

恶性胸/腹水游离 TS、 β -tubulin III mRNA 的表达及其与化疗药物敏感性的关系

王立峰,胡 静,李茹恬,孟 谊,禹立霞,钱晓萍,刘宝瑞*

(南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心,南京大学临床肿瘤研究所,江苏 南京 210008)

[摘要] 目的:探索恶性胸腹水上清中游离胸苷酸合成酶(TS)、 β -tubulin III mRNA 的表达,以及游离 TS、 β -tubulin III 表达和患者 5-氟尿嘧啶(5-FU)、多西紫杉醇药物敏感性的关系。方法:收集 43 例进展期肿瘤患者的恶性胸/腹水,分离、提取游离核酸,分离肿瘤细胞。实时荧光定量 RT-PCR 分别检测游离上清和肿瘤细胞中 TS 和 β -tubulin III mRNA 表达;ATP-TCA 方法检测肿瘤细胞 5-FU、多西紫杉醇的敏感性。结果:TS 和 β -tubulin III mRNA 在恶性胸/腹水游离上清中的检出率为 98%。与配对的肿瘤细胞相比,游离上清中 TS mRNA 表达水平高($P = 0.02$)。在胃肠肿瘤患者中,游离上清中 TS mRNA 表达水平与 5-FU 药物敏感性相关($P = 0.002$)。尽管观察到游离上清中 β -tubulin III mRNA 高表达者多西紫杉醇药物敏感性高的趋势,但差异没有统计学意义。结论:晚期肿瘤患者恶性胸腹水游离上清中可检测到游离 TS、 β -tubulin III mRNA 的表达。在胃肠肿瘤患者中,游离上清 TS mRNA 表达水平与 5-FU 药物敏感相关。

[关键词] 恶性胸/腹水;游离核酸;TS; β -tubulin III;分子生物标志物

[中图分类号] R730.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)12-1671-06

doi:10.7655/NYDXBNS20141210

Cell-free TS and β -Tubulin III mRNA expression in malignant effusions and its' association with chemosensitivity *in vitro*

Wang Lifeng, Hu Jing, Li Rutian, Meng Yi, Yu Lixia, Qian Xiaoping, Liu Baorui*

(The Comprehensive Cancer Center of Drum Tower Hospital, Medical School of Nanjing University & Cancer Institute of Nanjing University, Nanjing 210008, China)

[Abstract] **Objective:** Genetic assessment of biomarkers in appropriate tumor samples remains to be hallmarks of the real-time individualized therapy in malignant diseases. Malignant effusion is one of the most common presentations in advanced solid cancer. The aim of this study was to characterize cell-free mRNA in malignant effusions and evaluate its association with the sensitivity of primary tumor cells to docetaxel and 5-fluorouracil (5-FU). **Methods:** Forty-three Malignant effusions samples were prospectively collected from 42 patients. After cell-free RNA extraction and separation of tumor cells, TS and β -tubulin III mRNA transcripts in both supernatants and tumor cells were characterized by real-time quantitative PCR. ATP-TCA assay was used to analyze the sensitivity of primary tumor cells to docetaxel and 5-FU. **Results:** Cell-free TS and β -tubulin III transcripts were observed in 42 of 43 specimens. Compared with gene expression patterns in paired-tumor cells, TS mRNA was significantly higher in supernatant whereas β -tubulin III mRNA remained the same ($P = 0.02$). Cell-free TS mRNA was inversely associated with *in vitro* sensitivity of cancer cells to 5-FU in the gastrointestinal cohort ($P = 0.002$). Although high β -tubulin III mRNA expression in supernatants appeared is positively related with cancer cells' sensitivity to docetaxel, the result didn't reach the statistical significance. **Conclusion:** The cell-free mRNA transcripts in malignant effusions were highly detectable and cell-free TS mRNA levels in gastrointestinal patients were correlated with 5-FU sensitivity.

[Key words] malignant effusions; cell-free nucleic acids; thymidylate synthase; β -Tubulin III; biomarkers

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(12): 1671-1676]

[基金项目] 江苏省卫生科研项目(H201235);南京市医学重点科技发展项目(ZKX12012)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: baoruiliu@nju.edu.cn

如何获取合适的肿瘤标本以进行实时个体化检测分子生物标志物已成为亟待解决的关键问题^[1]。肿瘤患者血清、血浆或体液中游离核酸 (cell-free nucleic acids, cfNAs) 的检测可发挥“液体活检”的作用^[2]。胸/腹水常常是恶性肿瘤转移或首发临床表现, 尽管目前研究者们已在包括血浆/血清、唾液、羊水、支气管灌洗液、脑脊液、尿液等^[3-4]在内的多种体液中证实了游离核酸的存在并成功运用于肿瘤的诊断和治疗, 然而恶性胸/腹水中游离 RNA 的研究却仍处于起步阶段。

胸苷酸合成酶 (thymidylate synthase, TS) 是 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU) 代谢途径的关键酶之一。在结直肠癌、乳腺癌、胸腺癌、尿路上皮癌等多种实体瘤中发现, TS 表达和基因多态性与 5-FU 类药物疗效相关^[5]。作为 β 微管蛋白 (β -tubulin) 亚型之一, β -tubulin III 在正常组织中主要分布于神经、睾丸组织; 然而研究发现在非小细胞性肺癌 (NSCLC)、胃癌、乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌等多种肿瘤中存在 β -tubulin III 的异常表达, 这种异常高表达常与不良预后相关^[6]; 同时 β -tubulin III 的表达水平高低与作用微管蛋白的化疗药物 (紫杉类, 长春瑞滨) 疗效相关^[7]。

基于游离核酸在多种恶性肿瘤中已显示出的巨大应用前景, 期望通过本研究建立一种可从少量胸/腹水中提取游离 mRNA 的方法; 比较 TS、 β -tubulin III 基因表达在胸/腹水上清和肿瘤细胞间的差异; 进一步探索晚期恶性肿瘤患者胸水/腹水游离上清中药物疗效相关分子生物标志物 (TS、 β -tubulin III) 与 5-FU、多西紫杉醇药物敏感性的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

TRIzol、TRIzol LS Reagent 及 RPMI 1640 (HEPES) (Gibco 公司, 美国); ExScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time)、EASY Dilution 及荧光定量 PCR 试剂盒 Ex Taq R-PCR (TaKaRa 公司, 大连); 多西紫杉醇 (江苏恒瑞医药股份公司); 5-FU 为山东齐鲁制药厂产品; 细胞活性荧光检测试剂 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega 公司, 美国); Taqman 探针及引物 (ABI 公司, 美国); 其余试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 标本来源

所有患者资料及标本均来源于南京大学医学

院附属鼓楼医院。从 42 例确诊的 IV 期恶性肿瘤患者中前瞻性地收集了 43 个恶性胸腔/腹腔积液标本, 其中在 1 例胃癌患者中先后收集了其腹腔化疗前后的标本。在进一步分析游离上清中分子生物标志物和药物敏感性关系时, 考虑到腔内灌注治疗对胸腔/腹腔中细胞的影响, 42 个未接受过治疗的患者标本用于此部分研究。患者基本临床资料见表 1。入组的恶性积液肿瘤细胞含量至少 50% (病理证实)。

表 1 患者的临床资料

Table 1 Demographic and clinical parameters of patients

临床病理特征	例数	比例 (%)
总例数	42	
年龄 (岁)		
中位数 (四分位数间距)	64 (18)	
范围	39~87	
性别		
女	19	45
男	23	55
分期	IV	100
ECOG PS 0-2	42	100
原发肿瘤		
非小细胞肺癌	18	43
胃癌	15	36
大肠癌	4	10
其他肿瘤		11
乳腺癌	1	
卵巢癌	3	
子宫内膜癌	1	
标本类型		
胸腔积液	19	45
腹腔积液	23	55

ECOG PS: Eastern Cooperative Oncology Group performance status.

1.2.2 游离上清标本的收集及处理

所有实验用物品均经去 RNA 酶处理。具体标本收集及处理步骤如下: 如患者有腔内置管, 则在引流液体约 200 ml 后收集标本; 如患者无腔内置管, 则在最初的 200 ml 液体弃去后收集液体, 以避免导管内、皮肤表面的 RNA 酶污染。以灭菌一次性空针抽取胸/腹水注入事先加入 3.8% 枸橼酸钠的无 RNA 酶管中; 将标本放入冰盒中尽快运到实验室; 4 000 g, 4℃ 离心 10 min, 小心将上清转移至新管; 4 000 g, 4℃ 再次离心 10 min, 吸取上 2/3 的上清至新管, 1 ml/管分装, -80℃ 冻存。

1.2.3 肿瘤细胞培养标本的收集及细胞分离

无菌条件下收集胸/腹水 500~800 ml (预先在容器中加入 10 000 U 肝素), 1 500 r/min 离心 10 min,

弃上清。将 7 ml 细胞悬液小心加至 7 ml Ficoll 之上,2 000 r/min 离心 25 min; 吸取中间层至新管。洗涤、台盼蓝染色计算细胞活力及细胞计数后,调整密度用于进一步 ATP-TCA 分析及总 RNA 抽提。

1.2.4 ATP-TCA 体外药敏

ATP-TCA 药敏实验按文献报道进行^[6],简述如下:将分离的肿瘤细胞按 2×10^4 个/孔接种于 96 孔培养板(Corning-Costar, 美国),同时加入不同浓度多西紫杉醇或 5-FU。选用的试验药物浓度(test drug concentration, TDC)为多西紫杉醇 4.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 5-FU 22.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。梯度稀释为 6 个浓度,分别为 200.00%、100.00%、50.00%、25.00%、12.50% 及 6.25% TDC。每个浓度设 3 个平行孔,同时设立两组对照:不加任何药物的对照 MO 及仅含培养液的 MI, 每组设 12 个平行孔。培养板在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 饱和湿度培养 6 d 后,自每孔吸取 100 μl 细胞悬液至 96 孔荧光检测白板(丹麦 Nunc); 加入 CellTiter-Glo 试剂; 将板放入荧光检测仪 (Berthod Diagnostic Systeme, 德国)中读数。

1.2.5 药物敏感结果判定

药物抑制率按下列公式计算^[8]: 抑制率(%INH)=[1-(Test-MI)/(MO-MI)] \times 100%。个体的药物敏感指数(Index SUM)按下列公式计算: Index SUM=600-Sum(%INH200-6.25)。Index SUM 600 表示最大范围的细胞存活即最小程度的药物敏感; Index SUM 0 表示细胞完全死亡即最大程度的药物敏感。Index SUM 值越小,细胞对该种药物越敏感。

1.2.6 RNA 提取及 cDNA 合成

恶性胸/腹水上清游离 RNA 提取方法如下: 取 1 ml 上清,溶解后加入 3 ml TRIzol LS, 室温震荡 15 min; 加入 0.8 ml 氯仿,剧烈震荡后室温放置 15 min; 12 000 g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min; 吸取水相层至新管,加入等体积异丙醇,-20 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀过夜; 12 000 g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min, 75% 乙醇洗涤 2 遍后晾干; 无 RNA 酶水溶解 RNA, 定量, 反转录 cDNA。细胞内总 RNA 提取采用 TRIzol 法(按说明书进行), 取 1 μl 在核酸定量仪上定量后将剩余 RNA 反转录为 cDNA 保存, 反转录反应按试剂盒说明进行。

1.2.7 实时荧光定量 PCR

在冰上于 real-time PCR 反应管中配制下列反应液, 5 \times real-time PCR Buffer (无 Mg^{2+}) 4 μl , dNTP Mixture (10 mmol/L) 0.5 μl , Mg^{2+} 溶液(250 mmol/L) 0.4 μl , TaKaRa Ex Taq HS (5 U/ μl) 0.2 μl , 1 \times 引物混合物 (β -tubulin III : Hs00964965_m1, β -actin :

Hs99999903_m1; TS: Hs00 426591_m1) 1 μl , cDNA 2 μl , 总体积 20 μl 。两步法 Real-time PCR: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 45 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火/延伸 60 s, 45 个循环。所有样品均设 3 个复孔, 以提取的总 RNA 为阴性对照, 以 Commercial RNA (Clontech) 为阳性对照。以 β -actin 为内参, 按照 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算相对基因表达量。

1.3 统计学方法

Wilcoxon Signed Ranks Test 统计方法用于比较恶性胸水/腹水中游离上清和肿瘤细胞基因表达的差异; Mann-Whitney U 检验用于分析游离上清中 TS、 β -tubulin III 表达和体外药物敏感之间的关系。统计软件为 SPSS18.0。P \leq 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

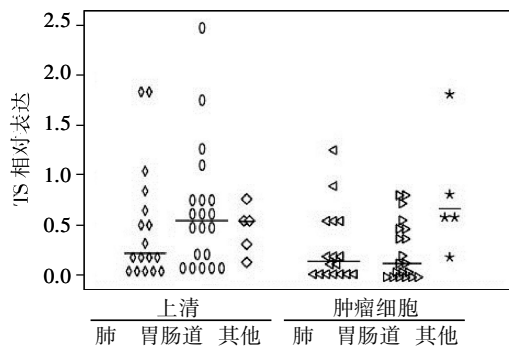
2.1 恶性胸/腹水上清游离 RNA 的成功提取

在符合标本收集条件的 43 个样本中全部检测到游离 β -actin 的扩增, 证实了恶性胸腔/腹腔积液中游离 RNA 的存在。进一步检测 TS、 β -tubulin III 在恶性体腔积液游离上清中的表达, 结果表明, 除了在 1 例肺癌患者恶性胸腔积液中仅有 β -actin 的扩增而无相关基因的扩增外, 其他标本全部可检测到相关基因的扩增, 检出率为 98%(42/43)。图 1、2 所示分别为 42 例配对标本游离上清和肿瘤细胞中 TS 和 β -tubulin III mRNA 表达的范围和中位值。

2.2 恶性胸水/腹水上清中游离 RNA 和肿瘤细胞中基因表达的差异

在证实了相关基因 mRNA 在体腔积液游离上清中的表达后, 进一步比较同一基因在恶性胸/腹水游离上清和肿瘤细胞中表达的差异, 以深入了解体腔积液中游离 RNA 的特性及其和肿瘤细胞间的关系。在配对的样本中, TS mRNA 在上清中的表达水平(中位数: 0.485, 四分位数间距: 0.581) 高于其在肿瘤细胞的表达水平(中位数: 0.192, 四分位数间距: 0.495)(P = 0.02)。进一步进行亚组分析, 发现胃肠肿瘤组中, TS mRNA 在游离上清(中位数: 0.555, 四分位数间距: 0.592) 和肿瘤细胞(中位数: 0.171, 四分位数间距: 0.453) 中表达的差异更为显著(P = 0.008)。 β -tubulin III mRNA 的表达水平在上清(中位数: 0.031, 四分位数间距: 0.064) 中和在肿瘤细胞(中位数: 0.020, 四分位数间距: 0.041) 中相比没有显著性差异(P = 0.117)。

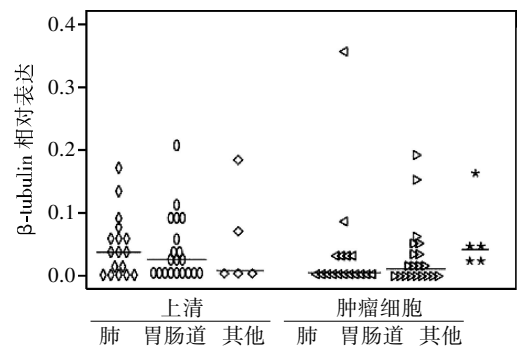
2.3 ATP-TCA



肺癌组: n=17; 胃肠肿瘤组: n=20; 其他: n=5。

图1 TS mRNA在游离上清和肿瘤细胞中的表达

Figure 1 Comparison of TS mRNA transcripts in paired supernatants and tumor cells samples



肺癌组: n=17; 胃肠肿瘤组: n=20; 其他: n=5。

图2 beta-tubulin III mRNA在游离上清和肿瘤细胞中的表达

Figure 2 Comparison of beta-tubulin III mRNA transcripts in paired supernatants and tumor cells samples

由于标本收集、处理过程中严格无菌操作;收集的恶性胸水/腹水肿瘤细胞含量>50%, ATP-TCA检测得以在42例未经治疗的标本中完成(检测率100%)。5-FU、多西紫杉醇在不同组别中的敏感指

数均值及范围见表2。

2.4 分子生物标志物与药物敏感的关系

同时比较了游离上清中TS、beta-tubulin III mRNA表达水平与5-FU、多西紫杉醇药物敏感性之间

表2 恶性胸/腹腔积液中肿瘤细胞药物敏感结果(Index SUM)

Table 2 Chemosensitivity of primary tumor cells from malignant effusions

抗肿瘤药物	全部(n=42)	肺癌(n=18)	胃肠肿瘤(n=19)	其他肿瘤(n=5)
5-氟尿嘧啶	431(290~587)	436(333~586)	431(306~587)	397(290~516)
多西紫杉醇	454(206~600)	420(206~566)	504(382~600)	364(206~438)

except for the data of one specimen from post-chemotherapy

关系,这部分研究主要在肺癌组(n=17)和胃肠肿瘤组(n=19)中进行(1例胃癌患者中先后收集了其腹腔化疗前后的标本,在此部分研究中仅采用该患者腹腔化疗前腹水标本)。分析基因表达与相应个体药物敏感性之间的关系时,采用每种药物的均值将接受该组药物ATP-TCA测试的患者分为敏感组(Index SUM < 均值)和抵抗组(Index SUM ≥ 均值),以进行后续的分析。

胃肠肿瘤患者恶性腹水上清中游离TS mRNA表达水平与肿瘤细胞体外对5-FU的化疗敏感性有关,与抵抗组相比,对5-FU敏感的患者上清中TS表达水平低(P=0.002,图3);在肺癌组中,游离TS mRNA的表达与5-FU化疗敏感与否无关(P=0.475)。进一步分析游离上清中beta-tubulin III mRNA表达水平与多西紫杉醇药物敏感关系发现:尽管发现了游离beta-tubulin III mRNA高表达者多西紫杉醇药物敏感性高的趋势,但结果没有统计学意义(肺癌组:P=0.092,胃肠肿瘤组P=0.778,图4)。

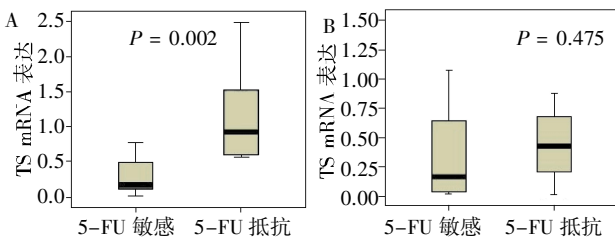
3 讨论

对于进展期非小细胞肺癌患者,已有临床试验

证实可通过患者外周血游离核酸中EGFR基因突变情况预测EGFR酪氨酸激酶抑制剂疗效^[9]。Shinozaki等^[10]也发现,在恶性黑色素瘤患者中,外周血游离核酸中BRAFV600E突变与患者对抗BRAF药物的疗效有关。游离核酸中分子生物标志物的检测为实现真正意义上的实时个体化治疗奠定了基础。

恶性胸水/腹水是进展期恶性肿瘤的常见临床表现,其出现常提示预后不良。研究组经过反复实验多种方法,创新性地实现胸腹水中游离RNA的提取并扩增目的基因。研究结果证实游离RNA存在于恶性胸腔/腹腔积液中,并且相关基因检出率很高。尽管在体液中存在大量的RNA酶,然而令人惊讶的是释放入循环中的游离RNA仍然能保持其稳定性。由于胸腔/腹腔穿刺相对无创、简单,并且游离RNA提取所需的标本量极小,提示以游离RNA为基础的分子生物学检测在恶性体腔积液的诊断和治疗中有着广泛的应用前景。

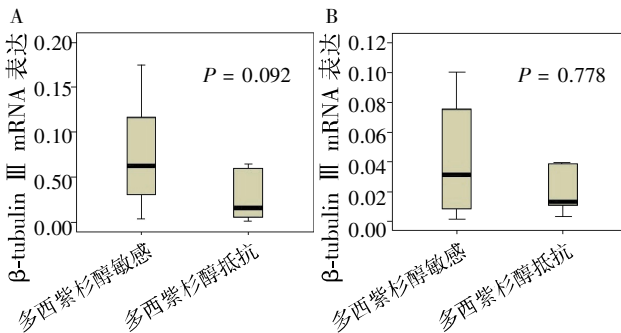
进一步比较相关基因mRNA在恶性胸腹水上清和肿瘤细胞中的表达发现:TS mRNA在游离上清中的表达水平高于其在肿瘤细胞中的水平;而



A: 胃肠肿瘤组; B: 肺癌组。

图 3 恶性腹水上清中游离 TS mRNA 表达水平与 5-FU 药物敏感性的关系

Figure 3 Association between the levels of TS mRNA transcripts in the supernatants of malignant effusions and the sensitivity of primary tumor cell to 5-fluorouracil(5-FU)



A: 胃肠肿瘤组; B: 肺癌组。

图 4 恶性腹水上清中游离 β -tubulin III mRNA 表达水平与多西紫杉醇敏感性的关系

Figure 4 Association between the levels of β -tubulin III mRNA transcripts in the supernatants of malignant effusions and the sensitivity of primary tumor cell to docetaxel

β -tubulin III 的表达水平在上清和配对的肿瘤细胞中没有显著性差异。Garcia 等^[11]发现大肠癌患者血浆中游离 TS mRNA 的检出频率、表达水平均显著升高,这与本文在恶性胸腹水游离上清中观察到的现象一致。作为 5-FU 类药物代谢途径的关键酶之一,TS 表达水平与 5-FU 疗效的关系一直受到关注。不少学者发现,肿瘤组织低 TS 表达者用 5-FU 类药物化疗疗效好。本研究发现,胃肠肿瘤患者恶性腹水上清中游离 TS mRNA 表达水平与肿瘤细胞体外对 5-FU 的化疗敏感性相关,与抵抗组相比,对 5-FU 敏感的患者上清中 TS 表达水平低;然而在肺癌组中,尽管观察到同样趋势但没有统计学意义。初步推测这主要是由于与肺癌组患者相比,胃肠肿瘤组恶性胸腹水中游离 TS mRNA 表达水平显著高于配对的肿瘤细胞($P = 0.008$, 图 1),因此更能反映出与 5-FU 药物敏感性的关系。具体机制仍有待于进一步扩大样本研究。

β -tubulin III 作为作用于微管蛋白药物的疗效

预测分子标志的研究方兴未艾。有研究组分别在乳腺癌、卵巢癌中发现,高 β -tubulin III 表达者对紫杉醇化疗敏感^[6]。本研究首次探讨恶性胸腹水中游离 β -tubulin III 与紫杉类药物敏感性的关系,遗憾的是尽管发现了游离 β -tubulin III mRNA 高表达者多西紫杉醇药物敏感性高的趋势(图 4),但结果没有统计学意义。Mariani 等^[12]发现, β -tubulin III 通路可对微环境改变如缺氧、低营养条件发生适应性改变,并指出这也是 β -tubulin III 高表达常预示肿瘤侵袭性高、容易发生转移的原因之一。恶性胸/腹水作为一特殊的肿瘤转移灶具有独特的特性:氧气和营养供应少、肿瘤细胞缺少和基质细胞、内皮细胞的相互作用等,因此本文推测由于胸腹水中微环境的影响干扰了 β -tubulin III 通路;同时其他因素如 β -tubulin 转录后修饰、与微管相关蛋白(MAPs)的结合等也可能影响紫杉类药物的敏感性^[13]。

综上所述,本研究成功实现了恶性胸腹水中游离 RNA 的提取并扩增目的基因,初步探索了转移性肿瘤患者恶性胸腹水游离上清中 TS、 β -tubulin III mRNA 表达水平与 5-FU、多西紫杉醇药物敏感性的关系。基于转移性肿瘤患者在实时个体化治疗过程中对肿瘤标本的迫切需求以及胸/腹腔穿刺相对简单、无创及可重复性,对恶性体腔积液中游离分子生物标志物的研究值得进一步深入。

[参考文献]

- [1] Rosell R, Bivona TG, Karachaliou N. Genetics and biomarkers in personalization of lung cancer treatment [J]. *Lancet*, 2013, 382(9893): 720-731
- [2] Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients [J]. *Nature Review*, 2011, 11(6): 426-437
- [3] Pandit P, Cooper-White J, Punyadeera C. High-yield RNA-extraction method for saliva [J]. *Clin Chem*, 2013, 59(7): 1118-1122
- [4] Hui L, Wick HC, Edlow AG, et al. Global gene expression analysis of term amniotic fluid cell-free fetal RNA [J]. *Obstet Gynecol*, 2013, 121(6): 1248-1254
- [5] Arrazubi V, Suárez J, Guerrero D, et al. Prognostic significance of thymidylate synthase polymorphisms in rectal cancer patients treated with neoadjuvant chemoradiotherapy [J]. *Colorectal Dis*, 2013, 15(4): 428-435
- [6] Wang Y, Sparano JA, Fineberg S, et al. High expression of class III β -tubulin predicts good response to neoadjuvant taxane and doxorubicin/cyclophosphamide-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer

- [J]. Clin Breast Cancer, 2013, 13(2):103-108
- [7] Zhang Y, Yang H, Liu J, et al. High expression levels of class III β -tubulin in resected non-small cell lung cancer patients are predictive of improved patient survival after vinorelbine-based adjuvant chemotherapy [J]. Oncol Lett, 2013, 6(1):220-226
- [8] Ugurel S, Schadendorf D, Pfohler C, et al. *In vitro* drug sensitivity predicts response and survival after individualized sensitivity-directed chemotherapy in metastatic melanoma: a multicenter phase II trial of the dermatologic cooperative oncology group [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(18):5454-5463
- [9] Rosell R, Moran T, Queralt C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer [J]. N Engl J Med, 2009, 361(10):958-967
- [10] Shinozaki M, O'Day SJ, Kitago M, et al. Utility of circulating B-RAF DNA mutation in serum for monitoring melanoma patients receiving biochemotherapy [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(7):2068-2074
- [11] Garcia V, García JM, Peña C, et al. Thymidylate synthase messenger RNA expression in plasma from patients with colon cancer: prognostic potential [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(7 Pt 1):2095-2100
- [12] Mariani M, Zannoni GF, Sioletic S, et al. Gender influences the class III and V β -tubulin ability to predict poor outcome in colorectal cancer [J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(10):2964-2975
- [13] Leandro-García LJ, Leskel S, Landa I, et al. Tumoral and tissue-specific expression of the major human beta-tubulin isoforms [J]. Cytoskeleton (Hoboken), 2010, 67(4):214-223

[收稿日期] 2014-05-29

(上接第1670页)

- [6] Pineda P, Rojas P, Liberman C, et al. Detection of malignancy markers in thyroid nodules by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) [J]. Revista Medica de Chile, 2003, 131(9):965-972
- [7] da Silveira Mitteldorf CAT, de Sousa-Canavez JM, Masumoto C, et al. Fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules as a possible source for molecular studies: Analysis of RNA obtained from routine cases [J]. Diagnostic Cytopathology, 2008, 36(12):899-903
- [8] Šamiija I, Mateša N, Lukač J, et al. Thyroid fine-needle aspiration samples inadequate for reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis [J]. Cancer Cytopathology, 2008, 114(3):187-195
- [9] Winzer R, Schmutzler C, Jakobs TC, et al. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of thyrocyte-relevant genes in fine-needle aspiration biopsies of the human thyroid [J]. Thyroid, 1998, 8(11):981-987
- [10] 田胜男, 苏静芬, 向志光, 等. 两种核酸提取方法对小鼠诺如病毒 RNA 提取效能的比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(9):57-60
- [11] Pessina P, Castillo V, Araújo M, et al. Expression of thyroid-specific transcription factors in thyroid carcinoma, contralateral thyroid lobe and healthy thyroid gland in dogs [J]. Research in Veterinary Science, 2012, 93(1):108-113
- [12] Takano T, Miyauchi A, Matsuzuka F, et al. Preoperative diagnosis of medullary thyroid carcinoma by RT-PCR using RNA extracted from leftover cells within a needle used for fine needle aspiration biopsy [J]. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1999, 84(3):951-955

[收稿日期] 2014-06-07