

CK20 诊断大肠癌微转移的价值

苏琪, 韩霞, 殷红专

苏琪, 韩霞, 殷红专, 中国医科大学第二临床学院普外四科
辽宁省沈阳市 110004
辽宁省教育厅自主研究项目 202010792
项目负责人: 苏琪, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街 36 号, 中国医科大学第二临床学院普外四科. suqi100@hotmail.com
电话: 024-83955072
收稿日期: 2004-06-16 接受日期: 2004-07-11

摘要

微转移是一项独立的预后指标, 其价值优于Dukes分期和肿瘤分级. 目前用于检测的方法多使用RT-PCR方法, 但此技术在临床应用中遇到很多棘手的难题. 细胞角蛋白20 (CK20)是新发现的一种多肽, 局限在胃肠上皮细胞, 具有严格的组织特异性, 且几乎所有大肠癌都明显表达, 优于其他标志物. 1995年研制成功的荧光定量PCR技术, 融合了PCR高灵敏性、DNA杂交的高特异性和光谱技术的高精确定量等优点, 同时他采用完全封闭式的操作系统, 克服了传统的PCR技术易受污染, 造成假阳性的缺点; 定量范围宽, 无需样品梯度稀释; 操作快速, 无需PCR后处理; 技术操作简便、重复性能好、高灵敏性, 高特异性, 高精确性; 安全, 对操作人员和环境都无危害. 通过荧光定量PCR技术检测CK20mRNA指示大肠癌微转移状况, 提供治疗依据, 目前在国外文献中罕有报道, 国内尚未有报道, 具有广泛的研究空间及研究价值.

苏琪, 韩霞, 殷红专. CK20 诊断大肠癌微转移的价值. 世界华人消化杂志 2004;12(9):2153-2155
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2153.asp>

0 引言

转移和侵袭是恶性肿瘤的重要特征, 也是肿瘤患者死亡的主要原因. 近年来随着免疫学及分子生物学的发展, 使大肠癌的微转移检测成为可能^[1]. 微转移一般指非血液系统的恶性肿瘤在发展过程中, 播散并存活于淋巴系统、血循环、骨髓、肝、肺等组织器官中间的微小肿瘤细胞灶(小于2 mm), 常无任何临床表现, 能够逃避免疫监视、侵犯血管和发展成肉眼可见的病变. 常规检查方法如CT、MRI、单抗放射显影技术、普通病理检查等都很难发现. 微转移是一项独立的预后指标, 其价值优于Dukes分期和肿瘤分级, 成为目前的研究热点之一.

1 检测方法

传统的区域淋巴结常规组织病理学检查是应用甲醛固定的标本经石蜡包埋、切片和HE染色等步骤, 一般统计在不足3个细胞直径的微小转移灶仅有1%的机会能被检出, 其缺点是敏感性差且工作量过大难以推广. 淋

巴结廓清技术通过增加受检淋巴结数目来达到检出转移灶的目的, 即“二甲苯-乙醇清除技术”. 将标本用甲醛固定后用乙醇反复冲洗, 之后用二甲苯将肠系膜的脂肪溶解、清除, 从而将几乎所有的淋巴结检出, 这一方法能显著增多淋巴结数目及检出转移的淋巴结.

1.1 免疫学技术 免疫学技术大致有免疫组化法、放射免疫导向法、流式细胞分析法. 免疫组织化学技术(IHC) 又称免疫细胞化学技术(ICC), 是指以显色剂标记的特异性抗体在组织细胞原位通过抗原抗体反应和组织化学的显色反应, 对相应抗原进行定位、定性、定量的检测方法^[2-3]. 免疫组化技术可从1-10万个淋巴细胞中找出1个肿瘤细胞; 在检查骨髓抽吸液, 可获得 10^6 正常细胞中检出1个肿瘤细胞的敏感度, 检出率明显提高. 目前免疫组化技术已被广泛用于微转移的检测, 但该技术存在两大问题尚待解决. 首先是抗体的标化和选择. 目前尚未找到一种大肠癌特异的又有足够敏感性的抗体, 这主要是尚未发现大肠癌特异性抗原. 目前学者们普遍推荐使用的抗体是针对CEA, CK, EMA等抗原的. 免疫组化技术的另一主要问题就是结果的判断缺乏客观的、统一的标准.

1.2 分子生物学 常用的方法有MASA(mutant allele-specific amplification, 突变等位基因特异性扩增), RT-PCR(逆转录酶PCR技术)及近几年出现的FQ-PCR(荧光标记PCR技术), 可准确检测1 g组织或1 mL液体中的1个癌细胞^[4]. 因此分子生物学技术被认为是目前检测微转移的最有效的方法. RT-PCR是目前检测结直肠癌淋巴结微转移最常用的PCR技术, 先将靶基因(如CEA, CK)的mRNA分离纯化, 然后通过逆转录酶合成cDNA, 再合成PCR引物, 通过基因扩增来检测细胞中是否表达靶基因从而检测微转移^[5-6]. 另一种基于PCR的MASA技术通过检测突变的基因片段而被用于结直肠癌淋巴结微转移的检测. RT-PCR和MASA技术除了敏感性高以外, 他还具常规病理检查和免疫组化技术无法比拟的优点: 作PCR扩增时将整个淋巴结标本的细胞DNA或RNA提取出来, 克服了常规病理检查和免疫组化只取数个切面的缺点. 而且, 只要靶基因的引物序列统一, PCR技术的程序相对更容易标化和控制, 结果的判断也比免疫组化要客观. 但同时他们又存在固有的不足: K-ras在大肠癌的突变率仅为40-50%, P53基因的突变率为75-80%并且突变位点不一致, 因此在用MASA方法检测标本前首先要检测原发肿瘤的突变类型, 二者在原发肿瘤都不表达的便不能进一步进行

检测^[7]; RT-PCR具有严格要求新鲜标本及其迅速处理,技术要求较高,易受污染等缺点. 荧光定量PCR技术是在PCR技术出现6a后,于1995年美国PE公司率先研制成功的荧光定量技术. FQ-PCR的Taq酶不仅有延伸的DNA引物的活性还有5' → 3' 外切核酸酶活性,可在链延伸过程中实现链替换,并将被替换的单链切断,这就是FQ-PCR的酶学基础. FQ-PCR反应体系中不仅有两条普通的引物,还有一条荧光标记探针,这条探针的5'端和3'端分别标记了荧光报告基团(R)和荧光淬灭基团(Q). 当这条探针保持完整时R基团的荧光信号被Q基团所淬灭;一旦探针被切断,淬灭作用消失,产生荧光发射,通过荧光光谱分析仪检测荧光强度,即准确可测知扩增产物的含量,具有操作简单、快速、结果判断客观、重复性能好、定量范围宽(可包括0-10¹⁴个拷贝/L)、无需样品梯度稀释、高灵敏性,高特异性,高精确性的特点,采用完全封闭式的操作系统,克服了传统的PCR技术易受污染,造成假阳性等诸多缺点. 因此,荧光定量PCR技术是基因诊断、疗效评价、技术创新和临床研究的高新技术手段,具有广泛的开发前景^[8].

2 标志物

Hayashi *et al* 1995年采用PCR对120例大肠癌患者常规诊断无转移的淋巴结进行了K-ras、p53基因突变检测,发现71例(59%)有淋巴结微转移存在,但K-ras在大肠癌的突变率仅为40-50%,P53基因的突变率为75-80%并且突变位点不一致^[9],该方法敏感性较低. Mori *et al* 1995年应用CEA mRNA的RT-PCR方法检测大肠癌区域淋巴结,发现88个常规诊断阴性的淋巴结中有47个表达阳性. 1996年Jonas *et al*报道各类大肠癌细胞中只有65%CEA表达阳性,健康人群却有23%CEA mRNA表达阳性,肝转移患者中84%表达阳性. CD44分子为一类黏附分子,CD44v6是CD44的变异型之一,可以用来检测大肠癌的微转移^[10]. 但孙念绪 *et al*^[11]通过免疫组化方法在健康对照组中检测到CD44v6的表达. Rosengerg *et al*应用免疫组化技术证实溃疡性结肠炎组织的隐窝区上皮细胞CD44v6 mRNA表达增高. CK19是常见的角蛋白之一,对于大肠癌,其RT-PCR的检测明显提高了区域淋巴结的微转移诊断率,但CK19 mRNA低、中表达见于头颈部肿瘤、肺癌、乳腺癌、泌尿系肿瘤等多种肿瘤,特异性差,且CK19基因3'末端个别碱基存在突变而不能排除CK19假基因的表达,使得检测结果成假阳性,故降低了其诊断血循环、骨髓中微转移的价值. 细胞角蛋白20(CK20)是新发现的一种多肽,局限在胃肠上皮细胞,几乎所有大肠癌都明显表达^[12-22]. 通过检测细胞角蛋白mRNA表达来诊断大肠癌微转移状况,指导临床诊断和治疗成为目前的研究热点之一. Gunn *et al*对CK19和CK20进行了比较,虽然CK19在淋巴结检测中阳性率高于CK20(分别为77%

和24%),但CK19在正常对照淋巴结和骨髓中的阳性率达到了85%和42%,而CK20则全部为阴性,提示CK20特异性高. 细胞角蛋白(CK)是分布于外胚层起源细胞中的中间纤维丝,为细胞骨架的组分之一. 已知CK至少包括20个成员,分为酸性CK和碱性CK两大家族^[23]. CK在细胞转化过程中一般保持其亚微结构和免疫学特性,检测蛋白类型可判断肿瘤组织来源,如癌组织是以富含CK为特征,肌肉肉瘤富含结蛋白,非肌肉肉瘤富含波形蛋白. CK20属酸性CK,含424个氨基酸, M_r48 553,等电点为5.66. 其编码DNA总长18 kb,含8个外显子,7个内含子,其mRNA长1.75 kb. CK20的合成首先出现于第8wk胚胎的黏膜上皮中,之后广泛分布于杯状细胞和绒毛细胞中.

不同于其他CK,CK20具有更为严格的上皮组织特异性,非上皮来源组织或细胞如正常血液、骨髓和淋巴结不表达CK20. 正常组织中,CK20见于肠黏膜细胞、胃黏膜及幽门腺体细胞、十二指肠黏膜、泌尿系伞状细胞、表皮Merkel细胞,而其他正常组织如乳腺、平滑肌、血细胞、淋巴细胞、造血细胞等均为阴性^[24],正常人无表达^[25-26]. CK20的表达在细胞发生化生、恶变、肿瘤转移、体外培养等改变时持续表达阳性. 下列肿瘤CK20表达阳性:结肠直肠癌、胃腺癌及未分化癌、泌尿道移行细胞癌、胆道腺癌、胰管细胞腺癌、皮肤Merkel细胞癌等. CK20表达阴性的有:乳腺黏液腺癌和小叶腺癌、子宫内膜癌、卵巢非黏液腺癌、肾细胞癌、肺腺癌及鳞状细胞癌、鳞状细胞癌(子宫颈、咽、食管、皮肤)、肉瘤、恶性淋巴瘤等. CK20的分布特点使其成为良好的肿瘤标志物,也用来被鉴别肿瘤组织来源.

3 CK20 诊断大肠癌微转移

CK20不同于其他角蛋白,他非常局限于胃肠上皮细胞,几乎所有大肠癌都明显表达且在侵袭、转移、扩散到其他组织器官时始终保持稳定. 目前,我们推断大肠癌患者预后和选择术后治疗方案主要是根据患者的分期,但这些分期指标仍然存在不足,已经不能作为惟一指导治疗和判断预后的标准. 骆成玉 *et al*应用靶向细胞角蛋白20基因mRNA的RT-PCR方法检测了大肠癌淋巴结微转移情况. 结果12例大肠癌患者的110个淋巴结经常规病理学检测,4例有淋巴结转移,阳性淋巴结13个,CK20 RT-PCR检测6例有淋巴结转移,阳性淋巴结28个. 两种方法的阳性检出率差异有显著性意义($\chi^2=6.72$, $P<0.01$). 汤睿 *et al*用RT-PCR检查法,结果可见,大肠癌患者205个淋巴结中有35个检测到CK20 mRNA的表达,而病理组织学检查仅发现18个淋巴结存在肿瘤转移. 该组17例中有4例按该检查方法由Dukes' A, B期改为Dukes' C期,或者说这些患者是Dukes' A, B期中的高危病例,应当进行更为积极的随访. 微转移的检测较常规病理组织学检查具有更高的敏感性. 对患者分期、判断预后、确定

手术和术后的治疗方案具有重要的指导作用. 具有良好的应用前景. 对发现微转移的患者, 应采取更积极的治疗方案. PCR法除检测淋巴结外, 也能对患者的血液、骨髓和腹膜腔的微转移灶进行检测. 他将临床处理提供更多的指导和参考, 具有良好的应用前景.

通过检测CK20的表达可检测大肠癌淋巴结、血循环、骨髓的微转移. CK20被认为是检测肠癌微转移的良好标志物. Futamura *et al*和Bostick *et al*分别对大肠癌患者、乳腺癌患者、正常人、良性疾病患者淋巴结进行CEA, CK19, CK20, 肿瘤相关抗原733.2(GA733.2), 粘蛋白1(MUC-1)的mRNA RT-PCR联合检测, 发现组织学检查为阴性的淋巴结中有40%左右已经有微转移. 并且在正常人外周血和淋巴结中只有CK20无表达, 其他标志物都有不同程度的假阳性.

微转移的转归取决于癌细胞的生物学特性、机体的免疫状态及宿主器官微环境, 动物实验表明血循环中至少有10 000个肿瘤细胞才可至显形转移, 多数发生凋亡, 少数进入休眠甚至增生, 即微转移不是必然发生肿瘤的复发和转移, 但他提示发生复发和转移的可能性大. 普通PCR技术本身存在一定的缺点, 因之产生假阴性结果.

4 参考文献

- Chen XM, Chen GY, Wang ZR, Zhu FS, Wang XL, Zhang X. Detection of micrometastasis of gastric carcinoma in peripheral blood circulation. *World J Gastroenterol* 2004;10:804-808
- Lassmann S, Bauer M, Rosenberg R, Nekarda H, Soong R, Ruger R, Hofler H, Werner M. Quantification of CK20 gene and protein expression in colorectal cancer by RT-PCR and immunohistochemistry reveals inter- and intratumour heterogeneity. *J Pathol* 2002;198:198-206
- Chu PG, Weiss LM. Immunohistochemical characterization of signet-ring cell carcinomas of the stomach, breast, and colon. *Am J Clin Pathol* 2004;121:884-892
- Oberg AN, Lindmark GE, Israelsson AC, Hammarstrom SG, Hammarstrom ML. Detection of occult tumour cells in lymph nodes of colorectal cancer patients using real-time quantitative RT-PCR for CEA and CK20 mRNAs. *Int J Cancer* 2004;111:101-110
- Bustin SA, Siddiqi S, Ahmed S, Hands R, Dorudi S. Quantification of cytokeratin 20, carcinoembryonic antigen and guanylyl cyclase C mRNA levels in lymph nodes may not predict treatment failure in colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2004;108:412-417
- Vlems FA, Diepstra JH, Cornelissen IM, Ruers TJ, Ligtenberg MJ, Punt CJ, van Krieken JH, Wobbes T, van Muijen G. Limitations of cytokeratin 20 RT-PCR to detect disseminated tumour cells in blood and bone marrow of patients with colorectal cancer: expression in controls and downregulation in tumour tissue. *Mol Pathol* 2002;55:156-163
- Davenport A, Hale RJ, Hunt CR, Bigley G, McMahon RF. Expression of Ki-67 and cytokeratin 20 in hyperplastic polyps of the colorectum. *J Clin Pathol* 2003;56:200-204
- 陈文学, 邹学森, 陈岳青, 黄秀珍, 钟礼瀑. 荧光定量PCR技术在肿瘤研究中的应用. *基因诊断* 2004;1:1-4
- 张宏, 丛进春, 陈春生, 乔雷, 苏琪, 冯勇, 刘恩卿. 结直肠癌患者血清P53抗体检测的意义. *世界华人消化杂志* 2004;12:1726-1727
- 范如英, 李世荣. CD44分子与大肠癌的浸润和转移. *北京医学* 2002;24:122-123
- 孙念绪, 王德虎, 张超. 结直肠癌腹腔转移与CK20mRNA, CD44v6和P53表达及意义. *第三军医大学学报* 2003;25:430-433
- Tanaka Y, Sano T, Qian ZR, Hirokawa M. Expression of adhesion molecules and cytokeratin 20 in merkel cell carcinomas. *Endocr Pathol* 2004;15:117-130
- Spruessel A, Steimann G, Jung M, Lee SA, Carr T, Fentz AK, Spangenberg J, Zornig C, Juhl HH, David KA. Tissue ischemia time affects gene and protein expression patterns within minutes following surgical tumor excision. *Biotechniques* 2004;36:1030-1037
- McGregor DK, Wu TT, Rashid A, Luthra R, Hamilton SR. Reduced expression of cytokeratin 20 in colorectal carcinomas with high levels of microsatellite instability. *Am J Surg Pathol* 2004;28:712-718
- Wang GY, Wang SJ, Li Y, Wang LL, Wang XL, Song ZC, Fan LQ. Multi-antibody combined determination of lymph node micrometastasis in patients with gastric cancer. *Ai Zheng* 2004;23:559-563
- Tot T. Identifying colorectal metastases in liver biopsies: the novel CDX2 antibody is less specific than the cytokeratin 20+/7- phenotype. *Med Sci Monit* 2004;10:BR139-143
- Bismar TA, Humphrey PA, Grignon DJ, Wang HL. Expression of beta-catenin in prostatic adenocarcinomas: a comparison with colorectal adenocarcinomas. *Am J Clin Pathol* 2004;121:557-563
- Conzelmann M, Dieterle CP, Linnemann U, Berger MR. Cytokeratin 20 and guanylyl cyclase C mRNA is largely present in lymph node and liver specimens of colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2003;107:617-628
- Lassmann S, Bauer M, Rosenberg R, Nekarda H, Soong R, Ruger R, Hofler H, Werner M. Identification of occult tumor cells in node negative lymph nodes of colorectal cancer patients by cytokeratin 20 gene and protein expression. *Int J Colorectal Dis* 2004;19:87-94
- Lee MJ, Lee HS, Kim WH, Choi Y, Yang M. Expression of mucins and cytokeratins in primary carcinomas of the digestive system. *Mod Pathol* 2003;16:403-410
- Park SY, Kim HS, Hong EK, Kim WH. Expression of cytokeratins 7 and 20 in primary carcinomas of the stomach and colorectum and their value in the differential diagnosis of metastatic carcinomas to the ovary. *Hum Pathol* 2002;33:1078-1085
- Guller U, Zajac P, Schnider A, Bosch B, Vorburger S, Zuber M, Spagnoli GC, Oertli D, Maurer R, Metzger U, Harder F, Heberer M, Marti WR. Disseminated single tumor cells as detected by real-time quantitative polymerase chain reaction represent a prognostic factor in patients undergoing surgery for colorectal cancer. *Ann Surg* 2002;236:768-775
- 章希炜, 范萍, 杨宏宇, 杨力, 陈国立. CK20 mRNA RT-PCR检测诊断胃癌微小转移. *世界华人消化杂志* 2002;10:1463-1464
- 周广军, 沈洪薰, 王志伟, 陈瑞新, 陈玉泉. CK20mRNA在大肠癌患者外周血中阳性表达的临床意义. *南通医学院学报* 2002;22:24-26
- 林国乐, 邱辉忠, 徐彤, 钱家鸣. 大肠癌患者术前和术中外周血微转移的检测及其临床意义. *中华普通外科杂志* 2002;17:605-607
- 孙念绪, 王德虎, 唐波. 直肠癌血行转移与肿瘤转移因子的关系. *中国普外基础与临床杂志* 2002;9:348-351