

球蛋白和肌动蛋白含量均有不同程度的上升。提示手术刺激可能使大鼠 MLCK、肌球蛋白和肌动蛋白含量下降,活性降低,结肠平滑肌舒张,进而导致胃肠功能障碍;AEA 和 SEA 高、中剂量可能通过提高 MLCK、肌球蛋白和肌动蛋白含量,增加结肠平滑肌的收缩性而对抗胃肠功能障碍。

REFERENCES

- [1] SUN B, XU J, ZHOU Z Q, et al. Functional delayed gastric emptying after abdominal operation: clinical analysis of 36 cases [J]. Chin J Pract Surg(中国实用外科杂志), 2003, 23(8): 465-467.
- [2] ZHOU Y D, XIAO Y, ZHAO Y P. Diagnosis and management of delayed gastric emptying after Whipple's operation [J]. Chin J Gen Surg(中华普通外科杂志), 2002, 11(17): 671-672.
- [3] WANG J J, WANG W H, RUAN X M, et al. Effect of abdominal needling in treating post-cardio surgical operational gastrointestinal dysfunction [J]. Chin J Integr Tradit West Med (中国中西医结合杂志), 2008, 28(4): 310-313.
- [4] 李道五. 温中理气健脾和胃法治疗腹部术后胃肠功能紊乱 30 例观察[J]. 中国中医药信息杂志, 2001, 8 (4): 60-61.
- [5] ZHOU X M, ZHOU X, Li Y M. Research progress of Danggui Buxue decoction [J]. Word Chin Med(世界中医药), 2013, 8(6): 705-707.
- [6] ZHOU X Q, YU K, YANG J F, et al. Modified "Danggui Buxue Decoction" for the treatment of postoperative enteroparalysis [J]. Shanghai J Tradit Chin Med(上海中医药杂志), 2014, 48(5): 48-50.
- [7] LIU W Z, TUO H Y, WU G T, et al. Semi bionic extraction of Dangguibuxuetang [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床), 2015, 31(5): 19-23.
- [8] SUN J H, GUO H, CHEN L, et al. Effect of electroacupuncture at "Tianshu" (ST25) on colonic smooth muscle structure and interstitial cells of Cajal in slow transit constipation rats [J]. Acupunc Res(针刺研究), 2011, 36(3): 171-175.
- [9] LU Y J, LIAN Z C. The impact of gastrointestinal hormone on gastric dynamic [J]. China Tropic Med(中国热带医学), 2005, 5(6): 1338-1339.
- [10] 宋瑞, 张惠卿, 陈学谦, 等. 腹部手术后胃肠激素变化的研究[J]. 中国现代普通外科进展, 2010, 13(4): 323-324.
- [11] 吴佩, 吴采月, 赵唯信, 等. 腹部手术后血清胃泌素、胃酸水平的变化以及与应激性溃疡的关系[J]. 医师进修杂志, 1995, 18(3): 16-18.
- [12] 徐荣, 程华. 腹部手术对血清胃泌素水平的影响 [J]. 江西医学院学报, 2002, 42(6): 53-54.
- [13] BREUKINK S O, PIERIEJ P, GROND A J, et al. Laparoscopic versus open total mesorectal excision: a case-control study [J]. Int J Colorectal Dis, 2005, 20(5): 428-433.
- [14] ZHAO G H, ZHANG Y S, JIANG Y, et al. Measurement of plasma motilin and vasoactive intestinal peptide contents in postabdominal operation patients before and after gastrointestinal function recovery [J]. J Radioimmunol(放射免疫学杂志), 2001, 14(6): 323-324.
- [15] LI Z P, QIU Y, PENG Y. Relationship between interstitial cells of Cajal and gastrointestinal motility [J]. Chin J Gastroenterol Hepatol(胃肠病学和肝病学杂志), 2014, 23(9): 983-986.
- [16] TONG W D, LIU B H, ZHANG S B, et al. Colectomy for idiopathic slow transit constipation [J]. J Med Coll PLA(中国人民解放军军医大学学报), 2003, 18(1): 56-59.
- [17] HU Y H. Effects of acupuncture on regulative mechanism of thick myofilament in smooth muscle contraction and gastrointestinal pacing cell ICC in abdominal postoperative rat [D]. Guangzhou, Guangzhou University of Chinese Medicine, 2011.

收稿日期: 2015-08-23

从肺癌组织提取高纯度总 RNA 方法的优化及应用

程斌^{1,2}, 钟里科², 王增², 黄萍², 陈枢青^{1*} (1.浙江大学药学院, 杭州 310006; 2.浙江省肿瘤医院, 杭州 310022)

摘要: 目的 通过对传统 TRIzol 提取组织中 RNA 的方法进行优化, 建立一种较为简便、高效、经济的提取方法, 并用优化后的方法检测非小细胞肺癌组织中 ERCC1、RRM1 和 BRCA1 的 mRNA 表达水平。方法 非小细胞肺癌的组织标本(包括肿瘤组织和正常组织)36 例, 采用传统和优化后的方法提取肺癌组织及正常组织中 RNA, 以 SYBR Green 荧光实时定量 PCR 分析各组织中 ERCC1、RRM1、BRCA1 以及管家基因 GAPDH 的 mRNA 表达水平。结果 传统方法的 RNA 浓度和纯度分别为 $(0.76 \pm 0.07) \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 1.87 ± 0.04 , 优化方法的 RNA 浓度和纯度分别为 $(1.12 \pm 0.07) \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 1.95 ± 0.03 ; 琼脂糖凝胶电泳表明 RNA 没有降解, 各个引物的溶解曲线均呈单峰, 特异性良好。实时荧光定量显示, 肺癌组织中 ERCC1、RRM1 和 BRCA1 的相对 mRNA 表达高于正常组织; ERCC1 和 BRCA1 在不同病理类型(腺癌、鳞癌)的肿瘤组织中表达无显著性差异, RRM1 在肺鳞癌中的表达显著高于腺癌 ($P < 0.05$); 不同性别中的基因表达均无显著性差异。结论 相比传统方法, 利用优化后的方法提取样本的总 RNA 浓度、纯度和完整性均显著提高, 能满足各种基因表达和定量检测实验的需要。非小细胞肺癌中 ERCC1、RRM1 和 BRCA1 的表达水平与肿瘤增殖活性密切相关, 与临床

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划(2014KYB036)

作者简介: 程斌, 男, 副主任药师 Tel: (0571)88122120 E-mail: bbbuben@sina.com *通信作者: 陈枢青, 男, 博士, 教授, 博导 Tel: (0571)88122438 E-mail: chenshuqing@zju.edu.cn

肿瘤的病理类型也有一定的相关性。

关键词: 肿瘤组织; 非小细胞肺癌; RNA 提取; TRIzol 法; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: Q5-33

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)05-0539-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.05.005

Optimizing Method of High Quality Total RNA Isolated and Purified from Lung Cancer and Its Application

CHENG Bin^{1,2}, ZHONG Like², WANG Zeng², HUANG Ping², CHEN Shuqing^{1*} (1.College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China; 2.Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a more simple, efficient and economical method of total RNA extracted from human non-small cell lung cancer tissues by optimization of traditional TRIzol method, and detect mRNA expression levels of ERCC1, RRM1 and BRCA1. **METHODS** Thirty-six samples of non-small cell lung cancer(NSCLC, including tumor tissues and normal tissues) were collected and RNA from these samples were extracted through traditional and optimized method, expression levels of ERCC1, RRM1, BRCA1 and housekeeping gene GAPDH SYBR were detected by RT-PCR. **RESULTS** The concentration and purity of RNA extracted by traditional method were $(0.76 \pm 0.07) \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ and 1.87 ± 0.04 , respectively, the concentration and purity of RNA extracted by the optimized method performed better, which were $(1.12 \pm 0.07) \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ and 1.95 ± 0.03 , respectively. The agarose gel electrophoresis showed no degradation of RNA, each primer melting curve showed a single peak and good specificity. According to the fluorescence-based real-time detection, ERCC1, RRM1 and BRCA1 mRNA levels in tumor tissues were respectively higher than those of normal tissues. No significance in expression of ERCC1 and BRCA1 between adenocarcinoma and squamous carcinoma was found. Nevertheless, RRM1 expression level in lung squamous carcinoma was significantly higher than that of adenocarcinoma($P < 0.05$). In addition, gene expression related to gender had no significant difference. **CONCLUSION** The concentration, purity and integrity of extracted total RNA meet the needs of a variety of gene expression and quantitative detection experiments. The expression levels of ERCC1, RRM1 and BRCA1 in NSCLC is closely correlated with tumor proliferative activity and clinical efficacy of adjuvant chemotherapy for cancer.

KEY WORDS: tumor tissue; non-small cell lung cancer; RNA extraction; TRIzol method; real-time quantitative PCR

RNA 技术在肿瘤分子生物学研究中发挥着重要的作用,对某一肿瘤组织进行性状研究,首先要获得该性状基因,从肿瘤组织细胞中分离高质量的 RNA 是许多研究成功与否的关键,如 cDNA 合成、PCR 等实验的成效在很大程度上取决于提取 RNA 的质量。RNA 非常容易被内源的和外源的核酸酶特异性降解,或者由于二价阳离子、温度、pH 值的变化以及存储时间过长等因素而被非特异性降解,这些都会影响下游基因表达模式分析的准确性^[1]。研究表明,将肿瘤组织样本于液氮中迅速冷冻,随后于 -80°C 贮存可以维持 RNA 的完整性^[2]。目前实验室常用的 RNA 提取方法是酸性硫氰酸胍-酚-氯仿提取法(TRIzol 法),但大部分推荐的操作方法都是在液氮中进行,即取冻存的肿瘤组织放入研钵中,边研磨边加入液氮保护,如果粉碎时间过长,会导致 RNA 降解^[3]。该实验方法过程比较复杂且耗时长,笔者在实验过程中,通过对该方法改进,建立了一种较为简便、高效、经济的提取 RNA 的方法,其提取的 RNA 浓度、纯度和完整性均令人满意。本研究利用优化后的

方法提取了人非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)组织及正常组织中的总 RNA,并采用实时荧光定量 PCR 方法检测了切除修复交叉互补组基因 1(excision repair cross-complmenting-group1, ERCC1)、核糖核苷酸还原酶 M1(ribonucleotide reductase M1, RRM1)和乳腺癌易感基因家族 1(breast cancer susceptibility gene1, BACA1)的 mRNA 表达水平,为进一步研究基因表达水平和预后的相关性提供参考。

1 材料和方法

1.1 标本来源

36 例 NSCLC 的组织标本(包括肿瘤组织和正常组织)均取自浙江省肿瘤医院标本库 2009 年 3 月—2012 年 11 月的标本,所有患者全部为 IIIA 肺癌患者,包括男性 26 例(10 例腺癌、15 例鳞癌、1 例腺鳞癌),女性 10 例(均为腺癌),平均年龄 60 岁。

1.2 仪器与试剂

TRIzol 试剂(Invitrogen 公司);cDNA 逆转录试剂盒(Takara 公司,批号:AK5102);SYBR Green 反应试剂盒(Takara 公司,批号:AK5305);异丙

醇、氯仿、无水乙醇(上海凌峰化学试剂有限公司); DEPC 水(上海生工生物工程有限公司); 75%乙醇用 DEPC 水配置。

TissueLyser II 组织匀浆机(Qiagen 公司); LEGEND MICRO 17R 低温高速离心机(Eppendorf 公司); MULTISKAN SPECTRUM 全波长酶标仪(Thermo 公司); ND-2000 核酸蛋白测定仪(Thermo 公司); 1156MINI-P TET 电泳装置(Bio-Rad 公司); 7500 实时荧光定量 PCR 仪(Life Technologies 公司)。

1.3 总 RNA 提取方法

1.3.1 传统 RNA 提取方法 取冻存肺癌组织大约 50~80 mg(电子分析天平称量)放入研钵中, 缓慢加入液氮, 待组织变脆, 反复研磨 15 min, 期间加 3 次液氮, 等到研磨充分, 看不到明显的颗粒, 加入 4℃预冷的 TRIzol(每 10 mg 组织加入 200 μL TRIzol)充分和组织接触, 快速裂解组织。继续碾磨至澄清后转移至离心管中, 加入氯仿充分混匀, 室温静置 5 min, 10 000 r·min⁻¹离心 15 min, 吸出上清。离心后取上清至另一 1.5 mL 离心管中, 加入等体积的异丙醇, 上下轻轻摇晃 15 s, 室温静置 10 min; 10 000 r·min⁻¹离心 10 min, 弃上清液, 加入 75%乙醇(DEPC 水配制)漂洗 RNA 沉淀 2 次, 涡旋后 8 000 r·min⁻¹离心 5 min, 弃尽上清(除尽乙醇), 室温干燥 RNA 沉淀, 每 20 mg 组织加入 10 μL 的 DEPC 水溶解, 测定 RNA 浓度。

1.3.2 优化后的 RNA 提取方法 从-80℃冰箱中取肺癌组织大约 50~80 mg(电子分析天平称量), 用高温灭菌处理并经 DEPC 水浸泡过的手术剪快速剪碎; 取 DEPC 水处理的 1.5 mL 离心管, 加入 4℃预冷的 TRIzol 试剂(每 10 mg 组织加入 200 μL TRIzol); 剪碎的组织立即放入含 TRIzol 试剂的离心管中; 用组织匀浆机匀浆剪好的肺癌组织(匀浆在冰水浴中进行), 保证匀碎; 10 000 r·min⁻¹离心 10 min, 去除不溶性杂质, 转移上清液至另一 1.5 mL 离心管中, 室温放置 2~3 min, 以充分裂解核蛋白复合体; 加入 0.2 mL 氯仿, 涡旋充分混匀, 室温静置 5 min, 10 000 r·min⁻¹离心 15 min; 吸出上清, 重复上步(重复 1 次氯仿抽提)。离心后取上清至另一 1.5 mL 离心管中, 加入等体积的异丙醇, 上下轻轻摇晃 15 s, 室温静置 10 min; 10 000 r·min⁻¹离心 10 min, 弃上清液, 加入 75%乙醇(DEPC 水配制)漂洗 RNA 沉淀 2 次, 涡旋后 8 000 r·min⁻¹离

心 5 min; 弃尽上清(除尽乙醇), 室温干燥 RNA 沉淀, 每 20 mg 组织加入 10 μL 的 DEPC 水溶解, 测定 RNA 浓度。

1.4 总 RNA 的质量鉴定

紫外分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 处吸收的比值, 按常规方法计算 RNA 含量。取 3 μL 总 RNA 样品与 1 μL 溴酚蓝指示剂上样缓冲液混合, 以 1 倍的 TAE 为电泳缓冲液, 在 2%的琼脂糖凝胶(含 EB)上和 200 V 电压条件下电泳 30 min, 260 nm 短波紫外灯下检测 RNA 的质量。

1.5 实时荧光定量 PCR

提取的总 RNA 使用试剂盒方法逆转录得到 cDNA, 将 cDNA 产物加入 PCR 反应体系中进行扩增。PCR 的扩增条件如下(总反应体系为 10 μL): 1 μL cDNA, 正反引物(分别加 0.5 μL), 1 μL ROX II(10×), 2 μL H₂O, 5 μL Taq PCR Master Mix(2×), 混匀。启动 PCR 仪, 设定程序, 先 95℃变性 30 s, 然后进行 PCR 循环(95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 循环 40 次), 末次循环后测定熔解曲线, 各引物序列如下^[4]: GAPDH, 正向 5'-GTCATCCATGACAACCTTGG-3', 反向 5'-GAGCTTGACAAAGTGGTCGT-3'; ERCC1, 正向 5'-CTGGGAATTTGGCGACGTAA-3', 反向 5'-ATGGATGTAGTCTGG GTGCAG-3'; RRM1, 正向 5'-ACTAAGCACCTGACTATGCTATCC-3', 反向 5'-CTTCCATCACATCACTGAACA CTTT-3'; BRCA1, 正向 5'-CCCATTTTCCTCCCG CA-3', 反向 5'-GGACCTTGGTGGTTTCT-3'。反应结束后, 由软件自动得出荧光反应曲线以及每个标本反应体系的扩增效率及 CT 值。将实时荧光定量 PCR 所得数据(CT 值)用 2^{-ΔΔCT} 法处理, 得出目的基因相对于管家基因(GAPDH)的相对表达量后再进行统计分析。

1.6 统计学处理

以 SPSS 18.0 统计软件分析数据, 采用 Wilcoxon 秩和检验法分析肺癌组织和正常组织、鳞癌组织和腺癌组织、男性腺癌组织和女性腺癌组织的基因表达水平的差异, 以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RNA 纯度及质量分析

OD260/OD280 的比值可以表示 RNA 的纯度。本实验采取 2 种不同方法分别提取了 10 例肺癌组织的总 RNA, 结果显示, 传统方法的 RNA 浓度

和纯度分别为 $(0.76\pm 0.07)\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 1.87 ± 0.04 , 优化方法的 RNA 浓度和纯度分别为 $(1.12\pm 0.07)\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 1.95 ± 0.03 , 2 种方法测得的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 比值都在 1.8~2.0 内, 但是用优化后方法提取的 RNA 浓度明显高于传统提取方法 ($P<0.001$)。

为了进一步检测所提总 RNA 的质量, 用 2% 的琼脂糖凝胶甲醛变性电泳检测, 结果显示 2 种方法 28S 和 18S 条带都清晰可见, 见图 1。肉眼比较 2 种方法的清晰度和亮度, 用优化后方法提取的 RNA 浓度高于传统提取方法。

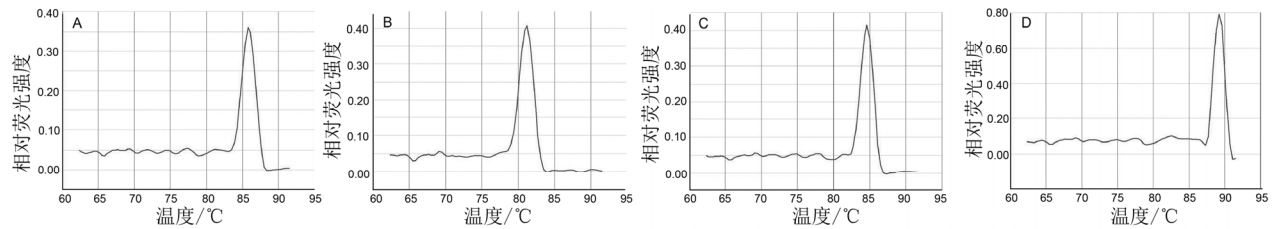


图 1 总 RNA 电泳结果
Fig. 1 Result of total RNA electrophoresis

2.2 目标基因的定量和熔解曲线

熔解曲线分析结果见图 2。由图可见, 熔解峰单一, 结果具有良好特异性。结果表明目的基因和管家基因具有相一致的扩增效率, 因而实验设计无需建立标准曲线便能够对实验数据进行相对定量分析。

图 2 熔解曲线
A-ERCC1; B-RRM1; C-BRCA1; D-管家基因。

Fig. 2 The melting curve
A-ERCC1; B-RRM1; C-BRCA1; D-house-keeping gene.

2.3 肺癌组织和正常组织基因表达水平的差异

基因表达为 ERCC1、RRM1、BRCA1 对 GAPDH 的相对 mRNA 表达水平。本实验发现 ERCC1、RRM1 和 BRCA1 在肺癌组织中表达量均显著高于正常组织 ($P<0.05$ 或 0.01), 表明肿瘤组织存在基因损伤, 使 DNA 修复基因的表达增加, 结果见表 1。

2.4 鳞癌组织和腺癌组织基因表达水平的差异

35 例肿瘤组织样本中(除去腺鳞癌 1 例),

RRM1 在肺鳞癌中的表达显著高于腺癌 ($P<0.05$); ERCC1 和 BRCA1 在不同病理类型(腺癌、鳞癌)的肿瘤组织中表达无显著性差异, 结果见表 1。

2.5 男性腺癌组织和女性腺癌组织的基因表达水平的差异

随后笔者考察了 ERCC1、RRM1 和 BRCA1 在腺癌组织中的表达与性别之间的关系, 10 例男性腺癌组织和 10 例女性腺癌组织中, ERCC1、RRM1 和 BRCA1 的表达均无显著性差异, 结果见表 1。

表 1 基因表达水平比较

Tab. 1 Comparison of gene expression levels

基因	组织		病理分型		性别	
	肺癌	正常	腺癌	鳞癌	男	女
ERCC1	$16.25\pm 1.22^{2)}$	6.83 ± 0.78	7.86 ± 1.32	17.55 ± 3.03	5.73 ± 1.33	9.99 ± 1.89
RRM1	$5.78\pm 0.33^{2)}$	1.23 ± 0.12	2.65 ± 0.18	$7.93\pm 2.45^{3)}$	1.78 ± 0.73	3.52 ± 1.01
BRCA1	$0.92\pm 0.21^{1)}$	0.33 ± 0.07	0.55 ± 0.23	1.26 ± 0.14	0.39 ± 0.18	0.71 ± 0.12

注: 与正常组织相比, $^{1)}P<0.05$, $^{2)}P<0.01$; 与腺癌相比, $^{3)}P<0.05$ 。

Note: Compared with normal tissue, $^{1)}P<0.05$, $^{2)}P<0.01$; compared with adenocarcinoma, $^{3)}P<0.05$.

3 讨论

目前 IIIA 期肺癌术后辅助化疗基本遵循肺癌 NCCN 指南推荐的以铂类为基础的第 3 代新药联合的化疗方案^[5], 但个体之间对辅助化疗的疗效差异很大, 仅部分患者受益, 通过基因、蛋白等生

物学指标的检测, 筛选出能够从辅助化疗中受益的个体或人群, 对于实现 NSCLC 个体化治疗、提高个体疗效、降低不良反应至关重要。ERCC1、RRM1、BACA1 都是调控 DNA 代谢和损伤修复的 3 种重要核酸因子。ERCC1 定位于 19 号染色体上,

是核苷酸剪切修复家族中的一个重要成员^[6]。RRM1 是核苷酸还原酶调节 M1 亚单位,当 ERCC1 与修复基因将 DNA 链中受损的部分切除后, DNA 链上留下的空缺就由 RRM1 提供的核苷酸来填补^[7]。BRCA1 在基因修复方面也扮演了一个重要角色,参与核苷酸剪切修复和同源重组修复^[8]。通过检测肿瘤组织中 ERCC1、RRM1 和 BRCA1 基因的表达水平,筛选出辅助化疗受益的患者,是当前肺癌研究领域的热点^[9]。

传统 RNA 提取的 TRIzol 法,操作需要在液氮中进行,采用冷冻条件下进行研磨提取,过程比较繁琐,成本较高^[10]。在提取组织 RNA 过程中,最重要的问题是防止 RNA 酶对 RNA 的降解,因此,笔者首先总结了肿瘤组织 RNA 提取过程中的几个关键点:①要在操作过程中创造一个无 RNA 酶的环境;②抑制内源性 RNA 酶的活性;③使用 RNA 酶的特异性抑制剂。在此背景下,笔者对 TRIzol 法进行优化,建立了简便、易行提取组织 RNA 的方法,并采用实时荧光定量 PCR 技术检测 NSCLC 患者 ERCC1、RRM1 和 BRCA1 的 mRNA 表达水平,本研究具有操作简便、成本低、不需复杂设备的优点。本方法优化以下几方面:①肿瘤组织匀浆之前进行快速剪碎处理,在较短时间内放入 TRIzol 试剂中,保证组织匀浆彻底并充分裂解核蛋白复合体,这有利于获得高产量的 RNA;②采用 TRIzol 直接进行匀浆处理,避免外界 RNA 酶的干扰,同时抑制内源性 RNA 酶的活性;③用氯仿抽提 2 次,并小心吸取 RNA 上清,避免接触到蛋白和 DNA 层,提高 RNA 纯度。本方法操作简单、快速,并且获得的 RNA 质量令人满意,在甲醛变性琼脂糖凝胶电泳上可清晰显出 2 条 RNA 带,说明该方法中 RNA 很少降解。纯度分析及浓度测定结果表明,和传统的方法相比,优化后的方法提取 RNA 纯度高、结构完整性好,能满足各种基因表达和定量检测实验的需要,为后续研究构建了理想的平台。

本研究用优化后的方法对 36 例 NSCLC 患者的肿瘤组织和正常组织标本中 ERCC1、RRM1 和 BRCA1 的 mRNA 表达水平进行测定。结果表明,肿瘤组织中 ERCC1、RRM1 和 BRCA1 的表达水平明显高于正常组织,这提示 ERCC1、RRM1 和 BRCA1 的表达水平与肿瘤增殖活性密切相关;ERCC1、RRM1 和 BRCA1 在腺癌组织中的表达在

男女之间虽然无统计学差异,但绝对值女性普遍比男性的表达要高,有待大样本量的研究验证;而 RRM1 在肺鳞癌中的表达高于腺癌,ERCC1 和 BRCA1 在不同病理类型(腺癌、鳞癌)中表达无显著性差异,这和临床肿瘤的病理类型与术后辅助化疗的疗效密切相关也相符。

通过对 36 例患者进行电话随访(失访 2 名),截止 2015 年 11 月 30 日,10 例患者已死亡,3 年的生存率为 24/34(70.6%)。能否通过上述 3 个基因的表达来预测 NSCLC 化疗疗效,有效地筛选获益人群,笔者将继续随访患者的生存状态和进一步实验来研究证实。

REFERENCES

- [1] AUER H, LYIANARACHCHI S, NEWSOM D, et al. Chipping away at the chip bias: RNA degradation in microarray analysis [J]. *Nat Genet*, 2003, 35(4): 292-293.
- [2] 赵爽,勾文峰,杨雪峰,等. 电动冻结破碎法提取组织蛋白和 RNA 的实验观察[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2014, 30(5): 576-578.
- [3] LI D M, REN W C, WANG X, et al. A method with TRIzol® reagent and liquid nitrogen to extract high-quality RNA from rat pancreas [J]. *J Xi'an Jiaotong Univ(Med Sci)(西安交通大学学报: 医学版)*, 2009, 30(5): 639-642.
- [4] CHEN J, LI M W, ZHANG G B, et al. Detection of RRM1, ERCC1 and BRCA1 gene expression in non-small cell lung cancer tissues and peripheral blood by SYBR real-time fluorescent quantitative PCR [J]. *J Zhejiang Univ(Med Sci)(浙江大学学报: 医学版)*, 2010, 39(6): 628-633.
- [5] SUN H Y, XU F H, GUO R R. Gemcitabine plus platinum chemotherapy compared with other platinum containing regimens in advanced non-small-cell lung cancer: a Meta-analysis of survival outcomes [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2014, 31(7): 884-890.
- [6] TAKAHATA C, MASUDA Y, TAKEDACHI A, et al. Repair synthesis step involving ERCC1-XPF participates in DNA repair of the Top1-DNA damage complex [J]. *Carcinogenesis*, 2015, 36(8): 841-851.
- [7] ZHAO H, ZHANG H, DU Y, et al. Prognostic significance of BRCA1, ERCC1, RRM1, and RRM2 in patients with advanced non-small cell lung cancer receiving chemotherapy [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(12): 12679-12688.
- [8] JIANG Q, GREENBERG R A. Deciphering the BRCA1 tumor suppressor network [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(29): 17724-17732.
- [9] ZHAO M Q, WANG H B. Study on the relationship between BRCA1, ERCC1, RRM1 protein expression and sensitivity of non-small-cell lung cancer to chemotherapeutic drug *in vitro* [J]. *J Nantong Univ(Med Sci)(南通大学学报: 医学版)*, 2014, 34(4): 251-254.
- [10] YANG Z, CHENG C F, HUANG X Y, et al. Trizol extraction of total RNA from neonatal mouse brain tissue for optimization [J]. *J Apoplexy Nerv Dis(中风与神经疾病杂志)*, 2012, 29(2): 155-156.

收稿日期: 2015-09-02