

· 临床研究 ·

荧光实时定量 PCR 对肺癌相关基因检测及其临床意义

王明贤¹, 杨 华¹, 杨志强²

(1. 乐山职业技术学院, 四川乐山 614000; 2. 中山大学医学院, 广州 510080)

摘要:目的 采用荧光实时定量 PCR 对肺癌相关基因检测并建立辅助诊断指数。方法 采用荧光实时定量 PCR 对肺癌患者手术标本 LUNX、CK19、CEA、MUC1 及 Survivin 等肺癌相关基因 mRNA 进行检测, 运用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 算法计算相对表达量, 并以此建立辅助诊断指数。结果 LUNX、CK19、CEA、MUC1 及 Survivin 在正常肺组织、手术切缘、癌旁与肿瘤组织间的表达比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且呈现递增趋势; 设定辅助诊断指数大于或等于 3.5 为肺癌时, 其敏感度 95%, 特异度为 92%, 阳性结果预示值 (PPV) 为 95.33%, 阴性结果预示值 (NPV) 为 98.00%。结论 利用荧光实时定量 PCR 对肺癌相关基因进行检测并建立辅助诊断指数, 能有助提高肺癌诊断的敏感度与特异度。

关键词: 聚合酶链反应; 肺肿瘤; 分子辅助诊断指数

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.06.013

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)06-0635-02

Application of real-time fluorescent quantitative PCR in detection of lung cancer-related genes and its clinical significance

Wang Mingxian¹, Yang Hua¹, Yang Zhiqiang²

(1. Leshan Vocational and Technical College, Leshan, Sichuan 614000, China;

2. School of Medicine, Zhongshan University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

Abstract: Objective To apply real-time fluorescent quantitative PCR to detect lung cancer-related genes and established molecular diagnostic index. Methods Applied real-time fluorescent quantitative PCR to detect gene LUNX, CK19, CEA, MUC1 and Survivin of surgical specimen from patients with lung cancer. Relative expression of these genes were calculated by $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, based on which, MDI was established. Results Differential expression of LUNX, CK19, CEA, MUC1 and Survivin were found in normal, surgical margin, paratumor and tumor tissues ($P < 0.05$), a significant decline trend was found. When MDI was set ≥ 3.5 equivalent to cancer, MDI's sensitivity was 95%, specificity was 92%, positive result predicted value (PPV) was 95.33%, negative results predicted values (NPV) was 98.00%. Conclusion Sensitivity and specificity of diagnosis of lung cancer could be enhanced by MDI which is established based on real-time fluorescent quantitative PCR detection of related genes.

Key words: polymerase chain reaction; lung neoplasms; molecular diagnostic index

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一, 严重威胁人类生命及健康, 发病率较高, 且有继续增高的趋势。通过影像学及病理学检查虽可发现, 但由于无法发现隐性病灶、亚临床病灶及微小转移灶的资料与证据, 目前做到早期发现尚存在一定的难度, 大部分患者在出现临床症状而就诊时疾病已经处于中晚期, 从而错过手术时间窗。据统计, 肺癌的 5 年生存率不足 15%^[1]。近年来, 肿瘤基因类标志物研究取得长足进展, 已经成为肿瘤分子诊断的重要内容之一, 通过分析肿瘤相关基因的关系、类型、表达及缺陷等, 最终达到肿瘤早期诊断的目的^[2]。本研究采用荧光实时定量 PCR 对肺癌相关基因 LUNX、CK19、CEA、MUC1 及 Survivin 进行检测分析并建立辅助诊断指数, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2009 年 9 月至 2011 年 9 月于中山大学医学院胸外科行手术治疗的肺癌患者 34 例, 其中男 19 例, 女 15 例; 年龄 27~67 岁, 平均 (46.72 ± 5.88) 岁; 所有患者均经过术后病理检查确诊。应用世界卫生组织 (WHO) 1999 年对肺癌的组织学分类方法, 发现小细胞肺癌 (SCLC) 患者 12 例, 非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者 22 例; 按照国际抗癌联盟 (UICC) 1997 年对肺癌 TNM 分期方法进行分期, 其中 I 期 6 例, II 期 10 例, III 期 14 例, IV 期 4 例。收集患者手术切除的肿瘤、肿瘤切缘组织及切缘周围 2 cm 组织。另取同期 10 例行肺大泡切

除术患者肺组织作为正常对照组。本研究对术前评价具有手术适应证患者进行手术, 有些 SCLC 以及 IV 期的 NSCLC 均为术后补充诊断。

1.2 方法

1.2.1 mRNA 提取 将组织置入 1.5 mL 的 RNA 裂解液 (购自美国 Promega 公司), 再加入 11 μ L β -巯基丙醇进行匀浆, 分装入离心管中, 加入水饱和酚与氯仿, 充分震荡后冰浴 30 min 后, 于 4 $^{\circ}$ C 以 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液, 加入等体积异丙醇后 12 000 r/min 离心 15 min。重新加入 β -巯基丙醇、RNA 裂解液与异丙醇, 12 000 r/min 离心后留取沉淀。使用 RNA 提取试剂盒 RNAagents (购自美国 Promega 公司) 提取 mRNA, 具体步骤参照该试剂盒说明书。

1.2.2 逆转录 逆转录过程采用逆转录试剂盒 ImRrom-II (购自美国 Promega 公司) 与 M-MLV 试剂盒 (购自美国 Promega 公司), 采用随机引物, 整个过程均参照试剂盒说明书进行。

1.2.3 引物设计 引物设计均根据 GenBank 中 LUNX、CK19、CEA、MUC1 及 Survivin 的 mRNA 序列进行, 采用 Al-leleID 4.0 软件进行设计, 最终由北京博奥森科技有限公司进行合成, 具体序列如下。LUNX 基因, 上游: 5'-CTC ATT GTC TTC TAC GGG CTG TT-3', 下游: 5'-GGC AGG GCT GGA TTC ACA T-3', 片段大小 104 bp; CK-19 基因, 上游: 5'-AGG

表 1 肝癌相关基因的差异表达($\bar{x}\pm s$)

基因	正常肺组织	手术切缘组织	癌旁组织	肿瘤组织	P
LUNX	1.77±0.56	2.03±0.49	6.06±0.55	7.69±0.38	0.002
CK19	1.53±3.72	15.39±4.11	29.48±3.20	34.75±3.25	0.001
CEA	1.50±0.33	8.96±2.54	139.69±27.04	696.58±130.05	0.000
MUC1	1.44±0.29	5.10±0.55	19.04±3.99	55.47±1.86	0.001
Survivin	1.05±0.32	4.77±5.21	11.93±3.30	95.44±14.60	0.002

TGG ATT CCG CTC CGG GCA-3', 下游:5'-AGC TCC CTG TCC TTC TAG TG-3', 片段大小 338 bp; CEA 基因, 上游:5'-TGC TCA CAG CCT CAC TTC-3', 下游:5'-CCA TCC ACT CTT TCA CCT T-3', 片段大小 169 bp; MUC1 基因, 上游:5'-CGT CGT GGA CAT TGA TGG TAC C-3', 下游:5'-GGT ACC TCC TCT CAC CTC CTC CAA-3', 片段大小 287 bp; Survivin 基因, 上游:5'-CCG CAT ACA GTC GAG AGA-3', 下游:5'-GTG TAG GGT GTA GAA TCC TGT TCA-3', 片段大小 121 bp。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 采用 SYBR Green I 染料法对样本进行实时定量 PCR 反应, 应用 Ex Tap 试剂盒以及荧光定量 ABI 7900 型 (ABI, 美国) 实时定量 PCR 系统进行, 操作均按照厂家及试剂盒说明书进行。PCR 反应条件如下: 95 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 45 s, 60 °C 退火 1 min, 71 °C 延伸 1 min, 共进行 45 个循环, 循环结束后于 71 °C 下延伸 1 min, 所得结果用 IQ5 软件进行读数分析, 内参采用 G3PHD 基因。待测基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行计算 ($\Delta CT = CT_{\text{待测}} - CT_{\text{内参}}$; $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{待测}} - \Delta CT$), 当计算出的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值相差 3 倍时, 即认为相关基因有差异表达。

1.3 多个相关基因荧光实时定量 PCR 反应体系建立 将合成好的相关基因 cDNA 混合, 连续进行 2 倍梯度稀释, 得到相关基因与内参 G3PHD 的荧光曲线, 计算得到 logcDNA 浓度对 ΔCT 值直线, 内参与待测基因扩增效率抑制, 应用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法适合对本研究结果进行分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS10.0 软件进行统计学处理, 计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间差异比较采用 *t* 检验; 计数资料采用百分比表示, 组间差异比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法相关基因相对表达水平检测 LUNX、CK19、CEA、MUC1 及 Survivin 基因表达均上调, 分别上调 88.23%, 75.42%, 85.01%, 66.42% 和 70.66%; 在正常肺组织、手术切缘组织、癌旁组织与肿瘤组织中表达两两比较或多个比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 均具有从正常肺组织到肿瘤组织明显递减的趋势。见表 1。

2.2 建立分子辅助诊断指数 根据 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法所得数值, 该 5 种肿瘤相关基因在组织中上调 3 倍或 3 倍以上的个数建立分子辅助诊断指数 (与正常肺组织相对表达量相差 3 倍者计为辅助诊断指数增加 1)^[3], 因此本研究中分子辅助诊断指数为 0~5。经过计算可知, 正常肺组织辅助诊断指数为 1.2 ± 0.51 , 手术切缘组织为 2.4 ± 0.64 , 癌旁组织为 3.36 ± 0.43 , 肿瘤组织为 4.65 ± 0.38 。手术切缘组织、癌旁组织与肿瘤组织均较正常肺组织显著升高, 以肿瘤组织最为明显。当以正常肺组织作为对照, 设定辅助诊断指数大于或等于 3.5 为肺癌时, 受试者

工作特征曲线 (ROC 曲线) 敏感度为 95%, 特异度为 92%, 阳性结果预示值 (PPV) = 95.33%, 阴性结果预示值 (NPV) = 98.00%, 说明分子辅助诊断指数可提高诊断准确性。

2.3 分子辅助诊断指数与 WHO 组织分型及 UICC TNM 分期的关系 对于 12 例 SCLC 患者及 22 例 NSCLC 患者, 两组辅助诊断指数分别为 3.69 ± 0.24 与 3.98 ± 0.30 , 二者之间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 对于 TNM 分期, 以 IV 期患者得分最高, I 期患者得分最低, 得分比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨 论

随着肿瘤分子生物学技术的不断发展, 对于肿瘤的发生、发展的认识亦在不断更新。分子生物学技术对肿瘤基因标志物的检测用于肿瘤发现与诊断, 是目前的研究热点之一^[4]。传统对于单基因的研究用于诊断肿瘤时, 存在较高的假阳性与假阴性, 从而造成漏诊与误诊的发生^[5]。因此, 采用多个相关基因标志物联合检测并寻找新的标志物, 可降低漏诊、误诊的发生率, 最终提高肿瘤的诊断率。

LUNX 即肺特异性蛋白 X, 该基因定位与 20p11.1-q12, 长度为 1 015 bp, 共编码 26 个氨基酸, 具有较强的组织特异度, 在肺外未发现表达。LUNX 对肺癌患者外周血/淋巴等部位的未转移具有较高的特异度, 因此可以作为一种新型的肺癌基因标志物^[6]。LUNX mRNA 在肺癌 III 期与 IV 期的检出率显著高于 I、II 期患者, 即 LUNX mRNA 的表达随着 TNM 分期的提高而增高^[7]。LUNX mRNA 水平与肿瘤负荷及转移程度密切相关^[8]。CK-19 属于细胞角蛋白, 是角蛋白的可溶性片段, 可以作为上皮来源肿瘤的敏感标志物^[9]。CEA 是正常组织不表达的一种分泌糖蛋白, 其基因水平检查的敏感度高于蛋白水平。现认为, 如果检出 CEA mRNA, 可以从理论上推断有肿瘤细胞的存在^[10]。已经有学者检测患者体内 MUC1 作为肺癌发生播散转移的生物学标志, 通过 logistic 回归分析发现 NSCLC 患者外周血 MUC1 mRNA 水平与 TNM 分期及肿瘤细胞分化程度均存在密切关系^[11]。Survivin 基因全长 15 kb, 主要生理功能与胚胎细胞及增殖细胞的生长、分化有关。在大多数人类肿瘤存在高表达情况。研究发现, 肺癌组织中 Survivin mRNA 水平高的患者预后较差, 可作为判断肺癌预后的指标^[12]。

本研究在查阅文献的基础上, 选择肺癌组织中表达高、特异度好的上述基因, 采用荧光实时定量 PCR 进行检测并初步建立辅助诊断指数。LUNX、CK19、CEA、MUC1 及 Survivin 基因在肺癌组织中表达最高, 正常组织中表达最低, 符合既往文献。统计得出的分子辅助诊断指数对于诊断肺癌有良好的特异度与敏感度。此外, 该分子辅助诊断指数还与肺癌的 TNM 分期有关, 分期愈高, 分子辅助诊断指数愈高, 说明该分子辅助诊断指数对于肺癌的临床分期亦具有 (下转第 639 页)

本组病例术后主要并发症为切口皮缘浅表坏死、感染和距下关节创伤性关节炎。选择恰当的手术时机,术中紧贴骨面锐性剥离全层皮瓣以及不接触牵开技术的使用可以减少局部血供的不良影响,从而减少局部皮缘坏死的发生。切口皮缘浅表坏死的病例通过早期观察,间断拆线减张,延迟拆线时间均得到治愈。手术操作轻柔、尽量缩短手术时间及术后抗菌药物合理运用能减少术后感染的发生,本组出现感染的病例均为复位固定困难,手术暴露时间过长的 SandersⅣ型骨折说明了这点。术后出现创伤性关节炎的病患 6 例,其中 3 例通过Ⅱ期距下关节融合手术使疼痛得以缓解^[16]。

综上所述,跟骨的解剖复位不仅尽可能的维持了跟骨的正常生物力学特性,而且其复位的关节面也避免或延缓了相邻跗间关节(主要是距下关节后关节面和载距突的中关节面)创伤性关节炎的形成。同时早期的功能锻炼还能避免长时间外固定所带来的患肢骨骼废用性改变和踝关节伸屈受限。因此作者认为在患肢局部条件允许的情况下使用手术切开复位、植骨及钢板内固定治疗有移位的跟骨关节内骨折是完全有必要的,是得到了远期随访肯定的。

参考文献:

- [1] 李伟,潘显明,王艳萍,等. 20 例跟骨关节内骨折的手术治疗[J]. 重庆医学,2010,39(12):1576-1577.
- [2] 唐跃先,周鹏程,何川生,等. 切开复位内固定加人工骨移植治疗根骨粉碎骨折[J]. 实用骨科杂志,2011,17(3):273-275.
- [3] 祝雁冰,万里,关中伟,等. 异型解剖钢板在跟骨粉碎性骨折中的临床应用[J]. 创伤外科杂志,2011,13(1):73-74.
- [4] 申琳,辛景义,梁军,等. 严重跟骨关节内骨折的治疗体会[J]. 中国矫形外科杂志,2011,19(24):2101-2103.
- [5] 陶天遵. 新编临床骨科学[M]. 北京:北京科学技术出版社,2002:436.

(上接第 636 页)

一定的预测与指导意义。

参考文献:

- [1] Oklibo K, Bando T, Miyahara R, et al. Resection of pulmonary metastasis of non-small cell lung cancer[J]. J Thoracic Oncology, 2009, 4(2):203-207.
- [2] Tufman A, Huber R. Biological markers in lung cancer: a clinician's perspective[J]. Cancer Biomarkers, 2010, 6(3/4):123-135.
- [3] 王昌生. 肿瘤标志物在肺癌诊断中的联合应用[J]. 河北医学, 2012, 18(4):499-501.
- [4] Sieber O, Heinemann K, Tomlinson I. Genomic stability and tumorigenesis[J]. Seminars Cancer Biology, 2005, 15(1):61-66.
- [5] Yu Q. Stem cells and cancer stem cells[J]. J Clin Rehabil Tissue Engineer Res, 2007, 11(15):2948-2951.
- [6] 邓永键,王爽,郑林,等. LUNX 基因增强子的克隆及调控活性分析[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(8):2025-2059.
- [7] Tan S, Cheng Z, Ma Y, et al. LUNX mRNA in regional lymph nodes of, non-small cell lung cancer patients by

- [6] Canale ST, Beaty JH. 坎贝尔骨科手术学[M]. 王岩,译. 11 版. 北京:人民军医出版社,2011:3778-3803.
- [7] 王蒙,吴雪晖,谢肇,等. 跟骨关节内骨折的治疗[J]. 重庆医学,2007,36(11):1022-1023.
- [8] 毛宾尧. 足外科学[M]. 北京:人民卫生出版社,1992:141-145.
- [9] Sanders R, Fortin P, Dipasquale T, et al. Operative treatment in 120 displaced intraarticular calcaneal fractures. Results using a prognostic computed tomography scan classification[J]. Clin Orthop Relat Res, 1993(290):177-178.
- [10] 倪增良,樊渊,何建群,等. 跟骨骨折围手术期的软组织处理[J]. 中国骨与关节损伤杂志,2011,26(10):956-957.
- [11] 王金辉,武勇,王岩,等. 姑息清洁换药法治疗跟骨骨折术后皮肤坏死[J]. 中国修复重建外科杂志,2011,25(7):805-807.
- [12] 谭祐光,彭继红,黄建凯,等. 钢板内固定治疗跟骨关节内骨折[J]. 临床骨科杂志,2011,14(1):62-64.
- [13] Edward VC. 临床骨科学[M]. 范清宇,唐农轩,译. 2 版. 西安:世界图书出版西安公司,2003:924-932.
- [14] 李宗军,肖春凌,殷建新,等. 累及距下跟骰关节损伤跟骨骨折术后远期疗效[J]. 中国矫形外科杂志,2008,16(22):1746-1748.
- [15] 张彬,高锋,彭文宏. 跟骨骨折手术 69 例疗效分析[J]. 重庆医学,2008,37(16):1806-1807.
- [16] 胡怀建,沈惠良,冯明利,等. 三关节融合术治疗跟骨骨折远期并发症的疗效评价[J]. 中国修复重建外科杂志,2006,20(1):17-19.

(收稿日期:2012-11-13 修回日期:2012-12-17)

RT-PCR and its clinical significance[J]. J Central South University, 2010, 35(12):1236-1241.

- [8] Zhu G, Liu D, Wang X. Detection of micrometastasis of lung cancer by using lunx mRNA specific reverse transcription-polymerase chain reaction[J]. Chinese J Clin Oncol, 2003, 30(2):124-127.
- [9] 郑智,潘铁成,李军,等. CK-19 抗体在检测非小细胞肺癌淋巴结微转移中的应用[J]. 华中科技大学学报:医学版, 2004, 33(5):606-608, 618.
- [10] 廖秋林,李莲花,陈铭声,等. 比较研究 TPS、CEA、CY-FRA21-1 和 STNFR 四种肿瘤活性标志物在肺癌中的诊断价值[J]. 中国肺癌杂志,2005,8(4):309-312.
- [11] Hirasawa Y, Kohno N, Yokoyama A, et al. Natural autoantibody to MUC1 is a prognostic indicator for non-small cell lung cancer[J]. Am J Res Critical Care Med, 2000, 161(2):589-594.
- [12] Donahue J, Chang E, Xiao L, et al. The RNA-binding protein Hur stabilizes survivin mRNA in human oesophageal epithelial cells[J]. Biochemical J, 2011, 437(1):89-96.

(收稿日期:2012-11-07 修回日期:2012-12-21)