

## • 临床研究 •

## 长链非编码 RNA AC004920.3 在胃腺癌癌栓和细胞中的作用

黄建刚<sup>1</sup> 沈菁<sup>2</sup> 陈雯<sup>2</sup> 林有东<sup>2</sup>

**【摘要】 目的** 探寻 AC004920.3 在胃腺癌患者血清中的表达和细胞中的作用。**方法** 收集胃腺癌患者血清标本和病历资料。PCR 扩增 AC004920.3 的表达。慢病毒过表达 AC004920.3 转染 AGS 细胞后进行凋亡、CCK 增殖和划痕实验。**结果** 胃腺癌脉管癌栓患者血清 AC004920.3 表达  $\Delta Ct$  值  $12.06 \pm 3.33$  明显高于无脉管癌栓  $\Delta Ct$  值的  $10.05 \pm 3.32$ , 差异有统计学意义 ( $P=0.003$ ), 与 D-二聚体呈正相关 ( $r=0.679$ ,  $P<0.001$ )。AC004920.3 过表达组 AGS 细胞早期凋亡率为  $(33.45 \pm 3.90)\%$ , 高于未转染组  $[(12.13 \pm 1.54)\%$ ,  $P<0.001$ ] 和空载体组  $[(13.18 \pm 1.55)\%$ ,  $P<0.001$ ]; CCK 增殖实验 AC004920.3 过表达组的 A 值为  $2.89 \pm 0.17$ , 低于未转染组的  $3.20 \pm 0.21$ , 差异有统计学意义 ( $P=0.003$ ); 也低于空载体组  $3.28 \pm 0.18$ , 差异有统计学意义 ( $P=0.001$ ); AC004920.3 过表达组的划痕面积 ( $3.54 \pm 0.12$ ) 灰度值, 明显大于未转染组和空载体组 ( $2.43 \pm 0.34$ ) 灰度值, 差异有统计学意义 ( $P=0.001$ ); 也大于空载体组 ( $2.60 \pm 0.39$ ) 灰度值, 差异有统计学意义 ( $P=0.004$ )。**结论** 胃腺癌脉管癌栓患者血清 AC004920.3 高表达, 且与 D-二聚体正相关。AC004920.3 促进 AGS 细胞凋亡以及抑制 AGS 细胞增殖和迁移。

**【关键词】** AC004920.3; 胃腺癌; 脉管癌栓; 细胞凋亡; 细胞增殖; 细胞迁移

**【中图分类号】** R319; R737.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2024)01-0005-04

## Effects of long non-coding RNA AC004920.3 on cancer embolus and cells of gastric adenocarcinoma

HUANG Jiangang<sup>1</sup>, SHEN Jing<sup>2</sup>, CHEN Wen<sup>2</sup>, LIN Youdong<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Fujian Provincial Center for Clinical Laboratory, Fuzhou, Fujian 350001, China; <sup>2</sup> Department of Clinical Laboratory Medicine, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou, Fujian 350001, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the expression of AC004920.3 in serum of gastric adenocarcinoma patients and its effect on cells. **Methods** Serum samples and medical records were collected. The expression of AC004920.3 was amplified by PCR. After transfecting AGS cells with lentivirus overexpression of AC004920.3, apoptosis, CCK proliferation and scratches were performed. **Results** Serum AC004920.3 expression  $12.06 \pm 3.33$  was significantly lower in patients with gastric adenocarcinoma with venous embolus than that without venous embolus ( $10.05 \pm 3.32$ ,  $P=0.003$ ), and was positively correlated with D-dimer ( $r=0.679$ ,  $P<0.001$ ). The early apoptosis rate of AGS cells in AC004920.3 overexpression group ( $33.45 \pm 3.90\%$ ) was higher than that in untransfected group  $[(12.13 \pm 1.54)\%$ ,  $P<0.001$ ] and transfection negative control group  $[(13.18 \pm 1.55)\%$ ,  $P<0.001$ ]. The proliferation of CCK showed that OD value of AC004920.3 overexpression group ( $2.89 \pm 0.17$ ) was lower than that of untransfected group and transfection negative control group ( $3.20 \pm 0.21$ ,  $P=0.003$ ;  $3.28 \pm 0.18$ ,  $P=0.001$ ). The scratch area of AC004920.3 overexpression group ( $3.54 \pm 0.12$ ) was significantly larger than that of untransfected group and transfection negative control group ( $2.43 \pm 0.34$ ,  $P=0.001$ ;  $2.60 \pm 0.39$ ,  $P=0.004$ ). **Conclusion** The serum AC004920.3 expression in patients with gastric adenocarcinoma with venous embolus was lower than that without venous embolus, and was positively correlated with D-dimer. AC004920.3 promoted the apoptosis of AGS cells and inhibited the proliferation and migration of AGS cells.

**【Key words】** AC004920.3; gastric adenocarcinoma; vascular cancer thrombus; cell apoptosis; cell proliferation; cell migration

我国 2022 年新发胃癌 50 多万例, 死亡约 40 万例<sup>[1]</sup>。我国胃癌大多为腺癌<sup>[2]</sup>。临床 CA199、

基金项目: 福建省卫健委医学创新课题 (2018007)

作者单位: 1 福建省临床检验中心, 福州 350001; 2 福建省立医院检验科, 福州 350001

通信作者: 林有东, Email: 2444734512@qq.com

DOI: 10.20148/j.fmj.2024.01.002

CA724 和癌胚抗原的敏感性和特异性均不理想<sup>[3]</sup>。脉管内癌栓促进肝癌<sup>[4]</sup>、肺癌<sup>[5]</sup>和胃腺癌<sup>[6]</sup>的进展、侵袭转移和复发,甚至出现急性癌症相关静脉血栓栓塞并发症(acute cancer-associated venous thromboembolism, Ca-VTE)<sup>[7]</sup>。胃腺癌晚期患者是并发深静脉血栓(deep vein thrombosis, DVT)的高危人群<sup>[8]</sup>。长链非编码核糖核酸(long non-coding ribonucleic acid, LncRNA)参与胃腺癌的进展<sup>[9]</sup>、转移<sup>[10]</sup>和耐药<sup>[11]</sup>等过程。在前期组织芯片和血清检测基础上,我们分析 AC004920.3 在胃腺癌患者血清中的表达与临床参数的关系,随后利用慢病毒过表达技术探讨 AC004920.3 对胃腺癌 AGS 细胞功能的影响。

## 1 资料与方法

### 1.1 血清标本和病例资料收集

收集 2019 年 9 月至 2021 年 8 月福建省立医院胃肠外科和消化内科住院初诊 105 例术前患者的血清标本和病例资料。入选患者无其他肿瘤、化疗、发热和严重感染。该研究经医院伦理委员会批准,所有患者均已签署知情同意书。

### 1.2 细胞株

AGS 细胞株系由福建省立医院检验科保存。

### 1.3 试剂和细胞培养耗材

试剂购自北京全式金公司。荧光定量 PCR 扩增仪型号为罗氏 4800。AC004920.3 慢病毒过表达载体和空病毒载体委托北京全式金公司进行病毒包装(病毒最终滴度为  $1 \times 10^9$  CFU)。

### 1.4 实验方法

**1.4.1 荧光定量 PCR** (1) 血清 RNA 提取和逆转录: TransZol Up 试剂手工提 RNA。按说明书逆转录。(2) 实时荧光定量 PCR: 目的基因和 16S RNA 参比基因的引物由上海生工合成。反应程序  $95^{\circ}\text{C}$  2 min, 扩增 40 个循环( $95^{\circ}\text{C}$  15 s、 $57^{\circ}\text{C}$  40 s)。

**1.4.2 细胞实验分组** AGS 细胞设未转染组、空载体组和过表达组,分别不加慢病毒、加空病毒载体和慢病毒 AC004920.3 过表达载体。

**1.4.3 慢病毒转染** 使用  $25\text{ cm}^2$  培养瓶,细胞密度达到大约 80% 时转染,转染前换新配胎牛血清培养液 5 mL。每瓶加 200  $\mu\text{L}$  慢病毒液,转染成功后传代进行后续实验。

**1.4.4 凋亡实验** 每瓶接种 1 mL 细胞悬液(约  $4.0 \times 10^5$  个细胞),加 4 mL F12 培养液,每组 3 瓶培养 72 h。鞘液洗涤后胰酶消化,2% 多聚甲醛固

定 30 min,离心后细胞用缓冲液悬浮,按试剂盒说明书加 FITC 和 PI 荧光染料 20 min 流式仪检测。

**1.4.5 CCK 细胞增殖实验** (1) 96 孔板每孔 10  $\mu\text{L}$  细胞悬液(约  $2 \times 10^3$  个细胞)加 140  $\mu\text{L}$  F12 培养液,每组 8 个复孔培养 24 h。(2) 每孔加 CCK 试剂 20  $\mu\text{L}$ ,于第 0、12 和 24 h 酶标仪测吸光度值。

**1.4.6 划痕实验** (1) 6 孔板每孔 300  $\mu\text{L}$  细胞悬液(约  $5 \times 10^4$  个细胞)加 2 mL F12 培养液,每组 6 个复孔培养 24 h。(2) 用 10  $\mu\text{L}$  无菌 Tip 头划线于 0、36 和 72 h 镜下观察和拍照,计算划痕面积。

### 1.5 统计学分析

两种状态下血清 AC004920.3 表达情况分析使用两样本  $t$  检验。细胞功能实验 3 组之间分析使用单项方差分析。基因表达用  $\Delta\text{Ct}$  值( $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{目的基因}} - \text{Ct}_{\text{管家基因}}$ )。用 GraphPad Prism 9.3.1 绘图,划痕面积计算用 Image J 软件扫描读取灰度值。采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,检验水准  $\alpha = 0.05$  (双侧)。

## 2 结果

### 2.1 胃腺癌患者血清 AC004920.3 表达

105 例血清 AC004920.3 在有脉管内癌栓患者中表达低于无脉管内癌栓患者。高 D-二聚体患者 AC004920.3 表达低于 D-二聚体正常患者,而且与 D-二聚体呈正相关( $r = 0.679$ ,  $P < 0.001$ )。见表 1。

表 1 胃腺癌患者血清 AC004920.3 表达情况 ( $\bar{x} \pm s$ )

病例参数	例数	$\Delta\text{Ct}$ 值	$t$ 值	$P$ 值
性别				
男	80	$11.45 \pm 3.47$	1.848	0.067
女	25	$10.00 \pm 3.23$		
年龄				
<60 岁	55	$10.36 \pm 3.64$	-0.761	0.448
$\geq 60$ 岁	50	$11.36 \pm 2.81$		
脉管内癌栓				
有	55	$12.06 \pm 3.33$	-3.086	0.003
无	50	$10.05 \pm 3.31$		
D-二聚体				
<0.5 $\mu\text{g/L}$	71	$9.87 \pm 3.11$	-6.130	<0.001
$\geq 0.5 \mu\text{g/L}$	34	$13.67 \pm 2.66$		

注:总例数为 105 例。

### 2.2 流式细胞仪检测 AGS 细胞凋亡实验

AC004920.3 过表达组早期凋亡率( $33.45 \pm 3.90$ )% 高于未转染( $12.13 \pm 1.54$ )% 和空载体组( $13.18 \pm 1.55$ )%,差异均有统计学意义( $P$  均 <

0.001)。

### 2.3 AGS 细胞 CCK 增殖实验

共培养第 24 h 后过表达组 A 值  $2.89 \pm 0.17$  低于未转染组的  $3.20 \pm 0.21$ , 差异有统计学意义 ( $P=0.003$ ); 也低于空载体组的  $3.28 \pm 0.18$ , 差异有统计学意义 ( $P=0.001$ )。

### 2.4 AGS 细胞划痕实验

AC004920.3 过表达组划痕面积 ( $3.54 \pm 0.12$ ) 灰度值大于未转染 ( $2.43 \pm 0.34$ ) 灰度值, 差异有统计学意义 ( $P=0.001$ ); 也大于空载体组 ( $2.60 \pm 0.39$ ) 灰度值, 差异有统计学意义 ( $P=0.004$ )。见图 1。

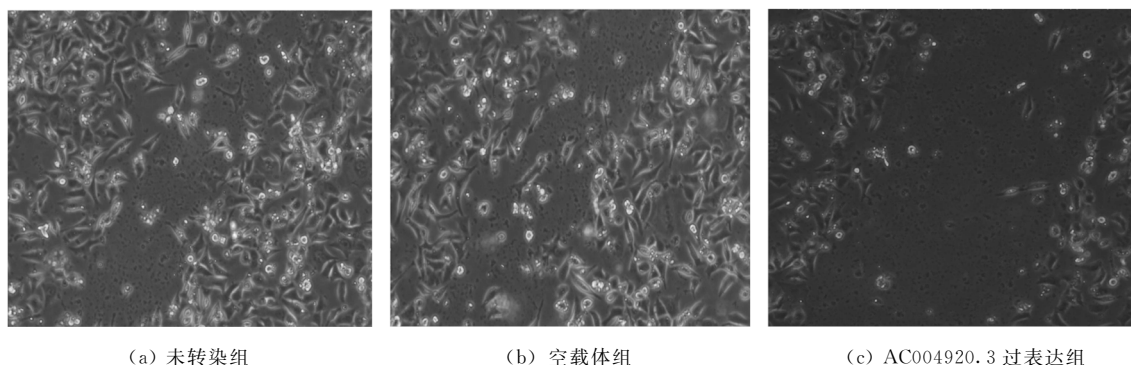


图 1 AGS 细胞各组划痕代表性图 ( $\times 400$ )

## 3 讨论

LncRNA 对肿瘤包括胃腺癌的功能和调控是目前研究的热点, 我们前期胃腺癌组织标本 LncRNA 和 mRNA 芯片检测以及 GEO 数据库均发现 AC004920.3 表达明显低于癌旁组织<sup>[12]</sup>, 我们亦验证了 AC004920.3 在血清中低表达以及对胃腺癌具有一定的诊断价值。临床上肿瘤患者需进行 VTE 评估, 为此也开发了各种量表<sup>[13]</sup>, 但是缺乏血液生物标志和相关的分子机制研究。本研究通过前瞻性设计发现胃腺癌有脉管内癌栓的患者血清 AC004920.3 基因表达高于无脉管内癌栓者, 且与 D-二聚体相关, 表明血清 AC004920.3 低表达可能与脉管内癌栓发生有关。找到能对 VTE 进行风险预测、早期诊断和治疗监测的血液生物标志具有非常重要的临床应用价值, 目前主要的检测方式为血液 D-二聚体检测, D-二聚体预测 VTE 风险特异性较高但敏感性低, 应用有一定的局限性, 如严重感染与发热、自身免疫性疾病活动期、妊娠期等都会导致不同程度的 D-二聚体增高<sup>[14]</sup>。另外, D-二聚体检验方法学基于抗原抗体特异性免疫反应和免疫比浊法, 各试剂厂家缺乏统一标准, 并且人体内高滴度的类风湿因子、生物素类药物治疗、CA125 增高以及标本重度脂血等均可引起 D-二聚体的假性升高, 而基因扩增可避免此类方法学的缺点。因此, 血清 AC004920.3 表达水平基因扩增检测对胃腺癌患者 VTE 的风险预测和治疗监测有潜在的应用价

值, 后续需增加样本量进行诊断价值研究和具体机制分析。

为了探讨 AC004920.3 对胃腺癌 AGS 细胞生物功能的影响, 我们利用慢病毒过表达技术进行了细胞功能实验。我们用体外实验发现 AC004920.3 过表达后可以促进 AGS 细胞的早期凋亡、抑制增殖和迁移, 表现为抑癌基因的作用。后续我们准备进行动物体内功能实验来验证 AC004920.3 对胃腺癌的作用。

AC004920.3 为长链非编码 RNA, 本身不翻译蛋白质, 主要参与下游基因的调控, 本课题组前期胃腺癌组织芯片生物信息学分析发现 AC004920.3 与 EphB6 基因共表达, 且功能富集于同一信号通路。据报道 EphB6 促进结直肠癌肿瘤生长<sup>[15]</sup>。生物信息学分析认为 EphB6 参与了肿瘤生长的 EGFR 信号调节<sup>[16]</sup>。有研究也发现 EphB6 基因能抑制胃腺癌的发生发展<sup>[17]</sup>。因此, AC004920.3 有可能通过调控下游 EphB6 基因来促进胃腺癌的发生发展, 我们后续将进行下一步的机制研究。

### 参考文献

- [1] XIA C, DONG X, LI H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants [J]. Chin Med J (Engl), 2022, 135 (5): 584-590.
- [2] 周家琛, 魏文强, 赫捷, 等. 2000—2015 年中国肿瘤登记地区胃癌发病趋势及年龄变化 [J]. 实用肿瘤学杂志, 2020, 34 (1): 1-5.

- [3] YUAN L, XU Z Y, RUAN S M, et al. Long non-coding RNAs towards precision medicine in gastric cancer: early diagnosis, treatment, and drug resistance [J]. Mol Cancer, 2020, 19 (1): 96.
- [4] KRAMER S J, AMANAVICIUS N, STAANUM P F, et al. Incidental finding of pulmonary embolism at workup before SIRT [J]. Clin Nucl Med, 2022, 47 (2): e201-e202.
- [5] LUO Z, MA G, LU Y, et al. Characteristics and 6-Month mortality of medical oncology patients with incidental and symptomatic pulmonary embolism: A single institutional retrospective longitudinal analysis [J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2023, 29; 10760296231155177.
- [6] MAHÉ I, CHAPELLE C, PLAISANCE L, et al. Management of cancer-associated thrombosis in France: A national survey among vascular disease and supportive care specialists [J]. Cancers (Basel), 2022, 14 (17): 4143.
- [7] HOUGHTON D E, VLAZNY D T, CASANEGRA A I, et al. Bleeding in patients with gastrointestinal cancer compared with nongastrointestinal cancer treated with apixaban, rivaroxaban, or enoxaparin for acute venous thromboembolism [J]. Mayo Clin Proc, 2021, 96 (11): 2793-2805.
- [8] WANG W D, WEI J P, GAO R Q, et al. A retrospective study of the role of preoperative ultrasonography in the detection of deep vein thrombosis in 1750 patients with gastric and colorectal cancers [J]. Thromb Res, 2022, 216: 52-58.
- [9] KIM E, KIM H, YEO M K, et al. Identification of a novel long non-coding RNA, lnc-ATMIN-4: 2, and its clinicopathological and prognostic significance in advanced gastric cancer [J]. Cancer Genomics Proteomics, 2022, 19 (6): 761-772.
- [10] ZHANG N, WANG B, MA C, et al. LINC00240 in the 6p22.1 risk locus promotes gastric cancer progression through USP10-mediated DDX21 stabilization [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2023, 42 (1): 89.
- [11] ASHRAFIZADEH M, MOHAN C D, RANGAPPA S, et al. Noncoding RNAs as regulators of STAT3 pathway in gastrointestinal cancers: Roles in cancer progression and therapeutic response [J]. Med Res Rev, 2023 43 (5): 1263-1321.
- [12] DANG Y, OUYANG X, ZHANG F, et al. Circular RNAs expression profiles in human gastric cancer [J]. Sci Rep, 2017, 7 (1): 9060.
- [13] 王昊, 袁建松. 消化道恶性肿瘤并发静脉血栓栓塞的分子机制与风险评估 [J]. 中国分子心脏病学杂志, 2021, 21 (6): 4380-4383.
- [14] 段炼, 何国琳. 妊娠期 D-二聚体升高带来的临床困惑 [J]. 四川大学学报 (医学版), 2022, 53 (3): 543-548.
- [15] YU H, QIN X K, YIN K W, et al. EphB6 deficiency in intestinal neurons promotes tumor growth in colorectal cancer by neurotransmitter GABA signaling [J]. Carcinogenesis, 2023, 44 (9): 682-694.
- [16] HANOVER G, VIZEACOMAR F S, BANERJEE S L, et al. Integration of cancer-related genetic landscape of Eph receptors and ephrins with proteomics identifies a crosstalk between EPHB6 and EGFR [J]. Cell Rep, 2023, 42 (7): 112670.
- [17] LIU J, XU B, XU G, et al. Reduced EphB6 protein in gastric carcinoma and associated lymph nodes suggests EphB6 as a gastric tumor and metastasis inhibitor [J]. Cancer Biomark, 2017, 19 (3): 241-248.

## • 临床研究 •

# 血清程序性死亡蛋白 1 和高迁移率族蛋白 1 水平与脓毒症并发肝损伤的相关性研究

林爱芳 甘巧蓉 吴旭玮

**【摘要】 目的** 探讨血清程序性死亡蛋白 1 (programmed cell death protein 1, PD1)、高迁移率族蛋白 1 (high mobility group protein 1, HMGB1) 水平与脓毒症并发肝损伤的相关性。**方法** 选取 58 例脓毒症并发肝损伤患者作为肝损伤组, 同期选择 58 例单纯脓毒症患者作为对照组。根据肝损伤程度将肝损伤组患者分为轻度损伤组 (n=18)、中度损伤组 (n=26)、重度损伤组 (n=14); 比较患者血清 PD1、HMGB1 表达水平; 采用 Spearman 秩相关分析患者血清 PD1、HMGB1 表达水平与肝损伤程度的相关性; 采用受试者工作特征曲线 (receiver operating characteristic, ROC) 评估血清 PD1、HMGB1 表达水平对脓毒症患者并发肝损伤的诊断价值。**结果** 肝损伤组患者的血清 PD1、HMGB1 表达水平均高于对照组 ( $P<0.05$ ); 轻度损伤组、中度损伤组、重度损伤组患者的血清 PD1、HMGB1 表达水平依次递增 ( $P<0.05$ ); Spearman 秩相关分析显示: 脓症患者血清 PD1、HMGB1 表达水平与肝损伤程度呈正相关 ( $P<0.05$ ); ROC 曲线结果显示, 血清 PD1、HMGB1 表达水平对脓毒症并发肝损伤的曲线下面积 (area under the curve, AUC) 值分别为 0.718 和

作者单位: 福建医科大学孟超肝胆医院肝病内科, 福州 350007

DOI: 10.20148/j.fmj.2024.01.003