

# 血清环状RNA表达与胃癌关系的探索性研究

高哈尔<sup>1</sup> 刘芬<sup>2</sup> 马峻岭<sup>1</sup> 李哲轩<sup>1</sup> 刘卫东<sup>3</sup> 周彤<sup>1</sup> 李文庆<sup>1</sup> 潘凯枫<sup>1</sup> 张阳<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北京大学肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所流行病学研究室 恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室 100142; <sup>2</sup>首都医科大学公共卫生学院, 北京 100069; <sup>3</sup>山东省临朐县卫生局胃癌防治研究所 262600

通信作者:张阳, Email:y Zhang76@sina.com

**【摘要】目的** 分析血清中候选环状RNA表达与胃癌的关系,初步探索其是否具有胃癌早期诊断标志物的潜在应用价值。**方法** 从山东省临朐县人民医院选取48例胃癌病例,并在同期胃镜筛查队列中选择年龄、性别匹配的48例对照。采用实时荧光定量PCR方法对血清中3个候选环状RNA (hsa\_circ\_002059、hsa\_circ\_0000096、hsa\_circ\_0001895)表达水平进行定量检测,并对胃癌组与对照组进行比较。**结果** 胃癌病例中血清 hsa\_circ\_002059、hsa\_circ\_0000096、hsa\_circ\_0001895 表达阳性率分别为70.8%、47.9%、75.0%,略高于对照组(58.3%、31.3%、60.4%),差异均无统计学意义(均 $P>0.05$ )。血清中上述3个候选环状RNA表达水平 $M(P_{25} \sim P_{75})$ 在胃癌组中分别为1.60%(0~5.64%)、0(0~0.61%)、0.91%(0.06%~1.88%),在对照组中分别为0.05%(0~6.07%)、0(0~0.34%)、0.42%(0~1.39%)。多因素分析调整幽门螺杆菌感染、吸烟和饮酒状况后,3种候选环状RNA高表达与胃癌之间的关联强度呈上升趋势,差异无统计学意义(均 $P>0.05$ )。进一步将上述3种环状RNA进行组合,对其与胃癌的关系进行联合分析发现,与3种环状RNA均为阴性者相比,随着表达阳性环状RNA个数增加,与胃癌的关联强度呈上升趋势,趋势检验 $P=0.040$ 。**结论** 本研究初步提示 hsa\_circ\_002059、hsa\_circ\_0000096、hsa\_circ\_0001895 表达水平可能与胃癌相关。

**【关键词】** 肿瘤;胃;环状RNA;候选标志物

**基金项目:**国家重点研发计划(2018YFC1313100);北京市自然科学基金(7182032);恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部/北京市重点实验室开放基金(2017开放-11)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2019.12.005

## Association between circular RNAs expression in serum and gastric cancer

Gao Haer<sup>1</sup>, Liu Fen<sup>2</sup>, Ma Junling<sup>1</sup>, Li Zhexuan<sup>1</sup>, Liu Weidong<sup>3</sup>, Zhou Tong<sup>1</sup>, Li Wenqing<sup>1</sup>, Pan Kaifeng<sup>1</sup>, Zhang Yang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Carcinogenesis and Translational Research (Ministry of Education), Department of Cancer Epidemiology, Peking University Cancer Hospital & Institute, Beijing 100142, China; <sup>2</sup>School of Public Health, Capital Medical University, Beijing 100069, China; <sup>3</sup>Institute for Gastric Cancer Prevention and Treatment, Linqu County Public Health Bureau of Shandong Province, Linqu 262600, China  
Corresponding author: Zhang Yang, Email: y Zhang76@sina.com

**【Abstract】Objective** To analyze the association between circular RNAs expression in serum and gastric cancer and evaluate the potential of the related markers in early diagnosis of gastric cancer.

**Methods** Forty eight gastric cancer cases in Linqu County People's Hospital were selected as case group, and 48 controls matched by age and sex were randomly selected in the gastric cancer screening cohort during the same period. The expression levels of hsa\_circ\_002059, hsa\_circ\_0000096 and hsa\_circ\_0001895 were detected by quantitative real-time PCR. The results were compared between case group and control group. **Results** The positive expression rates of hsa\_circ\_002059, hsa\_circ\_0000096 and hsa\_circ\_0001895 were 70.8%, 47.9%, 75.0% in case group, slightly higher than those in control group (58.3%, 31.3%, 60.4%), although  $P$  values were all more than 0.05. The expression level medians of the 3 candidate circRNAs expression levels were 1.60% (0-5.64%), 0 (0-0.61%), 0.91% (0.06%-1.88%) in case group, while 0.05% (0-6.07%), 0 (0-0.34%), 0.42% (0-1.39%) in control

group, respectively. Conditional logistic regression analysis showed that the association strength of high expressions of 3 candidate circRNAs with gastric cancer showed an increase trend, but the differences had no significance after adjusted by *Helicobacter pylori* infection, smoking and drinking status (all  $P > 0.05$ ). Further analysis by combining the 3 candidate circRNAs showed the increased strength of association between circRNAs and gastric cancer with the elevated number of positive circRNAs in serum (trend test  $P = 0.040$ ) compared with circRNAs negative persons. **Conclusion** Our study preliminarily suggested that the expression of hsa\_circ\_002059, hsa\_circ\_0000096 and hsa\_circ\_0001895 in serum might be correlated with gastric cancer.

**【Key words】** Gastric neoplasm; Circular RNA; Candidate biomarker

**Fund programs:** National Key Research and Development Program of China (2018YFC1313100); Beijing Natural Science Foundation (7182032); Open Project Funded by Key Laboratory of Carcinogenesis and Translational Research, Ministry of Education/Beijing (2017 Open Project-11)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2019.12.005

胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一,发病率和死亡率分别为 29.3/10 万、21.2/10 万<sup>[1]</sup>。内窥镜检查及活检组织病理学诊断是目前常用的胃癌早期筛查手段<sup>[2]</sup>。但该方法为侵入性、对操作者技术水平要求较高,难以在大规模社区人群中广泛开展<sup>[3]</sup>。因此,寻找有效、简便、非侵入性的外周血胃癌相关标志物,对胃癌早诊筛查具有重要意义。近年来,胃癌相关外周血标志物研究涉及 DNA、蛋白质、RNA 等<sup>[4-5]</sup>。其中,环状 RNA 具有高度保守性和较长的半衰期,可能与肿瘤的发生发展相关。既往研究提示, hsa\_circ\_002059、 hsa\_circ\_0000096 和 hsa\_circ\_0001895 表达水平  $\Delta Ct$  值在胃癌中高于癌旁组织 (13.0 vs. 12.5、13.5 vs. 12.6、12.0 vs. 9.8,  $P < 0.05$ ); 且胃癌患者血浆 hsa\_circ\_002059 水平可在术后出现显著变化<sup>[6-8]</sup>。本研究以山东省临朐县胃癌高发区人群为基础,采用病例对照研究设计,定量分析血清候选环状 RNA 表达水平与胃癌的关系,初步探索其作为胃癌相关非侵入性标志物的潜在应用价值。

## 对象与方法

1. 研究对象:山东省临朐县是我国北方的胃癌高发区之一,本课题组自 1989 年起在临朐县开展了多项胃癌相关流行病学研究<sup>[9]</sup>。此外,自 2008 年开始,临朐县承担“中央转移支付胃癌筛查和早诊早治项目”(早诊早治项目),每年在该地区采用整群抽样的方法对 1 500 ~ 2 000 名 40 ~ 69 岁常住居民进行胃镜筛查和胃癌早诊早治。本研究利用 2012 年 1 月至 2014 年 12 月在临朐县人民医院就诊的胃癌患者,选择首次经临床病理学确诊、未接受任何手术治疗、放疗或化疗的胃癌病例 48 例。在同期参加早诊早治项目,接受胃镜筛查、病理学诊断为正常胃黏膜或浅表性胃炎的病例中,根据年龄 ( $\pm 2$  岁)、性别进行 1 : 1 匹配,选择 48 例对照。全部研究对象均在接受

胃镜检查及病理诊断的同时进行体格检查及问卷调查,收集外周血样本和详细的人口学资料。本研究经北京大学肿瘤医院伦理委员会批准,所有研究对象均签署知情同意书。

2. 幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, HP) 感染状况检测:采用 ELISA 检测血清 HP IgG 抗体<sup>[10-11]</sup>,具体步骤如下:用抗原稀释液 (10  $\mu$ l/ml) 包埋酶标板过夜,每孔 100  $\mu$ l。用 PBSTTG 液封闭酶标板,37  $^{\circ}$ C 保温 3 h, PBS 缓冲液洗 3 次。待测血清样品以 1 : 800 倍稀释,每孔加入 100  $\mu$ l, 37  $^{\circ}$ C 保温 1 h, PBS 缓冲液洗 3 次;每孔加入结合过氧化氢酶的羊抗人 IgG 的二抗 100  $\mu$ l (英国 Abcam 公司), 37  $^{\circ}$ C 保温 1 h, PBS 缓冲液洗 3 次;每孔加入 100  $\mu$ l 新配制的显色液, 15 min 后 415 nm 波长下比色;每块板带有阴性对照和阳性对照,每个样品做 2 孔平行样,每批样品重复一次,实验误差  $< 10\%$ 。IgG 平均的光密度值  $\geq 1.0$  确定为 HP 感染阳性。

3. 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测血清环状 RNA 表达水平:根据 miRNeasy Serum/Plasma Kit 试剂盒说明书 (德国 Qiagen 公司), 提取研究对象血清中总 RNA。进一步参照 GoScript Reverse Transcription System (美国 Promega 公司) 试剂盒说明书反转录合成 cDNA。并采用 qRT-PCR 方法检测胃癌和对照血清中候选环状 RNA (hsa\_circ\_002059、 hsa\_circ\_0000096 和 hsa\_circ\_0001895) 表达水平。引物序列引自参考文献 [6-8]。PCR 扩增条件:95.0  $^{\circ}$ C 15 s, 60.2  $^{\circ}$ C (hsa\_circ\_002059) 或 62.0  $^{\circ}$ C (hsa\_circ\_0000096 和 hsa\_circ\_0001895) 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 45 个循环。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法对环状 RNA 表达水平进行相对定量。以 *GADPH* 基因作为内源性参照,全部研究对象血清混合液作为阳性参照,同时以无 RNA 酶水作为阴性对照。采用如下公式对待测样品血清中候选环状 RNA 表达百分比 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) 进行计算:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-\left\{ [Ct(\text{环状 RNA}) - Ct(GADPH)]_{\text{样品}} - [Ct(\text{环状 RNA}) - Ct(GADPH)]_{\text{阳性参照}} \right\}}$$

本研究首先根据候选环状 RNA 表达百分比 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) 是否  $>0$ , 将血清样本定义为环状 RNA 表达阳性和阴性, 分析表达阳性率与胃癌的关系。此外, 由于本研究的对照来自临朐县整群抽样的早诊早治项目中胃镜筛查、病理确诊的正常胃黏膜及浅表性胃炎病例, 可初步反映该地区正常及轻度胃黏膜病变病例血清候选环状 RNA 的水平。同时, 参照既往 qRT-PCR 定量分析文献[12-13], 根据对照组中候选环状 RNA (hsa\_circ\_002059、hsa\_circ\_0000096、hsa\_circ\_0001895) 表达水平  $M$ , 进一步将 3 个候选环状 RNA 表达水平划分为低表达或阴性表达和高表达或阳性表达组, 分析环状 RNA 表达状态与胃癌的关系。

4. 统计学分析: 采用配对  $t$  检验比较胃癌组与对照组间年龄分布差异, 采用 McNemar 检验比较分类变量如性别、吸烟、饮酒和 HP 感染状态在两组间的分布。候选环状 RNA 表达水平在两组间的比较采用 Wilcoxon 符号秩和检验进行单因素分析; 采用条件 logistic 回归分析或非条件 logistic 回归分析进行多因素分析, 调整吸烟、饮酒、HP 感染状态, 计算与胃癌关联强度的 OR 值及其 95%CI。所有统计分析均由 SPSS 24.0 软件完成。双侧检验, 检验水准  $\alpha=0.05$ 。

### 结 果

1. 基本情况: 胃癌组与对照组年龄均为 (58.5 ± 7.8) 岁, 男性 35 例 (72.9%), 女性 13 例 (27.1%)。胃癌组吸烟及饮酒者所占比例分别为 52.1% 和 47.9%, 对照组吸烟及饮酒比例分别为 39.6% 和 58.3%。两组差异无统计学意义 ( $P=0.263$  和  $P=0.302$ )。HP 感染阳性者在胃癌组所占比例 (62.5%) 与对照组 (58.3%) 差异无统计学意义 ( $P=0.523$ )。见表 1。

2. 血清候选环状 RNA 表达阳性率与胃癌的关系: 胃癌病例血清中 3 个候选环状 RNA (hsa\_circ\_002059、hsa\_circ\_0000096、hsa\_circ\_0001895) 表达阳性率分别为 70.8% (34/48)、47.9% (23/48) 和 75.0% (36/48), 略高于对照组中的 58.3% (28/48)、31.3% (15/48) 和 60.4% (29/48), 差异均无统计学意义,  $P$  值分别为 0.327、0.152 和 0.167。胃癌组中 hsa\_circ\_002059、hsa\_circ\_0000096、hsa\_circ\_0001895 表达水平  $M$  ( $P_{25} \sim P_{75}$ ) 分别为 1.60% (0 ~ 5.64%)、0 (0 ~ 0.61%)、0.91% (0.06% ~ 1.88%); 对照组中分别为 0.05% (0 ~ 6.07%)、0 (0 ~ 0.34%)、0.42% (0 ~ 1.39%), 两组表达水平差异无统计学意义 ( $P$  值分别

表 1 胃癌患者和对照基本资料

变量	合计	对照组 (n=48)	胃癌组 (n=48)	P 值 <sup>a</sup>
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$ )	58.5 ± 7.8	58.5 ± 7.8	58.5 ± 7.8	0.569 <sup>b</sup>
性别				>0.999
男	70(72.9)	35(72.9)	35(72.9)	
女	26(27.1)	13(27.1)	13(27.1)	
吸烟				0.263
否	52(54.2)	29(60.4)	23(47.9)	
是	44(45.8)	19(39.6)	25(52.1)	
饮酒				0.302
否	45(46.9)	20(41.7)	25(52.1)	
是	51(53.1)	28(58.3)	23(47.9)	
HP 感染				0.523
阴性	33(34.4)	20(41.7)	13(27.1)	
阳性	58(60.4)	28(58.3)	30(62.5)	
缺失	5(5.2)	-	5(10.4)	

注: 括号外数据为人数, 括号内数据为构成比(%); <sup>a</sup>分类变量采用 McNemar 检验; <sup>b</sup>连续型变量采用配对  $t$  检验

为 0.692、0.210 和 0.105)。

根据对照组中 hsa\_circ\_002059、hsa\_circ\_0000096、hsa\_circ\_0001895 表达水平中位数 (0.05%、阴性、0.42%), 本研究将 3 个候选环状 RNA 表达水平分为低表达或阴性表达组 ( $\leq 0.05\%$ 、阴性、 $\leq 0.42\%$ ) 与高表达或阳性表达组 ( $> 0.05\%$ 、阳性、 $> 0.42\%$ ) 进行分析, 结果显示, 胃癌组中 hsa\_circ\_002059、hsa\_circ\_0000096、hsa\_circ\_0001895 高表达病例所占比例略高于对照组 (62.5% vs. 50.0%、47.9% vs. 31.3% 和 70.8% vs. 50.0%)。多因素分析调整吸烟、饮酒和 HP 感染状况后发现, 与对照组相比, hsa\_circ\_002059、hsa\_circ\_0000096、hsa\_circ\_0001895 高表达与胃癌之间的关联强度略有上升, OR 值 (95%CI) 分别为 1.39 (0.73 ~ 2.64)、1.35 (0.73 ~ 2.50) 和 1.64 (0.85 ~ 3.14), 但差异无统计学意义 ( $P$  值分别为 0.320、0.336 和 0.139)。见表 2。

表 2 环状 RNA 表达与胃癌的关系

类别	对照组 <sup>a</sup> (n=48)	胃癌组 <sup>a</sup> (n=48)	OR 值 (95%CI) <sup>b</sup>	P 值 <sup>b</sup>
hsa_circ_002059 表达 <sup>c</sup>				
$\leq 0.05\%$	24(50.0)	18(37.5)	1.00	
$> 0.05\%$	24(50.0)	30(62.5)	1.39(0.73 ~ 2.64)	0.320
hsa_circ_0000096 表达 <sup>c</sup>				
阴性	33(68.7)	25(52.1)	1.00	
阳性	15(31.3)	23(47.9)	1.35(0.73 ~ 2.50)	0.336
hsa_circ_0001895 表达 <sup>c</sup>				
$\leq 0.42\%$	24(50.0)	14(29.2)	1.00	
$> 0.42\%$	24(50.0)	34(70.8)	1.64(0.85 ~ 3.14)	0.139

注: <sup>a</sup>括号外数据为人数, 括号内数据为构成比(%); <sup>b</sup>条件 logistic 回归, 调整吸烟、饮酒及 HP 感染状况; <sup>c</sup>以对照组中 hsa\_circ\_002059、hsa\_circ\_0000096、hsa\_circ\_0001895 表达水平  $M$  (0.05%、阴性、0.42%) 为阈值, 将 3 种候选环状 RNA 表达水平分为低表达或阴性表达和高表达或阳性表达组

3. 候选环状 RNA 表达状态影响因素分析:对年龄、性别、吸烟、饮酒、HP 感染状况与 hsa\_circ\_002059、hsa\_circ\_0000096 和 hsa\_circ\_0001895 表达的关系进行分析。结果显示,年龄、性别、吸烟、饮酒、HP 感染与血清环状 RNA 表达状态均无显著相关(均  $P > 0.05$ )。见表 3。

4. HP 对环状 RNA 表达水平与胃癌关系的影响:在 HP 感染阴性和阳性病例中,hsa\_circ\_002059、hsa\_circ\_0000096、hsa\_circ\_0001895 高表达者所占比例均在胃癌组略高于对照组。调整吸烟、饮酒状况后的多因素分析结果显示,hsa\_circ\_002059、hsa\_circ\_0000096、hsa\_circ\_0001895 高表达与胃癌关联强度的 OR 值呈上升趋势,但差异无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。见表 4。

5. 环状 RNA 表达与胃癌关系的联合分析:上述研究结果提示,血清 hsa\_circ\_002059、hsa\_circ\_0000096、hsa\_circ\_0001895 表达水平在胃癌病例中均略高于对照组,因此本研究将 3 种候选环状 RNA 进行组合,对其与胃癌的关系进行联合分析,结果显示,同时表达 2 种或 3 种环状 RNA 的病例所占比例在胃癌组中略高于对照组(45.8% vs. 33.3%; 27.1% vs. 18.8%)。非条件 logistic 回归调整吸烟、饮酒及 HP 感染状况后,分析结果显示,与 3 种候选环状 RNA 表达均为阴性者相比,环状 RNA 与胃癌之间关联强度的 OR 值由表达 1 个候选环状 RNA 的 1.31,上升为表达 2 个候选环状 RNA 的 2.74,和表达 3 个候选环状 RNA 的 3.46。环状 RNA 与胃癌之间的关联强度随环状 RNA 表达阳性个数增加逐渐升高,趋

表 3 候选环状 RNA 血清表达状态影响因素分析

变量	hsa_circ_002059 <sup>a</sup> (n=96)		P 值 <sup>b</sup>	hsa_circ_0000096 <sup>a</sup> (n=96)		P 值 <sup>b</sup>	hsa_circ_0001895 <sup>a</sup> (n=96)		P 值 <sup>b</sup>
	≤0.05%	>0.05%		阴性	阳性		≤0.42%	>0.42%	
年龄组(岁)			0.243			0.590			0.236
≤58	13(31.0)	23(42.6)		23(39.7)	13(34.2)		17(44.7)	19(32.8)	
>58	29(69.0)	31(57.4)		35(60.3)	25(65.8)		21(55.3)	39(67.2)	
性别			0.224			0.891			0.891
男	28(66.7)	42(77.8)		42(72.4)	28(73.7)		28(73.7)	42(72.4)	
女	14(33.3)	12(22.2)		16(27.6)	10(26.3)		10(26.3)	16(27.6)	
吸烟			0.353			0.279			0.807
否	25(59.5)	27(50.0)		34(58.6)	18(47.4)		20(52.6)	32(55.2)	
是	17(40.5)	27(50.0)		24(41.4)	20(52.6)		18(47.4)	26(44.8)	
饮酒			0.897			0.937			0.937
否	20(47.6)	25(46.3)		27(46.6)	18(47.4)		18(47.4)	27(46.6)	
是	22(52.4)	29(53.7)		31(53.4)	20(52.6)		20(52.6)	31(53.4)	
HP 感染			0.326			0.138			0.853
阴性	16(38.1)	17(31.4)		17(29.4)	16(42.1)		13(34.2)	20(34.5)	
阳性	22(52.4)	36(66.7)		39(67.2)	19(50.0)		24(63.2)	34(58.6)	
缺失	4(9.5)	1(1.9)		2(3.4)	3(7.9)		1(2.6)	4(6.9)	

注:括号外数据为人数,括号内数据为构成比(%);<sup>a</sup>以对照组中 hsa\_circ\_002059、hsa\_circ\_0000096、hsa\_circ\_0001895 表达水平  $M(0.05\%$ 、阴性、 $0.42\%$ )为阈值,将 3 种候选环状 RNA 表达水平分为低表达或阴性表达和高表达或阳性表达组;<sup>b</sup>Pearson  $\chi^2$  检验(缺失值除外)

表 4 HP 对环状 RNA 表达水平与胃癌关系的影响

类别	HP 阴性				HP 阳性			
	对照组 <sup>a</sup> (n=20)	胃癌组 <sup>a</sup> (n=13)	OR 值(95%CI) <sup>b</sup>	P 值 <sup>b</sup>	对照组 <sup>a</sup> (n=28)	胃癌组 <sup>a</sup> (n=30)	OR 值(95%CI) <sup>b</sup>	P 值 <sup>b</sup>
hsa_circ_002059 表达 <sup>c</sup>								
≤0.05%	10(50.0)	6(46.2)	1.00		14(50.0)	8(26.7)	1.00	
>0.05%	10(50.0)	7(53.8)	1.10(0.37 ~ 3.27)	0.866	14(50.0)	22(73.3)	1.68(0.74 ~ 3.80)	0.216
hsa_circ_0000096 表达 <sup>c</sup>								
阴性	13(65.0)	4(30.8)	1.00		20(71.4)	19(63.3)	1.00	
阳性	7(35.0)	9(69.2)	2.15(0.65 ~ 7.17)	0.213	8(28.6)	11(36.7)	1.11(0.52 ~ 2.37)	0.794
hsa_circ_0001895 表达 <sup>c</sup>								
≤0.42%	10(50.0)	3(23.1)	1.00		14(50.0)	10(33.3)	1.00	
>0.42%	10(50.0)	10(76.9)	1.82(0.48 ~ 6.90)	0.376	14(50.0)	20(66.7)	1.50(0.70 ~ 3.21)	0.303

注:<sup>a</sup>括号外数据为人数,括号内数据为构成比(%);<sup>b</sup>条件 logistic 回归,调整吸烟、饮酒状况;<sup>c</sup>以对照组中 hsa\_circ\_002059、hsa\_circ\_0000096、hsa\_circ\_0001895 表达水平  $M(0.05\%$ 、阴性、 $0.42\%$ )为阈值,将 3 种候选环状 RNA 表达水平分为低表达或阴性表达和高表达或阳性表达组

势检验  $P=0.040$ 。见表5。

表5 候选环状RNA表达与胃癌关系的联合分析

环状RNA 表达阳性 个数	对照组 <sup>a</sup>	胃癌组 <sup>a</sup>	OR值 (95%CI) <sup>b</sup>	P值 <sup>b</sup>
0	10(20.8)	4(8.3)	1.00	
1	13(27.1)	9(18.8)	1.31(0.29 ~ 6.00)	0.726
2	16(33.3)	22(45.8)	2.74(0.67 ~ 11.15)	0.160
3	9(18.8)	13(27.1)	3.46(0.76 ~ 15.85)	0.257

注：<sup>a</sup>括号外数据为人数，括号内数据为构成比(%)；<sup>b</sup>非条件logistic回归，调整吸烟、饮酒及HP感染状况；趋势检验  $P$ 值=0.040

## 讨论

环状RNA是一类5'端和3'端以共价键结合形成的闭合环状RNA分子<sup>[14]</sup>，其不易被核酸外切酶降解，可以稳定存在于体内。前期研究提示，环状RNA可能具有miRNA海绵作用<sup>[15]</sup>，在调控基因转录、RNA结合蛋白、蛋白质翻译等生理、病理过程中发挥重要作用<sup>[16-18]</sup>。此外，环状RNA可能参与多种肿瘤的发生发展<sup>[19-20]</sup>，为肿瘤相关标志物研究提供新的方向。

近年来，有研究提示，环状RNA可能与胃癌密切相关，且外周血中环状RNA水平可能具有非侵入性标志物的应用潜力。然而，既往研究多采用癌旁组织作为对照，或比较胃癌手术前后血浆环状RNA表达水平<sup>[6-8,21]</sup>。本研究基于山东省临朐县胃癌高发区人群，对3种候选环状RNA(hsa\_circ\_002059、hsa\_circ\_0000096、hsa\_circ\_0001895)血清表达水平，在胃癌病例及严格根据年龄、性别匹配，胃镜活检病理学诊断为正常胃黏膜或浅表性胃炎的对照病例间进行比较，结果显示，胃癌病例血清中上述3种环状RNA表达水平有升高趋势，且随着表达阳性标志物个数的增加，其与胃癌的关联强度呈显著上升趋势。

既往曾有研究提示，胃癌发生的重要危险因素HP感染引起的慢性炎症能够诱导机体内LincRNA、microRNA等多种RNA分子表达失调<sup>[22]</sup>。但本研究利用所有研究对象初步分析了年龄、性别、吸烟、饮酒及HP感染状况与血清候选环状RNA表达水平的关系，并未发现上述因素与血清环状RNA表达水平显著相关。

本研究存在局限性。胃癌病例及匹配对照的样本量较小，上述结果尚有待于进一步扩大样本量验证。此外，血清中环状RNA的来源与可能的作用机制也有待进一步的功能学研究阐明。

综上所述，本探索性研究为血清环状RNA作为

潜在的非侵入性胃癌相关标志物研究提供了初步的流行病学线索。但是上述标志物是否可以作为胃癌早期筛查、早期诊断标志物尚需进一步扩大样本的前瞻性队列验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] 郑荣寿,孙可欣,张思维,等. 2015年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 41(1): 19-28. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2019.01.005.
- Zheng RS, Sun KX, Zhang SW, et al. Report of cancer epidemiology in China, 2015 [J]. Chin J Oncol, 2019, 41(1): 19-28. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2019.01.005.
- [2] 游伟程. 胃癌早诊早治进展[J]. 中国肿瘤, 2009, 18(9): 695-699.
- You WC. Progress in early detection and treatment for gastric cancer [J]. Chin Cancer, 2009, 18(9): 695-699.
- [3] Leung WK, Wu MS, Kakugawa Y, et al. Screening for gastric cancer in Asia: current evidence and practice [J]. Lancet Oncol, 2008, 9(3): 279-287. DOI: 10.1016/S1470-2045(08)70072-X.
- [4] Sawaki K, Kanda M, Kodera Y. Review of recent efforts to discover biomarkers for early detection, monitoring, prognosis, and prediction of treatment responses of patients with gastric cancer [J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2018, 12(7): 657-670. DOI: 10.1080/17474124.2018.1489233.
- [5] 陆俊骏,钱烨,连强. 胃癌遗传学及表遗传学研究进展[J]. 中国医药导报, 2013, 10(19): 43-46. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7210.2013.19.014.
- Lu JJ, Qian Y, Lian Q. Advances on promotion of genetics and epigenetics in gastric cancer [J]. Chin Med Her, 2013, 10(19): 43-46. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7210.2013.19.014.
- [6] Li PF, Chen HL, Chen SC, et al. Circular RNA 0000096 affects cell growth and migration in gastric cancer [J]. Br J Cancer, 2017, 116(5): 626-633. DOI: 10.1038/bjc.2016.451.
- [7] Li PF, Chen SC, Chen HL, et al. Using circular RNA as a novel type of biomarker in the screening of gastric cancer [J]. Clin Chim Acta, 2015, 444: 132-136. DOI: 10.1016/j.cca.2015.02.018.
- [8] Shao YF, Chen LB, Lu RD, et al. Decreased expression of hsa\_circ\_0001895 in human gastric cancer and its clinical significances [J]. Tumour Biol, 2017, 39(4): 1010428317699125. DOI: 10.1177/1010428317699125.
- [9] 游伟程. 胃癌及癌前病变的研究与干预——23年胃癌高发现场的实践[J]. 北京大学学报: 医学版, 2006, 38(6): 565-570. DOI: 10.3321/j.issn: 1671-167X.2006.06.001.
- You WC. Study and intervention of gastric cancer and precancerous lesions — 23 years of practice in the high risk area of gastric cancer [J]. J Peking Uni: Health Sci, 2006, 38(6): 565-570. DOI: 10.3321/j.issn: 1671-167X.2006.06.001.
- [10] Su HJ, Zhang Y, Zhang L, et al. Methylation status of COX-2 in blood leukocyte DNA and risk of gastric cancer in a high-risk Chinese population [J]. BMC Cancer, 2015, 15: 979. DOI: 10.1186/s12885-015-1962-x.
- [11] Zhang L, Blot WJ, You WC, et al. *Helicobacter pylori* antibodies in relation to precancerous gastric lesions in a high-risk Chinese

population[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1996, 5(8): 627-630.

[12] Wu S, Zhang Y, Zhang L, et al. Methylation and expression of nonclustered protocadherins encoding genes and risk of precancerous gastric lesions in a high-risk population[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2018, 11(11): 717-726. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-18-0119.

[13] Asada K, Nakajima T, Shimazu T, et al. Demonstration of the usefulness of epigenetic cancer risk prediction by a multicentre prospective cohort study[J]. *Gut*, 2015, 64(3): 388-396. DOI: 10.1136/gutjnl-2014-307094.

[14] Hsiao KY, Sun HS, Tsai SJ. Circular RNA — New member of noncoding RNA with novel functions [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2017, 242(11): 1136-1141. DOI: 10.1177/1535370217708978.

[15] Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges [J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 384-388. DOI: 10.1038/nature11993.

[16] Guarnerio J, Bezzi M, Jeong JC, et al. Oncogenic role of fusion-circRNAs derived from cancer-associated chromosomal translocations[J]. *Cell*, 2016, 166(4): 1055-1056. DOI: 10.1016/j.cell.2016.07.035.

[17] Li ZY, Huang C, Bao C, et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, 22(3): 256-264. DOI: 10.1038/nsmb.2959.

[18] Di Leva G, Garofalo M, Croce CM. MicroRNAs in cancer [J]. *Annu Rev Pathol*, 2014, 9: 287-314. DOI: 10.1146/annurev-pathol-012513-104715.

[19] 付丽云, 胡耀仁, 郭俊明. 环状 RNA 与人类疾病 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2015, 31(8): 771-778. DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2015.08.01.

Fu LY, Hu YR, Guo JM. CircRNAs and human diseases [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2015, 31(8): 771-778. DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2015.08.01.

[20] Lei B, Tian ZQ, Fan WP, et al. Circular RNA: a novel biomarker and therapeutic target for human cancers [J]. *Int J Med Sci*, 2019, 16(2): 292-301. DOI: 10.7150/ijms.28047.

[21] Li WH, Song YC, Zhang H, et al. Decreased expression of hsa\_circ\_00001649 in gastric cancer and its clinical significance [J]. *Dis Markers*, 2017, 2017: 4587698. DOI: 10.1155/2017/4587698.

[22] 朱虹. 幽门螺杆菌感染相关非编码 RNAs 筛选鉴定与功能研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2017.

Zhu H. Identification and functional analysis of non-coding RNAs involved in *Helicobacter pylori*-associated infection [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2017.

(收稿日期: 2019-05-14)

(本文编辑: 万玉立)

## 读者·作者·编者

### 本刊常用缩略语

本刊对以下较为熟悉的一些常用医学词汇将允许直接用缩写,即在文章中第一次出现时,可以不标注中文和英文全称。

OR	比值比	HBeAg	乙型肝炎核心抗原
RR	相对危险度	HBeAg	乙型肝炎 e 抗原
CI	可信区间	HBsAg	乙型肝炎表面抗原
$P_n$	第 n 百分位数	抗-HBs	乙型肝炎表面抗体
AIDS	艾滋病	抗-HBc	乙型肝炎核心抗体
HIV	艾滋病病毒	抗-HBe	乙型肝炎 e 抗体
MSM	男男性行为者	ALT	丙氨酸氨基转移酶
STD	性传播疾病	AST	天冬氨酸氨基转移酶
DNA	脱氧核糖核酸	HPV	人乳头瘤病毒
RNA	核糖核酸	DBP	舒张压
PCR	聚合酶链式反应	SBP	收缩压
RT-PCR	反转录聚合酶链式反应	BMI	体质指数
$C_t$ 值	每个反应管内荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数	MS	代谢综合征
PAGE	聚丙烯酰胺凝胶电泳	FPG	空腹血糖
PFGE	脉冲场凝胶电泳	HDL-C	高密度脂蛋白胆固醇
ELISA	酶联免疫吸附试验	LDL-C	低密度脂蛋白胆固醇
A 值	吸光度值	TC	总胆固醇
GMT	几何平均滴度	TG	甘油三酯
HBV	乙型肝炎病毒	COPD	慢性阻塞性肺疾病
HCV	丙型肝炎病毒	CDC	疾病预防控制中心
HEV	戊型肝炎病毒	WHO	世界卫生组织