

• 临床研究 •

肝细胞癌患者的外周血单个核细胞 caveolin-1mRNA 表达升高及其意义*

张志波,余陈贵,石 铮
(福建医科大学附属第一医院肝胆胰外科,福州 350004)

摘 要:目的 检测外周血单个核细胞 caveolin-1mRNA 在肝细胞癌患者中的表达,探讨其临床意义和应用前景。方法 利用 RT-PCR 技术检测 64 例肝细胞癌患者组及 68 例对照组外周血单个核细胞 caveolin-1mRNA 表达量;比较两组表达差异,并分析其与肝细胞癌患者中不同临床参数的关系。结果 外周血单个核细胞 caveolin-1mRNA 在肝细胞癌组的表达量较对照组显著升高($P=0.017$);且其高表达与肝细胞癌的组织低中分化程度和进展期密切相关($P=0.041, P=0.023$)。结论 外周血单个核细胞 caveolin-1mRNA 在肝细胞癌患者中的表达水平较对照组显著升高,且与肿瘤的组织恶性程度和进展密切相关,该检测手段有望成为评估肝细胞癌进展与预后的重要生物学指标之一。

关键词:caveolin-1mRNA; 肝细胞癌; 外周血单个核细胞; 肿瘤进展; 预后
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.01.036 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2017)01-0096-03

肝细胞癌(HCC)是世界常见恶性肿瘤之一,位于肿瘤致死病因第 3 位^[1]。因此,为提高 HCC 更好的治疗效果和临床预后判定,急需进一步探索更有价值的生物学标志物。越来越多的临床病理学研究表明,caveolin-1mRNA 作为细胞膜上窖蛋白的主要结构组成成分^[2],其表达升高与 HCC 进展、侵袭转移以及不良预后都有着显著相关^[3-4]。本研究的目的是在 mRNA 水平上阐明 caveolin-1mRNA 在 HCC 患者外周血单个核细胞中的表达量,以及比较其与健康人中表达的差别。探索外周血单个核细胞 caveolin-1mRNA 在 HCC 患者中表达水平差异,并分析其与 HCC 进展和预后的关系,探讨其可能应用前景。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究收集 2012 年 9 月至 2013 年 7 月在本院住院的 64 例 HCC 患者(治疗前)和 68 例健康体检志愿者(来自本院健康体检中心),肝癌确诊通过手术标本(60%)或经皮穿刺活检和影像学检测(40%)。肝癌的分期是根据国际抗癌协会(UICC2010)TNM 分期和 Edmonson 的病理分级。

1.2 材料及试剂 Red Blood Cell Lysis Buffer(红细胞裂解液)购自 Beyotime 公司,TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司,PrimeScript RT reagent Kit 试剂盒及 SYBR Premix Ex Taq 荧光定量 PCR 试剂盒购自大连宝生物工程公司,Caveolin-1mRNA 和 GAPDH 引物合成于 Invitrogen 公司。

1.3 研究方法

1.3.1 外周血单个核细胞总 RNA 的提取 用 EDTA 抗凝管分别收集两组中空腹外周静脉血各 5 mL,保存 4℃冰箱,2 h 内分离其单个核细胞,进行总 RNA 提取。操作如下:将 5 mL 的血液分成各 2.5 mL 分装于 15 mL 的离心管中,加入 3 倍体积的红细胞裂解液,于 4℃下充分裂解 10 min 后,500 r/min 离心 10 min 后小心收集离心管底部细胞团块,即为外周血单个核细胞(PBMCS)。1 mL 的 TRIzol 加入 PBMCS 用于提取总 RNA(详见 Invitrogen RNA 提取说明书)。根据分光光度计 260 nm 波长值来决定抽提的总 RNA 的浓度,测定 260/280 OD 值和琼脂糖凝胶电泳来分析 RNA 的质量。

1.3.2 逆转录 cDNA 的合成及荧光定量 PCR 使用 PrimeScript RT reagent Kit 逆转录试剂盒将 4 μL 的总 RNA 逆转录成 cDNA,反应体系为 20 μL,逆转录条件为:37℃ 15 min,85℃ 5 s;cDNA 保存于-20℃。依照 SYBR Premix Ex Taq 荧光定量 PCR 试剂盒说明书,于 ABI7500 荧光定量 PCR 仪上扩增 caveolin-1mRNA 和内参基因 GAPDH,反应体系为 20 μL,反应条件为:95℃预变性 30 s 后,95℃变性 5 s,60℃退火

34 s,共 40 个循环。引物序列及片段大小详见表 1。

表 1 caveolin-1mRNA 和 PCR 引物序列

基因	引物序列(5'→3')	片段大小(bp)
Caveolin-1	上游 TTAGCGGCATTGGAAGG	212
	下游 GTAGATGGAATAGACACGCTG	
GAPDH	上游 GGGTGTGAACCATGAGAAGT	142
	下游 GGCATGGACTGTGGTCATGA	

1.4 统计学处理 运用 SPSS19.5 统计软件分析结果,2^{-ΔΔCt}方法统计 caveolin-1mRNA 表达水平,使用两个独立样本比较的 Wilcoxon 秩和检验比较两组间差异及与各临床参数间关系,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HCC 患者与对照组间外周血单个核细胞 caveolin-1mRNA 表达水平比较 利用实时荧光定量 PCR 技术检测两组外周血单个核细胞中 caveolin-1mRNA 的表达水平,统计分析表明,PBMCS caveolin-1mRNA 在对照组不表达或低表达,而 HCC 组呈高表达水平,其相对表达量为对照组 6.08 倍,且差异具有统计系意义($P=0.017$)。见表 2。

表 2 描述统计及两个独立样本比较 Wilcoxon 秩和检验

临床参数	<i>n</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	最小值	最大值	中位数	<i>P</i>
对照组	68	5.00	4.11	1.00	14.04	4.14	0.017
肝细胞癌组	64	30.38	47.29	1.42	153.51	8.96	
年龄(岁)							
≤52.6	30	30.93	34.79	1.42	92.70	9.50	0.25
>52.6	34	29.89	47.34	1.57	153.51	8.43	
分期							
早期(TNM I+II)	28	9.40	9.84	1.42	36.22	5.33	0.023
进展期(TNM III)	36	46.70	48.89	2.13	153.51	20.60	
肝细胞癌组织分化							
高分化	4	6.66	5.70	10.70	2.13	6.66	0.041
中低分化	26	30.54	42.85	1.41	128.51	8.20	
乙肝表面抗原							
阳性	50	30.18	44.04	1.42	153.51	8.43	0.90
阴性	14	31.10	32.39	1.57	79.20	19.43	
甲胎蛋白							
阳性	44	29.93	39.11	1.57	128.51	8.33	1.00

* 基金项目:福建省自然科学基金资助项目(2013J01293);福建医科大学青年骨干教师培养专项基金项目(JGG201311)。

续表 2	描述统计及两个独立样本比较 Wilcoxon 秩和检验						
临床参数	<i>n</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	最小值	最大值	中位数	<i>P</i>
阴性	20	31.37	47.96	1.42	153.51	10.10	
肝硬化							
阳性	26	32.42	50.26	1.57	153.51	9.50	0.92
阴性	38	28.98	35.31	1.42	94.00	8.43	
门静脉及肝内转移							
阳性	30	24.55	33.79	1.57	92.70	8.20	0.43
阴性	34	35.53	47.37	1.42	153.51	10.70	
淋巴结转移							
阳性	8	64.73	72.38	3.29	153.51	51.05	0.39
阴性	56	25.47	34.29	1.42	128.51	8.97	
远处转移							
阳性	6	32.22	46.87	2.19	86.22	8.24	0.90
阴性	58	30.19	41.60	1.42	153.51	9.50	

2.2 HCC 组外周血单个核细胞 caveolin-1mRNA 表达差异与不同临床参数之间的关系 分析 64 例 HCC 患者外周血单个核细胞 caveolin-1mRNA 的表达水平与不同临床参数之间的关系发现,进展期 HCC 中外周血单个核细胞 caveolin-1mRNA 表达水平是早期的 4.97 倍,且差异具有统计学意义($P<0.023$);组织学中低分化组的表达水平为高分化的 4.58 倍,且差异具有统计学意义($P=0.041$)。而其表达差异与甲胎蛋白、是否(乙肝表面抗原阳性、肝硬化、肝内转移、静脉侵袭、淋巴结转移及远处转移)均无显著相关性($P>0.05$),见表 2。

3 讨 论

窖蛋白是嵌入在细胞质膜上主要的蛋白膜状复合体,参与调节细胞膜的脂质转运、信号转导以及肿瘤血管的生成等,caveolin-1mRNA 为其主要组成成分之一^[5]。起始 caveolin-1mRNA 在很多肿瘤中表现为抑制作用^[6-8]。而近来很多研究发现,caveolin-1mRNA 的过表达与有些肿瘤,尤其是肝细胞癌的进展、侵袭转移和不良预后等因素显著正相关^[9-10]。以上证据表明,caveolin-1mRNA 的双重不同调节作用可能与肿瘤类型和分期有关。

近年来有研究发现外周血单核细胞细胞中检测到 caveolin-1mRNA 表达,且其表达水平受细胞活化刺激、疾病状态等因素的影响;研究表明,caveolin-1mRNA 于前列腺癌患者的外周血液中可检测到,且表达水平不同与前列腺癌的进展关系密切^[11-12]。目前,国内外鲜有肝细胞癌中外周血 caveolin-1mRNA 表达水平的研究,在本研究中,笔者运用荧光定量 PCR 技术检测 caveolin-1mRNA 在肝细胞癌患者外周血单个核细胞中表达变化,分析其与不同临床病理学参数之间的相关性。

通过本研究发现,外周血单个核细胞 caveolin-1mRNA 水平在肝细胞癌组中的表达明显高于对照组;肝细胞癌组中进展期的外周血单个核细胞 caveolin-1mRNA 表达水平较早期组显著升高;同时,组织学低中分化组较高分化组亦有显著提高。本实验结果与本研究组早期在肝细胞癌组织学中的研究结果一致,进一步证实了 caveolin-1mRNA 在肝细胞癌的发生、发展侵袭、转移过程中发挥关键效应。

外周血游离核酸水平检测已成为肿瘤分子生物学技术的重要手段之一,检测肿瘤相关目的基因的 mRNA 表达水平可应用于肿瘤的早期发现与复发监测^[13]。有学者研究发现,前列腺癌组织标本中 caveolin-1mRNA 蛋白质和 mRNA 表达量升高与不同病理学参数明显相关,包括淋巴结是否转移和手术边缘有否阳性等多种重要前列腺癌预后指标,并认为 caveolin-1mRNA 表达变化可用于判断局限性前列腺癌的独立预后因素^[14]。随后,另外学者通过检测外周血中 caveolin-1mRNA 表达量变化,发现能区分前列腺良恶性疾病,在前列腺癌中可作

为一种重要的生物学检测手段^[15]。本实验首次研究了外周血单个核细胞 caveolin-1mRNA 表达量与肝细胞癌之间的关系;证明了外周血 caveolin-1mRNA 在肝细胞癌的发生和发展中起着重要的作用。因此,笔者认为肝细胞癌患者外周血单个核细胞 caveolin-1mRNA 表达水平的检测有望用于评估肝细胞癌患者预后,并成为一项重要生物学手段,值得下一步充分实验证实。

本研究尚存在一些不足之处,首先,外周血 caveolin-1mRNA 表达水平检测的特异性还需更多实验研究判断;其次,本研究发现肝细胞癌患者外周血 caveolin-1mRNA 表达水平不同与其甲胎蛋白水平、有无(肝硬化、静脉侵袭、肝内转移、淋巴结及远处转移)无明显相关,这可能与本研究的例数不够有关;最后,本研究尚未对肝细胞癌患者外周血中 caveolin-1mRNA 的蛋白质表达水平进行检测。这些不足之处需要下一步研究加以完善和证实。

总之,本研究发现肝细胞癌患者的外周血中单个核细胞 caveolin-1mRNA 的表达水平显著升高,且与肝细胞癌更差的肿瘤分期和组织分化密切相关。采用 RT-qPCR 技术检测外周血中相关目的基因的游离核酸水平显得更简单、稳定,可重复性和可操作性高,通过该手段检测肝细胞癌外周血中单个核细胞的 caveolin-1mRNA 表达量有望称为评估肝细胞癌进展及预后的重要生物学指标。

参考文献

[1] Lovet JM,Burroughs A,Bruix J. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet,2003,362(9399):1907-1917.

[2] Shatz M,Liscovitch M. Caveolin-1: a tumor-promoting role in human cancer[J]. Int J Radiat Biol,2008,84(3): 177-189.

[3] Lee JS,Thorgeirsson SS. Functional and genomic implications of global gene expression profiles in cell lines from human hepatocellular cancer [J]. Hepatology, 2002, 35 (5):1134-1143.

[4] Cokakli M,Erdal E,Nart D,et al. Differential expression of Caveolin-1 in hepatocellular carcinoma:correlation with differentiation state,motility and invasion[J]. BMC Cancer,2009,9(1):1-12.

[5] Liu P,Rudick M,Anderson RGW. Multiple functions of caveolin-1[J]. J Biol Chem,2002,277(44):41295-41298.

[6] Witkiewicz AK,Dasgupta A,Sotgia F,et al. An absence of stromal caveolin-1 expression predicts early tumor recurrence and poor clinical outcome in human breast cancers[J]. Am J Pathol,2009,174(6):2023-2034.

[7] Wikman H,Kettunen E,Seppanen JK,et al. Identification of differentially expressed genes in pulmonary adenocarcinoma by using cDNA array[J]. Oncogene,2002,21(37): 5804-5813.

[8] Williams M,Lisanti P. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis [J]. Am J Physiol Cell Physiol,2005,288(3):C494-506.

[9] Zhang ZB,Li GP. Caveolin-1 promotes angiogenesis of hepatocellular carcinoma in vivo[J]. Chin J Curr Adv Gen Surg,2011,14(10):760-764.

[10] Tse Yuk,Ko Chi,Tung K,et al. Caveolin-1 overexpression is associated with hepatocellular carcinoma tumourigenesis and metastasis[J]. J Pathol,2012,226(4):645-653.

[11] Tang PF,Burke GA,Li G,et al. Patients with long bone fracture have altered Caveolin-1 expression in their pe-

ripheral blood mononuclear cells[J]. Arch Orthop Trauma Surg, 2009, 129(9): 1287-1292.

[12] Freeman MR, Yang W, Di VD. Caveolin-1 and prostate cancer progression[J]. Adv Exp Med Biol, 2012, 729(29): 95-110.

[13] Vlassov VV, Laktionov PP, Rykova EY. Circulating nucleic acids as a potential source for cancer biomarkers[J]. Curr Mol Med, 2010, 10(2): 142-165.

[14] Horiguchi A, Asano T, Asakuma J, et al. Impact of caveo-
• 临床研究 •

lin-1 expression on clinicopathological parameters in renal cell carcinoma[J]. J Urol, 2004, 172(2): 718-722.

[15] Tahir SA, Kurosaka S, Tanimoto R, et al. Serum caveolin-1, a biomarker of drug response and therapeutic target in prostate cancer models. [J]. Cancer Biol Ther, 2013, 14(2): 117-126.

(收稿日期: 2016-07-28 修回日期: 2016-10-19)

黑龙江某院临床分离病原菌的分布及耐药性分析*

栾艳森, 张海云[△], 李庆阳

(黑龙江省牡丹江市第一人民医院检验科 157011)

摘要:目的 回顾性分析黑龙江省某院 2016 年 1 月 1 日至 2016 年 3 月 31 日临床分离病原菌的分布和耐药特点, 为临床抗菌药物的使用提供依据。方法 采用 HH. CP-01W 二氧化碳培养箱及 BACT/ALERT 3D 全自动血培养仪进行标本培养, 使用黑马 DL-96 鉴定系统进行菌株鉴定和药敏试验。结果 送检的 5 285 份标本共分离病原菌 825 株, 其中革兰阴性菌 496 株, 占 60.1%; 革兰阳性菌 268 株, 占 32.4%; 念珠菌 61 株, 占 7.4%。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)占金黄色葡萄球菌 56.9%, 耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌(MRCON)占凝固酶阴性葡萄球菌 56.0%, 未检出对万古霉素和利奈唑胺耐药的阳性菌。结论 严格执行标本的前处理过程有助于提高标本的阳性检出率, 临床医师在经验用药的基础上应重视药敏监测结果, 严格用药指征, 从而做到合理应用抗菌药物。

关键词:医院感染; 耐药率; 细菌敏感性试验; 回顾性研究

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2017. 01. 037 文献标识码: A 文章编号: 1673-4130(2017)01-0098-03

临床致病菌耐药性的普遍存在, 以及耐药水平越来越高, 给人类生存环境带来了极大的创伤。目前国内外的研究普遍认为: 细菌耐药问题已成为人类所面临的重要的公共卫生问题, 是一个具有灾难性的难题。由于滥用抗菌药物, 加速了细菌耐药基因蔓延的速度。细菌耐药性的产生使患者的病情不能得到有效的控制, 患病和发病时间的延长, 死亡的危险性增大, 使其他人感染的危险性增加等^[1]。因此合理的应用抗菌药物成为控制细菌耐药性的重要一部分^[2]。掌握重要致病菌对抗菌药物耐药率的准确资料才能合理选用抗菌药物。同时根据细菌耐药情况, 建立抗菌药物临床应用与细菌耐药的预警机制, 并采取相应的干预措施^[3]。本次对本院 2016 年第 1 季度培养检出的细菌及其对抗菌药物耐药率进行分析, 为抗菌药物的合理应用和对其的干预措施提供依据。

1 资料与方法

1.1 标本收集 2016 年 1 月 1 日至 2016 年 3 月 31 日本院共收集的细菌培养标本 5 285 例。规定时间内及时送检, 标本接收合格后放入二氧化碳培养箱及全自动血培养仪中进行培养。所有过程严格按照《全国临床检验操作规程》进行操作。

1.2 细菌鉴定 所有接收标本分别接种于中国兰琼脂培养基、哥伦比亚血琼脂培养基、巧克力琼脂培养基。特殊标本加用特别培养基, 菌株的鉴定和药敏试验用黑马 DL-96 药敏鉴定系统进行, 辅助鉴定方案为 API 试剂条。依据 CLSI 2014 年标准对药敏结果进行解读。

1.3 仪器 BACT/ALERT 3D 全自动血培养仪、中国兰琼脂培养基、哥伦比亚血琼脂培养基、巧克力培养基以及广东珠海黑马 DL-96 药敏自动鉴定系统。

1.4 统计学处理 采用 WHONET 5.6 软件对所有实验数据进行统计分析。

2 结果

2.1 病原菌分布 2016 年 1 月 1 日至 2016 年 3 月 31 日共收集本院细菌培养标本 5 285 例。其中痰液标本 3 012 例, 尿液 575 例, 咽拭子 1 192 例, 血液标本 262 例, 其他标本共计 244 例。其中分离的各种病原菌的分布及构成比见表 1。

表 1 分离的各种病原菌的分布及构成比		
病原菌	株数(n)	构成比(%)
革兰阳性菌	268	100.0
凝固酶阴性葡萄球菌	25	9.3
肠球菌属	88	32.8
金黄色葡萄球菌	79	29.4
链球菌属	72	26.9
其他阳性菌	4	1.1
革兰阴性菌	496	100.0
大肠埃希菌	137	27.6
肺炎克雷伯菌	149	30.0
鲍曼不动杆菌	72	14.5
铜绿克雷伯菌	51	10.3
阴沟肠杆菌	13	2.6
其他阴性菌	74	14.9
酵母菌	61	100.0

2.3 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)及耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌(MRCON)检出率以及不同病区标本送检率

* 基金项目: 黑龙江牡丹江市科技攻关项目[Z2015(s0054)]; 黑龙江省卫生计生委科研立项(2016-344)。

[△] 通信作者, E-mail: zhy34@163. com。