



## 癌胚抗原分泌性肿瘤患者外周血中癌胚抗原 mRNA的表达

肿瘤的复发和转移是临床治疗常见而棘手的问题,肿瘤微转移的检测已为众多学者所关注[1]。随着分子生物学特别是逆转录PCR技术的发展,因其具有高度的敏感性和特异性,已逐步成为早期发现癌细胞转移的新手段。本研究采用RT-PCR技术检测癌胚抗原(CEA)分泌性肿瘤病人外周血中CEA mRNA的表达,旨在探讨其在肿瘤微转移检测中的意义。

### 1 材料和方法

#### 1.1 检测对象

1998年10月至1999年6月我院收治的CEA分泌性肿瘤患者46例,其中男36例、女10例,年龄28~78岁。其中结/直肠癌20例、胃癌11例、肺癌9例、乳腺癌4例、卵巢癌1例、宫颈癌1例;临床分期: I期5例、II期18例、III期10例、IV期13例;有远处转移者13例、无远处转移者33例;CEA正常者23例、升高者23例。正常对照12例,均为我院健康献血人员。

#### 1.2 细胞的收集及总RNA的提取

每人抽取5 ml新鲜肝素抗凝血,用淋巴细胞分离液进行有核细胞的分离。采用Trizol试剂(Gibco公司)进行细胞总RNA的抽提。

#### 1.3 RNA鉴定

用紫外分光光度计分别在波长260及280 nm处测定 $D_{(λ)}$ 值,并行1%琼脂糖凝胶电泳观察。

#### 1.4 逆转录反应合成cDNA

使用Gold Key软件设计一对引物Primer A和B(由上海Sangon生物工程公司合成)。引物序列如下,Primer A: 5' -GCTCCTGCTCACAGCCTCACTTCT AACC-3' ; Primer B: 5' -CAAGATCTGACTTTATGA CG-3'。取1~2 μg细胞总RNA,用Primer B(1.0 μmol/L)进行逆转录。反应体系中还有MMLV逆转录酶和5×Buffer(美国Amersham公司)、10×dNTP(美国Promega公司)、RNasin(华美生物工程公司)。反应条件: 37℃水浴1 h, 95℃灭活逆转录酶5 min。

#### 1.5 PCR反应

取逆转录反应产物2 μl为模板行PCR反应。反应体系中引物为Primer A和Primer B(各0.2 μmol/L),另有10× PCR缓冲液,10×dNTP等。反应条件: 97℃变性5 min,冰浴冷却,加入Taq酶(Promega公司)0.5 U后进入PCR循环。95℃变性1 min、42℃退火1 min、72℃延伸1 min,循环30次,72℃延伸10 min后终止反应。在相同反应条件下,以质粒pCEA的扩增产物为阳性对照,以无RNA酶水替代模板的RT-PCR反应产物作为阴性对照。

#### 1.6 结果分析

PCR终产物行5%聚丙烯酰胺凝胶电泳。以出现338 bp电泳扩增带为CEA mRNA阳性标准。收集PCR阳性产物作DNA序列测定。

### 1.7 统计分析

采用 $\chi^2$ 检验分析组间差异,  $P < 0.05$ 为有显著差异。

## 2 结果

### 2.1 RNA鉴定

测定细胞总RNA, 测得其吸光度值(260 nm, 280 nm)  $> 1.5$ 。细胞总RNA 经1%琼脂糖凝胶电泳分析, 28S、18S条带清晰可见。

### 2.2 CEA mRNA的检测与鉴定

取46例CEA分泌性肿瘤患者及正常人血细胞PCR产物、质粒pCEA PCR产物进行5%聚丙烯酰胺凝胶电泳。CEA mRNA阳性病人与阳性对照均在338 bp处出现一条带(图1), 正常人及阴性对照则无此条带。用末端终止法在Model 377 DNA测序仪上对PCR阳性产物进行DNA序列分析, 序列结果与文献报道[2]CEA cDNA序列第51~365位100%相符, 证明了扩增产物的特异性。相符的DNA序列如下:

```
1 ATGTTCTGGAAPCCTGTGTCATTCTGGATTATGTT CTGGATCAGCAGGGA;  
51 GCATTTGGGTATATTATCTTCGACCACTGTATG CGGGC CCTGGGGTAG;  
101 CTTGTTGAGTTCCTATTACATATCCTATAATTTG ACGGTTGCCATCCACT;  
151 CTTTCACCTTTGTACCAGCTTAGCCAAAAAGA TGCTGGG GCAGATTGTG;  
201 GACAAGTAGAAGCACCTCCTCCCCTCTGCGAC ATTGAAC GGC GTGGATT;  
251 CAATAGTGAGCTTGGCAGTGGTGGGCGGGTTC CAGAAGGTTAGAAGTGAG;  
301 GCTGTGAGCA GGAGC
```

### 2.3 外周血CEA mRNA与不同临床参数的关系

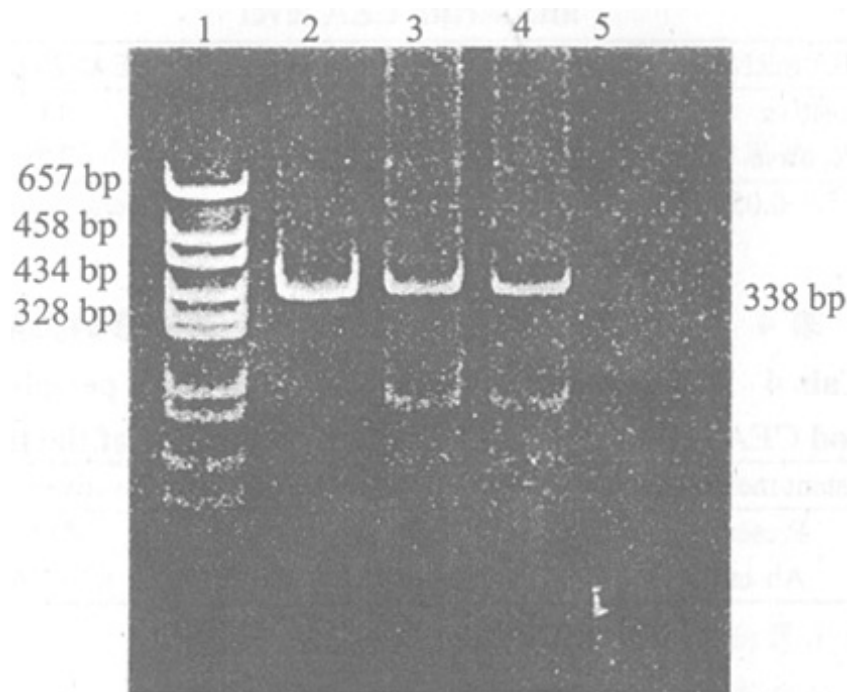


图1 外周血CEA PCR产物

Fig. 1 PCR products of peripheral blood CEA in tumor patients on 5% polyacrylamide gel electrophoresis

Lane 1: pGEM-7zf(+)-HaeIII; Lane 2: pCMV-CEA; Lane 3, 4: Peripheral blood of tumor patients; Lane 5: Negative control

46例CEA分泌性肿瘤患者有25例检出CEA mRNA, 阳性率为54.35%, 12例正常人均阴性(表1)。随着临床

分期的提高, CEA mRNA的检出率也随之升高, 即CEA mRNA阳性率与临床分期成正相关( $P < 0.05$ , 表2); 外周血CEA mRNA阳性与阴性之间血清CEA阳性率无显著性差异( $P > 0.05$ , 表3); 有远处转移组的CEA mRNA阳性率显著高于无远处转移组的( $P < 0.05$ , 表4); 对临床无远处转移而外周血CEA mRNA阳性的12例患者随访半年, 有3例出现远处脏器的转移。

表 1 外周血 CEA mRNA 的检测结果

Tab. 1 Detection of peripheral blood CEA mRNA

Group	<i>n</i>	Positive cases
Colorectal cancer	20	11
Gastric cancer	11	8
Pulmonary glandular	9	2
Breast cancer	4	3
Ovarian cancer	1	1
Cervical cancer	1	0
Control	12	0

表 2 外周血 CEA mRNA 与肿瘤临床分期的关系

Tab. 2 Relationship between peripheral blood CEA mRNA levels and clinical stages of tumors

Clinical stage	<i>n</i>	Positive cases	Positivity rate(%)
I	5	1	20.00
II	18	6	66.67*
III	10	5	50.00
IV	13	13	100.00**
Total	46	25	54.35

\* $P < 0.05$  vs stage I; \*\* $P < 0.05$  vs stage III

表 3 外周血 CEA mRNA 与血清 CEA 的关系

Tab.3 Relationship between peripheral blood CEA mRNA and serum CEA level

CEA mRNA	<i>n</i>	CEA < 20 $\mu\text{g/L}$	CEA > 20 $\mu\text{g/L}$
Positive	25	14	11
Negative	21	9*	12*

\* $P > 0.05$  vs patients positive of CEA mRNA in peripheral blood

表 4 外周血 CEA mRNA 阳性率与远处转移的关系

Tab. 4 Relationship between positivity rate of peripheral blood CEA mRNA levels and distant metastases of the tumors

Distant metastases	<i>n</i>	CEA mRNA positive	Positive rate(%)
Present	13	11	84.62
Absent	33	12	36.36*

\* $P > 0.05$  vs patients with tumor metastasis

### 3 讨论

在肿瘤转移的检测过程中,标志基因的选择非常重要。以肿瘤特异性表达基因作为靶向,可使肿瘤检测的特异性大大增加。但多数常见实体瘤缺乏特异性基因,故实际多选择组织特异性或肿瘤相关性靶基因进行检测,如PSA mRNA[3]、AFP mRNA[4]、CK mRNA[5]等。

CEA分泌性肿瘤是临床最常见的一类恶性肿瘤,它发生于几乎所有的结肠、直肠,40%以上发生于胃、胰腺、乳腺等部位[6],也见于肺腺、食道腺等。CEA mRNA几乎能在所有的上皮细胞包括癌细胞中被检测到,而在非上皮细胞中则不能。如果在血中检测出CEA mRNA,则意味着异位的存在,由此可推断存在有表达CEA的肿瘤细胞的可能[7]。CEA mRNA虽然不是肿瘤特异性抗原,但已成为CEA分泌性肿瘤的标志基因,以其作为肿瘤标志物进行微转移检测可以在骨髓、外周血、淋巴结及腹腔灌洗液[6][8][9][10]等进行,国内尚未见有关报道。

本组46例CEA分泌性肿瘤病人中,检出CEA mRNA 25例,而12例正常对照均阴性。统计本组不同临床分期病人的CEA mRNA阳性率,发现III期和IV期病人的阳性率明显高于I期和II期的,提示标志基因的阳性检出率与肿瘤的分期成正相关[11]。

进行统计学分析后发现,CEA mRNA的存在与血清CEA浓度无明显关系。CEA是肿瘤组织分泌的一种大分子糖蛋白,正常组织中含量非常低且相对稳定,血清CEA阳性可能与CEA从细胞表面释放及被肿瘤组织分泌有关[8]。它的浓度高低只能提供原发灶的信息,但不能预测微循环转移,通常被作为结直肠癌预后的一项指标。而CEA mRNA阳性可直接反映分泌CEA的肿瘤细胞的存在,且因检测方法的高度敏感性易于反映其与肿瘤微转移的密切关系。

在46例病人中,临床有、无远处转移者分别为13和33例,CEA mRNA检出率分别为84.62%和36.36%。其中12例无转移征兆但检出CEA mRNA阳性的病人经半年的随访,有3例出现脏器的转移,可见外周血标志基因阳性提示循环可能存在着转移的癌细胞。然而,在我们的研究中也存在假阴性现象。13例临床有远处转移的病人中,仅检出CEA mRNA 11例,可能的解释有:(1)肿瘤细胞也许是间歇地侵入血循环,取样的一次性可能造成疏漏。(2)由于肿瘤在基因表达上具有异质性,加上微循环的某种因素,血循环中的肿瘤细胞也许不表达CEA,因而有别于组织标本[12]。故选择单一的标志基因进行微转移的RT-PCR检测敏感性欠佳。因此,有学者[13]建议采用多个标志基因进行检测可提高RT-PCR的敏感度。

综上所述,本研究说明外周血标志基因检测是检测肿瘤微转移的一种灵敏方法。应用RT-PCR技术在CEA分泌性肿瘤外周血检出CEA mRNA与循环中存在转移的癌细胞有关。血中标志基因阳性提示可能存在肿瘤的早期转移。

#### 参考文献:

- [1] Redding WH, Monaghan P, Imprie SF, et al. Detection of micro-metastases in patients with primary breast cancer[J]. Lancet, 1984, 3:1271-3.
- [2] Beauchemin N, Benchimol S, Cournoyer D, et al. Isolation and characterization of full-length functional cDNA clones for human carcinoembryonic antigen[J]. Mol Cell Bio, 1987, 7(9):3221-30.
- [3] Moreno JG, Croce CM, Fischer R, et al. Detection of hematogenous micrometastasis in patients with prostate cancer[J]. Cancer Res, 1992, 52:6110-2.
- [4] Hillaire S, Barbn V, Boucher E, et al. Albumin messenger RNA as a marker of circulating hepatocytes in hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 1994, 106(1):239-42.
- [5] Buchill SA, Bradburg MF, Pittman K, et al. Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction[J]. Br J Cancer, 1995, 71(3):278-81.

[6] Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H, et al. Specific detection of carcino-embryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction[J]. J Clin Oncol, 1994, 12(4):725-29.

[7] Mori M, Mimori K, Ueo H, et al. Molecular detection of circulating solid carcinoma cells in the peripheral blood: the concept of early systemic disease[J]. Int J Cancer, 1996, 68:739-43.

[8] Jonas S, Windeatt S, Boateng AO, et al. Identification of carcino-embryonic antigen-producing cells circulating in the blood of patients with colorectal carcinoma by reverse transcriptase polymerase chain reaction[J]. Gut, 1996, 39:717-21.

[9] Mori M, Mimori K, Inoue H, et al. Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction[J]. Cancer Res, 1995, 55:3417-20.

[10] Nakanishi H, Kodera Y, Torii A, et al. Detection of carcinoembryonic antigen expressing free tumor cells in peritoneal washes from patients with gastric carcinoma by polymerase chain reaction[J]. Jpn Cancer Res, 1997, 88(7):687-92.

[11] Olsson CA, de Virus GM, Buttyan R, et al. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays for prostate cancer[J]. Urol Clin North Am, 1997, 24(2):367-78.

[12] Hoon D, Wang Y, Dale P, et al. Detection of occult melanoma cells in blood with a multiple-marker polymerase chain reaction assay[J]. J Clin Oncol, 1995, 13:2109-16.

[13] Bostick PJ, Chatterjee S, Chi DD, et al. Limitations of specific reverse-transcriptase chain reaction markers in the detection of metastases in the lymph nodes and blood of breast cancer patients [J]. J Clin Oncol, 1998, 16(8):2632-40.

#### 参考文献:

[1] Redding WH, Monaghan P, Imprie SF, et al. Detection of micro-metastases in patients with primary breast cancer[J]. Lancet, 1984, 3:1271-3.

[2] Beauchemin N, Benchimol S, Cournoyer D, et al. Isolation and characterization of full-length functional cDNA clones for human carcinoembryonic antigen[J]. Mol Cell Bio, 1987, 7(9):3221-30.

[3] Moreno JG, Croce CM, Fischer R, et al. Detection of hematogenous micrometastasis in patients with prostate cancer[J]. Cancer Res, 1992, 52:6110-2.

[4] Hillaire S, Barbn V, Boucher E, et al. Albumin messenger RNA as a marker of circulating hepatocytes in hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 1994, 106(1):239-42.

[5] Buchill SA, Bradburg MF, Pittman K, et al. Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction[J]. Br J Cancer, 1995, 71(3):278-81.

[6] Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H, et al. Specific detection of carcino-embryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction[J]. J Clin Oncol, 1994, 12(4):725-29.

[7] Mori M, Mimori K, Ueo H, et al. Molecular detection of circulating solid carcinoma cells in the peripheral blood: the concept of early systemic disease[J]. Int J Cancer, 1996, 68:739-43.

[8] Jonas S, Windeatt S, Boateng AO, et al. Identification of carcino-embryonic

antigen-producing cells circulating in the blood of patients with colorectal carcinoma by reverse transcriptase polymerase chain reaction[J]. Gut, 1996, 39:717-21.

[9] Mori M, Mimori K, Inoue H, et al. Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction[J]. Cancer Res, 1995, 55:3417-20.

[10] Nakanishi H, Kodera Y, Torii A, et al. Detection of carcinoembryonic antigen expressing free tumor cells in peritoneal washes from patients with gastric carcinoma by polymerase chain reaction[J]. Jpn Cancer Res, 1997, 88(7):687-92.

[11] Olsson CA, de Virus GM, Buttyan R, et al. Reverse transcriptase -polymerase chain reaction assays for prostate cancer[J]. Urol Clin North Am, 1997, 24(2):367-78.

[12] Hoon D, Wang Y, Dale P, et al. Detection of occult melanoma cells in blood with a multiple-marker polymerase chain reaction assay[J]. J Clin Oncol, 1995, 13:2109-16.

[13] Bostick PJ, Chatterjee S, Chi DD, et al. Limitations of specific reverse-transcriptase chain reaction markers in the detection of metastases in the lymph nodes and blood of breast cancer patients [J]. J Clin Oncol, 1998, 16(8):2632-40.

---

[回结果列表](#)