

GST- π 在喉癌及淋巴结微转移中的表达及其临床意义

李书聆, 阮 标

(昆明医科大学第一附属医院耳鼻喉科, 云南 昆明 650032)

[摘要] **目的** 探讨 GST- π 基因在喉癌组织中的表达, 探讨其相关的临床意义. **方法** 收集昆明医科大学第一附属医院 2011 年 1 月至 2014 年 7 月手术切除的喉癌标本 40 例及颈淋巴结组织 40 枚, 另取喉癌手术中的癌旁正常组织 40 例作为正常对照组. 实时定量反转录聚合酶链反应 (real-time quantitative reverse transcriptional polymerase chain reaction, real-time) (RT-PCR) 技术在喉癌及淋巴结微转移中的检测方法, 寻找具有特异性和敏感性的肿瘤标记物. 进行 HE 染色及 RT-PCR 检测 GST- π 的表达. **结果** GST- π 在喉癌组织中的表达高于对照组 ($P < 0.05$), 喉癌术中颈清扫的总的淋巴结组织的表达高于对照组 ($P < 0.05$), HE 染色阳性的颈淋巴结组织与对照组的表达均有差异 ($P < 0.05$). HE 染色阴性的颈淋巴结组织中 GST- π 的表达量与对照组无差异 ($P > 0.05$). **结论** 应用 real-time (RT-PCR) 技术检测喉鳞癌患者颈部淋巴结标本中的 GST- π 标记物可能是提高检测喉鳞癌和颈淋巴结隐匿性微转移敏感性和特异性的可行方法.

[关键词] 喉鳞癌; GST- π ; 实时定量反转录聚合酶链反应; 微转移

[中图分类号] R739.65 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 12-0093-05

Expression of GST- π and Significance in Laryngeal Carcinoma and Lymph Node Micrometastasis

LI Shu-ling, RUAN Biao

(Dept. Of ENT, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) technique in detecting laryngeal carcinoma and lymph node micrometastasis, find out highly specific and sensitive tumor marker, test GST- π gene expression in laryngeal carcinoma and explore the related clinical significance. **Methods** We collected 40 cases of resected specimens of laryngeal carcinoma and 40 cases of cervical lymph nodes, and 40 cases of normal tissues as a control group. HE staining and RT-PCR were used for detection of GST- π expression. **Results** The expression levels of GST- π were higher in laryngeal carcinoma than the control group, in lymph node tissues were higher than control group. The expression in HE staining-positive cervical lymph node was different to control group. The expression GST- π in HE staining-negative cervical lymph node tissue had no difference with the control group. **Conclusions** GST- π may be associated with the development of laryngeal carcinoma, may become one of the indicators of detection of micrometastases in cervical lymph nodes. Application of real-time (RT-PCR) for detection of GST- π marker in laryngeal squamous cell carcinoma and neck lymph node specimens may improve the sensitivity and specificity in detection of laryngeal squamous cell carcinoma micrometastasis.

[Key words] Laryngeal carcinoma; GST- π ; RT-PCR; Micrometastasis

[基金项目] 云南省教育厅科学研究基金资助项目 (2011Y179)

[作者简介] 李书聆 (1974~), 女, 云南昆明市人, 医学硕士, 副主任医师, 主要从事耳鼻咽喉头颈外科学及整形外科的科研、临床及教学工作.

[通讯作者] 阮标. E-mail: ynent@163.com

喉癌是头颈部常见的恶性肿瘤,近年来喉癌的发病率有明显的上升趋势.据统计,在2003年美国有37 000人被新诊断出患有头颈部恶性肿瘤,其中,45%是喉癌患者;其5 a生存率为56%^[1].喉癌在我国约占全身肿瘤的1%~2%,占耳鼻咽喉头颈外科肿瘤的11%~22%^[1].颈淋巴结转移常常是影响预后及手术效果的关键,对于各种临床及影像学检查无淋巴结转移的喉癌患者,是否行颈淋巴结清扫是有争议的,术前临床未发现淋巴结转移(cN0)的患者存在10%~30%淋巴结转移,术后淋巴结病理阴性(pN0)的患者,仍有5%~20%的隐匿性微转移的存在^[2].

是否有更为简便的、更为灵敏的方法可以对早期的、微小的淋巴结转移进行监测,实施更为有效地治疗方法,据此决定是否需要颈淋巴结清扫,制定手术方案,以免过度治疗或治疗不足.应用RT-PCR技术及免疫组化SP法对比普通病理学HE染色法对喉癌组织、正常组织、颈淋巴结进行检测,探寻更灵敏的检测方法.本实验将RT-PCR技术检测GST- π 对比常规HE方法用于喉癌及淋巴结微转移的研究.

1 材料与方 法

1.1 组织标本收集与保存

收集昆明医科大第一附属医院2011年1月至2014年7月收治的喉癌患者住院手术治疗的原发性喉癌患者新鲜手术切除喉癌组织、进行颈淋巴结清扫术取出的颈淋巴结及术中取的癌旁正常组织(癌旁的正常组织离癌组织5 cm以上)进行对照,所有组织取材后一部分组织进行石蜡包埋组织做切片进行HE染色,另一部分将新鲜组织标本10 min内投入液氮中快速冰冻,后置于-80℃冰箱保存,做RT-PCR法.

1.2 RNA的提取和荧光定量PCR

TRIzol购于美国Invitrogen公司,逆转录试剂盒购于Fermentas公司;荧光定量引物由Invitrogen公司合成;荧光定量试剂盒购于Fermentas公司.

1.2.1 样品总RNA的提取和测定 用TRIzol(Invitrogen)抽提组织总RNA.加入1 mL TRIzol,放置5 min;加入0.2 mL氯仿,充分震荡混匀,放置2 min;4℃,12 000 r/min离心,10 min;转移上层水相到新的1.5 mL离心管;加入等体积异丙醇,混匀后-20℃静置20 min;4℃,12 000 r/min离心10 min,弃上清;75%乙醇洗沉淀,4℃,12 000 r/min离心10 min;弃上清,风干3~5 min,30 μ L

DEPC水溶解;-80℃保存待用.

1.2.2 cDNA合成 实验方法依据RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas)试剂盒操作.

1.2.3 Real-time PCR引物设计 通过GenBank基因数据库搜索mRNA序列,用BLAST分析寻找特异性最好的一段设计引物,引物设计软件为primer 5.0,引物设计序列见表1.基因mRNA序列在GeneBank中序列号如下:GST- π : Homo sapiens glutathione S-transferase pi 1 (GSTP1), mRNA; NCBI Reference Sequence: NM_000852; β -actin(内参): Homo sapiens actin, beta (ACTB), mRNA NCBI Reference Sequence: NM_001101.

表1 SYBR荧光定量PCR引物设计

Tab. 1 The sequence of primers for SYBR real-time PCR

基因名称	引物序列(5'-3')	产物长度
人GST- π	F: CCGCACCTTGGGCTCTA R: TCCACGCCGTCATTCACC	72 bp

1.2.4 荧光定量PCR检测相对表达量 实验方法依据Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix(2 \times)(Fermentas)操作.

将引物稀释至10 μ M;设计96孔板上样顺序,每个样品做3个重复,用水为模板作阴性对照.实验在ABI Prism 7300HT(Real Time PCR扩增仪)上进行Real-time反应体系混匀液体,将96孔板膜覆盖在板上;Real-time反应两步法PCR扩增.

衡量结果的参数主要是观察溶解曲线和扩增曲线,用软件DataAssisTM v3.0 Software(ABI)以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法表示基因在组织中的相对表达量.

1.3 统计学处理

每个实验组及对照组的GST- π 检测结果为每组的平均值,表达为($\bar{x} \pm s$)标准差;数据采用非配对Student test和方差分析(ANOVA)进行检验.实时逆转录荧光定量PCR的结果则表达为平均值(ΔC_t),并采用Mann-Whitney nonparametric U test进行检验.以上检验都采用GraphPad Prism, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 病例的基本情况

共收集40名患者样本,基本情况为:术前病理均证实为喉鳞状细胞癌;均为男性;年龄40~

70 岁, 平均 55.7 岁; 均有吸烟史; 饮酒 19 例占 47.5%; 分化程度为: 低分化 2 例, 中分化 5 例, 高、中分化 18 例, 高分化 15 例; 所有患者术前均未进行放、化疗及其他相关治疗.

2.2 RNA 抽提结果

用 Nanodrop 2000 核酸微量检测仪测定 RNA 浓度; 并在 1% 琼脂糖凝胶上检测 RNA. 检测结果如下: 所有 RNA 样本经变性凝胶电泳检测可见清晰的条带, 说明 RNA 提取成功. 本实验成功提取人组织总 RNA, 并逆转录为 cDNA; 经过 PCR 条件的摸索, 使用 SYBR Real-time PCR 法成功完成了 GST- π 基因转录水平检测, 基因检测结果溶解曲线为单峰, 扩增曲线呈 S 型对数增长, 结果真实可信.

2.3 荧光定量 PCR 结果

在 96 孔 PCR 板上顺序上样, 每基因每样品做 3 个复孔, 只要有扩增, 染料就可以镶嵌在双链中发出荧光. 从溶解曲线结果中笔者可以看到 (图 1), 曲线只有单一的特征峰, 没有其他明显的小峰出现, 说明该 PCR 反应退火温度适合, 引物浓度和模板浓度适中, 引物设计比较合理, 扩增出的 PCR 产物比较单一, Realtime 荧光数据可以真实的反应待检测基因的荧光信号, 结果可信.

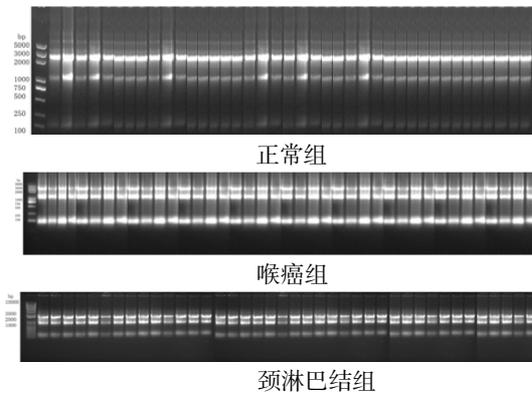


图 1 RNA 电泳检测结果
Fig. 1 RNA electrophoresis results

绿色的线显示的是荧光阈值, 当信号超过绿色线时所经历的循环数即为 Ct 值, 见图 2.

以上实验结果表明各项指标均符合相对定量分析要求, 引物特异性较好, 本次试验数据可信. 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法来对结果进行分析, 确定待测基因在实验组与对照组之间的表达差异.

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法即: 表达水平差异 = 2^X 倍, 其中, $X = (\text{实验组 Ct 待测基因} - \text{实验组 Ct 内参基因}) - (\text{对照组 Ct 待测基因} - \text{对照组 Ct 内参基因})$, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 得出的数值代表实验组待测基因的表达水平是对照组的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 倍.

为了直观的表现数据, 笔者假设对照组的数值为 1, 实验组的数值是对照组的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 倍, 柱状图数据见图 3.

本实验结果分析, 应用实时荧光定量 PCR 法检测喉癌组织、颈淋巴结组织和 HE 染色阳性的颈淋巴结组织的 GST- π 的表达均高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); HE 染色阴性的颈淋巴结组织与对照组中的 GST- π 的表达无差异 (表 1、图 4).

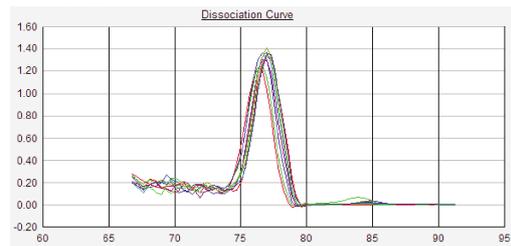


图 2 SYBR Green 扩增产物溶解曲线分析
Fig. 2 SYBR Green PCR dissolved curve analysis

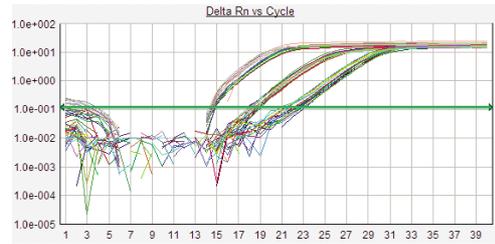


图 3 荧光定量 PCR 扩增曲线
Fig. 3 Fluorescence quantitative PCR amplification curve

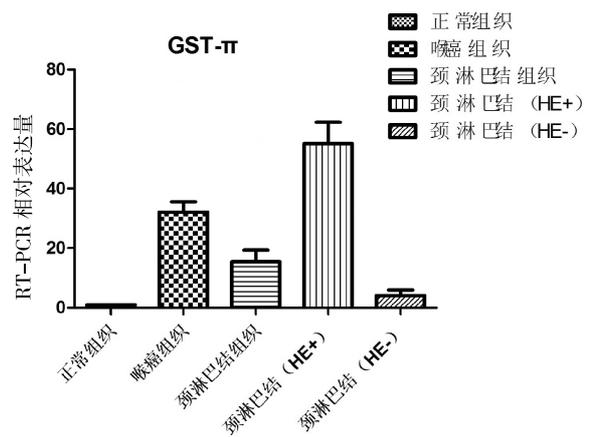


图 4 GST- π 基因 mRNA 水平相对表达量 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
Fig. 4 Expression of GST- π gene mRNA levels of PI relative ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

表 1 Realtime PCR 相对表达量 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)Tab. 1 Realtime PCR relative expression levels ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

名称	标本名称	Ave. $2^{-\Delta\Delta Ct}$
GST- π	正常组织	1.00
	喉癌组织	$23.1 \pm 0.5794^*$
	颈淋巴结组织	$12.63 \pm 3.188^*$
	颈淋巴结 (HE+)	$40.01 \pm 1.798^*$
	颈淋巴结 (HE-)	4.364 ± 1.397

与正常对照组比较, * $P < 0.05$.

3 讨论

目前喉癌治疗后的复发和转移越来越成为影响疗效的主要因素。有研究^[3]证实, 隐匿性微转移的存在是临床头颈部肿瘤复发、转移的根源和萌芽。小于 2 mm 的淋巴结转移用常规的 HE 染色不能发现^[4], 寻找更为灵敏的检测方法是本课题的研究方向。本研究以喉鳞癌患者选择性颈清扫术后标本为研究对象, 通过实时定量反转录聚合酶链反应 (real-time quantitative reverse transcriptional polymerase chain reaction, real-time qRT-PCR) 定量检测各区域淋巴结中 GST- π (谷胱甘肽 S 转移酶) 基因的表达, 检测该技术用于喉鳞癌肿瘤隐匿性微转移检测的可行性。

谷胱甘肽 S- 转移酶 (glutathione S-transferases, 简称 GST- π), 是一组具有多种生理功能的蛋白质, 具有保护、储存、结合和转运等多种生理功能, 参与机体解毒功能的超基因家族, 并参与对细胞的保护, 维持细胞的正常功能, 可分为胞浆型、胞膜型、线粒体酶和白细胞三烯合成酶 (LTC4 合成酶)^[5]。胞浆型 GST 同工酶又可分为 GST- α 、 μ 、 π 、 θ 和 σ 等, 其基因在染色体上的位置各不相同。GST- π 定位于人第 11 号染色体上, 长度约 3.0 Kb, 有 7 个外显子, 其组织特异性较强, 主要分布于胎盘、肺、肾和红细胞中, 与组织的分化有关。在许多肿瘤细胞和癌变形成过程中 GST- π 的表达会升高。许多化合物可诱导其表达, 同时受多种调控元件的影响。在肿瘤的发生、肿瘤耐药和肿瘤易感性中起重要作用^[6]。许多外源性诱导剂或损伤性刺激均可引起细胞内 GST 异常表达, 尤其是 GST- π 在人多种肿瘤组织中表达。在多种肿瘤组织中 GST- π 表达增强, 常常被认为是典型的癌前病变的标志酶, 与肿瘤的诊断、预后等密切相关^[7]。GST- π 蛋白表达变化

是基因转录水平变化的结果, 当细胞癌变处于启动阶段, 细胞形态还未发生变化时, 细胞的一些功能或代谢酶就已经开始异常表达, 此时应用一般的常规方法难以检测出, 采用灵敏的 RT-PCR 法检测个别细胞的 GST- π 的 mRNA 表达改变就可能检测出。国内外学者发现 GST- π 在胃癌^[8-9]、结肠癌^[10]、消化道肿瘤^[11]、肺癌^[12]、乳腺癌^[14]中表达异常, 发现 GST- π 阳性率明显升高。但在喉癌中的表达并不明确。本文着重研究 GST- π 喉癌中的表达情况。

本研究结果采用灵敏的 RT-PCR 法显示 GST- π 的表达在喉癌组织中的表达高于对照组, GST- π 在喉癌组织中表达异常, 说明 GST- π 有可能成为检测喉癌及的灵敏的指标之一。本实验将所有淋巴结组织总的进行 GST- π 的检测, 发现颈淋巴结组织中 GST- π 的表达高于对照组, 差异有统计学意义; 其中 HE 染色阳性的颈淋巴结组织的 GST- π 的表达高于对照组, 考虑为转移的颈淋巴结组织; 而 HE 染色阴性的颈淋巴结组织与对照组相比差异无统计学意义, 考虑为未发生转移。说明只要有淋巴结的转移就有可能用 RT-PCR 方法检测出来。

有报道用连续切片法对颈淋巴结内转移癌进行研究, 虽然可以提高了转移癌的诊断率, 但该方法工作量太大, 无法应用于常规的临床工作中^[5]。是否可以结合 RT-PCR 检测有可疑淋巴结转移时再应用连续切片的方法进行进一步检测, 一方面可以提高淋巴结微转移的准确率, 一方面可以提高工作效率, 为临床工作提供新的思路。本研究发现 GST- π 对喉癌的诊断、治疗和预后有重要意义。检测 GST- π 的表达可能用作喉癌的诊断的参考指标。本研究的样本量有限, 结论难以避免误差的产生, 仍需要大量的实验进一步进行证实。

运用 RT-PCR 技术对比目前普遍采用的 HE 染色技术对喉癌组织及淋巴结微转移的 GST- π 表达进行分析, RT-PCR 技术是较为灵敏的方法, 可以监测喉癌的颈淋巴结的微小的转移; GST- π 在喉癌的表达异常, 可能与喉癌的发生发展有关, 可能成为检测喉癌的指标之一; 对于喉癌患者, 特别是影像学检查及未能触及颈淋巴结的患者, 在手术中颈淋巴结探查时应用 RT-PCR 技术也未能检测出颈淋巴结转移的患者可能暂时不用颈淋巴结清扫及术后放疗, 可定期复查即可。本实验为提高患者生活质量及生存时间, 并对是否需要进行颈淋巴结清扫这个争议提供依据。在手术中颈淋巴结探查时能否应用 RT-PCR 技术结合传统的方法来进行

颈淋巴结的微转移的检测, 给临床实践的应用提供了参考依据。

[参考文献]

- [1] JEMAL A, SIEGEL R, XU J, et al. Cancer statistics, 2010 [J]. *CA Cancer Clin*, 2011, 60(5):277 - 300.
- [2] SHORESC G, YINX Y, FUNKHOUSER W, et al. Clinic al-evaluation of a new molecular method for detection of micrometastases in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2004, 130(8): 937 - 942.
- [3] SOIKKELI J, LUKKM, NUMMELA P, et al. Systematic search for the best gene expression markers for melanoma micrometastasis detection [J]. *J Pathol*, 2007, 213(2): 180 - 189.
- [4] FERLITO A, DEVANEY K O, RINALDO A, et al. Micrometastases : have they an impact on prognosis? *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1999, 108:1 185.
- [5] HAMAKAWA H, FUKUZUMIM, BAO Y, et al. Keratinm RNA for detecting micrometastasis in cervical lymph nodesoforal cancer [J]. *Cancer Letters*, 2000, 160(1): 115 - 123.
- [6] DANIEL V. Glutathione Stransferases: gene structure and r-regulation Expression [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1993, 28(3):173 - 270.
- [7] CLARK G M, MATHIEU M C, OWENS M A, et al. Prognostic significance of Sphase fraction in good-risk, node-negative breast cancer patients [J]. *J Clin Oncol*, 1992, 10(3):428 - 432.
- [8] KANG M S, KIM H S, HAN J A, et al. Characteristics of human gastric carcinoma cell lines with induced multidrug resistance[J]. *Anticancer Res*, 1997, 17(5A):3 531.
- [9] 刘连新, 姜洪池, 朱安龙, 等. GST- π 和P-gp蛋白在胃癌中的表达中国肿瘤临床与康复[J], 2000, 7(6):23 - 24.
- [10] KANG M S, KIM H S, HAN J A, et al. Charactreristics of human gastric carcinoma cell lines with induced multidrug resistance [J]. *Anticancer Res*, 1997, 17(5A):3 531.
- [11] 沈金辉, 王少洪, 曾绍文, 等. GST- π 在结肠癌组织中的表达及意义[J]. *四川肿瘤防治*, 2002, 15(2):68 - 70.
- [12] 李春海. 谷胱甘肽S-转移酶基因家族在癌变中的应用. 肿瘤分子生物学研究进展[M]. 北京:军事医学科学出版社, 1996:103.
- [13] 薛亚梅, 周清. 谷胱甘肽S转移酶 π 在人肺癌组织的表达[J]. *重庆医科大学学报*, 1997, 22(2):127 - 129.
- [14] MC GUIRE W L, CLARK G M. Prognostic factors and treatment decisions in axillary-node-negative breast cancer [J]. *N En-gl J Med*, 1992, 326(26):1 756 - 1 761.
- [15] HAMAKAWA H, TAKEMURA K, SUMIDA T, et al. Histological study on Pn upgrading of oral cancer [J]. *Virchows Arch*, 2000, 437:116.

(2014 - 09 - 05 收稿)