

践行四川大学“两个伟大”暨庆祝四川大学学报（医学版）创刊60周年系列图书

现代医学 实践探析

——肿瘤分册

XIANDAI YIXUE SHIJIAN TANXI
ZHONGLIU FENCE

李为民 别明江 / 主编

汤洁 余琳 吕熙 陈杉 / 副主编

四川大学学报（医学版）编辑部 / 编

四川大学出版社

践行四川大学“两个伟大”暨庆祝四川大学学报（医学版）创刊60周年系列图书

现代医学 实践探析

——肿瘤分册

XIANDAI YIXUE SHIJIAN TANXI
ZHONGLIU FENCE

李为民 别明江 / 主编
汤洁 余琳 吕熙 陈杉 / 副主编

四川大学学报（医学版）编辑部 / 编



四川大学出版社

责任编辑:杨丽贤
责任校对:龚娇梅
封面设计:墨创文化
责任印制:王 炜

图书在版编目(CIP)数据

现代医学实践探析. 肿瘤分册 / 李为民, 别明江主
编. —成都: 四川大学出版社, 2018. 7
ISBN 978-7-5690-2021-2

I. ①现… II. ①李… ②别… III. ①临床医学—研
究②肿瘤—诊疗—研究 IV. ①R4

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2018) 第 148404 号

书名 现代医学实践探析——肿瘤分册

主 编 李为民 别明江
出 版 四川大学出版社
地 址 成都市一环路南一段 24 号 (610065)
发 行 四川大学出版社
书 号 ISBN 978-7-5690-2021-2
印 刷 郫县犀浦印刷厂
成品尺寸 210 mm×285 mm
插 页 2
印 张 14
字 数 416 千字
版 次 2018 年 8 月第 1 版
印 次 2018 年 8 月第 1 次印刷
定 价 59.00 元



版权所有◆侵权必究

◆读者邮购本书, 请与本社发行科联系。
电话: (028)85408408/(028)85401670/
(028)85408023 邮政编码: 610065
◆本社图书如有印装质量问题, 请
寄回出版社调换。
◆网址: <http://www.scupress.net>

目 录

• 肺癌分子病理与临床诊疗进展 •

肺癌诊治水平的进展与提高	李为民, 刘 丹, 卢 铀 (3)
核糖体蛋白 S6 shRNA 慢病毒载体的构建及其对肺腺癌 A549 细胞株增殖的影响	陈勃江, 李为民, 刘 丹, 张 雯 (8)
携带人 AKT2、PDK1、BAD 基因的慢病毒表达载体的构建及其在 293T 细胞中的表达	朱 静, 陈勃江, 黄 娜, 李为民 (14)
REG γ 促进肺癌细胞的恶性生物学行为	覃 晴, 郭福春, 罗顺涛, 李晓玉, 刘晓柯, 王永生 (20)
2000 年与 2010 年四川大学华西医院收治肺癌患者的临床流行病学特征及病理类型分布特点	姚晓军, 张洪伟, 蒲 强, 刘伦旭 (26)
局限性磨玻璃影在 I 期肺癌中的诊断价值	黄 燕, 王佑娟, 王威亚, 蒲 强, 李为民 (35)
32 例晚期及术后复发肺肉瘤样癌患者的治疗及生存分析	熊伟杰, 张新星, 黄媚娟, 陈 柳, 宋玲玲, 薛建新, 王永生, 卢 铀 (40)

• 肺癌的早期诊断 •

肺癌早期诊断及临床意义	李为民, 赵 爽, 刘伦旭 (47)
TTF-1、NapsinA、P63 和 CK5/6 在肺癌组织的表达与分型诊断的价值	余 何, 李 镭, 刘 丹, 李为民 (53)
Rh-Endostatin 作用肺癌血管正常化时相与 CA9 表达的关系初探	何 朗, 孙永红, 刘 康, 徐幸幸, 杨 蜜, 吴 迅, 蒋 莉 (60)
支气管内超声引导针吸活检术对肺门、纵隔淋巴结肿瘤和结核的诊断价值	王 业, 朱 辉, 杨 赛, 王 可, 田攀文, 史静宇, 韩青兵, 罗永霄, 罗凤鸣, 李为民 (66)
6 458 例肺癌患者临床特征及诊疗现状分析	李 镭, 刘 丹, 张 立, 周 萍, 宋 娟, 程 越, 余 何, 赵 爽, 李为民 (72)
肺磨玻璃结节的外科诊断和治疗分析——附 663 例报告	韦诗友, 赵珂嘉, 郭成林, 梅建东, 蒲 强, 马 林, 车国卫, 陈龙奇, 伍 仁, 王 允, 寇瑛琍, 林一丹, 李为民, 刘伦旭 (80)

· 泌尿系统肿瘤的综合治疗 ·

- 在规范化诊治基础上改进和提高泌尿系统肿瘤综合治疗水平 李响, 李虹 (87)
- BNIP3 在肾透明细胞癌中的表达及其与 HIF-1 α 、VEGF 的相关性研究
..... 罗琳, 熊子兵, 曾浩, 陈锐, 陈雪芹, 张朋, 李响 (93)
- 结缔组织生长因子受体结合区域的预测及筛选 张朋, 朱育春, 张立, 李响 (98)
- 原发性肾平滑肌肉瘤 13 例临床病理分析
..... 熊子兵, 石明, Kunwar Ashok, 陈锐, 张朋, 曾浩, 李响 (102)
- 高危局限进展性肾透明细胞癌术后辅助应用干扰素- α 的生存分析
..... 夏娟, 李响, 陈雪芹, 李雄, 曾浩, 魏强, 张朋, 朱育春 (108)
- 耻骨后逆行前列腺癌根治术与逆行根治术的围手术期情况和长期并发症比较
..... 熊子兵, 石明, Kunwar Ashok, 陈锐, 张朋, 曾浩, 李响 (113)
- 根治性膀胱切除术围手术期并发症风险因素分析
..... 范钰, 石明, 熊子兵, 韩平, 张朋, 曾浩, 李响, 魏强 (118)

· 血液肿瘤的靶向治疗 ·

- 血液肿瘤靶向治疗进展 牛挺, 刘霆 (127)
- 酪氨酸激酶抑制剂治疗慢性粒细胞白血病的临床疗效分析
..... 李向龙, 朱焕玲, 刘红英, 吕素娟, 郑素萍, 吴保, 牛挺, 刘霆 (133)
- 中国西南地区老年人 EB 病毒阳性弥漫大 B 细胞淋巴瘤的临床病理特点及预后分析
..... 叶云霞, 张文燕, 李甘地, 刘卫平, 刘艳梅, 林莉, 廖殿英,
..... 郭嘉, 谢春燕, 蒋炜杰, 刘莉, 张尚福 (139)
- 儿童急性 B 前体淋巴细胞白血病 CD20 表达与临床特征及预后的相关性研究
..... 陈晓曦, 袁粒星, 张鸽, 万朝敏, 霍婉莹, 唐雪, 艾媛, 万智, 朱易萍, 高举 (146)
- GATA-2 基因高表达在 AML1/ETO 阳性急性髓系白血病中的临床意义
..... 谢惠敏, 高丽, 王楠, 徐媛媛, 李永辉, 于力, 王莉莉 (153)
- FLT3 基因突变与急性早幼粒细胞白血病髓外复发
..... 李军, 邹兴立, 刘婷婷, 蒋孟, 牛挺 (160)
- 急性白血病异基因造血干细胞移植 BFA/BuCyA 两种预处理方案的比较
..... 唐韞, 李建军, 陈心传, 刘志刚, 卢忠平, 黄晓鸥, 刘霆 (166)
- HyperCVAD 方案和 CHOP 方案治疗淋巴瘤母细胞淋巴瘤的效果分析
..... 胡原, 赵夏, 吴丽莉, 蔡昌枰, 赵维莅, 王黎 (172)

· 消化道肿瘤的内镜诊治 ·

- 消化道肿瘤的早期诊断与内镜下微创治疗 王一平, 吴俊超 (181)
- 常规内镜黏膜下剥离术与经内镜黏膜下隧道剥离术治疗食管大面积黏膜病变的疗效及并发症分析
..... 王瑾, 秦金玉, 郭天娇, 甘涛, 王一平, 吴俊超 (188)
- 内镜经黏膜下隧道切除术治疗上消化道黏膜下肿瘤的研究
..... 秦金玉, 罗斌阳, 郭天娇, 王一平, 吴俊超, 王显坤, 甘涛 (194)

表浅食管鳞癌淋巴结转移规律探讨
..... 苏 畅, 朱林林, 冯 丽, 郭天骄, 甘 涛, 杨锦林, 吴俊超, 王一平 (200)

130 例内镜下黏膜切除浅表型食管癌及食管上皮内肿瘤的病理学分析
..... 何 度, 吴 霞, 江 丹, 要文青, 刘庆林, 王艺颖, 朱林林, 秦金玉, 张文燕 (206)

表浅胃食管交界腺癌内镜分型与浸润深度相关性分析
..... 郭天娇, 马一菡, 秦金玉, 王一平, 杨锦林 (212)

附录 (219)

· 肺癌分子病理与临床诊疗进展 ·

肺癌诊治水平的进展与提高*

李为民¹, 刘 丹¹, 卢 铀²

1. 四川大学华西医院 呼吸内科 (成都 610041); 2. 四川大学华西医院 肿瘤中心 胸部肿瘤科 (成都 610041)

【摘要】 肺癌是恶性肿瘤死亡的首要原因。本专题主要针对肺癌流行病学、早期筛查及诊断以及治疗策略等热点问题进行研究, 提出目前肺癌临床流行病学及病理类型分布的变化, 阐述低剂量 CT 及孤立性结节影像学特点在肺癌早期筛查诊断中的价值, 研究晚期脑转移肺癌及肺肉瘤样癌患者的治疗策略, 并探索靶向治疗的新靶点。在规范化诊治的基础上, 通过基础研究获得新发现并逐步应用于临床, 从而提高肺癌高危人群早期筛查的准确率, 从分子病理水平对肺癌进行分子分型, 充分实现个体化治疗, 改善晚期肺癌治疗策略, 达到改善患者生存和预后的目的。

【关键词】 肺癌 早期筛查 靶向治疗

Advances and Improvements in the Diagnoses and Treatments of Lung Cancer LI Wei-min¹, LIU Dan¹, LU You². 1. Department of Respiratory Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Thoracic Center, Cancer Center, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

【Abstract】 Lung cancer is the leading cause of cancer-related death worldwide. The topics of this issue include the changes of lung cancer epidemiology and its histological characteristics, the value of low dose CT in early detection of lung cancer and the image characteristics of solitary pulmonary nodule in early diagnosis of lung cancer, the advances in the therapeutic strategies for lung cancer with brain metastases and pulmonary sarcomatoid carcinoma, and new potential targets of molecular targeted therapy in lung cancer. In order to more effectively improve the survival and prognosis of the patients with lung cancer, it is necessary to strengthen basic research on the molecular pathogenesis of lung cancer, and to translate the advances in basic research into the efforts of exploring the specific and sensitive diagnosis tools for lung cancer, and so increasing the accuracy of early screening and diagnosis, as well as classifying the lung cancer by molecular pathology to achieve individualized therapy.

【Key words】 Lung cancer Early screening for lung cancer Target therapy

肺癌是恶性肿瘤死亡的首要原因。近年来, 伴随环境及人们生活习惯的改变, 以及人们对肺癌认识的不断深入, 肺癌无论在流行病学、早期筛查, 还是诊断技术、治疗方式上都发生了巨大变化。本专题针对这些热点问题进行研究, 分析目前肺癌的临床流行病学及病理类型分布、早期筛查及晚期肺癌治疗的新进展, 并从分子水平研究肺癌分子标志物, 探索靶向治疗的新靶点。本文将从以下几个方面进行简要述评。

1 流行病学变化

近 50 年来, 肺癌发病及死亡率呈逐年快速增高的趋势, 全球肺癌的男性发病率增加了 10~30 倍, 而女性增加了 3~8 倍^[1]。2008 年我国 36 个肿瘤登记点发布的数据显示, 肺癌新发病例数的约 52.2 万, 占有恶性肿瘤病例数 18.5%; 肺癌死亡病例数约 45.3 万, 占有恶性肿瘤死亡例数的 23.1%, 发病率和死亡率均居恶性肿瘤之首^[2]。未来 20 年, 我国的肺癌发病数和死亡数仍可能持续上升。

随着戒烟措施的实施以及人们戒烟意识的加强, 肺癌患者的性别构成比发生了变化, 男性肺癌发病率逐渐达到平台, 甚至开始出现下

* 国家自然科学基金 (No. 81372504、No. 81241068、No. 81201851) 资助

降趋势,而女性肺癌发病率却快速上升。2012年欧洲呼吸年会公布的数据显示,相比2007年,2012年肺癌患者中,男性患者死亡率降低了10%,而女性增加了7%。在中国,女性肺癌发病率高于欧洲国家,尤其是非吸烟女性。研究结果认为这与中国女性承受更多的烹饪油烟污染及被动吸烟相关。除此之外,欧洲及日本的研究数据发现,青年肺癌发病率呈逐年上升趋势^[3,4]。尽管国内尚无大规模数据统计,但是多个地区单中心研究结果都显示肺癌发病有年轻化的趋势,青年患者中以肺腺癌多见,且女性所占比例较高,吸烟患者所占比例较低,这种改变和工业化进程、大气污染愈加严重有着不可分割的关系。

另一变化趋势是肺癌病理类型分布在发生变化。过去吸烟所致肺癌患者中,肺鳞癌最多,而从20世纪末开始,肺腺癌发病率不断增加,目前已取代肺鳞癌,成为最常见的病理类型。姚晓军等^[5]对四川大学华西医院2167例肺癌患者进行分析后同样发现,近十年内,肺癌女性患者构成比明显上升;病理类型分布上,肺腺癌及小细胞癌构成比明显上升,而肺鳞癌由44.8%下降至28.7%。

因此,目前肺癌流行病学特点的变化,与社会环境、大气污染、生活习惯、职业暴露及遗传背景等均密切相关,而关注肺癌流行病学特征,更有利于提高早期诊断率,避免漏诊及误诊,尽早选择针对性的治疗方案。

2 肺癌早期筛查的进展

2.1 高危人群

肺癌早期筛查应主要在高危人群中进行。高危人群主要涵盖高龄和有吸烟史的人群。目前各个研究及指南对高危人群的定义标准尚不一致,2013年美国癌症综合网络(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)发布的非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)指南定义高危人群为55~74岁,且吸烟史30包/年(现在或既往),而戒烟不超过15年;或者年龄大于50岁,吸烟史20包/年,且合并一项额外的高危因素(除外二手烟)^[6]。而法国Blanchon等^[7]的研究对象是50~75岁无症

状、当前或既往吸烟每天多于15支,持续至少20年(戒烟不超过15年)的人群。前列腺、肺、结肠、卵巢癌筛查试验(PLCO)肺癌研究还包含了社会经济状况、体质指数、肺癌家族史、慢性阻塞性肺疾病(COPD)病史等危险因素,更全面地分析了肺癌的高危因素。由PLCO开发出的PLCO模型较美国全国性肺癌行动计划(NLST)标准敏感性更高,特异性与NLST标准相当,但是PLCO模型复杂,临床应用受限^[8]。

2.2 低剂量CT(low-dose computer tomography, LDCT)筛查

2013年NCCN发布的NSCLC指南推荐高危人群应当每年使用LDCT进行肺癌筛查。早期肺癌行动计划(ELCAP)研究结果发现,使用LDCT筛查非钙化结节阳性率为胸部X线检查(CXR)的3倍,筛查出肺癌阳性率为CXR的4倍,Ⅰ期肺癌筛查阳性率为CXR的6倍^[9]。但是,利用LDCT在高危人群中进行早期筛查能否降低肺癌患者的死亡率尚存在争议。在丹麦及德国分别进行的两项早期肺癌筛查的随机研究,均未获得CT筛查能降低肺癌死亡率的证据^[10,11];NELSON研究及美国NLST研究尽管最终死亡率分析结果尚未公布,却首次发现了LDCT筛查能够降低肺癌的死亡率,但还需要更大样本的随机对照试验进行验证^[12,13]。

LDCT筛查具有较明确的筛查程序,临床操作性较高。如NCCN推荐在高危人群中进行LDCT筛查,将发现结节分为实性或部分实性结节,以及磨玻璃样影(ground glass opacity, GGO)、磨玻璃结节(ground glass nodule, GGN)。非实性结节(nonsolid nodule, NS)。根据结节大小及实性成分比例不同,调整随访复查LDCT时间及进一步检查措施。尽管LDCT筛查方法能提高肺癌的早期诊断率,但特异性较差,使患者面临精神负担、过度诊断及过度治疗的风险。

早期肺癌往往以单发结节为表现,其中GGO是肺癌的一种重要CT征象,在CT影像上表现为密度增加、局灶性云雾状密度影,阴影内血管和支气管纹理清晰可辨。越来越多的研究^[14]认为,GGO与早期肺腺癌密切相关,结

节实性成分越多,恶性程度越大,病情越趋于疾病晚期。黄燕等^[15]研究发现局限性磨玻璃影(focal ground glass opacity, fGGO)总恶性率为71.4%。混合型磨玻璃影(mixed ground glass opacity, mGGO)、单纯型磨玻璃影(pure ground glass opacity, pGGO)和实性病灶的恶性率分别为75.0%、60.0%和48.2%。恶性fGGO毛刺、分叶、血管束征的发生率均超过70%,且高于良性组。这说明磨玻璃样结节的恶性诊断率相当高,在临床诊断时需要提高警惕。

3 晚期肺癌靶向治疗的进展

晚期肺癌的治疗以综合治疗为主。过去,肺癌的治疗策略往往是“一刀切”方案,而传统化疗方案逐渐步入平台期,标准含铂双药化疗方案的有效率仅为25%~35%,中位生存期为8~10月^[16]。但随着分子靶向治疗的应用,晚期肺癌治疗方案的制订已不仅要考虑性别、年龄、体力评分、TNM分期及病理类型等因素,还需要重视肿瘤的基因特征,以制订个体化治疗方案。

靶向治疗的出现标志着晚期肺癌的治疗进入了新纪元,跨入了个体化治疗时代。目前已在临床广泛应用的靶向药物主要包括表皮生长因子酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI)、抗EGFR单克隆抗体、肿瘤血管生长抑制药,以及针对棘皮动物微管相关蛋白样4(echinodermmicrotubule-associated protein-like 4, EML4)-间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, ALK)融合基因突变靶点的抑制剂。

EGFR是具有酪氨酸激酶活性的跨膜蛋白。EGFR酪氨酸激酶功能区的突变位点主要集中在第18~21外显子,EGFR突变是EGFR-TKI治疗疗效的预测生物标记。2011年,美国肿瘤学会建议,对于EGFR突变阳性患者,EGFR-TKI作为晚期NSCLC患者的一线治疗方案;2013年,NCCN指南提出肺癌组织学分型和分子分型的重要性,推荐腺癌患者需常规进行EGFR突变及ALK检测。目前我国上市的EGFR抑制剂吉非替尼、埃罗替尼及厄洛替尼

等,以及EGFR的单克隆抗体西妥昔单抗都已在临床广泛应用。

EML4-ALK融合基因靶点是NSCLC新兴生物标记和治疗靶点,有报道称2%~11%的肿瘤患者EML4-ALK呈阳性,而罕见于小细胞肺癌^[17]。在NSCLC患者中,EML4-ALK重排常见于年轻非吸烟腺癌患者。虽然NSCLC患者EML4-ALK阳性率较低,但因其独特的分子病理特点以及临床特征,研究者们认为EML4-ALK阳性是一种独立的肺癌亚型,它与EGFR突变是互为独立的分子事件。目前,克唑替尼是唯一批准应用于临床的ALK抑制剂。2009年美国临床肿瘤学会(ASCO)报道,克唑替尼治疗ALK阳性NSCLC患者,客观缓解率为57%,缓解时间为1~15月;随后ASCO更新了I期克唑替尼的临床试验结果,客观有效率达61%,中位生存时间1年的概率为81%。2012年,NCCN指南推荐克唑替尼作为ALK阳性的晚期NSCLC患者的一线治疗方案。

KRAS突变是EGFR-TKI治疗反应的阴性预测因子,主要引起原发耐药^[18]。KRAS突变主要见于非亚裔、肺黏液腺癌及吸烟患者,而且在肺癌中KRAS突变与EGFR突变是相互排斥的,目前对于KRAS突变患者,各个指南尚不推荐行靶向治疗。但是,2012年ASCL会议上Janne等^[19]的一项前瞻性研究,首次报告了对KRAS突变的肺癌患者采用司美替尼联合多西他赛的靶向治疗方案后患者临床获益。随后,BATTLE试验^[20]则证明KRAS突变患者可获益于索拉菲尼治疗,Riely等^[21]也发现采用哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)抑制剂地舒单抗治疗KRAS突变患者较安慰剂无进展生存期更长。因此,KRAS突变患者是否能够采用EGFR-TKI治疗,或采用其他更有效的靶向药物治疗尚需更大规模的临床试验。

肿瘤血管生长抑制剂是指作用于血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的单克隆抗体,如贝伐单抗、索拉菲尼等。Ⅲ期随机对照临床试验ECOG4599研究分析了贝伐单抗联合卡铂、紫杉醇方案治疗晚期非鳞癌非小细胞肺癌疗效,结果显示联合贝伐单抗后患者中位生存时间首次超过了1年^[22]。

因此,贝伐单抗可作为晚期肺癌的治疗选择,但其仅适用于非鳞癌患者,且易发生出血风险,需要严格把握适应证。

靶向药物在 NSCLC 脑转移治疗中的作用研究,也越来越多地受到学者们的关注。Kim 等^[23]回顾性分析,吉非替尼单药治疗 NSCLC 脑转移可将患者的中位生存期延长至 9~13.5 个月。Welsh 等^[24]Ⅱ期研究全脑放疗 (whole brain radiotherapy, WBRT) 联合厄洛替尼治疗 NSCLC 脑转移的反应率达 85%,中位生存期为 11.81 个月。2013 年 NCCN 指南推荐,EGFR 突变阳性患者发生脑转移,建议局部治疗或 WBRT 放疗同时,联合厄洛替尼 (部分地区可用吉非替尼) 或阿法替尼治疗。

尽管晚期肺癌的靶向治疗获得了突破性进展,但是对于 EGFR 突变及 ALK 阴性或未定性的肺癌患者,标准含铂化疗方案仍为首选;对于临床少见肺癌病理类型,如肺肉瘤样癌,晚期治疗方案的研究尚少,但熊伟杰等^[25]的研究分析仍提示与其他同期 NSCLC 患者效果相似,铂类联合 3 代细胞毒性药物是Ⅳ期 NSCLC 患者的一线治疗标准方案。为提高这些患者的生存期及治疗反应,更全面的新型靶点仍需不断探索。

4 潜在靶点的研究进展

有关肺癌潜在靶标的探索始终是热点研究。如 mTOR 靶点,通过激活 PI3K 通路参与调节细胞周期,其抑制剂依维莫司等单药或联合治疗研究都已进入Ⅰ期/Ⅱ期临床试验。纤维细胞生长因子受体 1 (FGFR1) 通过 4 条不同信号通路,包括 RAS-RAF-MAPK、PI3K/Akt、STAT 及 PLC γ 通路,在细胞凋亡、增殖、血管生成及远处转移等过程中发挥作用。以 FGFR1 为靶点的小分子抑制剂 BIBF1120 已有Ⅱ期临床试验结果,发现以铂类为基础的化疗失败后的晚期 NSCLC 患者,接受 BIBF1120 治疗后中位生存期提高^[26]。

大量处于研究初级阶段的靶点也不断涌现,比如陈勃江等^[27]发现特异性抑制核糖体蛋白 S6 对肺腺癌细胞株增殖有显著抑制;覃晴等^[28]发现蛋白酶体激活因子 γ (REG γ) 在肺癌组织中

的表达高于癌旁正常组织,对肺癌增殖、迁移具有明显促进作用;朱静等^[29]前期研究发现 PI3K/Akt 信号通路中的 AKT2、BAD 及 PDK1 靶点在 NSCLC 中发挥关键作用。这些都有望成为肺癌靶向治疗的新靶点,有利于进一步完善肺癌分子分型图谱,指导靶向治疗。

综上,提高早期筛查及早期诊断率是降低肺癌死亡率的根本,改善肺癌治疗策略是提高肺癌患者生存时间的关键。肺癌的诊治已进入崭新的分子时代,在传统的病理分型基础上,对肺癌进行分子分型,实施个体化治疗方案将成为肺癌临床治疗的主流,在完善“肺癌分子分型图谱”的基础上,更多肺癌患者能够从靶向治疗中获益。

参 考 文 献

- 1 钱桂生,余时沧. 肺癌流行病学最新资料与启示. 中华结核和呼吸杂志, 2012, 35 (2): 86-89.
- 2 昌盛,代敏,任建松,同d等. 中国 2008 年肺癌发病、死亡和患病情况的估计及预测. 中华流行病学杂志, 2012, 33 (4): 391-394.
- 3 STRAND T E, MALAYERI C, ESKONSIPO P K, *et al.* Adolescent smoking and trends in lung cancer incidence among young adults in Norway 1954-1998. *Cancer Causes Control*, 2004, 15 (1): 27-33.
- 4 MARUGAME T, YOSHIMI I, KAMO K, *et al.* Trends in lung cancer mortality among young adults in Japan. *Jpn J Clin Oncol*, 2005, 35 (4): 177-180.
- 5 姚晓军,张洪伟,蒲强,等. 2000 年与 2010 年四川大学华西医院收治肺癌患者的临床流行病学及病理类型分布特点. 四川大学学报 (医学版), 2014, 45 (2): 309-315.
- 6 NCCN guidelines version 1.2014. Non-small cell lung cancer. Naional Comprehensive Cancer Network, 2013. Available at www.nccn.org.
- 7 BLANCHON T, BRÉCHOT J M, GRENIER P A, *et al.* Baseline results of the Depiscan study: a French randomized pilot trial of lung cancer screening comparing low dose CT scan (LDCT) and chest X-ray (CXR). *Lung Cancer*, 2007, 58 (1): 50-58.
- 8 TAMMEMAGI M C, KATKI H A, HOCKING W G, *et al.* Selection criteria for lung-cancer screening. *N Engl J Med*, 2013, 368 (8): 728-736.
- 9 HENSCHKE C I. Early lung cancer action project: overall design and findings from baseline screening. *Cancer*, 2000, 89 (11 Suppl): 2474-2482.
- 10 SAGHIR Z, DIRKSEN A, ASHRAF H, *et al.* CT screening for lung cancer brings forward early disease. The randomised Danish lung cancer screening trial: status after five annual screening rounds with low-dose CT. *Thorax*, 2012, 67 (4): 296-301.
- 11 BECKER N, MOTSCH E, GROSS M L, *et al.* Randomized study on early detection of lung cancer with MSCT in Germany: study design and results of the first screening round. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138 (9): 1475-1486.
- 12 HOREWEG N, VAN DER AALST C M, THUNNISSEN E, *et al.* Characteristics of lung cancers detected by computer tomography screening in the randomized NELSON trial. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013, 187

- (8): 848-854.
- 13 ABERLE D R, ADAMS A M, BERG C D, *et al.* Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med*, 2011, 365 (5): 395-409.
- 14 NAKATA M, SAEKI H, TAKATA I, *et al.* Focal ground-glass opacity detected by low-dose helical CT. *Chest*, 2002, 121 (5): 1464-1467.
- 15 黄燕, 王佑娟, 王威亚, 等. 局限性磨玻璃影在 I 期肺癌中的诊断价值. *四川大学学报 (医学版)*, 2014, 45 (2): 316-319.
- 16 ETTINGER D S, AKERLEY W, BEPLER G, *et al.* Non-small cell lung cancer. *J Natl Compr Canc Netw*, 2010, 8 (7): 740-801.
- 17 CHENG L, ALEXANDER R E, MACLENNAN G T, *et al.* Molecular pathology of lung cancer: key to personalized medicine. *Mod Pathol*, 2012, 25 (3): 347-369.
- 18 南娟, 曹志成. 肺癌的个体化靶向治疗. *中国肺癌杂志*, 2013, 16 (8): C21-34.
- 19 JANNE A P, SHAW T A, PEREIRA J R, *et al.* Phase II double-blind, randomized study of selumetinib (SEL) plus docetaxel (DOC) versus DOC plus placebo as second-line treatment for advanced KRAS mutant non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)*, 2012, 30 (15 Suppl): 7503.
- 20 KIM E S, HERBST R S, WISTUBA II, *et al.* The BATTLE trial: personalizing therapy for lung cancer. *Cancer Discov*, 2011, 1 (1): 44-53.
- 21 RIELY J G, BRAHMER R J, PLANCHARD D, *et al.* A randomized discontinuation phase II trial of ridaforolimus in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with KRAS mutations. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)*, 2012, 30 (15 Suppl): 7531.
- 22 LOPEZ-CHAVEZ A, YOUNG T, FAGES S, *et al.* Bevacizumab maintenance in patients with advanced non-small-cell lung cancer, clinical patterns, and outcomes in the Eastern Cooperative Oncology Group 4599 Study: results of an exploratory analysis. *J Thorac Oncol*, 2012, 7 (11): 1707-1712.
- 23 KIM J H, KIM H S, KWON J H, *et al.* Systemic chemotherapy after cranial irradiation in patients with brain metastases from non-small cell lung cancer: a retrospective study. *Lung Cancer*, 2009, 63 (3): 405-409.
- 24 WELSH J W, KOMAKI R, AMINI A, *et al.* Phase II trial of erlotinib plus concurrent whole-brain radiation therapy for patients with brain metastases from non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 2013, 31 (7): 895-902.
- 25 熊伟杰, 张新星, 黄媚娟, 等. 32 例晚期及术后复发肺肉瘤样癌患者的治疗及生存分析. *四川大学学报 (医学版)*, 2014, 45 (2): 320-323.
- 26 RECK M, KALSER R, ESCHBACH C, *et al.* A phase II double-blind study to investigate efficacy and safety of two doses of the triple angiokinase inhibitor BIBF 1120 in patients with relapsed advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*, 2011, 22 (6): 1374-1381.
- 27 陈勃江, 李为民, 刘丹, 等. 核糖体蛋白 S6 shRNA 慢病毒载体的构建及其对肺腺癌 A549 细胞株增殖的影响. *四川大学学报 (医学版)*, 2014, 45 (2): 293-298.
- 28 覃晴, 郭福春, 罗顺涛, 等. REG γ 促进肺癌细胞的恶性生物学行为. *四川大学学报 (医学版)*, 2014, 45 (2): 304-308.
- 29 朱静, 陈勃江, 黄娜, 等. 携带人 AKT2、PDK1、BAD 基因的慢病毒载体的构建及其在 293T 细胞中的表达. *四川大学学报 (医学版)*, 2014, 45 (2): 299-303.

编辑 吕 熙

核糖体蛋白 S6 shRNA 慢病毒载体的构建及其对肺腺癌 A549 细胞株增殖的影响*

陈勃江, 李为民[△], 刘 丹, 张 雯

四川大学华西医院呼吸内科 (成都 610041)

【摘要】 目的 探讨靶向抑制核糖体蛋白 S6 (rpS6) 表达的短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 慢病毒载体的构建方法及抑制 rpS6 表达对肺腺癌 A549 细胞株增殖的影响。**方法** 合成针对 rpS6 基因的双链寡核苷酸序列, 插入质粒载体 pGCsil-GFP, 转化大肠杆菌细胞, 测序鉴定插入片段; 再通过 293T 细胞转染和慢病毒包装, 收集浓缩病毒并感染肺腺癌 A549 细胞株。流式细胞技术分选强阳性表达绿色荧光蛋白 (GFP) 的细胞克隆, 荧光定量 PCR 及 Western blot 检测 rpS6 基因的 mRNA 和蛋白干扰效率。体外利用 CCK-8 试剂盒定点检测细胞的光密度 (OD) 值, 分析抑制 rpS6 表达对肺腺癌 A549 细胞株增殖能力的影响。**结果** 重组 pGCsil-sh-rpS6-GFP 质粒经测序鉴定示: 插入序列与 rpS6 干扰序列完全符合, 证实 pGCsil-sh-rpS6-GFP 质粒构建成功。sh-rpS6 慢病毒稳定感染 A549 细胞株后, 流式细胞技术分选 GFP 强阳性表达的细胞克隆比率为 86.80%。荧光定量 PCR 与 Western blot 检测示: sh-rpS6 组的 mRNA 和蛋白干扰效率分别为 (79.72±6.83)%、(83.77±12.13)%。体外增殖实验示: 与 A549 细胞相比, sh-rpS6 组在各时间点的 OD 值较对照组均下降 (均 $P<0.05$)。**结论** 构建的 sh-rpS6 慢病毒载体能稳定、有效地抑制肺腺癌 A549 细胞株 rpS6 的表达, 并有效减慢 A549 细胞株的增殖速度。

【关键词】 核糖体蛋白 S6 短发夹 RNA 肺腺癌 增殖

Construction of sh-rpS6 Lentivirus Vectors and Its Effect on Proliferation in Lung Adenocarcinoma A549 Cell Lines CHEN Bo-jiang, LI Wei-min[△], LIU Dan, ZHANG Wen, Department of Respiratory Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: weimi003@yahoo.com

【Abstract】 Objective To construct the sh-rpS6 lentivirus vector targeting ribosomal protein S6 (rpS6) and explore its effect on proliferation in lung adenocarcinoma A549 cell lines. **Methods** Sequences targeting the rpS6 gene were selected. The double strand shRNA oligo was ligated to pGCsil-GFP lentivirus vector and transformed into *E. coli*. The resulting recombinant vector was verified by sequencing. After transfection and lentivirus packing, the viral particles were collected and infected A549 cells. After selection of GFP positive cells by FACS, mRNA and protein expression levels of rpS6 were determined by real time PCR and Western blot. In the following experiment, the proliferation changes of A549 cell lines after the interference by sh-rpS6 was investigated by using CCK-8 kit. **Results** The sequencing result confirmed that pGCsil-sh-rpS6-GFP vector was successfully developed. Stably transfected A549 cell lines by sh-rpS6 were selected through FACS, with a selection ratio of 86.80%. The silencing effects of sh-rpS6 were determined by real-time PCR and Western blot, suggesting that mRNA and protein expression of rpS6 in the targeted cells reduced by (79.72±6.83)% and (83.77±12.13)%, significantly lower than those of control groups. *In vitro* showed the cell proliferation with sh-rpS6 was significantly slower than that of controls ($P<0.05$). **Conclusion** The constructed sh-rpS6 lentivirus vector could inhibit the expression of rpS6 in A549 cell lines effectively and significantly slow the cell proliferation *in vitro*.

* 国家自然科学基金 (No. 81241068, No. 81372504)、中国博士后科学基金 (2013M542281)、四川省科技厅应用基础研究 (No. 2013JY0012) 资助

[△]通信作者, E-mail: weimi003@yahoo.com

【Key words】 Ribosomal protein S6 (rpS6)

Short hairpin RNA (shRNA)

Lung adenocarcinoma

Proliferation

肺癌是全球范围内导致肿瘤相关死亡的首位恶性肿瘤^[1]。近年来,大量研究聚焦于各种癌基因的异常激活及其相关信号传导通路,为肺癌的防治开辟了新途径。蛋白质合成是基因表达的根本,主要在核糖体内完成。核糖体蛋白 S6 (ribosomal protein S6, rpS6) 是核糖体结构蛋白,有研究报道, rpS6 参与正常细胞大小的调节,其磷酸化是细胞生长与存活的关键环节^[2,3]。在食管癌^[4]、口腔癌^[5]、胰腺癌^[6]等多种恶性肿瘤中检测到 rpS6 的异常高表达,而其在肺癌中的作用鲜见报道。

由于超过 85% 的肺癌为非小细胞肺癌 (NSCLC),且腺癌的发病率逐年升高,故本研究以肺腺癌 A549 细胞株为目的细胞株,利用 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术,合成针对 rpS6 的短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 序列,以慢病毒为载体,将其转染到 A549 细胞中,特异性抑制 rpS6 的表达;采用免疫荧光定量 PCR (Real-time PCR) 和 Western blot 检测 rpS6 的抑制效率,并获得稳定抑制的细胞克隆;再在体外采用 CCK-8 试剂盒检测抑制 rpS6 表达对 A549 细胞增殖速度的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pGCsil-GFP (带绿色荧光)、辅助质粒 pHelper 1.0、pHelper 2.0 及 293T 细胞、PCR 用试剂 primer (R&F) 均购自上海吉凯基因技术有限公司;胎牛血清购自上海微科生化试剂有限公司;凯基全蛋白抽提试剂盒购于南京凯基生物科技有限公司;A549 细胞株、DMEM 细胞培养基、Age I 和 EcoRI、兔抗人 S6 抗体 (1:1 000, #2217)、Phototope-HRP Western blot 二抗及 Cell Counting kit-8 (CCK-8) 分别为美国 ATCC、GIBCO、New England Biolabs、Cell signaling technology、NEB、日本 Dojindo 产品。

1.2 方法

1.2.1 靶向干扰 rpS6 表达的 pGCsil-sh-rpS6-GFP 质粒的构建 在 NCBI 基因库中查找 rpS6

的基因 mRNA 序列 (NM_001010, 829 bp), 根据 RNAi 序列的设计原则,采用 Beacon designer 2 软件设计并合成特异性沉默 rpS6 的双链寡核苷酸 (double-strand oligonucleotide, ds oligo)。rpS6 的 shRNA 序列为 TGAACG CAAACTTCGTAC T, 同时设计阴性对照 (NC) 序列。经退火形成带黏性末端的双链。Age I 和 EcoR I 酶切 pGCsil-GFP 载体,使其线性化并与 ds oligo 连接,再转化大肠埃希菌 (大肠杆菌) 细胞,提取阳性克隆,PCR 送 Invitrogen 公司测序鉴定插入序列片段。

PCR 上游引物: 5'-CCTATTTCCCATGA TTCCTTCATA-3'; PCR 下游引物: 5'-GTA ATACGGTTATCCACGCG-3'。PCR 电泳以双蒸水 (ddH₂O) 作为对照以排除外源性核酸污染所导致的假阳性。

1.2.2 慢病毒的包装、收获与滴度测定 将 pGCsil-sh-rpS6-GFP 质粒和辅助质粒 pHelper 1.0、pHelper 2.0 按照 Qiagen 试剂盒操作说明进行高纯度无内毒素抽提。将 293T 细胞铺板并保证细胞处于良好状态,加入 Lipofectamine 2000 试剂与各质粒 DNA 混合液进行细胞转染。置于 37 °C、5%CO₂ 孵箱孵育 48 h 后收集 293T 细胞上清液,置于 4 °C、4 000 ×g 离心 10 min 获得浓缩病毒液。设置 8 孔,将病毒原液按照 10 倍比例梯度稀释,采用逐孔稀释法测定病毒滴度。设病毒原液的病毒滴度为 x TU/ μ L,则第 2 管至第 8 管病毒滴度为 $x \times 10^{-1}$ TU/ μ L ~ $x \times 10^{-7}$ TU/ μ L。各管分别取 10 μ L 加入各孔 293T 细胞中,则第 1 孔至第 8 孔的病毒总量为 $x \times 10$ TU ~ $x \times 10^{-6}$ TU,病毒原液量为 10 μ L ~ 10^{-6} μ L。观察细胞孔中可清晰计数的带荧光的细胞数 (每个带荧光的细胞均感染了 1 个病毒),即为该孔中感染了细胞的病毒总量,根据公式“病毒滴度 (TU/ μ L) = 带有荧光细胞数/病毒原液量”计算病毒滴度^[7]。

1.2.3 感染目的细胞 A549 细胞株及流式细胞技术筛选 所有实验均分为 3 组: sh-rpS6 A549 细胞组 (sh-rpS6 组)、阴性对照病毒

A549 细胞组 (NC 组) 和未干预的 A549 细胞组 (A549 组)。通过前期预实验确定 A549 细胞株的感染最佳条件: 感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 值=40, 且同时予完全培养基及 5 $\mu\text{g/mL}$ polybrene 孵育细胞。按 5×10^4 /孔将 A549 细胞接种于 6 孔板, 当细胞融合度达到 30% 左右时, 相当于细胞数为 1×10^5 /孔, 所需病毒量为细胞数的 40 倍, 即 4×10^6 TU/孔; 再结合病毒滴度计算每孔需加入的病毒体积和 polybrene 进行病毒感染细胞实验。24 h 后以含 10% 胎牛血清的完全培养基为细胞换液, 继续孵育, 并每 24 h 于荧光显微镜下观察报告基因 GFP 的表达情况。当荧光率大于 80% 时, 提示感染达到理想状态。加胰酶消化细胞并采用无菌流式细胞术筛选强阳性表达绿色荧光蛋白的稳定感染 sh-rpS6 慢病毒载体的 A549 细胞, 获得纯化细胞。再将纯化的细胞接种至培养皿, 加含有 10% 胎牛血清的培养基, 置于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 孵箱继续培育, 取部分纯化细胞分为 2 份, 分别提取 RNA 和总蛋白。

1.2.4 荧光定量 PCR 鉴定 rpS6 mRNA 的干扰效率 按照 RNase-free 操作提取 3 组细胞 (sh-rpS6 组、NC 组及 A549 组) 总 RNA, 再根据 Promega 公司 M-MLV 操作说明书进行 RNA 逆转录获得 cDNA。以 β -actin 为内参, 采用两步法荧光定量 PCR 测定 mRNA, $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算 mRNA 表达量, 再根据公式 “(对照组 mRNA 值 - 干扰组 mRNA 值) / 对照组 mRNA 值 $\times 100\%$ ” 计算 sh-rpS6 组 mRNA 干扰效率。引物利用 Beacon designer 2 软件设计, rpS6 上游引物: 5'-ATTGAGCGTCTTGTTACTCCAC-3', 下游引物: 5'-CCTTAGCCTCCTTCATTCTCTTG-3'。

1.2.5 Western blot 检测 rpS6 的蛋白干扰效率 使用凯基全蛋白提取试剂盒, 按照说明书步骤, 分别提取 3 组细胞的总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳, 转膜、封闭后滴加抗 rpS6 一抗 (1 : 1 000 稀释) 并于膜上 4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜; 洗涤后再滴加二抗, 孵育 60 min; 显色液显色, Quantity one 软件检测蛋白条带, 以目的蛋白与 β -actin 内参的积分光密度 (IOD) 比值表示蛋白相对含量。sh-rpS6 组蛋白干扰效

率计算公式为: (对照组 IOD 值 - 干扰组 IOD 值) / 对照组 IOD 值 $\times 100\%$ 。

1.2.6 CCK-8 法检测体外细胞增殖能力 实验分组: 除上述 3 组细胞外, 同时设置培养基组 (无细胞), 共 4 组。将生长状态良好的目的细胞用完全培养基配制成细胞悬液, 以 2×10^3 /孔接种至 96 孔板, 每组 3 个复孔。各孔定容至 100 μL , 孵箱培养 24 h。向各孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 注意避免产生气泡, 再置于孵箱中孵育 1 ~ 2 h。利用酶标仪分别在加入 CCK-8 后 24 h、48 h、72 h、96 h、120 h 及 144 h 时间点测定细胞在 450 nm 处的光密度 (OD) 值, 绘制细胞生长曲线, 分析各组细胞的增殖能力。

1.2.7 统计学方法 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。正态分布且方差齐性, 则多组间进行单因素方差分析 (ANOVA), 两两比较采用 LSD 法; 否则作非参数秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pGCsil-sh-rpS6-GFP 载体的构建及鉴定

PCR 电泳结果显示, 连接的空载体片段大小为 306 bp, sh-rpS6 阳性克隆片段大小为 343 bp (已从载体切去 24 bp), 提示阳性克隆片段已插入质粒中 (图 1)。

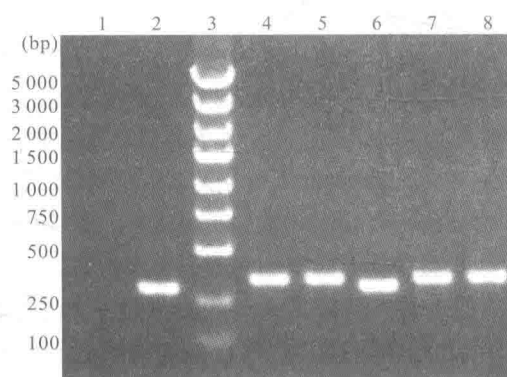


图 1 pGCsil-sh-rpS6-GFP 质粒的 PCR 电泳结果

Fig 1 PCR electrophoresis for pGCsil-sh-rpS6-GFP PCR positive clones

1: Control (ddH₂O); 2: Negative vector control (NC); 3: Marker; 4-8: pGCsil-sh-rpS6-GFP

图 2 显示阳性克隆菌群的测序结果。可见 sh-rpS6 片段包含在阳性克隆序列中, 为 Ccg gaaTGAACGCAAACTTCGTACTTTCAAGAG

AAGTACGAAGTTTTCGTTCA_{tt}TTTTTg, 完全符合之前设计的 shRNA 片段序列, 说明 sh-*rpS6* 序列已成功克隆到慢病毒 pGCSil-sh-*rpS6*-GFP 载体中。

2.2 慢病毒的包装、收获与滴度测定

由图 3 可见, 病毒转染 293T 细胞 4 d 后, 在第 8 孔 (图 3 H) 中观察到 3 个带荧光的细胞, 提示该孔有 3 个病毒感染细胞, 病毒总量为 3, 病毒滴度为 3×10^6 TU/ μ L, 即 3×10^9 TU/mL。

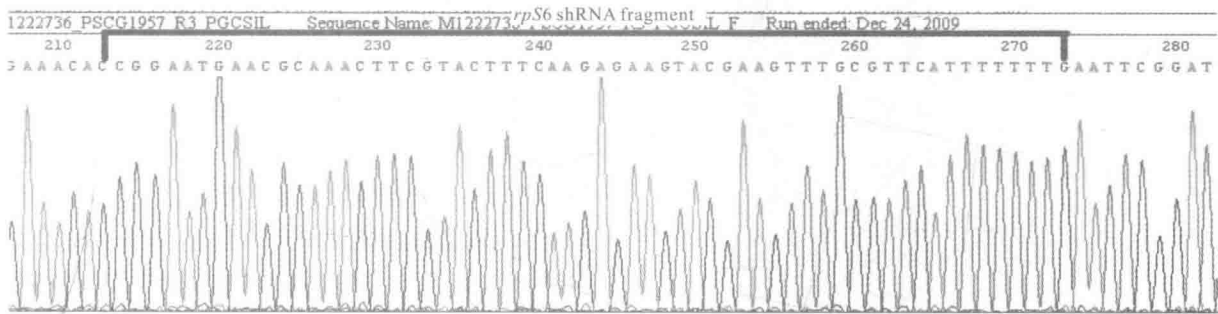


图 2 pGCSil-sh-*rpS6*-GFP 质粒测序结果 (彩图见附录图 1)

Fig 2 Sequencing results for pGCSil-sh-*rpS6*-GFP plasmid

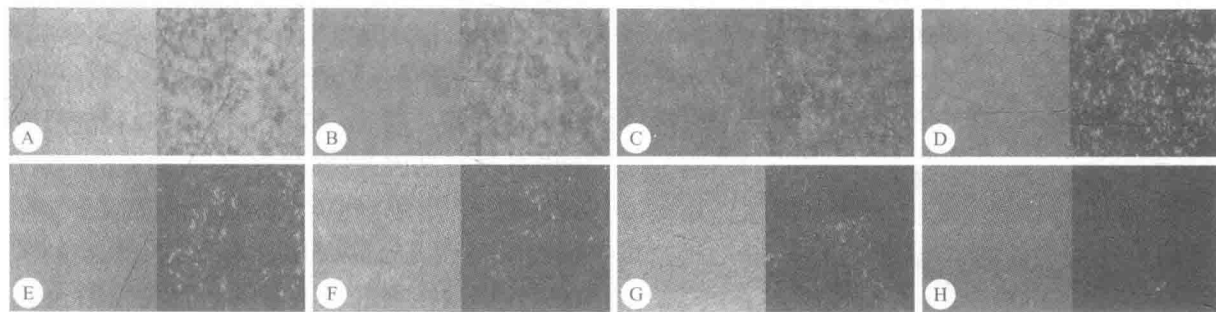


图 3 “逐孔稀释法”测定 sh-*rpS6* 慢病毒滴度 ($\times 100$) (彩图见附录图 2)

Fig 3 Determination the titer for lentiviral sh-*rpS6* with the method of hole-by-dilution in bright fields and fluorescent fields ($\times 100$)

A: Virus stock; B-H: Virus solutions with sequential 10-fold dilutions from the virus stock, indicating that their virus titers were 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} and 10^{-7} to virus stock respectively

2.3 感染目的细胞 A549 细胞株及流式细胞技术分选阳性克隆

计算每孔细胞所需加入的病毒体积, 为 $1.3 \mu\text{L}$ [$(4 \times 10^6 \text{ TU}) / (3 \times 10^9 \text{ TU/mL})$]。加入病毒 5 d 后, sh-*rpS6* 和 NC 组 80% 细胞出现绿色荧光, A549 组未见荧光, 所有细胞均状态良好 (图 4)。

流式细胞技术分选阳性表达 GFP 蛋白的细胞, 分析显示 GFP 强阳性的细胞占细胞总数的 86.80%, 说明所构建的慢病毒载体为靶细胞, 有较高的感染效率。

2.4 *rpS6* mRNA 和蛋白干扰效率的检测结果

荧光定量 PCR 示: A549 组 (0.942 ± 0.034) 及 NC 组 (1.002 ± 0.080) 细胞相比, 差异无统计学意义, sh-*rpS6* 组的 *rpS6* mRNA

水平 (0.191 ± 0.008) 则较前二者降低 ($P < 0.05$), 提示 sh-*rpS6* 干扰 A549 细胞株中 *rpS6* mRNA 的表达。sh-*rpS6* 组的 mRNA 干扰效率为 $(79.72 \pm 6.83)\%$ 。

如图 5 所示, NC 组 (0.790 ± 0.145) 和未干预的 A549 细胞 (0.986 ± 0.121) 相比, 差异无统计学意义, sh-*rpS6* 组 *rpS6* 的蛋白表达 (0.160 ± 0.117) 则较前二者下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。这说明这 *rpS6* 蛋白在 A549 细胞中获得稳定沉默。sh-*rpS6* 细胞组的蛋白干扰效率为 $(83.77 \pm 12.13)\%$ 。