

• 临床检验研究论著 •

外周血游离 LUNX mRNA 检测在非小细胞肺癌患者辅助诊断中的意义

柳一花, 周洪兴[△], 张平, 孙颖昕, 王文伟, 白阳, 周韩, 陈磊
(南京医科大学附属常州市第二人民医院检验科, 江苏常州 213003)

摘要:目的 检测非小细胞肺癌(NSCLC)患者外周血细胞外游离 LUNX mRNA, 探讨其在 NSCLC 辅助诊断中的意义。方法 选择原发性 NSCLC 患者 65 例, 将体检正常的 50 例健康者设为对照组。采用实时聚合酶链反应(RT-PCR)检测其外周血游离 LUNX mRNA, 评价该指标对 NSCLC 辅助诊断的价值。结果 65 例肺癌患者 38 例外周血游离 LUNX mRNA 检出阳性, 阳性率显著高于健康体检者, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 低分化以及晚期肺癌患者该基因检出阳性率高于中高分化及早期肺癌患者, 差异有统计学意义($P < 0.01$); LUNX mRNA 阳性率与患者性别、年龄、肿瘤组织类型、发生部位及患者吸烟与否无关。结论 外周血游离 LUNX mRNA 检测对 NSCLC 具有特异辅助诊断价值。

关键词:癌, 非小细胞肺; 聚合酶链反应; 诊断; LUNX

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.03.013

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)03-0284-03

Clinical significance of cell-free LUNX mRNA detection in peripheral blood in patients with non-small cell lung cancer

Liu Yihua, Zhou Hongxing[△], Zhang Ping, Sun Yingxin, Wang Wenwei, Bai Yang, Zhou Han, Chen Lei
(Department of Clinical Laboratory, the Second People's Hospital of Changzhou, Affiliated to Nanjing Medical University, Changzhou, Jiangsu 213003, China)

Abstract: Objective To investigate the clinical significance of cell-free LUNX mRNA in peripheral blood in patients with non-small cell lung cancer. **Methods** Cell-free LUNX mRNA was detected by real-time PCR in 65 patients with non-small cell lung cancer and 50 healthy subjects. **Results** The positive LUNX mRNA rate was 58.5% (38 in 65) in lung cancer patients, which was significantly higher than in healthy subjects ($P < 0.01$). The positive rates in poorly differentiated and advanced stage cancer patients were significantly higher than that in lung cancer patients with high differentiation and early stage ($P < 0.01$). Positive LUNX mRNA had no correlation with gender, age, histological type, tumor location and smoking. **Conclusion** Detection of cell-free LUNX mRNA in peripheral blood can be used in auxiliary diagnosis of non-small cell lung cancer with high specificity.

Key words: carcinoma, non-small-cell lung; polymerase chain reaction; diagnosis; LUNX

全球几种常见恶性肿瘤中, 肺癌的发病率占首位, 其中非小细胞肺癌(NSCLC)约占肺癌的 4/5。由于肺癌早期症状不明显, 一旦确诊, 大部分已属中、晚期, 5 年生存率不足 15%^[1], 因此, 早期诊断是提高肺癌患者生存率的关键。

LUNX 基因是通过差异显示技术筛选克隆出的一个人类肺组织特异度基因, 在肺以外的其他肿瘤组织中不表达或表达很低^[2-3]。过去研究显示检测 NSCLC 患者外周血循环肺癌细胞内的 LUNX 基因, 可以推断是否有血液循环微转移的可能^[4-6]。而直接检测外周血细胞外游离 LUNX 基因, 国内仅有 2 篇报道^[7-8]。国外研究表明肿瘤患者外周血细胞外游离 mRNA 检测是一种辅助诊断恶性肿瘤的新手段^[9-11]。笔者检测了 NSCLC 患者外周血细胞外游离 LUNX mRNA, 旨在找到一种能早期特异度辅助诊断 NSCLC 的新方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2011 年 7 月至 2012 年 10 月在本院确诊的原发性 NSCLC 患者 65 例, 其中, 男 42 例, 女 23 例; 年龄 38~82 岁, 平均 65.4 岁。将同期来本院体检, 提示血常规、肝功能、肾功能、胸部 X 线透射检查均正常的 50 例健康者设为对照组, 其中, 男 31 例, 女 19 例; 年龄 48~72 岁, 平均 61.3 岁。

1.2 主要仪器与试剂 RNA 病毒提取试剂盒(QIAamp Viral RNA Mini Kit)购自凯杰生物技术(上海)有限公司, PrimeScript 实时聚合酶链反应(real time-polymerase chain reaction, RT-PCR)定量试剂盒、pMD18 TA 克隆试剂盒、质粒提取试剂

盒购自宝生物工程(大连)有限公司。PCR 引物及 TaqMan 探针由上海生工生物工程有限公司合成, 序列为跨外显子设计, 见表 1。目的扩增段长度为 145 bp, 退火温度为 60 °C。所用仪器为德国 Eppendorf 5331 PCR 仪及美国 ABI PRISM 7000 荧光定量扩增仪。

表 1 引物及探针序列

引物类型	序列
正向	5'-AAG TCT GTT GAG GCT GGC TG-3'
反向	5'-GCC AAG TCC ATC AAG CAG AG-3'
探针	5'-FAM-CCT CAA CAG ACT TGC ACC GAC CA-TAMRA-3'

1.3 方法

1.3.1 RNA 提取与逆转录 患者及健康者空腹采集静脉血 2.0 mL, 乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝, 2 h 内 4 000 r/m 离心 15 min, 吸取上层血浆按照 RNA 病毒提取试剂盒说明书提取游离 RNA。随即按说明书将 RNA 逆转录为 cDNA, 反应总体系为 20 μL, 包括 4 μL 5×PrimeScript Buffer、4 μL Random 6 mers、1 μL Oligo dT Primer、1 μL PrimeScript RT Enzyme Mix 1、5 μL 提取的 RNA 及 5 μL 无 RNA 酶的双蒸水。设置反应程序为 37 °C 15 min, 85 °C 5 s, 短暂离心后置 -20 °C 保存。

1.3.2 荧光定量 PCR 反应体系为 50 μL, 包括 25 μL Premix Ex Taq™ 溶液, 正向与反向引物各 1 μL 至终浓度为

0.2 μmol/L, 荧光探针溶液 2 μL 至终浓度为 0.2 μmol/Lol/L, ROX Reference Dye 1 μL, cDNA 模板 5 μL 及灭菌蒸馏水 15 μL。按如下程序进行扩增: 94 °C 预变性 30 s 后, 94 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 31 s, 扩增 45 循环。按照试剂盒说明书将扩增后的产物 T-A 克隆至 pMD-18 载体质粒中, 经转化、筛选等步骤后提取质粒, 在 260 nm 处检测浓度, 按下式计算出拷贝数: 拷贝数 (copy/mL) = (M × 6.02 × 10²³) / (L × 10¹² × 650), 其中 M 为浓度 (ng), L 为片段长度。将标准质粒梯度稀释至 10²、10³、10⁴、10⁵ copy/mL, 与标本同步进行定量 PCR 扩增。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析, 率的比较采用 χ² 检验, 以 α=0.05 为检验水准, 以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

将 65 例肺癌患者及 50 例健康者的外周血游离 LUNX mRNA 拷贝数作受试者工作特征 (ROC) 曲线, 见图 1, 根据曲线, 当设定外周血细胞外游离 LUNX mRNA 的 Cut-off 值为 1.06 × 10⁴ copy/mL 时, 对肺癌有最大辅助诊断价值。此时灵敏度为 58.5%, 特异度为 100.0%, 阳性预测值为 100.0%, 阴性预测值为 64.9%, 曲线下面积为 0.839。表 2 为肺癌患者及健康者 LUNX mRNA 的阳性率比较, NSCLC 患者外周血游离 LUNX mRNA 阳性率显著高于健康者 (P<0.01)。

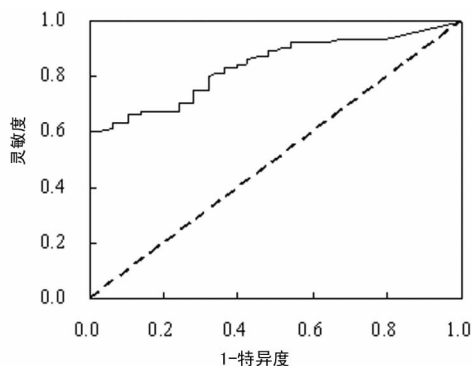


图 1 肺癌患者及健康者 LUNX mRNA 检测的 ROC 曲线

表 2 肺癌患者及健康者外周血游离 LUNX mRNA 表达阳性率

组别	n	阳性率[n(%)]	χ ²
肺癌组	65	38(54.3)*	43.66
对照组	50	0(0.0)	

*: P<0.01, 与对照组比较。

NSCLC 患者外周血游离 LUNX mRNA 表达与肿瘤各病理资料的关系见表 3, 游离 LUNX mRNA 的表达与肿瘤分化程度及分期有关, 低分化及晚期肺癌患者 LUNX mRNA 阳性率较高。NSCLC 患者外周血游离 LUNX mRNA 表达与患者常规资料的关系见表 4, 游离 LUNX 与患者性别、年龄及吸烟与否无关。

表 3 NSCLC 患者外周血游离 LUNX mRNA 与肿瘤病理资料的关系

病理资料	n	阳性率[n(%)]	χ ²
分化程度			
高	19	11(57.9)	10.42
中	14	6(42.8)	
低	32	28(87.5)	

续表 3 NSCLC 患者外周血游离 LUNX mRNA 与肿瘤病理参数的关系

病理资料	n	阳性率[n(%)]	χ ²
分期			
I	16	5(31.3)	18.21
II	12	3(25.0)	
III~IV	37	30(81.1)	
组织类型			
鳞癌	46	29(63.0)	2.97
腺癌	12	7(58.3)	
大细胞癌	7	2(28.6)	
肿瘤发生部位			
中央型	16	7(43.8)	1.89
周围型	49	31(63.3)	

表 4 NSCLC 患者外周血游离 LUNX mRNA 与常规资料的关系

常规资料	n	阳性[n(%)]	χ ²
性别			
男	42	28(66.7)	3.29
女	23	10(43.5)	
年龄(岁)			
≤60	24	13(54.2)	0.29
>60	41	25(61.0)	
是否吸烟			
是	19	12(63.2)	0.24
否	46	26(56.5)	

3 讨 论

肿瘤标志物检测是辅助诊断恶性肿瘤的重要组成部分。用于常规筛查的理想标志物除需取材容易、检测方便外, 还应有一定的敏感性与特异度。目前临床广泛使用的肺癌标志物, 如神经元特异烯醇化酶(NSE)、细胞角蛋白 19 片段抗原 21-1 (CYFRA21-1)、鳞状细胞癌相关抗原(SCCA)等虽在肺癌患者中有较高的阳性率, 但仍缺乏特异度^[12-13]。LUNX 基因定位于 20p11.1~q12, cDNA 全长 1 015 bp, 包含一个开放的读码框, 编码含 257 个氨基酸、相对分子质量为 26.7 × 10³ 的蛋白质, 是近年来发现的对肺组织高度特异的基因^[14]。目前针对该基因的研究集中在对 NSCLC 血液循环微转移的预测方面, 检测标本类型主要为外周血的有核细胞, 而对于细胞外游离的 RNA 却少有研究。Tsui 等^[15] 的研究显示, RNA 从细胞内释放进入血浆后, 与脂质及蛋白类物质结合, 能抵抗血浆中 RNase 的降解, 这为检测游离 RNA 提供了可能。

笔者用荧光定量 PCR 方法检测了 NSCLC 患者及健康者血浆游离 LUNX mRNA, 发现虽然敏感性与其他肿瘤标志物差不多, 但其对 NSCLC 的辅助诊断有极高的特异度及阳性预测值, 适用于对肺癌高危人群的普查。研究还显示, 游离 LUNX mRNA 的表达与肿瘤的分化程度及分期有关, 而与性别、年龄、肿瘤组织类型、发生部位及吸烟与否(下转第 289 页)

然敏感。万古霉素仍作为良好的一线药物,临床用药应掌握适应证,避免细菌对其产生耐药。

目前,分离自 ICU 医院感染患者的菌株仍以革兰阴性菌为主,但革兰阳性的分离数量有逐年增加的趋势。分离菌大部分为多重耐药菌。医院相关人员应通过回顾性分析熟悉本单位的细菌学资料,加强高耐药菌的监测,合理应用抗菌药物。除此之外,还应加强 ICU 内的消毒隔离工作,避免耐药菌株的播散和爆发流行,严格控制抗菌药物的使用,并注意联合用药,加强高耐菌株的动态监测,最大限度地减少或延缓耐药菌株的产生。同时,医护人员应规范 ICU 各种器械的无菌操作,注意清洁和消毒,采取积极的医院感染控制措施,防止交叉感染的发生。

参考文献

[1] 陈民钧. 当前我国抗生素耐药的发展现状及趋势[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(12): 744-747.
 [2] 周贵民, 张军民. 我国细菌耐药性监测应注意的几个问题[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(1): 5-6.
 [3] Clinical and Laboratory Standards Institute. M10-S18 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth informational supplement[S]. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
 [4] 宋青, 何蕾, 黄晓明, 等. 外科重症监护病房医院肺部感染的病原

菌分布[J]. 中华医院感染学杂志, 2003, 13(4): 389-390.
 [5] 张贺平, 李华, 梁学玲, 等. 综合性医院 405 株细菌的分离鉴定及耐药性调查[J]. 中国医学检验杂志, 2002, 3(3): 207-209.
 [6] 王邦松, 李庆兴, 泮发愤. 复数菌败血症感染的危险因素和耐药菌谱分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2004, 14(7): 25-27.
 [7] Klekner A, Bagyi K, Bognar L, et al. Effectiveness of cephalosporins in the sputum of patients with nosocomial bronchopneumonia [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(9): 3418-3421.
 [8] 卓超, 黄文祥, 盛家琦, 等. 重症监护病房革兰阴性杆菌连续六年耐药性监测研究[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(11): 752-756.
 [9] 李耘, 李家泰, 王进, 等. 中国重症监护病房细菌耐药性监测研究[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(11): 733-738.
 [10] 年华, 褚云卓, 欧阳金鸣, 等. ICU 连续 8 年革兰阴性杆菌的菌谱调查[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(1): 111-114.
 [11] 高伟, 秦瑾, 冯忠军, 等. 重症监护病房医院内感染临床特点及病原菌耐药性分析[J]. 中国综合临床, 2010, 26(10): 1059-1062.
 [12] 宋青, 周飞虎, 马迎民, 等. 外科重症监护病房嗜麦芽寡养单胞菌暴发流行调查[J]. 中华医院感染学杂志, 2004, 14(12): 1433-1434.
 [13] 余续发. 耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌医院感染的调查[J]. 中华医院感染学杂志, 2002, 12(4): 312-313.

(收稿日期: 2013-10-15)

(上接第 285 页)

等因素无关。肿瘤分化程度越低,分期越晚,阳性率越高。笔者推测低分化且分期晚的实体瘤,瘤组织内部常因营养缺乏而导致肿瘤细胞凋亡、坏死,胞内 RNA 游离出细胞进入血循环。Zhou 等^[16]的研究发现肿瘤细胞的缺氧是导致 RNA 从细胞内释出的重要因素,这一点,也佐证了本实验结果。

外周血细胞外游离 RNA 的检测取材方便,是一种非侵入性的检测手段。本实验结果提示游离 LUNX mRNA 检测对 NSCLC 有高度特异的辅助诊断价值,且因其与肿瘤分化和分期有关,因此,亦可作为患者预后不良的一个重要指标,对肺癌的综合治疗具有指导作用。

参考文献

[1] Mountain CF. Revisions in the international system for staging lung Cancer[J]. Chest, 1997, 111(6): 1710-1717.
 [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] 刘宏伟, 谢风, 刘刚, 等. RT-PCR 法检测非小细胞肺癌患者外周血 Lunx mRNA 的表达及临床意义[J]. 中国实验诊断学, 2008, 12(8): 1007-1009.
 [5] 余辉, 黄秀英, 胡祎, 等. 检测外周血 Lunx mRNA 表达在诊断非小细胞肺癌微转移中的临床价值[J]. 中国肿瘤临床, 2012, 39(2): 74-76, 84.
 [6] 冯斌, 刘希斌, 吕丽燕, 等. Lunx mRNA 在非小细胞肺癌外周血中的表达[J]. 山东医药, 2008, 48(45): 4-6.

[7] 周洪兴, 王苏建, 王家平, 等. 血浆肺特异性 X 基因 mRNA 检测对诊断肺癌的意义[J]. 临床检验杂志, 2011, 29(4): 266-267.
 [8] 赵文杰, 周洪兴, 王苏建, 等. 肺癌患者血浆及外周血单个核细胞 Lunx mRNA 检测的临床意义[J]. 检验医学, 2012, 27(8): 631-634.
 [9] El-Hefnawy T, Raja S, Kelly L, et al. Characterization of amplifiable, circulating RNA in plasma and its potential as a tool for Cancer diagnostics[J]. Clin Chem, 2004, 50(3): 564-573.
 [10] Swarup V, Rajeswari MR. Circulating (cell-free) nucleic acids—a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases[J]. FEBS Lett, 2007, 581(5): 795-799.
 [11] Xu W, Zhou H, Qian H, et al. Combination of circulating CXCR4 and Bmi-1 mRNA in plasma: A potential novel tumor marker for gastric Cancer[J]. Mol Med Report, 2009, 2(5): 765-771.
 [12] 万锦平, 黄建安, 刘皓, 等. 血清 SCC-Ag、CYFRA21-1、NSE、CEA 联合检测对肺癌的诊断价值[J]. 临床肺科杂志, 2007, 12(2): 111-112.
 [13] 高华, 张炳昌, 范卫华, 等. NSE、CYFRA21-1 及 CEA 检测在肺癌诊断中的价值[J]. 山东医药, 2010, 50(27): 11-12.
 [14] 庄翔, 刘伦旭, 朱文, 等. 肺癌患者外周血中 Lunx mRNA 的检测及其临床意义[J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2007, 14(3): 184-187.
 [15] Tsui NB, Ng EK, Lo YM. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma[J]. Clin Chem, 2002, 48(10): 1647-1653.
 [16] Zhou H, Xu W, Qian H, et al. Circulating RNA as a novel tumor marker: an in vitro study of the origins and characteristics of extracellular RNA[J]. Cancer Lett, 2008, 259(1): 50-60.

(收稿日期: 2013-12-01)