,但不具有或很少具有蛋白编码功能,而是以 RNA 形式在多个层面(转录前、转录中以及转录后)调控基因的表达水平。根据其在基因中的位置可分为正义 lncRNA、反义 lncRNA、双向 lncRNA、基因内 lncRNA 及基因间 lncRNA 5 种类型<sup>[8]</sup>。最初认为 lncRNA 是 RNA 聚合酶 II 转录的副产物,不具有生物学功能。近年来的研究表明,lncRNA 参与 X 染色体沉默、基因组印记以及染色质修饰、转录激活、转录干扰和核内运输

等多个重要调控过程,与许多肿瘤及非肿瘤疾病关系密切。lncRNA UCA1 可促进膀胱癌细胞的侵袭和转移<sup>[6]</sup>;lncRNA PRNCR1 在结直肠癌中高表达且能促进结直肠癌细胞的增殖<sup>[7]</sup>。LncRNA 在胃癌中的报道较少,有研究<sup>[9]</sup>认为 lncRNAs 在胃癌发生和发展中有潜在作用,H19 过表达可能参与胃癌发病,uc001lsz 在胃癌组织和细胞系下调,与肿瘤早期调节异常和癌前期病变相关。目前的研究<sup>[10-12]</sup>表明其表达异常与胃癌的发生、发展、侵袭、转移及预后等有关,可能作为诊断的肿瘤标志物和治疗靶点。

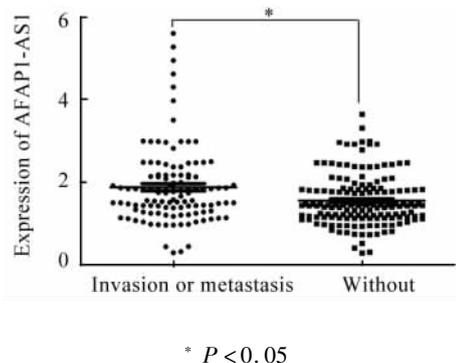


图 3 AFAP1-AS1 在有和无侵袭和/或远处转移的胃癌组织中的表达  
Fig.3 Expressions of AFAP1-AS1 in the gastric cancer tissues with local invasion and/or metastasis, and without local invasion and/or metastasis

近年来,反义 lncRNA 在肿瘤中的重要作用得到了人们更多的关注<sup>[13-14]</sup>。AFAP1-AS1 是一个首先在 Barrett 食管和食管腺癌中发现的 lncRNA。Wu 等<sup>[15]</sup>对食道腺癌组织全基因组甲基化谱研究,发现食道癌中 lncRNA AFAP1-AS1 基因位点由于低甲基化而呈现高表达。鼻咽癌是中国南方常见的高发恶性肿瘤,Bo 等<sup>[16]</sup>利用基因芯片技术构建了鼻咽癌组织的 lncRNA 表达谱,从中筛选并验证 AFAP1-AS1 在鼻咽癌组织呈高表达,随后在大量鼻咽癌石蜡存档样本中通过原位杂交实验进一步证实了 AFAP1-AS1 的高表达与鼻咽癌患者的临床分期、淋巴结转移、远处转移及不良预后密切相关,AFAP1-AS1 高表达患者总体生存时间和无病生存时间均短于 AFAP1-AS1 低表达患者。而在肺癌的相关研究<sup>[17-21]</sup>中 AFAP1-AS1 在全部肺癌样本中表达都显著高于对照样本,且 AFAP1-AS1 高表达患者生存时间明显短于 AFAP1-AS1 低表达患者<sup>[22]</sup>。Ye 等<sup>[23]</sup>同样利用 lncRNA 芯片技术,筛选了胰腺导管腺癌的差异表达 lncRNA,发现 AFAP1-AS1 在胰腺导管

腺癌中同样高表达, AFAP1-AS1 高表达与肿瘤的侵袭、转移及患者不良预后密切相关。赵艳华等<sup>[24]</sup>研究显示 AFAP1-AS1 的表达与肝癌的临床分期和淋巴结转移有密切关系,发现 AFAP1-AS1 作为肝癌转

移分子标志物具有较高的灵敏度,提示 AFAP1-AS1 可能成为新的肝癌分子标志物,用于肝癌的预后判断。

表 1 AFAP1-AS1 表达量与患者病理特征的相关性( *n* )  
Tab. 1 Correlation between expression of AFAP1-AS1 and pathological characteristics of the patients with gastric carcinoma ( *n* )

Clinical features	<i>N</i>	Expression of AFAP1-AS1		$\chi^2$	<i>P</i>
		High	Low		
Number of cases	274	73	201		
Age				0.000	0.991
> 55	165	44	121		
≤ 55	109	29	80		
Sex				0.140	0.708
Male	145	40	105		
Female	129	33	96		
Tumor sizes( <i>d</i> /cm )				4.860	0.027
> 2 cm	197	82	115		
≤ 2 cm	77	21	56		
Pathologic type				1.467	0.832
Papillary adenocarcinoma	87	23	64		
Tubular adenocarcinoma	69	18	51		
Poorly differentiated adenocarcinoma	34	9	25		
Mucinous adenocarcinoma	37	11	26		
Ring cell carcinoma	33	12	21		
Stage				11.442	0.001
Early	118	46	72		
Advanced	156	93	63		
Distant or lymph node metastasis				13.827	0.000
Positive	114	73	41		
Negative	160	66	94		

本研究采用 real-time PCR 检测胃癌和癌旁正常胃组织中 AFAP1-AS1 的表达,发现 AFAP1-AS1 在胃癌组织中相对高表达。AFAP1-AS1 在早期胃癌组织中的平均表达量明显低于进展期胃癌。AFAP1-AS1 的表达量与肿瘤大小及是否发生淋巴转移或者远处转移有密切关系,在伴有淋巴结侵犯或者远处转移的胃中,AFAP1-AS1 显著高表达。本研究结果提示 AFAP1-AS1 是胃癌发生及发展过程

中重要调控因子,有可能成为新的胃癌预后标志物,可用于胃癌的临床诊断及预后评估,为进一步探讨 AFAP1-AS1 在肿瘤中的功能及机制打下了一定基础。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China[ J ]. CA Cancer J Clin, 2016, 66( 2 ):115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.

- [ 2 ] HUNT R H, CAMILLERI M, CROWE S E, et al. The stomach in health and disease[ J ]. *Gut*, 2015, 64( 10 ): 1650-1668. DOI: 10.1136/gutjnl-2014-307595.
- [ 3 ] TAYLOR D H, CHU E T, SPEKTOR R, et al. Long non-coding RNA regulation of reproduction and development[ J ]. *Mol Reprod Dev*, 2015, 82( 12 ):932-956. DOI:10.1002/mrd.22581.
- [ 4 ] 左君波, 朱阿考, 夏加增. 长链非编码 RNA 与肿瘤的研究进展[ J ]. *中华医学杂志*, 2011, 91( 47 ): 3380-3382. DOI:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2011.47.019.
- [ 5 ] 赵海涛, 陈蓉蓉, 毛一雷, 等. 人类肝癌非编码 RNA 转录组研究进展[ J ]. *中华医学杂志*, 2010, 90( 2 ): 134-137. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2010.02.020.
- [ 6 ] XUE M, PANG H, LI X, et al. Long noncoding RNA UCA1 promotes bladder cancer cell migration and invasion via hsa-miR-145/ZEB1/2 /FSCN1 pathway[ J ]. *Cancer Sci*, 2016, 107( 1 ): 18-27. DOI: 10.1111/cas.12844.
- [ 7 ] YANG L, QIU M, WANG J, et al. Upregulation of long non-coding RNA PRNCR1 in colorectal cancer promotes cell proliferation and cell cycle progression[ J ]. *Oncol Rep*, 2016, 35( 1 ):318-324. DOI: 10.3892/or.2015.4364.
- [ 8 ] PONTING C P, OLIVER P L, REIK W. Evolution and functions of long noncoding RNAs[ J ]. *Cell*, 2009, 136( 4 ): 629-641. DOI: 10.1016/j.cell.2009.02.006.
- [ 9 ] SONG H J, SUN W L, YE G L, et al. Long non-coding RNA expression profile in human gastric cancer and its clinical significances[ J ]. *J Transl Med*, 2013, 11( 3 ):225-235. DOI:10.1186/1479-5876-11-225.
- [ 10 ] YANG X, GAO L, GUO X, et al. A network based method for analysis of lncRNA-disease associations and prediction of lncRNAs implicated in diseases[ J/OL ]. *PLoS One*, 2014, 9( 1 ): e87797 [ 2016-12-01 ]. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087797>. DOI:10.1371/journal.pone.0087797.
- [ 11 ] MEI D, SONG H, WANG K, et al. Up-regulation of SUMO1 pseudogene 3 ( SUMO1P3 ) in gastric cancer and its clinical association[ J ]. *Med Oncol*, 2013, 30( 4 ): 709. DOI:10.1007/s12032-013-0709-2.
- [ 12 ] YANG F, XUE X, BI J, et al. Long noncoding RNA CCAT1, which could be activated by c-Myc, promotes the progression of gastric carcinoma[ J ]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2013, 139( 3 ): 437-445. DOI:10.1007/s00432-012-1324-x.
- [ 13 ] KAWAJI H, NAKAMURA M, TAKAHASHI Y, et al. Hidden layers of human small rnas[ J ]. *BMC Genomics*, 2008, 9( 8 ): 157. DOI:10.1186/1471-2164-9-157.
- [ 14 ] KHORKOVA O, MYERS A J, HSIAO J, et al. Natural antisense transcripts[ J ]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23( R1 ):R54-R63. DOI: 10.1093/hmg/ddu207.
- [ 15 ] WU W, BHAGAT TD, YANG X, et al. Hypomethylation of non-coding DNA regions and overexpression of the long noncoding RNA, AFAP1-AS1, in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma[ J ]. *Gastroenterology*, 2013, 144( 5 ):956-966. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.01.019.
- [ 16 ] BO H, GONG Z J, ZHANG W L, et al. Upregulated long non-coding RNA AFAP1-AS1 expression is associated with progression and poor prognosis of nasopharyngeal carcinoma[ J ]. *Oncotarget*, 2015, 6( 24 ):20404-20418. DOI:10.18632/oncotarget.4057.
- [ 17 ] OKAYAMA H, KOHNO T, ISHII Y, et al. Identification of genes upregulated in ALK-positive and EGFR/KRAS/ALK-negative lung adenocarcinomas[ J ]. *Cancer Res*, 2012, 72( 1 ):100-111. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1403.
- [ 18 ] LU T P, TSAI M H, LEE J M, et al. Identification of a novel biomarker, SEMA5A, for non-small cell lung carcinoma in nonsmoking women[ J ]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010, 19( 10 ):2590-2597. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0332.
- [ 19 ] SANCHEZ-PALENCIA A, GOMEZ-MORALES M, GOMEZ-CAPILLA J A, et al. Gene expression profiling reveals novel biomarkers in nonsmall cell lung cancer[ J ]. *Int J Cancer*, 2011, 129( 2 ):355-364. DOI: 10.1002/ijc.25704.
- [ 20 ] BOTLING J, EDLUND K, LOHR M, et al. Biomarker discovery in non-small cell lung cancer: integrating gene expression profiling, meta-analysis, and tissue microarray validation[ J ]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19( 1 ):194-204. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1139.
- [ 21 ] ZENG Z, BO H, GONG Z, et al. AFAP1-AS1, a long noncoding RNA upregulated in lungcancer and promotes invasion and metastasis[ J ]. *Tumour Biol*, 2016, 37( 1 ):729-737. DOI: 10.1007/s13277-015-3860-x.
- [ 22 ] DENG J, LIANG Y, LIU C, et al. The up-regulation of long non-coding RNA AFAP1-AS1 is associated with the poor prognosis of NSCLC patients[ J ]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 75: 8-11. DOI: 10.1016/j.biopha.2015.07.003.
- [ 23 ] YE Y, CHEN J, ZHOU Y, et al. High expression of AFAP1-AS1 is associated with poor survival and short-term recurrence in pancreatic ductal adenocarcinoma[ J ]. *J Transl Med*, 2015, 13( 1 ): 1-11. DOI: 10.1186/s12967-015-0490-4.
- [ 24 ] 赵艳华, 冷书生, 范松青等. 长链非编码 RNA AFAP1-AS1 在消化系统肿瘤中的表达及意义[ J ]. *肿瘤*, 2014, 34( 1 ):39-46. DOI: 10.3781/j.issn.1000-7431.2014.01.007.

[ 收稿日期 ] 2016 - 11 - 29

[ 修回日期 ] 2017 - 01 - 29

[ 本文编辑 ] 宋关鸿

《中国肿瘤生物治疗杂志》欢迎投稿、欢迎订阅