

· 临床研究 ·

外周血生存素的表达与结肠癌相关性研究

刘金龙, 邬淑雁, 刘丽红, 于爱军, 张学军, 孙志德

(承德医学院附属医院普外科, 河北承德 067000)

摘要:目的 探讨外周血生存素的表达与结肠癌的关系。方法 以逆转录-聚合酶链反应-酶联免疫吸附测定(RT-PCR-ELISA)方法检测 95 例结肠癌患者外周血生存素 mRNA 的表达, 比较其是否与肿瘤部位、浸润深度、分化程度、淋巴结转移和临床分期具有相关性。结果 35 例(36.8%)结肠癌患者外周血生存素 mRNA 表达阳性。肿瘤高、中分化及低、未分化生存素 mRNA 表达率分别为 31.0%、45.0%。浸润深度达浆膜层者外周血生存素 mRNA 表达率(44.0%)高于侵及黏膜下层及肌层的表达率(20.0%), 淋巴结有转移者外周血表达率为 47.5%, 高于无淋巴结转移的表达率(19.4%)。结论 生存素 mRNA 在外周血的表达与肿瘤分化、浸润深度、淋巴结转移和临床分期均有明显相关性, 但与肿瘤部位无明显相关。

关键词: 结肠肿瘤; 逆转录聚合酶链反应; 酶联免疫吸附测定; 淋巴转移; 生存素

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.35.022

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)35-3582-02

A study on the correlation of survivin expression in peripheral blood and colon cancer

Liu Jinlong, Wu Shuyan, Liu Lihong, Yu Aijun, Zhang Xuejun, Sun Zhide

(Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Chengde Medical

University, Chengde, Hebei 067000, China)

Abstract: **Objective** To explore the correlation of survivin expression in peripheral blood and colon cancer. **Methods** Reverse transcriptase-polymerase chain reaction and enzyme linked immunosorbent assay (RT-PCR-ELISA) was employed to detect the mRNA expression of survivin in peripheral blood of 95 patients with colon cancer. The correlations between the survivin mRNA expression and the tumor location, depth of invasion, differentiation degree, lymphatic metastasis or clinical stages were studied. **Results** 35 (36.8%) patients with colon cancer showed positive survivin mRNA expression in peripheral blood. The expression rate of survivin in well and moderately differentiated tumor was 31.0% and that in poorly differentiated and undifferentiated tumor was 45.0%. The mRNA expression rate of survivin in peripheral blood of patients with serosal invasion(44.0%) was higher than that in patients with submucosa and muscular invasion(20.0%), and the rate was 47.5% in patients with lymphatic metastasis, which was higher than that in patients without lymphatic metastasis(19.4%). **Conclusion** Survivin mRNA expression in peripheral blood shows a significantly correlation with tumor differentiation, invasive depth, lymphatic metastasis and clinical stages, but not with tumor location.

Key words: colonic neoplasms; reverse transcriptase polymerase chain reaction; enzyme-linked immunosorbent assay; lymphatic metastasis; survivin

凋亡蛋白抑制因子(inhibitors of apoptosis protein, IAP)是一族凋亡抑制蛋白,生存素(survivin)是新近发现的 IAP 家族成员之一,但具有不同于 IAP 家族其他成员的独特结构和性质^[1]。其在正常成人组织(除胸腺、生殖器官)中不表达,而选择性表达于恶性肿瘤组织,它具有调节细胞有丝分裂和抑制细胞凋亡的双重功能,能抑制细胞凋亡和促进细胞增殖,并可能参与血管生成,对肿瘤细胞浸润、转移可能起重要的作用^[2-3]。有研究表明,生存素不仅在多种人类肿瘤中有异常表达,且与肿瘤预后不良的病理参数有关^[4]。检测血液中生存素的表达是一种非侵害性、简单的检测方法。为了对游离于血液中的少数肿瘤细胞进行监测进而达到早期肿瘤转移筛查的目的,本研究通过检测外周血生存素 mRNA 的表达,旨在探讨生存素的表达与结肠癌的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 血液标本取自 2009 年 6~12 月本院外科的 95 例结肠癌手术患者。术前均未接受过化疗或放疗。诊断均经术后病理检查证实。其中男 57 例,女 38 例;年龄 28~75 岁,平均 59 岁;肿瘤位于升结肠 20 例,横结肠 28 例,降结肠 33

例,乙状结肠 14 例;有淋巴结转移者 59 例,无淋巴结转移者 36 例。

1.2 方法

1.2.1 取材及试剂 外周血为术前外周静脉抽血,置-80℃保存。生存素 mRNA 检测试剂盒购自四川新创生物科技有限公司。

1.2.2 试验方法 (1)逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR):采集 1 mL 静脉血于抗凝管中,4℃ 3 000 r/min 离心 10 min 收集细胞沉淀,用 Trizol 试剂提取细胞沉淀中的总 RNA,用逆转录试剂盒按厂商说明合成 cDNA,用特异的荧光素标记引物对生存素 cDNA(来自血液中的游离肿瘤细胞)进行 PCR 扩增。扩增产物,即荧光素标记的生存素 DNA 片段。生存素转录物的 PCR 扩增采用顺向引物序列为 5'-GGC ATG GGT GCC CGG ACG TT-3' 及逆向引物序列为 5'-AGA GGC CTC AAT CCA TGG CA-3'。循环参数为 94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 1 min,62℃ 复性 1 min,72℃ 延伸 2 min,循环 30 次,最后 72℃ 延伸 10 min。产物为 439 bp 的部分生存素 DNA 序列片段。(2)酶联免疫吸附测定(ELISA):96 孔杂交板的包被底物为 439 bp 生

存素 DNA 序列片段中一段 338 bp 片段作为探针。用 NaOH 变性荧光素标记的生存素标准和血样 PCR 产物并与包被片杂交, 50 °C 保温 2 h, 洗去未杂交的核酸, 用抗荧光素 HRP 结合物测定杂交的生存素扩增产物, 显色反应底物 TMB, 以酶标仪读取 A450/630。通过直线回归比较计算扩增的生存素 cDNA 相对含量。

1.3 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计分析软件, 计算直线回归方程, 定性资料以百分率表示, 组间差异的分析采用 χ^2 检验, 多组间 (≥ 3 组) 差异应用 Spearman 等级相关分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结肠癌不同病理特征外周血生存素表达结果 95 例结肠癌患者外周血生存素 mRNA 表达率为 36.8% (35 例)。结肠癌低及未分化者的外周血生存素 mRNA 表达率 (45.0%) 高于高中分化者的表达率 (31.0%) ($P < 0.05$)。浸润深度达浆膜层者外周血生存素 mRNA 表达率为 44.0%, 高于及及黏膜下层及肌层的表达率 20.0% ($P = 0.024$)。淋巴结有转移者外周血表达率为 47.5%, 高于无淋巴结转移的表达率 19.4% ($P = 0.008$) (表 1)。用标准各点的光密度均值减去阴性质控的光密度均值得到 $\Delta A450$, 以标准单位 (U) 为横坐标, 以其光密度增量 ($\Delta A450$) 为纵坐标绘制的直线回归方程, 见图 1。

2.2 结肠癌不同部位外周血生存素表达 病灶位于升结肠、横结肠、降结肠、乙状结肠表达率分别为 36.8%、40.7%、38.7%、35.7%, 经相关分析, $r = -0.4$, $P = 0.6$, 生存素的表达与肿瘤的部位不具有相关性。

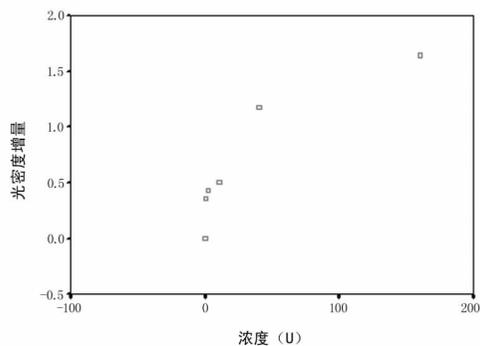


图 1 生存素标准曲线直线回归散点图

表 1 生存素的表达与结肠癌临床病理特征的关系

病理特征	n	阳性(n)	阴性(n)	阳性率(%)	P
分化程度					
高、中分化	58	18	40	31.0	0.009
低、未分化	37	17	10	45.0	
浸润深度					
黏膜下层及肌层	30	6	24	20.0	0.024
浆膜层	65	29	36	44.0	
淋巴结转移					
有	59	28	31	47.5	0.008
无	36	7	29	19.4	

2.3 结肠癌外周血生存素表达阳性率与结肠癌不同分期之间的关系 结肠癌病理分期按照 Dukes 方案分期 (1935 年)。I 期

患者 12 例, II 期患者 24 例, III 期患者 46 例, IV 期患者 13 例。随病期越晚, 外周血生存素表达阳性率越高, I、II 期患者表达率较低, 分别为 8.3%、20.8%; III、IV 期表达率较高, 其中 IV 期患者 13 例中有 11 例表达, 阳性率为 84.6%, 经相关分析, $r = 1$, $P = 0.000$, 生存素的表达与结肠癌的病理分期具有相关性。

3 讨论

生存素是迄今为止发现的最强的 IAP, 生存素的高表达能抑制多种因素如 p53、半胱天冬酶 (caspase) 等诱导的细胞凋亡^[5], 其在多数实体肿瘤中存在高表达^[6]。在结肠癌组织中有非常高的表达率, 刘集鸿等^[7]对 51 例结肠癌患者应用实时荧光定量 PCR 检测, 结果癌细胞生存素高表达, 而正常结肠黏膜无表达, 且有报道证实并不在血液中表达^[8-9]。所以生存素有可能是具有较高敏感度及特异度的非常理想的外周血中癌细胞标志物。已有学者在近期研究中发现外周血生存素 mRNA 的表达与结肠癌的临床分期、淋巴结转移具有相关性^[10]。

RT-PCR 是目前检测癌细胞敏感度较高的一种方法。虽然现今采用的肿瘤标志物肿瘤特异性不高, 但很多却具有组织特异性。比如癌胚抗原 (CEA) 来自上皮细胞, 鳞状细胞癌抗原 (SCC) 来自鳞状细胞, 前列腺特异性抗原 (PSA) 来自前列腺和甲胎蛋白 (AFP) 来自肝脏。因此如果在血液中检测到这些肿瘤标志物的 mRNA, 就表明血液中有来自这些组织或脏器的癌细胞。这些文献报道的大多数都认为用 RT-PCR 方法检测血中是否有游离癌细胞能够用来进行癌症转移和复发的早期诊断、预后的判断和治疗的监测。

已有文献报道 RT-PCR-ELICA 检测方法敏感度较普通 RT-PCR 更高, 且有更高的特异性, 重复性强, 且操作简单^[11]。外周血查肿瘤标志物提示癌细胞血行转移已被证实为一种安全可行的癌症早期诊断方法。Yie 等^[11]曾应用 RT-PCR-ELISA 技术对乳腺癌患者外周血生存素的表达进行相关研究, 有 50% 的乳腺癌患者表达阳性, 而作为对照的健康女性外周血无表达。并证实外周血表达与临床病理分期具有相关性。

本研究通过分析外周血生存素的表达与结肠癌主要临床病理特征的关系, 发现生存素 mRNA 在外周血的表达与肿瘤分化程度、浸润深度、淋巴结转移和病理分期均有明显相关性, 而这些病理特征均与患者的预后息息相关, 这提示检测外周血生存素可以判断患者的预后。本研究认为采集血样的方法, 简便易行且无侵害性, 若能应用于临床对于其临床诊断和判断预后将有很大应用价值。

参考文献:

[1] 李金贵, 胡自力. 存活素基因与肿瘤的研究现状[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(5): 462-464.
 [2] Nassar A, Sexton D, Cotsonis G, et al. Survivin expression in breast carcinoma: correlation with apoptosis and prognosis[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2008, 16(3): 221-226.
 [3] 于志成, 王海霞, 郭德玉, 等. survivin 反义核酸抑制胶质瘤细胞增殖的实验研究[J]. 重庆医学, 2008, 37(22): 2570-2574.
 [4] Sohn DM, Kim SY, Baek MJ, et al. Expression of survivin and clinical correlation in patients with breast cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2006, 60(6): 289-292. (下转第 3586 页)

对照组在手术中细胞免疫功能受到了一些影响,可能是全麻药物的作用和手术部位伤害性刺激向中枢传导引起的手术应激反应,但并未发生明显的受抑制现象。与之相比,施行 ECC 的 RHD 组在细胞免疫功能上受到了抑制,特别对于双瓣组的影响更为明显。ECC 时血液长时间接触体外转流装置,机器各部分的阻力以及心内负压吸引等均可大量破坏 T 淋巴细胞;手术失血量和血液有形成分破坏较多,使细胞功能衰退,免疫功能降低;ECC 中低温可加剧手术过程中免疫细胞和免疫活性物质的损害,对患者术后恢复有一定的影响^[13]。本组 RHD 患者 ECC 中采用了浅低温技术,严格控制输血量,缩短 ECC 时间,减轻了机体免疫系统的变化,减少神经系统并发症^[14-15],使术后无感染。有报道应用西咪替丁可减轻 ECC 对细胞因子的干扰,减少手术应激,降低术后感染率^[16],故在围术期强化术后 5 d 内预防感染的综合性措施十分重要。

综上所述,ECC 可使 RHD 患者的细胞免疫功能受到明显的抑制,机体处于暂时的免疫抑制状态。通过了解 ECC 中 T 淋巴细胞水平的变化规律,可探索较好的方法,以减轻细胞免疫功能的损害,维持免疫系统的自稳以及防止术后感染。

参考文献:

- [1] 郭巍,邹承伟,王安彪,等. 西咪替丁对体外循环手术患者免疫功能的保护作用[J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2007, 14 (2): 97-100.
- [2] 张克强. 重症心脏瓣膜病围手术期处理[J]. 河北医药, 2005, 27(3): 186-187.
- [3] 刘美明,于建华,吴树明. 体外循环对机体免疫功能的损害及其防治研究[J]. 中国综合临床, 2007, 23 (2): 153-156.
- [4] Franke A, Lante W, Kurig E, et al. Hyporesponsiveness of T cell subsets after cardiac surgery: a product of altered cell function or merely a result of absolute cell count changes in peripheral blood[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2006, 30(1): 64-71.
- [5] Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment[J]. Cell,

2000, 100(6): 655-669.

- [6] 叶凤青,林辉. 体外循环对机体细胞免疫功能影响的研究进展[J]. 广西医学, 2007, 29(4): 531-532.
- [7] 洗磊,陈铭伍,雷宾峰,等. 心脏停跳和不停跳体外循环手术对机体细胞免疫的影响[J]. 中国体外循环杂志, 2008, 6(4): 204-206.
- [8] 刘延芹,杨永辉. 体外循环对婴幼儿先天性心脏病单个核免疫细胞功能的影响[J]. 河北医药, 2006, 28(7): 577.
- [9] Sano T, Morita S, Tominaga R, et al. Adaptive immunity is severely impaired by open-heart surgery[J]. Jpn J Thorac Cardiovasc Surg, 2002, 50(5): 201-205.
- [10] 倪海峰,张颖彬. 体外循环对 T 淋巴细胞细胞免疫功能的影响[J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2008, 15(2): 104-107.
- [11] 徐洪军,徐永根,严向明,等. 体外循环心内直视手术对小儿 T 淋巴细胞免疫功能的影响[J]. 江苏医药, 2004, 30 (2): 146.
- [12] 胡金川,田亚平,李佳春,等. 体外循环手术对红细胞 CD35、CD59 及 T 淋巴细胞免疫的影响[J]. 中国体外循环杂志, 2008, 6(4): 210-212.
- [13] Lehle K, Preuner JG, Vogt A, et al. Endothelial cell dysfunction after coronary artery bypass grafting with extracorporeal circulation in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2007, 32(4): 611-616.
- [14] 唐令凤,杨康,张玉霞,等. 深低温停循环在心血管手术中的应用[J]. 重庆医学, 2004, 33(12): 1763-1764.
- [15] 丁凯,周华富,覃家锦,等. 60 岁以上瓣膜病患者的瓣膜置换术 65 例临床分析[J]. 重庆医学, 2010, 39(13): 1687-1688.
- [16] Tayama E, Hayashida N, Fukunaga S, et al. High-dose cimetidine reduces proinflammatory reaction after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass [J]. Ann Thorac Surg, 2001, 72(6): 1945-1949.

(收稿日期: 2011-03-09 修回日期: 2011-08-12)

(上接第 3583 页)

- [5] Parenti A, Leo G, Porzionato A, et al. Expression of survivin, p53, and caspase 3 in Barrett's esophagus carcinogenesis[J]. Hum Pathol, 2006, 37(1): 16-22.
- [6] Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, et al. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14 (16): 5000-5005.
- [7] 刘集鸿,李旭艳,钟选芳,等. 实时荧光定量聚合酶链反应检测大肠癌生存素基因[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31 (7): 634-438.
- [8] Moriai R, Asanuma K, Kobayashi D, et al. Quantitative analysis of the anti-apoptotic gene survivin expression in malignant haematopoietic cells[J]. Anticancer Res, 2001, 21(1B): 595-600.

- [9] Mehes G, Witt A, Kubista E, et al. Circulating breast cancer cells are frequently apoptotic[J]. Am J Pathol, 2001, 159(1): 17-20.
- [10] Yie SM, Lou B, Ye SR, et al. Detection of survivin-expressing circulating cancer cells (CCCs) in peripheral blood of patients with gastric and colorectal cancer reveals high risks of relapse[J]. Ann Surg Oncol, 2008, 15 (11): 3073-3082.
- [11] Yie SM, Luo B, Ye NY, et al. Detection of Survivin-expressing circulating cancer cells in the peripheral blood of breast cancer patients by a RT-PCR ELISA[J]. Clin Exp Metastasis, 2006; 23(5/6): 279-89.

(收稿日期: 2011-03-09 修回日期: 2011-07-15)