

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.01387

· 短篇论著 ·

胃癌患者术前外周血鸟苷酸环化酶 C mRNA 表达与术后复发的关系

徐雯¹, 张健锋², 蒯小玲², 张弘², 朱惠君³, 毛振彪^{2*}, 吴永峰^{4*}

1. 南通大学卫生科, 南通 226000

2. 南通大学附属医院消化内科, 南通 226000

3. 南通大学附属医院病理科, 南通 226000

4. 南通市如皋港人民医院外科, 如皋 226532

[摘要] **目的** 探讨胃癌患者术前外周血鸟苷酸环化酶 C 信使 RNA (guanylate cyclase C, GC-C mRNA) 表达与术后复发的关系。**方法** 收集 60 例胃癌患者术前外周血和同期门诊 15 例肠上皮化生、21 例异型增生患者以及 20 例健康体检者外周血标本, 应用实时荧光定量 PCR (RFQ-PCR) 检测 GC-C mRNA 的表达, 并分析其与临床病理参数及胃癌术后复发的关系。**结果** 健康体检者外周血中未检测到 GC-C mRNA 表达, 肠上皮化生和异型增生患者外周血 GC-C mRNA 表达阳性率分别为 9.5% (2/15) 和 20.0% (3/21); 而胃癌患者术前外周血阳性率为 48.3% (29/60), 高于健康体检者及肠上皮化生、异型增生患者 ($P < 0.05$)。胃癌患者术前外周血 GC-C mRNA 表达与肿瘤 Laurén 分型、临床 TNM 分期、浸润深度、淋巴结转移和分化程度等均有关 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。GC-C 阳性胃癌患者术后 1~4 年的累计肿瘤复发率分别为 41.4%、79.3%、96.6% 和 100.0%; GC-C 阴性患者术后 1~4 年的累计肿瘤复发率分别为 16.1%、41.9%、67.7% 和 80.6%, 且 GC-C 阳性患者术后中位复发时间短于 GC-C 阴性患者。两组患者术后 1~4 年的累计肿瘤复发率、中位复发时间和总体生存期差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 胃癌患者术前外周血 GC-C mRNA 阳性者预后更差, 且更易出现术后短期复发。

[关键词] 胃肿瘤; 鸟苷酸环化酶 C; 复发; 存活率分析**[中图分类号]** R 735.2**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2014)12-1387-04

Correlation of preoperative guanylate cyclase C mRNA in peripheral blood with postoperative gastric cancer recurrence

XU Wen¹, ZHANG Jian-feng², KUAI Xiao-ling², ZHANG Hong², ZHU Hui-jun³, MAO Zhen-biao^{2*}, WU Yong-feng^{4*}

1. Health Department of Nantong University, Nantong 226000, Jiangsu, China

2. Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226000, Jiangsu, China

3. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226000, Jiangsu, China

4. Department of Surgery, People's Hospital of Rugao Port, Rugao 226532, Jiangsu, China

[Abstract] **Objective** To explore the correlation of preoperative guanylate cyclase C (GC-C) mRNA in peripheral blood with postoperative gastric cancer recurrence. **Methods** The preoperative blood samples were collected from 60 patients with gastric cancer (GC) before operation, also from 21 patients with dysplasia, 15 with intestinal metaplasia, and 20 healthy volunteers during the same period. GC-C mRNA in the peripheral blood samples was assessed by real-time fluorescent quantitative PCR (RFQ-PCR). The association of peripheral blood GC-C mRNA expression with pathological parameters and gastric cancer recurrence was analyzed. **Results** The positive rate of preoperative GC-C mRNA in blood samples of gastric cancer patients (48.3% [29/60]) was significantly higher than that of patients with dysplasia (20.0% [3/21], $P < 0.05$) and those with intestinal metaplasia (9.5% [2/15], $P < 0.05$); GC-C mRNA was not detected in healthy controls. The preoperative blood GC-C mRNA in gastric cancer patients were significantly correlated with Laurén type, clinical TNM stage, depth of invasion, lymph metastasis, and differentiation degree ($P < 0.05$ or 0.01). The 1-year, 2-year, 3-year, and 4-year cumulative recurrence rates of GC-C positive patients were 41.4%, 79.3%, 96.6%, and 100.0%, respectively; and those of GC-C negative patients were 16.1%, 41.9%, 67.7%, and 80.6%, respectively. The median recurrence time in GC-C positive patients was significantly shorter than that in GC-C negative patients ($P < 0.01$). The 1-4 years of cumulative recurrence rates

[收稿日期] 2014-07-25 **[接受日期]** 2014-11-28**[作者简介]** 徐雯, 主治医师. E-mail: xwen@ntu.edu.cn

* 通信作者 (Corresponding authors). Tel: 0513-80552999, E-mail: 373513983@qq.com; Tel: 0513-81161806, E-mail: mzb63@163.com

and overall survival time were significantly different between the two groups after surgery ($P < 0.05$ or 0.01). **Conclusion** The preoperative presence of GC-C mRNA in the peripheral blood of gastric cancer patients is related to poor prognosis and early recurrence after surgery.

[Key words] stomach neoplasms; guanylate cyclase C; recurrence; survival analysis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(12):1387-1390]

胃癌是常见的恶性肿瘤之一,居全世界癌症死亡原因的第2位,我国属于胃癌的高发地区,胃癌患者总体预后尚不理想,5年总体生存率仅25%^[1-2]。鸟苷酸环化酶C(GC-C)是鸟苷酸环化酶家族成员之一,是一种N连接糖蛋白受体,常分布于绒毛肠细胞顶端,如正常小肠黏膜上皮和原发或继发大肠肿瘤,而肠外组织(如正常食管和胃上皮组织)不表达^[2]。前期研究^[3-4]发现,GC-C mRNA和蛋白在胃癌组织中出现异位表达,且胃癌患者外周血GC-C mRNA表达与病情进展有关。因此,本研究采用实时荧光定量PCR(RFQ-PCR)技术检测胃癌患者外周血GC-C mRNA表达水平,并探讨其可能的临床价值。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器

TRIzol试剂、Prime Script™ RT试剂盒和SYBR Premix Ex Taq™ II试剂盒购自大连宝生物有限公司,淋巴细胞分离液购自天津中国医学科学院血液学研究所,β-肌动蛋白和GC-C引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成,焦碳酸二乙酯(DEPC)为上海捷瑞公司产品,纯水处理仪812-3为上海宝尔公司产品,立式压力蒸气灭菌锅(YXQ-LS-75SII)为上海博迅公司产品,低温冷冻离心机(ALLEGRA X-15R)为美国Beckman公司产品,烘箱(BHG-9243BS)为上海新苗公司产品,−80℃冰箱(MDF-U71V型)为日本Sanyo公司产品,RFQ-PCR仪为杭州博日公司产品。

1.2 样本来源

收集2009年11月至2010年8月南通大学附属医院普通外科及南通市如皋港人民医院外科住院60例胃癌患者,术前一次性采集外周血5 mL,采血时间均为手术前48 h以内,抽取同时期门诊15例胃肠上皮化生和21例胃异型增生患者及20例健康体检者外周血各5 mL。患者年龄32~81岁,其中男性42例、女性18例。术前均未行放疗和其他抗肿瘤治疗,外周血标本采集后立即置入液氮速冻后转至−80℃冰箱保存备用。

所有标本切片均由两位病理科医师双盲法核片

确定病理类型。所有肿瘤患者均行D2胃癌根治术,术后记录病理类型、临床分期、组织学分级、浸润深度、淋巴转移等参数。胃癌患者的TNM分期依照美国癌症联合委员会(AJCC)制定的胃癌TNM分期第7版标准判定。所有患者术后均行XELOX方案化疗6个周期,均未放疗。60例胃癌患者中肿瘤组织<5 cm 32例,≥5 cm 28例;肠型胃癌28例,弥漫型胃癌32例;I~II期胃癌26例,III~IV期胃癌34例;淋巴结转移19例,无淋巴结转移41例;肿瘤未浸润浆膜层17例,浸润浆膜及以上43例;高中分化癌29例,低分化癌31例。本研究入组患者和对照术前均行胃镜检查 and 活检病理确诊,并行电子肠镜检查排除了大肠肿瘤。本研究经南通大学附属医院医学伦理委员会批准,并获得所有患者及受试者知情同意。

1.3 实验方法

1.3.1 总RNA提取

将抽取的外周血用单核细胞分离液分离单个核细胞(PBMC),按照说明书应用TRIzol试剂提取PBMC总RNA。取已分离的外周血PBMC悬液放于1.5 mL Eppendorf管中,加入TRIzol 1 mL,室温静置5 min,再加入0.2 mL氯仿,振荡15 s,静置2 min。4℃离心,12 000 g×15 min,取上清;随后加入0.5 mL异丙醇,混匀后静置10 min。4℃离心12 000 g×10 min,弃上清。加1 mL 75%乙醇,轻轻洗涤沉淀。4℃离心7 500 g×5 min,弃上清。再次加入1 mL 75%乙醇,轻轻洗涤沉淀。再次4℃离心7 500 g×5 min,弃去上清。真空离心干燥后加入30 μL DEPC,水浴箱内65℃促溶15 min。检测RNA浓度后分装,−80℃保存。

1.3.2 cDNA合成

总RNA 1 μg、引物1 μg、DEPC H₂O补齐至12 μL,70℃孵育5 min,置冰上;加5×反应缓冲液4 μL、RNA酶抑制剂1 μL、10 mmol/L dNTP混合液2 μL,37℃孵育5 min,置冰上;加Revert Aid™ M-Mulv反转录酶1 μL,42℃ 60 min;70℃ 10 min。反转录成cDNA后分装,−20℃保存。

1.3.3 实时荧光定量 PCR 检测 从 GenBank 查取 GC-C 和 β -肌动蛋白基因序列, 以 Primer 5 软件分别设计引物各 1 对由上海生工生物工程公司合成, 序列如下, GC-C: 上游, 5'-CAA CCT GAC CAA GTT CTA CGG-3', 下游, 5'-AAT GTG CCA TCA GGG TAG GA-3', 预计扩增产物长度 126 bp; β -肌动蛋白: 上游, 5'-TGA CGT GGA CAT CCG CAA AG-3', 下游, 5'-CTG GAA GGT GGA CAG CGA GG-3', 预计扩增产物长度 205 bp。PCR 反应体系: SYBR Premix Ex TaqTM 12.5 μ L, PCR 上游引物 1.0 μ L, PCR 下游引物 1.0 μ L, 模板 2.0 μ L, 无菌水 8.5 μ L, 总体积 25 μ L。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 30 s 预变性, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 循环。确认 RFQ-PCR 扩增曲线和融解曲线分别读取各样本实时 PCR 扩增曲线所对应的循环次数。在相同的条件下实验重复 3 次。Ct 值 > 35 认为该基因不表达, 即为阴性。

1.4 术后随访 纳入标准: (1) 经病理检测证实为胃腺癌; (2) 切缘无癌细胞残留; (3) 术前行外周血 GC-C mRNA 检测; (4) 术前未行新辅助化疗; (5) 术后行 XELOX 方案化疗 6 个周期。采用门诊随访为主结合电话随访。随访时检查 CEA、胃镜、腹部 B 超、CT 或 MRI 等。术后第 1 年每 3 个月随访, 术后 1~4 年每 6 个月随访, 胃癌组随访自手术后起, 终点指标: (1) 残胃复发或食管空肠吻合口复发; (2) 死亡, 或者生存者随访至 2014 年 7 月 31 日。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 率的比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法, 偏态分布计量资料采用中位数和范围表示以及 Wilcoxon 秩和检验, Kaplan-Meier 法计算各组生存率, Log-rank 法进行显著性检验, 检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 胃癌患者术前外周血 GC-C mRNA 的表达水平 健康体检者外周血中未检测到 GC-C mRNA 表达, 在肠上皮化生和异型增生患者外周血中分别检测到 2 例和 3 例阳性, 表达阳性率分别为 9.5% 和 20.0%; 而胃癌患者术前外周血 GC-C mRNA 的阳性率较高, 为 48.3% (29/60), 与健康体检者、肠上皮化生和异型增生患者比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。在肠型胃癌患者外周血中 GC-C mRNA 表达高于弥漫型胃癌, 并且与胃癌临床 TNM 分期、浸润深

度、淋巴结转移和分化程度相关 ($P < 0.05$ 或 0.01, 表 1), 而与性别、年龄及肿瘤大小等因素无关。

2.2 胃癌患者术前外周血 GC-C mRNA 表达对术后复发的影响 60 例胃癌患者中, 术后 1 年肿瘤复发 17 例, 复发率为 28.3%; 术后 2 年累计肿瘤复发 36 例, 累计复发率为 60.0%; 术后 3 年累计肿瘤复发 49 例, 累计复发率为 81.7%; 术后 4 年累计肿瘤复发 54 例, 累计复发率为 90.0%。其中, GC-C 阳性 29 例, GC-C 阴性 31 例, GC-C 阳性患者术后 1 年、2 年、3 年和 4 年的累计复发率高于 GC-C 阴性患者 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且 GC-C 阳性患者术后中位复发时间短于 GC-C 阴性患者, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 表 2)。

表 1 胃癌患者术前外周血 GC-C mRNA 的表达与临床病理特征的关系

临床特征	N	GC-C mRNA		P 值
		阳性例数	阳性率 (%)	
年龄(岁)				0.631 ^a
<60	25	13	52.0	
≥ 60	35	16	45.7	
性别				0.464 ^a
男	42	19	45.2	
女	18	10	55.6	
肿瘤大小 d/cm				0.073 ^a
<5	32	12	37.5	
≥ 5	28	17	60.7	
Lauren 分型				0.001 ^a
肠型	28	20	71.4	
弥漫型	32	9	28.1	
临床病理分期				0.017 ^a
I~II	26	8	30.8	
III~IV	34	21	61.8	
淋巴结转移				0.004 ^b
无	19	4	21.1	
有	41	25	58.5	
浸润深度				0.016 ^b
浆膜内	17	4	23.5	
浆膜外	43	25	58.1	
分化程度				0.038 ^a
高中分化	29	10	34.5	
低分化	31	19	61.3	

^a χ^2 检验; ^b Fisher 确切概率法

2.3 术前外周血 GC-C mRNA 表达对胃癌患者术后生存期的影响 随访 60 例胃癌患者的资料表明: 术后 4 年内累计死亡 47 例, 占总人数的 78.3%。其中, 术前外周血 GC-C mRNA 阴性表达患者 4 年生存率高于术前阳性表达患者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1)。

表 2 胃癌患者术后累计复发率和中位复发时间

组别	N	术后累计复发率 n(%)				中位复发时间 t/月
		1 年	2 年	3 年	4 年	
GC-C 阳性	29	12(41.4)	23(79.3)	28(96.6)	29(100.0)	16(2~37)
GC-C 阴性	31	5(16.1)	13(41.9)	21(67.7)	25(80.6)	34(5~47)
P 值		0.030 ^a	0.003 ^a	0.006 ^b	0.024 ^b	0.001 ^c

^a χ^2 检验; ^b Fisher 确切概率法; ^c Wilcoxon 检验法

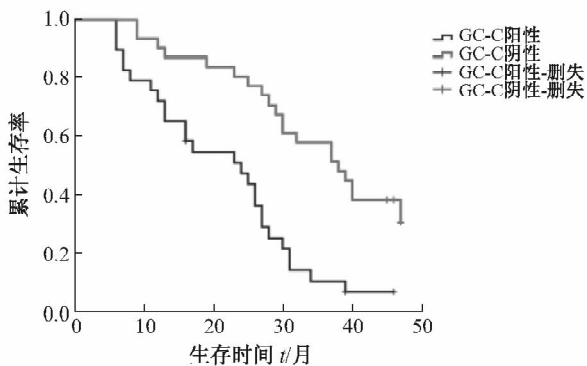


图 1 胃癌患者术前外周血 GC-C mRNA 阳性与阴性患者生存曲线的对比

3 讨论

GC-C 可作为大肠癌微转移的生物学指标,与 CK19、CK20、CEA 等相比,GC-C 有较高的肠道组织特异性和较低的假阳性率,外周血 GC-C mRNA 的表达能早期监测大肠癌患者术后复发和转移^[5]。既往研究提示 GC-C 在胃腺癌发生、发展过程中可能发挥重要作用, Hp 感染可能参与 GC-C 的致瘤调节^[3,6-7]。然而,GC-C 表达与胃癌预后关系的研究目前鲜有报道。本研究结果发现,在健康体检者未检测到 GC-C mRNA 的表达,肠上皮化生及异型增生患者外周血中表达阳性率很低,而胃癌患者术前外周血中检测到 GC-C mRNA 阳性表达,临床病理分期 III~IV 期、淋巴转移、低分化和浆膜外浸润胃癌患者 GC-C mRNA 阳性率显著高于 I~II 期、无淋巴转移、高中分化和浆膜内浸润患者 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。GC-C 阳性患者术后中位复发时间明显短于 GC-C 阴性患者,两组术后 1~4 年累计肿瘤复发率及中位复发时间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。因此,对于术前 GC-C 阳性患者,尤其是含量较高的患者,应视为术后复发和转移的高危患者,应对其加强术后监测,及时辅助治疗,必要时术前进行新辅助化疗。

综上所述,胃癌患者术前外周血 GC-C mRNA 有较高的阳性率,其与胃癌患者病情进展有关,可能作为一种有效预测胃癌术后复发的生物学标记物,

通过对 GC-C mRNA 的检测有助于了解患者的预后、评价手术效果,也有助于选择最有效的治疗方案尽可能延长患者的生命。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62:10-29.
- [2] Chen W, Zheng R, Zhang S, Zhao P, Li G, Wu L, et al. Report of incidence and mortality in China cancer registries, 2009[J]. Chin J Cancer Res, 2013, 25:10-21.
- [3] 毛振彪, 许 钟, 张健锋, 朱慧君, 章建国, 潘正平. 鸟苷酸环化酶 C 和尾型同源盒转录因子 2 在胃癌及癌前病变组织中的表达及意义[J]. 中华消化杂志, 2008, 28: 673-677.
- [4] 张健锋, 薛世民, 张 弘, 孟 海, 朱惠君, 毛振彪. 胃癌患者外周血中鸟苷酸环化酶 C 信使 RNA 的表达及其临床意义[J]. 中华医学杂志, 2012, 92:371-375.
- [5] 毛振彪, 王唯一, 张冬雷, 黄介飞, 鞠少卿. 实时荧光定量 PCR 检测大肠癌患者外周血鸟苷酸环化酶 C 基因及其临床意义[J]. 第二军医大学学报, 2005, 26:1252-1255. Mao Z B, Wang W Y, Zhang D L, Huang J F, Ju S Q. Real-time fluorescence quantitative reverse transcription PCR in determination of guanylyl cyclase-C gene expression in peripheral blood of patients with colorectal cancer and its clinical significance[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26:1252-1255.
- [6] Mao Z B, Zhang J F, Xu Z, Zhu H J, Zhang J G, Pan Z P, et al. Ectopic expression of guanylyl cyclase C in gastric cancer as a potential biomarker and therapeutic target[J]. J Dig Dis, 2009, 10:272-285.
- [7] Zhang J F, Mao Z B, Li Z L, Xue S M, Zhu H J, Zhang H, et al. Ectopic expression of guanylyl cyclase C and endogenous ligand guanylin correlates significantly with *Helicobacter pylori* infection in gastric carcinogenesis [J]. Med Oncol, 2012, 29:1748-1757.