

外周血血浆中甲胎蛋白、丙酮酸激酶M2和白蛋白mRNA检测在乙型肝炎肝硬化患者早期诊断中的价值

夏晓寒, 黄丁

■背景资料

临床研究表明, 甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)、丙酮酸激酶M2(pyruvate kinase M2, PKM2)和白蛋白(albumin, ALB)对肝癌的诊断具有重要临床应用价值。本研究主要针对AFP、PKM2与ALB mRNA在乙型肝炎肝硬化患者血浆中的表达。本研究采用实时定量PCR法对健康人群和乙型肝炎肝硬化患者血浆中的AFP mRNA、PKM2 mRNA和ALB mRNA表达进行了检测, 而与检测细胞、组织中mRNA的表达相比, 其检测无创, 灵敏度高, 快速, 简便, 并可同时检测多个样本, 具有一定的应用价值。

■同行评议者

顾国利, 副主任医师, 空军总医院普通外科

夏晓寒, 浙江省血液中心献血服务部 浙江省杭州市 310005
黄丁, 瑞安市人民医院急诊科 浙江省瑞安市 325200
夏晓寒, 主要从事利用血液检测肝硬化的工作。
作者贡献分布: 本文由夏晓寒撰写; 黄丁修改。
通讯作者: 夏晓寒, 主管护师, 310006, 浙江省杭州市武林路345号, 浙江省血液中心献血服务部, 81783465@qq.com
收稿日期: 2014-03-24 修回日期: 2014-04-15
接受日期: 2014-04-26 在线出版日期: 2014-05-08

Diagnostic value of alpha-fetoprotein, pyruvate kinase M2 and albumin mRNA expression in peripheral blood in hepatitis B virus-related cirrhosis

Xiao-Han Xia, Ding Huang

Xiao-Han Xia, Department of Blood Services, Blood Center of Zhejiang Province, Hangzhou 310005, Zhejiang Province, China

Ding Huang, Department of Emergency Medicine, Rui'an City People's Hospital, Rui'an 325200, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Xiao-Han Xia, Charge Nurse, Department of Blood Services, Blood Center of Zhejiang Province, 345 Wulin Road, Hangzhou 310005, Zhejiang Province, China. 81783465@qq.com

Received: 2014-03-24 Revised: 2014-04-15

Accepted: 2014-04-26 Published online: 2014-05-08

Abstract

AIM: To assess the diagnostic value of alpha-fetoprotein (AFP), pyruvate kinase M2 (PKM2) and albumin (ALB) mRNA expression in the peripheral blood in hepatitis B virus (HBV)-related cirrhosis.

METHODS: One hundred patients with HBV-related cirrhosis who were treated at our hospital from January 2011 to December 2013 (observation group) and 102 healthy volunteers (control group) were included in this study. Real-time quantitative PCR was used to detect the mRNA expression of AFP, PKM2 and ALB in the peripheral blood of the above subjects.

RESULTS: The expression of ALB mRNA in the

peripheral blood was significantly correlated with γ -glutamyltransferase and serum albumin. Joint detection of the mRNA expression of AFP, PKM2 and ALB in the peripheral blood had a significantly higher rate of detection of cirrhosis ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The mRNA expression of AFP, PKM2 and ALB in the peripheral blood has important diagnostic value in patients with cirrhosis.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Peripheral blood; Alpha-fetoprotein; Pyruvate kinase M2; Albumin; mRNA; Cirrhosis

Xia XH, Huang D. Diagnostic value of alpha-fetoprotein, pyruvate kinase M2 and albumin mRNA expression in peripheral blood in hepatitis B virus-related cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(13): 1876-1880
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1876.asp>
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i13.1876>

摘要

目的: 探究外周血血浆中甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)、丙酮酸激酶M2(pyruvate kinase M2, PKM2)和白蛋白(albumin, ALB) mRNA检测在乙型肝炎肝硬化患者诊断及预后中的价值分析。

方法: 选择2011-01/2013-12瑞安市人民医院收治的乙型肝炎肝硬化患者共102例作为观察组, 并选取102例体检的健康人群作为对照组, 所有受试者采用实时定量PCR方法, 对AFP、PKM2和ALB基因的检出率、表达差异和mRNA与临床相关性进行分析。

结果: 计算AFP mRNA、PKM2 mRNA和ALB mRNA的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$, 同时对AFP、PKM2及ALB的表达与临床生化指标的相关性, 得到ALB mRNA和 γ -谷氨酰基转移酶和血清白蛋白存在相关性。对所有患者经过联合检测后, 乙型

肝炎肝硬化组联合检测阳性率的最高, 较为敏感, 差异有统计学意义($P < 0.05$).

结论: 外周血AFP mRNA、PKM2 mRNA和ALB mRNA对乙型肝炎肝硬化患者的早期诊断具有一定的诊断价值, 值得临床参考.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 外周血甲胎蛋白; 丙酮酸激酶M2; 白蛋白; mRNA; 肝硬化

核心提示: 本次研究对乙型肝炎肝硬化患者中血浆的甲胎蛋白(alpha-fetoprotein)、丙酮酸激酶M2(pyruvate kinase M2) 和白蛋白(albumin) mRNA的表达, 为指导临床治疗提供参考.

夏晓寒, 黄丁. 外周血血浆中甲胎蛋白、丙酮酸激酶和白蛋白mRNA检测在乙型肝炎肝硬化患者早期诊断中的价值. 世界华人消化杂志 2014; 22(13): 1876-1880 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1876.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i13.1876>

0 引言

因乙型肝炎肝硬化而致肝癌是我国肝癌高发的一个重要原因^[1,2], 其较高致死率的主要原因是患者早期诊断特异性差, 一旦确诊, 常已为中晚期, 治疗难度增加. 肝癌患者中, 早期患者常带有肝硬化基础病变, 若在肝硬化阶段获得重要的诊断标志, 从而对患者病情进行判断, 采取正确而有效的治疗手段, 将可能抑制或延缓肝癌的发生. 本次研究对乙型肝炎肝硬化患者外周血浆中甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)、丙酮酸激酶M2(pyruvate kinase M2, PKM2)和白蛋白(albumin, ALB)mRNA的表达进行检测, 为指导临床治疗提供参考.

1 材料和方法

1.1 材料 选取2011-01/2013-12我院收治的乙型肝炎肝硬化患者102例, 男性62例, 女性40例. 年龄35-74岁(46.4岁±9.2岁), 其中不伴腹水患者61例, 伴腹水患者共41例. 另选取102例体检的健康人群作为对照组, 其中男性60例, 女性42例, 年龄34-72岁(47.2岁±9.9岁). 患者年龄、性别等一般资料无显著差异, 有可比性. 临床实验均经过院伦理委员会批准, 患者或家属自愿签署知情同意书. 采用Sigma公司生产的TRI试剂与焦炭酸二乙酯(DEPC); Ambion公司生产的糖

表 1 定时定量PCR引物和逆转录引物序列

引物名称	引物序列
ALB mRNA正向引物	5'-tggcacaatgaagtgggtaa-3'
ALB mRNA反向引物	5'-ctgagcaaaggcaatcaaca-3'
AFP mRNA正向引物	5'-tggatagcttccatattggattc-3'
AFP mRNA反向引物	5'-aagtggcttctgaacaaactgg-3'
PKM2 mRNA正向引物	5'-agtaccatgaggagaccatc-3'
PKM2 mRNA反向引物	5'-gcgttatccagcgtgatttt-3'
GAPDH正向引物	5'-tcagtggggacctgacctg-3'
GAPDH反向引物	5'-tgctgtagccaaattcgttg-3'
逆转录引物	5'-tttttttttttttttt-3'

AFP: 甲胎蛋白; PKM2: 丙酮酸激酶M2; ALB: 白蛋白.

原, NEB公司生产的Poly(A)加尾酶; Promega生产的ImProm- IITM逆转录酶; TaKaRa公司生产的SYBR ExTaq Mix定量PCR试剂. 本次采用Invitrogen公司合成的引物.

1.2 方法

1.2.1 标本准备: 外周血单个核细胞的分离: 取健康人新鲜抗凝血, 以Ficoll分离液分离PBMC, 加150 μL TRIzol Reagent(美国Gibco BRL公司). 每100 μL TRIzol加20 μL氯仿, 充分混匀, 破碎细胞, 使之释放出RNA; 以预冷无水乙醇沉淀, 最终溶于DEPC水中. 为排除可能混有的DNA污染, 加3 U DNA seRNA se-free, 于37 °C水浴1 h消化DNA. 抽提的RNA保存于-20 °C冰箱中.

1.2.2 RNA提取: 所有患者都空腹抽取静脉血约5 mL, EDTA采血管进行收集, 收集全血静置10 min, 以1500 r/min进行离心10 min, 之后放入无RNase的Ep管, 在-80 °C进行保存. 对血浆总RNA按照TRI试剂说明书进行提取.

1.2.3 逆转录: 将800 μL血浆分为4份, 分别加入于无RNase的离心管中, 同时每个离心管中加入TRI试剂提取液1 mL, 而在加入等量的异丙醇同时加入2 μL(5 mg/mL)的糖原使其助沉; 利用DEPC对水溶解的沉淀样品进行处理, 加入2 μL(1 μg/μL) mRNA 逆转录引物oligo dT, 使用ImProm- IITM逆转录酶使其逆转录成cDNA.

1.2.4 PCR扩增: PCR 反应体系组成如下: 三蒸水36.5 μL, 10×PCR 缓冲液5 μL, 10 mmol/L dNTP μL, 正义引物和反义引物各适量, 逆转录形成的cDNA 5 μL, TaqDNA聚合酶0.5 μL, 混匀. 加热至94 °C 5 min后, 完成30个如下循环: 94 °C 45 s, 65 °C 1 min; 再进行 15个下列循环: 94 °C 45 s, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min, 再置72 °C 10 min, 然后

■ 研发前沿

因乙型肝炎肝硬化而致肝癌是我国肝癌高发的一个重要原因, 其较高致死率的主要原因是患者早期诊断特异性差, 一旦经诊断患有肝癌时, 常已为中晚期, 治疗难度增加.

■ 相关报道

循环RNA作为一个崭新的研究领域,虽处于探索时期,但作为一种无创性早期检测方式,具有重要应用价值。

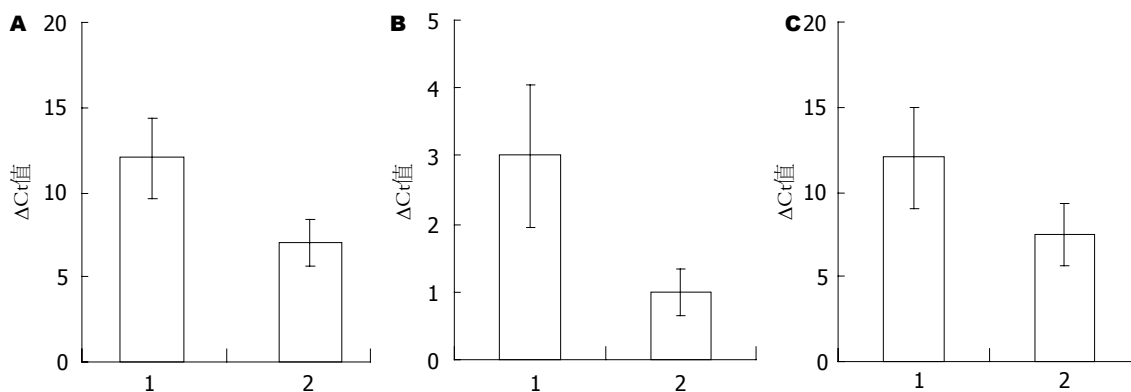


图1 对照组受试者和乙型肝炎肝硬化组患者ALB、AFP、PKM2 mRNA的表达。A: ALB; B: AFP; C: PKM2。1: 乙型肝炎肝硬化组; 2: 健康对照组。AFP: 甲胎蛋白; PKM2: 丙酮酸激酶M2; ALB: 白蛋白。

表2 健康对照组受试者和乙型肝炎肝硬化组患者ALB、AFP、PKM2基因检出率 [n = 102, n(%)]

分组	ALB基因	AFP基因	PKM2基因
健康对照组	2(1.9)	3(2.9)	0(0)
乙型肝炎肝硬化组	31(30.3)	28(27.5)	71(69.6)
χ^2	30.40	23.77	108.90
P值	0.01	0.01	0.01

AFP: 甲胎蛋白; PKM2: 丙酮酸激酶M2; ALB: 白蛋白。

冷却,常规琼脂糖凝胶电泳。定时定量PCR引物和逆转录引物序列见表1。

统计学处理 采用SPSS17.0统计学软件分析, χ^2 检验分析计数资料,对mRNA与临床相关性进行分析,并计算检测mRNA的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ALB、AFP、PKM2基因检出率比较 健康对照组受试者ALB、AFP、PKM2基因的检出率较低,乙型肝炎肝硬化组明显高于健康对照组,差异有统计学差异($P < 0.05$), (表2)。

2.2 ALB、AFP、PKM2 mRNA表达 经过检测后,得到乙型肝炎肝硬化组患者的ALB、AFP、PKM2 mRNA表达高于健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$), (图1)。

2.3 AFP、PKM2和ALB mRNA在患者血浆存在量与临床生化指标间的相关性 计算AFP mRNA、PKM2 mRNA和ALB mRNA的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$,其中, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{肝病样本}) - \Delta Ct(\text{健康样本均值})$ 。同时对AFP、PKM2及ALB的表达与临床生化指标的相关性进行统计,分析结果显示ALB mRNA和 γ -谷氨酰基转移酶和血清白蛋白存在

相关性(表3)。

2.4 患者ALB、AFP和PKM2 mRNA阳性率比较 对所有患者经过联合检测后,肝硬化组联合检测阳性率的最高,与健康对照组相比均差异显著($P < 0.05$), (表4)。

3 讨论

AFP的血清学检测是肝癌患者进行诊断的重要指标,但若仅进行AFP检测,会造成误诊或漏诊^[3,4]。因此,临床上对其他分子标志物进行了多方面研究。其中,研究最多的是AFP mRNA,现其他相关mRNA也逐渐得到了广泛关注。肝癌患者几乎都需经过肝硬化阶段,故在肝硬化阶段得到相应的分子标志物可对肝癌有早期警示作用。

AFP是一种在胚胎时期肝细胞内进行合成特殊蛋白,现已是原发性肝癌患者的常规检测指标^[5,6]。近年研究表明,AFP mRNA与肝癌的转移具有紧密联系^[7]。在本研究中,对血浆AFP mRNA的表达进行检测,得出其在对照组与观察组人群血浆中的表达具有统计学差异($P < 0.05$),说明AFP mRNA与肝癌的转化过程显著相关。

PKM2是一种在肿瘤细胞中特异表达的蛋白,在人体生理代谢过程中具有重要意义,能对肿瘤的形成过程进行控制^[8-11]。本研究中,PKM2 mRNA在2组患者之间具有统计学意义,其表达具有差异性,观察组患者血浆中的表达显著高于对照组,说明PKM2在肝硬化临床诊断中具有重要作用。

ALB是一种肝脏特异性蛋白,是反应患者肝细胞的敏感指标,对肝脏储备功能进行评价,并对患者病情的变化及预后的判断具有重要意义^[12,13]。本研究中,对ALB mRNA在血浆中的表达进行了检测,观察组中ALB mRNA的表达显著高于

■同行评价
本文具有一定指
导意义。

表 3 ALB mRNA与临床生化指标的相关性分析

临床参数	正常范围(U/L)	ALB mRNA的表达n(%)		P值
		低表达($2^{-\Delta\Delta Ct} < 2$)	高表达($2^{-\Delta\Delta Ct} > 2$)	
γ -谷氨酰基转移酶	0-50	13(17.3)	62(82.7)	<0.05
血清ALB	30-50	15(20.0)	60(80.0)	<0.05

ALB: 白蛋白.

表 4 患者ALB, AFP和PKM2 mRNA阳性率的比较 [n = 102, n(%)]

分组	ALB	AFP	PKM2	联合检测
健康对照组	3(2.9)	3(2.9)	0(0)	6(5.8)
肝硬化组	88(86.3) ^a	77(75.5) ^a	83(81.4) ^a	93(91.2) ^a

^aP<0.05 vs 健康对照组. AFP: 甲胎蛋白; PKM2: 丙酮酸激酶M2; ALB: 白蛋白.

对照组, 说明ALB mRNA对肝硬化患者的临床诊断及预后具有重要意义.

临床研究表明, AFP、PKM2与ALB对肝癌的诊断具有重要临床应用价值. 本研究主要针对AFP、PKM2与ALB mRNA在乙型肝炎肝硬化患者血浆中的表达. 采用实时定量PCR法对健康人群和乙型肝炎肝硬化患者血浆中的AFP mRNA、PKM2 mRNA和ALB mRNA表达进行了检测, 而与检测细胞、组织中mRNA的表达相比, 其检测无创, 灵敏度高, 快速, 简便, 并可同时检测多个样本, 具有一定的应用价值^[14-16]. 对患者进行联合检测后, 肝硬化组联合检测阳性率的最高, 与健康对照组相比差异显著(P<0.05). 对3种mRNA指标的相关性进行分析, 得到AFP、PKM2与临床检测指标无显著相关性, 但ALB mRNA与 γ -谷氨酰基转移酶和血清白蛋白具有相关性. γ -谷氨酰基转移酶是人体血清中的转移酶, 担任着重要角色, 其临床应用广泛. 肝硬化患者的 γ -谷氨酰基转移酶通常会升高, 且能帮助患者判断恶性肿瘤是否转移, 有助于临床诊断. 本研究得到, 乙型肝炎肝硬化患者血浆中的ALB mRNA与 γ -谷氨酰基转移酶具有相关性, 故ALB mRNA在肝病的临床治疗中具有重要意义.

循环RNA作为一个崭新的研究领域, 虽处于探索时期, 但作为一种无创性早期检测方式, 具有重要应用价值. 因此, 深入研究RNA在血浆中的表达水平, 为发现疾病特异性标志物开创前景, 对肝癌患者提供具有重要依据.

4 参考文献

- 任嫦娥, 郭惠萍. 姜黄素对肝癌HepG2和Bel-7404细胞增殖的抑制作用. 中国生化药物杂志 2012; 33: 251-253
- 武艳, 袁晓环, 张羽飞, 刘海峰, 包海花, 吴丹, 初彦辉. 原发性肝癌患者外周血中TGF- β 1 mRNA表达水平的检测及其临床意义. 中国生化药物杂志 2010; 31: 327-329
- Personeni N, Bozzarelli S, Pressiani T, Rimassa L, Tronconi MC, Sclafani F, Carnaghi C, Pedicini V, Giordano L, Santoro A. Usefulness of alpha-fetoprotein response in patients treated with sorafenib for advanced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2012; 57: 101-107 [PMID: 22414760 DOI: 10.1016/j.jhep.2012.02.016]
- Memon K, Kulik L, Lewandowski RJ, Wang E, Ryu RK, Riaz A, Nikolaidis P, Miller FH, Yaghami V, Baker T, Abecassis M, Benson AB, Mulcahy MF, Omary RA, Salem R. Alpha-fetoprotein response correlates with EASL response and survival in solitary hepatocellular carcinoma treated with transarterial therapies: a subgroup analysis. *J Hepatol* 2012; 56: 1112-1120 [PMID: 22245905 DOI: 10.1016/j.jhep.2011.11.020]
- Cui Z, Yu X, Guo L, Wei Y, Zheng S, Li W, Chen P, Zhu J, Peng J. Combined analysis of serum alpha-fetoprotein and MAGE-A3-specific cytotoxic T lymphocytes in peripheral blood for diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Dis Markers* 2013; 35: 915-923 [PMID: 24427779 DOI: 10.1155/2013/907394]
- Huang YK, Fan XG, Qiu F, Wang ZM. Combined detection of mRNA expression of Alpha-fetoprotein in peripheral blood and telomerase activity of monocytes in hepatocellular carcinoma patients. *Hepato-gastroenterology* 2013; 60: 1-5 [PMID: 22773301]
- 周琦, 张琼, 魏来. 血清甲胎蛋白、肿瘤相关物质和癌胚抗原对原发性肝癌的鉴别诊断. 世界华人消化杂志 2010; 18: 1936-1939
- Gupta V, Bamezai RN. Human pyruvate kinase M2: a multifunctional protein. *Protein Sci* 2010; 19: 2031-2044 [PMID: 20857498 DOI: 10.1002/pro.505]

- 9 Varghese B, Swaminathan G, Plotnikov A, Tzimas C, Yang N, Rui H, Fuchs SY. Prolactin inhibits activity of pyruvate kinase M2 to stimulate cell proliferation. *Mol Endocrinol* 2010; 24: 2356-2365 [PMID: 20962042 DOI: 10.1210/me.2010-0219]
- 10 詹成, 时雨, 王群. 丙酮酸激酶M2型应用于肿瘤诊断与治疗的研究进展. *中华肿瘤防治杂志* 2013; 20: 1043-1046
- 11 梁钢, 肖虹, 郑绘霞, 李宁, 武丽娜, 高红变, 赵杨璐, 梁建芳. 粪便肿瘤M2型丙酮酸激酶检测对结直肠癌诊断价值的Meta分析. *中华肿瘤防治杂志* 2013; 20: 1607-1611.
- 12 Kakazu E, Kondo Y, Kogure T, Ninomiya M, Kimura O, Iwata T, Morosawa T, Iwasaki T, Shimosegawa T. Supplementation of branched-chain amino acids maintains the serum albumin level in the course of hepatocellular carcinoma recurrence. *Tohoku J Exp Med* 2013; 230: 191-196 [PMID: 23892757]
- 13 Saha S, Sengupta J, Banerjee D, Khetan A, Mandal SM. *Schizophyllum commune*: a new organism in eye infection. *Mycopathologia* 2013; 175: 357-360 [PMID: 23385954 DOI: 10.1007/s11046-013-9625-4]
- 14 丁华, 何维娜, 陈望, 何玥, 许瑞娜, 杨鸿雅, 李娴. 3种检测方法在丙型肝炎诊断中的临床评价. *国际检验医学杂志* 2013; 34: 3387-3388
- 15 唐九歌, 丁剑冰, 郭劲, 乔艳辉, 袁晓华, 何智, 郭伟鹏. 三联放大技术与荧光定量PCR检测乙型肝炎病毒的应用比较. *中国病原生物学杂志* 2010; 5: 16-18
- 16 郭晓东, 杨美, 皋月娟, 熊璐, 周艳贤, 张红萍. 实时定量PCR检测miRNA-29a在肝癌中的变化. *现代生物医学进展* 2013; 13: 1484-1485

编辑 田滢 电编 鲁亚静

