

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.07.011
文章编号: 1005-8982 (2018) 07-0055-06

Survivin mRNA 和 CK19 mRNA 在胃癌患者外周血中的表达及临床意义

陈国飞¹, 杨华², 蒋幸新¹, 王波³, 徐艳¹

(1. 江苏省苏州市中西医结合医院 检验科, 江苏 苏州 215000; 2. 江苏省苏州市中西医结合医院 内四科, 江苏 苏州 215000; 3. 江苏省苏州市吴中人民医院 内科, 江苏 苏州 215128)

摘要: 目的 探讨 Survivin mRNA 和 CK19 mRNA 在胃癌患者外周血中的表达及其在胃癌诊断及预后方面的价值。**方法** 利用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 89 例胃癌患者及健康对照外周血中 Survivin mRNA 和 CK19 mRNA 的表达情况, 并利用统计学方法分析血清 Survivin mRNA 和 CK19 mRNA 在胃癌中的诊断和预后价值。**结果** RT-PCR 结果发现胃癌患者外周血中 Survivin mRNA 和 CK19 mRNA 的表达均高于健康对照组; ROC 曲线显示外周血中 Survivin mRNA 和 CK19 mRNA 为胃癌有效诊断分子靶点; χ^2 检验显示外周血中 Survivin mRNA 和 CK19 mRNA 与胃癌患者的 TNM 分期呈正相关; Kaplan-Meier 生存曲线显示 Survivin 和 CK19 双阳性组的胃癌患者术后 5 年生存率低于其他各组。**结论** 胃癌患者外周血中 Survivin mRNA 和 CK19 mRNA 表达水平增高, 是胃癌早期诊断和判断预后的潜在分子指标。

关键词: Survivin; CK19; 诊断; 预后; 胃癌

中图分类号: R 735.2

文献标识码: A

Expressions of Survivin mRNA and CK19 mRNA in peripheral blood of patients with gastric cancer and clinical significance

Guo-fei Chen¹, Hua Yang², Xing-xin Jiang¹, Bo Wang³, Yan Xu¹

(1. Clinical Laboratory, 2. The Fourth Department of Medicine, Suzhou Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Suzhou, Jiangsu 215000, China; 3. Department of Medicine, Suzhou Wuzhong People's Hospital, Suzhou, Jiangsu 215128, China)

Abstract: Objective To explore the expressions of Survivin mRNA and CK19 mRNA in the peripheral blood of the patients with gastric cancer and their clinical significance. **Methods** Expressions of Survivin mRNA and CK19 mRNA in peripheral blood were analyzed by RT-PCR in 89 patients with gastric cancer. Statistical analysis was conducted to analyze the diagnostic and prognostic value of Survivin mRNA and CK19 mRNA in the peripheral blood of the patients with gastric cancer. **Results** RT-PCR revealed that the Survivin mRNA and CK19 mRNA were both significantly higher in the peripheral blood of the patients with gastric cancer than in the normal controls. ROC curves revealed that both Survivin mRNA and CK19 mRNA were promising diagnostic biomarkers for gastric cancer. Chi-square test revealed that both Survivin mRNA and CK19 mRNA expressions were positively associated with TNM stage of the patients with gastric cancer. Kaplan-Meier curves revealed that the patients with gastric cancer which were both Survivin-positive and CK19-positive had the lowest 5-year survival rate after surgery, which was statistically significant. **Conclusions** Survivin mRNA and CK19 mRNA are upregulated in the peripheral blood of

the patients with gastric cancer. They are promising biomarkers for early diagnosis and prognostic prediction of the patients with gastric cancer.

Keywords: Survivin; CK19; diagnosis; prognosis; gastric cancer

胃癌是世界上最为普遍的恶性肿瘤之一,在全球范围内,每年约有 70 万人死于胃癌,位居所有肿瘤的第 2 位^[1]。在我国胃癌发病率远高于西方国家,是我国发病率第 2 高的恶性肿瘤,死亡率也高居第 3 位^[2-3]。胃癌患者预后较差,大部分患者初次就诊时肿瘤已处于晚期或发生转移^[3]。因此,胃癌的 5 年生存率仅为 40% 左右,其中大约 5% 的胃癌患者发生远处器官转移^[4-6]。近年来,随着诊治水平的提高,胃癌的发病率在全球范围内逐步下降,但如何提高胃癌的早期诊断率及改善胃癌患者的术后生活质量仍是全球性的科研难点和热点。

Survivin 是近年来发现的凋亡蛋白抑制分子,在多种恶性肿瘤中广泛表达,与肿瘤的恶性表型及不良预后密切相关^[7-8]。CK19 片段 CYFRA 21-1 也被证实是乳腺癌^[9]、非小细胞肺癌^[10-11]和结肠癌^[11]等多种肿瘤的血清诊断标志物。但胃癌患者外周血中 Survivin mRNA 和 CK19 mRNA 的诊断和预后价值目前尚未得到充分研究。本研究拟通过 RT-PCR 检测胃癌患者外周血中 Survivin mRNA 和 CK19 mRNA 的表达水平,并联合分析 Survivin mRNA 和 CK19 mRNA 在胃癌早期诊断和判断预后中的临床意义,为胃癌早期诊断和个体化治疗寻找有效分子指标以及奠定理论基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 研究对象 2007 年 5 月-2010 年 12 月于苏州市中西医结合医院就诊的胃癌患者 89 例以及同期健康对照 89 例,所有入选患者的临床病理资料完整。病例纳入标准如下:①经病理组织学确诊为胃癌,且均为初诊初治患者;②入组患者术前均未接受放、化疗及生物治疗;③入组患者肝肾功能未见明显异常;④未合并其他肿瘤或严重内科疾病。入组患者术前空腹采血 5 ml,枸橼酸钠抗凝去酶的采血管中保存。经本院伦理委员会批准,所有入选本课题的胃癌患者均同意使用其外周血标本用于科学研究并签署知情同意书。

1.1.2 实验试剂和仪器 Survivin 和 CK19 引物由上海吉玛科技有限公司合成,血液总 RNA 试剂盒购

自北京天根科技有限公司, RNA 逆转录试剂盒购自 TaKaRa 公司, SYBR Premix 试剂盒购自 TaKaRa 公司;主要仪器如下:美国 Bio-Rad CFX96 荧光定量 PCR 仪, Thermo 公司 -80℃ 冰箱, 海尔公司 -20℃ 冰箱, 德国 Eppendorf 公司台式低温高速离心机。

1.2 外周血 Survivin mRNA 和 CK19 mRNA 的提取及逆转录

外周血总 RNA 提取方法参照北京天根科技有限公司的血液总 RNA 提取试剂盒所述步骤。紫外分光仪检测 RNA 浓度及纯度。逆转录步骤参照 TaKaRa 逆转录试剂盒所述步骤,每个逆转录体系中含有 10 ng 的 RNA 模板。逆转录条件为:30℃ 10 min, 42℃ 50 min, 95℃ 5 min, 反应产物储存于 -20℃ 冰箱备用。

逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)条件为:95℃ 5 min, 94℃ 30 s, 72℃ 60 s, 循环 40 次,最后 72℃ 5 min, Survivin mRNA 复性温度 62℃ 30 s, CK19 mRNA 复性温度 63℃ 30 s。采用相对定量法计算外周血中 Survivin mRNA 和 CK19 mRNA 的相对表达量(F), $F=2^{-\Delta Ct}$, $\Delta Ct=Ct_{miR-17-5p}-Ct_{U6}$, Ct 为每个反应管荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行数据分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验,采用 Spearman 相关分析,外周血 Survivin mRNA 和 CK19 mRNA 在胃癌患者中的诊断价值采用 ROC 曲线,采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,各组间生存差异比较采用 Log-rank 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Survivin 和 CK19 在胃患者外周血中的表达

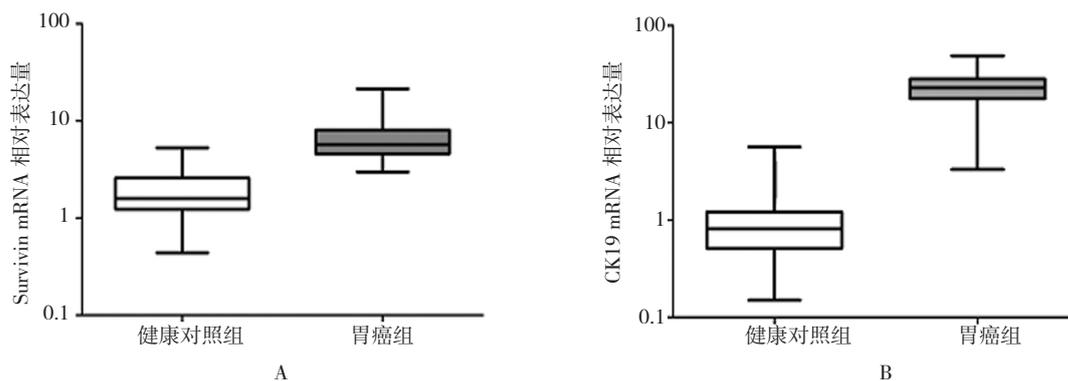
RT-PCR 结果显示,健康对照中 Survivin 的表达水平为 (1.871 ± 1.317),胃癌患者外周血中 Survivin 表达水平为 (8.131 ± 4.182),经 *t* 检验,差异有统计学意义 ($t=7.195$, $P=0.019$);健康对照中 CK19 的表达水平为 (1.018 ± 0.819),胃癌患者外周血中 CK19 表达水平为 (13.256 ± 7.518),经 *t* 检验,差异有统计学意义 ($t=12.013$, $P=0.003$)。89 例胃癌患者外周血

中 Survivin mRNA 和 CK19 mRNA 的表达水平均高于健康对照组。见图 1。

2.2 外周血 Survivin mRNA 和 CK19 mRNA 的诊断价值

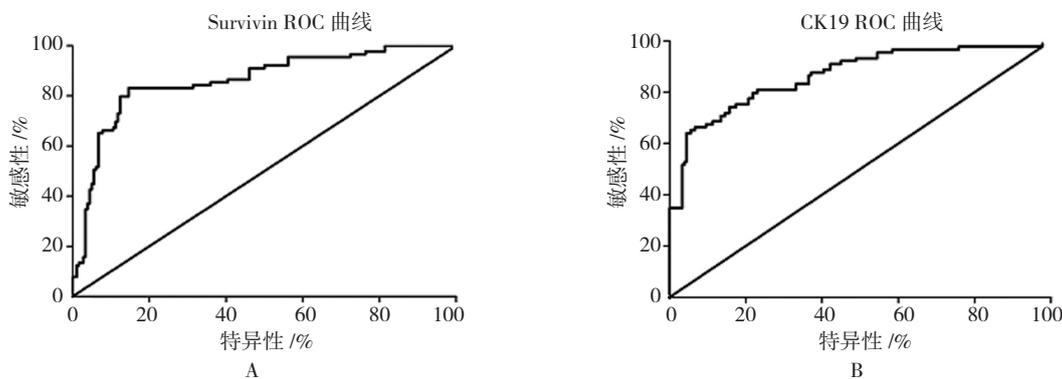
根据 89 例胃癌患者和健康对照外周血中 Survivin 和 CK19 mRNA 的表达水平分别绘制 ROC 曲线。结果显示, Survivin 的 ROC 曲线下面积为 0.8305 (95%CI: 0.784, 0.887), 敏感性为 78.151%, 特异性为 85.394%,

对应诊断界值为 7.875 (图 2A); CK19 的 ROC 曲线下面积为 0.8149 (95%CI: 0.761, 0.899), 敏感性为 73.157%, 特异性为 81.825%, 对应诊断界值为 8.114 (图 2B)。两者联合检测并联试验可提高敏感性至 92.136%, 串联实验可提高特异性之 97.751%, 高于任一单一指标的检测, 提示外周血中的 Survivin mRNA 和 CK19 mRNA 表达水平在胃癌患者中均具有较高的诊断价值。



A: Survivin 在胃癌患者及对照患者外周血中 mRNA 相对表达; B: CK19 在胃癌患者及对照患者外周血中 mRNA 相对表达

图 1 胃癌患者外周血中 Survivin mRNA 和 CK19 mRNA 的表达水平



A: Survivin 在胃癌中的诊断价值; B: CK19 在胃癌中的诊断价值

图 2 胃癌患者外周血中 Survivin mRNA 和 CK19 mRNA 的诊断价值

2.3 外周血 Survivin mRNA 的表达水平与胃癌患者临床病理特征的关系

χ^2 检验显示, 外周血 Survivin mRNA 的表达与胃癌患者的 TNM 分期正相关, 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 随着 TNM 分期的进展, 外周血中 Survivin mRNA 的表达水平亦逐渐升高。而外周血 Survivin 的表达与患者的年龄、性别、Lauren 分型等临床病理特征无相关。见表 1。

2.4 外周血 CK19 mRNA 的表达水平与胃癌患者临床病理特征的关系

χ^2 检验显示, 外周血 CK19 mRNA 的表达与胃癌患者的 TNM 分期正相关, 组间差异有统计学

意义 ($P < 0.05$), 随着 TNM 分期的进展, 外周血中 CK19 mRNA 的表达水平亦逐渐升高。而外周血 CK19 mRNA 的表达水平与患者的年龄、性别、Lauren 分型等临床病理特征无相关。见表 2。

2.5 外周血中 Survivin mRNA 和 CK19 mRNA 表达水平与胃癌患者术后 5 年生存率的关系

根据外周血中 Survivin mRNA 表达水平, 将胃癌患者分为 Survivin 高表达组和 Survivin 低表达组。Kaplan-Meier 生存曲线显示, Survivin 高表达组的胃癌患者的术后 5 年总体生存率低于 Survivin 低表达组 ($P < 0.05$)。而后, 根据外周血中 CK19 mRNA 表达水平, 将胃癌患者分为 CK19 高表达组和 CK19 低表达

组。Kaplan–Meier 生存曲线显示，CK19 高表达组的胃癌患者的术后 5 年总体生存率低于 CK19 低表达组 ($P < 0.05$)。最后，根据胃癌患者外周血中 Survivin mRNA 和 CK19 mRNA 的表达水平，将胃癌患者分为 Survivin+CK19+ 组、Survivin+CK19- 组、Survivin-

CK19+ 组和 Survivin-CK19- 组，利用 K-M 曲线分析 4 组胃癌患者术后 5 年生存率的差异，结果显示，Survivin+CK19+ 组胃癌患者术后 5 年生存率低于其他各组，Survivin-CK19- 组胃癌患者术后 5 年生存率高于其他各组 ($P < 0.05$)。见图 3。

表 1 外周血 Survivin mRNA 表达水平与 89 例胃癌患者临床病理因素的关系 例

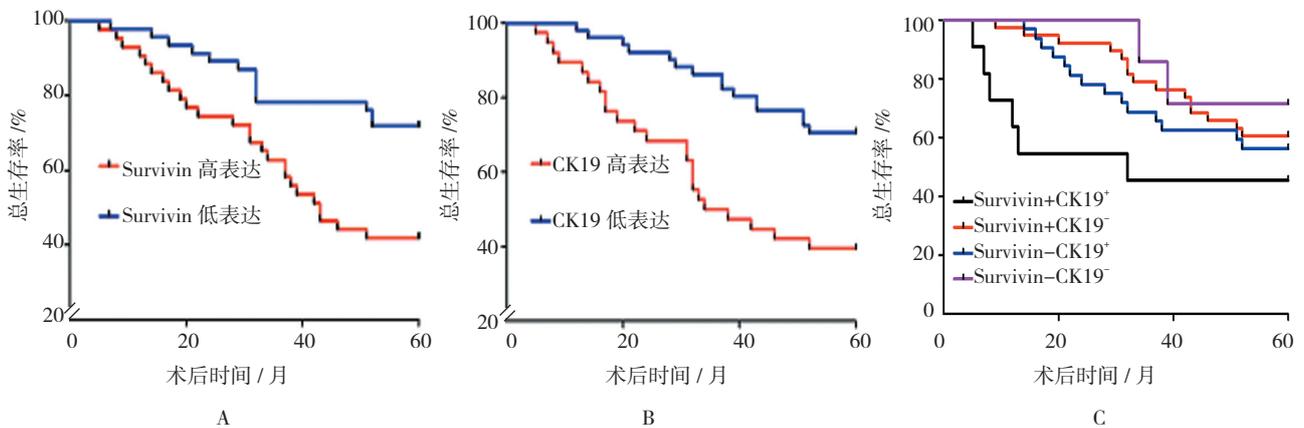
临床病理特征	例数	Survivin mRNA		r 值	P 值
		高表达	低表达		
年龄					
≤ 60 岁	40	24	16	-0.166	0.105
>60 岁	49	37	12		
性别					
男性	44	27	17	-0.051	0.210
女性	45	34	11		
TNM 分期					
I + II	39	19	20	0.417	0.023 [†]
III + IV	50	42	8		
Lauren 分型					
肠型	42	28	14	-0.038	0.206
弥漫性	47	33	14		

注：† $P < 0.05$

表 2 外周血 CK19 mRNA 表达水平与 89 例胃癌患者临床病理因素的关系 例

临床病理特征	例数	CK19 mRNA		r 值	P 值
		高表达	低表达		
年龄					
≤ 60 岁	40	28	12	0.157	0.206
>60 岁	49	33	16		
性别					
男性	44	31	13	0.118	0.219
女性	45	30	15		
TNM 分期					
I + II	39	21	18	0.519	0.021 [†]
III + IV	50	40	10		
Lauren 分型					
肠型	42	32	10	0.048	0.381
弥漫性	47	29	18		

注：† $P < 0.05$



A: Survivin 表达与患者术后 5 年生存率的关系；B CK19 表达与患者术后 5 年生存率的关系；C: Survivin 与 CK19 表达同患者术后 5 年生存率的关系

图 3 胃癌患者外周血中 Survivin mRNA 和 / 或 CK19 mRNA 表达与患者术后 5 年生存率的关系

3 讨论

循环肿瘤细胞是肿瘤转移和复发的元凶，检测肿瘤患者外周血中的循环肿瘤细胞有助于动态监测肿瘤治疗效果及预测预后。Survivin 是近年来发现的凋亡抑制蛋白，定位于 17q25 染色体，其特异性地高表达于肿瘤组织，与肿瘤发生及进展密切相关^[12]。CK19

是国内外应用最广泛的检测上皮来源肿瘤患者外周血循环肿瘤细胞表达情况的生物标志物^[12]。Survivin 和 CK19 是常用的循环肿瘤细胞的鉴定标志物。本研究利用 RT-PCR 检测了 Survivin mRNA 和 CK19 mRNA 在胃癌患者外周血的表达水平，并进一步研究了 Survivin mRNA 和 CK19 mRNA 与胃癌患者早期诊

断、临床病理特征和术后生存率之间的关系。本研究显示胃癌患者外周血中 Survivin mRNA 的表达水平高于健康对照组,提示了 Survivin mRNA 和 CK19 mRNA 在胃癌早期诊断中的潜在价值。因此,利用 ROC 曲线进一步检测 Survivin mRNA 和 CK19 mRNA 的诊断价值,结果显示 Survivin mRNA 和 CK19 mRNA 均为胃癌早期诊断的有效分子指标。更为重要的是,联合检测 Survivin mRNA 和 CK19 mRNA 在胃癌患者外周血中表达可进一步提高胃癌早期诊断的敏感性或特异性,可避免单一检测带来的假阳性和假阴性等局限性。

研究证实,胃癌患者腹腔灌洗液中 Survivin 的表达水平与胃癌患者肿瘤浸润深度、淋巴转移和 TNM 分期密切相关^[13]。而关于 CK19 与胃癌临床病理特征的关系目前尚存在争议。既往研究采用 RT-PCR 检测胃癌患者外周血中 CK19 mRNA 在胃癌中的表达及临床意义,发现 CK19 mRNA 与胃癌患者的年龄、性别和 TNM 分期等病理特征无相关^[14]。另有研究利用免疫荧光法检测 CK19 在外周血中的表达表达,研究发现外周血中 CK19 的表达与淋巴结转移、远处转移和复发密切相关,而与性别、年龄、肿瘤部位、TNM 分期和肿瘤分化程度无关。然而本研究显示 Survivin mRNA 和 CK19 mRNA 与胃癌患者的 TNM 分期呈正相关^[15]。各实验结果差异的可能原因为实验方法敏感性和特异性的差异以及不同的病例群。为了进一步明确胃癌患者外周血中 CK19 与胃癌患者临床病理特征的关系,急需进一步的大病例群前瞻性研究。

既往研究显示,外周血 CK19 mRNA 阳性的患者术后 5 年生存率低于 CK19 mRNA 阴性组^[14],且 CK19 阳性或 Survivin 阳性的循环肿瘤细胞与胃癌患者的预后密切相关,是判断胃癌患者预后和复发独立的分子指标^[16-17]。值得注意的是,也有研究报道 CK19 mRNA 的表达水平与胃癌患者预后并无相关^[18]。为了进一步明确外周血中 Survivin mRNA 和 CK19 mRNA 的表达水平与胃癌患者预后的关系,本研究进一步分析了 2 者单独和联合检测在胃癌患者预后判断中的价值。本研究结果证实 Survivin mRNA 和 / 或 CK19 mRNA 阳性的胃癌患者术后 5 年生存率低于 Survivin mRNA 和 / 或 CK19 mRNA 阴性组。更为重要的是,联合分析 2 者表达与胃癌术后 5 年生存率的关系显示, Survivin+CK19+ 组胃癌患者术后 5 年生存率低于其他各组, Survivin-CK19- 组胃癌患者术后 5 年生存率高于其他各组,提示联合检测 2 者表达水平更有助于判

断胃癌患者预后并制定个体化治疗方案。

综上所述,本研究证实了胃癌患者外周血中 Survivin mRNA 和 CK19 mRNA 表达高于健康对照组;外周血中 Survivin mRNA 和 CK19 mRNA 均为有效的胃癌早期诊断的分子指标;外周血中 Survivin mRNA 和 CK19 mRNA 的表达水平与胃癌的 TNM 分期呈正相关,而与年龄、性别、及 Lauren 分型等临床病理特征无相关; Survivin+CK19+ 组胃癌患者术后 5 年生存率低于其他各组, Survivin-CK19- 组胃癌患者术后 5 年生存率高于其他各组。本研究为胃癌发生及进展的基础研究奠定了一定的前期基础,为胃癌的早期诊断及个体化治疗提供了潜在的分子靶点。

参 考 文 献:

- [1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] LIN Y, UEDA J, KIKUCHI S, et al. Comparative epidemiology of gastric cancer between Japan and China[J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(39): 4421-4428.
- [3] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [4] DASSEN A E, LEMMENS V E, VAN DE POLL-FRANSE L V, et al. Trends in incidence, treatment and survival of gastric adenocarcinoma between 1990 and 2007: a population-based study in the Netherlands[J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(6): 1101-1110.
- [5] LAVY R, KAPIEV A, POLUKSHT N, et al. Incidence trends and mortality rates of gastric cancer in Israel[J]. *Gastric Cancer*, 2013, 16(2): 121-125.
- [6] JING J J, LIU H Y, HAO J K, et al. Gastric cancer incidence and mortality in Zhuanghe, China, between 2005 and 2010[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(11): 1262-1269.
- [7] ALTIERI D C. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer[J]. *Oncogene*, 2003, 22(53): 8581-8589.
- [8] WANG T T, QIAN X P, LIU B R. Survivin: potential role in diagnosis, prognosis and targeted therapy of gastric cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(20): 2784-2790.
- [9] NAKATA B, TAKASHIMA T, OGAWA Y, et al. Serum CYFRA 21-1 (cytokeratin-19 fragments) is a useful tumour marker for detecting disease relapse and assessing treatment efficacy in breast cancer[J]. *Br J Cancer*, 2004, 91(5): 873-878.
- [10] EDELMAN M J, HODGSON L, ROSENBLATT P Y, et al. CYFRA 21-1 as a prognostic and predictive marker in advanced non-small-cell lung cancer in a prospective trial: CALGB 150304[J]. *J Thorac Oncol*, 2012, 7(4): 649-654.
- [11] FAHMUELLER Y N, NAGEL D, HOFFMANN R T, et al. Predictive and prognostic value of circulating nucleosomes and serum biomarkers in patients with metastasized colorectal cancer

- undergoing selective internal radiation therapy[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 5.
- [12] 魏向群, 陈艳, 李瑞敏, 等. 早期宫颈癌患者术前外周血 CK19 mRNA 的检测及其临床意义 [J]. *昆明医科大学学报*, 2013, (10): 116-121.
- [13] WANG Z N, XU H M, JIANG L, et al. Expression of survivin mRNA in peritoneal lavage fluid from patients with gastric carcinoma[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2004, 117(8): 1210-1217.
- [14] TANG Z, SHENG H, ZHENG X, et al. Upregulation of circulating cytokeratin 20, urokinase plasminogen activator and C-reactive protein is associated with poor prognosis in gastric cancer[J]. *Mol Clin Oncol*, 2015, 3(6): 1213-1220.
- [15] 李嫚, 张志广, 刘霞, 等. 胃癌患者循环肿瘤细胞的检测及临床意义 [J]. *中国肿瘤临床*, 2014, (22): 1442-1445.
- [16] YEH KH, CHEN YC, YEH SH, et al. Detection of circulating cancer cells by nested reverse transcription-polymerase chain reaction of cytokeratin-19 (K19)--possible clinical significance in advanced gastric cancer[J]. *Anticancer Res*, 1998, 18 (2B): 1283-1286.
- [17] YIE S M, LOU B, YE S R, et al. Detection of survivin-expressing circulating cancer cells (CCCs) in peripheral blood of patients with gastric and colorectal cancer reveals high risks of relapse[J]. *Ann Surg Oncol*, 2008, 15(11): 3073-3082.
- [18] BERTAZZA L, MOCELLIN S, MARCHET A, et al. Survivin gene levels in the peripheral blood of patients with gastric cancer independently predict survival[J]. *J Transl Med*, 2009, 7: 111.

(张西倩 编辑)