

胃癌患者外周血人端粒酶逆转录酶 mRNA 表达及其临床意义

刘永萍^{1,2}, 凌 扬^{1,2}, 王凤军¹, 孔颖泽², 张亚平^{1,2}, 盛桂凤², 徐建忠², 杨全良²

Expression of Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) mRNA in Peripheral Blood with Gastric Cancer and Its Clinical Significance

LIU Yong-ping^{1,2}, LING Yang^{1,2}, WANG Feng-jun¹, KONG Ying-ze², ZHANG Ya-ping^{1,2}, SHENG Gui-feng², XU Jian-zhong², YANG Quan-liang²

1. Laboratory of Clinical Oncology, Soochow University Affiliated Changzhou Cancer Hospital, Changzhou 213001, China, 2. Department of Oncology

Abstract: Objective To investigate the expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA in peripheral blood of patients with gastric cancer and to discuss its clinical significance. **Methods**

hTERT mRNA in peripheral blood was detected by TaqMan real time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR)in 58 patients with gastric cancer and 20 healthy subjects. The patients were followed for 2 years. **Results** The positive rate of hTERT mRNA in patients with gastric cancer was 55. 17%(32 / 58), which was significantly higher than that in the healthy controls($P<0. 001$). Univariate analysis revealed that depth of tumor invasion($P=0. 038$), tumor lymphatic metastasis($P=0. 008$), distant metastasis ($P<0. 001$)and clinical stages ($P=0. 003$)were related to the hTERT mRNA expression in peripheral blood of the gastric cancer patients, among them lymphatic metastasis and distant metastasis were independent compact factors of the hTERT mRNA expression in peripheral blood of gastric cancer patients. The positive rate of hTERT mRNA in patients with chemotherapy no-response was significantly higher than those in the patients with chemotherapy response. The rate of one year survival for patiens with positive hTERT mRNA before chemotherapy was lower than those with negative one ($P<0. 001$). **Conclusion** hTERT mRNA can be used as a marker for the detection of tumor micro-metastasis in gastric cancer, and it may be important to regularly detection for evaluating chemotherapy response and prognosis. Lymphatic metastasis and distant metastasis were closely correlated with the expression of hTERT mRNA in peripheral blood of patients with gastric cancer

Key words: Gastric neoplasms; Telomerase; Reverse transcriptase; Response; Prognosis

摘 要:目的 研究胃癌患者外周血人端粒酶逆转录酶(hTERT) mRNA 的表达,并探讨其临床意义。**方法** 应用 TaqMan 实时定量 RT-PCR 法检测 58 例患者、20 名健康对照者外周血 hTERT mRNA 的表达,随访 2 年。**结果** 胃癌患者外周血 hTERT mRNA 阳性率为 55. 17%,显著高于健康对照组($P<0. 001$);hTERT mRNA 表达与肿瘤浸润深度、淋巴结转移、远处转移和临床分期相关,其中淋巴结转移和远处转移是影响 hTERT mRNA 表达的独立因素;近期疗效无效的患者 hTERT mRNA 的阳性率显著高于近期疗效有效的患者($P=0. 003$)。化疗前 hTERT mRNA 阳性与阴性患者的 1 年生存率分别是 28. 13%和 76. 92%。**结论** 外周血 hTERT mRNA 可作为检测胃癌患者微转移的分子标志,定期监测有助于评估化疗疗效和预测预后。淋巴结转移和远处转移与 hTERT mRNA 表达密切相关。

关键词:胃肿瘤; 人端粒酶; 逆转录酶; 疗效; 预后

中图分类号:R735. 2;R730. 43 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2009)04-0302-04

0 引言

胃癌是我国常见的实体肿瘤之一,死亡率较高^[1]。血道转移是发生远处转移的重要途径。影像学发现远处转移时多已失去手术切除机会。在常规影像学发现肿瘤转移之前检测到外周血中隐匿存在的肿瘤细胞对预测肿瘤复发、转移、指导临床治疗等

收稿日期:2008-03-31;修回日期:2008-09-05
基金项目:江苏省卫生厅面上科研课题资助项目(H200553);江苏省常州市科技计划资助项目(C2005215)
作者单位:1. 213001 苏州大学附属常州肿瘤医院临床肿瘤学实验室,2. 肿瘤内科
作者简介:刘永萍(1972-),女,博士,副主任医师,主要从事消化道肿瘤基础与临床研究

方面具有重要意义。人端粒酶逆转录酶(hTERT)mRNA 在各种胃癌细胞中均高表达^[2],是监测胃癌患者外周血肿瘤细胞微转移较为理想的分子标志。本研究采用 Taq Man 定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术动态监测胃癌患者化疗前后外周血 hTERT mRNA 表达情况,旨在探讨外周血 hTERT mRNA 表达对胃癌患者辅助诊断、疗效评估及预后判断等方面的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

所有胃癌患者均为我院 2005 年 1 月~2006 年 12 月期间的住院患者。其中男 44 例,女 14 例。年龄 30~83 岁,中位年龄 57 岁。胃窦癌 30 例,为统计方便,此处定义为远端胃癌,其他部位共 28 例,定义为近端胃癌(包括胃体癌和胃底、贲门癌)。根据 1997 年国际抗癌联盟(UICC)TNM 分期,I 期 6 例,II 期 4 例,III 期 24 例,IV 期 24 例,均经组织学或细胞学确诊,其中 30 例行根治术,18 例行姑息切除术,余 10 例患者未行手术治疗。按组织类型,中高分化腺癌 27 例,低分化腺癌 26 例,粘液腺癌 5 例。其中 50 例患者接受全身化疗,为排除因化疗方案不同造成近期疗效判断的不可比性,本组 50 例患者均采用改良 FOLFOX4 方案化疗(Oxaliplatin 85 mg/m²,静脉注射,2 h,d1;CF 25 mg/m²,静脉注射,2 h,d1、d2;5-Fu 400 mg/m²,静脉注射,d1、d2;5-Fu 600 mg/m²持续静脉滴注 22 h,d1、d2;每 2 周重复,2 周期为 1 疗程),初治 34 例,复治 16 例。所有复治病例均未经奥沙利铂治疗,既往治疗结束至少 1 月以上。所有患者 KPS≥60 分,预计生存期>3 月以上。正常健康对照组 20 名,为我院健康工作人员,男 8 例,女 12 例,年龄 28~45 岁,中位年龄 35 岁。患者均知情同意。

1.2 研究方法

1.2.1 主要试剂和仪器 hTERT mRNA 核酸扩增(RT-PCR)荧光定量检测试剂盒(杭州博日科技有限公司),β-actin mRNA 核酸扩增(RT-PCR)荧光定量检测试剂盒(上海基康生物技术有限公司),icycler 荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad,美国)。

1.2.2 荧光定量 RT-PCR 法检测 hTERT mRNA 水平 (1)抽提总 RNA,抽取胃癌患者及健康对照者第 2 管静脉血 5 ml,均为 EDTA 钠抗凝。采用淋巴细胞分离液分离出有核细胞。SV Total RNA isolation system(promega)抽提总 RNA,焦碳酸二乙酯(DEPC)水溶解,-70℃保存备用。(2)一步法荧光定量 RT-PCR 测定,严格按照试剂盒说明操

作,其中每次 PCR 反应设定 4 个标准品,拷贝数为 5×10⁷、5×10⁶、5×10⁵、5×10⁴,并设阴性对照。配制反应混合液,每个反应需 hTERT RT-PCR 反应液 36.2 μl,Taq E 0.3 μl,逆转录酶 0.4 μl,RNA 抑制剂 1 μl,UNG 0.1 μl,RNA 模板 2 μl,共计 40 μl,混匀离心。入 icycler 定量 PCR 仪。反应程序如下:37℃孵育 5 min,50℃反应 30 min;94℃保温 5 min;再按 95℃15 s,60℃45 s,共 40 个循环。(4)反应结束后由计算机自动得出 Ct 值及相应的 hTERT mRNA 拷贝数,为简化统计处理,本实验采用试剂盒提供的参考值,当 Ct 值>36 时,定义为阴性。同时用 β-actin 作为内参照,检测被测样品 RNA 的完整性和可靠性,保证 RNA 质量,避免因 RNase 酶污染引起的假阴性。

1.2.3 疗效评估 每位患者至少接受 2 个周期含铂方案化疗后进行全面评估。有可测量病灶者,按 WHO 抗肿瘤药物客观疗效标准^[3]评价疗效:完全缓解(CR),部分缓解(PR),稳定(SD),进展(PD),有效为 CR+PR,无效为 SD+PD;无可测量病灶者,则以 CT 结果和病理学检查等综合检测结果为标准进行判断(有效:未发现新的病灶;无效:原发部位或远处发现新的病灶)。

1.2.4 随访 患者每三至六个月门诊或住院部复查,包括查血常规,肝肾功能,外周血相关肿瘤标志物。根据病情复查胸腹部 CT。平均随访 2 年。

1.3 统计学方法

数据采用 SPSS 13.0 软件进行处理,阳性率的比较及单因素分析采用卡方检验,例数较少时采用精确概率计算法。胃癌患者外周血 hTERT mRNA 表达情况与病理特性的关系采用多因素 Logistic 回归分析。 $P<0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hTERT mRNA 检测结果及与胃癌病理特性的关系

2.1.1 两组受检者外周血 hTERT mRNA 表达情况 胃癌组 hTERT mRNA 阳性率显著高于健康对照组,见表 1。所有被检样品均有 β-actin mRNA 表达,表明被测样品的 RNA 是完整的。

2.1.2 胃癌患者外周血 hTERT mRNA 表达与其病理特性的关系 单因素分析结果显示胃癌患者外周血 hTERT mRNA 表达与肿瘤浸润深度、淋巴结转移、远处转移及临床分期相关。多因素 Logistic 回归分析表明:胃癌淋巴结转移和远处转移是影响胃癌患者外周血 hTERT mRNA 表达的独立因素,见表 2、3。

表 1 胃癌患者与健康对照者 hTERT mRNA 表达比较

Table 1 Comparison of hTERT mRNA levels between gastric cancer patients and health control					
Groups	Number	hTERT mRNA			
		Positive	Positive(%)	χ^2	P
Gastric cancer	58	32	55.17		
Health control	20	0	0.00	18.711	< 0.001

表 2 胃癌患者外周血 hTERT mRNA 表达与临床病理特性的关系

Table 2 Relationships between clinicopathological features and presence of hTERT mRNA in the peripheral blood samples of stomach cancer patients					
Variables	Number	hTERT mRNA			
		Positive	Positive rate (%)	χ^2	P
Gender				0.200	0.655
Male	44	25	56.82		
Female	14	7	50.00		
Age				0.759	0.384
≤55 years	21	10	47.62		
>50 years	37	22	59.46		
Location				0.586	0.444
Upper	28	14	50.00		
lower	30	18	60.00		
histologic type				0.511	0.775
Well different	27	16	51.85		
Moderately different	26	13	50.00		
Others	5	3	60.00		
Depth of invasion					0.038▲■
T1	3	0	0.00		
T2	4	1	25.00		
T3	30	20	66.67		
T4	21	11	52.38		
Lymph node metastasis					0.008■
Present	47	30	63.84		
Absent	11	2	18.18		
Distant metastasis				16.276	<0.001
Present	40	15	37.50		
Absent	18	17	94.44		
TNM stage					0.003★■
I	6	0	0.00		
II	4	1	25.00		
III	24	13	54.17		
IV	24	18	75.00		

▲: Comparison between T1、T2 and T3、T4; ■: Fisher exact test; ★: Comparison between stage I、II and stage III、IV

表 3 胃癌患者外周血 hTERT mRNA 表达的多因素 Logistic 回归分析

Table 3 Multivariable logistic regression analysis of hTERT mRNA in the peripheral blood samples of stomach				
Variables	β	S. E	Ward	P
Lymph node metastasis	-2.234	1.113	4.03	0.045
Distant metastasis	-2.902	1.094	7.037	0.008

2.1.3 胃癌患者化疗前后 hTERT mRNA 表达比较 50 例胃癌患者化疗前后 hTERT mRNA 的阳性率分别为 52%和 44%,差异无统计学意义($\chi^2 = 0.641, P = 0.423$),但化疗 2 周期后复查发现:化疗无效的 18 例患者中有 13 例显示 hTERT mRNA 阳性表达,而 32 例化疗有效的患者中有 9 例显示 hTERT mRNA 阳性表达,两组比较具有统计学意义($\chi^2 = 9.901, P = 0.003$);另外,始终阳性的 10 例患者中 6 例治疗无效,阴转阳的 12 例患者中 7 例治疗无效,始终阴性的 12 例患者中 10 例治疗有效,阳转阴 16 例患者中 13 例治疗有效。

2.1.4 胃癌患者随访结果 58 例患者至随访结束时 24 例存活,6 例失访,28 例死亡。hTERT mRNA 阳性患者的中位生存期 10 月,hTERT mRNA 阴性患者的中位生存期至随访结束还未统计出,1 年生存率分别是 28.13%和 76.92%,差异具有统计学意义($\chi^2 = 13.663, P < 0.001$)。

3 讨论

胃癌是严重危害人类健康的实体瘤之一。早期患者和复发转移患者初期由于缺乏特异性症状,确诊时多已失去手术根治机会。胃镜检查是较为有效的监测方法,但不易为患者接受和普及。目前用于胃癌患者的常用肿瘤标志物有血清 CEA、CA199 和 CA72-4 等,这些指标在胃癌患者诊断和随访中发挥了重要作用^[4-5],但敏感性较低。Marrelli 等^[5]报道 153 例患者中血清 CEA、CA199、CA72-4 的阳性率分别为 20.9%、34.6%和 28.1%。因此仍需寻找更为敏感的肿瘤标志物用于胃癌的早期诊断,疗效评估和随访监测。

荧光定量 RT-PCR 技术的产生和肿瘤相关癌基因的陆续发现使得肿瘤细胞微转移的检测成为可能^[6]。端粒酶是一种依赖 RNA 的 DNA 多聚酶。大多数恶性肿瘤细胞高表达端粒酶活性,而大多数正常体细胞不表达端粒酶活性^[7]。人端粒酶逆转录酶(hTERT)主要存在于肿瘤细胞中,是端粒酶活性的限速因子^[8]。hTERT 的表达与端粒酶活性表达具有一致性^[9]。有报道认为通过 RT-PCR 检测 hTERT mRNA 的敏感性要高于采用 TRAP 法检测端粒酶活性^[10]。因此,hTERT mRNA 完全可作为诊断恶性肿瘤微转移的较为可靠的分子标志。远处转移一般由微转移而来,外周血肿瘤细胞微转移是远处转移的重要根源,且外周血取材方便,适宜随访监测,因此本研究采用荧光定量 PCR 技术检测外周血 hTERT mRNA 表达情况。结果显示 58 例胃癌患者外周血 hTERT mRNA 阳性表达率为

55.17%，而 20 例正常对照无 1 例阳性表达，敏感性接近文献^[2,11]，略低于文献^[12]；特异性高于文献^[2,11]，提示该法敏感性及特异性均较高，有助于外周血肿瘤细胞微转移的检测。单因素分析表明胃癌患者外周血 hTERT mRNA 表达与肿瘤浸润深度、淋巴结转移、远处转移及临床分期均相关。多因素 Logistic 回归分析表明：淋巴结转移和远处转移是影响胃癌患者外周血 hTERT mRNA 表达的独立因素。提示淋巴结转移和远处转移与外周血 hTERT mRNA 表达密切相关，发生淋巴结转移和远处转移的患者外周血中更易检测到 hTERT mRNA 表达，而 10 例Ⅰ、Ⅱ期患者中有 1 例外周血 hTERT mRNA 阳性表达提示，即便是早期患者亦有可能发生了隐匿性转移。

hTERT mRNA 表达用于预后判断和疗效评估国内外报道较少。Wu 等^[12]报道胃癌患者外周血 hTERT mRNA 阳性率为 61.9%，但 hTERT mRNA 并不是预测胃癌患者术后复发转移的理想指标。与此相反，Usselman 等^[13]发现在远端胃癌中高端粒酶活性的患者预后较低端粒酶活性者差。Oya 等^[14]发现 4 例外周血 hTERT mRNA 阳性表达的原发性肝癌患者经全身免疫化疗后 2 例阴转；肝移植术前 7 例外周血 hTERT mRNA 阴性表达的原发性肝癌患者术后无复发生存时间明显长于另 7 例术前阳性表达患者。本组患者中有 50 例化疗前及化疗 2 周期后均检测了外周血 hTERT mRNA 表达，结果显示化疗前后 hTERT mRNA 的阳性率比较无统计学意义，但化疗 2 周期后病情进展的 18 例患者中有 13 例示 hTERT mRNA 阳性表达（其中 7 例化疗前阴性），而 32 例化疗有效的患者中仅有 9 例示 hTERT mRNA 阳性表达，两组比较有统计学意义（ $P = 0.003$ ）。另外，始终阳性的 10 例患者中 6 例治疗无效，阴转阳的 12 例患者中 7 例治疗无效，始终阴性的 12 例患者中 10 例治疗有效，阳转阴的 16 例患者中 13 例治疗有效。结果显示尽管化疗前后外周血 hTERT mRNA 总体阳性率无差异，但每位患者外周血 hTERT mRNA 的动态变化却与近期疗效密切相关，持续阳性和阴转阳患者近期疗效均较差，反之亦然。这表明外周血 hTERT mRNA 的动态变化有助于胃癌患者化疗后近期疗效评估。平均随访 2 年后发现，化疗前 hTERT mRNA 阳性患者的中位生存期 10 月，阴性患者中位生存期仍在随访之中，1 年生存率分别是 28.13% 和 76.92%，差异具有统计学意义（ $\chi^2 = 13.663, P < 0.001$ ），提示外周血 hTERT mRNA 阳性表达的胃

癌患者预后较差。

总之，本研究小样本结果显示检测胃癌患者外周血 hTERT mRNA 表达可用于诊断肿瘤细胞微转移、近期疗效评估和预后判断，但仍需扩大样本后验证。

参考文献：

[1] 孙秀娣,牧人,周有尚,等. 中国胃癌死亡率 26 年变化情况分析及其发展趋势预测[J]. 中华肿瘤杂志,2004,26(1):4-9.

[2] Shin JH, Chung J, Kim HO, et al. Detection of cancer cells in peripheral blood of stomach cancer patients using RT-PCR amplification of tumour-specific mRNAs[J]. Aliment Pharmacol Ther,2002,16 (2):137-144.

[3] Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada[J]. J Natl Cancer Inst,2000,92(3):205-216.

[4] Aloe S, D Alessandro R, Spila A, et al. Prognostic value of Serum and tumor tissue CA72-4 content in gastric cancer [J]. Int J Biol Makers,2003,18(1):21-27.

[5] Marrelli D, Roviello F, Stefano AD, et al. Prognostic importance of CEA, CA19-9, CA72-4 preoperative serum levels in gastric carcinoma[J]. Oncology,1999,57(4B):55-56.

[6] Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR and the detection of occult disease in colorectal cancer[J]. Mol Aspects Med,2006,27(2-3):192-223.

[7] Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer[J]. Eur J Cancer,1997,33(5):787-791.

[8] Poole JC, Andrews LG, Tollefsbol TO. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT) [J]. Gene,2001,269(1-2):1-12.

[9] Nakayama J, Tahara H, Tahara E, et al. Telomerase activation by hTERT in human normal fibroblasts and hepatocellular carcinomas[J]. Nat. Genet,1998,18(1):65-68.

[10] Hu LH, Chen FH, Li YR, et al. Real-time determination of human telomerase reverse transcriptase mRNA in gastric cancer [J]. World J Gastroenterol,2004,10(23):3514-3517.

[11] Wu CH, Lin SR, Yu FJ, et al. Development of a high-throughput membrane-array method for molecular diagnosis of circulating tumor cells in patients with gastric cancers[J]. Int J Cancer,2006,119(2):373-379.

[12] Wu CH, Lin SR, Hsieh JS, et al. Molecular detection of disseminated tumor cells in the peripheral blood of patients with gastric cancer: evaluation of their prognostic significance[J]. Dis Markers,2006,22(3):103-109.

[13] Usselman B, Newbold M, Morris AG, et al. Telomerase activity and patient survival after surgery for gastric and oesophageal cancer[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol,2001,13(8):903-908.

[14] Oya H, Sato Y, Yamamoto S, et al. Comparison between human-telomerase reverse transcriptase mRNA and alpha-feto-protein mRNA as a predictive value for recurrence of hepatocellular carcinoma in living donor liver transplantation[J]. Transplant Proc,2006,38(10):3636-3639.

[编辑:安 凤;校对:杨 卉]