

应用实时荧光定量RT-PCR法建立肝癌分子诊断指数

王伟丽, 高英堂, 杜智, 王毅军, 景丽, 郭华, 杨斌, 白同

王伟丽, 天津医科大学第三中心临床学院 天津市 300170
高英堂, 杜智, 王毅军, 景丽, 郭华, 杨斌, 白同, 天津市第三中心医院 天津市人工细胞重点实验室 天津市 300170
王伟丽, 天津医科大学硕士, 主要从事多种医学分子技术在肝癌临床诊断治疗中的应用研究。
天津市科委攻关基金资助项目, No. 05YFSZSF02500
作者贡献分布: 此课题的设计与论文写作由王伟丽与高英堂完成; 研究过程由王伟丽、郭华和景丽完成; 标本采集由杜智、王毅军及白同完成; 数据分析由王伟丽、高英堂及杨斌完成。
通讯作者: 高英堂, 300170, 天津市河东区津塘路83号, 天津市第三中心医院. gaoyt816@163.com
电话: 022-84112148 传真: 022-24382234
收稿日期: 2009-02-03 修回日期: 2009-02-20
接受日期: 2009-02-23 在线出版日期: 2009-04-08

Molecular diagnostic index for hepatocellular carcinoma using real-time fluorescent quantitation RT-PCR: a pilot study

Wei-Li Wang, Ying-Tang Gao, Zhi Du, Yi-Jun Wang, Li Jing, Hua Guo, Bin Yang, Tong Bai

Wei-Li Wang, the Third Central Hospital Affiliated to Tianjin Medical University, Tianjin 300170, China
Ying-Tang Gao, Zhi Du, Yi-Jun Wang, Li Jing, Hua Guo, Bin Yang, Tong Bai, Artificial Cells Key Laboratory of Tianjin, the Third Central Hospital, Tianjin 300170, China
Supported by: the Key Program of Tianjin Science Committee, No. 05YFSZSF02500
Correspondence to: Ying-Tang Gao, Artificial Cells Key Laboratory of Tianjin, the Third Central Hospital, Tianjin 300170, China. gaoyt816@163.com
Received: 2009-02-03 Revised: 2009-02-20
Accepted: 2009-02-23 Published online: 2009-04-08

Abstract

AIM: To develop molecular diagnostic indexes to detect hepatocellular carcinoma (HCC) using genes whose expression level differs markedly from the normal tissue.

METHODS: Thirty eight tissue samples were obtained from surgical resection at random including 5 normal liver, 4 hepatitis, 12 liver cirrhosis, 17 HCC and paracancer tissues. Gene expression in 9 cases was detected using real-time fluorescent quantification RT-PCR on the control of G3PDH (housekeeping gene). The method of $2^{-\Delta\Delta CT}$ was used to calculate the relative qualification of target genes, and then the molecular

diagnostic index was estimated according to the gene numbers of abnormal expression.

RESULTS: Six gene expression differed among normal, hepatitis, LC and HCC groups. GPC3 and E2F1 showed an increasing trend, while PTEN, PRDM2, and MGMT showed a decreasing trend. But HGF, CLDN10 expression was elevated in LC, decreased in HCC. For 9 genes as molecular diagnosis index, their average value was 1.58 in LC, 5.24 in HCC, and the difference was significant. GPC3, E2F1 and MMP2 increased gradually from paracancer to cancer. CLDN10, HGF, PTEN, DLC1, PRDM2, and MGMT decreased gradually from paracancer to cancer.

CONCLUSION: The method of molecular diagnostic index can be potentially used to detect and differentiate early HCC effectively by analyzing the combination of more screening genes.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Gene expression; Expression; Real-time fluorescent quantitation polymerase chain reaction; Molecular diagnostic index

Wang WL, Gao YT, Du Z, Wang YJ, Jing L, Guo H, Yang B, Bai T. Molecular diagnostic index for hepatocellular carcinoma using real-time fluorescent quantitation RT-PCR: a pilot study. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(10): 985-991

摘要

目的: 筛选肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中表达水平较正常肝细胞差异大、特异性好的基因, 建立肝癌分子诊断指数, 以期从分子病因学角度实现对肝癌的早期诊断。

方法: 随机选择38例手术切除组织标本, 其中正常肝5例、肝炎4例、肝硬化(LC)12例、HCC和癌旁组织17例, 实时荧光定量RT-PCR检测9个基因的表达, 以管家基因G3PDH为对照, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因相对表达量, 依据表达异常的基因个数建立分子诊断指数。

结果: GPC3等6个基因在正常肝、肝炎、LC与HCC组的两组或多组间存在差异($P<0.05$); GPC3、E2F1从肝炎组到LC、HCC组呈递增

背景资料

常规病理学技术对某些微小且分化较好的肝癌或交界性病变的诊断具有一定的局限性和挑战性, 随着肿瘤基因组学研究的深入, 分子病因学诊断有望应用于肝癌的早期诊断。

同行评议者

黄志勇, 副教授, 华中科技大学同济医学院普外科; 崔云甫, 教授, 哈尔滨医科大学第二附属医院普外科

■ 研发前沿

随着分子生物学的迅猛发展, 肿瘤基因诊断成为当今研究的重点, 基因诊断结合病理学诊断等方法将实现肝癌的早期诊断、鉴别诊断。

趋势, HGF、CLDN10在LC组表达量升高, 而在HCC组明显下降, PTEN、PRDM2、MGMT从肝炎组到LC、HCC组呈递减趋势; 9个基因在LC组分子诊断指数平均值为1.58, 在HCC组平均值为5.24, 二者差异显著; GPC3、E2F1、MMP2从癌旁到癌呈递增趋势, CLDN10、HGF、PTEN、DLC1、PRDM2、MGMT从癌旁到癌呈递减趋势。

结论: 通过筛选更多基因的组合分析, 分子诊断指数有望成为鉴别诊断早期肝癌的一种有效方法。

关键词: 肝细胞癌; 基因; 表达; 实时荧光定量RT-PCR; 分子诊断指数

王伟丽, 高英堂, 杜智, 王毅军, 景丽, 郭华, 杨斌, 白同. 应用实时荧光定量RT-PCR法建立肝癌分子诊断指数. 世界华人消化杂志 2009; 17(10): 985-991

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/985.asp>

0 引言

原发性肝癌是世界范围内发病率最高的恶性肿瘤之一, 也是我国最常见且恶性程度最高的肿瘤之一, 由于其早期诊断困难, 肝癌的病死率居高不下^[1-2]. 肝癌多数由慢性肝炎、肝硬化演化而来, 是一个多基因、多途径相互作用的过程, 基因表达分析能对早期癌变、微小且分化较好的肿瘤和交界性病变的诊断提供帮助^[3]. 实时荧光定量RT-PCR是一种简便、快速且高敏感性的基因表达检测方法, 能准确分析基因表达水平的改变. 我们利用实时荧光定量RT-PCR法检测9个基因在正常肝、肝炎、肝硬化及肝癌组织中的表达水平, 初步建立肝癌分子诊断指数。

1 材料和方法

1.1 材料 选取2004-12/2006-08天津市第三中心医院肝胆外科手术组织标本38例, 其中17例HCC患者(14例为乙肝, 1例为丙肝, 3例无病毒感染的癌组织(T)、癌旁0 cm(N0)和2 cm(N2)组织, 其中男11例, 女6例, 年龄22-75(平均57)岁, 所有患者经病理诊断均为肝细胞癌, 其中6例高分化, 7例中分化, 4例低分化; 4例乙型肝炎; 12例LC(9例为乙肝, 其中2例合并丙肝; 3例无病毒感染); 5例正常肝(取自手术治疗的肝血管瘤旁组织)作对照. 所有标本取材均通过我院伦理委员会审核, 家属知情签字同意。

1.2 方法

1.2.1 RNA提取和逆转录: 参照Promega公司

RNAagents试剂盒提取总RNA, 每50 mg组织的总RNA溶于50 μ L DEPC水中, 琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性, 紫外分光光度计检测A值, 计算其浓度. 逆转录参照Promega公司的ImRrom-II™使用说明书, 反应体系为2 μ g RNA、0.5 μ g随机引物, 70℃热变性10 min, 迅速冰浴3 min; 再依次加入2.4 μ L 25 mmol/L MgCl₂、4 μ L 5×逆转录缓冲液、1 μ L 10 mmol/L dNTP、20 U RNase inhibitor、1 μ L逆转录酶, 加DEPC水至终体积为20 μ L. 37℃水浴90 min, 然后70℃ 10 min灭活逆转录酶。

1.2.2 引物设计: 依据GenBank中癌基因GPC3、E2F1、MMP2、HGF、CLDN10, 抑癌基因PTEN、DLC1、PRDM2、MGMT和管家基因G3PDH的mRNA序列设计引物, 软件采用Primer Express 2.0设计, 由上海生物工程技术有限公司负责合成, 序列见表1。

1.2.3 实时荧光定量PCR检测9个基因的表达水平: 优化反应条件, 如引物浓度、退火温度和延伸时间等, 使目的基因和管家基因的扩增效率保持一致. 按照TaKaRa公司的实时荧光定量PCR反应体系, 组成如下: cDNA模板2 μ L、上下游引物各0.5 μ L、1 U Taq聚合酶、2 μ L 2.5 mmol/L dNTP和2.5 μ L 10×PCR缓冲液, 加超纯水至总体积25 μ L. 采用两步PCR法, 扩增条件为: 94℃预变性2 min, 94℃变性60 s, 各基因退火温度见表1. 根据各基因的实时扩增曲线和熔解曲线进行分析, 取CT值, 按 $2^{-\Delta\Delta CT}$ ^[4]法计算待测目的基因相对表达量, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值相差3倍认为有表达差异。

统计学处理 通过SPSS13.0软件进行方差分析, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 总RNA提取 肝组织总RNA的 A_{260}/A_{280} 为1.7-2.0, 表明纯度较高. 紫外灯下观察琼脂糖凝胶电泳可见清晰的28S、18S条带, 其亮度之比为1.5-2, 表明完整性好。

2.2 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法检测9个基因的相对表达水平与分子诊断指数的建立 实时荧光定量PCR表明, 各扩增曲线良好, 呈明显的“S”型; 各融解曲线未见杂峰, 也未出现主峰的异常增宽, 说明目的序列扩增的特异性较高. 各基因在不同标本中的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值如表2所示, 在17个HCC标本中, GPC3、E2F1表达量在HCC中显著升高, 其中分别有15个、10个标本呈3倍量上调; 而

■ 相关报道

Jia *et al* 使用GPC3等5个基因对218例HCC标本进行检测, 结果表明5个基因组合诊断能改善预测的精确性.

表 1 9个基因的引物序列

引物	序列5'→3'片段	大小(bp)	退火温度(°C)
G3PDH	CTC ATG ACC ACA GTC CAT GCC ATC ACT G	140	55
	CAT GAG GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA		
GPC3	TGA CCT GAA AGT ATT TGG GAA TTT CC	427	60
	CAA TAG TGG TGG TCA GCT TTC CTG		
E2F1	GAA CCA CAT CCA GTG GCT GG	520	63
	GGA CAA CAG CGG TTC TTG CT		
MMP2	GAA GGC TGT GTT CTT TGC AGG	325	61
	TCA GGT AAT AGG CAC CCT TGA AG		
CLDN10	TGT CAG GGC TGT GCT CAA TG	150	57
	CCA CCA ATT ATG CAC AGT GAG G		
HGF	GAA AAC AAT GCC TCT GGT TCC	200	57
	TGT GTT CGT GTG GTA TCA TGG A		
PTEN	TAG AGT TCT TCC ACA AAC AGA ACA GA	550	60
	AAT CTG ACA CAA TGT CCT ATT GCC		
DLC1	TTT ACC ACC TGC TGA ATT ACT CAC GCC	300	60
	ACG TCT GTG TAG TGC ACA GGA AAG CC		
PRDM2	GGG ATG GAT GTG CAT TGA TG	350	61
	GCA GAG GTG AAA TCT GGC TCA		
MGMT	GTG CAC AGC CTG GCT GAA T	500	62
	CGC ATC CGA TGC AGT GTT AC		

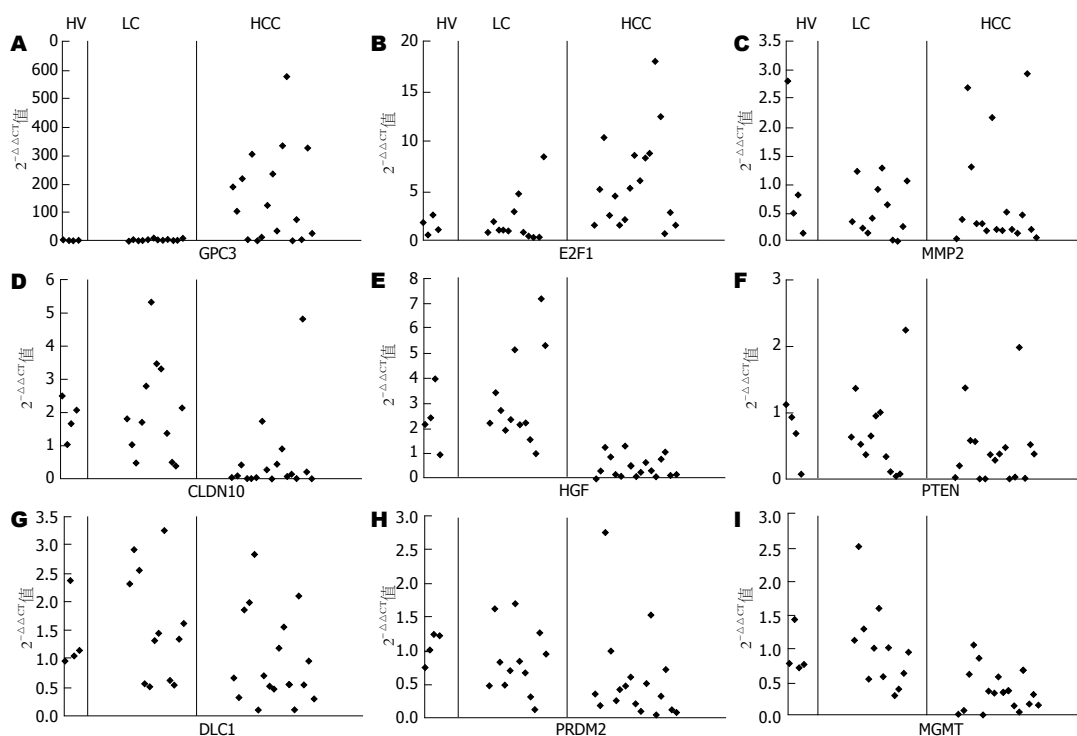


图 1 9个基因在肝炎(HV)组、LC组、HCC组的相对表达量.

CLDN10、MGMT、MMP2、HGF、PTEN和PRDM2在HCC中呈低表达, 分别有13、11、10、9、8和8个标本下调. 各基因在不同组织中的表达差异如表3所示, 除MMP2、DLC1、PRDM2外, 其余6个基因在正常组、肝炎组、肝

硬化组、癌旁与癌组之间存在表达差异.

为进一步区分9个基因在个体中的差异, 以其在肝炎、LC、HCC组的表达量做散点图, 如图1所示GPC3、E2F1在正常组、LC、HCC组 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值递增; MMP2变化不明显, 但散点图可见

■创新盘点

本研究在前期实验基础上,选择GPC3等5个肝癌高表达基因和PTEN等4个低表达基因进行实时荧光定量RT-PCR分析,初步建立肝癌的分子诊断指数,结果表明分子诊断指数在肝癌组织与癌旁组织及肝炎、肝硬化组织中存在明显差异,具有诊断价值。

表 2 基因表达量和分子诊断指数

	GPC3	E2F1	MMP2	CLDN10	HGF	PTEN	DLC1	PRDM2	MGMT	Index
NL1	1.268	1.254	0.575	0.947	1.379	0.600	0.737	0.752	1.652	0
NL2	1.528	1.271	1.406	1.406	1.278	1.268	1.803	0.869	0.322	0
NL3	1.127	1.823	1.008	0.860	0.630	1.638	1.932	1.567	1.408	0
NL4	0.347	0.561	0.836	0.556	1.113	0.629	0.702	0.496	0.982	0
NL5	1.321	0.614	1.466	1.571	0.809	1.276	0.555	1.970	1.360	0
HV219	2.570	1.724	2.813	2.518	2.180	1.134	0.966	0.752	0.798	0
HV229	1.081	0.610	0.508	1.030	2.402	0.928	2.378	1.020	1.448	0
HV238	0.819	2.542	0.836	1.684	3.956	0.694	1.035	1.238	0.729	1
HV239	0.848	1.011	0.154	2.045	0.989	0.092	1.149	1.229	0.781	2
LC224	0.494	0.868	0.369	1.805	2.241	0.638	2.313	0.482	1.136	0
LC232	4.323	1.900	1.241	1.058	3.444	1.368	2.928	1.622	2.539	2(1)
LC241	0.372	1.054	<i>0.247</i>	0.490	2.721	0.544	2.549	0.822	1.287	1
LC243	1.793	1.004	<i>0.162</i>	1.696	1.964	0.377	0.563	0.503	0.552	1
LC247	3.487	0.950	0.421	2.793	2.369	0.656	0.514	0.701	1.024	1
LC248	6.507	2.900	0.928	5.322	5.148	0.961	1.338	1.715	1.607	3(1)
LC250	4.234	4.744	1.285	3.463	2.180	1.008	1.444	0.846	0.580	3(2)
LC253	1.507	0.833	0.656	3.299	2.210	0.342	3.249	0.668	1.010	2(1)
LC254	3.309	0.419	<i>0.037</i>	1.349	1.541	<i>0.114</i>	0.620	0.332	0.347	3
LC255	<i>0.194</i>	0.394	<i>0.027</i>	0.501	1.038	<i>0.067</i>	0.532	<i>0.133</i>	0.416	4
LC256	0.708	0.337	<i>0.259</i>	0.374	7.180	<i>0.080</i>	1.347	1.255	0.639	3(2)
LC259	7.579	8.433	1.073	2.132	5.329	2.238	1.625	0.945	0.942	3(2)
120N2	0.427	<i>0.176</i>	<i>0.181</i>	0.477	1.235	0.385	1.828	0.379	0.576	2
121N2	0.903	1.554	0.616	0.552	2.683	<i>0.286</i>	1.765	0.846	0.416	1
122N2	0.467	<i>0.192</i>	0.629	1.096	3.795	0.412	1.932	0.817	1.003	2(1)
123N2	1.921	1.401	1.250	5.177	2.091	0.548	2.445	1.355	0.709	1(0)
124N2	1.989	2.920	0.934	1.030	1.858	1.111	1.404	1.171	1.120	0
125N2	2.553	0.378	0.754	0.679	1.833	0.430	2.969	1.412	0.885	0
127N2	18.791	1.362	<i>0.183</i>	3.842	2.957	<i>0.091</i>	1.292	0.668	0.787	4(3)
128N2	0.418	0.336	<i>0.162</i>	0.341	0.815	0.401	0.559	<i>0.184</i>	0.560	2
130N2	0.354	<i>0.162</i>	0.490	0.764	1.795	<i>0.247</i>	0.973	0.376	0.501	2
131N2	1.073	0.700	<i>0.182</i>	0.537	0.969	0.401	1.670	<i>0.179</i>	1.090	2
132N2	1.233	0.343	<i>0.245</i>	0.567	1.024	0.334	0.946	0.400	0.666	1
133N2	52.783	5.525	1.397	3.737	4.299	0.334	4.438	1.876	1.053	5(3)
134N2	2.813	12.782	<i>0.169</i>	0.723	0.776	<i>0.016</i>	0.390	0.513	<i>0.185</i>	4
137N2	0.442	0.394	0.415	2.161	1.618	<i>0.094</i>	0.753	0.506	0.455	1
143N2	11.096	2.213	1.073	9.660	2.610	<i>0.097</i>	2.099	1.703	1.541	3(2)
145N2	0.385	<i>0.064</i>	<i>0.110</i>	0.575	1.607	0.342	0.629	0.479	0.367	2
146N2	<i>0.093</i>	<i>0.027</i>	<i>0.079</i>	0.374	0.402	<i>0.069</i>	<i>0.257</i>	<i>0.104</i>	<i>0.194</i>	7
120T	190.283	1.501	<i>0.054</i>	<i>0.039</i>	<i>0.017</i>	<i>0.039</i>	0.655	0.358	<i>0.036</i>	6
121T	107.040	5.155	0.396	<i>0.070</i>	0.331	<i>0.209</i>	<i>0.310</i>	<i>0.181</i>	<i>0.091</i>	7
122T	220.098	10.310	2.698	<i>0.304</i>	1.243	1.368	1.866	2.766	0.613	3
123T	3.345	2.578	1.312	<i>0.004</i>	0.898	0.595	1.986	0.999	1.067	2
124T	306.980	4.488	<i>0.326</i>	<i>0.006</i>	<i>0.171</i>	0.567	2.848	<i>0.266</i>	0.867	6
125T	<i>0.042</i>	1.491	<i>0.315</i>	<i>0.034</i>	<i>0.074</i>	<i>0.019</i>	0.104	0.432	<i>0.021</i>	6
127T	14.143	2.167	<i>0.211</i>	1.731	1.314	<i>0.012</i>	0.702	0.479	<i>0.322</i>	4
128T	127.292	5.263	2.161	<i>0.263</i>	0.512	0.387	0.503	0.602	<i>0.330</i>	4
130T	234.265	8.550	<i>0.213</i>	<i>0.007</i>	<i>0.073</i>	<i>0.296</i>	0.463	<i>0.204</i>	0.588	7
131T	35.555	6.004	<i>0.208</i>	0.467	<i>0.300</i>	0.382	1.189	<i>0.101</i>	0.357	5
132T	333.606	8.374	0.526	0.903	0.657	0.487	1.558	0.513	<i>0.323</i>	3
133T	576.829	8.791	<i>0.229</i>	<i>0.054</i>	<i>0.326</i>	<i>0.012</i>	0.551	1.535	<i>0.155</i>	7
134T	1.571	18.076	<i>0.161</i>	<i>0.146</i>	<i>0.097</i>	<i>0.034</i>	<i>0.111</i>	<i>0.056</i>	<i>0.075</i>	8
137T	71.606	12.519	0.477	<i>0.003</i>	0.771	1.975	2.114	<i>0.325</i>	0.690	4
143T	3.736	0.672	2.932	4.830	1.053	<i>0.010</i>	0.540	0.726	<i>0.197</i>	4
145T	326.740	2.840	<i>0.216</i>	<i>0.219</i>	<i>0.149</i>	0.522	0.959	<i>0.141</i>	<i>0.320</i>	6
146T	29.081	1.554	<i>0.088</i>	<i>0.003</i>	<i>0.186</i>	0.387	<i>0.277</i>	<i>0.088</i>	<i>0.176</i>	7

3倍量上调用粗体表示, 3倍量下调用斜体表示。

表 3 9个基因在各组中的相对表达 (mean ± SD)

组织类型	n	GPC3	E2F1	MMP2	CLDN10	HGF	PTEN	DLC1	PRDM2	MGMT
正常	5	1.12 ± 0.45 ^a	1.10 ± 0.52 ^a	1.06 ± 0.38	1.07 ± 0.41	1.04 ± 0.32 ^c	1.08 ± 0.45 ^{ae}	1.15 ± 0.66	1.13 ± 0.61	1.14 ± 0.52 ^{ae}
肝炎	4	1.33 ± 0.84	1.47 ± 0.85 ^a	1.08 ± 1.19	1.81 ± 0.63	2.38 ± 1.22 ^a	0.71 ± 0.45	1.38 ± 0.67	1.06 ± 0.23	0.94 ± 0.34 ^a
肝硬化	12	2.87 ± 2.46 ^a	1.99 ± 2.40 ^a	0.56 ± 0.46	2.02 ± 1.48 ^a	3.11 ± 1.83 ^a	0.70 ± 0.63	1.59 ± 0.97	0.83 ± 0.49	1.00 ± 0.62 ^{ae}
癌旁 (2 cm)	12	5.33 ± 12.99 ^a	1.67 ± 3.18 ^a	0.50 ± 0.40	1.53 ± 1.55 ^a	1.82 ± 1.08 ^{ac}	0.34 ± 0.25	1.49 ± 1.06	0.69 ± 0.50	0.63 ± 0.32
癌	17	151.84 ± 163.51	5.90 ± 4.71	0.74 ± 0.94	0.54 ± 1.19	0.48 ± 1.43 ^c	0.43 ± 0.52	0.98 ± 0.81	0.57 ± 0.68	0.37 ± 0.30
P值		0.000	0.003	0.359	0.045	0.000	0.024	0.407	0.244	0.000

^aP<0.05 vs 癌组织; ^cP<0.05 vs 肝硬化组织; ^eP<0.05 vs 癌旁组.

其在3例HCC标本中明显上调; CLDN10、HGF在LC上调,但在HCC明显下调; PTEN、DLC1、PRDM2、MGMT在正常、LC、HCC组 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值递减,虽然MMP2、DLC1、PRDM2方差分析结果差异不显著,但通过散点图可以看出个体标本的差异.

对每个标本,他的分子诊断指数根据各基因相对表达量大于或小于3倍正常组表达量的基因个数确定,即标本中每有一个基因表达量与正常组相差3倍则分子诊断指数增加1,因此分子诊断指数从0到9.由于CLDN10、HGF在HCC组下调,而在LC、癌旁组上调,因此若以HCC表达量的改变为准,则这两个基因在LC、癌旁组将不计入分子诊断指数,其分子诊断指数如表2括号中所示.如表2所示,正常组和肝炎组分子诊断指数接近于0;LC组中除LC255外分子诊断指数介于0-2之间,平均值为1.58;肝癌组中除123T外都大于等于3,分子诊断指数平均值为5.24,与LC组等差异显著.此结果表明应用分子诊断指数明显优于单个基因的诊断,提高了HCC与LC等组织间的鉴别能力.

通过成对比较HCC患者癌组织与癌旁2 cm组织的分子诊断指数,表明癌旁组织的分子诊断指数明显低于前者,17例HCC标本中13例癌旁组织的分子诊断指数小于3,而127N2、133N2为3,134N2为4,146N2为7,提示这4例标本可能混有少量癌细胞,或者这部分细胞已存在基因异常,但形态学上未发生明显改变.进一步比较146T与其N2各个基因的相对表达量,发现尽管分子诊断指数均为7,多数基因的异常表达也一致,但GPC3的表达二者差异显著(300倍),因此,不能

应用要点
多基因分子诊断指数的运用有望成为鉴别诊断早期肝癌的一种有效方法.

简单将146N2看成癌组织,尚需更深入的分析.

2.3 9个基因从癌旁组织到癌组织中的表达趋势分析 标本来源于9例患者的T、N0、N2组织,依据每个基因在每例患者标本的N2、N0、T相对表达量做柱状图(图2). GPC3在9例患者中7例呈明显递增趋势,且T组中表达量明显高于N组; E2F1在7例中呈递增趋势,2例差异不明显; MMP2在3例呈递增趋势,1例呈递减趋势; CLDN10在6例中呈递减趋势; HGF在7例中呈递减趋势; PTEN在4例中呈递减趋势,1例呈递增趋势; DLC1在5例中呈递减趋势,2例中呈递增趋势; PRDM2在7例中呈递减趋势; MGMT在6例中呈递减趋势,这说明癌组织和癌旁组织基因表达量存在差异,而且从癌旁到癌呈现趋势改变.

3 讨论

病理学诊断对肝病诊断具有重要意义,但对病理学家来说,肝癌的病理学诊断也具有一定的挑战性,特别对于肝硬化伴结节改变、微小且分化较好的肝癌和交界性病变等^[3].随着分子生物学的迅猛发展,肿瘤基因诊断成为当今研究的重点,基因诊断结合病理学诊断等方法将实现肝癌的早期诊断、鉴别诊断.本研究从以往文献和实验基础上选择肝癌中表达水平较正常组织差异大、特异性好的基因进行分子诊断指数的初步研究.

在以往研究中,多数是对单个分子指标进行实时荧光定量RT-PCR或免疫组化分析;即使是同时检测多个指标也是单个进行分析,而没有将这些分子指标进行整合分析.但单个基因容易造成漏诊、误诊,依研究较多的GPC3为例,如

同行评价

本研究利用9个基因进行肝癌分子诊断指数的研究充分表明了肝癌发生的复杂性,也提示临床医师要想准确无误地诊断早期肝癌或癌前病变,必须有效整合多项指标进行综合分析。

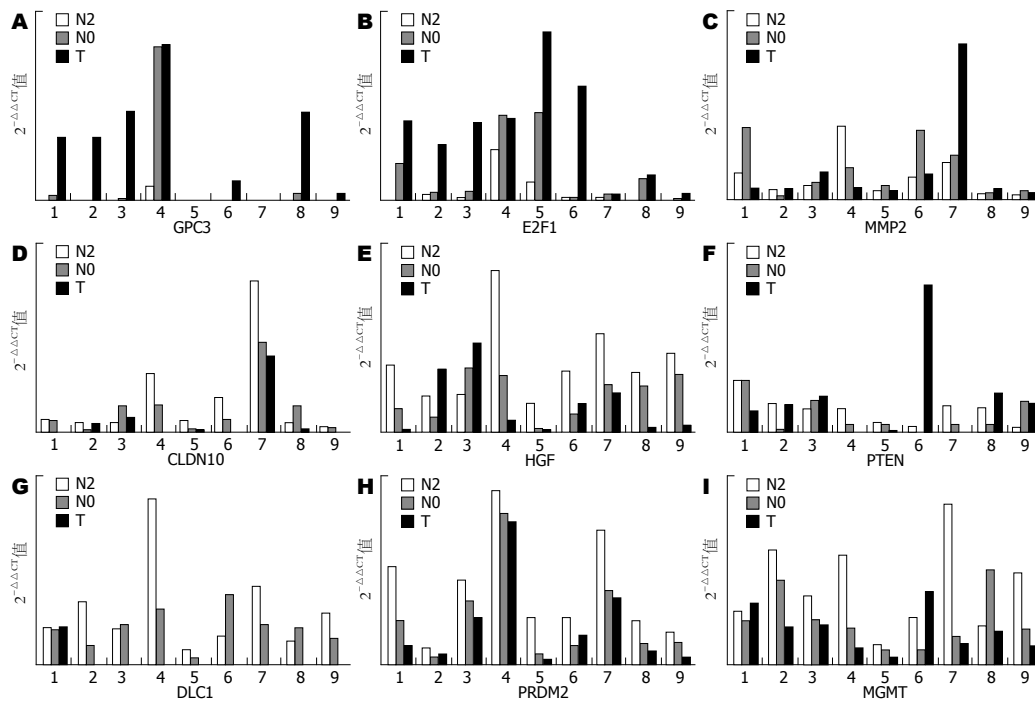


图 2 9个基因在癌旁2 cm处(N2)、癌与癌旁交界处(N0)、癌组织(T)的相对表达量。

本研究所示, GPC3在17例肝癌标本中有15例表达量上调,造成了2例标本漏诊;而12例肝硬化标本有6例标本上调,将会造成肝癌的误诊,由此可见单个基因检测的局限性。应用多个基因进行分子诊断指数研究可提高检测的准确性,在本研究中,正常组、肝炎组诊断指数接近于0,肝硬化组平均值为1.58,明显低于肝癌组的5.24。此结果与Jia *et al*^[2]和Paradis *et al*^[3]相一致, Jia *et al*^[2]使用GPC3等5个基因对218例HCC标本进行检测,结果表明5个基因组合评分能检测出100%的非癌组织, 71%的癌组织,说明相对于单个基因检测, 5个基因组合诊断能改善预测的精确性,包括对AFP血清水平正常的标本以及微小肿瘤的诊断。Paradis *et al*^[3]对筛选的13个基因做分子诊断指数研究,结果显示25例正常肝和22例肝硬化标本分子诊断指数在1到4内, HCC标本中除2例标本分子诊断指数为2和3外,其余的34例标本分子诊断指数均大于5。以上结果表明分子诊断指数所具有的可行性和优越性。

根据文献选择癌基因GPC3^[5]、E2F1^[6]、MMP2^[7]、HGF、CLDN10和抑癌基因PTEN^[8]、DLC1^[9]、PRDM2^[10]、MGMT^[11]作为分子诊断指数的候选基因,本次实时荧光定量PCR结果表明,癌基因GPC3、E2F1、MMP2和抑癌基因PTEN、DLC1、PRDM2、MGMT的表达与文献相符。但HGF、CLDN10却有独特的表达方式,即在癌组织中下调,而在部分肝硬化及癌旁

组织中上调,均区别于正常肝组织,因此,考虑HGF、CLDN10不但可以作为诊断HCC的指标,也可作为肝硬化的诊断指标,由于本研究例数较少,尚需大样本的数据支持。

关于HGF的报道多数为肝切后血清水平升高。吴福生 *et al*^[12]使用ELISA测定肝癌患者术前术后HGF血清水平,结果显示术后HGF血清水平出现高峰,术后复发转移患者血清水平高于未发生转移者。Efimova *et al*^[13]采集肝切术后患者血清中HGF进行细胞培养,结果显示其促进肝细胞DNA合成,但抑制肝癌细胞系(Hep3B、HepG2)生长。Burr *et al*^[14]在研究二乙基亚硝胺(DEN)诱发小鼠肝癌模型时发现,在10 wk炎症反应时,血清HGF水平升高,但肝组织没有升高;16 wk肝细胞异型增生,血清和组织HGF水平均明显升高;至19 wk小鼠致肝癌时,小鼠血清和组织水平依然升高,但发育不良的肝细胞和肿瘤细胞呈HGF阴性。整合上述文献提示我们,在HCC发生时,确有血清HGF表达升高,但不一定是肝癌细胞高表达,而可能由于部分肝细胞坏死,癌组织周围间质细胞及新生肝细胞的大量增生(包括肝硬化组织)导致HGF分泌增加,这一推论也符合我们观察到的结果,即HGF在肝硬化和癌旁组织有表达量的升高,肝癌中表达量下降。

近年通过肝癌基因组学、蛋白质组学和代谢组学的研究,众多学者筛选了大量与肝癌早期发生、演化密切相关的分子标记,充分表明

了肝癌的异质性和复杂性, 也提示人们要想准确无误地诊断早期肝癌或癌前病变, 单一指标根本行不通, 而是有效整合的多指标进行综合分析. 本研究利用9个基因进行HCC分子诊断指数的研究也是从这一角度进行的尝试, 初步结果表明: 由多基因组成的分子诊断指数比单一基因有更高准确性和鉴别诊断能力; 下一步的工作是筛选更多、更有效的基因, 同时扩大检测样本数, 建立可用于临床早期诊断和预后评估的分子诊断指数.

4 参考文献

- 1 徐海峰, 杨华瑜, 张宏冰, 毛一雷. 改变肝癌早期诊断和治疗现状的新肝癌血清标志物. *基础医学与临床* 2008; 28: 104-108
- 2 Jia HL, Ye QH, Qin LX, Budhu A, Forgues M, Chen Y, Liu YK, Sun HC, Wang L, Lu HZ, Shen F, Tang ZY, Wang XW. Gene expression profiling reveals potential biomarkers of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 1133-1139
- 3 Paradis V, Bièche I, Dargère D, Laurendeau I, Laurent C, Bioulac Sage P, Degott C, Belghiti J, Vidaud M, Bedossa P. Molecular profiling of hepatocellular carcinomas (HCC) using a large-scale real-time RT-PCR approach: determination of a molecular diagnostic index. *Am J Pathol* 2003; 163: 733-741
- 4 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-408
- 5 Wang XY, Degos F, Dubois S, Tessitore S, Allegretta M, Guttman RD, Jothy S, Belghiti J, Bedossa P, Paradis V. Glypican-3 expression in hepatocellular tumors: diagnostic value for preneoplastic lesions and hepatocellular carcinomas. *Hum Pathol* 2006; 37: 1435-1441
- 6 Arakawa Y, Kajino K, Kano S, Tobita H, Hayashi J, Yasen M, Moriyama M, Arakawa Y, Hino O. Transcription of dbpA, a Y box binding protein, is positively regulated by E2F1: implications in hepatocarcinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322: 297-302
- 7 Matsunaga Y, Koda M, Murawaki Y. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in hepatocellular carcinoma tissue, compared with the surrounding non-tumor tissue. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2004; 115-116: 143-150
- 8 Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007; 133: 647-658
- 9 Kim TY, Lee JW, Kim HP, Jong HS, Kim TY, Jung M, Bang YJ. DLC-1, a GTPase-activating protein for Rho, is associated with cell proliferation, morphology, and migration in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 355: 72-77
- 10 Chen LB, Xu JY, Yang Z, Wang GB. Silencing SMYD3 in hepatoma demethylates RIZ1 promoter induces apoptosis and inhibits cell proliferation and migration. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5718-5724
- 11 Nomoto S, Kinoshita T, Kato K, Otani S, Kasuya H, Takeda S, Kanazumi N, Sugimoto H, Nakao A. Hypermethylation of multiple genes as clonal markers in multicentric hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2007; 97: 1260-1265
- 12 吴福生, 郑树森, 吴灵娇, 丁伟, 马志敏, 王照明, 滕理送, 赵文和. 肝细胞生长因子及其受体c-met在肝细胞癌中的表达与预后价值. *中华外科杂志* 2006; 44: 603-608
- 13 Efimova EA, Glanemann M, Liu L, Schumacher G, Settmacher U, Jonas S, Langrehr JM, Neuhaus P, Nüssler AK. Effects of human hepatocyte growth factor on the proliferation of human hepatocytes and hepatocellular carcinoma cell lines. *Eur Surg Res* 2004; 36: 300-307
- 14 Burr AW, Hillan KJ, McLaughlin KE, Ferrier R, Chapman C, Mathew J, Burt AD. Hepatocyte growth factor levels in liver and serum increase during chemical hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 1996; 24: 1282-1287

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志栏目设置

本刊讯 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确. (常务副总编辑: 张海宁 2009-04-08)