

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2009.08.011

非小细胞肺癌化疗前后外周血 LUNX mRNA 检测的临床意义

冯 斌¹, 吕丽燕², 刘希斌³, 宋丽华¹, 宋现让²

Clinical Significance to Detect Lunx mRNA of Pre- and Post- chemotherapy in Peripheral Blood of Non-small Cell Lung Cancer Patients

FENG Bin¹, LV Li-yan², LIU Xi-bin³, SONG Li-hua¹, SONG Xian-rang²

1. Department of Internal Medicine, Shandong Tumor Hospital, Ji'nan 250117, China, 2. Central Laboratory, 3. Department of Thoracic Surgery

Abstract: Objective To detect the expression of Lunx mRNA in circulating tumor cells in peripheral blood of no small cell lung cancer (NSCLC) patients with metaphase and advanced stage and to investigate the effect and clinical significance of chemotherapy on circulating tumor cells. **Methods** Sixty-three patients with NSCLC of metaphase and advanced stage were treated with platinum based chemotherapy. Lunx mRNA of their peripheral blood prior and posterior to the first course and the second course chemotherapy was detected and the curative effect after 2 cycles of chemotherapy was evaluated. Peripheral blood of 10 patients with pulmonary benign lesions and 10 healthy volunteers was used as control. **Results** The positive rate of Lunx mRNA in NSCLC patients was 73.02% before chemotherapy, and in the control group was zero. The expression of Lunx mRNA had no close correlation with age, gender, pathological types and performance status score, and was closely related to clinical stages ($P = 0.05$). After two cycles of chemotherapy, the patients reached CR, PR, SD and PD were 0, 21, 23, 16 respectively. The positive rates of NSCLC patients after first and second cycles of chemotherapy were both 38.33%, which was significant decreased compared with those before therapy ($P = 0.00$). The expression rates of Lunx mRNA in patients with PR, SD and PD were 23.81%, 26.09% and 75.00% respectively. The positive rates of PR and SD were significantly decreased compared with that prior to therapy ($P = 0.01$ and $P = 0.00$, respectively). But the positive rates of PD was similar to that of prior treatment ($P = 0.65$). **Conclusion** Lunx mRNA was a favourable tumor marker to predict micrometastases in NSCLC patients. Lunx mRNA expression in peripheral blood was highly correlated with clinical stage of NSCLC patients. The positive rate of circulating tumor cells in peripheral blood was markedly decreased in patients with PR or SD, rather than that with PD. The descent of positive rate was not a course-depended. It suggests that the detection of Lunx mRNA in peripheral blood should be able to optimize therapeutic strategies.

Key words: Lung Neoplasms; Blood; Circulating tumor cells; Lunx; Chemotherapy

摘要:目的 通过检测中晚期非小细胞肺癌(NSCLC)患者外周血中循环癌细胞的 Lunx mRNA 表达情况,探讨全身化疗对外周血循环癌细胞的影响。**方法** NSCLC 组为 63 例中晚期 NSCLC 患者,化疗方案为含铂类的两药联合方案,化疗 2 周期后评价客观疗效。分别在化疗前、化疗 1 周期后、化疗 2 周期后抽取外周血静脉血。肺部良性疾病患者 10 例和健康志愿者 10 例为对照组。用 RT-PCR 法检测外周血中循环癌细胞 Lunx mRNA 的表达情况。**结果** NSCLC 组化疗前外周血 Lunx mRNA 阳性表达率为 73.02%,而肺部良性疾病患者和健康志愿者外周血均没有表达。外周血循环癌细胞 Lunx mRNA 表达情况与年龄、性别、不同病理类型、行为状态评分的关系不密切,而与临床分期密切相关($P = 0.04$)。化疗完成 2 周期的 60 例中 CR 0 例,PR 21 例、SD 23 例、PD 16 例。外周血 Lunx mRNA 阳性率在化疗 1 周期和 2 周期后均为 38.33%,较化疗前显著降低($P = 0.00$)。Lunx mRNA 阳性率在 PR、SD、PD 三个

亚组分别为 23.81%、26.09%、75.00%,PR 组和 SD 组的阳性率较化疗前显著降低($P = 0.01$ 、 $P = 0.00$),而 PD 组与化疗前相比差异无统计学意义($P = 0.65$)。**结论** Lunx mRNA 是检测 NSCLC 外周血微转移的良好

收稿日期:2008-07-22;修回日期:2009-01-13

基金项目:山东省自然科学基金资助项目(Y2005C49)

作者单位:1. 250117 济南,山东省肿瘤医院内科,2. 中心试验室,3. 胸外科

作者简介:冯斌(1970-),男,本科,副主任医师,主要从事肺癌的临床研究

分子标志物。患者临床分期越晚,外周血循环癌细胞阳性率越高。全身化疗可显著降低有效或稳定患者的外周血循环癌细胞检出率,对病情进展的患者则没有作用,而且这种变化在化疗初始阶段即已出现,可帮助我们提前判断化疗对病情的控制情况,从而制定更合理的治疗计划。

关键词: 肺肿瘤;血液;循环癌细胞;肺特异性蛋白 X;化疗

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A

文章编号: 1000-8578(2009)08-0669-04

0 引言

肺特异性 X 蛋白(Lunx)是新发现的人类肺组织特异性基因,研究表明 Lunx 在正常肺组织及 NSCLC 组织中特异表达。如果在肺癌患者的肺外组织中检测到 Lunx 的存在,提示该检测组织中存在肺癌细胞^[1]。因此,如果在外周血中检测到 Lunx mRNA 转录,则提示在患者外周血中存在循环肺癌细胞,Lunx mRNA 在外周血中的表达情况反映了肺癌循环细胞的存在状况。我们采用 RT-PCR 技术检测了 Lunx mRNA 在晚期肺癌外周血循环癌细胞中的表达情况,研究全身化疗对外周血中循环癌细胞的影响。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2006 年 1 月~2008 年 5 月在我院内科住院的 63 例 NSCLC 初治患者(NSCLC 组),所有病例均经病理或细胞学诊断。其中男 34 例,女 29 例,平均年龄 56.7 岁(38 岁~76 岁);Ⅲ期 26 例,Ⅳ期 37 例;腺癌 27 例,鳞癌 36 例;PS 评分均 < 4 分。化疗方案为含铂类的两药联合方案,化疗完成 2 周期以上者为可评价病例。同期肺部良性疾病患者 10 例和健康志愿者 10 例为对照组。

1.2 主要仪器设备

台式高速离心机 sorvall biofuge primo R 为德国 Sorvall 公司产品,DU800 核酸蛋白分析仪为 Beckman coulter 产品,ABI PRISM 7000 型荧光定量 PCR 仪为美国应用生物系统公司产品。

1.3 试剂和引物设计

总 RNA 快速抽提试剂盒(RNAfast1000)为上海飞捷生物公司产品,DEPC 为 Invitrogen 公司产品,RT 试剂盒 SYBR PrimeScript™ RT-PCR Kit 及 PCR 试剂盒 SYBR Premix Ex Taq™(Perfect Real Time)为 TaKaRa 公司产品。Lunx 引物:从 Gene Card 网站下载 lunxmRNA 基因序列后,利用 primer premier 5.0 软件设计。由上海生工生物工程公司合成 Lunx 上下游引物分别为:5'-AGTCT-GTTGAGGCTGGCTGT-3'和 5'-CAAGATCCCT-

GTGAGGCTGT-3'。扩增的片段为 189 bp。 β -action 上下游引物分别为:5'-GAGCTACGAGCT-GCCTGACG-3'和 5'-CCTAGAAGCATTTGCG-GTGG-3'。扩增的片段为 416 bp。

1.4 标本采集和总 RNA 提取

所有 NSCLC 患者在化疗前抽取清晨空腹外周静脉血 3 ml,置于 EDTA 试管中,立即送实验室提取总 RNA。每周化疗用药结束后 1 周再次抽血。对照组同期抽取清晨空腹静脉血。总 RNA 提取按照总 RNA 快速抽提试剂盒 RNAfast1000 说明书进行。

1.5 总 RNA 鉴定

测定 RNA 样品在 260 nm 和 280 nm 的吸光值,按 $1\text{OD}_{260} = 40 \mu\text{g/ml}$ RNA 计算 RNA 的产量; $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 理想值在 1.8~2.0 视为抽提的 RNA 纯度较高。进行甲醛变性琼脂糖凝胶电泳,确定 RNA 的完整性和污染情况。

1.6 cDNA 第一链合成

按 SYBR PrimeScript™ RT-PCR Kit 说明书进行。RT 的反应体系为 25 μl 。反应条件为:37 °C 15 min,85 °C 5 s。

1.7 PCR 扩增 Lunx mRNA

按 SYBR PrimeScript™ RT-PCR Kit 说明书进行。RT 的反应体系为 25 μl 。反应条件为:95 °C 预变性 10 s。继之 35 个扩增循环,循环参数为 95 °C 5 s,57 °C 13 s,72 °C 31 s。

1.8 统计学方法

应用统计分析软件 SPSS 13.0,进行 χ^2 检验及 Fisher 精确确切概率法对数据进行相关性分析。

2 结果

2.1 Lunx mRNA 在三组人外周血的表达情况

10 例肺部良性疾病患者和 10 例健康志愿者外周血中均没有检测到 Lunx mRNA 表达。63 例 NSCLC 患者治疗前外周血中有 46 例(73.02%)表达 Lunx mRNA。

2.2 外周血 Lunx mRNA 阳性表达与患者临床特征的关系

外周血 Lunx mRNA 阳性表达与是否存在远处转移灶(Ⅳ期)显著相关($P = 0.039$),而与年龄、性别、病理类型、行为状态评分无显著相关性,见表 1。

2.3 NSCLC 组化疗疗效评价

63 例患者中 60 例可评价客观疗效,3 例因严重并发症未完成第 2 周期化疗。CR 0 例,PR 21 例,SD 23 例,PD 16 例,客观有效率(CR + PR)为

35%。

2.4 化疗前后外周血 Lunx mRNA 表达的情况

60 例 NSCLC 患者完成化疗 1 周期和 2 周期后 Lunx mRNA 阳性表达率均为 38.33%，显著低于化疗前的 71.67%。化疗 1 周期和 2 周期组间的阳性率相同，见表 2。

表 1 外周血 Lunx mRNA 表达与患者临床特征的关系

Table 1 Correlation between the expression of Lunx mRNA and clinical characteristics

Item	n	Lunx mRNA		χ^2	P
		positive	negative		
Age					
≤60	37	26	11	0.34	0.56
>60	26	20	6		
Gender					
Male	34	24	10	0.22	0.64
Female	29	22	7		
Pathological types					
Adenocarcinoma	34	25	9	0.01	0.92
Squamous cell carcinoma	29	21	8		
Clinical stage					
III	31	19	12	4.26	0.04
IV	32	27	5		
Behavioral state score					
0~1	41	27	14	3.06	0.08
≥2	22	19	3		

表 2 化疗前后外周血 Lunx mRNA 的表达

Table 2 The expression of Lunx mRNA in peripheral blood before and after chemotherapy

Time	n	Lunx mRNA			χ^2	P
		+	-	positive rate (%)		
Prechemotherapy	60	43	17	71.67		
Chemotherapy cycle 1	60	23	37	38.33	13.47	0.00
Chemotherapy cycle 2	60	23	37	38.33		

2.5 化疗疗效与外周血 Lunx mRNA 表达的关系

按照客观疗效将 NSCLC 组分为 PR、SD、PD 三个亚组，PR 组和 SD 组患者化疗后 Lunx mRNA 阳性率较治疗前显著降低，而 PD 组化疗前后变化不大。详见表 3。PR 组治疗前的 14 例 Lunx mRNA 阳性患者治疗后有 9 例转为阴性，转阴率为 64.29%，SD 组治疗前的 16 例阳性患者治疗后 10 例转为阴性表达，转阴率 62.50%，两组 Lunx mRNA 阴性患者治疗前后均保持阴性表达。PD 组中治疗前 14 例 Lunx mRNA 阳性患者治疗后仅有 3 例转阴，转阴率 21.43%，而且治疗前的 2 例阴性患者中有 1 例转阳。

表 3 外周血 Lunx mRNA 表达与疗效的关系

Table 3 Relation both the expression of Lunx mRNA and curative effect

Time	PR(N=21)		SD(N=23)		PD(N=16)	
	+	-	+	-	+	-
Prechemotherapy(%)	14(66.67)	7(33.33)	16(69.57)	7(30.43)	14(87.50)	2(12.50)
Postchemotherapy(%)	5(23.81)	16(76.19)	6(26.09)	17(73.91)	12(75.00)	4(25.00)
χ^2	7.79		8.71			
P	0.01		0.00		0.65	

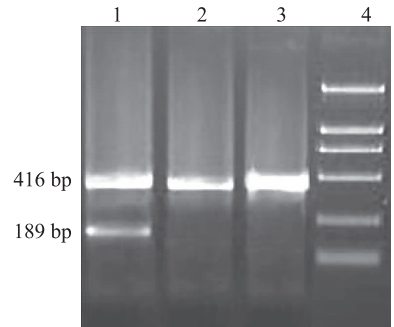


图 1 化疗前后 Lunx mRNA 的检测结果

Figure 1 The expression of Lunx mRNA in peripheral blood before and after chemotherapy

图 1 显示 PR 组患者化疗前 Lunx mRNA 阳性 (1 泳道)，有 189 bp 条带，显示检测到肺癌细胞。化疗 1 周期和 2 周期后转为阴性 (2、3 泳道)。416 bp 条带为内参照 β -action。4 泳道为分子量标志 DNA Ladder。

3 讨论

肺癌患者外周血中出现循环癌细胞，是肿瘤发生发展过程中经历的必然阶段，研究证明外周血微转移是影响肿瘤患者预后的重要因素^[2-4]。利用反转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 扩增外周血中组织特异或肿瘤特异的靶基因，是目前外周血循环癌细胞最常用的检测方法，敏感度可达到 $10^{-6} \sim 10^{-7}$ ^[5]。选择恰当的靶基因是决定检测结果是否可靠的重要因素，但目前由于肺癌特异性基因较少，因此组织特异性 mRNA 常被用于肺癌外周血癌细胞的检测。LunX 是肺组织特异性基因，来源于肺组织的肿瘤细胞应该 100% 表达^[1]。有研究认为 Lunx mRNA 对肺癌外周血和区域淋巴结微转移具有较高的敏感度和特异性，与其他肺癌相关基因相比，LunX 是目前 NSCLC 敏感度最高的标志基因^[6-8]。本研究中良性肺疾病患者组和健康志愿者组中均无 Lunx mRNA 表达，NSCLC 组外周血循环癌细胞 Lunx mRNA 表达率为 73.02%，显著高于对照组，显示出对中晚期 NSCLC 具有良好的敏感度和特异性。

NSCLC 组在化疗前外周血 Lunx mRNA 阳性

率高达73.02%，明显高于文献报道的可手术肺癌阳性率33.3%~60%^[8-9]，可能与入组患者均为Ⅲ~Ⅳ期有关。Ⅳ期患者阳性率显著高于Ⅲ期患者，提示肺癌患者分期越晚、肿瘤负荷越大、转移越广泛，外周血癌细胞阳性率越高，为肿瘤的继续转移提供条件。外周血 Lunx mRNA 表达情况在不同病理类型之间差异无统计学意义，说明在中晚期 NSCLC 患者中不论是腺癌或是鳞癌，外周血微转移发生的机会可能相似。

对不同客观疗效的亚组分析发现，化疗疗效与外周血 Lunx mRNA 表达显著相关。PR 组和 SD 组患者阳性率均较化疗前显著降低，分别为 23.81%、26.09%，而 PD 组患者阳性率无明显降低，与化疗前相似。PR 组和 SD 组治疗前的 Lunx mRNA 阳性患者治疗后大部分患者转阴，转阴率分别为 64.29%、62.50%。提示化疗可使有效或稳定患者的外周血癌细胞数量显著下降，而对病情进展患者的作用不大。杨浩贤等^[9]利用该标志物检测肺癌手术前中后循环癌细胞的研究发现，原发肿瘤的切除可能有利于降低外周血微转移，也说明病情得到控制的患者，可减少外周血中循环癌细胞数量。

化疗过程中多次监测外周血中循环癌细胞的 Lunx mRNA 表达情况发现，化疗 1 周期后外周血 Lunx mRNA 阳性表达率即显著下降，继续化疗 2 周期后阳性率未发现继续降低。提示在全身化疗初始阶段，外周血循环癌细胞的变化情况已经可以预示化疗的客观疗效，Sher 等^[10]研究也认为循环癌细胞的检测为快速判定治疗效果和改善预后提供了一种新的方法。特别是外周血 Lunx mRNA 表达转阴的患者，从后续化疗中可能获益更大，而化疗后外周血循环癌细胞检测仍然阳性的患者提示疗效较差^[10]，可能从原方案的后续化疗中获益机会不大，肿瘤细胞可能存在继发或原发耐药，需要重新审定原来的治疗计划，使患者从治疗计划中充分获益。

以上研究证明 Lunx mRNA 是检测肺癌外周血微转移的良好分子标志物，肺癌患者分期越晚，其

外周血中循环癌细胞 Lunx mRNA 表达的可能性越高。全身化疗可显著降低有效或稳定患者的外周血循环癌细胞检出率，对病情进展的患者则没有作用，而且这种变化在化疗初始阶段即已出现，可帮助我们提前判断化疗对病情的控制情况，从而制定更合理的治疗计划。入组患者仍继续进行随访，进一步研究确定外周血 Lunx mRNA 与复发转移、生存的关系。

参考文献：

- [1] 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.
- [2] Mocellin S, Keilholz U, Rossi CR, et al. Circulating tumor cells; the 'leukemic phase' of solid cancers [J]. *Trends Mol Med*, 2006, 12(3): 130-139.
- [3] Yasumoto K, Osaki T, Watanabe Y, et al. Prognostic value of cytokeratin-positive cells in the bone marrow and lymph nodes of patients with resected nonsmall cell lung cancer; a multi-center prospective study [J]. *Ann Thorac Surg*, 2003, 76(1): 194-201.
- [4] 吴昊, 李洪, 章希贤. 非小细胞肺癌患者外周血和骨髓中 LUNX 基因表达的临床意义 [J]. *中国肿瘤*, 2006, 15(5): 329-332.
- [5] Sidransky D. Nucleic acid-based methods for the detection of cancer [J]. *Science*, 1997, 278(5340): 1054-1059.
- [6] 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 [corrected] [J]. *J Mol Diagn*, 2003, 5(4): 237-242.
- [7] 冯斌, 孙亚红, 宋丽华. 逆转录聚合酶链反应检测肺癌外周血微转移基因的研究进展 [J]. *国际肿瘤学杂志*, 2007, 34(2): 119-122.
- [8] 朱广迎, 刘德林, 王绪, 等. Lunx mRNA RT-PCR 检测肺癌的微转移 [J]. *中国肿瘤临床*, 2003, 30(2): 124-127.
- [9] 杨浩贤, 吴一龙, 陈刚, 等. RT-PCR 法检测外周血 LUNX mRNA 诊断非小细胞肺癌微转移的研究 [J]. *肿瘤防治研究*, 2004, 31(8): 464-503.
- [10] Sher YP, Shih JY, Yang PC, et al. Prognosis of non-small cell lung cancer patients by detecting circulating cancer cells in the peripheral blood with multiple marker genes [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(1): 173-179.

[编辑: 贺文; 校对: 刘红武]