

非小细胞肺癌外周血 Lunx mRNA 检测及其对微转移诊断和预后判断的意义

夏雪梅¹, 赵福友², 陈余清¹, 李殿明¹

[摘要] **目的:** 检测非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者外周血 Lunx mRNA 表达, 探讨其诊断 NSCLC 微转移、评估预后和化疗疗效的价值。**方法:** 荧光定量 PCR 法测定 66 例 NSCLC 患者和 40 例良性肺疾病患者外周血 Lunx mRNA 表达。肺癌组患者随访 1~40 个月, 了解 Lunx mRNA 表达与生存期的关系, 并对其中 50 例 III~IV 期 NSCLC 患者化疗 2 周期后进行疗效评价以了解其与 Lunx 基因表达的关系。**结果:** 肺癌患者外周血 Lunx mRNA 阳性率为 57.6%, 中位拷贝数为 48 copies/ml; 良性肺疾病中则无表达。III、IV 期肺癌患者外周血 Lunx mRNA 阳性率(59.3%, 88.9%)均明显高于 I~II 期患者(18.8%) ($P < 0.01$), Lunx mRNA 阳性表达的患者总体生存期明显低于阴性表达者 ($P < 0.01$), 但其表达与化疗疗效则无明显关系 ($P > 0.05$)。**结论:** 外周血 Lunx mRNA 表达对判断肺癌患者预后具有较大的价值。

[关键词] 肺肿瘤; 荧光定量聚合酶链反应; 肺特异性 X 蛋白; 微转移

[中国图书资料分类法分类号] R 734.2 **[文献标识码]** A

Detection of Lunx mRNA in peripheral blood of non-small cell lung cancer and its for diagnosis of micrometastasis and cancer and prediction of prognosis

XIA Xue-mei¹, ZHAO Fu-you², CHEN Yu-qing¹, LI Dian-ming¹

(1. Department of Respiratory Diseases, 2. Department of Medical Oncology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the value of the expression of Lunx mRNA in the peripheral blood in detecting the micrometastasis in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) and assessing the prognosis and efficacy of chemotherapy. **Methods:** Fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the expression of Lunx mRNA in the peripheral blood samples from 66 patients with NSCLC and 40 patients with benign pulmonary lesions. The NSCLC patients the cases were followed up for 1 to 40 months, and the relationship between the expression of Lunx and the survival rate of the patients were observed. The objective response of 50 NSCLC patients receiving chemotherapy was evaluated every two cycles. **Results:** The positive expression of Lunx mRNA was 57.6% in the peripheral blood of patients with NSCLC. The median of copy number was 48 copies/ml. Significant difference of the expression level of Lunx was found in different TNM stages of the lung cancer. No patients with benign pulmonary disease showed positive expression of Lunx mRNA. The overall survival rate in patients with positive expression of Lunx mRNA was obviously lower than that with negative expression ($P < 0.01$). But the expression was not related to the efficacy of chemotherapy ($P > 0.05$). **Conclusions:** The expression of Lunx mRNA in the peripheral blood has great predictive value for the prognosis of patients with NSCLC.

[Key words] lung neoplasms; fluorescent quantitation polymerase chain reaction; Lunx; micrometastasis

肺癌是当今世界上发生率和死亡率最高的恶性肿瘤之一, 预后很差, 总的 5 年生存率只有 8.9%^[1]。肺癌即使是在早期发现并加以切除, 仍可能是致命性的。大约 1/4 经治疗的 I 期肺癌患者最终死于肺癌复发, 但 I 期肺癌未显示可见的肿瘤扩散至淋巴结或肺部以外其他组织的迹象。如果能够早期诊断肿瘤的微转移, 及时制定个性化的综合治疗方案, 对于延长非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者的无瘤生存期、改善生活质量和提高生

存期, 具有重要的临床意义。Lunx 是 Iwao 等^[2] 2000 年通过差异显示技术分离出来的一个肺组织特异性基因, 外周血 Lunx 基因检测有可能帮助医生确定哪些病人可能出现肿瘤复发, 并帮助判断预后。为此, 我们运用荧光定量 PCR 法测定肺癌患者外周血 Lunx mRNA 表达, 探讨其对 NSCLC 的微转移诊断与判断预后的价值, 并评估其与 NSCLC 化疗疗效的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 66 例 NSCLC 均来自我院 2004 年 2 月至 2005 年 3 月住院患者。男 46 例, 女 20 例; 年龄 34~75 岁。鳞癌 31 例, 腺癌 30 例, 肺泡透明细胞癌 2 例, 大细胞癌 3 例。均取得病理及细胞学确

[收稿日期] 2009-01-06

[作者单位] 蚌埠医学院第一附属医院 1. 呼吸病科, 2. 肿瘤内科, 安徽蚌埠 233004

[作者简介] 夏雪梅(1971-), 女, 硕士, 主治医师。

诊,包括纤维支气管镜活检、手术、经皮肺穿刺活检、淋巴结活检或胸腔积液脱落细胞学检查;均进行询问病史、临床查体、胸部 X 线片、胸部 CT、腹部 B 超及同位素骨扫描。据 1997 年国际抗癌联盟(UICC)分期标准进行 TNM 分期: I 期 7 例, II 期 9 例, III 期 32 例, IV 期 18 例。留取标本前均未进行过化疗、放疗及生物治疗。NSCLC 患者中, I 期患者行手术治疗; II 期患者给予手术治疗后,术后化疗 4 周期; III a 期患者 8 例给予 2 周期新辅助化疗后行手术治疗,余给予 4 周期化疗后放射治疗; III b 期、IV 期患者给予 4 周期化疗,前 2 周期均采用 NP 方案(长春瑞滨+顺铂)化疗,以后采用 GP(吉西他滨+顺铂)或 TP(紫杉醇+顺铂)方案化疗。其中 50 例 III 期、IV 期 NSCLC 患者 2 个周期化疗结束后 4 周,结合临床体检、实验室检查及胸部 CT 等影像学检查进行化疗疗效评价。完全缓解(CR):CT 图像下肿瘤完全消失;部分缓解(PR):CT 图像下肿瘤体积减少 50% 以上;疾病稳定(SD):CT 影像肿瘤体积缩小小于 50% 或增大小于 25%;疾病进展(PD):CT 影像肿瘤增大大于 25%。以 CR、PR 作为化疗有效。自首次留取标本起随访 1~40 个月,总体生存期定义为治疗开始到患者病死或未次随访之间的时间,末次随访时间至 2007 年 10 月 30 日止。40 例良性肺疾病作为对照,其中肺间质纤维化 14 例,肺部感染 10 例,肺脓肿 6 例,肺结核 10 例。

1.2 方法

1.2.1 Lunx 基因引物设计

参考文献[3](目的基因 111 bp),上游引物 5'-CCC TGG AAG CCT GCA AAT T-3';下游引物 5'-GAA CCA ACT CAG GCA GGA CTT T-3'。自行设计 β -actin 内参照引物(目的基因 312 bp),上游引物 5'-TCC TGT GGC ATC CAC GAA ACT-3';下游引物 5'-TAA TCA TTT GCG GTG GAC GAT-3';质粒以 PUC57(全长 2 710 bp)为载体,克隆的 Lunx 特异片段为 CAC CCA TTC CCC TGG AAG CCT GCA AAT TTC TCT GCT TGA TGG ACT TGG CCC CCT CCC CAT TCA AGG TCT TCT GGA CAG CCT CAC AGG GAT CTT GAA TAA AGT CCT GCC TGA GTT GGT TCA GGG CAA CGT GTG C,由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.2.2 标本采集

分别对治疗前肺癌患者及肺部良性病变患者采取静脉血 5 ml,枸橼酸钠抗凝。用淋巴细胞分离液分离有核细胞,PBS 清洗,离心去上清液,置 1.5 ml 无菌 Ep 管中,加入 Trizol 1 000 μ l 消化,氯仿抽提,异丙醇沉淀总 RNA,75% 乙醇漂洗 2 次,气干后加入无菌 DEPC 水 15 μ l 溶解 RNA,进

行逆转录反应或置 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温保存备用。逆转录反应严格按照 Invitrogen 逆转录试剂盒说明书进行。

1.2.3 检测 Lunx mRNA 的拷贝数

(1) 荧光定量 PCR 检测 Lunx mRNA 的表达:PCR 反应体系有以上合成的 cDNA 1 μ l, Master mix 12.5 μ l, 0.5 μ mol/L 上下游引物各 0.5 μ l, 加超纯水至 25 μ l。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 12 s。共 40 个循环。(2) 建立标准曲线:用去离子水稀释质粒,制备标准品溶液,依次将起始模板溶液 1:10 稀释,得到不同的标准模板 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 同时进行 PCR 扩增,将检测的临界点定在 PCR 产物进入指数增长期的起始点即阈值循环数(threshold cycl, Ct) 值处,将 Ct 值与不同浓度的定量模板的对数拟合作图。由仪器软件自动绘制标准曲线(见图 1),作为计算样品 Lunx mRNA 拷贝数的依据。取扩增产物用 1% 琼脂糖[含溴化乙锭(EB) 0.5 mg/ml] 凝胶电泳, β -actin 检测逆转录效率,紫外透视仪下观察结果。以 DNA 标记作为分子大小对照确定阳性琼脂糖凝胶电泳条带;采用 PCR 扩增产物绘制标准曲线,根据各自的标准曲线计算起始模板拷贝数,样本中 Lunx mRNA 的相对表达量为目的基因 Lunx cDNA 拷贝数与同一样本看家基因 β -actin cDNA 的拷贝数的比值。

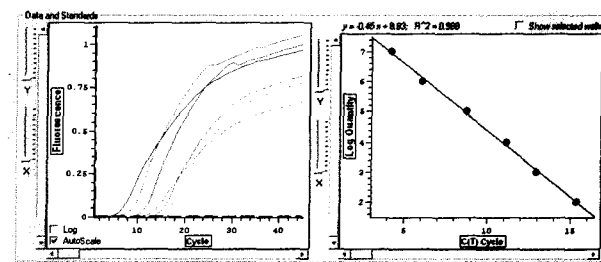


图 1 不同浓度 Lunx mRNA 标准品的扩增曲线及 Lunx mRNA 定量检测的标准曲线

1.3 统计学方法

采用 χ^2 检验和 t 检验。

2 结果

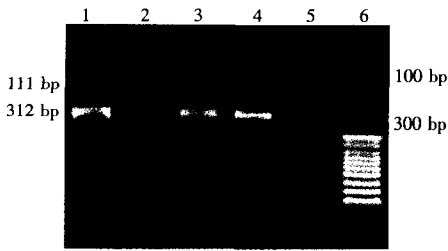
2.1 肺癌、良性肺疾病患者外周血 Lunx mRNA 表达

肺癌患者外周血 Lunx mRNA 阳性率为 57.6%, 中位拷贝数为 48 copies/ml, 明显高于良性肺疾病患者($P < 0.01$) (见图 2 及表 1)。

2.2 NSCLC 患者 TNM 分期与外周血 Lunx mRNA 表达的关系

TNM 分期高的 NSCLC 患者外周血 Lunx mRNA 表达的阳性率高, III、IV 期肺癌患者外周血 Lunx 阳性率分别为 59.3% 和 88.9%, 皆明显高于 I~II 期患者(18.8%) ($P < 0.01$) (见表 2);

I ~ II 期 NSCLC 患者外周血中检出 Lunx mRNA, 提示肺癌早期即有微转移的存在。



1:β-actin;2:阴性对照;3~5 外周血阳性标本;6:DNA Marker
图 2 肺癌患者外周血 Lunx mRNA 琼脂糖凝胶电泳

表 1 两组患者外周血 Lunx mRNA 表达结果比较 (n)

分组	n	Lunx mRNA 中位拷贝数 (copies/ml)		阳性数	阳性率 (%)	χ^2	P
		中位数	范围				
NSCLC 组	66	48.0	0~1 200	38	57.6		
良性肺疾病组	40	0	0	0	0.0	35.90	<0.01
合计	106	—	—	38	35.8		

表 2 NSCLC 患者 TNM 分期与外周血 Lunx mRNA 表达的关系 (n)

TNM 分期	n	Lunx mRNA 拷贝数 (copies/ml)		Lunx mRNA		χ^2	P
		中位数	范围	阳性数	阳性率 (%)		
I ~ II 期	16	0	0~43	3	18.8		
III 期	32	53	0~423	19	59.3**		
IV 期	18	205	0~1 200	16	88.9**	17.14	<0.01
合计	66	—	—	38	57.6		

率的两两比较:与 I ~ II 期比较 **P<0.01

2.3 NSCLC 患者外周血 Lunx mRNA 表达与化疗疗效的关系 对 50 例 III 期、IV 期 NSCLC 患者进行 2 周期 NP 方案化疗后评价疗效,发现肺癌患者外周血 Lunx mRNA 表达阴性者与表达阳性者化疗有效率分别为 53.3% 和 45.7%, 差异无统计学意义 (P>0.05) (见表 3)。

表 3 NSCLC 患者外周血 Lunx 表达与化疗疗效的关系 (n)

观察项目	n	有效	有效率 (%)	χ^2	P
Lunx +	35	16	45.7		
Lunx -	15	8	53.3	0.24	>0.05
合计	50	24	48.0		

2.4 随访 对 66 例 NSCLC 患者随访 1~40 个月,外周血 Lunx mRNA 表达阳性者,其总体生存期明显低于阴性表达者。Lunx 阳性表达者 1 年、2 年、3 年生存率分别为 71.05%、23.7% 和 5.26%, 均低于 Lunx mRNA 表达阴性者 (92.9%、64.3% 和 46.4%) (P<0.01) (见表 4)。

16 例早期 NSCLC (I ~ II 期), 3 例 Lunx 表达阳性的患者均于随访期内复发, 复发时间分别于 4 个月、8 个月及 13 个月, 总体生存期平均为 20.1 个月; Lunx 表达阴性的患者, 在随访期间 4 例复发, 复发率为 30.8%, 总体生存期平均为 35.7 个月, 两者比较差异有统计学意义 (P<0.01) (见表 5)。

表 4 不同外周血 Lunx 表达的 NSCLC 生存期的比较 [n; 生存率 (%)]

观察项目	n	总体生存期 (月)	1 年生存数	2 年生存数	3 年生存数
Lunx +	38	15.3 ± 7.1	27(71.1)	9(23.7)	2(5.3)
Lunx -	28	30.4 ± 9.3	26(92.9)	18(64.3)	13(46.4)
合计	66	—	53(80.3)	27(40.9)	15(22.7)
t	—	7.48	4.85 ^Δ	10.99 ^Δ	15.56 ^Δ
P	—	<0.01	<0.05	<0.01	<0.01

Δ 示 χ^2 值

表 5 16 例早期 NSCLC 患者外周血 Lunx 表达与生存期的关系

观察项目	n	复发数	总体生存期 (月)	t	P
Lunx +	3	3	20.1 ± 5.6	5.40	<0.01
Lunx -	13	4	35.7 ± 4.3		

3 讨论

目前用于检测 NSCLC 微转移的分子标志物主要有两大类: (1) 肿瘤特异性标志物, 如癌胚抗原、血管内皮生长因子、癌基因、抑癌基因表达异常等; (2) 组织特异性标志物, 如上皮组织特异性标志物及肺组织特异性标志物。当前国内外不少学者应用分子生物学及分子免疫学技术在淋巴结、骨髓及外周血标本中检测到肿瘤细胞或肿瘤微转移的分子标记, 发现肺癌微转移阳性检出率与患者的预后密切相关, 可作为患者预后不良的一个预测指标^[4,6]。

Lunx 是一个人类肺组织特异性基因, 它定位于 20 p11.1 - q12, 全长 1 015 bp, 包括一个开放的读码框, 编码含 257 个氨基酸, 相对分子质量为 26.7 × 10 的蛋白质 Plunc (Lunx 蛋白)。实验发现 Lunx 在所有 NSCLC 组织及正常肺组织中特异表达, 并且在肺癌组织中过表达, 而在人类其他肿瘤及组织中极少表达或不表达。Lunx 在正常人外周血细胞中无表达, 因循环中有 RNA 裂解酶, 游离的 mRNA 极易被降解, 所以外周血检测到 Lunx mRNA, 理论上说明循环中存在肺癌细胞, 有肺癌微转移的存在。

(下转第 360 页)

分辨出并保留垂体柄,与文献报道相似。

术后并发症的防治也是影响颅咽管瘤术后预后的关键。(1)尿崩症。为术后最常见的并发症,本组术前有尿崩症2例术后仍有,术后1~2天出现尿崩20例,经垂体后叶素及去氨加压素治疗后2周内恢复17例,未恢复3例,术后长期服用去氨加压素。(2)垂体功能低下。需要激素替代治疗,治疗的原则是“缺什么补什么”,术后本组患者均有预防性糖皮质激素的替代应用,并根据患者激素水平,进行其他激素(如甲状腺激素、性激素)的替代治疗。(3)电解质紊乱。术后早期电解质紊乱多为高钠、高氯血症,晚期可出现低钠、低氯血症,可为脑性耗盐综合征,亦可为抗利尿激素分泌不当综合征。本组有1例患者术前出现脑性耗盐综合征,经反复对症处理后效果不佳,但术后痊愈。

[参 考 文 献]

[1] 杨树源,只达石. 神经外科学[M]. 北京:人民卫生出版社,

2008:594-596.

- [2] Rhoton AL Jr, Yamamoto I, Peace DA. Microsurgery of the third ventricle: Part 2. Operative approaches [J]. *Neurosurgery*, 1981, 8(3):357-373.
- [3] 金保哲,张新中,周国胜,等. 经终板手术入路的临床解剖学研究[J]. *解剖与临床*, 2007, 12(5):310-312.
- [4] 张玉琪,王忠诚,马振宇,等. 经额部纵裂入路术中切断前交通动脉的可行性分析[J]. *中华神经外科杂志*, 2008, 24(8):483-486.
- [5] Shibuya M, Takayasu M, Suzuki Y, et al. Bifrontal basal interhemispheric approach to craniopharyngioma resection with or without division of the anterior communicating artery [J]. *J Neurosurg*, 1996, 84(6):951-956.
- [6] Amir RD, Nicolas T. Frontobasal interhemispheric trans-lamina terminalis approach for suprasellar lesions [J]. *Neurosurgery*, 2005, 56(2 Suppl):418-424.
- [7] Yasargil MG, Curcic M, Kis M, et al. Total removal of craniopharyngiomas: approaches and long-term results in 144 patients [J]. *J Neurosurg*, 1990, 73(1):3-11.

(上接第357页) 荧光定量PCR(FQ-PCR)又称实时PCR,是1995年研制出来的一种核酸定量技术。其优点为:解决了传统PCR技术不能定量和扩增产物污染的问题;避免了普通定量PCR操作过程中的污染,只在加样时打开反应管1次;操作简便、快捷,结果准确,不需要普通PCR扩增后进行电泳或放射自显影观察结果,方便临床应用;可以对每一批扩增样品进行扩增效率的评价。FQ-PCR技术可在指数扩增稳定期准确地测量出模板的初始含量,使基因表达的准确定量成为可能。

我们采用荧光定量PCR技术检测66例NSCLC患者外周血Lunx mRNA表达,结果57.6%(38/66)表达阳性,其中16例I~II期患者外周血中有3例检测出Lunx mRNA表达,提示早期NSCLC患者的外周血中即有肺癌微转移存在。进一步随访中发现,3例Lunx表达阳性的I~II期NSCLC患者术后分别于4、8及13个月复发,总体生存期平均为20.1个月,低于Lunx表达阴性的I~II期NSCLC患者(总体生存期平均为35.7个月)。提示外周血Lunx阳性则患者复发率高、预后差;随着临床分期的升高,III、IV期患者外周血Lunx阳性率明显升高,提示肿瘤分期越晚,肺癌细胞脱落进入血液循环的机会就越大,发生转移几率越高。而40例肺部良性病变患者外周血Lunx mRNA表达均阴性,表明检测外周血Lunx mRNA具有较高的特异性。随访1~40个月后发现,外周血Lunx mRNA表达阳性者总体生存期明显低于阴性者,1年、2年和3年生存率均低于阴性者,16例早期肺癌中3例Lunx mRNA表达

阳性者均于随访期内复发,提示外周血检测Lunx mRNA对判断NSCLC患者复发及预后可能具有较大价值,阳性者发生转移的几率大,预后差。

外周血Lunx mRNA表达阳性NSCLC患者,化疗敏感性略高于阳性患者,但其差异无统计学意义,提示外周血Lunx mRNA表达可能与化疗疗效无明显关系。临床中还须继续寻找能够预测化疗疗效的有效的肿瘤生物学指标,从而避免患者耐药的产生,提高临床疗效。故外周血Lunx mRNA表达可以作为较为有效的检测NSCLC微转移的指标,对评估预后、辅助制定综合治疗方案具有较大的价值。

[参 考 文 献]

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2005, 55(2):74-108.
- [2] Iwao K, Watanabe T, Fujiwara Y, et al. Isolation of a novel human lung-specific gene, LUNX, a potential molecular marker for detection of micrometastasis in non-small cell lung cancer [J]. *Int J Cancer*, 2001, 91(4):433-437.
- [3] Mitas M, Hoover L, Silvestri G, et al. Lunx is a superior molecular marker for detection of non-small cell lung cancer in peripheral blood [J]. *J Mol Diagn*, 2003, 5(4):237-242.
- [4] Nosotti M, Falleni M, Pallechi A, et al. Quantitative real-time polymerase chain reaction detection of lymph node lung cancer micrometastasis using carcinoembryonic antigen marker [J]. *Chest*, 2005, 128(3):1539-1544.
- [5] Ito M, Minamiya Y, Kawai H, et al. Intraoperative detection of lymph node micrometastasis with flow cytometry in non-small cell lung cancer [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2005, 130(3):753-758.
- [6] 李雅莉,赵立群,张娟妮,等. 肺癌患者血清与肺泡灌洗液和胸腔积液中TPS水平检测及其临床意义[J]. *肿瘤防治研究*, 2005, 12(6):453-455.