·论　著·

原发性肝癌患者血清肿瘤标志物与肿瘤组织中凋亡调节基因表达的关系

陈　军，吴洪坤，李　畅，耿红莲，周　琳△
（第二军医大学附属长征医院实验诊断科，上海 200003）

摘　要：目的　探讨原发性肝癌患者血清肿瘤标志物与肿瘤组织中凋亡调节基因表达的关系。**方法**　40 例原发性肝癌患者与 40 例健康者分别纳入观察组和对照组，检测 2 组受试者的高尔基体蛋白 73（GP73）、胸苷激酶（TK1）、Dickkopf1（DKK1）水平，以及肿瘤组织中凋亡调节基因的表达水平。**结果**　观察组患者血清中 GP73、TK1、DKK1 水平明显高于对照组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。肝癌组织中凋亡抑制基因 Plk1、Livin 和 Xiap 的水平高于癌旁正常组织，促凋亡基因 MTS1、Caspase-3、Caspase-8 的水平低于癌旁正常组织，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。血清 GP73、TK1、DKK1 水平与肝脏组织中 Plk1、Livin、Xiap 水平呈正相关，与 MTS1、Caspase-3、Caspase-8 的水平呈负相关。**结论**　原发性肝癌患者血清中 GP73、TK1、DKK1 水平异常升高，且与肿瘤组织中凋亡调节基因的表达密切相关，是判断原发性肝癌病情的理想指标。

关键词：原发性肝癌；　肿瘤标志物；　凋亡
DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2016.03.007　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130（2016）03-0305-03

Relationship between serum tumor marker level with apoptosis regulation gene expression of tumor tissue in patients with primary hepatocarcinoma

Chen Jun, Wu Hongkun, Li Chang, Geng Honglian, Zhou Lin△
（*Department of Laboratory Diagnosis, Affiliated Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai* 200003, *China*）

Abstract: Objective　To study the relationship between serum tumor marker level and the apoptosis regulation gene of tumor tissue in the patients with primary hepatocarcinoma. **Methods**　40 cases of primary hepatocarcinoma and 40 healthy people were included into the observation group and control group. Then the levels of tumor marker GP73, TK1, DKK1 in serum and the expression of apoptosis regulation gene in tumor tissue were detected in the two groups. **Results**　The serum GP73, TK1 and DKK1 levels of the observation group were significantly higher than those of the control group, the difference was statistically significant（$P<0.05$）. The apoptosis inhibiting gene Plk1, Livin and Xiap levels in the hepatocellular carcinoma tissue were higher than those in the adjacent normal tissues, while the pro-apoptotic gene MTS1, Caspase-3 and Caspase-8 levels were lower than those in the adjacent normal tissues, the difference had statistical significance（$P<0.05$）; serum GP73, TK1 and DKK1 levels were positively correlated with Plk1, Livin and Xiap levels and negatively correlated with MTS1, Caspase-3 and Caspase-8 levels. **Conclusion**　The levels of serum GP73, TK1 and DKK1 in the patients with primary hepatocarcinoma are abnormally increased, moreover which are closely correlated with the apoptosis regulating gene expression and the ideal indexes to evaluate the disease condition of primary hepatocarcinoma.

Key words: primary hepatocarcinoma;　tumor marker;　apoptosis

原发性肝癌是消化道系统常见恶性肿瘤，患者预后较差、生存率较低。在临床实践中，采取有效的辅助检查手段早期发现肿瘤，并准确判断病情有助于及时制定合理的治疗方案。血清学指标检测是较为理想的无创性检查方法，有利于长期监测并动态评估病情变化。高尔基体蛋白 73（GP73）、胸苷激酶（TK1）、Dickkopf1（DKK1）等新型的肿瘤标志物在原发性肝癌的筛查中具有较高的特异度[1-2]，但其在肿瘤生长和存活中的作用尚不明确，本研究旨在明确肝癌患者血清中上述标志物的变化情况，讨论其与肝癌组织中凋亡基因和抗凋亡基因表达的关系，以此来探索血清肿瘤标志物水平在原发性肝癌中的应用价值。

1　资料与方法

1.1　一般资料　2013 年 5 月至 2014 年 8 月在本院消化科与感染科确诊为原发性肝癌的 40 例患者纳入观察组，所有患者均参照原卫生部医政司组织，并由全国肿瘤防治办公室与中国抗癌协会合编的《新编常见恶性肿瘤诊治规范》中有关原发性肝癌等肿瘤疾病的诊断标准，排除有转移病灶的患者；同期本院体检中心的 40 例体检健康者纳入对照组，肝肾功能均正常。观察组中男 26 例，女 14 例，平均（55.52±7.48）岁；对照组中男 22 例，女 18 例，平均（54.84±6.84）岁。2 组受试者一般资料比较，差异无统计学意义（$P>0.05$），具有可比性。

1.2　仪器与试剂　ELISA 试剂盒购于武汉伊莱瑞特生物科技有限公司，mRNA 提取和检测试剂盒购于日本 Takara 公司，酶标仪由美国 Bio-Rad 公司生产。

1.3　检测方法　观察组患者在入院后采集外周血 5 mL，离心后取血清保存在－80 ℃环境下；术中操作时，取肝癌组织和癌旁正常组织，经病理检查确认后，投入液氮冷冻并保存在－80 ℃环境下。对照组健康者在体检时采集外周血 5 mL，离心后取血清保存在－80 ℃。采用 ELISA 法在 Bio-Rad 酶标仪上检测血清中 GP73、TK1、DKK1 水平。取观察组患者肝癌组织和癌旁正常组织约 60 mg，加入 Trizol 裂解液 1 mL 抽提总 RNA，反转录成为 cDNA 后采用实时荧光定量 PCR 的方法分别扩增 Plk1、Livin、Xiap、MTS1、Caspase-3、Caspase-8。扩增条件：变性 95 ℃、15 s→特异性退火温度、15 s→延伸 72 ℃、25 s，

作者简介：陈军，男，检验主管技师，主要从事生物化学及 LIS 管理研究。　△　通讯作者，E-mail：lynnzhou36@163.com。

重复 40 个循环，引物序列见表 1。通过软件读取循环阈值（Ct 值）并计算 mRNA 水平相对值，两组间比较时，设定癌旁正常组织中目的基因的 mRNA 水平为 100，计算肝癌组织中目的基因的 mRNA 水平。

表 1　引物序列

基因名称	上游引物	下游引物
Plk1	5′-GAA TTC GGT TCG AAG GAA T-3′	5′-AAT GCG AGG CCA ATT GCA GG-3′
Livin	5′-GGC TAT TAA CGG CTT ACA G-3′	5′-GCG TTA GCC TTA ACG GCC TA-3′
Xiap	5′-CGA TCG TGG CAT AAC GAA T-3′	5′-TAT TTG CCG TCT TAG ATG G-3′
MTS1	5′-GTA CGA TTA ACT TCA AGC T-3′	5′-CTG TGC AAT CGG TAA CGC TT-3′
Caspase-3	5′-GCA AGT TGC AGG TTC CAT A-3′	5′-GCG CCA TGG AGC CAA CTT G-3′
Caspase-8	5′-GCA TCT CAC ATT ACT GCC G-3′	5′-CCG TTA GTC CTG GCT AAT GCC-3′

1.4　统计学处理　采用 SPSS18.0 统计软件进行数据处理及统计学分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用 t 检验，回归分析采用一元线性回归，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　2 组受试者血清肿瘤标志物的水平比较　观察组患者血清中 GP73、TK1、DKK1 水平明显高于对照组，差异有统计学意义（$t=35.857$、28.948、54.402，$P<0.05$），见表 2。

表 2　2 组受试者血清肿瘤标志物的水平比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	GP73（μg/L）	TK1（pmol/L）	DKK1（μg/L）
观察组	40	123.45±16.85*	5.14±0.65*	15.52±1.85*
对照组	40	17.25±2.18	0.85±0.11	1.86±0.24

*：$P<0.05$，与对照组比较。

2.2　凋亡抑制基因　肝癌组织中凋亡抑制基因 Plk1、Livin 和 Xiap 的 mRNA 浓度高于癌旁正常组织中凋亡抑制基因 mRNA 浓度，差异有统计学意义（$P<0.05$），见表 3。

表 3　癌旁正常组织与肝癌组织中凋亡抑制基因 mRNA 水平比较（$\bar{x}\pm s$）

组织类型	Plk1	Livin	Xiap
癌旁正常组织	100.00±17.92	100.00±15.95	100.00±18.22
肝癌组织	251.23±28.59*	301.42±38.59*	287.35±31.34*

*：$P<0.05$，与癌旁正常组织比较。

表 4　癌旁正常组织与肝癌组织中促凋亡基因 mRNA 水平比较（$n=40$，$\bar{x}\pm s$）

组织类型	MTS1	Caspase-3	Caspase-8
癌旁正常组织	100.00±19.22	100.00±18.48	100.00±17.14
肝癌组织	24.19±3.29*	28.86±3.14*	18.33±2.16*

*：$P<0.05$，与癌旁正常组织比较。

表 5　血清肿瘤标志物与凋亡调节基因的相关分析

	GP73		TK1		DKK1	
	回归系数（b）	t	b	t	b	t
Plk1	1.134	7.828*	1.331	11.345*	0.887	14.249*
Livin	0.485	8.384*	0.983	14.597*	0.672	12.613*
Xiap	0.682	10.192*	1.103	12.349*	1.103	9.398*
MTS1	−1.029	9.384*	−1.405	9.879*	−0.782	11.318*
Caspase-3	−0.856	12.378*	−0.883	10.138*	−0.913	13.049*
Caspase-8	−0.761	11.304*	−0.914	17.409*	−0.674	15.582*

*：$P<0.05$，相关显著。

2.3　促凋亡基因　肝癌组织中促凋亡基因 MTS1、Caspase-3、Caspase-8 的 mRNA 浓度低于癌旁正常组织，差异有统计学意义（$P<0.05$），见表 4。

2.4　血清肿瘤标志物与凋亡调节基因的相关分析　血清 GP73、TK1、DKK1 浓度与凋亡抑制基因 Plk1、Livin 和 Xiap 的 mRNA 浓度呈显著正相关；与促凋亡基因 MTS1、Caspase-3、Caspase-8 的 mRNA 浓度呈显著负相关，见表 5。

3　讨　论

原发性肝癌的早期诊断与筛查一直是临床研究的热点和重点，血清学指标检测是十分理想的辅助检查方式，具有采样操作方便、可以反复操作、结果稳定性好的优势。GP73、TK1、DKK1 等是近年来新发现的对原发性肝癌具有诊断价值的血清肿瘤标志物[1-2]。GP73 是一类位于高尔基体顺面的蛋白，在生理条件下处于细胞内；在肝细胞发生癌变的过程中，GP73 会由高尔基体进入胞浆，而后在分泌小体的包裹下进入血液循环[3]。TK1 是一类存在于细胞质中，且与细胞周期调控密切相关的蛋白，具体的作用是催化胸腺胞嘧啶脱氧核苷酸与磷酸脱氧核苷酸的互相转化[4]。DKK1 是一类分泌性糖蛋白，同样与细胞增殖的调控密切相关，通过羧基末端的结构域与 LRP6 结构域互相作用来实现促进肝癌细胞增殖的效应[5]。本研究通过分析原发性肝癌患者和健康者血清中肿瘤标志物水平可知，观察组患者血清中 GP73、TK1、DKK1 水平高于对照组。这就初步说明原发性肝癌患者血清中 GP73、TK1、DKK1 水平异常升高，对疾病具有诊断价值。

肝癌细胞的增殖过程同时受到了凋亡促进基因和凋亡抑制基因的调控，Plk1、Livin、Xiap 是新发现的凋亡抑制蛋白，Plk1 属于有丝分裂的丝氨酸/苏氨酸激酶家族，具有明显的促进细胞分裂和增殖的效应[6-7]；Livin 和 Xiap 均属于凋亡抑制蛋白，能够通过抑制凋亡分子 Caspase 来阻断细胞的凋亡过程[8]。Caspase 家族及 Bax 是效应明确的促凋亡基因，Caspase 家族中的 Caspase-3 和 Caspase-8 是凋亡过程的执行分子，可以通过与细胞内相关原件的结合来直接造成细胞发生凋亡[9-10]；Bax 的促凋亡作用是通过与 Bcl-2 形成异源二聚体、抑制 Bcl-2 的促增殖作用来实现的，Bax 表达缺失会造成细胞发生恶性增殖[11]。本研究通过荧光定量 PCR 的方法检测了肝癌组织中凋亡相关基因的 mRNA 水平，结果显示肝癌组织中凋亡抑制基因 Plk1、Livin 和 Xiap 的水平高于癌旁正常组织；促凋亡基因 MTS1、Caspase-3、Caspase-8 的水平低于癌旁正常组织。这就说明肝癌组织中存在凋亡调节基因表达异常。

血清中肿瘤标志物水平的升高与肝癌细胞的恶性增殖有关，肝癌细胞的恶性增殖能力越强、肿瘤的恶性程度越高。在临床实践中，检测肝癌细胞的恶性增殖能力有助于判断肿瘤的恶性程度。但是，肝癌细胞增殖能力的检查需要通过有创性的

穿刺活检来完成，不利于病情的长期监测；并且在癌症早期，调控肝癌细胞增殖的相关基因也不会出现明显变化。相比穿刺活检，血清学指标检测的优势在于创伤小、可重复，并且在癌症发生的早期便会出现改变。如上所述，肝癌患者血清中 GP73、TK1、DKK1 水平异常升高。那么，上述血清学指标能否反映肝癌细胞的增殖能力及疾病的恶性程度呢？为了验证这一点，本研究对血清学指标与凋亡调节基因的相关性进行了分析，结果显示血清中 GP73、TK1、DKK1 水平与凋亡抑制基因的 mRNA 水平呈正相关；与促凋亡基因 MTS1、Caspase-3、Caspase-8 的 mRNA 水平呈负相关。这就说明血清肿瘤标志物可以反映肿瘤组织中凋亡相关基因的表达情况。

综上所述，原发性肝癌患者血清中 GP73、TK1、DKK1 水平异常升高，且与肿瘤组织中凋亡调节基因的表达存在相关性，是判断原发性肝癌病情的理想指标。

参考文献

[1] 王然，王晓东，李凤焕，等. 高尔基体蛋白 GP73 在肝癌诊断中的临床意义[J]. 国际检验医学杂志，2012，33(13)：1572-1573.

[2] 王强，谢跃文，夏洁. 血清 TK1、AFP、CEA 联合检测在原发性肝癌诊断中的临床价值[J]. 国际检验医学杂志，2013，34(9)：1101-1102.

[3] Jia Z, Wang L, Liu C, et al. Evaluation of α-fetoprotein-L3 and Golgi protein 73 detection in diagnosis of hepatocellular carcinoma [J]. Contemp Oncol (Pozn), 2014, 18(3): 192-196.

[4] Faria M, Halquist MS, Kindt E, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of thymidine kinase activity in human serum by monitoring the conversion of 3′-deoxy-3′-fluorothymidine to 3′-deoxy-3′-fluorothymidine monophosphate[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2012, 907(907): 13-20.

[5] Huang Y, Yang X, Zhao F, et al. Overexpression of dickkopf-1 predicts poor prognosis for patients with hepatocellular carcinoma after orthotopic liver transplantation by promoting Cancer metastasis and recurrence[J]. Med Oncol, 2014, 31(7): 966.

[6] 喻宏，贾晓敏，张灿，等. PLK1、CCL18 在原发性肝癌中的表达及其与临床病理的关系[J]. 中国现代医学杂志，2013，23(34)：48-52.

[7] Mok WC, Wasser S, Tan T, et al. Polo-like kinase 1, a new therapeutic target in hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(27): 3527-3536.

[8] 何金花，陈顺仪，王莉，等. Survivin、xiap、apollon 和 livin 反义寡核苷酸对人消化系肿瘤细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国药理学通报，2011，27(3)：367-372.

[9] 谭湘芳，陈鹄，周俊，等. Livin 和 Caspase-3 在原发性肝癌中的表达及意义[J]. 广东医学，2013，34(5)：768-770.

[10] Luan Z, He Y, He F, et al. Rocaglamide overcomes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in hepatocellular carcinoma cells by attenuating the inhibition of caspase-8 through cellular FLICE-like-inhibitory protein downregulation [J]. Mol Med Rep, 2015, 11(1): 203-211.

[11] Al-Fatlawi AA, Al-Fatlawi AA, Irshad M, et al. Rice bran phytic acid induced apoptosis through regulation of Bcl-2/Bax and p53 genes in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(8): 3731-3736.

（收稿日期：2015-09-20）

（上接第 304 页）

溶剂提取法，但其在后续扩增目的基因的 PCR 反应中有更好的效果，还避免了繁琐的技术劳动和有毒的有机溶剂[5]。有研究在提取脑脊液的肺结核分枝杆菌 DNA 时，用含 chelex100 和蛋白酶 K 的缓冲液 56 ℃孵育前，用溶菌酶 37 ℃孵育 1 h 并未改善检测的灵敏度，其最低检测限从 10^4～10^5 CFU 细菌反而升至 10^5～10^6 CFU 细菌[6]。因此本文继续研究了当 chelex100R 和蛋白酶 K 与溶菌酶等酶同时应用时的反应条件。

本研究分析显示含溶菌酶、溶葡萄球菌酶、chelex100R 树脂、蛋白酶 K 的裂解液同时与细菌于 56℃孵育 30min，是获取 MRSA 细菌 DNA 既便捷又高效的方法[7]，溶葡萄球菌酶和 chelex100R 树脂降低 PCR 反应 Ct 值的效果非常明显，提高了检测能力，该方法可用于细菌定量检测。同时本研究发现以上所有成分 56 ℃一步法裂解的效果最佳，不同于研究者们通常采用的方法，即细菌经溶菌酶和溶葡萄球菌酶 37 ℃孵育后，再用蛋白酶 K56 ℃孵育[8]。本研究方法可以立即用于下一步 PCR，如用于日常检测能大大缩短标本处理时间，提高检测效率，为 PCR 法快速检测临床 MRSA 感染奠定了基础。

参考文献

[1] 史小英，陈启容，余新玉，等. ICU 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌快速监测及防控[J]. 国际检验医学杂志，2015，36(7)：877-879.

[2] Grisold AJ, Leitner E, Mühlbauer G, et al. Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and simultaneous confirmation by automated nucleic acid extraction and real-time PCR[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(7): 2392-2397.

[3] 汤一苇，白春学，倪语星，等. 微生物分子诊断学[M]. 北京：科学出版社，2013.

[4] Nagdev KJ, Kashyap RS, Deshpande PS, et al. Determination of polymerase chain reaction efficiency for diagnosis of tuberculous meningitis in chelex100 extracted DNA samples[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2010, 14(8): 1032-1038.

[5] Zucol F, Ammann RA, Berger C, et al. Real-time quantitative broad-range PCR assay for detection of the 16S rRNA gene followed by sequencing for species identification[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(8): 2750-2759.

[6] Zhao J, Carmody LA, Kalikin LM, et al. Impact of enhanced Staphylococcus DNA extraction on microbial community measures in cystic fibrosis sputum[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33127.

[7] 金姝，朱晴晖，邹玉涵，等. 一种提取耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 DNA 的方法[P]. 中国：ZL201310124795.2, 2015-01-14.

[8] López M, Rivera MG, Viettri M, et al. Comparing two protocols of DNA extraction of Trypanosoma cruzi cultured in axenic medium [J]. Rev Peru Med Exp Salud Publica, 2014, 31(2): 222-227.

（收稿日期：2015-10-28）