

- 经型钙黏蛋白、雌激素受体、孕激素受体和 P53 的表达及意义 [J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2011, 5(19): 5645-5649.
- [5] 郑晓霞, 张宁, 郭伟男, 等. 雌激素受体、孕激素受体及增殖细胞核抗原在子宫内膜癌中的表达及意义 [J]. 疑难病杂志, 2011, 10(7): 515-516.
- [6] 孙冬霞, 孙峰瑞, 李彩红, 等. c-erbB-2 蛋白与雌激素受体  $\beta$  亚型在子宫内膜癌中的表达及意义 [J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(22): 5590-5591.
- [7] Ko EM, Walter P, Jackson A, et al. Metformin is associated with improved survival in endometrial cancer [J]. Gynecol Oncol, 2014, 132(2): 438-442.
- [8] Koskas M, Genin AS, Graesslin O, et al. Evaluation of a method of predicting lymph node metastasis in endometrial cancer based on five pre-operative characteristics [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2014, 172: 115-119.
- [9] Delotte J, Desantis M, Frigenza M, et al. Cyto-reductive surgery with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for the treatment of endometrial cancer with peritoneal carcinomatosis [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2014, 172: 111-114.
- [10] 刘丽, 陈育梅, 何雪芬. 子宫内膜癌患者血清胰岛素与子宫内膜雌激素受体相关性研究 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2013, 23(1): 43-45.
- [11] 姚微, 黄华, 花敏慧, 等. 子宫内膜息肉及子宫内膜癌组织中雌激素受体  $\beta$  的甲基化与表达研究 [J]. 中国肿瘤外科杂志, 2013, 5(3): 179-182.
- [12] 魏桎楠, 周冬梅, 吴凌, 等. 过表达 ER 恢复雌激素对子宫内膜癌 KLE 细胞中 Notch 信号通路的调控 [J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(16): 3001-3004.

收稿日期: 2016-02-18 编辑: 王娜娜

## · 临床研究 ·

# 胃癌术后化疗前后检测外周血细胞角蛋白 20 mRNA 的临床意义

艾冬梅<sup>1</sup>, 王宝娟<sup>1</sup>, 乔秀真<sup>2</sup>, 国义民<sup>3</sup>, 王震生<sup>4</sup>

1. 衡水市第二人民医院肿瘤科, 河北 衡水 053000; 2. 衡水市第二人民医院检验科, 河北 衡水 053000;  
3. 衡水市第二人民医院腹部外科, 河北 衡水 053000; 4. 衡水市第二人民医院麻醉科, 河北 衡水 053000

**摘要:** **目的** 探究胃癌患者术后化疗前后外周血细胞角蛋白 20(CK20 mRNA)的水平用作评估化疗效果的临床意义。**方法** 对衡水市第二人民医院收治的 29 例胃癌患者术后进行化疗辅助治疗(FOLFOX4),分别在化疗前后的各时点收集患者的外周血,采用荧光定量 PCR(RT-PCR)检测外周血中 CK20 mRNA 表达。对照组为 18 例健康志愿者。**结果** 于化疗前一周进行检测,选取胃癌患者中有 23 例(79.3%)表达 CK20 mRNA,6 例(20.7%)不表达;有 15 例(51.7%)的 CK20 mRNA 表达升高,8 例(27.6%)降低;CK20 mRNA 表达量  $2.57 \pm 3.12$ 。开始化疗时检测 CK20 mRNA 表达量  $3.12 \pm 1.98$ ,与化疗前一周比较差异显著( $P < 0.05$ )。于化疗 1 周期后检测,20 例(72.4%)患者表达 CK20 mRNA,表达量  $1.89 \pm 1.43$ ,与开始化疗时检测值比较有明显差异( $P < 0.05$ )。**结论** 经过化疗胃癌患者术后外周血中 CK20 mRNA 表达降低,提示通过检测化疗前后外周血中 CK20 mRNA 表达可以预测胃癌患者术后的化疗效果。

**关键词:** 胃癌; 细胞角蛋白 20; 化疗; 荧光定量 PCR

**中图分类号:** R 735.2 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2016)07-0927-03

胃癌是目前我国常见恶性肿瘤之一,目前胃癌在临床上常用的治疗方法还是以手术为主。术后化疗可以及时杀灭肿瘤生长时扩散转移入血液的微量癌细胞。近年来研究发现,施用胃癌辅助化疗患者相对于单纯手术治疗患者的总生存期(OS)及无病生存期(DFS)危险比分别降低为 20%、30%<sup>[1]</sup>。但不同个

体由于个体差异造成的对化疗药物敏感性不同,造成化疗效果存在明显的个体间差异。细胞角蛋白(cytokeratin,CK)主要分布于外胚层细胞中的中间纤维丝,仅表达于上皮来源的细胞。CK20 具有更加严格的上皮特异性分布,其余组织或细胞则不表达<sup>[2]</sup>,具有重要的临床意义。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 选取我院 2012 年 2 月至 2014 年 2 月收治的行胃癌根治术患者 29 例,全部病例均在术

后证实为胃癌。其中男 21 例,女 8 例,年龄( $58.3 \pm 7.5$ )岁。术后统一采用 FOLFOX4 化疗方案,即奥沙利铂(Oxaliplatin)  $100 \text{ mg/m}^2$ , d1; 亚叶酸钙(LV)  $200 \text{ mg/m}^2$ , d1~2; 5-氟尿嘧啶(5-Fu)  $400 \text{ mg/m}^2$  静脉推注,  $600 \text{ mg/m}^2$  持续静脉滴注 22 h, d1~2。同期选取 18 名健康志愿者作为对照组,其中男 12 例,女 6 例,年龄( $58.5 \pm 7.0$ )岁。两组患者性别、年龄等一般资料差异性不明显( $P$ 均 $>0.05$ ),具有可比性。

**1.2 主要试剂** 总 RNA 提取试剂盒购自 Qiagen 生物公司,反转录试剂盒与 FQ RT-PCR 试剂盒购自大连宝生物工程有限公司,所需引物均有北京六合华大基因科技有限公司合成。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 采集标本** 实验所需标本均在患者知情同意的前提下收集。分别取患者手术后化疗前一周、化疗开始及化疗一个周期后的外周血 2 ml,需加 EDTA 抗凝另外也可再抽取 2 ml 外周血避免假阳性结果。同时收集正常对照组外周血。

**1.3.2 总 RNA 提取** 从 2 ml 样本中抽取 0.5 ml,具体操作按照 RNA 提取试剂盒进行。抽提结束用琼脂糖凝胶电泳查看 RNA 是否完整,并且用核酸蛋白分析仪检测样本 RNA 浓度。

**1.3.3 RNA 反转录** 反应体系为  $15 \mu\text{l}$ ,其中 RNA 样本  $650 \text{ ng}$ ,  $5 \times \text{PrimeScript Buffer}$   $3 \mu\text{l}$ , Oligo dT Primer ( $50 \mu\text{mol/L}$ )  $0.75 \mu\text{l}$ , Random 6mers ( $100 \mu\text{mol/L}$ )  $0.75 \mu\text{l}$ , PrimeScript RT Enzyme Mix I  $0.75 \mu\text{l}$ ,最后用无 RNase 水补足至  $15 \mu\text{l}$ 。反应条件: $37 \text{ }^\circ\text{C}$  15 min,  $85 \text{ }^\circ\text{C}$  5 s。实验结果进行相对定量分析,把对照组设定为阴性对照,对各个时点的 CK20 mRNA 相对表达量进行计算。

**1.3.4 荧光定量 PCR** 查阅文献设计 CK20 引物,产物长度 110 bp,引物序列如下:上游 5'-GCAAAT-CAAGCAGTGGTACGAAAC-3' 下游 5' GCAGTTGAG-CATCCTTAATCTGAC-3'。GAPDH 产物长度 138 bp,自行设计引物序列如下:上游 5'-GCACCGTCAAGGT-GAGAAC-3' 下游 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGG-3'。选择  $20 \mu\text{l}$  反应体系:SYBR Premix Taq  $10 \mu\text{l}$ , PCR Reverse Primer ( $10 \mu\text{mol/L}$ )  $0.4 \mu\text{l}$ , PCR Forward Primer ( $10 \mu\text{mol/L}$ )  $0.4 \mu\text{l}$ , ROX Reference Dye  $0.4 \mu\text{l}$ , cDNA  $2 \mu\text{l}$ ,加无菌水至  $20 \mu\text{l}$ 。复孔数为 3,反应条件: $95 \text{ }^\circ\text{C}$  预变性 10 s,  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  变性 5 s,  $64 \text{ }^\circ\text{C}$  退火 20 s,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸 31 s,循环数 40。

**1.3.5 产物特异性判定及定量分析** 观察溶解曲线,判断 PCR 产物是否具有特异性。实验结果采用

相对定量分析,计算各时点 CK20 mRNA 相对表达量。

**1.4 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 软件处理实验数据。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用  $t$  检验;计数资料用  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 确定扩增产物特异性** 观察 CK20 及 GAPDH 的 RT-PCR 溶解曲线呈单一峰行,并且将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳也可见单一条带且大小与预期相符(图 1),无二聚体或者其他非特异性扩增产物出现,说明 CK20 和 GAPDH 的 PCR 产物特异性较好。

**2.2 CK20 mRNA 相对表达量** 将对照组 CK20 mRNA 表达量设定为 1,不同时点表达量  $2^{-\Delta\Delta} > 1$  即为表达,后取平均检测对值表示 CK20 mRNA 相对定量数值的数量级变化。结果显示,化疗开始前一周胃癌术后患者 CK20 mRNA 相对表达量  $2.57 \pm 3.12$ ,化疗开始后 CK20 表达量上升至  $3.12 \pm 1.98$ ,且差异有统计学意义( $P < 0.05$ );进行一个周期化疗后患者 CK20 mRNA 相对表达量  $1.89 \pm 1.43$ ,与化疗开始平均表达量相比差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1。

**2.3 化疗前后 CK20 表达水平分析** 以化疗开始为时间节点,观察在化疗前后 CK20 mRNA 表达变化,化疗前,15 例患者的 CK20 表达水平呈升高态势;8 例患者的 CK20 表达水平呈降低态势,6 例患者的 CK20 呈未表达状态;化疗后,5 例患者的 CK20 表达水平呈升高态势;15 例患者的 CK20 表达水平呈降低态势,9 例患者的 CK20 呈未表达状态。化疗前后相比,患者 CK20 表达水平差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 2。

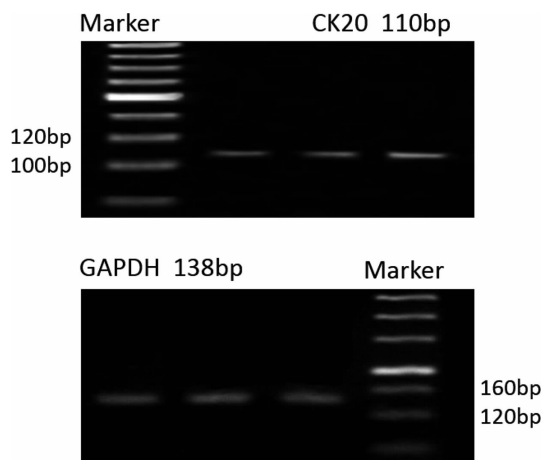


图 1 CK20 和 GAPDH 的 PCR 产物电泳图

表 1 不同时间点 CK10 mRNA 相对表达量 ( $\bar{x} \pm s$ )

时间	表达 CK20 患者数	CK20 表达量
化疗前一周	23	2.57 ± 3.12*
化疗时	23	3.12 ± 1.98
化疗一周期	20	1.89 ± 1.43*

注:与化疗时相比,\* $P < 0.05$ 。

表 2 化疗开始前后 CK20 表达水平变化 例(%)

时间	例数	升高	降低	未表达	$P$ 值
化疗前	29	15(51.7)	8(27.6)	6(20.7)	<0.05
化疗后	29	5(17.2)	15(51.7)	9(31.0)	

### 3 讨论

胃癌是常见的恶性肿瘤之一,患者多数死于肿瘤复发和癌细胞转移。而转移多存在于患者外周血、骨髓、淋巴结及腹腔,这也是导致胃癌复发的重要因素,此类转移在当前条件下往往很难被发现,所以我们又称此类转移为微转移<sup>[3]</sup>。微转移中的癌细胞具有传播范围广、难以被杀灭等特点,虽然术后化疗可改善患者的生存质量,但化疗过程中不能对癌细胞进行实时监控,是目前化疗效果不理想的主要原因<sup>[4]</sup>。如果我们能通过某种检测技术实现对外周血中癌细胞的实时监控,直至消灭癌细胞,这样胃癌患者的术后生存率将会被大大延长。

研究发现,CK20 具有严格的表达范围,一般健康人的外周血中不存在表达<sup>[5]</sup>。但在胃肠道肿瘤中几乎均能检测到 CK20 表达,如果肿瘤通过侵袭、转移等途径扩散到其他组织或者器官,那么在整个侵袭、转移过程中都能检测到表达。所以我们将 CK20 用作预测胃肠道肿瘤是否发生微转移的标志之一<sup>[4]</sup>。本实验中,在胃癌患者术后化疗前 CK20 的表达量是呈升高趋势,这一点可能是由术后体内残余的部分癌细胞扩散入血液,致使循环肿瘤细胞增加<sup>[6]</sup>。但在一周期的化疗之后,我们发现 CK20 的表达量明显降低,说明在化疗的过程中癌细胞被化疗药物所杀灭。而后对不同时间点 CK20 表达量分析发现,化疗前后患者 CK20 表达趋势有所不同,这与 Cao 等<sup>[7]</sup>的研究结果一致。这也说明化疗药物具有显著的个体差异。所以根据个体 CK20 的动态表达水平,可以预测胃癌患者术后对化疗的敏感性。

随着荧光检测技术的发展,结合 PCR 技术产生的实时定量 PCR 技术给 mRNA 检测提供了更加直观和便利的手段。由于实体病灶获取困难,检测标本均采用外周血。CK20 作为特定表达在外周血且表达具有保守性,用 RT-PCR 技术动态监测 CK20 mRNA 水平,预测化疗效果,为及时调整化疗策略提供帮助,避免因个体差异造成化疗本身的不良反应。有研究发现,胃癌手术可以短暂升高外周血中的肿瘤循环细胞,但 2~3 d 即可恢复正常<sup>[7]</sup>,本实验选择术后 1 周的患者作为研究对象,并且根据国外研究发现,将化疗一周期以后作为时间点检测 CK20 水平,结果表明 CK20 变化具有统计学差异。

本研究结果显示,CK20 水平具有预测胃癌术后化疗效果的潜在应用价值,但具体预测趋势还需要大量的临床资料证实。

### 参考文献

- [1] 谢勇,傅仲学.进展期胃癌术后化疗效果的 Meta 分析[J].重庆医学,2014,43(26):3445-3448.
- [2] Takata A, Kurokawa Y, Fujiwara Y, et al. Prognostic value of CEA and CK20 mRNA in the peritoneal lavage fluid of patients undergoing curative surgery for gastric cancer[J]. World J Surg, 2014, 38(5):1107-1111.
- [3] 凌杰,曹红勇,袁爱华.胃癌微转移检测的现状和展望[J].医学综述,2012,18(4):587-590.
- [4] 李国胜,颜登国,张汝一,等.外周血 CK20 mRNA 表达与结直肠癌临床病理和预后的关系[J].世界华人消化杂志,2012,20(21):1993-1997.
- [5] Wang J, Mao X, Guo F, et al. An isolation technique to prevent the spread of tumor cells during radical gastrectomy for gastric carcinoma located on the anterior wall of the gastric antrum[J]. Eur J Surg Oncol, 2013, 39(10):1136-1143.
- [6] Satoh Y, Mori K, Kitano K, et al. Analysis for the combination expression of CK20, FABP1 and MUC2 is sensitive for the prediction of peritoneal recurrence in gastric cancer[J]. Jpn J Clin Oncol, 2012, 42(2):148-152.
- [7] Cao W, Yang W, Li H, et al. Using detection of survivin-expressing circulating tumor cells in peripheral blood to predict tumor recurrence following curative resection of gastric cancer[J]. J Surg Oncol, 2011, 103(2):110-115.

收稿日期:2016-03-10 编辑:王国品