

# 胆管癌组织 LOXL2 mRNA 与 Tenascin-C mRNA 表达的临床应用研究\*

肖小平<sup>1</sup>, 郭玲<sup>2a</sup>, 张熊<sup>2b</sup> (1. 西安市第八医院检验科, 西安 710061;  
2. 咸阳市第一人民医院 a. 病理科; b. 检验科, 陕西咸阳 712000)

**摘要:**目的 探讨组织赖氨酰氧化酶样蛋白-2(LOXL2)mRNA 和 Tenascin-C mRNA 表达在胆管癌疾病中的临床应用价值。方法 收集 35 例胆管癌患者(胆管癌组)和 28 例正常胆管组织(对照组)的血清及临床资料,采用实时荧光定量 PCR(real-time-PCR, RT-PCR)技术检测组织 LOXL2 mRNA 与 Tenascin-C mRNA 的表达,探讨两标志物的变化与胆管癌疾病之间的关系。结果 组织 LOXL2 mRNA 和 Tenascin-C mRNA 在胆管癌组中的表达量分别为  $1.27 \pm 0.18$ ,  $1.39 \pm 0.19$ ;在对照组的表达量分别为  $0.20 \pm 0.06$ ,  $0.23 \pm 0.06$ 。胆管癌组组织 LOXL2 mRNA 与 Tenascin-C mRNA 的表达与对照组比较显著增高,差异均有统计学意义( $t=52.18, 56.87$ ,  $P$  均  $< 0.01$ )。胆管癌组两标志物的表达呈正相关性( $r=0.687$ ,  $P<0.01$ )。结论 组织 LOXL2 mRNA 与 Tenascin-C mRNA 的表达可能成为胆管癌疾病的早期诊断及判断其病程进展的分子标志物。

**关键词:**胆管癌;赖氨酰氧化酶样蛋白 2 mRNA; Tenascin-C mRNA

中图分类号:R735.8;R730.43 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2017)03-079-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2017.03.021

## Clinical Application of the Expression of LOXL2 mRNA and Tenascin-C mRNA in Tissues of the Bile Duct Cancer

XIAO Xiao-ping<sup>1</sup>, GUO Ling<sup>2a</sup>, ZHANG Xiong<sup>2b</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, the Eighth Hospital of Xi'an City, Xi'an 710061, China;

2a. Department of Pathology; 2b. Department of Clinical Laboratory,  
the First People's Hospital of Xianyang City, Shaanxi Xianyang 712000, China)

**Abstract:** Objective To explore the clinical application of the expression of LOXL2 mRNA and Tenascin-C mRNA in tissues for the disease with the bile duct cancer. **Methods** The serum and clinical data in 35 cases of patients with the bile duct cancer (cancer group) and 28 cases of patients with normal bile duct tissue (control group) were collected, used the real-time fluorescent quantitative PCR (real-time-PCR, RT-PCR) technology to detect the expression of LOXL2 mRNA and Tenascin-C mRNA in tissues to observe the relationship between the changes and the bile duct cancer for the two markers. **Results** The expression of LOXL2 mRNA and Tenascin-C mRNA in tissues in the cancer group were  $1.27 \pm 0.18$  and  $1.39 \pm 0.19$ , which of ones in the control group were  $0.20 \pm 0.06$  and  $0.23 \pm 0.06$ . In the cancer group, the expression of LOXL2 mRNA and Tenascin-C mRNA in tissues respectively with comparison to those in the control group were significantly higher, the differences had statistical significance ( $t=52.18, 56.87$ ,  $P<0.01$ ), which of ones in the cancer group was positively related ( $r=0.687$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion** The expression of LOXL2 mRNA and Tenascin-C mRNA in tissues may be a molecular targets for the disease with the bile duct cancer in the early diagnosis and judgment of progression in the courses of this disease.

**Keywords:** bile duct cancer; LOXL2 mRNA; Tenascin-C mRNA

胆管癌是较常见的恶性肿瘤之一,其具有恶性程度高、诊断困难、转移早、预后差等特点<sup>[1]</sup>。近年来的研究表明, Tenascin 在许多人类恶性肿瘤组织中呈现较高的表达<sup>[2]</sup>。有文献报道赖氨酰氧化酶样蛋白-2(LOXL2)参与了某些肿瘤的发生、发展过程,其表达水平的上调与肿瘤侵袭转移呈正相关性<sup>[3]</sup>。本研究应用 RT-PCR 技术检测了 LOXL2 mRNA, Tenascin-C mRNA 在胆管癌组织中的表

达状况,旨在探讨两标志物与胆管癌的关系,以期

### 1 材料与方法

1.1 研究对象 收集我们医院 2012 年 9 月~2016 年 9 月期间行手术的胆管癌组织标本 35 例,其中男性 20 例,女性 15 例,年龄 42~76 岁,平均年龄  $56.3 \pm 8.9$  岁。其中高分化腺癌 9 例,中、低分化腺癌 26 例;肿瘤部位:位于肝内胆管者 8 例,

\* 作者简介:肖小平(1968—),男,本科学历,主管检验师,研究方向:肿瘤标志物的检测, E-mail: 418079040@qq.com。

通讯作者:郭玲(1979—),女,本科学历,主治医师,研究方向:肝胆肿瘤疾病的诊断, E-mail: 407205950@qq.com。

位于肝门部胆管者 20 例,位于胆总管中下段者 7 例;经肉眼或病理所见有转移者 22 例,无转移者 13 例,胆管癌转移者主要转移在淋巴结、神经、胰腺、肝脏、胆管等部位。所有患者术前均未接受化疗和放疗。另选取同期正常胆管组织 28 例作为对照组,其中男性 18 例,女性 10 例,年龄 43~78 岁,平均年龄  $55.7 \pm 9.2$  岁。所有组织标本切片均由两位高年资病理医生复阅确诊,对照组正常胆管组织经病理证实无肿瘤细胞浸润及其他病变。两组研究对象性别和年龄比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。本研究经本院伦理委员会批准,所有研究对象签署知情同意书。

1.2 试剂和仪器 RNA 提取使用美国 Invitrogen 公司产品,PCR 试剂盒采用上海久盛医疗用品有限公司产品,lightCycler 荧光 PCR 仪和全自动化学发光分析仪采用德国 Roche 公司产品。

### 1.3 研究方法

1.3.1 血清 CEA,CA19-9 及 CA50 水平应用化学发光技术检测:采用 Trizol 法提取组织中的总 RNA,并在分光光度计上检测其在波长 260 nm 和 280 nm 处的吸光度比值以验证 RNA 的纯度。若  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  的比值在 1.7~2.0 间则考虑总 RNA 溶液无杂质。

1.3.2 引物及逆转录反应:逆转录反应按上海久盛医疗用品有限公司提供的试剂盒说明进行。用 pfimer5 软件设计引物,Tenascin-C mRNA 的引物序列为:上游 5'-CAGAAGCTGAACCGGAAGT-TA-3',下游 5'-GGCTGTTGTTGCTATG-GCACT-3',扩增产物为 570bp;LOXL2 mRNA 的引物序列为:上游 5'-GGGTGGAGGTGTAC-TATGATGG-3',下游 5'-CTGCCGTAGGAG-GAGCTG-3',扩增产物 590 bp;以  $\beta$ -actin 作为内参照,其上游序列为 5'-CTCATTTGACAATGGT-GAT-3',下游为 5'-ACCGAGCGCGGCTA-CAGC-3',扩增产物为 410 bp。采用同管扩增。反应体系为 12.5  $\mu$ l。反应条件:95℃ 5 min→95℃ 30 s→58℃ 30 s→72℃ 45 s,30 个循环→72℃ 5 min→4℃ 保存。

1.3.3 mRNA 表达量测定:对扩增的目的片段进行凝胶电泳,并通过图像处理系统分析、计算,得出 mRNA 的吸光度,以  $\beta$ -actin 的吸光度为参考物,求出 LOXL2 mRNA 与 Tenascin-C mRNA 吸光度的变化值 ( $\Delta Ct$ ),mRNA 表达量通过  $2^{-\Delta Ct}$  求得。

1.4 统计学分析 实验数据应用 SPSS21 统计软件进行分析,表达量的比较采用  $t$  检验。相关性分析用 Pearson 法。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意

义。

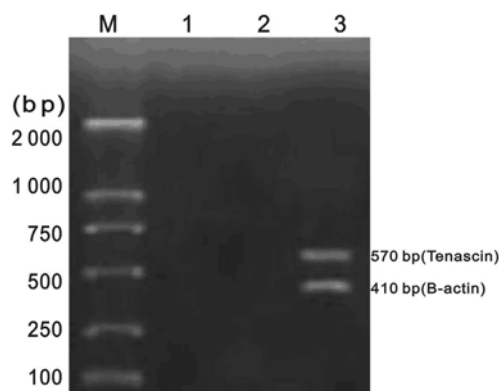
## 2 结果

2.1 两组血清肿瘤标志物检测结果比较 见表 1。胆管癌组与对照组 CEA,CA199 及 CA50 水平分别与对照组比较均显著增高,其差异有统计学意义 ( $t=15.88,17.52,11.79, P$  均  $< 0.01$ )。

表 1 两组血清肿瘤标志物检测结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

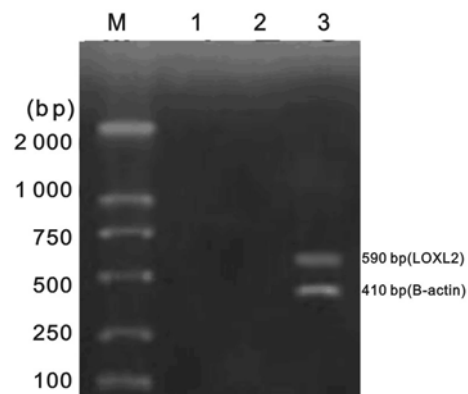
项 目	胆管癌组	对照组	$t$	$P$
CEA(ng/ml)	$17.37 \pm 12.33$	$1.27 \pm 1.10$	15.88	$< 0.01$
CA199(U/ml)	$267.95 \pm 191.22$	$11.30 \pm 5.93$	17.52	$< 0.01$
CA50(U/ml)	$107.27 \pm 59.36$	$10.12 \pm 1.97$	11.79	$< 0.01$

2.2 两组 LOXL2 mRNA 和 Tenascin-C mRNA 的表达比较 LOXL2 mRNA 和 Tenascin-C mRNA 在胆管癌组中的表达量为  $1.27 \pm 0.18, 1.39 \pm 0.19$ ;在对照组的表达量为  $0.20 \pm 0.06, 0.23 \pm 0.06$ 。胆管癌组两标志物表达量与对照组比较明显增高,差异均有统计学意义 ( $t=52.18, 56.87, P$  均  $< 0.01$ )。mRNA 电泳图见图 1,2。



M. DL2000;1. 阴性对照;2. 正常胆管组织;3. 胆管癌;

图 1 组织 Tenascin-C mRNA 表达



M. DL2000;1. 阴性对照;2. 正常胆管组织;3. 胆管癌;

图 2 组织 LOXL2 mRNA 表达

2.3 相关分析 胆管癌组组织 LOXL2 mRNA 与 Tenascin-C mRNA 表达量具有正相关性 ( $r = 0.687, P < 0.01$ )。胆管癌组组织 LOXL2 mRNA 与 Tenascin-C mRNA 表达量分别与血清 CEA, CA19-9 和 CA50 水平具有相关性 ( $r = 0.627, 0.593, 0.607, P < 0.01$ ), ( $r = 0.643, 0.610, 0.623, P < 0.01$ )。

3 讨论 LOXL2 作为赖氨酰氧化酶家族的成员之一,其可能参与了某些肿瘤的发生及发展过程<sup>[4]</sup>。Peinado 等<sup>[5]</sup>的研究结果证明,LOXL2 的高表达与肿瘤侵袭呈正相关。近年来的研究发现,采用 RNAi 技术沉默胆管癌组织中 LOXL2-shRNA 的表达,能减慢肿瘤的生长速度,同时出现肿瘤细胞凋亡的增加,这些结果证实了 LOXL2 的基因表达,在胆管癌的发生、发展中的生物学特性<sup>[6]</sup>。本研究结果显示 LOXL2 mRNA 表达显著高于对照组 ( $P < 0.01$ )。进一步提示 LOXL2 mRNA 的异常表达可能参与了胆管癌的发生、发展,并在胆管癌的恶性生物学行为中起着重要作用。

Tenascin 是细胞外基质中具有独特六臂体结构的高分子糖蛋白,至今发现有 Tenascin-C, Tenascin-R, Tenascin-X, Tenascin-Y 四种异构体。研究表明 Tenascin-C 在某些恶性肿瘤如乳腺癌、结肠癌和黑色素瘤中均呈高表达。尹传昌等<sup>[7]</sup>采用实时荧光定量 PCR 技术研究 Tenascin-C mRNA 在原发性肝细胞癌中的表达,结果显示原发性肝细胞癌组 Tenascin-C mRNA 的表达高于对照组<sup>[7]</sup>。另外的研究通过免疫组织化学法分析 33 例胆管癌组织标本中 Tenascin 的表达状况显示,其在胆管癌组织中的阳性表达率为 81.8%,显著高于正常胆管组织<sup>[8]</sup>。本研究结果显示, Tenascin-C mRNA 在胆管癌组织的表达量明显增高 ( $P < 0.01$ )。因此认为,研究胆管癌组织 Tenascin 表达可能为胆管癌的早期诊断提供基因依据。

相关性分析也发现胆管癌组织 LOXL2 mRNA 与 Tenascin-C mRNA 表达量分别与血清 CEA, CA19-9 和 CA50 水平具有相关性,两标志物的表达也具有正相关性。进一步推测 LOXL2 mRNA 与 Tenascin-C mRNA 的表达可能与胆管癌的病理变化有关,与该疾病的发生和发展密切相关。因此认为,组织 LOXL2 mRNA 与 Tenascin-C mRNA 的表达可能成为胆管癌疾病的早期诊断及判断其病程进展的潜在的分子标志物。

#### 参考文献:

[1] 吕炎,张小文.胆管癌发病机制的研究进展[J].西南国防医药,2016,26(2):222-224.

Lü Y, Zhang XW. The research progress on pathogenesis the of bile duct cancer[J]. Medical Journal of National Defending Forces in Southwest, 2016, 26(2):222-224.

[2] 薛东炜,徐慧慧,于涛,等. Tenascin-C 在肾透明细胞癌中的表达及意义[J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23(12):1714-1717.

Xue DW, Xu HH, Yu T, et al. The express and significance of Tenascin -C in renal clear cell carcinoma[J]. Journal of Modern Oncology, 2015, 23(12): 1714-1717.

[3] 李海丽,周亚萍,张方方,等. 赖氨酰氧化酶样蛋白-2 与肿瘤[J]. 医学分子生物学杂志, 2016, 13(4): 244-248.

Li HL, Zhou YP, Zhang FF, et al. Lysyl oxidase-like 2 protein and tumor[J]. Journal of Medical Molecular Biology, 2016, 13(4): 244-248.

[4] 曹宇勃,于涛,惠林萍,等. LOXL2 促进乳腺癌 MCF-7 细胞侵袭研究[J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23(6): 749-751.

Cao YB, Yu T, Hui LP, et al. LOXL2 promotes the invasion of human breast cancer cell line MCF-7[J]. Journal of Modern Oncology, 2015, 23(6): 749-751.

[5] Peinado H, Del Carmen Iglesias-de La Cruz M, Olmeda D, et al. A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression[J]. EMBO J, 2005, 24(19): 3446-3458.

[6] 刘鹏,王建华,蒋海滨,等. LOXL2 和 E-cadherin 在胆管癌浸润转移中的表达及相关性[J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(35): 5542-5549.

Liu P, Wang JH, Jiang HB, et al. Expression of E-cadherin and lysyl oxidase like 2 in cholangio carcinoma[J]. World Chinese Journal of Digestology, 2014, 22(35): 5542-5549.

[7] 尹传昌,廖晓峰,陈雯,等. Tenascin-C 在人原发性肝细胞癌浸润、转移和血管生成中的作用[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2012, 41(3): 278-283.

Yin CC, Liao XF, Chen W, et al. Role of Tenascin-C in invasion, metastasis and angiogenesis of human hepatocellular carcinoma[J]. Acta Medicine Universitatis Scientiae Technologiae Huazhong (Medicine Edition), 2012, 41(3): 278-283.

[8] 王林,董小刚,姚俊. Tenascin, CD34 在胆管癌组织中的表达及临床意义[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2006, 27(1): 46-48, 58.

Wang L, Dong XG, Yao J. Expression and clinical significances of Tenascin and CD34 in human cholangio-carcinoma[J]. Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Edition), 2006, 27(1): 46-48, 58.

收稿日期:2017-02-15

修回日期:2017-02-20