

学校编码: 10384  
学号: 24520131153526

分类号\_\_\_\_密级\_\_\_\_  
UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

# 长链非编码 RNA-ROR 在胃癌中的表达及其对胃癌细胞生物学行为的影响

Expression and biological behaviors of long non-coding  
RNA-ROR in gastric cancer

朱长明

指导教师姓名: 闫峰 副 教 授

专 业 名 称: 外 科 学

论文提交日期: 2016 年 04 月

论文答辩时间: 2016 年 05 月

学位授予时间: 2016 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2016 年 5 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月

目 录

摘 要.....	5
Abstract.....	6
第一章 前言 .....	8
1.1 胃癌研究现状 .....	8
1.2 长链非编码 RNA 简介.....	9
1.3 LincRNA-ROR 的发现及功能.....	10
1.3.1 ROR 的发现 .....	10
1.3.2 ROR 的功能 .....	10
1.4 本研究的实验设计 .....	12
第二章 材料和方法 .....	13
2.1 材料.....	13
2.1.1 组织样本及其临床资料.....	13
2.1.2 胃癌细胞株.....	15
2.1.3 质粒及引物序列.....	15
2.1.4 实验主要试剂.....	16
2.1.5 实验溶液及配置方法.....	18
2.1.6 实验耗材及仪器设备.....	19
2.2 实验方法 .....	22
2.2.1 总 RNA 的提取及鉴定 .....	22
2.2.2 逆转录 cDNA 反应 .....	23
2.2.3 实时荧光定量 PCR 反应 .....	24
2.2.4 细胞培养及细胞计数.....	25
2.2.5 细胞转染及筛选.....	27
2.2.6 CCK-8 实验 .....	29
2.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡.....	30
2.2.8 Transwell 侵袭、迁移实验.....	30

2.2.9 蛋白质免疫印迹实验 (Western Blot) .....	31
2.2.10 统计分析.....	35
<b>第三章 实验结果与分析 .....</b>	<b>36</b>
<b>3.1 ROR 在胃癌组织中的表达情况 .....</b>	<b>36</b>
3.1.1 qRT-PCR 检测靶基因的特异性 .....	36
3.1.2 qRT-PCR 检测胃癌及其配对正常组织中 ROR 的表达情况 .....	37
3.1.3 ROR 在各组中的表达差异 .....	38
3.1.4 50 例胃癌样本中 ROR 的总体表达差异 .....	39
<b>3.2 ROR 的表达与胃癌临床病理特征的相关性分析 .....</b>	<b>40</b>
<b>3.3 构建稳定过表达 ROR 的胃癌细胞株 .....</b>	<b>41</b>
3.3.1 过表达载体测序结果.....	41
3.3.2 构建 ROR 过表达的胃癌细胞株 MGC-803、SGC-7901.....	42
<b>3.4 ROR 对胃癌细胞的增殖能力的影响 .....</b>	<b>43</b>
<b>3.5 ROR 对胃癌细胞凋亡的影响 .....</b>	<b>44</b>
<b>3.6 ROR 对胃癌细胞的侵袭及迁移能力的影响 .....</b>	<b>45</b>
<b>3.7 ROR 对胃癌细胞 EMT 过程的影响 .....</b>	<b>47</b>
<b>第四章 讨论 .....</b>	<b>48</b>
<b>第五章 结论 .....</b>	<b>52</b>
<b>参考文献.....</b>	<b>53</b>
<b>中英文缩略词表 .....</b>	<b>59</b>
<b>致 谢.....</b>	<b>61</b>
<b>硕士期间发表的论文情况 .....</b>	<b>62</b>

---

## Table of Contents

<b>Abstract in Chinese</b> .....	<b>5</b>
<b>Abstract in English</b> .....	<b>6</b>
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1 Current status and research progress of gastric cancer</b> .....	<b>8</b>
<b>1.2 LncRNA profile</b> .....	<b>9</b>
<b>1.3 Discovery and function of incRNA-ROR</b> .....	<b>10</b>
1.3.1 Discovery of ROR.....	10
1.3.2 Biological function of ROR.....	10
<b>1.4 Experiment design</b> .....	<b>12</b>
<b>Chapter 2 Materials and Methods</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1 Materials</b> .....	<b>13</b>
2.1.1 Tissue samples and clinical datas collection.....	13
2.1.2 Human gastric cancer cell line .....	15
2.1.3 Plasmid and primers.....	15
2.1.4 Reagents.....	16
2.1.5 Main solutionand preparation method .....	18
2.1.6 Instruments and consumables .....	19
<b>2.2 Methods</b> .....	<b>22</b>
2.2.1 Total RNA extraction and identification .....	22
2.2.2 Reverse transcription reaction.....	23
2.2.3 Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) .....	24
2.2.4 Cell culture and counting .....	25
2.2.5 Transfection and screening .....	27
2.2.6 Cell Counting Kit-8(CCK-8) .....	29
2.2.7 Flow cytometry .....	30
2.2.8 Transwell invasion and migration assay .....	30
2.2.9 Western Blot .....	31

2.2.10 Statistical analysis .....	35
<b>Chapter 3 Results and Analysis .....</b>	<b>36</b>
<b>3.1 Expression of ROR in gastric cancer tissues .....</b>	<b>36</b>
3.1.1 Test of qRT-PCR products.....	36
3.1.2 Expression of ROR in gastric cancer and its paired normal tissues .....	37
3.1.3 Comparison of ROR levels in each group of tissues .....	38
3.1.4 Differential Expression of ROR in 50 samples.....	39
<b>3.2 Association between ROR expression and clinicopathological features .....</b>	<b>40</b>
<b>3.3 Constructs the stable over-expression ROR in gastric cancer cells .....</b>	<b>41</b>
3.3.1 Sequencing of the vector LV-5 .....	41
3.3.2 Establish stable cells use MGC-803、SGC7901 by transfection.....	42
<b>3.4 The effect of ROR on proliferation of gastric cancer cells.....</b>	<b>43</b>
<b>3.5 The effect of ROR on apoptosis of gastric cancer cells.....</b>	<b>44</b>
<b>3.6 The effect of ROR on invasion and migration of gastric cancer cells .....</b>	<b>45</b>
<b>3.7 The effect of ROR on the epithelial-to-mesenchymal transition .....</b>	<b>47</b>
<b>Chapter 4 Discussion .....</b>	<b>48</b>
<b>Chapter 5 Conclusion .....</b>	<b>52</b>
<b>References .....</b>	<b>53</b>
<b>Abbreviations .....</b>	<b>59</b>
<b>Acknowledgement .....</b>	<b>61</b>
<b>Publications .....</b>	<b>62</b>

## 摘要

**背景:** 胃癌是消化系统常见的恶性肿瘤, 发病率高, 预后效果差。早期发现、早期诊断是目前提高胃癌患者生存率的关键环节, 因此, 寻找新的胃癌早期诊断的分子标志物是目前胃癌研究亟待解决的问题之一; 此外, 近年来肿瘤的分子靶向治疗方兴未艾, 但这些靶向治疗药物价格昂贵、疗效不稳且大多依赖进口, 因而, 从我国国情的实际出发, 寻找新的治疗靶点是我国目前肿瘤靶向治疗急需克服的困难。长链非编码 RNA-ROR 是最新发现对细胞重编程过程具有重要调控作用的非编码 RNA。目前研究发现 ROR 与乳腺癌、肝癌及胶质瘤的发生进展密切相关, 但 ROR 在胃癌中的作用还未见报道。本课题首先检测 ROR 在胃癌组织中的表达情况, 继而研究过表达 ROR 对胃癌细胞生物学行为的影响, 并进一步探讨其调控机制, 为胃癌寻找新的分子标志物及治疗靶点提供理论依据。

**方法:** 1. 采用实时荧光定量 PCR 技术 (qRT-PCR) 对 50 例胃癌及其配对正常组织中 ROR 的表达水平进行检测, 并对其临床病理特征的相关性进行统计分析; 2. 利用基因过表达技术构建 ROR 过表达载体, 通过慢病毒转染实现 ROR 在胃癌细胞株中的稳定过表达, qRT-PCR 检测转染效果; 3. 分别应用 CCK-8、流式细胞术、Transwell 实验检测过表达 ROR 后对胃癌细胞株生物学行为的影响; 4. 通过 Western Blot 实验检测过表达 ROR 后胃癌细胞株中 EMT 相关标志物的变化。

**结果:** 1. 在 50 例胃癌组织中, ROR 的表达量明显低于正常对照组织 ( $P < 0.001$ ); 2. 通过慢病毒转染胃癌细胞株 MGC-803 和 SGC-7901, 成功实现了 ROR 在胃癌细胞株的稳定过表达; 3. CCK-8、流式细胞术、Transwell 实验结果显示: 过表达 ROR 后对胃癌细胞的增殖能力无明显影响 ( $P > 0.05$ ), 但可以促进胃癌细胞的凋亡 ( $P < 0.05$ ), 降低胃癌细胞的侵袭及迁移能力 ( $P < 0.05$ ); 4. Western Blot 结果显示: 过表达 ROR 后 EMT 上皮性标志物 E-cadherin 表达升高, 而 EMT 间质性标志物 N-cadherin、Vimentin、 $\alpha$ -SMA 表达降低。

**结论:** ROR 在胃癌组织中表达量明显低于正常对照组织; 过表达 ROR 可以促进胃癌细胞的凋亡, 抑制细胞的侵袭及迁移, 但对细胞的增殖能力无明显影响; ROR 可能通过抑制 EMT 过程来抑制胃癌细胞的转移。

**关键词:** 胃癌 长链非编码 RNA ROR



## Abstract

**Background:** Gastric cancer is one of the most common malignant tumor in the digestive system, which has a high incidence and bad prognosis. Early detection and diagnosis is the key mean to improve the survival rate. Therefore, it is an urgent problem to identify new biomarkers for early diagnosis of gastric cancer. Moreover, with the development of molecular targeted therapy for cancers in recent years, lots of targeted drugs has been applied to clinical, but most of them are expensive and unstable, more importantly are dependent on imports. So, according to the actual situation of our country, it is also an urgent need to identify new molecular for targeted therapy in our country. Long intergenic non-coding RNA regulator of reprogramming (LincRNA-ROR), is a newly identified long non-coding RNA, was initially found to regulate the process of reprogramming. Present studies indicated that it played important roles in development and progression of breast cancer, hepatocellular carcinoma and glioma. However, the role of ROR in gastric cancer is largely unknown. The aim of our study was to investigate the expression, biological behaviors and mechanism of ROR in human gastric cancer, try to provide a theoretical basis for ROR as a new biomarker and potential therapeutic target of gastric cancer.

**Methods:** 1. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression levels of ROR in 50 gastric cancer tissues and its paired normal tissues, analyzed the relationship between the expression of ROR and its Clinicopathological features. 2. Over-expression approach was used to up ROR expression, the transfection efficiency was verified by qRT-PCR. 3. The effect of ROR after over-expression on proliferation and apoptosis was evaluated by CCK-8 assay and flow cytometry. Transwell assay was performed to detect the ability of migration and invasion in gastric cancer cells. 4. Western blot was used to detect the markers of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT).

**Results:** 1. The levels of ROR were significantly down-regulated in gastric cancer compared with normal tissues samples ( $P < 0.001$ ). 2. The ROR expression was

up-regulated in MGC-803 and SGC-7901 cells after stably transfected by lentivirus construction( $P<0.001$ ). 3.CCK-8 assay, flow cytometry,transwell assay indicated that there is little effect on cell proliferation about overexpression of ROR( $P>0.05$ ), but could significantly induced apoptosis( $P<0.05$ ), suppressed invasion and migration( $P<0.05$ ).4. Western blot has discovered the epithelial markers (E-cadherin) were up-regulated after ROR overexpression, whereas the mesenchymal markers (N-cadherin、Vimentin、 $\alpha$ -SMA) were reduced when we examined the EMT markers.

**Conclusion:** The levels of ROR was significantly down-regulated in gastric cancer tissues.Moreover, over-expression of ROR in gastric cancer cells could significantly induced apoptosis, suppressed invasion and migration, while had little effect on cell proliferation.Additionally,ROR could induce epithelial-to-mesenchymal transition to inhibit metastasis of gastric cancer cells.

**Keywords:** Gastric cancer; Long non-coding RNA; ROR

## 第一章 前言

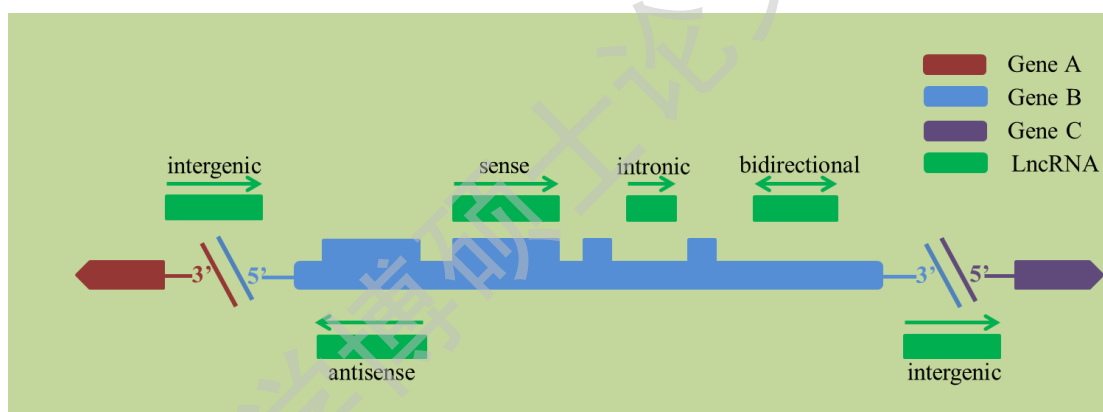
### 1.1 胃癌研究现状

胃癌是消化系统常见的恶性肿瘤，与生活习惯、地理环境、遗传、癌前病变及幽门螺杆菌的感染等密切相关。在其发生与进展中，往往伴随一系列基因的突变及表达模式的改变；此外，体内复杂的调控网络及庞大的分子机制又在不同层面影响着胃癌的进程，从而在多因素、多步骤共同作用下不断产生恶性后果。在世界范围类，胃癌是人类第四大常见的恶性疾病和第二大肿瘤致死性的疾病<sup>[1]</sup>，在占全球胃癌患者总数60%的亚洲国家中，中国是最多的。根据最新发布的《2015年中国肿瘤登记年报》显示，虽然胃癌的发病率整体呈下降趋势，但目前中国每年仍然有超过42万例的胃癌新发病例，居全球首位。对于大多数胃癌患者来说，被诊断时已是晚期，且常常伴随着恶性增殖、广泛外周侵犯和淋巴结转移，预后效果差。资料显示，大部分早期胃癌在内镜下即可获得根治性治疗，5年生存率超过90%，然而，目前中国早期胃癌的诊治率不足10%，这对提高患者的生存率是极为不利的。胃癌以手术治疗为主，虽然近年来随着技术在不断提高，综合治疗手段越来越丰富（包括化疗、靶向治疗等），但胃癌的生存率仍然不容乐观<sup>[2]</sup>。在中国，胃癌患者的5年生存率不足40%<sup>[3]</sup>。因此，如何实现胃癌的早期诊断、怎样做到有效治疗一直都是研究人员迫切解决的问题。

随着研究的不断深入及生物技术的不断更新进步，分子生物学和基因工程技术使我们认识到，肿瘤是正常细胞内基因组多重改变所产生的。从分子遗传学的角度来看，肿瘤可被看作一类基因疾病，是由某些或某一类基因损伤使体细胞发生突变的结果，外界的环境等致癌因素只是诱因，基因改变才是根本原因，从癌变机理中说明胃癌与其他肿瘤一样，它的产生是在原癌基因的激活和抑癌基因的失活、系列基因表达异常及调控机制失控等情况下共同作用的结果。这是一大飞跃，使得我们对肿瘤的研究从临床现象转移到更加微观、更加精确的研究体系上，让我们从本质上更加清晰的认识到基因表达及调控所蕴含的巨大能量。这不仅极大的促进了胃癌的基因诊断及靶向治疗研究的发展，也为胃癌的早期诊断、有效治疗、提高患者的生存率提供了新的希望。

## 1.2 长链非编码 RNA 简介

通过对人类基因组的大规模测序及高通量转录技术分析,我们发现,人体内蛋白编码基因仅占约 20000 种,其余绝大部分的基因为非编码 RNA<sup>[4]</sup>。这些非编码的 RNA 根据其分子量的大小分为:短链非编码 RNA (<200nt) 和长链非编码 RNA。短链非编码 RNA 包括在肿瘤中起重要作用的 microRNAs, 而长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)虽然广泛存在于基因组中,但一度被认为无功能的而未受到重视。LncRNA 是指一类转录本长度大于 200 核苷酸且不具有蛋白质编码功能的长链 RNA 分子<sup>[5]</sup>。它具有高度保守的序列元件、特定的空间二级结构,亚细胞定位也较复杂,可位于细胞核内或胞浆中<sup>[6]</sup>。根据基因的位置及特点, lncRNA 可分为正义 (Sense)、反义 (Antisense)、双向(Bidirectional)、基因内(Intronic)及基因间(Intergenic)五类<sup>[7-8]</sup>, 如下图一所示。



图一 lncRNA 的分类略图

随着研究的不断深入,越来越多的人认识到 lncRNA 并非安静的存在于基因组中,如编码蛋白的基因一样,它在机体的生物学过程中发挥着重要的作用,能在多种水平调控基因表达<sup>[9-10]</sup>,且异常表达的 lncRNA 与多种疾病密切相关<sup>[11-12]</sup>, lncRNA 已成为近十年来研究的新热点。就肿瘤来说,目前发现了大量的 lncRNA 与肿瘤的发生、发展、侵袭及转移等生物学行为密切相关。如研究发现 HOTAIR<sup>[13]</sup>与肝癌、乳腺癌、结直肠癌、胃间质瘤等密切相关; H19 在食管癌、膀胱癌、结肠癌等中存在表达异常。此外,在肝癌中首个发现的 lncRNA,高表达的 HULC<sup>[14]</sup>通过直接作用靶基因而参与癌变过程;与非小细胞肺癌明显相关的 MALAT-1<sup>[15]</sup>能显著促进肿瘤的转移;具有组织特异表达的 PCA3 可作为诊断前列腺癌敏感的肿瘤标志物;在甲状腺癌中异常表达的 PTCSC3,通过与 miR-574-5p 相互作用

来调控细胞增长和凋亡<sup>[16]</sup>。

现在大量的数据表明：lncRNA 具有丰富的生物学功能，其广泛的调控机制及在疾病进程中作用越来越受到人们的重视，尤其是在肿瘤中，lncRNA 可作为一种新型肿瘤分子标志物及靶向治疗的靶点<sup>[17]</sup>，为肿瘤的诊断及治疗提供了开辟了新前景。

## 1.3 LincRNA-ROR 的发现及功能

### 1.3.1 ROR 的发现

细胞重编程(Reprogramming)是指在特定条件下将已分化的细胞通过导入多能性转录因子(transcription factors, TFs)而逆转成具有类似干细胞特性的细胞的过程，在此过程中，往往伴随着大量基因表达模式及调控机理的改变<sup>[18-19]</sup>。LincRNA-ROR (Regulator of reprogramming)是最新发现的对细胞重编程过程具有重要调控作用的长链非编码 RNA。2010 年 Sabine Loewer 等<sup>[20]</sup>为研究 lncRNA 是否参与了细胞重编程过程，于是将成纤维细胞诱导成具有干细胞特性的诱导多能性干细胞 (Induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs)，然后通过基因筛选，并以胚胎干细胞 (Embryonic stem cells, ESCs)为参照，发现与原始的母细胞相比，重编程形成的 iPSC 中有 237 种 lncRNA 的表达存在不同程度的改变，由此说明重编程过程中伴随着大量 lncRNA 的活化或抑制。为充分研究 lncRNA 在重编程过程中的作用，研究人员利用染色质免疫共沉淀 (ChIP) 等技术手段，最终从活化的 lncRNA 筛选出对转录因子具有调控作用的 lincRNA-ST8SIA3，因其通过介导转录因子的表达而调控细胞重编程过程，因此将 lincRNA-ST8SIA3 命名为 Regulator of reprogramming，即 ROR<sup>[20]</sup>。ROR 位于第 18 号染色体，全长 2.6kb，由四个外显子组成，亚细胞定位显示其在胞核和胞浆中都有存在，它通过调节多能性转录因子 Oct4、Sox2 和 Nanog 的表达来维持 iPSCs 的自我更新及多向分化的潜能。

### 1.3.2 ROR 的功能

#### 1.3.2.1 ROR 通过与 miR-145 的相互作用而调控转录因子的表达

如上所述，Sabine Loewer 等<sup>[20]</sup>发现通过调控 ROR 的表达能引起转录因子 Oct4、Sox2 和 Nanog 出现差异性的改变，但具体的机制尚不清楚。但在另外对 microRNA

的研究中, Xu 等<sup>[21]</sup>发现 miR-145 能抑制 Oct4、Sox2 和 KIF4 的表达。此外, 大量的数据表明, 在机体内 lncRNA 可通过与 miRNA 的竞争性作用, 进而参与到 miRNA 的调控机制中<sup>[22-23]</sup>。因此, 为深入发掘 lncRNA 的功能, 研究人员以 miRNA 为桥梁, 通过研究其与 miRNA 的相互作用而充分认识 lncRNA。Wang 等<sup>[24]</sup>通过研究 ROR 与 miR-145 的相互作用中发现, 在 ROR 和多能性因子 (TFs) 的基因序列上均含有 miR-145 的作用位点, ROR 通过与 miR-145 的竞争性相结合, 阻止其结合到 TFs 上, 从而阻断 miR-145 对 TFs 的抑制作用, 间接的提高了 TFs 在胚胎干细胞中的表达水平, 维持 hESC 的自我更新和多能性。

### 1.3.2.2 ROR 参与细胞的氧化应激过程

在 ROR 发现的过程中, 研究人员通过基因筛选, 发现在抑制 ROR 的表达后机体中与 P53 反应相关的基因活性表达增加<sup>[20]</sup>, 但具体的机制尚不清楚。在随后的研究中, Ali Zhang 等<sup>[25]</sup>发现: 正常情况下 ROR 对 P53 无明显; 但在 DNA 损伤等刺激下, 胞质中磷酸化的不均一核糖核蛋白 I (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein I, hnRNP I) 与 ROR 序列上的结合位点相结合, 在翻译水平上抑制 P53 的表达。转录因子红细胞系-2p45(NF-E2) 相关因子-2( Nuclear factor erythroid-2 related factor2, Nrf2) 是维持体内氧化还原平衡重要的因子, Yongshu Zhang 等<sup>[26]</sup>在对乳腺干细胞的研究中发现, ROR 侧翼的两个启动子上存在 Nrf2 反应元件, Nrf2 与其结合后能抑制 ROR 的表达, 说明在一定程度上 ROR 可能参与维持体内氧化还原平衡, 但具体的机制仍有待进一步的研究。

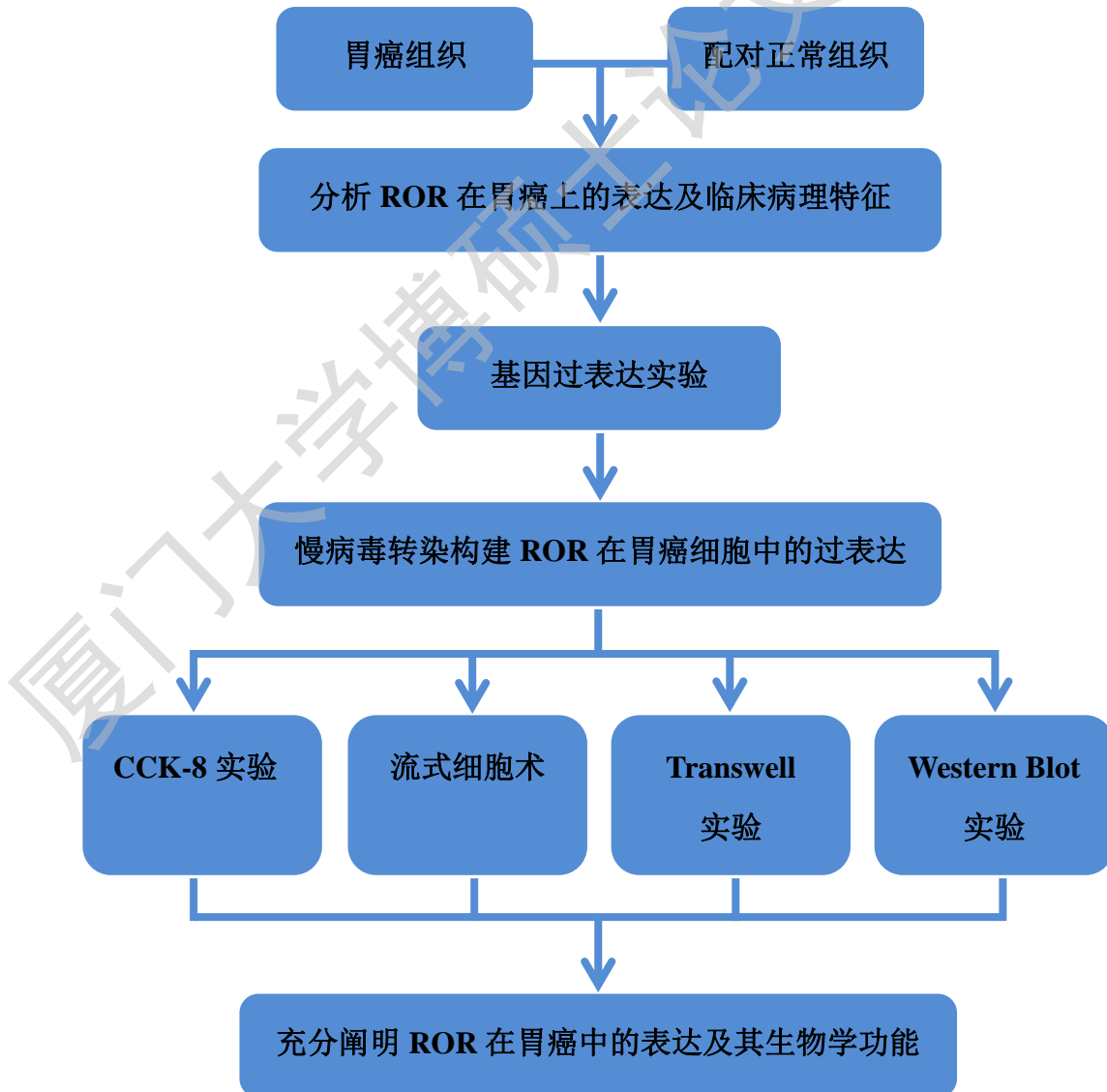
### 1.3.2.3 ROR 在肿瘤中的作用

关于 ROR 在肿瘤中的作用, 目前研究相对较少, 现有报道 ROR 与乳腺癌、肝癌、胶质瘤密切相关。Hou P 等<sup>[27]</sup>研究发现: 在乳腺癌中高表达的 ROR 能通过调控上皮-间质转化(Epithelial to mesenchymal transition, EMT)的过程促进乳腺癌的发生与转移, 其机制可能是 ROR 作为 miR-205 的竞争内源性 RNA, 通过抑制 miR-205 的表达从而降低其对靶基因 ZEB1 和 ZEB2 的抑制作用, 进而促进 EMT 过程; Gabriel Eades 等<sup>[28]</sup>发现在三阴乳腺癌中, ROR 通过与 miR-145、ARF6 的相互作用来调控肿瘤的侵袭能力。在肝癌及耐药性方面, 通过胞外囊泡转移的 ROR 可作为一种细胞间的信号介质, 能减弱化疗药物对细胞的损伤<sup>[29-30]</sup>。此外, 在胶质瘤中低表达的 ROR 能抑制肿瘤细胞的增殖及胶质瘤干细胞的更新<sup>[31]</sup>。

## 1.4 本研究的实验设计

综上所述，ROR 作为新发现的 lncRNA，它具有丰富的生物学功能，并与多种肿瘤的发生与发展密切相关，但关于 ROR 在胃癌上的作用，目前还未见相关报道。本研究以胃癌患者的组织标本为检测对象，通过实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）方法检测 ROR 在胃癌及其正常组织中的表达水平，并分析其临床意义；同时，利用基因过表达技术，构建 ROR 稳定过表达的胃癌细胞株，通过 CCK-8 实验、流式细胞术、体外迁移及侵袭实验等方法检测过表达 ROR 后对胃癌细胞增殖、凋亡及转移的影响，充分阐明 ROR 在胃癌上的生物学功能。

技术路线：



## 第二章 材料和方法

### 2.1 材料

#### 2.1.1 组织样本及其临床资料

50 例胃癌及其配对的正常组织（距离癌灶 5cm 以上）均取自 2011 年 1 月至 2013 年 10 月厦门大学附属中山医院胃肠外科胃癌手术患者，术后经病理确诊为胃癌，患者术前均未接受放化疗。其中男性 45 例，女性 5 例，年龄 24~84 岁，平均（62.36±11.29）岁。按 2010 年国际抗癌联盟/美国癌症联合委员会（UICC/AJCC）胃癌 TNM 分期标准：I 期 2 例，II 期 12 例，III 期 22 例，IV 期 14 例。胃癌分化程度：中分化腺癌 23 例，中-低分化腺癌 4 例，低分化腺癌 23 例。胃周淋巴结转移情况：37 例发生淋巴结转移，13 例未发生淋巴结转移，具体的临床资料见表一所示。所有的样本均剪成直径约 0.5cm 大小的组织块，放入去酶的冻存管中后立即置于液氮中冻存，随后转入-80℃冰箱长期保存，整个收集及保存过程均按照无酶操作原则进行。本研究经厦门大学附属中山医院伦理委员会批准，所有纳入的患者均在术前签署知情同意书。

表一 50 例胃癌患者临床资料

序号	性别	年龄	肿瘤分化	TNM	分期
1	男	53	中分化腺癌	T4aN2M0	IIIC
2	男	55	低分化腺癌	T4aN0M0	II B
3	男	40	低分化腺癌	T3N3M0	IV
4	女	70	低分化腺癌	T4N3M1	IV
5	男	82	中-低分化腺癌	T3N1M0	III A
6	男	58	中-低分化腺癌	T3N3M0	III C
7	男	70	低分化腺癌	T4aN1M0	III A
8	男	66	中分化腺癌	T4aN3aM1	IV
9	男	57	中分化腺癌	T4aN3bM1	IV
10	男	56	中分化腺癌	T4aN1M1	IV
11	男	60	低分化腺癌	T4aN3bM1	IV
12	女	78	低分化腺癌	T4N2M0	III B
13	男	56	低分化腺癌	T4N1M0	IV



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.