

贲门癌患者外周血 Cytokeratin 20 mRNA 表达的检测 及其临床意义

吴楚成¹/杨捷生^{1,*}/陈于平¹/杨卫平¹/
许丽艳²/翁鸿锐¹/刘迪填¹/李桦¹

(1. 汕头大学医学院附属肿瘤医院胸外科;

2. 汕头大学医学院分子生物学实验室,

广东, 汕头 515041)

Detection of Cytokeratin 20 mRNA in Peripheral Blood of Patients with Cardial Carcinoma and Its Clinical Implication

WU Chu-cheng¹, YANG Jie-sheng^{1,*}, CHEN Yu-ping¹,
YANG Wei-ping¹, XU Li-yan², WENG Hong-rui¹,

LIU Di-tian¹, LI Hua¹

(1. Department of Thoracic Surgery, Tumor Hospital of Shantou
University Medical College, Shantou 515041, Guangdong, China;

2. Department of Pathology, Shantou University Medical College,
Shantou 515041, Guangdong, China)

【摘要】背景与目的: 探讨贲门癌患者外周血微转移的检测及其临床意义。材料与方法: 以巢式逆转录聚合酶链反应 (Reverse transcriptase - polymerase chain reaction, RT-PCR) 技术检测 58 例贲门癌患者术前外周血角蛋白 20 (Cytokeratin 20, CK20) mRNA 的表达情况。结果: 58 例贲门癌患者外周血 CK20 mRNA 阳性率为 36.2%。有淋巴结转移者阳性率 51.5%, 无淋巴结转移者 16%, 二者差异有统计学意义。结论: 应用巢式 RT-PCR 技术检测贲门癌患者外周血 CK20 mRNA 的表达情况, 有助于外周血微转移的早期诊断, 其阳性表达与淋巴结转移有关。

【关键词】贲门癌; 微转移; 角蛋白 20; 外周血

中图分类号: R735.2

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2005)05-0280-04

【ABSTRACT】 BACKGROUND & AIM: To study the detection of micrometastasis in peripheral blood of patients with cardiac carcinoma and its clinical implication. MATERIAL AND METHODS: Cytokeratin 20 (CK20) mRNA in peripheral blood of 58 patients with cardiac carcinoma was detected by using nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique. RESULTS: The positive rate of CK20 mRNA in peripheral blood of the 58 patients was 36.2%. The positive rate of CK20 mRNA in patients with lymph node metastasis was 51.5%, while 16% in patients without lymph node metastasis, the two rates were significantly different. CONCLUSION: Using nested RT-PCR technique to detect CK20 mRNA in peripheral blood of patients with cardiac carcinoma is helpful for early diagnosis of micrometastasis, the positive expression is related to metastasis of lymph node.

【KEY WORDS】 cardiac carcinoma; micrometastasis; cytokeratin 20; peripheral blood

贲门癌是潮汕地区常见的恶性肿瘤之一, 外科手术至今仍是主要的治疗手段, 但患者术后多死于转移或复发。微转移则是肿瘤转移、复发的主要根源。及时发现肿瘤患者血循环中的微转移不仅对肿瘤转移和复发的判断有重要意义, 而且对指导临床个体化的综合治疗有着重大价值。近年来 RT-PCR 技术的应用, 极大提高肿瘤微转移检测的敏感性和特异性。细胞角蛋白 20 (Cytokeratin 20, CK20) 是低分子角蛋白, 存在于外胚层起源的细胞内中间丝, 构成细胞的骨架, 在全身各部位

的上皮性恶性肿瘤中均有表达^[1]。我们采用巢式 RT-PCR 技术对 58 例贲门癌患者术前外周血 CK20 mRNA 的表达情况进行了检测研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 试验组 经病理确诊为贲门癌并排除其它良、恶性肿瘤和癌前病变的患者 58 例, 男 49 例, 女 9 例, 年龄 41~75 岁, 平均 61.7 岁。所有患者

收稿日期: 2004-09-15; 修订日期: 2004-12-09

作者简介: 吴楚成 (1977-), 男, 广东省潮州市人, 医师, 硕士研究生, 研究方向: 胸部肿瘤。

* Correspondence to: YANG Jie-sheng Tel: 86-754-8555844

术前经B超、CT等检查均未发现远处转移,心、肝、肾等各器官功能无明显异常,术前未行放、化疗等抗肿瘤治疗。按国际抗癌联盟(International Union of Counter Cancer, UICC)国际肿瘤、淋巴结、转移(Tumor, node, metastasis, TNM)标准分期:Ⅰ期5例,Ⅱ期15例,Ⅲ期24例,Ⅳ期14例。对照组:①健康人外周血11例,②慢性浅表性胃炎患者外周血10例,③贲门癌组织11例,④正常贲门粘膜组织10例。

1.1.2 主要试剂 淋巴细胞分离液购自天津血液病研究所,AMV R-T试剂盒、PCR MM购自美国Promega公司,Trizol试剂购自上海生工,引物(各引物的序列见表1)由上海基康生物技术有限公司合成,其余试剂均为国产分析纯。

表1 引物序列
Table 1 Primer ranks

| Primer name | Primer ranks |
|-------------|--|
| GAPDH-1 | 5' gaa ggt gaa ggt cgg agt c3' |
| GAPDH-2 | 5' gaa gat ggt gat ggg att tc 3' |
| CK20-1 | 5' cag aca cac ggt gaa cta tgg3' |
| CK20-2 | 5' gat cag ctt cca ctg tta gac g3' |
| CK20-3 | 5' ctg ttt gtt ggc aat gag aaa atg g3' |
| CK20-4 | 5' gta ttc ctc tct cag tct cat act 3' |

1.2 实验方法

1.2.1 收集标本 抽取贲门癌患者、慢性浅表性胃炎患者、健康人的外周血5 ml, EDTA抗凝,用淋巴细胞分离液分离单个核细胞, -80℃保存备用。抽取外周血时,先从外周静脉抽取2 ml血液,弃去,针头固定,接一新的注射器,再抽取实验所需的5 ml血液,以避免皮肤上皮细胞污染血样品。贲门癌组织和正常贲门粘膜组织离体后即刻取材, -80℃保存备用。

1.2.2 总RNA的提取 用Trizol试剂一步法提取细胞总RNA。

1.2.3 合成cDNA 采用AMV R-T试剂盒,按其说明书逆转录合成cDNA,反应体系: MgCl₂ (25 mmol/L) 4 μl, 10× Buffer 2 μl, dNTPs(10 mol/L) 2 μl, RNase inhibitor (40 U/μl) 0.5 μl, AMV R-T (25 U/μl) 1 μl, Oligo dT 1 μl, Random Primers 1 μl, 总RNA 10 μg, 加DEPC水至20 μl。反应条件: 30℃ 10 min, 42℃ 60 min, 99℃ 5 min, 4℃ 5 min。

1.2.4 PCR扩增 以磷酸甘油醛脱氢酶(Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参对照。总反应体系包括cDNA 5 μl, PCR MM 12.5 μl, 引物各1 μl, 加Nuclease-Free Water至25 μl。扩增GAPDH的条件: 94℃预变性5 min, 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 循环30次, 72℃再延伸10 min。扩增片段长度为226 bp。扩增CK20 mRNA的条件: 第一

次PCR以CK20-1、CK20-2为引物,条件是: 94℃预变性5 min, 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1 min, 循环40次, 72℃再延伸1 min。扩增片段长度为370 bp。第二次PCR以CK20-3、CK20-4为引物,取第一次PCR产物2.5 μl为模板,循环30次,其它反应条件相同。扩增片段长度为303 bp。

1.2.5 电泳、照相 取10 μl PCR产物,在1.5%的琼脂糖凝胶上电泳,溴化乙啶染色。凝胶图像处理系统(Kodak EDAS290)扫描凝胶。

1.2.6 产物测序 将扩增出来的CK20 mRNA片段寄往上海基康生物技术有限公司测序,结果100%符合。

1.2.7 统计学分析 采用SPSS10.0软件进行χ²检验、精确检验法及二项分布分析, α = 0.05为检验水准。

2 结果

各样品均能扩增出片段大小为226 bp的内参对照GAPDH(图1)。说明本实验方法可靠。

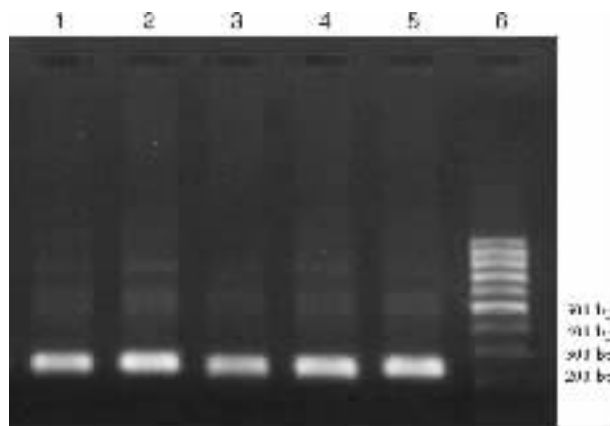


图1 GAPDH的电泳图。1:正常贲门粘膜组织;2:贲门癌组织;3:贲门癌患者外周血;4:慢性浅表性胃炎患者外周血;5:健康人外周血;6:Marker最亮条带为500 bp

Figure 1 Products of RT-PCR for GAPDH mRNA separated electrophoresis. 1: constitution of cardiac normal mucosa; 2: constitution of cardiac carcinoma; 3: peripheral blood of patient with cardiac carcinoma; 4: peripheral blood of patient with chronicity superficial gastritis; 5: peripheral blood of healthy person; 6: 100 bp DNA ladder

11例健康人和10例慢性浅表性胃炎患者的外周血CK20 mRNA均无表达(与试验组比较,采用精确检验法, P值分别为0.012, 0.018), 11例贲门癌组织和10例正常贲门粘膜组织均阳性(与试验组比较,采用精确检验法, P值均为0), 显示出CK20 mRNA阳性表达对贲门癌外周血微转移的诊断有较好的特异性。

试验组58例贲门癌患者外周血中有21例阳性,占36.2% (95%可信区间为23.8%~48.6%)。有淋巴结转

移者阳性率为 51.5%，无淋巴结转移者阳性率为 16%，二者间差异有统计学意义 ($P = 0.005$)。CK20 mRNA 的表达与肿瘤分化程度、浸润深度、UICC 分期、性别和年龄无关。详见表 2、图 2。

表 2 58例贲门癌患者外周血CK20 mRNA的表达情况

Table 2 The expression of CK20 mRNA in peripheral blood of 58 patients with cardiac carcinomas

| | Total number | Positive number | Positive rate ($\times 10^{-2}$) | P |
|------------------------------|--------------|-----------------|------------------------------------|--------|
| Differentiation | | | | |
| Well differentiation | 6 | 1 | 16.7 | 0.2962 |
| Moderate differentiation | 22 | 8 | 36.4 | 0.6009 |
| Low differentiation | 29 | 11 | 37.9 | 0.6557 |
| Undifferentiation | 1 | 1 | 100 | 1.0000 |
| Infiltration | | | | |
| T1 | 1 | 0 | 0 | 0.6379 |
| T2 | 5 | 1 | 20 | 0.4055 |
| T3 | 31 | 12 | 38.7 | 0.6877 |
| T4 | 21 | 8 | 38.1 | 0.6640 |
| Lymph node metastasis | | | | |
| Negative | 25 | 4 | 16 | 0.005 |
| Positive | 33 | 17 | 51.5 | |
| UICC stage | | | | |
| I | 5 | 1 | 20 | 0.4055 |
| II | 15 | 3 | 20 | 0.1492 |
| III | 24 | 11 | 45.8 | 0.8826 |
| IV | 14 | 6 | 42.9 | 0.7893 |
| Sex | | | | 0.581 |
| Male | 49 | 18 | 36.7 | |
| Female | 9 | 3 | 33.3 | |
| Age | | | | 0.663 |
| < 60 | 20 | 8 | 40 | |
| > = 60 | 38 | 13 | 34.2 | |

Note: Differentiation, Infiltration and UICC stage were analysed by using binomial distribution. Lymph node metastasis and Age were analysed by using chi-square test (Lymph node metastasis: $\chi^2 = 7.768$; Age: $\chi^2 = 0.190$). Sex was analysed by using exact method.

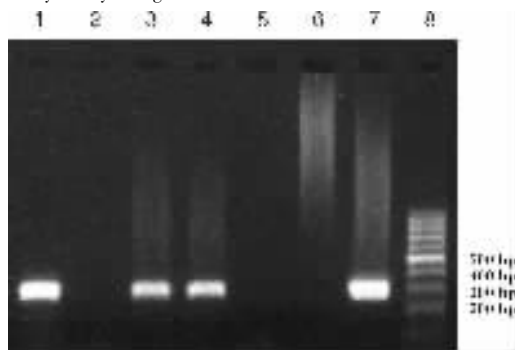


图 2 CK20 mRNA 的电泳图:1: 正常贲门粘膜组织; 2: 健康人外周血; 3: 贲门癌患者外周血(Ⅳ期); 4: 贲门癌患者外周血(Ⅲ期); 5: 贲门癌患者外周血(Ⅱ期); 6: 慢性浅表性胃炎患者外周血; 7: 贲门癌组织; 8: Marker 最亮条带为 500 bp

Figure 2 Products of RT-PCR for CK20 mRNA separated by electrophoresis. 1: constitution of cardiac normal mucosa; 2: peripheral blood of healthy person; 3: peripheral blood of patient with cardiac carcinoma(Ⅳ); 4: peripheral blood of patient with cardiac carcinoma(Ⅲ); 5: peripheral blood of patient with cardiac carcinoma(Ⅱ); 6: peripheral blood of patient with chronicity superficial gastritis; 7: constitution of cardiac carcinoma; 8: 100 bp DNA ladder

3 讨论

贲门癌患者临床症状出现较晚, 早期诊断率低, 多数失去根治的机会, 术后多死于转移与复发。血液中癌细胞的出现是贲门癌远处转移的先决条件。如何在贲门癌形成远处转移灶之前对血液中的微转移作出诊断, 这就要求有可靠的检测指标和敏感的检测方法。

mRNA 作为检测远处转移的标志物较蛋白为好, 因为 RNA 在细胞外环境中极不稳定, 极易被 RNA 酶分解破坏; 而在血液循环中, 恶性肿瘤细胞破碎释放的 RNA 碎片不影响检测结果, 因此, 在外周血中检测到 mRNA 就提示有活力的完整肿瘤细胞的存在。进入血液的癌细胞通常保留有起源组织的特异性标志物, 如癌胚抗原 (Carcinoembryonic antigen, CEA)、细胞角蛋白 (Cytokeratins, CKs)、前列腺特异性抗原 (Prostate special antigen, PSA) 及组织多肽抗原 (Tissue polypeptide antigen, TPS) 等, 而骨髓、血液等间皮组织无表达。若血中检测出编码这些蛋白的特异性标志物, 则判断肿瘤可能已发生转移 [2]。

CKs 至少有 20 种组分, 其中 CK19、CK20 被认为有肿瘤转移诊断价值。但有不少研究指出, CK19 可在正常的对照中不同程度地被检出, 因而限制了其应用的价值, 而 CK20 表达范围较特异, 仅局限在胃肠上皮细胞, 在正常骨髓、血液和淋巴结中均无表达, 几乎全部胃肠道肿瘤以及在侵袭、转移、扩散到其它组织器官时, 均保持稳定表达 [3,4]。如能在贲门癌患者的外周血中检测到 CK20 mRNA, 则说明血中存在癌细胞, 应诊断为贲门癌外周血微转移。

RT-PCR 用于检测肿瘤细胞微转移, 具有病理学方法和免疫组化法不可比拟的敏感性, 能从 1 ml 全血中检测出 1 个上皮来源的肿瘤细胞 [5]。Fnaki 等 [6] 曾采用三轮扩增的 RT-PCR 技术, 但未显示较巢式 RT-PCR 技术更理想的结果。

本实验采用巢式 RT-PCR 技术检测血液及组织中 CK20 mRNA 的表达情况。结果显示 11 例健康人和 10 例慢性浅表性胃炎患者的外周血 CK20 mRNA 均无表达, 11 例贲门癌组织和 10 例正常贲门粘膜组织均阳性, 提示 CK20 mRNA 阳性表达对贲门癌外周血微转移的诊断有较好的特异性。58 例贲门癌患者外周血检测出 CK20 mRNA 阳性表达 21 例, 阳性率为 36.2%, 即使 I 期患者阳性率也高达 20%。这就说明贲门癌在早期就可能累及全身, 外周血 CK20 mRNA 的检测可帮助判断病情和预后, 并为术后辅助治疗提供理论依据。临床上可根据贲门癌患者外周血 CK20 mRNA 的检测结果进行针对性化疗, 这对 I 期患者可能更有意义。有淋巴结

转移者与无淋巴结转移者阳性率之间的差异有统计学意义,提示有淋巴结转移且外周血 CK20 mRNA 阳性者的癌细胞可能具有更强的侵袭力,术后很有必要进行综合辅助治疗。CK20 mRNA 的表达虽与肿瘤分化程度、浸润深度、UICC 分期、性别和年龄无关,但从结果可以看出,随着分化程度的降低,阳性率有增加的趋势。有文献推测肿瘤细胞可能是间隙性以簇状方式释放入血液循环^[7]。我们将继续扩大研究例数,并在每一例患者术前不同时间多次抽血,以提供更可靠的研究结果。

参考文献:

[1] Ikeguchi M, Ohro S, Maeda Y, *et al.* Detection of cancer cells in the peripheral blood of gastric cancer patients[J]. *Int J Mol Med*, 2003, 11(2): 217-221.

[2] Bockmann B, Grill HJ, Giesing M. Molecular characterization of minimal residual cancer cells in patients with solid tumors [J]. *Biomol Eng*, 2001, 17(3):95.

[3] Moll R, Franke WW, Schiller DL, *et al.* The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumor and cultured cells[J]. *Cell*, 1982, 31(1):11-24.

[4] 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(6):739-743.

[5] Funaki NO, Tanaka J, Itami A, *et al.* Detection of colorectal carcinoma cells in circulating peripheral blood by reverse transcription-polymerase chain reaction targeting cytokeratin-20 mRNA[J]. *Life Sci*, 1997, 60(9): 643-652.

[6] Funaki NO, Tanaka J, Ohshio G, *et al.* Cytokeratin 20 mRNA in peripheral venous blood of colorectal carcinoma patients[J]. *Br J Cancer*, 1998, 77(8):1 327-1 332.

[7] Gala JL, Loric S. Sensitivity of specificity of reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays: the real challenge of molecular staging of prostatic carcinomas[J]. *Int J Cancer*, 1998, 77(1): 161.

欢迎订阅《中国药理学通报》

《中国药理学通报》是由中国药理学会主办,安徽医科大学编辑出版的全国性学术性杂志。本刊主要刊登药理学研究论文,辟有论著、讲座与综述、小专论、实验方法学、新药介绍与老药新用、国内外医药学动态、研究简报、快报等专栏。

本刊荣获 2003、2005 年两届国家期刊奖百种重点期刊奖,第 1、第 2 届全国国家科委、中共中央宣传部、国家新闻出版署优秀科技期刊二等奖,第 1、第 2、第 3 届中国科学技术协会优秀期刊二等奖,第 1 届华东地区优秀期刊一等奖,第 2 届华东地区最佳期刊奖。本刊 1999、2002、2004 年分别获国家自然科学基金和中国科协资助基础性和高科技期刊专项资金资助。

本刊已被中国科学院文献情报中心中国科学引文数据库确定为医学类核心期刊;被北京大学图书馆主编《中文核心期刊要目总览》第 1、第 2 版及 2000 版,2004 版均选定为药理学类核心期刊;被国际核心期刊研究会确定为核心期刊;被国家科委科技信息研究所确定为科技论文统计源期刊即中国科技核心期刊。

本刊已被国内几乎所有相关检索期刊及国际著名检索期刊 Chemical Abstract(美国)、《PK》(俄罗斯)、Biochemical Abstract(美国)、Index Medicus(美国)、EMBASE/Excerpta Medica(荷兰)、Kunst and Wissen(德国)、Centre for Agriculture and Biosciences international (CAB international, 英国)等收录利用。连续 9 年进入《CA 千种表》。

医师用药要懂药理,药师药研人员更要懂药理。中国药理学通报,医师药师都需要

本刊为月刊,大 16 开 128 页,彩色铜版纸印刷,每期定价 15.00 元(零售:20 元/期),全年 180.00 元。邮发代号:26-52,请及时向当地邮局订阅,漏订读者请直接汇款至我刊编辑部(零售价:每期 20 元),免收邮寄费。地址:安徽省合肥市安徽医科大学校内《中国药理学通报》编辑部,邮编:230032,联系人:吴慧、程西望、武明静。电话:0551-5161221、5161222,电子信箱:epb@ahmu.edu.cn

