

58.8%，与陈雨等<sup>[7]</sup>报道的较一致，但比马骏龙等<sup>[8]</sup>报道的高得多，原因可能为后者试验时对检测结果进行了等级差设置增加了结果的匹配度，但其未考虑尿液结晶、类酵母菌对检测结果的影响。本实验将尿液结晶、类酵母菌检测结果一起编进了复检规则中，提高了复检率。规则验证假阴性率为 1.5%，参照血液复检规则评价假阴性率应小于 5% 的标准<sup>[9]</sup>，且在发生假阴性的 5 例病例中未出现严重的、活动性的肾脏疾病，该规则验证通过。

在充分发挥尿液自动化分析优势的同时，通过合理的设置规则及软件支持。智能化地筛选需显微镜复检标本，加快尿常规检测的速度，提高检验质量，使尿液常规检验逐步规范化、标准化。

## 参考文献

- [1] Dos Santos JC, Weber LP, Perez LR. Evaluation of urinalysis parameters to predict urinary-tract infection[J]. Braz J Infect Dis, 2007, 11(5): 479-481.
- [2] Delanghe J. New screening diagnostic techniques in urinalysis[J]. Acta Clin Belg, 2007, 62(3): 155-161.

## · 经验交流 ·

# RT-PCR 对原发性肝癌中 ASPP2 基因检测的意义

李 靖

(深圳市龙岗区坪地人民医院检验科，广东深圳 518117)

**摘要：**目的 探讨逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)对原发性肝癌中 ASPP2 基因检测的意义。方法 选择原发性肝癌手术患者 36 例，所有患者手术切除 30 min 内收集癌组织和癌旁组织，另选 20 例正常肝组织作为对照。各组患者行 RT-PCR 半定量检测 ASPP2 水平，患者术后进行为期 1 年的随访，观察 ASPP2 mRNA 表达与患者年龄、性别、肿瘤直径、临床分期、癌栓形成、淋巴结转移以及术后复发等病理指标的相关性。结果 肝癌组织中的 ASPP2 水平为  $(0.53 \pm 0.19)$ ，显著高于癌旁组织  $(0.71 \pm 0.15)$  和正常肝组织  $(0.85 \pm 0.19)$  中的 ASPP2 含量，差异有统计学意义  $(P < 0.05)$ 。ASPP2 mRNA 表达水平与肿瘤的临床分期、肿瘤直径以及术后复发情况密切相关  $(P < 0.05)$ 。结论 ASPP2 在肝癌组织中呈现低表达，ASPP2 表达的降低预示着肿瘤患者的不良预后，对 ASPP2 的检查能够对肝癌的早期诊断及确定治疗方案提供可靠依据。

**关键词：**原发性肝癌； 逆转录聚合酶链反应； ASPP2； 基因检测

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.12.049

文献标识码：B

文章编号：1673-4130(2013)12-1591-02

肝癌恶性程度高、病情进展快、患者早期往往没有明显症状，而一旦出现症状，往往已属于中晚期<sup>[1]</sup>。目前甲胎蛋白(AFP)作为肝癌标志物的检出率约占 60%~70%，仍不能满足临幊上对肝癌的诊断。P53 涅亡刺激蛋白(ASPP)家族包括 ASPP1、ASPP2 以及 iASPP 三个成员，ASPP 家族成员主要功能为调控 P53 的涅亡功能<sup>[2]</sup>，而 P53 细胞涅亡通路是人类肿瘤发生过程中最常见的通路，本研究采用逆转录 PCR(RT-PCR)方法检测了原发性肝癌患者癌组织及癌旁组织 ASPP2 mRNA 表达情况，并探讨其与肝癌患者预后的相关性，现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选自本院 2008 年 6 月至 2010 年 6 月收入的原发性肝癌手术患者 36 例，男 25 例，女 11 例。患者年龄 45~68 岁，平均年龄  $(54.3 \pm 9.4)$  岁，所有患者手术切除 30 min 内，收集癌组织和癌旁组织(距离癌组织 2 cm 内)标本并置于  $-135^{\circ}\text{C}$  冰箱内备用，所有肿瘤组织均行病理检测确诊为原发性肝癌。另选 20 例正常肝组织标本作为对照。

**1.2 引物设计及合成** ASPP2 基因引物由 GeneBank 报道的

- [3] 丛玉隆, 马骏龙. 尿液有形成分镜检与自动化检测方法学利弊和互补分析[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(6): 609-611.
- [4] 顾可梁. 尿液有形成分检查的难点与疑点[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(6): 605-608.
- [5] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 275-276.
- [6] 熊立凡, 刘成玉. 临床检验基础[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 169-174.
- [7] 陈雨, 程润, 李薇, 等. 自动化尿液干化学和有形成分分析复检规则的制定和应用[J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34(6): 501-506.
- [8] 马骏龙, 丛玉隆, 陆玉静, 等. 尿干化学和流式细胞术联合用于尿液有形成分镜检筛选的研究与应用[J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34(6): 494-500.
- [9] Barnes PW, McFadden SL, Machin SJ, et al. The international consensus group for hematolgy review: suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis[J]. Lab Hematol, 2005, 11(2): 83-90.

(收稿日期: 2012-12-18)

人类 ASPP2 及  $\beta$ -actin mRNA 的基因系列设计的 PCR 引物，ASPP2 引物系列，上游: 5'-CGA GAG TGA TTG CCA TTT GG-3'；下游: 5'-AAT CTG TTG CTG CTG GCG AG-3'，扩增片段长 310 bp。 $\beta$ -actin 上游: 5'-GAG ACC TTC AAC ACC CCA GC-3'；下游: 5'-ACA TCT GCT GGA AGG TGG AC-3'。

**1.3 RT-PCR** 总 RNA 的提取: Trizol 裂解细胞后，进行总 RNA 提取，并测量 RNA 含量以及纯度。cDNA 的合成: PCR 反应总体积  $30 \mu\text{L}$ ，反应条件  $42^{\circ}\text{C}$  60 min,  $95^{\circ}\text{C}$  5 min，终产物 cDNA 置于  $4^{\circ}\text{C}$  时保存。PCR 反应: 采用合成的 cDNA 作为模板并进行 PCR 扩增反应，反应条件  $93^{\circ}\text{C}$  40 s,  $64^{\circ}\text{C}$  40 s,  $72^{\circ}\text{C}$  50 s，循环 30 次，最后  $72^{\circ}\text{C}$  8 min。取  $6 \mu\text{L}$  PCR 扩增产物行琼脂糖凝胶电泳，采用 Imagestone-5000 系统对获得的条带行半定量分析。以 ASPP2 与  $\beta$ -actin 比值为 ASPP2 相对含量。

**1.4 随访指标** 患者术后进行为期 1 年的随访，观察 ASPP2 mRNA 表达与患者年龄、性别、肿瘤直径、临床分期、癌栓形成、淋巴结转移以及术后复发等相关情况。

**1.5 统计学处理** 数据采用 SPSS13.0 统计学软件进行处

理,数据进行方差分析、*t*检验和相关性分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 不同肝组织中的 ASPP2 表达** 不同肝组织中的 ASPP2 表达中显示,肝癌组织中 ASPP2 水平为  $(0.53 \pm 0.19)$ , 显著高于癌旁组织  $(0.71 \pm 0.15)$  以及正常肝组织  $(0.85 \pm 0.19)$  中的 ASPP2 水平, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。而癌旁组织与正常肝组织的 ASPP2 表达水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

**2.2 ASPP2 mRNA 表达水平与各项病理指标相关性** ASPP2 mRNA 表达水平与肿瘤的临床分期、肿瘤直径以及术后复发情况密切相关 ( $P < 0.05$ ), 而年龄、性别、癌栓形成、淋巴结转移与 ASPP2 mRNA 表达水平不相关 ( $P > 0.05$ ), 见表 1。

表 1 ASPP2 mRNA 表达水平与各项病理指标相关性

项目	n	ASPP2 mRNA 表达水平	P
年龄			
≥50岁	22	0.57±0.22	>0.05
<50岁	14	0.52±0.16	
性别			
男	25	0.56±0.20	>0.05
女	11	0.53±0.15	
肿瘤直径			
≥5 cm	17	0.67±0.23	<0.05
<5 cm	19	0.43±0.13	
临床分期			
I~II期	21	0.68±0.24	<0.05
III~IV期	15	0.45±0.14	
癌栓形成			
有	18	0.57±0.21	>0.05
无	18	0.54±0.16	
淋巴结转移			
有	19	0.58±0.22	>0.05
无	17	0.51±0.15	
术后复发			
有	16	0.61±0.27	<0.05
无	20	0.38±0.14	

## 3 讨 论

原发性肝癌是常见的恶性肿瘤, 既往多依赖血清 AFP 检测结合超声显像对高危人群进行监测, 但 AFP 作为肝癌标志物的检出率为 60%~70%, 仍不能完全满足临幊上对肝癌的诊断。P53 涅亡刺激蛋白家族包括 ASPP1、ASPP2 以及 iASPP 三个成员, 其中 ASPP1、ASPP2 功能都是促进 P53 涅亡基因启动子活化, 并增强 P53 细胞涅亡的功能。而 iASPP 的功能主要是与 ASPP1、ASPP2 竞争性地结合 P53, 抑制 ASPP1、ASPP2 的促涅亡能力, 从而促进肿瘤的发生<sup>[3]</sup>, ASPP 蛋白家族拥有 3 个共同的结构 SH3 结构域、4 个锚蛋白重复序列以及富含脯氨酸的结构域, 其中 SH3 结构域与 P53 的促涅亡关系密切。ASPP2 与 P53 之间的相互作用主要能够特异性的增强 P53 本身的促进细胞涅亡的功能<sup>[4]</sup>。

ASPP2 在肿瘤中表达的差异性近年来被广泛研究, Cao 等<sup>[5]</sup>在骨肉瘤细胞株 Saos-2 以及肝癌细胞株 HepG-2 的研究中发现, P53 与 ASPP2 对细胞涅亡起着共同的促进作用, p53 与 ASPP2 的协同作用能够显著增加细胞的存活数量。Mori 等<sup>[6]</sup>在白血病、肺癌、乳腺癌等细胞株中发现, ASPP2 mRNA 表达水平在肺癌细胞中显著降低, 且这种下降与 P53 基因突

变并不相关, 但 ASPP2 低表达能够使细胞株具有较强的抗紫外线和 X 线辐射的能力。Lossos 等<sup>[7]</sup>采用 RT-PCR 对弥漫性大 B 淋巴细胞瘤及滤泡性淋巴瘤进行研究, 发现 ASPP2 表达的高低与患者生存时间的长短呈正相关。Sgroi 等<sup>[8]</sup>采用基因芯片技术研究对比转移性乳腺癌以及非转移性乳腺癌中的 ASPP2 表达差异情况, 研究结果显示, 转移性乳腺癌中 ASPP2 表达显著低于非转移性乳腺癌中的 ASPP2 表达, 表明 ASPP2 可能与乳腺癌的转移及疾病的进展密切相关。

本研究结果显示, 肝癌组织中 ASPP2 水平为  $0.53 \pm 0.19$ , 显著高于癌旁组织  $(0.71 \pm 0.15)$  以及正常肝组织  $(0.85 \pm 0.19)$  中的 ASPP2 水平 ( $P < 0.05$ ), 而癌旁组织与正常肝组织的 ASPP2 表达水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 表明 ASPP2 mRNA 在原发性肝癌组织中呈现低表达, ASPP2 mRNA 在正常组织中呈现相对较高表达。对 ASPP2 mRNA 表达水平与各项病理指标相关性研究, ASPP2 mRNA 表达水平与肿瘤的临床分期、肿瘤直径以及术后复发情况密切相关 ( $P < 0.05$ )。肿瘤临床分期差、肿瘤直径大的患者 ASPP2 mRNA 表达下降, 表明 ASPP2 表达低, 患者预后差。而术后肝癌复发患者的 ASPP2 表达低也同样表明, ASPP2 表达与患者的预后呈正相关。年龄、性别、癌栓形成、淋巴结转移与 ASPP2 mRNA 表达情况不相关 ( $P > 0.05$ ), 说明 ASPP2 表达的普遍性及其与肿瘤的侵袭不具有相关性。

综上所述, ASPP2 在肝癌组织中呈现低表达, ASPP2 表达水平的降低预示着肿瘤患者的不良预后, 检测 ASPP2 能够为肝癌的早期诊断及确定治疗方案提供可靠依据。

## 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] Park SW, An CH, Kim SS, et al. Mutational analysis of ASPP1 and ASPP2 genes, a p53-related gene, in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability [J]. Gut Liver, 2010, 4(2): 292-293.
- [3] 谭军英, 张洪海, 郭洪亮, 等. 原发性肝癌组织 p53 和 ASPP2 基因突变检测及临床意义 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010, 17(7): 513-516.
- [4] Samuels-Lev Y, O'Connor DJ, Bergamaschi D, et al. ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53 [J]. Mol Cell, 2001, 8(4): 781-794.
- [5] Cao Y, Hamada T, Matsui T, et al. Hepatitis C virus core protein interacts with p53-binding protein-53BP2/Bbp/ASPP2, and inhibits p53-mediated apoptosis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 315(4): 788-795.
- [6] Mori T, Okamoto H, Takahashi N, et al. Aberrant overexpression of 53BP2 mRNA in lung cancer cell lines [J]. FEBS Lett, 2000, 465(2): 124-128.
- [7] Lossos IS, Natkunam Y, Levy R, et al. Apoptosis stimulating protein of p53 (ASPP2) expression differs in diffuse large B-cell and follicular center lymphoma: correlation with clinical outcome [J]. Leuke Lymphoma, 2002, 43(12): 2309-2317.
- [8] Sgroi DC, Teng S, Robinson G, et al. In vivo gene expression profile analysis of human breast cancer progression [J]. Cancer Res, 1999, 59(22): 5656-5661.