

· 临床研究 ·

## 联合检测外周血 AFP mRNA、h-TERT mRNA 对肝细胞肝癌的诊断价值\*

张利国<sup>1</sup>, 周杰<sup>1</sup>, 林建华<sup>1</sup>, 张兴<sup>2</sup>

(1. 南方医科大学附属南方医院肝胆外科, 广州 510515; 2. 河南省鲁山县人民医院 467300)

**摘要:**目的 探讨肝细胞肝癌患者外周血 AFP mRNA、h-TERT mRNA 表达对肝细胞肝癌的诊断价值。方法 应用荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)定量检测 60 例肝细胞肝癌患者外周血 AFP mRNA、h-TERT mRNA 的表达量,并与对照组进行比较。结果 肝细胞肝癌患者外周血中的 AFP mRNA、h-TERT mRNA 表达量比对照组增高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。它们的阳性率分别达到 76.7%、83.3%,和对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ );联合两个指标进行检测,敏感度提高到 92.6%,同时其特异度为 97.2%,是诊断肝细胞肝癌的良好肿瘤标志物。其表达结果与肿瘤包膜是否完整、有无肝内浸润和(或)转移明显相关( $P < 0.05$ );而与肝癌组织的分化程度、外周血 AFP 的表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 在外周血中定量检测 AFP mRNA、h-TERT mRNA 表达量可以作为肝细胞肝癌的诊断指标,能够早期发现肿瘤,甚至可以发现其他检测方法尚不能发现的小肝癌,联合检测的意义更为明显。

**关键词:**肝细胞肝癌;早期诊断;实时荧光定量检测;AFP mRNA;h-TERT mRNA

**中图分类号:**R734.1;R730.43

**文献标识码:**A

**文章编号:**1671-8348(2010)13-1672-02

## Value of combined detection of AFP mRNA and h-TERT mRNA in peripheral blood of hepatocellular carcinoma\*

ZHANG Li-guo<sup>1</sup>, ZHOU Jie<sup>1</sup>, LIN Jian-hua<sup>1</sup>, et al.

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated NanFang Hospital of Southern

Medical University, Guangzhou, 510515, China; 2. The People's Hospital of Lushang County, Henan 467300, China)

**Abstract: Objective** To study the value of combined detection of the serum levels of AFP mRNA and h-TERT mRNA in the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. **Methods** The serum levels of AFP mRNA and h-TERT mRNA in 30 patients with hepatocellular carcinoma and 35 controls were measured by real-time quantitative PCR, then the correlation between the expression of h-TERT mRNA, AFP mRNA and the malignant nature of HCC was analyzed. **Results** AFP mRNA, h-TERT mRNA expression value in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma were higher than the control group significantly ( $P < 0.01$ ). The positive rate of AFP mRNA, h-TERT mRNA in hepatocellular carcinoma group were 76.7%, 83.3%, respectively. They were significantly higher than those in control group ( $P < 0.01$ ). But there were no expression in control group in AFP mRNA and there was appostive case in h-TERT mRNA in control group. Sensitivity of combined detection of two kinds of tumormarkers was 92.6%. The specificity of this experiment was 97.2%. It was significantly higher than that of single detection. **Conclusion** Combination of detection of AFP mRNA, h-TERT mRNA in peripheral blood is a sensitive and valuable assay for the early prediction of the prognosis of the HCC patients. And it can also help to distinguish the potential patients.

**Key words:** HCC; early Diagnosis; FQ-PCR; AFP mRNA; h-TERT mRNA

肝细胞肝癌是一种严重危害人类生命健康的恶性肿瘤。其发病率居高不下,早期发现、早期诊断、早期治疗可以提高患者的生存率,改善其预后<sup>[1]</sup>。而对肝肿瘤的早期诊断,目前采用的 B 超、CT 扫描等手段通常难以实现;检测 AFP 可以作为肿瘤标志物用于肝癌人群筛检,但其阳性率和特异性较低,结果不够理想,因而使用新的、更为敏感的肝癌标志物就显得非常的必要。作者应用灵敏的荧光定量 PCR 技术分析肝细胞肝癌患者外周血中 AFP mRNA、h-TERT mRNA 的表达量作为肿瘤标志物,达到对肝细胞肝癌的早期诊断,为临床早期诊断提供更为合理的方案。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 南方医科大学附属南方医院肝胆外科 2008 年 1~11 月收治的肝癌患者,术前经影像学、血清 AFP 检测以及临床资料证实为原发性肝癌,并行肝癌切除手术治疗,术后经病理证实为肝细胞癌患者 60 例,其中男 38 例,女 22 例,患者平均年龄( $51.2 \pm 10.4$ )岁;血清 AFP 阳性( $AFP \geq 200 \mu\text{g/L}$ )

40 例(66.7%);肿瘤直径大于或等于 5 cm 者 36 例(60%);肉眼及镜下门静脉癌栓 14 例(23.3%);肝内转移者 16 例(26.7%);肝外转移者 8 例(13.3%);肿瘤细胞分化程度高、中、低度者分别为 20 例(33.3%)、28 例(46.7%)、12 例(20%)。对照组为 35 例肝外良性病变者或健康人。

**1.2 标本采集** 所有对象均于清晨空腹采集外周静脉血 5 mL,应用含 EDTA 的抗凝剂抗凝。静脉血采集后立即提取总 RNA。

**1.3 总 RNA 的提取与 cDNA 的合成** 总 RNA 的提取按 TRIZOL(invitrogen)说明书进行操作。总 RNA 提取后即进行 cDNA 合成,反应体系包括:(1)  $5 \times$  缓冲液 4  $\mu\text{L}$ ;(2) dNTP (10 mM) 1  $\mu\text{L}$ ;(3) 随机引物(50 uM) 1  $\mu\text{L}$ ;(4) RNasin (40 u/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ ;(5) M-MLV(200 u/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ ;(6) 总 RNA 1~2  $\mu\text{g}$ ;(7) 加 DEPC 处理的三蒸水至 20  $\mu\text{L}$ 。在全自动 PCR 仪按照说明设定参数,产物置于 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。

**1.4 荧光定量 PCR 检测 AFP mRNA、h-TERT mRNA 方法**

\* 基金项目:广东省科技计划基金资助项目(2007B031514004)。

表 1 AFP mRNA 和 h-TERT mRNA 在肝癌和对照组的相对表达量

组别	AFP mRNA 平均 CT 值	h-TERT mRNA 平均 CT 值	AFP mRNA $\Delta\Delta CT$	h-TERT mRNA $\Delta\Delta CT$	AFP mRNA $2^{-\Delta\Delta CT}$	h-TERT mRNA $2^{-\Delta\Delta CT}$
对照组	36.32±1.09	35.87±2.68	0.00±0.08	0.00±0.09	1	1
术前组	24.92±6.57	23.46±4.72	-11.31±6.27	-12.32±4.39	2538.92±8.94	5113.16±36.07

的建立

**1.4.1 引物的设计、合成** 从 GenBank 中调出 AFP 和 h-TERT 的 RNA 序列,根据引物设计原则,利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,跨内含子序列。AFP 上游引物:5'-AGA TAG CAA GAA GGC ATC CCT T-3';下游引物:5'-CCT TTG TTT GGA AGC ATT CAA CTG 3';h-TERT 上游引物:5'-CGG AAG AGT GTC TGG AGC AA-3';下游引物:5'-GGA TGA AGC GGA GTC TGG A-3';GAPDH 上游引物:5'-GGG TGT GAA CCA TGA GAA TG-3';下游引物:5'-CCA AAG TTG TCA TGG ATG ACC T-3';引物由上海英骏公司合成。

**1.4.2 FQ-PCR 定量分析** 用 real-time PCR 仪(Bio-Rad 公司)及 SYBR Green I (北京百泰克公司)试剂,进行荧光定量分析 AFP mRNA、h-TERT mRNA 含量,并用 GAPDH 作为参照正常化校正。分别用 AFP、h-TERT 的 cDNA 样品和 GAPDH 样品倍比稀释做标准曲线,呈现良好的线性关系, $r^2$  分别是 0.999、0.998 和 0.999。样品管均外加 2 个复管,结果取其均值,另设空白和阴性对照管。FQ-PCR 反应条件:93℃ 预变性 2 min,93℃ 45 s,55℃ 120 s,共 45 个循环,反应结束后荧光定量仪自动给出相关的结果和曲线。

**1.5 统计学方法** 以  $\Delta Ct$  为差异比较的基础,相对定量公式为  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ;其中  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{未知样品}) - \Delta Ct(\text{内参})$ ,结果为倍数关系。 $Ct$  值反映了模板扩增到一定量拷贝数时(处于指数上升期)所需反应循环数大小。 $Ct$  值越大,参与反应的起始的模板量就越小,反之则越大。用 SPSS13.0 软件对数据进行统计分析,组间的比较和相关性统计均用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

以循环数  $Ct$  为纵坐标,以样品各稀释度的倍数值为横坐标作标准曲线,观察到各个指标的扩增效率基本一致,可以用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  分析数据,结果见表 1。

各组间表达结果差异显著,同时 AFP mRNA、h-TERT mRNA 在各组中的阳性表达也存在较大差异,结果见表 2。

表 2 AFP mRNA、h-TERT mRNA 在两组表达情况[n(%)]

组别	n	AFP mRNA	h-TERT mRNA
对照组	35	0(0.0)	1(2.8)
HCC 组	60	46(76.7)*	50(83.3)*
$\chi^2$		88.697	88.707
P		0.000	0.000

与对照组比较,差异有统计学意义,\* :  $P < 0.001$ 。

在对照组 35 例中,无论是 AFP mRNA 还是 h-TERT mRNA,几乎没有表达,仅 1 例 h-TERT mRNA 表达阳性,而在肝细胞肝癌中二者都有明显的表达,两组之间差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。在肝细胞肝癌患者中,AFP mRNA 和 h-TERT

mRNA 的阳性检出率分别为 76.7%、83.3%,与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。进一步分析它们表达的相关因素,有远处转移与肝内转移者阳性率均为 100%。其表达和血清中 AFP 的量以及肿瘤的分化程度没有明显相关性( $P > 0.05$ ),与门静脉癌栓也密切相关( $P < 0.05$ )。

**3 讨论**

由于 mRNA 不仅是基因在转录水平的表现,也可作为细胞表型的标志,能在细胞无任何形态变化的情况下判断该细胞的表现型,因此,其作为肝细胞肝癌诊断指标可以发现一些早期甚至是亚临床期的肝细胞肝癌。现采用外周血循环细胞 RNA 进行反转录 PCR 检测肿瘤标志物的表达情况,由此判断是否存在癌细胞,以达到早期诊断肿瘤的目的。在部分肝细胞肝癌患者中,由于 AFP 基因在表达过程中翻译缺失而停止转录之后,血清 AFP 表达为阴性<sup>[2]</sup>,而 AFP mRNA 则为阳性,故检测 AFP mRNA 可对血清 AFP 阴性的患者做出早期诊断,弥补了现行单纯以 AFP 作为诊断依据的不足。本研究也证实,肝细胞肝癌患者 AFP 阳性率为 66.7%,而 AFP mRNA 的阳性率为 76.7%,是比 AFP 更加敏感的指标。近年来,国内外很多学者报道了 RT-PCR 法检测外周血中 AFP mRNA 在肝癌诊断和鉴别诊断中的作用。石宏等<sup>[3]</sup>报道检测患者外周血中癌细胞表达的 AFP mRNA 阳性率为 76%,高于血清 AFP 阳性率 64%,表明检测 AFP mRNA 较 AFP 灵敏度高,在部分血清 AFP 阴性的肝细胞肝癌患者,检测外周血 AFP mRNA 有助于诊断的确立。Zhu 等<sup>[4]</sup>的研究结果表明,外周血 AFP mRNA 在原发性肝癌患者中的检出率为 53.7%,AFP mRNA 检出率与血清 AFP 浓度之间无明显关系。因此,检测外周血 AFP mRNA 与血清 AFP 有互补性,对血清 AFP 阴性的部分 PHC 可做出诊断,提高诊断准确率。本研究以单纯的肝细胞肝癌为对象,排除了胆管细胞癌和混合细胞癌,故 AFP mRNA 的结果更高,达到 76.7%,阳性率也显著提高。Tamaoki 和 Fausto<sup>[5]</sup>认为在肝细胞肝癌患者中,AFP 基因的表达再次被激活,其 AFP mRNA 的水平高于正常肝细胞的 30~1 000 倍。本实验证明,如果应用更为灵敏的荧光定量 PCR 技术,则肝细胞肝癌患者外周血中 AFP mRNA 的检出率明显增高,但总体阳性率仍不是非常满意,存在偏低的问题。本研究的阳性率也只有 76.7%,如果采取联合检测 h-TERT mRNA 则可以较好地解决这个问题。徐焰等<sup>[6]</sup>证实,联合检测可以明显提高肝癌的诊断率。h-TERT mRNA 在良性疾病患者和健康人中几乎不表达,在恶性肿瘤患者中才会出现较高的表达,是检测恶性肿瘤的一个很好的标志物。大多数恶性肿瘤端粒酶活性升高,检测端粒酶的表达为恶性肿瘤的诊断和治疗开辟了新的途径,已成为诊断恶性肿瘤和判断预后的重要指标。Wang 等<sup>[7-8]</sup>应用荧光定量技术检测外周血中 h-TERT mRNA 的表达,结果显示该项指标在作为肿瘤标志物的价值优于 AFP mRNA。本实验的结果也说明,h-TERT mRNA 是比 AFP mRNA 更敏感的指标,其阳性率达 83.3%。总体来说,单纯应用一种作为检验指标还存在阳性率较(下转第 1676 页)

了输卵管<sup>[6]</sup>。如包块较大破裂出血,并与周围组织相连形成较大的囊实性包块,内部回声杂乱,TVS 能显示更为清晰的内部回声特点及解剖关系。

EP 的包块多为 2~3 cm, TAS 宫内外妊娠囊内很少见到胚芽及胎心搏动等,而 TVS 能清晰分辨包块内的孕囊样回声及孕囊内的胚芽和胎心搏动,诊断符合率明显高。有学者认为,在附件区非特异性包块中检测到的与卵巢分离的低阻血流(RI<0.6)代表了 EP 的滋养血流<sup>[7]</sup>,其发现可明显提高 EP 诊断的敏感性。

有文献报道孕周在 4~6 周为“妊娠盲区”,处于这段时期, TAS 有时不能识别和作出妊娠诊断,而彩色多普勒 TVS(CD-FI-TV S)的应用,使“妊娠盲区”逐渐缩小,而且 TVS 能早于 TAS 1 周左右发现宫内 0.5~1.0 cm 左右的小孕囊<sup>[8]</sup>,故可较后者早期诊断 IUP,但对于大于 6 周的 IUP 两者比较差异无统计学意义。

TAS 扫查范围大,便于观察盆腹腔积液、子宫、包块以及相互关系等,但探头频率低,图像质量低于 TVS,且容易受膀胱充盈程度、肠气、肥胖等因素的影响。联合扫查可以相互补充信息,进一步提高诊断准确率。TVS 的缺点是扫查范围受限,但频率高,图像分辨率好,探头放置于阴道内,接近检查部位,受干扰因素少,容易发现小包块,对孕囊结构、卵黄囊、胚芽、原始心管搏动等精细结构的显示更清晰,更容易区分孕囊、附件包块的性质以及包块与卵巢的关系<sup>[9]</sup>,极大地减少了误诊、漏诊率,因而 TVS 对宫外孕包块的检出率较 TAS 检查明显提前提高。

HP 时宫内妊娠能否成功存活与手术时机及术前孕妇情况有相当大的影响,TVS 的应用,提高 EP 诊断的敏感性,进而提供了 HP 的准确率,早发现早诊断 HP,对其宫外胚胎早手术可使手术对宫内胎儿的影响减至最低。

输卵管妊娠者宜实行根治性输卵管切除,虽然有可能影响卵巢血供,但能防止持续性 EP,避免再次腹腔内出血。治疗 EP 的手术方式有开腹手术及腹腔镜手术。开腹手术中操作应轻柔,尽量减少对宫内妊娠的影响,术后应行病灶病理检查,异位妊娠灶的去除可能引起体内激素水平的波动,会出现先兆流

产征象,术后动态监测激素变化,根据激素水平调整孕酮用量。腹腔镜手术中电切输卵管造成局部高温和 CO<sub>2</sub> 气腹对人体呼吸、循环系统产生的影响,对宫内胚胎是否有影响需要进一步探讨。

联合应用 TAS 与 TVS 检查,可互相弥补不足,提早对 HP 的诊断准确率,对临床确定治疗方案,减少宫外孕破裂大出血的机会,提高宫内胚胎的存活率,具有至关重要的作用。

#### 参考文献:

- [1] 魏淑贞,陈士岭.体外受精-胚胎移植术后宫内外同时妊娠 11 例分析[J].实用医学杂志,2007,23(14):2219.
- [2] Habana A, Dokras A, Giraldo JL, et al. Cornual heterotopic pregnancy: contemporary management options[J]. Am J Obstet Gynecol, 2000, 182(5):1264.
- [3] Tal J, Haddad S, Gordon N, et al. Heterotopic pregnancy after ovulation induction and assisted reproductive technologies: a literature review from 1971 to 1993[J]. Fertil Steril, 1996, 66(1):1.
- [4] 姜娅莉,宫内外同时妊娠 2 例[J].重庆医学,2005,34(10):1599.
- [5] 高碧兰,宫内外同时妊娠 2 例[J].西南国防医药,2006,16(3):291.
- [6] Reece EA, Petrie RH, Srmans MF, et al. Combined intrauterine and extrauterine gestations: a review[J]. Am J Obstet Gynecol, 1983, 146(3):323.
- [7] 万青,余虹.经阴道超声诊断输卵管妊娠的临床价值[J].中国超声诊断杂志,2004,5(4):296.
- [8] 余雯.经阴道彩色多普勒超声在妇产科中的应用[J].中国超声医学杂志,1999,15(2):146.
- [9] 赵云,黄华,聂红莲.宫外孕诊断中经腹与经阴道超声的临床评价[J].湖北民族学院学报:医学版,2006,23(1):44.

(收稿日期:2009-12-18 修回日期:2010-02-09)

(上接第 1673 页)

低的问题,如果把两者结合,则可以使肝细胞肝癌的检出率提高到 92.6%,比现行的检测 AFP 的做法优越,同时其特异性也达到 97.2%,是非常理想的肿瘤诊断标志物。

#### 参考文献:

- [1] Rudzki S, Jamroz A. Chemoembolization and ethanol ablation of primary hepatic carcinoma and metastatic tumors [J]. Pol Merkur Lekarski, 2004, 16(91):78.
- [2] Luzzi KJ, Macdonald IC, Schimidt EE, et al. Multi step nature of metastatic efficiency. Dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases [J]. Am J Pathol, 1998, 153(3):865.
- [3] 石宏,马振华,郝大林.联合检测外周血中 AFP mRNA 和 AFP 在原发性肝癌诊断中的临床意义[J].中国实验诊断学,2008,12(5):637.
- [4] Zhu YS, Yang DM, Yao DF, et al. The clinical value of u-

nited detecting AFP mRNA and alumin mRNA in peripheral blood[J]. Chinese Journal of Digestion, 2002, 22(3):176.

- [5] Tamaoki T, Fausto N. Expression of the  $\alpha$ -fetoprotein gene during development, regeneration and carcinogenesis [M]. In: Stein, Stein, eds. Recombinant DNA and cell proliferation. San Diego: Academic Press, 1984:145.
- [6] 徐焰,陈名声,郝晓柯.联合检测血清 AFU、AFP 肿瘤标志物在原发性肝癌诊断中的临床价值[J].重庆医学,2008,12(24):2805.
- [7] Wang WB, Rui JG, Liu YH, et al. The detection of  $\alpha$ -fetoprotein mRNA in peripheral blood of patients with hepatic carcinoma and its clinical significance[J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2000, 15(1):47.
- [8] Shay JW, Bacchett IS. A survey of telomerase activity in human cancer[J]. Eur J Cancer, 1997, 33(5):787.

(收稿日期:2009-09-10 修回日期:2009-12-20)