

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.13.011

文章编号: 1005-8982 (2018) 13-0062-05

血清 CGB 和 GnRH1 mRNA 表达与妊娠滋养细胞肿瘤血行转移的相关性研究

李莉, 李涛

(西南医科大学附属医院 肿瘤科, 四川 泸州 646000)

摘要: **目的** 研究妊娠滋养细胞肿瘤患者血清人绒毛膜促性腺激素 β 亚基 (CGB) mRNA 和人类促性腺激素释放激素 1 型 (GnRH1) mRNA 的表达情况, 探讨其表达与肿瘤转移的相互关系, 寻找诊断妊娠滋养细胞肿瘤患者早期血行转移的可能标志物。 **方法** 选取门诊治疗的 52 例妊娠滋养细胞肿瘤患者和 21 例葡萄胎患者, 选取体检门诊的 20 例正常妊娠妇女和 20 例非妊娠妇女作为对照。采集临床资料和外周血, 采用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 4 组患者血清 CGB 和 GnRH1 mRNA 表达水平, 分析与肿瘤早期转移临床指标的关系。 **结果** 妊娠滋养细胞肿瘤患者血清 CGB 和 GnRH1 mRNA 表达升高, 高于其余 3 组; CGB mRNA 表达与患者年龄、最大肿瘤大小、前次妊娠无关, 与远处转移、转移灶数目、国际妇产科联盟 (FIGO) 临床分期及预后相关; 妊娠滋养细胞肿瘤患者血清 GnRH1 mRNA 表达与患者年龄、最大肿瘤大小、转移灶数目、前次妊娠无关, 与远处转移、临床 FIGO 分期及预后相关。 **结论** 妊娠滋养细胞肿瘤患者血清 CGB 和 GnRH1 mRNA 表达升高, 并与转移相关临床指标相关, 因此 CGB 和 GnRH1 可能成为评估妊娠滋养细胞肿瘤早期血行转移的有效标志物。

关键词: 人绒毛膜促性腺激素 β 亚基; 促性腺激素释放激素 1 型; 逆转录聚合酶链反应; 妊娠滋养细胞肿瘤

中图分类号: R737.33

文献标识码: A

Correlations of serum CGB mRNA and GnRH1 mRNA expressions with early blood metastasis of gestational trophoblastic neoplasm

Li Li, Tao Li

(Department of Oncology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University,
Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of human chorionic gonadotropin beta subunit (CGB) mRNA and gonadotropin-releasing hormone type 1 (GnRH1) mRNA in the serum of the patients with gestational trophoblastic tumor, and to explore the relationships of the expressions of CGB mRNA and GnRH1 mRNA with metastasis, and the possible markers of early hematogenous metastasis. **Methods** Fifty-two pregnant women with gestational trophoblastic tumor and 21 patients with hydatidiform mole were selected. Twenty normal pregnant women and twenty non-pregnant women were selected as controls. Clinical data and peripheral blood of all participants were collected. The serum levels of CGB mRNA and GnRH1 mRNA in the four groups were detected by RT-PCR, and their relationships with clinical indicators of early metastasis were analyzed. **Results** The expressions of CGB mRNA and GnRH1 mRNA in serum of the patients with gestational trophoblastic tumor were higher than those of the other three groups. The expression of CGB mRNA was not related to age, tumor size, or previous

收稿日期: 2017-06-21

pregnancy status, but was correlated with distant metastasis, number of metastatic foci, clinical FIGO stage and prognosis. The expression of GnRH1 mRNA in the patients with gestational trophoblastic tumor was not related to age, tumor size, number of metastatic foci or previous pregnancy status, but was related to distant metastasis, clinical FIGO stage and prognosis. **Conclusions** Serum CGB mRNA and GnRH1 mRNA expressions increase in the patients with gestational trophoblastic tumor and are correlated to metastasis-related clinical indicators. Therefore, CGB and GnRH1 may be useful markers for assessing the early hematogenous metastasis of gestational trophoblastic tumor.

Keywords: human chorionic gonadotropin beta subunit; gonadotropin releasing hormone type 1; RT-PCR; gestational trophoblastic neoplasm

妊娠滋养细胞疾病 (gestational trophoblastic disease, GTD) 是一组来源于胚胎滋养细胞的疾病, 根据组织学将其分为葡萄胎 (hydatidiform mole, HM)、侵蚀性葡萄胎 (invasive mole, IM)、妊娠性绒毛膜癌 (gestational choriocarcinoma, GCC) 及胎盘部位滋养细胞肿瘤^[1]。而侵蚀性葡萄胎、妊娠性绒毛膜癌和胎盘部位滋养细胞肿瘤又统称为妊娠滋养细胞肿瘤 (gestational trophoblastic neoplasia, GTN)。GTN 可继发于葡萄胎、流产、异位妊娠及足月产等, 其中约 60% 来源于葡萄胎^[2]。一些肿瘤细胞拥有能力穿透血管壁, 在血液中循环, 达到身体的其他领域。这些循环肿瘤细胞 (circulating tumor cell, CTC) 是血行转移和肿瘤进展的重要原因之一^[3]。因此检测患者外周血循环肿瘤细胞可能对评估 GTN 早期血行转移、检测治疗和预后起重要作用。

人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, HCG) 是由 α 和 β 2 条多肽链通过非共价键结合, β 亚基决定其免疫特性^[4], 人绒毛膜促性腺激素 β 亚基 (human chorionic gonadotropin beta subunit, CGB) 作为妊娠滋养细胞肿瘤标志物之一, 长期被用于 GTN 的诊断、疗效评估和随访。人类促性腺激素释放激素 (gonadotropin releasing hormone, GnRH) 是由下丘脑分泌的十肽激素, 在性成熟和生殖繁育能力方面起重要作用。人体中存在 2 种亚型 GnRH1 和 GnRH2, 在卵巢癌、子宫内膜癌、乳腺癌和前列腺癌中 GnRH1 表达水平升高^[5], 并且已证明 GnRH1 的受体激动剂可以抑制卵巢癌和子宫内膜癌的增殖, 促进细胞凋亡^[6]。有研究表明在子宫内膜癌和子宫内膜非典型增生时 CGB 的表达增加同时伴有 GnRH1 表达增加^[7]。

本研究通过采用逆转录聚合酶链反应 (transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测 GTN 患者血清 CGB 和 GnRH1 mRNA 表达情况, 探讨其表达与肿瘤转移的相互关系, 寻找诊断 GTN 患者早期血行转移的可能标志物。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2014 年 1 月–2015 年 6 月西南医科大学附属医院、四川省遂宁市射洪县人民医院和四川省肿瘤医院 3 所医院肿瘤科门诊确诊的 GTN 患者 52 例 (GTN 组) 和 HM 患者 21 例 (HM 组), 同期体检正常妊娠妇女 20 例 (正常妊娠组) 和非妊娠妇女 20 例 (非妊娠组) 的基本临床资料及外周血 5 ml。52 例 GTN 患者, 年龄 16 ~ 42 岁, 平均 (29.7 ± 0.31) 岁; 末次妊娠为葡萄胎者 41 例 (78.8%), 流产 9 例 (17.3%), 异位妊娠 1 例 (1.9%), 足月产 1 例 (1.9%)。

1.1.1 GTN 组 纳入标准: ①初诊的妊娠性绒毛膜癌、侵蚀性葡萄胎或中间型滋养细胞肿瘤患者; ②经 B 超、影像学或病理学诊断确诊。排除标准: ①已接受药物或手术治疗的 GTN 患者; ②不能配合研究抽取外周血的患者; ③非妊娠性绒毛膜癌患者; ④其他肿瘤病史者。

1.1.2 HM 组 纳入标准: 初诊经 B 超、影像学或病理学确诊的葡萄胎患者。排除标准: 已接受过药物或手术治疗; 其他肿瘤病史者。

1.1.3 正常妊娠组 纳入标准: 经血 β -HCG 和 B 超确诊的孕 8 ~ 12 周正常妊娠妇女。排除标准: 既往有葡萄胎病史; 既往有其他肿瘤病史。

1.2 GTN 的诊断及 FIGO 分期

根据患者妊娠后 (包括葡萄胎组织排空以后或流产、异位妊娠及足月产后) 出现的相应症状和体征 (如阴道流血, 肺转移等), 结合患者的血清 HCG 水平, GTN 的诊断可以确定, 影像学和组织学检测对诊断是非必须的。FIGO 分期: 所有患者依据国际妇产科协会 (the International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO) 2002 年颁布的新的标准进行分期及预后评分^[8-9], 0 ~ 6 分为低危, ≥ 7 分为高危。

1.3 总 RNA 提取及 RT-PCR

RNA 提取试剂盒 RNAfast 200 购自上海飞捷生

物科技有限公司, RT-PCR 试剂盒 [Prime Script™ RT reagent Kit (Perfect Real Time)] 及 real-time PCR 试剂盒 [SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)] 均购自宝生物工程(大连)有限公司。CGB 引物(正向 5'-AGCCAAAGACCGCTACG-3'; 反向 5'-TGAGGGGACAAGCTACCG-3'), GnRH1 引物(正向 5'-GACCTGAAAGGACTCTGGA-3'; 反向 5'-CTTCTGGCCCAATGGATTTA-3')^[10] 均由上海吉玛生物科技有限公司合成。按 RNAfast 200 说明书分别提取血液中总 RNA, 经紫外分光光度计检测, OD260/OD280 者为合格样品。取 500 ng 总 RNA 为模板, 按 RT-PCR 试剂盒说明书配制逆转录反应体系, RNA 水平使用 2^{-ΔΔCt} 方法相对定量。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件, 计量资料符合正态分布采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 Kruskal-Wallis H 检验, 组间两两比较使用 q 检验, 计数资料采用例表示, 采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GTN 组、HM 组、正常妊娠组及非妊娠组血清 CGB 和 GnRH1 mRNA 表达情况

各组 CGB mRNA、GnRH1 mRNA RT-PCR 典型条带图见图 1、2。20 例非妊娠组血清中 CGB mRNA 阴性, GnRH1 mRNA 表达较少; 20 例正常妊娠组 CGB mRNA 和 GAPDH mRNA 较少量表达; 21 例 HM 组和 52 例 GTN 组 CGB mRNA 和 GAPDH mRNA 表达均有所升高。4 组患者血清 CGB mRNA 表达水平差异有统计学意义 ($H = 9.748$, $P = 0.005$), 说明 4 组血液中 CGB mRNA 表达水平不同, GTN 组血清中 CGB mRNA 水平高于其余 3 组。4 组血清 GnRH1 mRNA 表达水平差异有统计学意义 ($H = 6.522$, $P = 0.018$), 说明 4 组血液中 GnRH1 mRNA 表达水平不同, GTN 组血清中 GnRH1 mRNA 水平升高, 见表 1。

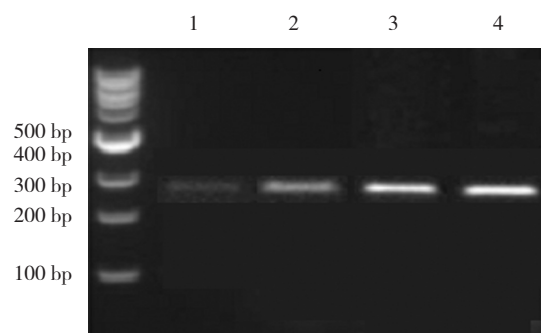
2.2 GTN 组血清 CGB mRNA 表达与临床指标的关系

根据临床指标中年龄、前次妊娠、最大肿瘤大小、远处转移、转移灶数目、临床分期、预后评分等因素分组。分别比较不同组中血清 CGB mRNA 表达情况。其中 CGB mRNA 表达与年龄、前次妊娠、最大肿瘤大小无关 ($P > 0.05$); 与远处转移、转移灶数目、临

床分期、FIGO 预后相关 ($P < 0.05$)。见表 2。

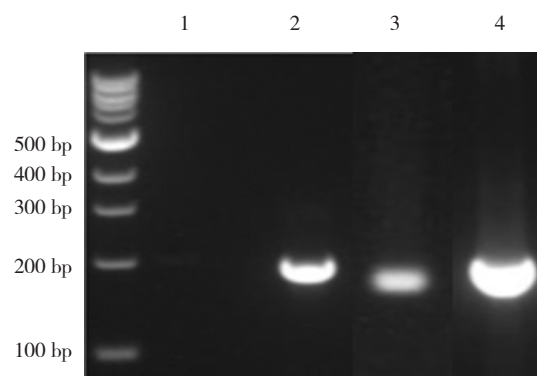
2.3 GTN 组血清 GnRH1 mRNA 表达与临床指标的关系

根据临床指标中年龄、前次妊娠、最大肿瘤大小、远处转移、转移灶数目、临床分期、预后评分等因素分组。分别比较不同组中血清 GnRH1 mRNA 表达情况。其中 GnRH1 mRNA 表达与年龄、前次妊娠、最大肿瘤大小、转移灶数目无关 ($P > 0.05$); 与远处转移、临床分期、FIGO 预后相关 ($P < 0.05$)。见表 3。



1: 非妊娠组; 2: 正常妊娠组; 3: HM 组; 4: GTN 组

图 1 GnRH1 mRNA RT-PCR 条带图



1: 非妊娠组; 2: 正常妊娠组; 3: HM 组; 4: GTN 组

图 2 CGB mRNA RT-PCR 条带图

表 1 各组血清 CGB 和 GnRH1 mRNA 表达情况

组别	CGB mRNA	GnRH1 mRNA
非妊娠组 ($n=20$)	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.02
正常妊娠组 ($n=20$)	0.56 ± 0.21	0.33 ± 0.07
HM 组 ($n=21$)	2.72 ± 0.44	0.69 ± 0.12
GTN 组 ($n=52$)	4.18 ± 0.42	1.73 ± 0.14
H 值	9.748	6.522
P 值	0.005	0.018

表 2 GTN 组血清 CGB mRNA 表达与临床指标的关系

项目	CGB mRNA 表达		P 值 [†]
	阳性	阴性	
年龄			
<40 岁	41	7	0.499
≥ 40 岁	3	1	
前次妊娠			
葡萄胎	23	18	0.734
非葡萄胎	7	4	
最大肿瘤大小			
<5 cm	26	4	0.975
≥ 5 cm	19	3	
远处转移			
有	46	0	0.000
无	1	5	
转移灶数目			
<8 个	30	8	0.038
≥ 8 个	7	1	
临床分期			
I、II 期	6	8	0.000
III 期	38	0	
FIGO 预后			
低危	31	9	0.017
高危	12	0	

注：†Fisher's 精确概率法

3 讨论

GTN 是胚胎的滋养细胞发生恶变而形成的肿瘤, 包括中间型滋养细胞肿瘤、侵蚀性葡萄胎和妊娠性绒毛膜癌。妊娠滋养细胞肿瘤患者死亡的重要原因多数是发生远处转移, 如肺转移、肝转移、脑转移等。一些肿瘤细胞拥有能力穿透血管壁, 在血液中循环, 到达身体的其他领域。CTC 反映了肿瘤的侵犯, 因此早期发现血液中的 CTC, 对于患者预后判断、疗效评价和个体化治疗都有着重要的指导作用。GTN 是胚胎的滋养细胞发生恶变, 因此外周血中检测恶变的细胞滋养细胞和合体滋养细胞, 有助于早期发现肿瘤血行转移。目前, 直接检测肿瘤细胞技术较为复杂, 检测周

表 3 GTN 组血清 GnRH1 mRNA 表达与临床指标的关系

项目	GnRH1 mRNA 表达		χ ² 值	P 值
	阳性	阴性		
年龄				
<40 岁	25	23	0.936 [†]	
≥ 40 岁	2	2		
前次妊娠				
葡萄胎	21	20	0.115	0.734
非葡萄胎	5	6		
最大肿瘤大小				
<5 cm	17	13	0.154	0.695
≥ 5 cm	16	6		
远处转移				
有	44	2	0.001 [†]	
无	2	4		
转移灶数目				
<8 个	27	11	0.684 [†]	
≥ 8 个	5	3		
临床分期				
I、Ⅱ期	2	12	0.000 [†]	
Ⅲ期	34	4		
FIGO 预后				
低危	7	33	0.000 [†]	
高危	11	1		

注：†Fisher's 精确概率法

期较长, 临床推广困难, 因此检测外周血中循环肿瘤细胞的重要任务是寻找其特异性标志物。国外对于检测妊娠滋养细胞肿瘤外周血循环肿瘤细胞的相关研究报道较多, 而针对国人的报道则较少^[11-12], 本研究纳入 4 组不同人群, 收集临床资料和外周血, 使用 RT-PCR 检测各组患者血清 CGB 和 GnRH1 mRNA 表达情况, 分析其与妊娠滋养细胞肿瘤早期转移等临床参数的关系, 探究其与妊娠滋养细胞肿瘤血行转移的相互关系。

CGB 是有胎盘合体滋养细胞分泌的一种糖蛋白。本研究显示非妊娠组外周血中无 CGB mRNA 表达, GTN 组外周血中 CGB mRNA 表达水平高于 HM 组、正常妊娠组。GTN 组外周血中 GnRH1 mRNA 表达水平高于 HM 组、正常妊娠组和非妊娠组。提示 CGB 和 GnRH1 表达可能作为妊娠滋养细胞肿瘤检测的标志物之一。

本研究显示, GTN 组外周血 CGB mRNA 表达阳性

与年龄、前次妊娠、最大肿瘤大小无关;与远处转移、转移灶数目、临床分期、FIGO 预后相关。GnRH1 mRNA 表达阳性与年龄、前次妊娠、最大肿瘤大小、转移灶数目无关;与远处转移、临床分期和 FIGO 预后相关。CGB mRNA 和 GnRH1 mRNA 表达阳性有远处转移组患者高于无远处转移组,临床分期Ⅲ组高于临床分期Ⅰ、Ⅱ组,FIGO 高危组高于 FIGO 低危组,这些均提示外周血 CGB mRNA 和 GnRH1 mRNA 表达与转移相关临床指标相关,因此 CGB 和 GnRH1 可能成为评估妊娠滋养细胞肿瘤早期血行转移的有效评价指标。

参 考 文 献:

- [1] SANTORO G, LAGANÀ A S, MICALI A, et al. Historical, morphological and clinical overview of placental site trophoblastic tumors: from bench to bedside[J]. Archives of Gynecology and Obstetrics, 2017, 295(1): 173.
- [2] 朱晓旭, 钱建华, 掌佩文, 等. 不同 HCG 水平妊娠滋养细胞肿瘤的临床特征和治疗分析 [J]. 浙江医学, 2016, 38(9): 611-613.
- [3] GERGES N, RAK J, JABADO N. New technologies for the detection of circulating tumour cells[J]. British Medical Bulletin, 2010, 94(1): 49-64.
- [4] COHEN L, BOUSFIELD G R, BEN-MENACHEM D. The recombinant equine LH β subunit combines divergent intracellular traits of human LH β and CG β subunits[J]. Theriogenology, 2015, 83(9): 1469-1476.
- [5] HUANG P P, BRUSMAN L E, IYER A K, et al. A novel gonadotropin-releasing Hormone 1 (Gnrh1) enhancer-derived noncoding RNA regulates Gnrh1 gene expression in GnRH neuronal cell models[J]. PLoS One, 2016, 11(7): e0158597.
- [6] FAN L, SHIEKHATTAR R. Enhancer RNAs: the new molecules of transcription[J]. Current Opinion in Genetics & Development, 2014, 25(4): 38-42.
- [7] PNUELI L, RUDNIZKY S, YOSEFZON Y, et al. RNA transcribed from a distal enhancer is required for activating the chromatin at the promoter of the gonadotropin α -subunit gene[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015, 112(14): 4369-4374.
- [8] COMMITTEE F O. FIGO staging for gestational trophoblastic neoplasia 2000. FIGO Oncology Committee[J]. International Journal of Gynecology & Obstetrics, 2002, 77(3): 285-287.
- [9] 雷呈志, 向阳, 万希润, 等. 足月产后绒毛膜癌患者的临床特征与预后分析 [J]. 中华妇产科杂志, 2006, 41(11): 752-755.
- [10] MIROSLAW A. CGB and GNRH1 expression analysis as a method of tumor cells metastatic spread detection in patients with gynecological malignances[J]. Journal of Translational Medicine, 2011, 9(1): 1-9.
- [11] SUZUKA K, MATSUI H, IITSUKA Y, et al. Detection of beta-subunit human chorionic gonadotropin mRNA in the peripheral blood of patients with nonmetastatic gestational trophoblastic disease[J]. Gynecologic Oncology, 2002, 86(1): 53-56.
- [12] 朱建春. 妊娠滋养细胞肿瘤外周血肿瘤细胞检测方法的临床研究 [J]. 医药论坛杂志, 2011, 13(21): 98-100.

(张蕾 编辑)