



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.10.023
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract4080.shtml

· 简要论著 ·

胃肠道肿瘤患者外周血 Survivin- Δ EX3 mRNA 的表达变化及其意义

张恩, 程冲, 霍斌亮, 王永恒

(陕西省人民医院 肿瘤外科, 陕西 西安 710068)

摘要

目的: 探讨胃肠道肿瘤患者外周血 Survivin 剪接变体 Δ EX3 mRNA 的表达对该病的发生及发展和预后的价值。

方法: 选 52 例胃肠道肿瘤患者为观察组, 35 例健康体检人员为对照组。采用 PCR 技术对其外周血 Survivin- Δ EX3 mRNA 表达进行检测。

结果: 观察组外周血组织中 Survivin- Δ EX3 mRNA 相对表达量明显高于对照组 [(0.51 ± 0.289) vs. (0.003 ± 0.003), $P=0.000$]; 低分化者 Survivin- Δ EX3 mRNA 阳性率及 Survivin- Δ EX3 mRNA 相对表达指数均高于中高分化者 ($\chi^2=12.5759$, $P=0.0004$; $U=13.0915$, $P=0.0000$); I+II 期与 III+IV 期比较, Survivin- Δ EX3 mRNA 阳性率及 Survivin- Δ EX3 mRNA 相对表达指数后者明显比前者升高 ($\chi^2=7.0806$, $P=0.0078$; $U=13.2359$, $P=0.0000$); 淋巴结无转移者与有转移者 Survivin- Δ EX3 mRNA 阳性率及 Survivin- Δ EX3 mRNA 相对表达指数比较, 后者明显高于前者 ($\chi^2=8.7970$, $P=0.0030$; $U=13.6479$, $P=0.0000$)

结论: Survivin- Δ EX3 mRNA 阳性表达与胃肠道肿瘤具有关; 其表达的高低在分化程度、临床病理分期和淋巴结转移方面均有意义。 [中国普通外科杂志, 2014, 23(10):1423-1426]

关键词

胃肿瘤; 肠肿瘤; Survivin- Δ EX3mRNA; PCR

中图分类号: R735.2

胃肠道肿瘤是临床上常见的恶性肿瘤^[1], 肿瘤的浸润和转移是造成肿瘤患者死亡的主要因素^[2]。有研究显示 Survivin 在肿瘤的发展过程中发挥重要作用, 本研究主要以 2009 年 11 月—2013 年 11 月 52 例胃肠道肿瘤患者和 35 例健康体检人员为研究对象, 分析了胃肠道肿瘤患者外周血 Survivin 剪接变体 Δ EX3 mRNA 的表达在胃肠道诊疗中的作用。

1 材料与方法

1.1 一般资料

2009 年 11 月—2013 年 11 月胃肠道肿瘤

患者 52 例为观察组: 男 31 例, 女 21 例; 年龄 32.1~65.6 岁, 平均年龄 (52 ± 7.9) 岁; 其中胃癌 27 例, 结直肠癌患者 25 例; 低分化 27 例, 中高分为 25 例; 根据 WHO2004 临床病理分期包括 I+II 期 18 例和 III+IV 期 34 例; 淋巴结无转移 20 例, 有转移 32 例。随访时间为 (9~24) 个月, 平均随访时间为 (12 ± 2.3) 个月。入选标准^[3]: (1) 符合胃肠道肿瘤的诊断标准; (2) 无心、肝、肾等其他器脏疾病; (3) 无意识障碍或失语症的患者; (4) 同意接受本次试验并签署自愿同意书的患者。排除标准^[4]: (1) 不符合胃肠道肿瘤的临床诊断标准; (2) 合并有心、肝、肾等重要器脏疾病; (3) 排除孕妇和哺乳期妇女; (4) 不接受本次试验的患者。对照组 35 例健康体检人员为对照组, 其包括男 22 例, 女 13 例; 年龄 32.2~65.8 岁, 平均年龄 (52 ± 8.5) 岁。取两组人员外周血 10 mL 均分 5 管内待检测。

收稿日期: 2014-02-11; 修订日期: 2014-09-09。

作者简介: 张恩, 陕西省人民医院副主任医师, 主要从事消化道肿瘤及乳腺、甲状腺肿瘤诊疗方面的研究。

通信作者: 张恩, Email: zhangen_sx@163.com

1.2 诊断标准

所有患者均符合1999年世界卫生组织规定的胃肠道肿瘤临床诊断标准。

1.3 方法

总RNA的提取：通过红细胞裂解液对样本红细胞进行裂解，收集外周血单个核细胞。根据Trizol试剂盒说明书对全血总RNA进行提取。同时测定RNA A_{280} 和 A_{260} 的值，计算出RNA的产物纯度和浓度。

合成cDNA：采用来自TaKaRa大连宝生物的逆转录反应试剂盒，严格按照试剂盒说明书进行逆转录反应。反应体系：5 μ L，5 \times PrimeScript™ Buffer 3 μ L，浓度为50 μ mol/L的Oligo dT Primer 0.5 μ L，PrimeScript™ RT Enzyme Mix 1.0 μ L，浓度为100 μ mol/L的Random 6 mers (100 μ mol/L) 2 μ L，将RNA酶去除加水至10 μ L。混合均匀后放置在温度为36 $^{\circ}$ C的恒温箱中进行逆转录反应，持续反应15 min后，改为95 $^{\circ}$ C使反应中止。

PCR技术对其外周血Survivin- Δ EX3 mRNA表达进行检测：选择TaKaRa大连宝生物生产的PCR检测试剂盒。Survivin探针：5'-AGC-CAGATGACGACCCCATAGAGGAACAT-3'；Survivin上游：5'-CAACCGGACGAATGCTTTT-3'；下游：5'-CGAGGCTGGCTTCATCCA-3'； Δ EX3探针：5'-AGAAAGTGCGCCGTGCCATCGA-3'；上游：5'-AGGCCTCAATCCATGGCAG-3'，下游5'-GATGACGACCCCATGCAAA-3'。反应体系10 μ L，循环参数为：90 $^{\circ}$ C 40 s 预变性，60 $^{\circ}$ C 30 s 退火，持续50个循环，在延伸阶段采集荧光信号。将所得产物在浓度为2.5%的琼脂糖凝胶电泳EB染色下观察目的基因与其相对位置的关系。

1.4 统计学处理

采用SPSS 19.0软件进行数据经统计，均数比较采用T检验，阳性率数据进行 χ^2 检验，选取检验水准 $\alpha=0.05$ 。方差齐性检验水准 $\alpha=0.05$ ，t（或t'，U）检验水准 $\alpha=0.05$ （双侧）。

2 结果

2.1 RNA凝胶电泳

对所取RNA的纯度及浓度、完整性进行鉴定表明本次所取样本均处于260 nm其吸光度值均处

于0.05~0.3； OD_{260}/OD_{280} 则介于1.7~2.0， OD_{260}/OD_{230} 均 >2.0 。凝胶电泳可见28S、18S、5S 3条色带（图1）。

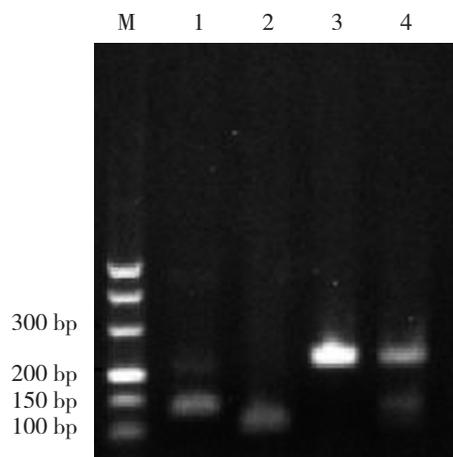


图1 1%琼脂糖凝胶电泳三色带 M: DNA marker; 1, 2: 观察组患者随机取2例患者的RNA; 3, 4: 对照组随机取2例受检者的RNA

2.2 观察组与对照组外周血中Survivin- Δ EX3 mRNA表达情况

观察组外周血组织中Survivin- Δ EX3 mRNA相对表达量明显高于对照组[(0.51 \pm 0.289) vs. (0.003 \pm 0.003), $P=0.000$]（表1）。

表1 观察组与对照组外周血中Survivin- Δ EX3 mRNA表达情况比较

组别	n	Survivin- Δ EX3 mRNA	t	P
观察组	52	0.51 \pm 0.289	12.6488	0.0000
对照组	35	0.003 \pm 0.003		

2.3 胃肠道肿瘤患者外周血中Survivin- Δ EX3 mRNA表达情况

低分化患者27例，中高分为25例；低分化者Survivin- Δ EX3 mRNA阳性率及Survivin- Δ EX3 mRNA相对表达指数均高于中高分化者($\chi^2=12.5759$, $P=0.0004$; $U=13.0915$, $P=0.0000$)；I+II期与III+IV期比较，Survivin- Δ EX3 mRNA阳性率及Survivin- Δ EX3 mRNA相对表达指数后者明显比前者升高($\chi^2=7.0806$, $P=0.0078$; $U=13.2359$, $P=0.0000$)；淋巴结无转移者与有转移者Survivin- Δ EX3 mRNA阳性率及Survivin- Δ EX3 mRNA相对表达指数比较，后者明显高于前者($\chi^2=8.7970$, $P=0.0030$; $U=13.6479$, $P=0.0000$)（表2）。

表 2 Survivin- Δ EX3mRNA 表达阳性率与临床病理参数比较

组别	n	Survivin- Δ EX3 mRNA 阳性率 [n (%)]	χ^2	P	Survivin- Δ EX3 mRNA 相对表达指数	U	P
分化程度							
中高度分化	25	12 (48.00)	12.5759	0.0004	0.228 \pm 0.042	13.0915	0.0000
低分化	27	25 (92.59)			0.356 \pm 0.026		
临床病理分期							
I+II	18	10 (55.56)	7.0806	0.0078	0.278 \pm 0.025	13.2359	0.0000
III+IV	34	30 (88.24)			0.366 \pm 0.016		
淋巴结转移							
有	32	29 (87.50)	8.7970	0.0030	0.376 \pm 0.023	13.6479	0.0000
无	20	10 (50.00)			0.288 \pm 0.022		

3 讨 论

胃肠道肿瘤目前已经成为威胁人类生命健康的主要肿瘤疾病之一,该病发病机制复杂,通常是环境、遗传、病毒、自身免疫等多种因素综合作用的结果,具有一定的治疗难度^[5]。因此,对该病的早期诊断和治疗显得尤为重要。近年来,国内外大量研究表明,造成胃肠道肿瘤患者死亡的重要因素是肿瘤细胞发生远处转移所致^[6]。随着 PCR 技术的不断发展和普及,通过 PCR 技术对患者外周血中特异性基因表达水平的检测已经成为临床上诊断异位肿瘤是否存在的主要手段。

Survivin 基因处于 EPR-1 基因的对侧反义链上,含有 3 个内含子和 4 个外显子,其有 15kb 跨度^[7]。由于 Survivin 基因是选择性剪接,转录过程中会产生多个 mRNA,目前,临床上已经发现的 mRNA 包括 Survivin- Δ EX3 mRNA、Survivin-2B、Survivin 以及 Survivin-2a。其中, Survivin- Δ EX3 mRNA 在选择剪切时剪切掉外显子 3,同时改变外显子 4 区域的编码顺序,从而使密码子中止并转移至 3' 端非翻译区,重新编码出 130 个新的氨基酸。相关文献^[8]表明, Survivin- Δ EX3 mRNA 在恶性肿瘤中具有高表达,而 Survivin-2B 则高表达于良性肿瘤。研究发现, Survivin- Δ EX3 mRNA 在胃肠道肿瘤外周血患者的阳性表达率和肿瘤大小、位置、患者的年龄性别等没有直接关系,和肿瘤的分化程度、临床病理分期以及淋巴结转移具有不同程度的联系,这表明, Survivin- Δ EX3 mRNA 在癌变组织中发挥了重要作用。实际上, Survivin- Δ EX3 mRNA 在表达过程中虽然没有掉外显子 3,但其抗凋亡活性依然存在。相关表达试验^[9]证实, Survivin- Δ EX3 mRNA 和正常 Survivin 可以形成异源复合物,同时与线粒体共同作用,较好地发挥抗凋亡功能。另外,在肿瘤组织

中促凋亡剪接变体的表达和抗凋亡剪接变体的表达水平不平衡,这也是导致胃肠道肿瘤发生的重要机制之一。唐余燕等^[10]对 40 例胃肠道肿瘤患者和 20 例健康外周血进行检查,结果发现,有 36 例胃肠道肿瘤患者外周血 Survivin- mRNA 出现阳性表达,而在 20 例健康患者中则只有 1 例有 Survivin- mRNA 阳性表达情况,这一结果提示, Survivin- mRNA 的阳性表达与胃肠道肿瘤的发生发展具有直接关系。

本研究通过采用 PCR 技术对其对 52 例胃肠道肿瘤患者和 35 例健康体检人外周血 Survivin- Δ EX3 mRNA 表达进行检测,结果显示,肿瘤患者 Survivin- Δ EX3mRNA 的表达明显高于正常人, Survivin- Δ EX3mRNA 于胃肠道肿瘤患者外周血中所表达情况为: Survivin- Δ EX3 mRNA 阳性率和 Survivin- Δ EX3 mRNA 相对表达指数为低分化者高于中高分化者; I+II 期与 III+IV 期 Survivin- Δ EX3 mRNA 阳性率及 Survivin- Δ EX3 mRNA 相对表达指数比较,后者高于前者;无淋巴结转移者与有淋巴结转移者 Survivin- Δ EX3 mRNA 阳性率和 Survivin- Δ EX3 mRNA 相对表达指数比较,有转移者明显升高。在分化程度、临床病理分期和淋巴结转移方面均有不同程度的高表达这一结果与相关文献报道的数据相吻合。

综上所述, Survivin- Δ EX3 mRNA 阳性表达与胃肠道肿瘤具有一定相关性,其高表达在分化程度、临床病理分期和淋巴结转移方面具有一定的诊断意义,在胃肠道的临床诊断中,应当重视对 Survivin- Δ EX3 mRNA 表达水平的检测,以提高胃肠道肿瘤的诊断率,提高临床治愈率。

参考文献

- [1] Esh AM, Atfy M, Azizi NA, et al. Prognostic significance of survivin in pediatric acute lymphoblastic leukemia[J]. Indian J Hematol Blood



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.10.024
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract4081.shtml

· 简要论著 ·

凋亡抑制蛋白因子 Livin 在结肠癌中表达的研究

蒋晖

(江苏省无锡市第四人民医院 普通外科, 江苏 无锡 214011)

摘要

目的: 探讨凋亡抑制蛋白因子 Livin 在结肠癌组织中的表达及其与结肠癌发生发展的各临床病理因素之间的关系。

方法: 收集 2008 年 10 月—2012 年 4 月经手术切除且病理证实的 95 例结肠癌患者临床资料, 记录患者性别、年龄、分化程度、浸润程度、淋巴结转移情况及 TNM 分期等各项临床相关资料。应用免疫组化方法检测 Livin 在 95 例结肠癌患者肠组织中的表达情况。

结果: Livin 在结肠癌中表达阳性率 46.32% (44/95), 明显高于对照组的 12.82% (5/39); Livin 基因表达与患者性别、年龄、肿瘤病灶大小、是否有远处转移均无关 ($P>0.05$); 与是否有淋巴结转移、TNM 分期、分化程度及浸润深度有关 ($P<0.05$)。

结论: 检测 Livin 在结肠癌组织中的表达对结肠癌的临床诊断、病情评估、治疗及预后可提供重要指导。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(10):1426-1428]

关键词

结肠肿瘤 / 病理学; Livin; 免疫组织化学

中图分类号: R735.3

结肠癌是指结肠黏膜上皮在环境或遗传等多种致癌因素作用下发生的恶性病变, 是人类最常见

的恶性肿瘤之一, 以 40~50 岁年龄组发病率最高, 全球每年新发病例约 800 万人, 占有恶性肿瘤的 10%~15%^[1]。近年来, 随着医疗水平的提高, 结肠癌的早期诊断率和治愈率均有了明显的提高。但在很多情况下, 早期结肠癌及其分型仍较难明确, 须依靠临床、影像和病理多种手段的结合明确诊断。特异性肿瘤标志物的检测也日益成为一种

收稿日期: 2013-12-24; 修订日期: 2014-08-10。

作者简介: 蒋晖, 江苏省无锡市第四人民医院副主任医师, 主要从事普通外科方面的研究。

通信作者: 蒋晖, Email: 17899866@qq.com

Transfus, 2011, 27(1):18-25.

- [2] 左文革, 李瑜元, 聂玉强, 等. Survivin 基因及其主要剪接变构体 mRNA 在大肠癌组织中的表达 [J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(7):852-856.
- [3] 黄少军, 陶建蜀, 程正江. Survivin 及其剪接变体 Δ Ex3 在胃肠道肿瘤患者外周血中的表达 [J]. 广东医学, 2011, 32(7):859-862.
- [4] Church DN, Talbot DC. Survivin in solid tumors: rationale for development of inhibitors[J]. Curr Oncol Rep, 2012, 14(2):120-128.
- [5] 杨黎, 姬少绯, 朱振宇, 等. 肝细胞癌中 Survivin mRNA 和 Survivin- Δ Ex3 mRNA 的表达及临床意义 [J]. 肿瘤防治研究, 2013, 40(12):1147-1150.
- [6] 张超, 冯其柱, 姚磊, 等. GRIM-19 在肝细胞癌和肝硬化中的表达 [J]. 安徽医科大学学报, 2011, 46(8):747-749.
- [7] Guo LD, Chen XJ, Hu YH, et al. Curcumin inhibits proliferation and induces apoptosis of human colorectal cancer cells by activating the mitochondria apoptotic pathway[J]. Phytother Res, 2013, 27(3):422-430.
- [8] 张海元, 熊维, 任松森. 肝细胞癌中 Runx3 基因表达状态分析及预后评估价值的研究 [J]. 长江大学学报 (自科版) 医学卷,

2010, 7(3):15-17.

- [9] 潘庆春, 余永胜, 汤正好, 等. 慢性丙型肝炎患者血清 IL-21 水平检测及临床意义 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2013, 18(2):190-194.
- [10] 唐余燕, 陈小华, 余永胜. 分子伴侣 Tapasin 在介导特异性细胞毒性 T 淋巴细胞反应中的作用 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2013, 18(2):212-216.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 张恩, 程冲, 霍斌亮, 等. 胃肠道肿瘤患者外周血 Survivin- Δ EX3 mRNA 的表达变化及其意义 [J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(10):1423-1426. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.10.023

Cite this article as: ZHANG E, CHENG C, HUO BL, et al. Survivin- Δ EX3 mRNA expression levels in peripheral blood of gastrointestinal tumor patients [J]. Chin J Gen Surg, 2014, 23(10):1423-1426. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.10.023