

小细胞肺癌患者外周血胃泌素释放肽前体 mRNA 的检测及其临床意义



李媛^{1,2,3}, 宋丽华¹, 宋现让⁴

Detection of ProGRP mRNA in Peripheral Blood and Its Significance in Patients with Small Cell Lung Cancer

LI Yuan^{1,2,3}, SONG Lihua¹, SONG Xianrang⁴

1. Department of Internal Medicine Oncology, Shandong Cancer Hospital, Shandong Academy of Medical Sciences, Ji'nan 250117, China; 2. School of Medicine and Life Sciences, University of Ji'nan, Shandong Academy of Medical Sciences; 3. Department of Oncology & Hematology, Linyi People's Hospital; 4. Cancer Research Center, Shandong Cancer Hospital
Corresponding Author: SONG Lihua, E-mail: slh9999@vip.163.com

Abstract: Objective To investigate the relationship between the expression of pro-gastrin-releasing peptide(ProGRP) mRNA in peripheral blood and serum ProGRP protein and their association with pathological factors and chemotherapy response in patients with small cell lung cancer(SCLC).

Methods The expression of ProGRP mRNA was detected by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) in peripheral blood from 61 patients with SCLC before the first and the third chemotherapy. Serum ProGRP protein was also determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

Results ProGRP mRNA expression and the level of serum ProGRP protein were related to primary tumor size, clinical stages and distant metastasis($P < 0.05$). Linear correlation analysis revealed then there was a correlation between ProGRP mRNA expression in peripheral blood and serum ProGRP protein level ($R^2 = 0.34$, $P < 0.05$). Both levels of ProGRP mRNA and serum ProGRP protein in PR and CR cases were significantly declined following the second cycle of chemotherapy ($P < 0.05$). There was no obvious decrease in SD and PD cases before or after treatment ($P > 0.05$). **Conclusion** ProGRP mRNA could be used as a marker in the detection of circulating tumor cells in SCLC, and regular quantification of ProGRP mRNA in peripheral blood may be useful to evaluate the therapeutic efficiency and predict prognosis of SCLC patients. Serum ProGRP may also serve as a prognostic marker and be used in the assessment of therapeutic response in SCLC patients and the method is simple and feasible.

Key words: Small cell lung cancer(SCLC); Circulating tumor cells; Pro-gastrin-releasing peptide (ProGRP); Reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR)

摘要: 目的 探讨小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)患者外周血胃泌素释放肽前体(pro-gastrin-releasing peptide, ProGRP) mRNA表达水平和血清ProGRP水平的相关性及其与临床病理因素、近期疗效的关系。**方法** 收集61例初治小细胞肺癌患者, 分别于第1次和第3次化疗前抽取外周静脉血, 采用实时荧光定量反转录聚合酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)法检测ProGRP mRNA的表达水平, 同时采用酶联免疫吸附(ELISA)法测定患者血清ProGRP水平进行比较。**结果** SCLC患者外周血ProGRP mRNA表达水平、血清ProGRP水平均与原发肿瘤大小、临床分期及远处转移相关($P < 0.05$)。直线相关分析表明外周血ProGRP mRNA表达水平与血清ProGRP水平具有相关性($R^2 = 0.34$, $P < 0.05$)。化疗2周期后, PR+CR组患者外周血ProGRP mRNA表达水平及血清ProGRP水平均较治疗前明显下降($P < 0.05$), 而SD+PD组患者化疗前后两者水平均无明显下降($P > 0.05$)。**结论** ProGRP mRNA可作为检测SCLC患者外周血循环肿瘤细胞的标志物, 定期监测外周

血ProGRP mRNA表达水平变化有助于评估化疗疗效和预测预后; 血清ProGRP水平检测也可以作为SCLC疗效判断和预后评估指标, 且检测方法简便易行。

关键词: 小细胞肺癌; 循环肿瘤细胞; 胃泌素释放肽前体; 反转录聚合酶链反应

中图分类号: R734.2 文献标识码: A

收稿日期: 2013-02-01; 修回日期: 2013-04-18

作者单位: 1. 250117济南, 山东省肿瘤医院内科, 山东省医学科学院; 2. 济南大学 山东省医学科学院, 医学与生命科学学院; 3. 临邑县人民医院肿瘤血液科; 4. 山东省肿瘤医院基础研究中心

通信作者: 宋丽华, E-mail: slh9999@vip.163.com

作者简介: 李媛(1985-), 女, 硕士, 主要从事肿瘤内科的基础与临床研究

0 引言

小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)占原发性支气管肺癌的10%~25%,其特点是恶性程度高、生长迅速、侵袭力强,易出现远处转移,虽然对放疗化疗敏感,但治疗完全缓解的患者在未来也几乎无一例外地出现复发或转移。血行播散是SCLC转移的重要途径,肿瘤细胞进入外周血即循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs),在一定条件下形成微转移灶,是肿瘤发生远处转移的早期事件。因此,CTCs检测对SCLC的早期诊断、疗效评估、监控复发转移和判断预后方面有重要意义^[1-2]。胃泌素释放肽前体(pro-gastrin-releasing peptide, ProGRP)在SCLC患者高表达,而在NSCLC患者中不表达或低表达,在肺部良性疾病及健康人群中不表达,成为SCLC比较理想的肿瘤标志物^[3]。外周血ProGRP mRNA的检测可以作为CTCs存在的标志。本研究采用实时荧光定量反转录聚合酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)法,以ProGRP mRNA为指标,检测SCLC患者外周血中的CTCs,并与血清ProGRP蛋白检测进行比较,探讨两者的临床意义。

1 资料与方法

1.1 资料

收集2012年4月—2012年9月间山东省肿瘤医院初治的SCLC患者61例,均经病理组织学 and (或)细胞学证实。其中男43例,女18例;年龄41~76岁,中位年龄60岁。临床分期按1973年美国退伍军人医院分期标准:局限期(limited disease, LD)27例,广泛期(extensive disease, ED)34例。卡氏评分均为60~90分,治疗前肝、肾功能及血象正常。化疗方案多为EP(依托泊甙+顺铂)、EC(依托泊甙+卡铂),化疗2周期以上。所有患者于第1次和第3次化疗前进行影像学检查,并根据2009年美国国立癌症研究所实体瘤客观疗效评定标准修订版RECIST1.1^[4]进行疗效评价,分为完全缓解(complete response, CR)、部分缓解(partial response, PR)、稳定(stable disease, SD)和进展(progressive disease, PD)。根据疗效分为化疗有效组(PR+CR)、无效组(SD+PD)。

1.2 主要试剂

CanAg ProGRP EIA试剂盒为瑞典CanAg公司;RNA提取试剂盒购自德国Qiagen公司;RT-PCR试剂盒购自TaKaRa公司;引物由上海生物工程技术有限公司设计合成,序列为:

ProGRP上游引物;5'-AAAGAGCACAGGGGAGTCTT C-3',下游引物:5'-TCCTTTGCTTCTATGAG ACCCA-3';内参 β -actin上游引物:5'-TGGCACCC AGCACAATGAA-3',下游引物:5'-CTAAGTCAT AGTCCGCCTAGAA GCA-3'。

1.3 标本采集及处理

于第1次和第3次化疗前采集清晨空腹静脉血2 ml,离心后吸取血清分装保存于-20℃冰箱冰冻保存待检,禁止标本反复冻融及加热。同时取新鲜EDTA抗凝血1.5 ml,使用QIAamp RNA Blood Mini Kit试剂盒提取总RNA,紫外分光光度计下测定RNA纯度和浓度,取 OD_{260}/OD_{280} 值在1.8~2.1范围内的标本进行反转录。RNA提取及反转录实验中的塑料制品及实验用具均经0.1%DEPC水处理后高压灭菌。

1.4 标本检测

ELISA法检测血清ProGRP浓度,严格按说明书进行操作。ProGRP mRNA检测采用实时荧光定量RT-PCR法:RNA提取完成后,将RNA反转录为cDNA,反应条件为37℃、15 min,85℃、5 s。以cDNA为模板进行PCR扩增目的片段ProGRP和 β -actin。PCR反应体系为20 μ l,其中SYBRpremixEX Taq TMII 10 μ l (TaKaRa DRR081S)、上下游引物各0.8 μ l (10 μ mol/L)、ROX Reference Dye 0.4 μ l、cDNA 2.0 μ l、dH₂O 6.0 μ l,每个基因做3个复孔,于实时定量PCR仪进行PCR反应,扩增条件为:95℃预变性30 s,95℃变性5 s,60℃退火31 s,40个循环。读取Ct值,首先按公式“ $\Delta Ct = Ct_{(ProGRP)} - Ct_{(\beta-actin)}$ ”分别计算治疗前和治疗后的 ΔCt ,其值表示待测样本达到荧光阈值所用的PCR循环数较内参达到荧光阈值所用PCR循环数的差, ΔCt 值与ProGRP mRNA的表达量呈负相关,即 ΔCt 值增加,表示ProGRP mRNA表达水平下降;再按公式“ $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{治疗前} - \Delta Ct_{治疗后}$ ”得到“ $2^{-\Delta \Delta Ct}$ ”,代表ProGRP基因相对表达量。

1.5 统计学方法

使用SPSS17.0软件进行数据处理。所有数据均用中位数和四分位间距表示。ELISA检测结果经对数转换后成正态分布,方差齐性检验后的计量资料比较采用独立样本t检验、配对t检验;计数资料采用 χ^2 检验,小样本采取Fisher精确检验;ProGRP mRNA表达水平与血清ProGRP水平相关性分析采用直线相关分析方法;治疗前后ProGRP mRNA表达水平及ProGRP浓度变化与客观疗效评

价的相关性采用Spearman等级相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SCLC患者外周血ProGRP mRNA表达水平与临床病理因素的关系

SCLC患者外周血ProGRP mRNA表达水平与性别、年龄无相关性,差异无统计学意义($P > 0.05$);而与原发肿瘤大小、临床分期及远处转移均有相关性,其差异有统计学意义($P < 0.05$)。ED期患者ProGRP mRNA表达水平明显高于LD期患者,有转移患者的ProGRP mRNA表达水平较高,见表1。

表1 SCLC患者外周血ProGRP mRNA表达与临床病理因素之间的关系[中位数(四分位间距)]

Table1 Relationship between ProGRP mRNA expression and clinicopathological factors [Median(Inter Quartile Range)]

Characteristics	n	ProGRP mRNA ΔCt	P
Gender			0.096
Male	46	5.72(1.43)	
Female	15	5.30(1.30)	
Age(years)			0.609
<60	29	5.46 (1.45)	
≥ 60	32	5.89(1.21)	
Tumor size			0.033
≤ 3 cm	22	6.00(1.89)	
>3 cm	39	5.43(0.95)	
Clinical stage			0.001
LD	27	6.22(1.54)	
ED	34	5.28(0.90)	
Distant metastasis			0.000
No	39	5.93(1.59)	
Yes	22	5.24(0.66)	

Notes: SCLC: small cell lung cancer; ProGRP:pro-gastrin-releasing peptide; LD :limited disease; ED:extensive disease

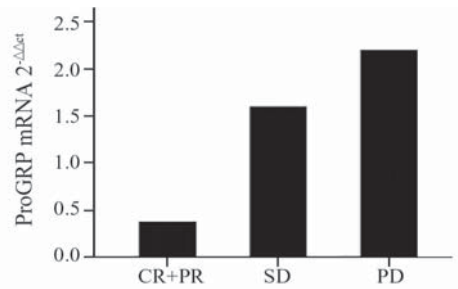
2.2 ProGRP mRNA表达水平与近期疗效的关系

61例SCLC患者化疗2周期后进行疗效评价:CR 2例、PR 40例、SD 13例、PD 6例;化疗有效组42例、无效组19例。化疗有效组ProGRP mRNA表达水平($\Delta Ct=7.63$)明显低于化疗前($\Delta Ct=5.89$),差异有统计学意义($P < 0.01$);无效组化疗前后ProGRP mRNA表达水平无明显变化($\Delta Ct_{\text{化疗前}}=5.41$: $\Delta Ct_{\text{化疗后}}=5.74$),差异无统计学意义($P > 0.05$)。治疗后ProGRP mRNA相对表达量($2^{-\Delta\Delta Ct}$)在PR+CR组、SD组、PD组分别为0.38、1.59、2.19,治疗前后ProGRP mRNA相对表达量与影像学疗效评价显著相关($r=0.671$, $P < 0.001$),见图1。

2.3 血清ProGRP水平与临床病理因素的相关性

血清ProGRP水平与性别、年龄无关($P > 0.05$),与肿瘤大小、临床分期及远处转移相关($P < 0.05$),见表2。

2.4 化疗前后血清ProGRP水平变化与近期疗效关系



CR: complete response; PR: partial response; SD: stable disease; PD: progressive disease

图1 ProGRP mRNA表达水平变化与影像学评价的关系
Figure1 The analysis of ProGRP mRNA expression and objective responses

表2 SCLC患者血清ProGRP水平与临床病理因素的关系 [中位数(四分位间距)]

Table2 The relationship between clinicopathological factors and serum level of ProGRP in SCLC patients[Median(Inter Quartile Range)]

Characteristics	n	proGRP(ng/L)	P
Gender			0.275
Male	46	495.17(1554.79)	
Female	15	1601.00(2145.00)	
Age(years)			0.317
< 60	29	387.67(1583.33)	
≥ 60	32	743.92(2103.96)	
Tumor size			0.001
≤ 3 cm	22	142.67(476.66)	
> 3 cm	39	1151.83(1871.16)	
Clinical stage			0.000
LD	27	121.00(697.50)	
ED	34	1378.08(1833.75)	
Distant metastasis			0.000
No	39	159.33(1070.00)	
Yes	22	1865.17(1667.5)	

化疗2周期后,SCLC患者血清中ProGRP的浓度水平(54.33 ng/L)明显低于化疗前(602.67 ng/L),差异均有统计学意义($P < 0.01$)。治疗有效组血清ProGRP (28.50 ng/L)明显低于治疗前(420.17 ng/L),差异有统计学意义($P < 0.01$),而无效组化疗前后血清ProGRP浓度无明显变化(1 201.83 ng/L、1 022.67 ng/L),差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.5 外周血ProGRP mRNA表达水平与血清ProGRP浓度的相关性

采用直线相关的方法对外周血ProGRP mRNA的 ΔCt 值和血清ProGRP蛋白进行相关性分析,结果显示两者之间存在着直线负相关($r=-0.586$, $P < 0.001$),见图2,间接说明ProGRP mRNA表达水平与血清ProGRP呈正相关。

3 讨论

SCLC血行转移发生较早,肿瘤细胞血循环微转移是肿瘤转移复发重要起始步骤,若能早期

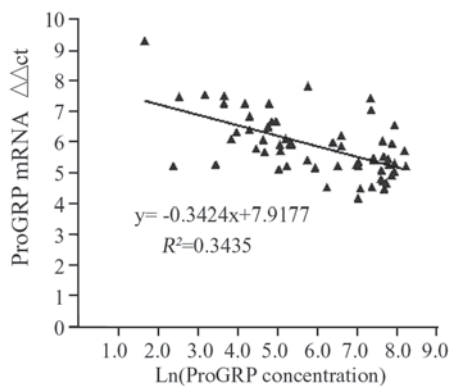


图2 外周血ProGRP mRNA表达与血清ProGRP蛋白的相关性
Figure2 The relationship between ProGRP mRNA expression and serum ProGRP

检测肿瘤转移并及时治疗,可提高治疗效果和改善患者预后。常规影像学检查方法对于微转移病灶不能提供可靠的证据,RT-PCR方法是目前检测微转移敏感度较高的方法,可在 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个外周血细胞中检测出单个肿瘤细胞。由于血液中有RNA裂解酶,游离mRNA极易被降解,因此外周血中检测到靶RNA则说明外周血中存在完整的肿瘤细胞。选择恰当的靶mRNA是决定检测结果是否可靠的重要因素,而ProGRP mRNA是SCLC微转移最常选择的靶RNA^[3]。

本研究应用实时荧光定量RT-PCR法在SCLC患者外周血中检测到ProGRP mRNA,间接提示CTCs的存在。虽然在血液中检测到肿瘤细胞并不意味着一定存在转移灶,但研究^[1,5-6]显示CTCs与肿瘤分期及转移具有明显相关性。Tanaka等^[5]研究发现肺癌患者CTC计数随着肺癌分期的增加而显著增加,IV期患者CTC计数显著高于I~III期患者,有远处转移的患者CTC计数显著高于无转移的患者。Hou等^[6]研究同样表明,CTCs的存在与肿瘤分期存在明显的相关性,ED期患者计数明显高于LD期。本研究结果与文献报道结果一致,提示肿瘤分期越晚,侵袭性越强,释放到外周血中的CTCs越多,发生血行转移的可能性就越大。另外,本研究发现外周血ProGRP mRNA水平与血清ProGRP呈正相关,提示肿瘤负荷增加,释放到外周血的肿瘤细胞及标志物水平同步升高,因而,尽管血清ProGRP浓度高低只能提供肿瘤原发灶的信息,而不能反应肿瘤转移及循环肿瘤细胞的情况,但本研究显示ProGRP对SCLC的早期诊断、监测病情、评估疗效和判定预后的价值与文献^[7-8]报道结果一致。

化疗是SCLC首选的治疗方法,监测化疗过程中外周血CTC的动态变化,可反映肿瘤对化疗药物敏感度,是目前评估化疗敏感度的重要方法。目前众多研究^[1-2,9-10]提示动态监测CTCs水平变化有助于早期评估患者化疗疗效,对患者生存期有较

好的预测作用。本研究结果显示,化疗前后患者ProGRP mRNA水平变化与疗效相关,化疗有效时水平下降,无效或进展时不变或升高,化疗前后患者ProGRP mRNA水平变化与化疗后影像学的应答存在明显相关性,可作为预测肿瘤患者化疗效果的指标。因此,定期检测并监测ProGRP mRNA的变化,可及时判断治疗效果,早发现疾病进展,为个体化治疗方案选择提供依据。但治疗前或治疗后CTCs水平较高的患者,延长治疗时间是否有意义,值得进一步研究。血清ProGRP水平检测,无论是治疗前水平对病情的评估,还是治疗前后的水平变化与疗效的关系,均与ProGRP mRNA的结果一致,该指标检测简便易行,是否能作为CTCs检测的间接指标,需要大样本的临床观察证实。本组病例数偏少,随访时间尚短,关于ProGRP mRNA作为CTCs的标志对SCLC患者疗效评价和预后预测的价值尚需大规模、多中心的随访研究进行验证。

参考文献:

- [1] Naito T, Tanaka F, Ono A, *et al.* Prognostic impact of circulating tumor cells in patients with small cell lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2012,7(3):512-9.
- [2] Hiltermann TJ, Pore MM, van den Berg A, *et al.* Circulating tumor cells in small-cell lung cancer: a predictive and prognostic factor[J].*Ann Oncol*, 2012,23 (11):2937-42.
- [3] Saito T, Kobayashi M, Harada R, *et al.* Sensitive detection of small cell lung carcinoma cells by reverse transcriptase-polymerase chain reaction for prepro-gastrin- releasing peptide mRNA [J]. *Cancer*, 2003, 97(10):2504-11.
- [4] Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, *et al.* New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1) [J]. *Eur J Cancer*, 2009, 45(2): 228-47.
- [5] Tanaka F, Yoneda K, Kondo N, *et al.* Circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(22):6980-6.
- [6] Hou JM, Greystoke A, Lancashire L,*et al.* Evaluation of circulating tumor cells and serological cell death biomarkers in small cell lung cancer patients undergoing chemotherapy [J].*Am J Pathol*, 2009, 175(2):808-16.
- [7] Ono A, Naito T, Ito I, *et al.* Correlations between serial pro-gastrin-releasing peptide and neuron-specific enolase levels, and the radiological response to treatment and survival of patients with small-cell lung cancer[J].*Lung Cancer*,2012,76(3):439-44.
- [8] Yang HJ, Gu Y, Chen C, *et al.* Diagnostic value of pro-gastrin-releasing peptide for small cell lung cancer: a meta-analysis[J]. *Clin Chem Lab Med*,2011,49(6): 1039-46.
- [9] Hou JM, Krebs MG, Lancashire L,*et al.* Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(5):525-32.
- [10] Wu C, Hao H, Li L,*et al.* Preliminary investigation of the clinical significance of detecting circulating tumor cells enriched from lung cancer patients [J]. *J Thorac Oncol*, 2009, 4(1):30-6.